

par区域的克隆及其对质粒pUC9稳定性的影响

王 杨² 张志毅¹ 杨胜利² 吴汝平¹

(中国科学院上海药物所, 上海)¹

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海)²

将pSC101上的par区域克隆到载体pUC9上,得重组质粒pEC302。将pUC9和pEC302分别转入*E.coli* HB 101, 在无机培养基M₀中试验两者的稳定性,结果发现*E.coli* HB101(pUC9)传代培养40代后质粒几乎全部丢失,而*E.coli* HB101(pEC302)的质粒全部存在。并且发现质粒的稳定性与宿主菌的recA基因有关。

关键词 par区域; 正筛选; 基因克隆; 质粒稳定性

近年来重组DNA技术正在从实验室研究转向工业生产。在利用工程菌进行大规模发酵生产时,重组质粒在宿主细胞中的稳定性是一个非常重要的问题。质粒不稳定性有两种类型,一种是因质粒在细胞分裂时的分配不均导致整个质粒丢失而引起的,称为“分配的不稳定”;另一种是因重组质粒的缺失、插入或重排引起的,称为“结构的不稳定”。重组质粒的稳定性取决于重组质粒本身的组成,质粒编码基因表达强度,宿主细胞的遗传特性及环境条件等因素。

本文报道pSC101的par区域对质粒分配稳定性的作用及宿主对par稳定作用的影响。

材料与 方法

(一) 细菌与质粒

所用大肠杆菌菌株见表1。

质粒pSC101(Tc^r)常有par区域,pUC9(Ap^r)做为克隆载体。

(二) 培养基

1. LB培养基组成(%): 蛋白胨1,

酵母粉0.5, 氯化钠0.5, 用于培养菌体。

2. M₀无机培养基(g/L): Na₂HPO₄ 6, KH₂PO₄ 3, NaCl 0.5, NH₄Cl 1, 调pH至7.4, 高压灭菌、冷却, 然后加1mol/L MgSO₄·7H₂O 2ml、20%葡萄糖10ml, 1mol/L CaCl₂ 0.1ml, 上述溶液分别高压消毒, pro 20μg/ml、leu 20μg/ml, B₁ 50μg/ml, 这三种溶液应过滤消毒。此培养基用于质粒稳定性实验。

(三) 药品试剂

Ap 50μg/ml, 克隆过程中用的酶均由华美生物工程公司上海分公司提供。

(四) 实验方法

1. 质粒提取、转化、酶切、电泳及体外重组方法: 参照文献[3]。

2. 质粒的稳定性实验: 细菌先在含Ap的LB中37℃培养过夜, 然后在不含Ap的M₀培养基中培养, 每10代转接一次(接种量1/10³, 37℃培养24h为10代)。接着在固体LB上分得单菌落, 最后在Ap固体LB上检测质粒丢失率。

本文于1991年4月19日收到。

表 1 大肠杆菌菌株
Table 1 *E. coli* strain

菌株 Strain	遗传型 Genotype	用途 Function	来源 Source
C 2110	polA, his, rha	Selection for cloning	This institute
HB 101	F ⁻ , hsdS20(rB ⁻ , mB ⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20(Sm ^r), xyl-5, mtl-1, supE44, λ ⁻ , leu	Research for plasmid stability	This institute
C 600	F ⁻ , thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ ⁻	Research for plasmid stability	This institute
JM 107	supE, Δ(lac-proAB), hsdR17, F', traD36, proAB ⁺ , lacI ^g , lacZAM15	Research for plasmid stability	This institute
JM 109	supE, Δ(lac-proAB), hsdR17, F ⁺ , recA1, traD36, proAB ⁺ , lacI ^g , lacZAM15	Research for plasmid stability	This institute

