

# 在变铅青链霉菌基因组中定域克隆外源 DNA 的置换性载体及通过反选择获得重组体的模式方法\*

周秀芬<sup>1 2</sup> 白林泉<sup>1</sup> 邓子新<sup>1 2</sup> Kieser Tobias<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(华中农业大学生命科技学院 武汉 430070)

<sup>2</sup>(John Innes Center, Norwich, UK)

**摘 要**  $\Phi$ HAU3<sup>R</sup> 是变铅青链霉菌 66 中对噬菌体  $\Phi$ HAU3 显示抗性的基因,已从基因组中获得分离。将基因组中邻近于该基因两侧的一个 3.5kb 和另一个 3.8kb 的 DNA 片段分别以其在染色体上的天然取向插入到一个由 pIJ101 衍生的质粒 pIJ653 上 构建成 pHZ806。然后在 pHZ806 上对应于 pIJ101 复制子的区域中插入一个 *spc/str* 抗性基因,同时在 3.5kb 和 3.8kb 片段之间插入一个潮霉素抗性基因(*h<sub>yg</sub>*),衍生出一个新质粒 pHZ808。由于 pHZ808 中不具有完整的 pIJ101 复制功能区,所以它不能在链霉菌中复制。然而,在该质粒 3.5kb 和 3.8kb 片段之间插入的任何 DNA 片段,在导入到变铅青链霉菌中后都可借助于 3.5kb 和 3.8kb 两个片段与内源染色体的同源区域所发生的双交换而稳定地整入到内源染色体的特定区域(3.5kb 和 3.8kb 片段之间),同时置换出染色体上的  $\Phi$ HAU3<sup>R</sup> 基因。发生了这种基因置换的重组子菌株会对噬菌体  $\Phi$ HAU3 变得敏感,这种反选择方法可用来浓缩和初选携带定域插入片段的重组子。已利用潮霉素抗性基因(*h<sub>yg</sub>*)作为一个模式基因片段阐明了这种载体和这种在染色体上定域克隆外源基因片段的方法学和适用性。同时,用 pHZ808 作载体克隆另外的基因片段时还有另一个优越性:*h<sub>yg</sub>* 可作为报告基因一同参与外源基因片段的定域整合,携带插入片段的重组子除了对噬菌体  $\Phi$ HAU3 显示敏感性以外,还对潮霉素显示抗性。

**关键词** 链霉菌,基因克隆,基因置换

**分类号** Q753 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0141-46

探索有效的途径把有用的基因稳定地置换到染色体中一直是众多研究者长期思考和重视的问题。变铅青链霉菌是国际链霉菌分子生物学和遗传工程研究通用的受体菌体,用该菌株表达异源基因(包括高等动、植物基因)的研究发展很快。我们曾从该菌株中成功地分离了一个对噬菌体  $\Phi$ HAU3 显示抗性的基因,并将该基因定位在染色体上一个约 80 kb 的 *AseI* 片段上<sup>[1,2]</sup>,已知该片段不是变铅青链霉菌正常生长和繁殖所必须的,因为变铅青链霉菌限制性缺陷突变菌株 ZX1 基因组发生的缺失包括了 80 kb 在内的 *AseI* 片段及其相邻的大约 100 kb 的 DNA,这个区域的可缺失性以及缺失菌株会对噬菌体  $\Phi$ HAU3 变得敏感,这个特性为我们提供了用外源 DNA 置换出这个片段的可行性和敏感的筛选工具。因此,我们从变铅青链霉菌噬菌体  $\Phi$ HAU3 抗性基因两侧寻找到大小适宜(分别为 3.8kb 和 3.5 kb),易于操作的两个片段,设计了以这两个来源于野生型变铅青链

\* 国家自然科学基金,教育部和国际科学基金资助课题。

收稿日期:1998-04-27,修回日期:1999-01-07。

霉菌的 DNA 片段为媒介,通过与野生型变铅青链霉菌的同源区域进行同源重组,将  $\Phi\text{HAU3}^R$  基因区域置换出来,而将外源 DNA 稳定植入到染色体上这两个片段之间的克隆载体的构建和操作方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、质粒和噬菌体

