

青霉素酰化酶调节基因的定位和反式作用

蒋巧玲 吴汝平* 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海)

(中国科学院上海药物研究所, 上海)*

青霉素酰化酶基因(pac)的定位研究表明它的调节基因和结构基因位于3.5kb的Hind III-EcoR I片段。本文报道构建一系列质粒pPA 6的缺失衍生物,并测定这些缺失对pac表达的影响。结果表明调节基因位于pac结构基因内的Sph I-Pvu II片段。Sph I-Pvu II片段克隆到质粒pTZ18U,所得质粒pPA57转化到青霉素酰化酶产生菌*E. coli* D816,观察Sph I-Pvu II片段对染色体 pac 基因表达的影响。结果表明在 Sph I-Pvu II 片段内的调节基因反式调节 pac 基因表达。计算机分析表明在 Sph I-Pvu II 片段内有两个 ORF 是编码调节蛋白的可能候选者。pac 调节基因的精确定位正在进行中。

关键词 青霉素酰化酶; 调节基因; 反式作用

青霉素 G 酰化酶操纵子 (pac) 位于 Hind III-EcoR I 3.5kb 的 A 片段上^[1], 在青霉素酰化酶克隆株中青霉素酰化酶基因表达仍受苯乙酸诱导和温度的调控^[1,2]。在 3.5kb 的 A 片段上青霉素酰化酶结构基因实际只占 2.5kb, 下游 1.0kb 片段的功能不清楚。操纵子的调节基因 (i) 通常位于结构基因上游, 也有的位于结构基因内部或下游。在 3.5kb 的 A 片段内, 青霉素酰化酶结构基因的信号肽上游只有 52 个碱基, 此内含有启动子和 SD 顺序^[1,3,4], 没有起始密码, 这个小片段不可能编码一个调节蛋白, 推测调节基因位于结构基因内部或下游, 也可能是青霉素酰化酶自身调控。虽然青霉素酰化酶基因已用遗传工程手段克隆得到^[5-8], 并对其基因结构有所认识^[3], 但基因调控方面的研究尚未见报道。本文报道青霉素酰化酶调节基因位于结构基因内部的 Sph I-Pvu II 2.3 kb 区域内 Bgl II 位点的上下游, 并证明调节基因以反式作用方式调节青霉素酰化酶基因的表达。

材料与方 法

(一) 菌种与质粒

大肠杆菌 C600 (thr, leu, thi, sup E46, lacY, tonA, F⁻) 为基因工程研究常用宿主。

pACYC184 为遗传工程常用质粒, 带四环素 (Tc) 及氯霉素 (Cm) 双抗性标记。

pBR322 为遗传工程常用质粒, 带四环素 (Tc) 及氨苄青霉素 (Ap) 双抗性标记。

pPA6 为带青霉素酰化酶基因的 pRK 733.2 杂种质粒, 带氨苄青霉素 (Ap) 抗性标记^[1]。

(二) 试剂

³²P- α -dATP 为 Amersham 产品; 限制酶购自 Boehringer 公司。

(三) 培养基及培养条件

LB 液体培养基用于提取质粒及转化

本文于 1991 年 4 月 24 日收到。

本工作得到南京大学刘建宁、周朝军的帮助, 特此致谢。

DNA, LB固体培养基加1.5%琼脂。

发酵培养基: 3%酵母浸膏干粉, 0.5%NaCl, 0.2%苯乙酸, pH7.8~8.0。

培养条件: 250ml三角瓶装150ml培养基, 在旋转式摇床上培养, 摇床转速为180~200rpm(或试管内培养)。

(四) DNA体外重组方法

质粒DNA的提取、转化、酶切、电泳及体外重组方法参照文献[9—12]。

(五) 青霉素酰化酶活性测定

用3-苯乙酰胺-6-硝基苯甲酸(NIP-AB)为底物测定青霉素酰化酶活性, 方法参照文献[13]。

(六) RNA提取

用异硫氰酸胍一步法提取RNA^[14]。大肠杆菌培养30—38h后, 离心收集菌体, 分别用异硫氰酸胍-酚-氯仿破壁去蛋白和DNA杂质。用乙醇沉淀。置-20℃保存。

(七) DNA探针制备

所需DNA片段用合适的酶从质粒上切出后, 经琼脂糖凝胶电泳分离, 用DE-AE81滤纸回收, Cellulose小柱纯化所需DNA片段。所得DNA片段用缺口转移法进行标记^[15]。

(八) RNA-DNA点杂交

RNA-DNA点杂交参照Casey法^[16]。RNA样品用 $3 \times \text{SSC}$, 7%甲醛溶解, 在50~55℃水浴保温30min变性, 点样于Zeta-probe blotting membranes(Bio Rad)滤膜上, 80℃烘2h。42℃条件下用 $2 \times \text{SSC}$, 0.1%SDS洗3次, 42℃预杂交2—4h。加入标记好的探针, 42℃杂交24—48h。65℃条件下分别用大量的 $2 \times \text{SSC}$, 0.1%SDS和 $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1%SDS洗3次, 晾干杂交膜, 放射自显影24—48h。

