

地衣芽孢杆菌温噬菌体的具有 启动子功能片段的克隆

盛小禹 李育阳

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

载体 pTG402 与地衣芽孢杆菌噬菌体 B1p7 经限制酶酶切并连接后转化大肠杆菌。从全部转化子中抽提质粒 DNA, 转化枯草杆菌后经菌落原位显色选到 22 个有启动子功能片段的克隆子。

利用邻苯二酚双加氧酶对底物的显色反应, 测定了 15 个克隆子的启动子活性, 并绘制了启动子功能最强的重组质粒的酶切图谱。此外, 还测定了两个克隆子在枯草杆菌各个生长期的表达情况, 发现在对数生长后期表达量大增, 认为识别这两个启动子的 σ 因子可能是 σ^{37} 。

关键词 启动子; 地衣芽孢杆菌温噬菌体; 邻苯二酚 2,3-双加氧酶; σ 因子

枯草杆菌从实际应用来讲是一个有潜在优越性的宿主^[1], 我们企图从地衣芽孢杆菌温噬菌体中克隆能在枯草杆菌中高效表达且能被调控的启动子, 并希望由于克隆的片段与宿主染色体之间缺乏同源性而避免整合。

用启动子探测载体穿梭质粒 pTG-402, 以鸟枪法克隆启动子, 获得 22 个具有启动子功能的重组子。用生物素标记的 Southern 吸印分析证明启动子来源于供体 B1p7 DNA。通过对邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (CatO₂ase) 活力的测定, 比较了重组质粒中启动子功能的强弱, 并对活力最强的重组质粒进行了限制酶酶切分析。考察了在枯草杆菌细胞的各个生长期中启动子的功能, 并根据所得结果讨论了枯草杆菌的 Sigma (σ) 因子对地衣芽孢杆菌温噬菌体启动子功能片段的识别。

材料和方法

(一) 材料

1. 细菌菌株和噬菌体: 细菌菌株和噬菌体见表 1。

表 1 细菌菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株 Strain	基因型 Genotype	文献或来源 Reference or source
<i>E. coli</i> C800	F ⁻ , thi-1, leuB6, lacY1, thr-1, tonA21, supE44 λ^-	Lab stock
<i>E. coli</i> MC1061	F ⁻ , araD139, Δ (ara, leu)7696, lacY74, galU, galK, hsr, strA	Lab stock
<i>E. coli</i> K154 (pTG402)		P. Dhease's gift
<i>B. subtilis</i> 1A40 (also as BR151)	lys-3, trpC2, metB10	Lab stock
<i>B. licheniformis</i> 8	Wild type	Li et al. [2]
Temperate phage (B1p7) of <i>B. licheniformis</i>	Wild type	Wang et al. [3]

本文于 1989 年 12 月 30 日收到。

2. 培养基: 液体完全培养基组成(%) : 蛋白胨 1, 酵母抽提物 0.5, NaCl 1, 葡萄糖 0.2, 灭菌前 pH 7.4。固体完全培养基: 液体完全培养基中加入琼脂粉 2.5%(w/v)。液体 B 培养基组成(%) : 蛋白胨 2, 酵母抽提物 1, NaCl 0.5。枯草杆菌感受态产生培养液 I: 每 1000ml 重蒸水中含 $10 \times$ 基本盐溶液 100ml, 葡萄糖 5g, 色氨酸 50mg, 水解酪蛋白 200mg。枯草杆菌感受态培养液 II: 每 1000ml 重蒸水中含 $10 \times$ 基本盐溶液 100ml, 色氨酸 10mg, 水解酪蛋白 100mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6g, 葡萄糖 5g。 $10 \times$ 基本盐溶液($10 \times BS$): 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 140g, 磷酸二氢钾 60g, 硫酸铵 20g, 柠檬酸钠 10g, 硫酸镁 2g, 加蒸馏水至 1000ml。

3. 抗生素: 选择抗性克隆时氯霉素 (Cm) 浓度为 $10\mu g/ml$, 氨苄青霉素 (Ap) 浓度为 $50\mu g/ml$, 链霉素 (Sm) 浓度为 $100\mu g/ml$ 。

