

枯草杆菌-大肠杆菌多功能穿梭载体的构建

郭兴华¹ 熊占² 周民³ 贾士芳¹ 许怡¹

(中国科学院微生物研究所, 北京)¹

(江西省科学院微生物研究所, 南昌)²

由枯草杆菌载体pUB110和大肠杆菌载体pGEM3构建了两个新的多功能穿梭载体 pBE2 和pBE3, 它们具有强启动子和多酶切位点区。这两个载体能在枯草杆菌和大肠杆菌中复制和表达, 是比较理想的载体。

关键词 穿梭载体; 枯草杆菌; 大肠杆菌

已构建的很多枯草杆菌和大肠杆菌之间穿梭的载体^[1], 各有其优点和用途。随着基因工程的发展, 对载体也提出了新的要求, 即多种功能和高效表达等。

到目前为止, pUB110 仍是芽孢杆菌中重要的载体之一。它的特点是较稳定, 拷贝数多, 单酶切位点也不少。pGEM3 是大肠杆菌的多用途载体, 它具有两个强启动子和一个多酶切位点, 分子量小、扩增率高, 双启动子和双向转录, 保证了任何插入方向都可以有正确的 RNA 转录。它除了可以作为基因工程常规的载体外, 还可用于体外转录、翻译的研究, 以及基因产物的微量分析和 DNA 序列分析等。本文报道了用pUB110 和 pGEM3 载体构建的两个多功能穿梭载体。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌株: 所用菌株列于表 1。
2. 酶和试剂: 核糖核酸酶、限制酶 EcoRI 和 HindⅢ为 BRL 公司产品。限制酶PvuⅡ、T4DNA 连接酶, Mung Bean核酸酶和CIP酶为 Sino-American

Biotec公司产品。溶菌酶为上海生化所产品。SPPI噬菌体 DNA 为本所郑文尧赠送。

3. 抗生素: 氨苄青霉素贮液浓度为 25mg/ml, 工作浓度为 50μg/ml; 新霉素贮液浓度为 1mg/ml, 工作浓度为 5μg/ml。以上两种抗生素均需过滤灭菌, 然后放 4℃贮存备用。

4. 培养基: LB 液体和固体培养基用于大肠杆菌和枯草杆菌的培养。枯草杆菌转化用培养基按郭兴华^[2]的方法配制。

(二) 方法

大肠杆菌质粒提取按分子克隆一书^[3]方法; 枯草杆菌质粒提取按 Hardy 的方法^[4], 快速提取质粒按 Hopwood 的方法^[5]。纯化质粒采用北京东方仪器厂生产的DNA回收仪, 回收ccc DNA。携带淀粉酶基因的噬菌体p11amy1的提取和纯化按郭兴华等方法^[6]。酶切、Mung Bean Nuclease去尾以及T4DNA 连接酶的连接按Maniatis的方法^[3]。枯草杆菌转化按郭兴华等的方法^[2]。大肠杆菌的

本文于1989年8月16日收到。

国家自然科学基金资助项目(3870281)。

3 北京大学生物系, 1988年毕业生。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株 Strains	主要基因型 Main genotype	来源 Source
大肠杆菌 <i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , hsdS20(rβ ⁻ , mβ ⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20(Sm ^r), xyl-5, mtl-1, supE44, λ	This institute
大肠杆菌 <i>E. coli</i> HB101 (pGEM3)	as above, Amp ^r	"
大肠杆菌 <i>E. coli</i> C600	F ⁻ , thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ	"
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> BR151	tryC2, metB5, lys3	"
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> AS. 1.1098(pUB110)	tryC2, metB5, lys3, Neo ^r	"
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> AS.1.1358	metB5, sacA321, aro906 p11Amy1	"