结果与讨论

(一) par区域的克隆

pSC101的par区域有270bp^[1,2],有三种不同的重复顺序a, b, a'。a与a'是直接重复的,两者都可与b形成发夹结构。par区域使质粒稳定性增加的原因是:par⁺质粒能与膜结合,其与膜结合的位置与细胞膜的分裂板有关。在分配过程中par⁺质粒可做为独立的复制子进入子代细胞。pSC101的par区域的作用原理不同于低拷贝质粒R₁、P₁的par基因。pSC101的par区域的功能不需质粒编码的蛋白产物,而R₁、P₁是由par位点和par基因编码的蛋白产物组成并使质粒稳定性提高的。pSC101的par区域的作用原理也不同于高拷贝随机分配的ColE1质粒^[4],pSC101的par区域不能使质粒从多聚体形式向单体形式转化,而ColE1的cer/xer重组稳定系统使质粒从多聚体向单体转化,从而提高质粒随机分配的机率。

如图1所示,用Hind II酶切pSC101,

可得到7个DNA片段,其中2.9kb的DNA片段包含有复制区(rep区)和par区域,用Sma I酶切pUC9,两者经T4 DNA连接酶连接后转入*E. coli* C2110(polA⁻)。因*E. coli* C2110缺少编码DNA聚合酶I的polA基因,而pSC101的复制不需要DNA聚合酶I, pUC9的复制需要DNA聚合酶I,这样就可以在含Ap的固体LB上进行正筛选,得到带重组质粒pEC301的转化子。用BamH I, Sma I双酶切pEC301,得2.8 kb片段,所以所得重组子的基因排列顺序如图1(1)所示。然后用Ava I切除pEC301中的pSC101复制区。因为Ava I识别的碱基顺序是C⁺(C, T)CG(A, G)G,用Ava I酶切pEC301后,得到所需片段的粘性末端为:
TCGGG—C

