

绛红色小单孢菌噬菌体启动子在大肠杆菌中的克隆和表达

周健明* 阵孝康 杜 艳* 朱逸忻* 王建红*

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

绛红色小单孢菌是氨基糖苷类庆大霉素、小诺霉素的产生菌。长期以来, 人们对微生物的次级代谢作用进行了大量的研究^[1,2], 对小单孢菌也进行了细胞融合、质粒抽提及感染噬菌体等方面的研究^[3-6], 小单孢菌基因调控的机理及启动子结构和功能的研究对小单孢菌产生的抗生素生产具有极其重要的意义。本文报道利用启动子探测质粒pGA46作为载体, 从绛红色小单孢菌噬菌体 Mph1 DNA 上克隆具有启动子功能的片

段, 筛选具有抗四环素能力达100 μ g 以上的重组质粒, 并对这些活性片段进行了酶切分析, 分子杂交和抗性表达等方面的研究。

材料与 方法

(一) 材料

1. 菌种 *E. coli* K12 802met his 以及 *E. coli* K12 802(pGA46)均由本实验室保藏; 绛红色小单孢菌 72*, 绛红色小单孢菌噬菌体 Mph1

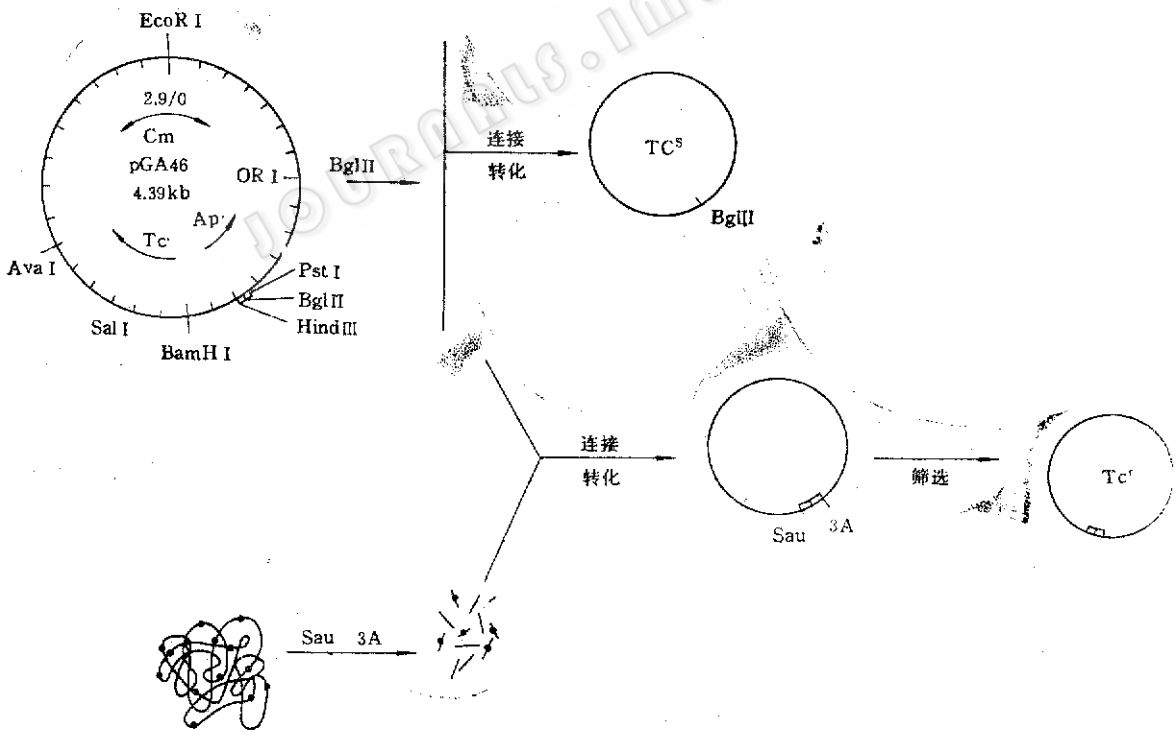


图 1. 从噬菌体Mph1 DNA 克隆含启动子的片段

本文于1989年7月12日收到。
*现在杭州华东制药厂。

均由杭州华东制药厂提供; *E. coli* K12 802 (pMS13), *E. coli* K12 802 (pMS14), *E. coli* K12 802 (pMS15), *E. coli* K12 802 (pMS16), *E. coli* K12 802 (pMS17), *E. coli* K12 802 (pMS19) 均为本实验室保藏, 含我们构建的重组质粒的菌株。

2. 培养基: LB 培养基(%): 蛋白胨 1, NaCl 0.5, 酵母粉 0.5, pH7.2. LB 固体培养基: 液体培养基加琼脂粉 1.5% (日本进口分装), 根据需要添加不同的抗生素。

3. 工具酶及其使用条件: 限制酶 *Sau* 3A, *Pst*I, *Hind* III, *Eco*RI, *Bgl*II, T4 DNA 连接酶均购自 BRL 公司, RNase 为 Sigma 公司产品。

(二) 方法

1. DNA 的分离和纯化: 按文献[7], 质粒 DNA 用碱法抽提, CsCl 密度梯度离心, 以 0.7% 琼脂糖, 40V 电泳检测。噬菌体扩增及 DNA 抽提及检测按文献[5]进行。

2. DNA 的酶解、连接: 均按公司产品说明书进行。

3. 连接反应物的转化: 用 CaCl_2 法, 按文献[7]进行。以含 Tc 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Cm 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LB 选择培养基筛选重组子。