4. 酶: 除 EcoRI 购自华美公司外, 其余限制酶均购自 New England Biolabs。小牛肠碱性磷酸酯酶 (CIP) 及 T4 DNA 连接酶系 Boehringer Mannheim 产品。

(二) 方法

1. 噬菌体 DNA 制备

(1) 敏感菌活化: 接种一环地衣芽孢杆菌 8 于 B 培养液中, $37^\circ C$ 振荡培养过夜后加入 4 倍原体积的 B 培养液, $37^\circ C$ 振荡活化 1h 后备用。

(2) 半固体增殖: 参照 Miller 所载方法进行^[4]。

(3) 液体增殖: 参照 Silhavy 和 Berman 所载方法进行^[5]。

(4) 噬菌体 DNA 制备: 参照 Miller 所载方法进行^[4]。

2. 质粒 DNA 制备

(1) 碱法抽提质粒: 按 Maniatis 等所载方法进行^[6]。

(2) 去除 RNA: 用 Sepharose 2B 凝胶过滤, 按彭秀玲等所载方法进行^[7]。

3. 限制酶消化和 DNA 的连接: 都按产品厂家的使用说明书进行。

4. CIP 处理: 按 Maniatis 等所载方法进行^[6]。

5. 大肠杆菌的转化: 参照 O'Connell 所载方法进行^[8]。

6. 枯草杆菌感受态转化: 参照 Glover 所载方法进行^[9]。

7. 邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (CatO₂-ase) 活力测定: 参考何笑松等的改良方法进行^[10], 即用菌液代替经超声波破碎的无细胞抽提物, 以 $0.1mmol/L$ 的邻苯二酚为底物, $30^\circ C$ 水浴保温 30min 后离心, 测上清液的 A₃₇₅ 值。把邻苯二酚溶液喷到培养基上可以使具有 CatO₂-ase 酶活性的菌落呈现黄色。

8. 细菌蛋白含量测定: 离心收集培养好的细菌, 用磷酸缓冲液 ($20mmol/L$, pH 7.2) 洗涤一次后悬浮于磷酸缓冲液中, 超声波破碎 (功率 150W, 超声处理 1 秒, 间隔 1 秒, 共处理 60 次) 后除去细胞碎片, 按 Bradford^[11] 方法测定上清液中的蛋白质含量。

9. Southern 吸印杂交

(1) 探针制备: 按 BRL 的操作说明书^[12], 以生物素-11-dUTP 进行缺口平移标记。

(2) 分子杂交: 硝酸纤维膜上 DNA 酶切样品的吸印、预杂交、杂交等都按 Maniatis 等所载方法进行^[6]。膜上显色按 BRL 的操作说明书进行^[12]。

结果与讨论

(一) 具有启动子功能的地衣芽孢杆菌温 and 噬菌体 Blp7 DNA 片段的克隆

启动子探测载体 pTG402^[13] 是在大肠杆菌和枯草杆菌中都能复制的穿梭质粒。它带有一个来自恶臭假单胞杆菌的芳香烃降解质粒 TOL 上不带启动子的 xylE 基因。xylE 基因编码邻苯二酚 2,3-双加氧酶。xylE 基因的表达可以作为所克隆的片段的启动子功能的指标。

pTG402 经 BamHI 酶切后用 CIP 处理脱去 5' 端磷, 通过 T4DNA 连接酶把它与经 Sau3AI 部分酶切的 Blp7 DNA 连接, 连接物用来转化大肠杆菌 MC1061, 在含有 Sm 及 Ap 的完全培养基上选择 Sm^rAp^r 转化子。抽提全部转化子的质粒 DNA, 用它来转化枯草杆菌 BR151, 将转化物涂布在含 Cm 的完全培养基上选择 Cm^r 转化子。向培养基上喷洒邻苯二酚水溶液, 出现的少数黄色菌落被初步认为其中的细菌携带有含启动功能片段的重组质粒。

