

大肠杆菌-链霉菌-假单胞菌穿梭表达 BAC 载体的构建

黄慧颖, 宋 杰, 尚广东

(南京市微生物工程技术研究中心, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 异源表达生理活性物质的生物合成基因簇是药物研发领域的一个重要的方向, 它可通过异源表达来研究基因功能, 获得目标化合物或对现有的化合物进行结构改造. 生物合成基因簇一般较大, 常规的 DNA 载体由于容量不足、拷贝数较低或不能在不同的异源宿主间穿梭表达而难以对其进行操作. 本研究运用重组工程策略和常规的克隆手段, 将多个异源表达所必须的功能基因克隆至常用的构建 BAC 文库的载体 pECBAC1, 获得了一个可在大肠杆菌-链霉菌-假单胞菌 3 个常见的异源表达宿主间进行穿梭表达的 BAC 载体.

[关键词] BAC 载体, 重组工程, 穿梭表达

[中图分类号] Q 819 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)02-0104-05

Construction of an *E. coli*-*Streptomyces*-*Pseudomonas* Shuttle Expression BAC Vector

Huang Huiying Song Jie Shang Guangdong

(Nanjing Engineering and Technology Research Center for Microbiology, Jiangsu Key Lab for Biodiversity and Biotechnology,
School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract Heterologous expression of biosynthetic gene cluster is an important study area of drug research and development and it can be used for gene function study to obtain target compound or its derivatives. A biosynthetic gene cluster is usually very large, normal DNA vectors may have the problems of low content, hard to handle because of vector's low copy number or not suit for shuttle expression in different heterologous strains. In this work, recombinering strategy as well as normal gene cloning techniques are used to clone functional heterologous expression DNA elements into pECBAC1, one of the most commonly used BAC library construction vector.

Key words BAC vector; recombinering; shuttle expression

微生物是临床使用药物的主要来源. 随着越来越多的微生物基因组被解析, 微生物基因组资源的充分利用成为微生物药物学研究领域的一个热点.

作为一种重要的基因工程手段, 微生物药物生物合成基因簇的异源表达在: ①常规方法难以或不能培养的生理活性物质产生菌的遗传操作; ②产量极低而通常发酵难以进行的化合物的研究; ③因结构复杂而使得化学合成难以进行或因收率极低而不能运用于工业化生产的化合物的研究等方面有着其它方法无可比拟的优越性^[1-3].

大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 链霉菌 (*Streptomyces* sp) 和假单胞菌 (*Pseudomonas* sp) 是最为常见的 3 种生物合成基因簇异源表达的宿主菌, 三者各有其优点^[4-6].

微生物药物的生物合成基因簇常常较大 (数十至上百 kb), 常规的克隆载体以及粘粒载体 (cosmid), fosmid 等由于容量有限 (最大可达 45 kb) 而不能在一个载体中涵盖完整的生物合成基因簇, 而基因簇分布在两个甚至多个载体上则牵涉载体的抗性筛选标记、载体的兼容性以及 DNA 之间和蛋白质之间相互作用效率可能受影响等等问题.

收稿日期: 2009-10-14

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项课题 (2009ZX09103-674).

通讯联系人: 尚广东, 副教授, 研究方向: 微生物药物的研发. E-mail: shanggd@hotma il .com

BAC (Bacterial Artificial Chromosome) 载体, 即细菌人工染色体载体, 由于具有可克隆大片段 (多至 300 kb)、所克隆的外源片段可在宿主内稳定存在 (不发生缺失、扩增、重组) 等特点而成为克隆和异源表达的首选载体之一^[7, 8]。通常使用的 BAC 载体为单拷贝 (1~2 个分子/细胞), 这样在进行 DNA 操作以及获取足够量的 DNA 方面有许多困难。而且迄今的 BAC 载体多为在大肠杆菌中进行操作, 缺乏可在大肠杆菌、链霉菌和假单胞菌 3 个宿主之间穿梭表达 BAC 载体。

本研究综合运用常规的基因克隆方法和重组工程 (recombinering) 方法^[9, 10], 从构建基因文库常用的 BAC 载体 pECBAC1^[11]出发, 将异源表达的必需原件加以有效地综合和优化排列, 构建了新型的大肠杆菌-链霉菌-假单胞菌的穿梭表达的 BAC 载体。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

