

青霉素酰化酶操纵子为负调控模型

蒋巧玲¹ 吴汝平² 杨胜利¹

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海)¹

(中国科学院上海药物研究所, 上海)²

质粒pBR322用HindⅢ-BamHⅠ双酶切作为载体,从质粒pPA4上克隆含有pac操纵基因的HindⅢ-BglⅡ1.65kb的DNA片段,得到质粒pPA41。质粒pBR322和pPA41转化染色体上含有完整pac操纵子的大肠杆菌D816,进行操纵基因滴定。大肠杆菌D816、D816(pPA41)、D816(pBR322)在22℃摇瓶发酵96h,NIPAB法测定青霉素酰化酶活性。结果发现,在不加诱导剂时,D816(pPA41)产生的青霉素酰化酶是D816细胞的2.5倍;在加诱导剂时,D816(pPA41)产生的青霉素酰化酶是D816细胞的1.3倍。对照组D816(pBR322)细胞产生的青霉素酰化酶和D816细胞产生的几乎一致,说明质粒pPA41的竞争滴定作用确是其上克隆的操纵基因引起的。高拷贝的操纵基因(pPA41)和pac操纵子竞争结合调节蛋白,使得pac操纵子表达增加,说明调节蛋白在pac操纵子表达过程中起阻遏作用,调节蛋白为阻遏蛋白,pac操纵子为负调控模型。RNA-DNA点杂交检测pac基因表达,发现D816(pPA41)细胞转录产生的pac-mRNA量明显高于D816细胞,mRNA量和青霉素酰化酶活性呈现一致的趋势,证实了pac操纵子的负调控发生在转录水平。

关键词 青霉素酰化酶; 操纵子; 操纵基因滴定

操纵子系统中,结构基因的表达受到启动基因(p)、操纵基因(o)和调节基因(i)的控制,这三个基因共同调节结构基因的表达,使操纵子表现为正、负调控和诱导、阻遏的特性。大肠杆菌表达青霉素G酰化酶基因(Penicillin G acylase,pac)受苯乙酸诱导^[1],青霉素酰化酶操纵子属于诱导型,但诱导机制不清楚。如果诱导剂的作用是使阻遏蛋白失活而导致结构基因表达增强,则操纵子属于负调控诱导模型;如果诱导剂的功能是使激活蛋白活化而引起结构基因表达增强,则操纵子属于正调控诱导模型。鉴别操纵子的正、负调控,阐明苯乙酸的诱导机制,最直接的证据是操纵基因突变型的特征。

本文用“操纵基因”滴定阐明了苯乙酸的诱导机制,表明青霉素酰化酶操纵子为负调控模型,并用RNA-DNA点杂交证明操纵基因剂量在转录水平调控青霉素酰

化酶基因表达。

材料与方 法

(一)菌种与质粒

大肠杆菌D816为青霉素酰化酶产生菌,由上海第三制药厂赠送。

大肠杆菌C600(thr, leu, thi, supE36, lacY, tonA, F⁻)为基因工程研究常用宿主。

pBR322为遗传工程常用质粒,带四环素(Tc)及氨苄青霉素(Ap)双抗性标记。

质粒pPA4为pRK733.2衍生物,带有青霉素酰化酶基因及氨苄青霉素(Ap)抗性。

(二)试剂

本文于1991年4月24日收到。

^{32}P - α -dATP为Amersham产品,限制酶购自Boehringer公司。

(三)培养基及培养条件

LB液体培养基用于提取质粒和转化DNA, LB固体培养基加1.5%琼脂粉。

发酵培养基: 3%酵母浸膏干粉, 0.5%NaCl, 0.2%苯乙酸, pH7.8—8.0,

培养条件: 250ml三角瓶装150ml培养基, 在旋转式摇床上培养, 转速为180—200rpm。

(四)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[3—6]。

(五)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, 方法参照文献[7]。

(五)RNA提取

用异硫氰酸胍一步法提取RNA^[8]。大肠杆菌培养30—38h后, 离心收集菌体, 分别用异硫氰酸胍-酚-氯仿破壁去蛋白和DNA杂质, 用乙醇沉淀, 置-20℃保存。

(七)DNA探针制备

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, 用DEAE81滤纸回收, Cellulose小柱纯化所需DNA片段。所得DNA片段用缺口转移法进行标记^[9]。

(八)RNA-DNA点杂交

RNA-DNA点杂交参照Casey法^[10]。RNA样品用 $3\times\text{SSC}$, 7%甲醛溶解, 在50—55℃保温30min变性, 点样于Zeta-probe杂交膜上, 80℃烘2h。42℃条件下用 $2\times\text{SSC}$, 0.1%SDS洗3次, 预杂交2—4h。加入标记好的探针, 42℃杂交24—48h。65℃条件下分别用 $2\times\text{SSC}$, 0.1%SDS和 $0.1\times\text{SSC}$, 0.1%SDS洗3次。晾

干杂交膜, 放射自显影24—48h。

结果和讨论

(一)pac操纵基因的分子克隆

以前的实验和文献报道, 青霉素酰化酶操纵子受苯乙酸的诱导, 但诱导机制不清楚。鉴别诱导剂是失活阻遏蛋白还是活化激活蛋白, 可用操纵基因变种或操纵基因滴定。我们用高拷贝的操纵基因滴定调节蛋白, 去竞争低拷贝的完整操纵子上的操纵基因。以质粒pBR322作为克隆载体, 从质粒pPA4上克隆含有操纵基因的片段。pBR322用Hind III-BamH I双酶解, 质粒pPA4用Hind III-Bgl II切出1.65kb的片段, BamH I和Bgl II相同的粘性末端用T4DNA连接酶连结, 转化大肠杆菌C600, 在固体LB培养基上筛选Ap^r、Tc^r、NIPAB^r的转化子。转化菌落的质粒DNA经酶切电泳分析, 得到分子量为5.7kb带有pac操纵基因的质粒pPA41, 见图1所示。

(二)操纵基因滴定表明pac操纵子为负调控模型

构建好的质粒pPA41和载体pBR322分别转化染色体上带有完整pac操纵子的大肠杆菌D816。大肠杆菌D816、D816(pPA41)、和D816(pBR322)在有诱导剂和没有诱导剂的培养基中摇瓶发酵96h, 培养温度为22℃, 用NIPAB法测定三种细胞染色体上pac操纵子表达产生的青霉素酰化酶, 结果见表1所示。

在不加诱导剂时, 大肠杆菌D816(pPA41)细胞内调节蛋白分别和染色体上o基因和质粒上o基因竞争结合。质粒上多拷贝的o基因和染色体上单拷贝的o基因竞争的结果, 使得D816(pPA41)细胞内结合于染色体上o基因的调节蛋白明

显减少,远远少于D816细胞内结合于染色体上 σ 基因的调节蛋白,实验结果显示,

此时D816(pPA41)细胞合成青霉素酰化酶比D816细胞高2.5倍,见表1。

表1 操纵基因剂量对pac基因表达的影响
Table.1 Effect of operator dosage on the pac gene expression

Strain	Induction	Cell density (OD _{546nm})	Activity of penicillin acylase	
			u/100ml	10 ⁻³ u/OD
D816	-	11.0	6.30	5.73
D816(pBR322)	-	11.0	5.80	5.27
D816(pPA41)	-	10.5	15.12	14.40
D816	+	10.0	13.54	13.54
D816(pBP322)	+	9.5	12.60	13.26
D816(pPA41)	+	10.0	17.96	17.96

在加诱导剂时,大肠杆菌D816(pPA41)细胞内调节蛋白不仅受染色体和质粒上 σ 基因的竞争,还受苯乙酸的竞争结合,这样质粒上的 σ 基因对染色体上 σ 基因的竞争作用有一部分被苯乙酸的竞争所抵消,结果D816(pPA41)细胞合成青霉素酰化酶是D816细胞的1.3倍,见表1。

