

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/70

C12N 15/74

C12P 21/02

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 91103343.2

[45]授权公告日 2000 年 10 月 18 日

[11]授权公告号 CN 1057567C

[22]申请日 1991.4.22 [24]颁证日 2000.6.10

[21]申请号 91103343.2

[30]优先权

[32]1990.4.24 [33]FR [31]9005185

[73]专利权人 罗纳-布朗克生物化学公司

地址 法国安东尼

[72]发明人 贝齐思·凯莫龙 约尔·科劳瑟特

奥非·雷威·齐尔

审查员 孙广秀

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 吴大建

权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 克隆和/或表达的新载体其制备方法及应用

[57]摘要

本发明涉及在革兰氏阴性细菌中有宽范围宿主的、不能迁移的、并且有较大稳定性的新的克隆和/或表达载体。本发明还涉及这些载体的应用,尤其是在生产重组蛋白质与代谢产物中的应用或在生物转化反应中的应用,以及含有这种载体的宿主细胞。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 产生一种革兰氏阴性细菌的方法, 其中包括向这种细菌中引入一种有宽范围宿主的克隆和/或表达载体, 其特征在于

a) 载体具有在不相容性 P 组群革兰氏阴性细菌中有由宽范围宿主之质粒衍生的复制原点,

b) 载体含有携带质粒 RP4 之 par 区域的 DNA 片段,

c) 由于缺失 mob 座位该载体无法迁移。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于载体具有质粒 RK2 的复制原点。

3. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于载体还含有克隆的多位点。

4. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于载体还含有由抗生素抗性基因构成的选择标志。

5. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于载体由质粒 RK2 衍生的、有一个小于 20Kb 的尾部、含有携带质粒 RP4 之 par 区域的 DNA 片段、不含 mob 座位、并且必要时含克隆的多位点和选择标志。

6. 根据权利要求 5 的方法, 其特征在于载体是质粒 PXL1635。

7. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于载体还含有重组 DNA。

8. 根据权利要求 7 的方法, 其特征在于依赖于遗传表达的调节序列的重组 DNA 含有编码给定之一种或多种多肽的一个或多个结构基团。

9. 根据权利要求 8 的方法, 其特征在于所说的结构基因可依赖于其固有的调节序列或不同的调节序列。

10. 根据权利要求 8 的方法, 其特征在于遗传表达的调节序列是由选自启动子、终止密码子、信号肽和核蛋白体固定位点的一个或多个元件组成的。

11. 根据权利要求 8 的方法, 其特征在于其中一个或多个结构基因编码选自酶、激素、生长因子, 优选选自白蛋白、tPA、TIMP、白细胞介素、脱辅基脂蛋白和干扰素的蛋白质。

12. 根据权利要求 8 的方法, 其特征在于其中的一个或多个结构基因是在遗传与生物化学水平上参与代谢产物之生物合成的基因。

13. 根据权利要求 12 的方法, 其特征在于其中代谢产物选自维生素、抗生素、氨基酸和所有其他细菌代谢产物。

14. 根据权利要求 13 的方法, 其特征在于所说的代谢产物选自维生素 B12、生物素、核黄素、赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、青霉素和四环素。

15. 生产蛋白质或代谢产物的方法, 其特征在于:

- 在革兰氏阴性细菌中引入权利要求 7 至 14 中所定义的载体, 该载体含有编码所述蛋白质的结构基因或在遗传或生物化学水平上参与所述代谢产物之生物合成的一个或多个基因,

- 在一个或多个所述基因的表达条件下培养所说的细菌,

- 回收所产生的蛋白质或代谢产物。

说明书

克隆和/或表达的新载体 其制备方法及应用

本发明涉及在革兰氏阴性细菌之广泛宿主中克隆和/或表达的新载体。本发明还涉及这些载体的应用，特别是这些载体在生产重组蛋白质或代谢产物中或生物转化反应中的应用，以及含有这些载体的宿主细胞。

分子生物学的最新进展导致可用于遗传基因方法之具有广泛宿主之新载体的开发。这些载体与那些具有窄范围宿主特异性的载体（如 Col E1）截然不同，特征在于这些载体可在分类学上普遍存在的宿主体内复制。就可在几乎所有革兰氏阴性细菌内复制的某些质粒来说，这一特性是很明显的。这样的质粒具有特别适用于大肠杆菌等细菌，以进行必要的构建，然后直接引入所选择之革兰氏阴性宿主的特点。这些载体的另一个特点是它们具有由供体细菌向受体细菌接合转移的迁移或被迁移性质。这种转移一般可以很高频率进行（在 $1-10^{-2}$ 之间），此大大高于已知的转化系统。

文献中描述的在革兰氏细菌中有广泛宿主的质粒属于不相容性 C、N、P、Q 和 W 组群（inc C、inc N、inc P、inc Q 和 inc W）。其中已对不相容性组群 P 和 Q 作了充分研究，并已构建了大量的衍生物（Schmidhauser et al., 1988）。这些组群也是几乎无例外地得到了应用。在这方面，还描述过这些质粒在除黄色粘球菌（Myxococcus xanthus）、Bradyrhizobium japonicum 和拟杆菌属

(Bacteroides) 外之所有革兰氏阴性细菌中的复制情况

(Kies and Stahl, 1989)。对不相容性 W 组群质粒的使用并不太重要, 这一方面是因为它们的优点比不相容性 P 和 Q 组群质粒少, 另外是对它们了解尚不多。

不相容性 F 组群分两个亚群: inc P_α 和 inc P_β , 其中研究最多的是质粒 RK2、RP4 (事实上它们是同种质粒的两个不同的分离物) 和 R751。这些质粒具有自动接合特性, 即它们都具有接合功能 (tra 和 mob)。此外, 它们都是具有低拷贝数 (RK2 在大肠杆菌内的拷贝数为 4—7) 的大质粒 (RK2 有 60 Kb 的尾部)。

Kies 和 Stahl 已详细研究了这些质粒的复制情况。另外, 已经知道复制原点 ori V 由 (i) 8 个 17 pb 的片段、(ii) 大肠杆菌之 Dna A 蛋白质固定位点周围的推断的启动子和推断的大肠杆菌之 IHF 蛋白质固定位点、(iii) 富含 AT 的 9 bp 序列及相接的 Dna A 蛋白质固定位点, 以及 (iv) 一个富含 GC 的区域组成。与 trf A 基因相关联的复制原点构成与 RK2 同样普遍存在的复制子, 其中所说的 trf 基因转译成由相同相编码的两种蛋白质 A1 和 A2, 且该基因被赋予了不同的密码子。就这些宿主来说, A2, 或者 A1 与 A2 两者对其复制似乎都是必不可少的 (Thomas, 1986)。这些质粒的复制受到 Kil 和 Kor 基因所介入的复合调节系统的控制。Kor 基因 (Kil—override) 拮抗 Kil 基因 (Kil A、Kil B、Kil C 和 Kil D) 的致死性作用, 并且对 trf A 的表达起负调节作用。已鉴定出五个 Kor 基因 (Kor A、Kor B、Kor C、Kor E 和 Kor F)。鉴于 RK2 复制子能适应

于用来进行复制的宿主，故证实了存在这些基因及 trf 基因之调节网 (Kies and Stahl, 1989)。Schmidhauser 和 Helinski (1985) 也证明当在某些宿主中有较差的分离稳定性时，可造成其中某些基因的缺失。

