

葡萄糖异构酶产生菌——玫瑰红链霉菌336质粒 pSR336 限制酶图谱的建立

还连栋 李彤* 董可宁 庄增辉 薛禹谷

(中国科学院微生物研究所, 北京)

开发新的克隆载体依然是链霉菌基因克隆的一项重要基础工作。我们首次从葡萄糖异构酶产生菌——玫瑰红链霉菌(*Streptomyces roseoruber*)336中分离到质粒pSR336。由于该质粒分子量较小,拷贝数较高,比较稳定,很适于改造成一个新的克隆载体。为了了解该质粒有无可利用的限制酶切点及它们之间的相互位置,为此,本文报道用单酶切、双酶切和部分酶切的方法建立pSR336限制酶图谱。

材料和方法

(一) 菌株和质粒

玫瑰红链霉菌336(pSR336),本实验室保藏。SPP1 DNA/EcoRI酶切样品为分子量标准,由本研究室郑文尧同志赠送。

(二) 培养基

高氏1号培养基按文献[1]方法配制,作斜面或生长孢子用。完全培养基(CM)按文献[2]方法配制,作液体培养菌体抽提质粒用。

(三) 质粒pSR336的提取与纯化

按文献[3]方法。

(四) 限制酶及反应缓冲液

限制酶BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, PvuII, XbaI和XhoI均购自华美生物工程公司。PstI为中科院生物物理所生化试剂厂产品。SacI为Promega公司产品。SalI为BRL公司产品。酶反应条件按厂商提供说明进行。

(五) 限制酶酶切

单酶切、双酶切和部分酶切操作均按文献[4]方法。

结果与讨论

(一) pSR336的单酶切分析

用10种限制酶分别对质粒pSR336进行单酶切分析,琼脂糖凝胶电泳图谱见图版I-A。片段数和分子量列于表1。

(二) pSR336的双酶切分析及作图

为了确定pSR336上各酶切位点的相互位置,我们进一步对该质粒进行双酶切分析(见图版I-B),结果见表1。

根据单酶切和双酶切分析, HindIII, XhoI, SacI, SalI的酶切片段和BamHI完全酶切得到的2.50kb, 1.46kb和0.86kb这3个片段的位置均已确定。由于BamHI的另2个片段(0.86kb和0.62kb)中没有已知的其他限制酶切点,所以虽知相邻,但彼此之间的位置难以断定。

(三) BamHI部分酶切确定小片段的位置

我们用BamHI部分酶切pSR336 DNA的方法来帮助确定0.86kb和0.62kb片段在酶切图谱中确切位置。如果未定位的0.86kb片段紧靠着已经定位的0.86kb片段的话,则BamHI部分酶切电泳图谱中将会出现1.72kb的区带,如果未定位的0.62kb片段紧靠着已经定位的0.86kb片段的话,则部分酶切电泳图谱中将会出现1.48kb的区带。这样未定位的0.86kb片段必定位于0.62kb

本文于1989年10月11日收到。

* 北京大学生物系1985级学生。

本工作曾得到本所王永力同志、刘振英同志和赵小平同志的大力协助,特此感谢。

和2.50kb片段的中间。经BamH I 部分酶切,还会出现新的1.48kb的片段(由未定位的0.86kb和0.62kb两片段形成),加上 BamH I 完全酶切产生的1.46kb 片段,因此,就会在 1.47kb 的位置出现1条很亮的区带。BamH I 部分酶切pSR 336 DNA的电泳图谱(图版 I -C)显示在1.47kb 位置确有1条很亮的区带,而未见1.72kb 的区带。说明未定位的0.86kb 和0.62kb 这2个片段在酶切图上的位置是2.50kb-0.86kb-0.62kb-0.86kb-1.46kb,而不是2.50kb-0.62kb-0.86kb-0.86

kb-1.46kb。根据上述结果,我们可以建立 pSR 336的Hind III、Xho I、Sac I、Sal I 和BamH I 5种限制酶的15个切点相对位置的酶切图谱(见图1)。

pSR336 限制酶图谱的建立为将该质粒改造成一个有用的克隆载体奠定了基础。我们已利用 pSR336的Hind III单切点将 pSR336 与另一链霉菌质粒pIJ486构建成一嵌合质粒 pIR30,用以研究质粒pSR336与葡萄糖异构酶产生的关系。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组编著:链霉菌鉴定手册,科学出版社, p.658, 1975.
- [2] 薛禹谷等:微生物学报, 18(3):195, 1978.
- [3] Kieser, T.; *Plasmid*, 12:19, 1984.
- [4] Maniatis, T. et al.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1982.

