

简 报

棘孢小单孢菌启动子片段在大肠杆菌中的克隆和表达

聂丽平 薛禹谷

(中国科学院微生物研究所, 北京)

棘孢小单孢菌是庆大霉素产生菌。棘孢小单孢菌基因调控的机理及其启动子的结构、功能的研究对提高和改造棘孢小单孢菌的抗生素产生具有深远的指导意义。

本文报道了利用启动子探测质粒载体 pGA46, 克隆棘孢小单孢菌中能在大肠杆菌中表达四环素抗性的 DNA 片段, 筛选具有四环素抗性的重组子。对棘孢小单孢菌中的大肠杆菌类型的启动子活性片段进行了酶切分析、分子杂交和抗性表达等研究。

材 料 与 方 法

(一) 材料

1. 菌种: *E. coli* 1161 (pGA46) (Tc^r Cm^r)^[1] 及 *E. coli* C600 (F⁻, thi-1, thr-1, leu B6, Lac Y-1, Ton A21, Sup E44, λ⁻), 均由本组保藏。棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*) M814-455 由本组筛选^[2]。*E. coli* No. 8-1 为本组构建的含重组质粒的菌株^[3]。

2. 培养基: LB 培养基见文献^[4]。LB 固体培养基由 LB 培养基加 1.2% 的琼脂而成, 加适量抗生素即为选择性培养基。豌豆液培养基和麸皮培养基见^[5]文献。

3. 工具酶: 限制性内切酶 BamH I、EcoR I、Hind I、Pst I 以及 RNase 均为西德 Boehringer-Mannherim 公司产品; 限制性内切酶 Bgl I、Sal I、Sau3A 及 DNase I、Polym-erase I、T4 连接酶为 Promega 公司产品、蛋白

酶 K 为西德 E. Merck 公司产品。

(二) 方法

1. DNA 的分离和纯化: 用碱裂解法大量收集质粒 DNA, 并用氯化铯密度梯度离心法纯化和收集纯净的质粒 DNA^[4]。用煮沸法快速提取小量质粒 DNA, 经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测快速分析质粒 DNA^[4]。用 Marmur 法制备大肠杆菌全 DNA^[6]。用 D.A. Hopwood 等的方法提取棘孢小单孢菌全 DNA, 并进行纯化^[7]。

2. DNA 的酶解, 连接均按产品生产公司的使用说明书进行。

3. 转化: 利用氯化钙方法制备感受态细胞, 在含有抗生素的选择性培养基上筛选转化子^[4]。

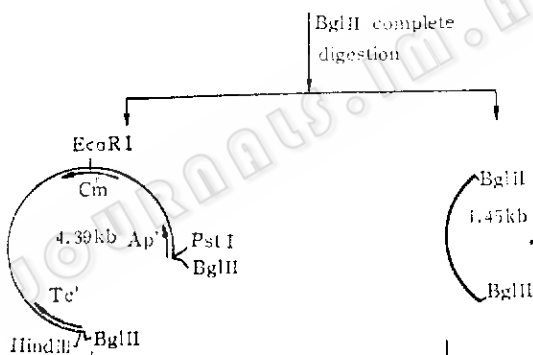
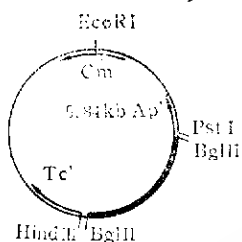
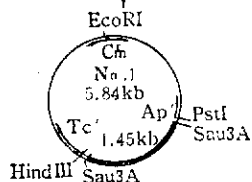
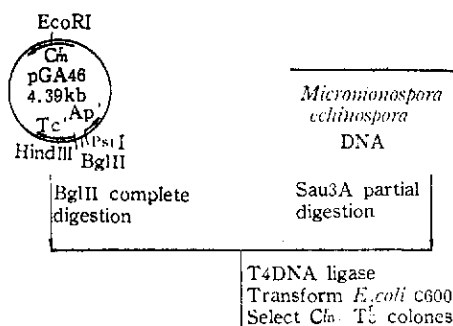
4. DNA 杂交: 按分子克隆手册上的方法进行^[4], Southern 转移和 Southern 杂交及放射自显影、缺口平移、标记探针按 BRL 公司 Nick Translation agent Kit 产品使用说明书的方法及反应体系进行。

结 果 与 讨 论

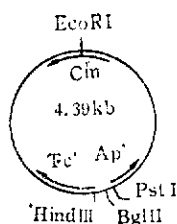
(一) 重组体的构建和筛选

用 Bgl I 完全酶解载体 pGA46, 用 Sau3A 部分酶解棘孢小单孢菌全 DNA, 用 T4 DNA 连接酶连接载体和供体 DNA 片段, 转化大肠杆菌 *E. coli*-C600, 在含有氯霉素及四环素的选择培养基上筛选具有抗性的重组体, 共获得 129 个重组克隆, 见图 1。