研究中用到的链霉菌菌株有野生型变铅青链霉菌菌株 1326( $\Phi\text{HAU3}^R$ )<sup>[3]</sup>和限制性发生了缺失突变的菌株 ZX1( $\Phi\text{HAU3}^S$ )<sup>[4-6]</sup>,大肠杆菌受体菌株为 LE392( $\text{hsd R514R}^- \text{M}^+$ )<sup>[7]</sup>。质粒 pIJ653<sup>[8]</sup>系从链霉菌高拷贝质粒 pIJ101 所衍生的一个链霉菌-大肠杆菌双功能柯斯质粒,含有噬菌体  $\lambda$  的 *cos* 位点,可用于在大肠杆菌和链霉菌中选择转化子的抗性标记分别为氨基青霉素抗性基因 *bla* 和硫链丝菌素抗性基因 *tsr*。也可用于在大肠杆菌中制备基因文库;质粒 pIJ4813 和 pIJ4642 均为链霉菌高拷贝质粒,前者含有潮霉素(*hyg*)氯霉素(*cml*)抗性基因,后者含有壮观霉素/链霉素(*spc/str*)抗性基因(T. Kieser, 未发表材料)。噬菌体  $\Phi\text{HAU3}$  的部分特征见文献 9~12]。

### 1.2 培养基及试剂

实验所用的培养基、缓冲液及试剂除特殊说明外均见文献 13,14]。限制酶分别购自 Gibco-BRL 和 Promega 公司,溶菌酶和过滤柱(Costar microcentrifuge filters)均购自 Sigma 公司。在变铅青链霉菌中硫链丝菌素的使用浓度为  $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ,潮霉素的浓度为  $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 1.3 操作技术

噬菌体的感染方法参见文献 9],质粒 DNA 的制备及体外技术,大肠杆菌感受态细胞和链霉菌原生质体转化等技术参见文献 13]。基因置换技术参见文献 15]。

## 2 结 果

### 2.1 定域置换型克隆载体 pHZ808 的构建

同源重组的频率一般取决于同源片段的长度,同源片段超过 2 kb 一般视为理想。如要定域以比较高的频率置换某个区域,这个区域两端的同源片段大小最好相近。据此,我们首先以分离的  $\Phi\text{HAU3}$  抗性基因为探针,从以 pIJ653 为载体所构建的野生型变铅青链霉菌 1326 的基因文库中筛选并确证出 9 个阳性克隆。对这 9 个阳性克隆进行初步的限制酶谱分析发现 9 个杂合质粒均携带了 35~45 kb 的外源片段, $\Phi\text{HAU3}^R$  基因均位于其中。用 *Bam*HI 切除包括  $\Phi\text{HAU3}$  抗性基因在内的外源片段(约 30 kb),然后对遗留在 pIJ653 克隆位点两侧的 DNA 片段大小进行分析,发现其中一个大小约为 15 kb 并包括 pIJ653(7.9 kb,见图 1)在内的片段上,pIJ653 克隆位点的两端各自携带了 3.5 kb 和 3.8 kb 的两个片段,与 pIJ653 的克隆位点 *Bgl* II 形成的 *Bgl* II/*Mbo*I 接头不可能被 *Bam*HI 切下。这个约 15 kb 片段的自连形成了 pHZ806(图 1)。将来自链霉菌质粒 pIJ4813 中含有潮霉素抗性基因的 *Bgl* II 片段(该片段还含有氯霉素抗性基因 *cml* 但不能在链霉菌中表达),克隆到 pHZ806 中 3.5 和 3.8 kb 片段之间的 *Bam*HI 位点上就获得了 pHZ807(图 1)。由于 pHZ807 中的载体 pIJ653 含有链霉菌高拷贝质粒 pIJ101 的复制子,应将其复制功能去除,使其成为自杀性质粒才便于做基因置换试验。将来自链霉菌质粒

pIJ4642 中含有壮观霉素/链霉素抗性基因(*spc/str*)的 *Xho*I 片段克隆到 pHZ807 中链霉菌复制子区的 *Xho*I 位点上即获得了 pHZ808(图 1), pHZ808 失去了在链霉菌中的复制功能,从理论上讲,该质粒导入变铅青链霉菌后,只有当内、外源 3.5 kb 和(或 3.8 kb)的同源片段发生了同源重组,才能获得硫链丝菌素和(或潮霉素)抗性的转化子。

