

青霉素酰化酶基因的克隆与表达

Ⅲ、温度在转录水平调控青霉素酰化酶基因表达

杨胜利 吴汝平 王镜新 何建森 张继宝

(中国科学院上海药物研究所, 上海)

高表达的基因工程菌大肠杆菌A56 (pPA22) 青霉素酰化酶基因表达对温度敏感。在37℃几乎不产生青霉素酰化酶, 在28℃以下积累青霉素酰化酶, 合成酶的最适温度为20—22℃, 产量可达250u/100ml。当用DNA-RNA点滴杂交法定量分析RNA时, 发现在37℃培养的细胞中不积累青霉素酰化酶mRNA, 而22℃培养的细胞中相应mRNA的量是28℃培养的细胞中的5倍。同一质粒pPA22上的氯霉素乙酰转移酶的mRNA在三种温度培养的细胞中的浓度相同。将37℃培养的细胞转移到22℃继续培养, 当菌体不继续增殖时, 细胞内仍无青霉素酰化酶及其mRNA的积累。上述结果表明温度在转录水平上专一地调控了青霉素酰化酶基因的表达, 在37℃长时期培养的细胞中青霉素酰化酶基因被永久地关闭。

关键词 青霉素酰化酶; 基因表达; 转录; DNA-RNA杂交

微生物细胞中大部分蛋白质的合成在相当大的温度范围内是恒定的, 这是由于温度对大部分基因表达的影响是类似的。但有些酶的基因表达对温度十分敏感, 升高或降低温度可对这些酶基因的表达产生暂时或永久的抑制。温度对基因表达的调控作用可发生在复制、转录、翻译或低分子调节分子合成等水平^[1]。大肠杆菌合成青霉素G酰化酶不仅受苯乙酸诱导和葡萄糖阻遏, 而且受温度调控, 在37℃几乎不合成酶, 在29℃以下才积累显著量青霉素酰化酶^[2-4]。在青霉素酰化酶的克隆株中青霉素酰化酶基因表达仍受上述因子调控, 表明这些调控特点是青霉素酰化酶操纵子专一的^[5-7]。

本文报道基因工程菌大肠杆菌A56 (pPA22) 青霉素酰化酶基因表达的最适

温度为20—22℃, 并用DNA-RNA点滴杂交试验证明温度在转录水平上调控青霉素酰化酶基因表达。

材料与方 法

(一) 菌种与质粒

大肠杆菌A56为大肠杆菌K12的recA变种, 质粒pEC4为pUC7的衍生物, 在Pst I切口插入1.87kb的带氯霉素抗性基因的Pst I片段。质粒pPA22是pBR322衍生物, 带氯霉素抗性基因和青霉素酰化酶基因。质粒pPA6为pRK733.2衍生物, 带青霉素抗性基因及青霉素酰化酶基因^[7]。

(二) 试剂

³²P- α -dATP为Amersham产品, 内切酶由Boehringer购买。

本文于1986年10月22日收到。

(三) 培养基及培养条件

培养基: 3% 酵母浸膏干粉, 0.5% NaCl, 0.2% 苯乙酸, 消毒前 pH 7.8。

培养条件: 250ml 三角瓶装 150ml 培养基, 在旋转式摇床上振荡培养, 摇床转速为 180—200rpm/min。

(四) RNA 提取

用改良的 Aiba 法提取 RNA^[8]。大肠杆菌培养 30—36h 后, 4℃ 离心收集菌体, 菌体悬浮于 0.02M 醋酸缓冲液 (pH 5.5, 含 0.5% SDS 及 1 mM EDTA), 再加等体积醋酸缓冲液饱和的苯酚, 于 65℃ 水浴中振荡保温 10min, 离心收集上清液, 用异丙醇沉淀。沉淀溶于 0.02M 醋酸缓冲液后用苯酚-氯仿混合液脱蛋白后用异丙醇沉淀, 沉淀溶于 70% 乙醇, 保存于 -20℃ 低温冰箱。

(五) 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, 并用 DEAE81 滤纸回收所需 DNA 片段。所得 DNA 片段用缺口转移法进行标记。缺口转移按 Rigby 等的方法进行^[9]。

