

谷氨酸棒杆菌质粒pXZ10145自发缺失突变体的特性 及其重组质粒的构建

那淑敏 沈天翔 贾盘兴 门大鹏 陈琦

(中国科学院微生物研究所,北京)

用谷氨酸棒杆菌质粒 pXZ10145 转化钝齿棒杆菌 T6-13 原生质体,得到自发缺失突变体 pNAT65,该质粒为 2.4kb,仍带有氯霉素抗性,经物理图谱分析表明,质粒 pXZ10145 Sma I 到 Cla I 位点之间的片段已缺失,仍保留 EcoR I、Xba I、Bcl I 三个酶的单切点。质粒 pNAT65 与 pBR322 用 EcoR I 酶切连接得到重组质粒 pNAR67,这一质粒在 *E. coli* 中复制并表现 Ap, Tc 抗性,但氯霉素抗性能力大大降低,只能抗 2 μg/ml。

关键词 钝齿棒杆菌; 谷氨酸棒杆菌; 物理图谱; 重组质粒; 缺失突变体

棒杆菌类广泛应用于氨基酸、核苷酸工业上,并在生物转化、甾体转化、类固醇氧化、碳水化合物降解、抗癌制剂、乳酪、棒杆菌素和乳化剂等生产中起着重要的作用^[1],有很高的经济价值。

非致病的棒杆菌不像大肠杆菌那样带有内毒素、枯草杆菌蛋白酶分泌较多等缺点,生长快、对人畜安全,因此从棒杆菌中分离质粒,组建新的载体及转化受体系统,建立 DNA 重组技术,对有生产价值的工业生产菌的定向育种,具有理论和实际意义。

近 10 年来,国外已构建了在大肠杆菌、芽孢杆菌、棒杆菌和放线菌之间的多种选择标记的穿梭质粒载体,并在棒杆菌中成功地克隆了多种氨基酸生物合成关键酶基因、启动子基因等,有些已应用于生产^[1,2]。

国内这方面的工作刚刚起步,郑兆鑫,余红等^[3,4]已将谷氨酸棒杆菌质粒 pXZ10145 转化到钝齿棒杆菌 B9 中,并测定了它的酶切图谱。为了寻找、扩大更适宜的载体及转化受体系统,我们用 pXZ

10145 转化钝齿棒杆菌 T6-13,得到了缺失约一半片段的 pXZ10145 缺失突变体,该突变体质粒带有氯霉素抗性,测定了它的酶切图谱,与大肠杆菌 pBR322 质粒连接获得嵌合质粒。

材料和方法

(一)菌株和质粒

1. 菌株:钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*) B9, T6-13 均由本组保存,不含质粒,对氯霉素敏感;谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) 1014-6T,该菌株带有氯霉素抗性质粒,由浙江大学生物科学与技术系杜珠还赠;大肠杆菌 HB101 本组保存。

2. 质粒:谷氨酸棒杆菌 1014-6T (pXZ10145)Cm^r; HB101(pBR322)Ap^r, Tc^r。

(二)培养基和溶液

1. 营养培养基(%):葡萄糖 0.05,

本文于 1990 年 9 月 7 日收到。

承本所技术室的协助,特此致谢。

胰胨1, 酵母粉0.5, 牛肉膏0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, pH7.0, 用于固体时加琼脂2%。

2. SB培养基: 2倍浓度的营养培养基与0.5mol/L蔗糖和0.5mol/L丁二酸钠的混合液等体积混合, 每100ml培养基加2ml 1mol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 与1mol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 的混合液, 固体SB培养基加1.5%琼脂。

