

两种被修饰鱼腥藻和大肠杆菌 穿梭载体的分析

徐 平* 曾昭琪

(南京大学生物系, 南京 210008)

Machray, G. C.

(英国丹迪大学生物科学系, Dundee, U. K.)

将穿梭载体 pRL1 和 pRL10 经双亲接合从大肠杆菌转入鱼腥藻中后, 发现两种被修饰的穿梭载体 pRL1M 和 pRL10M。经限制酶图谱和 DNA 序列分析表明, pRL1M 和 pRL10M 中分别含有插入序列因子 IS2 和 IS10。DNA 序列分析表明 IS10 为 IS10-R 和 IS10-L 的杂交体。由于插入序列因子, 使宿主对氯霉素的抗性增加。Southern 杂交表明在鱼腥藻的基因组 DNA 中不含 IS10。

关键词 穿梭载体; 鱼腥藻

蓝藻 (Blue-green algae) 又称蓝细菌 (*Cyanobacterium*) 是一种光能自养的原核生物。自 1970 年 Shestakov 等^[1]将外源 DNA 通过转化进入蓝藻后, 蓝藻分子遗传学的研究迅速发展。1981 年 Kuhlemeier 等^[2]构成大肠杆菌和单细胞蓝藻 *Anacystis nidulans* 的穿梭载体, 通过转化进入蓝藻。1984 年 Wolk 等^[3]又构成大肠杆菌与丝状固氮蓝藻鱼腥藻的穿梭载体, 通过接合 (conjugation) 进入蓝藻。由于这一系列穿梭载体的构建, 极大地推动了蓝藻分子遗传学, 对光合作用及固氮机制的研究具有重要意义。

我们在通过改良的方法^[4]将穿梭载体 pRL1 和 pRL10^[3]引入鱼腥藻的过程中, 发现大部分穿梭载体经接合进入蓝藻后, 仍保持原样, 但有一些穿梭载体发生了变化。本文就这些发生变化的穿梭载体进行了分析。

材 料 和 方 法

(一) 菌、藻株和质粒

鱼腥藻 (*Anabaena* sp. strain ATCC27893) 培养于 BG110^[6]中, 大肠杆菌 S17-1 培养于 LB 中, S17-1 基因组中整合有 RP4 衍生物^[6], 该菌对 Km 敏感而且没有限制性系统, 故能有效地吸收外源 DNA。将辅助质粒 pDS4101 (Ap^r) 和穿梭载体 pRL1 和 pRL10 (Cm^r) 转化到 S17-1 中, 筛选出同时抗氨苄青霉素和氯霉素的菌落为供体, 用抗卡那霉素的 *Anabaena* sp. ATCC 27893 为受体, 进行双亲接合^[4]。质粒 pTZ18R (Ap^r) 来自

本文于 1991 年 7 月 17 日收到。

* 现在工作单位: 浙江农业大学生物技术所, 杭州 310029。

Pharmacia 公司。

(二) 质粒的分离及纯化

鱼腥藻质粒的分离按文献 [7] 所述, 但分离后质粒不经 CsCl 超离心纯化, 而用酚溶液和氯仿/异戊醇 (24/1) 溶液各抽提三次, 用乙醇沉淀。

大肠杆菌质粒的大量分离、CsCl 超离心纯化和少量质粒的分离参照文献 [8]。

(三) 限制酶切割 DNA、电泳和片段的回收

少量 DNA 的酶切反应通常 2 小时即可, 大量 DNA 的酶切反应在水浴中保温过夜。

电泳通常在 0.7% 琼脂糖、0.5 倍 TBE 中进行。如果从凝胶中回收小片段 DNA 则在 1.4% 琼脂糖上电泳过夜, 参照文献 [8] 回收 DNA。

(四) 重组 DNA、转化和 DNA 序列分析

DNA 重组参照文献 [8]、重组 DNA 转化大肠杆菌用 CaCl_2 法^[8], 在 Ap、X-gal 和 IPTG 上筛选重组菌落。DNA 序列分析用 Maxam-Gilbert 的化学分析法^[9]。