转化按 Maniatis 的方法^[8]。α-淀粉酶摇瓶发酵按贾士芳方法^[7]。α-淀粉酶活力测定按部颁方法^[8]。

结果与讨论

(一) 穿梭载体 pBE2 的构建

1. 重组载体的获得: 经纯化的 pUB110 和 pGEM3 质粒 DNA, 分别用 EcoRI 酶切, 两个质粒各有一个 EcoRI 切点(图 1), 为了防止在连接过程中质粒 DNA 自身环化, 对酶切后的 pGEM3 DNA 进行脱磷酸化处理。

将等量的 EcoRI 酶切的 pUB110 和脱磷酸的 pGEM3 DNA 用 T4DNA 连接酶连接, 然后转化大肠杆菌 HB101, 结果在含 Amp(50μg/ml) 的平板上长出 25 个菌落, 把 25 个菌落分别挑到含 Neo(5μg/ml) 和双抗的(Amp+Neo) 平板上, 37°C 培养 24h, 在含 Neo 和双抗平板上都长的只有 5 个菌落。将 5 个转化子快速提取质粒,

经电泳检测, 5 个转化子所含质粒的带均在 pUB110 和 pGEM3 之上, 另外将 pUB110、pGEM3 和重组质粒分别用 EcoRI 酶切, 电泳后的结果为: 重组质粒的两条带分别与 pUB110 和 pGEM3 的带相对应(图版 I-B), 因此可以证实 5 个转化子都含有重组质粒。

2. 重组质粒的检验: 从图 1 中可以知道, 重组质粒可以顺向和反向连接, 顺向连接时, 重组质粒上的 Pvu II 酶切位点相距较远, 将重组质粒分为大小几乎相等的两个片段。反向连接时两个 Pvu II 切点的距离较近, 将重组质粒分为一大片段和一小片段。为了验证重组质粒的连接方式, 用 Pvu II 酶切 5 个重组质粒, 电泳后均显示了一条大片段(约为 4.2Md) 和一条小片段(约为 0.64Md)(图版 I-C)。证实 5 个重组质粒均为反向连接。

