

口腔链球菌丙酮酸氧化酶基因 调节区的 DNA 序列分析

章锦才 张蓉 张蕴惠

【摘要】 目的 了解口腔链球菌丙酮酸氧化酶基因调节区的分子结构。方法 将从口腔链球菌丙酮酸氧化酶基因 (*Sopox*) 的上游区序列体外扩增得到的,并经证明含有启动子活性的 1.30 kb 片段和 PBK-CMV 质粒 DNA 用 *Hind* Ⅰ 单酶切产物连接,转化 *E. coli* JM109,筛选阳性菌落,增菌后取质粒 DNA,再经 *Hind* Ⅰ 酶切鉴定。将阳性克隆进行 DNA 序列分析。结果 重组克隆酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示,获得约为 1.30 kb 的条带,与预计片段大小相符证实其为阳性重组克隆。重组克隆测序获得 *Sopox* 基因上游序列共计 1 350 bp。结论 *Sopox* 基因调节区序列的获得为进一步阐明口腔链球菌产生过氧化氢的分子机理奠定基础。

【关键词】 口腔链球菌; 丙酮酸氧化酶; 丙酮酸氧化酶基因; 调节基因

DNA Sequence Analysis for the Promoter of Pyruvate Oxidase Gene from *Streptococcus Oralis*

ZHANG Jincan^{*}, ZHANG Rong, ZHANG Yunhui. (^{*} Department of Periodontology, Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China)

【Abstract】 **Objective** To elucidate the molecular structure of pyruvate oxidase gene promoter. **Methods** The 1.30 kb fragment with promoter activity, amplified from upstream of *Streptococcus oralis* pyruvate oxidase gene (*Sopox*), was cloned into vector PBK-CMV. The positive transformed *E. coli* JM109 clone was selected, the recombinant plasmid was further identified with restriction mapping analysis. The positive recombinant plasmid was studied with sequence analysis. **Results** After digesting the recombinant plasmid with *Hind* Ⅰ, 1% agarose electrophoresis showed 1.30 kb fragment, which was consistent with predicted size. Sequence analysis revealed 1 350 bp. **Conclusion** The *Sopox* promoter region is sequenced. Further characterization of the *Sopox* promoter region will elucidate the molecular mechanism of H₂O₂ production of *streptococcus oralis*.

【Key words】 *Streptococcus oralis*; pyruvate oxidase; pyruvate oxidase gene; promoter

血链球菌和口腔链球菌通过丙酮酸氧化酶使丙酮酸盐氧化产生过氧化氢¹,从而在拮抗牙周致病菌、维护牙周健康中起重要作用²⁻⁵。为了阐明口腔链球菌等产生过氧化氢的调节机理,在对口腔链球菌丙酮酸氧化酶基因 (*Sopox*) 成功克隆和序列分析的基础上⁶,本课题组对口腔链球菌丙酮酸氧化酶基因的上游区序列进行了体外扩增,得到了 2.3 kb 左右的特异性条带⁷,将此片段克隆至启动子探针型载体 PKK232-8 中,证明该扩增片段中含有启动子活性。为了进一步了解口腔链球菌丙酮酸氧化酶基因调节区的分子结构,本实验将其克隆至真核表达载体 PBK-CMV 进行 DNA 序列分析。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种 *E. coli* JM109 及真核表达质粒 PBK-CMV (原华西医科大学感染免疫研究室提供),DNA 胶回收试剂盒 (上海华舜公司),限制性内切酶 *Hind* Ⅰ (GIBCO BRL 公司,美国),生化试剂 IPTG,5-溴-4-氯-3-吲哚-D-半乳糖苷 (X-gal) (华美生物工程有限公司),高速台式冷冻离心机 (Beckman 公司,美国),Biorad Model 200/20 电泳仪 (Biometra 公司,德国)。

1.2 重组质粒 DNA 的构建

在琼脂糖凝胶上分离目的片段 (1.30 kb) 后,切下含目的片段的胶条,使用华舜公司的小量胶回收试剂盒回收 DNA 片段,按其说明书操作。采用公司提供的缓冲液和推荐方法,对质粒 PBK-CMV 用 *Hind* Ⅰ 酶切,酶切完成后用 2 倍无水乙醇沉淀,10 000 r/min 离心 5 min 收集 DNA,70% 乙醇洗涤,干燥溶解于 DD H₂O 中。取 44 μl 溶于 DD H₂O 的酶切完全的质粒载体 DNA,加 1 μl 牛肠碱性磷酸酶及 5 μl 10 倍的缓冲液,37 反应 1 h,用等体积苯酚,氯仿/异式醇抽提后,2 倍无水乙醇沉淀

