

青霉素酰化酶基因的克隆与表达

IV. 宿主对青霉素酰化酶基因表达的影响

姜增莲 何建森 张继宝 杨莉娟 杨胜利 吴汝平

(中国科学院上海药物研究所, 上海)

选用带青霉素酰化酶基因的Hind III -A片段或Hind III -A及其邻接的Hind III -B, C片段的4种不同的质粒pPA2, pPA 4, pPA 5, pPA 6分别转化于4种大肠杆菌宿主A56, C600, HB101, MC1000得16种转化子并测这些转化子的青霉素酰化酶活力。结果表明:同一质粒在不同宿主中青霉素酰化酶基因表达程度有明显差别,其中以A56为最高,其次是C600和MC1000,而以HB101为最低。在所试验的4个宿主菌中青霉素酰化酶基因表达都具温度依赖性,而且Hind III -B片段对表达有相同程度的促进作用。用DNA-RNA点滴杂交试验测定青霉素酰化酶的信使RNA的量,发现同一质粒在不同宿主中信使RNA量的差异与酶活力的差异相一致。上述结果表明宿主在转录水平上影响了青霉素酰化酶基因的表达。

关键词 青霉素酰化酶; 大肠杆菌宿主菌; 基因的表达; 信使RNA

在青霉素酰化酶基因的克隆研究中我们发现重组质粒pPA 1在大肠杆菌宿主HB101和C600中表达水平相差2-3倍^[1]。基因定位研究表明青霉素酰化酶结构基因和调节基因在Hind III -A片段上,但邻接的Hind III -B片段对青霉素酰化酶基因的表达有促进作用^[2]。在这些质粒中青霉素酰化酶基因表达都受苯乙酸诱导和葡萄糖阻遏^[1],而且受温度调控,在28℃以下培养,细胞可有效地合成青霉素酰化酶,而在37℃几乎不合成酶^[3]。

本文进一步研究宿主与B片段促进作用和温度调控作用关系以及ReCA蛋白质与青霉素酰化酶表达的关系。

材料与 方法

(一) 材料

1. 菌种与质粒: 见表1。
2. 培养基及培养条件: LB培养基

用于提取质粒及转化。LBB培养基由LB培养基加0.5%牛肉膏, 1.5%琼脂用于转化。检测转化子的青霉素酰化酶活性所用培养基为(%):

蛋白胨1, 酵母粉1, NaCl 0.5, 苯乙酸0.2, 消前pH8.0。

培养条件: 质粒提取及DNA转化培养温度为37℃, 旋转式摇床上振摇培养, 摇床转速为200r/min。检测青霉素酰化酶活力发酵温度为22℃, 通气条件为250ml三角瓶装量150ml培养基, 旋转式摇床上振摇培养, 摇床转速为120r/min。

(二) 方法

1. 质粒DNA提取及DNA转化: 参照文献[4, 5]。

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

本文于1987年5月4日收到。

表1 菌种和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌种和质粒 Strains and plasmids	性 状 Description
<i>E. coli</i> A56	trpE5, recA56
<i>E. coli</i> C600	thr, leu, thi, supE46, lacY, tonA, F-
<i>E. coli</i> MC1000	F ⁻ , araD139Δ(araABC-leu)7679, galV, galK, Δ(lac)X74rpsL, thi
<i>E. coli</i> HB101	hsdR ⁻ , hsdM ⁻ , recA13, supE44, lacY, leu, proA ₂ , thi-1, Sm ^R
pPA2	pRK733.2+HindⅢ(A+B+C)
pPA4	pRK733.2+HindⅢ(A+B)
pPA5	pPK733.2+HindⅢ(A+C)
pPA6	pPK733.2+HindⅢ-A

3. RNA提取:用改良的 Aiba 法提取 RNA^[7], 大肠杆菌培养30—36h后, 4℃离心收集菌体, 菌体悬浮于0.02mol/L 醋酸缓冲液(pH5.5, 含0.5% SDS及1mmol/L EDTA)再加等体积醋酸缓冲液饱和的苯酚, 于65℃水浴中振荡保温10min, 离心收集上清液, 用异丙醇沉淀。沉淀溶于0.02mol/L 醋酸缓冲液后用苯酚-氯仿混合液脱蛋白, 再用异丙醇沉淀, 沉淀离心收集后溶于70%乙醇, 保存于-20℃低温冰箱。

4. DNA探针的制备:所需DNA片段用合适的酶从质粒上切出后, 经琼脂糖凝胶电泳分离并用DEAE81滤纸回收所需DNA片段, 所得DNA片段用缺口转移法进行标记。缺口转移法按 Rigby 等的方法进行^[8]。

5. DNA-RNA点滴杂交:DNA-RNA点滴杂交参照Casey法^[9], RNA样品于100℃加热10min变性后, 点样在经6×SSC溶液预处理的Zeta-probe blotting membranes(Bio Rad)滤膜, 在42℃洗涤, (溶液50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 0.1% SDS)保温2h后烘干, 然后转到杂交溶液中于42℃保温42h再加变性的DNA探针, 42℃水浴中继续保温12—18h, 滤膜用2×SSC缓冲

液冲洗后在0.2×SSC溶液浸泡1h, 烘干后放射自显影, 所得放射自显影底片用密度仪(Bio Rad Model 620 Video Densitometer)扫描, 定量分析mRNA量。

结 果

(一) 宿主对青霉素酰化酶基因表达的影响

将质粒pPA2, pPA4, pPA5, 和pPA6分别转化大肠杆菌HB101, A56, C600, MC1000, 其中HB101和A56为recA⁻变种, 但突变位点不同, 得16株重组菌株的青霉素酰化酶活力测定结果见表2。质粒pPA6中的青霉素酰化酶基因在大肠杆菌A56中表达最高; 在HB101中最低。这表明宿主对质粒上带有青霉素酰化酶基因的表达有明显的影响, 但与宿主的recA突变无明显相关性。

(二) 不同宿主中HindⅢ-B片段对青霉素酰化酶基因表达的影响

表2的结果还表明在同一宿主中带HindⅢ-B片段的质粒青霉素酰化酶基因的表达都高于不带B片段的质粒, 而在不同

表2 宿主对青霉素酰化酶基因表达的影响
Table 2 the effect of the hosts on the expression of pac gene

大肠杆菌 <i>E. coli</i>	酰化酶活性 Activity of acylase (u/100ml)	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	酰化酶活性 Activity of acylase (u/100ml)
A56(pPA2)	138.8	HB101(pPA2)	49.7
A56(pPA4)	119.7	HB101(pPA4)	32.8
A56(pPA5)	14.5	HB101(pPA5)	8.2
A56(pPA6)	29.0	HB101(pPA6)	12.6
C600(pPA2)	66.8	MC1000(pPA2)	57.0
C600(pPA4)	65.6	MC1000(pPA4)	60.5
C600(pPA5)	13.6	MC1000(pPA5)	11.7
C600(pPA6)	21.4	MC1000(pPA6)	17.4

宿主中, 宿主对带HindⅢ-B片段的质粒pPA2和pPA4及不带B片段的质粒pPA5和

表3 不同宿主中温度对青霉素酰化酶基因表达的影响
Table 3 The effect of the temperature in different hosts on the expression of pac gene

大肠杆菌 <i>E. coli</i>	青霉素酰化酶活性 (u/100ml) Activity of penicillin acylase		
	22°C	24°C	28°C
A56(pPA2)	163.0	107.0	48.0
C600(pPA2)	61.4	44.0	27.0
HB101(pPA2)	49.0	35.9	10.7
MC1000(pPA2)	59.2	42.9	26.0

pPA6 上的青霉素酰化酶基因表达的影响相同, 因此宿主不是通过B片段对基因表达产生影响。

(三) 不同宿主中温度对青霉素酰化酶基因表达的影响

所试的4种宿主中在22°C培养的细胞酶活力最高, 24°C次之而28°C最差, 在同一温度下仍显示了由于宿主的不同而引起的酶活力的差异(表3), 这些结果表明在不同宿主中温度对青霉素酰化酶表达的影响是相同的。

(四) 比较不同宿主中青霉素酰化酶 mRNA 量

用3.5kb的Hind III λ A片段作为探针,

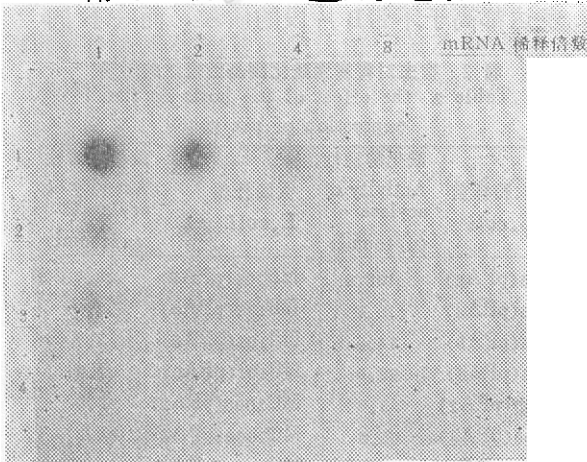


图1 4种宿主细胞青霉素酰化酶mRNA的点杂交
Fig.1. Dot hybridization of penicillin G acylase mRNA of four host strains

1. *E. coli* A56(pPA2)
2. *E. coli* C600(pPA2)
3. *E. coli* HB101(pPA2)
4. *E. coli* MC1000(pPA2)

分别检测 A56 (pPA2), C600 (pPA2), MC1000(pPA2)和HB101(pPA2) 细胞中的青霉素酰化酶的mRNA量, DNA-RNA点杂交结果如图1所示。在不同宿主中青霉素酰化酶的mRNA量有明显差异。用密度扫描仪测得各菌株的mRNA相对量: A56 (pPA2) 的mRNA量最高, 分别为HB101(pPA2)的6.0倍, 是C600(pPA2)的3.0倍和MC1000(pPA2)的4.5倍(图2)。

上述结果表明细胞中的mRNA量和各菌株的青霉素酰化酶活力是相应的, 即A56 (pPA2) 细胞在培养中产生的青霉素酰化酶的mRNA量最高, 所产生的青霉素

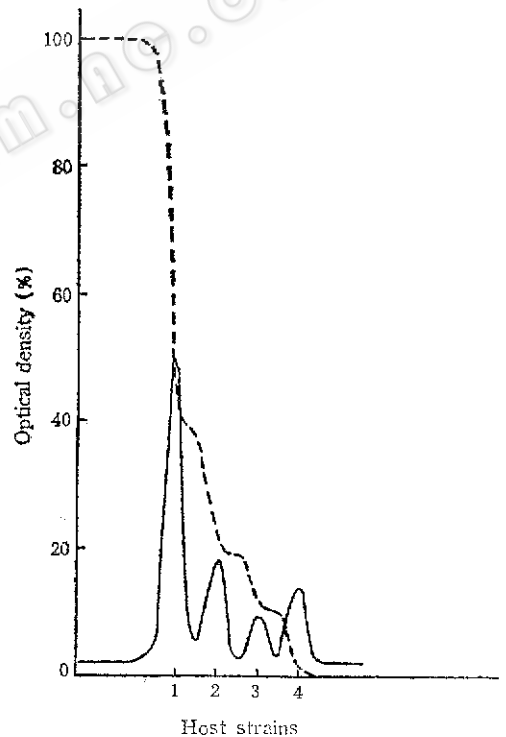


图2 宿主对pac基因mRNA浓度的影响
Fig.2 Effect of hosts on the mRNA concentrations of pac gene

— 光密度 Optical density
..... 积分线 Integral curve

1. *E. coli* A56(pPA2)
2. *E. coli* C600(pPA2)
3. *E. coli* HB101(pPA2)
4. *E. coli* MC1000(pPA2)

酰化酶的量也最多,其次是C600(pPA2),再次是MC1000(pPA2),而HB101(pPA2)细胞中的青霉素酰化酶mRNA量最少,因此青霉素酰化酶量也最少。

上述结果说明宿主对青霉素酰化酶基因表达的影响发生在转录水平。

讨 论

青霉素酰化酶是大肠杆菌 *pac* 基因的产物,活性的青霉素酰化酶由两个亚基组成,即 α 亚基和 β 亚基。它们是由一条单一肽链经翻译后加工产生的。青霉素酰化酶前体由信号肽- α 亚基-间隔肽- β 亚基组成,在易位到细胞质膜外的细胞周质时切除了信号肽,并在细胞周质中进一步加工移去间隔肽产生 α 亚基和 β 亚基,这两个亚基结合成活性的青霉素酰化酶^[10]。宿主对青霉素酰化酶基因表达的影响可发生在转录水平,翻译水平或翻译后加工水平。本文报道用DNA-RNA杂交试验证明宿主细胞对青霉素酰化酶基因表达的影响主要发生在基因的转录水平。

