

# 大肠杆菌脯氨酸基因的体内克隆及表达

王敖全 焦红\* 陈秀珠 黄和容

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用含mini-Mu的多拷贝质粒pEG5005体内克隆了大肠杆菌脯氨酸基因ProA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>,其Pro<sup>+</sup>克隆频率为 $1.46 \times 10^{-3}/\text{Kan}^r$ 转导子。遗传和生化分析表明这些克隆的Pro<sup>+</sup>基因位于质粒上,用生长谱法对若干克隆子作了脯氨酸产量测定,但未检测出脯氨酸的积累。通过细胞内诱变Pro<sup>+</sup>克隆pPR3获得的去反馈抑制突变质粒pPR7,在脯氨酸ProAB基因缺失的寄主中可积累0.35mg/ml的脯氨酸,将此克隆转移至产1mg/ml脯氨酸的受体菌,其产量达2.5mg/ml,比受体高2.5倍,比供体提高了7倍,文中还对pEG5005和克隆pPR3作了内切酶分析。

**关键词** 体内克隆; 脯氨酸; PEG5005

体内基因克隆指在转座子的参与下通过细胞内DNA重组过程,将目的基因克隆到载体的过程。与体外基因克隆比较,它不需要各种昂贵的生化试剂和核酸酶类,实验操作比较简单,获得克隆的周期短,频率高,因此是基因工程中很有潜在价值的DNA重组技术之一。Windass等已将大肠杆菌谷氨酸脱氢酶基因克隆到有广泛寄主范围的RP4质粒,并通过接合转移,将此克隆引入到*Methylophilus methylotrophus*有效提高了从甲醇转变成单细胞蛋白质的转化率<sup>[1]</sup>。Thega等将大肠杆菌 $\beta$ -hydroxydecanoxy l thioester dehydrase基因克隆到多拷贝质粒R6K,使该酶产量提高了11倍<sup>[2]</sup>。最近Casadaban等构建了可将大肠杆菌基因体内克隆到ColE1质粒的克隆载体<sup>[3]</sup>。这个载体是由微小Mu上连接一个ColE1型复制子和转座子Tn5的卡那霉素抗性标记组成,既是转座子可转座,又是多拷贝质粒可进行无性繁殖。本文报道应用这个体内克隆系统于大肠杆菌氨基酸基因克隆及其表达的研究结果。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 实验菌株、质粒和噬菌体: 见表1。

2. 培养基: 丰富培养基用LB, 基础培养基M9, Mu噬菌体效价测定用R培养基<sup>[4]</sup>, 发酵培养基组成(g/L): 葡萄糖50, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.8, FeSO<sub>4</sub> 0.01, MnSO<sub>4</sub> 0.01, 维生素B<sub>1</sub> 0.001, 酵母粉0.5, 氨基酸(需要时补加0.075)灭菌后加无菌CaCO<sub>3</sub> 25, 用KOH调pH到7.0。所用抗菌素和各种氨基酸浓度: 丰富培养基中卡那霉素和青霉素均为50 $\mu$ g/ml, 基础培养基抗生素量减半, 补加氨基酸20 $\mu$ g/ml(除文中指出的以外)。

### (二) 方法

1. 培养液中L-脯氨酸的定性测定:

