

谷氨酸棒状杆菌质粒pXZ10145的限制 酶图谱和嵌合质粒的组建

郑兆鑫 马楚平 严维耀 贺沛富 毛宜祥 孙 薇

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

雷肇祖 朱 平 吴菊芬

(上海工业微生物研究所, 上海)

从谷氨酸棒状杆菌中已经分离到质粒pXZ10145,该质粒带有氯霉素抗性。通过电子显微镜和BamH I 酶切后在1%琼脂糖凝胶电泳上测定 pXZ10145质粒的大小为5.3kb。用BamH I、Pst I、EcoR I、Sal I等限制酶进行酶切,并用BamH I + Sal I、BamH I + Pst I、Pst I + Sal I、EcoR I + Pst I、EcoR I + BamHI等双重酶切,得到pXZ10145限制性内切酶的图谱。证明BamH I和Pst I为单一酶切点。将pXZ10145与pBR322利用BamH I切点连接得到一嵌合质粒pXZ34。这一质粒能在大肠杆菌中复制,在大肠杆菌中表现有氨苄青霉素和氯霉素的抗性,但是抗氯霉素的能力大大降低,只抗2 γ /ml。

关键词 棒状杆菌质粒; 限制酶图谱; 嵌合质粒; pBR322

七十年代以来,遗传工程技术迅速发展,已用来合成激素、干扰素、病毒疫苗及其他医药和化学产品。在改造动物及植物品种方面也有巨大的潜力。当前遗传工程技术中使用的载体和受体系统主要是大肠杆菌系统。由于大肠杆菌带有内毒素,在产品分离提取上困难较多,不是理想的发酵生产菌株,因此近年发展枯草杆菌系统。枯草杆菌虽然是传统的发酵生产菌株,对人畜无害,菌体生长迅速。但是蛋白酶分泌较多,容易使基因编码的蛋白质产物分解。棒状杆菌是氨基酸发酵工业中主要的生产菌株之一,它生长迅速,对人畜安全,而且不会分泌大量的体外蛋白酶,有利于积累大量的蛋白质。棒状杆菌可用来生产谷氨酸、核苷酸等10多种发酵工业产品,有很高的经济价值。此外,对于棒状杆菌的生理、生化、氨基酸的生物合成途径与代

谢调节过程都已进行过大量研究。因此从棒状杆菌中分离质粒,组建新的载体、受体系统,建立DNA重组技术,将为氨基酸、核苷酸发酵菌株的选育和棒状杆菌的代谢与遗传之间关系的研究提供有力的手段。

近年来,国外已经从棒状杆菌中分离到隐蔽型质粒(Koneko等^[2]; Sandoval等^[3]; Miwa等^[4])和带有抗菌素抗性的质粒(Katsumata等^[5]; Santamaria等^[6])。我国雷肇祖等^[1]从谷氨酸棒状杆菌1014菌株(*Corynebacterium glutamicum* 1014)中分离到质粒。我们分离、提纯了质粒DNA,进一步研究质粒对氯霉素的抗性,测定质粒的大小和限制性内切酶图谱,并与大肠杆菌的pBR322质粒连接获得嵌合质粒。

本文于1986年8月16日收到。

材 料 与 方 法

(一) 菌株与培养基

1. 菌株: 棒状杆菌1014菌株(*Corynebacterium glutamicum* 1014)由上海工业微生物研究所提供, 该菌株带有氯霉素抗性的质粒。

大肠杆菌C600菌株, 复旦大学遗传学研究所保藏。

2. 质粒: 棒状杆菌质粒 pXZ10145 带有氯霉素抗性, 存在于棒状杆菌1014菌株中。大肠杆菌质粒 pXZ2^[7], pSC101 和 pBR322 分别存在于大肠杆菌C600中。上述质粒均由复旦大学遗传学研究所保藏。

3. 培养基: 棒状杆菌的培养基为(%) : 蛋白胨 1, 氯化钠 0.5, 牛肉膏 1, pH7.2, 培养质粒时加入 20 μ g/ml 氯霉素。培养大肠杆菌用LB培养基^[8]。

