

枯草杆菌启动基因在大肠杆菌中的克隆和表达

罗进贤 陆幸妍· 罗学斌

(生物学系/生物工程研究中心)

摘 要

以大肠杆菌启动基因选择载体pHE5为载体,枯草杆菌染色体DNA为供体,克隆了一批启动基因功能片段,带克隆片段的重组质粒在大肠杆菌中表现不同的四环素抗性水平,其中50%在100 $\mu\text{g/ml}$ 以上,12%达到200 $\mu\text{g/ml}$ 。对其中一个转化子进行质粒检测和分析,获得一个重组质粒pHE273,经酶切分析证明,克隆的强启动基因位于2.2kb的EcoRI-Hind III片段上。

关键词 枯草杆菌,启动基因,大肠杆菌,基因克隆

枯草杆菌由于安全和能分泌胞外蛋白,是理想的基因克隆受体^[1],但非芽胞杆菌的基因一般不易在枯草杆菌中表达,据认为,这是由于枯草杆菌RNA聚合酶对启动基因的特异性引起的^[2]。因此,克隆芽胞杆菌属基因或其噬菌体基因的强启动子,构建表达载体是实现外源基因在枯草杆菌中正确高效表达的重要途径。Williams等构建了枯草杆菌的启动基因探针质粒并以此为载体克隆了噬菌体spo2的启动基因使小鼠的二氢叶酸还原酶基因及大肠杆菌色氨酸操纵子基因在枯草杆菌中表达^[3~5]。本研究以大肠杆菌启动基因质粒pHE5为载体克隆了枯草杆菌染色体的启动基因并研究了其在大肠杆菌中的表达。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种与质粒 本实验所用的供体枯草杆菌808,系枯草杆菌BF7658经诱变而成的衍生菌株,产 α -淀粉酶,由东莞石龙酶制剂厂提供;载体pHE5由上海生物化学研究所提供;受体大肠杆菌HB101及C600分别来自北京微生物研究所及法国生物物理化学研究所。含地衣芽胞杆菌 α -淀粉酶基因的大肠杆菌质粒pJ07由法国Heslot实验室供给。质粒pHE27, pHE272及pHE273为本实验室组建。

本文1990年9月28日收到

* 现在广东省医药学院,丘云、吴伟精参加部份工作

1.1.2 培养基 大肠杆菌、枯草杆菌细胞培养及大肠杆菌转化均采用L-肉汤培养基, 固体平板另加1.5%的琼脂, 选择培养基补加定量的抗生素。

1.1.3 化学试剂 各种限制酶, T_4 -DNA连接酶, RNase, DNaseI, 及四环素和氨苄青霉素均为Boehringer Mannheim公司或Sigma公司产品, 余为国产试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA的分离与纯化 染色体DNA的制备主要采用Saito及Miura的方法^[6], 质粒的分离采用碱裂解法^[7], 所得粗品在1 mol/L NaCl中40000rpm离心6 h 纯化^[8]。质粒快速检测按文献^[9]的方法进行。

1.2.2 DNA的酶切及连接反应 酶解及连接反应缓冲液均按厂家提供配方。5 μ g 质粒pHE5DNA用适量Hind III完全酶解后65 $^{\circ}$ C 15分钟终止反应与经Hind III酶解的25 μ g 枯草杆菌808DNA混合, 用酚-氯仿及氯仿各抽提一次, 酒精沉淀, 沉淀DNA溶于TE缓冲液中, 加入适量连接酶缓冲液及 T_4 -DNA连接酶, 14 $^{\circ}$ C保温40h, 然后进行转化。

1.2.3 感受态细胞的制备及DNA转化 采用文献[10]的方法

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳及分子量测定 见文献[11]

1.2.5 启动基因表达水平的检测 将含克隆的启动基因的重组子在含20 μ g/ml四环素的LB平板上培养过夜后, 分别点在含50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 150 μ g/ml, 200 μ g/ml及250 μ g/ml四环素的抗性平板上, 37 $^{\circ}$ C培养24h, 观察重组子的生长情况以确定启动基因的表达水平。