pUB110 质粒没有 Hind III 切点, 而 pGEM3 的多克隆位点区有一个 Hind III 位点。用 Hind III 酶切重组质粒, 电泳结果

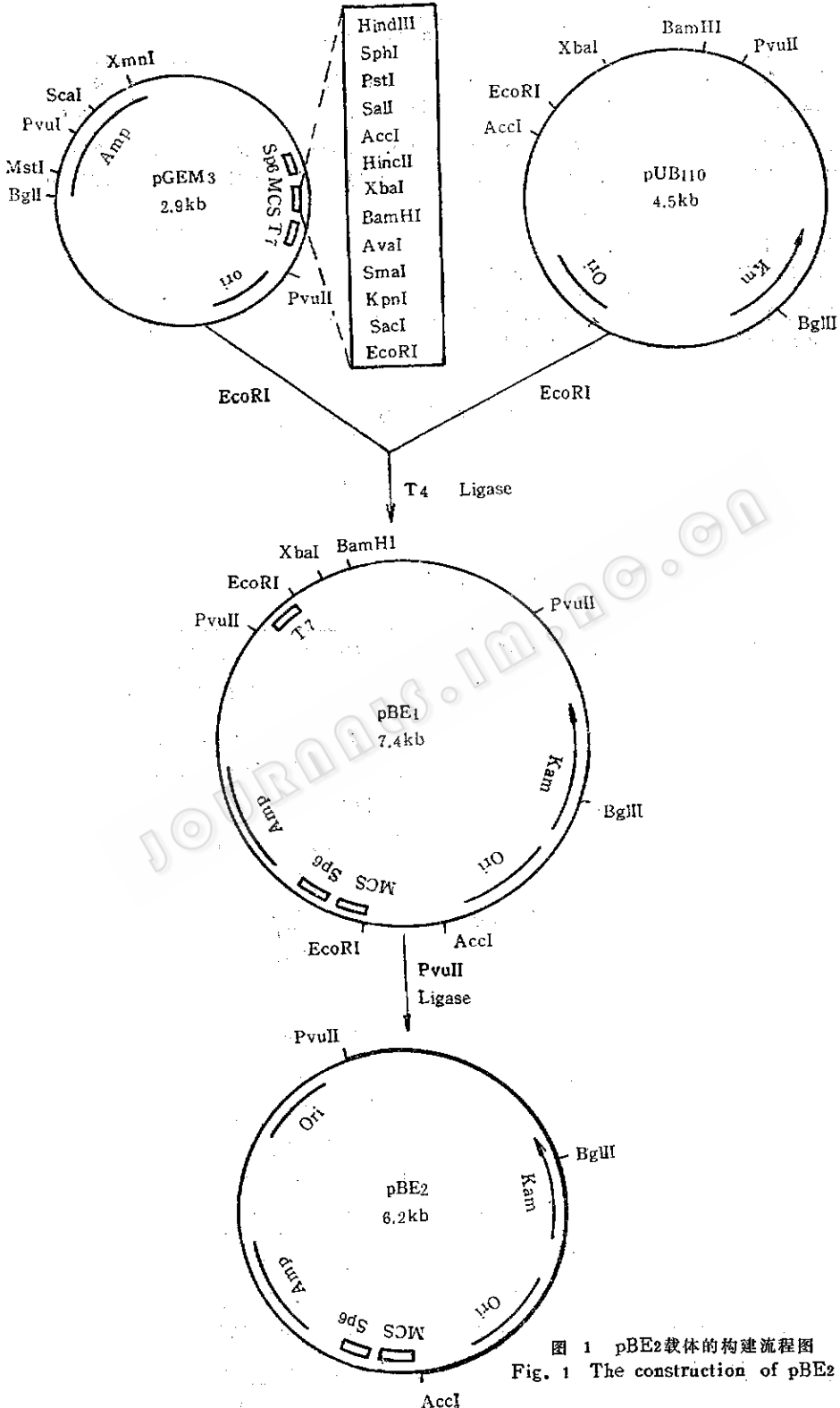


图 1 pBE2载体的构建流程图
Fig. 1 The construction of pBE2 vector

显示了一条带(图版 I -C)。证实重组质粒是由pUB110 和 pGEM3 质粒构成的, 并命名为pBE1 (B代表枯草杆菌, E 代表大肠杆菌)。

3. 重组质粒的改造: pBE1的 Pvu II, EcoRI XbaI和BamHI 酶切位点是重复的, 为了减小它的分子量, 必须去掉多余的酶切位点和无用的片段。我们采用 Pvu II 酶切重组质粒, 使其形成平末端, 然后用T4DNA 连接酶连接, 再转化大肠杆菌C600。用双抗(Amp+Neo) 平板筛选, 从转化子中随机挑出10个菌落, 经快速法提取质粒之后, 电泳显示出比pBE1 重组质粒分子量小的新的重组质粒(图版 I -A)。用Pvu II 和 EcoRI 酶切新的重组质粒, 电泳结果表明它只有一个Pvu II 和 EcoRI切点, 证实所含重复的4个酶切位点已被切掉。将它再转化枯草杆菌BR151, 转化效率为 $8.6 \times 10^3/\mu\text{g DNA}$ 。经改造的穿梭载体定名为pBE2。

(二) 穿梭载体pBE3的构建

1. 重组载体的获得: 用 Pvu II 和 EcoRI酶切pUB110质粒, 把EcoRI到Pvu II 这一段非主要区去掉。留下部分具有一个EcoRI粘末端和一个Pvu II 平末端, 再用 Mung Bean Nuclease 处理粘末端, 使其成为平末端。这样, 就可以和Pvu II 切过的pGEM3 相对应了(图2), 用 T4 DNA 连接酶进行平末端连接然后转化大肠杆菌 HB101 的感受态细胞。在双抗的LB 平板上, 长出几百个菌落。把单菌挑在双抗LB平板上, 进一步验证转化子。

2. 重组载体的检验: 从几百个转化子中随机挑取20个菌落, 快速提取质粒后电泳, 发现它们的分子量大小不一, 取其分子量约为4.2Md(理论推测)的重组质粒, 进一步用EcoRI, Hind III 酶切, 都得到单一的条带。这个重组质粒被命名为 pBE3

