

GL-7-ACA酰化酶基因片段的酶谱分析及基因定位

杨蕴刘 恽定芳 彭惠琳 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

本文报道了从假单胞菌 130 菌株 (*Pseudomonas* sp.130) 染色体上克隆得到的 6.8kb 的 GL-7-ACA 酰化酶基因片段的限制酶谱, 基因定位以及在不同的大肠杆菌基因启动子控制下酰化酶基因的表达水平。结果表明, 所克隆的片段上, 不存在 EcoR I、Hind III、Cla I 切点, 分别具有一个 Hpa I、两个 Xho I、三个 BamH I 以及四个 Pst I 切点, 同时初步确定了这些酶切位点之间的相对位置。经过一系列次级克隆研究, GL-7-ACA 酰化酶基因已被定位在 3.0kb 的 B₂-B₃-Hpa I 片段上。实验比较了以 pACYC184、pDR540、pUC19 等为载体的次级克隆株(分别为 pMR9、pMR10 和 pMR11) 在大肠杆菌中酰化酶基因的表达水平, 测定数据表明 tac 启动子的启动活力比 tet 启动子强, 即 pMR10 的产酶量比 pMR9 高一倍, 而当 tac 启动子前再串接一个 lac 启动子时(pMR11), 产酶水平并不进一步提高。本文还对假单胞菌基因在大肠杆菌中的表达进行了讨论。

关键词 GL-7-ACA 酰化酶; 基因定位; 基因表达

以前的研究报告表明^[1], 利用大肠杆菌中的 pBR322 质粒载体和鸟枪法, 从假单胞菌 130 菌株的染色体 DNA 上克隆得到编码 GL-7-ACA 酰化酶基因的片段, 重组质粒 pMR 5, pMR 6 和 pMR 7 能在大肠杆菌中表达产生 GL-7-ACA 酰化酶蛋白, 在该酶的催化下, GL-7-ACA 被水解成 7-ACA。7-ACA 是发展半合成头孢菌素衍生物的重要中间体。经凝胶电泳分析证明 pMR 5 和 pMR 7 为相同的重组质粒 DNA 分子, 所插入的外源片段分子量相同; 分别携带这两个重组质粒的大肠杆菌, 产 GL-7-ACA 酰化酶水平一样。pMR 6 的分子量略小于 pMR 5 和 pMR 7, 其产酶水平仅是后者的五分之一。许多研究报告指出^[2-5], 在影响基因表达水平的诸多因子中, 启动子的强弱, 启动区的结构以及核糖体结合位置与结构基因起始密码之间的距离等因素起着重要作用。为了更好地了解来源于假单胞菌的 GL-7-

ACA 酰化酶基因在大肠杆菌中的表达以及提高该基因的表达水平, 我们对重组质粒中的插入片段进行了较深入的分析。本文报道了重组质粒 pMR 5 和 pMR 6 中插入片段的酶谱分析; 通过一系列的次级克隆研究, 确定了 GL-7-ACA 酰化酶基因在片段上的初步位置以及 GL-7-ACA 酰化酶基因片段在 tet、tac 和 lac-tac 等启动子下游的表达。

