

两个链霉菌复制子探针载体的构建

邓子新

(华中农业大学土化系农抗研究室, 武汉)

T. Kieser D. A. Hopwood

(英国约翰·英勒斯研究所)

因链霉菌质粒的大小、拷贝数各异,并不是所有的质粒都易于分离和纯化,尤其是低拷贝的大质粒,质粒的分离提取往往耗资费力。在这种情况下,如果能用携带有链霉菌药物抗性标记的大肠杆菌载体把未知质粒复制区分离出来,既可马上把这种复制子发展成为有用的载体,又可把DNA操作的绝大部分工作转到大肠杆菌中进行。我们在以pBR322的衍生质粒pUC7为母体的质粒中,分别组入来自远青链霉菌的tsr或来自于酒红链霉菌的vph基因,在大肠杆菌中组建了链霉菌复制子探针载体pIJ2703和pIJ2702。这两个质粒携带了可在大肠杆菌中选择的药物抗性基因amp,兼有链霉菌的抗性基因标记tsr或vph,tsr和vph基因只有借助于链霉菌复制子的克隆才能在链霉菌中得到表达。以neo为指示基因,这两个载体还兼有启动子探针载体的特征。

材料和方法

(一) 菌株和质粒

ED8767^[1] (recA56⁻, dam⁺)和GM242^[2] (recA1⁻, dam⁻)用作大肠杆菌质粒转化的受体菌株,ED 8767的转化频率可达10⁶/μg DNA,比GM₂₄₂略高10倍。本试验所用到的大肠杆菌的质粒列于表1。

(二) 培养条件

大肠杆菌的液体培养采用L-肉汤培养基,配方见文献[5]。感受态大肠杆菌细胞的制备和转化采用文献[5]所述方法。选择大肠杆菌抗性转化子时所用的各种抗生素的浓度分别为:氨苄

表1 大肠杆菌质粒

质粒	大小 (kb)	抗性标记-起源	参考文献
pIJ648	4.65	neo-Tn5 cat-Tn9 vph-酒红链霉菌	T. Kieser 未发表
pIJ675	5.2	nec-Tn5 cat-Tn9 tsr-远青链霉菌	同上
pLT98	2.7	amp-pUC7	[3]
pSKS114	3.8	amp-pUC7 cat-Tn9	[4]

tsr: 硫链丝菌素抗性基因; amp: 氨苄青霉素抗性基因; cat: 氯霉素抗性基因; vph: 紫霉素抗性基因

青霉素,以ED8767为受体时浓度为100μg/ml,以GM 242为受体时浓度为200μg/ml (Beccham公司产品),固体培养基为Oxoid营养琼脂(ONA)或L-琼脂,配方见文献[5],紫霉素,100μg/ml (由Pfizer公司赠送),固体培养基为Difco营养琼脂(简称DNA);卡那霉素,5μg/ml(Sigma公司产品),固体培养基为ONA。

(三) DNA操作技术

质粒的分离采用Kieser^[6]所述方法。连接酶,CIAP以及各种限制内切酶为BCL或BRL等公司产品,酶处理条件详见文献[5],部分酶解时,常在酶解缓冲液中加入50-100μg/ml的溴化乙烷。酶反应的终止通常采用苯酚抽提,苯酚又通过异丙醇,精胺和乙醇的多次沉淀去除。琼

本文于1988年11月17日收到。

脂糖凝胶为 $20 \times 20 \times 3\text{cm}$ 的水平胶, 电泳缓冲液为 TAE 或 TBE [5]。琼脂糖浓度根据欲分离片段的大小选用 0.7—1.1%。分离线状片段时, 溴化乙锭通常混合在电泳缓冲液中, 电泳后直接照相。而分离 CCC 质粒时, 电泳缓冲液中没有溴化乙锭的存在, 电泳完毕后再行染色并在紫外光下 (310nm) 照相。琼脂胶上 DNA 片段的大小 (kb) 基于 Southern 法 [7] 用 DNA GEL 计算机程序 [8] 计算确定。入 DNA Hind III 和 pBR322 Hae III 酶切片段用作分子量标准。

