

## BstNI 同功酶限制-修饰系统基因的表达检测和定位分析\*

刘金毅 薛越强 孟 雁 赵晓娟 蔡有余

(中国协和医科大学、中国医学科学院实验动物研究所 北京 100021)

**摘 要** 鉴定了 *E. coli* HB101 和 JM110 的部分遗传标记, 作为受体菌分别用于 BstNI 同功酶限制-修饰系统中限制性内切酶 (Restriction endonuclease, 简称 R) 基因和甲基化酶 (Methylase, 简称 M) 基因表达的检测。用外切酶 III 单向删切含 R-M 基因的 DNA 片段, 获得 23 个缺失突变亚克隆。通过检测各亚克隆表达的 R 酶和 M 酶活性, 将 R 和 M 基因分别定位在距克隆位点 PstI 的 0.2→1.4kb 和 1.5→3.3kb 范围内。分析表明: 该系统属于 II 类限制-修饰系统, 两个基因受控于不同的启动子; 该系统与 *E. coli* 染色体编码的胞嘧啶 DNA 甲基转移酶 (Dcm) 的识别序列相同, 后者的甲基化作用也能阻止 R 酶的切割。R<sup>+</sup>M<sup>-</sup> 的重组质粒对 Dcm<sup>+</sup> 和 Dcm<sup>-</sup> 的宿主都是致死性的, 这说明在进化过程中, 与 R 基因紧密连锁的 M 基因对系统的存在至关重要。

**关键词** 限制-修饰系统, 缺失突变, 基因表达, 基因定位

**分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)03-0209-14

限制-修饰系统在原核生物中广泛存在, 具有保护细菌免受外来 DNA 侵染的防御功能。每个系统由成对的 R 酶和 M 酶组成, 两者在 DNA 上有相同的识别序列, M 酶在宿主 DNA 识别序列上的甲基化作用能阻止相应 R 酶的切割, 而入侵的外源 DNA 在甲基化完成之前即受到 R 酶的降解<sup>[1]</sup>。限制-修饰系统的两个基因常紧密连锁<sup>[2]</sup>, 因而易于同时克隆。对它们的克隆和分析, 不仅通过构建高产菌株为基因工程提供了大量的工具酶<sup>[3]</sup>, 而且也为研究蛋白质-核酸的相互作用以及趋同进化和趋异进化积累了丰富的材料和信息, 在这方面, 分析一系列有相同识别序列的异源同功酶基因具有特别重要的意义<sup>[4]</sup>。我们曾从大肠杆菌中分离到一个含 BstNI 同功酶限制-修饰系统 (识别序列 CCWGG) 基因的 DNA 片段, 本文选择适于该系统基因表达检测的宿主菌, 通过顺序缺失突变, 将紧密连锁的 R 基因和 M 基因在克隆片段上进行精确定位, 分析 R 酶和 M 酶的关系和功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

**1.1.1 R 基因表达检测受体菌:** *E. coli* HB101, 遗传标记为 hsdR<sup>-</sup> + dcm<sup>+</sup>, 为本研究室保存菌种。

**1.1.2 M 基因表达检测受体菌:** *E. coli* JM110, 遗传标记为 hsdR<sup>-</sup> + dcm<sup>-</sup>, 为中国科学院上海生物化学研究所惠赠。

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39380009)

收稿日期: 1997-12-22, 修回日期: 1998-04-28

1.1.3 pBluescript SK + : 2.96kb, 带 Amp 抗性基因, 为 Stratagene 公司产品。

1.1.4 pSKRM3.7: 6.6kb, 带有 3.7kbBstNI 同功酶 R-M 基因片段, 连接在 pBluescript SK + 的 PstI-Clal 位点, 由本实验室史顺娣等与香港中文大学生物化学系合作完成克隆和鉴定。

## 1.2 培养基

LB 液体及平板培养基见文献[5], 选择性培养基 LBA 中 Amp 的终浓度为 0.1mg/mL。

## 1.3 生化试剂

$\lambda$ DNA 及  $\lambda$ DNA/HindIII Marker 为华美生物工程公司产品, 限制性内切酶为 Boehringer Mannheim 公司和中国医学科学院基础医学研究所友谊公司产品, 外切酶 III (ExoIII) 顺序缺失系统试剂盒(Erase a-Bases System)为 Promega 公司产品。

## 1.4 缓冲液

1.4.1 酶提缓冲液: 10 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH7.4, 1 mmol/L EDTA, 10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇。