因此可见，这些基因对于所观察到的 RK2 或 RP4 衍生物的好稳定性是不可缺少的。

已构建了许多 RK2 的衍生物作为多宿主载体。这便是那些因离开复制原点 (ori V) 部位而保留了起始载体之四环素抗性基因的质粒。例如质粒 pRK290、pRK404、pRK415 (Ditta et al., 1980 和 1985; Keen et al., 1988; Schmidhauser et al., 1988)。其中特别应提到的是质粒 pRK290 (Ditta et al., 1980)，该质粒在许多革兰氏阴性菌中显示出很高的稳定性 (Schmidhauser and Helinski, 1985)。该质粒可稳定地存在于大肠杆菌、固氮菌 (*Azotobacter*)、臭味假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*)、球形红色假单胞菌 (*Rhodopseudomonas sphaeroides*) 中。然而，在其他革兰氏阴性菌中该质粒仍是不稳定的：如在瘤病土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、*Acetivibrio*、柄杆菌属 (*Caulobacter*) 及铜绿色假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中 (Schmidhauser et Helinski, 1985)。pRK290 有一个 20 Kb 的尾部，这对于一个克隆载体来说是很大的。由 RK2 开始，通过一系列连续缺失而得到了该

质粒。除转移功能 (tra 基因)、卡那霉素抗性基因及转座子 Tn1 外, 这些缺失除去了 Kil A 和 Kil C、Kil C 和 Kil E 功能 (Schmidhauser et Helinski, 1985)。因此, 尽管失去了某些 Kil 和 Kor 功能, 仍有可能观察到 RK2 衍生物的某些稳定性。然而, 已观察到单纯丢失 Kil B 功能可表现出其在许多革兰氏阴性菌中之稳定性的净减低, 并且还观察到 pRK290 比所有被试的有更小尾部的 RK2 衍生物之稳定性都低 (Schmidhauser et Helinski, 1985)。

除了有关在 trf A 表达调节系统中所涉及的不同 RK2 决定子之各自重要性的研究工作外, 还发现了一个对这些质粒之分离稳定性可能起决定性作用的片段 (Sauruger et al., 1986)。这个位于 tra 2 区域和卡那霉素抗性基因之间的片段编码一个分配系统 (par)。而且表明该片段可稳定大肠杆菌中的 pBR322 和 pACYC177 (Sauruger et al., 1986)。

至于不相容性组群 Q 的天然质粒, 其实例可包括 RSF1010、R1162 和 R300B。这些质粒在适当微生物中的拷贝数可为 10 至 60 个。这些质粒的尾部小于不相容性 P 组群质粒的尾部; 事实上它们的尾部在 10 Kb 以下。

复制这些质粒需要有一个 Cis 区域, 其包括两个亚区域: (i) 由 3, 5 重复序列、40 pb 富 AT、60 pb 富 GC 和推断的大肠杆菌 Dna A 蛋白质固定盒所形成的区域; 以及 (ii) 另一个有反向重复序列的区域, 该反向重复序列构成了有 40—60 pb “杆”部分的次级结构。RSF1010 复制的起始必需有由下述质粒编码的三种蛋白质存在: 由 rep A、rep B 和 rep C 基因编码的 Rep A、

Rep B 和 Rep C。Rep C (与重复序列相对应) 识别复制原点, 并正向调节其复制的起始; Rep A 具有解螺旋酶活性; Rep B 和 Rep B* (它们相应于由相同相编码的而又赋予各蛋白质以不同密码子的两种蛋白质) 具有体外 RSF1010 特异性的引物酶 (Primase) 活性。RSF1010 的复制依赖于 DNA 聚合酶 III 和宿主的促旋酶。RSF1010 可借助不相容性 Inc I α 、Inc M、Inc X, 特别是 Inc P 组群的质粒的 tra 功能由一种革兰氏阴性菌迁移到另一种革兰氏阴性菌中 (Derbyshire et Willets, 1987)。

迄今尚未描述过有关 RSF1010 及其衍生物之稳定性的任何研究工作。此外, RSF1010 的序列已为人们所熟知 (Scholz et Scherzinger, 1989), 但用功能性分析和分子分析法均不能鉴定出任何质粒稳定性的决定子。有各种理由认为不相容性 Q 组群质粒, 以及不相容性 P 组群质粒都是不稳定的。

虽然作了上述工作, 但有广泛宿主的已知质粒存在着许多与其性能及工业规模上的应用有关的缺点。

尤其是对于工业应用, 除不依赖于宿主细菌外, 载体质粒还应具有某些与开发限制及生物安全性相对应的性质。

应用上受到限制实质上与质粒的分离稳定性有关。事实上, 非常希望在抗生素工业应用中不选择那么易于丢失的质粒。基于这一观点, 要求工业上应用的载体应具有很好的稳定性。这种稳定性应大到能维持 25 次连续传代, 此即代表了达到 200 M³ 工业发酵罐之生产规模时仍能保留重组菌株所必须的传代数 (Stanburry et Whitaker, 1984)。而且, 对于含有可扩增、表达等 DNA

序列之核苷酸插入段的这些质粒的衍生物来说，也应有相近的稳定性。

另外，生物安全限制性规定迫使对重组菌株实行许多生物学限制。1987年5月7日NIH“有关重组DNA分子研究准则”中述及的I级（BL1）生物安全系统提出了相应较少的限制。这一大肠杆菌和臭味假单胞菌中的系统必须以利用非接合和非迁移质粒为条件。事实上，如果重组微生物在天然介质中偶然处于被释放状态，则这些质粒一定不能被转移到其他生物体内（Trevors et al., 1987）。

然而，文献中描述的宽宿主范围的质粒中，没有一种能完全满足这些条件。首先，这些质粒从未以普遍存在的方式达到一种良好的分离稳定性。事实上，如果其中某些质粒在某些宿主内是很稳定的，却不能在所有革兰氏阴性菌中有同样的稳定性。此外，长时间以来一直没有研究过在将含有例如可扩增或表达之序列的DNA片段插入这些质粒后的稳定性。这里特别应提到的是质粒pRK290，以前从未研究过该质粒中插入DNA片段后的稳定性特征。再者，现有技术中描述的有宽范围宿主之质粒的其他特性是它们可以迁移或被迁移，以便由供体细菌接合转移到受体细菌中。具有mob座位的pRK290质粒同样是这种情况。为此，这些质粒便不适合于对生物安全性的限制，而只能以很高迁移频率从其他微生物中排除这些带有特定DNA序列的质粒。

另外，这些质粒中的某些质粒因缺乏稳定性而导致只能以低效率产生蛋白质或代谢产物，从而使其在工业发酵过程中的应用受到限制。

本发明的一个目的是提供适于在广泛宿主内克隆和/或表达的载体，其特征在于该载体可在几乎所有革兰氏阴性菌内复制，它具有很

高的分离稳定性，而且是不能迁移的。本发明的再一个目的是提供这种载体的所有衍生物。从本发明的意义来说，该载体的许多衍生物都包括了保留上述特征的载体，尽管可在其相对重要的区域内有某些改变或修饰（缺失、突变、插入等）。