(二) 方法

1. 质粒DNA的分离纯化: 参考Clewell等^[9]方法, 并作了较大修改, 方法如下: 提取棒状杆菌质粒DNA时, 先将菌株接种于30ml培养液中, 37 $^{\circ}$ C振荡培养24h, 然后用1/20的体积转接到新鲜培养液中, 每2000ml三角瓶装培养液250ml, 在往复式摇床上37 $^{\circ}$ C振荡培养24h。提取质粒采用氯化铯密度梯度离心法。1000ml菌液用Beckman JA 21离心机在7000rpm离心10min。沉淀菌体, 然后悬浮于30ml 50mM Tris 缓冲液中 (pH8.0), 再以7000rpm离心, 沉淀悬浮于9ml TNE缓冲液 (Tris 30mM pH8.0, EDTA 50mM, NaCl 50mM)。加入2ml溶菌酶溶液(25 mg/ml), 置于37 $^{\circ}$ C水浴中保温40min, 缓慢搅动, 加入5ml TE缓冲液 (250mM EDTA, 50mM Tris pH8.0), 混合后继续在37 $^{\circ}$ C保温20~40min。滴加20% SDS

2.5ml, 继续放37 $^{\circ}$ C保温10min。30000 rpm离心30min, 除去细胞碎片, 得到透明裂解液。该裂解液在TE缓冲液 (10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA) 中透析2h除去SDS。收集透明裂解液, 在每ml裂解液中加入1.1g氯化铯和0.1ml溴乙锭 (10mg/ml), 离心40000rpm 40h, 15 $^{\circ}$ C, 离心后吸出质粒DNA, 加入异戊醇萃取溴乙锭, 重复3~4次, 直至红色完全去除。如果发现蛋白质可加入等体积的酚: 氯仿 (1:1), 重复抽提数次直至两相间无白色中间层为止。最后加入1/10体积的2M醋酸钠和2.5倍体积的无水乙醇, 置于-20 $^{\circ}$ C下过夜。在10000rpm下离心10min, 去除上清, 将DNA悬浮于TE缓冲液 (10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA) 中, 即得到提纯的质粒DNA。

2. 大肠杆菌质粒 pXZ2, pSC101 和 pBR 322 的提取: 均按 Clewell 等的方法^[9]。

3. 质粒DNA的电泳分析: 用1%琼脂糖凝胶, 以Tris-NaAc缓冲液 (40mM Tris-HCl, 20mM NaAc, 2.5mM EDTA, pH8.0) 作为电泳缓冲液, 电泳时电压为100V, 在室温下电泳3h。

4. 限制性内切酶酶解: 本文中所应用的限制性内切酶从Biolabs或Boehringer Mannheim公司购买, 酶切条件按上述公司介绍的方法。

5. 质粒分子大小的测定: 测定质粒分子的大小, 分别应用电子显微镜测量和凝胶电泳法测量。用电子显微镜测定棒状杆菌质粒DNA分子的大小是用pSC101与pXZ2质粒作为内标。在琼脂糖凝胶上测定棒状杆菌 pXZ10145 质粒大小是测定经 BamH I 酶切后产生的片段大小, 以 λ 噬菌体DNA经Hind III酶切后的DNA片段作为标准。

6. 质粒的转化: 重组质粒 pXZ34 转化大肠杆菌 C600 按照 Cohen 等^[10]的方法。

7. 质粒消除: 带有质粒 pXZ10145 的菌种培养在肉汤培养基中 (含氯霉素 20 μg/ml)。37℃ 培养过夜, 取一接种环菌液加入带有吡啶橙 (50 μg/ml) 的培养基中, 37℃ 避光振荡培养 24—28h。每一肉汤平板涂皿 0.1ml, 菌落长出后, 检出失去氯霉素抗性的菌株。

结果与讨论

(一) pXZ10145 质粒的消除

为了确定 pXZ10145 质粒是否带有氯霉素抗性基因, 对携带 pXZ10145 质粒的棒状杆菌进行消除试验, 经吡啶橙处理后, 共检查了 450 个菌落, 其中对氯霉素敏感的有 14 株。质粒消除的比率为 3.1%。而在相同条件下, 不加吡啶橙的对照组, 检查了 500 个菌落, 未发现对氯霉素敏感的菌落。质粒消除后的菌株再培养在肉汤培养基内, 并抽提其质粒 DNA, 发现这些菌株全部不带有质粒。结果证明, 抗氯霉素基因是携带在 pXZ10145 质粒上。

(二) 棒状杆菌质粒的电子显微镜观察与质粒大小的测定

将提纯的样品进行电子显微镜观察, 并在电子显微镜下测定质粒的大小, 以 pXZ2 质粒和 pSC101 质粒为内标, 证明质粒大小为 4.9kb (图版 I-1), 用 BamH I 酶切后, 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 测定质粒大小为 5.3kb, 两者比较接近。