2 结果与讨论

2.1 氨苄青霉素及四环素抗性转化子的筛选

采用鸟枪法, 用Hind III分别酶切枯草杆菌808及载体pHE5DNA, 经体外重组, 转化大肠杆菌HB101, 筛选氨苄青霉素及四环素抗性转化子。如图1所示, pHE5是pBR322除去一段含四环素抗性基因启动子的EcoRI-Hind III片段再接回一段 T_4 -噬菌体2.5kb的EcoRI-Hind III片段构成的衍生质粒, 分子量为6.8kb, 表型为Amp^r及Tc^s, 若在四环素抗性基因前Hind III位点处插入一段带启动功能的片段, 则抗性基因被激活而表达。根据pHE5的这一特性, 我们将连接好的供体和载体DNA混合物转化大肠杆菌后, 用含50 μ g/ml氨苄青霉素及20 μ g/ml四环素的LB平板上进行筛选, 获得192个双抗性转化子。随机挑选部份重组转化子进行质粒的快速检测, 结果如图2。从图中可见, 这些重组质粒都比载体pHE5大, 表明这些质粒含有不同大小的插入片段。将这些双抗性转化子分别点种在含不同浓度四环素的LB平板上, 发现它们的抗四环素水平在20-200 μ g/ml之间即克隆的片段表现不同的启动功能。载体pHE5经Hind III酶解后在相同的条件下自我环化转化大肠杆菌HB101, 没有出现Tc^r转化子, 说明克隆的启动基因片段不是来自混杂在pHE5中的大肠杆菌染色体。

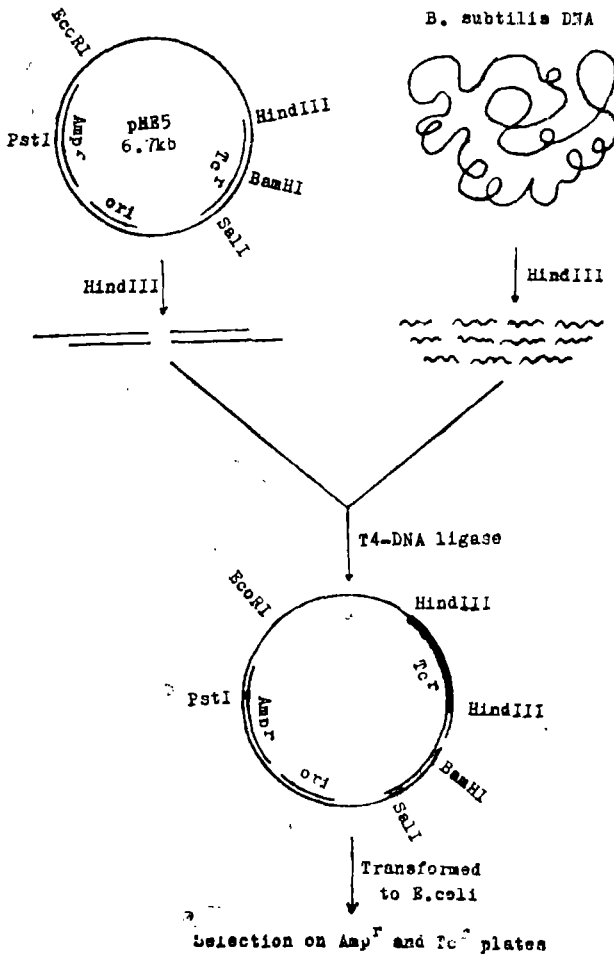


图1 枯草杆菌启动子片段的克隆

Fig.1 Protocol for cloning promoter fragments from *B. subtilis*

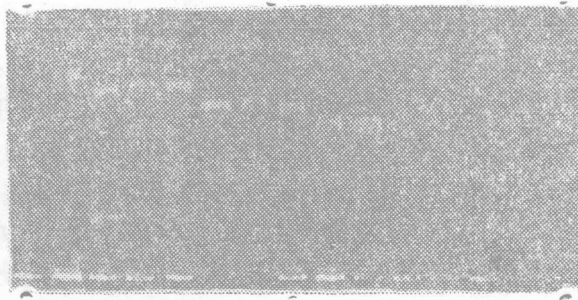


图2 从转化子中快速分离的质粒的电泳图

Fig.2 Gel electrophoresis of rapidly isolated plasmids from some transformants

2.2 重组质粒上启动基因表达水平的测定

将192个双抗性转化子分别点种于四环素含量为 50, 100, 150, 200, 250 μ g/ml 的 LB平板上作克隆的启动基因表达水平检测, 结果如图 3。从此结果可以看出, 近50%的重组转化子的四环素抗性水平都达到100 μ g/ml, 其中24株的抗性达到 200 μ g/ml。不同

