

一种基于 *lacZ* 基因和 pUC 复制子的原核启动子报告系统的构建及评价

付立霞^{1,2}, 徐敬潇³, 韩先干⁴, 杨辉², 赖迎迢¹, 黄志斌¹, 龚建森³

1 农业农村部渔用药物创制重点实验室 广东省水产动物免疫技术重点实验室 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380

2 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009

3 中国农业科学院家禽研究所, 江苏 扬州 225125

4 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241

付立霞, 徐敬潇, 韩先干, 等. 一种基于 *lacZ* 基因和 pUC 复制子的原核启动子报告系统的构建及评价. 生物工程学报, 2021, 37(1): 321-330.

Fu LX, Xu JX, Han XG, et al. Construction and evaluation of a pUC-type prokaryotic promoter reporter system based on *lacZ* gene. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 321-330.

摘要: 为构建一种具有广泛适用性的原核启动子报告系统, 以质粒 pFLX107 为骨架, 通过多克隆位点替换和序列改造, 构建出基于 *lacZ* 基因和 pUC 复制子的 pFGH 系列报告载体, 然后以 *lacZ* 基因缺失株 MC4100 为宿主菌筛选背景活性最低的质粒作为最终的报告系统, 并利用诱导型启动子 *araBAD* 和组成型启动子 *rpsM* 分别对其进行测试。结果显示, 在所构建的 pFGH 系列质粒中, pFGH06 的背景活性显著低于同系列其他质粒, 在 28 °C 培养条件下甚至显著低于低拷贝参考质粒 pRCL 的活性 ($P < 0.01$)。进一步的评估测试显示, 质粒 pFGH06 可用于诱导型启动子或组成型启动子的克隆及活性测定, 且在模拟应用于启动子筛选时, 通过蓝白斑筛选即可实现对目标启动子的完全识别。与已报道的原核启动子报告系统相比, pFGH06 具有体积小、克隆位点多、背景活性可调、对启动子筛选识别效率高等优点, 具有广泛的应用前景。

关键词: 报告基因, β -半乳糖苷酶, 定点突变, 启动子报告系统, pUC 复制子, 阿拉伯糖启动子

Received: May 9, 2020; **Accepted:** July 3, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2019YFD0900103), National Natural Science Foundation of China (No. 31772758), the Open Project Program of Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs and Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province (No. 201801), the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2016B020234003).

Corresponding authors: Zhibin Huang. Tel: +86-20-81334212; E-mail: hzb1393@163.com

Jiansen Gong. Tel: +86-514-85599282; E-mail: jjsensen@163.com

国家重点研发计划 (No. 2019YFD0900103), 国家自然科学基金 (No. 31772758), 农业农村部渔用药物创制重点实验室和广东省水产动物免疫技术重点实验室项目 (No. 201801), 广东省科技计划项目 (No. 2016B020234003) 资助。

网络出版时间: 2020-08-13

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200812.1104.016.html>

Construction and evaluation of a pUC-type prokaryotic promoter reporter system based on *lacZ* gene

Lixia Fu^{1,2}, Jingxiao Xu³, Xian'gan Han⁴, Hui Yang², Yingtiao Lai¹, Zhibin Huang¹, and Jiansen Gong³

1 Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China

2 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

3 Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225125, Jiangsu, China

4 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

Abstract: To construct a prokaryotic promoter report system with wide applicability, a series of pFGH reporter vectors based on *lacZ* gene and pUC replicon were constructed from plasmid pFLX107 through the replacement of multiple cloning sites and sequence modifications. The plasmid with the lowest background activity was selected as the final report system with the *lacZ* gene deletion strain MC4100 as the host bacterium, following by testing with inducible promoter araBAD and the constitutive promoter rpsM. The background activity of pFGH06 was significantly lower than that of other plasmids of the same series, and even lower than that of reference plasmid pRCL at 28 °C ($P < 0.01$). Further evaluation tests show that the plasmid pFGH06 could be used to clone and determine the activity of inducible promoter or constitutive promoter, and the complete recognition of the target promoter could be achieved through blue-white selection in the simulation test of promoter screening. Compared with the reported prokaryotic promoter report systems, pFGH06 has the advantages of smaller size, more multiple clone sites, adjustable background activity, high efficiency of promoter screening and recognition, thus with a wide application prospect.

Keywords: reporter gene, β -galactosidase, site-directed mutagenesis, promoter reporter system, pUC replicon, arabinose promoter

原核启动子是位于基因上游的一段能被 RNA 聚合酶识别、结合并起始转录的特定 DNA 序列,其主要功能是控制基因表达的强度及模式,是基因转录水平调控的中心^[1-2],因此对启动子进行准确识别与鉴定是研究分析基因功能及其调控机制的前提和基础,对于实现特定实验目的而进行的相关基因工程载体构建和突变菌株改造亦具有十分重要的意义^[3-4]。

随着越来越多细菌和病毒基因组序列被测定并发布,以及生物信息学的发展,对启动子的识别可借助于各种基于不同算法的软件模型进行预测^[5-6],但最终的验证或鉴定仍需通过报告基因系统来完成。迄今,已报道的可用于启动子筛选及活性测定的报告基因有氯霉素乙酰基转移酶、绿色荧光蛋白、荧光素酶和 β -半乳糖苷酶等^[7-10],

其中由 *lacZ* 基因编码的 β -半乳糖苷酶具有良好的稳定性,在多种生物体中均能正确表达和折叠,且能比较方便地进行定量检测等优点,使得其目前仍是基因工程中最常用、最成熟的一种报告基因^[11-13]。

