

# 吸水链霉菌应城变种10-22中一个复制子的克隆和基本复制区的定位

邓子新 周秀芬

(华中农业大学土化系农抗研究室, 武汉)

利用由pBR322衍生的链霉菌复制子探针载体pIJ2703, 从吸水链霉菌应城变种菌株10-22中克隆了一段13kb的可以自主复制的DNA, 制作了携带这段DNA的杂合质粒pHZ54的限制酶图谱。利用缺失、次级克隆等方法将基本复制区确定在2.86kb的范围内。用外切酶Ⅲ顺序缺失法不仅进一步确证了基本复制区的位置, 而且将其缩小到2kb的范围内。同时, 在上述试验过程中, 还组建了一系列既可在大肠杆菌、又可在变铅青链霉菌中复制的双功能质粒, 其中有些质粒是有用的穿梭载体。

**关键词** 吸水链霉菌; 外切酶Ⅲ顺序缺失; 复制子探针; 基本复制子; 双功能质粒; 穿梭载体

在筛选农用抗生素的过程中, 我们研究室曾获得了一株农抗产生菌——吸水链霉菌应城变种<sup>[1]</sup>, 为了以这个菌株为对象, 对其抗生素生物合成途径进行遗传分析, 同时利用重组DNA技术去操作不同的抗生素生物合成基因以提高抗生素的产量, 产生“杂合抗生素”, 有必要去发展吸水链霉菌自身有效的克隆系统。这个菌株质粒DNA的分离提取和电泳检测揭示, 它至少存在着一个质粒。然而, 这个质粒的拷贝数较低, 分离提取耗资费力, 操作很不方便。于是, 我们决定先利用复制子探针载体克隆它的复制子, 并把它发展成为有效的链霉菌-大肠杆菌双功能克隆载体。

本文报道这个菌株中一个复制子的克隆以及利用缺失分析、次级克隆和核酸外切酶Ⅲ顺序缺失法对基本复制区的准确定位。

## 材料和方法

### (一) 菌株和质粒

吸水链霉菌应城变种10-22系本室保

藏菌种(简称10-22)。变铅青链霉菌菌株JT46<sup>[2]</sup>用作质粒的链霉菌宿主由Jchn Innes研究所提供; 大肠杆菌的宿主菌株为ED8767(recA56, dam<sup>+</sup>)<sup>[3]</sup>和GM242(recA1, dam-3)<sup>[4]</sup>。链霉菌复制子探针质粒为pIJ2703<sup>[5]</sup>。大肠杆菌质粒pKK232-8和pUC7的限制酶图谱及有关特征请见文献[6]和[7]。

### (二) 通用技术

大肠杆菌、链霉菌的培养及DNA操作的方法见文献[8]。质粒的分离见文献[9]。琼脂糖凝胶上DNA片段的大小(kb)根据文献[10]的方法所衍生的计算机程序<sup>[11]</sup>确定。

### (三) 外切酶Ⅲ顺序缺失及质粒pHZ54的顺序缺失

采用文献[12]所述方法进行。

本文于1988年12月16日收到。

本文是国家自然科学基金会青年科学基金资助课题。

美国哈佛大学J. Brosius博士惠赠质粒pKK232-8, 美国ER Squibb and Sons公司惠赠硫链丝菌素, 英国John Innes研究所D. A. Hopwood教授和T. Kieser博士对此课题给予多方面的支持, 特此致谢。