Restriction Map of the Plasmid pSR336 from Glucose Isomerase Producing Strain *Streptomyces roseoruber* 336

Huan Liandong Li Tong Dong Kening
Zhuang Zenghui Xue Yugu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A plasmid pSR336 from glucose isomerase producing strain *Streptomyces roseoruber* 336 was isolated. The molecular weight of the plasmid was estimated to be 6.35 kb by gel electrophoresis. It has a single restriction site for Hind III, two for Xho I, three for Sac I, four for Sal I, and five for BamH I and none for Bgl II, EcoR I, Pst I, Pvu II and Xba I. The restriction map of pSR336 was constructed.

Key words

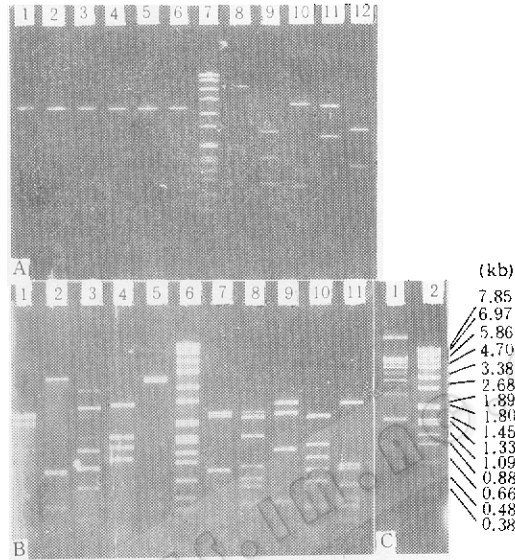
Restriction map; plasmid; *Streptomyces*

还连栋等：葡萄糖异构酶产生菌——玫瑰红链霉菌336质粒pSR336限制酶图谱的建立

图版 I

Huan Liandong et al.: Restriction map of the plasmid pSR336 from glucose isomerase producing strain *Streptomyces roseoruber* 336

Plate I



- A. pSR336 DNA 经单酶切后在 1% 琼脂糖凝胶中的电泳图
 1. pSR336 DNA/Bgl I; 2. pSR336 DNA/EcoR I; 3. pSR336 DNA/Xba I; 4. pSR336 DNA/Pst I; 5. pSR336 DNA/Pvu II; 6. pSR336 DNA; 7. SPP1 DNA/EcoR I; 8. pSR336 DNA/Hind III; 9. pSR336 DNA/BamH I; 10. pSR336 DNA/Sal I; 11. pSR336 DNA/Xho I; 12. pSR336 DNA/Sac I
- B. pSR336 DNA 经双酶切后在 1% 琼脂糖凝胶中的电泳图
 1. pSR336 DNA/Hind III-Xho I; 2. pSR336 DNA/Hind III-Sal I; 3. pSR336 DNA/Hind III-BamH I; 4. pSR336 DNA/Hind III-Sac I; 5. pSR336 DNA; 6. SPP1 DNA/EcoR I; 7. pSR336 DNA/Xho I-Sal I; 8. pSR336 DNA/Xho I-BamH I; 9. pSR336 DNA/Xho I-Sac I; 10. pSR336 DNA/Sal I-Sac I; 11. pSR336 DNA/Sal I-BamH I
- C. pSR336 DNA 经 BamH I 部分酶切后在 1% 琼脂糖凝胶中的电泳图
 1. pSR336 DNA/BamH I partial digestion; 2. SPP1 DNA/EcoR I