3. SBC培养基: 含7u/ml氯霉素的SB培养基。

4. SMMC缓冲液: 参照文献〔5〕。

5. DF缓冲液: 参照文献〔6〕。

6. MMYE培养基: 见文献〔7〕。

7. TEN缓冲液: 30mmol/L Tris, 50mmol/L Na_2-EDTA , 50mmol/L NaCl, pH8.0。

8. 裂解缓冲液: 25mmol/L Tris, 10mmol/L Na_2-EDTA , 蔗糖0.3%, pH8.0。

9. Sephacryl S1000树脂: Pharmacia Fine chemicals AB made in Sweden。

10. TE缓冲液: 10mmol/L Tris, 1mmol/L Na_2-EDTA , pH8.0。

(三) 方法

1. 质粒DNA的分离纯化: 参照 Santamaria^{〔8〕}的方法进行。得到的DNA粗制液用以下两种方法进一步纯化: ① Sephacryl S1000凝胶过滤: 参照 G6nez-M6rquez^{〔9〕}的方法。粗DNA液经酚-氯仿萃取, 乙醇沉淀, 溶于0.6ml TE缓冲液中, 上柱进行凝胶过滤提纯。提纯的质粒DNA用于原生质体转化; ②氯化铯密度梯度离心: 参照 Beckman 离心机使用说明书进行。配制成氯化铯密度为1.55的DNA液, 在 Beckman L8-80M离心机垂直转头VTi 65, 65000rpm, 20℃离心

4h, 针刺吸出质粒DNA, 除去EB, 用3倍无离子水稀释, 2倍体积乙醇沉淀, -20℃过夜, 沉淀经离心、洗涤、抽干后, 溶于适量TE缓冲液中。

2. 限制酶酶解: 内切酶均购自Boehringer Mannheim公司, 酶解条件按常规方法。分子量标准SppI DNA/EcoRI由本所郑文尧同志赠送。

3. 质粒大小的测定: 质粒分子的大小用凝胶电泳法测定, 并以SppI DNA经EcoRI酶解后的片段作为标准, 绘图测算。

4. 原生质体的制备及质粒DNA的转化: 参照 Kastumata^{〔7〕} 等方法, 离心收集用0.6u/ml青霉素G钾处理的受体菌, 用SMMC或DF高渗液洗一次, 再重悬于含溶菌酶(5mg/ml)的SMMC或DF高渗液中, 37℃保温6—8h(用DF时保温5—10min), 离心, 用SMMC或DF洗菌体两次, 重悬于0.1ml SMMC或DF液中, 加入10 μ l(约0.3 μ g)pXZ10145DNA, 混合后加1ml用相应高渗液配制的30%分子量6000的聚乙二醇, 37℃水浴保温3min, 加3ml SMMC或DF稀释后, 取0.1或0.2ml涂布SBC平板, 48h后, 挑取单菌落进行质粒检测。

5. 大肠杆菌感受态转化: 参照 Cohen^{〔10〕}的方法。

6. 质粒DNA的电泳检测: 0.7%琼脂糖凝胶, 电泳缓冲液TAE, pH8.3, 电泳电压4V/cm, 电泳时间3—4h。

结 果

(一) 质粒pXZ10145转化钝齿棒杆菌B9和T6-13的比较

B9及T6-13经亚抑制浓度的青霉素G钾致敏处理后, 对溶菌酶敏感, 原生

质体形成率为99.8%左右,转化效率为10³转化子/μg DNA。

质粒pXZ10145转化钝齿棒杆菌B9,得到的转化子(B9-1),其质粒大小及酶切位点与谷氨酸棒杆菌中的pXZ10145相同(图版I-A),但当pXZ10145转入T6-13后,转化子中的质粒有三种情况,其中大多数转化子的质粒约为2.4kb,比pXZ10145减小约一半,我们将这个质粒命名为pNAT65(图版I-A),带pNAT65的转化子仍表现氯霉素抗性(50μg/ml),与pXZ10145抗性水平相同,另外两种转化子中,除pNAT65外,还有另外的质粒,其中一个分子量与pXZ10145相同,另一个比pXZ10145还要大,我们只选择含单

一质粒的转化子 T6-13 (pNAT65) 作进一步研究。

(二)pNAT65的限制酶酶切图谱

用限制酶EcoRI、XbaI、BclI、SalI和PvuII进行酶切,并用BclI + EcoRI、SalI + EcoRI、SalI + XbaI、XbaI + EcoRI、BclI + SalI、BclI + XbaI、BclI + PvuII、PvuII + EcoRI进行双酶切,pNAT65酶切后的片段见表1,电泳结果见图版I-B,根据酶切的结果可以推算出各种限制酶的位点,其酶切图谱见图1。