本发明的载体衍生出在革兰氏阴性菌中有广泛宿主的不相容性P组群的质粒。具体地说，它们具有由属于不相容性P组群之质粒衍生的复制原点。更有利的是它们可衍生RK 2质粒。它们结合了对载体来说从未描述过的特性，即它们在革兰氏阴性菌中有广泛宿主、具有高稳定性，以及不存在迁移功能。

本发明载体的高稳定性是由于具有稳定性特性之特定核苷酸序列的掺入。特别是可使用得自天然RP 4质粒的特定片段。

Saurugger 等人（1986）描述了称为 par 片段的已克隆之片段，并述及它们在大肠杆菌内稳定某些质粒的能力。现已发现，插入 par 片段可大大提高稳定性，而且这种增加与所选择的宿主生物体、性质（基因、启动子等）或核苷酸插入段的尾部无关。事实上，本发明的载体及其衍生物的稳定分离稳定性比可用作克隆载体的RK 2衍生物的稳定分离稳定性更高，而且在所有已试验的革兰氏阴性菌中都是这样。

迁移功能的丢失是本发明载体的第二个特征。因此，与如PRK 290这样的质粒相反，本发明的载体不能从一种革兰氏阴性菌向另一种迁移。这样它们便与这些细菌形成I类宿主—载体对，使之符合工业生产规则。特别是因缺失含 mob 座位的区域所得到的本发明载体更具有这种有利的特性。

本发明载体的第三个特性是其能够在大多数革兰氏阴性菌中复制。这一特性是特别有利的，因为在将载体引入所选择的革兰氏阴性宿主

之前，这种特性尤其能在完成构建所需的大肠杆菌内发挥作用。同样还可根据所要求的载体应用（扩增、表达等）或其核苷酸插入段之尾部等性质，以及适当宿主来选择之。

在一特定的实施方式中，本发明的载体具有多个克隆位点及许多独特的克隆位点，这样将大大有利于整合期望扩增或表达的核苷酸插入段。

在另一实施方式中，本发明的载体含有选择标志，如抗生素抗性基因。更可取的是它们含有 R K 2 的四环素抗性基因。该抗性基因能用于选择存在于几乎所有革兰氏阴性菌中的质粒。可将其他抗性基因插入本发明所述的载体及其衍生物上。

本发明的一个特定目的是提供在革兰氏阴性菌中有宽范围宿主的克隆和/或表达载体，其特征在于它：衍生于 R K 2 质粒、其尾部小于 20 K b、含有一个携带 R P 4 质粒之 par 区域的 D N A 片段、不含 mob 座位，并可含有多个克隆位点及选择标志。

本发明的载体可用于扩增或表达给定的 D N A 序列。因此，本发明的一个目的是涉及前面限定之含重组 D N A 片段的载体。

更具体地说，依赖于遗传表达之调节序列的重组 D N A 含有一个或多个编码一种或多种给定之多肽的结构基因。根据本发明，结构基因总是依赖于它们所特有的调节信号或不同的调节信号。在一优选实施方案中，其遗传表达的调节序列是由选自启动子、决定子、信号肽和核蛋白体固定位点的一个或多个元件组成的。

编码多肽的结构基因可选自于编码酶、激素或生长因子的基因。最好是选自编码白蛋白、t P A、T I M P、白细胞介素、脱辅基脂蛋白及干扰素的结构基因。

在本发明的一个特定实施方式中，一个或多个结构基因是在代谢产物的生物合成中，在遗传或生物化学水平上起作用的基因，也就是说它们是为生物合成代谢产物之方法中所涉及的多肽编码的基因。具体地说，代谢产物可以是维生素、氨基酸、抗生素或其他任何细菌代谢产物。代谢产物最好选自于维生素B₁₂、生物素、核黄素、赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、青霉素或四环素。

在一更可取的实施方式中，本发明的载体含有位于允许表达的信号，可能还有允许分泌所需蛋白质的信号之前的，编码给定之蛋白质的结构基因。

本发明的另一个目的涉及生产蛋白质或代谢产物的方法，其特征在于：

一在革兰氏阴性菌内引入一个如上文中限定的载体，该载体含有编码所述蛋白质的结构基因，或在遗传或生物化学水平上参予生物合成上述代谢产物的一个或多个基因。

一在适于表达所说之基因的条件下培养该细菌；以及

一回收所产生的蛋白质或代谢产物。

可在工业规模上在几乎所有革兰氏阴性菌中利用本发明所描述的载体。对于质粒PXL1635来说，可在能复制质粒RK2的几乎所有革兰氏阴性菌，即除黄色粘球菌、Bradyrhizobium japonicum、拟杆菌属细菌以外的所有革兰氏阴性菌中使用该质粒(Kiies et Stahl, 1989)。可按下列方式利用这些质粒：如可在多克隆位点处克隆携带一个或多个将被扩增之基因的一个或多个DNA片段，然后将如此构建的质粒引入期望在工业上使用的细菌中。如可使用电穿孔转化系统来引入已构建好的质粒

(Wirth et al., 1986)。可基于由质粒提供的抗性来选择重组克隆。然后按照工业上应用的传统保存技术保存这些克隆 (Standburry et Whitaker, 1984)。

本发明的再一个目的是涉及含有本发明载体的革兰氏阴性细菌及其应用。这样的细胞特别适用于生产蛋白质或代谢产物，或直接用于生物转化反应中。

本发明的其他目的及优点可体现于下述实施例中，这些实施例旨在举例说明而不是限制本发明。

克隆、分子生物学及生物化学的一般技术

用于本发明的传统分子生物学方法，如在氯化铯—溴乙锭梯度下离心质粒 DNA、用限制酶消化、凝胶过滤、由琼脂糖凝胶中电洗脱 DNA 片段、向大肠杆菌内转化及核苷酸沉淀等均如文献所述 (Maniatis et al., 1982; Ausubel et al., 1987)。按已提出的程序经链终止法测定核苷酸序列 (Ausubel et al., 1987)。

所用限制酶由 New—England Biolabs (Biolabs) 公司、Bethesda Research Laboratories (BRL) 公司或 Amersham 公司 (Amersham) 提供。

为了进行连接，用 0.7% 琼脂糖凝胶或 8% 丙烯酰胺根据其尾部分离 DNA 片段，经电洗脱纯化、用苯酚提取、在乙醇中沉淀，然后在 T4 噬菌体的 DNA 连接酶 (Biolabs) 存在下，于含 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM MgCl₂、10 mM DTT、2 mM ATP 的缓冲液中保温。

必要时可在缓冲液 (10 mM 甘氨酸、1 mM MgCl₂、

1 mM ZnCl_2 , pH 10.5) 中于 37 °C 下用牛小肠碱性磷酸酶 (CIP, Pharmacia) 处理 30 分钟, 使带有突出之 5' 末端的 DNA 片段脱磷酸化。可用同样技术使突出的或跨越的 3' 末端脱磷酸化, 但不同的是于 37 °C 处理 15 分钟, 再于 56 °C 处理 15 分钟。于 1% SDS 和 100 mM NaCl 存在下, 65 °C 下加热该反应混合物以使酶失活, 然后用苯酚提取并用乙醇沉淀。

用大肠杆菌之 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段 (Biolabs) 填充突出的 5' 末端, 该反应于室温下在 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)、0.4 mM dNTPs、10 mM MgSO_4 、0.1 mM DTT、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA 缓冲液中进行 30 分钟。可按照制造商推荐的方法, 在 T4 噬菌体的 DNA 聚合酶存在下, 填充和/或消化突出的 3' 末端。

