霍乱弧菌染色体基因文库的构建

邵　煌

(军事医学科学院毒物药物研究所，北京　100850)

马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所，北京　100850)

摘要　利用限制性内切酶 Sau3A 将霍乱弧菌 178(埃尔托生物型，小川血清型)染色体 DNA 进行部分酶切后，分离 20～50kb 的 DNA 片断，与经过 BamHI 酶切的柯斯质粒 pHC79 连接重组，通过体外包装系统形成噬菌体颗粒，感染受体菌 *E. coli* HB101，构建成霍乱弧菌 178 染色体基因文库。为霍乱弧菌中未知基因的克隆及其它研究打下了基础。

关键词　基因文库，体外包装系统，柯斯质粒

构建基因文库是从事分子克隆工作的基础，常采用噬菌体及柯斯质粒作为载体，其中柯斯质粒比噬菌体具更高的容量(能重组 35～45kb 的外源 DNA 片断)。在霍乱弧菌研究中，尚有一些未知的基因，编码在免疫及治疗上有重要功能的抗原，如菌体保护性抗原脂多糖等[1]。这些基因结构复杂，可能以基因簇形式存在，需要采用高容量的柯斯质粒以获得完整的基因[2]。本文选择 pHC79 为载体，通过体外包装途径，建成霍乱弧菌 178 染色体基因文库。

1　材料与方法

1.1　菌株与载体

霍乱弧菌 178(*Vibrio cholerae*，埃尔托生物型，小川血清型)，由卫生部药品生物制品检定所提供。*E.coli* BHB2688，*E. coli* BHB2690，由中国医学科学院基础医学研究所提供。*E. coli* HB101，cosmid pHC79　本所保存。

1.2　工具酶

限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司。牛肠碱性磷酸酶(CIP)为 Boehr inger 公司产品。

1.3　质粒 DNA 的提取和纯化

采用碱法裂解提取质粒并按照氯化铯密度梯度离心法纯化。

1.4　染色体 DNA 的提取

离心收集 200ml 霍乱弧菌培养物中的菌体，悬浮于 4ml Tris-EDTA 溶液(50mmol／L Tris · HCl pH7.4，1mmol／L EDTA)，加 8mg 溶菌酶，冰浴 10min。加 10%SDS 0.4ml，室温 20min。用 0.5mg RNase A 在 50℃保温 1h。经酚和氯仿抽提后，乙醇沉淀，用玻棒缠出胶状染色体 DNA。

1.5　包装蛋白的制备

参照 Scalenghe 方法[3]，利用 *E. coli* BHB2690 制备超声裂解物，*E. coli* BHB2688 制备冻融裂解液，分装后保存于-70℃。

1.6　连接及包装反应

1.6.1　连接反应：将脱磷处理后的 pHC79 0.6μg 与部分酶切后霍乱弧菌 178 染色体 20—50kb 的片断 1μg 混合，加入 T4 DNA 连接酶 5u，12℃作用 12h。

1.6.2　包装反应：自-70℃取冻融裂解液(FTL)冰浴融解后，吸出 15μl 加至未融解的超

本工作由国家863计划基金资助

1995-05-15 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

声裂解液中，再加入 5μl 已连接的底物 DNA，混匀后置 22℃ 2h，加入 0.5ml SM 缓冲液及 20μl 氯仿，4℃保存。

2 结果

2.1 霍乱弧菌染色体 DNA 片断的分离

构建基因组文库需将大分子染色体 DNA 切割成载体 DNA 能够容纳的较小片断。利用限制性内切酶 Sau3A 对霍乱弧菌 178 染色体 DNA 进行部分酶切，选择最适反应条件。取等量 DNA 加入不同量的 Sau3A，37℃ 作用 1h 后进行琼脂糖凝胶电泳。结果表明要获得 20～50kb 范围的 DNA 片断，最适酶量为 0.015～0.03u／μg DNA（图 1）。在此基础上进行大量酶切，电泳回收 20～50kb 范围的 DNA 片断。