然而,当前基于 *lacZ* 基因的原核启动子报告系统多为低拷贝的穿梭载体,体积较大,不便于启动子克隆时重组质粒的构建,通常还会降低对弱启动子的检测灵敏度。此外,这些载体中紧邻 *lacZ* 基因上游的克隆位点普遍偏少,也不便于序列中含有相同酶切位点的启动子克隆;最后,部分报告系统所用宿主菌并非 *lacZ* 基因缺失突变株,潜在的背景活性也会干扰测定结果^[10,14-16]。鉴于此,本研究以质粒 pFLX107 为基础,通过多克隆位点置换和序列改造构建出一系列基于 *lacZ*

基因和 pUC 复制子的启动子报告载体, 然后以 *lacZ* 基因缺失株 MC4100 为宿主菌筛选背景活性最低的质粒作为最终的报告系统, 并利用诱导型启动子 araBAD 和组成型启动子 rpsM 分别对其进行测试, 以期获得具有广泛适用性的原核启动子报告或检测体系。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及试剂

大肠杆菌 DH5 α 化学感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 大肠杆菌 *lacZ* 基因突变菌株 MC4100 源自日本生物资源项目 (National Bioresource Project, NBRP)。质粒 pRCL 和 pKD46 由中国农业科学院上海兽医研究所王少辉博士惠赠^[16-17]; pFLX107 为本实验构建保存^[18]; pFPV25.1 源自于南京农业大学动物医学院刘永杰教授课题组^[19]。

限制性内切酶 *Bgl* II、*Sph* I、*Xba* I, T4 DNA 连接酶, PrimeSTAR HS (Premix), Premix Taq, DNA Marker DL5000, X-gal, ONPG 等均购自 TaKaRa 公司; 氯霉素和 SDS 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Na₂HPO₄·7H₂O、NaH₂PO₄·H₂O、MgSO₄、Na₂CO₃ 和氯仿等试剂购自国药集团化学试剂有限公司。 β -巯基乙醇和 L-阿拉伯糖为 Sigma 公司产品; DNA Mini Kit、Presto Mini Plasmid Kit 和 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit 等为 Geneaid 产品, 所有操作均按产品说明书进行。

1.2 引物设计

为便于后续实验设计, 需将 *lacZ* 基因中的 *Cla* I、*Sac* I、*Nde* I 酶切位点消除。为此, 基于同义密码子原理并根据已知 *lacZ* 基因设计定点突变引物, 其中 lacZ-M1-F/lacZ-M1-R、lacZ-M2-F/lacZ-M2-R、lacZ-M3-F/lacZ-M3-R 反向互补, 可对 *Cla* I、*Sac* I、*Nde* I 识别序列第 3 位碱基分别实现 C→T、G→A、T→C 的定点突变。lacZ-F1

及 lacZ-R 为针对 *lacZ* 基因两端的扩增引物, 引物 lacZ-F2 和 lacZ-F3 则为在 lacZ-F1 引物基础上依次引入所需序列和酶切位点 (表 1)。设计用于置换质粒中紧邻 *lacZ* 基因上游启动子的多克隆位点序列时, 利用启动子分析预测数据库 (www.softberry.com) 进行分析, 以确保序列中不含有潜在的启动子元件。所有引物均由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

1.3 *lacZ* 基因的定点突变及克隆

lacZ 基因的定点突变通过重叠 PCR 进行。以质粒 pRCL 为模板, 各自加入引物对 lacZ-F1/lacZ-M1-R、lacZ-M1-F/lacZ-M2-R、lacZ-M2-F/lacZ-M3-R、lacZ-M3-F/lacZ-R, 用 PrimeSTAR HS (Premix) 高保真酶进行 PCR 扩增, 反应体系为 50 μ L, 其中模板和正反向引物各 1 μ L, PrimeSTAR HS (Premix) 25 μ L, 灭菌双蒸水 22 μ L。PCR 扩增条件为: 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环。

PCR 反应结束后, 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳后在紫外分析仪中切下目的片段, 用胶回收试剂盒回收目的片段, 然后以回收的片段为混合模板, lacZ-F2、lacZ-F3 和 lacZ-R 为扩增引物, 进行第二轮 PCR, 再次进行电泳并切胶回收, 用 *Bgl* II 和 *Xba* I 对回收目的片段进行双酶切, 连入同样经 *Bgl* II/*Xba* I 双酶切的 pFLX107 质粒中, 最终构建成功的质粒命名为 pFLX107-lacZ (图 1)。

1.4 启动子报告载体的构建

在质粒 pFLX107-lacZ 的基础上, 通过多克隆位点置换和序列改造构建出一系列基于 *lacZ* 基因的启动子报告载体, 用于后续筛选。首先, 参照 Fu 等所述方法^[20]将寡聚核苷酸片段 MCS1-F/MCS1-R 和 MCS2-F/MCS2-R 溶于 STE 缓冲液中 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA), 取等体积混合后于 94 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 预冷至室温。变性退火后的引物形成可与