### 2.2 定域基因置换获得重组体的模式方法

我们用 pHZ808 上的 *hyg* 基因取代变铅青链霉菌基因组中  $\Phi$ HAU3 抗性基因区域。用 pHZ808 转化野生型变铅青链霉菌 1326 菌株,筛选硫链丝菌素抗性转化子,95% 以上这类转化子也都获得了潮霉素抗性,暗示这些转化子是发生了一次交换的产物(第一次交换既可能发生在 3.5 kb 区,也可能发生在 3.8 kb 区)(图 2A)。让这种双抗性(*thio<sup>r</sup>, hyg<sup>r</sup>*)转化子在非选择条件下培养后涂布成单菌落,再分离潮霉素抗性硫链丝菌素敏感(*hyg<sup>r</sup>, thio<sup>s</sup>*)的个体发现,最初 80% 以上的双抗菌落都丧失了对硫链丝菌素的抗性,暗示双交换以很高的频率发生(图 2B)。

为了证实双交换是定域发生在变铅青链霉菌 1326 基因组中 3.5 kb 和 3.8 kb DNA 之间的区域,我们首先测定了所获得的 *thio<sup>s</sup> hyg<sup>r</sup>* 重组子对噬菌体  $\Phi$ HAU3 的抗性情况,发现所有的个体均丧失了野生型变铅青链霉菌菌株 1326 对  $\Phi$ HAU3 的抗性表型而变得对  $\Phi$ HAU3 敏感。此外,将对  $\Phi$ HAU3 敏感的重组子基因组经 *Ase*I 酶切进行酶谱比较分析发现,  $\Phi$ HAU3 抗性基因( $\Phi$ HAU3<sup>R</sup>)所处的 80 kb *Ase*I 片段已经消失,而出现了一条约 50 多 kb 的 DNA 新带(图 3),与预期置换出来的包括  $\Phi$ HAU3 抗性基因在内的 DNA 片段的大小(约 30 kb)完全吻合。准确地反映出潮霉素抗性基因与  $\Phi$ HAU3 抗性基因区域在基因组特定区域的替代关系。

为了准确地进行基因克隆和分析重组子的需要,我们制作了 pHZ808 的详细限制酶谱(图 1)。从图 1 可知,将外源片段克隆到 pHZ808 的两个 *Bam*HI 位点之间,会置换出

