

谷氨酸棒杆菌/大肠杆菌穿梭型启动子探测载体构建

李 开^{1,2} 赵 智¹ 张英姿¹ 王 宇¹ 丁久元^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(² 中国科学院研究生院 北京 100039)

摘 要 从质粒 pXZ10145 和 pUC19 出发,构建了一个谷氨酸棒杆菌/大肠杆菌穿梭载体 pAK6。pAK6 的大小为 5684bp,带有卡那霉素和氨苄青霉素抗性选择标记,以及多克隆位点。在 pAK6 基础上,构建了以氯霉素乙酰转移酶为报告基因的启动子探测载体 pAKC6, pAKC6 的大小为 6474bp。采用鸟枪法,将经 *Sau3AI* 消化的谷氨酸棒杆菌基因组片段连入 pAKC6,根据谷氨酸棒杆菌对氯霉素的抗性,从中分离出两个具有启动子功能的插入片段。通过测定报告基因氯霉素乙酰转移酶的活性,对两个启动子片段在谷氨酸棒杆菌中的强度进行了初步的判断,测序后,用启动子预测软件对其结构进行了预测,证实了启动子序列的存在。

关键词 谷氨酸棒杆菌;大肠杆菌;穿梭载体;启动子探测载体

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)02-0191-06

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是一种不产芽孢,严格好氧的革兰氏阳性菌。自从 Kinoshita^[1]发现其能大量分泌谷氨酸以来,该菌及其突变体已广泛地用于发酵生产各种 L-氨基酸。基因工程技术的应用使得改造和设计氨基酸代谢途径成为可能,而分离棒杆菌的内源质粒和构建载体是基因工程研究的基础。目前已经从谷氨酸棒杆菌分离出 24 种内源质粒^[2]。根据复制方式和复制蛋白的相似性,它们被分类成 4 个棒杆菌质粒家族:pBL1、pCG1、pXZ10142 和 pCRY4 家族,前两个家族的成员采用滚环复制,后两个家族的成员采用 θ 复制。由于采用 θ 复制的质粒在复制中不会产生单链中间体,因而在结构上和分离时比滚环复制质粒有更高的稳定性^[2]。目前,已公开报道的大肠杆菌/谷氨酸棒杆菌穿梭载体均是从 pBL1 和 pCG1 及其衍生质粒构建而来,而采用 θ 复制的 pXZ10142 和 pCRY4 却鲜有用于构建各类载体的报道。启动子探测载体是分离和测定启动子效率的主要工具。Eikmanns 等^[3]使用质粒 pBL1 构建了启动子探测载体 pEKplCm, Pátek 等^[4]应用该载体从谷氨酸棒杆菌中分离了 13 个启动子。通过对 50 多个棒杆菌启动子序列结构的研究, Pátek^[5]认为棒杆菌的看家基因启动子结构类似于大肠杆菌启动子,但是其保守性却低于后者。虽然常用的大肠杆菌启动子如 *P-tac*

和 *lacZ* 启动子均能在谷氨酸棒杆菌中使用,但是,由于这些外来启动子低效率和泄漏表达^[5],因此有必要分离棒杆菌自身的强启动子和严格诱导表达启动子。

pXZ10145 是 pXZ10142 质粒家族中的成员,由雷肇祖^[6]从谷氨酸棒杆菌 1014-6T 菌株分离,它的序列、最小复制区及抗性已有所研究^[7,8],雷呈祥^[9]等利用它进行了构建谷氨酸棒杆菌基因工程菌的尝试。

本文从 pXZ10145 和 pUC19 出发构建了带有多克隆位点区 MCS 的谷氨酸棒杆菌-大肠杆菌穿梭载体 pAK6,并以 pAK6 为基础,构建了启动子探测载体 pAKC6,进一步用 pAKC6 从谷氨酸棒杆菌基因组中克隆具有启动子功能的片段,通过测定报告基因编码的氯霉素乙酰转移酶的活性,初步判断了启动子的相对强度。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本试验所用菌株和质粒见表 1。