## 结 果

### (一) 复制功能的克隆以及 pHZ54 的限制酶图谱

pIJ2703 是一个由 pUC7 衍生而来的大肠杆菌载体, 仅 5kb。它的复制起点来自于 pBR322, 携带了可在大肠杆菌中表达的氨苄青霉素抗性基因 amp。为了使它在链霉菌中作为有效的复制子探针载体, 已在这个质粒中装入了可在链霉菌中表达的硫链丝菌素抗性基因 *tsr*<sup>[10]</sup>。pIJ2703 经 BclI 酶切后 (质粒从 *dam*<sup>-</sup> 大肠杆菌菌株 GM242 分离而来), 与从吸水链霉菌应城变种 10-22 中分离的总 DNA 经 BamHI, BclI、BglII 和 MboI 部分酶解后的 DNA 片段分别相混合, 用 T4 连接酶连接后即去转化变铅青链霉菌 JT46 的原生质体。待原生质体在 R2YE 培养基平板上再生约 20h 左右后, 在每个平板上涂布 1ml 浓度为 250 $\mu$ g/ml 的硫链丝菌素水溶液, 以筛选硫链丝菌素抗性转化子。在用 4 种不同的连接混合物所做的转化试验中, 经 BclI 线性化的 pIJ2703 与 10-22 经 BamHI 酶解后 DNA 的连接物没有产生硫链丝菌素抗性转化子, 而其它试验都得到了少量转化子。用碱解法从转化子中提取质粒 DNA, 虽没有检测到明显可见的质粒带 (因质粒在 JT46 中的拷贝数十分低), 但用微量的质粒 DNA 去转化大肠杆菌的菌株 ED8767 则发现, 一个由 pIJ2703 与 10-22 的 BclI 片段重组所衍生的质粒在 ED8767 中产生了许多氨苄青霉素抗性转化子。从多个转化子中分离 DNA 得到了一个均匀大小的质粒, 命名为 pHZ54 (图 1)。限制酶图谱分析揭示 pHZ54 中的 pIJ2703 部分没有发生任何缺失, 说明其结构在 JT46 和 ED8767 中都是稳定的。这个特性使得 pHZ54 成为

稳定的链霉菌-大肠杆菌的双功能质粒。

pHZ54 除了含有完整的 pIJ2703 (5kb) 以外, 还含有 13kb 来自于 10-22 的 DNA (图 1)。这段 DNA 可在变铅青链霉菌中复制并被许多辨认富含 GC 顺序的限制酶所切割 (如被辨认 GGGCCC 序列的 ApaI 切割产生 6 个切点), 此特性反映出它不大可能是连接混合物中随 pIJ2703 分离提取所

表 1 pHZ54 的酶切点数目

Table 1 Numbers of restriction sites in pHZ54 by different restriction endonucleases

酶	切点数目	酶	切点数目
Enzyme	Number of site	Enzyme	Number of site
Bgl I	1	Mst I	10*
Kpn I	1	Hind I	11*
EcoRV	1	Pvu I	11*
Sph I	1	SalG I	11*
Cla I	2	Sma I	12*
Pst I	2	Sst I	14*
Sst I	3	Bgl I	16*
Dra I	3	Ava I	16*
EcoR I	3	Hind II	0
BamH I	6	Xho I	0
Apa I	6	Xba I	0
BstE I	8		

\* 在 pHZ54 的限制性图谱上, 这些酶切点的相对位置尚未精确确定

Relative positions of these restriction sites not yet determined

掺入的少量来自大肠杆菌的 DNA (因为链霉菌的 GC% 可高达 73%, 而大肠杆菌则只有 50% 左右)。用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 标记插入片段作为放射性探针所做的 Southern 法杂交试验也确证了这段 DNA 来自于 10-22。因此我们对 pHZ54 进行了详细的酶谱分析。它被多种不同的限制酶切割的情况详见表 1, 其中大部分酶切点的相对位置已经确定 (图 1)。

### (二) 利用缺失分析、次级克隆方法定位基本复制区

为了初步确定 13kb 克隆片段上的基本复制区段, 我们对质粒 pHZ54 进行了缺失、

重排和次级克隆分析试验(图 2)。这些质粒的衍生试验是在大肠杆菌中得到质粒, 然后再去转化 JT46 所进行的。只有当衍生的小质粒仍然携带了完整的复制区时, 才能得到硫链丝菌素抗性转化子。图 2 汇总了一些次级克隆片段在变铅青链霉菌中复制功能的测定结果。pHZ54 共有 3 个 Sst I 片段(见图 1), 大小分别为 9.52kb, 6.79kb 和 1.67kb。Sst I -A(9.52kb) 和 Sst I -C(1.67kb) 片段在 pHZ54 中的缺失产生了 pHZ79。这个质粒只能在大肠杆菌中复制, 不能在 JT46 中复制。在这个质粒中加入 Sst I -A 片段, 衍生了一个新质粒 pHZ77(Sst I -A 片段在这个质粒中的取向与在 pHZ54 中的取向相反), 然而, 这

