

研究报告

# 噬菌体T7溶菌酶基因的克隆

崔道珊 练永宁 许永瑞 李殿君 宋兰芝

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

以pBR322及含有噬菌体T7 RNA聚合酶强启动子 $\phi 10$ 的pBR322 衍生物作为克隆载体, 经限制内切酶Ava I + Hae III 切割的一段噬菌体T7 DNA片段分别克隆到pBR322及其衍生质粒的BamHI位点上。插入的DNA片段为632碱基对。该片段包括噬菌体T7基因3.5和T7 RNA聚合酶弱启动子 $\phi 3.8$ 的全部编码序列。已知噬菌体T7基因3.5的功能为产生噬菌体T7溶菌酶, 利用氟仿处理检测带有重组质粒的转化子胞内溶菌酶活力。证明两种克隆株整体细胞中, 均有溶菌酶存在。用10—20% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检查噬菌体T7基因3.5蛋白带, 结果表明T7基因3.5在pBR322衍生质粒中的表达优于pBR322。

**关键词** T7溶菌酶; T7 RNA聚合酶启动子; 基因克隆

溶菌酶在理论研究和实际应用上都有重要意义。卵清溶菌酶及与其相似的噬菌体T4溶菌酶已进行了深入的研究。近年来Wetzel用蛋白质工程技术为T4溶菌酶安装了人工二硫键, 从而增强了T4溶菌酶的热稳定性<sup>[1]</sup>。我们试图以噬菌体T7溶菌酶作为另一类溶菌酶的代表<sup>[2]</sup>。通过对该酶基因克隆和表达的研究提供一个产生纯T7溶菌酶的体系, 便于对该酶作深入的了解。同时有助于对基因表达与调控规律的认识。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 菌种与质粒: *E. coli* HMS 174 (rK12<sup>-</sup> mK12<sup>+</sup> recA1 Rif<sup>R</sup> Su<sup>-</sup>) 由F.W. Studier教授惠赠, 作为克隆DNA的宿主。质粒pBR322购自New England Biolabs; 质粒pAR951为含有噬菌体T7 RNA聚合酶强启动子 $\phi 10$ 的pBR322衍生物( $\phi 10$ 以反时针方向插入 pBR322的 BamHI 位点), 由F.W. Studier实验室构建。

2. 酶和重要试剂: 限制内切酶、T4

DNA连接酶、T4多核苷酸激酶, *E. coli* DNA聚合酶 I klenow片段及BamHI 接头购自 New England Biolabs。碱性磷酸酯酶为 Boehringer Mannheim 公司产品。作为分子量标准的卵清溶菌酶购自 Sigma 公司。考马氏亮蓝G250及SDS均为 Fluka 进口分装。

3. 培养基: (1)蛋白胨培养基: 每升含20g Tryptone, 10g NaCl为实验室用基本培养基。(2)M<sub>9</sub>蛋白胨培养基: 每升蛋白胨培养基中加入6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5g NaCl, 1g NH<sub>4</sub>Cl, 2ml 1mol/L MgSO<sub>4</sub>, 20ml 20%葡萄糖。需要时每100ml培养基加入1ml 氨苄青霉素 (2mg/ml)。(3)平板培养基: 为含1%琼脂的M<sub>9</sub>蛋白胨培养基。每100ml含1ml 氨苄青霉素 (2mg/ml)。

### (二) 方法

1. 质粒及T7 DNA纯化: 质粒纯化用PEG-Brij法<sup>[5]</sup>。噬菌体T7 DNA从纯化的噬菌体T7中抽提<sup>[6]</sup>, 选用适当的限制内切酶进行切割, 用琼脂糖凝胶电泳分

本文于1989年3月10日收到。  
国家自然科学基金资助项目。

离纯化。T7 DNA片段的大小和在T7基因组中的位置,按其所含核苷酸的数目或T7 DNA全长的1%为单位计算,一个T7单位为399.36碱基对<sup>[7]</sup>。

