

## 含 par 位点的重组质粒 pSJM3 的构建及其稳定性研究

毛牧灵 T. Lassana B. \* 沈萍 彭珍荣

(武汉大学生命科学院 武昌 430072)

**摘要** 利用自然质粒 pSC101par 位点的分离稳定性功能, 构建了含 par 位点的质粒 pSJM4 和 pSJM3, 通过在同样宿主 *E. coli* HB101 中的稳定性比较研究表明, 不含 par 位点的重组质粒 pSJ3 很不稳定, *E. coli* G3(pSJ3) 在培养到第 10 代时已开始出现 pSJ3 的丢失, 到培养至 50 代时则已全部丢失; 而含 par 位点的重组质粒 pSJM3 则表现得十分稳定, *E. coli* G3-1 (pSJM3) 经 70 代培养, 仍无明显的质粒丢失现象, 其稳定率保持 97% 以上。通过对不含 par 和含 par 的非重组质粒 pUC18 和 pSJM4 的稳定性比较也获得同样的结果。通过对 *E. coli* G3(pSJ3) 和 *E. coli* G3-1(pSJM3) 的产酶活性比较研究表明, G3-1 菌株明显高于 G3 菌株, 说明我们构建的重组质粒 pSJM3 上的 par 位点功能不仅没有因外源基因的表达而受影响, 而且有利于外源基因的表达。

**关键词** par 位点, 重组质粒 pSJM3, 稳定性

学科分类号 Q784

质粒作为一种细胞中的染色体外遗传因子, 从某种意义上说是宿主细胞的额外负担, 质粒的复制通常需要细胞的多种酶参与, 质粒自身也编码蛋白质产物, 这些活动都会消耗宿主的能量, 不利于它的生长和繁殖。但另一方面, 由于质粒赋予宿主细胞以特殊的机能(如抗药性和毒物降解性等), 使宿主在短期内能迅速适应改变的环境条件, 获得生长优势, 因此质粒也是细菌进化的重要因子。含有质粒的自然细胞是长期自然选择的结果, 所以被包含在细菌细胞中的自然质粒一般能稳定的传给子代, 保持种群中质粒的稳定性, 自然丢失率很低。这是因为它们有很多控制因子: 对低拷贝数质粒而言, 有二个主要的控制因子, 一个是 par 位点(Partition locus), 具有控制质粒分离的功能, 将细胞分裂与质粒复制协调起来, 以保证每个细胞至少获得一个拷贝。第二个控制因子是“抑制细胞分裂系统”(Control of cell division, 简称 ccd), 这个系统可使没有获得质粒的子代细胞的分裂受到抑制, 从而保证含质粒的细胞在细胞群体中处于优势地位; 对高拷贝数质粒而言, 主要是通过多拷贝的随机分配, 保证子细胞获得质粒, 但高拷贝数质粒往往会聚合成多聚体, 影响分配, 因此许多高拷贝的自然质粒往往还有多聚体解离系统(Multimer resolution system), 使质粒在分配之前分解成单体, 以保证每个子细胞都能获得质粒, 从而保证质粒的稳定遗传。

重组质粒一般是利用人工构建的各种类型的质粒与异源 DNA 片段组成, 是非自然

国家教委重点项目资助课题。

\* 在武汉大学留学的马里硕士, 现工作在马里医学院。

收稿日期: 1996-10-31, 修回日期: 1997-05-10。

的,而且是人为地通过各种方法引进宿主细胞,而不是自然存在于宿主细胞中的。重组质粒一般缺乏稳定因子和像自然质粒那样的控制因子,加之重组质粒分子量加大,外源基因要表达蛋白质,消耗宿主细胞的营养物、能量及相关酶等,所以重组质粒就有可能不稳定。这种不稳定性分两种情况:(1)分离不稳定性,也就是在子细胞中,有的细胞没有得到质粒,整个质粒的丢失。(2)结构不稳定性,重组质粒上的外源插入片段或其他 DNA 片段由于分子内和分子间的重组而发生的重排,缺失,插入。我们实验室构建的含重组质粒 pSJ3 的工程菌株 G3<sup>[1]</sup>,在摇瓶发酵条件下,所产生的碱性蛋白酶比出发菌株高 3~4 倍,但却十分不稳定。因此,我们想利用自然质粒的稳定因子来控制重组质粒的稳定性。已知自然质粒 pSC101 的 par 位点是一个大小为 300bp 的顺式作用位点,能和细胞内的某些因子(如细胞膜,INF 因子等)以特定方式结合并把质粒在细胞分裂时平均分配到子细胞中,起到稳定质粒的作用<sup>[2,3]</sup>。因此能否利用 par 位点的这种特性来稳定人工构建的质粒已引起人们的广泛兴趣,已有报道表明 par 对 pUC9 具有明显的稳定作用<sup>[4]</sup>,但对重组质粒的稳定作用却往往因外源基因的表达而受影响,不能达到完全的稳定性<sup>[5]</sup>。本研究试图用文献[4]报道的方法将 par 位点克隆到 pSJ3 重组质粒上,以此来加强其稳定性,获得既能提高酶活性又能稳定遗传的工程菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