个 9.52kb 的 DNA 片段仍不能赋予这个质粒在变铅青链霉菌中复制的能力。这两项试验暗示, 基本复制区可能位于这个 13kb 片段的两端, 而不在中央部分。继后, 在 pHZ79 中插入 1.67kb 的 Sst I -C 片段(以在 pHZ54 中的相同取向) 则赋予了衍生质粒 pHZ78 在链霉菌中复制的能力, 这说明基本复制区与 *tsr* 基因端十分靠近, 位于图 1 中位点 28 和位点 32 的 Bcl I -Sst I 片段之间, 这个片段仅有 2.86kb。用 pHZ54 经 *Apa* I 酶解, 再连接所组建的质粒 pHZ83 也证明了上面的推理。把包括了 *tsr* 基因和基本复制区的 *Bam*HI 片段以相反的取向分别克隆到另一个大肠杆菌质粒 pKK232-8 的 *Bam*HI 位点中, 以及把包括

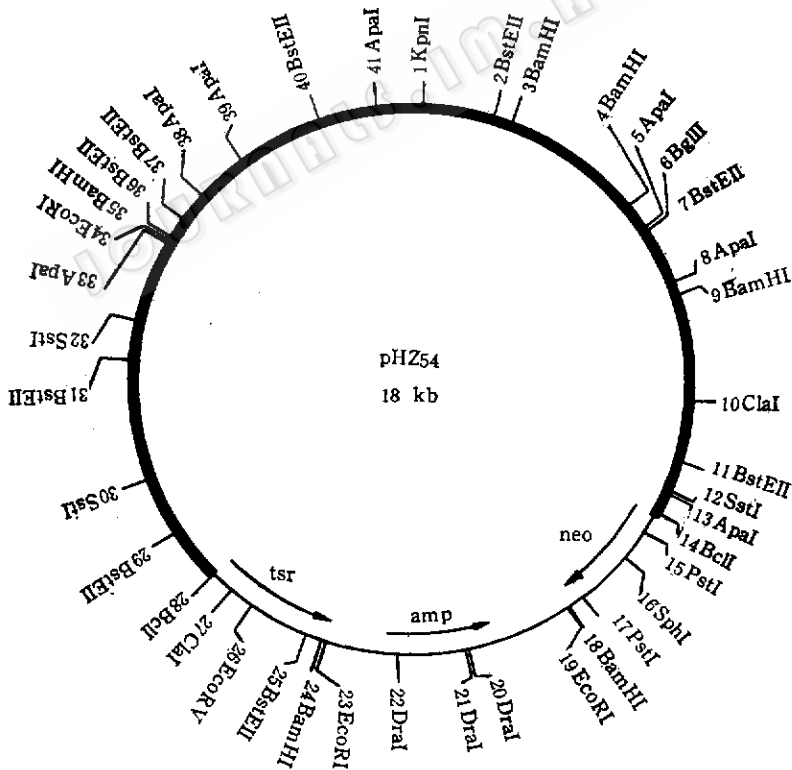


图 1 质粒 pHZ54 的限制酶图谱

Fig.1 Restriction endonuclease cleavage map of plasmid pHZ54

相对位置用数字标出, 13kb 插入片段用粗弧线表示

Relative positions are indicated by numbers. 13 kb insert is marked as heavy black arc