2. 基因克隆:DNA体外重组和转化按常规技术进行<sup>[8,9]</sup>,含有目的基因的DNA片段,通过平端连接加上BamHI接头,然后通过粘末端连接到经过碱性磷酸酯酶处理的pBR322及其衍生质粒pAR951的BamHI位点上。连接混合物转化*E. coli* HMS174。选择抗氨苄青霉素和对四环素敏感的转化菌。用Birnboim等人<sup>[10]</sup>的快速质粒纯化和电泳法筛选。对含有插入片段的重组质粒进一步用限制内切酶分析,确定插入片的长度和方向。

3. 聚丙烯酰胺凝胶电泳:重组质粒的限制内切酶分析采用3—20%梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳,用TAE电泳缓冲液(0.04mol/L Tris-醋酸pH8.0,0.002mol/L EDTA),溴化乙锭显色,紫外光下照像。蛋白质检测用含有5%浓缩胶的10—20%梯度聚丙烯酰胺SDS电泳,Tris-甘氨酸缓冲液,考马氏亮蓝染色。

## 结 果

### (一) T7溶菌酶基因克隆

噬菌体T7 DNA全部核苷酸序列分析已经完成,到目前为止所发现的基因及调控因子在整个T7基因组上的位置也已确定<sup>[7]</sup>。这为分离T7单个基因提供了方便。T7基因3.5,即T7溶菌酶基因位于T7 DNA的10706—11159碱基对处,相当26.81—27.94 T7单位。其后紧接着T7 RNA聚合酶弱启动子 $\phi 3.8$ ,位于11180碱基对处,相当於27.99 T7单位,寻找适当的限制内切酶时,发现Ava II在T7 DNA的10664和11900碱基对处有切割位点<sup>[11]</sup>,用该酶

切割可以分离出一段长为1236碱基对,相当26.70—29.80 T7单位的DNA片段,然后再用能在T7 DNA 11296碱基对处切割的Hae III切割,则可得到从10664到11296碱基对,相当26.70—28.29 T7单位的T7 DNA片段,全长632碱基对。该片段不仅含有完整的T7基因3.5的编码序列,而且包含了T7启动子 $\phi 3.8$ 的编码序列(图1)。分离纯化所需要的这段DNA,按照材料方法分别以pBR322及其衍生物pAR951为载体进行克隆,并转化*E. coli* HMS174。为筛选这两种载体的克隆株分别将50, 100

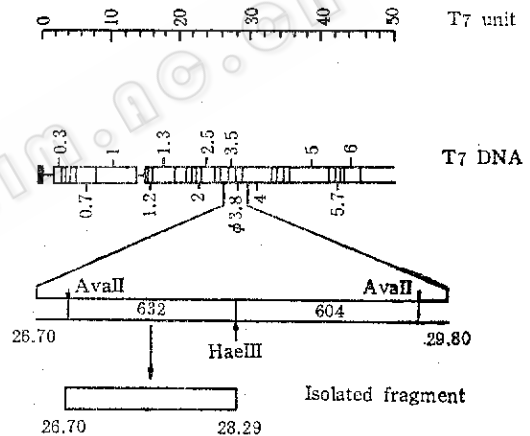


图1 从T7 DNA分离包含 $\phi 3.8$ 的T7基因3.5片段  
Fig.1 Isolation of gene 3.5 +  $\phi 3.8$ -containing fragment from T7 DNA

基因3.5和 $\phi 3.8$ 在T7基因组左端50%上的位置和长度以T7单位标出。分离片段的长度放大20倍  
The left 50% of T7 genome which includes gene 3.5 and 3.8 are shown. The position and length of each gene on the genome is indicated by T7 units. The size of isolated fragment was magnified by twenty times