(五) 大肠杆菌对氯霉素的抗性测定

从鱼腥藻中提取出 pRL1、pRL10、pRL1M 和 pRL10M 四种质粒, 同时转化入 HB101, 于氯霉素平板上挑取单个菌落, 经质粒分析证明为所需质粒后, 将菌落培养于 10ml 含 50 μg 氯霉素/ml 的 LB 中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养过夜, 用新鲜 LB 调节菌液浓度使各培养物的 OD_{600} 相同, 各取 20 μl 菌液接种于 10ml 含不同浓度氯霉素的 LB 中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养, 定时取 0.8ml 菌液测 OD_{600} 。

(六) 蓝藻基因组 DNA 的提取和 Southern 杂交

取对数生长期的蓝藻培养液 (培养的蓝藻经 NA 培养 3 天后证明无其他细菌污染), 提取蓝藻基因组 DNA^[10]。将 50 μg DNA 用 20 单位 EcoRV 和 Hind III 酶切 1 小时后, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳过夜。经过 Southern 印迹转移至硝酸纤维素滤膜上, 以 EcoRV 酶切分离的 IS10 中 657bp DNA 为探针进行分子杂交^[8]。

实验结果

(一) 修饰穿梭载体的发现及酶谱分析

将双亲接合后在氯霉素平板上生长的鱼腥藻转接于卡那霉素平板上数次, 除去大肠杆菌。分析鱼腥藻中的质粒, 发现了两种变化的质粒, 分别是由 pRL1 衍生的 pRL1M 和由 pRL10 衍生的 pRL10M。将两种质粒转化到大肠杆菌中, 大量培养, 分离质粒并进行酶谱分析, 四种质粒酶谱如图 1。其中 pRL1M 比 pRL1 多 1.3kb DNA, 这段 DNA 位于穿梭载体的蓝藻质粒部分 pDU1 中, 在氯霉素抗性基因 CAT (chloramphenicol acetyl transferase) 上游。在这段 DNA 中有 Sau96 I、Ava I、Hind III、Hpa I 位点各一个, 这与插入序列因子 (insertion sequence element) IS2 中酶切位点分布一致^[11], 表明 pRL1M 比 pRL1 多了一段单拷贝的 IS2。pRL10M 也比 pRL10 多一段约 1.3kb 的 DNA, 这段 DNA 位于穿梭载体的大肠杆菌质粒部分 pRB325 中。

