

麦迪霉素产生菌酮基还原酶基因在大肠杆菌中的表达*

夏焕章 王以光

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医药生物技术研究所 北京 100050)

摘要 用 PCR 法扩增麦迪霉素产生菌酮基还原酶(MKR)基因,得到约 0.8kb 的 DNA 片段,扩增片段重组到利用依赖 T7RNA 聚合酶的高效表达载体 pT7-7 中,在大肠杆菌中表达出 28.9kD 的蛋白质。表达的蛋白质具有生物活性。

关键词 麦迪霉素, 酮基还原酶基因, PCR, 大肠杆菌, 基因表达

分类号 Q939.92

聚酮体类化合物是由细菌、放线菌、真菌和植物产生的一系列各种结构的复杂次级代谢物。这类化合物生物合成基因的研究日益深入,但由于不易获得足够的材料,所以聚酮体类化合物的生物合成机制和酶学的体外研究很难进行。在合适的大肠杆菌或链霉菌表达系统中克隆和表达链霉菌基因可以克服这一难题。麦迪霉素产生菌酮基还原酶基因的功能和序列已经报道^[1],这个基因已经确定可以互补放线紫红素和阿克拉菌酮生物合成途径中的酮基还原酶基因。在麦迪霉素产生菌中该基因参与决定孢子色素的聚酮体的生物合成(待发表)。为详细研究其性质,我们在大肠杆菌中表达了该基因。本文报道了在大肠杆菌中使用可诱导的 T7 启动子表达麦迪霉素产生菌酮基还原酶基因的结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 (*E. coli*) DH-5 α 为构建 pT7-7 衍生质粒的宿主菌;大肠杆菌 (*E. coli*) K38[HfrC(λ)] 为质粒 pT7-7、pGP1-2 的宿主菌;加利利链霉菌 ATCC31671^[2] 由上海医工院朱春宝教授提供。pCBS1 是由麦迪霉素产生菌酮基还原酶(MKR)基因与 pWHM3 构成的重组质粒^[1]; pT7-7(Amp^r) 为含 T7 启动子和 SD 序列的大肠杆菌高效表达载体, pGP1-2(Km^r) 为在 λ_{pl} 启动子下可表达 T7RNA 聚合酶的质粒,由 Stan Tabor 教授提供; pUC119 为本室保藏。

1.1.2 培养基:LB 培养基、M9 培养基均按文献 [3] 配制。GPS 培养基按文献 [4] 配制。

1.1.3 抗生素:氨苄青霉素 (Amp, ampicillin), 卡那霉素 (Km, kanamycin), 利福平 (Rm, rifampicin)。

1.1.4 酶和试剂:所用限制性内切酶 BamHI、BglI、HindIII、SalI、SmaI 为中国医学科学院友

* 国家自然科学基金重点资助项目。

收稿日期: 1996-05-23

谊开发公司产品, NdeI 为 Promega 公司产品。T4DNA 连接酶为 BRL 公司产品。5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal), 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 为 Promega 公司产品。Geneclean II^R kit 为美国 Bio101 公司产品。DNA 合成试剂为美国 Applied Biosystem 公司产品。PCR 反应试剂盒为中国科学院遗传研究所产品。L-³⁵S-甲硫氨酸为英国 Amersham 公司产品。蛋白分子量标准为 Promega 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的操作: 质粒提取、限制酶酶切反应、DNA 连接、琼脂糖凝胶电泳等均按文献 [3] 方法进行, DNA 片段的分离与回收采用 Geneclean 试剂盒。

1.2.2 PCR 扩增: 质粒 pCBS1 用 HindIII 酶切完全, 再用苯酚和氯仿抽提纯化, 作为 PCR 反应扩增 MKR 基因的模板。在 MKR 结构基因的翻译起始端 (ATG) 合成了加有 NdeI 位点的 40mer 的引物 (primer I), 而在终止子 (TAG) 后也合成了含有 BamHI 位点的 20mer 的序列互补引物 (primer II) (图 1)。扩增时 DNA 模板的浓度为 100 ng, 引物浓度分别为 20 pmol, 反应循环 25 次, 反应温度及时间分别为 96℃ 1min, 50℃ 1min 和 72℃ 2 min。