(图版 I -D)。并在大肠杆菌→枯草杆菌→大肠杆菌→枯草杆菌穿梭转化, 转化效率都在 $10^2-10^4/\mu\text{g DNA}$ 以上。从以上结果证明pBE3具有pUB110和pGEM3 的复制点, 抗药性标记和完整的多酶切位点。

(三) pBE2和pBE3在枯草杆菌和大肠杆菌中的稳定性

为了检查载体的稳定性, 将含有pBE2 和pBE3质粒的大肠杆菌 HB101 和枯草杆菌BR151菌株, 放4℃冰箱保藏一个月, 另外分别每日转管一次, 一个月后分别适当稀释后涂 LB 平板, 然后再复制到含和不含抗生素的平板上, 37℃培养后结果为从大肠杆菌HB101来的菌落在含双抗的LB平板上百分之百生长。由枯草杆菌 BR151来的菌落在含 Neo的LB 平板上百分之九十八生长。分别提取质粒DNA, 电泳行为都和原来的一样。

(四) 淀粉酶基因在pBE2和pBE3载体上的表达

我们曾用p11噬菌体克隆了α-淀粉酶基因。为了检验新构建的载体功能, 用 Sau3A 酶切 p11amy1, 得到α-淀粉酶基因(分子量约为1.4Md)。把它插入到pBE2 和pBE3的BamHI 位点上, 然后转化到BR151中, 得到pBE2amy和pBE3amy。

以淀粉酶基因片段的给体菌枯草杆菌168为对照, 和BR151(pBE2amy)和 BR151(pBE3amy)同时进行摇瓶发酵, 然后测定淀粉酶活力, 结果如表2。

由表2 看出淀粉酶基因可以在pBE2 和pBE3载体上表达, 而且α-淀粉酶的活力比出发菌株的活力约高5倍左右。把pBE2amy和pBE3amy转化到大肠杆菌后同样有淀粉酶基因的表达。

