

黄地老虎颗粒体病毒 DNA 片段在枯草芽孢杆菌中的克隆和启动氯霉素抗性基因表达

郭三堆 邱并生 裴美云 贾士芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

艾秀莲 吴祖银 石玉瑚

(新疆农科院微生物研究所, 乌鲁木齐)

黄地老虎颗粒体病毒(*Agrotis segetum granulosis virus*简称AsGV) DNA和pPL603质粒DNA, 用限制性核酸内切酶EcoR I 酶切后, 再用T₄连接酶连接, 转化枯草芽孢杆菌BR151感受态细胞。然后在10 μ g/ml 氯霉素的 SPBY选择平皿上筛选, 得到了抗氯霉素的转化子。经过琼脂糖凝胶电泳检测, 转化子中的重组质粒比原载体 pPL603 质粒分子量大。由于重组质粒上的抗性表达水平可达250 μ g/ml 氯霉素, 比pPL603质粒抗性表达水平(5 μ g/ml)提高50倍。所以重组质粒携带了有启动作用的 DNA 片段。启动功能片段的分子量, 经琼脂糖凝胶电泳测定约为0.9kb。除进行DNA-DNA分子杂交确证外, 并用重组质粒 pAsGVP15 进行了第二次转化、抗性水平测定和分子量分析。

关键词 启动基因; 黄地老虎颗粒体病毒; 枯草芽孢杆菌

在结构基因前面, 有一些负责基因表达和调控的调节位点, 以及结构基因起始转录和翻译所必须的基因和序列。为了研究这些基因的结构与功能, 在大肠杆菌克隆系统中, 已构建了用于克隆带有启动基因DNA片段的质粒, 并克隆了带有启动子DNA片段^[1-4]。1981年, Williams^[5,6]等人在枯草芽孢杆菌克隆系统中, 也建成了能用于克隆启动基因片段的启动基因探针 pPL603 质粒, 并对此质粒作了遗传学分析。Harwood^[7]等人对 pPL603质粒带有的氯霉素乙酰转移酶结构基因片段序列进行了分析。结果表明, 该质粒带有的DNA片段, 除带有氯霉素乙酰转移酶结构基因外, 还带有起始密码。所以在 pPL603质粒中单一的 EcoR I 位点上可以插入启动该酶基因转录的启动子DNA片段。他们利用这个质粒克隆了地衣芽孢杆菌启

动基因片段, pUB110 质粒上的启动子片段和 SP02 噬菌体的启动子片段。利用带有SP02噬菌体启动子DNA片段的pPL608质粒, 把大肠杆菌的色氨酸基因和小鼠的二氢叶酸还原酶基因, 在枯草芽孢杆菌中进行了克隆并得到了表达^[7]。Caroline等^[8]还组建了能在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中均能复制并表达抗性基因的启动子探针质粒——PCED6。目前在国内外尚未见到AsGV启动基因的克隆以及在枯草芽孢杆菌系统中克隆昆虫病毒启动基因片段的报道。启动基因的克隆, 不仅对研究启动基因的结构与功能有意义, 对进一步研究昆虫病毒基因的调控, 表达以及启动基因应用于启动其它外源基因的表达也将会有一定的意义。本文是在AsGV EcoR I 酶解片段在枯草芽孢杆菌中的克隆的基础上, 利用pPL603质粒克隆AsGV片段得到

使抗性基因在枯草芽孢杆菌得到表达的报道。

材料和方法

(一) 材料

1. 病毒和质粒: 新疆黄地老虎颗粒体病毒 (*Agrotis segetum granulosis virus Xinjiang isolate* 简称 AsGV) 作为 DNA 供体。pPL603 质粒, 带有新霉素抗性基因 (Neo^r) 和一个缺失启动基因的氯霉素乙酰转移酶结构基因 (Cat), 分子量为 3.1 Md, 含有单一的 EcoR I 位点, 作为克隆外源含有启动基因片段探针的载体。