1.2.3 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化: 按文献 [3] 方法进行。

1.2.4 ³⁵S 标记: 含有不同用 pT7-7 载体构建的重组质粒的大肠杆菌 K38[HfrC(λ)] / pGP1-2 在含有 50 μ g / ml Amp 和 50 μ g / ml Km 的 LB 培养基中, 30℃ 培养过夜。然后按 1:40 转种到含 Amp 和 Km 的新鲜 LB 培养基中, 30℃ 培养至 $A_{600} = 0.4$ 。取 1 ml 培养液离心收集菌体, 用 5ml M9 培养基洗涤二次, 菌体重新悬浮于 5 ml 含 0.01% 18 种氨基酸 (缺少半胱氨酸和甲硫氨酸) 的 M9 培养基中, 30℃ 培养 90min, 在 42℃ 水浴中诱导 20min 后, 加入终浓度为 200 μ g / ml 的利福平, 在 42℃ 水浴中继续培养 10min, 然后在 30℃ 培养 20 min。0.5 ml 菌体加入 10 μ Ci L-³⁵S-甲硫氨酸, 30℃ 培养 5 min。离心收集菌体, 菌体重新悬浮于 50 μ l 载样缓冲液中, 100℃ 煮沸 3 min。取 40 μ l 加样于 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上, 电泳完毕用考马斯亮兰染色, 干胶, 进行放射自显影。

1.2.5 蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 按文献 [3] 方法进行。

1.2.6 大肠杆菌表达的 MKR 在链霉菌中的生物活性检测: 将含表达质粒 pTMKP 的受体菌 *E. coli* K38 / pGP1-2 于含有 Amp 和 Km 的 LB 培养基中 30℃ 培养过夜。然后按 1:40 转种到含 Amp 和 Km 的新鲜 LB 培养基中, 30℃ 培养至 $A_{600} = 1.5$, 在 42℃ 诱导 2h。离心收集细胞, 重新悬浮在 10 mmol / L Tris-HCl (pH8.0) - 0.1 mmol / L DTT - 0.2 mmol / L PMSF - 1 mmol / L EDTA - 7.5% 甘油中。用超声波破碎细胞, 12 000r / min 离心 15min, 上清液为酶液。加利链霉菌 ATCC31671 在 50 ml GPS 培养基中, 28℃ 振荡培养 2d。取 25 ml 加入酶液, 另 25 ml 加入没有诱导的含表达质粒 pTMKR 的受体菌 *E. coli* K38 / pGP1-2 破碎细胞的上清液, 以此作为对照。28℃ 继续振荡培养 4d。然后用氯仿: 甲醇 = 9:1 提取, 提取液在 GF₂₅₄ 硅胶板上进行 TLC 层析, 溶媒系统为乙酸乙酯: 环己烷 = 1:1, 在 365nm 紫外灯下观察。

2 结果和讨论

2.1 MKR 基因的体外扩增

因为大肠杆菌的 RNA 聚合酶不能识别链霉菌的启动子, 为了在大肠杆菌中表达链霉菌

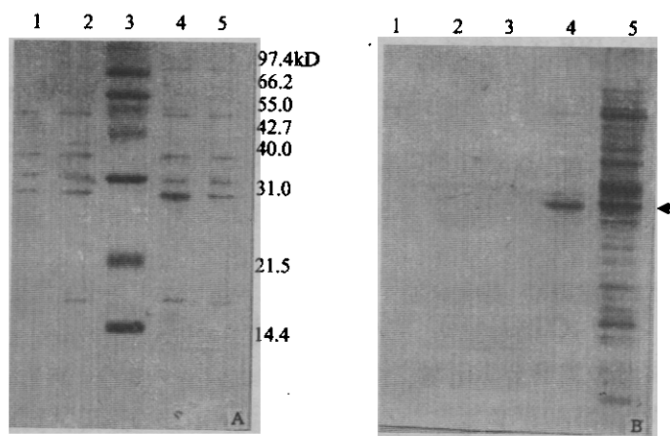


图4 大肠杆菌表达的 MKR 蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of MKR protein expressed in *E.coli*

A. Coomassie blue-stained gel of the insoluble fraction;

B. Autoradiography of ^{35}S -labeled protein.

1. *E.coli* / pGP1-2 induced; 2. *E. coli* / pGP1-2 uninduced; 3. Protein MW standard marker;
4. *E.coli* / pGP1-2/ pTMKR induced; 5. *E.coli* / pGP1-2 / pTMKR uninduced.

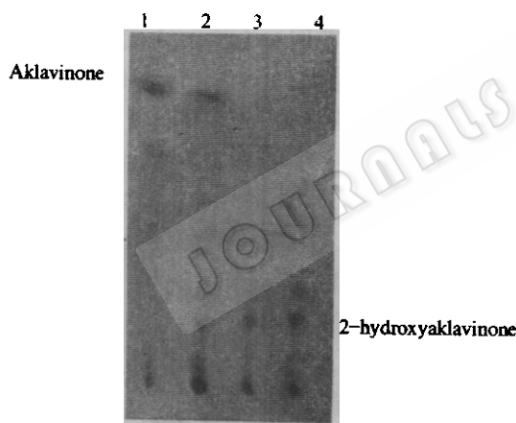


图5 加入大肠杆菌中诱导表达的 MKR 后加利利链霉菌 ATCC31671 发酵产物 TLC 图谱

Fig.5 TLC showing compound produced by *S. galilaeus* ATCC31671 added MKR expressed in *E.coli*

1. Aklavinone; 2. *E. coli* k38/pGP1-2 / pTMKR induced;
3. *E. coli* k38/pGP1-2/pTMKR uninduced;
4. 2-hydroxyaklavinone.

Aklavinone and 2-hydroxyaklavinone were a gift from Prof. Strohl W.

