

多能硫杆菌基因文库的构建以及 Rubis CO 基因的筛选

刘振盈 颜望明 徐海岩 郑雷

(山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要 以 pUC9 质粒 DNA 作为载体, 用 Pst I 酶切、碱性磷酸酯酶处理后, 与 Pst I 部分酶切的多能硫杆菌染色体 DNA 3-10 kb DNA 片段连接, 转化大肠杆菌 JM83, 在 MacConkey 培养基上筛选重组子, 所得的重组子为 6.5×10^3 , 达到建库要求的理论值。进一步用光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 类型 II 磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因 (*rbcL-rbcS*) 为探针, 从该库中筛选到了含有多能硫杆菌的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (RubisCO) 基因片段的重组子, 从而进一步证明所构建多能硫杆菌基因文库的完整性和可靠性。

关键词 多能硫杆菌, 基因文库, 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因

多能硫杆菌 (*Thiobacillus versutus*) 是革兰氏阴性能自养硫细菌, 能够进行自养、混养、及异养生长^[1]。由于它代谢多样性, 因此成为研究硫杆菌生理、生化、遗传学的理想材料。用基因工程的方法进行这方面的研究才刚刚起步^[2,3], 基因文库的建立必将促进自养细菌遗传学和生理学的研究, 对阐明这类特殊细菌基因结构、基因表达机制和调节方式, 以及自养与异养细菌关系等方面具有重要的理论意义和潜在的实用价值。多能硫杆菌基因文库的构建为我们深入研究自养细菌一些特殊的基因, 如与 CO₂ 固定的有关的基因——1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶基因, 以及与能量代谢有关的基因——硫氧化酶基因等, 奠定了基础。

基因文库的构建在异养细菌、真核生物中已有不少的报道^[4~6], 但是在兼性自养的硫杆菌中尚未见报道。本文以 pUC9 质粒 DNA 为载体, 构建了多能硫杆菌的基因文库, 并用光合细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 类型 II 羧化酶基因 (*rbcL-rbcS*) 为探针, 从文库中筛选到了

多能硫杆菌 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (简称 RubisCO) 基因, 并对该基因进行了分子杂交验证, 完成了多能硫杆菌基因文库的构建工作, 为今后的进一步分析、研究、克隆自养生物的特殊基因等项研究打下了基础。

1 材料和方法

菌株与质粒 (表 1)

1.2 培养基和培养条件

多能硫杆菌异养培养及含有质粒的大肠杆菌采用 LB 培养基^[8], 37 °C 培养; 自养生长时采用无机盐培养基^[7], 30 °C 培养, 根据需要加适量酵母粉。

1.3 主要生化试剂

所用的限制性内切酶、连接酶、尼龙膜均购自 Promega 公司, 分子杂交所用试剂均购自英国的 Amersham 的 ECMTM direct nucleic acid labelling and detection systems。

国家及山东省自然科学基金资助项目

1996-02-08 收稿

表1 细菌菌株及质粒

菌株或质粒	遗传性状或特征	来源或参考文献
pUC 9	Ap ^r	中国科学院微生物所提供
JM 83	recA1supE44endA1hsdR17 gyrA96relA1thi ⁻ △(lac-proAB) F[traD36proAB-lacI ⁿ lacZ ⁺ △M15	中国科学院微生物所提供
pSDLS-10 <i>T. versutus</i>	含有多能硫杆菌 RubisCO 基因片段的 pUC9 的重组质粒 Ap ^r lacZ ⁻ wild type Cm ^r As ^r Hg ^r	本工作 英国 Kelly 实验室提供[1]
pUC18-29N	编码 <i>R. sphaeroides</i> rbcL-rbcS 3.4kb 片段, 克隆在 pUC18 SmaI 位点	美国 F. R. Tabita 提供[7]
pRQ52	编码 <i>R. sphaeroides</i> rpL 基因片段	美国 F. R. Tabita 提供[7]