经pNAT65限制酶切图谱分析,我们发现,这个小质粒是由pXZ10145缺失一段片段后产生的,缺失片段的位置是从

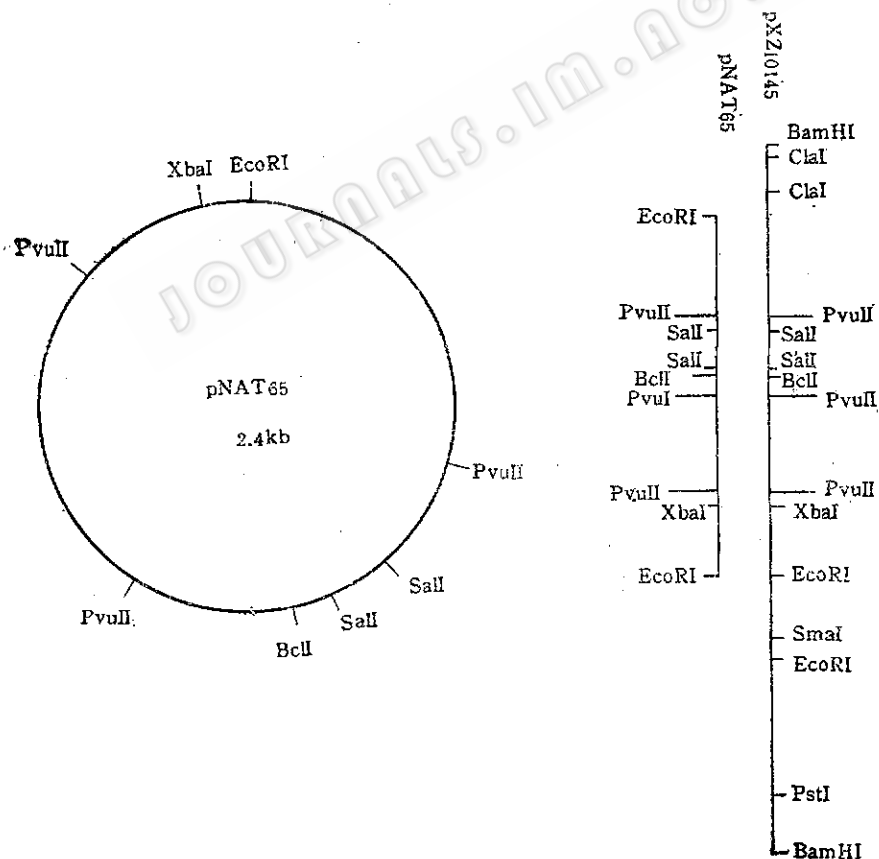


图1 质粒pXZ 10145 及pNAT65的限制酶图谱
Fig.1 Restriction endonuclease map of the plasmid pNAT65 and pXZ10145

Sma I 到 Cla I 切点, 缺失片段的边缘位置尚待序列测定后确定, 由于这个缺失, pNAT65 的单切点酶有 EcoR I、Xba I 和 Bcl I

左右的氯霉素, 在 5 μg/ml 的氯霉素中, 菌体生长仅为 2 μg/ml 时的 1/4。

表 1 质粒 pNAT65 限制酶酶切片段大小

Table 1. Plasmid pNAT65 restriction fragments

限制酶 Restriction endonuclease	切点数 Restriction sites	片段大小 Size of fragment kb
EcoR I	1	2.4
Xba I	1	2.4
Bcl I	1	2.4
Sal I	2	2.2, 0.2
Pvu II	3	1.05, 0.72, 0.63
Bcl I + EcoR I	2	1.3, 1.1
Sal I + EcoR I	3	1.25, 0.95, 0.20
Sal I + Xba I	3	1.2, 0.95, 0.25
Xba I + EcoR I	2	2.0, 2.4
Bcl I + Sal I	3	2.1, 0.25, 0.05
Bcl I + Xba I	2	1.5, 0.9
Bcl I + Pvu II	4	1.05, 0.72, 0.48, 0.15
Pvu II + EcoR I	4	0.72x 2, 0.62, 0.34