1.4.2 酶解缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 50mmol/L NaCl。

## 1.5 R 基因表达活性的检测

用含待测基因的重组质粒转化 HB101 菌, 挑取新鲜单菌落接种于 3mL LBA 中过夜培养, 1.5mL 培养物经离心收集菌体,  $-20^\circ\text{C}$  冷冻 30 min 后, 加 150  $\mu\text{L}$  预冷的酶提缓冲液, 用 MSE-150 超声波发生器处理 30 s, 10000 g  $4^\circ\text{C}$  离心 2 min, 上清即作为酶的粗提液, 取 2 $\mu\text{L}$  上清加 500ng  $\lambda$ DNA 及酶解缓冲液至总体积 10  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  保温 5 min 后, 立即加反应终止液(20 mmol/L EDTA, 0.05% 溴酚蓝, 50% 甘油), 以 pBluescript SK 转化 HB101 的粗提液作对照, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察  $\lambda$ DNA 的降解情况。

## 1.6 M 基因表达活性的检测

含待测基因的重组质粒转化 JM110 菌, 少量培养后用碱裂解法提取质粒 DNA, 取 200 ng DNA 加入 2  $\mu\text{L}$  已鉴定有 R 酶的粗提液及酶解缓冲液至总体积 10  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  保温 5~8 min, 加入反应终止液, 以在 JM110 中扩增过的 pBluescript SK DNA 作对照, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察重组质粒 DNA 被甲基化保护的情况(已知质粒 pBluescript SK 上有五个 CCWGG 位点)。

## 1.7 顺序缺失亚克隆的构建和筛选

pSKRM3.7 质粒 DNA 经氯化铯-溴乙锭梯度平衡超速离心后, 确保闭环 DNA > 90%, 外切酶 III 顺序缺失亚克隆的获得按照 Promega 公司提供的试剂盒说明书进行, 所得克隆经单酶切后按其大小排序, 大肠杆菌 DNA 体外操作技术及大肠杆菌感受态细胞的转化参见文献[5]。

## 2 结果

### 2.1 R 基因表达的检测及受体菌 HB101 的遗传标记

pBluescript SK 和 pSKRM3.7 分别转化 HB101, 酶粗提液与  $\lambda$ DNA 共孵育, 结果见图 1。pBluescript SK 转化菌的裂解上清未使  $\lambda$ DNA 限制性降解(图中的降解物为裂解上清

中的 RNA), 以此作阴性对照, pSKRM3.7 转化菌的酶粗提液降解  $\lambda$ DNA 后出现清晰的限制性酶解带, 说明重组质粒上的 R 基因已在 HB101 中有效表达。可见, *E. coli* HB101 无宿主特异的 DNA 限制酶(hsdR), 可用于外源 R 基因表达的检测。

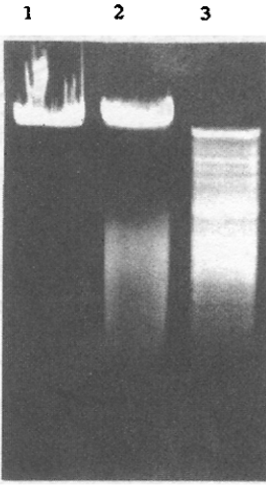


图 1 质粒转化 HB101 后 R 酶活性的检测

Fig. 1 Detection of R enzyme activity of HB101 transformed with plasmids

1.  $\lambda$ DNA; 2.  $\lambda$ DNA + Crude extracts of HB101/pBluescript SK; 3.  $\lambda$ DNA + Crude extracts of HB101/pSKRM3.7.

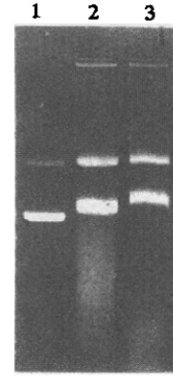


图 2 HB101 遗传标记 dcm 的鉴定

Fig. 2 Identification of genetic marker Dcm of HB101

1. pBluescript SK DNA (close circle and open circle);
2. Plasmid DNA extracted from HB101/pBluescript SK + Crude extracts of HB101/pBluescript SK;
3. Plasmid DNA extracted from HB101/pBluescript SK + Crude extracts of HB101/pSKRM3.7.

