

地衣芽孢杆菌的 β -内酰胺酶基因的 克隆与穿梭质粒的建造

陈永南

(北京大学生物系)

John Spizizen

(Department of Microbiology and Immunology, University of Arizona, USA)

本文简要报道了地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 染色体上的 β -内酰胺酶基因的克隆化, 及以此基因为基础建造了一批能在大肠杆菌 (*E. coli*) 和枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中都起作用的穿梭质粒的实验。该 β -内酰胺酶基因在枯草杆菌中产生大量产物并可分泌到细胞外。

关键词 β -内酰胺酶基因, 穿梭质粒

早期制作的大肠杆菌和枯草杆菌之间的穿梭质粒, 大都利用大肠杆菌质粒 pBR322 和枯草杆菌质粒 pC194 结合成新的杂种质粒^[1,2]。这种质粒虽然在大肠杆菌中三个基因标记 T^R 、 A_p^R 和 C_m^R 都能表达, 然而在枯草杆菌中只有一个标记 C_m^R 可表达, 来自 pBR322 的两个标记都不能表达。

我们要建造更强有力的新穿梭质粒, 该质粒应具有下述特点: (1) 它的基因标记在大肠杆菌和枯草杆菌中都能表达; (2) 具有高的拷贝数; (3) 其基因产物能分泌到细胞外。为此目的, 我们选用具有在大肠杆菌中增殖能力的质粒 pMB 9 和能在枯草杆菌中繁殖的质粒 pUB110。工作的重点放在地衣芽孢杆菌染色体的 β -内酰胺酶基因上。该基因近来引起人们很大的注意, 因为它能在大肠杆菌和枯草杆菌中表达, 而且在枯草杆菌中表达时能将其大量的基因产物分泌到细胞外的培养基中。这在微生物发酵工艺上是一个很大的

优点。

本文简要报道利用上述材料建造一批新穿梭质粒的实验过程。

材料和方法

(一) 菌株

本实验所用的 *E. coli* 受体菌株为: C600 (F^- , thr^-1 , leu^-6 , thi^-1 , $supE44$); RRI (F^- , pro^- , leu^- , thi^- , $lacY$, str^R , rk^- , mk^- , $Endo I^-$); Sk1592 (F^- , gal^- , thi^- , ton^R , $hsd R4$, $hsdM^+$, $avxV15$)。枯草杆菌受体菌株 BR151 (trp^- , met^- , lys^- , spo^+)。

地衣芽孢杆菌 749/C 为 β -内酰胺酶高产的菌株。

本文于 1985 年 5 月 10 日收到。

本实验是在美国 John Spizizen 教授实验室中完成的。

(二) 培养基

大肠杆菌培养于Luria (L) 肉汤液体或固体培养基上。转化所用的培养基及转化操作按照Kushner^[3]的方法进行。

枯草杆菌细胞培养于TBAB培养基。原生质球转化基本按Chang和Cohen^[4]方法, 所不同的只是用甘露醇再生培养基取代了DM3再生培养基。甘露醇再生培养基的配方如下: 第一部分包括酪蛋白氨基酸(Casamino acid) 5g, 酵母提出物 5g, 琼脂 8g, 无离子水 350ml。第二部分包括 1.4M pH8.1—8.2甘露醇500ml, 白明胶 15g。上述两部分溶液分别灭菌, 待温度降到55°C时把第一部分倾入第二部分中, 在无菌条件下分别加入: 50%葡萄糖 20ml, 5%K₂HPO₄ 100ml, 1M MgCl₂ 20ml 以及受体细胞所必需的氨基酸 50μg/ml。

EcoRI*酶的作用条件基本上按 Tik-honenko^[6] 等所述。T₄DNA 连接酶的连接在 0°C 下进行, 作用时间约为 15—20h (过夜)。

E. coli 质粒DNA的快速简便提取法参见陈永南的文章^[6]。

实 验 结 果

(一) 地衣芽孢杆菌的β-内酰胺酶基因在*E. coli* 中的克隆化

地衣芽孢杆菌749/C染色体的β-内酰胺酶基因曾被克隆化并进行了DNA序列分析^[7]。如用限制性内切酶EcoR I 酶解地衣芽孢杆菌的染色体DNA, 则该基因位于4.2kb的DNA片段上。据此我们将*B. licheniformis* 749/C的染色体DNA用内切酶EcoR I 充分降解, 将降解物用蔗糖密度梯度离心分离, 收集其4—6kb的部分, 经TE缓冲液(10mM Tris, 1mM