用 Biosearch 8600 型自动 DNA 合成仪, 按制造商推荐的程序以氰乙基基团呈 β 型保护的氨基磷酸酯 (phosphoramidites) 化学 (Sima et al., 1984; Giles, 1985) 方法合成寡核苷酸。

按照 Taylor 等人 (1985) 建立的方法, 用 Amersham 公司 (France, SA) 提供的试剂盒对寡核苷酸进行体外诱变。

按照制造商推荐的程序使用 Promega 公司 (Madison, WI, USA) 的 Erase-Base™ System 试剂盒, 借助核酸外切酶 III 和核酸酶 S1 以 Henikoff (1984) 的技术造成序列缺失。

用已连接的 DNA 转化感受态菌株: 对于质粒为大肠杆菌 MC 1060 ($\Delta(\text{lacIOPZYA})\phi\text{X74}$, galU, galK,

Str A^r, hsd R) (Casadaban et al. , 1983) 和 HB 101 (hsd S 20 , sup E 44 , rec A 13 , ara — 14 , pro A 2 , lac Y 1 , gal K 2 , rps L 20 , xyl — 5 , mtl — 1 , λ —) (Maniatis et al. , 1982) , 或对于噬菌体 M 13 之复制形式的衍生物则为大肠杆菌 T G 1 (△ (lac pro A , B) , sup E , thi , hsd D 5 / F' tra D 36 , pro A ⁺ , B ⁺ , lac I^q , lac Z △ M 15) (Gibson , 1984) 。所用 pol A 菌株是具有萘啶酮酸抗性 (Nal^r) 的 SF 800 菌株 (Stachel et al. , 1985) 。当大肠杆菌与大肠杆菌接合时, 利用 C 600 菌株 (thi — 1 , thr 1 , leu — B 6 , lac Y 1 , ton A L 1 , sup E 44 , λ —) (Maniatis et al. , 1982) 自发利福平抗性克隆 (C 600 Rif^r) (50 μg / ml) 作为受体菌株。

按照 Birnboim 和 Doly (1979) 的技术纯化质粒 DNA。按照 Klein 等人 (1980) 的方法小量制备质粒 DNA。

有关细菌部分的实验使用 LB 培养基 (Maniatis et al. , 1982) 。在 LB 培养基中和 30℃ 保温温度下培养脱氮假单胞菌 S C 510 Rif^r、瘤病土壤杆菌 C 58 C 9 (Cameron et al. , 1989)、臭味假单胞菌 K T 2440 (Bagdasarian et al. , 1981) 和苜蓿根瘤菌 102 F 34 (Leong et al. , 1982) 。

按已述方法 (Ditta et al. , 1980) 进行接合。将参予接合之各细菌的 10⁹ 个细胞经过滤吸附到 0.45 μm 微孔滤膜上。在 LB 培养基上 37℃ 保温该滤膜后将细胞悬浮在 1 ml 的

10 mM $MgSO_4$ 中。然后再将细胞悬浮液的稀释液涂布在添加了适当抗生素的LB培养基上。

实施例1：质粒pXL1635的构建

本实施例举例说明如何构建不能迁移的、具有高度分离稳定性的多宿主载体。

实施例1.1：得到丢失mob座位之pRK290的衍生物

本实施例举例说明如何使RK2的衍生物上缺失RK2的mob座位。

鉴于不清楚在靠近mob座位处有何独特的限制性位点，因而给缺失该座位带来困难。在这种情况下，如果使用已描述过的核酸外切酶BamHI，则将有可能进行体外缺失（Maniatis et al., 1982）。为了进行上述缺失，须在RK2的mob座位引入一个独特的限制性位点。为此，我们按照Taylor 等人（1985）的技术，分下述三个步骤在一小片段上进行定位诱变：首先将含有转移原点（ori T）的RK2的片段再克隆到噬菌体M13的噬菌体衍生物中，进行定位诱变以便引入一个独特的限制性位点；其次将如此突变的片段再克隆到质粒pUC13（Viera et Messing, 1982）上，然后将携带卡那霉素抗性基因的暗盒克隆到存在于转移原点内的限制性位点上；第三，经双重重组将突变的片段与由pRK290携带的野生片段交换。所产生的质粒即是在转移原点水平上具有独特限制性位点的pRK290衍生物。这样便有可能通过核酸外切酶，然后是DNA连接酶的作用经诱变完成缺失目的。有关构建细节如下文所述。

将足以以cis得以迁移的RK2之760 pb Hae II片段

(Guiney et Yakobson, 1982)克隆到 M13mp10 (Viera et Messing, 1982)中。该片段含有 RK2 的转移原点 (Guiney et Yakobson, 1983), 并且当其克隆到质粒上时, 可由 RK2 的 tra 功能提供以 trans 迁移的转移原点。由对 RK2 的 Hae II 消化开始纯化该片段, 并用 T4 噬菌体的 DNA 聚合酶消化末端。另外, 经 Pst I 和 Sst I 消化使可复制形式的噬菌体 M13mp10 线性化; 并用 T4 噬菌体的 DNA 聚合酶消化其末端。连接如此制得的复制形式并已纯化的片段, 然后用以转化感受态大肠杆菌 TG1 的细胞。按已述方法 (Viera et Messing, 1982) 检测这些重组噬菌体。将所得到的复制形式定名为 pXL1418 (参见图1)。

也已公开了含有 RK2 转移原点的 112 pb 之 Hpa II 片段的序列 (Guiney et Yakobson, 1983)。该片段包含于 pXL1418 之 760 pb HaeII 片段中。已观察到它存在一个反向重复序列, 且各重复序列均可形成有 19 pb 的发夹结构 (参见图2)。按照 Taylor 等人 (1985) 建立的方法, 对由这一复制形式开始制得的一小的噬菌体 DNA 进行定位诱变。所用的寡核苷酸具有下示序列: 5' — CCC GTT GAG CTC CGC CAG GTG C — 3'。图2中列出了 112 pb 之 Hpa II 片段及寡核苷酸的序列; 如该图所示, 寡核苷酸序列与该片段的序列只有一个核苷酸不同; 经这一突变而引入了 Sst I 位点。首先证实寡核苷酸与用复制形式之 pXL1418 感染大肠杆菌 TG1 所得到的单一小 DNA 片段完全互补。为此可使用所研究的寡核苷酸作为核苷酸序列的起始部分。已清楚地观察到所发生的序列反应。已显示出该核苷酸序列, 并且前

面的碱基相当于图 2 中上一列的右侧端序列。

按已述方法进行上述诱变。得到一个在所期望的位置上引入了适当 Sst I 位点的突变克隆。将其中一个复制形式的突变克隆定名为 PXL 1454 (参见图 1)。

下述步骤旨在将含有抗生素抗性基因的暗盒引入 Sst I 位点, 以使其中存在供选择的标志。为此, 用 Sst I 处理 PXL 1461 使之线性化, 然后与从 pUC 4KIXX (Pharmacia, France, SA) 纯化的 Sst I 片段连接。该 1.6 Kb 片段携带来自 Tn 5 转座子的卡那霉素抗性基因。在添加氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 培养基上转化之后, 选择重组体克隆。将如此得到的质粒定名为 PXL 1462 (参见图 1)。