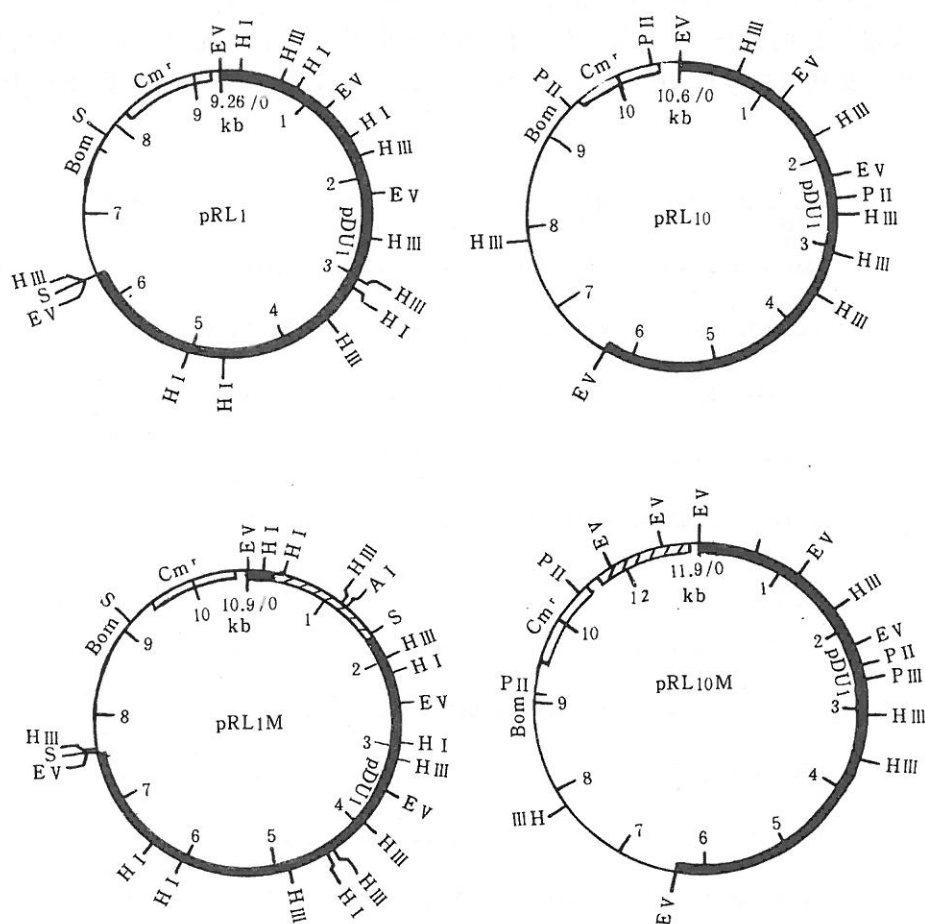


图 1 pRL1、pRL1M、pRL10 和 pRL10M 的限制酶图谱

Fig. 1 Restriction maps of pRL1, pRL1M, pRL10 and pRL10M

AI=Ava I, EV=EcoR V, HI=Hpa I, HIII=Hind III, PII=Pvu II,

S=Sau96 I, : pDU1, : Insertion element

(二) pRL10M 中插入 DNA 的序列分析

将 pRL10M 中插入 DNA 片段按图 2 所示路线重组入质粒 pTZ18R 中, 得到重组体 pX1、pX2、pX3。大量培养并分离纯化质粒, 将经 EcoR I 和 Hind III 酶切后回收 DNA

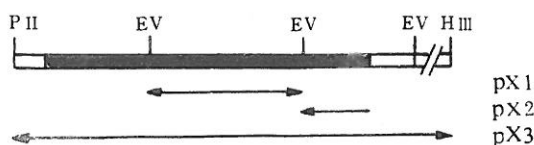


图 2 克隆 pRL10M 中插入片段的策略

Fig. 2 Cloning strategy for the insertion fragment in pRL10M

的片段进行 DNA 序列分析。所得的 DNA 序列（见图 3）经计算机从 EMBL DNA 序列文库中检索^[12]证明为 IS10^[13]。从序列上看，所分析的 IS10 与前人报道的 IS10-R 和 IS10-L 都有几个碱基对的差异，比较它们的序列，可以看出该 IS10 是 IS10-R 和 IS10-L 的杂交体。

```

CTGATGAATC CCCTAATGAT TTTTATCAAA ATCATTAACT TAAGGTAGAT ACACATCTTG TCATATGATC
IS10R----- --CG-A----- --G-----
IS10L----- --G----- --G-----
AAATGGTTTC GCCAAAAATC AATAATCAGA CAACAAAATG TCGGAATCTG ATATTTTACA CGACTCTCTT
--G----- --G-----
--pIN--> --pOUT-->
TACCAATTCT GCCCGAATT ACACCTAAAA CGACTCAACA GCTTAACGTT GCGTTGCCAC GCCTTACTTG
--A-----
--210
ACTGTAAATC TCTCACTCTT ACCGAACTTG GCGTAACTCT GCCAACCATA GCGAGAACAA AACATAACAT
--280
CAAACGAATC GACCGATTGT TAGGTAAATCG TCACCTCCAC AAAGAGCGAC TCGCTGTATA CCGTTGCCAT
--350
GCTAGCTTTA TCTGTTCGGG CAAATACGATG CCCATTGTAC TTGTGACTG GTCTGATATC CGTGAGCAAA
--T-----
--420
AACGGCTTAT GGTATTGCGA GCTTCAGTCG CACTACACGG TCGTTCTGTT ACTCTTTATG AGAAAGCGTT
--A-----
--490
CCCGCTTTCA GAGCAATGTT CAAAGAAAGC TCATGACCAA TTCTAGCCG ACCTTGCCAG CATTCTACCG
--560
AGTAACACCA CACCGCTCAT TGTCAGTGAT GCTGCTTTA AAGTGCCATG GTATAAATCC GTTGAGAACG
--630
TGGGTGGTA CTGGTTAAGT CGAGTAAGAG GAAAAGTACA ATATGCAGAC CTAGGAGCGG AAAACTGGAA
--700
ACCTATCAGC AACTTACATG ATATGTCATC TAGTCACTCA AAGACTTTAG GCTATAAGAG GCTGACTAAA
--770
AGCAATCCAA TCTCATGCCA AATTCTATTG TATAAATCTC GCTCTAAAGG CCGAAAAAAT CAGCGCTCGA
--840
CAGCGACTCA TTGTACCCAC CCGTCACCTA AAATCTACTC AGCGTCGTCA AAGGAGGCAT CCGTTCTAGC
--910
AACTAACTTA CCTGTTGAAA TTGGAACACC CAAACAACCT GTTAATAICT ATTCGAAGCG AATGCAGATT
--980
GAAGAAACCT TCCGAGACTT GAAAAGTCCT GCCTACGGAC TAGGCCTACG CCATAGCCGA ACGAGCACCT
--1050
CAGAGCGTTT TCATATCATG CTGCTAATCG CCTGTATGCT TCAACTAACA TGTGTGCTTG CGGCCGTTCA
--1120
TGCTCAGAAA CAAGGTTCGG pIII--> ACAGCTAAC ACAGTCAGAA ATCGAAACGT ACTCTCAACA
--1190
GTTCGCTTAG GCATGGAAGT TTTGCCGCAT TCTGGCTACA CAATAACAAG GGAAGACTTA CTCGTGGCTG
--C-----
CAACCTACT AGCGCAAAAT TTATTCACAC ATGGTTACCG TTTCGGGAAA TTATGAGGGG ATCTCTCAG
--GTA----- C-----T-----
--1260
--1329

