

缺失氨肽酶 N 的变铅青链霉菌的构建和鉴定*

洪斌¹ 李元¹ Jozef Anne²

(中国医学科学院医药生物技术研究所 北京 100050)¹

(Laboratory of Bacteriology, Rega Institute, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium)²

摘要: 用 PCR 方法扩增变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) TK24 氨肽酶 N 基因, 体外插入卡那霉素抗性基因进行失活, 然后利用不含链霉菌复制起点的重组质粒 pPEPN-KAN 进行同源重组, 获得了氨肽酶 N 缺失的菌株 PEPN⁻。突变株的胞外氨肽酶 N 活性与原株基本相同, 而胞内氨肽酶 N 的活性明显低于原株, 为原株的 $42.5 \pm 5.7\%$ 。

关键词: 变铅青链霉菌, 氨肽酶 N, 缺失菌株

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 01-0014-06

CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF AMINOPEPTIDASE N DEFICIENT *STREPTOMYCES LIVIDANS* TK24

HONG Bin¹ LI Yuan¹ Jozef Anne²

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)¹

(Laboratory of Bacteriology, Rega Institute, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium)²

Abstract: N-terminal degradation has been noted for some homologous and heterologous proteins expressed in *Streptomyces lividans*, and genes of some aminopeptidases have been cloned. Pep N is the one which has broad substrate specificities and the major leucine aminopeptidase activity in *S. lividans*. We cloned the *pepN* gene by PCR and inactivated it by homologous recombination to replace the wild type chromosomal *pepN* with a mutant gene in which kanamycin resistant gene was inserted. The recombinational exchange of mutant and wild type allele was effected using a non-replicating plasmid pPEPN-KAN (derivative of pUC19). The intracellular and extracellular PepN activities of wild type and negative strains were detected. The ability of the negative strains (designated PEPN⁻) to hydrolyze Leu-pNA was significantly reduced compared to the wild type.

Key words: *Streptomyces lividans*, Aminopeptidase N, Negative strain

链霉菌是最重要的工业微生物之一, 能够产生大量的次级代谢产物, 尤其是以抗生素的产生菌而闻名。近年来随着对链霉菌分子生物学的逐步深入, 变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 已被成功地用于生产重组蛋白, 尤其是真核药用蛋白^[1,2]。由于变铅青链霉菌具有高效分泌机制, 能够分泌表达大量具有生物学活性的真核表达产物, 因此具有良好的商业前景。变铅青链霉菌具有较低的内源性蛋白酶活性, 适合于异源基因的高效表达, 但 Strickler 等^[3]发现变铅青链霉菌分泌表达的丝氨酸蛋白酶抑制剂 STI 的 N 端随着发酵时间的延长将被不同程度地降解, 一些异源基因表达研究也发现其表达产物的 N 末端被不同程度地降解^[4]。这些现象促使人们积极寻找与之相关的氨

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30070009)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30070009)

中国与比利时弗莱芒区国际科技合作项目资助 (No. BIL97/42)

收稿日期: 2001-12-14, 修回日期: 2002-01-18

肽酶, Aphale 和 Strohl^[5]首先在变铅青链霉菌的发酵液中纯化出具有亮氨酸氨肽酶活性的蛋白酶, 其后陆续有一些氨肽酶基因如氨肽酶 P 基因、氨肽酶 N 基因、三肽氨肽酶基因等被克隆, 其中氨肽酶 N (PepN) 是主要的具有广泛底物特异性的氨肽酶^[6]。

本文根据报道的变铅青链霉菌氨肽酶 N 基因序列^[6]扩增出完整的氨肽酶 N 基因, 在体外插入卡那霉素抗性基因使其失活, 再通过同源重组使变铅青链霉菌染色体上的氨肽酶 N 基因失活, 获得了氨肽酶 N 失活的重组菌株, 研究结果表明重组菌株胞内的亮氨酸氨肽酶活性比原株低 $42.5 \pm 5.7\%$, 为提高异源蛋白在变铅青链霉菌中的表达水平和质量奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Escherichia coli TG1 为大肠杆菌质粒受体菌, *S. lividans* TK24 为链霉菌质粒受体菌。pUC19 和 pGEM-T Easy 用于在大肠杆菌中进行 DNA 的克隆和测序。pGEM-KAN 为克隆了卡那霉素抗性基因的 pGEM-T Easy, 为 Jozef Anné 教授实验室收藏。

1.2 培养基

1.2.1 ϕ 培养基: 葡萄糖 10 g, 胰蛋白胨 5 g, 酵母膏 5 g, Lab Lemco Powder (Oxoid, 英国) 5g, 氯化钙 0.74 g, 定容至 1L, pH7.2。用于链霉菌的种子发酵。

1.2.2 NB 培养基: Nutrient Broth 2 (Lab M, 英国)。用前加入 1/10 Vol 0.5mol/L MOPS (pH7.2) 和 1/1,000 Vol 1% Triton X-100。用于链霉菌的液体培养。

1.2.3 R2 培养基: 酵母膏 1g, Lab Lemco Powder 5g, 蔗糖 103g, 酪蛋白水解物 0.1g, 葡萄糖 10g, TES (0.25mol/L, pH7.2) 100mL, 硫酸钾 0.25g, 氯化镁 10.12g, 磷酸二氢钾 0.005g, 微量元素溶液 2mL (氯化锌 0.04g/L, 氯化铁 0.2g/L, 氯化铜 0.01g/L, 硼酸钠 0.01g/L, 氯化锰 0.01g/L, 钼酸铵 0.01g/L), 琼脂 22g, 定容至 1L。灭菌后加入 1/100 Vol 36.8% 氯化钙, 1/1,000 Vol 2mmol/L 硫酸铜。用于链霉菌的固体培养和原生质体的再生。

1.3 链霉菌的转化

链霉菌原生质体的制备与 DNA 转化按照 Hopwood DA 等^[7]的方法进行。

1.4 酶、试剂和寡核苷酸

限制性内切酶和 DNA 修饰酶购自美国 Life Technologies 公司、德国 Boehringer Mannheim 公司、比利时 Eurogentec SA 公司。

根据已知的变铅青链霉菌氨肽酶 N 基因的序列^[6]设计合成了 PCR 引物 P1, P2, P3, P4, P5, 用于氨肽酶 N 基因的扩增和检测。其中 P1 和 P2 分别引入了 *EcoR* I 和 *Bam*H I 位点, 由上海生工生物工程公司合成, P3, P4 和 P5 由 Amersham Pharmacia Biotech 合成。

P1: 5' GGAATTCATGGGTCGTGCCGTGTGGACG 3' (Nucleotide 19-40)

P2: 5' CGGGATCCCGCGACGAGCTGCTTGAAGAC 3' (Nucleotide 1331-1351)

P3: 5' AGCTCTTCGTGCCGGAGTTC 3' (Nucleotide 921-940)

P4: 5' ACGTCCTCAGCGCCTCGAAG 3' (Nucleotide 2500-2520)

P5: 5' AGTACGCCTGCACGCCCTTG 3' (Nucleotide 1375-1394)

1.5 DNA 的制备

链霉菌总 DNA 的提取参照 Hopwood DA 等^[7]的方法进行。DNA 片段的回收按 Qiagen 公司的 QIAquick Gel Extraction Kit 的说明书进行。

1.6 核苷酸序列分析

采用荧光染料标记法 (Cy5-标记引物), 用 ALFexpress DNA 自动测序仪 (Amersham Pharmacia Biotech) 测定 pUC19 和 pGEM-T Easy 中克隆片段的核苷酸序列。

1.7 Southern 杂交

提取 *S. lividans* 各菌株的总 DNA, 用适当的限制性内切酶进行酶切, 进行琼脂糖凝胶电泳后采用 VacuGene 系统 (Amersham Pharmacia Biotech) 将 DNA 转印到 Hybond-N 尼龙膜 (Amersham Pharmacia Biotech) 上。将膜上的 DNA 用 UV 交联后用地高辛标记的探针进行杂交^[8], 杂交信号用 0.25mmol/L CDP-Star (Boehringer Mannheim) 进行检测^[9]。

1.8 变铅青链霉菌培养上清液和细胞裂解液的制备

菌株于 27℃ 在 NB 培养基中振荡培养 (300r/min) 一定时间后, 4℃ 离心 (5,000 r/min, 10min), 所得上清液即为培养上清液; 所得菌体用 5mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 洗两次后悬浮于该溶液中, 超声破碎, 离心取上清, 即得细胞裂解液。

1.9 氨肽酶 N 活性的测定

1mL 反应体系中含有 50μL 1mol/L Tris-HCl (pH8.0), 10μL 100mmol/L Leu-pNA (溶于 DMSO) 和 940μL 发酵上清液或 100μL 细胞裂解液和 840μL H₂O。混合后立刻置于 25℃ 进行反应, 同时测定 OD₄₀₅ 的变化。氨肽酶 N 的活性定义为 1U 使反应体系每分钟每毫升发酵液产生 0.001 OD₄₀₅ 的变化。

2 结果

2.1 变铅青链霉菌 TK24 氨肽酶 N 基因的获得及插入失活

2.1.1 氨肽酶 N 基因的获得: 以变铅青链霉菌总 DNA 为模板, 用引物 P1 和 P2 扩增出 1.35kb 的片段, 经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切插入同样酶切的 pUC19 中, 得到重组质粒 pPEPN1。用引物 P3 和 P4 扩增出 1.6kb 的片段, 克隆在 pGEM-T 载体中, 得到重组质粒 pPEPN2。对 pPEPN1 和 pPEPN2 中克隆片段的序列测定结果表明其序列与已知的氨肽酶 N 基因序列一致。根据引物的设计, 质粒 pPEPN2 中克隆的片段与 pPEPN1 中克隆的片段有 430bp 是重叠的, 利用位于该重叠片段中的单切位点 *Nco* I 将这两个克隆片段连接成完整的 2.5kb 的氨肽酶 N 基因, 具体克隆步骤如下: 用 *Nco* I 和 *Pst* I 酶切 pPEPN1 得到的 4.0kb 片段, 和同样酶切 pPEPN2 得到的 1.43kb 片段连接, 得到重组质粒 pPEPN。在该质粒中克隆有完整的 2.5kb 的氨肽酶 N 基因 (图 1)。

2.1.2 氨肽酶 N 基因的插

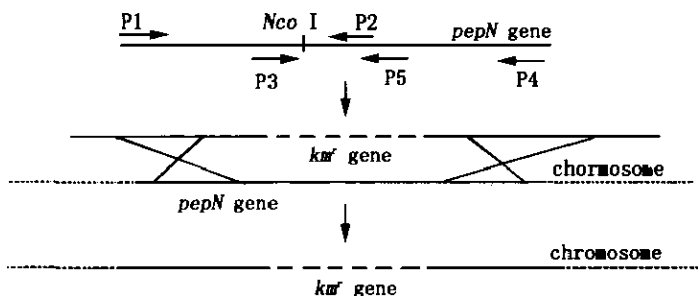


图 1 变铅青链霉菌氨肽酶 N 基因失活示意图

P1 & P2, P3 & P4 用于扩增 *pepN* 基因, P3 & P5 用于鉴定突变菌株, *lco* I 位点位于氨肽酶 N 的活性中心

入失活：据报道^[6]，氨肽酶 N 的活性中心的氨基酸序列为 HELAH-18aa-E，和辅助因子锌协同作用，上述 *Nco* I 位点恰好位于该基序的编码序列中。将 pGEM-KAN 用 *Eco* R I 切出卡那霉素抗性基因片段，Klenow 补平后插入 *Nco* I 酶切并补平的 pPEPN 中，将该基因中断失活，得到重组质粒 pPEPN-KAN。在该质粒中基因中断位点上游和下游各有 1.07kb 和 1.43kb 的序列可用于和染色体上氨肽酶 N 基因进行同源重组，卡那霉素抗性基因可作为筛选重组菌株的抗性标记（图 1）。

2.2 变铅青链霉菌 TK24 染色体上氨肽酶 N 基因的失活及鉴定

2.2.1 染色体上氨肽酶 N 基因的失活：用以上获得的克隆有失活氨肽酶 N 基因片段的 pPEPN-KAN 转化 *S. lividans* TK24 的原生质体，获得了卡那霉素抗性菌落（km^r）。由于质粒 pPEPN-KAN 中没有链霉菌的复制起点，不能单独存在于染色体外，因此卡那霉素抗性菌落应为卡那霉素抗性基因整合在染色体上的重组菌株。

2.2.2 染色体上氨肽酶 N 基因失活的鉴定：为了获得由插入失活的氨肽酶 N 基因和染色体上氨肽酶 N 基因进行了同源双交换的重组菌株，用 PCR 方法进行筛选。提取不同卡那霉素抗性转化子和野生型菌株的总 DNA，用 PCR 方法检测，野生型菌株用引物 P3 和 P5 应扩增出 480bp 的片段，而染色体上氨肽酶 N 基因被插入失活后应扩增出 1.7kb（图 2）。结果表明，菌株 23，110，113，117 可扩增出 1.7kb 的片段。

为进一步确证染色体上氨肽酶 N 基因的插入失活，对这 4 个突变菌株和野生型菌株进行 Southern blot 分析。将突变型和野生型菌株的总 DNA 经 *Mlu* I 酶切后用卡那霉素抗性基因片段为探针进行 Southern 杂交，结果表明卡那霉素抗性基因片段已整合在染色体中，得到 1.7kb 的杂交片段（1.2kb 卡那霉素抗性基因片段 + 0.5kb 氨肽酶 N *Mlu* I 片段）；总 DNA 经 *Sal* I 酶切后，用 *Sal* I 酶切的氨肽酶 N 基因片段为探针进行 Southern 杂交，结果证明突变菌株 23，110，113，117 染色体上的氨肽酶 N 基因中确已插入了 1.2kb 的卡那霉素抗性基因片段，杂交片段由 1.7kb 变为 2.9kb（图 3）。

上述结果表明重组菌株染色体上的氨肽酶 N 基因已被插入失活，将其定义为菌株 PEPN⁻ 23，110，113，117。

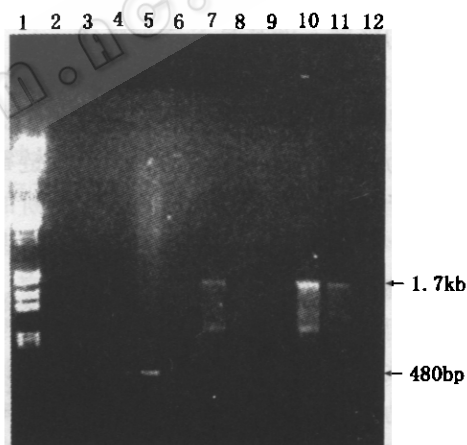


图 2 卡那霉素抗性转化子总 DNA 的 PCR 结果
1 Δ DNA/*Eco* R I, *Hind* III, 4, 5, 8 野生型菌株, 7, 10, 11 染色体上氨肽酶 N 基因插入失活的重组菌株

2.3 氨肽酶 N 失活的重组菌株氨肽酶 N 活性的测定

任意选取菌株 110 和 117 和原株 TK24 进行发酵培养，其生长特性基本一致。分别测定其不同培养时间的发酵上清液和细胞裂解液中的氨肽酶 N 活性，结果表明突变菌株 110 和 117 的胞外氨肽酶 N 活性与原株接近，且随发酵时间的延长而增加。而胞内氨肽酶 N 的活性远低于原株，约相当于原株的 $42.5 \pm 5.7\%$ （图 4）。

3 讨论

与革兰氏阴性细菌不同，链霉菌作为革兰氏阳性菌细胞壁没有粘多糖，可以直接

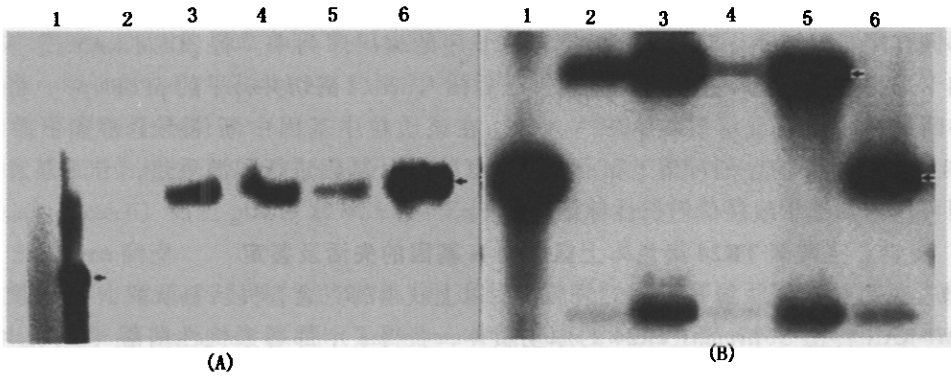


图3 氨肽酶 N 失活菌株的 Southern blot 鉴定

- (A) 以卡那霉素抗性基因片段为探针, 1 1.2kb *EcoR* I fragment of *km^r* gene, 2 TK24/*Mlu* I, 3 PEPN⁻ 23/*Mlu* I, 4 PEPN⁻ 110/*Mlu* I, 5 PEPN⁻ 113/*Mlu* I, 6 PEPN⁻ 117/*Mlu* I
(B) 以氨肽酶 N 基因片段为探针, 1 1.7kb *Sal* I fragment of *pepN* gene, 2 PEPN⁻ 117/*Sal* I, 3 PEPN⁻ 113/*Sal* I, 4 PEPN⁻ 110/*Sal* I, 5 PEPN⁻ 23/*Sal* I, 6 TK24/*Sal* I