EDTA, pH7.5) 透析后备用。

E. coli 的质粒pMB9带有一个四环素抗性标记T^R, 有单一的EcoR I 切点。该质粒DNA也用EcoR I 充分降解后, 与上述染色体降解物以1:4(重量比)的比例混合, 用T₄DNA 连接酶连接。此连接物用于转化*E. coli* C600 受体细胞。在含有20μg/ml 四环素和氨苄青霉素的培养皿上选择T^R、A^R的转化子。

转化结果与Imanaka^[8]及Gray^[9]等所述类似, 在此不详述。在两个平行的实验中, 60多个转化子的质粒DNA被提取出来并进行了检查。这些质粒中都包含有4.2kb的插入DNA片段。在这些质粒之中选择pCH23-5进行下列研究。此质粒具有T^R与A^R基因标记, 分子量约为6.3×10⁶d。它具有两个EcoR I 和Hind III 切点, Pst I、BamH I 和 Bgl II 各有一个切点。pCH23-5和pMB9一样, 也可以用氯霉素扩增。

虽然地衣芽孢杆菌的β-内酰胺酶基因能在*E. coli* 中表达, 但它所生成的产物只是细胞内的酶, 不能分泌到细胞外面去^[9]。因此, 当用*E. coli* 为宿主细胞时, 这种内酰胺酶基因的无性繁殖系不宜用于发酵生产。

(二) 质粒分子量的削减

为了制作穿梭质粒, 我们计划利用EcoR I 切点把pCH23-5和枯草杆菌质粒pUB110连接起来。但pCH23-5的分子量(6.3×10⁶d)较大, 若直接用它做成穿梭质粒, 则新的杂种质粒的分子量过大, 将来携带外源DNA的数量将很有限。为此必须削减pCH23-5的分子量。此外, pCH23-5有两个EcoR I 切点, 这会影响到下一步制作穿梭质粒的操作, 因此要去掉其中的一个EcoR I 切点。

我们用EcoR I *^[5,10] 重排的方法来削减质粒的体积和抹掉一个EcoR I 切点。

$EcoR\ I^*$ 能识别四核苷酸序列(AATT)。它在pCH23-5上的切点有10个以上。把质粒pCH23-5DNA用 $EcoR\ I^*$ 降解后,用 T_4 DNA连接酶把酶解片段连接起来。这些连接后的DNA样品被用于转化*E. coli* sk1592感受态细胞。在含20 μ g/ml 氨苄青霉素的培养皿上选择转化子,其后再测定这些转化子对四环素的敏感性。在这些选出的 $A_p^R T_c^R$ 转化子中,大约20%为 $A_p^R T_c^R$,其余为 $A_p^R T_c^S$ 。

61个转化子的质粒DNA曾被提取出来,用电泳测定分子量的大小。这些

$EcoR\ I^*$ 重排后的质粒分子量的大小各不相同,其分布范围从最小的 2.5×10^6 d至最大的稍大于pCH23-5的分子量(6.3×10^6 d)。在表型为 $A_p^R T_c^R$ 的转化子中,最小的一个质粒pCHT3,分子量约为 2.5×10^6 d,与pCH23-5不同,它只有一个 $EcoR\ I$ 切点。 $Bgl\ II$ 与 $Pst\ I$ 在pCHT3上也只有单一的切点, $Pvu\ II$ 有两个切点。而 $BamH\ I$ 与 $Hind\ III$ 则没有切点。这意味着pCHT3失去了来自质粒pMB9的四环素抗性基因 T_c^R ,因为 $BamH\ I$ 和 $Hind\ III$ 切点是位于这个 T_c^R 基因上的。见图1。