2. 菌株和培养基: 枯草芽孢杆菌 (*B. cillus subtilis*) BR151(*trpC2 metB5 Lys3 Neo^r chr^{*}*) 作为克隆受体菌株。枯草芽孢杆菌 BR151(*trpC2 metB5, Lys3 chr^r, Neu^r*, 带有 pPL603 质粒) 为克隆载体菌株, 由美国 Lovett 教授赠送。

LB 培养基组成 (%): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 5, pH7.2, 8 磅 30min 灭菌, 用于培养菌株。

SBPY 选择培养基组成 (%): 牛肉汁 10, 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 3, 葡萄糖 3, 琼脂 1.5, pH7.2, 8 磅 30min 灭菌后, 补加 5 μ g/ml 新霉素, 10 μ g/ml 氯霉素, 用于选择转化子。每毫升分别补加 50、100、150 及 200 μ g 氯霉素用于检测表达抗性水平。

3. 酶和试剂: 限制性核酸内切酶 EcoR I, T₄ 连接酶系 BRL 公司产品; 枯草芽孢杆菌噬菌体 Spp I DNA 系中国科学院微生物研究所工厂产品^[9]; 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (DNA Polymerase I) DNA 酶 I (DNase I) 系 Sigma 公司产品; 硝酸纤维素膜 BA85 系 Schleicher &

Schüll 公司产品; X 光底片系 Kodak 公司产品; [α -³²P]dCTP 系 UK 产品。

(二) 方法

1. 病毒 DNA 和质粒 DNA 的制备: AsGV DNA 的制备采用直接从纯化的 AsGV 包涵体提取。除在碱水解时加 1% 巯基乙醇外, 其他步骤与以前报道的方法^[10] 相同。质粒 DNA 的制备, 先按 Canosi^[11] 方法提取粗制品, 再经琼脂糖凝胶电泳^[12] 纯化。两种 DNA 制剂经琼脂糖凝胶电泳检查为单一条带, 达到适用纯度。分装后贮存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

2. 感受态细胞的制备和贮存: 按文献方法制备感受态细胞^[13], 加终浓度达 10% 的灭菌甘油, 在液氮中保存待用。

3. 克隆: 下面列出克隆操作过程的略图。

DNA 的酶切、连接和转化的具体条件以及选择转化子的方法详见参考文献 [1]。

AsGV DNA + pPL603 DNA

↓
EcoR I 酶切

↓
T₄ 连接酶连接

↓
转化 *B. Subtilis* BR151 感受态细胞

↓
在 5 μ g/ml 新霉素和 10 μ g/ml 氯霉素的琼脂平板上筛选转化子

4. 转化子检查: 用快速琼脂糖凝胶电泳方法检测重组质粒^[14]。

5. DNA-DNA 分子杂交: EcoR I 酶解的 AsGV DNA 片段用 [α -³²P] dCTP 进行缺刻翻译, 标记出探针, 与用 EcoR I 酶切的重组质粒进行 Southern 法薄膜 DNA 分子杂交^[12, 15, 16]。

6. 重组质粒分子量测定: 在水平琼

脂糖凝胶电泳中测定重组质粒 DNA 分子量^[3]。选用枯草芽孢杆菌噬菌体 SppI DNA 的 EcoR I 酶切片段制作分子量的标准曲线^[17]。

7. 启动基因表达水平的测定^[5]：含有 pAsGVP15 的转化子在含有 10 μ g/ml 氯霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜后，分别涂布在含不同浓度氯霉素的 SBPY 选择培养皿上，37 $^{\circ}$ C 培养 2 天。观察转化子生长情况，以测定启动基因表达水平。