嗜麦芽假单胞菌 P27(*Pseudomonas maltophilia* P27),由本实验室分离保存。*E. coli* HB101 和 *E. coli* AS.1.1434(F<sup>-</sup>NaI<sup>r</sup>polA<sup>-</sup>)分别作为质粒转化和选择 par 位点的受体菌。*E. coli* HB101(pSC101,TCr),由上海生物工程中心惠赠,作为本研究中克隆 par 位点的供体菌。*E. coli* HB101 G3(pSJ3),由本室构建,所含质粒 pJS3 为 pUC18 上插入有来自 *P. maltophilia* 的 E coRI 碱性蛋白酶基因片段(2.8kb)。

### 1.2 培养基

LB 和 M9 培养基配制按文献[6];碱性蛋白酶检测平板和发酵培养基配制按文献[1]。

### 1.3 方法

DNA 酶切分析,连接反应,细菌转化,质粒 DNA 的提纯和快速检测均参照文献[6]进行。碱性蛋白酶活性试验按文献[1]进行。

质粒稳定性实验,基本上按文献[4]报道的方法:细菌先在含 AP 的 LB 培养基中 37℃(*E. coli* AS.1434 菌株在 30℃)培养过夜,然后在无选择压力的 M9 培养基中培养,每 10 代转接一次,接种量为 1/1000(24h 为 10 代)。培养液经一定稀释后,先涂布于不含 AP 的 LB 平板上,形成单菌落,然后接种到含 AP 的 LB 平板上,通过两种平板上长出的菌落数之差计算质粒的稳定率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 含 par 位点的重组质粒 pSJM3 的构建

根据 pSC101 质粒的遗传及物理图谱,已知其复制区(rep)和 par 紧密连锁,并同在一

个 Hind II 片段上<sup>[7]</sup>, 而重组质粒 pSJ3 的多克隆位点上含有 Sma I 酶切位点<sup>[1]</sup>. 因此我们利用这两个形成平末端的限制酶分别切割质粒 pSC101 和 pSJ3, 经体外连接后转化到 *E. coli* AS. 1. 1434(*polA*<sup>-</sup>) 受体细胞中, 在含 AP 的酪素平板上筛选转化子. 如果含碱性蛋白酶基因的转化子可将其产物分泌至胞外, 则在酪素平板上能形成分解酪素的透明圈, 因此很容易筛选到这类转化子<sup>[1]</sup>. 此外, 由于 pSC101 *par* 位点不编码任何基因产物, 无检测标记, 因此我们选用一株具有 *PolA*<sup>-</sup> 遗传特征的菌株为选择 *par* 位点的受体菌株, 利用 pUC18 及其衍生质粒 (包括我们构建的 pSJ3) 的复制依赖于 *PolA* 酶, 而 pSC101 对该酶无依赖性以及 *par* 与 *rep* 紧密连锁的特征, 在体外进行连接反应并转化至 *polA*<sup>-</sup> 菌株, 如果 pSJ3 和 pSC101 的 *rep-par* 的连接物转入 *PolA*<sup>-</sup> 受体菌, 那么在含 AP 的酪素选择平板上就很容易选择到含 *rep-par* 片段的 pSJ3 的转化子 (图 1), 因为不含有 *rep-par* 区的 pSJ3 在 *PolA*<sup>-</sup> 受体菌中是不能复制的, 因此其宿主也就不能在含 AP 的选择平板上生长.