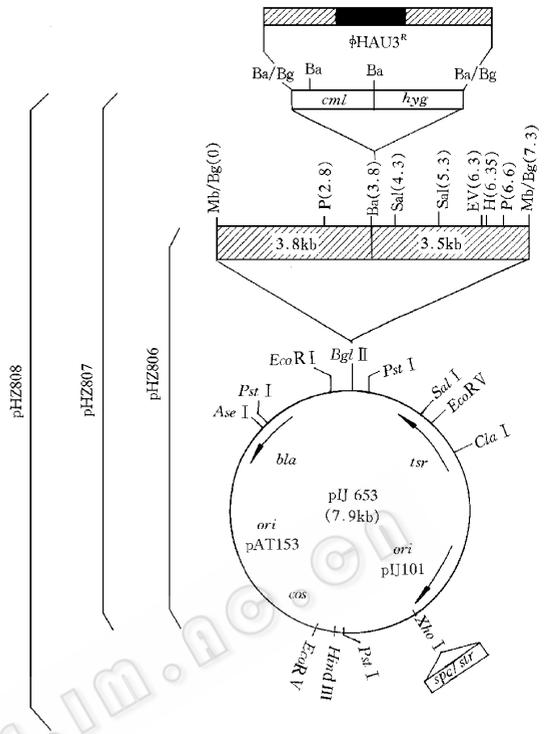


图 1 pHZ806, pHZ807 和 pHZ808 的限制酶图谱及其衍生关系

Fig. 1 Restriction maps of pHZ806 and its two derivatives pHZ807 and pHZ808

*hyg*: hygromycin resistant gene; *cml*: chloramphenicol resistant gene; *spc/str*: spectinomycin/streptomycin resistant genes; *tsr*: thiostrepton resistant gene; *bla*:  $\beta$ -lactamase gene; ampicillin resistance in *E. coli*; *cos*: cohesive end of phage  $\lambda$ ;  $\Phi$ HAU3<sup>R</sup>: *Streptomyces* phage  $\Phi$ HAU3 resistant gene isolated from wild type *Streptomyces lividans* 66; Mb: *Mbo*I; Ba: *Bam*HI; Bg: *Bgl* II; P: *Pst*I; Sal: *Sal*I; EV: *Eco*RV; H: *Hind* III

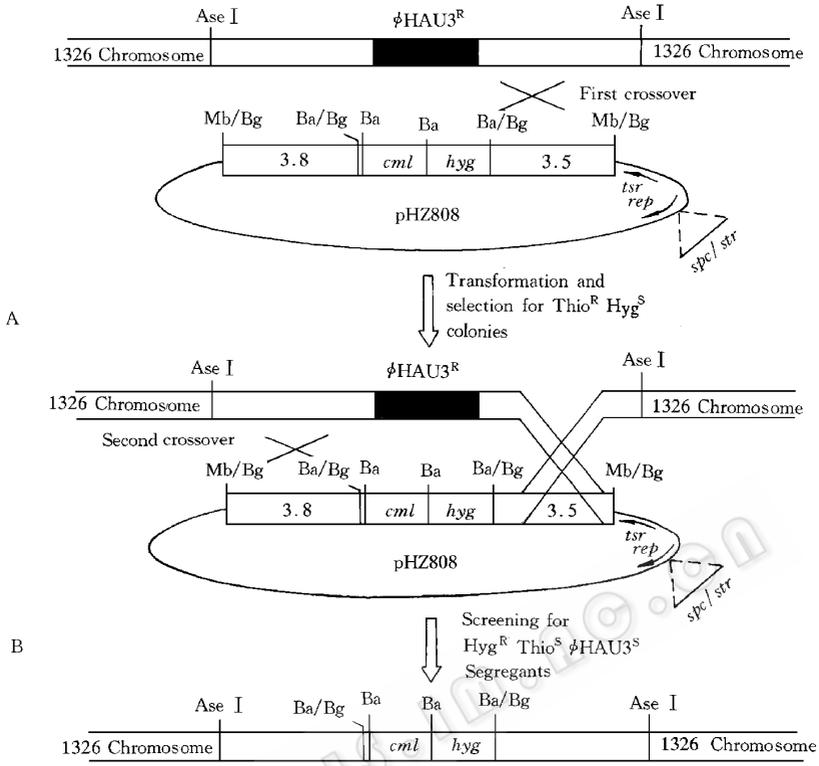


图 2 用 pHZ808 进行的基因置换试验示意图

Fig.2 Gene replacement in wild-type *Streptomyces lividans* using pHZ808

Wild-type *Streptomyces lividans* 66 chromosome is indicated as an open bar on top of this figure. The 80kb fragment with  $\Phi$ HAU3<sup>R</sup> gene in wild type strain was located between two AseI sites but is deleted in *S. lividans* mutant strain ZX1. Thio :Thiostrepton for abbreviations of *cml*, *hyg*, *spc/str* and *tsr* see Fig. 1.