本课题为国家自然科学基金资助项目 (编号 39970793)

作者单位:510280 广东省口腔医院牙周科 (章锦才),四川大学华西口腔医院牙周科 (张蓉,张蕴惠)

12 000 r/min 离心 10 min, 70 % 乙醇洗净, 干燥将沉淀溶于 44 μ l DD H₂O。在总体积为 10 μ l 反应体系中按比例 (摩尔比 3 : 1) 加入供体 DNA 及载体 DNA, 再加入 1 μ l DNA 连接酶于 16 作用 30 min。

1.3 转化大肠杆菌 *E. coli* JM109

采用氯化钙法制备大肠杆菌 JM109 感受态细胞⁸。取 2 μ l 连接产物于 EP 管中, 加入 200 μ l 感受态细胞, 轻轻混匀, 冰浴 30 min, 42 °C 热冲击 90 s, 冰浴 2 min, 加入 0.8 ml SOC, 37 °C 振荡 1 h, 将菌体涂布 LB 平板, 并加入 0.1 mmol/L IPTG 15 μ l, X-gal 20 μ l, 37 °C 培养 18 h, 至转化子长出。

1.4 重组克隆的筛选鉴定和序列分析

挑取琼脂板上的白色菌落接种于 5 ml 含抗生素 (10 mg/L 卡那霉素) 的 LB 培养液中 37 °C 振荡过夜, 取适量菌液, 抽提质粒 DNA, 以 *Hind* 酶切, 1 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 筛选阳性克隆。阳性克隆送 TakaRa 公司完成核苷酸序列分析。

2 结 果

2.1 重组克隆的酶切鉴定

将口腔链球菌丙酮酸氧化酶基因调节区 1.30 kb 酶切产物行胶回收后和 PBK-CMV 质粒 DNA 用 *Hind* 单酶切产物连接, 转化 *E. coli* JM109, 筛选得到 1 个单菌落, 增菌后取质粒 DNA, 再经 *Hind* 酶切鉴定。酶切产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳显示, 获得约为 1.30 kb 的条带, 与预计片段大小相符证实其为阳性重组克隆 (图 1)。

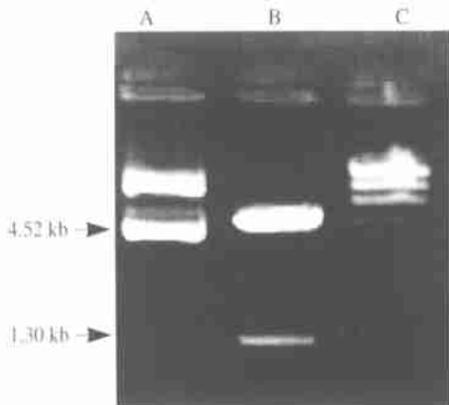


图 1 PBK-CMV 重组质粒 DNA 经 *Hind* 酶切后电泳图

Fig 1 Agarose electrophoresis map of *Hind* digested recombinant PBK-CMV

A 重组质粒 DNA; B 重组质粒 DNA 酶切; C DNA/*Hind*

2.2 口腔链球菌丙酮酸氧化酶基因调节区的测序

分别采用 T₇ 和 T₃ 引物对经酶切鉴定的重组克隆测序。由于片段较长, 一次不能测得全部序列。因此共进行了 3 个测序反应最后获得 *Sopox* 基因上游序列共计 1 350 bp。(见图 2, 黑体部分为测序引物与克隆酶切位点之间的载体序列) :

