

# 利用强启动功能片段提高麦迪霉素 4"-羟基丙酰化酶基因的表达

顾海东 王以光\* 徐小敏 魏贤英 冯明华

(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** 利用 PCR 技术将本室克隆到的强启动功能片段取代麦迪霉素丙酰化酶基因 (mpt) 的启动子或与 mpt 基因自身启动子串连, 获得含 mpt 重组质粒 pCHFPE3 和 pCHFPE2。用含有这两个质粒的 *Streptomyces lividans* TK24 对螺旋霉素进行微生物转化, 结果表明, 与含有原启动子的 mpt. *S. lividans* TK24 (p. WFPE) 相比, 丙酰螺旋霉素的组分比例分别提高了 89.02% 和 58.53%。含重组质粒 pCHFPE2 的螺旋霉素产生菌 *S. spiramyceticus* 发酵产物中丙酰螺旋霉素的组分也有较大幅度的提高。说明利用该强启动功能片段可以提高麦迪霉素丙酰化酶基因的表达。

**关键词** 启动子, PCR, 螺旋霉素, 丙酰螺旋霉素

近年来, 随着对链霉菌在分子遗传学、生物化学等方面的深入研究, 链霉菌的生物合成途径及相关基因已逐渐得以揭示, 而基因工程技术的兴起和发展, 使得直接控制链霉菌次级代谢产物的生物合成途径成为可能。自 D. A. Hopwood 于 1983 年首次成功地克隆到抗生素的生物合成基因<sup>[1]</sup>以来, 关于通过种间克隆以获得新结构的杂合抗生素的例子已屡有报道<sup>[2~4]</sup>。另一方面, 由于对链霉菌的基因表达调控机制的逐步了解, 人们又开始尝试通过增加基因剂量来提高抗生素的产量<sup>[5,6]</sup>。

利用基因工程技术引入调节基因, 不但可以定性地控制某一特定基因的表达, 而且可以有效地控制目的基因的表达量, 与传统方法相比, 无疑给改进抗生素工艺带来了新的手段。因此, 对于链霉菌调节基因的研究, 无论在理论上还是实际应用上都是非常有意义的。

我们利用经本室克隆、分析的一段具强启动活性的 DNA 片段 (Promoter-like fragment, PLF) 构建了麦迪霉素丙酰基转移酶基因<sup>[7]</sup> (mpt) 的高表达质粒, 从而使丙酰螺旋霉素的产量得到较大幅度的提高。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) TK24 (Sm<sup>R</sup>) 由 D. A. Hopwood 教授提供, *E. coli* DH-5 $\alpha$  为本室保藏, 其特征见文献<sup>[8,9]</sup>; 螺旋霉素产生菌 (*S. spiramyceticus*) 由本所提供; 实验所用质粒见表 1。

本研究由国家自然科学基金委员会资助。

\* 通信作者。

本文于 1995 年 7 月 21 日收到。

表 1 质 粒  
Table 1 Plasmids

Plasmids	Marker	Character	Source
pWHM3	amp <sup>r</sup> tsr <sup>r</sup>	<i>E. coli</i> / <i>S. lividans</i> shuttle vector <sup>(12)</sup>	Provided by Prof. C. R. Hutchinson
pWFPE	amp <sup>r</sup> tsr <sup>r</sup>	Recombinant plasmid of pWHM3 & mpt gene	This lab
pCH2-2	amp <sup>r</sup>	Recombinant plasmid of pWHM3 & 2.0kb PLF fragment <sup>(11)</sup>	This lab

## 1.2 培养基

LB 培养基用于细菌的培养; R<sub>2</sub>YE 培养基<sup>(10)</sup>用于链霉菌的培养; 微生物转化培养基用于螺旋霉素微生物转化试验<sup>(7)</sup>; 检定培养基(%): 蛋白胨 1.0, 牛肉膏 0.3, 酵母膏 0.3, 葡萄糖 0.1, NaCl 0.5, 琼脂 1.2, pH8.0, 用于八叠球菌生物显迹。

## 1.3 酶和试剂

限制酶为中国医学科学院友谊开发公司产品; X-gal、IPTG 和 T4DNA 连接酶为 Promega 公司产品; 硫链丝菌素 (Tsr) 为美国 Squibb & Sons 公司产品; 氨苄青霉素 (Amp) 为上海第四制药厂产品; 螺旋霉素和丙酰螺旋霉素由本所提供; 其它试剂均为国产分析纯。

## 1.4 DNA 的制备

大肠杆菌和链霉菌的质粒 DNA 提取分别按文献 [8, 9] 方法进行; DNA 限制酶解片段的分离纯化采用美国 Bio 101 公司的 Gene Clean I Kit, 按其产品说明书进行。

## 1.5 DNA 的酶切和连接

按产品说明书进行。

## 1.6 DNA 的转化

大肠杆菌感受态细胞的制备及转化按照 Maniatis<sup>(8)</sup>的方法; 链霉菌原生质体的制备及转化按 Hopwood<sup>(8)</sup>方法。

## 1.7 寡核苷酸引物的合成

采用 ABI (Applied Biosystems) 公司的全自动 DNA 合成仪 (391 型) 及试剂, 按产品说明书进行。

## 1.8 PCR 反应

Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司, 10 × PCR 反应缓冲液和 dNTPs (2.5mmol/L) 购自中科院遗传研究所, 反应过程基本按照文献 [9]。采用中国科学院遗传研究所 PCR-90AD 型仪器进行。

## 1.9 mpt 基因表达量的分析

麦迪霉素 4"-羟基丙酰化酶基因 (mpt) 在 *S. lividans* TK24 中的表达及检测方法按照文献 [1], 基因的表达量首先通过含 mpt 基因的 *S. lividans* TK24 对螺旋霉素进行微生物转化, 所得到丙酰螺旋霉素系根据紫外扫描的吸收峰面积值来确定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PCR 引物设计

我们曾从麦迪霉素产生菌中克隆到一个具强启动功能的 DNA 片段<sup>(11)</sup>, 为了考察该

启动子对其他基因转录表达的启动能力, 我们拟利用 PCR 技术将该启动片段代替 *mpt* 基因的启动子或与其串连, *mpt* 是麦迪霉素 4'-OH 丙酰化酶基因, 它在 *S. lividans* TK24 中表达后, 其表达产物能够将外源加入的螺旋霉素转化为丙酰螺旋霉素, 计算后者的转化率可以反映 *mpt* 基因的表达量。

根据本室克隆并定序的 *mpt* 基因的 DNA 序列及含 *mpt* 基因的重组质粒 pWFPE 的酶切图谱, 设计合成 3 个引物, 如图 1: 引物 1 (包括 18bp) 设计在 *mpt* 结构基因中部的 *EcoR* I 位点前后的 18bp 处; 引物 2 (包括 28bp) 设计在 *mpt* 基因的起始密码子 ATG 的上游 106bp 处, 并加入 *EcoR* I 和 *Hind* III 两个酶切位点, 使用引物 1 和引物 2 经 PCR 合成的片段将包含 *mpt* 基因自身的启动子 (*mpt*-p) 的 -35 区和 -10 区; 引物 3 (包括 29bp) 设计在 *mpt* 基因起始密码子 ATG 上游的 19bp 处, 始于 *mpt*-p 的下游, 因此使用引物 1 和引物 3 经 PCR 合成的片段将去除了 *mpt* 基因本身的启动子, 但保留有 *mpt* 基因的 SD 序列 GAGGT, 并引入 *EcoR* I 和 *Hind* III 两个酶切位点。引物 1, 2, 3 的核苷酸序列分别为:

引物 1: 5'-GAGCGCGAATTCCAGCAG-3'

EcoR I

引物 2: 5'-GGAATTCAAGCTTCCGGACGCTGACACC-3'

EcoR I Hind III

引物 3: 5'-GGAATTCAAGCTTACCTGCGAGGTAAGTGC-3'

EcoR I Hind III

EcoRI HindIII

Primer 2 5'-GGAATTCAAGCTTCCGGACGCTGACACC-3'

106bps upstream from ATG: TTCCGGACGCTGACACCAC

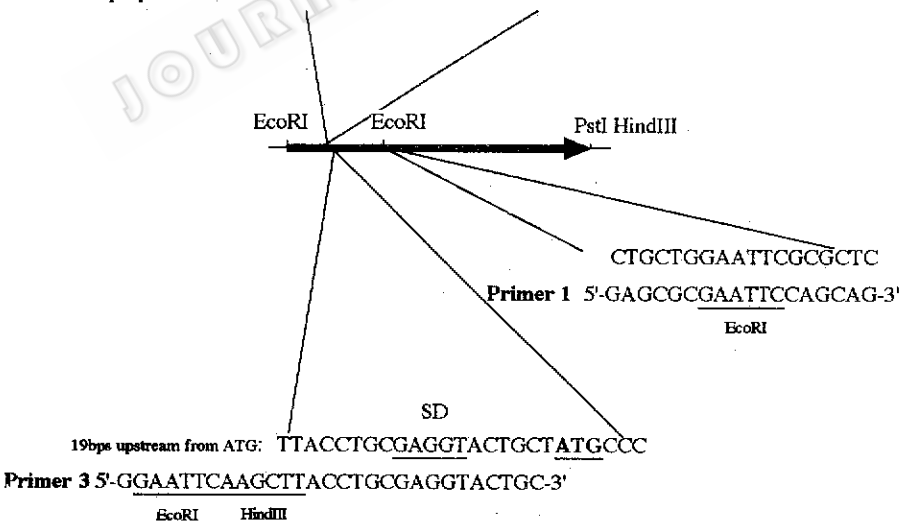


图1 PCR 引物设计策略

Fig. 1 Strategy of designing the PCR primers

## 2.2 PCR 合成的片段替代 *mpt* 基因的一部分从而改造 *mpt* 基因的上游旁侧序列

以 *Pst* I 酶切质粒 pWFPE 得到线性 DNA 为模板, 将引物 1 分别与引物 2、3 配对进行 PCR 反应, 合成出两个片段 (I 和 II), 分别带有 *mpt* 基因的结构基因的前半部分: 片段

I 从 ATG 上游的启动子开始到基因中部 EcoR I 位点结束, 片段大小为 0.7kb; 片段 II 从 ATG 上游的 SD 序列开始到基因中部的 EcoR I 位点结束, 片段大小为 0.6kb。

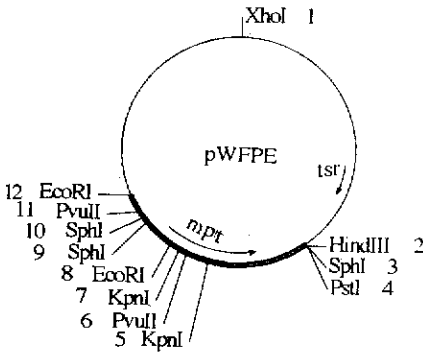


图2 pWFPE 的限制性酶切图谱

Fig. 2 Restriction map of pWFPE

1.	0	5.	5143	9.	6098
2.	3822	6.	5452	10.	6183
3.	3828	7.	5536	11.	6295
4.	3834	8.	5677	12.	6520

将 PCR 反应产物片段 I 和 II 用乙醇沉淀后, 溶于 TE 缓冲液, 分别用 EcoR I 酶切成粘端; 同时, 质粒 pWFPE (如图2), 用 EcoR I 酶切, 回收其 9.2kb 的大片段; 将 9.2kb 片段分别与 EcoR I 酶切的片段 I 和片段 II 连接, 即切除 pWFPE 上原有的 mpt 基因的前半部分及上游旁侧序列, 代之以 PCR 合成的片段, 从而得到含有完整的 mpt 基因及其启动子的 pWFPE2 (其中 mpt 基因为 2.7kb) 和含有完整的 mpt 结构基因, 不含启动子但保留其 SD 序列的 pWFPE3 (其中 mpt 基因为 2.6kb)。