0.8kb 的 MKR 基因, 与 NdeI 和 BamHI 酶切的质粒 pT7-7 连接, 并转化大肠杆菌 DH-5 α , 以氨苄青霉素为抗性标记筛选到了转化菌株。经质粒 DNA 的提取, 限制性内切酶酶切分析, 证明重组质粒所带的外源 DNA 酶切图谱与 MKR 基因的酶切图谱相同, 重组质粒的结构是正确的, 其主要结构如图 3 所示。该质粒被命名为 pTMKR。

2.3 MKR 基因的诱导表达

将表达质粒 pTMKR 转化到具有 T7 RNA 聚合酶活性的受体菌 *E. coli* K38 / pGP1-2 中, 经 42 $^{\circ}\text{C}$ 诱导, L- ^{35}S -甲硫氨酸标记, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。考马氏亮兰染色和放射自显影结果表明: 以标准的蛋白分子量为标准, 经诱导的含重组质粒 pTMKR 的转化子产生了一条分子量约 28.9kD 的蛋白条带, 而未经诱导的转化子不产生此条带; 经诱导和未经诱导的含载体质粒 pT7-7 的转化子

也都不产生此蛋白条带(图 4)。经诱导产生的蛋白条带的大小与理论计算的分子量是相符合的。

2.4 大肠杆菌表达的 MKR 在链霉菌中的生物活性

已有报道聚酮体酮基还原酶是在聚酮体链合成后起作用,即将羧基端第九位碳原子上的酮基还原成羟基,然后经环化等一系列反应形成稳定的聚酮体化合物。加利利链霉菌 ATCC31671 是酮基还原酶缺陷菌株,其发酵产物为 2-羟基阿克拉菌酮;如果存在酮基还原酶,其产物为阿克拉菌酮。本实验结果表明:加入没有诱导的含表达质粒 pTMKR 的受体菌 *E. coli* K38 / pGP1-2 破碎细胞上清液于加利利链霉菌 ATCC31671 培养液,其发酵产物与加利利链霉菌 ATCC31671 产物相同,为 2-羟基阿克拉菌酮;加入诱导的含表达质粒 pTMKR 的受体菌 *E. coli* K38 / pGP1-2 破碎细胞上清液于加利利链霉菌 ATCC31671 培养液,其发酵产物中含有阿克拉菌酮(图 5)。这一结果说明在大肠杆菌中表达的 MKR,能参与链霉菌中聚酮体的生物合成,证明其具有生物活性。

麦迪霉素酮基还原酶基因能在大肠杆菌中成功地表达,而且表达的酮基还原酶具有生物活性。这一结果为进一步研究其功能及表达调控和底物特异性奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 夏焕章,王以光. 生物工程学报, 1994, 10 (3): 218~226.
- [2] Matsuzawa Y, Yoshimoto A, Shibamoto Y et al. *J Antibiot*, 1981, 34:959~964.
- [3] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.
- [4] Dekleva M L, Strohl W R. *Can J Microbiol*, 1987, 33:1129.
- [5] Gramajo H C, White J, Hutchinson C R et al. *J Bacteriology*, 1991, 173 (20):6475~6483.

EXPRESSION OF THE POLYKETIDE KETOREDUCTASE GENE FROM MIDECAMYCIN PRODUCING STRAIN IN *E. coli*

Xia Huanzhang Wang Yiguang

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences,

Peking Union Medical College, Beijing 100050)

Abstract Two primers were designed and synthesized according to the polyketide ketoreductase from midecamycin producing strain gene(MKR) sequence data which has been reported, MKR gene was amplified using PCR technique. The amplified MKR gene was subcloned into NdeI and BamHI sites of the T7RNA polymerase-dependent pT7-7 expression vector, and introduced into *E. coli* K38 / pGP1-2. Proteins were isolated from transformant. The result of exclusive labeling by L-³⁵S-methionine of plasmid-encoded proteins SDS-PAGE analysis showed that the MKR was produced in *E. coli*. The expressed MKR has bioactivity.

Key words Midecamycin polyketide ketoreductase gene, PCR, *E. coli* Gene expression