(六) DNA-RNA 点杂交及 mRNA 定量分析

DNA-RNA 点杂交参照 Casey 法^[10]。RNA 样品于 100℃ 加热 10min 变性后, 点样在经 6 × SSC 溶液预处理的 Zeta-Probe blotting membranes (Bio Rad) 滤膜上, 在 42℃ 洗涤溶液 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) 中保温 2 h 后烘干。然后转到杂交溶液中, 于 42℃ 保温 6—8 h, 再加入变性的 DNA 探针, 于 42℃ 继续保温 12—18 h。滤膜用 2 × SSC 缓冲液冲洗三次后, 在 0.2 × SSC 溶液中浸泡 1 h, 烘干后放射自显影。所得放射自显影底片用密度仪 (Bio Rad Model 620 Video Densitome-

ter) 定量分析 mRNA 量。

(七) 青霉素酰化酶活力的测定

用 3-苯乙酰胺-6-硝基-苯甲酸法测定, 方法参考文献[11]。

结 果

(一) 温度对青霉素酰化酶基因表达的影响

大肠杆菌在 37℃ 几乎不合成青霉素酰化酶, 而在 29℃ 以下合成酶的量明显增加。Schömer 等报道基因工程菌大肠杆菌 5 K (pHM12) 合成青霉素酰化酶的最适温度为 27℃^[12]。我们在研究青霉素酰化酶基因工程菌大肠杆菌 A56 (pPA22) 表达时发现该菌株合成酶的最适温度低于 27℃。为此测定了 16—37℃ 大肠杆菌 A56 (pPA22) 合成青霉素酰化酶的量。表 1 结果表明大肠杆菌 A56 (pPA22) 合成青霉素酰化酶的量从 37℃ 起随着温度降低逐渐增加, 至 20—22℃ 达高峰, 每 100ml 中酶量可达 250 单位。在 18℃ 和 16℃ 合成酶量又逐渐下降, 这是由于在 16℃ 和 18℃ 培养时菌的生长较慢而影响了所合成酶的总量。大肠杆菌 A56 (pPA22) 合成青霉素

表1 温度对青霉素酰化酶合成的影响

Table 1 The effect of temperature on the synthesis of penicillin acylase

温 度 Temperature ℃	pH	细胞密度 Density of cells OD	青霉素酰化酶活力 Activity of penicillin acylase u/100ml
16	8.0	10.0	164
18	8.5	11.0	217
20	8.5	10.0	257
22	8.5	11.0	257
24	8.5	10.0	173
26	8.5	10.0	145
28	8.5	10.5	124
37	9.0	9.0	7

酰化酶的最适温度与大肠杆菌 5 K (pHM 12) 有明显差异, 可能是所选用的宿主, 表达载体和表达方式的差异引起的。

(二) 温度对青霉素酰化酶 mRNA 量的影响

用质粒 pPA 6 带青霉素酰化酶基因的 3.5kb EcoRI-HindⅢ 片段作为探针分析在 37℃、28℃ 及 22℃ 培养的细胞中青霉素酰化酶 mRNA 的量。放射自显影结果如图 1 所示。结果表明 37℃ 培养细胞中无可检出量的青霉素酰化酶 mRNA, 而 28℃ 和 22℃ 培养的细胞中积累显著量的青霉素酰化酶 mRNA。用密度仪定量测定青霉素酰化酶 mRNA 量, 结果在 22℃ 培养的细胞中青霉素酰化酶 mRNA 的量是 28℃ 培养细胞中的 5 倍左右〔图 2〕。



图 1 不同温度培养细胞青霉素酰化酶 mRNA 的点杂交

Fig. 1 Dot hybridization of penicillin acylase mRNA from cells incubated at different temperatures

细胞分别培养在 22、28 及 37℃, 30—36h, 取等量细胞, 提取 mRNA, 对倍稀释后再相应的 DNA 探针杂交

Cells were incubated for 30—36h, at 22℃, 28℃, and 37℃, respectively, mRNAs were extracted from same amounts of cells and then a series of twofold dilutions of mRNA solutions were hybridized with corresponding DNA probe

上述结果说明温度对青霉素酰化酶基因表达的调控作用是由于影响了细胞内青霉素酰化酶 mRNA 的浓度。Friedrich 等报道当提高培养温度时, *Alcaligenes* 的氢化酶的合成被抑制, 这是由于抑制了携带这个基因的质粒复制所致^[13]。大肠杆菌 A

56 (pPA22) 的青霉素酰化酶基因在质粒 pPA22 上。这个质粒还带有氯霉素乙酰转移酶基因, 为此我们分析了在不同温度培养细胞中氯霉素乙酰转移酶 mRNA 的量, 以确定温度是不是通过影响质粒的拷贝数调控青霉素酰化酶合成。

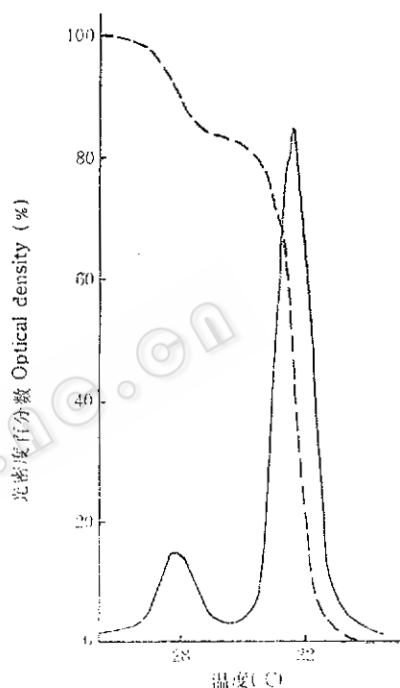


图 2 温度对青霉素酰化酶 mRNA 浓度的影响
Fig. 2 The effect of temperature on the mRNA concentrations of penicillin acylase
— 光密度 Optical density
---- 积分线 Integral curve

(三) 温度对氯霉素乙酰转移酶基因

表达的影响

从质粒 pEC 4 中用 PstI 切出 1.87kb 氯霉素抗性基因作为探针, 分析不同温度培养细胞中氯霉素乙酰转移酶 mRNA 的量。结果如图 3 所示, 在 37℃、28℃ 及 22℃ 三种温度培养细胞中氯霉素乙酰转移酶 mRNA 的浓度无明显差异。经密度仪测定, 22℃、28℃ 及 37℃ 细胞中氯霉素乙酰转移酶 mRNA 浓度比分别为 100%、100% 和 103% (图 3)。

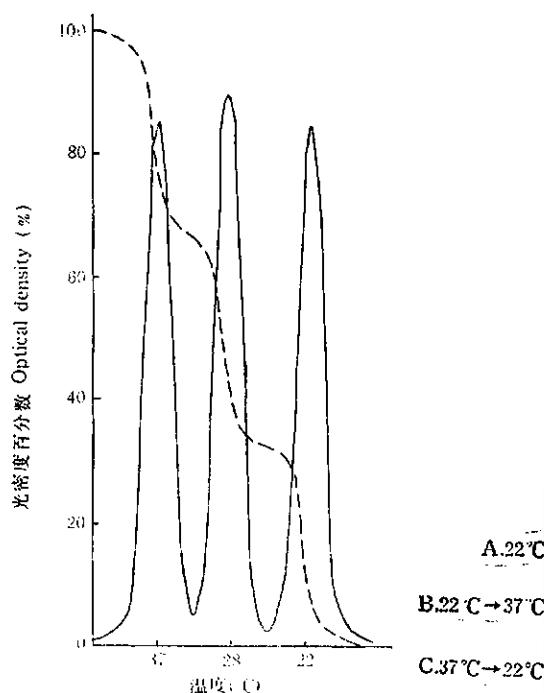


图3 温度对氯霉素乙酰转移酶mRNA浓度的影响

Fig. 3 The effect of temperature on the mRNA concentrations of chloramphenicol acetyl transferase

—— 光密度 Optical density
---- 积分线 Integral curve

上述结果说明在不同温度培养的大肠杆菌A56 (pPA22) 中质粒 pPA22 的拷贝数无明显差异, 而且质粒pPA22上另一个基因氯霉素乙酰转移酶基因的表达不受温度影响, 温度专一地调控青霉素酰化酶基