感受态大肠杆菌的质粒转化效率高达 10^6 — 10^7 /μg DNA, 感受态枯草杆菌的质粒转化效率仅为 10^3 — 10^4 /μg DNA。为了得到足够多的转化子, 我们首先用大肠杆菌作为克隆地衣芽孢杆菌噬菌体 DNA 片段的宿主菌。由于 xylE 基因上游有 Tc^r 基因的强启动子能使 xylE 基因在大肠杆菌中表达。为此, 必须将大肠杆菌中获得的重组质粒再次转化枯草杆菌, 才能获得 xylE 基因前插入具有启动功能的片段的重组质粒。此外, 将体外连接的 DNA 在大肠杆菌中先转化一次可以得到多连体形式的重组质粒, 这将有利于提高感受态枯草杆菌的转化效率^[14]。

我们最后从枯草杆菌转化子中选得 22

个黄色菌落, 根据黄色的深浅可以大致区分为深黄色和浅黄色两类。分别随机选取浅黄色的 2 号、4 号和深黄色的 5 号、11 号、14 号和 16 号以及含载体 pTG402 的枯草杆菌 (白色菌落), 从它们分别抽提质粒, 用来转化大肠杆菌, 然后再从中分别抽提质粒 DNA, 用它来转化枯草杆菌感受态细胞。来自 2 号和 4 号的质粒 DNA 的转化子仍为浅黄色, 来自 5 号、11 号、14 号和 16 号的质粒 DNA 的转化子仍为深黄色, 来自含载体 pTG402 的枯草杆菌的质粒 DNA 的转化子仍为白色。这一结果表明我们已经克隆到所要的启动子。

(二) 重组质粒的 Southern 吸印杂交

分别抽提枯草杆菌重组质粒 2、4、5、11、14 和 16 号及载体 pTG402 的 DNA, 用生物素 -11-dUTP 标记后作为探针, 与经 EcoRI 酶切的 Blp7 DNA 进行分子杂交, 结果见图版 I-A, 分子量测定结果见图版 I-B。各个酶切片段相加得 62.35kb, 与电泳法测得的数值 62.75kb^[8] 近似。

分子杂交结果表明 (1) 载体 pTG 402 与噬菌体 DNA 无同源性 (图略)。6 个重组质粒与供体 DNA 的杂交中也不出现共同的杂交带, 进一步说明 pTG 402 与噬菌体 DNA 没有同源性; (2) 6 个重组质粒与 Blp7 DNA 杂交都出现杂交带 (图版 I-A), 表明插入片段确实来自 Blp 7;

(3) 有些重组质粒的杂交中出现了两条带, 一种可能是插入片段中含有 EcoRI 切点, 另一种可能是供体 DNA 经 Sau3AI 酶切后出现由几个片段相连而成的片段。

(三) 启动效率的测定

载体 pTG402 上有 xylE 基因, 它编码的 CatO₂ase 能催化邻苯二酚变为 2-羟粘糠酸半醛的反应, 后者在波长 375nm 处有最大吸收, 摩尔吸光系数为 3.3×10^4 , 可

以根据光密度定量测定CatO₂ase的活力,从而估计插入片段的启动功能的强弱。以30℃中每分钟产生1n mol产物的酶活力作为1毫单位(mu)。在测定酶活力的同时用超声波破碎细胞来测定总蛋白量,计算出每个克隆的CatO₂ase比活力(表2)。

从表中数据来看,各个克隆的酶比活力的变化范围相当广,从27.99mu/mg到185.61mu/mg。这不意味着地衣

芽孢杆菌温和噬菌体有如此众多表达强度不等的启动子。造成这一现象的可能原因还有3方面(1)由于供体DNA的不完全酶切而克隆到同一启动子的不同长度的片段;(2)供体片段通过不同方式相连接的结果;(3)插入片段并不是地衣芽孢杆菌噬菌体的启动子,可是却能为枯草杆菌的RNA多聚酶所识别。