材料和方 法

(一) 菌株和质粒

见表 1。

(二) 限制酶、连接酶等工具酶

限制酶、连接酶等工具酶分别为 BRL 和 Boehringer 产品, 并以公司提供的方法进行酶促反应。

(三) 重组 DNA 技术、感受态细胞制

本文于 1990 年 12 月 13 日收到。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strain and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strain and plasmids	特征 Genotype & characteristics	文献 References
(Strain)		
<i>E. coli</i> C600	thr, leu, thi, sup, tonA.	6
(Plasmids)		
pBR322	Amp ^r , Tet ^r . 4.4kb	7
pACYC184	Cm ^r , Tet ^r . 4.0kb	8
pDR540	Amp ^r . 4.0kb	9
pUC19	Amp ^r . 2.7kb	10
pMR 5	Amp ^r , Acy ⁺ . 11.2kb	This study
pMR 6	Amp ^r , Acy ⁺ . 10.1kb	This study
pMR 9	Cm ^r , Acy ⁺ . 7.5kb	This study
pMR10	Amp ^r , Acy ⁺ . 7.5kb	This study
pMR11	Amp ^r , Acy ⁺ . 5.8kb	This study
pMR12	Amp ^r , Acy ⁻ . 1.1kb	This study
pMR13	Amp ^r , Acy ⁻ . 7.2kb	This study
pMR14	Amp ^r , Acy ⁻ . 5.1kb	This study
pMR15	Amp ^r , Acy ⁻ . 5.8kb	This study

备和质粒DNA转化

均按文献[11]方法进行。

(四)GL-7-ACA 酰化酶活力测定^[11]

见前文报道。

结 果

(一)重组质粒pMR 5的限制酶酶切图谱分析

质粒pMR 5系由载体质粒 pBR322和来源于假单胞菌染色体 DNA 上的 6.8kb GL-7-ACA 酰化酶基因片段两个部份构成。该重组质粒 DNA 分子经 EcoR I、Hind III 等 8 种限制酶分别降解处理并进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 根据电泳图谱上酶切片段的数目, 可以推断出上述各内切酶在重组质粒上的切点数。表 2 说明 6.8kb 的插入片段上各种限制酶的切点数。当我们以位于载体质粒 pBR322 上的 EcoR I 切点作为参照点, 分别将 EcoR I

表 2 重组质粒pMR5的酶切位点分析

Table 2 Restriction sites on recombinant plasmid pMR 5

限制酶 Restriction endonucleases	总切点数 Total sites	pBR322 上切点数 Sites on pBR322	插入片段上切点数 Sites on insert
BamH I	4	1	3
Cla I	1	1	0
EcoR I	1	1	0
Hind III	1	1	0
Hpa I	1	0	1
Pst I	5	1	4
Sal I	6	1	5
Xho I	2	0	2

与其它种类内切酶配对或不同酶类组合进行双酶切, 并从琼脂糖凝胶电泳图谱上各酶切片段的移行距离, 计算出所有片段的分子量(表 3)。据此, 可以推断出限制酶 Xho I, BamH I, Hpa I 以及 Pst I 等酶切位点, 在插入片段上的相对位置。图 1a 即为 pMR 5 质粒的环形酶切图。

(二)重组质粒 pMR6 的限制酶酶切图谱分析

带有重组质粒 pMR 6 的大肠杆菌 C600 菌株 (*E. coli* C600), 能表达 GL-7-ACA 酰化酶活性, 但是, 产酶活力只有同样条件下的 pMR 5 质粒的五分之一。从插入片段的大小来看 pMR 5 比 pMR 6 大 1.1kb。同样, 对 pMR 6 进行前述 8 种限制酶的单酶解反应, 发现亦无 EcoR I、Hind III、Cla I 等切点。与 pMR 5 的差别是前者只有两个 Pst I 切点, 同时存在一些共同的片段, 如 2.4kb Xho I 片段, 1.1kb, 0.7kb 的 BamH I 片段, 1.0kb 的 Pst I 片段。在进一步的实验中, 分别进行了 pMR 5 和 pMR 6 的 EcoR I / Hpa I 及 EcoR I / Xho I 的双酶切比较, 酶解片段大小见表 3。从这些数据推测的 pMR 6 的环形酶切图谱(图 1b) 证明, 重组质粒 pMR 6 中的外源片段的插入方向刚好与

表 3 质粒pMR5和pMR6酶切片段分析

Table 3 Analysis of fragments of plasmids pMR 5 and pMR6 cleaved with restriction endonucleases

质粒 Plasmids	内切酶 Restriction endonucleases	切点数 Sites	片段大小 Size of fragments in kb						
pMR 5	BamH I	4	6.6	2.8	1.1	0.7			
	Xho I	2	8.8	2.4					
	Pst I	5	5.0	3.7	1.4	0.8	0.3		
	BamH I + EcoR I	5	4.0	2.8	2.6	1.1	0.7		
	BamH I + Xho I	6	6.6	2.2	1.1	0.7	0.4		
	BamH I + Hpa I	5	6.6	2.3	1.1	0.7	0.5		
	Pst I + Xho I	7	5.0	2.2	1.5	1.4	0.4	0.4	0.3
	Pst I + EcoR I	6	5.0	3.7	0.8	0.7	0.7	0.3	
	Pst I + Hpa I	6	3.8	3.7	1.4	1.2	0.8	0.3	
	Xho I + Hpa I	3	7.1	2.4	1.7				
	EcoR I + Hpa I	2	6.7	4.5					
	EcoR I + Xho I	3	6.2	2.6	2.4				
	pMR 6	EcoR I + Xho I	3	4.7	2.9	2.5			
EcoR I + Hpa I		2	8.7	1.4					

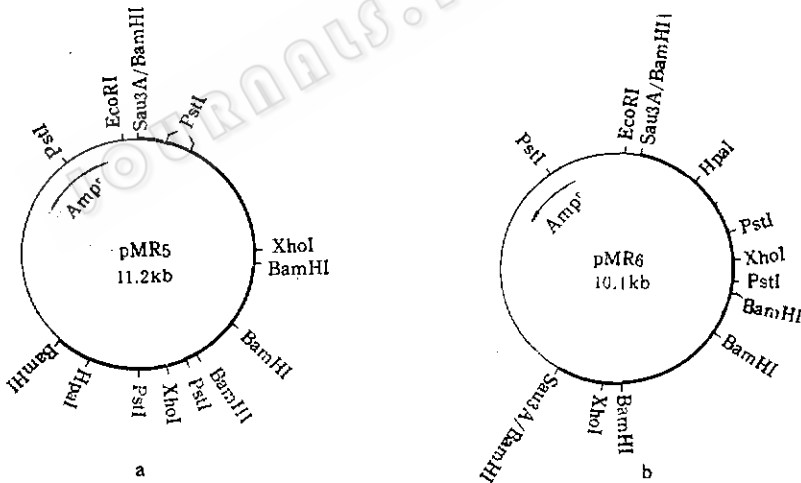


图 1 重组质粒pMR 5和pMR 6的限制酶图谱

Fig.1 Restriction maps of recombinant plasmids pMR 5 and pMR 6

pMR 5 中的外源片段相反, 其一端比 pMR 5 长 0.6kb, 而另一端则比 pMR 5 短 1.7kb, 因此, pMR 6 质粒的总分子量要比 pMR 5 质粒小 1.1kb。

(三)GL-7-ACA酰化酶基因片段的次级克隆研究

为了确定GL-7-ACA酰化酶基因在重组质粒pMR 5中6.8kb插入片段上的位置, 进行了一系列的次级克隆研究, 在次级克隆中, 利用了几种载体质粒以观察处于不同启动子下游的GL-7-ACA酰化酶基因片段在大肠杆菌宿主中的表达水平。

图2是次级克隆流程图。

1. pMR9和pMR10: 初级克隆所得到的重组质粒pMR5 DNA经BamHI

部份酶解, 酶解产物通过琼脂糖凝胶电泳并收集3.5kb的B₂-B₃-B₄片段, 然后将其分别连接到质粒pACYC184和pDR54

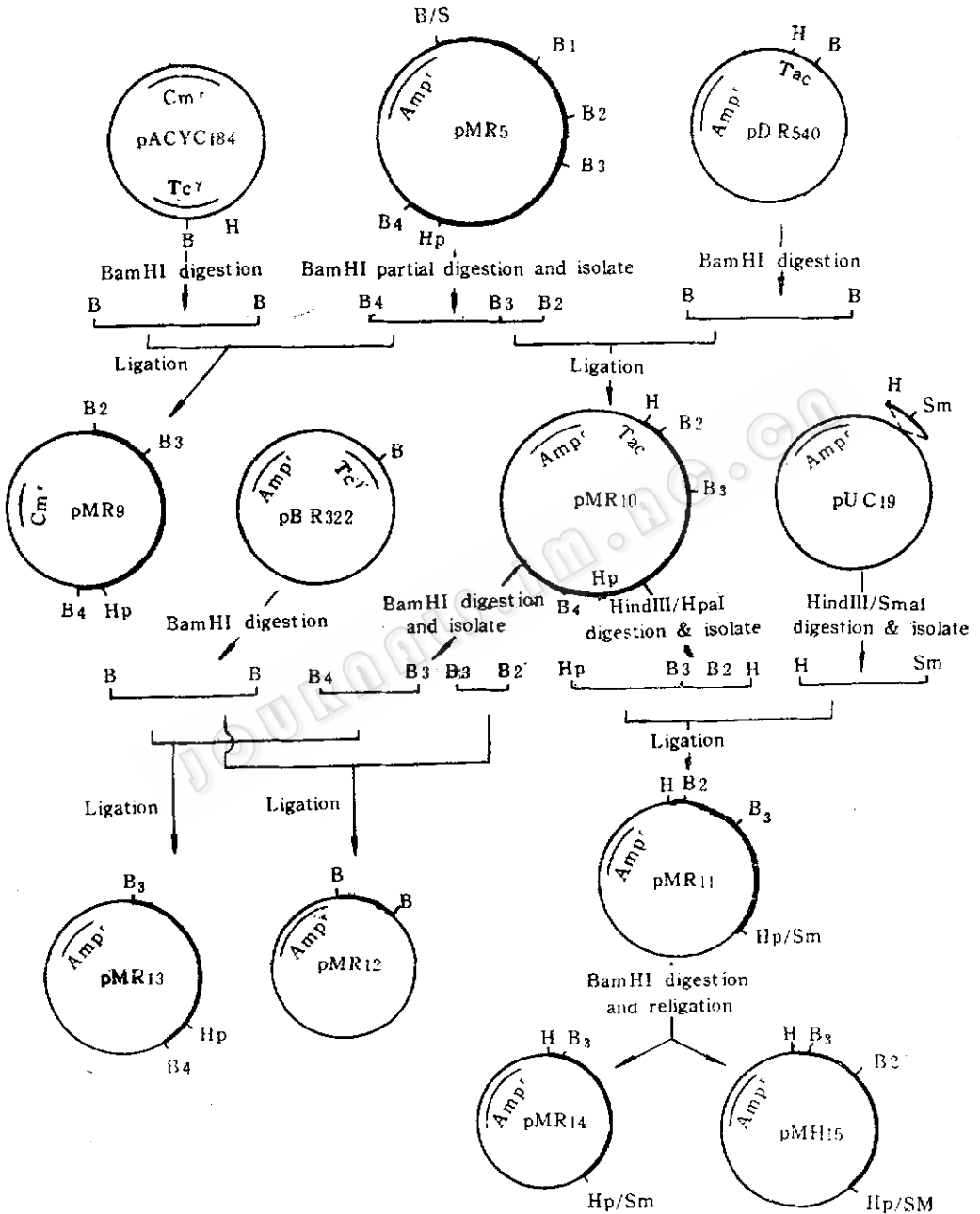


图2 GL-7-ACA酰化酶基因次级克隆流程

Fig.2 Scheme for the subcloning of GL-7-ACA acylase gene

的 BamHI 位点上, 构建得到 pMR 9 和 pMR10。携带 pMR 9 和 pMR10 的 *E. coli* C600 都呈现 GL-7-ACA 酰化酶活力, 而且通过 Hind III 和 Hpa I 双酶切产物的凝胶电泳分析证明片段是以 B₂-B₃-B₄ 正方向插入。因此, 在 pMR 9 中 GL-7-ACA 酰化酶基因片段处于 pACYC184 质粒的 tet 启动子的下游, 而在 pMR10 中, 该基因片段则在 tac 启动子的控制之下。在质粒构建过程中还筛选得到一些 GL-7-ACA 酰化酶活力很低的转化子, 它们所含质粒中插入片段大小同样为 3.5kb, 这是由于片段的反向插入之故。

2. pMR11: 为了确定片段上 Hpa I 至 B₄ 这一段 0.5kb 的 DNA 顺序是否为 GL-7-ACA 酰化酶基因表达所必需, 实验利用限制酶 Hind III 和 Hpa I 使 pMR10 质粒 DNA 完全酶解并分离纯化 3.0kb 的 Hind III/Hpa I 片段。然后将这一片段连接到用 Hind III 和 Sma I 酶解的 pUC19 质粒中去 (Hpa I 和 Sma I 之间可进行平端连接), 构建得到 pMR11, 该质粒转化 *E. coli* C600 后, 能表达 GL-7-ACA 酰化酶活力。因此, 除去 Hpa I 至 B₄ 之间这一段 0.5kb 的 DNA 顺序并不影响酰化酶基因的表达。另一方面, 在质粒 pMR11 的构建中, 酰化酶基因片段处于 pUC19 质粒的 lac 启动子的下游, 鉴于来源于重组质粒 pMR10 的 H₃-B₂-B₃-B₄ 片段上已带有一个 tac 启动子, 因此, 在 pMR11 中, B₂-B₃-B₄ 片段处于串接的 lac-tac 启动子控制之下。

3. pMR12 和 pMR13: 为了考察 B₂-B₃ 这一 0.7kb 片段与 GL-7-ACA 酰化酶基因表达的关系, 将 pMR10 DNA 用 BamHI 完全酶解并分离纯化 0.7kb 的 B₂-B₃ 和 2.8kb 的 B₃-B₄ 片段, 然后分别将它们连接到 BamHI 酶切的 pBR322

质粒上, 筛选到质粒 pMR12 和 pMR13。pMR13 中 B₃-B₄ 的连接方向可根据 EcoRI/HpaI 双酶切加以确定, 对于 pMR12 由于 B₂ 和 B₃ 之间没有其它的酶切位点可供鉴别, 因而不能确定该片段的连接方向。不管怎样, 在筛选过程中, 含 B₂-B₃ 或 B₃-B₄ 片段的重组质粒均无 GL-7-ACA 酰化酶活力, 因此, 对于酰化酶基因的表达, B₂-B₃ 与 B₃-B₄ 两个片段是不可分割的。

4. pMR14 和 pMR15: 进一步对质粒 pMR11 的改造, 也同样说明 B₂-B₃ 片段为 GL-7-ACA 酰化酶基因表达所必需的。实验发现, 当 pMR11 用 BamHI 酶解后, 用 T4 DNA 连接酶重新连接并转化 *E. coli* C600 后, 含 pMR14 的转化子均无酰化酶活力, 再一次证明 B₂-B₃ 片段是酰化酶基因表达的重要部分。另有一部分连接产物回复成 pMR11, 转化子产 GL-7-ACA 酰化酶。值得注意的是有一些重组质粒如 pMR15 分子量与 pMR11 相同, 仍能用 BamHI 酶解得到与 pMR11 相同的电泳图谱, 但是, 带 pMR15 的 *E. coli* C600 并不表达 GL-7-ACA 酰化酶活力。这种情况可能是由于在重新连接过程中 B₂-B₃ 的连接方向发生改变造成的。因此, 0.7kb 的 B₂-B₃ 片段不仅为酰化酶基因表达所必需, 而且方向不能颠倒。

(四) GL-7-ACA 酰化酶基因表达及初步定位

本研究在 GL-7-ACA 酰化酶基因初级克隆的基础上, 经次级克隆构建了一系列重组质粒, 这些质粒的载体不同, 因此, GL-7-ACA 酰化酶基因片段分别处于不同启动子的下游。实验进一步比较了带这些重组质粒的 *E. coli* C600 产酶能力, 结果见表 4, 从测定数据可知, B₂-B₃-B₄ 酰化酶基因片段 (3.5kb) 在启动子

tac控制之下时(pMR10), GL-7-ACA酰化酶基因表达水平较高,比初级克隆的pMR5高一倍,同样这一段处于pAC-YC184的tet启动子下游时(pMR9),产酶水平与pMR5相当。在重组质粒pMR11中,去除了0.5kb的Hpa I至B₄这一段DNA顺序, GL-7-ACA酰化酶基因仍能表达,尽管在这一片段的前端顺次串接

着lac和tac两个启动子,其基因表达水平与只带tac启动子的pMR10相当。根据上述数据,可以将GL-7-ACA酰化酶基因初步定位在3.0kb的B₂-B₃-Hpa I片段上(图3)。

讨论

已有报道表明^[12-14],当假单胞菌的某些基因片段被引到大肠杆菌以后往往很难表达,其原因是由于假单胞菌的启动子不能被大肠杆菌中的RNA聚合酶有效识别。

经一系列次级克隆,本工作已将GL-7-ACA酰化酶基因定位在3.0kb的B₂-B₃-Hpa I片段上。Matsuda等^[15-17]从假单胞菌GK16以及SE83等菌株中鉴定得到表达GL-7-ACA酰化酶活力的三种DNA片段,它们之间的酶切类型均不同。初步结果表明,由假单胞菌130菌株中克隆得到的酰化酶基因片段与Matsuda等的GK16菌株相似,但进一步比较有待于今

表4 不同启动子对GL-7-ACA酰化酶基因表达的影响

Table 4 The effect of promoters on the expression of GL-7-ACA acylase gene

重组质粒 Recombinant Plasmid	载体 Vector	片段前端的启动子 Promoter on the upstream of fragment	酰化酶活力 Acylase activity (u/L)
pMR5	pBR322	tet	37.3
pMR6*	pBR322	tet	5.9
pMR9	pACYC184	tet	27.1
pMR10	pDR540	tac	67.1
pMR11	pUC19	lac-tac	63.3

* 酰化酶基因片段反向插入在启动子下游

Acylase gene fragment was inserted downstream of the promoter in the opposite orientation

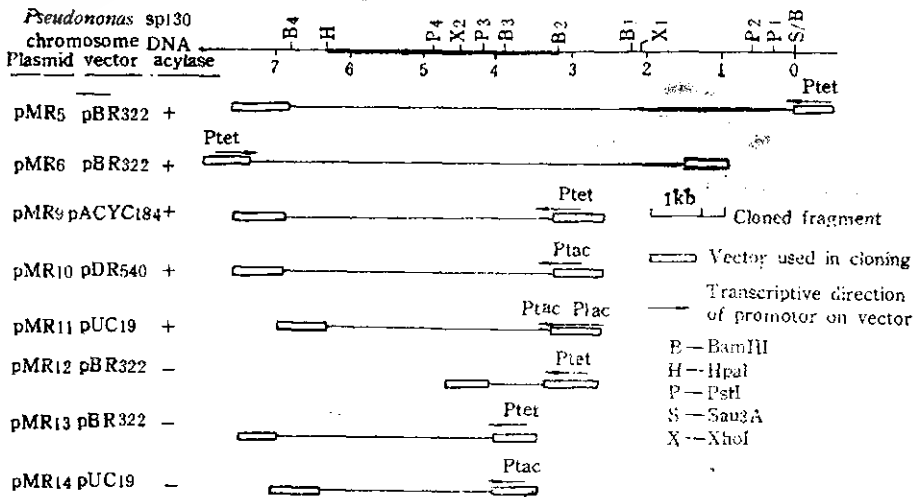


图3 GL-7-ACA酰化酶基因定位

Fig.3 Localization of GL-7-ACA acylase gene

后对克隆片段的DNA顺序分析。

有报道^[4,10,18]认为,启动子下游外源片段上无关顺序的去除,结构基因的表达水平会相应提高。我们在实验中,已将GL-7-ACA酰化酶基因与载体质粒上启动子之间的距离缩短了3 kb以上,结果pMR9的产酶水平仍与pMR5相似,并未提高,在这两个质粒中,插入片段前均为tet启动子。对于pMR10,酰化酶基因片段紧接于pDR540载体的tac启动子下

