

以 *thyA* 基因为选择压力非抗性质粒载体的构建*

王春风^{1,2} 秦泽荣¹ 孙哲¹ 黄瑜¹ 何召庆¹ 张莉¹ 刘尚高¹

(中国农业大学动物医学院 北京 100094)¹ (吉林农业大学动物科技学院 长春 130118)²

摘要:以干酪乳杆菌 *L. casei* 34103 染色体 DNA 为模板,利用 PCR 技术扩增胸苷酸合成酶(Thymidylate synthase, *thyA*)基因,回收纯化。选择以红霉素抗性为选择压力的可以在大肠杆菌和乳酸菌中穿梭表达的质粒 pW425e 为基本质粒,以 *thyA* 基因取代红霉素基因,获得重组载体并鉴定。此重组载体可以对 *thyA* 基因缺陷的大肠杆菌 *E. coli* X51 和嗜酸乳杆菌 DOMLaS 107 进行功能弥补。进而构建了以 *thyA* 基因为选择压力的非抗生素抗性穿梭表达载体,其大小为 3716bp,并命名为 pW425t。

关键词: *thyA* 基因,选择压力,穿梭载体,构建

中图分类号: S852.65.Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2001)02-0042-05

CONSTRUCTION OF SHUTTLE VECTOR BY USING THYA GENE AS A SELECTIVE PRESSURE

WANG Chun-Feng^{1,2} QIN Ze-Rong¹ SUN Zhe¹ LIU Shang-Gao¹

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094)¹

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)²

Abstract: Using chromosome DNA of *Lactobacillus casei* 34103 as template, *thyA* (Thymidylate synthase) gene was amplified by PCR with pfu DNA polymerase. Choosing pW425e vector, which can express shuttlely between *E. coli* and *Lactobacillus*, containing erythromycin resistance gene, as the basic plasmid. The PCR production of *thyA* gene was used to replace the erythromycin resistance gene of pW425e. The new plasmid vector consists of 3716bp as expected. Which can remedy the *thyA* mutant *E. coli* X51 and *Lactobacillus* DOMLaS107 successfully, and named as pW425t.

Key words: *thyA* gene, Selective pressure, Shuttle vector, Construction

以抗生素抗性为选择压力的质粒载体存在着耐药性基因扩散的问题,因此构建以非抗生素抗性为选择压力的质粒载体系统,显得尤为必要,它是以细菌的管家基因缺陷菌株为受体菌,在质粒上克隆入同源或异源完整的受体菌缺陷基因,作为外源性基因稳定表达的选择压力。目前比较成熟的系统包括:Asd 系统^[1]、*thyA* 系统^[2,3]、Ssb^[4]系统和 β -半乳糖苷酶系统^[5]等。乳酸菌为人和动物消化道正常菌群主要成员之一,选择它作为非抗生素抗性质粒载体的受体菌来构建重组工程乳酸菌,将益生菌生物学功能和外源基因表达产物活性于一体,在研制功能性食品、饲料方面具有极大的潜能。

本研究的目的是将携带红霉素抗性的穿梭表达载体 pW425e,改造为以胸苷酸合成酶(Thymidylate synthase, *thyA*) 基因作选择压力的表达载体,并用它转化胸苷酸合成酶缺陷型

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39980017)

Projection Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39980017)

收稿日期:1999-11-12,修回日期:2000-02-18

大肠杆菌和乳酸菌,探讨以胸苷酸合成酶作选择压力的可行性,为利用此载体表达外源性和内源性的功能基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:质粒载体 pW425e 自己提取鉴定, *E. coli* X51 *thyA* 基因缺陷的大肠杆菌购自中国科学院微生物所, DOMLaS107 *thyA* 基因缺陷的乳酸杆菌由自己筛选鉴定, *L. casei* 34103 干酪乳杆菌购自中国药品生物制品检定所。

1.1.2 培养基:LB 培养基:蛋白胨(Bacto-tryptone)10g, 酵母提取物(Bacto-yeast extract)5g, NaCl 10g, 蒸馏水加至 1000mL, pH7.4, 高压灭菌。

MRS 培养基:蛋白胨 10g, 牛肉膏 10g, 酵母粉 5g, 葡萄糖 20g, 吐温-80 1mL, K_2HPO_4 20g, 醋酸钠 5g, 枸橼酸三氨 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 200mg, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 50mg, 蒸馏水加至 1000mL, pH6.0。