表 1 本研究中所用引物序列

Table 1 Primer sequence used in this study

| Primer name | Primer sequence (5'-3') | Restriction site |
|-------------|--|------------------|
| lacZ-F1 | AGGTATACATATGACCATGATTACGGATTG | <i>Nde</i> I |
| lacZ-F2 | ACTTTATTAAGGAGGTATACATATGACCATGA | <i>Nde</i> I |
| lacZ-F3 | AGTAGATCTTTTAACTTTATTAAGGAGGTATACA | <i>Bgl</i> II |
| lacZ-M1-F | GTGAAATTATTGATGAGCGTGG | |
| lacZ-M1-R | CCACGCTCATCAATAATTTTCAC | |
| lacZ-M2-F | AGCGATAACGAACTCCTGCAC | |
| lacZ-M2-R | GTGCAGGAGTTCGTTATCGCT | |
| lacZ-M3-F | ACGGTTTCCACATGGGGATTG | |
| lacZ-M3-R | CAATCCCCATGTGGAAACCGT | |
| lacZ-R | ACGTCTAGATTATTTTGGACACCAGACCA | |
| MCS1-F | GGATCCTCGAGCATGCCTGCAGGTACCAATTGAGCTCAAGCTTGAATTCGTCGACTAGTA | |
| MCS1-R | GATCTACTAGTCGACGAATTCAAGCTTGGTACCTGCAGGCATGCTCGA GGATCCGC | |
| MCS2-F | CGAGCTCGAATTCCTAGTAGATCTTAACTTTAAGGAGGTATACA | |
| MCS2-R | TATGTATACCTCCTTAAAGTTAAGATCTACTAGTGAATTCGAGCTCGGTAC | |
| t0-F | TTACCGCGGGATTCTCACCATAAAAAAC | |
| t0-R | TAAGCATGCGACTCCTGTTGATAGATCCA | |
| MCS5-F | GAATTCTCGAGGTACCGAGCTCACTAGTA | |
| MCS5-R | GATCTACTAGTGAGCTCGGTACCTCGAGAATTCTGCA | |
| MCS6-F | GATCTTTAAGAAGGAGATTGTCA | |
| MCS6-R | TATGACAATCTCCTTCTTAAA | |
| DSeq-F | ATGGAAAAACGCCAGCAACG | |
| DSeq-R | TTCGCTATTACGCCAGCTGG | |
| araBAD-F | AGCGCATGCTTATGACAACCTTGACGGCTA | <i>Sph</i> I |
| araBAD-R | GTCAGATCTCCCAAAAAACGGGTATGGA | <i>Bgl</i> II |
| rpsM-F | GAGGCATGCCTGATTTTTCGCATATTTT | <i>Sph</i> I |
| rpsM-R | GCGAGATCTAATATGTACGTACCATGCTG | <i>Bgl</i> II |

Bold: mutated base; italic: restriction endonuclease site.

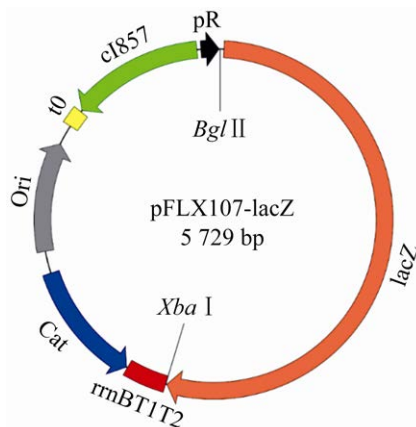


图 1 质粒 pFLX107-lacZ 物理图谱

Fig. 1 Physical map of plasmid pFLX107-lacZ. Cat: chloramphenicol acetyltransferase gene; Ori: origins of replication; pR: the rightward lambda promoter; cI857: a temperature sensitive repressor; lacZ: β -galactosidase gene; rrmBT1T2: ribosomal RNA operon T1T2 terminator; t0: lambda t0 terminator.

Sac II/*Bgl* II 酶切产物互补的粘性末端, 将其分别连入经 *Sac* II/*Bgl* II 酶切的 pFLX107-lacZ 中即构建成质粒 pFGH01 和 pFGH02。在此基础上, 以质粒 pFLX107-lacZ 为模板, 利用引物对 t0-F/t0-R 扩增终止子 t0 并将其分别克隆至质粒 pFGH01 和 pFGH02 的 *Sac* II 和 *Sph* I 位点之间, 即构建成质粒 pFGH03 和 pFGH04。质粒 pFGH05 则是通过将质粒 pFGH04 中 *Pst* I 和 *Bgl* II 间的酶切序列以变性退火的引物对 MCS5-F/MCS5-R 置换而成, 而质粒 pFGH06 则又是将质粒 pFGH05 中 *Bgl* II 和 *Nde* I 间的酶切序列以变性退火的寡聚核苷酸片段 MCS6-F/MCS6-R 置换构建而成 (图 2)。

1.5 大肠杆菌 MC4100 感受态细胞的制备

大肠杆菌 MC4100 感受态细胞的制备参照

Sambrook 等所述方法进行适应性修改^[21], 具体操作为: 用接种环从冻存的大肠杆菌 MC4100 甘油保存液中沾取少量菌液划线于 LB 平板, 置生化培养箱中 37 °C 培养 16–24 h, 然后用无菌牙签挑取单个菌落, 接种于装有 5 mL LB 液体培养基的试管中, 于 37 °C 恒温振荡器培养过夜。次日取 100 μL 细菌培养液于 10 mL 的 LB 液体培养基中振荡培养 3–4 h, 待 OD_{600} 值达到 0.3–0.4 时取出培养瓶, 分装于 1.5 mL 离心管中, 8 000 r/min 离心 30 s, 弃去上清液, 向沉淀中加入 500 μL 预冷的 0.1 mol/L $CaCl_2$ -MgCl₂ 溶液 (80 mmol/L $CaCl_2$, 20 mmol/L MgCl₂) 重悬每份细胞沉淀, 置碎冰上冰浴 30 min, 10 000 r/min 离心 15 s, 向沉淀中加入 100 μL 预冷的含 15% 甘油的 0.1 mol/L $CaCl_2$ 溶液重悬菌体, 置 -40 °C 冰箱保存备用。