原载体上的 *cml* 基因,但仍会保留 *hyg* 基因。将这种质粒衍生物导入变铅青链霉菌后由 3.5 kb 和 3.8 kb DNA 片段所介导的基因置换试验不仅会导致外源片段在基因组特定区域 3.5 kb 和 3.8 kb 片段之间的稳定整合,还会导致 *hyg* 基因的共整合,无疑这种共整合为重组子的选择提供了一个额外的选择标记,可作为外源基因插入的一个报告基因,最后的重组子既对噬菌体  $\Phi$ HAU3 显示敏感,又对潮霉素显示抗性,这个特征也有利于必要时对外源克隆片段的回收。

### 3 讨论

pHZ808 是为了在链霉菌分子生物学和基因工程研究的通用受体——变铅青链霉菌基因组的特定区域,通过基因置换技术稳定克隆一个单一拷贝的基因所设计和构建的特殊载体,作为对众多克隆载体的一个补充,它具有下述特点:①所克隆的基因与宿主染色体一起复制,只有一个拷贝,因此特别适合用来克隆和表达那些会因基因剂量效应而干扰细胞存活性的基因;②克隆的基因稳定地整合在染色体,适合用来构建工程化菌株;③克隆片段既可通过抗性标记 (*hyg<sup>r</sup>*) 进行正选择,又可通过对噬菌体  $\Phi$ HAU3 变得敏感来进

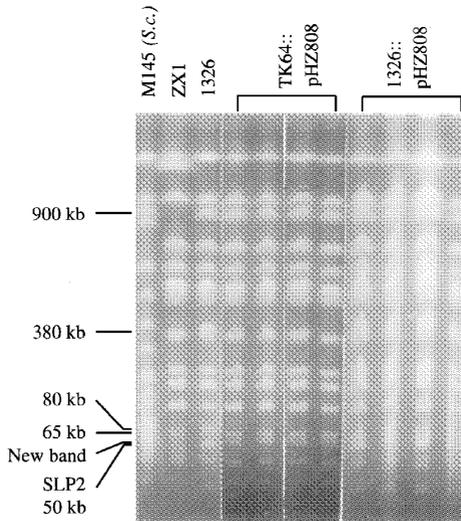


图 3 pHZ808 在野生型变铅青链霉菌中产生的定域基因置换重组子的高压脉冲电泳分析

Fig. 3 Analysis of the genomic DNA of *Streptomyces lividans* derivatives generated by gene-replacement using pHZ808 by PFGE

24h 6V/cm, 10~20s pulse, 1% agarose, TBE + 100 $\mu$ mol/L thiourea

The DNA plugs from the following strains were digested with *Ase*I and separated on PFGE in 0.5 $\times$  TBE buffer under following condition: Pulse times: 10~120 s; Angle: 120 $^\circ$ ; Volts: 6V/cm; Running time: 24 h. The DNA samples from left to right are as follows: 1. *S. coelicolor* M145 which was used as size markers, see [ 16 ] for the sizes of the individual fragments; 2. *S. lividans* mutant strain ZX1; 3. *S. lividans* wild-type 1326; 4~6. Gene replaced strains in *S. lividans* TK64 using pHZ808 ( *hyg*<sup>R</sup> *thio*<sup>S</sup>  $\Phi$ HAU3<sup>S</sup> ); 7~10. Gene replaced strain in *S. lividans* 1326 using pHZ808 ( *hyg*<sup>R</sup> *thio*<sup>S</sup>  $\Phi$ HAU3<sup>S</sup> ). Thiourea ( 100 $\mu$ mol/L ) should be added to the TBE buffer which protects wild-type *S. lividans* DNA against degradation during electrophoresis.

About 30kb DNA was deleted from 80kb *Ase*I fragment from wild-type *S. lividans* 1326, while a new fragment ( c. 50kb ) can be seen after gene replacement.

