

氧化硫硫杆菌 pTt54 质粒的限制性酶切分析及其在大肠杆菌中的克隆

金松谟 颜望明

(山东大学微生物研究所, 济南)

摘要 对 pTt54 质粒进行了限制性酶切分析, 实验证明 pTt54 质粒上有一个 EcoRI 切点和一个 Sau3A⁺ 切点, 无 BamHI、BclI、BglII、HindIII、SalI、XhoI、KpnI、PvuII、PstI 切点。绘出了该质粒的酶切图谱, 分子量为 2.14Kb。pTt54 质粒分别通过 EcoRI 位点和 BamHI 位点与 pBR 325 质粒重组, 得到了重组质粒 pSDT541 和 pSDT 542, 这两个质粒均可作为氧化硫硫杆菌遗传信息转移系统的载体。

关键词 氧化硫硫杆菌; 质粒; 载体

氧化硫硫杆菌 (*Thiobacillus thiooxidans*) 是嗜酸性的专性自养化能无机营养细菌, 它通过氧化无机的硫化物获得生长必需的能量和还原力, 固定 CO₂ 来合成细胞的碳水化合物。该菌已被应用于细菌冶金及煤和石油的脱硫。许多年来, 人们对它特殊的生理状态进行了较为深入地研究, 但对它的遗传学背景了解很少。为从基因水平来研究它的生理代谢方式, 以利于

开发和利用这种极端环境下生长的细菌, 有必要在该菌中建立一个遗传信息的转移系统。1988 年, 我们首先从氧化硫硫杆菌中发现并分离到了质粒^[1], 这为载体系统的构建提供了原始材料。虽然已有人将氧化亚铁硫杆菌 (*Tb. ferrooxidans*) 的隐蔽性质粒克隆到了 pBR 322 和 pBR 325 上, 使之在大肠杆菌中得到了复制^[2-3], 但在氧化硫硫杆菌中尚未见报道。本文

对氧化硫硫杆菌 Tt-5 菌株中的 pTt54 质粒进行了限制性酶切分析, 并与 pBR 325 质粒重组, 在大肠杆菌中得到了复制。

材 料 和 方 法

1. 菌种及菌种培养: 氧化硫硫杆菌 Tt-5 菌株分离自广东酸性土壤中, 采用 Starky 培养基, 培养基配方及菌体培养方法见前文^[1]。大肠杆菌 (*E. coli*) C600 及 pBR325 质粒由中国科学院微生物研究所提供, 大肠杆菌均采用 LB 培养基, 37℃ 迴旋振荡培养。

2. 质粒的提取与纯化: 氧化硫硫杆菌 30℃ 培养 7 天后, 去除硫磺, 用大容量冷冻离心机离心收集菌体, pTt54 质粒的提取与纯化均参照 Maniatis 等人的方法^[4]。

大肠杆菌 pBR325 质粒及重组质粒 pSDT 541 和 pSDT542 的纯化方法见参考文献 [4]。

3. 酶切、连接、转化: 限制性内切酶 BamHI、EcoRI、HindIII、PstI、KpnI、SalI、Sau3AI、XhoI 和 T₄DNA 连接酶均为中国医学科学院基础医学研究所产品。PvuII、BglII、BclI 和 RNase 为西德 Boehringer Mannheim 产品。限制性内切酶和 T₄DNA 连接酶的反应缓冲液及反应条件参考文献 4。

转化受体菌的处理及质粒 DNA 的转化方法均参考文献 4。

4. 琼脂糖凝胶电泳及质粒 DNA 分子量测定: 电泳缓冲液为 Tris-醋酸缓冲液 (40mmol/L Tris, 20mmol/L EDTA, 20mmol/L 醋酸钠, pH8.0), 琼脂糖凝胶浓度为 0.8—1%。凝胶用 EB 染色, 在紫外光灯下观察、拍照。

DNA 分子量根据 Meyers 等人^[5]的方法测定, 并以 λ DNA/HindIII 片段作为分子量标准。

结 果 与 讨 论

1. pTt54 质粒的限制性酶切分析: 我们用凝胶电泳透析法获得了纯化的 pTt54 质粒, 用不同的限制性内切酶对其进行了酶切分析。结果表明, pTt54 质粒上有一个 EcoRI 切点和

一个 Sau3AI 切点, 但没有 BamHI、BglII、BclI、HindIII、KpnI、PstI、SalI、XhoI、PvuII 切点。

为绘制 pTt54 质粒的酶切图谱, 我们分别用 EcoRI、Sau3AI 以及 EcoRI + Sau3AI 对其进行了酶切分析, 结果见图 1。由图 1 中 b、c 可以看出, EcoRI 和 Sau3AI 酶切 pTt54 质粒均产生一条 DNA 带, 用 HindIII 酶切的 λ DNA 作为分子量标准, 经测量后计算出 pTt54 质粒的分子量为 2.14Kb。EcoRI + Sau3AI 酶切 pTt54 质粒应产生两个片段 (图 1, d)。因一个片段太小, 在琼脂糖凝胶上难以检测到, 大片段 DNA 的分子量为 1.86 Kb。所以小片段 DNA 的分子量应为 0.28Kb。根据以上分析, 可以绘出 pTt54 质粒的限制性酶切图谱 (图 2)。



图 1 pTt54 质粒酶切电泳图谱

a. λ DNA/HindIII, b. pTt54/EcoRI,
c. pTt54/Sau3AI, d. pTt54/EcoRI + Sau3AI

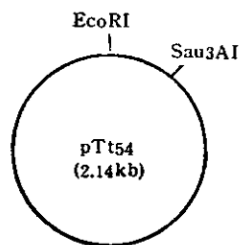


图 2 pTt54 质粒限制性酶切图谱

2. 重组质粒 pSDT541 和 pSDT542 的构建: 用 EcoRI 酶切 pTt54 和 pBR325 质粒, 连接后转化 *E. coli*C600, 在含有氨苄青霉素