根据文献报道,大肠杆菌烈性噬菌体

表2 携带各种Blp7插入片段的转化子的CatO₂ase比活力

Table 2 Specific activity of CatO₂ase of transformants with different Blp7 insert fragment

菌株 Strain	比活力 Specific activity (mu/mg protein)	菌株 Strain	比活力 Specific activity (mu/mg protein)
BR151/pTG402	0	BR151/pTG402-L10	57.77
BR151/pTG402-L2	27.99	BR151/pTG402-L11	185.61
BR151/pTG402-L3	48.66	BR151/pTG402-L12	185.30
RB151/pTG402-L4	69.52	BR151/pTG402-L13	144.90
BR151/pTG402-L5	177.0	BR151/pTG402-L14	124.70
BR151/pTG402-L6	73.75	BR151/pTG402-L15	99.28
BR151/pTG402-L7	122.21	BR151/pTG402-L16	157.79
BR151/pTG402-L8	96.08	BR151/pTG402-L41	124.75
BR151/pTG402-L9	121.36		

T4有25个早早期启动子, T5有30—35个启动子, 而T7只有2个启动子^[15,16], 大肠杆菌温和噬菌体λ的主要启动子有P_L、P_R、P_{RM}、P_{RE}等4个。地衣芽孢杆菌噬菌体的启动子尚未见报道。

(四) pTG402-L11 插入片段的限制酶分析

从酶比活来看, pTG402-L11是启动子功能最强的一个重组质粒, 对此插入片段进行限制酶酶切分析, 结果如下: pTG402-L11对BamHI不敏感, 这是因为插入片段与pTG402通过BamHI/Sau3AI粘性末端相连, 用BamHI酶将插入片段切下的机率只有1/16。选用酶切位点与BamHI最为邻近的HpaI进行酶切, 出乎意料的是在pTG402上找不到HpaI的酶切

位点。曾先后从大肠杆菌及枯草杆菌中抽提6批pTG402 DNA, 过Sepharose 2B柱除去RNA后再作酶切, 仍然没有发现HpaI位点。这一结果与文献报道不符, 而用EcoRI和HindIII酶切的结果都和文献报道相符。因此认为若不是原作者报道有误的话, 可能是HpaI位点发生了碱基置换突变所致。pTG402或pTG402-L11经KpnI和HindIII双酶切后得到0.52kb或0.77kb片段, 因此插入片段为0.25kb。另外, pTG402-L11经HindIII与HpaI双酶切后得到0.46kb片段。已知从HindIII到BamHI位点是0.346kb, 因此可以计算出HpaI位点位于插入片段中离图1b上方一个BamHI/Sau3AI位点约0.11kb处(图1)。酶切电泳结果见图版I-C。