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

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-64807415; E-mail: dingji@sun.im.ac.cn

作者简介 李 开(1978 -)男,湖北武汉人,硕士研究生,主要从事氨基酸代谢研究。

收稿日期 2006-07-10 接受日期 2006-08-09 修回日期 2006-09-08

表 1 试验所用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	ϕ 80 <i>LacZ</i> Δ M15	This lab
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 10147	<i>Corynebacterium glutamicum</i> 1014-6T cured plasmid	This lab
Plasmids		
pUC19	Amp ^R , ColE origin	This lab
pUC119-KanR	Amp ^R , Km ^R , ColE origin	This lab
pXC99E	<i>E. coli</i> expression vector, Cm ^R	[10]
pXZ10145	<i>C. glutamicum</i> 1014-6T plasmid, Cm ^R	[6]
pAK0	<i>C. glutamicum</i> recombinant plasmid Km ^R	This study
pAK2	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector Km ^R	This study
pAK6	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector with MCS, Km ^R	This study
pAKB6	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector with promoterless <i>cat</i>	This study
pAKC6	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> promoter probe vector, Km ^R	This study
pAKC6-F16	pAKC6 with <i>C. glutamicum</i> promoter fragment F16	This study
pAKC6-F19	pAKC6 with <i>C. glutamicum</i> promoter fragment F19	This study

MCS: multiple cloning site; Amp^R, Cm^R, Km^R indicate resistance to ampicillin, chloramphenicol, kanamycin respectively.

1.2 培养基和培养条件

LB 培养基用于大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌的培养, LB 培养基中加入 4% 甘氨酸用于谷氨酸棒杆菌感受态细胞的培养。抗生素的使用浓度分别为: 卡那霉素 25 μ g/mL, 氯霉素 30 μ g/mL。含 400 μ g/mL 氯霉素的 LB 固体培养基用于启动子的筛选。大肠杆菌在 37 $^{\circ}$ C 培养, 谷氨酸棒杆菌在 30 $^{\circ}$ C 培养。

1.3 DNA 操作

大肠杆菌 DNA 操作和谷氨酸棒杆菌质粒的提取均参考文献 [11], 谷氨酸棒杆菌 10147 总 DNA 的提取参考文献 [4]。大肠杆菌的转化采用 CaCl₂ 法, 谷氨酸棒杆菌 10147 的转化采用电击转化法 [12]。

1.4 引物设计与 PCR 反应

根据质粒 pXC99E 的序列 (GenBank 登录号: AY219685) 设计一对引物: P1: 5'-GGGAAGCTTAAGTAATTAACAGGAGCTAAGGAAGCTAAA-3', P2: 5'-AACTCTAGATAAGGATTTTGGTCATGCC-3', 下划线部分为限制性酶切位点 *Hind* III 和 *Xba* I, 引物 P1 中有 3 个不同阅读框的终止密码子 TAA, 以防止形成融合蛋白。通过 PCR 扩增氯霉素乙酰转移酶基因的编码区和 SD 序列, 用其作为报告基因。根据质粒 pUC119-KanR 的序列设计一对引物: P3: 5'-TAGAGGTACCCCTGGATACCGCTCG-3', P4: 5'-GCTCGGATCCCGAACCCAGAGTCC-3', 下划线部分为限制性酶切位点 *Kpn* I 和 *Bam* H I, 用来使 KanR 基因两侧原来的 *Bam* H I、*Kpn* I 位点定点突变为 *Kpn* I、*Bam* H I, 以改变 KanR 基因在启动子探测载体中的插入方向。根据已构建成功的启动子探测载体 pAKC6 的序列, 设计引物 P5: 5'-AAAAGGTGTCAACCTCGATAATTTG-3', P6: 5'-GAACGGTCTCGTTAT

AGGTACATTG-3', 用来扩增插入在 *Bgl* II 位点的启动子片段。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5min。