8. pAsGVP15 重组质粒的第二次转化、抗性测定和电泳分析：方法与第一次转化和电泳分析的方法相同。

结果与讨论

(一) 重组质粒带有启动功能片段

AsGV DNA 和 pPL603 质粒 DNA 经 EcoR I 酶切后，用 T₄ 连接酶连接，然后对 *B. subtilis* BR 151 感受态细胞进行转化。37 $^{\circ}$ C 水浴摇床中振荡 90min，涂布在加有 10 μ g/ml 氯霉素和 5 μ g/ml 新霉素的 SBPL 平皿上，37 $^{\circ}$ C 温箱中培养 2—4 天，得到了 15 个抗性转化子。用快速琼脂糖凝胶电泳分析，这 15 个抗性转化子都含有重组质粒。重组质粒的迁移速度比原 pPL 603 质粒慢，分子量比原载体大（图版 I-B）。这 15 个重组质粒迁移速度基本相同，位于同一位置上，所以分子量相似（图版 I-A）。尽管 AsGV DNA 的 EcoR I 酶解片段大小不一（至少有 16 个大小不同片段，未发表资料），插入这 15 个重组质粒的 AsGV DNA 的片段似乎是同一片段，但不排除连接方向的不同。看来用 EcoR I 酶切后，很可能破坏了 AsGV DNA 上的其它启动基因或由于大小不适合和其它原因不能表达，因而在选择培养基上被淘

汰。所以在我们实验的条件下，只能选择出带有此特定的启动功能片段的重组质粒的转化子。我们对其中的一个：pAsGVP 15 重组质粒进行了鉴定。

(二) 启动功能 DNA 片段分子量的测定

选用 Spp I DNA 的 EcoR I 酶解片段为标准分子量，与 pAsGVP15 重组质粒 DNA 和 pPL603 质粒 DNA 的各个 EcoR I

表 1 Spp I DNA 的 EcoR I 酶解片段分子量
Molecular weight of the fragments of
Spp I DNA

片段号码 Fragment No.	分子量 M.W. (kb)
1	7.82
2	6.97
3	5.86
4	4.67
5	3.38
6	2.68
7	1.90
8	1.80
9	1.45
10	1.33
11	1.09
12	0.88
13	0.66
14	0.48
15	0.35

酶解片段，同时在水平琼脂糖凝胶中进行电泳，EB 染色后，在紫外光下照像，测出各 DNA 片段的迁移率。由 Spp I DNA 15 个片段的迁移率绘制出分子量标准曲线（表 1）。由此测出重组质粒 pAsGVP15 中有启动作用的 DNA 片段与迁移率所相对应的分子量（图版 I-C）约为 0.9kb。在测定分子量时，未加误差校正，但 pPL 603 DNA 经 EcoR I 酶解后，在本实验条件下测得分子量为 4.63kb，其实际分子量为 4.65kb，误差范围约为 0.02kb。

(三) 重组质粒上启动功能片段表达水平的测定

在 pPL603 质粒上, 带有一个缺失启动基因的氯霉素乙酰转移酶的结构基因。因此含有 pPL603 质粒菌株在 10 μ g/ml 氯霉素的选择培养基上不能生长。只有将含有启动功能的 AsGV DNA 片段, 克隆到氯霉素乙酰转移酶结构基因前的单一的 EcoR I 位点上以后, 使氯霉素乙酰转移酶的结构基因得以表达。启动基因功能越强, 该酶结构基因表达得就越强, 该菌表现出抗氯霉素的特性就越高。所以, 把重组转化子涂在每毫升含不同浓度氯霉素的 SBPY 选择平皿上测出抗性水平。表 2 所列数据说明该启动功能表达水平超过受体菌株和带有 pPL603 质粒的菌株。

表 2 pAsGVP15 重组质粒氯霉素抗性特性

Table 2 Chloramphenicol resistance of recombinant plasmid pAsGVP15

菌株 strain	氯霉素浓度 μ g/ml concentration (μ g/ml)					
	5	50	100	150	200	250
<i>B. subtilis</i> BR151	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> BR151 (pPL603)	+	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> BR151-P15 (pAsGVP15)	+	+	+	+	+	+

