

短小芽孢杆菌质粒pCJ3的衍生质粒pAL32的酶谱及抗性基因定位

周楨林 陈琦 黄苹 许虹
(生物学系/生物工程研究中心)

摘要 从短小芽孢杆菌四环素抗性质粒pCJ3截短的衍生质粒pAL32, 经用6种限制酶双酶解试验, 根据琼脂糖凝胶电泳带估算各片段的分子量, 作出了pAL32的6种限制酶图谱。利用已除去复制功能的金黄色葡萄球菌质粒pUB110与pAL32构建的 Km^rTc^s 的双抗性重组质粒pSC33为载体, 在EcoRV位点克隆的 λ DNA片段的重组子均为 Km^rTc^s 。用pUB110与pAL32在PvuI位点连接后的重组质粒也为 Km^rTc^s 。根据这些重组子四环素抗性的失活, 推知pAL32上EcoRV与PvuI切点均位于其四环素抗性基因上。

关键词 四环素抗性质粒, 短小芽孢杆菌, 限制酶图谱, 基因定位

利用枯草杆菌作为基因工程的分子克隆系统有其独特的优点, 故对其载体受体系统的研究日益受到重视。但芽孢杆菌中的质粒大多为隐蔽质粒^[1~4], 无选择标记, 不宜作载体, 目前使用的载体主要来自金黄色葡萄球菌质粒^[5]。我们从短小芽孢杆菌中分离的质粒pCJ3具有四环素抗性标记, 做了分子特性及转化等研究^[6]。本文报导pCJ3的衍生质粒pAL32的限制酶切图谱及四环素抗性基因定位的初步研究。

1 材料与方 法

1.1 菌 株

Bacillus pumilus A3 (pCJ3), Bacillus subtilis BR151 (pAL32), Bacillus subtilis SB202 (pUB110)。

1.2 培养基

L-肉汤培养基用于提取质粒细胞培养。GM I 及GM II 用于枯草杆菌感受态细胞培养^[7,8]。

1.3 质粒DNA的分离与纯化

参照文献^[9]的方法, 用碱裂解法提取质粒DNA得到粗品, 用4倍1 mol/L NaCl以40000rpm离心6h, 得纯化的质粒DNA。

1.4 DNA酶切与连接反应

限制酶EcoRI、PvuI、HpaI、HaeI、AvaI及T₄DNA连接酶均购自中国科

本文1991年2月4日收到

学院基础所, EcoRV及 λ cl₈₅₇S₇ DNA 购自华美生物技术公司, Hpa I 及 Hind III 购自中国联合生物技术公司。酶切反应条件按厂家说明。在12℃连接反应24h后进行转化。

1.5 琼脂糖凝胶电泳及分子量测定

用1%琼脂糖凝胶平板电泳,以 λ cl₈₅₇S₇ DNA的Hind III 酶切片段作为分子量标准,根据DNA片段在凝胶电泳中的迁移率与分子量的对数成反比原理,估算未知DNA片段的分子量。

1.6 感受态细胞的制备及转化

参照文献[5]进行。筛选重组子用含10 μ g/ml卡那霉素或10 μ g/ml卡那霉素及25 μ g/ml四环素的L-肉汤平板。

2 结果与讨论

2.1 短小芽孢杆菌质粒pCJ3的衍生质粒pAL32的限制酶切图谱

2.1.1 7种限制酶解质粒pAL32试验

短小芽孢杆菌质粒pCJ3上具有EcoR I 切点2个,将pCJ3除去1个EcoR I 切点,获得截短后的衍生质粒pAL32,其四环素抗性水平与亲本质粒pCJ3相同。用7种限制酶解质粒pAL32结果如图1所示。质粒pAL32上有Hpa I、Hpa II、EcoR I、EcoRV切点1个, Pvu II、Ava I 切点2个, Hae II 没有切点。根据在琼脂糖凝胶电泳中质粒pAL32经单一切口的酶切后得到的线状分子大小为2.95Kb。

2.1.2 6种限制酶图谱的建立

分别用EcoR I、Hpa II、Hpa I、EcoRV、Pvu II、Ava I 6种限制酶进行交叉酶解质粒pAL32结果如图2-4及表1所示。由图2可见EcoR I—Hpa II 双酶解后出现2.25Kb及0.7Kb 2个片段(图2-7), EcoR I—Hpa I 双酶解后可见1.75Kb及1.2Kb 2条带(图2-6), Hpa I—Hpa II 双酶解后可得2.45K和0.5Kb 2个片段(图2-5)。取EcoR I 切点作为图谱的零点,则Hpa II 切点应在0.7Kb处,而Hpa I 切点位于1.2Kb处。EcoR I—EcoRV 双酶解后产生2.11Kb和0.84Kb 2个片段(图2-8), EcoRV—Hpa II 双酶解后在凝胶上仅显示一条略小于线状pAL32的片段,约为2.81Kb(图2-9,)推测另一小带已跑出胶外,由此可知EcoRV的切点应在0.84Kb处。从图3可看出EcoR I—Pvu II 双酶解后在凝胶上只出现1.8Kb及1.1Kb 2条带(图3-6);另一0.05Kb小带亦跑出胶外,同样