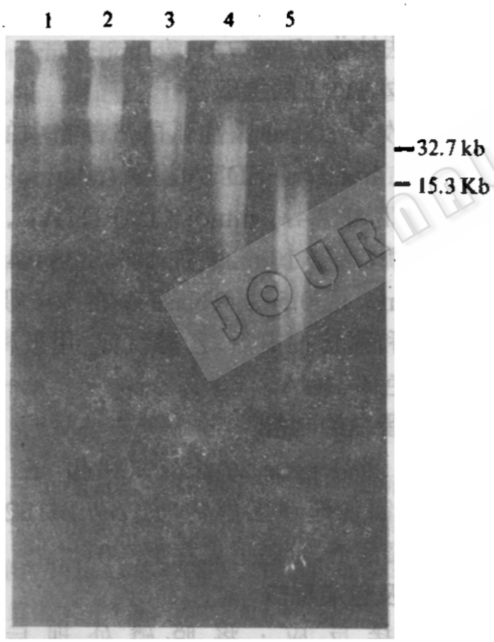

图 1 分离 20～50kb 染色体 DNA 片断的酶切条件

取不同量的限制性内切酶 Sau3A1～5，分别加 0，0.015，0.03，0.06 和 0.12u）消化 1μg 霍乱弧菌 178 染色体 DNA 1h 后，采用 7%琼脂糖凝胶电泳分离。

2.2 外源片断与载体 pHC79 的连接

柯斯质粒 pHC79 用限制性内切酶 BamHI 消化后再经 CIP 处理脱磷酸以防自身环化。鉴定脱磷效果，将三种样品：(1) BamHI 消化但未脱磷的 pHC79；(2) BamHI 消化后脱磷的 pHC79；(3) 脱磷的 pHC79 与 BamHI 消化的 DNA 的混合物。各分为 2 份，其中一份加 T4 DNA 连接酶，另一份未加。电泳表明（图 2）pHC79 已基本脱磷。将回收的外源霍乱弧菌 178 染色体 DNA 片断与处理后的 pHC79 混合，加入 T4 DNA 连接酶进行反应，图 3 显示，出现了大分子 DNA 片断，说明两者已连接重组。

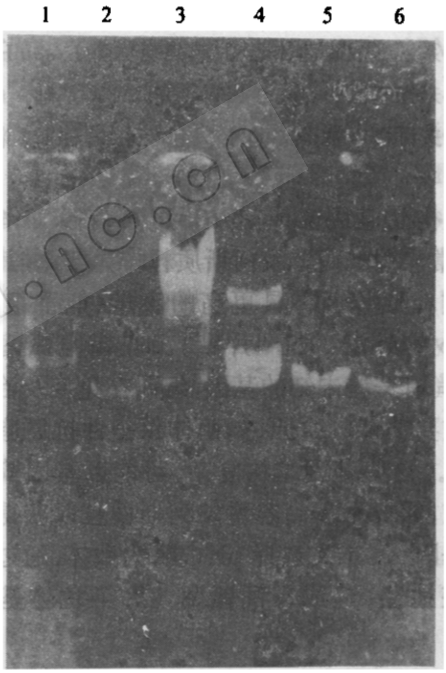

图 2 线状 pHC79 脱磷处理对连接反应的影响

1）BamHI 消化的 pHC79 自身连接 2）BamHI 消化的 pHC79 3）BamHI 消化后经脱磷的 pHC79 与目的基因片断连接 4）BamHI 消化后经脱磷的 pHC79 和目的基因 5）BamHI 消化后经脱磷的 pHC79 不产生自身连接 6）BamHI 消化的经脱磷的 pHC79

2.3 包装反应及感染

由于重组 DNA 分子大于 20kb，常规转化法难以将其导入宿主菌，必须运用体外包装系统，而高活性的包装蛋白则是该反应的关键。将制备的包装蛋白以噬菌体 EMBL4 DNA 为底物反应后，感染 *E. coli* C600，计算出每