本文于1989年1月14日收到。

本工作曾得到陈琦研究员, 方佩静研究员的帮助, 特此致谢。

\* 现在地址: 武汉大学生物系。

表 1 实验菌株、质粒和噬菌体  
Table 1 Strains plasmids and phages

菌株 Strain	遗传型 Genotype	来源 Source
MH125	<i>leu::Mucts</i>	M.M.Show
CSH26	<i>araΔ(pro AB lac)thi</i>	J.H.Miller
CSH26Mucts	<i>araΔ(pro AB lac)thi, Mucts</i>	本工作
C600	<i>thrB leu</i>	Institute collection
MH125Dp <sup>r</sup>	<i>leu::Mucts Dp<sup>r</sup></i>	本工作
MH125/pEG5005	<i>leu::Mucts carry pEG5005</i>	本工作
MH125Dp <sup>r</sup> /pPR3	<i>leu::Mucts carry pPR3</i>	本工作
MH125Dp <sup>r</sup> /pPR7	<i>leu::Mucts carry pPR7</i>	本工作
质粒 Plasmid		
pEG5005	Mucts A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> Kan <sup>r</sup> rep pMB1 Amp <sup>r</sup>	M.J.Casadaban
pPR3	Mucts A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> Kan <sup>r</sup> rep pMB1 with Pro <sup>+</sup>	本工作
pPR7	Mucts A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> Kan <sup>r</sup> rep pMB1	本工作
噬菌体 Phage		
Mucts	Mucts62	M.M.Show
Mud5005	Mucts A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> Kan <sup>r</sup> rep pMB1	M.J.Casadaban

在新华 1 号层析纸上点样, 溶剂系统为正丁醇:乙酸:水为5:2:2, 以 1% 吡啶-乙醇-乙酸溶液作为显色剂, 70℃显色。

2. 培养液中L-脯氨酸的定量测定: 采用生长谱法和比色法<sup>[5]</sup>。

3. Mucts溶源菌的分离: 将待溶源化的对数生长期培养物0.1ml涂于含Mg<sup>2+</sup>Ca<sup>2+</sup>的LB培养基上, 再放一滴Mucts噬菌体于此培养基平皿中央, 30℃培养 36h, 挑取在滴有Mucts的区域长成的菌落于同样培养基上划线分单菌落, 约50—80%菌落为Mucts溶源菌。

4. Mucts噬菌体裂解物的制备和效价测定: 将上述溶源菌的过夜培养物用含2.5mmol/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O的LB液按1:50稀释, 放30℃摇床培养至对数期(细胞浓度为2×10<sup>8</sup>/ml)移至42℃水浴诱导25min, 然后在37℃水浴摇床振荡培养2h直至完全裂解, 加1%氯仿振荡数秒钟后离心去细胞碎片, 保存上清液作效价测定。以2.5ml含MgSO<sub>4</sub>的LB液稀释Mucts裂解

物, 分别吸0.1ml与等体积的Mucts敏感菌混合后, 加入2.5ml R上层琼脂培养基, 摇匀后倾至R底层培养基上, 30℃培养过夜, 计数透明斑。Mud5005裂解物的制备, 除过夜培养需补加卡那霉素外同Mucts。

5. Mucts或Mud5005的感染: 取0.1ml Mucts或Mud5005裂解物与等体积过夜培养的受体菌混合, 30℃吸附30min后加入2ml LB培养液, 置30℃摇床培养75min以利于基因表达。

6. 质粒的提取和转化: 参考文献<sup>[6]</sup>。

7. 质粒的体内诱变: 将含待诱变质粒细胞于补加卡那霉素的LB液30℃培养至对数期, 以亚硝基胍作诱变处理, 处理细胞于新鲜的LB液30℃振荡培养1h后快速法提取质粒DNA, 用此质粒DNA转化适当受体以选择质粒突变