将具有生物活性的蛋白质分泌至发酵液中。链霉菌分泌蛋白的产量可以通过延长发酵时间来提高, 但这也会导致某些目的蛋白的降解, 尤其是 N 端的降解。*S. griseus* 产生的胞外氨肽酶已被纯化, 是晶体结构已被阐明的四个金属氨肽酶之一。而在作为异源蛋白表达宿主的变铅青链霉菌中克隆的氨肽酶 N 从 DNA 序列推断的氨基酸序列来看不是分泌蛋白, 和乳酸菌的氨肽酶 N 同样具有 HELAH + E 基序, 该基序同样存在于人、兔、大鼠和啤酒酵母的氨肽酶 N 中。细胞内的蛋白酶具有许多生理功能, 包括蛋白质前体的加工、畸变或受损伤蛋白质的降解以及及时地使调控蛋白质失活等。尽管正常状态下变铅青链霉菌的氨肽酶 N 应存在于细胞内, 但在发酵培养过程中由于搅拌而产生的高剪切力不可避免地会使一些菌丝裂解, 因此在表达异源蛋白时, 尤其是在发酵后期发酵液中活性会更加明显。

另外, 在用氨肽酶 N 基因片段为探针进行 Southern 杂交时, 除了预期的氨肽酶 N 杂交条带外, 还有一个弱的杂交条带, 这与 Butler 等^[10]的报道一致, 即除了 *pepN* 外还存在其他的同源的氨肽酶基因存在。这与本工作得到的氨肽酶 N 缺失菌株仍具有一定的 Leu-氨肽酶活性也是一致的。本工作获得的氨肽酶 N 缺失菌株可作为外源基因高效分泌表达的宿主菌, 而在本工作的基础上构建缺失多个氨肽酶活性的菌株将有助于进一步减少异源蛋白 N 端的降解。

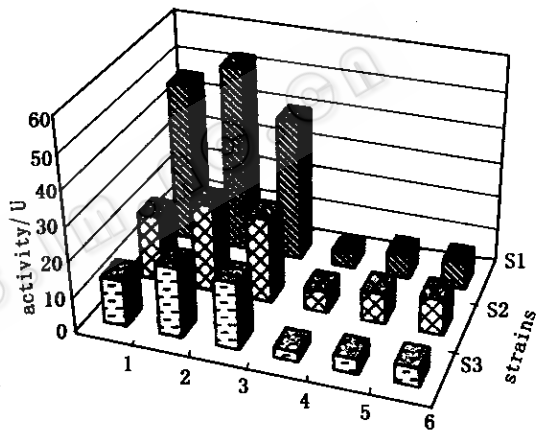


图4 变铅青链霉菌 TK24 和 PEPN⁻ 110、117 的氨肽酶 N 活性

- S1 *S. lividans* TK24, S2 *S. lividans* PEPN⁻ 117,
S3 *S. lividans* PEPN⁻ 110, 1 细胞裂解液 24h,
2 细胞裂解液 36h, 3 细胞裂解液 48h,
4 发酵上清液 24h, 5 发酵上清液 36h,
6 发酵上清液 48h

致谢 感谢 Elke Lammertyn, Nick Geukens 和 Godelieve Van Mellaert 在实验过程中提供的帮助。

参考文献

- [1] Binnie C, Cossar J D, Stewart D I H. TIBTECH, 1997, 15: 315 ~ 320.
- [2] 洪 斌, 李 元, 李嗣英, 等. 遗传学报, 1998, 25 (4): 287 ~ 293.
- [3] Strickler J E, Berka T R, Gorniak J, *et al.* J Biol Chem, 1992, 267: 3236 ~ 3241.
- [4] Van Mellaert L, Dillen C, Proost P, *et al.* Gene, 1994, 150: 153 ~ 158.
- [5] Aphale J S, Strohl W R. J Gen Microbiol, 1993, 139: 417 ~ 424.
- [6] Butler M J, Aphale J S, Binnie C, *et al.* Gene, 1994, 141: 115 ~ 119.
- [7] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F, *et al.* Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, Norwich: John Innes Foundation, 1985.
- [8] Engler-Blum G, Meier M, Frank J, *et al.* Anal Biochem, 1993, 210: 235 ~ 244.
- [9] Hoeltke H J, Schneider S, Ettl I, *et al.* Biochemica (Boehringer), 1995, 1: 17 ~ 20.
- [10] Butler M J, Aphale J S, DiZonno M A, *et al.* J Ind Microbiol, 1994, 13: 24 ~ 29.