

简报

启动子探测质粒pSDSI的构建

颜望明

(山东大学微生物研究所, 济南)

关于自养细菌启动基因的研究报道甚少。我们^[1]曾报道了一个专性自养细菌——氧化硫硫杆菌具有启动子活性的染色体DNA片段在大肠杆菌中的克隆和表达。本文报道了用专性自养硫杆菌染色体DNA片段与pBR322通过体外重组构建启动子探测质粒pSDSI的过程, 并通过pSDSI又一次证明了氧化亚铁硫杆菌启动子在大肠杆菌中的表达。

材料和方法

(一) 菌种及菌种培养

氧化硫硫杆菌 Tt-1菌株和氧化亚铁硫杆菌 Tf-52是本所分别从山东太安地区含硫煤矿堆积物和广东云浮酸性矿水中分离得到。

大肠杆菌C600和 HB101(pBR322)均由中国科学院微生物研究所提供。

氧化硫硫杆菌和氧化亚铁硫杆菌分别采用 Starky培养基^[2]和9K培养基^[3]培养。

*E. coli*用 LB培养基, 37℃ 迴旋振荡培养。

(二) 质粒和染色体DNA的分离和纯化

质粒是参照 Maniatis^[4]方法, 用碱法提取, 再经过RNase处理, 超速离心(Hitachi 55P-72离心机, RpS50-2转子, 40000r/min, 20℃ 离心6h)而纯化的。

氧化硫硫杆菌接种于以元素硫为能源的 Starky无机盐培养基中; 氧化亚铁硫杆菌接种于以硫酸亚铁为能源的9k无机盐培养基中, 30℃ 培养6—7天, 离心收集菌体, 去除硫粒和高铁沉淀后按Yates^[5]方法分离染色体DNA。

(三) 酶切、连接、转化、电泳及分子量测定

限制酶和 T4DNA连接酶是由中国医学科学院基础研究所提供; pVU I及RNase为西德 Boehringer Mannheim 产品; 酶反应液及反应条件均参照Maniatis^[4]等方法。

转化按照Cohen^[6]方法。

琼脂糖凝胶电泳采用 Tris-醋酸缓冲液, DNA分子量是根据 Meyers^[7]等方法测定的, 以ADNA Hind III 酶切片段作为标准。

结果和讨论

(一) 启动子探测质粒pSDSI的构建

专性自养细菌——氧化硫硫杆菌的染色体DNA和pBR322分别经 EcoR I -Hind III 酶切后, 连接起来, 转化*E. coli* C600菌株, 先在Ap (50μg/ml)的LB平板选择得到46个对Tc敏感的菌株, 再通过含更低浓度的Tc(6μg/ml)的平板进一步选择获得了两株在6μg/ml Tc平板上不能生长的菌株。提取质粒后用电泳检测, 发现分子量都比pBR322大。酶切分析证明除了原载体外, 都有外源DNA片段插入。经进一步分离纯化后, 质粒分别编号为pSDSI和pSDS I。

(二) pSDS I 质粒电泳分析

为了验证重组质粒, 我们选择了pSDS I进行了酶切电泳分析及分子量的测定, 结果见表1。

表1 pSDS I 重组质粒酶切结果

酶切	片段	分子量(kb)
pSDSI + Hind III	1	5.65
pSDSI + Hind III + EcoR I	2	4.24 1.40
pSDSI + BamH I	1	5.65
pSDSI + Pst I	1	5.65
pSDSI + Sal I	1	5.65
pSDSI + pVU I	2	3.20 2.43
pSDSI + pVU I + EcoR I	3	2.46 2.20 0.98

从表1可以看出 pSDS I 用EcoR I 和 Hind III 双酶切割可产生二个片段, 分子量分别为

本文于1989年4月3日收到。

国家自然科学基金资助项目。

4.24kb和1.4kb,前者为原载体 pBR322,后者为被置换进入的外源DNA片段。用 BamHI、Pst I、Sal I 酶切都只产生分子量为 5.65kb 的一个片段,这些单一酶切位点都是原载体 pBR322上的,说明在插入的外源DNA片段上没有这些酶的切点。但用 pVU I 酶解时出现了二个片段,已知原载体 pBR322 上 pVU I 只有一个切点,另一个切点则位于外源 DNA 片段上。为了进一步了解 pVU I 切点在外源DNA片段上的位置,又用 pVU I 和 EcoR I 进行双酶切,结果出现了三个片段,大小分别为 2.46、2.20 和 0.98kb,后两个片段加起来接近于 3.20kb,由此可以定出 pVU I 在外源片段上的位置。根据上述酶切结果,可以作出 pSDS I 重组质粒的限制酶酶切图谱(图 1)。