4. DNA 杂交, Southern 吸印: 按文献[7]进行。生物素及同位素用于分子杂交的方法均按 BRL 公司 kit 产品使用说明书进行。

表 1 重组质粒插入片段的分子量和 Tc 抗性水平

重组质粒	Tc 抗性水平 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	插入片段分子量 (kb)
pMS 13	120	1.40
pMS 14	120	0.25
pMS 15	120	0.75
pMS 16	120	0.75
pMS 17	120	1.00
pMS 19	120	0.80

表 2 不同 pH 值对绛红色小单孢菌噬菌体启动子表达 Tc 抗性的影响

pH	质粒	pMS13	pMS14	pMS15	pMS16	pMS17	pMS19
5		120	120	120	120	120	120
6		120	120	120	120	120	120
7		120	120	120	120	120	120
8		120	120	120	120	120	120

注: 表中数字 Tc 抗性水平 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

5. LB 培养基中 NaCl 浓度及 pH 值对启动子表达的影响: 按文献[8]进行。

结果与讨论

(一) 重组子的构建和克隆

用 *Bgl* I 完全酶解经 CsCl 密度梯度离心并纯化的 pGA46 DNA 0.5 μg , 加 *Sau* 3A 完全酶解绛红色小单孢噬菌体 Mph1 DNA 0.3 μg , 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* K12 802, 同时以 pGA46 DNA *Bgl* I 酶切自连转化 *E. coli* K12802 作对照。在 Tc 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 Cm 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 两种抗生素的 LB 平板上筛选具有抗性的转化子。对照组没有一个转化子出现, 试验组长出大约 500 个转化子, 随机挑出六个作进一步测定(图 1)。

(二) 重组质粒 DNA 插入片段分析及 DNA 片段鉴定

用碱法抽提重组质粒。以 *Eco*RI, *Hind* III, *Pst*I 和 *Bam* HI 单酶切, 证实重组子确实来源于 pGA46, 以 *Eco*RI, *Hind* III 双酶切重组质粒, 以 λ DNA *Eco*RI, *Hind* III 双酶切作分子量标记, 0.7% 琼脂糖电泳, 测定插入片段的分子量。结果如表 1 所示。所测定的重组质粒均失去 *Bgl* I 切割位点。