注 - : 不生长 no growth +, 生长 growth

(四) 重组质粒的确证

经过对含有 pAsGVP15 重组质粒抗性转化子抗氯霉素水平的测定, 已确证重组质粒上带有的外源 DNA 片段中含有比较强的启动功能片段。为了进一步确证此启动功能片段是由 AsGV DNA 片段和质粒 pPL603 DNA 重组而成的, 将重组质粒 pAsGVP15 再次进行 EcoR I 酶切检查以及进行 DNA-DNA 分子杂交鉴定。首先将 pAsGVP15 重组质粒 DNA, pPL603 质粒 DNA 和 AsGV DNA 同时用 EcoR I 酶切, 以 pPL603 质粒 DNA 和 AsGV DNA 为对

照, 进行水平琼脂糖凝胶电泳, 图版 I-C 显示出重组质粒 pAsGVP15 出现的二条带, 一条与 pPL603 质粒 DNA 处在同一位置, 是载体带。另一条系外源启动功能片段, 与 EcoR I 酶切的 AsGV DNA 中相应的一个片段也处于同一位置。版图 I-D 显示出 pAsGVP15 与 (α -³²P)dCTP 标记 AsGV DNA EcoR I 片段的探针进行 DNA-DNA 分子杂交试验的结果。除带有外源启动片段的重组质粒 DNA 能与 AsGV DNA 杂交外, pPL603 质粒 DNA, Spp I DNA 片段都没有杂交斑。由此进一步确证重组质粒所带有的一段外源启动功能 DNA 片段来自 AsGV DNA。

(五) pAsGVP15 重组质粒的转化, 抗性表达水平以及快速琼脂糖凝胶电泳检查

为了检查重组质粒的生物学特性和分子量是否与第一次得到的抗性转化子相同, 将 pAsGVP15 重组质粒进行第二次转化和抗性特性的检查。抗性水平与第一次相同 (表 2), 而 pAsGVP15 重组质粒的分子量, 从电泳迁移率观察, 没有发现有任何变化, 与第一次测定的结果 (图版 I-E) 完全相同。这些结果表明重组质粒还是稳定的。

上述试验证明从 AsGV EcoR I 酶解 DNA 片段获得了能使原核生物抗性得以表达的启动功能片段。研究是否枯草芽孢杆菌 RNA 聚合酶识别 AsGV 基因启动子。这是很有意义的现象。根据几十种基因的启动子核苷酸顺序分析, 已得出一个具有功能基因的共同规律, 即在转录起始的 5'-端有 TATATA 和 TTGACA 序列。杆状病毒苜蓿丫纹夜蛾核多角体蛋白基因全序列确有这类序列结构^[18, 19]。因此可以推想 pAsGVP15 也有这种规律的可能性。另外从表 2, 3 可以看出 pAsGVP15 的抗性

表 3 各种质粒的氯霉素抗性
Table 3 Chloramphenicol resistance of
various plasmids

质粒 Plasmid	插入片段 分子 量 insert M. W. (10 ⁶)	插入片段来源 source of insert	氯 霉 素 最高含量 maximum chr ^t	文 献 refer- ence
pPL608	0.21	EcoR I -SP02	200	5
pPL913	0.15	EcoR I -Bac- illus licheniformis	200	5
	1.0	同上	100	5
pAsGVP15	0.9	EcoR I-AsGV	250	

水平较 pPL603 等质粒为高。当 pPL613 插入 EcoR I -*B. licheniformis* 片段为 0.15kb 时, 抗性为 200 μ g/ml。插入片段, 如为 1.0kb 时, 最高抗性只达 100 μ g/ml。看来 pAsGVP15 中插入 0.9kb 片段, 就达到 250 μ g/ml 的水平, 表明来自 AsGV 片段的功能强, 如果进一步裁剪, 启动抗性表达水平还能提高。

参 考 文 献

(1) An, G. & I.D.Friesen: *J. Bacteriol.*, 140:400—410, 1979.