将质粒 PRK 290 转化到大肠杆菌 pol A, SF 800 菌株 (Stachel et al., 1985) 中。由 RK 2 衍生的质粒可在该菌株中复制, 因为它们的复制并不依赖于大肠杆菌的 DNA 聚合酶; 而 pUC 13 则不能被复制。然后将 PXL 1462 转化到菌株 SF 800 / PRK 290 中。转化后, 将细菌铺敷在添加了四环素、卡那霉素和氨苄青霉素的 LB 培养基上。因为质粒 PXL 1462 不能在该菌株中复制, 所以要使该质粒具有这一抗性, 只有在两质粒之间进行同源重组。事实上, 这两种质粒共同具有携带转移原点的 760 pb Hae II 片段。这样, 在两质粒的同源区域间进行同源重组, 便可导致两复制子之间的融合。用限制性酶切法分析三种抗生素抗性克隆的质粒 DNA。经琼脂糖凝胶分析表明其只含有单一的质粒。经限制性酶切分析, 表明就转移原点水平来说, PXL 1462 与质粒 PRK 290 重组很好。由两复制子融合所得到的质粒具有两个

RK 2 的转移原点：一个是野生型的，一个则具有经诱变而引入的 Sst I 位点，以用于克隆携带卡那霉素抗性基因的暗盒（见图 3）。然后在添加四环素和卡那霉素的 LB 培养基中，用稀释的培养物培养含有这类质粒的克隆。因切除携带转移原点之 760 pb 片段之野生拷贝的 pUC 13 会发生简单重组，从而可在没有苄青霉素情况下选择之。既然 pUC 13 及其衍生质粒未被复制，已切除的质粒会立即丢失。在可以选择 pRK 290 和突变之复制原点标志的液体培养基中，经代表 60 次传代的一系列稀释培养后，将细菌涂布在添加同样抗生素的 LB 培养基上。将 2000 个菌落接种到相同培养基和添加氨苄青霉素的 LB 培养基上。得到 2 个对氨苄青霉素敏感的克隆。纯化由这些克隆携带的质粒，进行限制性酶切分析。分析结果表明，这些质粒完全符合于切除了 RK 2 转移原点之野生拷贝及 pUC 13 的质粒。该质粒被定名为 pXL 1561（见图 3）。既然该质粒具有两个与转移原点相应的 Hind III 位点，那么就有可能在经 Hind III 消化后再用核酸外切酶切割以实现缺失（见图 3）。为此，先用 Hind III 消化 pXL 1561，再用 Henikoff（1984）的技术进行一系列缺失：该技术中利用了核酸外切酶和核酸酶 S1 的连续作用：所得到的缺失是双向的。然后连接这些缺失，并用连接产物转化 MC 1060。用限制性酶切法分析如此得到之转化体的质粒 DNA。结果表明许多克隆经受了与 mob 座位相应的缺失。我们得到了缺失 3.5 Kb 的质粒。如果核酸外切酶相对于 Hind III 位点以两个方向相同的动力学消化质粒 DNA，则该缺失应有相对于质粒转移原点为 1.75 Kb 的缺失。将如此得到的质粒定名为 pXL 1570（见图 3）。

PXL1570 具有独特的限制性位点 EcoRI 和 Bgl II。我们试图在 EcoRI 位点处引入克隆的多位点，以便使所得质粒包含多个克隆位点。使用具有以两个 EcoRI 位点为边界之多克隆位点的质粒 pFR10 (Shapira et al., 1983) 作为多克隆位点的来源。同 PXL1570 一样，用 EcoRI 消化 pFR10。连接两消化产物，并将连接物转化到大肠杆菌 MC1060 中。将所得到的已确定了多位点取向的重组克隆定名为 PXL1594 (参见图 4)。

实施例 1. 2: 构建具有 RK2 之 par 座位的不可迁移的 PRK290 衍生物

本实施例举例说明如何将具有 RP4 之 par 座位的片段克隆到 RK2 衍生物上，以得到分离稳定的质粒。

将含 RP4 之 par 座位的 pGMA28 (Gerlitz et al., 1988) 的 2.2 Kb BamHI 片段纯化后，与用 Bgl II 线性化的 PXL1594 相连接。用该连接物转化大肠杆菌 MC1060。经限制性消化分析 24 个转化体的质粒 DNA，以及 3 个携带 2.2 Kb 片段的克隆。其中两个具有相同定向的片段，第 3 个则相当于相反定向。与前两个克隆相应的质粒命名为 PXL1635，而有另一取向之片段者则定名为 PXL1634 (图 4)。

如此得到的质粒是 RK2，更准确地说是 PRK290 的衍生物，它缺失转移原点周围的 3.5 Kb，整合了 RP4 的 par 区域，且还可以具有克隆的多位点。对于对称性克隆可依次利用下列位点：

EcoRI、BamHI、PstI、Hind III、ClaI、XbaI、XhoI 和 SstI；对于非对称性克隆应排除 EcoRI，但可使用其

他的酶。

实施例 2: PXL 1635 的迁移

已研究过 PXL 1635 的迁移。这种迁移是基于从大肠杆菌到大肠杆菌的接合转移而达到的。按照 Ditta 等人已述及的技术, 利用下列菌株进行三对间的转移:

—携带迁移质粒的菌株: HB 101 (PXL 1635) 或 HB 101 (PRK 290) 或 HB 101 (PXL 1570) 或 HB 101 (pUC 9tet)。

—含有 RK 2 衍生物迁移所需之“辅助”质粒的菌株。

—受体菌株: C 600 Rif^r。

质粒 pUC 9tet 得自 Pharmacia France S. A.; 其为不能迁移的、pBR 322 衍生的质粒, 并被赋予与 PRK 290、PXL 1635 和 PXL 1570 相同的抗性。

在添加四环素和利福平的 LB 培养基上选择转移接合体。按常规方法 (Ditta et al., 1980), 根据有效地获得质粒抗性之受体细胞数对受体细胞总数之比计算接合的频率。用 HB 101 作供体菌株进行接合。这涉及到 rec A 菌株, 它可避免了因具有同源序列而在 PRK 2013 与 PXL 1570、PRK 290、PXL 1635 和 pUC 9tet 之间发生同源重组的可能性。

表: RK 2 的衍生物由大肠杆菌 HB 101 向
C 600 Rif^r 接合的频率。试验细节如正文所述。

一: 无供体质粒

质 粒	接合频率
P X L 1 6 3 5	$< 10^{-5}$
P X L 1 5 7 0	$< 10^{-5}$
P R K 2 9 0	0.2
—	$< 10^{-8}$
p U C 9 tet	$< 10^{-5}$

从上表可以清楚地看出, 根据 P X L 1 5 7 0 与 P R K 2 9 0 之接合频率间变动 (因数至少为 $2 \cdot 10^4$) 至几乎全部丢失, 可推知 mob 座位的丢失, 而这些质粒的差异只是 3, 5 Kb 的缺失。