C—GGGCC,该片段经DNA聚合酶I和4种dNTP补平后得pEC302。

pSC101上的par区域只有270bp,而且没有相应的蛋白质产物,没有检测标记,如直接克隆到pUC9载体上检出带par的重组质粒较困难。本实验巧妙地利用了

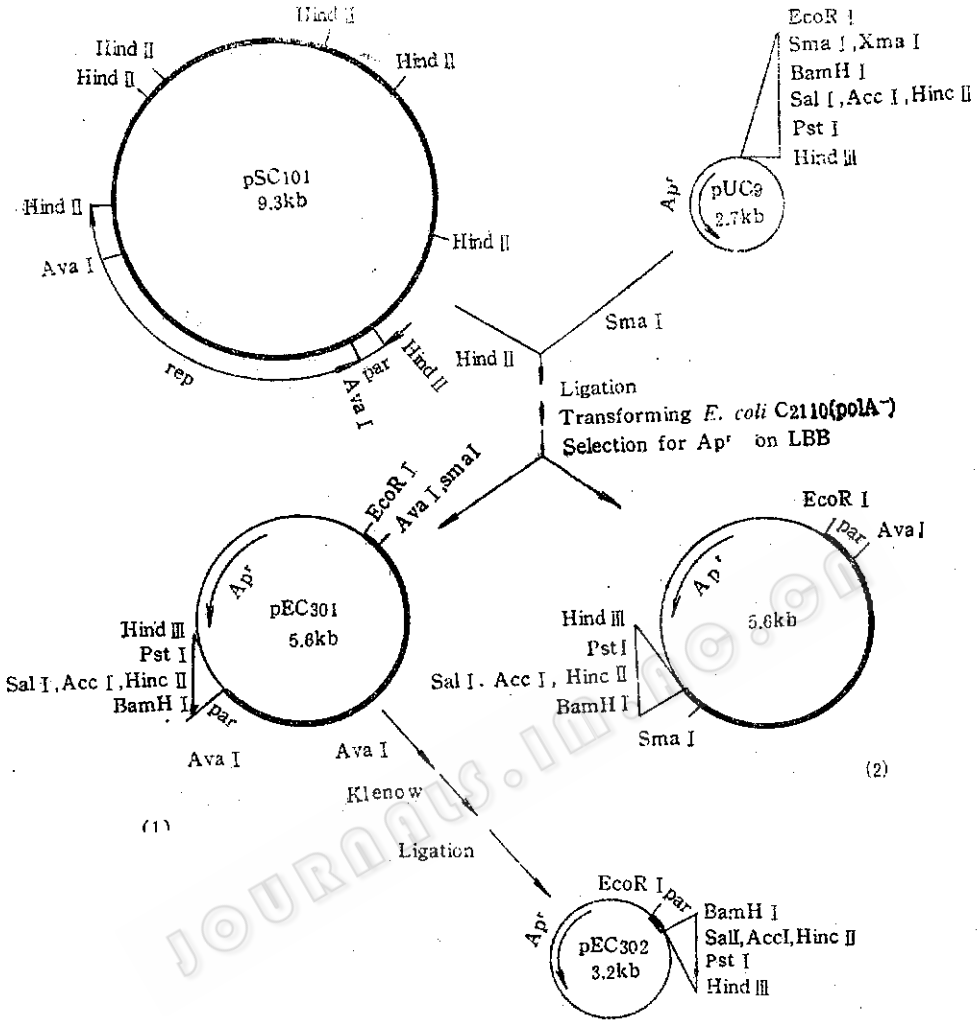


图1 pEC302 克隆路线
Fig.1 The Scheme of Cloning pEC302

pSC 101 和 pUC 9 质粒在复制过程中对 DNA 聚合酶 I 的不同依赖性, 选用缺乏 DNA 聚合酶 I 的 *E. coli* C2110(*polA*⁻) 为宿主菌, 在含 Ap 的 LBB 碟子上直接正筛选得带有 pSC101 的 *rep* 区域和 *par* 区域的 pUC9, 十分简便地得到所需克隆子, 避免了从大量转化子中筛选目的基因的步骤。

(二) *par* 区域对质粒 pUC9 稳定性的影响

将 pUC9 和 pEC302 这对质粒分别转入

E. coli HB101 中, 检测 *par* 区域对 pUC9 稳定性的影响。如图 2 所示, 在 M₀ 无机培养基中培养 40 代后, *E. coli* HB101(pUC9) 中的质粒几乎全部丢失, 而 *E. coli* HB101(pEC302) 中的质粒几乎没有丢失, 由此可见 *par* 区域明显地提高了质粒 pUC9 在 *E. coli* HB101 中的稳定性。

将 pUC9 和 pEC302 从 *E. coli* HB101 中提出后进行电泳分析, 如图 3 所示, 结果表明 *par* 区域对质粒 pUC9 所起的稳定性作用并不是因为使 pUC9 的多聚体变成

为单体所致, 这与 Tucker 等^[2]的报道相符。

我们将pUC9和pEC302这对质粒分别转入实验室常用菌*E. coli* C600中。如图4所示, 在*E. coli* C600中, pEC302的稳定性较pUC9更差。比较*E. coli* C600和*E. coli* HB101的遗传背景, 我们认为recA基因可能是影响par区域起作用的因素。因为*E. coli* C600来源于*E. coli* K-12而*E. coli* HB101是*E. coli* K-12和*E. coli* B杂交的产物, 两者的遗传背景相差甚大, 不能由此实验确认recA基因对par区域的影响。于是我们选用了*E. coli* JM107和*E. coli* JM109这对遗传背景仅差recA的菌株。如图5所示, 在*E. coli* JM109(recA⁻)中, pUC9和pEC302都非常