结 果

(一) pac 结构基因下游片段无调节作用

pac基因DNA顺序表明, pac结构基因含信号肽, 核苷酸编码 α 亚基, 间隙肽及 β 亚基^[3]。而我们研究的pac基因位于3.5kb Hind III-EcoR I 片段, 含结构基因和调节基因, 在结构基因下游约有1kb。为此我们先缺失下游片段, 观察pac基因的表达。

1. pac结构基因下游片段缺失: 质粒pPA6分别用Hind III、Sma I酶切, pBR322用Hind III-Pvu II双酶切作载体, DEAE81-Cellulose法分离纯化pPA6 3.0kb和pBR322 2.3kb片段。纯化后的DNA分子用T4 DNA连接酶连接, 转化大肠杆菌C600, 在LB固体培养基上筛选Ap^r、Tc^r的转化子。菌落分析酶切鉴定, 得到缺失pac基因下游0.5kb的质粒pPA51。质粒构建见图1所示。

2. 结构基因下游片段缺失对pac基因表达的影响: 大肠杆菌C600(pPA51)和C600(pPA6), 在加诱导剂和不加诱导剂的培养基中, 分别在22℃发酵72h, 37℃发酵48h, 测定青霉素酰化酶活性。结果见表1, 缺失下游片段的质粒pPA51表达青霉素酰化酶的特性不变, 与pPA6表达pac基因的强弱完全一致, 即pac基因表达受苯乙酸诱导, 在37℃产生没有活性的青霉素酰化酶, 在22℃合成有活性的青霉素酰化酶。此结果说明, 缺失的下游片段对pac基因表达没有调节作用, 调节基因可能在pac结构基因内部, 也可能是青霉素酰化酶自身调控。

(二) pac基因不是自身调控

青霉素G酰化酶专一性水解具有苯乙

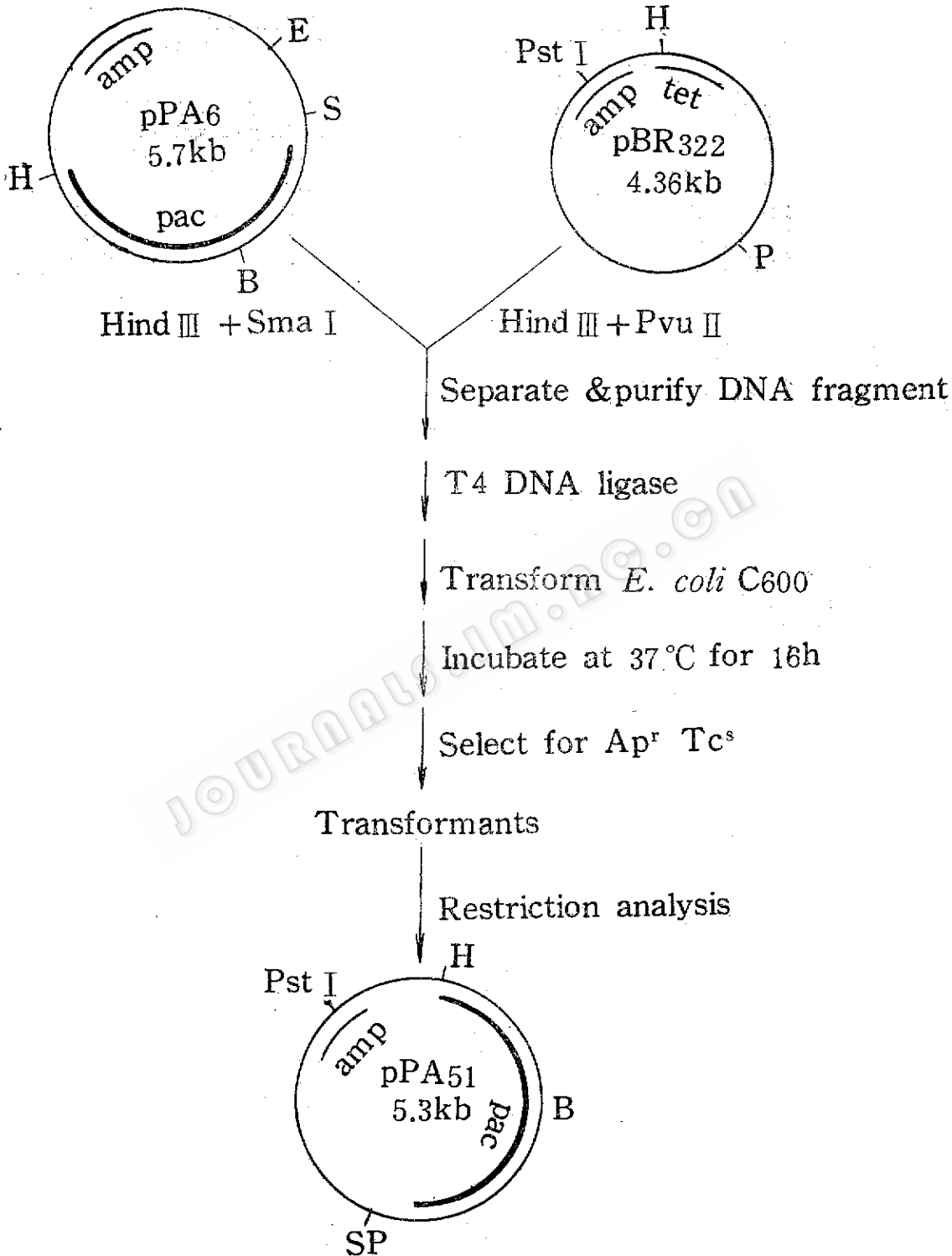


图1 *pac*基因下游DNA顺序的缺失

Fig.1 Deletion of the downstream DNA fragment of *pac* gene
E: EcoRI; H: HindIII; B:BglII; S:SmaI; P:PvuII;
SP:SmaI-PvuII