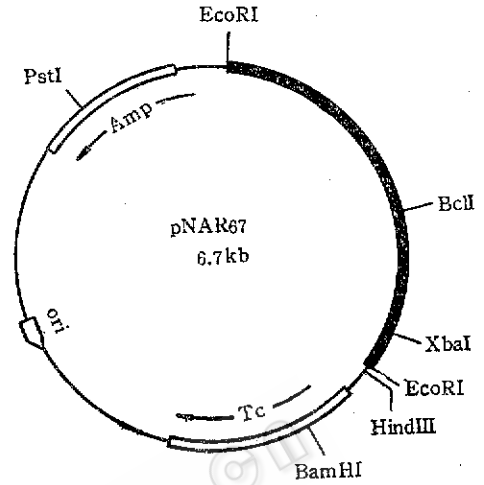


图 2 质粒 pNAR67 的限制酶酶切图谱
Fig.2 Restriction endonuclease map of the plasmid pNAR67

(三) pNAT65 的稳定性

将 T6-13 (pNAT65) 菌株在无选择压力 LB 斜面上, 每天转接一次, 连续转接传代 35 次后, 经提取质粒、电泳检查, 有质粒存在。

(四) 重组质粒 pNAR67 的组建

为了进一步研究质粒 pNAT65 的特性及其作为穿梭质粒的可能性, 我们用 EcoR I 分别酶切 pNAT65 及 pBR322, 然后用连接酶连接, 转化大肠杆菌 HB101, 以琼脂糖凝胶电泳检测转化子的质粒, 分离出来的嵌合质粒大小为 6.75 kb, 称为 pNAR67, 该质粒用 EcoR I 酶切便产生两个片段, 一个是 pNAT65, 另一个为 pBR322 (图版 I -A)。用其它酶酶切, 绘制了嵌合质粒的酶切图 (图版 I -C, 图 2)。这一嵌合质粒能在大肠杆菌中复制, 对氨基青霉素、四环素和氯霉素均有抗性, 但是, 抗氯霉素能力大大降低, 只抗 2 μg/ml

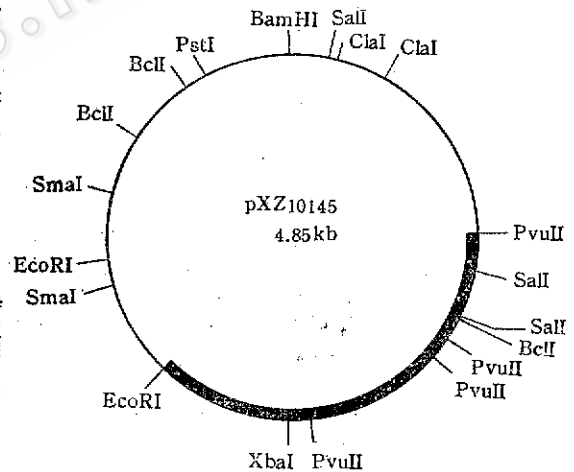


图 3 质粒 pXZ10145 的限制酶酶切图谱
Fig.3 Restriction endonuclease map of the plasmid pXZ10145

讨 论

棒杆菌中存在胞外 DNase 和限制酶, 可以限制外源基因的引入。棒杆菌质粒载体的寄主范围较窄^[1]。

Kastumata^[7]和 Smith^[11]最先报道棒杆菌中有限制修饰系统。1985年 Santamaria^[12]报道了 14.6kb 的穿梭质粒 pUL61(pBL1 + pIJ860) 转化乳糖发酵短杆菌后, 筛选到两个小的自发缺失突变体, 当它们转化受体菌时, 由于丢失一些非必需部分及其 pBR322 有害基因的序列, 质粒表现了结构稳定性, 而且质粒转化效率提高 10 倍。

B9 和 T6-13 虽同属钝齿棒杆菌, 但亲本来源不同, B9 又经变异, T6-13 为野生型菌, 因而可能存在限制修饰系统, 所以当 pXZ10145 转化 T6-13 后, 自发缺失而得到比亲本约小一半的质粒 pNAT65, 缺失部分为 Sma I 到 Cla I 片段(图 3), 其他酶切位点均未变, 说明缺失部分为复制非必需区, 从质粒 pXZ10145 的物理图(图 3)可以看到, 质粒复制的必需