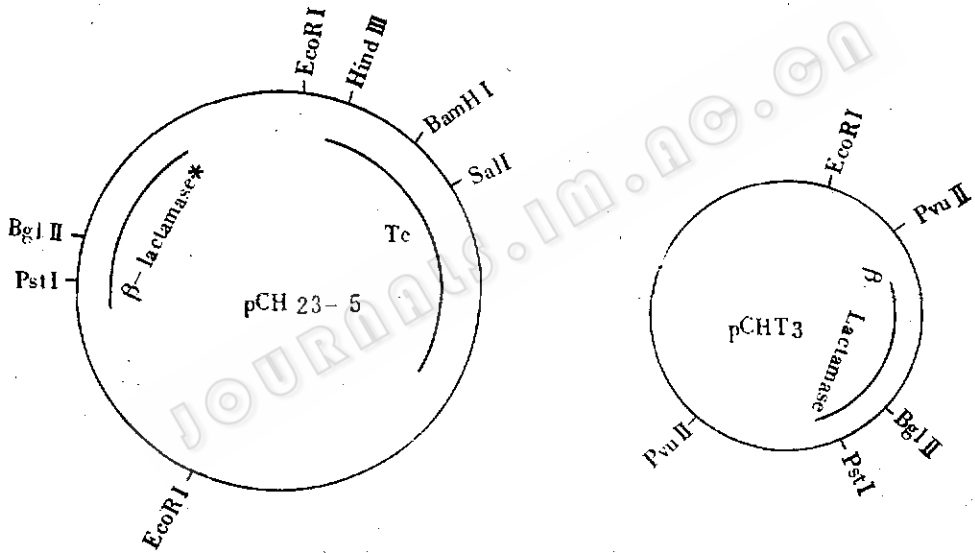


图1 质粒pCH23-5和pCHT3的酶切图谱

Fig. 1 Restriction map of plasmid pCH23-5 and pCHT3
(β -内酰胺酶基因在质粒pCH23-5中的方向有待进一步确定)*

在表型为 $A_p^R T_c^R$ 转化子之中,质粒最小的一个为pCHM9,分子量约为 3.8×10^6 d,也只有一个 $EcoR\ I$ 切点, $Bgl\ II$ 与 $Pst\ I$ 各有一个切点。此外它还保留了 $BamH\ I$ 与 $Hind\ III$ 各一个切点。这说明pCHM9保留了来自pMB9的四环素抗性基因。

与改造pCH23-5的方法相似,我们对枯草杆菌质粒pUB110也进行了 $EcoR\ I^*$

重排,以期削减其分子量。我们看到 $EcoR\ I^*$ 在pUB110上有十几个切点,而 $EcoR\ I$ 却只有一个切点。质粒pUB110DNA经 $EcoR\ I^*$ 降解后,用 T_4 DNA连接酶自行连接起来,用这种连接后的样品去转化枯草杆菌BR151的原生质球。转化子在含新霉素*5 μ g/ml的甘露醇再生培养基

* 在这里卡那霉素抗性基因使宿主细胞对新霉素也具有抗性。

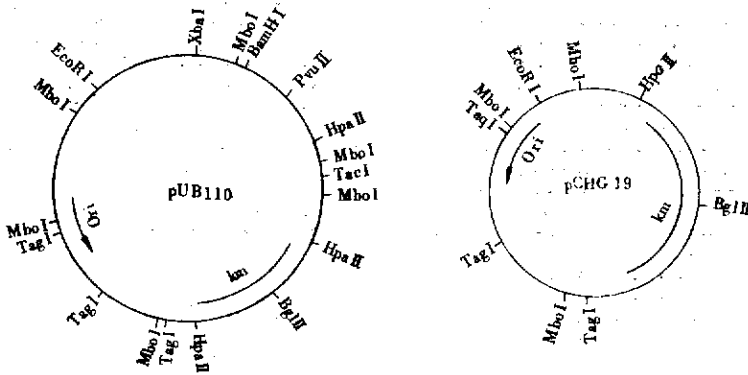


图2 质粒pUB110和pCHG19的酶切图谱
Fig. 2 Restriction map of plasmid pUB110 and pCHG19

上筛选。共得到了99个转化子，其中40个转化子的质粒DNA被提取出来，做电泳检测其分子量。这些质粒的分子量大小不等，其分布范围从 1.8×10^6 d到稍大于pUB110 (3.0×10^6 d)。最小质粒中的一个为pCHG19，分子量约为 1.8×10^6 d，仍有一个EcoR I切点(图2)，而与其分子量差不多的另一质粒pCHG9则失去了EcoR I切点。因此我们选用pCHG19作为进一步建造穿梭质粒的材料。

