

## 谷氨酸棒杆菌 10147 基因组中启动子活性片段的克隆与分析

刘桂明<sup>1,2</sup>, 赵智<sup>1</sup>, 张英姿<sup>1</sup>, 王宇<sup>1</sup>, 丁久元<sup>1\*</sup>

† 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

‡ 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 【目的】获得谷氨酸棒杆菌 10147 基因组中具有启动子活性片段的结构序列, 为构建表达载体做准备。

【方法】利用启动子探测载体 pAKC6, 采用鸟枪法克隆经过限制性内切酶 *Sau3A I* 完全酶切的谷氨酸棒杆菌 10147 染色体 DNA 片段, 并测定 pAKC6 上报告基因编码的氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 的比活力, 以筛选有启动子功能的片段。【结果】共克隆到 30 个具有启动子功能的片段。其中有 3 个插入片段启动的氯霉素乙酰转移酶比活力大于 24 U/mg, 插入片段 F57 启动的 CAT 比活力为 32.50 U/mg; 而插入有启动子 *P<sub>trc</sub>* 的阳性对照的 CAT 比活力为 26.33 U/mg。【结论】获得 3 个 DNA 插入片段具有与已知启动子 *P<sub>trc</sub>* 相当的启动活性, 这些片段可以用于构建谷氨酸棒杆菌表达载体。

**关键词:** 谷氨酸棒杆菌, 启动子探测载体, 启动子, 氯霉素乙酰转移酶

**中图分类号:** Q786    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0972-06

谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是一种革兰氏阳性, 非致病性土壤杆菌。该菌及其突变株已广泛用于工业化生产各种氨基酸<sup>[1]</sup>。代谢工程技术在氨基酸生产菌种的改良中发挥了重要作用, 通常采用的策略即为利用调节或组成型启动子引入外源基因, 改变基因的表达, 对代谢节点进行修饰, 以改变代谢流的分布。为研究棒杆菌的基因表达和调节, 已构建了几种带有不同报告基因的启动子探测载体<sup>[2-3]</sup>, 用于分离启动子和测定启动子的效率。目前已经从棒杆菌中分离了 50 多个启动子, 对它们的序列结构进行了研究<sup>[4]</sup>。

本工作利用带有氯霉素乙酰转移酶报告基因的启动子探测载体, 采用鸟枪法从谷氨酸棒杆菌 10147 基因组中克隆到具有启动子功能的片段 30 个, 测定了启动子活性片段的启动强度并分析了其 DNA 序列的相关信息。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 本实验所用菌株和质粒见表 1。菌株谷氨酸棒杆菌 10147 为本实验室保存, 由谷氨酸棒杆菌 1014-6T<sup>[5]</sup> 消去质粒 pXZ10145 后获得。表达载体 pXC99E 由比拉菲尔德大学 Andreas Tauch 惠赠, 该表达载体携带的启动子为 *P<sub>trc</sub>*<sup>[6]</sup>, *P<sub>trc</sub>* 在谷氨酸棒杆菌中可以高效启动基因的表达<sup>[7]</sup>。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** LA *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司, 其它生化药品为进口或国产分析纯试剂; 采用 MJ 公司 PTC-150 型基因扩增仪; Bio-RAD 公司 MicroPulser<sup>TM</sup> 电击仪, Beckman 公司 coulter 800 分光光度计。

### 1.2 培养基和培养条件

**1.2.1 培养基:** LB 培养基用于大肠杆菌 (*E. coli*) 和谷氨酸棒杆菌的培养, LB 培养基加 4% 甘氨酸<sup>[8]</sup>

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807415; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn

作者简介: 刘桂明 (1983–), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事氨基酸代谢研究。E-mail: guimingl@126.com

收稿日期: 2009-01-05; 修回日期: 2009-04-03

表 1 实验所用菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>C. glutamicum</i> 10147	<i>C. glutamicum</i> 1014-6T cured plasmid	This lab
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	$\varphi$ 80 <i>LacZ</i> $\Delta$ M15, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i>	This lab
Plasmids		
pAKC6	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> promoter probe vector, Km <sup>R</sup>	This lab
pXC99E	<i>E. coli</i> expression vector, <i>P<sub>trc</sub></i> , Cm <sup>R</sup>	[8]