```

图 3 pRL10M 中插入片段的 DNA 序列

Fig. 3 The DNA sequence of the insertion fragment in pRL10M

pIN, pOUT and pIII = promoter

(三) IS10 与鱼腥藻基因组 DNA 杂交

已有文献报道在大肠杆菌基因组 DNA 中含有 IS2^[14]和 IS10^[15]。在鱼腥藻(*Anabaena* sp. strain ATCC 27893)中也发现 IS2 的同源区(Boxer, M. 私人通信),因此 IS2 的来源难以断定。为了解 IS10 的来源,实验中以 IS10 为探针,与不含质粒的鱼腥藻基因组 DNA 进行 Southern 杂交,在鱼腥藻基因组中没有发现 IS10 的同源区。据此作者认为,pRL10M 中的 IS10 来自大肠杆菌,在双亲接合之前就已进入穿梭载体,随载体进入鱼腥藻。

(四) 插入序列因子使宿主对氯霉素抗性提高

同时将四种质粒转化进入大肠杆菌 HB101。在含不同浓度氯霉素的 LB 中培养,所得生长曲线如图 4 所示。实验重复三次,结果相似,取接种后生长 4 小时的细胞数,经统计检验表明,当氯霉素大于 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,含 pRL1、pRL10 和 pRL1M、pRL10M 的细菌生长之间有显著差异。这表明由于 IS2 和 IS10 的插入,使宿主对氯霉素的抗性提高。

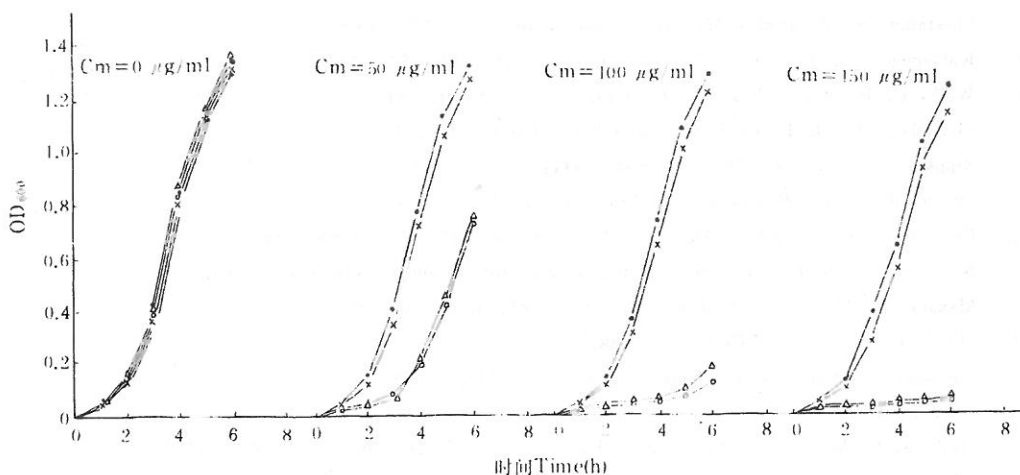


图 4 含不同穿梭载体的大肠杆菌宿主在氯霉素中的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of the *E. coli* hosts containing different shuttle vectors in chloramphenicol

