

谷氨酸棒状杆菌启动子在枯草芽孢杆菌 中的克隆及其序列分析

许正平 杜珠还

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

利用枯草芽孢杆菌启动子探针质粒pPL 603 为载体, 从谷氨酸棒状杆菌 1014-6 染色体 DNA 上克隆到一个有较强启动功能的DNA片段。生物素标记的DNA-DNA 分子杂交实验证明该片段确实来自谷氨酸棒状杆菌1014-6染色体DNA。在绘制该片段限制酶酶切图谱的基础上, 经另一个启动子探针质粒pPL 703 的亚克隆, 将其启动子功能区定位在BamHI酶切片段中。对后者进行了核苷酸序列分析, 发现它具有棒状杆菌类启动子的-35区和-10区序列。

关键词 谷氨酸棒状杆菌; 启动子; 克隆; 序列

启动子调控着基因的转录, 其功能强弱对基因的表达效率有决定性作用, 所以研究棒状杆菌的启动子对于推动这类细菌的分子生物学发展及构建高效表达载体具有重要的意义。国外已有在已知启动子的位置和序列的情况下克隆棒状杆菌启动子的报道^[1-3], 国内还未见公开报道。本文报道谷氨酸棒状杆菌1014-6染色体上启动子的鸟枪法克隆及其核苷酸序列。

材料和方法

(一) 菌株和载体

谷氨酸棒状杆菌 1014-6 (*Corynebacterium glutamicum* 1014-6), 本研究室保存。枯草芽孢杆菌 BR 151 (*Bacillus subtilis* BR 151) (trp C 2·met B 5·lys 3), 本研究室保存。大肠杆菌JM 103 [Δ (lac-pro)·thi·strA·supE·endA·sbcB hsdR·F'·traD36·proAB·lacI^q·lacZ· Δ M15], 复旦大学遗传学研究所赠送。M13mp18 噬菌体 DNA, 复旦大学遗传学研究所赠送。质粒pPL 603(Km^rCm^r)、

pPL 703(Km^rCm^r)、复旦大学遗传学研究所赠送。

(二) 方法

1. 染色体DNA 制备: 接种谷氨酸棒状杆菌1014-6单菌落于50ml LB培养液中, 30℃振荡培养过夜, 转接2 ml过夜培养物于100 ml LB培养液中, 30℃振荡培养至OD₆₀₀ = 0.8—1.0, 离心收集菌体, 悬浮于9 ml溶液 I (50 mmol/L葡萄糖, 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA(pH 8.0), 10 mg/ml溶菌酶)中, 37℃水浴3 h后, 加入1 ml 10% SDS, 37℃水浴保温10 min后, 加蛋白酶 K (MERCK 公司产品) 至终浓度为100 μ g/ml, 37℃水浴保温30 min, 用核糖核酸酶除去RNA, 用酚: 氯仿: 异戊醇抽提除去蛋白质, 最后用乙醇沉淀DNA并用玻璃棒绕出, 溶于TE (pH8.0) 缓冲液中。

2. 质粒DNA的制备

本文于1992年1月8日收到。

感谢复旦大学遗传学研究所江行娟副研究员在工作期间给予的指导和帮助。

(1) 小规模快速制备质粒: 按文献〔5〕的碱变性法进行。一般用于质粒检测。

(2) 大规模制备质粒: 按文献〔5〕的碱变性法提取粗制品, 用氯化铯密度梯度离心法纯化。

3. 琼脂糖凝胶电泳: 按文献〔5〕方法进行。

4. 质粒DNA浓度与分子量测定: 按文献〔6〕方法进行。

5. DNA酶切、连接: 用Boehringer Mannheim公司产品, 按产品说明书操作。

6. 枯草芽孢杆菌BR 151的转化: 按文献〔7〕方法进行。

7. 转化子抗性水平测定: 以枯草芽孢杆菌BR 151(pPL 603)为对照, 将转化子点种于含氯霉素(Cm) 50 μg/ml、100 μg/ml、150 μg/ml、200 μg/ml、250 μg/ml的LB平板上, 37℃培养过夜, 观察生长情况。

8. 重组质粒插入片段的分离: 用相应的限制酶酶切重组质粒, 于1%琼脂糖凝胶中电泳, 然后在长波长紫外光下割下含有待分离片段的凝胶块, 切碎并装入Eppendorf管中, 加入200 μl苯酚, 混匀后置甲醇-冰浴中放5 min, 14 000 r/min离心10 min, 转移上清液至另一Eppendorf管中, 有机相中加入200 μl TE缓冲液, 同上处理并将两次所得的上清液合并, 用苯酚:氯仿:异戊醇抽提数次, 氯仿:异戊醇抽提一次, 上清液用冷无水乙醇沉淀, 沉淀干燥后溶于TE缓冲液中。