MRSG 培养基:含有 1%~5%甘氨酸的 MRS 培养基。

1.1.3 抗生素:红霉素(Erythromycin), 购自上海生工生物工程公司。

1.1.4 各种工具酶及其它制品:各种限制性内切酶、T4DNA 聚合酶、DNA 聚合酶 I Klenow 大片段、小牛肠碱性磷酸酶(CIAP)、T4 DNA 连接酶、绿豆芽核酸酶、RNA 酶、蛋白酶 K 等均购自 Promega 公司、GIBCO 公司、华美公司。胶回收试剂盒购自上海华舜公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养:大肠杆菌的培养使用常规方法;乳酸杆菌的培养:挑取在 MRS 平板上生长良好的单个菌落,接种于 5mL 新鲜的 MRS(pH6.0)肉汤中,37°C 静止培养过夜,次日按 2% (v/v)接种于 10mL MRSG 肉汤(含 1%~5%的甘氨酸),37°C 静止培养 5~7h 用于质粒和染色体提取。

1.2.2 质粒 DNA 提取方法:大肠杆菌质粒 DNA 的提取:采用碱裂解法,参照文献[6]进行。乳杆菌质粒 DNA 和染色体 DNA 的提取,参照文献[7]进行。

1.2.3 胸苷酸合成酶(Thymidylate synthase, *thyA*)基因的 PCR 扩增:以干酪乳杆菌 *L. casei* 34103 的染色体 DNA 为模板,根据已发表的干酪乳杆菌 *thyA* 基因的序列^[8],设计了一对引物,在引物的 5'端分别加有 *Pst*I 和 *Nsi*I 酶切位点,引物由上海生工生物工程公司合成。用高保真聚合酶 pfu 进行 PCR 扩增 *thyA* 基因,将 *thyA* 基因用限制性内切酶 *Nsi*I 消化处理后,待连接用。

Primer 1: 5'TC CTGCAG CAC AGC TTG ATG CGA TC 3'25bp

Primer 2: 5'TT ATGCAT GTG TCA TTG GTA AAC CTG 3'26bp

PCR 循环条件:94°C 预变性 8min, 94°C 1min, 51°C, 1min, 72°C, 2min, 30 个循环。72°C 延伸 10min。

1.2.4 *thyA* 基因与载体质粒 pW425e 的连接与转化:选择可以在大肠杆菌和乳酸杆菌间穿梭表达的以红霉素为抗性的质粒 pW425e 为基本质粒,将其转化入 *thyA* 缺陷型的 *E. coli* X51 中,并在加有外源性胸腺嘧啶核苷和红霉素的 LB 培养基上培养,扩增质粒 pW425e 用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Nsi*I 将其酶切,去除红霉素基因,回收约为 2.6kb 的大片段,再用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 大片段将 3'端的 *Eco*RI 酶切位点补平。再用 T4 DNA 连接酶将 *thyA*

基因与质粒 pW425e 的大片段进行平端和粘端连接,分别用常规方法和电转化法将其转化于 *thyA* 缺陷的 *E. coli* X51 和乳酸杆菌 DOMLaS107 中,并分别在普通 LB 和 MRS 培养基(未加外源性胸腺嘧啶核苷和红霉素)中培养,挑选阳性克隆提取质粒并鉴定。

2 结果

2.1 胸苷酸合成酶(Thymidylate synthase, *thyA*)基因的 PCR 扩增

以干酪乳杆菌 *L. casei* 34103 染色体 DNA 为模板,用引物 1 和 2 进行 PCR 扩增 *thyA* 基因,经测序^[9] 其分子量为 1132bp,如图 1 所示。

2.2 质粒载体 pW425e 用 *EcoRI* 与 *NsiI* 限制性内切酶酶切

EcoRI/*NsiI* 酶切质粒 pW425e,应得两条片段,大片段为 2584bp 和小片段为 1027bp,酶切结果与预期相符,用胶回收试剂盒将大片段回收纯化,用于下一步连接,见图 2。