实 验 结 果

(一) 复制子探针 pIJ2703 的构建

pIJ 2703 的构建分两个步骤进行 (图 1)。pIJ675 是一个以 pACYC184 为复制子的质粒, 它除了含有来自于 Tn 5 的卡那霉素抗性基因 neo 以外, 还携带一个来自远青链霉菌的硫链丝菌素抗性基因 tsr。将该质粒用 Xho I (单一切点) 酶解以后, 与经过 Sal GI 酶解的质粒 pSKS 114 [4] (含有两个 sal GI 切点并携带了氨基青霉素抗性基因 amp) 在体外用 T4 连接酶相连接。连接反应终止以后, 纯化的 DNA 连接混合物再用 Xho I 酶解一次以切开连接反应中重新形成的环状 pIJ675。用连接物转化大肠杆菌 ED 8767 的感受态细胞, 选择抗氨基青霉素和卡那霉素 (或新霉素) 的双抗性转化子。

经过筛选, 获得了期望的质粒 pIJ679。它的 DNA 经 EcoR I 酶解后在同一凝胶上产生三个片段, 其中两个片段与 pIJ675 经过 EcoRI 和 Xho I 酶解后所产生的两个片段的泳动距离相对应, 另一个片段对应于 pSKS 114 中那个参与了连接反应的 SalGI 片段的泳动距离。同时还确证 pIJ679 上只有一个 Hind III 位点。从 dam⁻ 的大肠杆菌菌株 GM242 中提取的 pIJ679 经 Bcl I 酶解后产生两个理想大小的片段, 把较小的 Bcl I 片段 (含有 pACYC184 的复制起点) 用 Hind III 消化后, DNA 酶解物再用 T4 连接酶连接, 经过转化, 筛选氨基青霉素抗性转化子即获得了 pIJ2703 (图 1)。

用 pIJ2703 作为复制子探针载体时, 将供试

链霉菌的总 DNA 用产生 GATC 粘性末端的限制内切酶分别酶解后, 与经 Bcl I 完全消化的 pIJ 2703 在体外连接, 转化变铅青链霉菌的原生质体, 筛选硫链丝菌素抗性转化子, 从中有可能分离到潜在的复制子。

(二) 复制子探针 pIJ2702 的构建

我们构建了另一个携带不同选择标记的链霉菌复制子探针载体 pIJ2702。它与 pIJ2703 相似, 只不过要分离链霉菌复制子时, 用到的药物抗性标记不是 tsr, 而是 vph。vph 不仅能在链霉菌中表达, 也能够在大肠杆菌中表达。

图 2 列出了 pIJ 2702 的构建图解。携带有 vph 和 neo 基因的质粒 pIJ 648 和携带了 amp 基因的质粒 pLT98 [3] 均有两个 Pst I 切点。pIJ648 经 Pst I 部分酶解后与经过 Pst I 酶解的 pLT98 在体外相连接。在连接后的混合物中, 因无法使重新环化的 pLT98 或 pIJ648 线性化, 它们仍有可能与理想获得的质粒共转化进入同一细胞 (因为已知它们是相容性质粒)。为减少这种共转化的频率, 在对大肠杆菌株 ED8767 的转化时, 只用了微量的连接混合物。尽管许多转化子都仍含有两个质粒, 还是从氨基青霉素、卡那霉素和紫霉素三抗性的转化子中获得了含单一质粒的菌落, 这个转化子中的质粒比两个亲本质粒都要大, 但它 (pIJ676) 的结构并不理想, 因为它还含有三个 BamHI 位点, 使我们不能利用 BamHI 作为克隆位点。为了去除来自 pLT 98 多用接头上的两个 BamHI 位点, 对 pIJ676 进行了 SalGI 酶切 (三个位点, 一个位于 vph 基因内), 在 70 °C 水浴中加热 5 min 使 28bp 的接头变性。再连接的混合物转化 ED8767 后, 同时选择氨基青霉素和紫霉素的抗性即获得了两个较大的 SalGI 片段再连接的产物 pIJ2702。Hind III, Bgl I 和 BamHI 三种酶谱分析证明了图 2 所示的 pIJ2702 的结构。

在采用 pIJ 2702 作为探针载体时, 与采用 pIJ2703 类似, 只不过 pIJ2702 要采用 BamHI 和 Bgl I 双酶解, 选择标记是 vph 而不是 tsr。转化后, 原生质体要再形成孢子, 然后影印到含紫霉素的基本培养基平板上才能获得转化子。