9. 生物素标记的DNA-DNA分子杂交: 使用BRL公司的DNA检测试剂盒, 按产品说明及文献〔5〕方法进行。

10. 序列分析: 使用Pharmacia公司的序列分析试剂盒(Sequencing Kit), 按

产品说明书及文献〔5〕方法进行。

结果与讨论

(一) 鸟枪法克隆谷氨酸棒状杆菌1014-6染色体DNA上的启动子功能片段

质粒pPL 603是枯草芽孢杆菌分子克隆系统中的启动子探针质粒〔4〕, 携带有卡那霉素抗性基因(Km^r)和一个缺失启动子的氯霉素乙酰转移酶结构基因(Cat-86), 在枯草芽孢杆菌中表现为Km^r-Cm^r。当在Cm结构基因前的EcoRI单切位点中插入具有启动功能的DNA片段后, 启动cat-86基因表达, 表现为Km^r-Cm^r, 抗性水平的高低可反映启动子功能的强弱, 因此可以直接在含Km和Cm的选择性平板上筛选到克隆有较强启动子的重组质粒转化子。

将谷氨酸棒状杆菌1014-6染色体DNA和pPL 603质粒分别用EcoRI酶切、连接酶连接、转化枯草芽孢杆菌BR 151感受态细胞, 在选择性平板(Km 5 μg/ml, Cm 10 μg/ml)上筛选, 共得到30个转化子, 而在三种对照平板(质粒pPL 603直接转化、pPL 603 DNA EcoRI酶切后自身连接转化和染色体DNA EcoRI酶切后自身连接转化)上均未发现转化子, 初步说明具有启动功能的片段是来自于谷氨酸棒状杆菌的染色体DNA。

经Cm抗性水平测定后, 选取抗性达200 μg/ml的11个转化子抽提质粒, 以此两次转化枯草芽孢杆菌BR 151感受态细胞, 结果在选择性平板上出现大量转化子, 且其Cm抗性水平不变, 说明转化子抗性水平的提高是由质粒引起的, 也说明了所抽提到的质粒的可转化性和稳定性。

用EcoRI酶切上述11个质粒及pPL 603, 电泳后发现这11个质粒除了含有

pPL 603 外, 还含有大小不等的插入片段, 其中命名为 pA 18 的质粒中所含的插入片段最小。

由于携带有 pPL 603 的枯草芽孢杆菌 BR 151 只能在 Cm 为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的平板上生长, 而携带有 pA18 的枯草芽孢杆菌 BR 151 可以在 Cm 为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的平板上生长, 后者的 Cm 抗性水平比前者提高 40 倍, 可以认为 pA18 中克隆有较强功能的启动子, 对其作进一步研究。

(二) 重组质粒 pA18 同源性分析

用 EcoRI 酶切谷氨酸棒状杆菌 1014-6 染色体 DNA 和 pA 18 质粒 DNA, 电泳, 然后用 Southern 转移法将两种 DNA 转移到硝酸纤维素滤膜上。分离 pA 18 的 EcoRI 插入片段, 以生物素标记作为探针。将两者杂交, 结果如图 1, 在相应于插入片段大小的染色体 DNA EcoRI 酶切片段处和 pA 18 插入片段处均呈现明显的杂交带, 而在染色体 DNA 的其它 EcoRI 酶切片段和

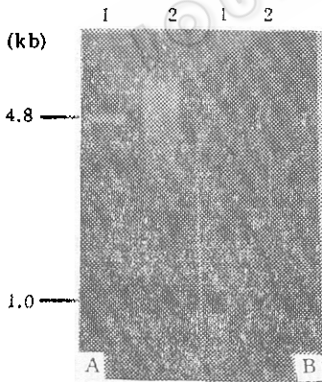


图 1 生物素标记的 DNA-DNA 分子杂交图
Fig. 1 Southern hybridization with biotin labelling

A. Electrophoretic pattern of pA18 and chromosomal DNA after digestion with EcoRI

B. Southern hybridization

1. Recombinant plasmid pA 18
2. Chromosomal DNA after digestion with EcoRI

pA18 的载体处无杂交带, 证明质粒 pA18 的插入片段与谷氨酸棒状杆菌染色体 DNA 具有同源性, 它来自于该染色体 DNA。

(三) 重组质粒 pA18 插入片段的亚克隆

pA 18 插入片段长 1 kb (图 1), 远远大于理论上的启动子大小, 估计大部分序列和启动子功能无关, 可以进一步缩短。

1. 插入片段的限制酶酶切图谱: 选取 Ava I, BamHI, BclI, BglII, EcoRI, Hind III, Pst I, Pvu II, Sal I, Sau 3A, SmaI, XbaI, XhoI 共 13 种限制酶制作 pA 18 插入片段的酶切图谱。限制酶的配对情况见表 1、表 2。