DNA 胞嘧啶甲基化酶基因(dcm)存在于大多数 *E. coli* 染色体中, 它编码的 Dcm 在 DNA 上的识别序列与 BstNI 同功酶相同, 催化形成  $C^mCWGG$ 。为鉴定 HB101 的该遗传标记及对 R 酶的抗性作用, 用 pBluescript SK 转化该菌后, 重提质粒 DNA, 与 R 酶粗提液共孵育, 发现 pBluescript SK DNA 对 R 酶产生了抗性, 结果见图 2(反应中加入酶粗提液后离子强度加大, 闭环 DNA 电泳速度变慢), 说明 HB101 为  $Dcm^+$ , 其甲基化作用能有效地阻止 BstNI 同功酶 R 的切割, 故 HB101 不能作受体菌用于该限制-修饰系统 M 基因表达的检测。

## 2.2 *E. coli* JM110 的遗传标记及转化体 M 基因表达的检测

为选择适于检测 M 基因表达的宿主菌, 鉴定了 JM110 的部分遗传标记。pBluescript SK 与 pSKRM3.7 分别转化 JM110 后扩增, 提取质粒 DNA, 与转化 HB101 的 R 酶粗提液共孵育, 结果见图 3。pBluescript SK DNA 受到含 R 酶粗提液的限制性降解, 电泳结果显示出降解后最大的 2.0 kb 的片段, 与根据质粒 DNA 序列上 BstNI 酶切位点预期的结果相符, 说明: *E. coli* JM110 为  $Dcm^-$ , 可用于对外源 M 基因表达的检测。pSKRM3.7 DNA 对含 R 酶的粗提液产生抗性, 证明该重组质粒上带有 M 基因并在 JM110 中有效表达。

## 2.3 目的 DNA 片段限制性内切酶物理图谱的构建

pSKRM3.7 上 3.7kb 的克隆片段经多种限制性内切酶单酶切或双酶切后, 根据 DNA 片段大小, 确定各酶切点的位置(图 4), 检索已知来自大肠杆菌的识别 CCWGG 的限制-修饰系统, 未发现对该基因研究的报道。

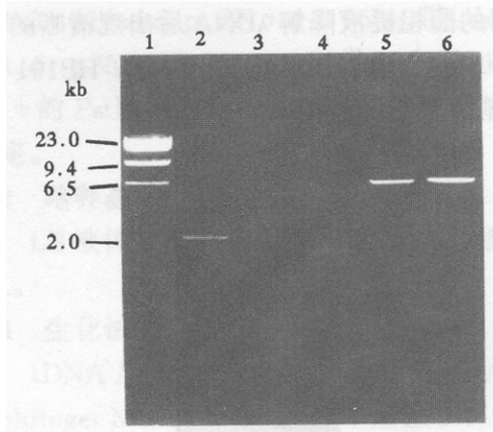


图3 质粒转化JM110后M酶活性的检测  
Fig. 3 Detection of methylase activity of JM110 transformed with plasmids

1.  $\lambda$ DNA/HindIII marker; 2. pBluescript SK DNA; 3. Plasmid DNA extracted from JM110/pBluescript SK + Crude extracts of HB101/pBluescript SK; 4. Plasmid DNA extracted from JM110/pBluescript SK + Crude extracts of HB101/pSKRM3.7; 5. pSKRM3.7 DNA; 6. Plasmid DNA extracted from JM110/pSKRM3.7 + Crude extracts of HB101/pSKRM3.7 (All plasmid DNAs were linearized before reactions).

### 2.4 顺序缺失亚克隆的构建

构建策略见图4。根据酶切图谱,从目的DNA的PstI端选取载体上有单一切点的

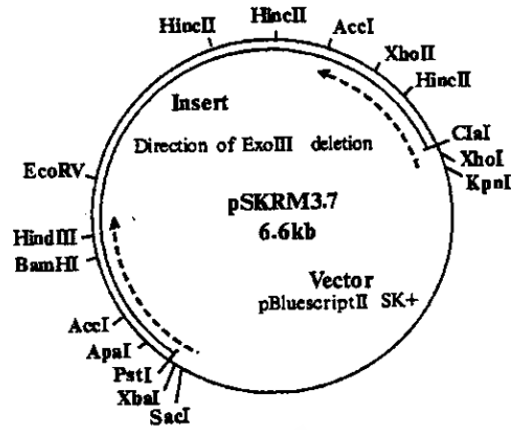


图4 pSKRM3.7中插入片段的物理图谱及顺序缺失体的构建策略

Fig.4 Restriction map of the insert in pSKRM3.7 and constructing strategies of progressive deletions