## 结果与讨论

### (一) 脯氨酸 Pro A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 基因的体内

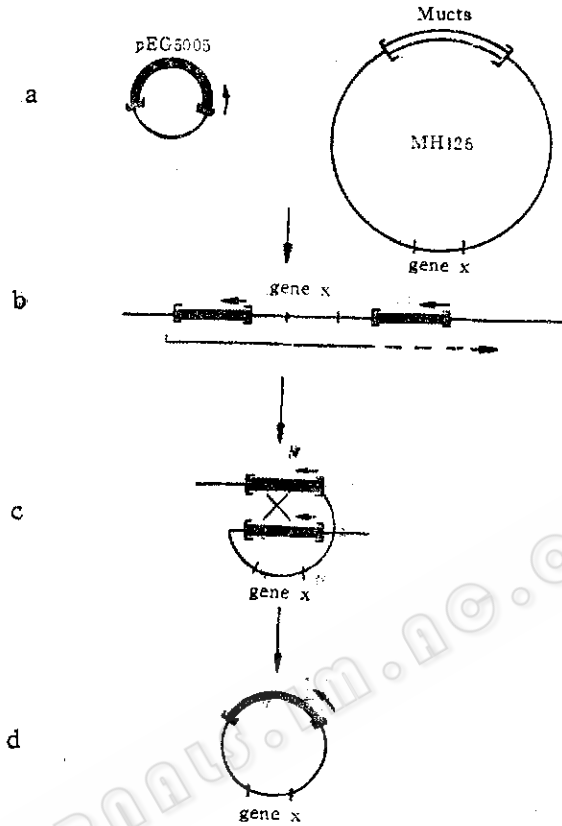


图 1 基因的体内克隆

Fig. 1 Genes cloning in vivo

a. 含mini-Mu复制子（重线表示）的pEG5005通过转化引入Mucts（双线表示）的溶源菌MH125中  
 A plasmid containing a Mu replicon, pEG5005 (filled bar) is introduced to Mucts (open bar) lysogenic cell MH125 by transformation

b. 热诱导使Mu复制而转座形成二个方向相同的Mu

When cells are induced for growth an intermediate in the cloning process is presumed to be formed. When a copy of the mini-Mu integrated near gene x and another copy of mini-Mu replicon integrates near in the same orientation on the other side. Packaging then proceeds by head full mechanism from left side of mini-Mu, including gene x sequences and at least a part of the other mini-Mu or Mucts to a total of 39 kb

c. 感染受体菌后在同源 Mu 顺序间发生重组

After infection of a recipient cell recombination can occur between Mu homology region to form a plasmid

d. 形成携带外源基因x的重组质粒

Hybridized plasmid containing gene x is formed

### 克隆

pEG5005是由最小Mu上连接ColE1复制子Amp<sup>r</sup>和 Tn5 的卡那霉素抗性基因构成，它作为噬菌体在辅助噬菌体存在下可复制而转座，作为质粒可进行转化，我们利

用这个复合载体体内克隆脯氨酸基因的原理和过程如图1。首先通过转化将pEG5005引入Mucts溶源化的MH125菌株，然后将该菌株热诱导使 Mucts和 Mud5005（此系pEG5005作为噬菌体的编号）复制而转

座, 由于 Mu 的转座具有很高的随机性, 拟克隆基因二侧有可能插入方向相同的二个 Mu 噬菌体, 一侧为 Mud5005, 另一侧可能为 Mucts 或 Mud5005, 因为 Mud5005 仅 10.4kb 当它自左至右复制形成 39kb 完整的颗粒时, 可包入约 28kb 外来 DNA 片段, 因此包入的外来 DNA 片段不仅可能含拟克隆基因而且也可能带有另一侧的部分 Mu。当用有这样结构的噬菌体去感染受体细胞时, 二个 Mu 噬菌体的同源部分便发生重组, 形成带有目的基因的杂种质粒。实验用  $6.6 \times 10^8$  细胞/ml 的 Mud5005 裂解液感染脯氨酸基因缺失株 CSH26Mucts, 分别涂布 LB + Kan 和 M9 + Kan 固体培养基平皿, 选择 Kan<sup>r</sup> 和 Pro<sup>+</sup>Kan<sup>r</sup> 转导子, 前者的频率为  $3.8 \times 10^{-4}$  噬菌体斑, 后者为  $5.57 \times 10^{-7}$  噬菌体斑, 因此获得 Pro<sup>+</sup> 克隆的频率为  $1.46 \times 10^{-3}$  / Kan<sup>r</sup> 转导子, 由于多拷贝质粒整入染色体是致死的, 故用此系统获得的 Kan<sup>r</sup> 转导子不大可能是 pEG5005 整入染色体的结果。我们检查了从 LB + Kan 上获得的 Kan<sup>r</sup> 转导子, 挑取 100 个, 用无菌牙签分别复印到 LB + Amp, LB + Kan 固体培养基平皿, 有 68 个为 Amp<sup>r</sup>, 32 个为 Amp<sup>r</sup>, 已知青霉素抗性基因 Amp<sup>r</sup> 位于 mini-Mu 的一侧, 因此, 前者可能是二个同源重组的结果, 而且包入了外来 DNA 片段, 后者则可能是单一 pEG5005 转化的结果, 任意挑取 10 个 Amp<sup>r</sup> 和 Amp<sup>r</sup> 菌落提取质粒进行琼脂糖电泳。Amp<sup>r</sup> 菌落所含质粒均变大, Amp<sup>r</sup> 菌落含质粒与 pEG5005 相同 (照片未列出)