表 1 pA18 酶切分析结果
Table 1 Enzymatic digestion of pA18

Restriction endonuclease	Restriction enzyme sites in pA18	Restriction enzyme sites in the insertion	Fragment size (kb)
Ava I	1	1	5.8
BamHI	2	2	5.3, 0.5
Bcl I	2	1	4.7, 1.1
Bgl II	1	0	5.8
EcoRI	2	0	4.8, 1.0
Hind III	3	2	4.0, 1.2, 0.6
Pst I	1	0	5.8
Pvu II	1	0	5.8
Sal I	0	0	
Sau 3A	多个	多个	
Sma I	1	1	5.8
Xba I	2	0	5.2, 0.6
Xho I	0	0	
Pvu II / Ava I	2	1	3.7, 2.1
Pvu II / BamHI	3	2	3.7, 1.6, 0.5
Pvu II / Sma I	2	1	3.7, 2.1

2. 插入片段的亚克隆: 质粒 pPL 703 是质粒 pPL 603 中一段 203 bp 的 EcoRI -Pst I 片段, 被一个长 21 bp 的多聚接头 (EcoRI, BamHI, SalI, PstI) 取代后

表 2 pA18 酶切分析
Table 2 Enzymatic digestion of pA18

Restriction endonuclease	Restriction enzyme sites in pA18	Restriction enzyme sites in the insertion	Fragment size* (kb)
Ava I / Bcl I	3	2	4.7, 1.1
Hind III / Sma I	4	3	4.0, 1.2, 0.3, 0.3
Hind III / Bcl I	5	3	4.0, 0.8, 0.4, 0.3, 0.3
Hind III / Ava I	4	3	4.0, 1.2, 0.3, 0.3
Sma I / Bcl I	3	2	4.7, 1.1
Bcl I / EcoR I	4	1	4.4, 0.7, 0.4, 0.3
Hind III / BamH I	5	4	4.0, 1.0, 0.3, 0.3, 0.2
BamH I / EcoR I	4	2	4.8, 0.5, 0.3, 0.2
Hind III / EcoR I	6	2	4.0, 0.8, 0.5, 0.5

产生的另一个启动子探针质粒^[8], 可以用作亚克隆的载体。分离 pA18 中的 EcoRI 插入片段, 按表 3 克隆入 pPL 703 中, 转化枯草芽孢杆菌 BR 151 感受态细胞的结果见表 3, 可见 BamHI 片段是具有启动子功能的最小片段。

从表 3 结果中发现: (1) 在同样的启动子作用下, pPL 603 表现的 Cm 抗性比 pPL 703 高; (2) pPL 703 中的插入片段缩短后其抗性水平有明显提高。说明启动子的位置与其功能直接相关, 与高美华等^[9]和敖世洲等^[10]的报道一致。

(四) 启动子的核苷酸序列分析

为了研究克隆到的启动子的结构, 我们测定了 pA18 BamHI 小片段 (约 0.5 kb) 的核苷酸序列。

表 3 插入片段的亚克隆
Table 3 Subcloning of the insertion in pA18

The Insertion digestion	The vector pPL703 digestion	Selection on the selective plate	Cm resistant level	The name of insertion
No digestion	EcoRI digestion	Transformants	100 µg/ml	EcoRI fragment
BamHI digestion	EcoRI/BamHI double enzyme digestion	no transformants	/	/
	BamHI digestion	transformants	150 µg/ml	BamHI fragment
BamHI partial digestion	EcoRI/BamHI double enzyme digestion	Transformants	100 µg/ml	EcoRI/BamHI fragment
	BamHI digestion	Transformants	150 µg/ml	BamHI fragment

分离 pA 18 的 BamHI 小片段, 同时用 BamHI 酶切 M13 mp18 RF-DNA, 将两者用 T 4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* JM 103 菌株的感受态细胞^[5], 在加有 X-gal 和 IPTG 的 2 YT 半固体双层平板培养 12 h 后挑取白斑。取单个白斑接于 2 YT 培养液中扩增, 取菌体用碱法抽提 RF-DNA (上清液于 4 °C 保存), 并用 BamHI 酶切、电泳检查, 挑选出与 pA18 中的 BamHI 片段一致的重组 M13mp18 噬菌体, 取其上清液于 2 YT 培养液中扩

