

大肠杆菌-链霉菌穿梭载体的构建及应用

杨闰英^{1,2} 胡志浩¹ 邓子新¹ 李季伦²

(华中农业大学生命科学技术学院 武汉 430070)

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘 要 pIJ6021 和 pIJ4123 是链霉菌的高拷贝表达载体,它们携带有受硫链丝菌素诱导的强启动子 P_{tipA} 。分别在它们的合适位点插入大肠杆菌质粒的复制子和在大肠杆菌中选择用的抗性标记基因(bla),得到了两个能在大肠杆菌和链霉菌中穿梭复制、并保持结构稳定的链霉菌表达载体 pHZ1271 和 pHZ1272。将透明颤菌(*Vitreoscillia* sp.)血红蛋白基因(vhb)克隆到 pHZ1272 中,用它转化变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*),经 Western blotting 分析和 CO 结合实验表明,在变铅青链霉菌中表达出了有生物活性的透明颤菌血红蛋白,从而证明所构建的 pHZ1272 载体具有在链霉菌中表达外源基因的功能。

关键词 链霉菌,大肠杆菌,穿梭载体,血红蛋白基因表达

学科分类号 Q782

链霉菌作为基因表达的宿主,在表达和分泌有活性的蛋白质方面已显示出优越性。但是在链霉菌基因表达的研究方面,可供选择用于基因表达的含严谨控制型启动子的质粒载体仍十分有限。最近, Takano 等人构建了高拷贝的链霉菌基因表达载体 pIJ6021 和 pIJ4123,并利用 pIJ6021 在变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)中成功地表达出在淡青链霉菌(*Streptomyces glaucescens*)中参与 tetracenomycin 聚酮合成的 β -酮酰合酶 K (TcmK),天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)的十一烷基灵菌红素基因簇中的正调节蛋白(RedD)和比目鱼生长激素(FGH)^[1]。

由于链霉菌质粒载体 DNA 操作比较困难,因此我们对 pIJ6021 和 pIJ4123 进行了相应的改造,使之成为大肠杆菌-链霉菌穿梭载体,以利于在链霉菌中表达外源基因的体外操作试验。

本文报道大肠杆菌-链霉菌穿梭载体 pHZ1271 和 pHZ1272 的构建以及应用 pHZ1272 在变铅青链霉菌中表达透明颤菌血红蛋白基因的研究结果。

1 材料和方法

1.1 质粒及菌株

链霉菌表达载体 pIJ4123 和 pIJ6021^[1](英国 John Innes 中心赠);质粒 pUC18 和 pUC19,大肠杆菌 DH5 α 和 JM109,以及变铅青链霉菌 JT4 α (均本室保存);携带有透明颤菌 vhb 基因的质粒 pRK404-vhb(由中科院上海生物工程中心杨胜利教授提供);Vhb 抗体

(本室制备)。

1.2 培养基及抗生素的使用

常规的大肠杆菌培养基为 LB 和 LA ;链霉菌液体培养用 YEME^[2] ;固体产孢培养基为 2CM^[3] ;链霉菌原生质体再生培养基为 R5^[2] ;大肠杆菌培养中使用氨苄青霉素的终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$;链霉菌培养时使用卡那霉素的终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$;链霉菌基因表达时,诱导用的硫链丝菌素的终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.3 DNA 克隆操作

常规操作见文献 [4] ;链霉菌的遗传操作见文献 [2] ;基因在链霉菌中的诱导表达及检测见文献 [1] ;透明颤菌血红蛋白的活性分析方法见文献 [5] 。

1.4 其它

为了从 pRK404-vhb 质粒上扩增和分离到具有合适限制酶位点的血红蛋白基因,设计并合成了如下两个引物:OligoA 5'-CCC ATA TGT TAG ACC AGC-3' 和 OligoB 5'-TGT CTA GAA AGC GGC CTG-3'。在上述两个引物的两端分别设计了对 PCR 产物进行 NdeI 和 XbaI 酶切的序列。PCR 的反应如下:先将样品在 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45s 后加入 Taq DNA 酶,然后加 50 μl 石蜡油覆盖反应液。PCR 条件为:50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸反应 1min,然后进入循环,循环参数为 93 $^{\circ}\text{C}$ 20s,55 $^{\circ}\text{C}$ 40s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45s,共循环 30 次。PCR 完成后,用 T4 核苷酸激酶对 5'端进行磷酸化,然后用 1% 的低熔点琼脂糖电泳回收 PCR 产物。PCR 产物经 Klenow 补平后克隆到 pUC18 中,随后采用 Promega 公司提供的 Taqtrack Kit 进行 DNA 序列分析。除试剂盒外,实验用酶均购自 GIBCO-BRL、Promega 和华美生物工程公司。