pBE2和pBE3穿梭载体能在枯草杆菌和大肠杆菌中复制, 而且较稳定。把α-淀粉酶基因插入后, 淀粉酶基因得到了表

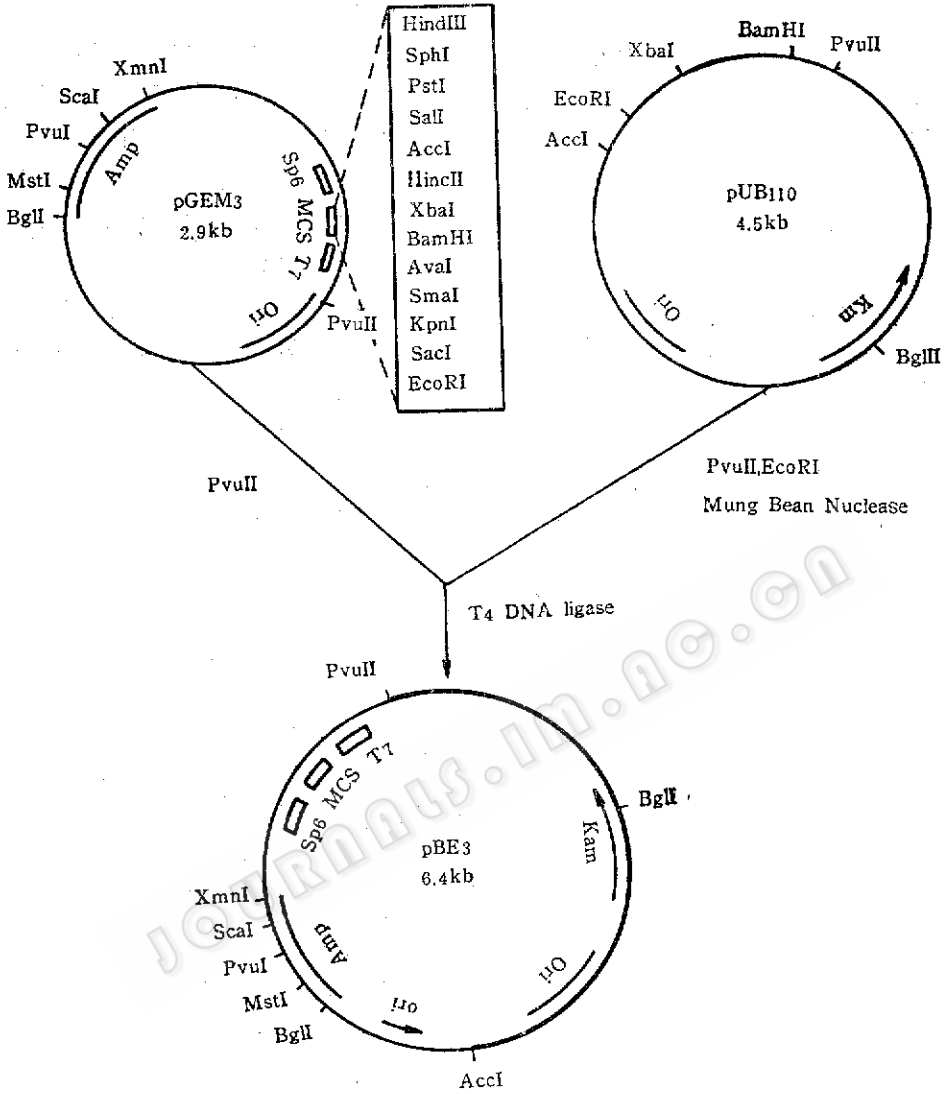


图 2 pBE3载体的构建流程图
Fig. 2 Construction of vector pBE3

表 2 α-淀粉酶活力
Table 2 Activity of α-amylase

菌株 Strains	α-淀粉酶活力 Activity of α-amylase (u/ml)
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> 168	6
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> BR151 (pBE2 amy)	29
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> BR151 (pBE3 amy)	29

达, 说明构建的两个载体都可以用于枯草杆菌的基因克隆和基因分析, 并将使这一系统中的工作更方便。

参 考 文 献

- [1] 郭兴华等: 微生物通报, 12(5):215, 1985.
 [2] 郭兴华等: 微生物学报, 22(3):263—268, 1982.
 [3] Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
 [4] Hardy, K. G.: *Bacillus Cloning Methods*, DNA Cloning Volume I, A practical approach, Edited by DMM, Clover, pp. 1—17, 1985.
 [5] Hopwood, D. A.: Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, The JohnInnes Foundation, Norwich p.85, 1985.
 [6] 郭兴华等: 微生物学报, 30(4):273—277, 1990.
 [7] 贾士芳等: 微生物学报, 30(1):83—85, 1990.
 [8] 中华人民共和国轻工业部部颁标准: 工业用液化型、糖化型淀粉酶、蛋白酶质量标准, QB746-747-80, 1981.

The Construction of Multifunctional Shuttle Vectors of *Bacillus subtilis*-*Escherichia coli*