### 2.3 将改造后的 mpt 基因与强启动子片段 PLF<sup>(11)</sup>相连

PLF 为我们利用启动子探针质粒 pIJ-486 从麦迪霉素产生菌中克隆到一个具有强启动子功能的片段<sup>(11)</sup>, 我们将其命名为 PLF (Promoter-like fragment), 并对它的结构和功能进行了详尽的分析。

为了探索利用强启动子提高目的基因表达的可能性, 我们将改造后的 mpt 基因与 PLF 相连。含有 PLF 的质粒 pCH2-2 (图3) 中有 2 个 Hind III 位点, 为了去除其中 1 个 Hind III 位点, 用 Pst I 酶切质粒 pCH2R (pCH2-2 重组质粒中的 2.0kb 片段为反向), 令其自连后得到 pCH2RP 再用 Hind III 酶切, 得到线性载体; 将 pWFPE2 和 pWFPE3 用 Hind III 酶切, 回收得到其中的 mpt 基因, 片段大小分别为 2.7kb 和 2.6kb, 与 Hind III 酶切的 pCH2RP 相连, 分别得到 PLF 启动方向与 mpt 基因表达方向一致的重组质粒 pCHFPE2 和 pCHFPE3 (图4)。

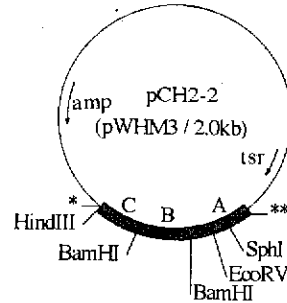


图3 pCH2-2 的限制性酶切图谱

Fig. 3 Restriction map of pCH2-2

\* EcoR I Sst I Kpn I Sma I BamH I Xba I  
Sal I Pst I Sph I

\*\* BamH I Xba I SalG I Pst I Sph I Hind III

### 2.4 pCHFPE2 和 pCHFPE3 中 mpt 基因表达量的测定

用重组质粒 pCHFPE2 和 pCHFPE3 转化 *S. lividans* TK24 的原生质体, 得到的转化子经斜面培养、种子培养, 在发酵过程中对外源加入的螺旋霉素进行微生物转化, 转化产物经乙酸乙酯抽提浓缩后, 作 TLC 薄层层析, 再经八叠球菌生物显迹, 结果如图 (图5), 再经 TLC 紫外扫描分别进行定性定量分析 (图略), 将 TLC 紫外扫描的峰面积积分值的计算归纳于表2。

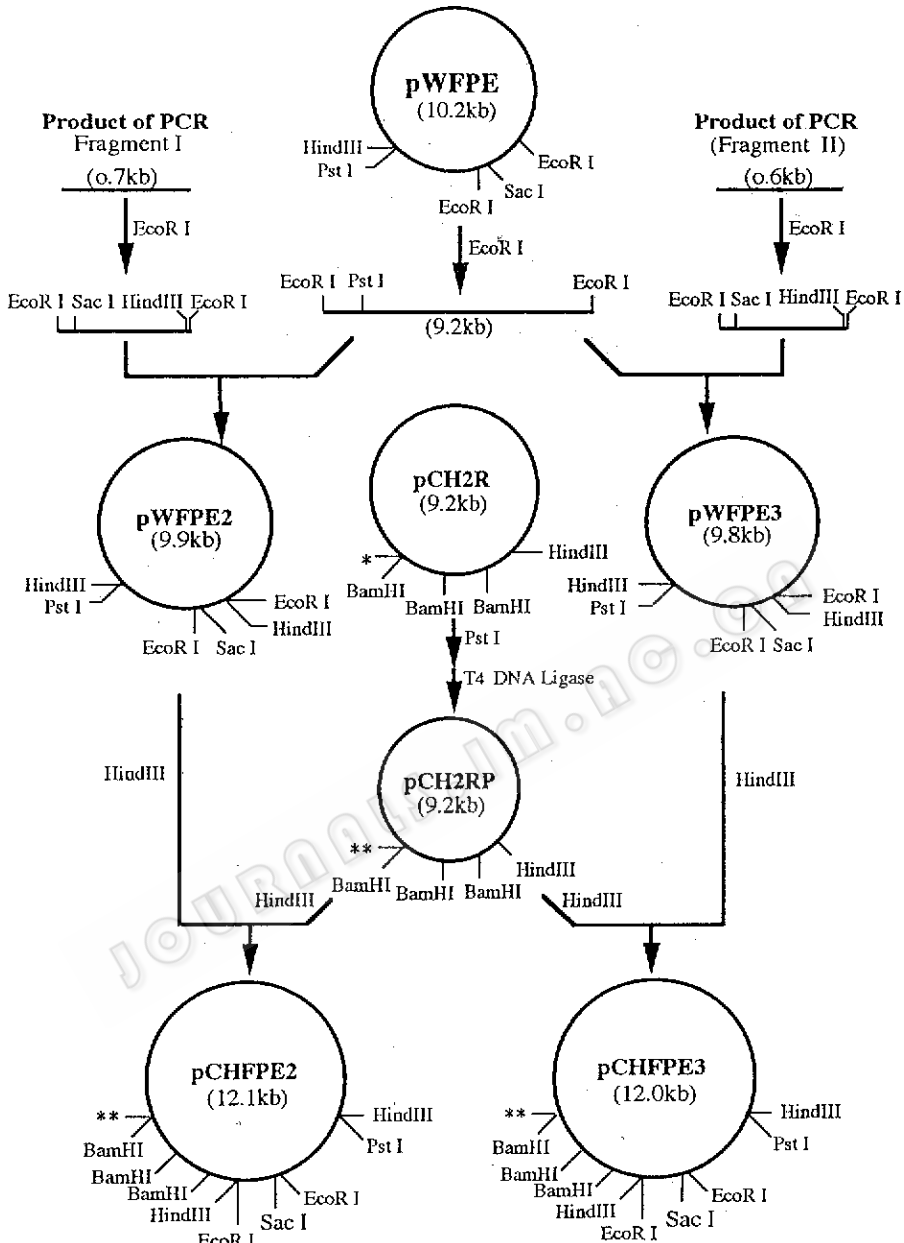


图4 pCHFPE2和pCHFPE3的克隆策略

Fig. 4 Cloning strategy of pCHFPE2 and pCHFPE3

\* EcoR I Sst I Kpn I Sma I BamH I Xab I Sal I Pst I Sph I Hind III Sph I Pst I SalG I Xba I  
 \*\* EcoR I Sst I Kpn I Sma I BamH I Xba I Sal I Pst I SalG I Xba I

表2 重组子微生物转化产物分析

Table 2 Analysis of the products of the bioconversion by recombinants

Recombinant	<i>S. lividans</i> TK24 (pWFPE2)	<i>S. lividans</i> TK24 (pCHFPE2)	<i>S. lividans</i> TK24 (pCHFPE3)
Spiramycin (Sp)	44.03%	31.63%	33.80%
Propionylspiramycin (Pr)	36.11%	48.94%	43.88%
Sp/Pr	0.82	1.55	1.30
Expression of mpt gene	100%	189.02%	158.53%

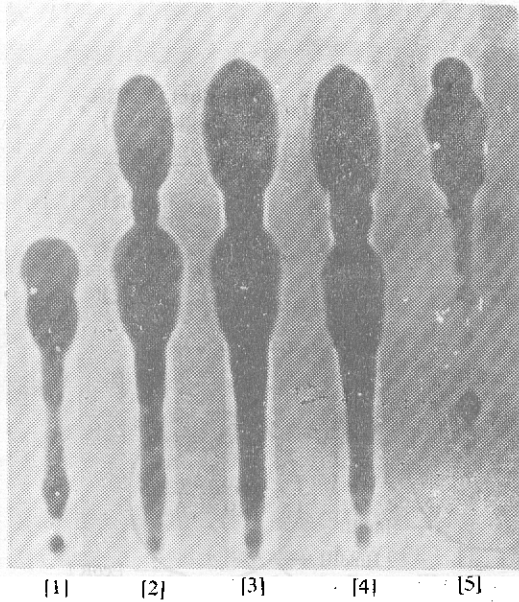


图5 pCHFPE2和PCHFPE3 *S. lividans* 转化子微生物转化螺旋霉素产物 TLC 生物活性显迹

Fig. 5 Bioautography of the products of the spiramycin bioconversion by *S. lividans* (pCHFPE2) and *S. lividans* (pCHFPE3)