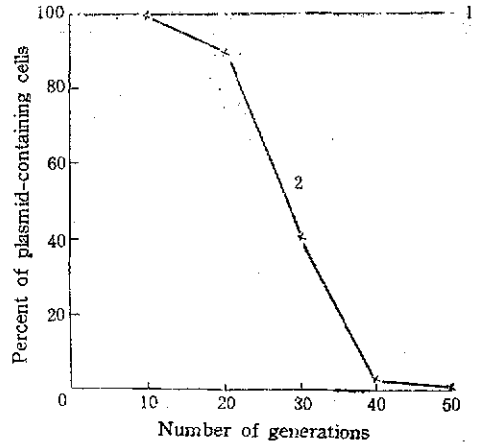


图2 pUC9/*E. coli* HB101和pEC302/*E. coli* HB101的质粒稳定性比较
 Fig.2 Stability of pUC9/*E. coli* HB101 and pEC 302/*E. coli* HB101 (37°C, M9 Medium)
 1. pEC 302/*E. coli* HB101
 2. pUC 9/*E. coli* HB101

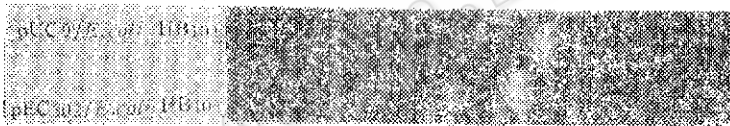


图3 pUC9/*E. coli* HB101和pEC302/*E. coli* HB101的电泳图谱
 Fig.3 Agarose gel electrophoresis of pUC9/*E. coli* HB101 and pEC302/*E. coli* HB101 (1% agarose, 80v, 20mA)

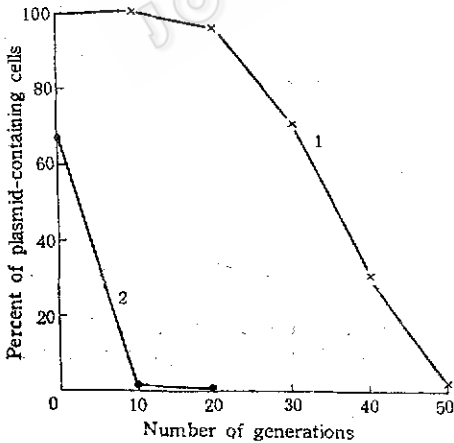


图4 pUC9/*E. coli* C600和pEC302/*E. coli* C600的质粒稳定性比较(37°C, M₉培养基)
 Fig.4 Stability of pUC9/*E. coli* C600 and pEC302/*E. coli* C600 (37°C, M₉ Medium)
 1. pUC9/*E. coli* C600
 2. pEC302/*E. coli* C600

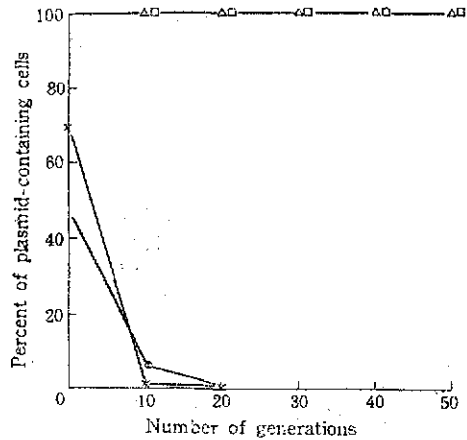


图5 pUC9/*E. coli* JM107和pEC302/*E. coli* JM107 pUC9/*E. coli* JM109和pEC302/*E. coli* JM109的质粒稳定性比较(37°C, M₉培养基)
 Fig.5 Stability of pUC9/*E. coli* JM107, pEC 302/*E. coli* JM107, pUC9/*E. coli* JM109 and pEC302/*E. coli* JM109
 • pUC9/*E. coli* JM107 × pEC302/*E. coli* JM107
 △pUC9/*E. coli* JM109 □ pEC302/*E. coli* JM109