○—○: pRL1; △—△: pRL10; ×—×: pRL1M; ●—●: pRL10M

讨 论

许多生物中都已发现了转座因子和插入序列因子^[16],已有报道认为,插入序列因子还具有调节其邻近基因表达的作用^[17]。蓝藻是一种光能自养的原核生物,实验表明,它也能作为插入序列因子的宿主。

实验中,由于 IS2 和 IS10 的插入,提高了宿主对氯霉素的抗性水平。尽管 IS 的插入频率较低(约 10^{-6}),但由于用氯霉素筛选鱼腥藻,所以含 IS 的宿主很容易被选出。IS 的插入有两种可能方式提高宿主抗性,即提高转录水平或增加拷贝数。根据文献报道^[18],该穿梭质粒在鱼腥藻中复制所必需的 DNA 区域距插入部位较远,因此 IS 的插入可能是由

于影响抗性基因的转录所致。已有文献报道, IS2 的插入可提高 ampC 基因的转录能力 20 倍^[19]。另外在 IS10 中存在三个启动子序列: p-IN、p-OUT 和 p-Ⅲ^[20], 其中 p-IN 和 p-Ⅲ 的方向与下游氯霉素基因一致。可能正是由于插入序列因子中的启动子提高了下游的氯霉素抗性基因的转录水平, 从而增强了宿主的抗性。尽管 IS2 和 IS10 插入的质粒部分不同, 前者插在穿梭质粒中鱼腥藻质粒部分, 后者插在大肠杆菌质粒部分, 但两者都能提高宿主对氯霉素的抗性。

所分析的 IS10 DNA 序列与已报道的 IS10-R 和 IS10-L 都不完全相同, 它是两者的杂交体。据报道^[20], 两种 IS10 对转座的影响不同, IS10-R 在无 IS10-L 帮助下, 可使 Tn10 的转座达正常水平, 反之 IS10-L 只有 1—10% 的转座能力, 这种功能上的差异仅由几个碱基对差异所造成。实验中分析的 IS10 的转座功能与前两种有何异同, 还有待于进一步分析。

参考文献

- [1] Shestakov, S. V. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **107**: 372—375, 1970.
- [2] Kuhlemeier, C. J. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **184**: 249—254, 1981.
- [3] Wolk, C. P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**: 1561—1565, 1984.
- [4] McFarlane, G. J. B. et al.: *J. Microbiol. Methods*, **6**: 301—305, 1987.
- [5] Rippka, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **111**: 1—61, 1979.
- [6] Simon, R. et al.: *Biotechnol.*, **1**: 784—791, 1983.
- [7] Reaston, J. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**: 185—188, New York, 1980.
- [8] Sambrook, J. et al.: *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, New York, 1989.
- [9] Maxam, A. M. et al.: *Methods in Enzymol.*, **65**: 499—560, 1980.
- [10] Lind, L. K. et al.: *FEBS Lett.*, **188**: 27—32, 1985.
- [11] Ghosal, D. et al.: *Nucl. Acids Res.*, **6**: 1111—1122, 1979.
- [12] Bishop, M. et al.: *Nucl. Acids Res.*, **12**: 5471—5474, 1984.
- [13] Halling, S. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**: 2608—2612, 1982.
- [14] Brahma, N. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **128**: 2229—2234, 1982.
- [15] Nisen, P. et al.: *J. Bacteriol.*, **140**: 588—596, 1979.
- [16] Shapiro, J.: *Mobile Genetic Elements*, New York, 1983.
- [17] Iida, S. et al.: *Mobile Genetic Elements*, P. 159—221, (ed. Shapiro J.), New York, 1983.
- [18] Schmetter, G. et al.: *Gene*, **62**: 101—109, 1988.
- [19] Jaurin B. and Normark S.: *Cell*, **32**: 809—816, 1983.
- [20] Kleckner, N.: *Mobile genetic elements*, P. 261—298, (ed. Shapiro, J.) New York, 1983.

ANALYSIS OF TWO MODIFIED SHUTTER VECTORS OF *ESCHERICHIA COLI* AND *CYANOBACTERIUM ANABAENA*

Xu Ping* Zeng Zhaoqi

(Department of Biology, Nanjing University, Nanjing 210008)

Machray, G. C.