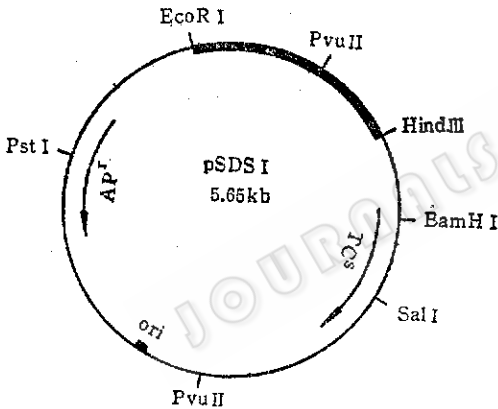


图 1 pSDS I 限制酶酶切图

从图 1 可以看出新构建的质粒带有一个 AP 抗性标记,而 Tc 抗性由于缺乏启动子而不能表达。如在 pSDS I 抗 Tc 结构基因前 HindIII 位点插入含有启动子的外源 DNA 片段,则可使抗 Tc 基因重新得到表达。因此, pSDS I 可作为启动子的探测载体,用于对各种启动子的筛选。

(三) pSDS I 功能的验证

将 pSDS I 质粒和氧化亚铁硫杆菌染色体 DNA 分别用 HindIII 酶切,通过体外重组后,转化 *E. coli* C600 菌株,在含有 Tc(25μg/ml)和 AP(50μg/ml)的 LB 平板上,获得了 32 个转化子,然后再通过较高浓度(100μg/ml)的 Tc 平板上进行筛选,发现有三个转化子可以在含 100μg/ml 的 Tc 平板上生长,其中二个可以在含有 240μg/ml 的 Tc 平板上生长。从抗 Tc 的转化子中,选出 No. 1, No. 4, No. 5 和 No. 12 四株,将质粒提取出来,分别编号为 pSDR-F₁, pSDR-F₄, pSDR-F₅ 和 pSDR-F₁₂,用电泳检查,结果表明这些质粒分子量明显大于原载体 pSDS I (图版 I-1)。进一步选择抗 Tc 能力较高的 pSDR-F₅ 和 pSDR-F₁₂ 质粒,用 HindIII 酶切,结果证明除了有原载体 pSDS I 的共同区带外,均有外源 DNA 片段插入,其分子量分别为 2.25kb 和 1.98kb (图版 I-2)。

以上结果证明了所构建的启动子探测载体 pSDS I 是能够有效地用来探测氧化亚铁硫杆菌染色体中具有启动子功能的 DNA 片段。

参 考 文 献

- [1] 颜望明: 遗传学报, 17(2): 143—147, 1980.
- [2] 金松谟等: 微生物学通报, 15(1): 20—21, 1988.
- [3] Silveiman, M.P. et al.: *J. Bacteriol.*, 77: 642, 1959.
- [4] Maniatis, T. et al.: 分子克隆操作指南, 余茂效译, 科学出版社, 1987.
- [5] Yates, J.R. et al.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, Vol. 16, p. 301, 1986.
- [6] Cohen, S.N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 69: 2110, 1972.
- [7] Meyers, T.A. et al.: *J. Bacteriol.*, 127: 1529, 1976.

CONSTRUCTION OF PROMOTOR-PROBE PLASMID pSDS I

Yan Wangming

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan)

A promotor-probe plasmid pSDS I (Ap^rTc^r) was constructed through deletion of the EcoR I -Hind III fragment containing the promotor region of tetracycline-resistance gene of pBR322, then substitution with a EcoR I -Hind III fragment of chromosomal DNA from *Thiobacillus thiooxidans*.

Fragments of chromosomal DNA of *Thiobacillus ferrooxidans* were inserted into the Hind III site of pSDSI and some recombinants were obtained which showed tetracycline-resistance (25—240 μ g/ml). This result indicates that the fragment carried by those recombinants contains a promotor region which is functional in *Escherichia coli* and that the plasmid can be used as an effective promotor-probe vector.

Key words

Thiobacillus ferrooxidans chromosomal DNA; promotor-probe plasmid; tetracycline resistance

图版说明

1. 重组质粒电泳图

A. pSDS I, B. pSDR-F1, C. pSDR-F5, D. pSDR-F12, E. pSDR-F4

2. 重组质粒用Hind III酶切后电泳图

A. λ DNA + Hind III, B. pSDS I + Hind III, C. pSDR-F5 + Hind III, D. pSDR-F12 + Hind III