表 1 缺失下游DNA片段对青霉素酰化酶合成的影响

Table 1 Effect of deletion of the downstream DNA fragment on the synthesis of penicillin G acylase

菌株 Strain	诱导 Induction	细胞密度 cell density OD _{546nm}	青霉素酰化酶活力 Activity of penicillin acylase (u/100ml)	青霉素酰化酶活力 (10 ⁻³ u/OD)
<i>E. coli</i> C600(pPA6)	+	6.5	10.71	16.50
<i>E. coli</i> C600(pPA6)	-	8.0	7.24	9.10
<i>E. coli</i> C600(pPA51)	+	6.8	10.08	14.80
<i>E. coli</i> C600(pPA51)	-	7.5	7.56	10.10

酰基侧链的底物，而 *pac* 操纵子的表达又需要苯乙酸的诱导，说明青霉素G酰化酶和调控蛋白具有共同的识别和结合苯乙酰基的活性部位，预示着自身调控的可能性，也可能调控蛋白是青霉素酰化酶蛋白的部分片段。

1. *pac* 结构基因 *Sph*I 位点和 C 末端缺失：质粒 pPA6 用 *Sph*I 酶切，继而用 *S*₁ 将粘性末端切平，缺失 4 个核苷酸；pPA6 另用 *Pvu*II - *Sma*I 双酶切，缺失 *pac* 基因 C 末端，两端平头的两种线性 DNA 分子分别用 T4 DNA 连接酶连接环化，转化大肠杆菌 C600，从 Ap^r 的平板上挑单菌落至含 NIPAB 的固体 LB 平板上，筛选不显黄色的菌落。这些无色菌落接种于 2ml 发酵培养基中，28℃ 过夜培养，菌体沉淀加入 200μl 3mmol/L NIPAB，37℃ 反应 4—20h，证实仍不显黄色。酶切分析鉴定，得到质粒 pPA54 和 pPA53，见图 2 和图 3。

2. *pac* 操纵子不是自身调控：质粒 pPA54、pPA53 和对照质粒 pPA6 转化大肠杆菌 C600。大肠杆菌 C600(pPA6)、C600(pPA53) 和 C600(pPA54) 在 26℃ 培养 38h，提取细胞总 RNA。从质粒 pPA6 上用 *Eco*R V - *Pvu*II 切出 2.15kb 的 *pac* 结构基因部分片段作为探针，分析上述三种细胞中青霉素酰化酶 mRNA 的量。放射自显影结果如图 4 和图 5 所示。结果显示 C600(pPA54) 和 C600(pPA53) 细胞转录

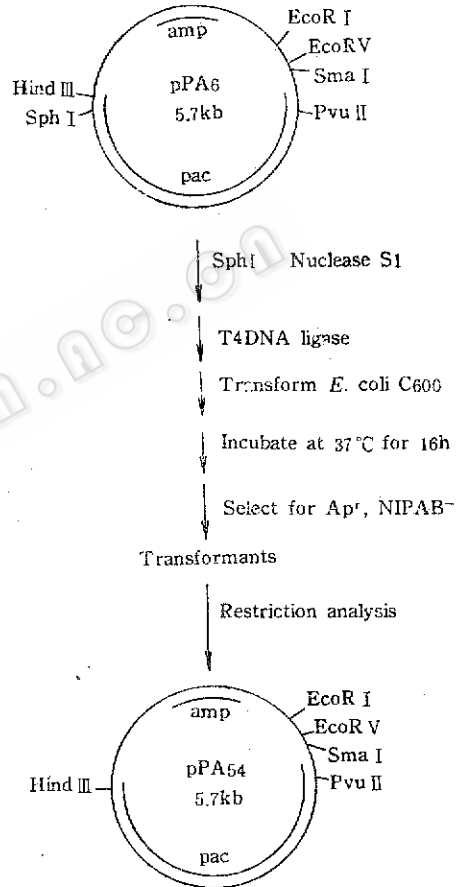


图 2 在 *Sph*I 位点缺失 *pac* 结构基因
Fig.2 Deletion of the *pac* structural gene at *Sph*I site

产生青霉素酰化酶 mRNA 的量与 C600 (pPA6) 细胞一致，表现为依赖苯乙酸的诱导，无苯乙酸诱导时，细胞内只能检测到微量的 *pac*-mRNA，有苯乙酸诱导时，细胞内积累显著量的 *pac*-mRNA。

