

调控蛋白 CRP 和 FNR 对 青霉素 G 酰化酶基因表达的影响

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 酰化酶的表达受多种因素的调控。利用 *crp* 和 *fnr* 基因缺陷型菌株研究了葡萄糖阻遏和氧调控的机制。结果表明:FNR 对 *pac* 表达不起调控作用,CRP 对 *pac* 基因表达有正调控作用,并且 CRP 的结合位点位于结构基因上游的 DNA 序列上。随后,测定结构基因上游调控区的 DNA 序列,发现可能的 CRP 蛋白结合位点的同源保守序列为 TGTGA。

关键词 CRP 蛋白,FNR 蛋白,青霉素 G 酰化酶,基因调控

青霉素 G 酰化酶基因(*pac*)的表达受多种因素的影响,已报道葡萄糖阻遏 *pac* 表达,而 cAMP 的加入能逆转葡萄糖的阻遏作用^[1]。这暗示了 cAMP 和 CRP(cAMP 受体蛋白)复合物可能参与 *pac* 基因的表达调控。利用 *crp* 缺陷型菌株 *E. coli* M182 和克隆的 *crp* 基因在分子水平阐明了葡萄糖阻遏作用的分子机制。青霉素酰化酶的表达还受氧调控,低氧条件下青霉素 G 酰化酶表达较高,富氧条件下表达较低。FNR(延胡索酸和硝酸盐还原反应调控蛋白)是一个介导氧对基因调控的蛋白因子。目前,发现了大约 20 个受 FNR 蛋白调控的操纵子,其中包括正和负的调控^[2-4]。在本实验中,我们利用 *fnr* 基因缺陷性菌株 *E. coli* JRG1728 和克隆的 *fnr* 基因研究 FNR 对 *pac* 基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒:见表 1。

1.1.2 缺陷型菌株和质粒:*E. coli* M182 和 *E. coli* JRG1728,质粒 pFNR 和 pCRP 由 Guest 赠送,其它质粒来自本实验室或在本实验室克隆。

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% 琼脂糖用于转化。检测转化子的青霉素 G 酰化酶活力所用的培养基为(%):蛋白胨 1,酵母粉 1,NaCl 0.5,苯乙酸 0.2,消毒前 pH8.0。培养条件:提取质粒和 DNA 转化培养温度为 37℃,旋转式摇床上振荡培养(转速 250r/min),检测转化子的青霉素 G 酰化酶活力发酵温度为 22℃,250ml 三角瓶装 150ml 培养基,往复式摇床上培养(100r/min)。

1.2 方法

1.2.1 质粒的提取和 DNA 的转化:参照文献[5—6]。

1.2.2 青霉素 G 酰化酶活力测定:参照文献[7]。

1.2.3 DNA 序列测定方法: Taq Track Sequencing Systems (Technical Manual,

本文于 1993 年 10 月 24 日收到。

Promega)。

表 1 菌种和质粒
Table 1 Strains and plasmid

Strain/plasmid	Discription	Source
<i>E. coli</i> D816	Containing penicillin G acylase gene operon	This lab.
<i>E. coli</i> JM109	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 recA1 thiΔ (lac-proAB)	This lab.
<i>E. coli</i> JRG1728	(Δlac galU)galK rpsI Δ[ara-leu] Δ[tyrR-fnr-rac-trg]	Professor Guest
<i>E. coli</i> M182	<i>E. coli</i> MC1000(crp ⁻)	This lab.
pOK12	Vector	Km ^r Reference[12]
pRK733. 2	Vector	Amp ^r This lab.
pPA4	pRK733. 2+fragment(A+B)of pac gene	Amp ^r This lab.
pPA6	pRK733. 2+fragment A of pac gene	Amp ^r This lab.
pJL11	pOK12+crp	Km ^r This study
pJL12	pRK404+fnr	Tc ^r This study
JL3	M13 BM20+fragment B of pPA4	This study
M13 BM20		Boehringer Co.
PRK 404		Tc ^r This lab.