和200 $\mu$ l转化细菌涂布到含有氨苄青霉素的平板培养基中,培养过夜,两种载体的平板培养总共出现500多株白色菌落。分别挑取24个菌株进行酶切鉴定。

### (二) 重组质粒的酶切电泳分析

小量培养选定的两组各24株转化菌,

快速抽提质粒DNA，以 pBR322 DNA 为对照，做酶切鉴定，先用 BamHI 切割纯化后的重组质粒，根据检测释放出的插入片段的长度来确定插入片段的完整性；再选择 RsaI 和 Hinf I 分别切割经纯化的重组质粒。这两种内切酶既能切割 pBR322 又能切割 T7 DNA，根据电泳中出现的新谱带，来判断插入片段的方向。现在已知 pBR322 和噬菌体 T7 DNA 的全部系列<sup>[12,7]</sup>及限制内切酶 BamHI、RsaI 和 HinfI 在这两种 DNA 分子上的所有酶切位点及完全酶解后应给出的片段数目及长度<sup>[13]</sup>，pBR322 经 BamHI 切割后应变成典型的 pBR322 线型分子，重组质粒则应释放出插入的 DNA 片段。经限制内切酶 RsaI 和 HinfI 切割的 pBR322 将显示出典型的酶切图谱。而重组质粒经酶切后插入的 T7 DNA 与 pBR322 酶切片段组合成的新片段因插入片段的方向不同而有差异。通过计算可知用限制内切酶 RsaI 切割后若出现 0.46kb 的新片段插入片段为逆时针方向，出现 0.26kb 的新片段为顺时针方向。用限制内切酶 HinfI 切割后，若出现 1.87kb 的新片段为逆时针方向，出现 1.51kb 的新片段为顺时针方向。电泳结果表明 90% 以上的测试菌株含有重组质粒，即经 BamHI 切割后释放出 0.63kb 的 DNA 片段，与目的基因一致，经 RsaI 切割后呈现 0.46kb 的新谱带，经 HinfI 切割后出现的新谱带为 1.87kb，说明 T7 溶菌酶基因均以反时针方向插入质粒 pBR322 及其衍生质粒 pAR951，经重复筛选 96 株转化菌，结果完全一致，均显示目的基因以反时针方向插入。我们分别将含有 pBR322 重组质粒的转化子定名为 pLA1。含有 pAR951 重组质粒的转化子定名为 pLA2 (图版 I - 1，图 2)。

**(三) 细胞内溶菌酶的检测**

为了阐明克隆的 T7 溶菌酶基因是否能

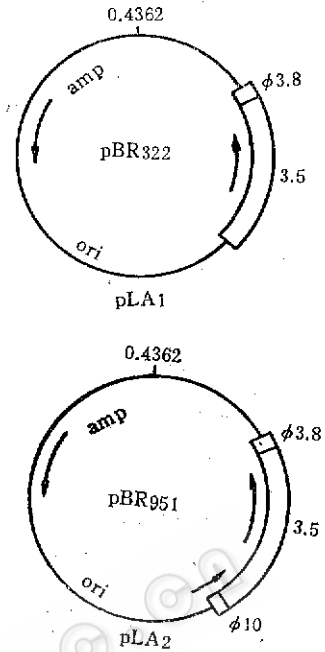


图 2 重组质粒 pLA1 和 pLA2 组成图

Fig.2 Composition of recombinant plasmids pLA1 and pLA2

在大肠杆菌中表达，我们首先设计了测试整体细胞内溶菌酶活性的简单方法。将载有重组质粒的大肠杆菌 HMS174/pLA1，HMS174/pLA2 和只载有质粒的大肠杆菌 HMS174/pBR322 分别在含有氨苄青霉素的 M<sub>9</sub> 蛋白胨培养基中 37℃ 培养过夜。次晨分别取一定量过夜培养物转入新鲜培养基中，按 1.5% (v/v) 加入氯仿。从零时起，每隔 5 min 测定 A<sub>600</sub> 吸收值，连续测定 30 min。如图 3 所示，HMS174/pBR322 加氯仿后，15 min 内 A<sub>600</sub> 吸收值没有变化，20 min 后略有下降，而 HMS174/pLA1 和 HMS174/pLA2 在加入氯仿后 5 min A<sub>600</sub> 吸收值即明显下降，到 20 min 时培养液已经变清。这一结果说明 HMS174/pLA1 和 HMS174/pLA2 整体细胞内有溶菌酶积累，而 HMS174/pBR322 细胞内没有可检出的酶活性 (图 3)。