上述结果表明，在 *pac* 结构基因的

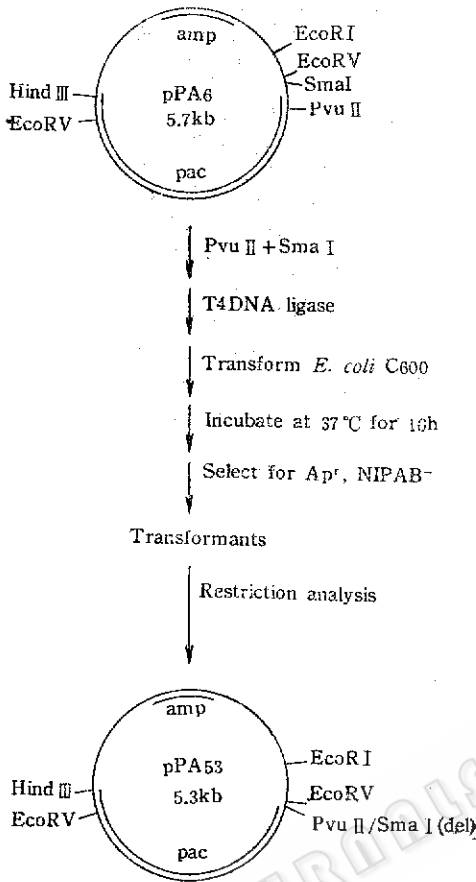


图3 在3'-末端缺失pac结构基因
Fig.3 Deletion of the pac structural gene at 3'-terminus

Sph I 位点缺失 4 个核苷酸和 C 末端的缺失，并不影响pac 基因的表达调控，因此 pac 基因不是自身调控的，而其调节基因位于结构基因内部的2.3kb的Sph I -Pvu II 片段内。

(三) 调节基因位于Bgl II 位点的上下游

用外源基因插入的方法，进一步定位调节基因。用不带自身启动子，但有 SD 顺序的氯霉素转乙酰酶基因(cat)作为 report 基因，将 cat 基因插入青霉素酰化酶基因Bgl II 位点，利用 pac 启动子转录产生融合的 mRNA，观察氯霉素抗性和青霉素酰化酶mRNA量变化来显示 pac 基因表达方式是否改变。

1. cat基因插入pac基因Bgl II 位点：质粒 pACYC184用Sau3A 完全水解，分离纯化0.9kb的cat基因片段，cat 无自身启动子含其SD顺序，pPA6用 Bgl II 全水解，利用Bgl II 和Sau3A 有相同的粘性末端，用T4DNA连接酶将cat基因插入 pac 基因Bgl II 位点。转化大肠杆菌C600，培养24℃筛选Ap^r、Cm^r的转化子，菌落分析酶切鉴定得到质粒pPA46，见图 6。

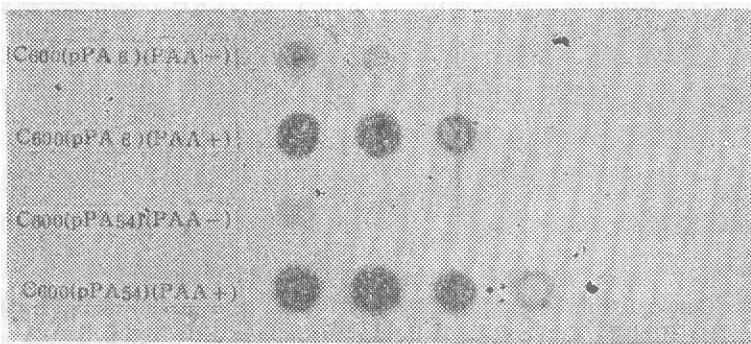


图4 Sph I 位点缺失对pac操纵子转录的影响
Fig.4 Effect of deletion at Sph I site on the transcription of pac operon. probe: pac(EcoRV-Pvu II 2.2kb)

2. report基因呈组成型表达：大肠杆菌C600(pPA46)分别在 22℃、37℃ 培养，发现在加诱导剂和不加诱导剂时，均

能抗 500γ 的氯霉素，cat作为report 基因不受温度和诱导剂的影响，表现为组成型表达的特点。cat基因利用pac启动子转录

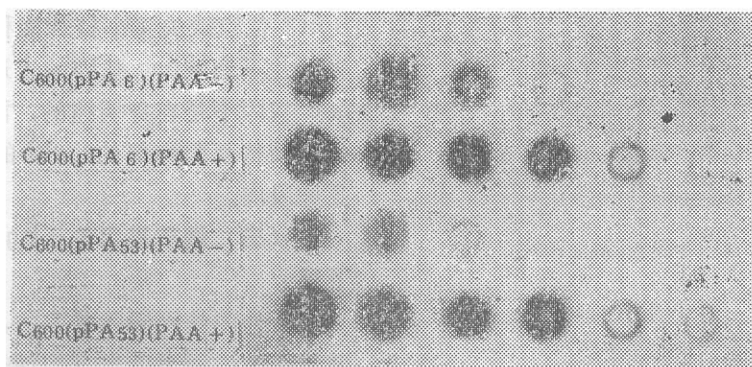


图 5 缺失pac结构基因3'末端对pac转录的影响

Fig.5 Effect of deletion at 3'-end of hte pac structural gene on the pac transcription

