

青霉素 G 酰化酶调节基因的定位

蒋 岚 王宇澄 蒋巧玲 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 为了定位青霉素 G 酰化酶的调节基因,从质粒 pPA6 克隆了一系列青霉素 G 酰化酶基因(*pac*)的片段,将这些重组质粒转化 *E. coli* D816,测定克隆片段对 *pac* 表达的影响。如果克隆片段含有完整的调节基因(*pacR*),诱导剂不能使由高拷贝 *pacR* 表达的阻抑物失活,部分阻抑物结合 *pac* 操纵基因,阻碍 RNA 聚合酶对 *pac* 的转录,因此 *pac* 的表达量降低。发酵结果表明,阻抑物可能是由 *pac* 结构基因内部的 ORF II 编码的蛋白因子。

关键词 青霉素 G 酰化酶调节基因(*pacR*), 基因定位

学科分类号 Q74

青霉素 G 酰化酶(PA, EC3.5.1.11)催化青霉素 G 分解为 6-APA 和苯乙酸,6-APA 是半合成抗生素的重要原料^[1]。在许多微生物中有 PA 活性,如革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、丝状真菌和酵母等^[2~6]。其中,以大肠杆菌和巨大芽孢杆菌研究得最为透彻^[7~9]。杨胜利教授等在 1985 年从 *E. coli* D816 中克隆了 *pac* 操纵子^[10],并进行了一系列研究。在 *E. coli* 中,*pac* 的表达受苯乙酸诱导,操纵子为负调控模式^[11],但青霉素 G 酰化酶调节基因(*pacR*)仍未精确定位。为了精确定位 *pacR*,从质粒 pPA6 克隆了一系列青霉素 G 酰化酶基因(*pac*)的片段,用这些重组质粒转化 *E. coli* D816,测定克隆片段对 *pac* 表达的影响。如果克隆片段含有完整的调节基因(*pacR*),诱导剂不能使由高拷贝 *pacR* 表达的阻抑物完全失活,部分阻抑物结合 *pac* 操纵基因,阻碍 RNA 聚合酶对 *pac* 的转录,因此 *pac* 的表达量降低,反之,*pac* 的表达不受影响。在本实验中,我们定位了 *pacR* 在 500bp 的 TaqI-DraI 的片段中,这个片段中有两个 ORF,ORF I 编码 68 个氨基酸残基的多肽,而 ORF II 编码 86 个氨基酸残基的多肽。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂: NIPAB 和 PAA 购自 Sigma 公司, X-gal 和 IPTG 购自 Gibco BRL 公司。

1.1.2 菌种和质粒: 青霉素 G 酰化酶产生菌 *E. coli* D816 由上海第三制药厂提供。*E. coli* DH5 α 用作质粒扩增菌株。质粒载体 pOK12 由 Dr. Jeffrey Vieira 提供^[12]。

1.1.3 培养基和培养条件: LB 培养基用于提取质粒和转化。LBB 培养基由 LB 培养基加 1.5% 琼脂粉用于转化。检测转化子的青霉素 G 酰化酶活力的培养基为(%) : 蛋白胨 1, 酵母粉 1, NaCl 0.5, 苯乙酸 0.2, pH 7.8~8.0。培养条件: 22 $^{\circ}$ C, 250ml 三角瓶装

收稿日期: 1997-03-25, 修回日期: 1997-09-10。

150ml, 往复式摇床上培养(100r/min)。

1.2 方法

1.2.1 质粒的提取, DNA的纯化: 参考文献[13]

1.2.2 青霉素 G 酰化酶活力的测定: 参考文献[14]

1.2.3 重组质粒的构建: (1)pJL1. pPA6 和 pOK12 用 Sph I 和 Pvu II 酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 在含有 X-gal 和 IPTG 的 Km^r 板上筛选白色菌落。pJL1 中克隆的片段是 *pac* 操纵子的 2.4kb 的 Sph I -Pvu II 片段。(2)pJL2. pJL1 和 pOK12 用 EcoRV 酶切, 用 T4DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 在含有 X-gal 和 IPTG 的 Km^r 板上筛选白色菌落。转化子经酶切鉴定, pJL2 中克隆的片段是 *pac* 操纵子的 2.1kb 的 EcoRV-Pvu II 片段。(3)pJL3. pJL2 和 pOK12 用 Nco I 和 Pvu II 酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 在含有 X-gal 和 IPTG 的 Km^r 板上筛选白色菌落。转化子经酶切鉴定, pJL3 中克隆的片段是 *pac* 操纵子的 1.9kb 的 Nco I -Pvu II 片段。(4)pJL4. pPA6 和 pBR322 用 Sph I 和 Pvu II 酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 在 Ap^r 板上筛选白色菌落。转化子经酶切鉴定, pJL4 中克隆的片段是 *pac* 操纵子的 2.4kb 的 Sph I -Pvu II 片段。(5)pJL5. pYEJ001 和 pOK12 用 HindIII 酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 在 Cm^r 和 Km^r 板上筛选白色菌落。转化子经酶切鉴定, pJL5 中克隆了 *cat* 基因。(6)pJL6. pJL4 用 BamHI 酶切, pJL5 用 BamHI 和 Bgl II 酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 在 Cm^r 和 Ap^r 板上筛选白色菌落。转化子经酶切鉴定, pJL6 中克隆的片段是 *pac* 操纵子的 2.4kb 的 Sph I -Pvu II 片段, 在 *pac* 的 Bgl II 位点插入了 *cat* 基因。(7)pJL7. pJL3 和 pOK12 用 Acc I 和 BamHI 酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 在含有 X-gal 和 IPTG 的 Km^r 板上筛选白色菌落。pJL7 中克隆的片段是 *pac* 操纵子的 1.4kb 的 Acc I -Pvu II 片段。(8)pJL8. pJL3 用 Ssp I 和 BamHI 酶切, pOK12 用 Hind II 和 BamHI 酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 在含有 X-gal 和 IPTG 的 Km^r 板上筛选白色菌落。转化子经酶切鉴定, pJL8 中克隆的片段是 *pac* 操纵子的 0.9kb 的 Ssp I -Pvu II 片段。(9)pJL9. pJL3 用 TaqI 和 DraI 酶切, pOK12 用 DraI 和 BstBI 酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 在含有 X-gal 和 IPTG 的 Km^r 板上筛选白色菌落。转化子经酶切鉴定, pJL9 中克隆的片段是 *pac* 操纵子的 0.5kb 的 Taq I -Dra I 片段。(10)pJL10. pJL3 用 TaqI 和 BglII 酶切, pOK12 用 Bgl II 和 BstBI 酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 在含有 X-gal 和 IPTG 的 Km^r 板上筛选白色菌落。转化子经酶切鉴定, pJL10 中克隆的片段是 *pac* 操纵子的 0.54kb 的 Taq I -Bgl II 片段。

2 结 果

2.1 *pacR* 在 *pac* 结构基因的 Nco I -Bgl II 片段中

重组质粒 pJL1, pJL2, pJL3, pJL4, pJL6, pJL8 分别转化 *E. coli* D816, 转化子 *E. coli* D816(pJL1), *E. coli* D816(pJL2), *E. coli* D816(pJL3), *E. coli* D816(pJL4), *E. coli* D816(pJL6), *E. coli* D816(pJL8)在有和没有诱导剂 PAA 存在的情况下, 22℃ 分别发酵 96h, 测定由染色体编码的青霉素 G 酰化酶的活力。结果见表 1(图 1)。在没有诱导剂的情况