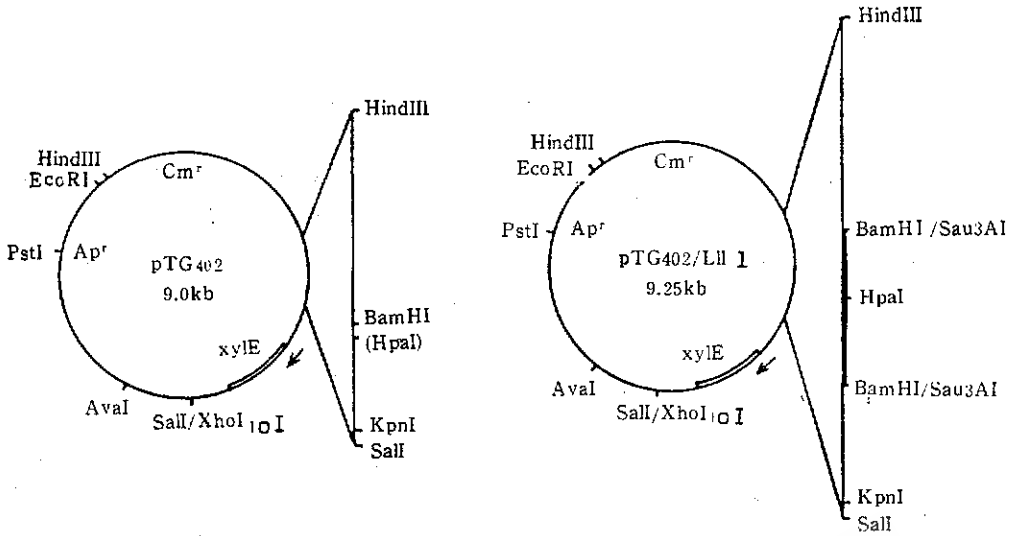


图 1 pTG402酶切图(a)和pTG402-L11酶切图(b)
Fig.1 Restriction map of pTG402 (a) and pTG402-L11 (b)

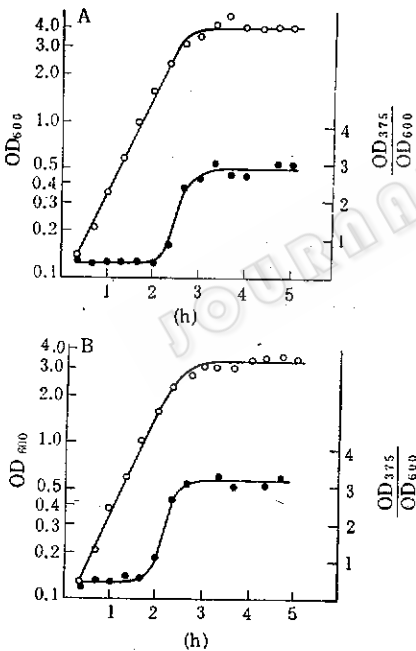


图 2 携带重组质粒pTG402-L5或pTG402-L11的枯草杆菌在各个生长时期(h)中的CatO₂ase比活力

Fig.2 Specific activity of CatO₂ase of *B. subtilis* harboring recombinant plasmids pTG402-L5 or pTG402-L11 at different growth phase(h)
A. BR151(pTG402-L5);
B. BR151(pTG402-L11)
○—: 细胞密度 Cell density
●—: 酶的比活力 Specific activity of enzyme

(五) pTG402-L11 及 pTG402-L5 在枯草杆菌中的表达时期

通过对于pTG402-L11 和 pTG402-L5 这两个重组质粒在枯草杆菌各个生长阶段中CatO₂ase比活的测定(以细胞浓度计算)考察了它们的表达时期。图 2 所示的结果说明在枯草杆菌生长的对数前期和中期酶比活始终维持在低水平上,对数后期比活迅速上升,在稳定期所测范围内仍维持最高水平。文献报道枯草杆菌在营养期中主要由σ³²和σ⁴³所识别的启动子进行转录^[17],σ³⁷的活性峰在对数后期^[17],σ²⁸的活性峰则在芽孢形成期中^[18,19],σ³⁰的活性峰和σ²⁸近似^[19,20]。根据图 2 的结果我们推测 pTG402-L11和pTG402-L5两个重组质粒中的启动子可能都由σ³⁷所识别。

如果对其他几个强表达的重组质粒也进行同样的表达时期测定,或许可以找到与宿主的蛋白酶基因不同步表达的启动子,它们对于保护基因产物不受宿主细胞中的蛋白酶的降解可能是有用的,因为已