因的表达。

(四) 温度位移对青霉素酰化酶基因表达的影响

先将大肠杆菌A56 (pPA22) 在 37°C 培养16、24及48h后位移至22°C继续培养, 96h 时取样测定青霉素酰化酶活力。表 2 结果表明培养温度由37°C位移至22°C并不能使细胞回复合成青霉素酰化酶的能力, 温度位移培养的细胞与37°C培养的细胞合成的青霉素酰化酶的量均不到20u/100ml, 而且位移后菌体无明显增殖。同时分析了

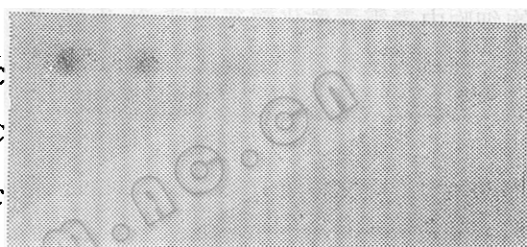


图4 温度位移培养细胞青霉素酰化酶mRNA的点杂交

Fig. 4 Dot hybridization of penicillin acylase mRNA from cells incubated at different temperature shift

A. 22°C培养30h B. 22°C培养30h后位移至37°C继续培养2h C. 37°C培养30h后位移至22°C继续培养2h

A. Incubated at 22°C for 30h, B. Incubated at 22°C for 30 h then shifted to 37°C for 2 h, C. Incubated at 37°C for 30 h then shift to 22°C for 2 h. Others were same as fig. 1

表2 温度位移对青霉素酰化酶合成的影响

Table 2 The effect of temperature shift on the synthesis of penicillin acylase

温度位移 Temperature shift (°C)	位移时间 Time of shift (h)	位移pH pH at shift	位移细胞密度 Density of cells at shift (O D)	pH 细胞密度 pH Density of cells (O D)	青霉素酰化酶活力 Activity of penicillin acylase (u/100ml)
27				8.5 7.1	15
22				8.5 11.0	254
37→22	16	6.0	5.3	8.5 5.2	19
37→22	24	6.0	4.9	8.5 4.6	19
37→22	48	7.5	6.1	8.5 5.7	16

温度位移对细胞中青霉素酰化酶mRNA浓度的影响。将大肠杆菌 A56 (pPA22) 先分别在22℃和37℃培养, 30h后将37℃培养的细胞位移至22℃培养, 而22℃培养的细胞则分别在22℃继续培养或位移至37℃培养, 温度位移后2h取出用点滴杂交法分析mRNA量。图4为放射自显影图谱。结果表明在37℃培养30h的细胞位移至22℃培养后细胞中仍无青霉素酰化酶mRNA积累, 因此合成青霉素酰化酶能力没有回复, 与表2结果一致。这表明在37℃培养的细胞中青霉素酰化酶基因被永久地关闭, 而且温度对青霉素酰化酶基因表达的调控发生在转录水平, 而不是由于影响青霉素酰化酶mRNA的降解速度。当22℃培养30h的细胞位移至37℃培养2h后, 青霉素酰化酶mRNA的量明显减少, 这是由于在37℃青霉素酰化酶基因转录被关闭, 在细胞中积累的青霉素酰化酶mRNA逐渐降解, 2小时后只有少量残存。

Deretic 等报道带青霉素酰化酶基因的重组质粒十分不稳定, 会高频发生青霉素酰化酶基因的缺失^[14]。这也是造成细胞永久丧失合成青霉素酰化酶能力的可能原因。但在大肠杆菌 A56 (pPA22) 中, 37℃培养的细胞失去合成青霉素酰化酶能力不是由于基因缺失造成的。因为我们对从37℃培养细胞中提出的pPA22进行酶切

分析, 未发现质粒中有缺失; 而且用37℃和22℃过夜培养的细胞分别作为种子, 在22℃进行发酵, 当接种量为1%时, 种子培养温度对青霉素酰化酶的产量没有影响。这结果进一步证明在37℃培养的细胞中青霉素酰化酶基因并没有缺失, 只是基因表达被关闭。

讨 论

温度可通过不同机制调控基因表达。在复制水平可通过调控复制, 改变基因剂量影响基因表达^[13]。在转录水平可通过影响RNA多聚酶的作用调控基因表达^[15]; 也可通过修饰RNA多聚酶调控表达^[16], 温度也可在mRNA降解和翻译水平影响基因表达^[17, 18]。此外温度也可能通过调节细胞内低分子调节因子的量而影响基因表达^[19], 也可通过影响细胞内ppGpp量调控一系列基因表达^[20]。