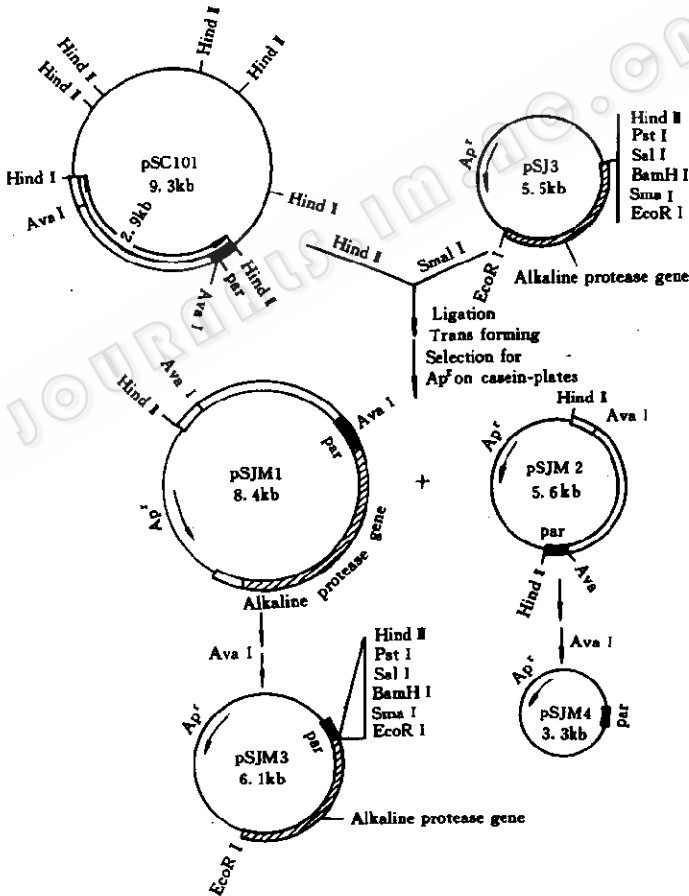


图 1 pSJM3 质粒的构建

Fig. 1 The scheme of construction of plasmid pSJM3

这次实验中,我们除获得了能形成透明圈的转化子外,还发现有不形成透明圈的转化子。通过对这二种转化子的质粒检测发现前者所含质粒大小约为 8.4kb,后者的质粒大小约为 5.6kb。已知 HindIII 切割 pSC101 产生 7 个 DNA 片段,其中 2.9kb 的片段包含有 rep-par 区<sup>[7]</sup>,8.4kb 大小的质粒正好是 pSJ3(5.5kb)与 rep-par(2.9kb)相加之和,称为 pSJM1;而 5.6kb 大小的质粒正好是 pUC18(2.7kb)与 rep-par 区(2.9kb)相加之和。说明不形成透明圈的转化子所含的质粒携带了 rep-par 片段,这一点后来用 AvaI 消化的结果得到进一步证实,但却失去了原来质粒上的碱性蛋白酶基因片段,实际上是一个含 rep-par 区的 pUC18 质粒,称为 pSJM2。用 AvaI 分别消化 pSJM1 和 pSJM2,以切除 rep 区,经 DNA 聚合酶 I 和 4 种 dNTP 补平并经 T4 连接酶连接后,获得了只含 par 的 pSJM3(6.1kb)和 pSJM4(3.3kb)质粒(图 2-2,3)。将 pSJM3 重组质粒转化到 *E. coli* HB101 中,在含 AP 的酪素平板上检测形成透明圈情况(图 3),结果进一步证实 pSJM3 是一个含有 par 位点和克隆有碱性蛋白酶基因的重组质粒,将含该质粒的菌株称为 *E. coli* HB101G3-1。

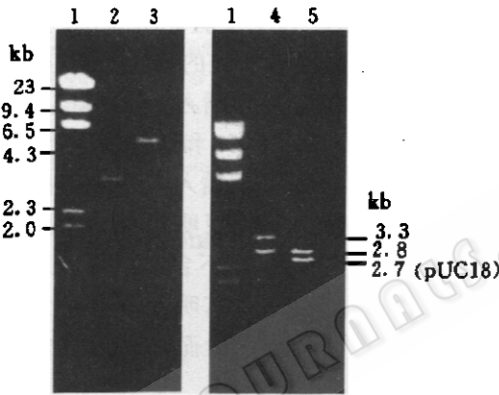


图 2 重组质粒 pSJM4 和 pSJM3 的限制酶切分析图谱

Fig. 1 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmids pSJM4 and pSJM3  
1.  $\lambda$ DNA/Hind III marker; 2. pSJM4/BamH I;  
3. pSJM3/BamH I; 4. pSJM3/EcoR I;  
5. pSJ3/EcoR I