知在两种蛋白酶基因都缺陷的枯草杆菌中 残留几乎 4 % 的蛋白酶活性^[21]。

参 考 文 献

- [1] Mezes, P. S. F. and Lampen, J. O. : in *The Molecular Biology of the Bacilli*, Vol. II. (David A. Daubnau, ed.) Academic Press Inc. 1985.
- [2] 李育阳等: 遗传学报, 13:172—178, 1986.
- [3] 汪训明等: 遗传学报, 13: 179—183, 1986.
- [4] Miller, J. H., *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972
- [5] Silhavy, T. J. et al. : *Experiments with Gene Fusion*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984.
- [6] Maniatis, T. E. et al. : *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [7] 彭秀玲、袁汉英: 基因工程实验技术, 湖南科学技术出版社, 1987.
- [8] O'Connell, M. P.: in *Advanced Molecular Genetics* (Puhler, A. and Timmis, K. N. eds.), Springer-Verlag, 1984.
- [9] Hardy, K. G.: in *DNA Cloning*, Vol. II, A Practical Approach, (Glover, D. M. ed.) IRL Press, 1985.
- [10] 何笑松等: 遗传学报, 17:46—52, 1990,
- [11] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72:248—254, 1976.
- [12] Instruction Manual of BRL: DNA detection system.
- [13] Zukowski, M. M. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:1101—1105, 1983.
- [14] Canosi, U. et al. : *Molec. Gen. Genet.*, 166:259—267, 1978.
- [15] Methews, C. K. *Bacteriophage Biochemistry*, Van Nostrand Reinhold Company, 1971.
- [16] von Gabain, A. and Bujard, H.: *Molec. Gen. Genet.* 157:301—311, 1977.
- [17] Doi, R. H. and Wang, L. F.: *Microbiol. Rev.*, 50:227—243, 1986.
- [18] Trempy, J. E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:4189—4192, 1985.
- [19] Trempy, J. E. et al.: *J. Bacteriol.*, 161:340—346, 1985.
- [20] Carter, H. L. III. et al.: *J. Bacteriol.*, 170:1617—1621, 1988.
- [21] Kawamura, F. and Doi, R. H.: *J. Bacteriol.*, 160:422—444, 1984.

Cloning of DNA Fragments with Promoter Function from Temperate Phage of *Bacillus licheniformis*

Sheng Xiaoyu Li Yuyan

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai)

Phage B1p7 DNA was digested with restriction endonuclease and ligated to the restriction endonuclease digested vector pTG402. The ligated was used to transform competent cells of *E. coli* MC1061. Plasmid DNA mixture was extracted from pooled transformants and competent cells of *B. subtilis* were transformed. By selecting yellow colonies upon spraying with catechol solution, 22 clones containing DNA fragments with promoter function were obtained. The promoter activity of 15 clones were determined by the color reaction of catechol 2,3-dioxygenase. The inserted fragment of the most potent promoter was mapped with restriction enzymes. CatO₂ase activity of two clones were measured in cells of *B.*

subtilis of all growth phases and was found to increase rapidly at the end of the log phase. It is inferred that these two promoters might be recognized by sigma 37.

Key words

Promoter; temperate phage of *Bacillus licheniformis*; catechol 2,3-dioxygenase; sigma factor

图版说明

Explanation of Plate I

- A. B1p7 DNA的EcoRI酶切片段与生物素标记的一些重组质粒的分子杂交
Molecular hybridization of B1p7 DNA with some biotin labeled recombinant plasmids
1. B1p7 DNA的EcoRI酶切片段 2—7. 以下列重组质粒分别与EcoRI酶切的B1p7 DNA进行杂交
EcoRI digested B1p7 DNA; 2—7. Southern hybridization of lane 1 using the following recombinant plasmids as probes
2—7 is number 2, 4, 5, 11, 14, 18, respectively
- B. B1p7 DNA的EcoRI酶切片段的琼脂糖凝胶电泳图谱
Agarose gel electrophoresis of EcoRI digested B1p7 DNA
- | | |
|------------------------|-----------------------|
| 1. ϕ X174/HaeIII; | 2. λ /HindIII |
| 3. B1p7 DNA/EcoRI | 4. SppI/EcoRI |
- C. 重组质粒酶切片段的琼脂糖凝胶电泳图谱
Agarose gel electrophoresis of restriction enzyme digested recombinant plasmids
- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. pTG402/HindIII | 2. pTG402-L11/HindIII |
| 3. pTG402-L11/HindIII, HpaI | 4. pTG402-L11/HindIII, KpnI |
| 5. pTG402/HindIII, KpnI | 6. SppI/EcoRI |
| 7. pTG402-L11/EcoRI | 8. pTG402/EcoRI |

Sheng Xiaoyu et al.: Cloning of DNA fragments with promoter function from temperate phage of *Bacillus licheniformis*