- (2) Casadaban, M.J. et al.: *J. Bacteriol.*, 143:971—980, 1980.
- (3) Casadaban, M.J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 138:198—207, 1980.
- (4) Clowew, R.C.: *Bacteriol. Rev.*, 36:361—405, 1972.
- (5) Williams, D.M. et al.: *J. Bacteriol.*, 146:1162—1165, 1981.
- (6) Williams, M.D. et al.: *Gene*, 16:199—206, 1981.
- (7) Harwood, C. et al.: *Gene*, 24:163—196, 1983.
- (8) Caroline, E.D. et al.: *J. Bacteriol.*, 157:965—967, 1984.
- (9) 郑文尧, 微生物通报, 11:229, 1984.
- (10) 裴美云等: 微生物学报 25: , 1985.
- (11) Canosi, U. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 166:259—267, 1978.
- (12) 郭三堆等: 微生物学报, 25:38—44, 1985.
- (13) 郭兴华等: 微生物学报, 22:263—268, 1982.
- (14) 郭三堆等: 待发表
- (15) Liu Liang-Shi, et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 188:27—36, 1982.
- (16) Kourisky, P.H. et al.: *Biochimie*, 56:1215—1221, 1974.
- (17) 郭三堆, 遗传, 3:37—39, 1981.
- (18) Morelli, L. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 164:93—97, 1978.
- (19) Gale, E.S. et al.: *Mol. & Cellular Biol.*, 3:2156—2165, 1984.

CLONING RESTRICTION FRAGMENT FROM AGROTIS SEGETUM GRANULOSIS VIRUS DNA THAT PROMOTE EXPRESSION OF CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE GENE IN *BACILLUS SUBTILIS*

Guo Shandui Qiu Bingsheng Pei Meiyien Jia Shifang
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Ai Shilian Wu Zuyin Shi Yuhu
(Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi)

Agrotis segetum granulosis virus (AsGv) DNA and plasmid pPL603 DNA were digested with EcoR I, ligated with T₄ ligase, then transformed into competent cell of *B. subtilis* BR151. Chr['] transformants were selected on medium containing 10μg of chloramphenicol per ml, and examined by agarose electrophoresis procedure contained plasmid having a molecular weight greater than pPL603. pAsGVP15 recombinant plasmid did confer high-level chr['] (250μg/ml), about 50 fold than pPL603 (5μg/ml), so that suggested the expression in pAsGVP15 was dependent on a 0.9Kb promoter-containing fragment from AsGV DNA, which identified by DNA-DNA hybridization.

Key words

Promote; *agrotis segetum granulosis virus*; *Bacillus subtilis*

图 版 说 明

A. 重组质粒pAsGVP1—15的凝胶电泳图

The electrophoresis pattern of recombinant plasmid pAsGVP1—15

B. 重组质粒与原载体在凝胶电泳中的比较

Comparison of the recombinant plasmid to original vector in agarose gel electrophoresis

左 1 left 1, pPL603

左 2—8 left 2—8 pAsGVP1, pAsGVP3, pAsGVP5, pAsGVP7, pAsGVP9, pAsGVP11, pAsGVP13, pAsGVP15

C. 重组质粒pAsGVP15中插入片段的大小

Molecular weight of insert fragment of recombinant plasmid pAsGVP15

1. pPL603; 2. pAsGVP15; 3. AsGV; 4. Spp I

D. 重组质粒pAsGVP15的分子杂交鉴定

Molecular hybridization of recombinant plasmid pAsGVP15 by Southern blot

1. pPL603 2. pAsGVP15 3. AsGV 4. Spp I

E. 重组质粒pAsGVP15重新转化到*B. Subtilis* BR151后在琼脂糖凝胶电泳中加以鉴定

Recombinant plasmid pAsGVP15 retransformed and examined by agarose gel electrophoresis

1. pPL603 2,3. pAsGVP15

郭三堆等：黄地老虎颗粒体病毒DNA片段在枯草芽孢杆菌中的克隆和
启动氯霉素抗性基因表达

图版 I
Plate I

Guo Shandui et al.: Cloning restriction fragment from agrotis segetum
granulosis virus DNA that promote expression of
chloramphenicol acetyltransferase gene in *Bacillus subtilis*