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

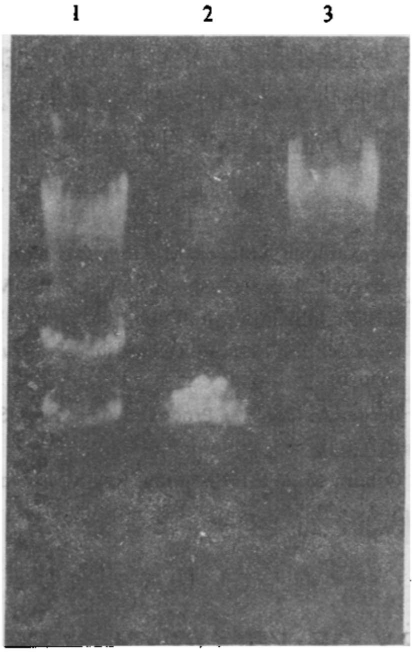

图 3　霍乱弧菌 30～50kb 染色体 DNA 片断与 pHC79 的连接反应电泳图

1) Hind III 消化的 λDNA　2) pHC79 和 30～50kb 染色体片断　3) pHC79 与 30～50kb 染色体片断的连接

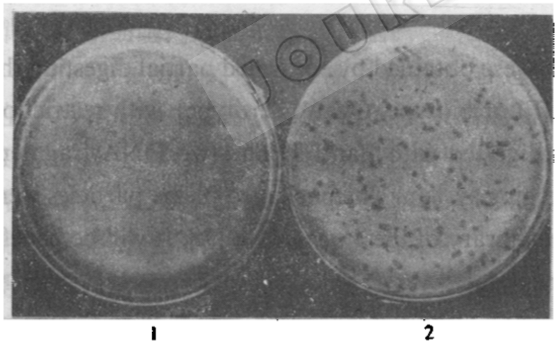

图 4　包装反应产生的噬菌斑

1) 包装蛋白本底对照　2) 包装蛋白与 EMBL4 DNA 反应

μgDNA 的包装效率为 1.12×10^8PFU(图 4)，达到了包装蛋白的高效指标。对重组 DNA 进行体外包装，反应完成后取 0.2ml 包装液及 0.1ml SM 缓冲液，加入 0.2ml 在含 0.4%麦芽糖培养基中生长至对数后期的 *E. coli*HB101，37℃孵温 20min，再加入 1ml 同样培养基，继续孵温 45min。取 50μl 涂布于含氨苄青霉素的培养基平板上，37℃过夜培养，获 644 个转化子，对照组未出现转化子。随机选择转化子进行质粒抽提鉴定，证明这些转化子确含有大小不等的大质粒(图 5)。

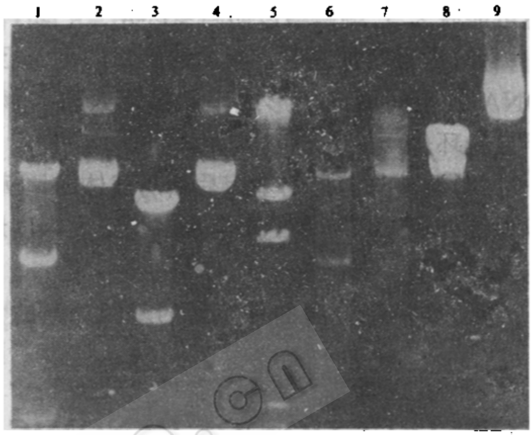

图 5　限制性内切酶分析重组质粒

1) BamHI 消化重组质粒 pMM-VO86　2) pMM-VO86　3) BamHI 消化重组质粒 pMM-VO534　4) pMM-VO534　5) Hind III 消化的 λDNA　6) BamHI 消化重组质粒 pMM-VO297　7) pMM-VO297　8) BamHI 消化重组质粒 pMM-VO171　9) pMM-VO171