1.5 T_{leuB} 终止子及 MCS 序列的合成与复性

根据文献 [13] 设计寡核苷酸序列 S1: 5'-AATTCAAAGTAAACCCCTCGCCATAAAAAGCGGAGGGGTAC-3', S2: 5'-CCCTCGCCTTTTATGGCGAGGGGTTTACTTTG-3'。S1 和 S2 复性后, 形成谷氨酸棒杆菌 *LeuB* 基因终止子序列, 两端分别为 *Kpn* I 和 *Eco* R I 的粘末端。设计寡核苷酸序列 S3: 5'-AGCTGCATGCTCTAGACTGCAGAAGCTTAGATCTG-3', S4: 5'-AATTGATCTAAGCTTCTGCAGTCTAGAGCATGC-3'。S3 和 S4 复性后, 形成多克隆位点区 (MCS), 具有 *Bgl* II、*Hind* III、*Pst* I、*Xba* I 和 *Sph* I 单一酶切位点, 两端分别为 *Eco* R I 的粘末端和与 *Hind* III 互补的突出端。复性条件: 将等体积的 50mmol/L 相关寡核苷酸混合, 在 80 $^{\circ}$ C 保持 10min, 自然降温。

1.6 启动子片段的筛选

采用鸟枪法筛选启动子片段。Sau3A I 完全消化谷氨酸棒杆菌 10147 的总 DNA, 将片段连入经 *Bgl* II 消化的 pAKC6, 转化大肠杆菌感受态细胞, 涂布于卡那霉素平板; 24h 后用牙签挑取转化子点种于含 400 μ g/mL 氯霉素的平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 24h; 从能生长的菌落中提取质粒, 电击转化谷氨酸棒杆菌 10147 的感受态细胞, 于卡那霉素平板上筛选转化子, 将转化子点种于含 30 μ g/mL 氯霉素的平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 24h, 从能生长的菌落中提取质粒, 酶切分析。同时以 pAKC6 为对照进行相同操作。

1.7 启动子强度的测定

1.7.1 粗酶液的制备 挑取在含 30 μ g/mL 氯霉素的

平板生长的谷氨酸棒杆菌菌落接种 LB 培养基,于 30℃ 摇床培养 16h,离心收集细胞,用 100mmol/L Tris-HCl (pH7.8) 洗涤两遍,悬浮。超声波破碎细胞,离心,取上清用于测定;以带有 pAKC6 的谷氨酸棒杆菌为对照,进行同样的试验。

1.7.2 总蛋白含量的测定 采用考马斯亮蓝法^[14]。

1.7.3 氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 活性的测定 参考 Shaw^[15] 的方法进行: 1.0mL 反应体系含 100mmol/L Tris-HCl (pH7.8), 0.1mmol/L acetyl-CoA 4mg/mL 5, 5-二硫 [2-硝基苯甲酸] DTNB 适量的粗酶液; 将反应混合物在水浴中加热到 37℃, 加入氯霉素使终浓度为 0.1mmol/L, 混匀, 立即测定光吸收值 A_{412} ; 以未加氯霉素的反应液为对照。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 μ mol 氯霉素所需酶量。

1.8 DNA 序列的测定与分析

DNA 序列的测定由上海生工生物工程技术服务有限公司完成; 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 CAT 和 KanR 基因的克隆

2.1.1 CAT 基因的克隆 以质粒 pXC99E 为模板, 使用引物对 P1/P2 PCR 扩增出大小约为 700bp 的片段, 经琼脂糖电泳验证与预期相符。

2.1.2 KanR 基因的克隆 以质粒 pUC119-KanR 为模板, 使用引物对 P3/P4 PCR 扩增出大小约为 1000bp 的片段; PCR 产物经 BamHI、KpnI 双酶切, 连入同样双酶切的 pUC19, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒, 经 NcoI 和 KpnI 双酶切, 产生 700bp 的小片段, 证实 KanR 基因两侧的 BamHI、KpnI 位点经突变而互换成功。