P X L 1 6 3 5 与 P X L 1 5 7 0 具有相同的迁移特性。如前所述, 这里所观察到的与 P X L 1 5 7 0 和 P X L 1 6 3 5 的接合作用, 很可能是由于这些质粒 (直接衍生于 P R K 2 9 0) 与有相同源区域的 P R K 2 0 1 3 之间的同源重组所致 (Ditta et al., 1981)。该质粒 (不能迁移的) 控制 p U C 9 tet 以与 P X L 1 6 3 5 和 P X L 1 5 7 0 不同的频率迁移, 此表明这些质粒几乎完全丧失了迁移特性, 而且既使在所述实验中供体菌株是 rec A 细菌时也只能借助重组迁移 (在该实验中涉及不依赖于 rec A 的重组)。P R K 2 9 0 在二个大肠杆菌和两个革兰氏阴性菌之间的接合转移机制都是相同的, 不管是哪种宿主, 质粒 P X L 1 6 3 5 都被看作是不能迁移的。

实施例3：将 P X L 1 6 3 5 引入大肠杆菌以外的革兰氏阴性菌中

本实施例举例说明如何将质粒 P X L 1 6 3 5（非迁移性的）引入各种革兰氏阴性菌中。

既然质粒 P X L 1 6 3 5 不具有转移原点，便不可能由大肠杆菌向其他革兰氏阴性菌中迁移。为将 P X L 1 6 3 5 引入各种革兰氏阴性细菌中，可使用经电穿孔转化的方法（Wirth et al., 1989）。借助这一方法用质粒 P R K 2 9 0、P X L 1 5 7 0 和 P X L 1 6 3 5 转化下列细菌：

—脱氮假单胞菌 S C 5 1 0 R i f^r

—瘤病土壤杆菌 C 5 8 C 9

—臭味假单胞菌 K T 2 4 4 0

—苜蓿根瘤菌 1 0 2 F 3 4

对每种细菌均再次分离重组克隆；纯化质粒 D N A 表明与经过许多限制性消化的起始质粒没有差异。据此可将质粒 P X L 1 6 3 5 引入革兰氏阴性细菌中。

实施例4：P X L 1 6 3 5 的稳定性

本实施例举例说明在革兰氏阴性菌中为什么 P X L 1 6 3 5 比 P R K 2 9 0 更稳定。

不同的重组体细菌及其亲代菌株均培养于添加抗生素的 L B 培养基中。达到生长稳定期时进行 1 / 1 0 0 0 稀释。如此培养这些菌株达到平均 5 0 代（传代数估计为 5 0 代，包括在 4 0 — 6 0 代之间），然后将培养物稀释液分散到 L B 琼脂培养基上。对每份培养物，取 2 0 0 个独立的克隆转移到对质粒有选择性的培养基上。计算失去抗

性,因而也就是失去了质粒之克隆的频率。所得数值列于下表中。

表 各种革兰氏阴性细菌中PRK290、PXL1570
和PXL1635的丢失频率

菌株	PRK290	PXL1570	PXL1635
大肠杆菌MC1060	2	3	0
脱氮假单胞菌SC510Rif ^R	15	13	1
癌病土壤杆菌C58C9	25	27	0
臭味假单胞菌KT2440	1	2	0
苜蓿根瘤菌102F34	2	2.5	0

这些数值相应于在非选择性的LB培养基中培养50代后,丢失质粒抗性之克隆的频率(%)。

由此表可以清楚地看出, PXL1635比PRK290和PXL1570稳定得多; 这种特性对于所研究的所有细菌都是符合事实的。携带后两种质粒的克隆均以同样的频率丢失质粒; 从统计学上看所观察到的差异性并不显著。可见缺失3.5 Kb并不影响PRK290的复制特性和稳定性。相反, 克隆PGMA28的2.2 Kb片段对于引起稳定性的增加却是极为重要的。这些结果清楚地表明, 从稳定性角度看, 质粒PXL1635是一种比PRK290更为有利的质粒。其他的RK2衍生物同样保留了这些优点。对于工业应用来说, 按照已公开的材料, RK2之其他衍生物的优点要比PRK290少。

附图说明

图1: PXL1418、PXL1454、PXL1461和PXL1462的构建。有关构建细节如正文所述。

图 2: 含有 R K 2 之转移原点的 110 b p Hpa II 片段的序列 (据 Guiney et Yakobson, 1983)。标出了用于诱变之寡核苷酸的序列及所引入的 Sst I 位点。用箭头着重标示了两个应形成发夹结构的反向重复序列。

图 3: PXL 1561 和 PXL 1570 的构建。构建的细节如正文所述。

图 4: PXL 1594、PXL 1635 和 PXL 1634 的构建。

所用术语的定义与缩写

重组 DNA: 技术组合, 它们或者在同一微生物中使微生物固有的 DNA 序列相结合, 或者对特定 DNA 片段进行诱变。

ATP: 腺苷-5' 三磷酸

BSA: 牛血清白蛋白

Codon Stop: 转导终止密码子

dNTP: 2' - 脱氧核苷 5' - 三磷酸

DTT: 二硫苏糖醇

Kb: 千碱基

pb: 碱基对

参考文献

Références bibliographiques

Ausubel F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology 1987-1988. John Wiley and Sons, New York.

Bagdasarian, J. Frey, and K. Timmis. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16, 237-247.

Cameron B, K. Briggs, S. Pridmore, G. Brefort and J. Crouzet, 1989. Cloning and analysis of genes involved in coenzyme B12 biosynthesis in *Pseudomonas denitrificans*. *J. Bacteriol*, 171, 547-557.

Casadaban, M. J., A. Martinez-Arias, S. T. Shapira and J. Chou. 1983. β -galactosidase gene fusion for analysing gene expression in *Escherichia coli* and Yeast. *Methods Enzymol.* 100, 293-308.

Derbyshire, K. M. and N. S. Willets. 1987. Mobilization of the non-conjugative plasmid RSF1010: a genetic analysis of its origin of transfer. *Mol. Gen. Genet.*, 206, 154-160.

Ditta G., Schmidhauser T., Yakobson E., Lu P., Liang X.-W., Finlay D. R., Guiney D., Helinski D. R., 1985. Plasmids related to the broad host range vector pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid*, 13, 149-154.

Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helinski D. R., 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77, 7347-7351.

Gerlitz, M., O. Hrabak and H. Schwab. Abstract 8th International Biootechnology Symposium, 1988, A156, p. 129.

Giles, J. W. 1985. Advances in automated DNA synthesis. *Am. Biotechnol.*, Nov./Dec.

Guidelines for research involving recombinant DNA molecules; Notice. National Institute of Health, Federal Register, Vol. 51, No. 88, 16958-16965.

- Guiney, D. G. and E. Jakobson. 1983. Location and nucleotide sequence of the transfer origin of the broad host range plasmid RK2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3595-3598.
- Henikoff S. 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene*, 28, 351-359.
- Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi and D. Trollinger. 1988. Improved broad host range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene*, 70, 191-197.
- Kües, U. and U. Stahl. 1989. Replication of plasmid in gram-negative bacteria. *Mic. Rev.*, 53, 491-516.
- Leong, L. S., G. S. Ditta, and D. R. Helinski. 1982. Identification of a cloned gene coding for δ -aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* 257, 8724-8730.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Saurugger, P. N., O. Hrabak, H. Schwab and R. M. Lafferty. 1986. Mapping and cloning of the *par*-region of broad-host-range plasmid RP4. *J. Biotechnol.*, 4, 333-343.
- Schmidhauser, T. J. and D. R. Helinski. 1985. Regions of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 164, 446-455.
- Schmidhauser, T. J., G. Ditta and D. R. Helinski. 1988. Broad-Host-Range plasmid cloning vectors for gram-negative bacteria. In R. L. Rodriguer and D. T. Denhardt (ed.), *Vectors, a survey of molecular cloning vectors and their uses*, Butterworths, Boston.