1.4 多能硫杆菌染色体 DNA 的提取

从多能硫杆菌无机固体斜面取一环菌接种到 10 ml LB 液体培养基, 37 °C 培养过夜, 次日按 1% 转接到 100 ml LB 液中, 继续培养 4 ~ 6 h, 离心收集菌体, 菌体用 50 mmol/L Tris·Cl (pH 8.0)、10 mmol/L EDTA 缓冲液悬浮。加溶菌酶至终浓度为 1 mg/ml, 室温放置 30 min, 再加入 10% SDS 至终浓度 1%, 0 °C, 放置 30 min; 加入等体积的酚/氯仿抽提去蛋白, 10,000 rpm 离心 10 min, 吸取上层水相转移到另一个的离心管, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAC (pH 5.2), 二倍乙醇沉淀, 挑取染色体 DNA, 用适当体积的 TE (10 mmol/L Tris, pH 7.4; 1 mmol/L EDTA) 溶解, 4 °C 保存。

1.5 DNA 操作技术

质粒 DNA 提取、酶切、酶切片段的纯化均参照 T. Maniatis 的方法^[8]。转化受体菌为 JM83, 在含有氨苄青霉素的 MacConkey 培养基上筛选出白色的含有克隆片段的重组子。

1.6 载体 DNA 的酶切和脱磷

pUC9 质粒 DNA 用 PstI 完全酶切, 68 °C, 10 min 终止反应, 加 1 μl (1 u/μl) 牛小肠磷酸酯酶, 37 °C 反应 15 min, 再补加 1 μl CIP, 55 °C 继续作用 45 min, 按文献^[8]将 CIP 失活, 酚、酚:氯仿、氯仿抽提去蛋白, 乙醇沉淀 DNA, 干燥后溶于 TE 缓冲液。

1.7 分子杂交

原位杂交、斑点杂交、Southern 转移、探

针标记以及杂交后探针的检测, 均按 Amersham 产品说明书进行。

2 结果和讨论

2.1 染色体 DNA 的制备

构建基因组文库中重要的一步就是获得高分子量的外源 DNA, 通过部分降解产生所需要长度的 DNA 片段, 便于与载体相连。在提取 DNA 时必须注意尽可能得到高分子量的染色体 DNA, 所提取的基因组 DNA 的大小至少是克隆片段大小的 4 倍, 部分酶切获得的片段有 80% 才能够被克隆。否则当用限制性内切酶进行部分酶切时, 产生的合适的大小片段中会有相当一部分片段的一端不具有相应的粘性末端, 这样的片段只能与处理过的载体一端连接, 形成的重组子不能有效地被包装或转化, 因此这样的文库是不完整的文库。所以获得高分子量的染色体 DNA 是构建完整的 DNA 文库的基础。

我们所构建的基因文库是以 pUC9 为载体, 它所克隆的最大片段一般为 10 ~ 15 kb, 因此它所要求的染色体 DNA 的长度应大于 50 kb, 从纯化的多能硫杆菌染色体 DNA 的紫外吸收曲线可见(图 1), A₂₆₀/A₂₈₀=1.85; A₂₆₀/A₂₃₀=2.1, 呈典型的核酸吸收特征, 说明染色体 DNA 的纯度满足了构建基因文库的需要。此外, 从琼脂糖凝胶电泳上也可以看到, 多能硫杆菌染色体 DNA 的分子量大于 50 kb(图 2), 符合建库要求。

