

在链霉菌中表达透明颤菌血红蛋白需要异源启动子

崔凤文 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 构建了质粒 pIJ4083Mpro、pIJ4083-pro、pWLD8 和 pFW3。在浅青紫链霉菌 TK24 中,启动子探针质粒 pIJ4083 上的邻苯二酚双加氧酶基因(xylE)不能被透明颤菌血红蛋白基因(vgb)的启动子带动转录,表明 vgb 启动子在链霉菌中无作用。TK24 中,pWLD8 和 pFW3 均能表达透明颤菌血红蛋白(VHb),pWLD8 上可能是由 Plac 带动 vgb 的表达;pFW3 上 vgb 基因去掉了非必要部分,克隆在 PCR 扩增得到的 glnA 启动子下游,两者连成嵌合基因。

关键词 浅青紫链霉菌,透明颤菌血红蛋白,异源表达,供氧
学科分类号 Q753

链霉菌及相近的菌用来生产许多种抗生素,如四环素、红霉素等。高密度链霉菌发酵物的高粘度特性使抗生素生产过程中的供氧成为一个主要问题。作为次生代谢物,抗生素的合成通常对氧气的供给又十分敏感。以前主要通过反应器的优化以改善通气或添加氧气助溶剂等来满足微生物的氧耗^[1]。

1988 年,由原核的透明颤菌(*Vitreoscilla* spp.)克隆到血红蛋白基因(vgb)^[2],并在大肠杆菌中进行了表达,研究了其低氧诱导的特性^[2,3]。在大肠杆菌和真菌系统中证明导入 vgb 基因可在细胞水平改善供氧和提高产生 ATP 的效率^[3,4]。Magnolo 等在天蓝链霉菌及浅青紫链霉菌中表达了透明颤菌血红蛋白(VHb),结果表明将 vgb 引入好氧的工业微生物中能起到更有效地利用氧气、降低能耗、促进生长、增加产品产量的有益作用^[1]。但是 Magnolo 等构建的表达质粒 pWLD5 和 pWLD10 不能确切地说明 vgb 表达的关键问题:vgb 基因启动子在链霉菌中能否起作用。为使 vgb 在链霉菌中的应用工作进一步深入,本文报道了 vgb 在链霉菌中表达的模式。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、质粒 pUC19、pWSK129、pOK12 和 pUC21-vgb 为本研究组收藏,浅青紫链霉菌(*Streptomyces lividans*)TK24 由上海医药工业研究院朱宝泉先生惠赠。启动子探针质粒 pIJ4083 由华中农业大学邓子新先生惠赠。质粒 pIJ699 由上海植物生理研究所焦瑞身先生惠赠。质粒 pLEW3 由 S. H. Fisher 博士惠赠,其上含天蓝链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)J1508 谷氨酰胺合成酶基因(glnA)^[5]。

收稿日期:1996-09-09,修回日期:1997-04-28。

1.1.2 培养基: 大肠杆菌用 LB 培养基^[6]。链霉菌用 YEME、R₂YE 培养基^[7]。

1.1.3 抗生素: 氨苄青霉素和卡那霉素按文献[6]使用。硫链丝菌素由朱宝泉先生和美国 E. R. Squibb and Sons 公司的 S. J. Lucania 先生惠赠, 按文献[7]使用。

1.1.4 酶和试剂: 限制酶 Afl II 为 Boehringer Mannheim 公司产品, 其他的内切酶和 Klenow 酶、T4 DNA 连接酶、琼脂糖均为 Promega 公司产品, 邻苯二酚为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 链霉菌质粒提取: 按文献[7]进行, 略加改动。完成步骤 6 后加入 100 μ l 2mol/L 醋酸铵, 1 000r/min 离心 2min, 移上清到另一 Eppendorf 管, 加入等体积异丙醇沉淀 DNA。

1.2.2 链霉菌转化: 按文献[7]进行。

1.2.3 大肠杆菌转化和 DNA 操作等: 按文献[6]进行。

1.2.4 PCR 扩增: 根据文献报道的序列^[5], 合成 glnA 启动子两端引物, 5'端的为 5'TC-TAAGCTTTCGATTGCTTGCTGTTGTC, 3'端的为 5'TCAGAATTCCAGCTCC TCC-TACTCCCAGAC。以 pLEW3 作模板, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 1min, 58 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共 25 个循环。

1.2.5 无细胞抽提液的制备: 收集菌体, 悬浮于 100mmol/L、pH7.5 的磷酸盐缓冲液中, 于冰上超声破碎, 10 000r/min 离心 10min 后取上清。

1.2.6 一氧化碳差分光谱的测定: 按文献[8]进行。

1.2.7 邻苯二酚 2,3-双加氧酶活力的测定: 按文献[9]进行。

2 结果

2.1 质粒的构建

质粒的构建见图 1。pUC21-vgb 上含 vgb 基因的透明颤菌 DNA 片段长约 1.4kb, 方向为 Hind III 到 BamH I, Hind III 与 Afl II 之间为启动子, Afl II 与 Aat II 之间为 ORF。下文中称去掉天然启动子的 vgb 为 vgb'。转化实验中所用受体菌为大肠杆菌 DH5 α 或变青链霉菌 TK24。pIJ4083Mpro 和 pIJ4083-pro 的构建过程: 将 pUC21-vgb 上 1.4kb 的 Hind III-BamH I 片段切下, 与同样酶切的 pIJ4083 用 T4DNA 连接酶连接得到 pIJ4083-vgb。BamH I 和 Mlu I 双酶切 pIJ4083-vgb, Klenow 酶补平, 冻融回收大片段, 自身连接后得到 8.1kb 的 pIJ4083Mpro。类似地以 BamH I 和 Afl II 双酶切 pIJ4083-vgb 得到 7.7kb pIJ4083-pro。pWLD8 的构建过程 Hind III 和 BamH I 双酶切 pUC21-vgb, 回收 1.4kb 的含 vgb 片段, 与同样酶切的 pUC19 连接得到 pUC19-vgb。EcoR I 和 Bgl II 双酶切 pIJ699, 回收 5kb 的 Bgl II-Bgl II 片段并与 BamH I 酶切的 pUC19-vgb 连接得到 pWLD8。pFW3 的构建过程: PCR 扩增 pLEW3 上 glnA 基因 250bp 长的启动子 (PglnA), Hind III 和 EcoR I 双酶切后与同样酶切的 pIJ4083 连接得到 pIJ4083-PglnA。Afl II 酶切 pUC21-vgb, Klenow 酶补平, 再以 BamH I 酶切后回收 1.3kb 的 vgb' 片段, 与 EcoR V 和 BamH I 双酶切的 pWSK129 连接得到 pWSK129-vgb'。Hind III 和 Aat II 双酶切 pWSK129-vgb', 回收 800bp 的 vgb' 片段并与 Hind III 和 Aat II 双酶切的 pOK12 连接得到 pOK12-vgb'。EcoR I 和

BamH I 双酶切 pOK12-vgb', 回收 800bp 的 vgb' 片段并与 EcoR I 和 BamH I 双酶切的 pIJ4083-PglnA 连接得到 pFW3。

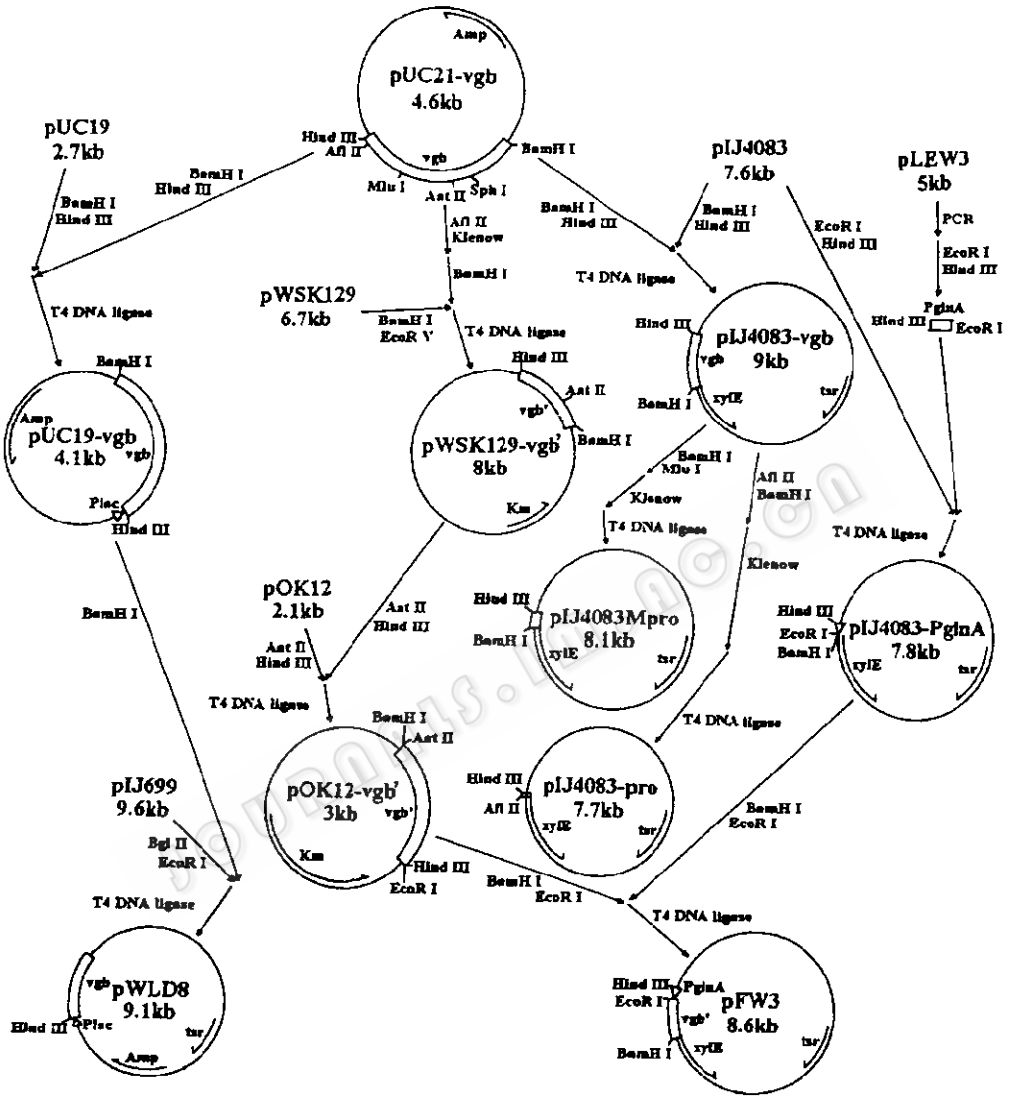


图 1 质粒 pIJ4083-pro、pIJ4083Mpro、pWLD8 和 pFW3 的构建

Fig.1 Construction of plasmids pIJ4083Mpro, pIJ4083-pro, pWLD8 and pLEW3

2.2 vgb 启动子在浅青紫链霉菌 TK24 中不工作

pIJ4083Mpro 含 vgb 启动子及蛋白编码区的 2/3 部分, pIJ4083-pro 只含 vgb 启动子 (图 1)。向 TK24(pIJ4083-pro)和 TK24(pIJ4083Mpro)在平板培养基上长出的菌落喷加 0.2mol/L 邻苯二酚不显黄色。即无 xylE 基因编码的邻苯二酚 2,3-双加氧酶活性。培养 TK24(pIJ4083-pro)至对数中期以后以塑料膜封口实现低氧诱导, 12h 后收集菌体制成无细胞抽提液也未能测到酶活, 表明 vgb 启动子在 TK24 中不能带动 xylE 的转录, 即不工作。

2.3 在浅青紫链霉菌 TK24 中表达 VHb

pWLD8 是仿照 pWLD5 和 pWLD10 构建的,三个质粒上 vgb 片段分别为 1.4kb 的 Hind III-BamH I、1.1kb 的 Hind III-Sph I 和 2.2kb 的 Hind III-Hind III 片段,均克隆在 pUC19 的多聚接头,5'端同为 Hind III 位点,与 lacZ 同向,所以三个 pWLD 类质粒上 vgb 表达的方式相同。Magnolo 等已经证明 pWLD5 和 pWLD10 在浅青紫链霉菌中能表达 VHb^[1],我们以一氧化碳差发分光谱法测定了 TK24(pWLD8)中 VHb 的活力(图 2),即 420nm 处有特征吸收峰,对照 TK24(pIJ699)没有。

对于 pIJ4083-PglnA,首先用酶切和 PCR 扩增检测证明克隆正确,然后通过 xylE 活力检测表明质粒上 PglnA 有功能。PglnA 下游插入 vgb 的 ORF 得到 pFW3。TK24 (pFW3)中能检测到 VHb 的活力(图 3),表明 PglnA-vgb'这一嵌合基因能有效地表达 VHb。

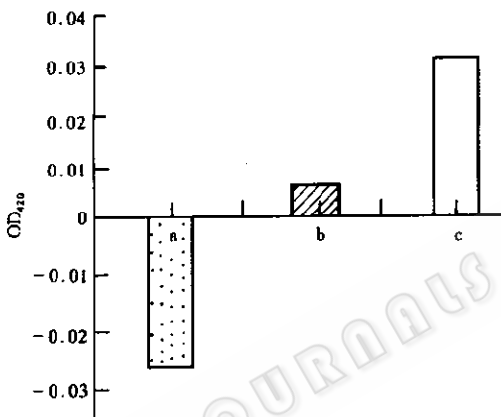


图 2 TK24(pWLD8)VHb 活力的测定

Fig. 2 Determination of VHb activity from TK24 (pWLD8)