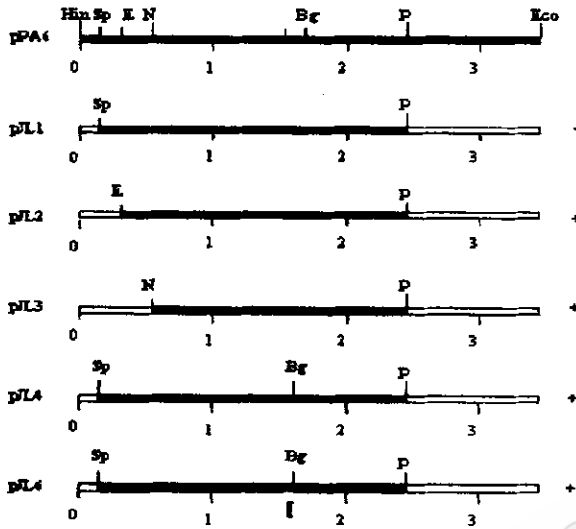


图1 克隆片段的酶切图谱以及对 *pac* 表达的影响

Fig. 1 Restriction cleavage maps of subcloned plasmids from pPA6 and the effects of these fragments on the expression of *pac*. Dark boxes represent the subcloned fragments from *pac* structure gene

Abbreviations: Bg, Bgl II; Eco, EcoR I; E, EcoR V; Hin, Hind III; N, Nco I; P, Pvu II; Sp, Sph I; S, Ssp I, Δ , the insertion site; +, There is complete *pacR* within the subcloned fragment which has effect on the expression of *pac*

下,阻抑物结合于 *pac* 操纵基因, *pac* 的表达很低。此时,重组质粒上高拷贝的调节基因所表达的阻抑物对 *pac* 的表达没有进一步的阻抑,因为染色体编码的阻抑物的量已足以与 *pac* 操纵基因结合并使之失活。所以, *E. coli* D816(pJL1), *E. coli* D816(pJL2), *E. coli* D816(pJL3), *E. coli* D816(pJL4), *E. coli* D816(pJL6), *E. coli* D816(pJL8) 的青霉素 G 酰化酶活力与 *E. coli* D816 基本一致。在有诱导剂的情况下,诱导剂与操纵基因竞争调节蛋白。如果克隆的片段含有完整的 *pacR*,则高拷贝的调节基因表达的阻抑物除了和诱导剂结合外,还有大量多余分子与操纵基因结合,使 *pac* 的表达量降低。而没有高拷贝调节基因的细胞中,染色体编码的阻抑物则绝大部分被诱导剂中和, *pac* 得以表达。由表 1 可知,在 Bgl II 位点插入 *cat* 基因和缺失 Hind III-Nco I 片段的 *E. coli* D816(pJL3) 和 *E. coli* D816(pJL6) 并不影响 *pacR*,因此, *pacR* 位于 Nco I-Bgl II 或 Bgl II-Pvu II 片段内。同时, *E. coli* D816(pJL8) 的青霉素 G 酰化酶活力和 *E. coli* D816 一致,因此, *pacR* 存在于 *pac* 的 Nco I-Bgl II 的片段内。

2.2 NcoI-Bgl II 片段的 ORF 分析

根据计算机的 ORF 分析,在 *pac* 的 NcoI-Bgl II 片段内有 3 个 ORF,并且方向与 *pac* 相反。ORF 的序列如下:

ORF I 在 ORF II 之内,但 ORF I 和 ORF II 阅读框架不同。

表 1 克隆片段对 *pac* 表达的影响Table 1 Effect of the cloned fragments on the *pac* expression

