

一个热诱导穿梭表达载体的构建及其在链霉菌中的应用

陶美凤¹ 周秀芬^{1,2} Tobias Kieser³ 邓子新^{1,2*}

¹(华中农业大学农业部农业微生物重点实验室,武汉 430070)

²(上海交通大学 Bio-X 生命科学研究中心,上海 200030)

³(John Innes Centre, Norwich, U.K.)

摘 要 为探索大肠杆菌 λ 噬菌体表达调控元件在链霉菌中的应用,构建了一个链霉菌-大肠杆菌穿梭表达载体 pHZ1080,并将来自链霉菌 FR-008 的聚酮合酶(PKS)基因置于其中的 λ 噬菌体启动子 P_R 下游,得到表达 PKS 的穿梭质粒 pHZ1067。与在大肠杆菌中一样,该质粒在变铅青链霉菌中也受热诱导表达 100kD 的 PKS 蛋白,表达的 PKS 蛋白可由 SDS-PAGE 和 Western-blot 实验检测到。PKS 在链霉菌中的热诱导表达表明,构建的载体也能用于链霉菌诱导表达外源基因。

关键词 链霉菌-大肠杆菌穿梭表达载体,热诱导, λ 噬菌体启动子,PKS

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0420-04

在链霉菌表达载体中,最常用的有依赖硫链丝菌素诱导启动子(P_{tipA})的载体 pIJ4123 和 pIJ6021^[1]等,其优点是在培养基中加入低浓度的硫链丝菌素即可诱导基因表达,缺点是需要宿主体内特定的激活物 TipA_L 蛋白来诱导 P_{tipA} 转录^[2],然而并不是在所有链霉菌中均存在 TipA_L 蛋白。而且已有大量未发表的数据表明 P_{tipA} 在未经诱导时有渗漏表达。此外,用于在链霉菌中表达异源基因的启动子还有红霉素抗性基因启动子 $PermE$ ^[3]、TraR 控制的热诱导启动子 P_{tm} ^[4]等。

在大肠杆菌表达系统中,利用 λ 噬菌体启动子及其调控元件组合 $P_R P_L$ -*clts857* 成功表达了外源基因,而且其表达受到严紧调控^[5]。为探索 λ 噬菌体表达调控元件组合在链霉菌的功能,本文构建了旨在链霉菌和大肠杆菌两类宿主中表达目的基因的穿梭表达载体 pHZ1080,并用此载体成功地表达了来自链霉菌 FR-008 的聚酮合酶(PKS)基因。

1 材料与方 法

1.1 质粒和菌株

pHZ1052 为大肠杆菌表达质粒,其中有来自链

霉菌 FR-008 的 2.7kb PKS 基因^[6],经高温诱导,可在大肠杆菌中超量表达 PKS 蛋白^[7]。用 *Bam*H I 酶切除去 pHZ1052 中的 PKS 基因片段得到大肠杆菌表达载体 pHZ330^[7],载体中目的基因表达及其有关调控元件包括串联的 $P_R P_{T7}$ 启动子、SD 序列、His₆ 标签以及 λ 噬菌体温敏突变阻遏物基因 *clts857*。pKC505 为具有低拷贝链霉菌复制子 SCP2* 的质粒^[8]。DH5 α 为大肠杆菌宿主,变铅青链霉菌菌株 ZX1^[9]为 PKS 表达的链霉菌宿主。

1.2 培养基及抗生素的使用

大肠杆菌培养基为 LB^[10],链霉菌原生质体再生固体培养基为 R₂YE,链霉菌菌丝体液体培养基为 YEME^[11]。用于选择大肠杆菌转化子的氨苄青霉素终浓度为 100 μ g/mL,阿泊拉霉素可用于链霉菌和大肠杆菌转化子的选择,终浓度为 30 μ g/mL。PKS 特异性抗体见文献[7]。

1.3 DNA 操作、SDS-PAGE、Western-blot

见文献[10],链霉菌原生质体转化见文献[11]。

1.4 热诱导基因表达

变铅青链霉菌在补加阿泊拉霉素的 YEME 液体培养基中,于 30 $^{\circ}$ C 培养 36~48h 至对数期,然后转至

39~40℃继续培养 12h 或 20h。

2 结果

2.1 穿梭表达载体 pHZ1080 及 PKS 表达质粒 pHZ1067 的构建

链霉菌-大肠杆菌低拷贝穿梭表达载体 pHZ1080 是由 pHZ330 和 pKC505 出发构建的。构建过程如图 1 所示。

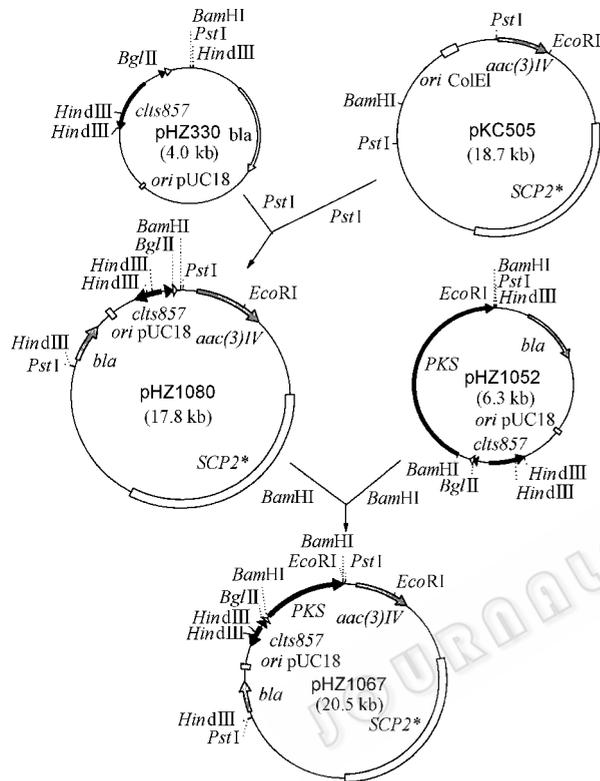


图 1 低拷贝载体 pHZ1080 和 PKS 表达质粒 pHZ1067 的构建

Fig. 1 Construction of the low copy number vector pHZ1080 and the PKS expression plasmid pHZ1067

▶▶ Tandem $P_R P_{T7}$ promoters

pKC505 在链霉菌中的拷贝数为 1, 所携带的阿泊拉霉素抗性基因 $aac(3)IV$ 可作为在大肠杆菌和链霉菌中的选择标记。pHZ330 则是利用 λ 噬菌体 P_R 启动子和 T7 噬菌体启动子 P_{T7} 的大肠杆菌表达载体, 其中外源基因的热诱导表达受 $clts857$ 基因控制。pHZ330 用 $Pst I$ 线性化并与 pKC505 的 13.8kb $Pst I$ 片段连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 以氨苄青霉素及阿泊拉霉素选择转化子, 得到的质粒用 $Pst I$ 、 $EcoR I$ 分别单酶切以及 $BamH I$ 加 $EcoR I$ 双酶切验证结构正确, 命名为 pHZ1080。待表达的外源基因可克隆到单一的 $BamH I$ 位点进行融合表达, 融合表达序列见图 2。

ACCATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAC AGC
Met Gly Gly Gly His His His His His Ser
AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC CAT ATG CTC
Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met Leu
Thrombin
 $\xrightarrow{Pst I}$
 $\xrightarrow{BamH I}$
GAG GAT CCG TCG ACC TGC AG
Glu Asp Pro Ser Thr Cys

图 2 pHZ1080 的融合表达序列

Fig. 2 The fusion expression sequence of pHZ1080

用 $BamH I$ 完全酶切 pHZ1052 并回收携带 PKS 基因编码序列的 2.7kb 片段, 与 $BamH I$ 酶切线性化的 pHZ1080 连接, 得到 pHZ1067 (图 1)。用 $BamH I$ 酶切验证 pHZ1067 有插入片段, 用 $EcoR I$ 酶切验证其中 PKS 基因具有正确的插入方向。得到的表达质粒 pHZ1067 的 PKS 基因上游, 与基因表达相关的元件包括来自载体的串联 $P_R P_{T7}$ 启动子、SD 序列, PKS 编码序列的 5'-端与载体上处于同一读码框的 6 个组氨酸编码序列 (His_6 标签) 形成融合基因; 质粒上还有 λ 噬菌体温敏突变阻遏物基因 $clts857$, 用于控制 P_R 启动子的转录。

此外, 如图 1 所示, pHZ1080 和 pHZ1067 均具有高拷贝大肠杆菌复制子 $ori pUC18$ 和低拷贝链霉菌复制子 $SCP2^*$ 、在链霉菌和大肠杆菌均能表达的选择标记 $aac(3)IV$, 以及大肠杆菌选择标记 bla 。

2.2 PKS 在链霉菌中的热诱导表达

质粒 pHZ1067 与大肠杆菌表达质粒 pHZ1052 相比, 具有相同的大肠杆菌复制子、完全相同的大肠杆菌表达调控元件, 相当于在 pHZ1052 的基础上组入了一个链霉菌复制子 $SCP2^*$ 及选择标记 $aac(3)IV$ 。与 pHZ1052 类似, SDS-PAGE 分析表明 pHZ1067 也能在大肠杆菌中热诱导表达 PKS (未显示数据)。

通过原生质体转化将表达质粒 pHZ1067 转入变铅青链霉菌 ZX1 中。通过对来自转化子的质粒 DNA 的凝胶电泳检测, 发现其分子量没有改变。将对数生长期的链霉菌培养物转移至 39℃ 分别诱导 12h 和 20h, 收获菌丝体, 并对细胞裂解物进行 SDS-PAGE 分析。结果如图 3 所示, 与未经诱导的对照相比, 诱导后的 ZX1 (pHZ1067) 在与 100kD PKS 蛋白一致的位置形成一条较强的带 (图 3, Lane 1, 4), 表明热诱导后的 ZX1 (pHZ1067) 可以表达 100kD 的 PKS 蛋白。不过, 热诱导的链霉菌蛋白样品产生不止一条特异的蛋白带, 因此有必要通过 Western 杂交来

鉴定 100kD 蛋白带是否是 PKS。

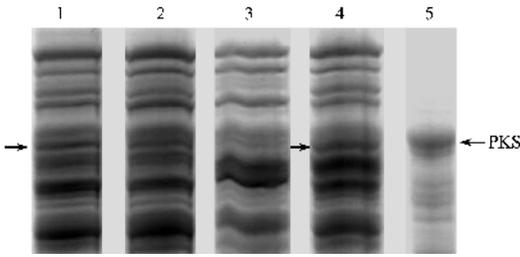


图 3 pHZ1067 的 PKS 基因在变铅青链霉菌 ZX1 中的表达

Fig.3 PKS expression by pHZ1067 in *S. lividans* ZX1

1. pHZ1067 40°C (induced) 20h ;
2. pHZ1067 30°C (uninduced) 20h ;
3. pHZ1067 30°C (uninduced) 12h ;
4. pHZ1067 40°C (uninduced) 12h ;
5. PKS expressed in *E. coli* as a control

2.3 PKS 蛋白的 Western 杂交验证

将诱导前后的链霉菌菌丝体总蛋白提取物进行 SDS-PAGE 分离,电转移到硝酸纤维素膜上。用 50 倍稀释的兔抗 PKS 抗血清杂交,依次与羊抗兔抗体、碱性磷酸酶和底物反应并显色。结果如图 4 所示,热诱导的变铅青链霉菌 ZX1(pHZ1067) 约 100kD 的蛋白带与 PKS 特异性抗体有阳性反应信号(Lane3 和 5),而未经诱导的链霉菌(Lane2 和 4) 则没有明显的阳性反应信号,表明 PKS 在链霉菌中得到了表达,而且其表达依赖于热诱导。

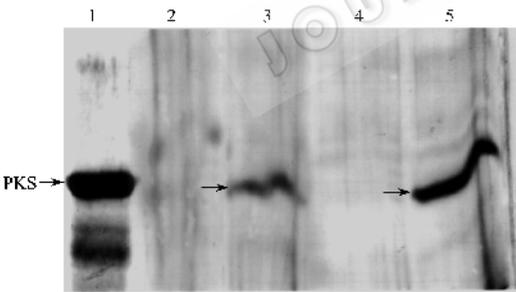


图 4 Western 杂交检测变铅青链霉菌 ZX1 中表达的 PKS 蛋白

Fig.4 Detection of PKS expression in *S. lividans*

ZX1 by Western hybridization

1. PKS expressed in *E. coli* as a control ;
2. ZX1(pHZ1067) 30°C (uninduced) 12h ;
3. ZX1(pHZ1067) 40°C (induced) 12h ;
4. ZX1(pHZ1067) 30°C (uninduced) 20h ;
5. ZX1(pHZ1067) 40°C (induced) 20h

3 讨 论

我们曾尝试用已有的链霉菌表达系统表达 2.7kb 的 PKS 基因。将 PKS 基因分别克隆到 P_{Tip4} 启动子和 $PermE$ 启动子下游,转入变铅青链霉菌 ZX1,

用考马斯亮蓝 R250 染色或用 Western 印迹法检测总蛋白均未观察到 100kD 的 PKS 蛋白质的表达。

在 pHZ1067 中 PKS 的热诱导表达表明 λ 噬菌体的 P_R 启动子在变铅青链霉菌中也有转录活性,而且其活性受 $CIts857$ 阻遏物调控。推测 λ 噬菌体阻遏物基因从其自身携带的启动子 P_M 得到表达,并阻遏 P_R 的转录。此外, pHZ1067 的链霉菌复制子为只有 1 拷贝的 $SCP2^*$ 复制子,由于基因剂量有限,有可能限制了目的基因的超量表达,换上高拷贝复制子有可能提高蛋白的表达量。 $cIts857-P_R$ 组合在链霉菌中能有控制地表达异源基因,这种温度诱导能力可能十分有用。pHZ1067 不需改变结构即可在大肠杆菌和链霉菌 2 种宿主中表达目的基因的特点为研究工作带来了极大的方便。

由于链霉菌 σ^{70} 因子与大肠杆菌 σ^{70} 因子相似,可识别类似于大肠杆菌保守启动子的序列-即链霉菌的大肠杆菌类似启动子(SEP)。因此,可推测载体 pHZ1080 及质粒 pHZ1067 上的 λ 噬菌体启动子 P_R 可被带有 σ^{70} 的链霉菌 RNA 聚合酶($E\sigma^{70}$)所识别,从而转录目的基因。此外,在 pHZ1080 及 pHZ1067 的 P_R 下游还携带有来自出发质粒 pHZ330 的 T7 噬菌体后期 $\Phi 10$ 基因启动子,但是只有 λ 噬菌体启动子 P_R 可望在链霉菌中起始目的基因的转录,因为能识别 T7 噬菌体启动子的 T7 噬菌体 RNA 聚合酶在结构和酶学机制方面均不同于其它的 RNA 聚合酶^[12]。迄今尚未见链霉菌基因组中存在 T7 噬菌体 RNA 聚合酶相似序列的报道。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Takano E,White J,Thompson C J *et al.* Construction of thiostrepton-inducible high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp. *Gene*,1995, **166** :133 ~ 137
- [2] Holmes D J,Caso J L,Thompson C J. Autogenous transcriptional activation of a thiostrepton-induced gene in *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* 1993 **12** :3183 ~ 3191
- [3] Bibb M J,White J,Ward J M *et al.* The mRNA for the 23 rRNA methylase encoded by the *ermE* gene of *Saccharopolyspora erythraea* is translated in the absence of a conventional ribosome-binding site. *Mol Microbiol*,1994, **14** :533 ~ 545
- [4] Kataoka M,Tatsuta T,Suzuki *et al.* Development of a temperature-inducible expression vector for *Streptomyces* spp. *J Bacteriol*,1996, **178** :5540 ~ 5542
- [5] ZHANG Z (张智清),YAO L H (姚立红),HOU Y D (侯云德). Construction and application of a high level expression vector containing P_{RPL} promoter. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报),1990 **6**

- [6] Hu Z , Bao K , Zhou X *et al.* Repeated polyketide synthase modules in the biosynthesis of a heptaene macrolide by *Streptomyces sp.* FR-008. *Mol Microbiol* ,1994 ,**14** :163 ~ 172
- [7] TAO M F(陶美凤) , HU Z H(胡志浩) , ZHOU X F(周秀芬) *et al.* Over-expression of a polyketide synthase (PKS) module of a giant polyene antibiotic gene cluster in *E. coli* by double induction. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报) ,1999 ,**26**(6) :721 ~ 730
- [8] Richardson M A , Kuhstoss S , Solenberg P *et al.* A new shuttle cosmid vector ,pKC505 for *Streptomyces* its use in the cloning of three different spiramycin-resistance genes from a *Streptomyces ambofaciens* library. *Gene* ,1987 ,**61** :231 ~ 241
- [9] Zhou X , Deng Z , Hopwood D A *et al.* *Streptomyces lividans* 66 contains a gene for phage resistance which is similar to the phage lambda ea59 endonuclease gene. *Mol Microbiol* ,1994 ,**12** :789 ~ 797
- [10] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* .2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989
- [11] Kieser T , Bibb M J , Buttner M J *et al.* *Practical Streptomyces Genetics* . Norwich : The John Innes Foundation 2000
- [12] Studier F W , Moffatt B A . Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* , 1986 ,**189** :113 ~ 130

Construction of a Temperature Inducible Shuttle Expression Vector and Its Application in *Streptomyces*

TAO Mei-Feng¹ ZHOU Xiu-Fen^{1,2} Tobias Kieser³ DENG Zi-Xin^{1,2*}

¹(Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Ministry of Agriculture , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China)

²(Bio-X Life Science Research Centre , Shanghai Jiaotong University , Shanghai 200030 , China)

³(John Innes Centre , Norwich , U K)

Abstract pHZ1080 , an *E. coli*-*Streptomyces* shuttle expression vector was constructed in order to explore the utilization of λ phage regulated expression elements in *Streptomyces* . A 2.7kb polyketide synthase (PKS) gene from *Streptomyces sp.* FR-008 was inserted into downstream of λ phage promoter (P_R) to give the shuttle plasmid ,pHZ1067 . The PKS protein was expressed in *Streptomyces lividans* carrying pHZ1067 in a heat-dependent manner , as it did in *E. coli* . The PKS protein expressed in both hosts with same molecular weight was detected by SDS-PAGE and Western-blot . The successful heat-induced expression of PKS suggested that pHZ1080 was useful and convenient for heat-induced expression of heterologous genes in both *E. coli* and *Streptomyces* .

Key words *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle expression vector , heat-induction , λ phage promoter , PKS

Received : 01-23-2002

This work was supported by Grants from 863 Young Scientist Foundation of National Science Committee , National Natural Science Foundation (No. 39970479 , 39825101) and the Royal Society of United Kingdom .

* Corresponding author . Tel/Fax 86-21-62933404 , E-mail zxdeng@mail . sjtu . edu . cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>