Scholz, P., V. Haring, B. Wittman-Liebholt, K. Ashman, M. Bagdasarian and E. Scherzinger. 1989. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene*, 75, 271-288.

Shapira S. K., J. Chou , F. V. Richaud, and M. C. Casadaban. 1983. New versatile plasmid vector for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to lacZ gene sequences encoding enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase. *Gene* 25, 71-83.

Sinha, N. D., J. Biernat, J. McManus and H. Köster. 1984. Polymer support oligonucleotide synthesis, XVIII: Use of β -cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucl. Acids Res.*, 12, 4539-4557.

Stachel S. E., G. An, C. Flores and E. W. Nester. 1985. A Tn3lacZ transposon for the random generation of β -galactosidase gene fusions: application to the analysis of gene expression in Agrobacterium. *Embo J.*, 4, 891-898.

Stanburry, P. F. and A. Whitaker. 1984. Principles of fermentation technology. Pergamon Press, Oxford.

Taylor J. W., J. Ott and F. Eckstein. 1985. The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA. *Nucl. Acid Res.*, 13, 8764-8765.

Thomas C.M. 1986. Evidence for the involvement of the incC locus of broad host range plasmid RK2 in plasmid maintenance. *Plasmid*, 16, 15-29.

Trevors, J. T., T. Barkay and A. W. Bourquin. 1987. Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments: a review. *Can. J. Microbiol.*, 33, 191-198.

Viera J. and J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19, 259-268.

Wirth, R., A. Frieseneger and S. F. Fielder. 1989. Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet.*, 216, 175-177.