probe: EcoRV-PvuII fragment of the pac gene

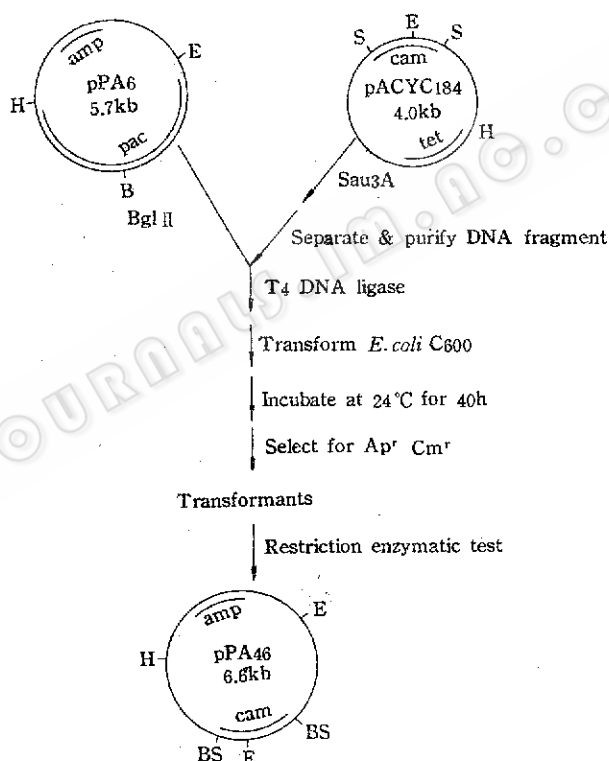


图 6 在BglII位点带cat基因插入的pPA46质粒构建图

Fig.6 Construction of plasmid pPA46 with cat gene insert at BglII site

H: HindIII; E: EcoRI; B:BglII; S: Sau3A; BS: BglII/Sau3A

得到融合的mRNA, 再利用其自身SD顺序翻译得到氯霉素转乙酰酶, 这样氯霉素抗性高低, 即氯霉素转乙酰酶活性高低, 就间接反映了pac操纵子的表达情况。cat基因插入BglII位点, 使pac基因呈组成

型表达, 说明cat插入破坏了pac操纵子的调节基因, 表明调节基因位于BglII位点上下游。

3. cat插入引起青霉素酰化酶mRNA增加; report基因间接反映了pac启动

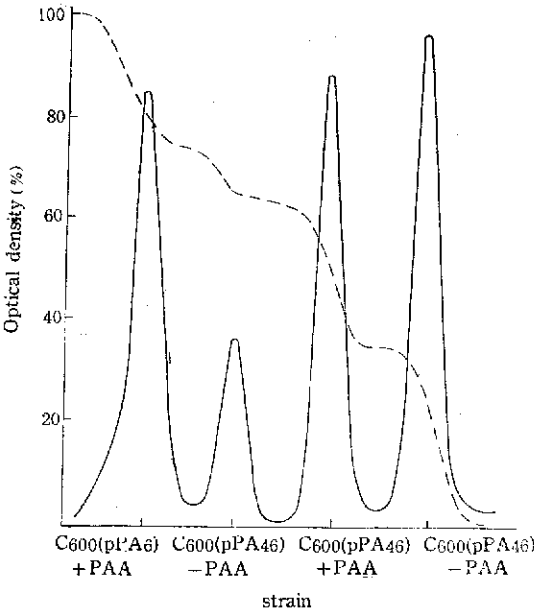


图7 cat基因插入对青霉素酰化酶 mRNA 浓度的影响

Fig.7 Effect of cat insertion on the mRNA concentrations of penicillin G acylase
—Optical density, ----Integral curve

子转录的强弱,我们进一步检测青霉素酰化酶mRNA量来直接反映pac启动子的转录情况。大肠杆菌C600(pPA6)和C600(pPA46)在22℃培养30h,提取细胞总RNA。从质粒pPA6上用HindⅢ-BglⅡ切出1.65kb的pac基因部分片段作为探针,分析上述两种细胞内青霉素酰化酶mRNA的量。放射自显影。结果显示C600(pPA46)细胞在加诱导剂和不加诱导剂时,细胞内青霉素酰化酶的量都很高,两者没有差别,和有诱导剂存在时C600(pPA6)细胞内的青霉素酰化酶mRNA水平一致,约为无诱导剂存在时C600(pPA6)细胞的2.7倍(见图7)。cat基因插入BglⅡ位点,pac基因转录表现为去阻遏状态。

上述结果表明,调节基因位于BglⅡ位点上下游,cat基因的插入破坏了调节基因,使之不能表达产生有活性的阻遏蛋白,操纵基因上无阻遏蛋白结合,RNA聚合酶能有效地作用于启动子,大量转录产生青霉素酰化酶mRNA。

(四) pac调节基因的分子克隆

用SphⅠ-SmaⅠ双酶切质粒pTZ18U的polylinker作用载体,从质粒pPA6上克隆含有调节基因的SphⅠ-PvuⅡ2.3kb的DNA片段。质粒pPA6上2.3kb的片段用DEAE81-Cellulose法从琼脂糖凝胶中分离纯化,用T4DNA连接酶将其与2.86kb的载体DNA分子连接,转化大肠杆菌C600,筛选Ap^r的转化子。转化菌落的质粒DNA经酶切电泳分析,得到分子量为5.16kb的质粒pPA57(见图8)。