GCTGGA GCTCGC GCCTGCA GGTG CACTAGTGGG
 TCCAAA GAATTC AAAAA GCTTTAAAAA TAGTCGAGCCG
 GCTATACGACCCACAA GAACGTCATTA GTGAAATATTTGG
 TTGCCAAA TCAAGCTT ACCGACTA GTGTGATTAATATTTGGT
 TAACATGTGTTACAACATTC AACAACACCCGACTTTAAAA GC
 GGA GTATGTGGATC GAATTC GAATGGGGACAAA GTGG
 CATTCATTCACCA GAAAA GCAATTGAACATGTCAGAAATT
 GCCAAAACAAA GCCATACCAACAAAAACA CGGACAACAAA
 ATTATTCA GGGAAACGCCAACTGTTCGACAA GAGCGATTGC
 CAGAATGGCA GATCA GCCAAACGATGAAACAAAACCTTCCCC
 AGGAA GAACAA GCCGAGTATGATCGACAAATTC AAGAATTTT
 TAAACCAAGGAGGTGACCAATGATGGAA GACGTAGGAAAGA
 AATGTCAAAAATTATCCA GAA CGGTGACATCAAAATGACGAT
 ATGAA GAGCTGGTTAACGAA GTATTGAAA GATCAAGATGTTT
 AAGCCTTTATACAA GCAAACCGA GAGCGTTTAA CGGATGAA G
 ATATTTCGTA AAA GTTATGCTAA CGTGTATGAA TTTGTTC AAGA
 AAAAA GAAATTC AATTAAACGATCCA GCAATGATTCTCC
 AGGCTATGACCAA GATTAATGTGTGAATTTTCATTACATTGA
 TGTAACGATGTCCCAACGGCTGATTTAATC CCCC GTCAGAA
 GGAA GAA GAAATTCGTAATCGA GTAA GGGCAATGGACATGCC
 AAAAGATGTC CGAGAA GCAAAATTTACGAGATTTCGATCCATC
 TTCTCAAGGTCGAGCCAAA CGGTTA GCA GAA GCAATGCAATT
 TTAA GAGAAATCCTCCGACACCAAAA GAATTTTCATAAAAGG
 GATCTATTTACAA GGGCCCTTCGGTGTA GGAAAACTTTCTT
 ATTAGGTCCGATGGCTAATGCTTTA CCA GAACGTGGATTTAC
 TACGACAATTGTTCATTTTCCAACATTTACA GTA GAAATGAA
 CCAA GCCATTGGTCCGATCAA GTTGGTGAAAA CCTCGATGC
 AGTAAAAAAAATCCCTATATTAATGATTGATGACATTGGTGC
 GGAATCCATGACTAGTTGGATTCTGTGACGACGCTTTTAA CCGT
 AATCTTGCAA TACC GAATGCAA GAACAATTA GTTACTTTTTT
 CTCTTCCAA TCTAGATTTAAAA GCTTCTCGA GAGTACTTTC
TAGAGCGGCCGCGGGCCCATCGATTTTCCACCCGGG
TGGGGTACCAGGTAA GTGTACC

图 2 *Sopox* 基因上游序列

Fig 2 The sequence of *Sopox* promoter region

3 讨 论

质粒 PBK-CMV 是目前比较常用的真核表达质粒, 来源于美国 Stratagene 公司, 它除了具有真核表达质粒所必备的功能元件, 如真核表达启动子 CMV, 多克隆位点, 终止信号, 牛生长激素 P_{oly}(A), 真核表达抗性标志-SV₄₀, 启动子启动的卡那霉素抗性基因, 原核复制子等外, 还具有一个最大优点就是它在 810 ~ 1 183 bp 处含有 β -半乳糖苷酶基因 (*LacZ*), 该基因可通过 β -互补来使载体具有颜色筛选标志。具体原理是: PBK-CMV 含有 *LacZ* 的调控序列和头 146 个氨基酸的编码信息。在这个编码区中插入一个多克隆位点, 它并不破坏阅读框架, 也不影响功能。虽然质粒和宿主细胞编码的片段各自都没有酶活性, 但它们可以融为一体, 形成具有酶学活性的蛋白质, 从而使

LacZ 基因上缺失近操纵基因区段的突变体与带有完整的近操纵基因区段的 β -半乳糖苷酶阴性的突变体之间表现互补,即 β -互补。由 β -互补而产生的 *Lac*⁺ 细菌在显色底物 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷 (x-gal) 存在下形成蓝色菌落。当外源 DNA 插入到质粒的多克隆位点后,导致产生无 β -互补能力的氨基酸片段。因此,带有重组质粒的细菌形成白色菌落^{9,10}。通过 PBK-CMV 这种用颜色使重组子泾渭分明的特性使初筛工作量较那些只能靠酶切电泳的质粒大大减少⁹,另外,从物理图谱上可见 PBK-CMV 具有便于测序的公用引物 T₃ 和 T₇。综上所述,在本实验中笔者采用 PBK-CMV 作为载体至少具有以下优点: 便于测序; 阳性菌落筛选迅速简便; 有利于启动子活性片段的保存,笔者既然已经将此片段重组入 PBK-CMV,就可以直接从重组质粒中切下此片段再克隆至其他载体,如 PBV220 等,这比用 PCR 产物克隆要容易得多。