2.3 质粒大片段与 *thyA* 基因的连接与转化

thyA 基因缺陷的 *E. coli* X51 和嗜酸乳杆菌 DOMLaS107 在普通的 LB 培养基上不能生长或生长不良,必须在加有外源的胸腺嘧啶核苷(50 μ g/mL)的条件下才能恢复生长,含 *thyA* 基因重组质粒的转入能使 *thyA* 基因缺陷的 *E. coli* X51 和嗜酸乳杆菌 DOMLaS107 在基本培养基上恢复生长,以此为选择压力来筛选阳性克隆。对阳性克隆子提取质粒,并进行鉴定。用 *EcoRI*/*NsiI* 酶切质粒 pW425e,所得大片段为 2584bp 小片段为 1027bp,回收纯化 2584bp 的大片段,并与 1132bp 的 *thyA* 基因相连接,得到 3716bp 的重组载体,命名为 pW425t,结果见图 3。

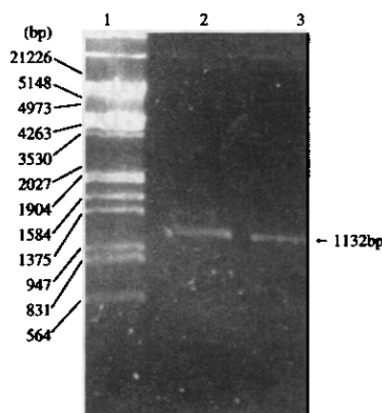


图 1 *thyA* 基因的 PCR 扩增

1 λ DNA/*EcoRI* + *HindIII* as Marker,

2,3 PCR amplified product of *thyA* gene

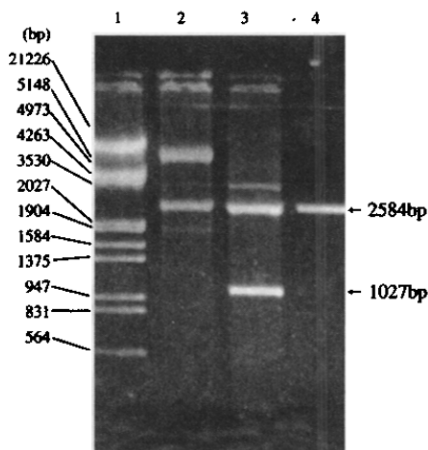


图 2 用 *EcoRI*/*NsiI* 酶切质粒 pW425e 及所得大片段的回收

1 λ DNA/*EcoRI* + *HindIII* as Marker, 2 Plasmid pW425e,

3 plasmid pW425e digested with *EcoRI*/*NsiI*, 4 the larger fragment collected

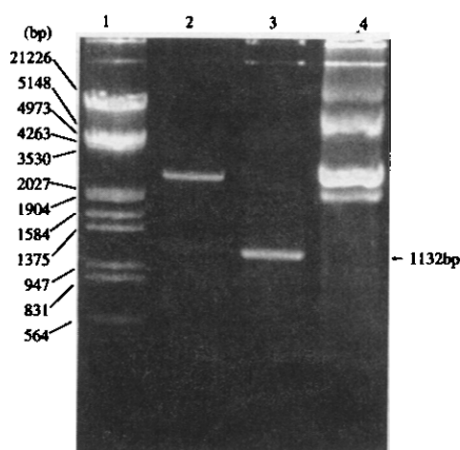


图 3 重组载体的电泳图

1 λ DNA/*EcoRI* + *HindIII* as Marker, 2 2584bps' fragment

of plasmid pW425e, 3 *thyA* gene, 4 Recombinant plasmid pW425t

2.4 重组载体的鉴定

2.4.1 PCR 鉴定:以重组质粒载体 pW425t 为模板,用原来引物 1 和 2 重新 PCR 扩增,反应条件如前扩增 *thyA* 基因,结果见图 4。

2.4.2 重组质粒载体 pW425t 的酶切鉴定:用 *Hinc* I 限制性内切酶对重组质粒载体进行酶切鉴定,所得应为两条片段:大片为 2657bp,小片段为 1059bp。结果与预期的大小相符,说明所得重组质粒载体 pW425t 为预期的产物,结果见图 5。