(Department of Biological Science, Dundee University, Dundee, U. K.)

The pRL1 and pRL10 were transferred by the biparental conjugation from *E. coli* to *Anabaena* sp. strain ATCC27893 and two modified vectors, pRL1M and pRL10M, were found. The insertion sequence elements IS2 and IS10 were identified in pRL1M and pRL10M respectively by restriction maps and DNA sequencing. The sequence of the IS10 from pRL10M appears to be a hybrid of IS10-R and IS10-L found at either end of the transposon Tn10. The resistance to chloramphenicol of hosts was enhanced after the insertion of IS2 and IS10. It was shown that there was no homology between IS10 and the genomic DNA of *Anabaena* by Southern hybridization.

Key words Shutter vector; *Anabaena* sp. strain ATCC27893

* New address: Institute of Biotechnology, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029.

球形芽孢杆菌 C₃-41 菌株杀蚊 毒素的提取及其同源性研究*

周志宏** 张用梅 刘娥英

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

从球形芽孢杆菌 C₃-41 菌株芽孢-晶体复合物中分别提取孢壁蛋白(S蛋白)和孢晶毒素。采用 SDS-PAGE 证明孢晶毒素具有 43 和 40kD 两种多肽, 但 S 蛋白只有一条 104kD 的蛋白带。后者经 NaOH 处理迅速降解成 43 和 40kD 的多肽。S 蛋白和用 Sephadex G-75 提纯的孢晶毒素对三龄致倦库蚊幼虫的 LC₅₀值(48h)分别为 267 和 10ng/ml。免疫双扩散试验证明 2362、1593、Bs-10 (H_{5a5b}) 和 2297 (H₂₅) 菌株的孢晶毒素能与 C₃-41 菌株的孢晶毒素抗血清发生交叉反应, 但 K (H₁)、SSII-1、1404 (H₂) 和 2315 (H₂₆) 菌株的孢晶毒素与此抗血清不发生交叉反应。同时还证明 C₃-41 菌株的 S 蛋白和孢晶毒素具有抗原同源性。

关键词 球形芽孢杆菌 C₃-41 菌株; 毒素; 同源性

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 杀蚊是通过其毒素起作用的, 杀蚊活性主要来源于晶体和芽孢^[1]。对球形芽孢杆菌 1593、2362 等菌株的杀蚊毒素已有报道^[2-4]。

Baumann 的工作证明球形芽孢杆菌对蚊幼虫具有毒杀作用的是 43、63kD 的多肽^[5]。然而近几年来, 通过对芽孢-晶体复合物及纯晶体中孢晶毒素和晶体毒素的深入研究, 证明对蚊幼虫或蚊细胞株具有毒性的是 42 和 51kD 的多肽^[5-7]。并证实 42 和 51kD 多肽为二元毒素, 只有在二者同时参与下才具毒性, 单一多肽对蚊幼虫是无毒的^[6,7]。42 和 51kD 多肽在抗原性上不同源, 但这二种多肽均存在于 H_{5a5b} 型菌株 1593、2362、1691, H₂₅ 型的 2297 和 H₆ 型的 IAB59 中, 而在 H₁ 型的 Kellen K、H_{2a2b} 型的 SS I-1 和 H₆ 型无晶体菌株 718 中未检测出这二种多肽^[6]。

有的作用曾报道在 2362 菌株部分提纯的晶体制备物中, 其主要成分除 42 和 51kD 多肽外, 还有 122 和 110kD 蛋白质^[5]。然而, 对球形芽孢杆菌的孢壁表层蛋白(简称 S 蛋白)的研究证明 122 和 110kD 蛋白质是污染了 S 蛋白^[8], 进一步证明 110kD 蛋白对蚊幼虫具有毒性是由于污染了少量 51 和 42kD 多肽所引起^[7]。

本实验室分离的球形芽孢杆菌 C₃-41 菌株杀蚊效果高于国内外的高毒株 Bs-10 和 2362^[9], 在野外大面积灭蚊试验和应用中杀蚊效果十分显著^[10-13], 对这一优良菌株的毒素有待了解。本文报道对其研究的结果。

本文于 1992 年 4 月 27 日收到。

* 本研究得到国家自然科学基金资助。

** 现在工作单位: 中国科学院微生物研究所。