比较质粒pUB110与pCHG19的酶切图谱，我们可以看到，在pCHG19中保留了pUB110的下半部即包括复制起始点与 km^r 基因的部分，而pUB110的上半部则已丢失掉。在pCHG19中有三个Mbo I切点，而上半部三个Mbo I切点已丢失掉。与此相应的在pCHG19中，原来pUB110的Xba I与BamH I也都丢失了。EcoR I的切点有些特殊，看起来原来pUB110中的EcoR I切点已经丢失了，而EcoR I*的酶解及其后的连接在pCHG19中创造了一个新的EcoR I切点。所有pUB110中的三个Taq I切点仍然保留在pCHG19中，Bgl II也仍然在pCHG19中有一个切点。

(三) 穿梭质粒的建造

质粒 pCHT3、pCHM9、pCHG19 与

pUB110 被用来建造穿梭质粒。这些质粒各有一个EcoR I切点。它们都被EcoR I降解，然后彼此用T₄DNA连接酶连接起来。其组合如下：pCHG19 + pCHT3、pCHG19 + pCHM9、pUB110 + pCHT3、pUB110 + pCHM9。

连接后的样品被用于转化*E. coli* RRI感受态细胞与*B. subtilis* BR151的原生质球。在*E. coli*中，转化子在L-平板+氨苄青霉素20 μ g/ml + 新霉素5 μ g/ml上筛选。

在*E. coli*的大量转化子中，少数转化子的质粒DNA被提取出来，并加以鉴定。其中有些转化子带有一个杂种质粒，另一些转化子同时带有杂种质粒和亲本之一的质粒，即在同一细胞中含有两种质粒。我们对那些仅仅带有杂种质粒的转化子进行了进一步的研究。这些质粒是：pGTE 5 (其含义是来自pCHG19 + pCHT3, *E. coli*为寄主细胞，该转化子为此组合中的第5号转化子)；pGTE8；pGME6 (来自组合pCHG19 + pCHM9, *E. coli*为寄主细胞，该组合的第6号转化子)；pGME7；pGME 8；pPTE 4 (pUB110 + pCHT 3, *E. coli*为寄主，第4号转化子)；pPTE7；pPME5 (pUB110 + pCHM9, *E. coli*为寄主，第5号转化子)；pPME6。这些杂种