2.2 穿梭载体 pAK6 的构建

用 EcoRI、SpeI 双酶切 pXZ10145, 回收带有复制区的大片段, 用 EcoRI、XbaI 双酶切质粒 pUC119-KanR, 回收带有 KanR 基因小片段, 将两片段连接, 电击转化谷氨酸棒杆菌 10147, 提取质粒, 命名为 pAK0。为在 pAK0 上引入大肠杆菌复制子, 用 EcoRI、AatII 双酶切 pAK0, 回收大片段; 对 pUC19 进行同样的双酶切, 回收大片段, 将两片段连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒, 得到具有双复制区和双抗性 (卡那霉素抗性和氨苄青霉素抗性) 质

粒, 命名为 pAK2。由于 pAK2 上有两个 KpnI、BamHI 切点, 不利于克隆外来片段, 所以重新设计了多克隆位点区, 特别是引入了 BglII 单一切点, 方便了经 Sau3AI 完全消化的片段的克隆。用 HindIII 和 EcoRI 双酶切 pAK2, 回收大片段, 与复性的多克隆位点区连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取重组子质粒, 命名为 pAK6 (图 1)。将 pAK6 电击转化谷氨酸棒杆菌 10147, 提取质粒, 再转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒, 经同样酶切电泳, 结果与转入的质粒相符, 说明 pAK6 可在大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌之间穿梭。

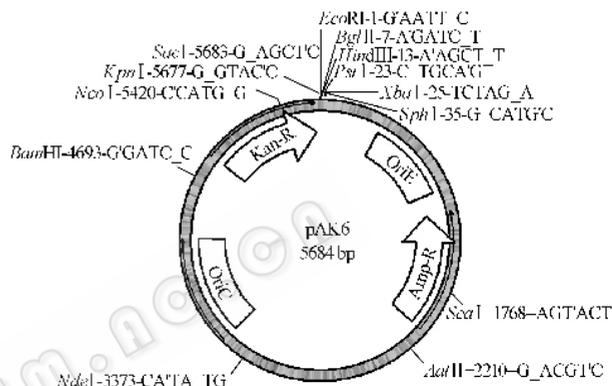


图 1 穿梭载体 pAK6

Fig. 1 Shuttle vector pAK6.

2.3 启动子探测载体 pAKC6 的构建

为构建启动子探测载体, 将终止子 T_{LeuB} 和报告基因 CAT 引入 pAK6。将 pAK6 用 EcoRI、KpnI 进行双酶切, 回收大片段, 与复性的 $LeuB$ 基因的终止子 T_{LeuB} 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 重组子质粒命名为 pAKT6。将 pAKT6 用 HindIII、XbaI 进行双酶切, 回收大片段; 同样双酶切 PCR 扩增所得的氯霉素乙酰转移酶基因 (CAT) 的编码区, 将两片段连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取重组质粒, 命名为 pAKB6。由于 pAKB6 上的 KanR 基因启动子较强, 且本身没有终止子序列, 因而有可能会通读过终止子 T_{LeuB} ; 于是, 应用 PCR 技术使 KanR 基因两侧的 KpnI、BamHI 互换, 该片段经 KpnI、BamHI 双酶切, 与同样双酶切并回收的 pAKB6 大片段连接, 改变 KanR 基因的插入方向, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取重组质粒, 经酶切鉴定, 与预期相符, 命名为 pAKC6 (图 2)。pAKC6 上的 KanR 基因转录方向与 CAT 转录方向相反, 不会引起通读。将 pAKC6 电击转化谷氨酸棒杆菌 10147, 提取质粒, 再转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒, 经同样酶切电泳, 结果与转入的质粒相符。

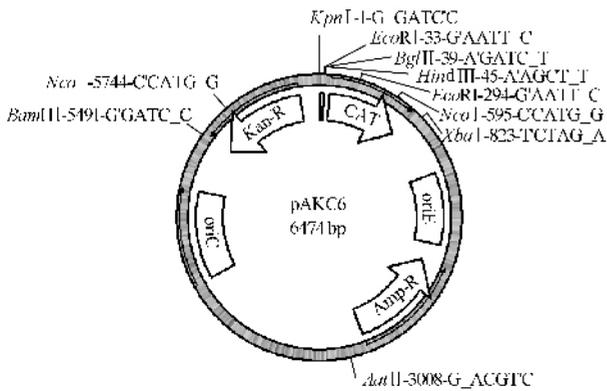


图 2 启动子探测载体 pAKC6

Fig. 2 promoter-probe vector pAKC6.