按照负调控模型, σ 基因是阻遏蛋白结合的部位, σ 基因的缺失使阻遏蛋白失去作用部位,而使结构基因表达处于去阻遏状态。D816(pPA41)细胞青霉素酰化酶基因的表达比原种细胞D816强,是由于在质粒pPA41上的 σ 基因拷贝数可达20以上,与调节蛋白结合降低了细胞内游离调节蛋白浓度,青霉素酰化酶基因表达处于部分去阻遏状态。由此可见,青霉素酰化酶操纵子属于负调控模型,苯乙酸的诱导机制是结合阻遏蛋白并使之失活,从而增强青霉素酰化酶基因的表达。质粒pPA41上的 σ 基因可进一步增强去阻遏作用,但由于苯乙酸的竞争作用, σ 基因滴定阻遏蛋白的效应减弱。

实验中我们同时用D816(pBR322)细胞作对照,发现D816(pBR322)细胞产生的青霉素酰化酶和D816细胞无甚差别,见表1所示。说明质粒pPA41对D816细胞操纵基因滴定的结果不是pBR322载体

引起的,而是pPA41质粒上克隆的 σ 基因引起的。

(三) σ 基因剂量在转录水平影响pac基因表达

阻遏蛋白对基因表达的抑制作用通常发生在转录水平。阻遏蛋白结合在操纵基因上,阻碍RNA聚合酶和启动子的相互作用,使基因转录受到抑制。下面我们进一步用核酸杂交探讨操纵基因剂量的作用环节。

大肠杆菌D816和D816(pPA41)分别在有诱导剂和没有诱导剂的培养基中22℃摇瓶发酵30h,提取细胞总RNA。用质粒pPA6带有青霉素酰化酶基因的3.5kb Hind III-EcoRI片段作为探针,分析上述两种细胞内青霉素酰化酶mRNA量。放射自显影结果见图2所示。结果表明,大肠杆菌D816(pPA41)细胞内青霉素酰化酶mRNA量明显高于D816细胞。在没有诱导剂时,D816(pPA41)细胞内青霉素酰化酶mRNA量约为D816细胞的4.5倍,有诱导剂存在时,D816(pPA41)细胞的pac-mRNA量约为D816细胞的3倍,如图3所示。D816(pPA41)细胞内青霉素酰化酶mRNA含量的变化和青霉素酰化酶活性变化趋势一致,两者呈正比关系。

上述结果说明,青霉素酰化酶操纵子

基因剂量在转录水平调控青霉素酰化酶基因表达, 青霉素酰化酶操纵子为负调控诱导模型。

导模型。

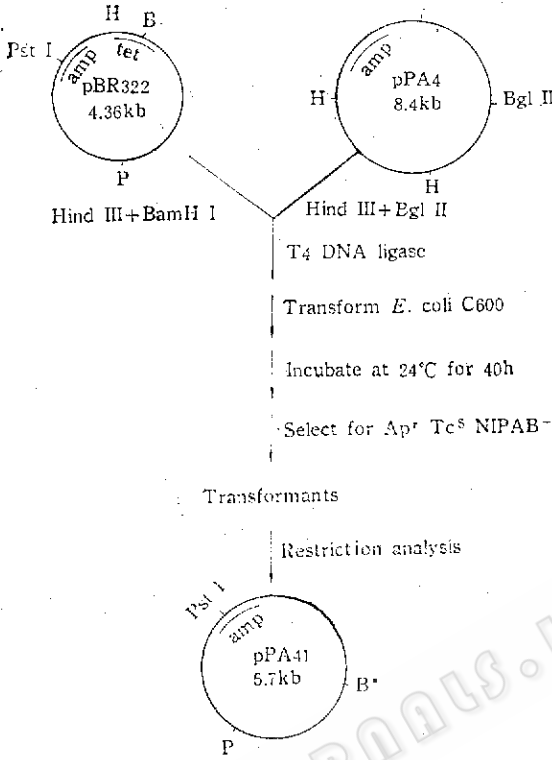


图1 pac操纵基因的克隆

Fig.1 Cloning of the pac operator gene
H:HindIII, B:BamHI, E:EcoRI,
P:PvuII, B*:BamHI/BgIII

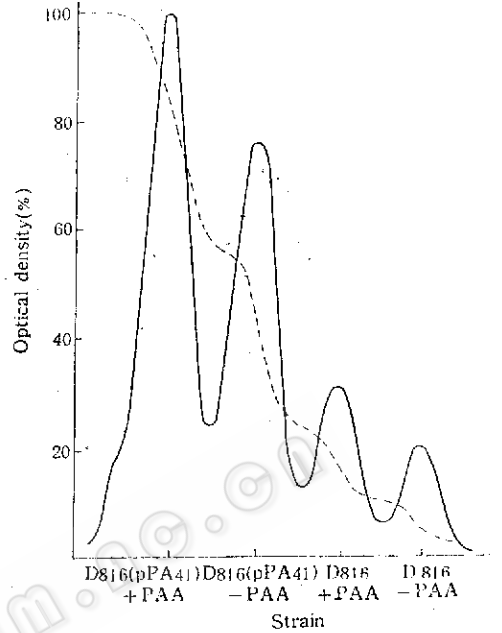


图3 操纵基因剂量对青霉素酰化酶 mRNA浓度的影响

Fig.3 Effect of operator dosage on the mRNA concentrations of penicillin G acylase.
—: Optical density, ---: Integral curve.

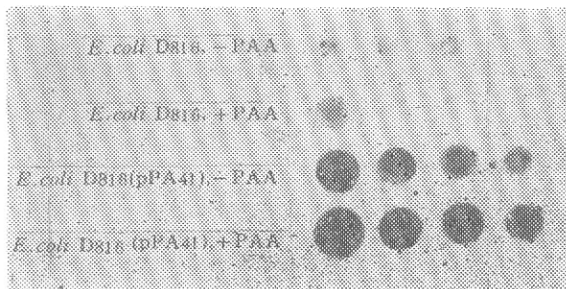


图2 操纵基因剂量对pac基因转录的影响

Fig.2 Effect of operator dosage on the transcription of pac gene
probe:HindIII-EcoRI fragment of the pac gene

参 考 文 献

[1] 杨胜利等; 生物工程学报, 1(1):29,1975.
 [2] 吴汝平等; 生物工程学报, 1(3):12,1985.

- [3] Birnboim, H.C. and Doly, J.: *Nucleic Acids Res.*, 7:1513, 1979.
- [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp.104, 1981.
- [5] Cohen, S.N.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69:2110, 1973.
- [6] Dugaiczky, A. et al.: *J. Mol. Biol.*, 96:171, 1975.
- [7] 张启先等: *微生物学报*, 19:302, 1979.
- [8] Chomczynski, P. and Sacchi, N.: *Analytical Biochem.*, 162:156, 1987.
- [9] Rigby, P.N.J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 113:237, 1977.
- [10] Casey, J. and Davidson, N.: *Nucleic Acids Res.*, 4:1539, 1977.

Regulatory Mode of pac Gene Expression

Jiang Qiaoling¹ Wu Ruping² Yang Shengli¹

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences)¹

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences)²

1.65kb HindIII-BglII DNA fragment containing pac operator was cloned from plasmid pPA4 to pBR322 at HindIII-BamHI sites, resultant plasmid pPA41 was transformed into *E. coli* D816 containing an intact pac operon on its chromosome, then operator titration was performed. It was found that the penicillin acylase activity in *E. coli* D816(pPA41) cells was always higher than that in *E. coli* D816 cells. The operators on the high copy plasmid pPA41 competed for the regulatory proteins with the single copy operator on the chromosomal pac operon, thus the expression of pac gene was enhanced, because the free cellular repressors were decreased by operator titration. The results of RNA-DNA hybridization showed that cellular pac mRNA concentration was parallel to the cellular penicillin acylase activity, the pac mRNA content in *E. coli* D816(pPA41) cells was much higher than that in *E. coli* D816 cells. These results indicated that the expression of pac gene was negatively controlled at the transcriptional level.

Key words

Penicillin G acylase; operon; operator titration