测定 DNA 核苷酸序列是分析基因结构和功能重要步骤。测序反应是利用引物与单链 DNA 模板相退火,在 DNA 聚合酶的作用下进行延伸反应,并在双脱氧核苷三磷酸作用下进行碱基特异性的链终止,然后采用聚丙烯酰胺凝胶电泳区分长度相差一个核苷酸的单链 DNA,从而完成测序反应。目前 DNA 测序反应可以通过自动测序仪来完成,但由于测序反应中模板 DNA 引物、DNA 聚合物、双脱氧核苷三磷酸受温度和时间等因素影响,大分子 DNA 尚不能一次完成全部序列的测定。本实验克隆片段长约 1.30 kb,因此通过 3 次反应,并再次设计引物,最后才获得了全部序列。

参考文献

- 1 Carlsson J, Kujala U. Pyruvate oxidase activity dependent on thiamine pyrophosphate, flavin adenine dinucleotide and orthophosphate in *streptococcus sanguis*. FEMS Lett, 1985, 25(1): 53-56
- 2 Hillman JD, Shivers M. Interaction between wild-type mutant and revertant forms of the bacterium. *Streptococcus Sanguis* and the bacterium *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* in vitro and in the gnotobiotic rat. Arch Oral Biol, 1988, 33(2): 395-401
- 3 Hillman JD, Socransky SS, Shiners M. The relationships between *streptococcal species* and periodontopathic bacteria in human dental plaque. Arch Oral Biol, 1985, 30(11-12): 791-795
- 4 Zhang J, Zhou C, Zhang Y. Investigation on interaction between *Streptococcus sanguis* and *Porphyromonas gingivalis* in specific pathogen-free rats. Chin J Dent Res, 2000, 3(4): 5-9
- 5 周村,章锦才,吴波,等. 血链球菌和牙龈卟啉单胞菌在 SPF 大鼠口腔中的相互作用. 华西口腔医学杂志, 1999, 17(4): 310-313
- 6 Zhang J, Hou B, Zhang R, et al. Pyruvate oxidase gene from *Streptococcus oralis*: Molecular cloning and sequence analysis of the gene. Chin J Dent Res, 2001, 4(2): 35-39
- 7 张蓉,张蕴惠,章锦才,等. 口腔链球菌丙酮酸氧化酶基因的调节基因体外扩增试验. 华西口腔医学杂志, 2000, 18(增刊): 19-20
- 8 萨姆布鲁克,弗里奇,曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 55-56
- 9 晏菊芳,鲍朗. 中国钩端螺旋体强毒株 017 膜蛋白基因的质粒载体构建及表达. 中华微生物和免疫学杂志, 1999, 19(2): 117-120
- 10 萨姆布鲁克,弗里奇,曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 57-59

(2002-09-05 收稿, 2003-05-20 修回)

(本文编辑 王晴)

《广东牙病防治》2004 年征订启事

《广东牙病防治》1993 年创刊,是面向全国公开发行的口腔医学专业期刊,为口腔医学临床、科研、教学服务。本刊入选中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊,中国学术期刊综合评价数据库来源期刊。本刊除开辟基础与应用研究、预防与社会医学、临床报告、综述、讲座、小知识等栏目外,还附送副刊《牙科信息》,主要介绍牙科市场动态、牙科器材信息、专业厂家介绍、医疗纠纷论坛等。

本刊为季刊,大 16 开本,国内外公开发行,国内统一刊号 CN44-1407/R,国际标准刊号 ISSN 1006-5245,邮发代号 46-225,欢迎订阅。如未能在邮局及时订阅,可直接从编辑部邮购。(全年订费 30 元)。

地址:广州市江南大道南 366 号《广东牙病防治》编辑部

邮编:510280 电话:020-84403311 传真:020-84445386

《广东牙病防治》编辑部