2.4 谷氨酸棒杆菌启动子的筛选

用 pAKC6 克隆经 *Sau3A* I 完全消化的谷氨酸棒杆菌 10147 总 DNA 片段, 转化大肠杆菌, 获得 20 个转化子, 将转化子点种于含 400 μg/mL 氯霉素的平板, 有 5 个可以生长; 提取质粒, 分别电击转化谷氨酸棒杆菌 10147 感受态细胞, 涂布在卡那霉素平板上, 再把生长出的转化子点种于含 30 μg/mL 氯霉素的平板, 有两个可以生长, 与之对照, 经 pAKC6 转化的谷氨酸棒杆菌没有生长。将这两个带有插入片段的质粒分别命名为 pAKC6-F16 和 pAKC6-F19。

2.5 启动子片段强度的测定

由于启动子的强弱决定了报告基因的表达量, 所以通过测定报告基因的比活力, 可以推断启动子的强度。分别测定含 pAKC6、pAKC6-F16 和 pAKC6-F19 的谷氨酸棒杆菌的总蛋白和 CAT 的酶活, 计算得到各自的比活力, 表 2 结果表明, 带有 pAKC6 谷氨酸棒杆菌可少量的表达 CAT, 而带有 pAKC6-F16 和 pAKC6-F19 的菌株的 CAT 表达量分别是前者的 88 倍和 120 倍(表 2), 说明 F16 和 F19 片段具有启动子功能, 启动子探测载体可用于筛选具有启动子功能的片段。

表 2 不同菌株的 CAT 比活力

Table 2 CAT Specific activity of different strains

<i>C. glutamicum</i> strain	CAT specific activity(U/mg)
10147	ND
10147/pAKC6	0.21
10147/pAKC6-F16	18.50
10147/pAKC6-F19	25.15

ND : Not detectable.

2.6 启动子序列的测定与分析

以引物对 P5/P6 对启动子片段进行测序, 结果表明 F16 和 F19 的长度分别为 494bp 和 632bp。经 BLASTN 比对, 发现 F16 由 4 段 *Sau3A*I 消化片段拼接而成, 这 4 个片段分别与谷氨酸棒杆菌糖基转移酶基因编码区, 泛醌/甲基萘醌类生物合成的甲基化酶基因编码区, 推测的膜蛋白基因编码区, *O*-琥珀酰苯甲酸酯合成酶基因编码区有 96% 的同源性。使用 BDGP Neural Network Promoter Prediction V2.2 对 F16 进行分析, 发现了一段可能的启动子序列, 该软件对其的评分为 0.52; 虽然潜在的 -10 区 (ACTAAT) 和 -35 区 (TTGAAA) 之间的距离为 19bp, 但是它们与标准的 -10 区 (TATAAT) 和 -35 区 (TTGACA) 有较高的相似性; 潜在的 -10 区和 -35 区分别位于两个相邻的消化片段中, 表明该启动子是偶然拼接而成的, 不是该菌株的野生型启动子。经 BLASTN 比对, 表明 F19 与谷氨酸棒杆菌 R 株的 Strain-specific DNA island 9 有 99% 的同源性。经同样的启动子预测, 发现一段得分为 0.97 的启动子, 该启动子潜在的 -10 区 (TGGGGT) 和 -35 区 (TTTACT) 与标准的 -10 区和 -35 区的相似性较低, 但是二者的间隔为标准的 18bp, 而且该 -10 区 (TGGGGT) 与已经报道的谷氨酸棒杆菌启动子 P34^[5] 的 -10 区 (TGGGGT) 完全一致, 表明它应该能为谷氨酸棒杆菌 RNA 聚合酶识别。启动子的预测结果如表 3 所示。