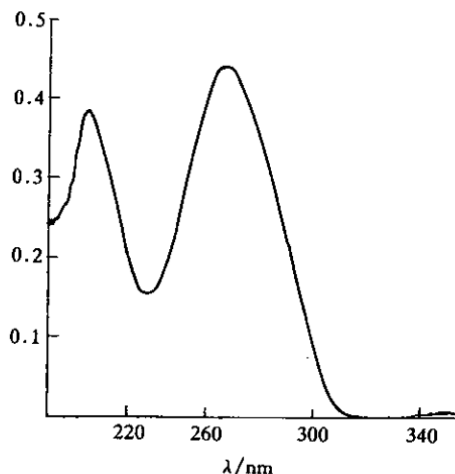


图1 多能硫杆菌染色体 DNA 的紫外吸收曲线

$$\frac{A_{260}}{A_{230}} = 2.1 \quad \frac{A_{260}}{A_{280}} = 1.85$$

2.2 目的 DNA 片段的制备

多能硫杆菌染色体 DNA 适当稀释后, 将 PstI 酶系列稀释, 找出了最适的酶切条件, 使染色体 DNA 处于部分酶解状态, 然后再大量酶切, 酶切完毕, 与 λ /Hind III 一起进行制备电泳, 切下 3 ~ 10 kb 的琼脂糖凝胶进行电泳透析, 纯化后用适量的 TE 溶解(使终浓度为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA)。

由于用琼脂糖凝胶电泳回收 DNA 片段, 得率较低, 随着 DNA 分子量的增加, 回收率减少, 为了增加回收率, 我们将琼脂糖凝胶反向放置, 使大分子量 DNA 片段朝向阳极, 小分子量 DNA 片段朝向阴极, 这样大分子 DNA 损失大为减少, 有效地提高了回收率。

2.3 载体 DNA 的制备

选择 pUC 系列作为载体, 因其易于选择重组子。但是载体 pUC9 用 PstI 酶切后与染色体 DNA 片段直接连接, 重组效率低, 重组子数量最高约为 10% 左右, 很难达到建库所需的重组子数目, 所以我们对载体用碱性磷酸酯酶处理, 经碱性磷酸酯酶处理后的 pUC9 与外源片段连接后, 转化 JM83 受体细胞, 重组效率达 60 ~ 80%, 这样所构建的文库, 不仅在数量上可以满足建库要求, 而且一次成库, 所包容片段完全, 否则分批克隆, 易造成克隆片段的局限性及偏向性。

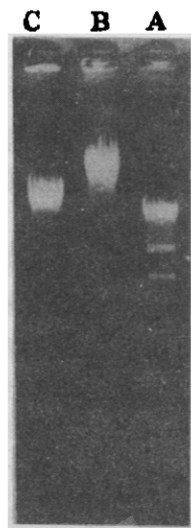


图2 多能硫杆菌染色体 DNA 的琼脂糖凝胶电泳
A. λ DNA, B. 多能硫杆菌染色体 DNA, C. λ DNA/Hind III

2.4 连接、转化及重组子的筛选

载体用碱性磷酸酯酶处理是提高重组效率的关键一步, 但是连接反应条件、底物浓度、载体与供体的比例也影响连接效率, 为了作好连接反应, 在连接前将 pUC9 载体与多能硫杆菌染色体 DNA 片段, 用琼脂糖凝胶电泳的方法估计浓度, 确保染色体 DNA 的浓度大于 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 过低的底物浓度易形成自我环化; 另外在连接反应时染色体 DNA 片段摩尔浓度应比载体高四倍以上。多能硫杆菌染色体 DNA 片段与碱性磷酸酯酶处理过的 pUC9 连接好后, 转化大肠杆菌 JM83 受体细胞, 将转化的受体细胞涂布在前一天准备好的含 A_p 的麦康凯培养基上。含有重组质粒的菌株丧失乳糖发酵的能力, 而在麦康凯培养基上呈白色, 我们一共选出 6.5×10^3 个重组子, 根据公式:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-F)}$$

可计算出任意 DNA 顺序在文库中出现的机率。其中 P 为任意一段 DNA 顺序在文库中出现的机率, F 为插入片段的长度与全体基因组总长度的比值, N 为重组克隆总数。外源片段按平均 6.5 kb 计算, 基因组大小按 3×10^6 bp 计算, 当 $N=6500$ 时, 代入上述公式, 计算出 $P=99.9\%$ 。

也就是任意片段存在的可能性达到99.9%，由上可知，构建重组子数已达到建库要求。

2.5 重组质粒的保存

由于在LB平板上保存重组质粒，极易造成重组子的污染，而且不能长期保存，为此我们提取质粒进行长期保存，以10个重组子为一组进行混合提取质粒，图3为提取重组质粒的照片，它们是从转化的重组子中随机挑出的9个转化子，进行质粒快速提取，其分子量均大于pUC9，说明转化子中均含有重组质粒的存在，进一步证明该基因文库的可靠性。