### (二) 克隆子的证实

为了证明上述体内克隆法获得的 Pro<sup>+</sup> 转导子确实含有脯氨酸基因克隆, 我们从遗传和生化二方面对转导子作了分析。将 M9 固体培养基平皿上获得的 Pro<sup>+</sup>Kan<sup>r</sup> 转导子, 提取质粒, 转化 CSH26, 在 LB + Kan

的平皿上选择 Kan<sup>r</sup> 转导子, 用无菌牙签挑取 100 个菌落分别点于 M9, M9 + Pro 培养基, 如果 Pro<sup>+</sup> 基因位于 pEG 5005 上, 那么每个 Kan<sup>r</sup> 转导子应为 Pro<sup>+</sup>, 结果与预期相符合, 100 个 Kan<sup>r</sup> 转导子均为 Pro<sup>+</sup>。反之, 从 M9 固体培养基上挑取 100 个 Pro<sup>+</sup>, 点于 LB + Kan 培养基 100% 为 Kan<sup>r</sup>, 因此可得出结论, Pro<sup>+</sup> 基因与 pEG5005 是连锁的。任挑 8 个 Pro<sup>+</sup> 克隆子, 纯化后提质粒。以 pEG5005 为对照进行琼脂糖电泳, 结果示于图版 I - 1, 由图可清楚看出每个 Pro<sup>+</sup> 克隆子的质粒均有不同程度的增大。

### (三) 克隆子的体内诱变

我们对由体内克隆法得到的 500 个 Pro<sup>+</sup> 克隆作了产酸测定。生长谱法测定的结果表明无一能过量积累脯氨酸, 这是因为脯氨酸生物合成有着复杂的调控机制, 可能涉及的机制有脯氨酸对生物合成第一个酶的反馈抑制和对生物合成途径中各酶形成的阻遏以及其它转录和翻译水平上的调控, 在不改变这些调控的条件下, 带有野生型脯氨酸操纵子菌株一般不会产生过量的脯氨酸。通过基因克隆虽然增加了脯氨酸的基因剂量, 但整个调控机制未变, 因此不能测出野生型脯氨酸克隆的产量不足为怪。为使克隆产脯氨酸, 我们用体内诱变克隆的方法分离去反馈抑制的突变克隆。实验用 CSH26Mucts/pPR3 为出发株, 用 NTG 处理细胞后提取质粒, 再转化 CSH26Mucts, 在含 20 $\mu$ g/ml D-proline 的 M9 培养基平皿上选择 Dp<sup>r</sup> 转化子, 测定了 200 个这样的转化子, 得到一株 CSH26Mucts/pPR7 产酸 0.35mg/ml。虽然诱变处理的是整个含 Pro<sup>+</sup> 的 pPR3 克隆细胞, 但通过转化获得的 Dp<sup>r</sup> 突变必定发生在 pPR3, 因为染色体 DNA 不能转化, 只有质粒才能转化。同时作为质粒转化的受体缺失 proAB 基因, 而已知抗 D-proline 突