Strain	Inducer PAA	Cell OD ₅₄₆	Activity of PA		Percentage of cellular PA activity/ %
			10 ⁻³ u/OD	u/100ml	
D816	+	5.69	22.30	39.31	100
D816(pJL1)	+	5.40	11.10	20.50	52
D816(pJL2)	+	5.36	9.96	18.50	47
D816(pJL3)	+	5.04	12.60	25.00	60
D816(pJL4)	+	6.00	11.20	18.70	48
D816(pJL6)	+	5.11	12.10	23.70	60
D816(pJL8)	+	5.40	24.70	45.90	110
D816(pOK12)	+	6.00	28.20	47.04	119
D816(pBR322)	+	4.80	17.10	35.70	91
D816	-	6.14	3.68	6.00	100
D816(pJL1)	-	5.50	3.19	5.80	97
D816(pJL2)	-	5.90	4.24	7.20	120
D816(pJL3)	-	5.40	3.72	6.90	115
D816(pJL4)	-	5.16	2.84	5.52	92
D816(pJL6)	-	5.87	2.99	5.10	85
D816(pJL8)	-	6.10	3.66	6.00	101
D816(pOK12)	-	5.80	3.94	6.80	113
D816(pBR322)	-	6.50	3.90	6.00	100

In the induction and uninduction conditions, *E. coli* D816 was taken as control.

ORF I:

ATG GTG TAT TGC CAG TGA CAT CAT AAC CAG CAC CGT GCA GAC CAA TAC CAT AAG TAT
ACG CAG GCG CAT ACC AGC CAA ACT GCG GAC CAT TTA CCA TGA TTG CTT TCG CAT CCT
GGG CTT TGC TTT TGC CGA TAA CCC ACA TAT TGC TGG TCG TTG GAT ACC CCG CCA GAC
CAT TGG CAC CAC CCT GTG CAA ATT GTG CAA CAA TAG

ORF II:

ATG ACC AAA AAC CAG CCC AGG ATA GGC AAA TGG TGT ATT GCC AGT GAC ATC ATA ACC
AGC ACC GTG CAG ACC AAT ACC ATA AGT ATA CGC AGG CGC ATA CCA GCC AAA CTG CGG
ACC ATT TAC CAT GAT TGC TTT CGC ATC CTG GGC TTT GCT TTT GCC GAT AAC CCA CAT
ATT GCT GGT CGT TGG ATA CCC CGC CAG ACC ATT GGC ACC ACC CTG TGC AAA TTG TGC
AAC AAT AGT TTC CCG GTT CTT CCC TGC TGT TAA

ORF III:

ATG AAC TAA ACC AAT ATT GCC GTT TAC ATC AGC ATA GTA CCA GTT GAT GGT CAG TGC
TTG TTT CGC TGC TGC TGT GTC CAC TCC TGC CAA TCT TTA CCA TCC CAT GCG CGG GAT
TTA GCG TAA GCC GTT TGT GTC GTC TGG TCA GTT TGG AGA ATG TTG CCA TGC ACC GTA
CGC CAG ACA GTA AAG GTC TCT GCC TGA

2.3 *pacR* 在 *pac* 结构基因的 *TaqI*-*DraI* 片段内

为了精确定位 *pacR*, 构建了含有 ORF III, 部分 ORF I 和 ORF II 的质粒 pJL7, 含有 ORF I 和 ORF II 的质粒 pJL9, 以及含有 ORF III 的质粒 pJL10. pJL7, pJL9 和 pJL10 分别转化 *E. coli* D816, 然后在有和没有诱导剂 PAA 存在的情况下, 22°C 分别发酵 96h, 测定由染色体编码的青霉素 G 酰化酶活力。结果见表 2(图 2)。在没有诱导剂的情况下, 阻抑物结合于 *pac* 操纵基因, *pac* 的表达很低, 此时, 重组质粒上高拷贝的调节基因所表