用于谷氨酸棒杆菌的培养,以制备感受态细胞。

**1.2.2 培养条件:**大肠杆菌在 37℃ 培养,谷氨酸棒杆菌在 30℃ 培养。抗生素的使用浓度分别为:卡那霉素 50  $\mu$ g/mL; 氯霉素 30  $\mu$ g/mL, 60  $\mu$ g/mL, 400  $\mu$ g/mL。

### 1.3 DNA 操作

大肠杆菌质粒提取、酶切、电泳和转化均参照文献 [10] 进行。谷氨酸棒杆菌染色体 DNA 的提取参照文献 [1] 进行。谷氨酸棒杆菌质粒提取使用改进碱法 [2]; 谷氨酸棒杆菌质粒 DNA 转化采用电击转化法 [3]。

### 1.4 引物设计和 PCR 反应

**1.4.1 插入片段的扩增:**根据启动子探测载体 pAKC6 的 DNA 序列,分别设计引物 P1: 5'-AAAAGGTGTCAACCTCGATAATTTG-3', P2: 5'-GAACGGTCTGGTTATAGGTACATTG-3', 用来扩增插入在 *Bgl* II 位点间的具有启动子功能的片段。PCR 反应条件: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 3 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。

**1.4.2 启动子 *P<sub>trc</sub>* 的扩增:**根据质粒 pXC99E 的 DNA 序列 (GenBank 登录号: AY219685), 分别设计引物 P3: 5'-GTGAGGTACCCGCAATTGATCTGTTTGAC-3', P4: 5'-GCTAAGCTTCCATGGTCTGTTTCCTGTGTG-3', 用来扩增启动子 *P<sub>trc</sub>*。下划线部分分别为限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 的酶切位点。

### 1.5 具有启动子活性片段的克隆

**1.5.1 采用鸟枪法克隆具有启动子活性的片段:**用 *Sau*3A I 酶完全酶切谷氨酸棒杆菌 10147 的染色体 DNA, 将 *Sau*3A I 片段与经 *Bgl* II 酶切的 pAKC6 连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 转化液涂布于含 60  $\mu$ g/mL 氯霉素的 LB 平板; 37℃ 培养 24 h 后, 用牙签挑取转化子点种于含 400  $\mu$ g/mL 氯霉素的平板, 37℃ 培养 24 h; 从能生长的菌落中提取质粒, 进行 PCR 反应分析。挑取插入片段小于 600 bp 的转化子, 然后从这些转化子中提取质粒电击转化谷氨

酸棒杆菌 10147 的感受态细胞, 转化液涂布于含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 平板以筛选转化子。将转化子点种于含 30  $\mu$ g/mL 氯霉素的 LB 平板以筛选带有插入片段的转化子, 30℃ 培养 24 h, 从能生长的菌落中提取质粒, 再次进行 PCR 反应分析。同时以 pAKC6 为对照进行相同操作。

**1.5.2 启动子 *P<sub>trc</sub>* 与 pAKC6 的连接:**用引物 P3 和 P4 从质粒 pXC99E 中扩增出含有启动子 *P<sub>trc</sub>* 的 DNA 片段, 大小长 302 bp, 该片段经 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切并回收后与同样双酶切并回收的 pAKC6 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取转化子, 提质粒电击转化谷氨酸棒杆菌 10147 的感受态细胞。

### 1.6 启动子活性片段强度的测定

**1.6.1 粗酶液的制备:**挑取在含 30  $\mu$ g/mL 氯霉素的平板生长的谷氨酸棒杆菌菌落接种于液体 LB 培养基, 于 30℃ 摇床培养 16 h, 离心收集细胞, 用 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8) 洗涤两遍, 悬浮。超声波破碎细胞 (条件: 溶液体积 300  $\mu$ L, 功率 280 w, 工作 10 s, 间隔 30 s, 30 次循环), 离心, 取上清用于测定; 以带有 pAKC6 以及 pAKC6-*P<sub>trc</sub>* 的谷氨酸棒杆菌为对照, 进行同样的实验。