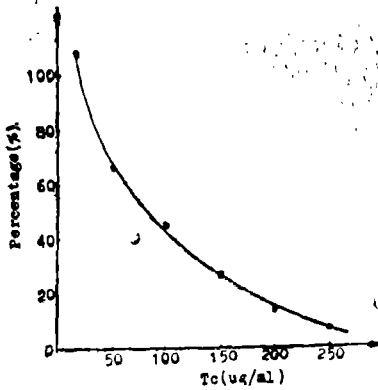


图3 转化子抗性水平的分布
Fig.3 Distribution of resistance level of transformants

的四环素抗性水平反映了Tc^r基因受强度不同的启动基因的作用，而且也受其它因素的影响如启动基因与Tc^r基因之间的距离等。

从四环素抗性水平达到200μg/ml的24个转化子中挑选出一个，分离重组质粒(命名为pHE27)进行鉴定。

2.3 重组质粒pHE27的改建

如图4所示，pHE27上有Hind III切点3个(其中一个在克隆的片段内)，EcoRI切点3个(2个在克隆片段内)，克隆片段长5.9kb。为了消除2个Hind III切点，我们按图5的路线对pHE27进行改建。第一步用Hind III酶解pHE27，获得3个片段，用T₄-DNA连接酶重新连接后转化大肠杆菌HB101，筛选四环素抗性转化子，质粒检测结果表明，这些转化子含两种质粒，一种是原来的质粒pHE27，另一种比pHE27小，是丢掉了一个小片段后生成的，命名为pHE272。将pHE272重新转化大肠杆菌HB101后，检查四环素抗性水平达到250μg/ml，比pHE27高，可能是丢失了靠近抗四环素结构基因的一段顺序，缩短了启动子与结构基因之间的距离所致。pHE272尚有Hind III及EcoRI切点各二个(图5)，为了再去掉一个Hind III切点，进一步缩短克隆的启动子功能片段，将pHE272用EcoRI酶切后再重新连接，转化大肠杆菌HB101，从四环素抗性转化子中，筛到一个6.3kb的重组质粒，命名为PHE273、pHE273上有