含重组酶质粒的菌株 HS996/pSC101-BAD-gbaA 由德国 Dresden University 张友明博士惠赠; pECBAC1 由美国加州大学戴维斯分校 Richard Michemore 教授惠赠; 菌株 *E. coli* DH 10B, *P. putida* KT244Q 质粒 pUC18, pIJ2925, pBluescriptKS(-) 和 pSET152 均为实验室保存。

1.1.2 试剂和仪器

pfu 聚合酶购自上海生工公司; 各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶和 DNA Blunting 试剂盒购自 TaKaRa Biotechnology 公司 (大连); 其余试剂均为分析纯。PCR 引物由上海生工公司合成; PCR 仪为 Bio-Rad 公司的 DNA Engine 电转化仪为 Bio-Rad 公司的 Gene Pulser II

1.1.2 DNA 序列测定

由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 分子生物学常规操作

大肠杆菌培养, 感受态细胞的转化, 质粒提取, 鉴定等按手册^[12]进行。

1.2.2 表达重组酶的菌株 HS996/pSC101-BAD-gbaA + pEXPUBAC 电转化感受态细胞的制备

将 HS996/pSC101-BAD-gbaA + pEXPUBAC 单菌落接种至 3 mL 10 μ g/mL 四环素及 12.5 μ g/mL 氯霉素的 LB 液体培养基, 于 30°C 过夜振荡培养, 按 1/50 的体积转接至 20 mL 同样的培养基, 30°C 振荡培养, 至 A_{600} 为 0.2 时, 加入终浓度为 0.15% 的 L-阿拉伯糖, 37°C 振荡培养至 A_{600} 为 0.4 时, 12 000 r/min, 4°C 离心 3 min, 弃上清, 以 10% 的甘油洗涤沉淀 2 次, 最终悬浮于 200 μ L 10% 的甘油中。50 μ L 分装, 用于一次转化。

1.2.3 PCR 扩增

反应体系: 2.5 mmol/L dNTP, 1 μ M 引物, 2.5 mmol/L MgCl₂, 100 ng 染色体 DNA (或 20 ng 质粒), 5U pfu, 5% DMSO, 加 ddH₂O 至 100 μ L。97°C 处理 5 min 后, PCR 循环条件: 97°C 45 s, 60°C 1 min, 72°C 3 min, 共 30 个循环, 最后在 72°C 延伸 10 min。

本研究所使用的 PCR 引物及测序引物见表 1, 引物中同源臂部分以小写表示, 酶切位点以下划线表示。

2 结果

2.1 pUC18 作为填充片段的引入

将 pECBAC1 和 pUC18 均以 *Bam*H I 酶切, 沉淀, 回收, 连接, 转化 *E. coli* DH 10B 感受态细胞, 转化液涂布至含 12.5 μ g/mL 氯霉素, 50 μ g/mL 氨苄青霉素, 20 μ g/mL IPTG 和 40 μ g/mL X-Gal 的 LB 固体平板上, 37°C 培养过夜。挑取白色菌落, 提取质粒, 酶切验证, pUC18 可以两个方向引入 pECBAC1, 酶切验证重组质粒, 选取一个方向的克隆, 命名为 pEPUBAC。pEPUBAC 兼具 pECBAC1 和 pUC18 的功能, 为高拷贝的 BAC 载体。

表 1 构建 pESPBA C 及其序列测序所用的引物

Table 1 Primers used in the construction and sequencing of pESPBA C Name e sequence	
A1	5'-AAA <u>GGATCC</u> GGTTCATGTG CA GCTCCATCA G-3'
A2	5'-GGG <u>CTGCACT</u> CAG CCAATCGA CTGGCGAGC-3'
C1	5'-GGG <u>CTGCACT</u> GTGATG TGCTGCGCGAGTG G-3'
C2	5'-GGG <u>GAATTC</u> ATG GTTG CCTCTCG CCCTACCC-3'
SP1	5'-tattcaggcgtag caa cca ggcgtttaagg gccaataac g ccttaaCCGG CCAG CCTCGCAGGCAGG-3'
SP2	5'-ctacgcgcctacgtcttcggtgcgctccggcgctgtcttcgtctgtctgc-3'
SP3	5'-gacgacgacgaa gacga cgc ccaggacgg ca cgg aag acg tag cgg gtaGG GTTCATG TGCAGTCCATCAG-3'
SP4	5'-c cgg ggcgtat tttttgag ttatcg agat tttcag gac gaag gaag ctaaATGGTTGCCTCTCG CCCTACCC-3'
S1	5'-AATTTCTG CCATT CATCCG CT-3'
S2	5'-CGGG CATTTCAGCGAAG CG CC-3'
S3	5'-GATTGCGGA CCGAT CATCGAG-3'
S4	5'-GCGTA GGGTTCATGTGCAG CT-3'
S5	5'-TG TGATG TGCTGCGCGAGTG G-3'