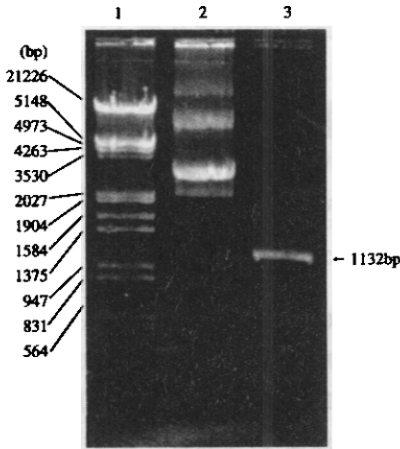


图 4 以重组载体 pW425t 为模板扩增 *thyA* 基因

1 λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III as Marker, 2 Recombinant plasmid pW425t as template, 3 PCR amplified product of *thyA* gene

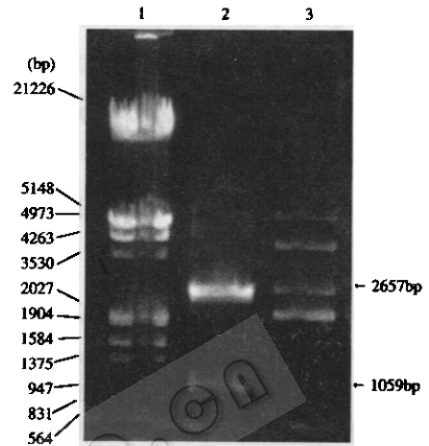


图 5 以限制性内切酶 *Hinc* I 酶切鉴定重组质粒 pW425t

1 λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III as Marker, 2 Recombinant plasmid pW425t digested with *Hinc* I restriction Endonuclease, 3 Recombinant plasmid pW425t

3 讨论

在分子生物学工作中,以抗生素基因作为克隆筛选的标记,虽然可以对克隆子进行正向筛选和保持质粒稳定,但却存在缺点:在饲料和食品工业中应用的菌株,如果含有位于质粒上的耐药性基因,增加了耐药性基因扩散的可能性,而且在缺乏抗生素压力的情况下,质粒很容易丢失。而以 *thyA* 基因为压力的系统即可以克服以上缺点。

胸苷酸合成酶(Thymidylate synthase, *thyA*)在体内 DNA 合成中起关键作用,它催化 dUMP 转变为 dTMP 的甲基化,同时使 5,10-二甲基四氢叶酸转变为 7,8-二甲基二氢叶酸。胸苷酸合成酶缺陷的菌株依赖外源性胸苷酸或胸腺嘧啶核苷进行 DNA 的生物合成,如果缺陷株生存的环境不能提供足够浓度的胸苷酸或胸腺嘧啶核苷,缺陷株就会死亡。如果以此缺陷菌株作为受体菌,导入以 *thyA* 基因为选择压力的载体,就会使此缺陷菌株得到弥补生长。

在本试验中作者成功地构建了以胸苷酸合成酶(Thymidylate synthase, *thyA*)基因为选择压力的穿梭质粒载体,此载体可以对 *thyA* 基因缺陷的大肠杆菌 *E. coli* X51 和乳酸杆菌 DOMLaS107 进行功能弥补,使这两种细菌可以在普通的 LB 和 MRS 培养基(即不含外源性的胸苷酸和红霉素)上生长存活。用此克隆载体,把有益于人和动物的多种外源基因,如某些营养物质、保健和治病的药物基因导入这种菌中,然后制成活菌制剂,需要时口服或饲喂。这就为各种有益于人类或动物的功能基因在肠道共生乳酸菌中表达而更好地发挥其生物学功能开辟了一条崭新的道路。

参 考 文 献

- [2] Morona R, Yeadon J, Considine A, *et al.* Gene, 1991, **107**:139~144.
- [3] 余秀军, 陶世德, 徐建国, 等. 中华流行病学杂志, 1994, **15**(6-A):37~45.
- [4] Porter R D, Stuart B, Sachin P, *et al.* Biotechnology, 1990, **8**:47~51.
- [5] Hashiba H, Takignchi R, Jyoho K, *et al.* Bioscience Biotechnology Biochemistry, 1992, **56**(2):190~194.
- [6] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1993, 19~31.
- [7] Anderson D G, Mckay L. Applied and Environmental Microbiology, 1983, **46**(3):549~552.
- [8] Pinter K, Davisson V J, Santi D V. DNA, 1998, **7**(4):235~241.
- [9] 王春凤, 秦泽荣, 孙 哲, 等. 中国预防兽医学报, 2000, (22):55~58.