在克隆试验中发现C600(pPA1)和HB101(pPA1)对青霉素酰化酶基因的表达相差2—3倍^[1]。因大肠杆菌HB101属 *recA*⁻菌株,因此考虑RecA蛋白质在青霉素酰化酶基因表达中的调节作用^[11],本

文选择另一 *recA*⁻菌株大肠杆菌 A56 宿主进行试验,结果在A56中青霉素酰化酶基因的表达不仅比HB101高而且比两个 *recA*⁺宿主C600,MC1000也高,这可能宿主不是通过 *recA* 基因的产物影响基因的表达,但RecA蛋白是一个多功能蛋白,A56和HB101的 *recA* 基因突变位点不同,因此,也可能是由于突变的RecA蛋白质功能差异而对青霉素酰化酶基因表达产生不同的影响。

McCullough报道在青霉素酰化酶产生菌巨大芽孢杆菌的染色体上克隆到一段2.7kb的DNA片段,如把含有这2.7kb的DNA片段的质粒转化到巨大芽孢杆菌细胞中,能使青霉素酰化酶产量提高20%^[12]。在青霉素酰化酶基因定位研究中,我们发现与青霉素酰化酶基因邻接的2.7kb的Hind III-B片段对青霉素酰化酶基因表达有促进作用^[2],这个片段可能与巨大芽孢杆菌的2.7kb片段功能相似,但宿主对带Hind III-A片段和Hind III-A,B片段的质粒上青霉素酰化酶基因表达的影响是相同的,而且B片段在4个宿主中对青霉素酰化酶基因表达有相同程度的促进作用。同样,温度对青霉素酰化酶基因表达的影响在各宿主中也表现出平行的关系,因此,宿主、B片段、温度以各自独立的机制影响青霉素酰化酶基因的表达。

参 考 文 献

- [1] 杨胜利等:生物工程学报,1(1):29,1985.
- [2] 吴汝平等:生物工程学报,1(3):12,1985.
- [3] 杨胜利等:生物工程学报,4(1):32—37,1988.
- [4] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning*, pp.90, 1982.
- [5] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning*, pp.250, 1982.
- [6] 张启先等:微生物学报,19(3):302,1979.
- [7] Aiba, H et al., *J. Biol. Chem.*, 259:11805, 1981.
- [8] Rigby, P.N.J. et al., *J. Mol. Biol.*, 113:237, 1977.
- [9] Casey, J. & Davidson, N., *Nucl Acids Res.*, 4:1539, 1977.
- [10] Schumacher, G. et al., *Nucl Acids Res.*, 14(14):5713, 1986.
- [11] Craig, N.L. & Roberts, J.W., *Nature*, 283:26, 1980.
- [12] McCullough, J.E., *Bio/Technology*, 1(10):879, 1983.

CLONING AND EXPRESSION OF THE PENICILLIN ACYLASE GENE

IV. EFFECT OF HOSTS ON THE EXPRESSION OF PAC GENE

Jiang Zhenlian He Jiansen Zhang Jibo Yang Lijuan Yang Shengli Wu Ruping
(*Shanghai Institute of Materia medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai*)

Four different plasmids with the HindIII-A fragment of penicillin G acylase gene or HindIII-A and adjacent HindIII-B,C fragments were transformed into four *E. coli* host strains A56, C600, MC1000, HB101 respectively and sixteen transformants were obtained.

The expression levels of penicillin G acylase gene in different host strains harbouring same plasmid were different, among them, the highest expression was achieved in A56, the lowest in HB101 and moderate expression levels were observed in C600 and MC1000.

The expression of penicillin G acylase gene of four host strains were all dependent on temperature, moreover, the HindIII-B fragment enhanced the expression levels in these four strains to similar extent.

The amount of messenger RNA were determined using DNA-RNA hybridization. It was observed that the quantitative differences in cellular pac mRNA were in correspondence with activities of the penicillin G acylase in four strains.

From above results, It was demonstrated that the host strains affected the expression of penicillin G acylase gene at the transcriptional level.

Key words

Penicillin G acylase; *E. coli* host strains; gene expression; messenger RNA