2 结果

2.1 调控蛋白 FNR 对 pac 基因表达不起调控作用

氧对一些基因的表达调控由 FNR 介导。FNR 对大多数基因的表达起正调控,在低氧情况下诱导表达,而对 FNR 本身的表达起负调控作用。当 FNR 结合于转录起始点上游的-30~-50 区,起正调控作用,而结合于启动子下游则起负调控作用^[8]。pac 基因的表达也受氧的调控,在低氧情况下高表达,为此用 fnr-菌株和克隆的 fnr 基因研究了氧调控 pac 表达的机制。所用 fnr⁻菌株 *E. coli* JRG1728 是 fnr 基因缺失突变株,质粒 pFNR 的 Hind Ⅲ -BamH I 片段中含有 fnr 基因的启动子、翻译起始区域和结构基因,先将 fnr 基因克隆到低拷贝载体质粒 pRK404 的 Hind Ⅲ -BamH I 位点,转化 *E. coli* JRG1728 后观察其对 pac 表达的影响。所用的 pac 表达质粒为 pPA4 和 pPA6,pPA6 含有 pac 的启动子、翻译起始区、结构基因和调节基因,而 pPA4 除含上述基因外还含有上游调控顺序,对 pac 表达起正调控作用。

质粒 pFNR 用 Hind Ⅲ 和 BamH I 酶切,pRK404 用 Hind Ⅲ 和 BamH I 酶切作载体。低熔点胶分离 pFNR 的 1.5kb 的片段,pRK404 的 10.6kb 的片段,纯化后的 DNA 片段用 T4DNA 连接酶连接,转化 *E. coli* JM109,在含有 Tc 的平板上筛选抗 Tc 的白色菌落,菌落分析,酶切鉴定,得到 pJL12 质粒。将 pPA4,pPA6,pPA4+pJL12,pPA6+pJL12 分别转化 fnr 基因缺陷型菌株 *E. coli* JRG1728,在有苯乙酸(PAA)存在的条件下,22℃发酵 72 小时,测定 PAC 的活力。结果见表 2。

E. coli JRG1728(pPA4+pJL12)和 *E. coli* JRG1728(pPA4)的 PAC 活力相当,*E. coli* JRG1728(pPA6+pJL12)和 *E. coli* JRG1728(pPA6)的 PAC 活力相当,可见 FNR 对 pac 基因表达不起调控作用。

表 2 FNR 对 *pac* 基因表达的影响Table 2 The effect of FNR on the expression of *pac* gene

Strains	Inducer (PAA)	Cell density (OD ₆₀₀)	Activity of PAC	
			(u/100ml)	10 ⁻³ u/OD ₆₀₀
<i>E. coli</i> JRG1728(pPA4)	+	4.00	44.40	31.80
<i>E. coli</i> JRG1728(pPA4+pJL12)	+	5.20	37.60	35.00
<i>E. coli</i> JRG1728(pPA6)	+	5.19	11.40	10.90
<i>E. coli</i> JRG1728(pPA6+pJL12)	+	3.52	9.50	13.00

2.2 调控蛋白 CRP 对 *pac* 基因表达起正调控作用

已对 *E. coli* 中几十个受 CRP 调控的启动子进行了结构与功能的研究^[9],发现 CRP 的调控作用与其结合位点的位置有关,但 CRP 结合位点与 FNR 不同,分布较散。所用的 *E. coli* M182 是 *E. coli* MC1000 的 *crp* 基因缺失突变株,将 *crp* 基因克隆到高拷贝载体 pOK12 的 *EcoR* I - *Bam* H I 位点,转化 *E. coli* M182 后观察其对 *pac* 表达的影响。质粒 pCRP 分别用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切,pOK12 用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切作载体。低熔点胶分离 pCRP 0.9bp 的片段,pOK12 的 2.13kb 的片段,纯化后的 DNA 片段用 T4DNA 连接酶连接,转化 *E. coli* JM109,在含有 IPTG Xgal 的平板上筛选抗 Km 的白色菌落,菌落分析,酶切鉴定,得到 pJL11 质粒。pJL11 的构建见图 1。

将 pPA4, pPA6, pPA4 + pJL11, pPA6 + pJL11 分别转化基因缺陷型菌株 *E. coli* M182,在有 PAA 存在的条件下,22℃发酵 72 小时,测定 PAC 的活力,结果见表 3。*E. coli* M182(pPA4+pJL11)PAC 活力是 *E. coli* M182(pPA4)的 3 倍左右。*E. coli* M182(pPA6 + pJL11)和 *E. coli* M182(pPA6)的 PAC 活力相当。可见,CRP 对 *pac* 基因表达有正调控作用,并且 CRP 表达增强作用依赖于 *pac* 基因的上游序列。

表 3 CRP 对 *pac* 基因表达的影响Table 3 The effect of CRP on the expression of *pac* gene

Strains	Inducer (PAA)	Cell Density (OD _{600nm})	Activity of PAC	
			(u/100ml)	10 ⁻³ u/OD ₆₀₀
<i>E. coli</i> M182(pPA4)	+	2.60	29.80	16.80
<i>E. coli</i> M182(pPA4+pJL11)	+	1.56	52.00	57.50
<i>E. coli</i> M182(pPA6)	+	1.56	16.20	5.60
<i>E. coli</i> M182(pPA6+pJL11)	+	1.80	16.10	5.40