说明书附图

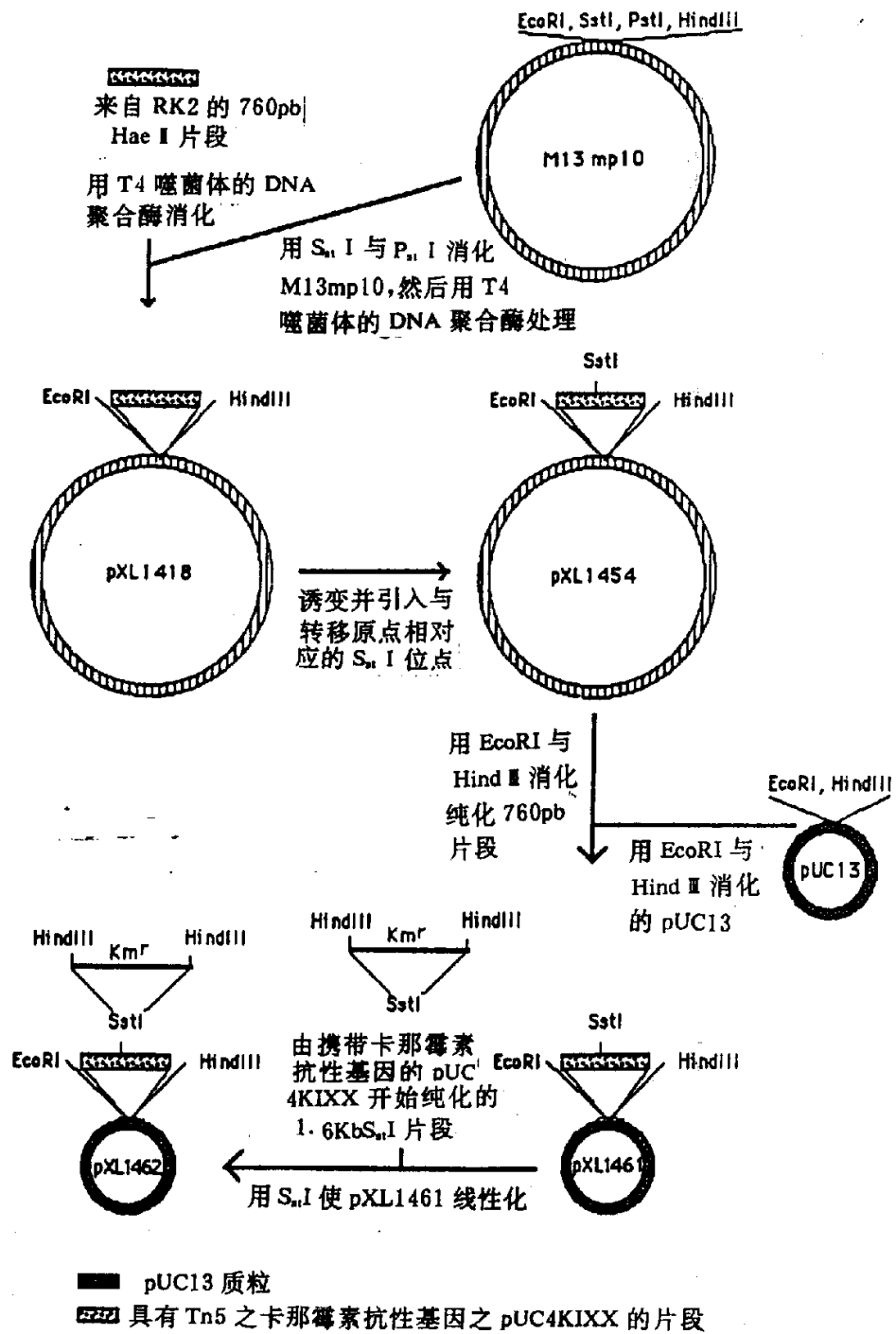


图 IV/1

引入 S_hI 位点诱变

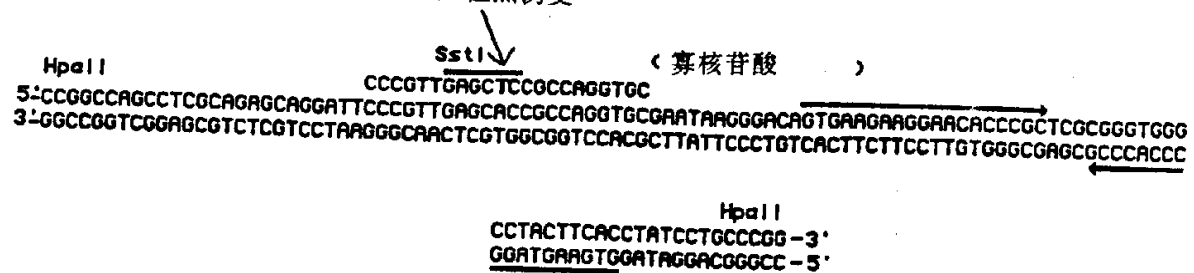


图 IV/2

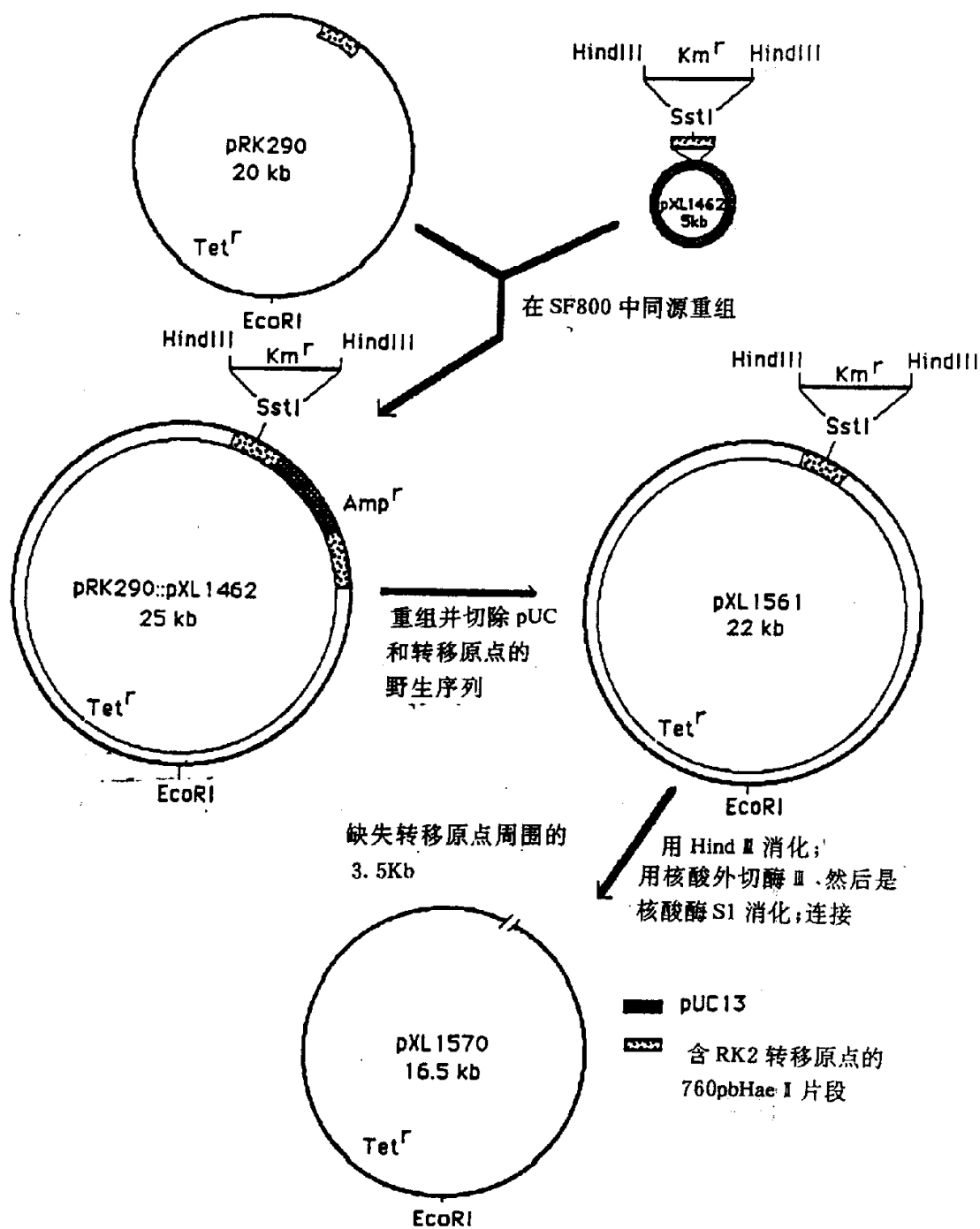


图 IV/3

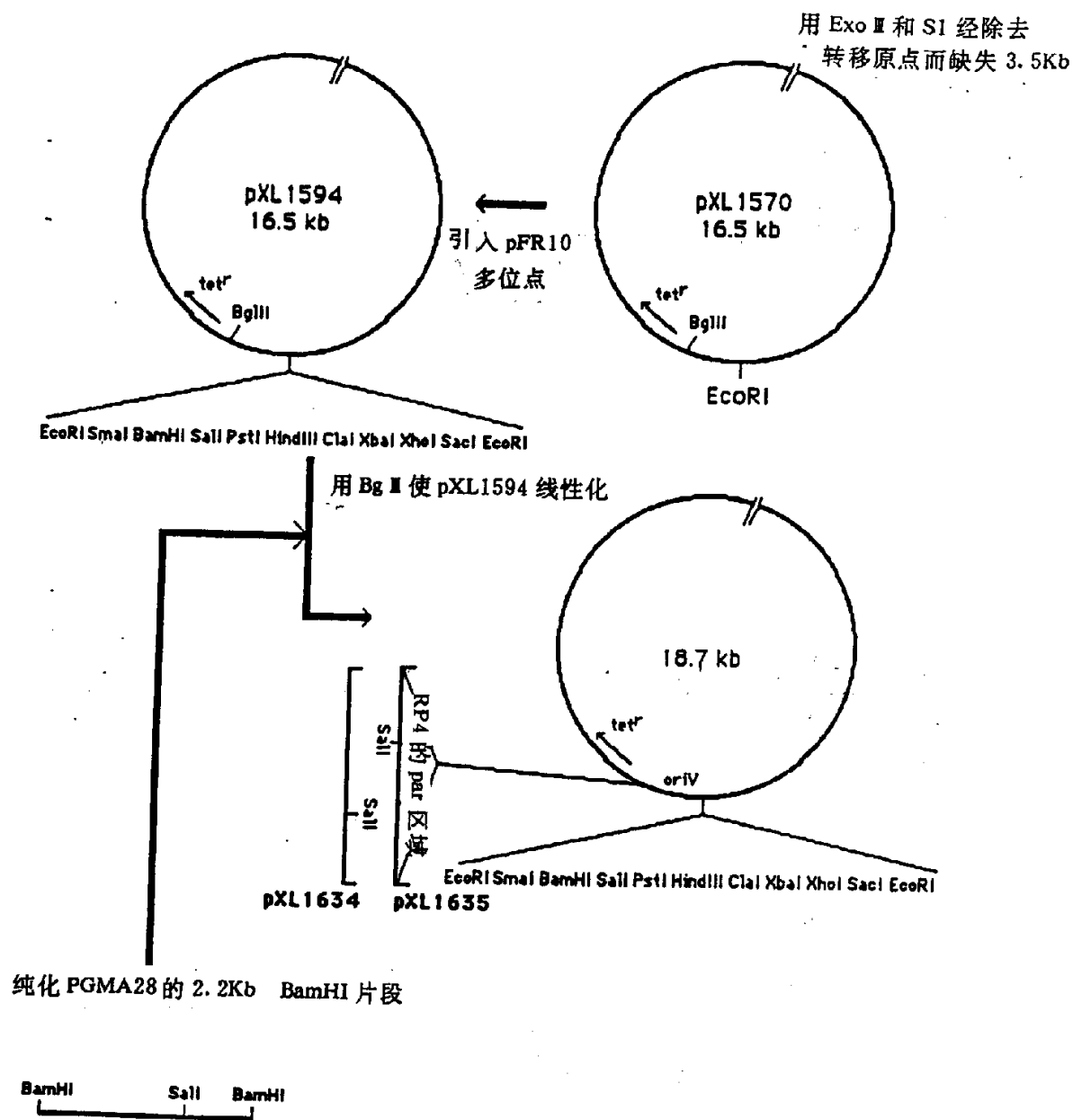


图 IV/4