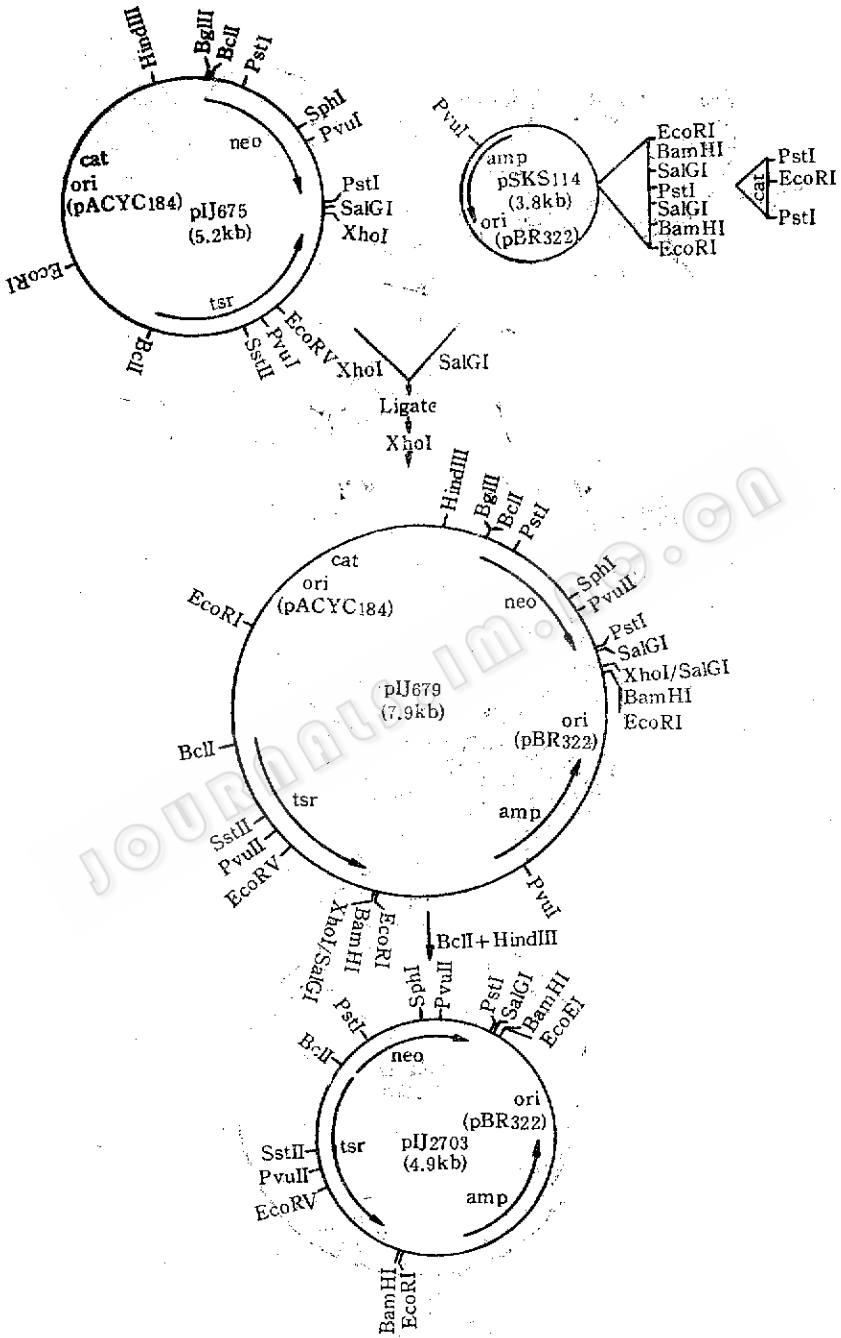


图 1 pIJ2703的构建

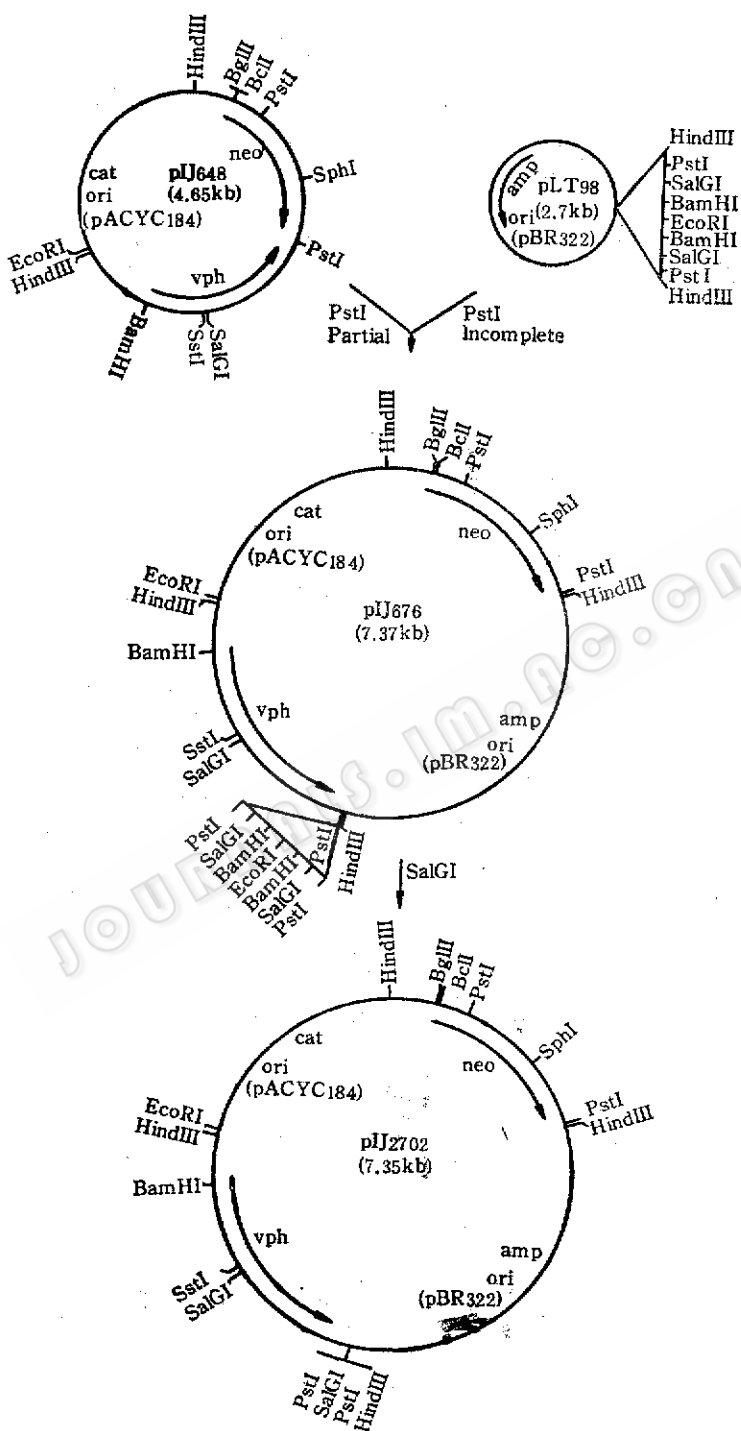


图 2 pIJ2702的构建

参 考 文 献

- [1] Murray, N.E. et al.; *M.G.G.*, 150:53—61, 1977.
[2] McGraw, B.R. et al.; *M.G.G.*, 178:309—315, 1980.
[3] Dixon, L.K. et al.; *Gene*, 25:189—199, 1983.
[4] Shapira, S.K. et al.; *Gene*, 25:71—82, 1983.
[5] Hopwood, D.A. et al.; *Genetic Manipulation of Streptomyces—A laboratory Manual*, 1985.
[6] Kieser, T.; *Plasmid*, 12:19—36, 1984.
[7] Southern, E.M.; *Ann. Biochem.*, 100:319—323, 1979.
[8] Kieser, T.; *Nucleic Acids Research*, 12:679—688, 1984.

CONSTRUCTION OF TWO REPLICATION PROBE VECTORS FOR *STREPTOMYCES*

Deng Zixin¹ T. Kieser² D. A. Hopwood²

(Laboratory of Agricultural Antibiotics, Huazhong Agricultural University, Wuhan)¹

(John Innes Institute, Norwich, England)²

Incorporation of *tsr* gene from *Streptomyces aureus* and *vph* gene from *Streptomyces vinaceus* into pUC7-based vectors, two replication probe vectors for *Streptomyces*, pIJ 2703 and pIJ 2702, have been constructed. Both vectors carry the same *amp* gene from same origin for selection in *Escherichia coli* but carry either *tsr* or *vph* gene for selection in *Streptomyces*. *tsr* and *vph* genes can only be expressed in *Streptomyces* with the help of cloned *Streptomyces* replicon. Using *neo* gene as indicator, two vectors have properties of promoter-probe vectors.

Key words

Replication probe vectors; *Streptomyces*