区为 EcoR I 到 Pvu II 片段(图 3 中粗黑线)。

pNAT65 与 pBR322 构建的重组质粒 pNAR67 转化大肠杆菌 HB101, 可以表达 Ap, Tc 抗性, 而氯霉素的抗性大大降低, 只抗 2—5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 比原质粒在棒杆菌中 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的氯霉素抗性降低 10—25 倍。说明大肠杆菌的 RNA 聚合酶可以识别棒杆菌的启动子, 但效率很低。

重组质粒 pNAR67 很难转化棒杆菌, 至今仍未得到满意的结果。作者将 pNAT65 与大肠杆菌质粒 pACYC184 构建的重组质粒可以在大肠杆菌和棒杆菌中穿梭, 而且表达抗性, 说明质粒来源不同 (pBR322 的复制子为 ColE1, pACYC184 的复制子为 p15A), 将影响重组质粒的转化及表达。

参 考 文 献

- [1] Mattin, J. *Microbial Products, New Approaches*, Baumberg, S., Hunter, I. S., Rhodes, P. M., (eds) Cambridge University Press, p.25—29, 1990.
- [2] 余 红等: 生物工程学报, 3(3):161—168, 1987.
- [3] 郑兆鑫等: 生物工程学报, 3(3):183—188, 1987.
- [4] 余 红等: 生物工程学报, 5(1):51—58, 1989.
- [5] Yoshihama, M. et al.: *J. Bacteriol.*, 162:591—597, 1985.
- [6] 洪益国等: 生物工程学报, 4(4):327—330, 1988.
- [7] Kastumata, R. et al.: *J. Bacteriol.*, 159:306—311, 1984.
- [8] Santamaria, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 130:2237—2246, 1984.
- [9] Gonez-Marquez, J. et al.: *Gene*, 54:255—259, 1987.
- [10] Cohen, S. et al.: *Nature*, 265:731—738, 1976.
- [11] Smith, M. D. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 51:634—639, 1986.
- [12] Santamaria, R. I. et al.: *J. Bacteriol.*, 162:463—467, 1985.

Characterization of the Natural Deletion Mutant of Plasmid pXZ10145 in *Corynebacterium glutamicum* and Construction of Its Recombinant Plasmid

Na Shumin Shen Tianxiang Jia Panxing Men Dapeng Chen Qi
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Plasmid pNAT65 carrying the chloramphenicol resistance marker was chosen from a number of natural deletion mutants of pXZ10145 when *Corynebacterium crenatum* T6-13 protoplast was transformed with pXZ10145 DNA from *Corynebacterium glutamicum* 1014-6 T. The size of pNAT65 is 2.4kb determined by electrophoresis on 0.7% agarose gel. The physical map of plasmid pNAT65 was determined with EcoRI, XbaI, BclI and PvuII.

One recombinant plasmid, pNAR67, was constructed from DNA fragments of pNAT65 and pBR322 digested with EcoRI respectively. This plasmid was capable of replication in *E. coli* expressed ampicillin resistance in *E. coli* and lower chloramphenicol resistance about 2 µg/ml.

Key words

C. crenatum; *C. glutamicum*; physical map; recombinant plasmid; deletion mutant

Na Shumin et al., Characterization of the natural deletion mutant of plasmid pXZ10145 in *Corynebacterium glutamicum* and construction of its recombinant plasmid



A. 5种质粒DNA用EcoR I 酶解的琼脂糖凝胶电泳图

Agarose gel electrophoresis of EcoR I —digested plasmid DNA

1. pBR322; 2. pNAT65; 3. pNAR67;
4. SPP I DNA; 5. pXZ10145 6. B9-1

B. 质粒pNAT65的限制酶图

Restriction endonuclease map of the plasmid pNAT65

1. EcoR I ; 2. Sal I ; 3. Pvu II ;
4. SPP I DNA/EcoR I 5. Xba I + EcoR I ; 6. Sal I + Xba I ;
7. Sal I + EcoR I ; 8. Xba I

C. 重组质粒pNAR67的限制酶图

Restriction endonuclease map of the plasmid pNAR67

1. BamH I + EcoR I ; 2. Xba I + EcoR I ; 3. Pvu II + BamH I
4. SPP I DNA/EcoR I ; 5. Pvu II + EcoR I ; 6. Pvu II ;
7. Pvu II + Pst I ; 8. BamH I + Cla I ; 9. Hind III + Cla I ;
10. Sal I