表 3 启动子的预测

Table 3 Prediction of promoters

Fragments	Score	Promoter sequence(5'→3')
F16	0.52	AGT TTGAAA CCTTCTGCCAGCGCATCTC ACTAAT ACCGTG CTTTCTTTTG
F19	0.97	AGGGT TTTACT TGAAAAGTACGGAAGTGG TGGGGT AGCTT TCTCGGAAAT
P34		CGACTT ATGGGA TTGAATGCCAAACGGTGA TGGGGT AGCGGAC CCCAACCA
Consensus		TTGACA (17 ± 1bp) TATAAT
		- 35 - 10

Score indicate the fitness value to the consensus promoter sequences when predicted by using Neural Network Promoter Prediction V2.2; The potential -35 and -10 regions of the two promoters and P34 are shadowed; The proposed TSP is underlined. The consensus -10 and -35 motifs of the *E. coli* are presented.

3 讨论

谷氨酸棒杆菌是一种具有极高经济价值的细菌,通过基因工程技术对其进行认识和改良都涉及到各种载体的运用。本文利用质粒 pXZ10145 构建了一个新的谷氨酸棒杆菌/大肠杆菌穿梭载体 pAK6。pAK6 不仅可以用来克隆基因,也可以被改造成整合载体、表达载体、启动子探测载体等。目前还未有以 pXZ10145 为出发质粒构建启动子探测载体的报道,因而在 pAK6 基础上构建了启动子探测载体 pAKC6。从谷氨酸棒杆菌基因组中,采用鸟枪法克隆到两个具有启动子功能的片段,通过测定报告基因编码的氯霉素乙酰转移酶的酶活,初步判断了启动子的强度,应用启动子预测软件对该启动子结构进行了分析。目前,仅有 50 多个谷氨酸棒杆菌启动子的结构获得研究,相对于数千的该菌启动子来说,还是很小的一部分。尽管 pAKC6 的报告基因没有启动子,但仍然表现出较弱的表达。这是因为谷氨酸棒杆菌启动子 -10 区和 -35 区保守性远不如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌,反映了其 RNA 聚合酶的特异性也较低,所以,当报告基因上游存在 A+T 丰富的外源序列时,会引起 RNA 聚合酶随机地识别并起始转录^[17]。由于谷氨酸棒杆菌启动子的一致序列类似于大肠杆菌启动子的一致序列,所以,虽然不呈一一对应的关系,但是谷氨酸棒杆菌强启动子一般在大肠杆菌也有较强的表现。通常克隆有相同启动子片段的载体赋予大肠杆菌对氯霉素的最低抑制浓度为其赋予谷氨酸棒杆菌的 6~10 倍^[4]。这种现象可能是由于同样的穿梭载体在大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌中的拷贝数相差极大所致:穿梭载体使用来自 pUC19 的 ColE 复制子在大肠杆菌中复制,其拷贝数可达数百个,而在谷氨酸棒杆菌中,其仅是中等拷贝数的质粒^[21]。当使用 100~300 μg/mL 的氯霉素平板进行初筛后,获得的克隆子再转化谷氨酸棒杆菌,均不能使该菌在 30 μg/mL 氯霉素平板上生长(数据未列出),表明这些克隆子要么是假克隆,要么是弱启动子克隆;当使用 400 μg/mL 的氯霉素平板进行初筛后,获得了 5 个克隆子,最终证实只有两个(F16 和 F19)具有较强的启动子功能。所以,可以推断当将初筛的氯霉素浓度提高到 600 μg/mL,会排除大多数的假克隆和弱启动子的克隆,提高发现强启动子的机率。