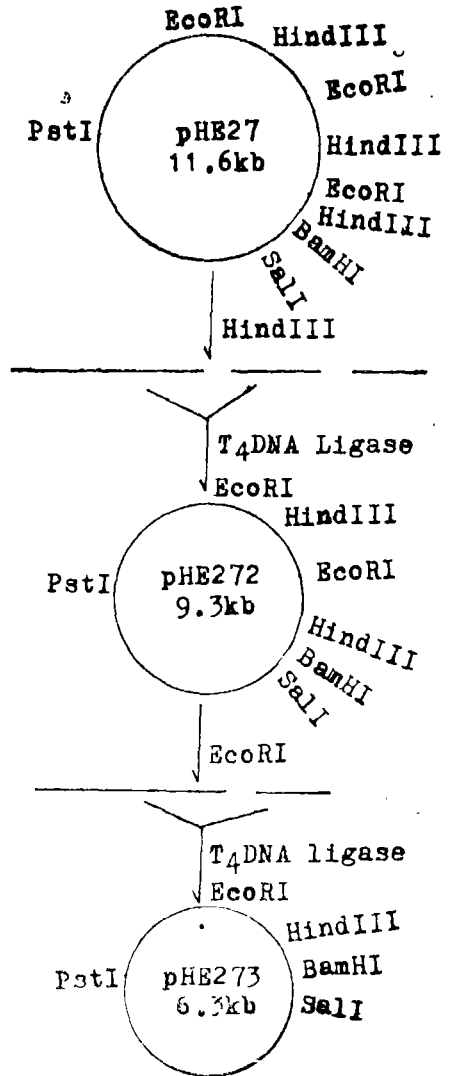


图4 质粒pHE273的构建
Fig.4 Construction of plasmid pHE 273

Hind III, EcoRI及BamHI切点各一个。双酶切pHE273可得到二个片段,大小为4.3kb及2.2kb,其中4.3kb是原来的载体DNA,2.2kb是克隆的启动子功能片段(图6)。将pHE273转化大肠杆菌 HB101后仍可获得四环素抗性到达250 μ g/ml的转化子,比pBR322的四环素抗性水平要高,表明我们已克隆到枯草杆菌的强启动子片段。在构建的质粒pHE273上,四环素抗性基因的前面,克隆的启动子的3'端是一个Hind III切点,便于通过Hind III位点插入外源基因,观察外源基因的表达情况。



图5 质粒pHE27, pHE272的限制
切酶片段的电泳图

Fig.5 Gel electrophoresis of restriction
fragments of plasmids pHE27 and pHE272

- (1) pHE27, (2) pHE27 + BamHI,
(3) pHE27 + Hind III, (4) pHE27 + EcoRI,
(5) cI857s7 + Hind III, (6) pHE272,
(7) pHE272 + Hind III, (8) pHE272 + EcoRI

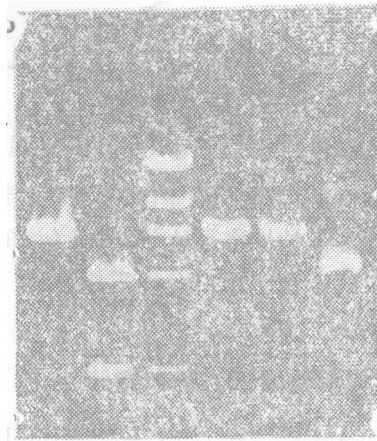


图6 质粒pHE273酶切片段的
电泳分析

Fig.6 Restriction patterns of
plasmid pHE273

- (1) pHE273, (2) pHE273 + Hind III,
(3) pHE273 + EcoRI, (4) cI857S7 +
Hind III, (5) pHE273 + Hind III +
EcoRI, (6) pHE273 + BamHI

参 考 文 献

- Priest F C. Bacteriol Review, 1973; 41: 711
- Kreft J *et al.* Current Topics in Microbiology and Immunology, 1982; 96:1
- Williams D M *et al.* J Bacteriol. 1981; 146:1162
- Williams D M *et al.* Gene, 1981; 19:206
- Harwood C *et al.* Gene, 1983; 24:163
- Saito H and Miura K. Biochem Biophys Acta, 1963; 72:619
- Maniatis T *et al.* Mol Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982
- 刘伟民等, 遗传, 1987; 9: 43
- Birnboim H C *et al.* Nucl Acid Res, 1979; 7: 1513
- Cohen S N *et al.* PNAS USA, 1972; 69: 2100
- 罗进贤等. 中山大学学报(自然科学版), 1985; (4): 81

- 12 Cornelis P *et al.* MGG, 1982; 186: 507
- 13 Griffin P J *et al.*, J Appl. Chem Biotech, 1973; 23:279
- 14 Thomas PS *et al.* PNAS USA, 1980; 77: 5201

Cloning and Expression of *B. amyloliquefaciens* Promoter Regions in *E. coli*

Luo Jinxian* Lu Xingyuen Luo Xuebin

Abstract

Promoter regions of *B. subtilis* chromosome were cloned in *E. coli* using the promoter selection vector pHE5. The *E. coli* harboring the recombinant plasmids expressed Tc^r resistant gene at different level; 50% of them at 100 μ g/ml and 12% up to 200 μ g/ml. One of the transformants was further characterizd and subcloned and a new recombinant plasmid pHE273 was obtained, which contains a 2.2kb EcoRI -Hind III fragment with promoter function.

Keywords: *B. subtilis*, promoter, *E. coli*, gene cloning

* Department of Biology