**(四) T7 溶菌酶克隆株的基因表达**

为了检测 T7 溶菌酶克隆株基因表达产

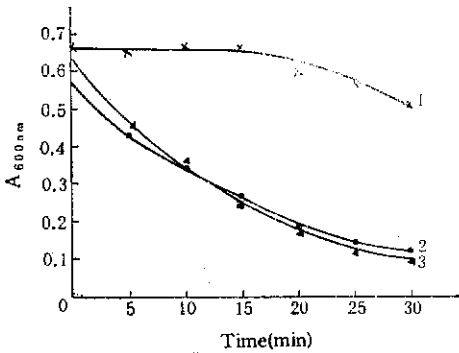


图3 整体细胞内溶菌酶的检测

Fig. 3 Test of intracellular lysozyme

1. HMS174/pBR322 as control
2. HMS174/pLA1
3. HMS174/pLA2

物,将载有T7溶菌酶基因重组质粒的大肠杆菌 pLA1、pLA2 和只载有质粒 pBR322 的大肠杆菌分别在含有氨苄青霉素的 M<sub>9</sub> 蛋白胨培养基中 37℃ 摇床培养。当 A<sub>600</sub> 为 0.6 时取出 0.2ml,离心收集菌体(5000rpm, 5 min) 悬浮于 1.5 体积的裂解缓冲液中 (50mmol/L Tris-HCl pH6.8, 2mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA、1% SDS、1% 巯基乙醇、10% 甘油和 0.03% 溴酚蓝),然后于沸水浴中加热 2 min 得到细菌裂解液,直接置于聚丙烯酰胺-SDS 凝胶进行电泳分析。结果表明 pLA1 和 pLA2 均显示出分子量为 16800 道尔顿的蛋白带,与经计算的 T7 溶菌酶分子量相等<sup>[11]</sup>。此带稍高于分子量为 14300 道尔顿的标准卵清溶菌酶所形成的

带,而质粒 pBR322 无此蛋白带出现(图版 I-2)。

## 讨 论

本文结果可以证明,噬菌体 T7 溶菌酶存在于细胞质中。因为只有当脂溶性溶剂氯仿加入到培养基中,使细胞内膜溶解,才使溶菌酶接触到细胞壁肽聚糖层而导致细胞壁溶解。克隆基因的表达才能使完整菌株对氯仿的作用更敏感。pLA2 在加入氯仿后 A<sub>600</sub> 下降的幅度要大于 pLA1。同样,在样品浓度相同情况下的聚丙烯酰胺-SDS 凝胶电泳分析, pLA2 的 T7 溶菌酶蛋白带要比 pLA1 浓度高。由此可以说明, T7 溶菌酶基因在 pAR951 中表达优于 pBR322。

克隆的基因能够在大肠杆菌中表达,这是由于选定的 T7 溶菌酶基因片段本身带有 T7 RNA 聚合酶弱启动子  $\phi 3.8$ , 虽然是弱启动子,但来自 T7 噬菌体本身,所以插入到质粒 pBR322 中的基因,仍能在  $\phi 3.8$  的作用下得到表达,但水平较低。插入到 pAR951 中的基因,除去片段本身有弱启动子外,载体上已带有噬菌体 T7 RNA 聚合酶强启动子  $\phi 10$ , 它们在 pBR322 中的插入方向一致,这就提高了克隆基因在大肠杆菌中的表达能力。