2. 2 pEPUBAC 中 Xba I 位点的去除

首先将 pEPUBAC 上含 Xba I 位点的 2.1 kb Bg lII 片段克隆至 pIJ2925 (pUC18 的衍生载体, 其多克隆位点两侧均为 Bg lII 位点), 得到 pBG2 以 Xba I 酶切 pBG2 通过 T4 DNA 聚合酶和 dNTP 的作用, 使得 Xba I 位点的序列 TCTAGA 变为 TCTAGCTAGA, 这样即去除了 Xba I 位点. 测序证明序列正确后, 将所得克隆命名为 pBG-2 将 pBG-2 上 Bg lII 2.1 kb 片段克隆至 pEPUBAC Bg lII 酶切的 8.0 kb 大片段, 酶切验证克隆方向正确后, 得到 pEXPUBAC. pEXPUBAC 只有在多克隆位点上存在单一的 Xba I 位点.

2. 3 Am-crp-PP0423' 基因盒的构建

以 pSET152 为模板, 引物 A1 和 A2 扩增 0.9 kb 的阿普霉素抗性基因 (Am) 片段, 以 BamH I 和 Pst I 酶切后, 克隆至 pBluescriptKS(-) 相同位点, 所得克隆测序正确后, 命名 pAM. 以 P. pudita KT2440 的基因组 DNA 为模板, 引物 C1 和 C2 扩增 1.0 kb 的 crp 区域, Pst I 和 EcoR I 酶切后, 克隆至 pBluescriptKS(-) 相同位点, 所得克隆测序正确后, 命名为 pCRP. 将 pAM 的 BamH I 和 Pst I 0.9 kb, pCRP 的 Pst I 和 EcoR I 1.0 kb 与 BamH I 和 EcoR I 处理的 pBluescript KS(-) 三片段连接, 得到包含 Am-crp-PP0423' 基因盒的克隆 pAC.

2. 4 重组工程法构建目的 BAC 载体

运用重组工程原理, 将 2 个 DNA 片段同时克隆至靶载体并去除靶载体相应部位的“三片段克隆”的策略是: 上下游 2 个片段分别在其 5' 和 3' 端引入与靶载体的同源臂 (同源臂即相同序列的一段核苷酸序列), 上游片段的 3' 端和下游片段的 5' 端之间也有同源臂, 同源臂常常是通过 PCR 的引物而引入. 在大肠杆菌体内, L-阿拉伯糖诱导重组酶的表达, 重组酶催化 3 个同源臂之间的 DNA 重组. 经过筛选, 即可得到目的克隆.

本研究所设计的引物 SP1 的前 50 个碱基 (小写) 为与 pEXPUBAC 氯霉素抗性基因 3' 端 3397-3346 序列相同的同源臂, 后面为扩增 pSET152 oriT 部位的序列; SP2 的 51 个碱基 (小写) 为 pSET152 整合酶基因 (int) 3' 端的序列; SP3 的前 51 个碱基 (小写) 为 SP2 的反向互补序列, 后面为扩增 Am-crp-PP0423' 基因盒 5' 的序列; SP4 的前 50 个碱基 (小写) 为与 pEXPUBAC redF 和氯霉素抗性基因 5' 端之间 4107~4156 序列相同的同源臂, 后面为扩增 Am-crp-PP0423' 基因盒 3' 的序列.

首先将 pEXPUBAC 转化至 HS996/pSC101-BAD-gbaA, 在 30℃ 下, 以 10 μg/mL 四环素和 12.5 μg/mL 氯霉素进行筛选. 所获菌株为 HS996/pSC101-BAD-gbaA + pEXPUBAC.