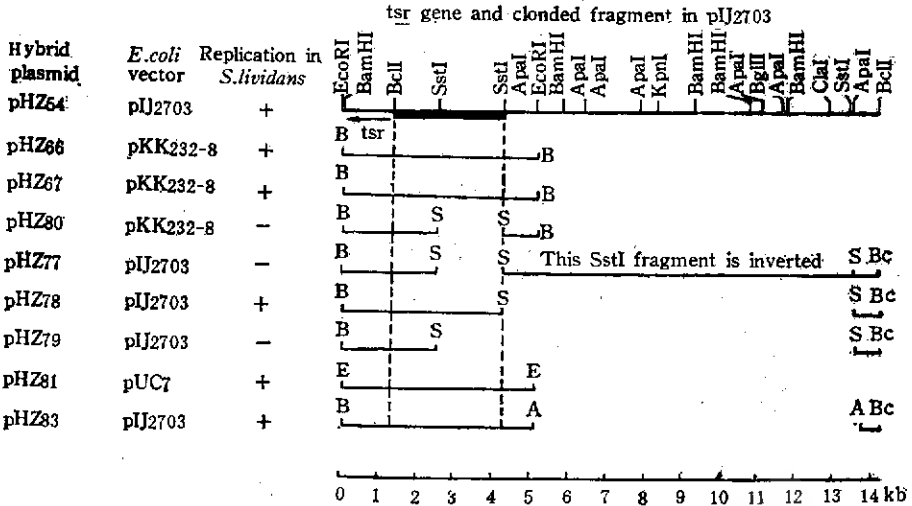


图2 用缺失和次级克隆的方法定位基本复制子

Fig.2 Localization of the minimal replication region by deletion and subcloning

+ 和 - 号分别表示质粒在变铅青链霉菌中复制与不复制, 粗黑线标出质粒复制的必需区段. A. Apa I; B. BamH I; Bc. Bcl I; E. EcoR I; S. Sst I

Ability of plasmid replication in *S. lividans* is indicated by + or -. The essential replication region is given as a heavy black bar. A. Apa I; B. BamH I; Bc. Bcl I; E. EcoR I; S. Sst I

了tsr基因和基本复制区的EcoR I片段克隆到大肠杆菌质粒pUC7中所衍生的质粒pHZ66, pHZ67和pHZ81都能在变铅青链霉菌中复制(图3), 由此进一步确证了这段复制功能区的可靠性。同时, 将pHZ66上1.67kb的Sst I片段去除、再连接所获得的质粒pHZ80又丧失了转化变铅青链霉菌的能力(图2)。这项试验更进一步证明, 这两个Sst I位点中至少有一个是位于复制功能必要区内的。

一系列双功能克隆载体的发展是这些次级克隆、缺失试验的“副产品”。这些载体都有在链霉菌和大肠杆菌中穿梭的特征, 它们不仅携带了可分别在两种不同生物体内进行选择药物抗性基因, 而且都在基本复制区以外分别具有各种不同的单一性切点, 以用于克隆各种不同的外源DNA片段。例如: pHZ54含有单一的Bgl II和Kpn I位点(位于neo基因中的两个Pst I位点也可用于克隆); pHZ66和pHZ67中含

有单一的Hind III和Apa I位点; pHZ78和pHZ83中含有单一的Apa I位点, pHZ81中含有单一的BamH I位点。许多可作为载体的质粒中都含有单一的EcoRV和Cla I位点, 但它们都位于在链霉菌中用作抗性标记的tsr基因内, 因此不能用于克隆。此外, 在含有neo基因的载体中, neo基因中的Pst I位点可用于克隆, 因为在这个系列的克隆载体中, neo既不能在大肠杆菌中用作选择标记, 也不能在链霉菌中用作选择标记, 原因是neo只含有结构基因, 并不含有启动子, 克隆在neo基因上方的那些DNA片段也没有激活neo基因的表达(即不赋予寄主卡那霉素或新霉素抗性)。显然, 当不需要在链霉菌和大肠杆菌中穿梭时, pHZ78, pHZ81和pHZ83中EcoR I或BamH I位点均可用于克隆。