1.6 启动子报告载体的背景活性测定

将上述构建成功的系列启动子报告质粒 pFGH01-pFGH06 和参考质粒 pRCL 通过热激转化至大肠杆菌 MC4100, 再接种至 100 mL 含氯霉素 (35 μg/mL) 的 LB 液体培养基中, 分别于 28 °C 和

37 °C 培养至对数生长期, 参照 Thongaram 等所述方法并略有修改进行 β-半乳糖苷酶活性测定^[22]。具体为: 取至少 2 mL 培养液, 6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用等体积预冷 Z 缓冲液 (0.06 mol/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 0.04 mol/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0.01 mol/L KCl, 0.001 mol/L $MgSO_4$, 0.05 mol/L β-巯基乙醇) 中重悬后测定其 OD_{600} , 然后用 Z 缓冲液将重悬菌液等比例或 10 倍稀释至 1 mL, 向稀释菌液中加入 100 μL 氯仿和 50 μL 0.1% SDS, 涡旋混匀后于 28 °C 水浴 5 min。水浴结束后向管中加入 0.2 mL ONPG (4 mg/mL), 同时准确记录加入时间, 然后置于 28 °C 孵育观察, 待呈现足够黄色后, 加入 0.5 mL 1 mol/L Na_2CO_3 溶液停止反应, 再次准确记录加入时间。转移 1 mL 液体至 EP 离心管, 以最大转速离心 5 min 以去除细菌残骸和氯仿, 测定每管在 420 nm 和 550 nm 处的 OD 值。β-半乳糖苷酶活性以 Miller Units (MU) 表示, 根据下列公式计算:

$$MU = 1\,000 \times [(OD_{420} - 1.75 \times OD_{550})] / (T \times V \times OD_{600})$$

式中, T 为反应时间 (min); V 为用于检测的培养物体积 (mL)。

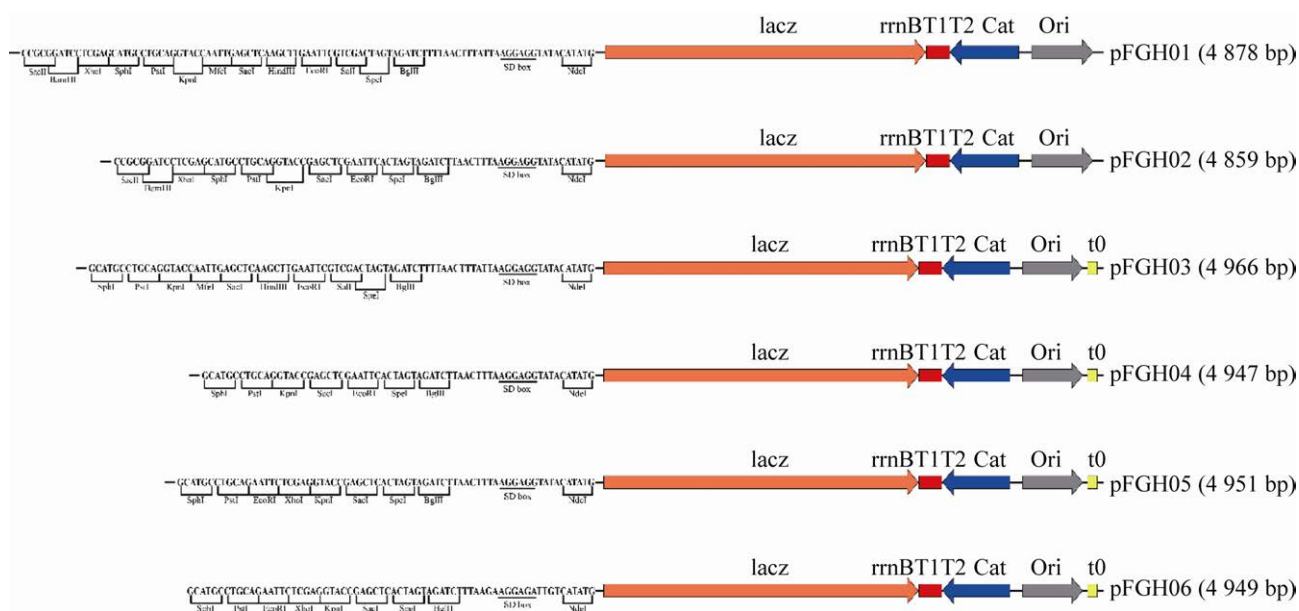


图 2 启动子报告质粒图谱

Fig. 2 Maps of promoter reporter plasmids. Cat: chloramphenicol acetyltransferase gene; Ori: origins of replication; lacZ: β-galactosidase gene; rrnBT1T2: ribosomal RNA operon T1T2 terminator; t0: lambda t0 terminator.

1.7 启动子 *araBAD* 和 *rpsM* 的克隆及活性测定

分别以质粒 pKD46 和 pFPV25.1 为模板,各自加入引物对 *araBAD*-F/*araBAD*-R 和 *rpsM*-F/*rpsM*-R,用 PrimeSTAR HS(Premix) 高保真酶进行 PCR 扩增,然后电泳回收,经 *Sph* I 和 *Bgl* II 酶切后,连入同样经 *Sph* I /*Bgl* II 双酶切的 pFGH06 质粒中,最终构建成功的质粒分别命名为 pFGH06-*araBAD* 和 pFGH06-*rpsM*。对启动子 *araBAD* 和 *rpsM* 的活性测定参照 1.6 所述方法于 28 °C 培养条件下进行,其中 *araBAD* 的活性测定需在细菌培养至对数生长期时加入 0.2% 的阿拉伯糖进行诱导。