Guo Xinghua¹ Xiong Zhan² Zhou Min³ Jia Shifang¹ Xu Yi¹

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)¹

(Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang)²

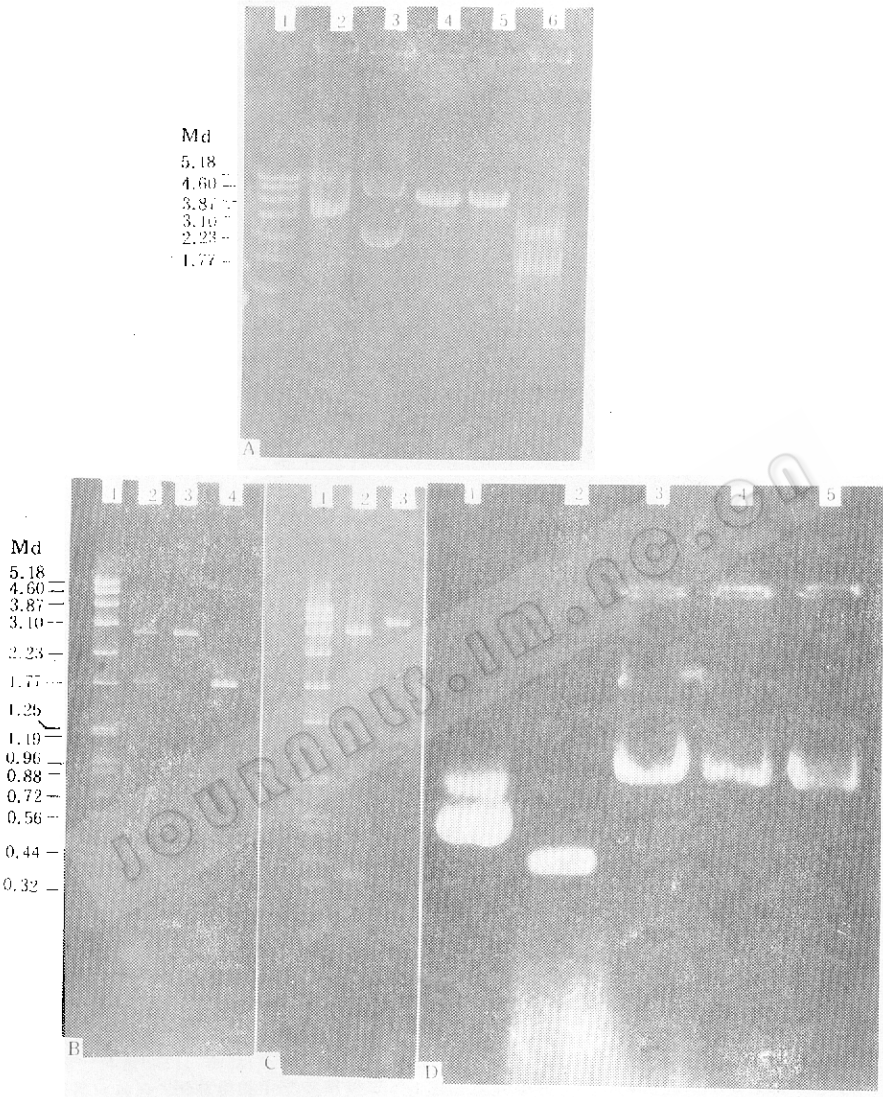
Multifunctional shuttle vectors pBE2 and pBE3 were constructed using pUB110 from *B. subtilis* and pGEM3 from *E. coli*. There are strong promoters and a multiple cloning site in two vectors. pBE2 and pBE3 can replicate in both *E. coli* and *B. subtilis* and express α -amylase gene in *B. subtilis* after inserting that gene. The expression level of α -amylase gene in the constructed *B. subtilis* was 5 times higher than that of parent strain.

Key words

Shuttle vectors, *B. subtilis*, *E. coli*

*This study was supported by National Natural Science Foudation of China (NNSFC).

3 Graduate from Beijing University in 1988.



A. pBE1和pBE2的电泳图 pBE1 and pBE2 on gel
 1. SPPI DNA/EcoRI; 2. pBE1; 3. pBE2; 4. pBE2/Pvu I; 5. pBE2/EcoRI; 6. pBE1/EcoRI
 B. EcoRI酶切pBE1的电泳图 The plasmids digested by FcoRI
 1. SPPI DNA/EcoRI; 2. pBE1/EcoRI; 3. pUB110/FcoRI; 4. pGEM3/EcoRI
 C. Pvu I, Hind III 酶切pBE1电泳图 The recombinant plasmid cut by Pvu I and Hind III
 1. SPPI DNA/EcoRI; 2. pBE1/Pvu I; 3. pBE1/Hind III
 D. 重组质粒pBE3的电泳图 The recombinant plasmid on gel
 1. pUB110; 2. pGEM3; 3-5. Recombinant plasmid pBE3