3　讨论

按照公式 $N=\ln(1-P)/\ln(1-f)$ 计算本实验构建的基因文库中任一 DNA 序列出现的机率[4]。其中“N”是重组子必须的数目，“P”是任一外源基因序列出现的机率，“f”是重组克隆 DNA 片断的平均大小与基因组大小的比值。霍乱弧菌染色体片断的平均大小为 35kb，霍乱弧菌基因组 DNA 分子量约为 2.5×10^3kb，若要求特定基因序列在文库中出现的机率为 99%，所得的重组子数约 300 个左右。实际获转化子 644 个，其中重组子比例在 98%以上，表明已构建成功霍乱弧菌 178 染色体基因文库。另外从该文库中筛选到能够表达霍乱弧菌脂多糖 O 抗原的克隆株(另文发表)，也进一步证实了这一途径的可靠性。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

在构建基因文库的过程中，通过实验可认为以下几点是值得重视的：

(1)必须具备高活性包装蛋白，包装效率低于 10^6PFU／μg DNA 则难以有效地建成基因文库。

(2)载体 pHC79 用限制性内切酶消化后尽可能脱去 5′端磷酸以防自身环化。

(3)适当增加底物 DNA 的绝对浓度，导致 DNA 分子间倾向于形成串联体形式，而不利于自身环化。

(4)调整外源目的基因片断与载体的比例，以保证外源 DNA 片断两个末端均最大限度地与载体连接。

(5)要控制分离的外源目的基因片断的大小以适应包装系统对底物的要求。

本实验所获得的霍乱弧菌 178 染色体基因文库为克隆霍乱弧菌中重要的保护性抗原脂多糖基因提供了必要的条件，也将有助于其它未知基因的研究，具有实用价值。

参 考 文 献

[1] Svennerholm AM, Jert M, Gothefors L, *et al.* Bacterial Dirrgeal Diseases, ed: Takeda Y and Miwatani T. Boston: Martinus nyhoff pub. 1985, 169～174.

[2] Gauthier D, Tate A, Richardson K, *et al.* Genetics, 1979, **91**: 191～214.

[3] Becker A, Gold M. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, **72** (2): 581～585.

[4] Oshorn M, Wu HCP. Annu Rev Microbiol, 1980, **34**: 369～422.

CONSTRUCTION OF GENOMIC LIBRARY OF *VIBRIO CHOLERAE* 178

Shao Huang

(*Institute of Pharmacology & Toxicology, Beijing* 100850)

Ma Qingjun

(*Institute of Biotechnology, Beijing* 100850)

Abstract Genomic fragments ranging from 20～50 kb were obtained by controled partial digesting the chromosomal DNA of the *Vibrio cholerae* 178 strain (Eltor biotype, Ogawa serotype) with restriction endonuclease Sau3A. The cosmid vector pHC79 was digested with BamHI. The two DNA fragment were used to ligated and packaged using in vitro pa ckaging system. The packaged phage particles were used to infect *E. coli* HB101 for constructing a genomic library of the *V. cholerae* 178. It will be beneficial for molecular cloning other unknown genes of V. cholerae.

Key words genomic library, in vitro packaging system, cosmid

(上接第 281 页)

and pH optima of which were 30℃ and 7.2 *Streptomyces* sp. LX was found to be inducible for extracellular endo–cellulase with CMC–liquefying activity (CMC–liquefying enzyme). The molecular weight of which is 9.2ku. It was found no detectable reducing sugar released and little weight loss over the fragmentation of filter paper, moreover, there was no significant change in the degree of polymerization of cellulose. Presumably it may be a chain–opening enzyme capable of disturbing to intra or inter china hydrogen bonds.

Key words Degradation of cellulose, Endocellulase, Fragmentation, CMC–liquefying enzyme, *Streptomyces*

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn