

青霉素酰化酶基因的克隆与表达

II 质粒pPA1的限制性酶切图及青霉素酰化酶基因的定位

吴汝平 杨胜利 姜增连 冯一民 杨莉娟 张继宝

(中国科学院上海药物研究所, 上海)

前文报道重组质粒pPA1中9.1kb的EcoRI片段上带青霉素酰化酶基因。用16种限制性内切酶消化pPA1, 其中Apa I, Kpn I, Sac I, Sma I及Xho I等六种内切酶在pPA1上无切口, BamH I, Cla I, Sph I, Bgl I为单切口, Sal I为双切口, Ava I, Hind III及Pvu II为三切口, EcoRV为五切口。经交叉双酶解法测定各片段的大小, 作出质粒pPA1的限制性酶切图。在包含青霉素酰化酶基因的9.1kbEcoRI片段上, Bgl I有一个切口, Ava I, Hind III及Pvu II都有两个切口, 而EcoRV有四个切口, Sal I, BamH I, Cla I及Sph I不切9.1kb的EcoRI片段。

Hind III切9.1kb EcoRI片段为A (3.5kb), B (2.7kb)及C (2.9kb)等三个片段。经Hind III部分水解后连接, 转化大肠杆菌HB101得到一系列带不同Hind III片段的质粒的转化子, 青霉素酰化酶活性测定证明其基因位于Hind III-A片段上。合成青霉素酰化酶仍需苯乙酸诱导, 并被葡萄糖阻遏, Hind III-B片段的的存在能增加青霉素酰化酶基因的表达, 而C片段无显著影响。

关键词 青霉素酰化酶, 限制性酶切图, 基因定位

随着半合成青霉素在临床上应用的品种和数量的日益增加, 以及研究新型半合成青霉素的需要, 作为原料的6-氨基青霉烷酸(6-APA)的需要量也越来越大。目前国内外大多用青霉素G酰化酶水解青霉素G为6-APA及苯乙酸。青霉素G酰化酶可由大肠杆菌和巨大芽孢杆菌产生。大部分国家用大肠杆菌生产青霉素G酰化酶。为了得到高比活性的产青霉素G酰化酶, 一些国家采用遗传工程手段克隆青霉素G酰化酶基因^[1-4]。西德已成功地用工程菌来生产6-APA^[5]。但对青霉素酰化酶基因的限制性酶切图、基因结

构、遗传分析及基因调控等基础理论研究尚未见报道。前文叙述了大肠杆菌D816染色体上的青霉素酰化酶基因克隆到质粒pBR322上得到重组质粒pPA1, 以及在大肠杆菌HB101和大肠杆菌C600中表达^[6]。本文报道带有青霉素G酰化酶基因的重组质粒pPA1的限制性酶切图及基因定位。

材料与 方法

(一) 菌种与质粒

大肠杆菌HB101 (hsd R⁻, hsd M⁻,

本文于1985年1月6日收到。

recA13, supE44, lacY).

大肠杆菌C600 (*thr, leu, thi, supE46, lacY, tonA, F⁻*).

pPA1为带青霉素酰化酶基因的pBR322杂种质粒^[6].

质粒pRk733.2为pBR322-R6K复合复制子2.4kb,带氨基青霉素(Ap)抗性标记^[7].

pACYC184为遗传工程常用质粒,带四环素(Tc)及氯霉素(CM)双抗性标记^[8].

抗生素加量: Ap 50 μ g/ml, Tc 10 μ g/ml, CM 25 μ g/ml.

(二) 培养基与培养条件

LB液体培养基用于提取质粒及转化DNA; LB固体培养基加1.5%琼脂.

检测转化子青霉素酰化酶活性时所用培养基(%): 蛋白胨1, 酵母粉1, NaCl 0.5, pH8.0, 0.2%苯乙酸用作为诱导剂.

培养温度: 24 $^{\circ}$ C, 200转/分, 试管或摇瓶培养.

(三) DNA体外重组方法

质粒DNA的提取、转化、酶切、电泳及体外重组方法参照文献[9—12].

(四) 青霉素酰化酶活性测定

用3-苯乙酰胺-6-硝基苯甲酸(NIP-AB)为底物测定青霉素酰化酶活性, 具体方法参照文献[13].

结 果

(一) 质粒pPA1的限制性酶切图

前文报道^[6]质粒pPA1是由pBR322带有复制区段及Tc抗性基因的EcoRI-Pst I片段. *E. Coli* D816染色体DNA大小为0.8kb的EcoRI-Pst I片段和带青霉素酰化酶基因, 大小为9.1kb的EcoRI

片段等三部分组成. 为进一步确定青霉素酰化酶基因在EcoRI片段上的位置及研究基因调控和青霉素酰化酶表达的关系, 必须了解在该片段上内切酶切点种类, 切点数目及其相对位置. 在所试验的十五种内切酶中, Apa I, Kpn I, Sac I, Sac II, Sma I及Xho I等六种在质粒pPA1上无限制性切点. BamH I, Bgl II, Cla I及Sph I等四种内切酶有一个切点; Sal I有两个切点; Ava I, Pvu II及Hind III有三个切点, 而EcoRV切pPA1成五个片段(图版I-A, B). 上述几种在pPA1上有切口的内切酶, 用交叉双酶解法切pPA1成不同大小的片段, 用枯草菌噬菌体Spp1 DNA的EcoRI酶切片段及 λ 噬菌体EcoRI酶切片段及Bgl II酶切片段的大小作为测量各片段分子量大小的标准, 计算各片段的大小. 根据其相等位置作出质粒pPA1的限制性酶切图.

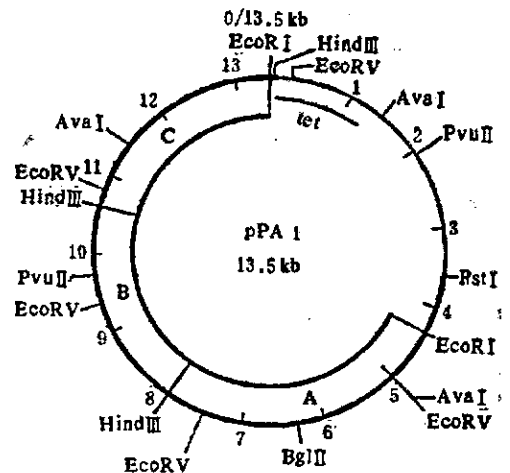


图1 质粒pPA1限制性酶切图

Fig. 1 Restriction map of the plasmid pPA1

图1所示, 带青霉素酰化酶基因的9.1kb EcoRI片段上, Bgl II有一个切点; Ava I、Pvu II及Hind III有两个切点, 而EcoRV有四个切点, BamH I, Cla I及Sph I只切载体pBR322, Sal I虽切pPA1

成两段，但两个切点都不在9.1kb EcoR I 片段上，其中一个切点在载体上，另一个切点在来自D816染色体的0.8kb EcoR I - Pst I 片段上（图泳图表示）。

(二) 质粒pPA2-pPA11的构建

pPA1的EcoRI 片段克隆到pRK733.2 的EcoR I 位置得 pPA2及pPA3两种质粒。用 EcoR I 酶切后在琼脂糖凝胶电泳上鉴

别，证明两者都由大小为9.1kb及2.4kb两个片段组成 Hind III 酶切后pPA2得5.7kb, 2.7kb, 3.1kb三个片段；pPA3得3.7kb, 2.7kb及5.1kb三个片段（图版 II -A）。虽然两种质粒所得三个片段的大小不同，但总分子量相等，故 pPA2及pPA3是插入片段方位相反的两质粒（图 2）。

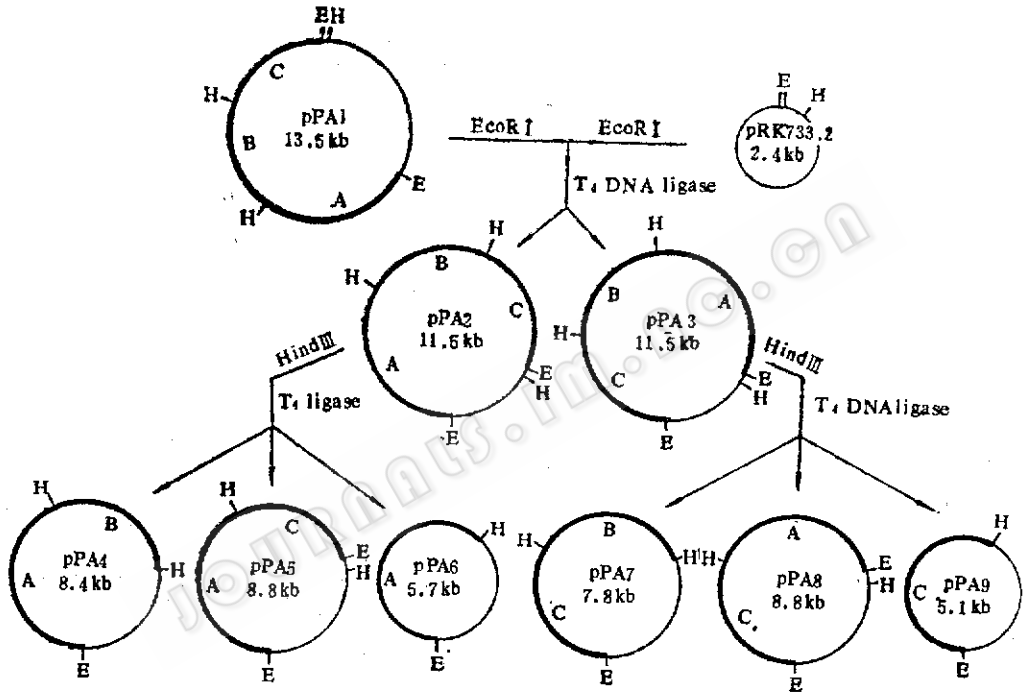


图 2 质粒pPA2-pPA9的构建
Fig. 2 Construction of the plasmid pPA2-pPA9

由图 2 可知，Hind III 在 9.1kb 的 EcoR I 片段上具有两个切点，可得片段分别称为 A 片段（EcoR I -Hind III 片段，3.5kb），B 片段（Hind III -Hind III 片段 2.7kb）和 C 片段（Hind III -EcoR I 片段 2.9kb）。为进一步了解编码青霉素酰化酶基因的位置，pPA2及pPA3分别用Hind III 部分酶解，T₄ DNA连接酶连接，得一系列带不同 Hind III 片段的重组质粒 pPA4-pPA9（图 2，图版 II -B）。但因Hind III - B 片段不与载体 pRK733.2 直接相连，用

Hind III 部分酶解法不可能得到只带 B 片段的质粒。为此，采用 pACYC184作为载体，用Hind III 分别酶解pPA1 及p ACYCY184，经连接得到只带有 Hind III -B 片段的质粒 pPA10 及只带 Hind III -C 片段的质粒 pPA11（图版 II -C、图 3）。

(三) 青霉素G 酰化酶基因的定位

表 1 指出用 NIPAB 法定性分析带 pPA2-pPA11质粒的转化子的青霉素 G 酰化酶活性。带质粒 pPA2 (A + B + C)，pPA3 (C + B + A)，pPA4(A + B)，pPA5

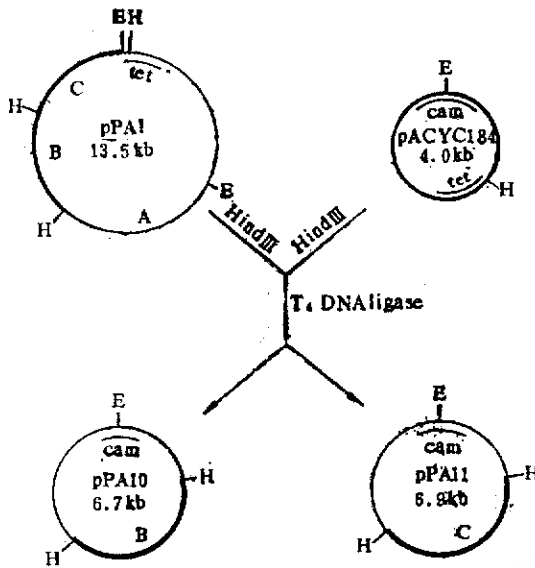


图3 质粒pPA10和pPA11的构建
Fig. 3 Construction of plasmids pPA10 and pPA11

表 1 青霉素G酰化酶结构基因定位

Table 1 The location of the structural gene of penicillin G acylase

菌株 Strain	重组质粒描述 Description of recombinant plasmid	青霉素G酰化酶活性 The activity of penicillin G acylase
<i>E. coli</i> HB101 (pPA 2)	pRK733.2 + A + B + C	+
<i>E. coli</i> HB101 (pPA 3)	pRK733.2 + C + B + A	+
<i>E. coli</i> HB101 (pPA 4)	pRK733.2 + A + B	+
<i>E. coli</i> HB101 (pPA 5)	pRK733.2 + A + C	+
<i>E. coli</i> HB101 (pPA 6)	pRK733.2 + A	+
<i>E. coli</i> HB101 (pPA 7)	pRK733.2 + C + B	-
<i>E. coli</i> HB101 (pPA 8)	pRK733.2 + C + A	+
<i>E. coli</i> HB101 (pPA 9)	pRK733.2 + C	-
<i>E. coli</i> HB101 (pPA10)	pACYC184 + B	-
<i>E. coli</i> HB101 (pPA11)	pACYC184 + C	-

(A + C), pPA6 (A)及pPA8(C + A)的菌株都显示出青霉素G酰化酶活性, 这些重组质粒都具有Hind III - A片段; 而带pPA7 (B + C), pPA9(C), pPA10(B), pPA11(C)等质粒的转化子无青霉素G酰化酶活性, 它们共同特点是质粒中无Hind III - A片段。

由此可见青霉素G酰化酶基因位于大小为3.5kb的Hind III - A片段上。

(四) Hind III - B及Hind III - C片段对青霉素G酰化酶基因表达的影响

前文报道^[6]带青霉素G酰化酶基因的克隆株C600 (pPA1) 仍具有亲株E.

表 2 Hind III-B及Hind III-C两片段对青霉素酰化酶基因表达的影响
Table 2 The effect of the fragments Hind III-B and Hind III-C on the expression of penicillin G acylase gene

菌 株 Strain	重 组 质 粒 描 述 Description of recombinant plasmid	青霉素 G 酰化酶比活性 (u/100ml) The specific activity of penicillin G acylase		
		不 诱 导	诱 导	诱导 + 葡萄糖
		Uninduced	Induced	Induced + Glucose
<i>E. coli</i> C600 (pPA 2)	pRK733.2 + A + B + C	12.1	36.2	0.9
<i>E. coli</i> C600 (pPA 4)	pRK733.2 + A + B	8.3	32.8	0.5
<i>E. coli</i> C600 (pPA 5)	pRK733.2 + A + C	3.0	7.7	0.7
<i>E. coli</i> C600 (pPA 6)	PRK733.2 + A	3.9	8.0	0.8

培养基: 1% 酵母粉, 1% 蛋白胨, 0.5% NaCl; 诱导加 0.2% 苯乙酸; 葡萄糖加 0.5%。

培养条件: 24℃, 48h, 200转/min, 40ml/100ml 三角瓶。

Medium: 1% yeast, 1% peptone, 0.5% NaCl, 0.2% phenylacetic acid for inducing; glucose 0.5%.

Cultural condition: 24℃, 48h, 200rpm, 40ml/100ml flask.

coli D816 的表达和调控特性: 葡萄糖阻遏青霉素G酰化酶产生, 苯乙酸诱导此酶合成。表 2 比较了苯乙酸及葡萄糖对大肠杆菌C600(pPA2), C600 (pPA4), C600 (pPA5) 及C600 (pPA6) 菌株合成青霉素 G 酰化酶的影响, 培养基中加入 0.2% 的苯乙酸后, 上述菌的青霉素G酰化酶的比活性增加了 3—4 倍。苯乙酸能促进细胞合成青霉素 G 酰化酶, 表明所有带这些质粒的菌株都未改变需苯乙酸诱导酶合成的特性。

在用苯乙酸诱导的培养基中, 再添加 0.5% 葡萄糖时, 上述菌株的青霉素酰化酶的比活性大大降低, 葡萄糖阻遏作用显著。

苯乙酸诱导后大肠杆菌C600(pPA2) 和C600(pPA4) 合成青霉素酰化酶的能力相似, 它们所带质粒中有 Hind III-A 和 Hind III-B 片段。大肠杆菌 C600 (pPA5) 及C600(pPA6) 都带有 Hind III-A 片段, 而都缺 Hind III-B 片段, 此两菌株的青霉素酰化酶活性无明显差异。但大肠杆菌C600 (pPA2) 及C600 (pPA4) 的酶活力约为

大肠杆菌C600(pPA5) 及C600(pPA6) 的四倍。推测 Hind III-B 片段对青霉素 G 酰化酶结构基因的表达起正调控作用。

讨 论

已知 9.1kb EcoR I 片段带青霉素酰化酶基因。青霉素 G 酰化酶前体的分子量大约是 90K 道尔顿^[14], 因此编码青霉素酰化酶的结构基因大约为 2.7kb。质粒 pPA1 的限制性酶切图表明, Hind III 在 9.1kb EcoR I 片段上有两个切口得 A (3.5kb)、B (2.7kb) 及 C (2.9kb) 三片段。为进一步阐明青霉素酰化酶基因在 9.1kb EcoR I 片段上的位置, 采用带 pBR322-R6K 复合复制子的质粒 pRK733.2 作为克隆 9.1kb EcoR I 片段的载体。pRK733.2 上有一个 Hind III 切口和二一个 EcoR I 切口, 在 9.1kb EcoR I 片段取代 pRK733.2 的 EcoR I 小片段后, 再用 Hind III 部分水解, 得到一系列带不同 Hind III 片段的质粒, 比较相应转化子的青霉素 G 酰化酶活性, 定出基因的位置。然而,

pRK733.2 的抗性标记是氨苄青霉素带 β -内酰胺酶基因,产生 β -内酰胺酶能使青霉素 G 裂解为青霉噻唑酸,因此不能用测定青霉素水解产生的 6-APA 量计算青霉素 G 酰化酶的比活性。本文采用 NIPAB 法测定,排除 β -内酰胺酶的干扰。虽然带 Ap 抗性标记的质粒不能作为工程菌的青霉素 G 酰化酶基因的载体,但并不妨碍用这类质粒进行青霉素 G 酰化酶基因的调控研究。

本文实验结果指出,青霉素 G 酰化酶基因位于 3.5kb 的 Hind III -A 片段上。大肠杆菌 C600(pPA6) 合成青霉素酰化酶仍需苯乙酸诱导,仍受葡萄糖阻遏。这表明在 Hind III -A 片段上不仅有青霉素酰化酶的结构基因及其启动子,还有调节基因、操纵基因和 CAP 结合位点,以致单独克隆 Hind III -A 片段的大肠杆菌 C600(pPA6) 与原种大肠杆菌 D816 有同样基因表达的调控机制。通常,诱导酶操纵子是阻遏物控制

的负调控系统,诱导物分子可与阻遏转录的阻遏物结合以解除抑制。阻遏物是调节基因的产物。乳糖操纵子的阻遏物是蛋白质^[15],而青霉素酰化酶操纵子的阻遏物是蛋白质还是 RNA 尚有待研究。

这些质粒的复制子来自 pBR322,通常带 pBR322 复制子的质粒拷贝数随分子量增大而减少;质粒 pPA2, pPA4 及 pPA6 的分子量分别为 11.5kb, 8.4kb, 及 5.7kb, 推测其拷贝数依次增加,因此表 2 中各个菌株青霉素酰化酶比活性的差异是基因剂量引起的。

带 Hind III (A + B) 片段质粒 pPA2 和 pPA4 的转化子要比只带 Hind III -A 片段质粒 pPA6 的转化子在诱导条件下合成青霉素酰化酶的量高四倍,推测在 Hind III -B 片段上有起正调控作用的基因,此基因产物是以 cis 或以 trans 调控还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Mayer, H. et al.: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance, pp. 459, 1979.
- [2] Meevootison, V. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1227, 1983.
- [3] Deretic, V. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.* 24:173, 1984.
- [4] Mayer, H. et al.: *Enzyme Engineering*, 5:61, 1980.
- [5] Schomer, U. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 47:307, 1984.
- [6] 杨胜利等: *生物工程学报*, 1 (1):29-35, 1985.
- [7] Kolter, R. and Helinski, D.R.: *J. Mol. Biol.* 161:45, 1982.
- [8] Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N.: *J. Bacteriol.*, 134:1141, 1978.
- [9] Birnboim, H.C. and Doly, J.: *Nucleic Acids Res.*, 7:1513, 1979.
- [10] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, pp104, 1982.
- [11] Cohen, S.N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2110, 1973.
- [12] Dugaiczkyk, A. et al.: *J. Mol. Biol.*, 96:171, 1975.
- [13] 张启先等: *微生物学报*, 19:302, 1979.
- [14] Eur. Pat. Appl. EP 107, 823 (cl. C12N15/00), 09 May 1984.
- [15] Beyreuther, K.: *The Operon*, pp123, 1980.

CLONING AND EXPRESSION OF THE PENICILLIN ACYLASE GENE

II. THE RESTRICTION MAP OF PLASMID pPA1 AND LOCALIZATION OF THE PENICILLIN ACYLASE GENE

Wu Ruping Yang Shengli Jiang Zhenlian
Fen Yiming Zang Jibo Yang Lijuan

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai)

The penicillin G acylase gene cloned from chromosomal DNA of *E. coli* 816 is located on the 9.1kb EcoR I fragment of recombinant plasmid pPA1. 15 restriction endonucleases were used to digest DNA of plasmid pPA1. Among them, Apa I, Kpn I, Sac I, Sac II, Sma I and Xho I could not cut pPA1 DNA; BamH I, Cla I, Sph I and Bgl II had single cleavage site on the DNA of plasmid pPA1, Sal I, had double, Ava I, Hind III and Pvu II had three and EcoRV had five cleavage sites. Using the method of double digestion to determine the size of each fragment, the restriction map of plasmid pPA1 has been constructed. The 9.1kb EcoR I fragment with penicillin G acylase gene contained single cleavage site of Bgl II, double sites of Ava I, Hind III and Pvu II, and four sites of EcoRV; Sal I, BamH I, Cal I and Sph I had no cleavage site.

The 9.1kb EcoR I fragment was cut with Hind III to three fragments called A (3.5kb), B(2.7kb) and C (2.9kb) respectively. A series of transformants harbouring plasmids with different Hind III fragments were obtained using partial digestion with Hind III and religation of the mixture. The structure gene of the penicillin G acylase was located on Hind III -A fragment by determining the penicillin acylase specific activity of various transformants. The synthesis of the penicillin G acylase in the hybrid strains was also induced by phenylacetic acid and repressed by glucose. The Hind III -B fragment increased the expression of the penicillin G acylase gene.

Key Words

Penicillin G acylase restriction endonuclease map; gene location

图 版 说 明

图 版 I Plate I

质粒pPA1的限制性内切酶酶切电泳图

The electrophoresis pattern of endonuclease cleavage sites on the plasmid pPA1/1%琼脂糖凝胶电泳
Electrophoresis was on a 1% agarose slab gel, 3 V/cm.

A: 消化pPA1的内切酶 pPA1 digested with following endonucleases: 2.EcoR I; 3.Ava I; 4.EcoR I + Ava I; 5.Bgl I; 6.Bgl I + EcoR I; 7.Bgl I + Ava I; 8.Hind III; 9.Hind III + Bgl I; 10.Hind III + EcoR I; 11.Hind III + Ava I; 分子量标准 Molecular weight standard: 1.EcoR I 酶切的 Spp1 EcoR I digested Spp1; 12.EcoR I 酶切的λDNA 及 Bgl I 酶切的 λDNA 的混合物。The mixture of EcoR I digested λDNA and Bgl I digested λDNA.

B: 消化pPA1的内切酶 pPA1 digested with following endonucleases: 2.Ava I; 3.Pvu I; 4.Ava I + Pvu I; 5.Bgl I + Pvu I; 6.EcoR I + Pvu I; 7.Hind III + Pvu I; 8.EcoR V; 9.EcoR V + Ava I; 10.EcoR V + Bgl I; 11.EcoR V + EcoR I; 12.EcoR V + Hind III; 13.EcoR V + Pvu I; 14.Hind III; 分子量标准 Molecular weight standard: 1.EcoR I 酶切的Spp1 EcoR I digested Spp1; 15.EcoR I 酶切的 λDNA 及 Bgl I 酶切的 λ DNA 的混合物 The mixture of EcoR I digested λDNA and Bgl I digested λDNA.

图 版 I Plate I

A: 质粒pPA2和pPA3的构建及方位电泳图

The agarose gel electrophoresis pattern for construction and orientation of the plasmids pPA2 and pPA3

1. 分子量标准Molecular weight standard: EcoR I 酶切的Spp1 Spp1 digested with EcoR I;
2. EcoR I 酶切的pRK733.2 pRK733.2 digested with EcoR I;
3. EcoR I 酶切的pPA1 pPA1 digested with EcoR I;
4. EcoR I 酶切的pPA2~pPA2 digested with EcoR I;
5. EcoR I 酶切的pPA3 pPA3 digested with EcoR I;
6. Hind III 酶切的pRK733.2 pRK733.2 digested with Hind III;
7. Hind III 酶切的pPA2 pPA2 digested with Hind III;
8. Hind III 酶切的pPA3 pPA3 digested Hind III;
9. 分子量标准Molecular weight standard: EcoR I 酶切的λ DNA λ DNA digested with EcoR I.

B: 质粒pPA2—pPA9的Hind III 酶切电泳分析

The electrophoresis analysis of the plasmids pPA2—pPA9 digested with Hind III

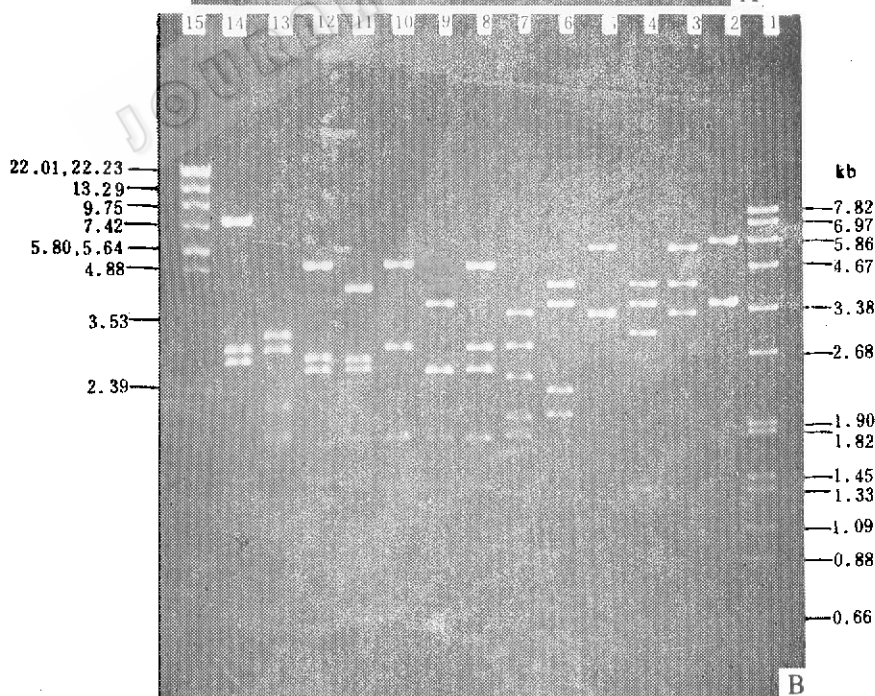
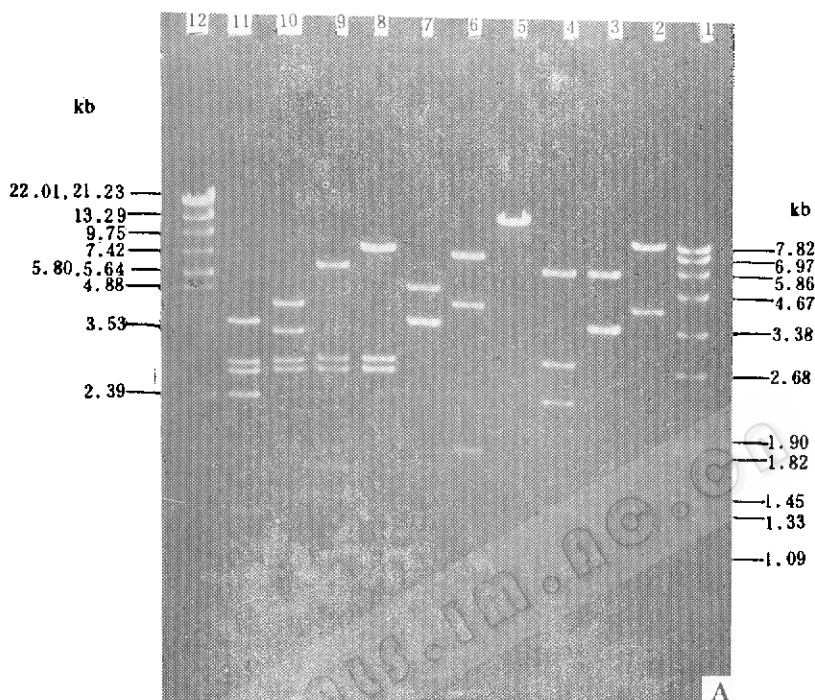
C: 质粒pPA10及pPA11的电泳图

The agarose gel electrophoresis pattern of the plasmids pPA10 and pPA11

1. Hind III 酶切的pACYC184 pACYC184 digested with Hind III;
2. Hind III 酶切的pPA1 pPA1 digested with Hind III;
3. Hind III 酶切的pPA11 pPA11 digested with Hind III;
4. Hind III 酶切的pPA10 pPA10 digested with Hind III;

A—C: 1%琼脂糖凝胶电泳, 3 V/cm

Electrophoresis was on a 1% agarose slab gel at 3 V/cm.



Wu Ruping et al.: Cloning and expression of the penicillin acylase gene II.