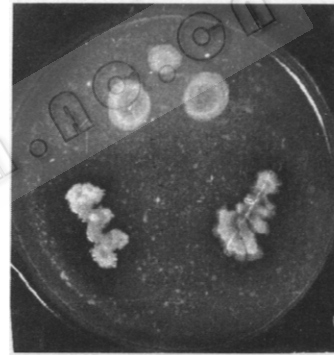


图 3 生长在酪素平板上的转化子  
*E. coli* HB101 G3-1/(pSJM3)

Fig. 3 Transformants *E. coli* HB101G3-1/(pSJM3) grown on Casein-plate

## 2.2 重组质粒 pSJM3 的稳定性

对重组质粒 pSJ3 及 pSJM3 在宿主 *E. coli* HB101 中的稳定性进行了比较研究,即将含 pSJM3 的 G3 菌和含 pSJM3 的 G3-1 菌在 M9 非选择培养基中进行传代培养,然后在含 AP 和不含 AP 的 LB 平板上检测菌落生长数,计算所含质粒的稳定率,结果如表 1 所示。

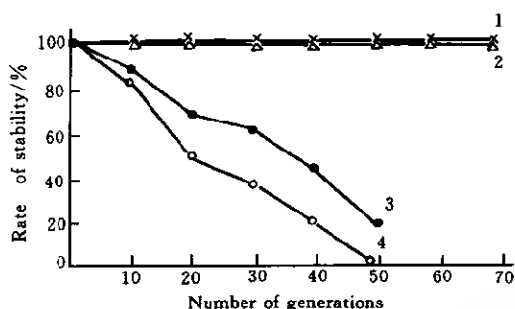
由表 1 可以看出 G3 菌在第 10 代已开始出现质粒 pSJ3 的丢失,其稳定率为 81%,到培养至 50 代时,则已全部丢失,说明 pSJ3 重组质粒在分离上很不稳定。相反,克隆有 par 区的重组质粒 pSJM3 在同样的宿主细胞中则表现的相当稳定,经 70 代 M9 非选择培养,基本没有丢失现象,这说明 pSC101 的 par 区可以有效地提高 pSJM3 的稳定性,用 pUC18 和 pSJM4 的稳定性比较实验也获得同样的结果(图 4)。

表 1 重组质粒 pSJ3 和 pSJM3 的稳定性比较

Table 1 Comparison of stability between recombinant plasmids pSJ3 and pSJM3

Number of generations	10		20		30		40		50		60		70		
	G3	G3-1	G3	G3-1	G3	G3-1	G3	G3-1	G3	G3-1	G3	G3-1	G3	G3-1	
Medium	LB	191	211	441	187	740	252	381	332	-	319	-	227	-	293
	LB+AP	154	208	237	186	289	246	89	324	-	312	-	222	-	286
Rate of stability/%	81	~100	54	~100	39	~100	23	97	0	~100	-	98	-	97	

注:表中的数据为 3 批实验的总和。

图 4 par<sup>+</sup>和 par<sup>-</sup>质粒稳定性的比较Fig. 4 Comparison of stability between par<sup>+</sup> and par<sup>-</sup> plasmids

1. pSJM4 (par<sup>+</sup>), 2. pSJM3 (par<sup>+</sup>), 3. pUC18 (par<sup>-</sup>), 4. pSJ3 (par<sup>-</sup>)

稳定性。

在含 AP 的酪素平板上检测经 60, 70 代培养的 G3-1 (pSJM3) 菌株形成透明圈的情况及质粒的酶切分析表明, pSJM3 质粒上的 2.8kb 插入片段十分稳定, 无丢失现象, 从而进一步证实了图 4 中的 pSJM4 和 pSJM3 的稳定性比较的可靠性。

### 2.3 E. coli HB101G3-1/(pSJM3) 的产酶活性

将 G3-1 菌株培养在检测碱性蛋白酶活性的液体发酵培养基中, 按文献[1]的方法进行培养和检测, 并以嗜麦芽假单胞菌 P27 和 G3 (pSJ3 质粒) 菌株作对照, 实验结果如表 2 所示。