2 结果

2.1 pHZ1271 及 pHZ1272 的构建

为了在 pIJ6021 及 pIJ4123 上插入大肠杆菌质粒的复制子和在大肠杆菌中选择用的抗性标记,并使构建出来的质粒具有单一性的克隆位点(尤其是 NdeI 位点),首先用 XbaI 和 NdeI 双酶切 pUC19,经 Klenow 补平后,自连得到 pHZ1270;随后将 pHZ1270 用 PstI 完全酶切后与 PstI 线性化的 pIJ4123 相连接,从而获得重组质粒 pHZ1271。将 pIJ6021 和 pHZ1271 分别用 EcoRI 和 XhoI 双酶切后,在琼脂糖凝胶上分别回收约 6kb 和约 4kb 的 DNA 带,再将回收的 DNA 片段重新连接,获得重组质粒 pHZ1272。pHZ1271 保留了 pIJ4123 上的单酶切克隆位点,pHZ1272 保留了 pIJ6021 上的全部单酶切克隆位点(Hind III 除外),它们还都携带有大肠杆菌质粒 pUC19 的复制子及氨苄青霉素抗性基因,因而可在大肠杆菌和变铅青链霉菌中穿梭复制(图 1)。

2.2 pHZ1271 及 pHZ1272 的结构稳定性

把从大肠杆菌中获得的重组质粒 pHZ1271 及 pHZ1272 分别转化变铅青链霉菌 JT46,从而获得重组子 JT46(pHZ1271)和 JT46(pHZ1272)。将它们分别在加有卡那霉素的 2CM 平板培养基上连续转接 5 代后,提取出质粒 pHZ1271 和 pHZ1272,并分别用 EcoRI+XhoI 和 Hind III 酶切后,进行琼脂糖凝胶电泳,其电泳带谱与来自大肠杆菌的,并经 EcoRI+XhoI 双酶切的 pHZ1271 和 Hind III 酶切的 pHZ1272 的带谱相同(图 2),说明

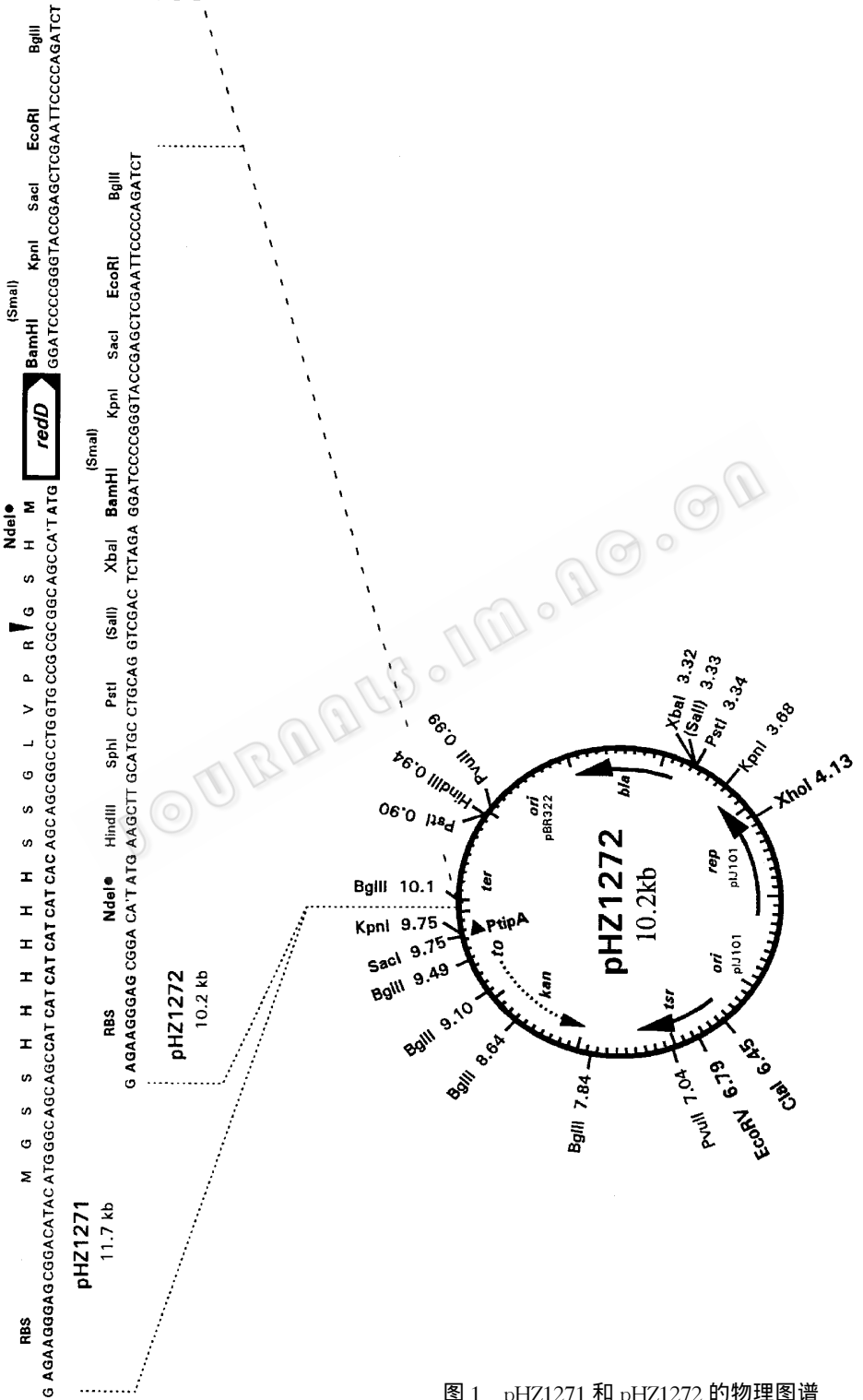


图 1 pHZ1271 和 pHZ1272 的物理图谱

pHZ1271 和 pHZ1272 的结构在变铅青链霉菌 JT46 中是能稳定复制的。

2.3 透明颤菌血红蛋白基因的亚克隆

以 pRK404-vhb 为模板进行 PCR 扩增,获得含透明颤菌血红蛋白(vhb)全长基因(500bp)的片段,经 Klenow 补平后,与 SmaI 线性化的 pUC18 连接,得到重组质粒 pHZ1250。序列分析表明,PCR 扩增出的 vhb 基因序列与 Khosla 等人^[6]所报道的透明颤菌血红蛋白基因的序列一致。

将质粒 pHZ1250 用 NdeI 和 BamHI 双酶切后,回收含 vhb 基因的片段,并与 NdeI + BamHI 双酶切的 pHZ1272 连接,从而获得重组质粒 pHZ1252(图 3)。

2.4 透明颤菌血红蛋白基因(vhb)在变铅青链霉菌中的表达

用 pHZ1252 转化变铅青链霉菌 JT46 获得重组子 JT46(pHZ1252),该重组子经硫链丝菌素诱导培养 12h 后,收集菌丝体,用超声波破碎

细胞,离心取细胞粗提物进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后转膜,用抗 Vhb 抗体(效价为 1:16)进行 Western blotting 分析,结果表明(图 4),诱导后的 JT46(pHZ1252)约在 16kDa 处出现一条杂交特异带,说明透明颤菌血红蛋白基因,经硫链丝菌素诱导后,在变铅青链霉菌中得到了表达。

2.5 变铅青链霉菌 JT46(pHZ1252)表达的 Vhb 的活性测定

采用 CO 结合实验检测了链霉菌中表达出来的透明颤菌血红蛋白活性,结果(图 5)表明,变铅青链霉菌(pHZ1252)重组子经硫链丝菌素诱导表达的蛋白质粗提物在 420nm 处有明显吸收峰,与 Sharor^[5]及 Demodena^[7]测定结果相符,说明在链霉菌中表达出的透明颤菌血红蛋白具有结合 CO 的生物活性。

3 讨论

P_{tipA} 启动子是一个绝对依赖硫链丝菌素诱导的强启动子,它来源于含有硫链丝菌素抗性基因(tsr)的变铅青链霉菌株经硫链丝菌素诱导后超量表达的 tipA 基因。Murakami 等将从 tipA 基因分离的启动子 P_{tipA} 插入启动子探针质粒 pIJ486 上,以控制卡那霉素抗性基因(kan)的转录。含有此重组质粒的变铅青链霉菌,在无硫链丝菌素诱导时对卡那霉素

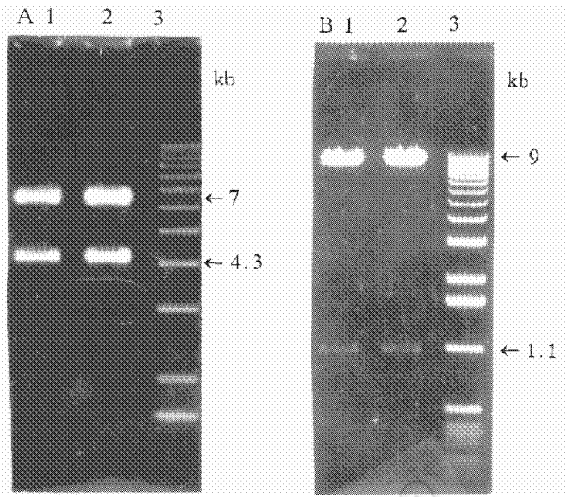


图 2 不同来源 pHZ1271 和 pHZ1272 的酶切凝胶电泳图谱

Fig. 2 The restriction patterns of endonuclease digested pHZ1271 and pHZ1272 isolated from *Streptomyces lividans* and *E. coli* respectively

- A: 1. pHZ1271 from *S. lividans* digested with EcoRI + XhoI;
 2. pHZ1271 from *E. coli* digested with EcoRI + XhoI;
 3. 1kb ladder
- B: 1. pHZ1272 from *S. lividans* digested with HindIII;
 2. pHZ1272 from *E. coli* digested with HindIII;
 3. 1kb ladder

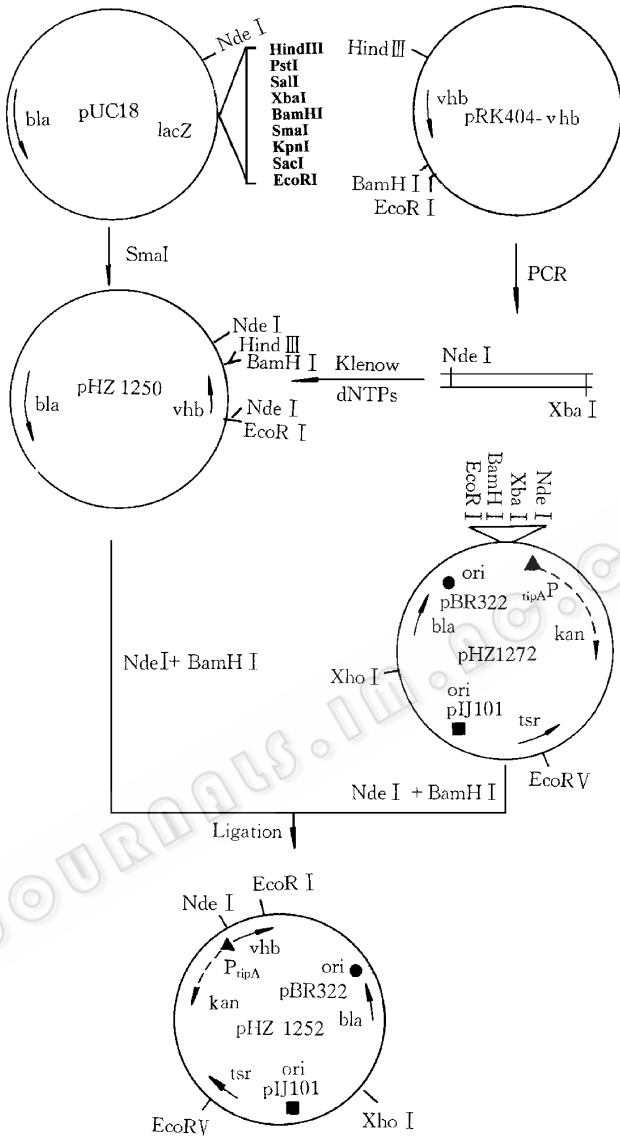


图 3 pHZ1252 的构建

Fig. 3 Construction of pHZ1252

很敏感,而一旦加入微量硫链丝菌素诱导后,则可抗 100 μ g/ml 高浓度的卡那霉素^[8]。 P_{tipA} 启动子这种严谨性的关闭与开放特性,使其成为构建链霉菌表达载体中最有价值的启动子之一。目前 P_{tipA} 已被用来构建各种类型的严谨控制型链霉菌表达载体,如整合型载体 pSAM2、多拷贝质粒 pIJ6021 与 pIJ4123 和低拷贝大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pKC1064。

由于 pIJ6021 和 pIJ4123 只能在链霉菌中复制,不能在大肠杆菌中复制,因而对它们进行了改造。经过基因工程改造的链霉菌表达载体 pHZ1271 和 pHZ1272,不仅保留了它们母本质粒的强启动子及多个单一的克隆位点等,而且还能在大肠杆菌中复制。因此,利

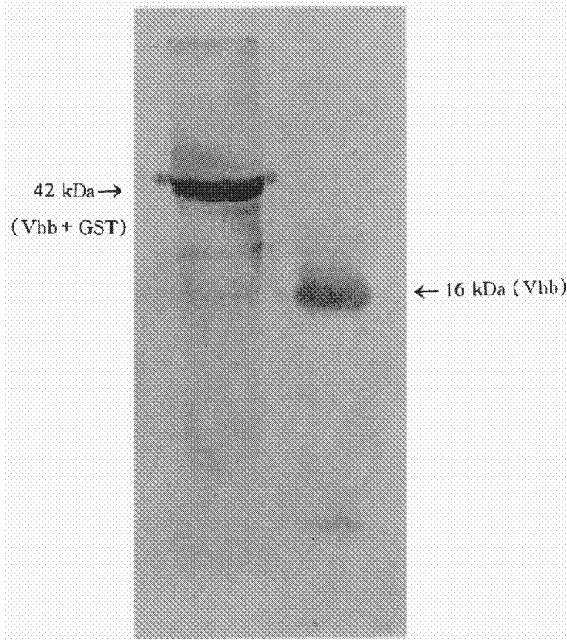


图 4 变铅青链霉菌 JT46(pHZ1252)产生透明颤菌血红蛋白的免疫检测

Fig. 4 Western blotting analysis of Vhb protein produced by *Streptomyces lividans* JT46 (pHZ1252) (right lane ,16kDa Vhb) ,and by *E. coli* JM109 (pHZ1251) (left lane ,42 kDa Vhb-GST fusion protein ,GST = Glutathione S-transferase(26kDa)).

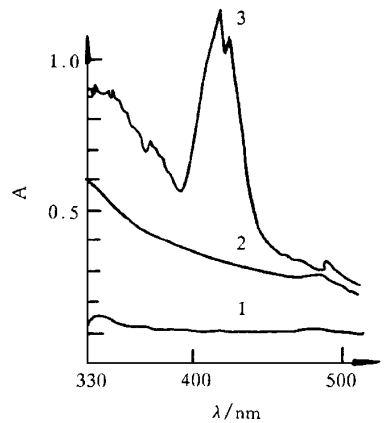


图 5 变铅青链霉菌 JT46(pHZ1252)细胞粗提物的 CO 结合光谱

Fig. 5 Carbon monoxide binding spectrum of cell extract from *Streptomyces lividans* JT46 (pHZ1252)
1. MPBS buffer solution 2. Crude extract from *Streptomyces lividans* JT46 (pHZ1272) , 3. Crude extract from *Streptomyces lividans* JT46 (pHZ1252) .

用这两个载体进行的基因克隆操作,可以大肠杆菌为宿主完成,从而克服了利用链霉菌进行遗传操作时的困难,有助于外源基因在链霉菌中的表达。

透明颤菌产生血红蛋白以适应供氧不足的生存环境^[9]。向需氧微生物中引入 vhb 基因可望提高其在氧供应不足时的细胞生长和代谢速率。将透明颤菌血红蛋白基因(vhb)引入大肠杆菌, vhb 基因的表达产物促进了大肠杆菌在分批补料高密度培养过程中的生长^[10,11]。 vhb 在 *Acremonium chrysogenum* 中的表达,使头孢霉素的产量有明显提高^[7]。在天蓝色链霉菌中的表达可使放线紫红素的产量提高 10 倍^[5]。向能表达人 tpa 基因(产物为 Tissue plasminogen activator, TPA)的重组中国仓鼠(Chinese hamster)卵母细胞中引入 vhb 基因,可使 TPA 蛋白产量提高 40% ~ 100%^[12]。我们利用改良后的载体 pHZ1272 尝试了在变铅青链霉菌中表达 vhb 基因,通过 Western blotting 和 CO 结合实验表明,在变铅青链霉菌中成功地表达出了透明颤菌血红蛋白。 vhb 基因在链霉菌发酵工业上将会得到进一步应用。

致 谢 英国 John Innes 中心 Bibb M J 惠赠 pIJ6021 和 pIJ4123, 美国 Squibb & Sons 公司的 Lucania J 博士惠赠硫链丝菌素,中国科学院上海生物工程中心杨胜利教授惠赠 pRK404-vhb, 在此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 Takano E, White J, Thompson C J *et al.* *Gene*, 1995, **166**(1):133~137
- 2 霍浦伍德等著, 邓子新, 唐纪良译. 链霉菌遗传操作实验手册, 长沙: 湖南科学技术出版社, 1988
- 3 袁丽蓉. 抗生素, 1983, **8**(6):380~387
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989
- 5 Sharon K M, Leenutaphong D L, DeModena J A *et al.* *Biotechnology*, 1991, **9**:473~476
- 6 Khosla C, Bailey J E. *Mol Gene Genet*, 1988, **214**:158~161
- 7 Demodena J A, Gutierrez S, Valsco J *et al.* *Biotechnology*, 1993, **11**:926~929
- 8 Murakami T, Holt T G, Thompson C J. *J Bacteriol*, 1987, **169**:4249~4256
- 9 Adtercreutz P, Mattiasson B. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1982, **16**:164~70
- 10 Khosla C, Bailey J E. *Nature*, 1988, **331**:633~635
- 11 Bailey J E. WO93/25697, 1993.
- 12 Girish J P, Bailey J E. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, **44**:1367~1370

Construction of *Escherichia coli*-*Streptomyces* Shuttle Vectors for Gene Expression in *Streptomyces*

Yang Runying^{1, 2} Hu Zhihao¹ Deng Zixin¹ Li Jilun²

(*Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070*)

(*China Agricultural University, Beijing 100094*)

Abstract pIJ6021 and pIJ4123 are high-copy-number vectors for gene expression in *Streptomyces*. They contain a strong λ hiostrepton-inducible promoter P_{tipA} . Two *E. coli*-*Streptomyces* shuttle vectors pHZ1271 and pHZ1272 were constructed by inserting a replicon and bla gene from *E. coli* into pIJ4123 and pIJ6021 respectively. Both vectors were structurally stable either in *E. coli* or in *Streptomyces lividans*. To demonstrate the utility of pHZ1272, the hemoglobin gene of *Vitreoscilla* (vhb) was cloned into pHZ1272 and expressed in *Streptomyces lividans*. The expression product (Vhb) was detected by Western blotting and carbon monoxide binding activity analysis.

Key words *Streptomyces lividans*, *E. coli* shuttle vectors, vhb gene expression