**1.6.2 总蛋白含量的测定:**采用考马斯亮蓝法 [4]。以牛血清白蛋白为标准蛋白。

**1.6.3 氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 活性的测定:**参考文献 [5] 进行, 150  $\mu$ L 反应体系含 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8), 0.1 mmol/L 乙酰辅酶 A (acetyl-CoA), 0.4 mg/mL 5, 5'-二硫 2-硝基苯甲酸) [DTNB], 适量的粗酶液; 将反应混合物于 37℃ 水浴中温育, 然后加入氯霉素使终浓度为 0.1 mmol/L, 混匀后立即测定光吸收值  $A_{412}$ ; 以未加氯霉素的反应液为对照, 每个样品测定三次, 取平均值。

CAT 活性单位的定义: 一个活力单位 (U) 为在上述反应条件下, 每分钟乙酰化 1  $\mu$ mol 氯霉素所需酶量。

### 1.7 SDS-PAGE 分析

参照文献 [10]进行,分离胶浓度为 15%。

### 1.8 DNA 序列的测定与分析

具有启动子活性的 DNA 片段的序列测定由上海生工生物工程技术有限公司完成;DNA 序列的比对使用 NCBI 数据库中的 BLASTN 程序。启动子的预测采用 BDGP Neural Network Promoter Prediction, V2.2 (www. fruitfly. org/seq-tools/promoter. html)。

## 2 结果

### 2.1 谷氨酸棒杆菌 10147 基因组中具有启动子活性片段的克隆

在含有 400 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上共挑取 75 个转化子,提取质粒 DNA 后进行 PCR 反应,得到插入片段小于 600 bp 的转化子 38 个。将这 38 个转化子的质粒 DNA,分别电击转化谷氨酸棒杆菌 10147,于卡那霉素平板和氯霉素平板上筛选和复筛转化子。复筛得到的转化子的质粒 DNA,再次进行

PCR 反应。经琼脂糖凝胶电泳分析得知,前后两次 PCR 结果完全一致,说明启动子活性片段克隆成功。

### 2.2 随机插入片段的 DNA 序列测定与分析

对上述 38 个随机插入片段进行了 DNA 序列测定与分析。结果表明,有些插入片段 DNA 序列完全相同,实际得到的不同序列随机插入片段共 30 个,片段大小为 38 bp (F54)到 586 bp (F53)。