(五) 质粒pPA55的构建

质粒pPA54在pac基因的SphⅠ位点缺失了4个核苷酸,以pPA54(5.7kb)为出发质粒,用PvuⅡ-SmaⅠ将pac基因C末端连同其下游片段缺失0.4kb,T4DNA连接酶使5.3kb的DNA分子自身环化,转化大肠杆菌C600,筛选Ap^r的转化子。转化菌落的质粒DNA经酶切电泳分析,得到分子量为5.3kb的质粒pPA55(见图9)。质粒pPA55破坏了pac结构基因的头、尾端,保证了pac操纵子的启动子,操纵基因和调节基因的完整。

(六) pac调节基因的反式作用

克隆载体pTZ18U和质粒pPA55、pPA57分别转化染色体上带有完整pac操纵子的大肠杆菌D816。大肠杆菌D816、D816(pPA57)、D816(pPA55)和D816(pTZ18U),分别在有诱导剂和没有诱导剂的培养基中摇瓶发酵96h,培养温度为26℃,用NIPAB法检测上述4种细胞染色体上pac操纵子表达产生的青霉素酰化

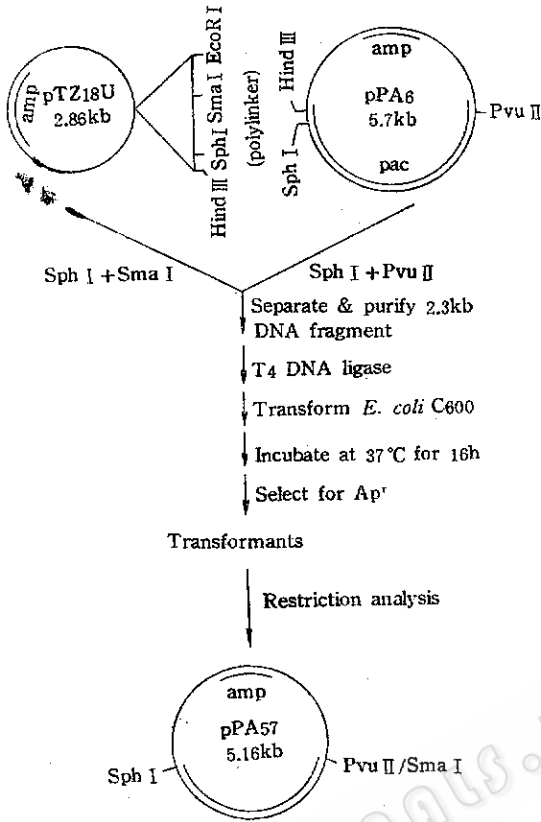


图8 pac 调节基因的克隆
Fig.8 Scheme of cloning pac regulatory gene

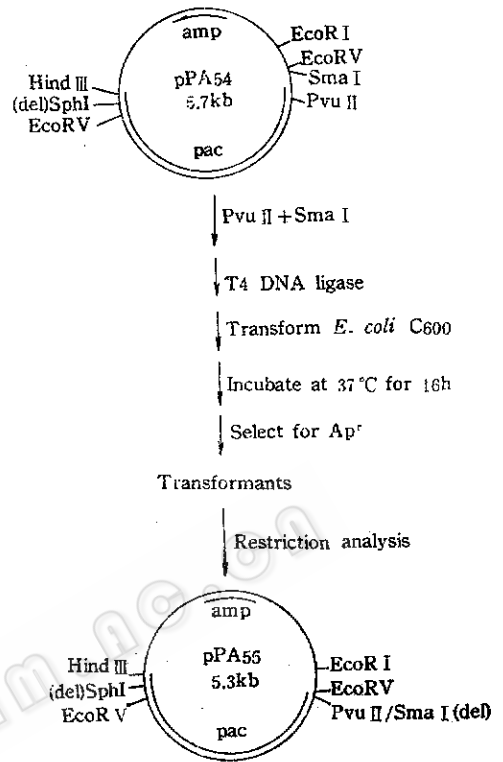


图9 质粒pPA55构建图
Fig.9 Construction of plasmid pPA55

表 2 调节基因对pac基因表达的反式作用
Table 2 Trans-action of regulatory gene on the pac gene expression

菌株 Strain	诱导 Induction	细胞密度 Cell density (OD _{546nm})	青霉素酰化酶活力 Activity of penicillin acylase	
			(u/100ml)	(10 ⁻⁴ u/OD)
D816	+	8.0	6,048	75.60
D816(pPA57)	+	8.0	3,276	40.95
D816(pPA55)	+	9.0	6,552	72.80
D816(pTZ18U)	+	10.0	8,820	88.20
D816	-	16.0	0,630	3.94
D816(pPA57)	-	16.0	0,504	3.15
D816(pPA55)	-	16.0	0,630	3.94
D816(pTZ18U)	-	15.0	0,630	4.20

酶, 结果见表 2。

表 2 显示, 加诱导剂苯乙酸后, D816 (pPA57) 细胞产生的青霉素酰化酶, 比 D816 细胞产生的少, 约为 D816 细胞的二分之一。有诱导剂存在时, D816 细胞染色体