转录是基因表达调控的第一步也是最重要的一

步,通过分离和分析启动子,进而改造和修饰谷氨酸棒杆菌代谢途径中基因的启动子,为优化代谢过程,提高氨基酸产率提供了可能。

参 考 文 献

- [1] Kinoshita O, Udaka S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol*, 1957, **3**:193-205.
- [2] Tauch A, Pühler A, Kalinowski J, et al. Plasmids in *Corynebacterium glutamicum* and their molecular classification by comparative genomics. *J Biotechnology*, 2003, **104**(1-3):27-40.
- [3] Eikmanns B, Kleinertz E, Liebl W, et al. A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled expression, and promoter probing. *Gene*, 1991, **102**(1):93-98.
- [4] Pátek M, Eikmanns BJ, Sahn H, et al. Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology*, 1996, **142**(5):1297-1309.
- [5] Pátek M, Nečvera J, Guyonvarch A, et al. Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnology*, 2003, **104**(1-3):311-323.
- [6] 雷肇祖, 吴菊芬, 王景玉, 等. 工业微生物中质粒 DNA 的检测. *工业微生物*, 1981, **1**(1):1-4.
- [7] 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*, 1993, **9**(3):216-222.
- [8] 任兆瑞, 施少林, 郑兆鑫, 等. 2 个棒杆菌质粒 pXZ10142 和 pXZ10145.1 及其转座子 TN45 的特性分析. *复旦学报(自然科学版)*, 2004, **43**(2):200-205.
- [9] Lei C, Fan C, Zheng Z, et al. Construction of shuttle expression vector and breeding of genetic engineered strains for L-phenylalanine. *Prog Nat Sci*, 1996, **6**(2):244-248.
- [10] Kirchner O, Tauch A. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnology*, 2003, **104**(1-3):287-299.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, 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.
- [12] Liebl W, Bayerl A, Schleifer KH, et al. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **65**(3):299-304.
- [13] Pátek M, Hochmannová J, Eggeling L, et al. Analysis of the leuB gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, **50**(1):42-47.
- [14] Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**(1-3):248-254.
- [15] Shaw WV. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-

- [16] Close TJ , Rodríguez RL. Construction and characterization of the chloramphenicol-resistance gene cartridge : A new approach to the transcriptional mapping of extrachromosomal elements. *Gene* ,1982 , **20** (2) 305 – 316.
- [17] Pátek M , Muth G , Wohlleben W. Function of *Corynebacterium glutamicum* promoters in *Escherichia coli* , *Streptomyces lividans* , and *Bacillus subtilis* . *J Biotechnol* ,2003 ,**104** (1 – 3) 325 – 334.

Construction of *Corynebacterium glutamicum*/*E. coli* shuttle promoter-probe vector

LI Kai^{1,2} , ZHAO Zhi² , ZHANG Ying-zi² , WANG Yu² , DING Jiu-yuan^{2*}

(¹ Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100039 , China)

Abstract :Based on the replication origins of the *C. glutamicum* pXZ10145 and the *Escherichia coli* ColE1 plasmid , a novel *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vector pAK6 was constructed. This vector was able to replicate in *C. glutamicum* and *E. coli* . Plasmid pAK6 carried multiple cloning site useful for gene cloning , kanamycin- and ampicillin-resistance-encoding gene. Furtherly based on the shuttle vector pAK6 , a promoter-probe vector was developed for the isolation of promoter elements from *C. glutamicum* . This vector carried the promoterless chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene as a reporter downstream from useful cloning site. For testing this promoter-probe vector , *C. glutamicum* genomic DNA was digested to completion with *Sau*3AI and the fragments shot-gun cloned into its unique *Bgl* II . Two fragments exhibiting promoter activity were isolated. By measuring CAT activity , the strength of promoter fragments was assayed. After being sequenced , promoter sequences were predicted by using BDGP Neural Network Promoter Prediction V2.2 and the similarities to the regions of the consensus promoter sequence or the known promoters were confirmed.

Keywords : *Corynebacterium glutamicum* ; *Escherichia coli* ; shuttle vector ; promoter-probe vector

* Corresponding author. Tel : 86-10-64807415 ; E-mail : dlingjy@sun.im.ac.cn

Received : 10 July 2006 / Accepted : 9 August 2006 / Revised : 8 September 2006