使用 NCBI 数据库中的 BLASTN 程序,对上述 30 个插入片段的 DNA 序列进行比对分析。除 F25 和 F41 完全没有匹配序列外,F15 片段的中间部分 51~185 bp (135 bp)和 F66 片段的前段部分 1~175 bp (175 bp)也没有匹配序列。F15 和 F66 片段的其余部分与谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 和谷氨酸棒杆菌 R 株染色体完全匹配。其余 26 个插入片段可以在谷氨酸棒杆菌 R 株染色体上找到匹配序列,且相似性在 95% 以上。除 F46 外的 25 个插入片段可以在谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 染色体上找到匹配序列,其中只有 F20 的后半部分相似性为 90%,其余均在 95% 以上。

```

F10  GCTTTATCAAAAGTCGTTTGAAGCTCCCTTATGTGGCGCTGTGGCATATTGCTGGCAGACGGTGCAGCTT
F15  TACATCTGCTTTCTGGGAAGTTGCCGCTCTTCGCATGGCTGTGAAAATGGGGTGGAAAACCGCTTTAAAC
F18  CACGCCAGGTGGGCGCTGTTTGGCGCCGCTACCTTGGCGCTGTGATGCAAAATAGGAGTGGCCACGGT
F20  TAGGGATTTTGTCCATGTGCTGGAAGGTGCACCGGCTGCTCCAGAAATGGCAGCTCCCTTGGCGTTGCT
F21  CGTTCTCGTGGACGGACTTAAACCAAAGCATCAGCAGGTTGCTGAAAATTTGGAGAAAATCTGCAGCAGC
F22  TCTCCAGCTATCAAGGAAGTGAAGGGCTTAAAGGGCCGCAAGGCCTTAACTACTGCTGGCGATTCTGGGAT
F23  GTCACCACCGTGTTCCTTGGTGAAGCCGATTCGATCTGGTGAATTCATGGTTCATCTGGCCAAGAC
F25  AAAAAGAAATTAATAAATGCTTTCTTTTGGAAACTGATATTCAGCGATAGAGGGCTCAGATT
F26  TTTTTCAACAAAATAACACGTTGCTGACCACATTTTCGGACATAAATCGGGCATAAATAAAGGTGTAA
F35  CTGGTATTTCTGAAATGCATCGTGGCAATTGCTAGGTCTTGACCAATATCAGCGATGAGATCTAAGCT
F41  GGACGGTTTTGAAGCCTGGAAACCATCCCATGTGACCAACGGCTTTCATTTTCGGAAGGTTTTGGTCATA
F42  ACGGCTGCGACGATGCGCTGTTGATCCGATCTGGAGAATCTGTCAAAATCCAGTCCAGGTACAGCAGCC
F43  CCGTCACTGCAGGTGGCTGAGTCCCGGATACAGCGTTGTCGGCAACATATCCGATGACCAACCTGGTT
F45  GAATTCAGATCCTTCTTTGGTCAGGAAGATGGCCGATTACCAAGAGAATATGGCAGGAAAGTTGAAGCC
F46  GACTTTTTAGAATAATCTTCTTGACAGCGGGTTAGTTTTATGTGACACATGAACACCTAAATAAAAGTTAG
F50  GGGTGATCTGCTTTGATTTGTTGGTGGGGAAATTTCTAGTCGGAAAATGGAACCTAAACTGGGTGTA
F53  CGGTTTCATCAGGCTGGGTGACAGTTTCTTAAACGATGTGATTAGCTCGGAGTGGACGTTTATGTGAC
F54*  ACTTTGAATTCAGATCAAGTTTGTCTGTTGCTTCATCTCCACAAATGATCTAAGCTTAAGTAATTAACAG
F55  CCAGATATTGTTTTTGTGTTTTTCTGCTGCCCCACGATTGTTTAAAAGTCTGATTAAGCTGTGCTTTCA
F56  CCGTTGTCACCACTGATCCTTGTGGATTGTGGTGTTTTTTAGAAATCATTATTTTGTGATAATGCCAGTA
F57  TAGCAACTGGGCAAAACCATATTTGATGCAGATTTGAAAGCGGAAAAATTAGCGATCAGGTACCCGAGC
F59  GAAAACCTTGGAGTCTGTGGTAGATTTTTCGCTTCCGGTCCGCTATTATGCAAAATCCATTCGATTTTG
F61  GCGAAAACCTACCCATATCCCGAGCCGACGCTGCGGATCGGACATAATCTCACAATTTTCGGGGTTCCG
F62  CCGCACCGGTTCTGGCGTTGGCCAGCTGAAATGACCGTTGAGCAAAAACGGCAACACCCCGAACTACATC
F63  GACGTTGCAGCACAATTACGTGATGCAGCCGAAAGGATCGCTGAGAAATACGTTGCTAAAAACTAGCGAA
F64  TTACCGACTAGGTTTGTGGCATTTAATCAGTTGGGGCTTTCAGAAATTTCTGCGAGGGCCCATGTTTT
F66  TCACAGCCTTGTATTGGCTTGACTACCGTCAATCAGCCCAATACCATTCGGCGCTGGACTTCAATTGG
F69  TGGCACCCATGATGAACACTGGTGGCGGCAATGCGGTGAGTACCATGCGGGCAAAAGGAATCGCAAT
F71  TTTACTTTGAATTCAGATCGTTGAGGGTCTGATGCTGAAATGGCTTCTACAAAGGAGAACTACTTCTGAGCAG
F75  ACTTTGAATTCAGATCAAATTTTTTGGCTTGGGTGACCGGATTAATAATACGGAAATAAGCGGAAGCGTC
-10 region

```

图 1 随机插入片段的启动子预测

Fig.1 Nucleotide sequences of predicted promoters aligned at the -10 hexamers. TS sites are in bold face and underlined. The presumed -10 hexamers are in bold face and shadowed. For each promoter-active fragment, 70 nucleotides are shown; 15 downstream of the TS site and 54 upstream of the TS. \* Sequence of the fragment F54 is double underlined.