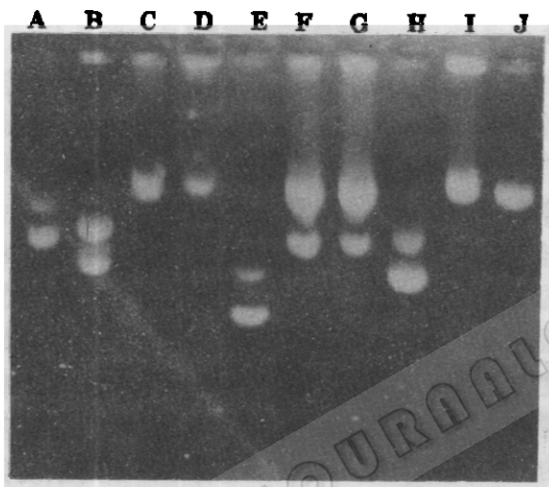


图3 基因文库的重组质粒电泳图

A~D、F~J: 为随机挑选的重组质粒 E: pUC9质粒

2.6 从基因文库中筛选含有 RubisCO 基因片段的重组子

将重组质粒点在硝酸纤维素滤膜上，经变性、中和并固定在滤膜上，以光合细菌 *R. sphaeroides* *rbcL-rbcS* 基因片段作为探针，HRP 标记后，与含有重组质粒的硝酸纤维素滤膜进行斑点杂交，杂交后的洗膜采用严谨条件洗膜，经光自显影显示出杂交斑点。由于一个阳性斑点，为多个质粒的混合，因此必须将混合质粒重新转化大肠杆菌 JM83，形成单个重组子，再进一步进行原位杂交，杂交结果如图4，经过反复多次的杂交，筛选出一个阳性重组质粒，将此重组质粒命名为 pSDLS-10。

为了进一步验证 pSDLS-10 外源插入片

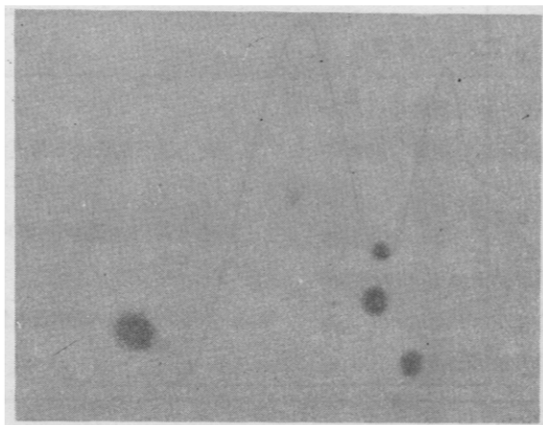
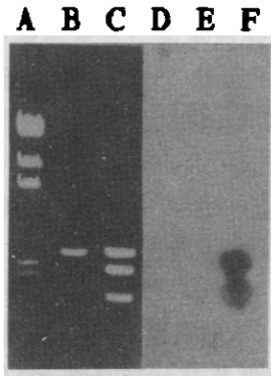


图4 *R. sphaeroides* *rbcL-rbcS* 基因探针与 *T. versutus* 染色体基因文库杂交

段确实与 *R. sphaeroides* *rbcL-rbcS* 基因同源，我们将 pSDLS-10 质粒 DNA 用 PstI 酶切，Southern 转移到尼龙膜上，与 HRP 标记的 *R. sphaeroides* *rbcL-rbcS* 探针杂交，经洗膜、发光自显影后，显示出杂交带型，参见图5。从图中可以看到 pSDLS-10 经 PstI 酶切后，有三条带 (laneC)，其中一条与载体 pUC9 pstI (laneB) 在同一位置，说明该片段为 pUC9，另外两条带为外源插入片段，分子量之和为 3.5kb，这两条带均能够与探针杂交 (laneF)，而相应的 pUC9 载体 (laneE) 没有杂交带，通过 PstI 酶切以及 Southern 杂交进一步证明了所克隆的多能硫杆菌片段与 *R. sphaeroides* *rbcL-rbcS* 基因具有同源性。

pSDLS-10 成功克隆不仅表明多能硫杆菌在 Rubis CO 基因序列上与 *R. sphaeroides* 序列同源，而且证明了我们所构建的基因文库的可靠性，为进一步对 pSDLS-10 进行酶切分析和基因表达的研究奠定了基础。