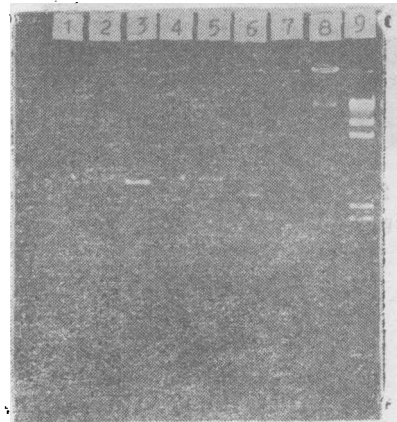


图1 pAL32的酶切电泳图之一
Fig.1 Testriction digestion pattern of pAL32(1)

1. pAL32/EcoR I,
2. pAL32/Hpa II
3. pAL32/Pvu II,
4. pAL32/Hpa I
5. pAL32/EcoRV,
6. pAL32/Ava I
7. pAL32/Hae II,
8. pAL32
9. λ /Hind III

Pvu I—*Hpa* I 双酶解结果也仅显示2条大小分别为2.5Kb和0.4Kb片段(图3-5),可以推知*Pvu* I的两个切点分别位于1.1Kb及1.15Kb处。*Eco*R I—*Ava* I 双酶解后预期应有3条带,但凝胶上仅出现1.95Kb和0.5Kb 2条带(图3-9),两者相加仅2.25Kb,然而在凝胶上见到的0.5Kb带比其它小带较亮且略宽,推测另一小带亦为0.5Kb左右。图4的*Ava* I—*Hpa* I 双酶解后预期也应得3个片段,凝胶上也只出现迁移率差别较大的2.45Kb和0.25Kb 2条带(图4-6),推测小带应为2个大小相近的片段组成,根据*Hpa* I切点位于0.7Kb处,则*Ava* I切点应在0.5Kb和1.0Kb处,由此可作出pAL32的限制酶图谱,见图5。

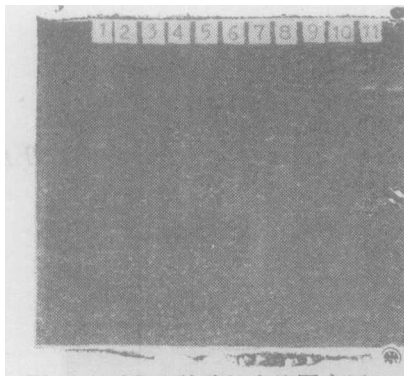


图2 pAL32的酶切电泳图之二
Fig.2 Restriction digestion pattern of pAL32(2)

1. pAL32/*Eco*R I,
2. pAL32/*Hpa* I,
3. pAL32/*Hpa* I,
4. pAL32/*Eco*R V,
5. pAL32/*Hpa* I—*Hpa* I,
6. pAL32/*Eco*R I—*Hpa* I,
7. pAL32/*Eco*R I—*Hpa* I,
8. pAL32/*Eco*R I—*Eco*R V,
9. pAL32/*Eco*R V—*Hpa* I,
10. pAL32,
11. λ /*Hind* I

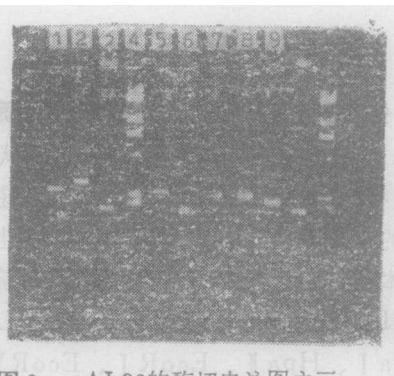


图3 pAL32的酶切电泳图之三
Fig.3 Restriction digestion pattern of pAL32(3)

1. pAL32/*Ava* I,
2. pAL32/*Pvu* I,
3. pAL32,
4. λ /*Hind* I,
5. pAL32/*Hpa* I—*Pvu* I,
6. pAL32/*Eco*R I—*Pvu* I,
7. pAL32/*Eco*R I—*Hpa* I,
8. pAL32/*Pvu* I—*Ava* I,
9. pAL32/*Eco*R I—*Ava* I