(三) pXZ10145 的限制性内切酶图谱

用限制性核酸内切酶 BamH I、Pst I、EcoR I、Sal I 等进行酶切, 同时用 BamH I + Sal I、BamH I + pSt I、Pst I

+ Sal I、EcoR I + Pst I、EcoR I + BamH I 等进行双酶酶切。pXZ10145 酶切后得到的片段如表 1。电泳结果见图版 I-2、I-3。根据酶切的结果可以推算出各种限制性内切酶的切点, 它的限制性内切酶图谱见图 1, 该图说明 pXZ10145 质粒的单一切点有 BamH I 和 Pstp I。

表 1 pXZ10145 质粒限制性内切酶酶切片段的大小

Table 1 Plasmid pXZ10145 restriction

fragments

酶的种类 Restriction endonuclease	切点数 Restriction sites	片段大小 Size of fragments (bp)
BamH I	1	5300
Pst I	1	5300
Sal I	2	4100, 1200
EcoR I	2	4660, 640
BamH I + Sal I	3	4000, 1200, 100
BamH I + Pst I	2	4900, 400
Pst I + Sal I	3	3600, 1200, 500
EcoR I + Pst I	3	3560, 1100, 640
EcoR I + BamH I	3	3160, 1500, 640

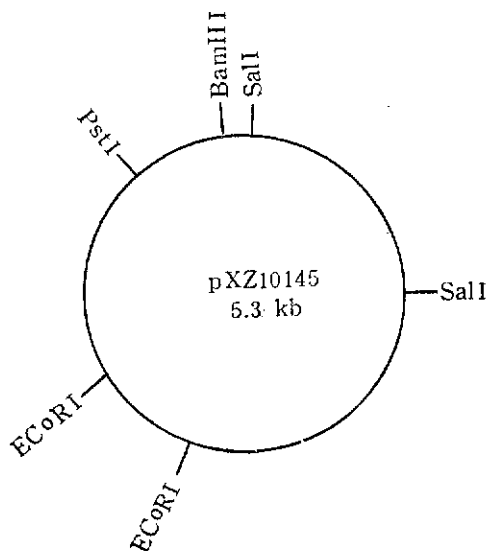


图 1 pXZ10145 质粒的限制性内切酶图谱
Fig. 1 Restriction map of the plasmid pXZ10145

(四) 嵌合质粒 pXZ34 的组建

遗传工程受体中大肠杆菌是研究最深

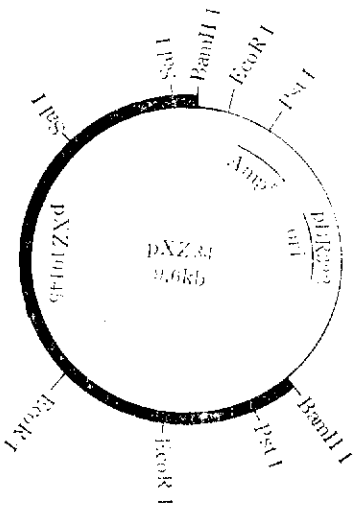


图 2 pXZ34 质粒的限制性内切酶图谱
Fig. 2 Restriction map of the plasmid pXZ34

入的受体系统。它容易进行 DNA 重组技术操作，而且比较好的维持质粒载体原有遗传结构的能力，可以避免质粒载体在细胞中产生 DNA 碱基缺失、重排等突变

现象。因此将棒状杆菌的质粒与大肠杆菌的质粒连接，组建能在大肠杆菌中复制的嵌合质粒很有意义，我们将 pXZ10145 与 pBR322 进行克隆，筛选嵌合质粒。用 BamH I 分别酶切二种质粒，然后用 T4 连接酶连接，大肠杆菌 C600 作为受体菌株。嵌合质粒转化以后选择 Ap^r 和 Tc^s 的菌株。分离出来的嵌合质粒大小为 9.6kb 称为 pXZ34。该质粒再用 BamH I 酶切便产生二个片段，一个是 pXZ10145；另一个是 pBR322 (图版 I - 4)。若 pXZ34 用 Pst I 酶切也产生二个片段，其中一个片段是 6.4kb，另一个片段为 3.2kb，这是由于在 pXZ34 质粒上有二个 Pst I 酶切位点。从二个 Pst I 酶切片段的大小，可以确定 pXZ 10145 插入 pBR322 的方向 (图 2)。这一嵌合质粒能在大肠杆菌中复制，对氨苄青霉素和氯霉素都有抗性，但是抗氯霉素能力大大降低，只抗 $2\gamma/ml$ 的氯霉素。

参 考 文 献

- [1] 雷荣祖等：工业微生物，(1):1—4，1981。
- [2] Koneko, H. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 43:867—868, 1979.
- [3] Sandoval, H. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19:409—413, 1984.
- [4] Miwa, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 48: 2901—2903, 1984.
- [5] Katsumata, R. et al.: *J. Bacteriol.*, 159:306—311, 1984.
- [6] Santamaria, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 130:2237—2246, 1984.
- [7] Zheng, Z.X. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 9:6265—6278, 1981.
- [8] Lennex, E.S.: *Virology*, 1:190—206, 1955.
- [9] Clewell, D.B. and Helinski, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 62:1159—1166, 1969.
- [10] Cohen, S.: *Nature*, 263:731—738, 1976.

RESTRICTION ENDONUCLEASE MAP OF PLASMID pXZ10145 IN *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* AND THE CONSTRUCTION OF COMPOSITE PLASMID

Zheng Zhaoxin Ma Chuping Yan Weiyao He Peifu
Mao Yixiang Sun Wei

(*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai*)

Lei Zaozu Zhu Ping Wu Jufen
(*Institute of Industrial Microbiology, Shanghai*)

Some strains of *Corynebacterium* are main producing organisms in amino acid fermentation. It is important to investigate the structure and function of genes in relation to the amino acid biosynthetic processes. The study of the plasmid of *Corynebacterium* will undoubtedly provide tools for the investigation of structure and function of genes, and also be useful for the application of genetics engineering techniques.

The plasmid of pXZ10145 has been isolated from one strain of *Corynebacterium glutamicum* 1014. The plasmid pXZ10145 confers chloramphenicol resistance. The size of pXZ10145 is 5.3kb as determined by means of electrophoresis on 1% agarose gel digested with BamH I. The restriction endonuclease map of plasmid pXZ 10145 was determined with BamH I, Pst I, EcoR I, Sal I, and double digested with BamH I + Sal I, BamH I + Pst I, Pst I + Sal I, EcoR I + Pst I, EcoR I + BamH I, Figure 1 shows the restriction map of pXZ10145.

One composite plasmid has been constructed from plasmid pXZ10145 and pBR322. Joining plasmid pXZ10145 with pBR322 through their single BamH I sites resulted in the plasmid pXZ34. This plasmid was capable of replication in *E. coli*, expressed ampicillin resistance in *E. coli* and lower chloramphenicol resistance about 2r/ml.

Key words

Corynebacterium glutamicum; restriction endonuclease map;
composite plasmid; pBR322

图 版 说 明

1. pXE10145质粒的电子显微镜观察

Electronmicrograph of plasmid pXZ10145

2. pXZ10145质粒经限制性内切酶酶解后DNA片段的电泳分析。测定DNA片段大小量以 λ 噬菌体DNA用Hind III酶解和pBR332用Rsa I酶解后的DNA片段作为测定标准

pXZ10145 digested with restriction endonucleases. Electrophoresis was for 3 h at 100 V in a 1% agarose gel in Tris-NaAc buffer. Measurements were made using λ -Hind fragments and pBR322-RsaI fragments as a standard

1. BamHI; 2. Sall; 3. BamHI + Sall; 4. PstI; 5. PstI + BamHI; 6. Sall + PstI; 7. pBR322-RsaI; 8. λ DNA-Hind III

3. pXZ10145质粒经限制性内切酶酶解后DNA片段的电泳分析

pXZ10145 digested with restriction endonucleases

1. pBR322-RsaI; 2. EcoRI + PstI; 3. EcoRI + BamHI; 4. EcoRI

4. 嵌合质粒pXZ34经限制性内切酶酶解后DNA片段的电泳分析

Agarose gel electrophoresis of plasmid pXZ34 digested with restriction endonucleases

1. pXZ34-BamHI; 2. pXZ10145-BamHI; 3. pBR322-BamHI; 4. pXZ34-PstI; 5. λ DNA-Hind III

Zheng Zhaoxin et al.: Restriction endonuclease map of plasmid pXZ10145
in *Corynebacterium glutamicum* and the construction of composite plasmid