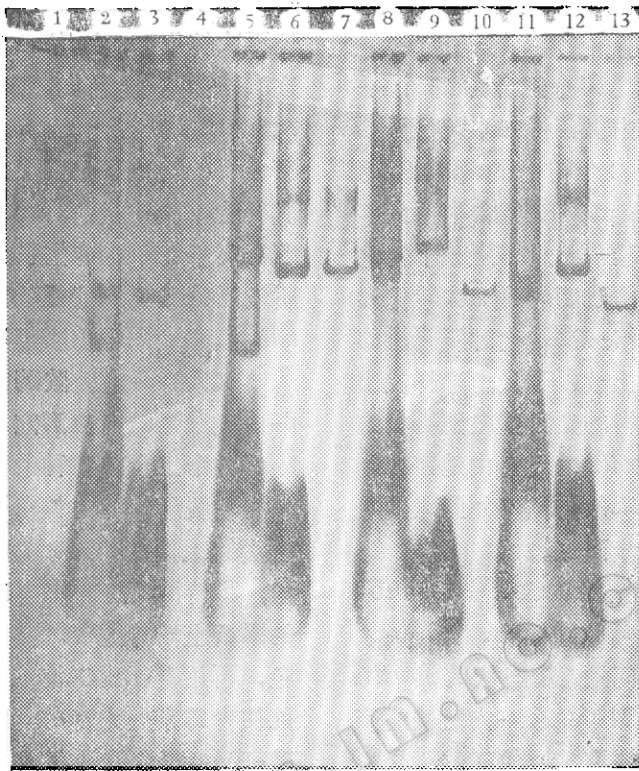


图3 杂种质粒及亲本质粒经EcoR I 降解后的电泳图象

Fig. 3 Electrophoresis of the hybrid plasmids and their parent plasmids digested by EcoR I
 1: pCHT3, EcoR I 降解; 2: pGTE5, EcoR I 降解, 呈现两条线形DNA的带, 3: pGTE5, 有CCC
 与OC带各一条; 4: pCHG19, EcoR I 降解, 泳道2的两条带相当于泳道1和泳道4的两个亲本质粒;
 5: pGME8, EcoR I 降解; 6: pGME8; 7: pCHM9, EcoR I 降解; 8: pPME5, EcoR I 降解;
 9: pPME5; 10: pUB110, EcoR I 降解; 11: pPTE4, EcoR I 降解; 12: pPTE4; 13: pCHT3,
 EcoR I 降解

质粒都被 EcoR I 降解, 可由电泳检测。
 在电泳照片中可以看到每个杂种质粒都被
 EcoR I 切成两个片段, 每个片段相当于
 一个亲本质粒(见图3)。

从图中可见每个杂种质粒都被 EcoRI
 切成两个片段各与线形的亲本质粒的电泳
 带相当。

电泳中出现两个片段和转化子同时具
 有对氨苄青霉素和新霉素抗性的事实是一
 致的, 这说明这些杂种质粒都含有 *E. coli*
 质粒和 *B. subtilis* 质粒两部分。因而这些质
 粒在 *E. coli* 和 *B. subtilis* 中都能复制增殖,
 即成为穿梭质粒。

(四) 穿梭质粒从 *E. coli* 到 *B. sub-*

tilis 的转化

杂种质粒 pGTE5、pGME8、pPTE4 和
 pPME 5 的转化子划线培养后选取单菌落
 进行繁殖, 以保证质粒的纯度与稳定性。从
 这些含杂种质粒的菌株中用快速简便的质
 粒提取法^[6]把质粒 DNA 提取出来, 用蔗
 糖密度梯度离心将其进一步纯化。用这些
 质粒转化 *B. subtilis* 的原生质球。这些转化
 后的原生质球在甘露醇再生培养基 + 新霉
 素 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的平板上培养、选择。这个转化
 实验的结果是很特殊的, 即所获得的转化
 子极少而且生长得很缓慢。有的菌落甚至
 在涂布平板后一周至十天才出现, 然而这
 种转化子仍然具有抗氨苄青霉素与新霉素

的能力。经测定都能产生 β -内酰胺酶。这个实验曾重复过,所得的结果是相似的。从两次转化实验中,每个组合各16个平板,从pGTE5组合中仅获得16个转化子;从pGME8组合获得3个转化子;pPTE4组合获得5个转化子;pPME5组合中得到7个转化子。两次实验一共只得到31个转化子。这与穿梭质粒构建后的第一次转化形成鲜明的对照。在第一次转化时所获得的转化子在每个平板上数以千计。这样就出现了问题,即新获得的杂种质粒能否稳定地在*E.coli*和*B.subtilis*之间自由地穿梭。从*E.coli*到*B.subtilis*的转化率如此之低是什么原因尚待进一步研究。

(五) 杂种质粒在*E.coli*与*B.subtilis*之间的穿梭及其稳定性

为了解决上述问题,我们从*B.subtilis*的少数转化子中选取了几个 β -内酰胺酶产量较高的转化子,提取其质粒DNA,用以转化*E.coli* RRI的感受态细胞和*B.subtilis* BR151的原生质球。这些给体是:pGTE5-B7(其含义为pCHG19+pCHT3组合,*E.coli*中的第5号转化子,又一次转化*B.subtilis*为第7号转化子),pGME8-B5,pPME5-B4。在这两个转化实验中,转化率是正常的,每个组合都获得了几万个转化子。由于这个实验中所用的DNA样品是用快速简便方法提取的,未经密度梯度离心纯化,不测定DNA含量表达其转化率,我们采用受体细胞被转化的频率作为本实验的转化率。在这里每个组合从 5×10^8 个细胞中可获得10000—20000个转化子。在同一实验中用提纯的pCH23-5为对照,从 5×10^8 个细胞中获得160000个转化子。两个结果差异不甚显著。