稳定,而在JM107(*recA*⁺)中,pUC9和pEC302都不稳定,并且带*par*区域的pEC302较pUC9更不稳定。由此实验可以肯定细菌染色体上的*recA*基因的存在抑制了*par*区域的稳定性作用,影响了质粒的稳定性。

Cohen^[4,5]等提出pSC101在大肠杆菌中的稳定存在,不仅依赖于自身的*par*区域,还与大肠杆菌染色体上的*recD*和*recA*的基因产物有关。在*recD*⁺菌体中,pSC101能稳定地存在,在*recD*⁻菌体中*recA*的基因产物使pSC101的多聚体形式增多,引起质粒pSC101的不稳定。可是我们的实验结果表明细胞中只要有*recA*存在pSC101的*par*区域的稳定作用即被抑制。Cohen等^[4,5]正在寻找一些影响*par*功能的宿主蛋白,他们认为这些蛋白可能作用于*par*区域。Cohen等^[4]也研究了宿主的*recA*对ColEI系统的影响。他们认为在*cer/xer*系统存在时,*recA*对质粒不起作用,当*cer/xer*系统被破坏后,*recA*的存在即引起质粒多聚体形式增多。我们的实验和Tucker, W.T^[2]的报道均证明*par*对多聚体形成和转换为单体无明显影响,因而*recA*产物对*par*的稳定作用影响的机

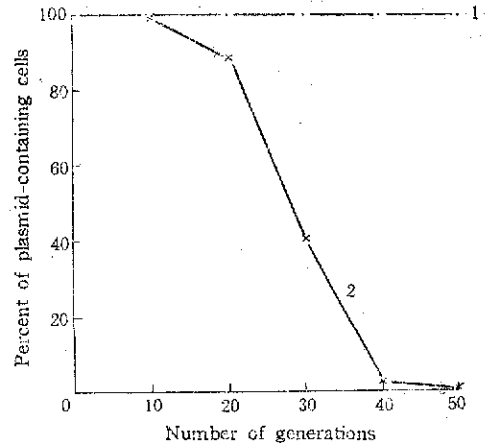


图6 pUC9/*E. coli* JM109和pUC9/*E. coli* HB101的质粒稳定性比较(37℃, M₉培养基)

Fig.6 Stability of pUC9/*E. coli* JM109 and pUC9/*E. coli* HB101(37℃, M₉ Medium)

1. pUC9/*E. coli* JM109,
2. pUC9/*E. coli* HB101

制有待进一步研究。

如图6所示,在研究过程中我们还发现,pUC9在*E. coli* JM109(*recA*⁻)中非常稳定,而在*E. coli* HB101(*recA*⁻)中稳定性较差,这可能是由于*E. coli* JM109带有*lacI*^q基因,该基因产生*lac*操纵子的超阻遏物的结果。

参 考 文 献

- [1] Meacock, P.A. et al.: *Cell*, 20:529, 1980.
- [2] Tucker, W.T. et al.: *Cell*, 38:191, 1984.
- [3] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [4] Cohen, S.N. et al.: *Banbury Report 24: Antibiotic Resistance Genes: Ecology, Transfer and Expression*, ed. Cohen, S.N. et al., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.247, 1982.
- [5] Biek, D.P. et al.: *Journal of Bacteriology*, 167(2):594, 1986.

Cloning par Region and the Effect of par Region on Stability of pUC9

Wang Yang² Zhang Zhiyi¹ Yang Shengli² Wu Ruping¹

(Shanghai Institute of Materia Medica, chinese Academy of Sciences, Shanghai)¹

(Shanghai Center of Biotechnology, chinese Academy of sciences, Shanghai)²

The par region of pSC101 was cloned into pUC9. Then pEC302 was obtained. The stability of pEC302 and pUC9 in *E. coli* HB101 was tested on M₉ medium to determine the effect of par region on the plasmid stability. After forty generations, pUC9 was almost lost, while pEC302 was 100% maintained in host cells.

Key words

par region; positive selection; gene cloning; plasmid stability