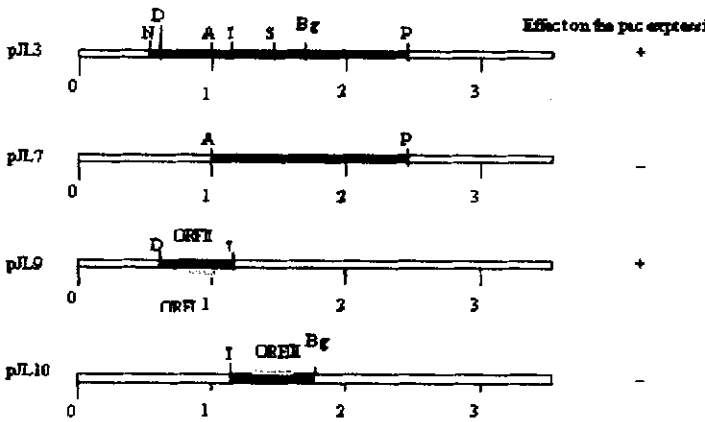


图 2 克隆片段的酶切图谱以及对 *pac* 表达的影响

Fig. 2 Restriction cleavage maps of subcloned plasmids from pPA6 and the effects of these fragments on the expression of *pac*

Dark boxes represent the subcloned fragments from *pac* structure gene. Grey box represent the ORFs.

Abbreviations; Bg, Bgl II ; Eco, EcoR I; N, Nco I; P, Pvu II ; S, SspI; A, Acc I; T, Taq I; D, Dra I; +, There is complete *pac R* within the subcloned fragment which has effect on the expression of *pac*.

达的阻抑物对 *pac* 的表达没有影响。所以 *E. coli* D816 (pJL7), *E. coli* D816 (pJL9), *E. coli* D816 (pJL10), 的青霉素 G 酰化酶活力与 *E. coli* D816 基本一致。在诱导剂存在的情况下, 高拷贝的调节基因表达的阻抑物不仅结合所有的诱导剂而且结合染色体的 *pac* 操纵基因, 使 *pac* 的表达量下降。由表 2 可知, *E. coli* D816 (pJL7) 的青霉素 G 酰化酶活力与 *E. coli* D816 基本一致, 这表明 Hind III - AccI 片段的缺失使 *pacR* 不完整。而 *E. coli* D816 (pJL9) 的 PA 活力比 *E. coli* D816 的 PA 活力低, *E. coli* D816 (pJL10) 的 PA 活力与 *E. coli* D816 基本一致, 这意味着 pJL9 中含有完整的 *pacR*。根据上述结果可知, *pacR* 存在于 *pac* 结构基因的 TaqI-DraI 片段内, 可能由 ORF I 或 ORF II 编码。

表 2 克隆片段对 *pac* 表达的影响

Table 2 Effect of the cloned fragments on the *pac* expression

Strains	Inducer PAA	Cell OD ₅₄₆	Activity of PA		Percentage of cellular PA
			u/100ml	10 ⁻³ u/OD	activity/%
D816	+	5.69	22.30	39.31	100
D816(pJL7)	+	5.67	24.50	43.20	109
D816(pJL9)	+	6.53	12.90	19.92	48
D816(pJL10)	+	5.35	20.70	38.70	98
D816	-	6.00	3.60	6.00	100
D816(pJL7)	-	5.80	3.77	6.50	108
D816(pJL9)	-	6.14	3.57	5.82	97
D816(pJL10)	-	5.20	2.53	4.86	81

In the induction and uninduction conditions, *E. coli* D816 was taken as control.

3 讨论

大肠杆菌青霉素 G 酰化酶的表达在转录后加工和基因调控方面是一个较为复杂的系统。*pac* 的表达受 cAMP 受体蛋白 (CRP 或 CAP), 苯乙酸, 温度, 宿主, 生长速率等因素的调控。在其启动子区域发现了两个 CRP 蛋白的特异性结合位点^[16]。同时, *pac* 的表达受苯乙酸诱导, 且诱导作用与生长速率有关, 在对数生长早期很强, 对数生长中期和末期逐渐减弱^[17]。另一个有趣的特点是温度调控, 在 *E. coli* 中, 青霉素 G 酰化酶的表达