从第二次转化的*E.coli*中,用快速简便方法提取其质粒DNA,这些质粒是:pGTE5-B7-E2, pGTE5-B7-E4, pGME8

-B5-E2, pPME5-B4-E4。用这些杂种质粒再次转化*B.subtilis* BR151的原生质球。这次转化的结果与第一次从*E.coli*到*B.subtilis*转化的结果截然不同。每个组合所获得的转化子数目都是成千上万。计算其转化率大约是在 3.8×10^8 个原生质球中获得高于20000转化子。至此,这些杂种质粒已被证明为是可以在*E.coli*与*B.subtilis*之间自由而稳定地穿梭的质粒。

(六) β -内酰胺酶基因向细胞外分泌 β -内酰胺酶的初步测定

各个组合的各种杂种质粒产生与分泌 β -内酰胺酶的能力曾在平板上测定过。此方法如D.J.Sherratt和J.F.Collins^[11]所述,将待测菌接种于含PVA(聚乙烯醇)的平板上培养过夜。其后用碘液染成深蓝色,再用青霉素G溶液浸没。 β -内酰胺酶能使青霉素变为青霉胺,后者使深色的碘-PVA复合物褪色。因而在含有 β -内酰胺酶基因的菌落周围出现一个透明的圆形区域。按照此透明区域的大小,可以粗略知道被测菌株 β -内酰胺酶产量的高低(见图4)。

从图4-II中可见,在*B.subtilis*的各个世代都有一个明显的褪色区域,其中区域大者与对照*B.licheniformis* 749/c的区域大小相近。如图中的pGTE5-B7(1号),pGTE5-B7-E4-B5(4号),pGME8-B5(6号),pGME8-B5-E2-B5(8号),pPME5-B4(10号),与pPME5-B4-E4-B3(12号)。而在*E.coli*中的各个世代则没有或只有很小的褪色区域,如pGTE5-B7-E4(3号)与pGME8(5号)等。这与文献中的报道是一致的^[7,9],即*B.licheniformis*的 β -内酰胺酶基因在*E.coli*中虽能合成 β -内酰胺酶,但这是结合在膜上的胞内酶,不能分泌到细胞外。而在*B.subtilis*中有蛋白水解酶进行转译后加工,把这些

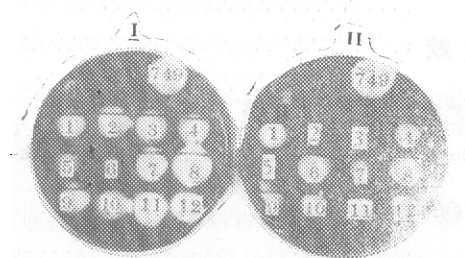


图 4 用 PVA 平板检查 β -内酰胺酶的分泌
Fig. 4 Assay for the secretion of β -lactamase on PVA plates

两个平板右上角为地衣芽孢杆菌对照。左上角为枯草杆菌 BR151 寄主细胞对照。下面 12 个菌落依次为: 第 I 平板: 1. pGTE5-B7 2. pGTE5-B15 3. pGME8-B1 4. pGME8-B5 5. pPME5-B4 6. pPTE4-B7 7. pMM-UBE6-B4 8. pMMCHE6-B18 9. pGTE5-B7-E2-B4 10. pGTE5-B7-E4-B5 11. pGME8-B5-E2-B5 12. pPME5-B4-E4-B3

第 II 平板: 1. pGTE5-B7 2. pGTE5-B7-E2 在染色过程中此菌落破碎, 漂到第 9 号旁边。3. pGTE5-B7-E4 4. pGTE5-B7-E4-B5 5. pGME8 6. pGME8-B5 7. pGME8-B5-E2 8. pGME8-B5-E2-B5 9. pPME5 10. pPME5-B4 11. pPME5-B4-E4 12. pPME5-B4-E4-B3

与膜结合的酶变成可溶性的, 因而能分泌到细胞外。这种可分泌的特性对于穿梭质粒来说是很重要的。因为具备此特性, 将来在此质粒的 β -内酰胺酶基因上克隆外源基因, 此基因产物将可分泌到细胞外, 因而不需破碎细胞即可获得基因产物。