2.3 结构基因上游序列的测定

已报道质粒 pPA6 的 *Hind* III - *EcoR* I 片段包含 *pac* 的调节基因和结构基因,而带 *Hind* III - B 片段的质粒 pPA4 的 *pac* 表达明显高于 pPA6^[10],因此在 *Hind* III - B 片段中可能有正调控基因或正调控蛋白的结合位点。已证明 CRP 蛋白对 *pac* 表达起正调控作用,而 pPA6 的 *Hind* III - *EcoR* I 片段包含启动子区,为此对 pPA4 中 *Hind* III - B 片段顺序测定。

Hind III 酶切 pPA4 质粒,将约 2.7kb 的 DNA 片段克隆到 BM20 载体的 *Hind* III 位点上,得到 JL3。JL3 的构建见图 2。抽提单链,测定结构基因上游的 DNA 序列。结果发现存在两个 CRP 蛋白的结合位点的同源保守序列为 TGTGA。

抽提单链噬菌体 JL3,进行序列测定,结果为:

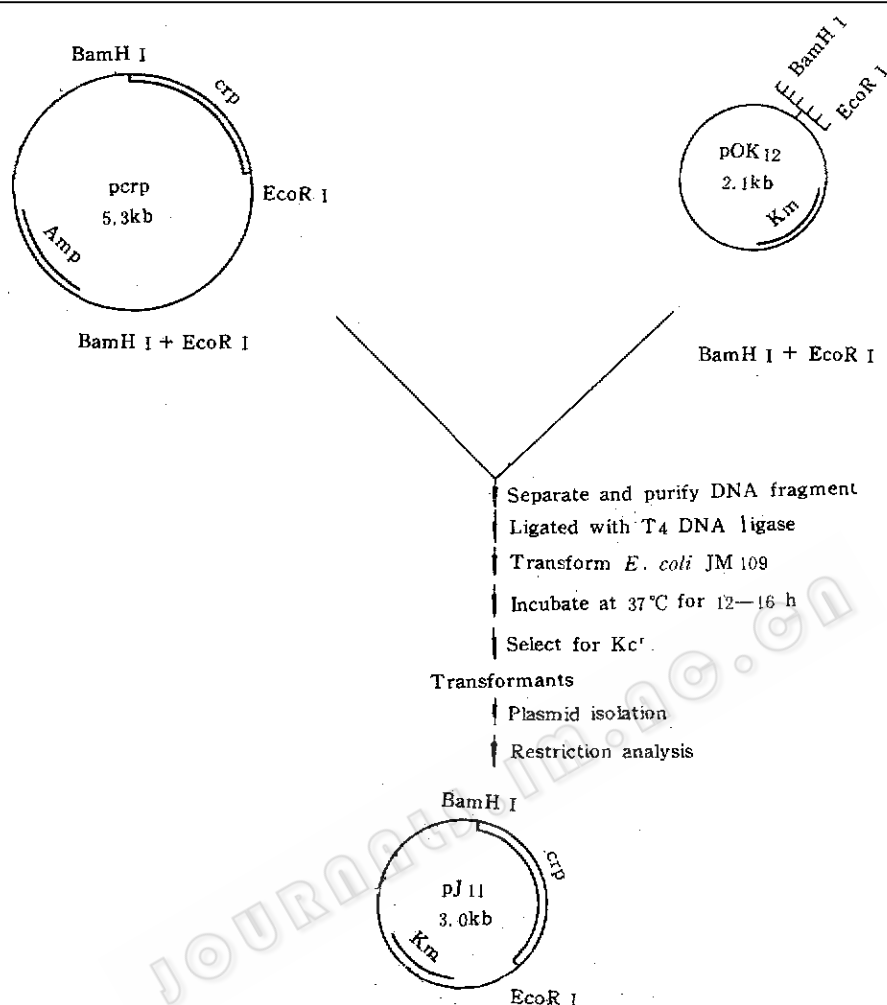


图 1 质粒 pJL11 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pJL11

ACATACAGATAATGACCTGAGCTGTCTCTCTGCGGGTCATCATCTATGCGTCCGGGGGATCTGTC
 ACAAAAAGGAATAGAACAAAATGATCAGCGCTGAATAAAGCGATTTCGTTTTAGATCACATTAATG
 (ACTGT)
 AAATTTTTGTATCAAAAATTAGTTATCGCGCTCACAGTTCATAATGAAACAATTCTCTGCAAATA
 (ACTGT)