本文于 1988 年 3 月 30 日收到。



T4DNA ligase itself
Transform *E. coli* C600
Select Tc^r Cm^r colonies



Cm^r but not Tc^r

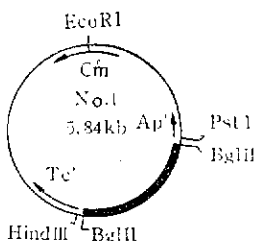
图 1 利用载体pGA46构建重组质粒
Fig. 1 Schematic diagram of construction of recombinant plasmid with vector pGA46

其中 (No.1) 的粗线部分代表具有启动子功能的棘孢小单胞菌DNA片段约1.45kb
DNA fragment of *Micromonospora echinospora* (heavy line) was inserted into BglII site of pGA46

BglII complete digestion

BglII
1.45kb
BglII

Insert into BglII site of pGA46 by BglII digestion
Transform *E. coli* C600
Select Tc^r Cm^r colonies



both Cm^r Tc^r

图 2 利用BglⅠ亚克隆重组质粒 No.1 示意图
Fig. 2 Schematic diagram of subcloning of recombinant plasmid No. 1
仅 1.45 kb 的片段有启动子活性
Only 1.45 kb fragment has promoter activity

(二) 重组体的大小及四环素抗性分析

用煮沸法快速提取重组质粒,随机选择10个克隆子用作分析,用0.7%琼脂糖凝胶电泳对其中No.1和No.2进行了分子量测定,结果见图版I-C。其中No.1插入片段较已知分子量为1.89 kb的重组质粒No.8-1^[3]略小,以EcoRI酶切的Spp1作为对照,测得其分子量约为1.45kb(图版I-D)。四环素抗性水平测定的结果No.1是30μg/ml, No.2是40μg/ml,均高于对照pGA46 10μg/ml,结合插入片段大小和四环素抗性水平考虑,选择No.1作进一步的分析鉴定。

(三) 重组质粒中载体DNA片段的鉴定

用Bgl I、Hind III、Pst I及Hind III + Pst I分别完全酶解载体pGA46和重组质粒No.1,经0.7%的琼脂糖凝胶电泳分析酶解产物,结果证明在重组质粒中有载体pGA46的区带(图版I-D中6,7所示)。表明重组质粒中的载体确是来自pGA46。

(四) 重组质粒的同源性分析

用Bgl I完全酶解No.1,电泳纯化1.45kb的插入片段,用α-³²P标记该片段作为探针,通过分子杂交的方法检测其与棘孢小单孢菌全DNA,大肠杆菌全DNA及载体pGA46、重组质粒No.1

的同源性。结果表明:1.45kb的插入片段仅与棘孢小单孢菌全DNA和重组质粒具有同源性,图版I-A,B进一步说明1.45kb的插入片段确实来自棘孢小单孢菌。

(五) 重组质粒再转化E.coli C600

为了检测重组质粒的稳定性及可转化性,纯化重组质粒No.1后,再转化E.coli C600,结果表明, No.1可以较高的频率(6.22×10^4)转化大肠杆菌C600,所得转化子的抗生素抗性水平及质粒DNA的分子量均同原始重组质粒。

(六) 将No.1中的1.45kb插入片段再克隆到pGA46

用Bgl I完全酶解重组质粒No.1,能得到大小二个片段,纯化1.45kb的小片段,与经Bgl I酶切的pGA46进行重组后,转化大肠杆菌C600,用四环素进行筛选,结果证明仍能得到抗四环素的转化子,如将4.39kb的大片段自身连接后转化大肠杆菌C600,则四环素抗性不能被启动得到表达(见图2)。经测定能表达的200个转化子分子量的大小,表明其与No.1基本一致,这证明,载体在No.1中没有发生异常变化,棘孢小单孢菌中确有部分DNA序列在大肠杆菌中具有启动子功能。

参 考 文 献

- [1] Gynheung, A.N. et al.: *J. Bacteriol.*, 140:400—407, 1979.
- [2] 还连栋等: 抗生素, 12(2):120—125, 1987.
- [3] 董可宁等: 遗传学报, 13(5):330—339, 1986.
- [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [5] 薛禹谷等: 微生物学报, 18(3):195—201, 1978.
- [6] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.
- [7] Hopwood, D.A. et al.: *Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*, 1985