1. Spiramycin, 2. Transformant (pWFPE),
3. Transformant (pCHFPE2), 4. Transformant (pCHFPE3),
5. Propionylspiramycin

由表2可以看出,以未经改造的 mpt 基因(带有自身的启动子)的 pWFPE2 的 mpt 基因表达量为100%来计算,则 PLF 与 mpt-p 串连时 mpt 基因表达量为189.02%,如果 PLF 单独地直接启动 mpt 基因,其表达量为158.53%。PLF 与 mpt-p 串连时 mpt 基因表达量高于 PLF 单独存在时,有可能是由于 PLF 与 mpt-p 串连使 mpt 基因启动子结构有所改变,因而提高了 mpt 基因的表达,也可能是由于 PLF 中含有增强 mpt 基因转录调控的因子,增强 mpt 基因的表达。其机理有待进一步的研究。

将 pWFPE2重组质粒转入螺旋霉素产生菌,获得直接产生丙酰螺旋霉素的基因工程菌,其发酵产物中丙酰螺旋霉素的比提高一倍。

以上研究说明用我们所克隆到的强启动功能片段 PLF 可以明显提高 mpt 基因的表达,因此,研究并探讨该启动片段用于提高链霉菌其他基因的表达将是十分有意义的。

### 参 考 文 献

- [1] Hopwood D A, Malpartida F, Kieser H M *et al.* Nature, 1985, 314: 642.
- [2] Feitelson J S, Hopwood D A. Mol Gen Genet, 1983, 190: 394.
- [3] Epp J K, Huber M L B, Turner J R *et al.* Gene, 1989, 85: 293.
- [4] Bartel P L, Zhu C B, Lampel J *et al.* J Bacteriol, 1990, 172: 4816.
- [5] Chater K F. Bio/Technol, 1990, 8: 115.
- [6] Stutzman-Engwall K J, Otten S L, Hutchinson C R. J Bacteriol, 1992, 174 (1): 144.
- [7] 王以光, 金莲舫, 金文藻等. 生物工程学报, 1992, 8 (1): 1.
- [8] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F. *et al.* In: Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, 1985.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. In: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [10] 龚利民, 王以光. 生物工程学报, 1986, 2 (2): 24.
- [11] 金红, 王以光. 微生物学报, 1994, 34 (6): 415.
- [12] Vara J, Lewandowsk-Scarbak M, Wang Y G. Bacteriol, 1989, 171: 5872.

## Increase the Expression of Midecamycin 4"-hydroxyl Propionyltransferase (mpt) by a Promoter-like Fragment from the Midecamycin Producing Strain

Gu Haidong Wang Yiguang Xu Xiaomin Wei Xianying Fong Minghua

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of  
Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050)

**Abstract** The promoter region of the midecamycin 4"-hydroxyl propionyltransferase (mpt) gene was reconstructed by PCR, and ligated with a fragment from the midecamycin producing strain (*S. mycarofaciens* var. 68) which contained fairly strong promoter activity (PLF) recombinant plasmids pCHFPE2 and pCHFPE3 were obtained. The extent of expression of mpt was measured according to the amount of propionylspiramycin bioconverted from exogenous spiramycin by transformants of *S. lividans* TK24 containing pCHFPE2 and pCHFPE3. The results showed that the PLF could increase the expression of mpt in *S. lividans* TK24 up to 89.02% and 58.53%, respectively, and also enhance the expression in *S. spiramyceticus* in great extent.

**Key words** Promoter, PCR, spiramycin, propionylspiramycin