的最适温度是 22~30℃, 37℃ 或 37℃ 以上表达很低^[18~21], 根据 DNA-RNA 杂交可知, 宿主在转录水平影响 *pac* 表达。然而, 参与 *pac* 表达的调节因子还不十分清楚, 因此, 确定调节因子对揭示 *pac* 表达的调节机制是十分重要的。我们曾经试图在 *pac* 结构基因的上游和下游寻找 *pacR*, 但都以失败告终。当我们在 *pac* 结构基因内部寻找时, 发现了 *pacR* 定位于 TaqI-DraI 片段, ORF 分析表明这个片段中有两个 ORF, 我们正用定点突变方法研究突变 *pacR* 的调节功能, 以确定 *pacR* 的调节机制。

参 考 文 献

- 1 Bush K. Clin Microbiol Rev. 1988, 1:109~123
- 2 Oliver G, Valle F, Rosetti F G *et al.* Gene, 1985, 40:9~14
- 3 Meevoortisson V, Saunders J R. Appl Microbiol Biotechnol. 1987, 25:372~378
- 4 Ohashi H, Katsuta Y, Nagashima M, Appl Envir Microbiol. 1989, 55:1351~1356
- 5 Garica J L, Beusa J M. J Biotechnol. 1986, 3:187~195
- 6 Alfonso C, Criebeiro L, Reyes F. Microbiol Immunol. 1989, 33:69~74
- 7 Erarslan A, Terzi I, Güray A *et al.* J Chem Tech Biotechnol. 1991, 51:27~40
- 8 Erarslan A, Terzi I, Güray A *et al.* J Chem Tech Biotechnol. 1991, 51:181~195
- 9 Hunt P D, Tolly S P, Ward R J *et al.* Protein Eng. 1990, 3:635~639
- 10 Yang S L, Wu R P, Jiang Z L. Chinese J Biotechnol. 1985, 1:29~355
- 11 Jiang Q L, Wu R P, Yang S L. Chinese Biotechnol. 1992, 8:153~158
- 12 Jeffrey V, Joachim M. Gene 1991, 100:189~194
- 13 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982
- 14 Kutzbach C, Rauenbusch E. Hopper-Seyler's Z. Physiol Chem. 1974, 345:45~53
- 15 Jiang Q L, Wu R P, Yang S L. Chinese J Biotechnol. 1992, 8:105~115
- 16 Valle F, Gosset G, Tenorio B, *et al.* Gene. 1986, 50:119~122
- 17 Jiang Q L, Wu R P, Yang S L. Chinese J Biotechnol. 1992, 8:309~313
- 18 Vandamme E J. In: Economic Microbiology (Rose A H, ed.) Academic Press, 1981, 5: pp. 467~522
- 19 Shewale J G, Sivaraman, Process Biochem. 1989, 24:146~154
- 20 Yang S L, Wu R P, Wang J X *et al.* Chinese J Biotechnol. 1988, 4:32~37
- 21 Jiang Z L, He J S, Zhang J B *et al.* Chinese J Biotechnol. 1988, 4:166~170

Localization of Regulatory Gene in Penicillin G Acylase Operon

Jiang Lan Wang Yucheng Jiang Qiaolin Yang Shengli*
(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences,
Shanghai 200233)

Abstract A set of segments from pPA6 which contained *pac* gene were sub-cloned to plasmid pOK12 or pBR322, and the recombinant plasmids were transformed into *E. coli* D816 containing an intact *pac* operon on its chromosome, then the effects of cloned segments on *pac* expression were estimated. If the cloned DNA fragment contained *pac* regulatory gene (*pacR*), then inducers could not bind and inactivate all the repressors encoded by high copy number plasmid harbouring *pacR*. Additionally some active repressors bound *pac* operator on chromosome and obstructed RNA polymerase from transcribing the *pac*, then the expression of *pac* decreased; The results indicated that the *pacR* is within the (Taq I-Dra I) fragment about 500bp in size within the *pac* structure gene and ORF I and ORF II were the candidates for *pacR*.

Key words Penicillin G acylase gene, regulatory gene