值得注意的是, 这些匹配序列除插入片段 F26 是谷氨酸棒杆菌中已知 *ldh A* 基因的启动子外, 大都是位于已知基因或推测编码功能蛋白的基因的内部, 说明虽然这些序列是这些结构基因的组成部分, 但它们也同样具有启动子的功能。

使用 BDGP Neural Network Promoter Prediction, V2.2 对这 30 个插入片段进行启动子预测分析, 可能的转录起始位点 (TS site) 和 -10 区见图 1。与大肠杆菌和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 相比, 谷氨酸棒杆菌的启动子不具有明显的 -35 区, 仅 -10 区有较高的保守性。

### 2.3 随机插入片段的功能验证

通过测定报告基因编码酶的比活力, 可以推断插入片段的启动子强度。分别测定含随机插入片段的 pAKC6、空载体 pAKC6 以及含启动子 *P<sub>trc</sub>* 的 pAKC6 的谷氨酸棒杆菌 10147 的总蛋白和 CAT 的酶活, 计算得到各自的比活力, 所有带有插入片段的转化子的 CAT 活力在 0.18 U/mg ~ 32.50 U/mg, 有 3 个插入片段的转化子的 CAT 活力大于 24 U/mg, 与对照 *P<sub>trc</sub>* 的强度相当或略高 (表 2)。

取 5 个 CAT 活力较高的带有不同插入片段的谷氨酸棒杆菌 10147 转化子进行培养, 提取总蛋白, 进行 SDS-PAGE 分析, 以带有空载体 pAKC6 和带有 *P<sub>trc</sub>* 启动子 pAKC6 的转化子作为对照。结果表明, 这 5 个不同的插入片段都可以不同程度地启动氯霉素乙酰转移酶基因的表达, 表达蛋白分子量为 25 kDa, 与预期的大小相符 (图 2)。

## 3 讨论

本工作利用启动子探测载体从谷氨酸棒杆菌 10147 中克隆具有启动子活性的片段, 获得了 30 个不同的随机插入片段, 这些片段可以不同程度地启动氯霉素乙酰转移酶基因的转录。DNA 序列比对分析结果表明, 26 个插入片段与谷氨酸棒杆菌 R 株基因组上的序列的相似性在 95% 以上, 其中 24 个插入片段与谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 基因组上的序列相似性也大于 95%。2 个完全没有匹配序列的片段可能是偶然拼接而成的。在已经研究过的 54 个谷氨酸棒杆菌的启动子序列中, -10 区通常具有 TA (Tc)AAT 序列。这个六聚体的位置和序列与大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 -10 区保守序列 (TATAAT) 非常相近 [4]。本工作克隆得到的 30 个具有启动子活性的片段中有 12 个片段具有 nAnAAT, 3 个片段具有 nAAAAT 序列。其中 F26 和 F61 的 -10 区

表 2 插入片段的大小和启动子活性

Table 2 Size and promoter activity of DNA fragments isolated from the chromosome of *C. glutamicum* 10147

Fragments in pAKC6	Fragment size/bp	Protein concentration / (mg/mL)	CAT activity in <i>C. glutamicum</i> 10147/ (U/mg)
None	0	5.29	0.15
F10	503	6.98	2.39
F15	339	3.92	1.21
F18	431	3.90	17.14
F20	473	4.10	18.27
F21	261	3.99	26.35
F22	219	2.61	0.75
F23	163	1.37	0.32
F25	416	1.81	1.07
F26	353	1.38	1.00
F35	87	4.06	14.43
F41	178	1.38	12.61
F42	318	2.33	0.18
F43	378	1.84	2.11
F45	110	3.82	10.42
F46	334	3.78	1.16
F50	550	3.74	18.66
F53	586	2.80	11.01
F54	38	3.82	24.03
F55	238	3.95	19.47
F56	330	3.70	12.50
F57	437	3.49	32.50
F59	272	3.89	17.68
F61	382	1.73	9.32
F62	274	1.71	15.17
F63	153	1.64	12.98
F64	424	1.78	16.64
F66	217	2.07	10.51
F69	186	3.93	1.17
F71	190	2.77	8.55
F75	109	2.74	2.13
<i>P<sub>trc</sub></i>	293	3.90	26.33