(a)TK24(pIJ699), (b)TK24(pWLD8)

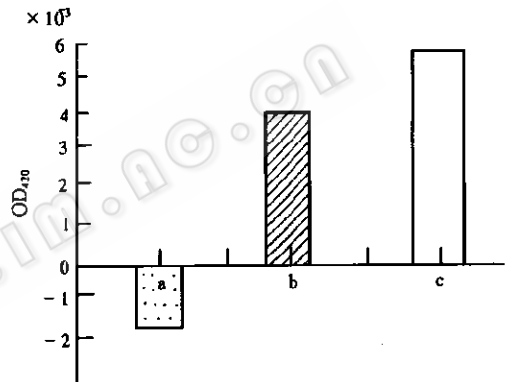


图 3 TK24(pFW3)VHb 活力的测定

Fig. 3 Determination of VHb activity in TK24 (pFW3)

(a)TK24(pIJ4083-PglnA), (b)TK24(pFW3)

3 讨论

以启动子探针质粒 pIJ4083 证明 vgb 本身的启动子在 TK24 中不起作用。大肠杆菌中 vgb 利用天然启动子表达需要正调控蛋白 FNR,链霉菌中可能不存在,所以 vgb 无法表达。由 pWLD 类质粒的结构看,pIJ699 的克隆位点 Bgl II 两端具正反向的终止子^[10],可以不考虑其对外源基因片段的影响。vgb 刚好处于 pUC19 上 Plac 的下游,而大肠杆菌 Plac 在链霉菌中是可以利用的^[11],所以可能是 Plac 带动了 vgb 的表达,但是由于 pUC19 为非表达性载体,以这种方式表达不会很有效。pFW3 的构建是将 PglnA 与去掉天然启动子的 vgb 连成嵌合基因,PglnA 是个组成型启动子^[5],可稳定有效地带动 vgb 的表达。去掉 vgb ORF 外 3'端透明颤菌 DNA 片段不影响 VHb 的表达和质粒的稳定性(pFW3),表明这一段 DNA 是非必需的。这种在链霉菌中表达 VHb 的模式是首次报道,也是比较完善的。

致 谢 中国科学院上海生物工程研究中心钱福根老师帮助使用 BeckmanDU7000 分光光度计,特致谢意。

参 考 文 献

- 1 Magnolo S K, Leenutaphong D L, Denodena J A *et al.* *Bio/Technology*, 1991, 9:473~476
- 2 Dikshilt K L, Webster D A. *Gene*, 1988, 70:377~386
- 3 Khosla C, Bailey J E. *J Bacteriol*, 1989, 171:5995~6004
- 4 DeModena J A, Gutierrez S, Velasco J *et al.* *Bio/Technology*, 1993, 11:926~929
- 5 Lewis V, Wray J, Fisher S H. *Gene*, 1988, 71:247~256
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- 7 Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces*. Norwich: John Innes Foundation, England, 1985
- 8 Webster D A, Liu C Y. *J Biol Chem*, 1974, 249:4257~4260
- 9 Konyecsni W M, Deretic V. *Gene*, 1988, 74:375~386
- 10 Kieser T, Melton R E. *Gene*, 1988, 65:83~91
- 11 Ingram C, Brawner M, Youngman P *et al.* *J Bacteriol*, 1989, 171:6617~6624

Heterologous Promoter is Necessary for the Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin in *Streptomyces*

Cui Fengwen Yang Shengli

(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract Plasmids pIJ4083Mpro, pIJ4083-pro, pWLD8 and pFW3 were constructed to study *Vitreoscilla* hemoglobin(VHb) expression in *Streptomyces*. The xyle gene on pIJ4083 could not be transcribed by *Vitreoscilla* hemoglobin gene(vgb) promoter in *Streptomyces lividans* TK24, it indicated that vgb promoter was functionally inactive in *Streptomyces*. pWLD8 and pFW3 expressed VHb in TK24. Probably Plac is responsible for VHb expression on pWLD8, while on FW3 vgb gene deleted of its unnecessary parts were cloned down stream from glutamine synthetase gene(glnA) promoter amplified through PCR to form a chimerical gene with P_{glnA}.

Key words *Vitreoscilla* hemoglobin, *Streptomyces lividans*, heterologous expression, oxygen supply