变发生在 *proB*, (7) 因此  $Dp^+$  突变也不可能发生于受体。为进一步证明突变发生于 *pPR3*, 我们将经过反复纯化后的  $Pro^+Dp^+$  转化子提取质粒, 再次转化 *CSH26Mucls*, 在不加 *D-proline* 的 *M9* 培养基上选择  $Pro^+$  转化子, 如果  $Dp^+$  突变发生在 *pPR3* 上, 那么可以预期, 这些转化子可能积累脯氨酸, 测定了 20 个这样的转化子, 平均产酸在 0.35mg/ml, 与供体产酸量完全一致。

**(四) pPR7 的转移**

吴汝平等报道 (8), 把能积累一定量的苏氨酸克隆引入到调节发生改变的苏氨酸产生菌, 能明显提高产量, 为选育产脯氨酸菌株作为克隆子 *pPR7* 的转化受体, 我们以 *MH125* 为出发株, 通过自发突变分离对 *D-proline* 抗性突变体获得了一株产酸 1mg/ml 的菌株 *MH125Dp^+*, 以此菌株为 *pPR7* 的转化受体, 在含卡那霉素的 *M9* 培养基上选择 *Kan^+* 转化子, 测得这些转化子 *MH125Dp^+ / pPR7* 的产酸达 2.5mg/ml, 比受体 *MH125Dp^+* 提高 2.5 倍, 比供体 *pPR7* 提高了 7 倍。这一结果表明选择生物合成调节机制发生了改变的菌株作为克隆子转化受体有显著的增产效应。

**(五) 克隆 pPR3 和 pEG5005 的物理图谱**

为建立克隆子 *pPR3* 和 *pEG5005* 的物理图谱, 我们利用 *Hind III*、*BamHI*、*EcoRI* 和 *PstI* 单切或双切 *pPR3* 和 *pEG5005*, 在 0.85% 琼脂糖凝胶上电泳, 由电泳结果测出了克隆子 *pPR3* 和 *pEG5005* 所具有的酶切位点及酶切后片段的大小(数据未列出) 因 *pEG5005* 为 10.4kb, 而 *pPR3* 为 18kb, 所以含  $Pro^+$  的克隆片段约为 7.6kb, 比较

*pEG5005* 与 *pPR3* 的酶切位点和片段大小可以推算出脯氨酸基因插入 *pEG5005* 的大体区域见图 2, 以上结果至少为次克隆和

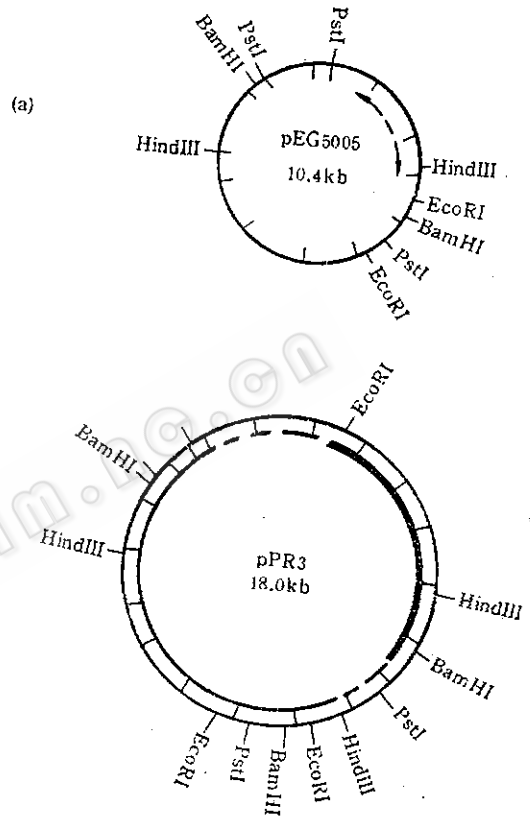


图 2 *pPR3* 和 *pEG5005* 的物理图谱  
 Fig.2 Physical map of *pPR3* and *pEG5005*  
 (a) ◀---▶ 含  $Pro^+$  基因片段插入 *pEG5005* 的可能区域  
 Possible region of fragment containing  $pro^+$  gene in *pEG5005*  
 (b) — 载体 DNA Vector DNA  
 — 含  $Pro^+$  基因片段  
 Fragment containing  $pro^+$  gene  
 ---- 未确定区域, 可能含载体 DNA 或外源 DNA  
 Unknown region, presumably are vector or foreign DNA

进一步在分子水平上改进脯氨酸工程菌提供了资料。

**参 考 文 献**

[1] Windass, J.D. et al., *Nature*, 287:396-399, 1980.