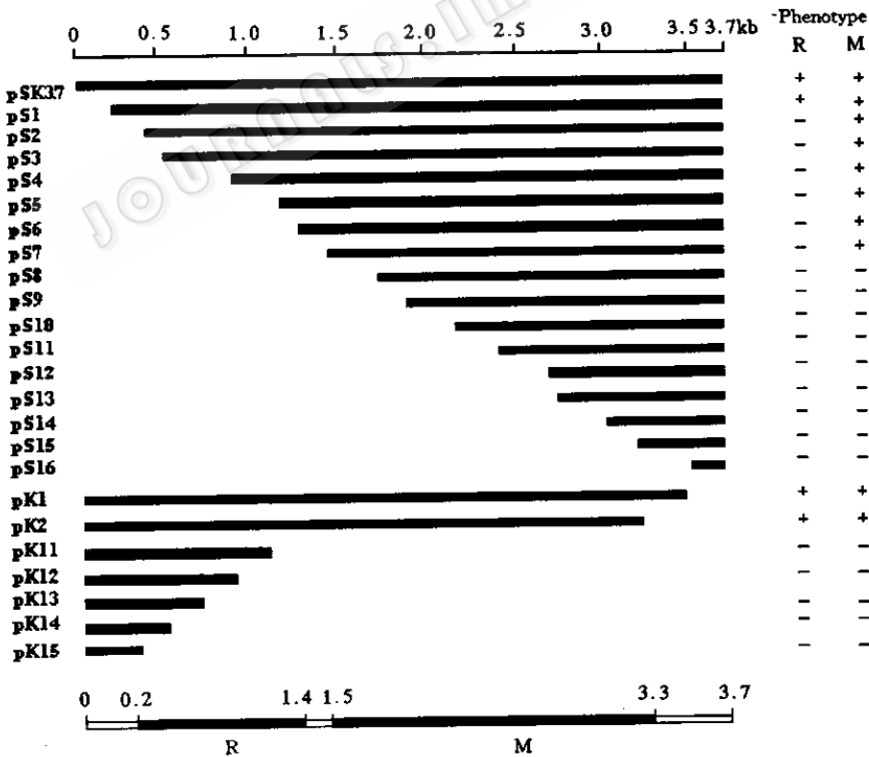


图5 pSKRM3.7各缺失突变体的大小和表型及R-M基因定位示意图  
Fig.5 The sizes and phenotypes of pSKRM3.7 deletion derivatives and localization of R-M genes

的限制酶 SacI(产生 3'-凸端, 对外切酶 III 有抗性)和 XbaI(产生 3'-凹端, 对外切酶 III 敏感)酶解 pSKRM3.7, 使其符合做下一步外切酶 III 顺序缺失的要求。按照 Promega 公司试剂说明书中描述的方法用外切酶 III 处理酶解后的 pSKRM3.7, 做顺序缺失, 转化大肠杆菌 HB101 后, 每号至少挑选 20 个克隆, 提取质粒 DNA, 经酶切线性化, 按其大小排序后, 得到 16 个预期大小的亚克隆, 依次编号为 pS1、pS2、pS3……pS16, 每个克隆之间相差平均 220bp。按同样的方法, 从目的基因的 ClaI 端选取限制酶 KpnI(产生 3'-凸端, 对外切酶 III 有抗性)和 XhoI(产生 3'-凹端, 对外切酶 III 敏感)酶解 pSKRM3.7 后, 做顺序缺失, 经排序后得到 7 个部分连续的亚克隆, 编号为 pK1、pK2、pK11……pK15(3 号到 10 号未得到预期克隆), 连续克隆之间大小相差约 230bp。

### 2.5 R-M 基因位置的判定

参照 2.1 和 2.2 的结果, 以 pBluescript SK 作阴性对照, pSKRM3.7 作阳性对照, 检测各亚克隆 R 酶和 M 酶的表达活性, 结果显示: 从 PstI 端删切的亚克隆中, pS1 仍表达 R 酶和 M 酶活性, pS2→pS7 的 R 酶活性丧失, 仅有 M 酶活性, pS8→pS16 的 R 酶和 M 酶的活性都丧失; 从 ClaI 端删切的亚克隆中, pK1 和 pK2 表达 R 酶和 M 酶活性, pK11→pK15 的 R 酶和 M 酶活性都丧失, 如图 5 所示, 据此, 将表达 R 基因的活性部位确定在距 PstI 端的 0.2→1.4kb 之间, 表达 M 基因的活性部位确定在距 PstI 端 1.5→3.3kb 之间。