(Ap) 和四环素 (Tc) 的 LB 平板上筛选转化子,然后在含有氯霉素 (Cm) 的平板上检出重组子。对其中之一命名为 pSDT541 的重组子进行了分析。用 EcoRI 酶切,结果见图 3。图 3 中的 b、c、d 分别为 EcoRI 酶切的 pBR325、pSDT 541 和 pTt 54 质粒,经比较可以确定 pSDT541 是由 pBR 325 与 pTt 54 重组而成的。已知 pBR325 的分子量为 6Kb,pTt54 的分子量为 2.14Kb,所以 pSDT541 的分子量为 8.14Kb。pSDT541 的酶切图谱见图 4。

用 Sau3AI 和 BamHI 分别酶切 pTt54 和 pBR325 质粒,连接后转化 *E.coli* C600, 我们

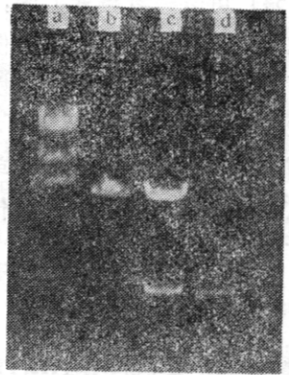


图 3 pSDT541 质粒酶切电泳图谱
a. λ DNA/HindIII, b. pBR325/EcoRI, c. pSDT541/EcoRI, d. pTt54/EcoRI

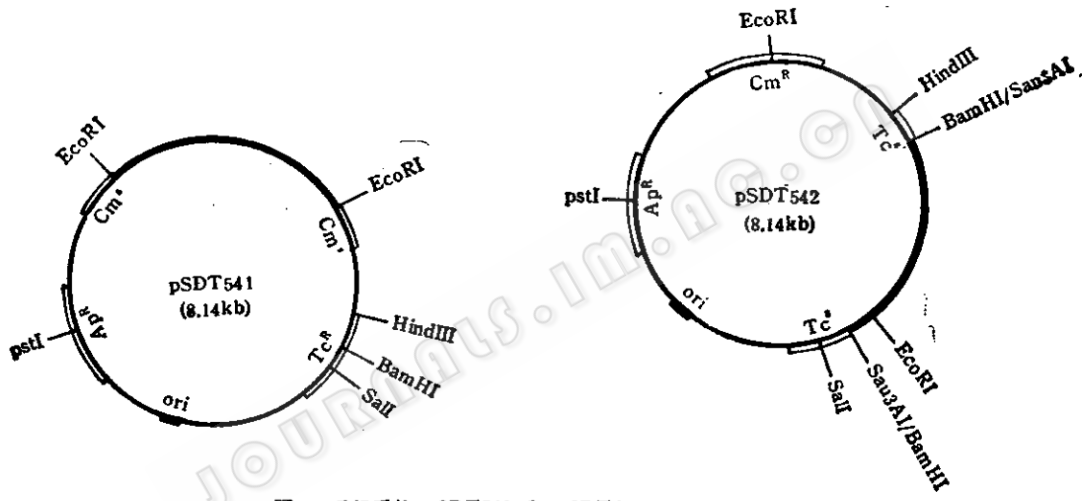


图 4 重组质粒 pSDT541 和 pSDT542 的限制性酶切图谱
粗线表示 pTt54, 细线表示 pBR325

得到了重组子,命名为 pSDT542。用 EcoRI 进行酶切,产生两个片段,分子量分别为 4.62 和 3.63Kb,总和为 8.25Kb,与 pSDT541 的分子量 8.14Kb 比较基本相同。虽有 0.11Kb 的偏差,但仍属正常误差范围。用 PstI 酶切 pSDT542 出现一条带,该切点位于原 pBR325 质粒上。根据 pBR 325 质粒上 EcoRI 位点与 BamHI 位点的距离以及 pTt 54 质粒上 EcoRI 位点与 Sau3AI 位点的距离,可以计算出 pTt54 质粒在 pBR325 中的插入方向,绘制出 pSDT542 的酶切图谱(图 5)。

pSDT 541 质粒具有氨苄青霉素和四环素抗性,氯霉素抗性因 pTt54 的插入而被破坏,因

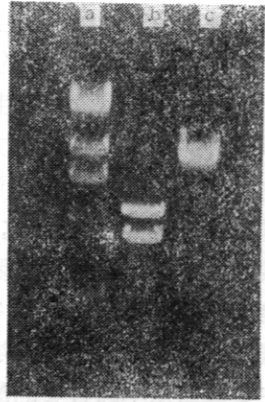


图 5 pSDT542 质粒酶切电泳图谱
a. λ DNA/HindIII, b. pSDT542/EcoRI, c. pSDT542/PstI

此 pSDT541 可以被氯霉素扩增, 这为获得大量的氧化硫硫杆菌质粒提供了方便。pSDT542 质粒具有氨苄青霉素和氯霉素抗性, 不具有四环素抗性。重组质粒 pSDT 541 和 pSDT 542 具有不同的选择标记, 分子量小, 单一酶切位点多等优点, 有希望成为硫杆菌遗传信息转移的载体。

参 考 文 献

金松谟、颜望明: 微生物学通报, 15(1): 20—21, 1988。

- 2 Holmes D S et al.: *J. Bacteriol.*, 157(1): 324—326, 1984.
- 3 Rawlings D E et al.: *J. Bacteriol.*, 158(2): 737—738, 1984.
- 4 Maniatis T et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- 5 Meyers J A et al.: *J. Bacteriol.*, 127: 1529—1537, 1976.