由于自养硫细菌的基因组比真核生物小的多 (小 10^3)，且序列简单，无插入序列，因此用质粒载体构建基因文库基本上能够满足克隆基因的需要。由于 pUC9 分子量较小，可以克隆较大的外源片段，而且在平板上可以直接区别转化子是否带有外源插入片段，



程中, 所得到的重组子效率非常的高, 可达到 80%, 而通常最高不过 50%, 我们得到高的克隆效率, 除了与 DNA 的纯度、连接酶、受体细胞的状态等因素有关以外, 还与碱性磷酸脂酶处理载体的好坏有极大的关系。我们在构建基因文库的工作中, 由于注意以上问题, 使我们得到了较为完整的基因文库, 并从该库中筛选出了 RUBisCO 基因, 从侧面说明了该基因文库的完整性及可靠性。

参 考 文 献

- [1] Smith A. L., D. P. Kelly & A. P. Wood. J. Gen. Microbiol. 1980, 121: 127 ~ 138.
- [2] 颜望明. 微生物学通报, 1989, 16(3): 173 ~ 175.
- [3] 刘振盈, 颜望明. 山东大学学报(自然科学版), 1990, 25(3): 389 ~ 393.
- [4] 崔玉海, 秦敏, 王焰玲等. 遗传学报, 1990, 17(5): 405 ~ 410.
- [5] 程玉忠, 米景九. 遗传学报, 1990, 17(6): 455 ~ 460.
- [6] 陶金洲, 翁坚, 周光宇. 生物工程学报, 1986, 2(3): 32 ~ 38.
- [7] Robert G. Quivey Jr. and F. Robert Tabita. Gene, 1984, 31: 91 ~ 101.
- [8] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [9] 刘振盈, 颜望明. 山东大学学报(自然科学版), 1993, 28(3): 358 ~ 364.

图 5 pSDLS-10 PstI 酶切以及与 *R. sphaeroides* rbcL-rbcS 探针杂交结果
A: λ DNA/Hind III; B: pUC9/PstI; C: pSDLS-10/PstI;
D: λ DNA/Hind III 与探针杂交; E: pUC9/PstI 与探针杂交; F: pSDLS/PstI 与探针杂交

较噬菌体建库简单, 快速^[9]。

基因工程迅速发展, 使人们对生物体的基因结构, 功能, 表达及基因调控的研究深入到分子水平, 而对特定基因的分离和获得是上述研究的基础, 完整的基因组文库的构建使任何 DNA 片段的筛选和获得成为可能, 高的重组效率及多的重组子数目, 才能保证基因组文库的完整性及代表性。我们在基因文库的构建过

CONSTRUCTION OF *THIOBACILLUS VERSUTUS* GENE LIBRARY AND ISOLATION OF RECOMBINANT CONTAINING RIBULOSE 1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE

Liu Zhenying Yan Wangming Xu Haiyan Zheng Lei

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract The genomic library of *Thiobacillus versutus* was constructed by using pUC9 plasmid as vector. pUC9 was digested by PstI enzyme, treated with phosphatase, then ligated with 3~10kb fragments of *T. versutus* partially digested by PstI and transformed to *Escherichia coli* JM83. The recombinant were screened on MacConkey medium and 6.5×10^3 recombinants were obtained. It has exceeded the necessary number of recombinants that represented an entire genome of *T. versutus*. Furthermore the recombinant containing the gene fragment of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase was isolated from the library.

Key words *T. versutus*, gene library, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase