

## 青霉素 G 酰化酶操纵子的负调控因子的研究

王宇澄 蒋 岚 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘 要** 青霉素 G 酰化酶(PA)操纵子的调节基因(*pacR*)存在于青霉素 G 酰化酶结构基因(*pac*)内部 *Dra1-Taq1* 一段约 500bp 的 DNA 片段内,此片段内含有 2 个 ORF。2 个 ORF 及其突变体分别克隆到 pUC18 得到一系列重组质粒,用这些重组质粒转化青霉素 G 酰化酶产生菌 *E. coli* D816,测定克隆片段对 PA 表达的影响。如果克隆片段含有具功能的 *pacR*,诱导剂苯乙酸(PAA)不能使由高拷贝 *pacR* 表达的阻抑物全部失活,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 PA 的表达量降低。结果表明,阻抑物是由 *pac* 结构基因内部的 ORF2 编码的蛋白因子,*pacR* 即 ORF2。RNA-DNA 杂交实验证实了 *pacR* 在转录水平阻抑 *pac* 的表达。

**关键词** 青霉素 G 酰化酶,调节基因,定点突变  
学科分类号 Q753

青霉素 G 酰化酶(PA, EC 3.5.1.11)是一种在医药工业生产上有重要应用价值的酶,可催化青霉素 G 分解为 6-APA 和苯乙酸,而 6-APA 是半合成青霉素的中间体<sup>[1]</sup>。在细菌、霉菌和酵母等许多微生物中都发现有 PA 活性<sup>[2~6]</sup>。其中,以大肠杆菌和巨大芽孢杆菌研究得最为透彻<sup>[7~9]</sup>。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,但以往的研究多集中于固定化酶和酶活的提高上,基因调控方面的研究却并不多见。杨胜利等在 1985 年从 *E. coli* D816 中克隆了 *pac* 操纵子<sup>[10]</sup>,并对它的表达调控进行了一系列研究。在 *E. coli* 中,*pac* 的表达是温度敏感的,受细胞生长速率影响<sup>[11]</sup>,且受苯乙酸诱导,操纵子为负调控模型<sup>[12]</sup>。在以前的研究中,经基因缺失证明 *pacR* 存在于 *pac* 内部 *Dra1-Taq1* 一段约 500bp 的 DNA 片段内,此片段内含有 2 个 ORF:ORF1 和 ORF2,但它们的转录方向与 *pac* 的转录方向相反。在本实验中,基因研究表明 *pacR* 即 ORF2。另外,由于 ORF2 起始密码子的定点突变破坏了 *pacR* 的作用,因此可确定 *pac* 操纵子的调节因子是一个蛋白因子,它由 86 个氨基酸残基组成。并通过 DNA-RNA 的点杂交进一步证实了 *pacR* 对 *pac* 转录的阻抑作用。

### 1 材料与方 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。DIG Labeling and Detection Kit 购自 Boehringer Mannheim 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 $\alpha$  用作质粒扩增菌株。*E. coli* A56 用做宿主。质粒 pUC18 作为载体。质粒 pPA6 由本实验室构建, 含有完整的 *pac* 操纵子。

**1.1.3 培养基和培养条件:** LB 和 LBB 培养基用于提取质粒和转化。检测转化子中青霉素 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。青霉素 G 酰化酶的发酵培养基为(%) : 酵母粉 3, NaCl 0.5, 苯乙酸 0.2, pH 8.0。

培养条件: 22 $^{\circ}$ C, 250ml 三角瓶装 150ml, 往复式摇床上培养(150r/min)。

## 1.2 方法

**1.2.1 质粒的提取、DNA 的纯化和 PCR:** 参考文献[13]。

PCR 引物的设计和合成: 合成 5 个 PCR 引物。引物 1 含有 ORF1 的 SD 序列和 5' 端; 引物 3 含有 ORF2 的 SD 序列和 5' 端; 引物 2 除了将起始密码 ATG 改为 AGG 外, 均与引物 1 相同; 引物 4 除了将起始密码 ATG 改为 AGG 外, 均与引物 3 相同。由于 ORF1 在 ORF2 内, 所以共用一个 3' 端引物: 引物 5。序列如下:

引物 1: 5' CTC GAA TTC GCC CAG GAT AGG CAA ATG 3'  
EcoRI  
2: 5' CTC GAA TTC GCC CAG GAT AGG CAA AGG 3'  
EcoRI  
3: 5' CTC GAA TTC CAG GAA ATC ACA CCA TTA TG 3'  
EcoRI  
4: 5' CTC GAA TTC CAG GAA ATC ACA CCA TTA GG 3'  
EcoRI  
5: 5' CTC AAG CTT CAC TGC TGG CGT TAA CA 3'  
HindIII

DNA 片段的合成: 用上述 PCR 引物拉 PCR, 合成 4 个 DNA 片段, 分别是 ORF1 和 ORF2 以及起始密码子上带有点突变的 ORF1 和 ORF2。

**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:** 用上述 PCR 引物合成的 4 个 DNA 片段, 以 pUC18 为载体, 构建 4 个重组质粒: pJL11, pJL12, pJL13, pJL14。

pJL11: 由 PCR 扩增出的一段 273bp 的 ORF1 和 pUC18 分别用 EcoRI 和 HindIII 酶切, 用 T4DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 在含有 X-gal 和 IPTG 的 Ap<sup>r</sup> 板上筛选白色菌落。转化子经酶切鉴定, pJL11 中克隆的片段是 ORF1。

pJL12: pJL12 可由类似的方法获得。pJL12 中克隆 ORF1 片段在其起始密码子有一定点突变。

pJL13: 由 PCR 扩增出的一段 298bp 的 ORF2 和 pUC18 分别用 EcoRI 和 HindIII 酶切, 用 T4DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 在含有 X-gal 和 IPTG 的 Ap<sup>r</sup> 板上筛选白色菌落。转化子经酶切鉴定, pJL13 中克隆的片段是 ORF2。

pJL14: pJL14 可由类似的方法获得。pJL14 中克隆 ORF2 片段在其起始密码子有一定点突变。

**1.2.4 *E. coli* RNA 的抽取:** 参考文献[15]。

**1.2.5 RNA-DNA 点杂交:** 按 Boehringer Mannheim 公司的产品说明使用。

## 2 结 果

以前的研究表明 *pacR* 存在于 *pac* 内一段约 500bp 的 Taq1-Dra1 片段内, 在此片段内

有2个完整的ORF,它们的转录方向与 *pac* 的转录方向相反, *pac* 基因转录的阻抑物可能是由其中一个ORF编码的蛋白因子(见图1)。为了搞清阻抑物的性质,将重组质粒 pJL11-14 转入染色体上带有完整 *pac* 操纵子的 *E. coli* D816,检测 PA 的活性,研究被克隆片段对 *pac* 表达的影响。

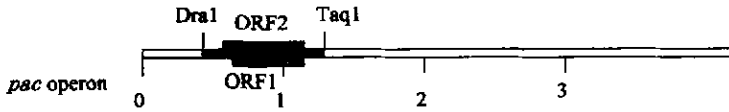


图1 *pac* 操纵子中 ORF1 和 ORF2 的位置

Fig.1 ORF 1 and ORF 2 in *pac* operon

2.1 阻抑物为 ORF2 编码的一个 86 氨基酸残基的蛋白

以上重组质粒分别转化染色体上带有 *pac* 操纵子的 *E. coli* D816,在有和没有诱导剂 PAA 存在的情况下,22℃ 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。在无诱导剂存在的情况下, *pac* 操纵子被染色体上 *pacR* 的产物所阻抑,青霉素 G 酰化酶的表达很低。当加入诱导剂,使阻抑物失活后, *pac* 表达恢复。如果重组质粒含有具调节功能的 *pacR*,高拷贝 *pacR* 表达的阻抑物不仅中和了诱导剂的作用,还有部分结合于 *pac* 操纵子的操纵基因上,使 *pac* 表达处于半抑制状态, *pac* 表达降低。由表1可知, *E. coli* D816(pJL13)的活力是 *E. coli* D816 的 60%,这表明 pJL13 含有完整的 *pacR*。另一方面, *E. coli* D816(pJL14)的活力和 *E. coli* D816 基本一致,而与 pJL13 相比,pJL14 只是在 ORF2 的起始密码子发生了单核苷酸的突变,却使 *pacR* 失去功能,因此可判定调节因子是一个蛋白因子,由 ORF2 编码,含有 86 个氨基酸残基。 *pacR* 的 DNA 序列及其编码的氨基酸序列如下:

```

ATG ACC AAA AAC CAG CCC AGG ATA GGC AAA TGG TGT ATT GCC
Met Thr Lys Asn Gln Pro Arg Ile Gly Lys Trp Cys Ile Ala
AGT GAC ATC ATA ACC AGC ACC GTG CAG ACC AAT ACC ATA AGT
Ser Asp Ile Ile Thr Ser Thr Val Gln Thr Asn Thr Ile Ser
ATA CGC AGG CGC ATA CCA GCC AAA CTG CGG ACC ATT TAC CAT GAT
Ile Arg Arg Arg Ile Pro Ala Lys Leu Arg Thr Ile Tyr His Asp
TGC TTT CGC ATC CTG GGC TTT GCT TTT GCC GAT AAC CCA CAT ATT
Cys Phe Arg Ile Leu Gly Phe Ala Phe Ala Asp Asn Pro His Ile
GCT GGT CGT TGG ATA CCC CGC CAG ACC ATT GGC ACC ACC CTG TGC
Ala Gly Arg Trp Ile Pro Arg Gln Thr Ile Gly Thr Thr Leu Cys
AAA TTG TGC AAC AAT AGT TTC CCG GTT CTT CCC TGC TGT TAA
Lys Leu Cys Asn Asn Ser Phe Pro Val Leu Pro Cys Csy

```

由于 pJL11 和 pJL12 不影响 *pac* 的表达,所以 ORF1 不编码 *pac* 操纵子的调节蛋白。因此, *pac* 操纵子的调节因子是 *pac* 结构基因内部 ORF2 编码的一个含 86 氨基酸残基的蛋白。

2.2 DNA-RNA 点杂交证实 pJL13 对 *E. coli* D816 中 *pac* 转录的反式作用

在有诱导剂PAA存在下,在有或没有IPTG时,将 *E. coli* D816(pJL13)接种于发酵

表 1 克隆片段对 PA 表达的影响

Table 1 Effect of the cloned fragments to the *pac* expression

Strain	Inducer PAA	Cell density (OD <sub>546</sub> )	Activity of PA		Cellular PA activity/%
			u/100ml	10 <sup>-3</sup> u/OD <sub>546</sub>	
D816	+	5.69	22.30	39.31	100
D816(pJL13)	+	5.45	12.95	23.58	60
D816(pJL14)	+	5.54	19.82	35.78	91
D816(pJL11)	+	5.84	21.12	36.16	92
D816(pJL12)	+	6.00	21.23	35.38	90
D816(pUC18)	+	6.00	28.20	47.04	119
D816	-	6.00	3.60	6.00	100
D816(pJL13)	-	5.33	3.83	7.20	120
D816(pJL14)	-	5.35	2.89	5.40	90
D816(pJL11)	-	6.15	4.60	6.60	110
D816(pJL12)	-	5.71	3.12	5.46	91
D816(pUC18)	-	6.50	3.90	6.00	100

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

To measure PA activity, the cells were washed with 0.05mol/L phosphate buffer(pH7.8) and incubated at 37°C for 10 minutes with the existing of NIPAB. The reaction was stopped by adding 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and absorbance of the supernatant was measured at 405 nm. The unit of activity (u/100ml) is given as A<sub>405</sub> × 31.5.

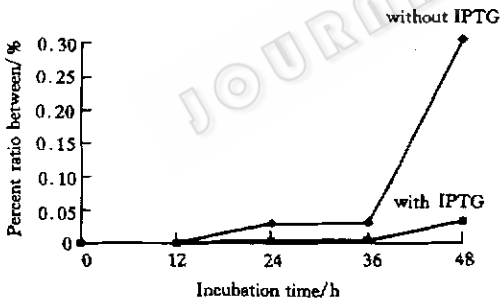


图 2 *E. coli* D816(pJL13)中 *pac*-mRNA 在总 RNA 中的含量

Fig.2 Ratio between *pac*-mRNA and total RNA in *E. coli* D816(pJL13) with or without IPTG in media

培养基中 22°C 摇瓶培养, 分别于 12、24、36、48h 取适量菌体, 抽取 RNA, 用 DIG 标记的 DNA 探针进行 DNA-RNA 点杂交, 检测总 RNA 中 *pac* 的 mRNA 的含量。结果见图 2。从图中可见, 有 IPTG 存在时, *pac* 的转录低于没有 IPTG 时, 这是因为有 IPTG 存在时, pJL13 上的 *pacR* 表达, 而高拷贝 *pacR* 表达的阻抑物部分阻抑 *pac* 的转录, 使 *pac* 的 mRNA 含量减少。此结果证实了 pJL13 上的 *pacR* 对 *pac* 转录的反式作用。

### 2.3 DNA-RNA 点杂交证明 *pacR* 的表达对 *pac* 操纵子的负调控作用

用含有完整 *pac* 操纵子的质粒 pPA6 转化 *E. coli* A56, 在有诱导剂 PAA 存在下, 将 *E. coli* A56(pPA6) 接种于发酵培养基中 22°C 摇瓶培养, 分别于 12、24、36、48h 取适量菌体, 抽取 RNA, 用两种 DIG 标记的 DNA 探针进行 DNA-RNA 点杂交, 检测总 RNA 中 *pacR* 和 *pac* 的 mRNA 的含量。结果见图 3。由图中可见, 随培养时间的延长, *pacR* 的 mRNA 含量呈上升趋势, 而 *pac* 的 mRNA

含量呈先上升,后下降的趋势。

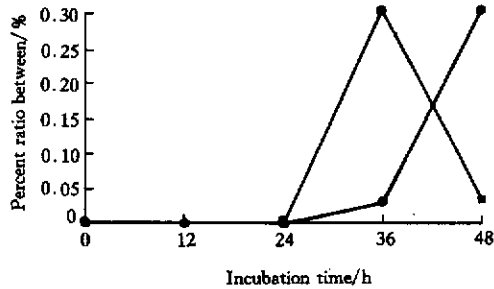


图3 *pacR* 的表达对 *pac* 转录的影响

Fig.3 Effects of *pacR* expression to *pac* transcription

这是由于在有诱导剂 PAA 存在下,在发酵初期,*pacR* 表达的阻抑蛋白被 PAA 中和,*pac* 能正常表达,所以 *pac* 的 mRNA 含量逐渐上升;然而随培养时间的延长,*pacR* 表达的阻抑蛋白在菌体内不断积累,中和了胞内的诱导剂 PAA,还有部分结合于 *pac* 操纵子的操纵基因上,使 *pac* 的转录降低,*pac* 的 mRNA 含量下降。

上述两个结果均证实 *pacR* 的表达在转录水平上抑制 *pac* 的表达。

### 3 讨 论

大肠杆菌青霉素 G 酰化酶的基因调控是一个较为复杂的系统。*pac* 的表达受 cAMP、苯乙酸、温度、宿主、生长速率和溶氧等因素的调控<sup>[16~21]</sup>。然而,参与 *pac* 表达调控的负调节因子还不十分清楚,因此,研究调节因子对揭示 *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,*pacR* 被发现存在于一段约 500bp 的 DNA 片段内。该片段内有两个可能的 ORF,基因定点突变证明了 ORF2 是 *pacR*,而且通过 DNA-RNA 点杂交证明了 *pacR* 的表达对 *pac* 操纵子的负调控作用。至此,我们定位了 *pacR*,并且弄清了 *pac* 操纵子中的负调节因子的性质。*pacR* 位于 *pac* 结构基因内部,其转录方向与 *pac* 相反,这个特征在原核生物中非常罕见。我们正进一步研究环境因素是否通过 *pacR* 调节 *pac* 的表达,以揭示青霉素 G 酰化酶表达调控的机制。

### 参 考 文 献

- 1 Bush K. Clin Microbiol Rev. 1988, 1:109~123
- 2 Oliver G, Valle F, Rosetti F, Gomez-Pedroso *et al.* Gene. 1985, 40:9~14
- 3 Meevootissov V, Saunders J R. Appl Microbiol Biotechnol. 1987, 25:372~378
- 4 Ohashi H, Katsuta Y, Nagashima M *et al.* Appl Envir Microbiol. 1989, 55:1351~1356
- 5 Garica J L, Beusa J M. J Biotechnol. 1986, 3:187~195
- 6 Alfonso C, Cribeiro L, Reyes F. Microbiol Immunol. 1989, 33:69~74
- 7 Erarslan A, Terzi L, Güray A *et al.* J Chem Tech Biotechnol. 1991, 51:27~40
- 8 Erarslan A, Terzi L, 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. *Chin J Biotechnol.* 1985, **1**: 329~355
- 11 Jiang Q L, Wu R P, Yang S L. *Chin J Biotechnol.* 1992, **8**: 309~313
- 12 Jiang Q L, Wu R P, Yang S L. *Chin J Biotechnol.* 1992, **8**: 153~158
- 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 Aiba H *et al.* *J Biol Chem.* 1981, **256**: 11905
- 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. *Economic Microbiology Academic Press.* 1981, Vol. 5 (Rose, A H, ed. ), pp467~522
- 19 Shewale J G, Sivaraman Process *Biochem.* 1989, **24**: 146~154
- 20 Yang S L, Wu R P, Wang J X *et al.* *Chin J Biotechnol.* 1988, **4**: 32~37
- 21 Jiang Z L, He J S, Zhang J B *et al.* *Chin J Biotechnol.* 1988, **4**: 166~170

## Research on Regulatory Gene of Penicillin G Acylase Operon(*pac*)

Wang Yucheng Jiang Lan Yang Shengli

(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

**Abstract** Regulatory gene of Penicillin G acylase operon (*pacR*) was located in a (Taq 1-Dra 1) fragment within the *pac* structure gene. There were two ORF been discovered in the fragment. Two ORFs: ORF1 and ORF2 were found in this fragment and their transcriptional orientation was opposite with *pac*. 4 fragments containing ORF1 or ORF2 with or without point mutation were obtained by PCR. The point mutation changed the initiation codons of ORF1 and ORF2 from ATG to AGG. 4 recombinant plasmids pJL11-14 were constructed by cloning these fragments into plasmid pUC18 respectively. The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* D816 and the effects of cloned fragments to *pac* expression were estimated. The results indicated that *pacR* was ORF2 and the repressor of *pac* operon was a protein with 86 amid acids. On the other hand, the results of DNA-RNA dot hybridization were also in agreement with this point.

**Key words** Penicillin G acylase, regulatory gene