### (三) 用外切酶III顺序缺失法进一步定位基本复制区

缺失、次级克隆试验揭示, pHZ54上

单一的Bgl II位点不是pHZ54在链霉菌中的复制所必需的,这个位点就为我们进行外切酶III顺序缺失提供了理想的起始点(图3)。对pHZ54同时进行Bgl II和Pst I酶切后,将纯化的DNA分成30个等分样

品,以30秒钟为间隔时间对每个样本进行了从30s到15min不等时间的外切酶III处理。因为Pst I酶切产生了不被外切酶III所降解的3'凸端,而Bgl II产生的5'凸端则是外切酶III的合适底物,这种不等时外

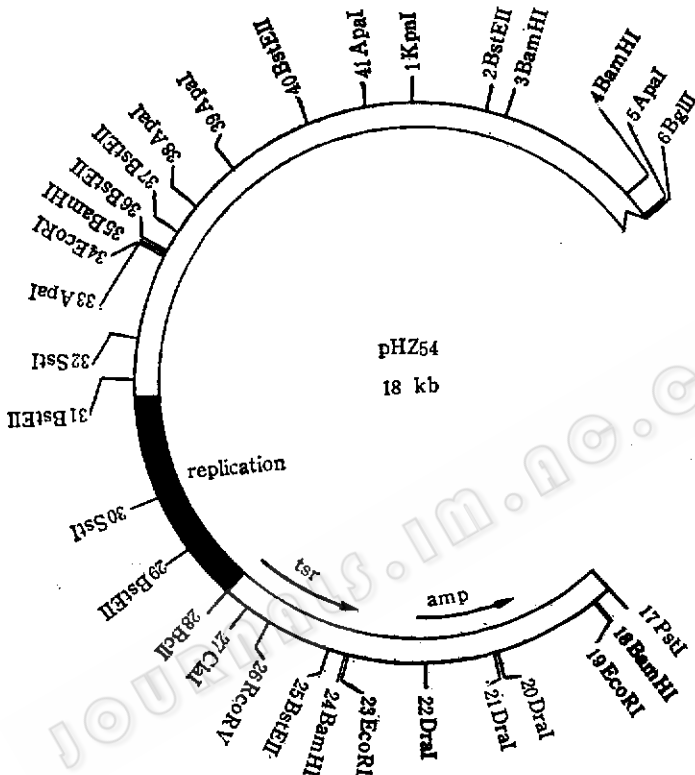


图3 外切酶III顺序缺失法定位基本复制子

Fig.3 Generation of exonuclease III deletions to localize minimal replication region

外切酶作用起始点是Bgl II,作用方向用箭头标出。所定位的基本复制区用粗黑线标出(2kb)

Bgl II site is the start point for exonuclease III deletion. Direction of deletion is indicated by a arrow. Localized 2 kb of the minimal replication region is marked as a black arc

切酶III处理会从Bgl II端依次降解,最终产生大小不同的DNA分子。把这些分子混合后,用对单链DNA有特异性作用的核酸酶S1处理,然后再用大肠杆菌DNA聚合酶的Klenow片段将末端补平,继而在体外用T4连接酶将平末端分子连接起来。用这种连接混合物去转化JT46,筛选硫链丝菌素抗性转化子。从这类转化子中提取微量的质粒DNA,把它们分别转化到大肠杆菌ED8767的感受态细胞中即可很

容易地从大肠杆菌中分离到大量质粒DNA。将用这种方法分离出来的不同分子量的DNA用EcoR I和Cla I酶解后,即可确定依次缺失片段的大小次序,结果发现,可以转化JT46的最小衍生质粒(pHZ91)只剩下2kb来自10-22的DNA,位于pHZ54(图1)上位点28(Bcl I)和位点31(BstE II)之间(图3),而来自于10-22其他部分的DNA全部被外切酶III降解了。因此,这项试验在插入、缺失和重