以 pSET152 为模板, 引物 SP1 和 SP2 扩增 2.4 kb 的 oriT-atp-int 基因盒, 以 pAC 为模板, 引物 SP3 和 SP4 扩增 2.6 kb 的 Am-crp-PP0423' 基因盒. PCR 反应体系乙醇沉淀, 溶解于水后, 以 20U 的 DpnI 酶切 4 h 胶回收, DNA 溶于 10 mmol/L pH 8.0 Tris Cl 将 0.3 μg 的 oriT-atp-int 基因盒 DNA 片段和 0.3 μg 的 Am-crp-PP0423' 基因盒 DNA 片段共转化至 L-阿拉伯糖诱导重组酶表达的 HS996/pSC101-BAD-gbaA + pEXPUBAC. 在 37℃ 下, 以 50 μg/mL 阿普霉素和 12.5 μg/mL 氯霉素 加以筛选, 所得的质粒再次转化 E. coli DH 10B 加以纯化, 最终得到氯霉素抗性基因部分为 oriT-atp-int 基因盒和 Am-crp-PP0423' 基因盒所取代的目标载体 pESPBA C. pESPBA C 的质粒图谱见图 1, 酶切验证的结果见图 2

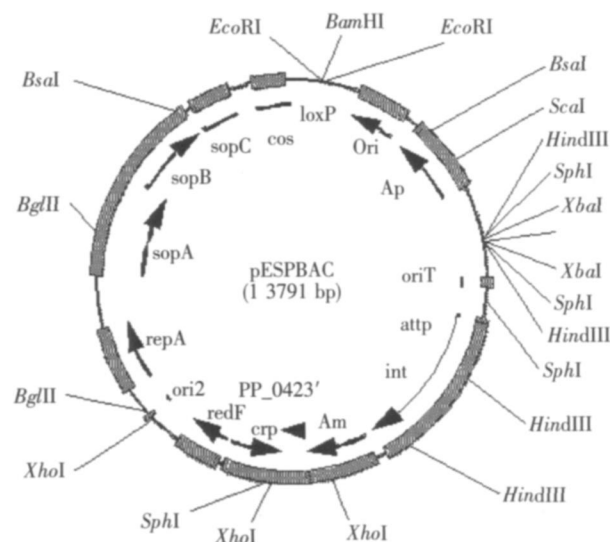


图1 pESPbAC 的质粒图谱
Fig.1 Restriction map of pESPbAC

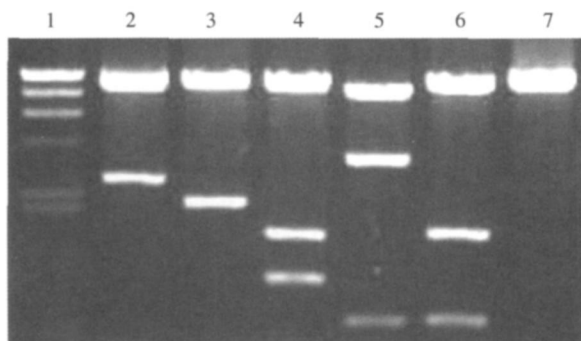


图2 pESPbAC 酶切的琼脂糖凝胶电泳结果
Fig.2 Agarose electrophoresis of the restriction enzymes digested pESPbAC

1. DNA 相对分子质量标准 λ /HindIII 23.1 kb、9.4 kb、6.6 kb、4.4 kb、2.2 kb、2.0 kb、0.5 kb; 2. pESPbAC/BamHI 11.0 kb、2.7 kb; 3. pESPbAC/BglII 11.6 kb、2.1 kb; 4. pESPbAC/HindIII 11.2 kb、1.5 kb、1.0 kb; 5. pESPbAC/SphI 9.5 kb、3.5 kb、0.7 kb; 6. pESPbAC/XhoI 11.2 kb、1.5 kb、0.7 kb; 7. pESPbAC/XbaI 13.8 kb

2.5 pESPbAC 克隆片段的序列测定

设计表 1 中的测序引物 S1-S5 对 pESPbAC 中通过重组工程法所引入的 4.3 kb 进行测序, 结果证明与预期完全一致. pESPbAC 的 GenBank 收录号为 EU 718182

3 讨论

微生物药物生物合成基因簇的异源表达是药物研究领域的一个有前途的方向, 其目的可包含: 提高化合物的产量、获得新的药效学性质改善的衍生物以及改进化合物的提取分离纯化工艺.