- [2] Medoza, T.D. et al.: *Gene*, 15:27—32, 1982.  
 [3] Casadaban, M.J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1480—1483, 1984.  
 [4] 方佩静等: 微生物学报, 22 (4): 350—360, 1982.  
 [5] Miller, J.H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1972.  
 [6] Horonicz, D.I. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp360—368, 1982.  
 [7] Rashlow, K.E. et al.: *Gene*, 39:109—112, 1984.  
 [8] 吴汝平等: 生物工程学报, 3 (3): 177—182, 1987.

## IN VIVO CLONING OF PROLINE GENES AND ITS EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*

Wang Aoquan Jiao Hong Chen Xiuzhu Huang Herong  
(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

The *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup> gene in *E. coli* was cloned *in vivo* by using a plasmid containing a mini-Mu replicon, pEG5005. The cloning frequency of proline gene is about  $1.46 \times 10^{-3}$ /Kan<sup>r</sup> transductants. Genetic and biochemical analysis of these clones indicated that the proline genes are on the plasmid pEG5005. The excretion of proline was assayed for some Pro<sup>+</sup> clones and no proline accumulation was detected. Then a Pro<sup>+</sup> clone pPR3 was mutagenized by NTG in the cells and mutants resistant to D-proline were obtained. One of the Dp<sup>r</sup> mutants pPR7 was able to produce 0.35mg/ml proline in the strain of *proAB* gene deletion. When the pPR7 was transformed into a proline producing strain, the yield of the proline was raised up to 2.5mg/ml. It was 7 and 2.5 times respectively higher than that of the donor and recipient. The physical maps of pEG5005 and pPR3 were roughly established in the paper too.

### Key words

Cloning *in vivo*; proline, pEG5005

### 图版说明

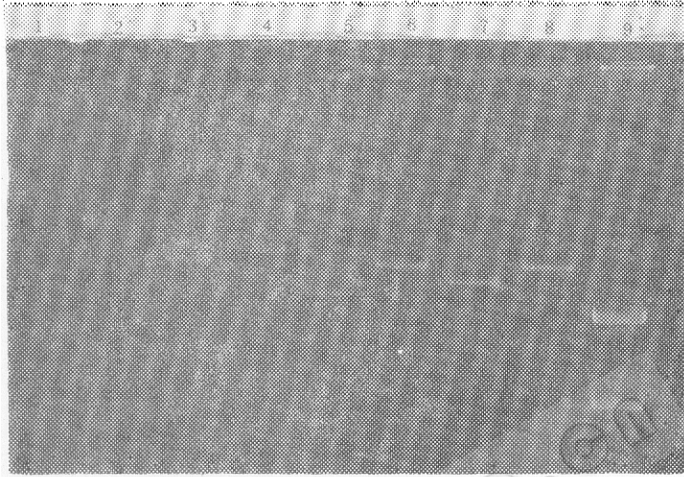
Explanation of plate

脯氨酸基因克隆子的琼脂糖电泳

1—8为Pro<sup>+</sup>克隆, 9为pEG5005

Agarose electrophoresis of Pro<sup>+</sup> clones. Lane 1—8 are Pro<sup>+</sup> clones, Lane 9 is pEG5005

Wang Aoquan et al., *In vivo* cloning of proline genes and its expression in *Escherichia coli*



余学政等：苏云金杆菌蜡螟变种晶体蛋白基因在枯草杆菌中的克隆及表达 图版 I  
Plate I

Yu Xuezheng et al., Cloning and expression of the crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* in *Bacillus subtilis*