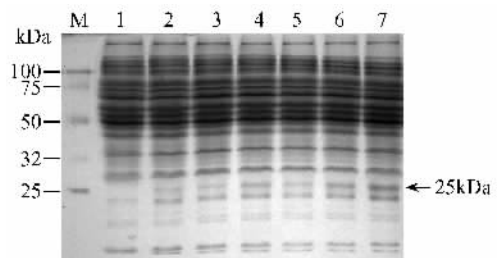


图 2 带插入片段的谷氨酸棒杆菌 10147 菌株的蛋白粗提液的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of crude extracts of *C. glutamicum* 10147 harboring the different respective pAKC6 derivative. M: Marker; 1: None; 2: F18; 3: F20; 4: F21; 5: F54; 6: F57; 7: *P<sub>trc</sub>*.

CATAAT 与已知的谷氨酸棒杆菌 *gdh* 基因启动子的 -10 区相同。其余 15 个片段启动子的 -10 区不具有

典型的保守序列。F69 的-10 区 TAGCAT 与已知的谷氨酸棒杆菌 *ilvB* 基因启动子的-10 区相同。这 30 个具有启动子活性的片段的-35 区都不具有保守序列。Pátek 等对谷氨酸棒杆菌启动子进行分析后认为-35 区的保守性很低,在转录过程中-35 区似乎起次要作用<sup>[4]</sup>。

氯霉素乙酰转移酶活性分析结果表明,这些具有启动子活性的片段在指数生长期有活性,推测它们都是组成型启动子。大肠杆菌中一些常用的启动子如 *tac*、*lacUV5* 和 *trp* 可以在谷氨酸棒杆菌中表现活性<sup>[6]</sup>。本工作以大肠杆菌 *P<sub>trc</sub>* 启动子为参照,对 30 个具有启动子活性的片段的强度进行了比较,绝大多数片段的强度都低于 *P<sub>trc</sub>*, F21 和 F54 的强度与 *P<sub>trc</sub>* 相当,而 F57 的强度高于 *P<sub>trc</sub>*,这三个片段可以用来进一步构建表达载体。由于谷氨酸棒杆菌的 RNA 聚合酶的特异性较低,表现为当报告基因上游存在 A + T 丰富的外源序列时,会引起 RNA 聚合酶起始的随机转录<sup>[7]</sup>,这也就是启动子克隆载体 pAKC6 有弱的 CAT 活性的原因。本工作得到的这些插入片段虽然大多与常规启动子位置不同,但同样具有启动功能,也是由于同样的原因所致。一些谷氨酸棒杆菌启动子在大肠杆菌,变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 和枯草芽孢杆菌中也具有活性<sup>[7]</sup>,Pátek 等认为在这三种细菌中,作为启动子功能所必需的区域的结构特征是共同的,但是可能由于相应的 RNA 聚合酶的主要  $\sigma$  因子的结构有差异导致 RNA 聚合酶识别严谨性不同,在这三种细菌中被识别的启动子区的特殊序列会发生变化<sup>[7]</sup>。在特定菌株中 RNA 聚合酶的识别特异性以及启动子与富含 A + T 保守序列相一致,可能是一种进化过程,以适应菌株染色体中 A + T 含量的变化<sup>[1]</sup>。本工作克隆到的具有启动子活性的片段也能够在大肠杆菌中启动氯霉素乙酰转移酶基因的转录,说明这些活性片段的-10 区与大肠杆菌启动子的-10 区序列相似性很高,而且这两种细菌的 RNA 聚合酶的功能可能也很相似。

启动子强度是影响基因表达的基本因素。虽然异源表达系统是十分重要的研究工具,但在实际应用中来自大肠杆菌的启动子在棒杆菌中表现出低强度和渗漏阻遏<sup>[4]</sup>。因此,对于谷氨酸棒杆菌这一重要的工业微生物菌种而言,利用同源的启动子实现生物合成基因的表达和调控是非常重要的。对具有启动子活性片段的转录起始位点进行精确定位以及确定启动子功能最小必需区的工作正在进行中。