行反选择, 经过正、反选择后的重组子可以保证有外源片段的插入。④ 需要从重组子中回收克隆片段时, 可利用潮霉素抗性基因 ( *hyg* ) 作为选择性标记或探针直接克隆出与其相邻的基因片段。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 周秀芬, 邓子新, T. Kieser 等. 病毒学报, 1995, 11(1): 63~71.
- [ 2 ] Zhou X., Deng Z., T. Kieser *et al.* *Molecular Microbiology*, 1994, 12: 789~797.
- [ 3 ] J. E. Harris, K. F. Chater, C. J. Bruton *et al.* *Gene*, 1983, 22: 167~174.
- [ 4 ] Zhou X., Deng Z., T. Kieser *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 4341~4352.
- [ 5 ] 周秀芬, 邓子新, T. Kieser 等. 农业生物技术学报, 1995, 3(2): 25~31.
- [ 6 ] 周秀芬, 邓子新, T. Kieser 等. 华中农业大学学报, 1995, 14(1): 1~6.
- [ 7 ] K. Borck, J. D. Beggs, W. J. Brammar *et al.* *Molecular and General Genetics*, 1976, 146: 199~207.
- [ 8 ] Hu Z., Bao K., Zhou X. *et al.* *Molecular Microbiology*, 1994, 14(1): 163~172. 编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 9 ] 周秀芬, 邓子新, 周 启. 病毒学报, 1992, 8(4): 342~348.
- [ 10 ] 周秀芬, 邓子新, T. Kieser 等. 病毒学报, 1993, 9(4): 367~373.
- [ 11 ] 周秀芬, 邓子新, T. Kieser 等. 病毒学报, 1995, 11(2): 163~168.
- [ 12 ] X. Zhou, Z. Deng, T. Kieser *et al.* *Journal of Bacteriology*, 1994, 176: 2096~2099.
- [ 13 ] D. A. Hopwood, M. J. Bibb, K. F. Chater *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual*. Norwich: John Innes Foundation, 1985.
- [ 14 ] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: CSH Press, 1989.
- [ 15 ] T. Kieser, D. A. Hopwood. *Methods in Enzymology*, 1991, 204: 430~438.
- [ 16 ] H. Kieser, T. Kieser, D. A. Hopwood. *J. Bacteriology*, 1992, 174: 5496~5507.

## Replacement Vectors for Localized Gene Cloning in the Specified Region of *Streptomyces lividans* 66 and Model Method for the Screening of Desired Recombinants Via Counter-selection\*

Zhou Xiufen<sup>1,2</sup> Bai Linquan<sup>1</sup> Deng Zixin<sup>1,2</sup> Kieser Tobias<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

<sup>2</sup>(John Innes Center, Norwich, UK)

**Abstract** Two DNA fragments (3.5 kb and 3.8 kb in size) flanking both ends of the  $\Phi$ HAU3<sup>R</sup> gene in the genome of *Streptomyces lividans* 66 have been determined and cloned in their natural relative orientations in pIJ653, a cosmid vector derived from the multi-copy *Streptomyces* plasmid pIJ101, resulting pHZ806. After insertion of spectinomycin/streptomycin (*spc/str*) resistance gene into the pIJ101 replication region in pHZ806 and insertion of a hygromycin (*hyg*) resistance gene between 3.5kb and 3.8kb DNA fragments, a new vector with a non-functional *Streptomyces* replicon, pHZ808, was obtained. In principle, any DNA fragment cloned between 3.5 kb and 3.8 kb fragments of this vector can be stably integrated between the two corresponding regions after introduction into the wild-type *S. lividans* strains, with synchronous replacement of the DNA between the two regions of the chromosome within which  $\Phi$ HAU3<sup>R</sup> gene is located. The resulted recombinant strains will thus become  $\Phi$ HAU3-sensitive ( $\Phi$ HAU3<sup>s</sup>). This phenotype could be served as a good indication that desired gene replacement had occurred. This principle had been demonstrated to be successful using pHZ808 as vector.  $\Phi$ HAU3-resistance gene ( $\Phi$ HAU3<sup>R</sup>) from the genome of *S. lividans* 1326 had been substituted by the hygromycin resistance gene (*hyg*<sup>R</sup>) from pHZ808. An additional advantage of using pHZ808 as vector to clone foreign genes is that *hyg* could be served as a report gene to imply that foreign DNA fragment had been co-integrated with *hyg*. The recombinants will both be *hyg*<sup>R</sup> and  $\Phi$ HAU3<sup>s</sup>.

**Key words** *Streptomyces*, gene cloning, gene replacement