(三) 重组质粒的同源性分析

用 *Pst*I 和 *Hind* III 完全酶解 pMS16, 分离插入片段, 以 α - ^{32}P 标记及 Biotin UTP 标记作探针, 以 Southern 吸印分子杂交检测插入片段与 Mph1 之间的同源性均证明 pMS16 插入片段与 Mph1 有同源性(图版 I - A, B)。

(四) 再转化实验

将提取并纯化的重组质粒 DNA 再转化 *E. coli* K12 802 均能得到具有 Tc 和 Cm 双重抗性转化子。各重组质粒 DNA 以 *Hind* III - *Pst*I 双酶切, 分离小片段和质粒 pGA46 DNA 以 *Pst*I - *Hind* III

双酶解产物,以 T4 连接酶连接,转化大肠杆菌 K12 802,均能得到 Cm 和 Tc 双重抗性的转化子, Cm 与 Tc 抗性水平均无变化。

(五) 不同 pH 值与不同 NaCl 浓度对启动子表达的平响

六株菌分别在 pH 为 5—8 的 LB 培养基上生长时,其四环素抗性水平如表 2 所示。六株菌分

别在 NaCl 浓度为 0、0.08mol/L、0.2mol/L 和 0.4mol/L 的 LB 培养基上生长时,其四环素抗性水平如表 3 如示。

我们从小单孢噬菌体中克隆启动子功能片段,最小分子量在 250bp 左右,可以直接进行顺序分析,也便于进行功能定位等工作。

表 3 不同 NaCl 浓度对链红色小单孢菌噬菌体启动子表达 Tc 抗性的影响

NaCl (mol/L)	质粒	pMS13	pMS14	pMS15	pMS16	pMS17	pMS19
0		120	120	120	120	120	120
0.08		120	120	120	120	120	120
0.2		120	120	120	120	120	120
0.4		120	120	120	120	120	120

注:表中数字为 Tc 抗性水平($\mu\text{g/ml}$)

参 考 文 献

- [1] Behal V. et al.: *Trends in Biochemical Science*, 11(2):88—91, 1986.
- [2] Jeffrey, T. F.: *Bio/Technology*, 4(9):786—789, 1986.
- [3] 周健明等: *抗生素*, 12(6): 399—401, 1987.
- [4] 谭华荣等: *遗传学报*, 12(3): 170—174, 1985.
- [5] 王鹤等: *中国抗生素杂志*, 14(2):81—85, 1989.
- [6] 聂丽平等: *生物工程学报*, 5(2):160—163, 1989.
- [7] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory 1982.

Cloning and Expression of Promoter of Phage Mph1 Attacking *Micromonospora purpurea* in *Escherichia coli*

Zhou Jianming* Chen Xiaokang
Du Yan* Zhu Yixing* Wang Jianhong*
(*Institute of Genetics, Fu Dan University, Shanghai*)

Sau3A restriction fragments from *Micromonospora purpurea* phage Mph1 DNA have been cloned into promoter probe plasmid pGA46 which had been digested with Bgl II. Transformants were selected on medium that allowed the selection of T₇ promoter bearing plasmid.

The origin of the cloned promoter was confirmed by means of Southern blot hybridization. Analysis of the molecular structure of the promoter got underway. We did not find that environmental factors such as pH and NaCl concentration in medium had influence on expression of promoter cloned from *Micromonospora purpurea* phage.

Key word

Micromonospora purpurea phage Mph1; promoter; cloning and expression

图 版 说 明

重组质粒 pMS16 DNA 和噬菌体 Mph1 DNA 同源性的杂交分析(以pMS16 DNA作为探针)

- A. 相应 DNA 样品的琼脂糖凝胶电泳
B. 杂交带的放射自显影
1. Mph1 2. pMS16

*Address: Hang Zhou East-China Pharmaceutical Plant.