## 参考文献

- [1] Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 1957, 3: 193 – 205.
- [2] Srivastava P, Deb J K. Gene expression systems in corynebacteria. *Protein and Express Purification*, 2005, 40: 221 – 229.
- [3] 李开,赵智,王宇,等. 谷氨酸棒杆菌/大肠杆菌启动子探测载体的构建. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47 (2): 191 – 196.
- [4] Pátek M, Nesvera J, Guyonvarch A, et al. Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 2003, 104 (1–3): 311 – 323.
- [5] 余红,杨能,应伟均,等. 质粒 pXZ10145DNA 转化棒杆菌原生质体的研究. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*). 1989, 5: 51 – 56.
- [6] Brosius J, Erfle M, Storella J. Spacing of the – 10 and – 35 regions in the *tac* promoter. Effect on its in vivo activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260 (6): 3539 – 3541.
- [7] Guillouet S, Rodal A A, An G H, et al. Expression of the *Escherichia coli* catabolic threonine dehydratase in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on isoleucine production. *Applied and Environmental Microbiological*, 1999, 65 (7): 3100 – 3107.
- [8] Kirchner O, Tauch A. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *The Journal of Biotechnological*, 2003, 104 (1–3): 287 – 299.
- [9] Cremer J, Eggeling L, Sahm H. Cloning of the *dapA dapB* cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular and General Genetics*, 1990, 220: 478 – 480.
- [10] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,黎孟枫,等译. 第二版. 北京:科学出版社, 1989.
- [11] Pátek M, Eikmanns B, Patek J, et al. Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology*, 1996, 142 (5): 1297 – 1309.
- [12] 沈天翔,贾盘兴,门大鹏,等. 质粒 pXZ10145 核苷酸序列的测定与分析. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*). 1993, 9 (3): 216 – 222.
- [13] Liebl W, Bayerl A, Schein B, et al. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 65 (3): 299 – 304.

- [4] Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1 - 2): 248 - 254.
- [5] Shaw W V. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods in Enzymology*, 1975, 43: 737 - 755.
- [6] Morinaga Y, Tsuchiya M, Miwa K, et al. Expression of *Escherichia coli* promoters in *Brevibacterium lactofermentum* using the shuttle vector pEB003. *The Journal of Biotechnology*, 1987, 5 (4): 305 - 312.
- [7] Pátek M, Muth G, Wohlleben W. Function of *Corynebacterium glutamicum* promoters in *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans*, and *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biotechnology*, 2003, 104 (1 - 3): 325 - 334.

## Cloning and analysis of promoter-active fragments from *Corynebacterium glutamicum* 10147

Guiming Liu<sup>1,2</sup>, Zhi Zhao<sup>1</sup>, Yingzi Zhang<sup>1</sup>, Yu Wang<sup>1</sup>, Jiuyuan Ding<sup>1\*</sup>

† Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

‡ Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** [Objective] To clone promoter-active fragments from *Corynebacterium glutamicum* for further construction of expression vectors. [Methods] Random *Sau3A* I digested fragments of *C. glutamicum* 10147 chromosome were shot-gun cloned into the promoter-probe vector pAKC6 and promoter activity of the inserted fragments was selected by chloramphenicol resistance of transformed *C. glutamicum* cells. [Results] Thirty promoter-carrying fragments were isolated. Three *C. glutamicum* clones harboring pAKC6 with promoter fragments displayed chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity of more than 24 U/mg. The fragment F57 led to the highest CAT activity of 32.50 U/mg, even more than that produced by the promoter *P<sub>trc</sub>*, 26.33 U/mg.

[Conclusion] The strength of promoter on fragments F21, F54 and F57 is as strong as promoter *P<sub>trc</sub>* in *C. glutamicum*. These fragments can be used to construct expression vector.

**Keywords:** *Corynebacterium glutamicum*; promoter-probe vector; promoter; chloramphenicol acetyltransferase

(本文责编:王晋芳)

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-64807415; E-mail: dingjy@sun.im.ac.cn