升高温度使一些供应细胞氨基酸的酶合成受抑制。在克雷伯氏菌属中参与氮同化的固氮酶合成的温度上限为30℃^[21]。青霉素酰化酶在苯乙酰胺为唯一氮源的培养基中对细胞生长是必需的^[22]。温度对青霉素酰化酶基因的调控作用是否与其他参与氮同化的酶基因表达调控有关也有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Chaloupka, P.: *Microbiol. Sci.*, 2:86, 1985.
- [2] Szentermay, A.: *Appl. Microbiol.*, 12:185, 1964.
- [3] Vojtisek, V., Slezek, J.: *Folia Microbiol.*, 20:289, 1975.
- [4] Gang, D.M. and Shaikh, K.: *Biochem. Biophys. Acta*, 425:110, 1976.
- [5] Meyer, H. et al.: *Plasmids of Medical, environmental and Commercial Importance.*, Timmis, K. N., Puhler, A. (eds), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p.459, 1979.
- [6] 杨胜利等: *生物工程学报*, 1(1):29, 1985.
- [7] 吴汝平等: *生物工程学报*, 1(3):12, 1985.
- [8] Aiba, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256: 11905, 1981.
- [9] Rigby, P.N. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 113: 237, 1977.
- [10] Casey, J. and Davidson, N.: *Nucl. Acids Res.*, 4: 1539, 1977.
- [11] 张启先等: *微生物学报*, 19: 302, 1979.

- [12] Schomer, U. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 307, 1984.
- [13] Friedrich, C., Friedrich, B.: *J. Bacteriol.*, 153: 176, 1983.
- [14] Deretic, V. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 24: 173, 1984.
- [15] Nakanishi, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 250: 8202, 1975.
- [16] Taylor, W.E. et al.: *Cell*, 38: 371, 1984.
- [17] Kennell, D. and Bicknell, I.: *J. Mol. Biol.*, 74: 21, 1973.
- [18] Schulz-Harder, B.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 17: 23, 1983.
- [19] Ihu, J. and Brill, W.J.: *J. Bacteriol.*, 145: 1116, 1981.
- [20] Daumy, G.O. et al.: *J. Bacteriol.*, 163: 925, 1985.
- [21] Naprstek, J. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 15: 37, 1982.
- [22] Gallant, J. et al.: *Cell*, 11: 181, 1977.

CLONING AND EXPRESSION OF THE PENICILLIN ACYLASE GENE

III. TEMPERATURE REGULATES THE EXPRESSION OF THE PENICILLIN ACYLASE GENE AT TRANSCRIPTIONAL LEVEL

Yang Shengli Wu Ruping Wang Jingxing
He Jiansen Zhang Jibao

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

The effect of temperature on the expression of penicillin acylase gene was investigated. The expression of this gene was sensitive to temperature. The cells of *E. coli* A56 (pPA22) hardly produced penicillin acylase at 37°C and synthesized significant amount of the enzyme below 28°C. The optimal temperature for penicillin acylase synthesis was 20—22°C and the yield was 250u/100ml. The DNA-RNA dot blotting was used to analyse RNAs. It was shown that the cells of *E. coli* A56 (pPA22) had no detectable amount of penicillin acylase mRNA at 37°C, and the amount of penicillin acylase mRNA at 22°C was 5-fold more than that at 28°C. The mRNA concentration of chloramphenicol acetyl transferase gene on the same plasmid pPA22 were almost the same at 22°C, 28°C and 37°C. The cells were shifted from 37°C to 22°C at different time and were incubated further, there was still no accumulation of the penicillin acylase and its mRNA, when the cells did not divide. These results indicated that temperature regulated the expression of penicillin acylase gene at transcriptional level and this gene was turned off permanently in the cells during long-term growth at 37°C.

Key words

Penicillin acylase; gene expression; transcription; DNA-RNA hybridization

Xiao Lei et al.: The isolation and characterization of cloned
glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase(GPD)gene and its
promoter from *Saccharomyces cerevisiae*