由表 2 可以看出, 含重组质粒 pSJM3 的菌株 G3-1 酶活性比 G3 株有明显地提高, 这显然与所含质粒的稳定性有关, 在 66h 的培养过程中, 由于 G3 株所含质粒 pSJ3 较易丢失, 必然会造成所产生的碱性蛋白酶不如 G3-1 株高, 虽然二种质粒在发酵培养基中的稳定情况可能

重组质粒 pSJ3 和 pSJM3 都携带有一段 2.8kb 的外源 DNA 片段(图 2-4, 5), 所不同的是后者还克隆有约 300bp 的 par 位点。以上实验证明 par 位点能有效地控制重组质粒的分离稳定性, 而且这种稳定性不因插入的 2.8kb 片段而受影响, 即 pSJM4 和 pSJM3 都含有 par 位点, 但后者还插入有 2.8kb 的外源 DNA 片段, 实验表明二者的稳定性均在 100% 左右; 而不含 par 的 pUC18 和 pSJ3 的稳定性却有明显的差异, 后者因插入有 2.8kb 片段而表现为更低的

表 2 含 pSJM3 重组质粒的菌株 G3-1 的产酶活性

Table 2 The activity of alkaline protease produced by G3-1 strain carrying recombinant pSJM3

Strains	Activity of alkaline protease/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<i>P. maltophilia</i> P27	340
<i>E. coli</i> HB101 G3/(pSJ3)	1219
<i>E. coli</i> HB101 G3-1/(pSJM3)	1431
<i>E. coli</i> HB101	0

注:表中数字为 3 次实验的平均值, 培养 66h。

会有不同,但从实际结果来看,我们构建的 pSJM3 质粒明显优于原来的 pSJ3。一般而言,外源基因的表达可能对 par 的功能有很大影响,特别是如果外源基因在翻译时通读到了 par 位点便会阻碍 par 的稳定功能<sup>[5]</sup>,我们的实验表明,pSJM3 达到完全稳定,表明碱性蛋白酶基因的表达未影响 par 的功能,par 在 pSJM3 上处于一个很合适的位置,我们成功的构建了一个含 par 位点并能稳定遗传的 pSJM3 重组质粒,携带该质粒的 G3-1 菌株所产生的碱性蛋白酶不仅能分泌至胞外,而且其酶活高于原来菌株 G3,所以 par 的稳定功能实际上是提高了酶的产量。特别值得一提的是,我们在实验过程中获得的含 par 位点的 pSJM4 为获得其它基因的稳定克隆提供了一个十分有用的载体。

### 参 考 文 献

- 1 江盛梅,沈 萍,彭珍荣. 生物工程学报,1993,9:266~270
- 2 Tucker W T, Miller C A, Cohen S N. Cell, 1984, 38: 191~201
- 3 Conloy D L. J Bacteriol. 1995, 177: 1086~1089
- 4 王 扬,张志毅,杨胜利等. 生物工程学报,1992, 8: 134~139
- 5 Skogman G, Nilsson J, Gustafsson P. Gene, 1983, 23: 105~115
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition, CSH Laboratory, New York, 1989
- 7 Meacock P A, Cohen S N. Cell, 1980, 20: 529~542

## Construction of Recombinant Plasmid pSJM3 Containing par Region and Study on Its Stability

Mao Muling T. Lassana B. Shen Ping Peng Zhenrong

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract** The plasmids pSJM4 and pSJM3, which contain both par region, were constructed. The comparative studies on stabilities of plasmids in same host (*E. coli* HB101) showed that recombinant plasmid pSJ3 containing 2.8kb alkaline protease gene fragment but not par region was very unstable. Some of G3 (pSJ3) strains lost their plasmids when they were cultured to 10 generations in nonselected medium, and no plasmids, essentially, were detected to 50 generations. However, the recombinant plasmid pSJM3 which consists of pSJ3 and par region was extremely stable. When G3-1 (pSJM3) strain was cultured even to 70 generations, no plasmids were almost lost from their host populations, and rate of stability is over 97%. Same result was obtained by comparative studies on stabilities between pUC18(par) and pSJM4 (par<sup>+</sup>). The comparison of activities of alkaline protease produced by strains G3 (pSJ3) and G3-1(pSJM3) indicated that the enzyme activity produced by strain G3-1(pSJM3) was higher than that of strain G3 (pSJ3). It is proved that function of par region inserted in pSJM3 not only is unaffected by expression of foreign genes but is favourable.

**Key words** par region, recombinant plasmid pSJM3, stability