BAC 载体已逐渐成为异源表达生物合成基因簇的常规载体, 因此发展有效的 BAC 载体可以大大提高异源表达的效率, 增加高通量筛选的成功率.

重组工程是上世纪 90 年代末发展并逐渐成熟的一种在大肠杆菌体内利用重组酶催化而进行 DNA 之间同源重组的基因克隆手段. 其优点在于不受任何酶切位点的限制, 不引入碱基突变, 快速高效.

本研究充分运用重组工程和经典的基因克隆策略, 构建了目标 BAC 载体 pESPbAC. pESPbAC 有如下 5 个特点: ①大肠杆菌-链霉菌-假单胞菌 3 个宿主之间穿梭表达 BAC 载体. 载体上的 oriT 片段同时供转移至假单胞菌和链霉菌. attP 位点用来整合至链霉菌基因组的 attB 位点, 而载体上假单胞菌基因组中的非必须基因 crp 部分可以通过同源重组而整合至假单胞菌的基因组. 这样, 克隆在 pESPbAC 载体上的 DNA 片段在大肠杆菌中以游离质粒形式存在而进行表达, 在链霉菌和假单胞菌中则为整合至基因组上进行表达. ②保留了原 BAC 载体克隆大片段 (可多至 300 kb) 的特点. 保留了 LacZ 可以使用蓝白斑筛选重组克隆. ③pUC18 作为填充片段克隆至 BamHI 位点, 使得 BAC 载体由单拷贝 (1~2 个分子/细胞) 变为高拷贝 (500~700 个分子/细胞), 这样基因操作如常规克隆载体一样简便易行. 填充片段可以通过 BamHI 切除, 所得片段即为克隆大片段 BAC 载体. ④去除了原载体 pECBAC1 一个多余的 XbaI 位点, 这样可用位于载体的多克隆位点上克隆片段两侧的、链霉菌基因组上酶切位点较少的限制性内切酶 EcoRI 和 XbaI 将克隆片段切出, 通过脉冲场凝胶电泳来鉴定克隆片段大小. ⑤阿普霉素作为大肠杆菌-链霉菌-假单胞菌 3 个宿主的共同筛选标记.

pESPbAC 具有成为通用的高效表达次级代谢来源的生物合成基因簇的载体和运用于高通量表达化合物的潜力.

[参考文献]

[1] Tang L, Shah S, Chung L, et al. Julien B. Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster[J]. Science

- 2000, 287(5453): 640-642
- [2] Long P F, Dunlap W C, Battershill C N, et al Shotgun cloning and heterologous expression of the patellamide gene cluster as a strategy to achieving sustained metabolite production[J]. Chembiotech, 2005, 6(10): 1760-1765
- [3] Wolpert M, Heide L, Kammerer B, et al Assembly and heterologous expression of the coumestatin A1 gene cluster and production of new derivatives by genetic engineering[J]. Chembiotech, 2008, 9(4): 603-612
- [4] Pfeifer B A, Admiraal S J, Gramajo H, et al Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*[J]. Science, 2001, 291(5509): 1790-1792
- [5] Alduina R, Gardina A, Galb G, et al Expression in *Streptomyces lividans* of *Nonomuraea* genes cloned in an artificial chromosome[J]. Appl Microbiol Biotechnol 2005, 68 (4): 656-662
- [6] Wenzel S C, Gross F, Zhang Y, et al Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via red/ET recombining[J]. Chem Biol 2005, 12 (3): 349-356
- [7] Sosio M, Giusino F, Cappellano C, et al Artificial chromosomes for antibiotic-producing actinomycetes[J]. Nat Biotechnol 2000, 18(3): 343-345
- [8] Penn J, Li X, Whiting A, et al Heterologous production of daptomycin in *Streptomyces lividans*[J]. J Ind Microbiol Biotechnol 2006, 33(2): 121-128
- [9] Zhang Y, Buchholz F, Muysers J P, et al A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*[J]. Nat Genet 1998, 20 (2): 123-128
- [10] Datsenko K A, Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(12): 6640-6645
- [11] Frijters A C J, Zhang Z, Danne M, et al Construction of a bacterial artificial chromosome library containing large *EcoRI* and *HindIII* genomic fragments of lettuce[J]. Theor Appl Genet 1997, 94(3/4): 390-399
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16-34

[责任编辑: 孙德泉]