游,tac的启动能力较强,并被用于多种基因在*E. coli*中的克隆表达^[19-21]。在该启动子控制下,酰化酶基因表达水平有所提高,比pMR9和pMR5高一倍。如果在tac之前再串接一个lac启动子(pMR11),产酶水平仍维持与pMR10相当。综上所述,假单胞菌的GL-7-ACA酰化酶基因片段在大肠杆菌宿主中表达时,基因的表达水平受其前端启动子种类的影响。

参 考 文 献

- [1] 杨蕴刘等: 生物工程学报, 7,99, 1991.
- [2] Ihoh, S. et al., *DNA*, 2(3),157, 1984.
- [3] Mark, D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:5662, 1984.
- [4] Backman, K. et al., *Cell*, 13:65, 1978.
- [5] Amann, E. et al., *Gene*, 40:183, 1985.
- [6] Appleyard, R. et al., *Genetics*, 39:440, 1954.
- [7] Bolivar, F. et al., *Gene*, 2:96, 1977.
- [8] Chang, A. C. Y. et al., *J. Bacteriol.*, 134:1145, 1978.
- [9] Russell, D. R. et al., *Gene*, 20:231, 1982.
- [10] Yanisch-Perron, C. et al., *Gene*, 33:103, 1985.
- [11] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [12] Inouye, S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1688, 1984.
- [13] Minton, N. P. et al., *Gene*, 31:31, 1984.
- [14] Nakai, C. et al., *J. Biol. Chem.*, 258:2923, 1983.
- [15] Matsuda, A. et al., *J. Bacteriol.*, 163:1222, 1985.
- [16] Matsuda, A. et al., *J. Bacteriol.*, 169:5815, 1987.
- [17] Matsuda, A. et al., *J. Bacteriol.*, 169:5821, 1987.
- [18] 郭文彤等: 生物工程学报, 2(3), 25, 1986.
- [19] De Boer, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21, 1983.
- [20] Babineau, D. et al., *J. Biol. Chem.*, 260:12313, 1985.
- [21] Thogersen, H. C. et al., *Eur. J. Biochem.*, 147:325, 1985.

Restriction Mapping of GL-7-ACA Acylase Gene Fragment and Its Localization

Yang Yunliu Yun Dinfang Peng Huilin Jiao Ruishen
(Shanghai Institute of the Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

This paper presents the results about the restriction mapping of recombinant plasmids pMR5 and pMR6 containing GL-7-ACA acylase

gene from *Pseudomonas* sp. 130, gene localization and its expression under the control of different promoters, tet, tac or lac/tac, in *Escherichia coli*. The analysis of gel electrophoresis of pMR5 cleaved with several kinds of restriction enzymes indicated that there is no sites of EcoR I, Hind III and Cla I but the presence of following sites: one Hpa I, two Xho I, three BamH I and four Pst I on the cloned gene fragment. The restriction maps of pMR5 and pMR6 were determined by comparative digestion of various endonucleases. The gene of GL-7-ACA acylase was localized on a 3.0kb fragment of B₂-B₃-Hpa I from the studies on a serial subcloning. Expression of subclones pMR9, pMR10 and pMR11 in *E. coli* was compared. Higher yield of acylase was obtained when the gene fragment was placed downstream of the tac promoter. The expression of *Pseudomonas* gene in *E. coli* was also discussed.

Key words

GL-7-ACA acylase; restriction mapping; gene localization