2.2 短小芽孢杆菌质粒pCJ3的衍生质粒pAL32的四环素抗性基因定位

2.2.1 *Eco*R V切点位于四环素抗性基因上的确定 已知pUB110没有*Eco*R V切点⁽¹⁰⁾,采用已除去复制点的pUB110(已除去1个*Taq* I切点)与pAL32构建成的 Km^rTc^r 双抗性重组质粒pSC33作载体,以 λ DNA为供体,分别经*Eco*R V酶切,*T*₄DNA连接酶连接后转化枯草杆菌感受态细胞,在含10 μ g/ml卡那霉素平板上挑取转化子经质粒快速检测以及在含25 μ g/ml四环素平板上复印,结果发现凡所含质粒大于载体pSC33的转化子均为 Km^rTc^r ,为四环素敏感菌株。挑取其中2株抽提质粒,分别命名为pSD37及pSD63进行酶切分析,电泳结果如图6、7。从图中可见pSD37经*Eco*R V酶解后产生2个片

表1 6种限制酶交叉酶解后各种片段的分子量
 Tab.1 The molecular weights of different fragments generated by reciprocal double digestions with six restriction enzymes

酶解组合	片段数目	片段大小(Kb)
EcoR I—Hpa I	2	2.25, 0.75
EcoR I—Hpa I	2	1.75, 1.2
Hpa I—Hpa I	2	2.45, 0.5
EcoR V—EcoR I	2	2.11, 0.84
EcoR V—Hpa I	2	2.81, 0.14
EcoR I—Pvu I	3	1.8, 1.1, 0.05
Hpa I—Pvu I	3	2.5, 0.4, 0.05
EcoR I—Ava I	3	1.95, 0.5, 0.5
Ava I—Hpa I	3	2.45, 0.2, 0.2

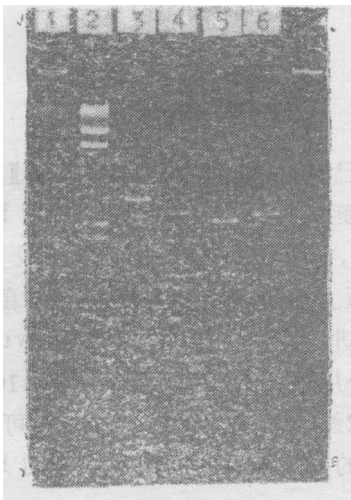


图4 pAL32的酶切电泳图之四
 Fig.4 Restriction digestion pattern of pAL32(4)

1. pAL32, 2. λ /Hind III,
3. pAL32/Hpa I,
4. pAL32/Hva I,
5. pAL32/Hpa I—EcoR I,
6. pAL32/Ava I—Hpa I

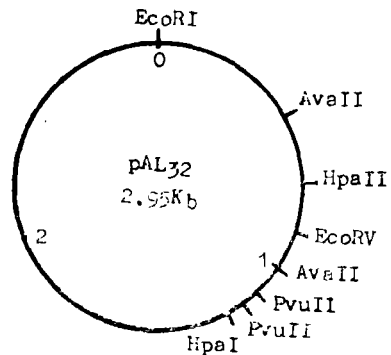


图5 pAL32的限制酶图谱
 Fig.5 Restriction map of pAL32

段, pSD63产生3个片段, 而其中最大的片段均与载体pSC33线状分子大小相同。估计其它片段应来自 λ DNA的EcoR V片段。在pSD63中有大小不同的2个 λ DNA的EcoR V片段。它们同时都与载体pSC33相连接(图7-3), 因而当pSD63经EcoR V切割后便产生3个片段。由于pUB110上无EcoR V切点, 可推断在pAL32的EcoR V位点插接了外源DNA片段, 从而使其失去了四环素抗性, 由此表明pAL32的EcoR V切点应位于其四环素抗性基因上。

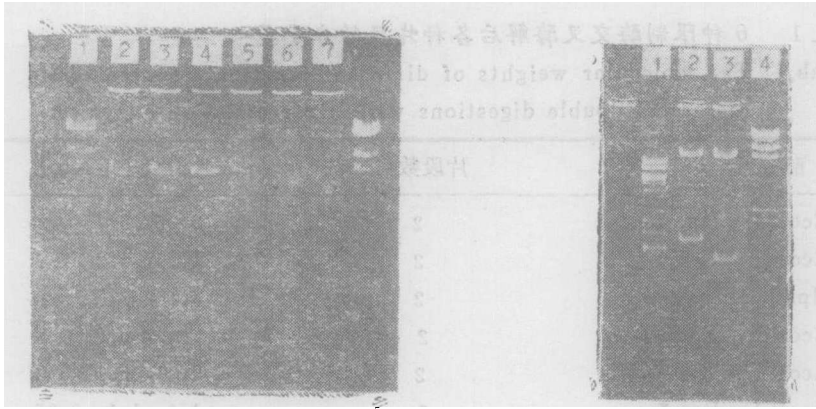


图6 重组质粒的电泳分析(一)
Fig.6 Electrophoresis analysis of recombinant plasmids(1)