## 3 讨论

限制-修饰系统基因的筛选既可利用限制表型也可利用修饰表型<sup>[6,7]</sup>。pSKRM3.7 是根据限制表型得到的, 为证实该重组体上含有完整的限制-修饰基因, 分别选择了 HB101 和 JM110 作为宿主菌。在检测粗提液的 R 酶活力时, 必须控制好反应时间和粗提液的量, 否则杂酶降解量增加, 观察不到专一酶的降解结果<sup>[8]</sup>。我们建立的 M 酶的检测方法(如前所述)比传统同位素标记的化学法更为简洁、安全, 适于任一限制-修饰系统, 尤其对大批克隆的检测。但应用时需注意重组质粒上必须含有待检 M 酶的识别序列, 宿主菌不能含有另一种抗 R 酶切割的甲基化酶, 以避免假阳性。

理论上, 宿主菌自身 Dcm 酶的甲基化修饰应能防止  $R^+M^-$  的质粒转化宿主后的自杀作用。然而, 我们用 HB101 筛选从 M 基因侧删切的克隆时, 并未得到  $R^+M^-$  的活菌克隆, 可见  $R^+M^-$  的质粒对  $dcm^+$  的大肠杆菌也是致死性的。该结果至少有两点重要提示: 1. 在进化过程中, 与 R 基因紧密连锁的 M 基因对系统的存在至关重要; 2. M 酶必须先于 R 酶表达并且先起作用才能使宿主免于死亡。在其他限制-修饰系统中也发现这种作用顺序的存在<sup>[9,10]</sup>。

R 和 M 基因的表达活性区仅间隔 100bp, 但通过缺失突变, 任一基因活性丧失后, 另一基因仍可表达酶活性, 说明两个基因分别在不同的启动子下表达, 酶活作用独立分开, 加之识别序列的对称性, 故认为该系统属于 II 类限制-修饰系统。

BstNI 的异源同功酶现已发现 60 多个, 但仅有两个系统的基因被克隆和分析<sup>[11,12]</sup>。本文对从大肠杆菌中克隆到的同功酶基因进行了初步研究, 目前序列测定和分析工作正在进行。

## 参 考 文 献

- [1] Price C, Bickle T A. *Microbial Sci*, 1986, **3**:296~299.
- [2] Geoffrey G W. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**:2539--2543.
- [3] 邹国林. 微生物学杂志, 1987, **7**(1):63~66.
- [4] 严佩芳, 叶盛钰, 王培之等. 生物化学与生物物理学报, 1982, **14**(2):151~157.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: CSH Press, 1989.
- [6] Wilson G G. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**:2539~2566.
- [7] Bougueleret L, Schwarzstein M, Tsugita A *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1984, **12**:3659~3676.
- [8] 杨香娇, 陈常庆, 王德宝. 生物化学与生物物理学报, 1991, **23**(5):378~383.
- [9] Nyengaard N, Vogensen F K, Josephsen J. *Gene*, 1995, **157**:13~18.
- [10] Fomenkov A, Xiao J P, Dila D *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(12):2399~2403.
- [11] Roberts R J, Macelis D. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24**(1):223~235.
- [12] Bhagwat A S, Johnson B, Weule K *et al.* *J Biol Chem*, 1990, **265**(2):767~773.

## EXPRESSION DETECTION AND LOCATION ANALYSIS OF BstNI ISOSCHIZOMER RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM GENE\*

Liu Jinyi Xue Yueqiang Meng Yan Zhao Xiaojuan Cai Youyu

(*Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS & PUMC, Beijing 100021*)

**Abstract** Some genetic markers of *E. coli* HB101 and JM110 were identified, two bacterial strains were used as recipients respectively to detect the expression of a restriction endonuclease(R) gene and a methylase(M) gene of BstNI isoschizomer restriction-modification system. DNA fragment containing the R-M genes was deleted unidirectively with *exoIII* and 23 deletion subclones were obtained. According to the Enzyme activity of each subclone, R and M gene were located respectively at the regions of 0.2→1.4kb and 1.5→3.3kb from cloning site *PstI*. Analysis showed that the R-M system belongs to type II, two genes are controlled by the different promoters; the recognition sequence of this system is the same as that of DNA-cytosine methyltransferase(Dcm), the latter's methylation function can resist the R enzyme. It was interesting that the recombinant plasmid with an R<sup>+</sup>M<sup>-</sup> genotype appeared to be lethal to *dcm*<sup>+</sup> hosts yet. This indicated that the M gene closely linking to R gene is of critical importance for the existence of the R-M system in process of evolution.

**Key words** R-M system, Deletion mutation, Gene expression, Gene location

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No.39380009)