增 6 h, 离心后将上清液用 20% PEG-6 000, 2.5 mol/L NaCl 溶液沉淀单链噬菌体 DNA。以纯净的重组 M13 mp18 噬菌体单链 DNA 为模板, 用 Sanger 双脱氧核苷酸链终止法进行序列分析, 结果见图 2。在所得到的 408 bp 长的序列中, 第 298 位存在一个 Hind III 位点, 它与该序列中的 BamHI 位点相距约 0.3 kb, 由此说明所分析的 BamHI 片段就是 pA18 中的 BamHI 小片段, 也就是包含有启动子的片段。

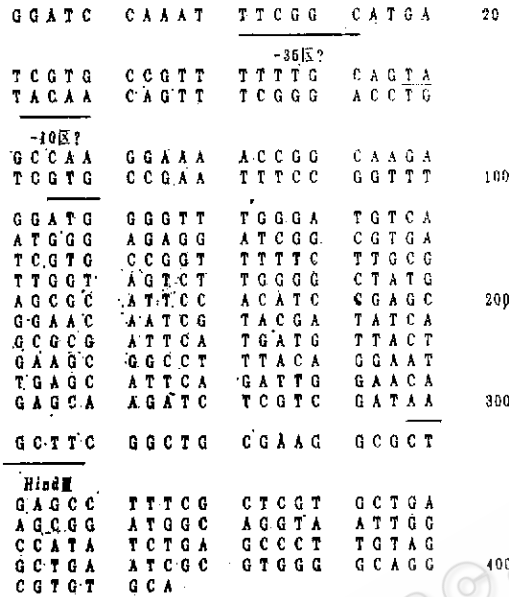


图 2 启动子片段的核苷酸序列
Fig. 2 Nucleotide sequence of the promoter

表 4 列举了一些棒状杆菌类启动子的结构。一般认为这类细菌的启动子与大肠杆菌启动子有很大相似性^[12-14]。在图 2 序列中, 第11—16和39—45位置存在类

似于表 4 中“-35”区和“-10”区的序列, 初步认为这两段序列是本文所克隆启动子的“-35”区和“-10”区列。

表 4 棒状菌类启动子的结构
Table 4 The structure of promoter of *Corynebacteria*

The source of promoter		-35 sequence	-10 sequence
pPM 330 from <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ^[3]	ORF 1	TTGCGC	TTAAGA
	ORF 5	TTCACC	TTAATA
ppc gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032 ^[11]		TTGATG	CGAAAT
Trp operon from <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ^[2]		TACACA	AATAAT

参 考 文 献

[1] Morinaga, Y. et al., *J. Biotechnol.*, 5(4):305, 1987.
 [2] Sano, K. et al., *Gene*, 52(2-3):191, 1987.
 [3] Yamaguchi, R. et al., *Agric. Biol. Chem.*, 50(11):2771, 1986.
 [4] Williams, D. M. et al., *J. Bacteriol.*, 146(3):1162, 1981.
 [5] Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (Second ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
 [6] 彭秀玲, 袁汉英, 基因工程实验技术, 湖南科学出版社, 长沙, 1987.

- [7] Gryczan, T. J. et al., *J. Bacteriol.*, 134:318, 1987.
[8] Messing, J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 9:309, 1981.
[9] 高美华等: 生物化学与生物物理学报, 17:56, 1985.
[10] 敖世洲等: 生物工程学报, 1(3):20, 1985.
[11] O'Regan, M. et al., *Gene*, 77:237, 1989.
[12] Rosenberg, M. et al., *Annu. Rev. Genet.*, 13:319, 1979.
[13] Siebenlist, U. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77:122, 1980.
[14] Siebenlist, U. et al., *Cell*, 20:219, 1980.

The Cloning of *Corynebacterium glutamicum* Promoter in *Bacillus subtilis* and Its Sequencing

Xu Zhenping Du Zhuhuan

(Department of Biological Sciences and Technology, Zhejiang
University, Hangzhou 310027)

A promoter fragment was cloned from chromosomal DNA of *Corynebacterium glutamicum* 1014-6 by using a promoter probing plasmid pPL 603 which functions in *Bacillus subtilis*. Biotin labelling DNA-DNA hybridization demonstrated that the promoter fragment was from *Corynebacterium glutamicum*. On the basis of constructing the restriction map of the promoter fragment, it was subcloned with another promoter probing plasmid pPL703 and its size was shortened to 0.5 kb. After sequencing the promoter, its sites of -35 and -10 sequence was tentatively determined.

Key words *Corynebacterium glutamicum*; promoter; clone; sequence