1. λ /Hind III, 2. pSD37/EcoRV,
3. pSD63/EcoRV,
4. pSC33/EcoRV
5. pSD37, 6. pSD63,
7. pSC33

图7 重组质粒的电泳分析(二)

Fig.7 Electrophoresis analysis of recombinant plasmids(2)

1. λ /EcoRV,
2. pSD37/EcoRV,
3. pSD63/EcoRV,
4. λ /Hind III

2.2.2 Pvu I 切点位于四环素抗性基因上的确定 已知质粒pUB110具有Pvu I 切点1个,其位点不在 Km^r 基因上^[10],pAL32有2个相距0.05Kb的切点,分别用Pvu I 酶切,T₄DNA连接酶连接后转化枯草杆菌感受态细胞,在含10 μ g/ml卡那霉素平板上挑取转化子,经质粒快速检测以及在含25 μ g/ml四环素平板上复印,发现具有大质粒的菌落全部为 Km^rTc^s 。挑选其中分子较大的重组质粒pBD21进行酶切试验,经限制酶Pvu I 消化后的电泳结果如图8。重组质粒pBD21被切成2个片段,大片段与线状pUB110分子大小相同,较小的片段则与经Pvu I 酶切后的pAL32线状分子相近。由此可知具 Km^rTc^s 的大质粒pBD21是由pUB110与pAL32组成的重组质粒,推测pAL32的Pvu I 切点位于四环素抗性基因上。

综上实验表明短小芽孢杆菌质粒pCJ3的衍生质粒pAL32的Pvu I 至 EcoRV 的0.5 Kb区域与其抗性基因有关。在EcoRV限制酶切点位置可插接外源DNA 而使其四环素抗性基因失活,而2个仅相距0.05Kb的Pvu I 酶切点位置在置换外源DNA后也能使其抗性基因失活。

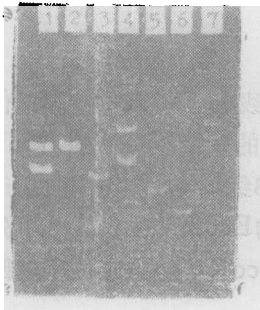


图8 重组质粒的电泳分析(三)

Fig.8 Electrophoresis analysis of recombinant plasmid(3)

1. pBD21/Pvu I, 2. pUB110/Pvu I
3. pAL32/Pvu I, 4. pBD21,
5. pUB110, 6. pAL32,
7. λ /Hind III

参 考 文 献

- 1 Lovett P S *et al.* J Bacteriol, 1975, 124: 481~490
- 2 Carton B C *et al.* J Bacteriol, 1974, 117: 1201~1209
- 3 Tanaka T *et al.* J Bacteriol, 1977, 129: 1487~1494
- 4 Tanaka T *et al.* J Bacteriol, 1977, 131: 699~701
- 5 Ehrlich S D. PNAS USA, 1977, 74: 1680~1682
- 6 周桢林等. 微生物学报. 1982, 22(3): 257~262
- 7 郭兴华等. 微生物学报. 1982, 22(3): 263~268
- 8 Spizien J *et al.* J Bacteriol, 1961, 82: 741~746
- 9 Maniatis T *et al.* Molecular Cloning, 1982
- 10 Mckemzie T *et al.* Plasmid, 1986, 15: 93~103

Restriction Map and Tc^r Gene Localization of the Truncated Plasmid pAL32 Derived from the Plasmid pCJ3 in *Bacillus pumilus*

Zhou Zhenlin* Chen Qi Wang Ge Xu Hong

Abstract The truncated Tc^r plasmid pAL32 derived from the plasmid pCJ3 was cleaved by reciprocal double digestions with 6 restriction endonucleases. The molecular weights of the fragments were estimated by agarose gel electrophoresis. A simple restriction map of pAL32 was thus constructed. Recombinants were obtained by cloning EcoRV fragments of λ DNA using Km^r Tc^r plasmid pSC33 as vector which was constructed from the plasmid pAL32 and the removed origin plasmid pUB110. All of them are resistant to Km and sensitive to Tc. A Km^rTc^r recombinant plasmid was also obtained by PvuII digest from the plasmid pAL32 and pUB110. Based on the inactivation of the tetracycline resistance of these recombinants, it is suggested that EcoRV and PvuII sites are located on Tc^r gene of the plasmid pAL32.

Keywords tetracycline resistant plasmid, *Bacillus pumilus*, restriction map, gene localization

* Department of Biology and Biotechnology Research Centre