1.8 启动子筛选测试

将含有质粒 pFGH06-*rpsM*、pFGH06-*araBAD* 和 pFGH06 的大肠杆菌 MC4100 分别接种至含氯霉素的 LB 液体培养基中振荡培养过夜,然后稀释调整其 OD_{600} 至 0.5 左右,按 1:1 的比例将大肠杆菌 MC4100 (pFGH06-*rpsM*) 和 MC4100 (pFGH06-*araBAD*) 分别与 MC4100 (pFGH06) 混合作适当稀释后,分别涂布于仅含有 X-gal 的 LB 抗性平板和同时加有 X-gal/阿拉伯糖的 LB 抗性平板,置于 28 °C 培养。待长出菌落后,每组用无菌牙签随机挑取 10 个蓝色菌落,用引物 DSeq-F/DSeq-R 进行菌液 PCR 鉴定,并随机送 3 株阳性克隆至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

1.9 统计分析

采用软件 SPSS22.0 对所得数据进行统计分析,数据差异采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别作为差异显著和极显著的判定标准。

2 结果与分析

2.1 *lacZ* 基因的定点突变及克隆

以质粒 pRCL 为模板,引物对 *lacZ*-F1/*lacZ*-M1-R、*lacZ*-M1-F/*lacZ*-M2-R、*lacZ*-M2-F/*lacZ*-M3-R、*lacZ*-M3-F/*lacZ*-R 成功扩增出大小分别为 861 bp、

1 133 bp、1 042 bp、122 bp 的预期目的片段。然后以回收的片段为混合模板,*lacZ*-F2、*lacZ*-F3 和 *lacZ*-R 为扩增引物,进行第二轮重叠 PCR,成功获得 3 119 bp 含突变位点的 *lacZ* 基因及附加序列的全长片段(图 3)。最终的测序结果亦显示原 *lacZ* 基因中的 *Cla* I、*Sac* I、*Nde* I 酶切位点被成功消除,并且突变序列符合预期。

2.2 启动子报告载体的构建

对构建而成的系列启动子报告质粒 pFGH01-pFGH06,以 DSeq-F 和 DSeq-R 引物进行 PCR 鉴定,可分别扩增出大小约为 328 bp、309 bp、416 bp、397 bp、401 bp 和 399 bp 的预期目的片段,而作为参照的 pRCL 质粒则未能扩增出片段(图 4)。

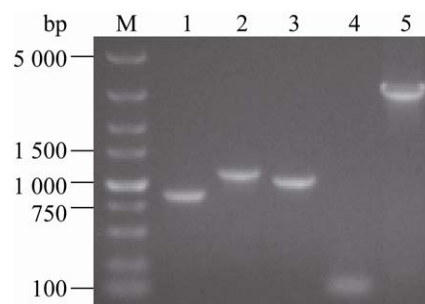


图 3 *lacZ* 基因的重叠 PCR 定点突变

Fig. 3 Site-directed mutagenesis of gene *lacZ* by overlapping PCR. M: DNA marker DL5 000; 1: *lacZ*-F1/*lacZ*-M1-R; 2: *lacZ*-M1-F/*lacZ*-M2-R; 3: *lacZ*-M2-F/*lacZ*-M3-R; 4: *lacZ*-M3-F/*lacZ*-R; 5: *lacZ*-F2+*lacZ*-F3/*lacZ*-R.

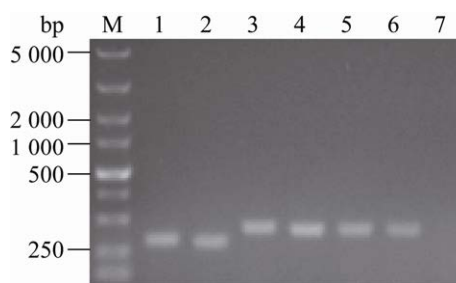


图 4 启动子报告质粒的 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR identification of promoter reporter plasmids. M: DNA marker DL5 000; 1-6: pFGH01-pFGH06; 7: pRCL.

为消除质粒超螺旋结构对其电泳体积大小的判断,用限制性内切酶 *Bgl* II 对质粒 pFGH01-pFGH06 进行单酶切,同时用 *Pst* I 对质粒 pRCL 进行单酶切,然后进行电泳,结果显示经 *Bgl* II 单酶切的线性质粒 pFGH01-pFGH06 均位于 5 000 bp 附近,与预期大小(分别为 4 878 bp、4 859 bp、4 966 bp、4 947 bp、4 951 bp 和 4 949 bp,见图 2)相符(图 5)。最终所构建质粒的测序结果也均与设计序列一致。

2.3 质粒 pFGH06-araBAD 和 pFGH06-rpsM 的构建

分别以质粒 pKD46 和 pFPV25.1 为模板,用引物对 araBAD-F/araBAD-R 和 rpsM-F/rpsM-R 成功扩增出大小约为 1 217 bp 和 150 bp (含限制性酶切位点和保护碱基)的预期目的片段(图 6)。以引物 DSeq-F/DSeq-R 对构建质粒进行 PCR 鉴定,可分别扩增出大小约为 1 571 bp 和 498 bp 的预期目的片段,而对照则未见扩增出片段(图 7)。

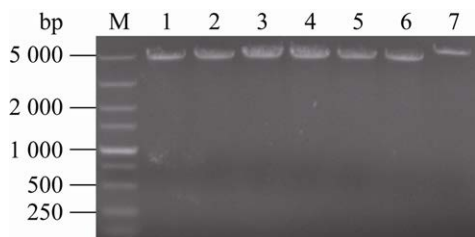


图 5 启动子报告质粒的酶切鉴定

Fig. 5 Electrophoresis of promoter reporter plasmids digested by restriction enzyme. M: DNA marker DL5 000; 1-6: pFGH01-pFGH06 digested by *Bgl* II; 7: pRCL digested by *Pst* I.



图 6 启动子 araBAD 和 rpsM 的 PCR 扩增

Fig. 6 PCR amplification of promoter araBAD and rpsM. M: DNA marker DL5 000; 1-2: araBAD; 3: negative control for araBAD; 4-5: rpsM; 6: negative control for rpsM.

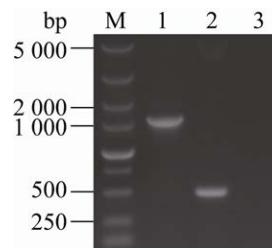


图 7 质粒 pFGH06-araBAD 和 pFGH06-rpsM 的 PCR 鉴定

Fig. 7 PCR identification of plasmids pFGH06-araBAD and pFGH06-rpsM. M: DNA marker DL5 000; 1: pFGH06-araBAD; 2: pFGH06-rpsM; 3: negative control.

最终的测序结果也表明,成功构建质粒 pFGH06-araBAD 和 pFGH06-rpsM。

2.4 启动子报告载体的背景活性测定

在 28 °C 培养条件下, pFGH01-pFGH06 的背景活性分别为 (31.4±2.2) MU、(74.8±3.3) MU、(18.2±2.0) MU、(32.7±1.8) MU、(18.7±1.3) MU 和 (12.2±0.6) MU,而在 37 °C 培养条件下的背景活性则分别为 (147.8±8.1) MU、(203.6±6.5) MU、(57.0±4.1) MU、(98.3±4.7) MU、(62.4±3.9) MU 和 (42.7±3.7) MU(图 8)。统计分析显示, pFGH01-pFGH06 系列质粒在 28 °C 培养条件下的背景活性均极显著低于其在 37 °C 培养条件下的背景活性 ($P<0.01$);在两种温度下,质粒 pFGH06 的背景活性均显著低于同系列其他质粒 ($P<0.01$),而质粒 pFGH01 和 pFGH02 的背景活性则显著高于其衍生质粒 pFGH03 和 pFGH04 ($P<0.01$)。作为对照的启动子报告质粒 pRCL 在两种温度下的背景活性分别为 (21.3±1.7) MU 和 (20.6±1.2) MU(图 8),无显著差异 ($P>0.05$),但均显著高于质粒 pFGH06 在 28 °C 培养条件下的背景活性 ($P<0.01$)。

2.5 启动子 araBAD 和 rpsM 的活性测定

重组菌株 β -半乳糖苷酶活性测定结果显示,诱导前 (0 h) 启动子 araBAD 的活性仅为 (5.3±0.2) MU,加入阿拉伯糖诱导 1 h、2 h 和 3 h 后的启动子活性分别为 (2 276.4±52.2) MU、

(4 407.8±91.3) MU、(9 160.5±163.0) MU, 较诱导前上调了 429.5 倍、831.7 倍和 1 728.4 倍; 与之相应的是, 组成型启动子 *rpsM* 在 0 h 的活性即为 (6 423.7±138.4) MU, 1 h、2 h 和 3 h 的活性分别为 (8 670.3±310.8) MU、(1 0245.0±154.3) MU、(12 081.7±253.6) MU, 仅为 0 h 活性的 1.3 倍、1.6 倍和 1.9 倍 (图 9)。

2.6 启动子筛选测试

在含有 X-gal 的 LB 抗性平板上大肠杆菌

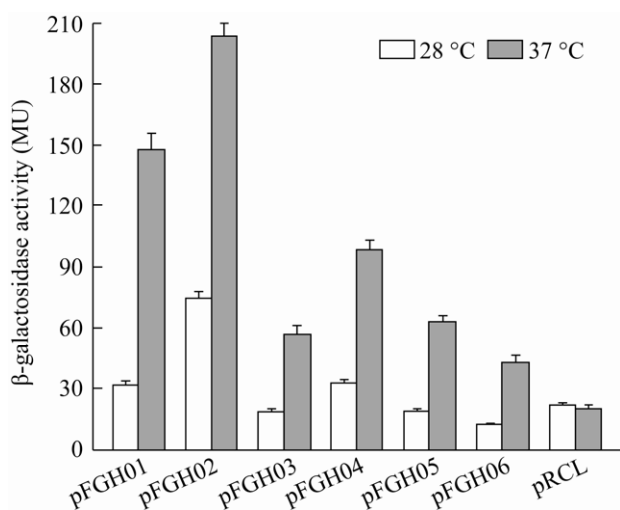


图 8 启动子报告质粒的背景活性

Fig. 8 The background activity of promoter reporter plasmids.

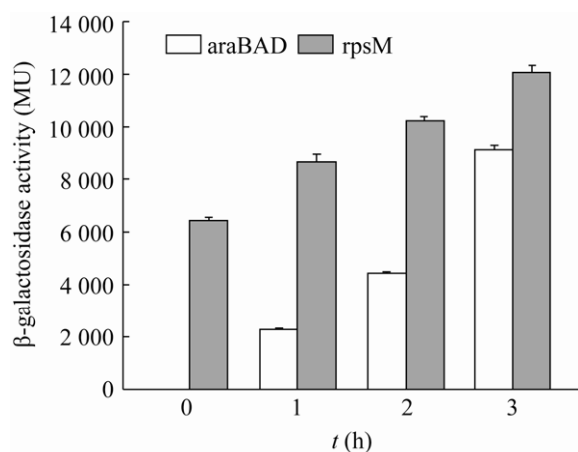


图 9 启动子 *araBAD* 和 *rpsM* 活性

Fig. 9 The activity of promoter *araBAD* and *rpsM*.

MC4100 (pFGH06-*rpsM*) 菌落呈蓝色 (图 10A), 在含有 X-gal/阿拉伯糖的 LB 抗性平板上大肠杆菌 MC4100 (pFGH06-*araBAD*) 菌落也呈蓝色 (图 10B), 而大肠杆菌 MC4100 (pFGH06) 在这两种平板上的菌落则均为白色。以引物 DSeq-F/DSeq-R 对随机挑取培养的目的克隆进行菌液 PCR 鉴定, 所有克隆均可扩增出预期目的条带, 大小分别约为 498 bp 和 1 571 bp (图 10C), 随机送样测序结果也均符合预期。

3 讨论

β -半乳糖苷酶广泛存在于多种生物中, 能水解乳糖为半乳糖和葡萄糖, 也具有转移半乳糖苷的作用, 可将乳糖转变为异乳糖, 而后者是乳糖操纵子的诱导物, 在细菌的代谢过程中有着非常重要的作用^[23]。此外, β -半乳糖苷酶性质稳定, 能使多种底物显色, 具有多样化的读出过程, 且在厌氧环境下仍能发挥功能, 这些优点使得其编码基因 *lacZ* 自 20 世纪 60 年代末被分离以来就成为基因工程实验中的一个常用报告基因^[11-13, 24], 其中用于启动子的筛选、验证或效能测定等便是其众多应用中非常重要的一个方面。

在实际应用中, 为了降低潜在的背景活性干扰, 基于 *lacZ* 基因的原核启动子报告系统多以低拷贝质粒为骨架构建而成, 但由于体积较大, 会导致实验操作成本增加并降低对弱启动子的检测灵敏度。为解决上述问题, 本研究将 pUC 型质粒复制子引入到启动子报告系统之中。作为质粒 pBR322 的衍生体, pUC 型质粒的复制子缺乏控制拷贝数的 *rop* 基因, 同时在复制引物 RNA II 区域存在点突变, 这使得其在大肠杆菌内的拷贝数数倍于亲本质粒, 不过降低培养温度可抑制这一表型效应^[25], 这一结论也在本次研究中再次得到证实, 以高拷贝质粒 pFLX107 (pUC 型质粒) 为基础构建而成的系列质粒 pFGH01-pFGH06 在 28 °C 培养条件下的背景活性均极显著低于其在 37 °C

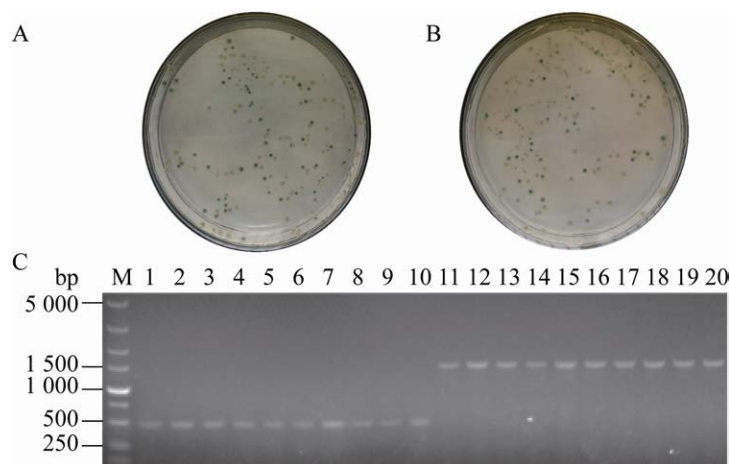


图 10 大肠杆菌 MC4100 (pFGH06-rpsM) (A) 和 MC4100 (pFGH06-araBAD) (B) 的菌落形态和 PCR 鉴定 (C)
Fig. 10 Colony morphology of *E. coli* MC4100(pFGH06-rpsM) (A) and MC4100(pFGH06-araBAD) (B) and PCR identification (C). M: DNA marker DL5 000; 1–10: pFGH06-rpsM; 11–20: pFGH06-araBAD.

培养条件下的背景活性。而基于 p15A 复制子的参考质粒 pRCL 在这两种温度下的活性大小相近, 没有显著差异。值得注意的是, 在两种温度下, 质粒 pFGH01 和 pFGH02 的背景活性均显著高于其衍生质粒 pFGH03 和 pFGH04。鉴于两者在结构上仅相差一个终止子 t0, 因此对这一现象的可能解释便是, t0 的加入有效阻止了多克隆位点前序列中潜在的启动子泄露。

在所构建的 pFGH 系列质粒中, pFGH06 的背景活性显著低于同系列其他质粒, 在 28 °C 培养条件下甚至显著低于低拷贝参考质粒 pRCL 的活性。进一步的评估测试显示, 质粒 pFGH06 可用于诱导型启动子和组成型启动子的克隆及活性测定, 而且在模拟应用于启动子筛选时, 仅通过蓝白斑筛选即可实现对于目标启动子的完全识别。这一切也表明, 只要进行合理的序列结构设计, 同时改进和完善相关实验方法, pUC 型高拷贝质粒亦可用作启动子报告系统。

与已报道的研究相比, 本研究中所构建的原核启动子报告系统 pFGH06 具有以下优点: ①pUC 型质粒为高拷贝质粒, 但由于 pUC 型质粒复制子的温度相关性, 使得其在具体应用时具有一定的灵活性, 可根据实验目的进行相应培养温度的调整,

从而调节其背景活性; ②更小的体积(仅 4 949 bp), 有利于提高质粒的稳定性和转化效率; ③在紧邻报告基因前无启动子区域具有更多的克隆位点, 便于序列中含有酶切位点启动子的克隆或筛选; ④对原核启动子具有高效的识别效率。这些特点使得其在用于原核启动子的筛选和鉴定时具有更大的适应性, 预期具有广泛的应用前景。

REFERENCES

- [1] Robert W. Molecular Biology. 5th ed. New York: McGraw-Hill Education, 2011: 123-125.
- [2] Majewska M, Wysokińska H, Kuźma L, et al. Eukaryotic and prokaryotic promoter databases as valuable tools in exploring the regulation of gene transcription: a comprehensive overview. *Gene*, 2018, 644: 38-48.
- [3] Ishihama A. Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 34(5): 628-645.
- [4] Goldstein MA, Doi RH. Prokaryotic promoters in biotechnology. *Biotechnol Annu Rev*, 1995, 1: 105-128.
- [5] Ryasik A, Orlov M, Zykova E, et al. Bacterial promoter prediction: Selection of dynamic and static physical properties of DNA for reliable sequence classification. *J Bioinform Comput Biol*, 2018, 16(1): 1840003.

- [6] Kanhere A, Bansal M. A novel method for prokaryotic promoter prediction based on DNA stability. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6: 1.
- [7] Palmano S, Kirkpatrick BC, Firrao G. Expression of chloramphenicol acetyltransferase in *Bacillus subtilis* under the control of a phytoplasma promoter. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 199(2): 177-179.
- [8] Valdivia RH, Falkow S. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol*, 1996, 22(2): 367-378.
- [9] Bruckbauer ST, Kvitko BH, Karkhoff-Schweizer RR, et al. Tn5/7-*lux*: a versatile tool for the identification and capture of promoters in gram-negative bacteria. *BMC Microbiol*, 2015, 15(1): 17.
- [10] Singh P, Chachan S, Singhi D, et al. Isolation and molecular characterization of a stationary phase promoter useful for gene expression in *Gordonia*. *Gene*, 2016, 591(1): 153-160.
- [11] Aviv G, Gal-Mor O. *LacZ* reporter system as a tool to study virulence gene regulation in bacterial pathogens//Medina C, López-Baena F, Eds. *Host-Pathogen Interactions*. New York, NY: Humana Press, 2018, 1734: 39-45.
- [12] Chiba M, Kamiya M, Tsuda-Sakurai K, et al. Activatable photosensitizer for targeted ablation of *lacZ*-positive cells with single-cell resolution. *ACS Cent Sci*, 2019, 5(10): 1676-1681.
- [13] Juers DH, Matthews BW, Huber RE. *LacZ* β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Prot Sci*, 2012, 21(12): 1792-1807.
- [14] Jain V, Sujatha S, Ojha AK, et al. Identification and characterization of *rel* promoter element of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene*, 2005, 351: 149-157.
- [15] Schwab S, Pessoa CA, De Lima Bergami AA, et al. Isolation and characterization of active promoters from *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain PAL5 using a promoter-trapping plasmid. *Arch Microbiol*, 2016, 198(5): 445-458.
- [16] Yi ZF, Wang D, Xin SH, et al. The CpxR regulates type VI secretion system 2 expression and facilitates the interbacterial competition activity and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res*, 2019, 50: 40.
- [17] 杨登辉, 汪洋, 王少辉, 等. 密度感应系统 *luxS* 基因对鼠伤寒沙门菌生物学特性及毒力的影响. *中国兽医科学*, 2016, 46(5): 537-543.
Yang DH, Wang Y, Wang SH, et al. Effects of quorum sensing system *luxS* gene on the biological characteristics and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Chin Vet Sci*, 2016, 46(5): 537-543 (in Chinese).
- [18] 付立霞, 冀德君, 卢徐斌, 等. 金黄色葡萄球菌核酸酶A与不同外源DNA片段融合表达的作用比较. *生物工程学报*, 2016, 32(12): 1654-1663.
Fu LX, Ji DJ, Lu XB, et al. Comparison of effects of staphylococcal nuclease A fused with different exogenous DNA fragments. *Chin J Biotech*, 2016, 32(12): 1654-1663 (in Chinese).
- [19] 李静, 张晓露, 刘永杰, 等. 绿色荧光蛋白基因标记嗜水气单胞菌的研究. *畜牧与兽医*, 2009, 41(3): 1-4.
Li J, Zhang XL, Liu YJ, et al. Genetically marking of *Aeromonas hydrophila* strains with green fluorescent protein gene. *Anim Hus Vet Med*, 2009, 41(3): 1-4 (in Chinese).
- [20] Fu LX, Lu CP. A novel dual vector coexpressing PhiX174 Lysis E gene and staphylococcal nuclease A gene on the basis of lambda promoter pR and pL, respectively. *Mol Biotechnol*, 2013, 54(2): 436-444.
- [21] Sambrook J, Russell DW. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. *Cold Spring Harb Protoc*, 2006, 2006(1).
- [22] Thongaram T, Hoeflinger JL, Chow J, et al. Prebiotic galactooligosaccharide metabolism by probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(20): 4184-4192.
- [23] Husain Q. β galactosidases and their potential applications: a review. *Crit Rev Biotechnol*, 2010, 30(1): 41-62.
- [24] Macgregor GR, Nolan GP, Fiering S, et al. Use of *Escherichia coli* (*E. coli*) *lacZ* (β -Galactosidase) as a reporter gene//Murray E J, Ed. *Gene Transfer and Expression Protocols*. Clifton, NJ: Humana Press, 1991, 7: 217-235.
- [25] Lin-Chao S, Chen WT, Wong TT. High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol Microbiol*, 1992, 6(22): 3385-3393.

(本文责编 郝丽芳)