上的青霉素酰化酶操纵子处于打开状态, 此时阻遏蛋白被苯乙酸结合而失活, 使 pac 操纵子得以表达; 当 D816 细胞内转入多拷贝的调节基因 (pPA57) 后, 质粒 pPA57 表达产生大量的阻遏蛋白, 苯乙酸不

能将阻遏蛋白全部结合失活，一部分有活性作用的阻遏蛋白结合于染色体上 *pac* 操纵基因上，阻碍 RNA 聚合酶对青霉素酰化酶基因的转录表达，使得 D816(pPA57) 细胞产生的青霉素酰化酶下降。

没有诱导剂存在时，D816(pPA57) 和 D816 细胞合成的青霉素酰化酶基本一致。这是因为在没有诱导剂的情况下，D816 细胞染色体上的 *pac* 操纵子已经处于关闭状态，它的操纵基因上已结合有阻遏蛋白。当多拷贝的调节基因(pPA57)转入 D816 细胞后，pPA57 质粒产生的阻遏蛋白对青霉素酰化酶操纵子进一步关闭的效应也就不明显。在没有诱导剂时，染色体上青霉素酰化酶操纵子的低微表达是“渗漏”引起的，因而此时 D816(pPA57) 细胞 *pac* 调节基因的反式作用也就不明显。

实验中我们同时用 D816(pPA55) 和 D816(pTZ18U) 细胞作对照，发现这两种细胞产生的青霉素酰化酶和 D816 细胞几乎没有差别(见表2)。当有完整的 *pac* 启动子，操纵基因和调节基因的质粒 pPA55 转入大肠杆菌 D816 细胞后，大肠杆菌 D816(pPA55) 细胞染色体上的青霉素酰化酶操纵子表达强弱不变，这是因为质粒 pPA55 上调节基因的产物阻遏蛋白大多被质粒本身含有的多拷贝操纵基因竞争

结合而失活，结合到染色体上操纵基因的阻遏蛋白数目变化不大，因此调节基因的 *trans*-阻遏效应也就不明显。调节基因的反式作用可被操纵基因逆转，说明起作用的确实是阻遏蛋白，再次证实了 *pac* 操纵子是负调控模型，此结果和操纵基因滴定实验完全相符。

大肠杆菌 D816(pTZ18U) 细胞染色体上青霉素酰化酶操纵子表达和 D816 细胞无甚差别，说明载体 pTZ18U 对 *pac* 基因表达没有影响，质粒 pPA57 对 D816 染色体上青霉素酰化酶操纵子表达的 *trans*-阻遏作用不是载体 pTZ18U 引起的，而确实是 pPA57 质粒上克隆的调节基因的产物所引起的。

上述结果表明，青霉素酰化酶操纵子的调节基因确实在 *pac* 结构基因内部 Sph I -Pvu II 2.3kb 范围内，而且调节基因具有自己的启动子和 SD 顺序，它并不是由 *pac* 基因的启动子转录的。

(七) Sph I -Pvu II 片段阅读框架 (ORF) 分析

我们借助于计算机，在基因数据库中检索 *pac* 基因内部存在的阅读框架 (ORF) 对正向和反向共 6 种读框都进行了检索，发现有 3 个反向的 ORF，但一个超越了 Sph I -Pvu II 范围，另一个在 Sph I 上游，还

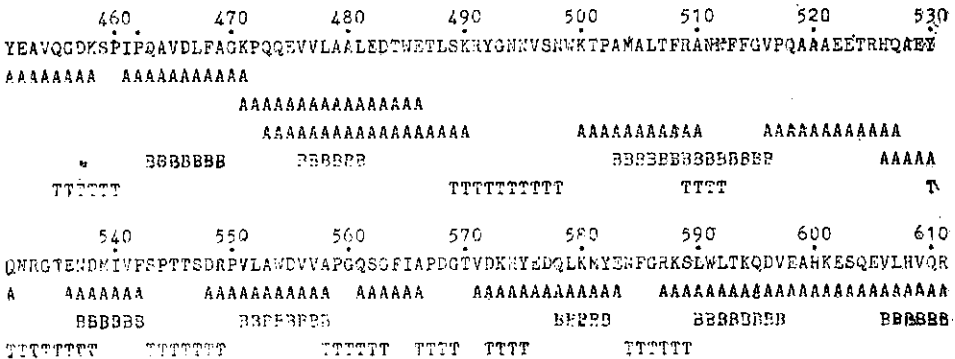


图10 451到611肽链的次级结构

Fig.10 Secondary structure of the peptide from 451 to 611 residues

有一个跨越了Sph I 位点, 3个反向ORF均可排除, 它们不可能编码阻遏蛋白。

正向的ORF有40个, 在 Sph I -Pvu II 区域内, 跨越Bgl II 位点的 ORF 有2个, 一个是 258bp(+1498—+1755bp, 86aa)的ORF₁, 另一个是 198bp(+1622—+1819bp, 66aa)的ORF₂。Bgl II 位点(+1620—+1625bp)插入cat基因, 将破坏ORF₁和ORF₂, 这2个ORF的大小很适合作为调控蛋白;另外38个正向ORF都不符合要求, 可排除。这2个ORF之一可能就是编码阻遏蛋白的调节基因。

分析青霉素酰化酶蛋白质的二级结构, 发现在ORF₁中有蛋白质结合位点的结构特征: “ α 螺旋-转角- α 螺旋”, 如图10所示。

基因库数据表明, 在 Bgl II 位点上下游确实存在编码调控蛋白的 ORF, 这个ORF具有调控蛋白的结构特征。

讨 论

青霉素酰化酶的底物专一性表现为酶对底物侧链的专一性, 青霉素 G 酰化酶专一性地水解具有苯乙酰基侧链的青霉素 G。青霉素 G 酰化酶操纵子的表达受苯乙酸的诱导, 苯乙酸是青霉素 G 酰化酶水解青霉素 G 的产物之一, 苯乙酰基是底物青霉素 G 的侧链。青霉素 G 酰化酶的诱导剂

和底物具有共同的苯乙酰基, 由此可推断: 青霉素酰化酶和调控蛋白(阻遏蛋白)具有共同的识别和结合苯乙酰基的部位, 这就存在三种可能: 第一, 青霉素酰化酶自身调控 pac 操纵子表达, 酶本身起阻遏蛋白的作用, 酶的底物专一性决定簇, 同时又是诱导剂的识别和结合部位; 第二, 阻遏蛋白是青霉素酰化酶的部分片段, 其中包含底物专一性的决定簇, 可能保留青霉素酰化酶168位 Met 残基^[17]; 第三, 阻遏蛋白包含了一个迄今尚未发现的苯乙酰基结合位点, 使得诱导剂能够识别并作用于这一位点, 而调节 pac 操纵子的表达。

基因缺失和插入实验发现 pac 操纵子不是自身调控, 阻遏物基因位于青霉素酰化酶结构基因内部, 只是 pac 基因的部分片段。计算机分析青霉素酰化酶基因 DNA 序列, 发现有 2 个 ORF 跨越 Bgl II 位点, 它们的大小分别是 86aa 和 66aa。调节蛋白通常都是小分子蛋白^[18], 这两个 ORF 之一可能编码阻遏蛋白的调节基因。

阻遏蛋白可能并不保留青霉素酰化酶 168 位的 Met 残基, 因为找不到同时跨越 Nco I (+502bp, 168 位点 Met 残基) 和 Bgl II (+1620bp) 位点的 ORF, 由此看来, 阻遏蛋白很可能包含另一个苯乙酰基的结合位点。青霉素酰化酶调节基因的精确定位正在进入进行。

参 考 文 献

- [1] 吴汝平等: 生物工程学报, 1(3):12, 1985.
- [2] 杨胜利等: 生物工程学报, 4(1):32, 1988.
- [3] Schumacher, G. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 14:5713, 1986.
- [4] Oh, S. J. et al.: *Gene*, 56:87, 1987.
- [5] Mayer, H. et al.: *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp459, 1979.
- [6] Meevootison, V. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46:1227, 1983.
- [7] Deretic, V. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 24:173, 1984.
- [8] Mayer, H. et al.: *Enzyme Engineering*, 5:61, 1980.
- [9] Birnboim, H. C. and Poly, J.: *Nucleic Acids Res.*, 7:1513, 1979.

- [10] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, P.104, 1982.
- [11] Cohen, S. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69:2110, 1973.
- [12] Dugaiczyk, A. et al.: *J. Mol. Biol.*, 96:171, 1975.
- [13] 张启先等: *微生物学报*, 19:302, 1979.
- [14] Chomczynski, P. and Sacchi, N.: *Analytical Biochem.*, 162:156, 1987.
- [15] Rigby, P. N. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 113:237, 1977.
- [16] Casey, J. and Davidson, N.: *Nucleic Acids Res.*, 4:1539, 1977.
- [17] Williams, J. A. et al.: *J. Cell. Biochem. Suppl.* 9B:99, 1985.
- [18] Armstrong, J. et al.: *Nucleotide Sequences*, Vol. I, A Special Supplement to *Nucleic Acids Res.*, IRL, pp. phage 12-25, 1985.

Location and Trans-action of the pac Regulatory Gene

Jiang Qiaoling Wu Ruping* Yang Shengli

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

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences)*

The study on the localization of the pac gene indicated that the regulatory and structural genes were located in a 3.5 kb HindIII-EcoRI fragment. This paper reported that a series of deletions derivatives of plasmid pPA6 was constructed and the effect of deletions on the pac expression was determined. The results implied that the pac regulatory gene was located in the SphI-PvuII fragment within the pac structural gene. Then, the Sph I -Pvu II fragment was cloned to the plasmid pTZ 18U at the Sph I -Sma I sites and the resulting plasmid pPA57 was transformed into the penicillin acylase producing strain *E. coli* D816 to observe the effect of Sph I -Pvu II fragment on the chromosomal pac expression. The results demonstrated that the regulatory gene within the Sph I -Pvu II fragment regulated the pac expression in trans. Computer analysis indicated that there were two ORFs in the Sph I -Pvu II fragment as the possible candidates coding for the regulatory protein. The precise localization of the pac regulatory gene is underway.

Key words

Penicillin acylase; regulatory gene; trans-action