讨 论

(1) EcoR I 配合 EcoR I* 的使用, 是一种非常有效的内切酶。在这个实验工作中, 我们用它克隆化了 β -内酰胺酶基因并用以建造了十分复杂的一系列穿梭质粒。因此这种酶在遗传工程工作中是非常有效的。

(2) T. Imanaka 认为高拷贝数的枯

草杆菌质粒 pUB110 不能用于克隆地衣芽孢杆菌的 β -内酰胺酶基因, 他用另一低拷贝质粒 pTB53 (1—3 拷贝) 克隆此基因获得了成功^[8]。但我们用 pUB110 及其衍生物都成功了。由此可见 Imanaka 的结论根据是不够充分的。至于为什么我们的实验结果与 Imanaka 的不同, 可能是由于克隆基因方法的不同所造成的。然而已知 pUB110 是枯草杆菌中最稳定的质粒之一, 因而用它建造的穿梭质粒将可能是比较稳定的。

(3) 用革蓝氏阳性菌的基因作为标记, 建造穿梭质粒, 较使用革蓝氏阴性菌的基因为有利。因为革蓝氏阳性菌的基因能在阳性菌与阴性菌中表达, 而阴性菌的基因则不易在阳性菌中表达。

(4) 穿梭质粒第一次从 *E. coli* 到枯草杆菌的转化率极低, 用原液涂布的平板上平均每个培养皿上还不到一个转化子。转化率这样低, 因而要精确统计其频率是不可能的, 只能对其进行粗略的估计。在不同的组合中, 转化率为 3—10 个转化子/ 3.8×10^8 原生质球。这个频率与穿梭质粒第二次从 *E. coli* 到枯草杆菌的转化 (> 20000 个转化子/ 3×10^8 原生质球) 形成鲜明的对照。其频率相差几乎达到 10000 倍。对于这种第一次穿梭转化低频率的现象, 前人没有报道过。对这现象我们也还不能提供确切的理论解释。我们估计它可能与枯草杆菌宿主细胞 (*B. subtilis* BR151, 基因型为 R^+ 、 M^+) 的限制-修饰系统的作用及质粒的突变有关。因为第一次从 *E. coli* 到 *B. subtilis* 转化的低频率与基因的突变率相当。然而这仅仅是一种推测, 问题的解决有待于进一步的研究工作。

参 考 文 献

- [1] Kreft, J. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 162:59—67, 1978.
 [2] Rapoport, C. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 176:239—245, 1979.
 [3] Kushner, S. R., "Genetic Engineering", H. W. Boyer and S. Nicosia, eds., Elsevier/North-holland Biomedical press, 1978, pp.17—23.
 [4] Chang, S. and Cohen, S.N., *Mol. Gen. Genet.*, 168:111—115, 1979.
 [5] Tikchonenko, T.I. et al., *Gene*, 4:195—212, 1978.
 [6] 陈永南, 北京大学学报自然科学版, 1983年, 第5期, pp.63—66.
 [7] Neugebauer, K. et al., *Nucleic Acids Res.*, 9 (11):2577—2588, 1981.
 [8] Imanaka, T. et al., *J. Bacteriol.*, 147 (3):776—786, 1981.
 [9] Gray, O. and Chang, S., *J. Bacteriol.*, 145 (1):422—428, 1981.
 [10] Polisky, B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72 (9):3310—3314, 1975.
 [11] Sherratt, D.J. and Collins, J.F., *J. Gen. Microbiol.*, 76:217—230, 1973.

CLONING OF THE β -LACTAMASE GENE OF *BACILLUS LICHENIFORMIS* AND THE CONSTRUCTION OF SHUTTLE PLASMIDS

Chen Yongnan

(Department of Biology, Beijing University)

John Spizizen

(Department of Microbiology and Immunology, University of Arizona USA)

In this paper, we reported the cloning of the β -lactamase gene of *Bacillus licheniformis*. Using this gene we have constructed a series of shuttle plasmids. These plasmids could replicate and express their resistance markers in both *E. coli* and *Bacillus subtilis*. In *Bacillus* this β -lactamase gene was capable of secreting a large amount of protein into the growth medium.

Key words

β -lactamase gene; shuttle plasmids