排分析的基础上,使最小复制区的范围又缩短了0.86kb。

在上述试验中, pHZ54 质粒位点 6 (Bgl II) 至位点 17 (Pst I) 之间既不含有复制功能, 又不含有选择标记, 因而在选择过程中被淘汰。

## 讨 论

对基本复制功能区的初步定位采用了缺失和次级克隆的方法。缺失和次级克隆均在大肠杆菌中进行, 得到衍生质粒后再转化到变铅青链霉菌中以测定其复制功能, 综合分析可以复制和不能复制的质粒中 DNA 的内含使我们能够把基本复制区

定位在 2.86kb 的范围内。

进一步更准确地定位基本复制区采用了外切酶 III 顺序缺失法。这种方法利用外切酶 III 只能从 DNA 上 5' 凸末端进行依次切割而对 3' 凸端显示惰性的特点, 通过控制反应时间的长短来控制依次缺失的程度, 使 DNA 连接后, 形成分子量大小各异的环状 DNA 分子, 然后从能够转化 JT46 的最小分子来定位最小复制区的长度以及它在 pHZ54 上的位置。用这种方法已使基本复制区进一步浓缩到图 3 所示的 2kb 范围内。因此, pHZ54 上来自于 10-22 的基本复制子的大小与许多链霉菌质粒基本复制区的大小差不多<sup>[13-17]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] 华中农学院微生物教研组: 微生物学报, 18(1):23-26, 1978.
- [2] Tsai, J. F. Y. and Chen, C. W.: *M. G. G.*, 208:211-218, 1987.
- [3] Murray, N. E. et al.: *M. G. G.*, 150:53-61, 1977.
- [4] McGraw, B. R. and Marinus, M. G.: *M. G. G.*, 178:309-305, 1980.
- [5] 邓子新等: 生物工程学报, 6(2):157-161, 1990.
- [6] Brosius, J.: *Gene*, 27:151-160, 1984.
- [7] Vieira, J. and Messing, J.: *Gene*, 19:259-268, 1982.
- [8] Hopwood, D. A. et al.: *Genetic Manipulation of Streptomyces-A laboratory Manual*, 1985.
- [9] Kieser, T.: *Plasmid*, 12:19-38, 1984.
- [10] Southern, E. M.: *Ann. Biochem.*, 100:319-323, 1979.
- [11] Kieser, T.: *Nucleic Acids Research*, 12:679-688, 1984.
- [12] Henikoff, S.: *Gene*, 28:315-359, 1984.
- [13] Kieser, T. et al.: *M. G. G.*, 185:223-238, 1982.
- [14] McMeil, T. and Gibbons, P. H.: *Plasmid*, 16:182-194, 1986.
- [15] Nakanishi, N. et al.: *Plasmid*, 15:217-229, 1986.
- [16] Shindoh, Y. et al.: *Plasmid*, 17:149-156, 1987.
- [17] Muth, G. et al.: *M. G. G.*, 211:424-429, 1988.

# MOLECULAR CLONING OF A REPLICATION FUNCTION FROM *STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS* STRAIN 10-22 AND LOCALIZATION OF ITS MINIMAL REPLICON

Deng Zixin Zhou Xiufen

(Laboratory of Agricultural Antibiotics, Huazhong Agricultural University, Wuhan)

13 kb DNA carrying a replication function has been isolated from *Streptomyces hygroscopicus* var. *yingchengensis* strain 10-22 using a pBR322-derived *Streptomyces* replication-probe vector pIJ2703. The restriction endonuclease cleavage map of the hybrid plasmid, pHZ54, has been constructed. Following a series of deletion and subcloning experiments, the minimal replication region was located within a 2.86 kb DNA fragment. Subsequently, this region was further shortened into a 2 kb region by exonuclease III deletion. A few small bifunctional plasmids which were able to replicate in *E. coli* as well as in *Streptomyces*, were obtained during above process. Some plasmids could be used as shuttle vectors.

## Key words

Bifunctional plasmid; exonuclease III deletion; minimal replicon; replication-probe vector; shuttle vector; *Streptomyces hygroscopicus*