## 参 考 文 献

- [1] Perry, L.J. and Wetzell, R., *Science*, 266:555-557, 1984.
- [2] Inouye, M. et al., *J. Biol. Chem.*, 248:7247-7252, 1973.
- [3] Campbell, J.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:2276-2280, 1978.
- [4] Bolivar, F. et al., *Gene*, 2:95-113, 1977.
- [5] 崔道珊等:生物化学杂志, 4:48-55, 1988.
- [6] Studier, F.W., *Virology*, 38:562-574, 1960.
- [7] Dunn, J.J. and Studier, F.W., *J. Mol. Biol.*, 166:477-535, 1983.
- [8] Wu, R. et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 68, Academic press, 1979.
- [9] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [10] Birnboim, H.C. and Doly, J., *Nucleic Acids Res.*, 7:1513-1523, 1979.
- [11] Rosenberg, A.H. et al., *J. Mol. Biol.*, 135:907-915, 1979.
- [12] Sutcliffe, J.G., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43:77-90, 1979.
- [13] Studier, F.W. et al., *J. Mol. Biol.*, 135:917-937, 1974.
- [14] Studier, F.W. and Dunn, J.J., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 47:999-1007, 1983.

# CLONE OF THE BACTERIOPHAGE T7 LYSOZYME GENE

Cui Daoshan Lian Yongning Xu Yongrui

Li Dianjun Song Lanzhi

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

Plasmid pBR322 and its derivative containing strong promoter  $\phi 10$  of bacteriophage T7 RNA polymerase were used as vectors. A fragment of bacteriophage T7 DNA which was digested with two restriction endonucleases *Ava* II and *Hae* III was cloned in *Bam*HI site of plasmid pBR322 and its derivative respectively.

The inserted DNA is 632 base pairs. It contains the complete coding sequence of both T7 gene 3.5 and weak promoter  $\phi 3.8$  for bacteriophage T7 RNA polymerase. The function of T7 gene 3.5 is known to make bacteriophage T7 lysozyme. Transformants that carry recombinant plasmid were tested for intracellular lysozyme by adding  $\text{CHCl}_3$ . Both cloned strains produce active T7 lysozyme. The product of gene expression, T7 3.5 protein, was analysed by 10—20% gradient polyacrylamide-SDS electrophoresis. The result showed that expression of inserted T7 gene 3.5 in pBR322 derivatives is stronger than that in pBR322.

## Key words

T7 lysozyme; T7 promoter; gene cloning

## 图版说明

### Explanation of plate

#### 1. 重组质粒 pLA1 和 pLA2 的酶切电泳图

Electrophoresis of recombinant plasmids

Electrophoresis was carried out on a 3—20% polyacrylamide gradient gel. I. *Bam*HI digestion:

A. pBR322 B. pLA1 C. pLA2, II. *Rsa*I digestion: A. The *Hind*III digested T7 DNA as standard ((1) 2.74kb (2) 1.89kb (3) 1.64kb (4) 1.41kb (5) 1.13kb (6) 0.96kb (7) 0.82kb (8) 0.71kb (9) 0.57kb (10) 0.45kb (11) 0.35kb (12) 0.21kb (13) 0.12kb) B. pBR322 C. pLA1 D. pLA2,

III. *Hinf*I digestion: A. The *Hind*III digested T7 DNA as standard (See I-A) B. pBR322 C. pLA1 D. pLA2

#### 2. 克隆基因表达产物的电泳分析

The electrophoresis of products expressed by cloned gene. The electrophoresis was carried out on

10—20% polyacrylamide-SDS gradient gel. A. Suspension of disrupted cells harbouring pBR322,

B. Suspension of disrupted cells harbouring pLA1, C. Suspension of disrupted cells harbouring

pLA2, D. Pure egg lysozyme as marker

崔道珊等：噬菌体T7溶菌酶基因的克隆

Cui Dashan et al., Clone of the bacteriophage T7 lysozyme gene

图版 I

Plate I



王大钧等：用酶标受体法检测牛生长激素的生物活性

Wang Daijun et al., ELISA-receptor assay for testing the bioactivity of growth hormone

图版 I

Plate I