CLONING AND EXPRESSION OF *MICROMONOSPORA* *ECHINOSPORA* PROMOTER IN *ESCHERICHIA COLI*

Nie Liping Xue Yugu

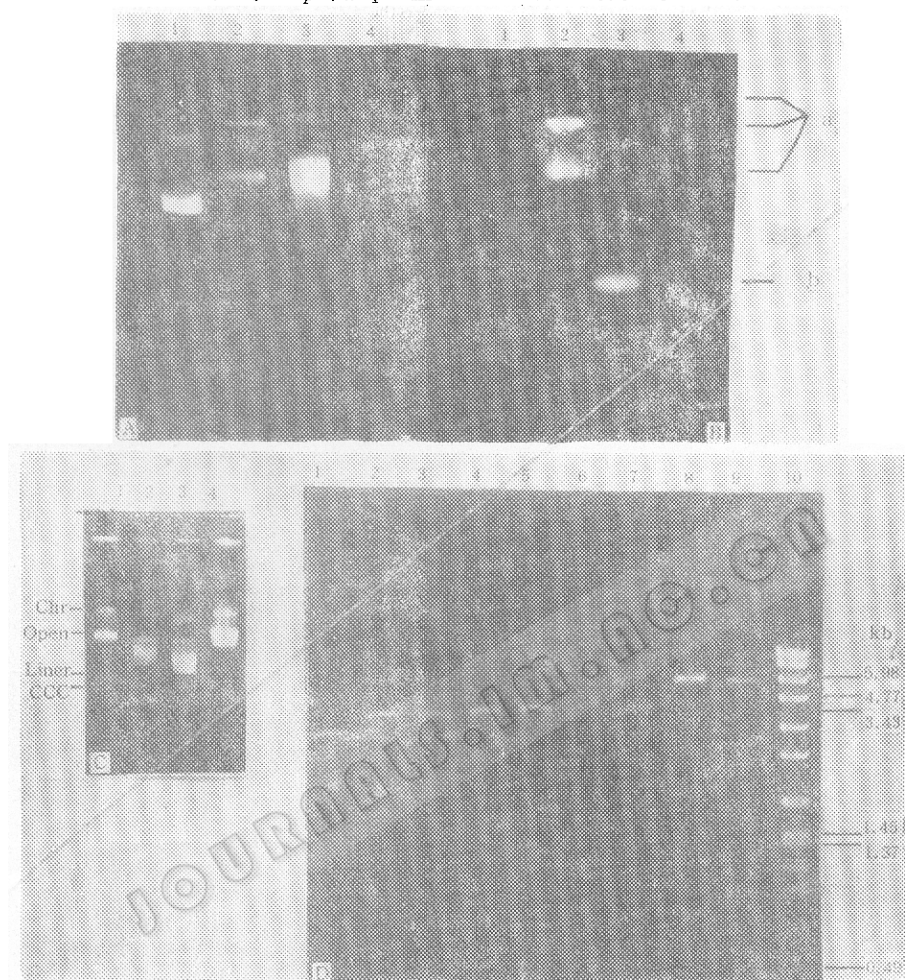
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Sau3A partial digested DNA fragments from *Micromonospora echinospora* have been cloned into promoter-probe plasmid pGA46 which had been digested with BglII. Transformants with Tc^r gene promoter-bearing plasmids were selected on the medium. Electrophoresis showed that there were common vector bands in BglII and PstI+HindIII cleavage patterns of the recombinant plasmids. Hybridization studies revealed that the 1.45 kb fragment inserted in the recombinant plasmid No.1 was homology with *Micromonospora echinospora* DNA.

Our results indicated that some DNA fragments of *Micromonospora echinospora* have a promoter function in *E. coli*.

Key words

Micromonospora echinospora; promoter-probe plasmid pGA46



A,B: ^{32}P 标记探针 (1.45kb 插入片段) DNA 杂交 Southern hybridization of ^{32}P -labeled 1.45kb DNA fragment with *M. echinospora* DNA

A. DNA 样品琼脂糖凝胶电泳结果 Agarose gel electrophoresis of corresponding DNA samples

1. vector pGA46; 2. recombinant plasmid No. 1; 3. *M. echinospora* DNA + Sau 3A; 4. *E. coli* JF1161 + Sau 3A

B. 分子杂交后的放射自显影结果 Autoradiography of hybridization pattern.

2. Hybridization band of recombinant plasmid No. 1 with ^{32}P -labeled 1.45 kb DNA fragment;
 3. Hybridization band of *Micromonospora echinospora* DNA with ^{32}P -labeled 1.45 kb DNA fragment

C. 重组质粒分子量大小分析 The comparison of the molecular weights of recombinant plasmid

1. Vector pGA46; 2. Recombinant plasmid No. 8-1; 3. Recombinant No. 1; 4. Recombinant No. 2

D. 载体pGA46和重组质粒 No. 1 共同区的分析 Analysis of the common vector bands within vector pGA46 and recombinant plasmid No. 1

1. No. 1; 2. pGA46 + Bgl I; 3. pGA46 + Hind III + PstI; 4. pGA46 + Hind III; 5. pGA46 + PstI; 6. No. 1 + Bgl I; 7. No. 1 + Hind III + PstI; 8. No. 1 + Hind III; 9. No. 1 + PstI
 10. SppI + EcoRI as Control