GATAACCGAAGCTT

Hind III 位点

结果表明 B 片段与 A 片段邻接区有两段 CRP 结合位点的同源保守序列 TGTGA, 分别位于启动子上游的 (-77) - (-82) 和 (-119) - (-124) 区, 与报道的正调控启动子的结合部位相符^[11]。上述结果表明以前报道的 Hind III - B 片段对 pac 基因表达的增强作用的机制之一是 CRP 蛋白介导的正调控, 从而在遗传学水平和分子生物学水平阐明了 CRP 蛋白对 pac 表达的调控机制。

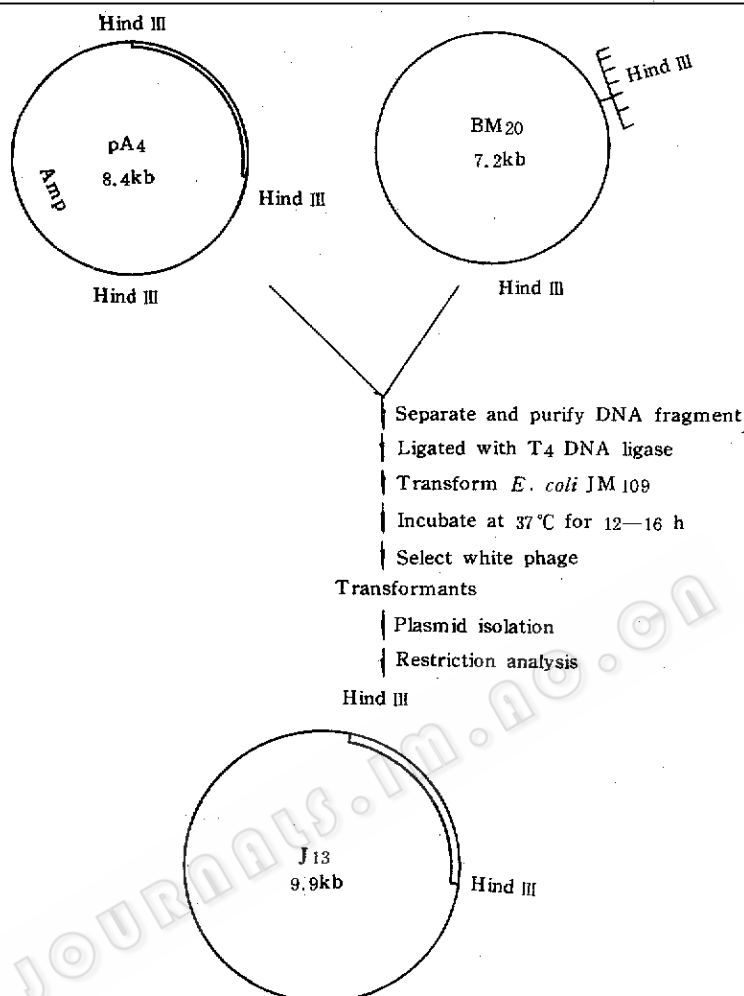


图 2 噬菌体 JL3 的构建

Fig. 2 Construction of phage JL3

3 讨 论

我们利用 CRP(cAMP 受体蛋白)缺陷型菌株 M182,研究 CRP 蛋白对 *pac* 基因表达的影响。结果表明 CRP 对 *pac* 基因表达起正调控作用,且在 *pac* 结构基因的上游序列中发现两个可能的 CRP 结合位点。可见,细胞内 cAMP 与 CRP 的复合体和 CRP 结合位点结合后,促使 RNA 聚合酶与模板相互作用而增加 *pac* 基因转录,以葡萄糖作碳源,由于激活特异的磷酸二酯酶活性和抑制腺苷酸环化酶活力,使 cAMP 量迅速降低,*pac* 转录不能顺利进行,从而使 *pac* 表达量降低。这就在分子水平解释了葡萄糖对 *pac* 基因表达的阻遏作用。且在 *pac* 结构基因上游序列的互补链中发现两个 CRP 结合位点 TGTGA。这种上游调控序列与启动子序列分别位于两条 DNA 互补链的基因组织及 CRP 与 RNA 聚合酶的相互作用有待进一步研究。溶氧对 *pac* 基因表达的影响越来越受到人们的重视,一系列的发酵实验表明,青霉素 G 酰化酶在低氧条件下的表达最高,富氧条件下表达量反而降低,这表明可能存在一些调控因子,调节 *pac* 在低氧条件下的表达。

FNR 蛋白是与 *E. coli* 在厌氧条件下生长有关的蛋白,它不仅抑制了一些好氧条件下表达的基因的表达,而且激活有利于厌氧生长的基因的表达。目前,发现了大约20个受 FNR 蛋白调控的操纵子,其中包括正和负的调控。我们利用 FNR 基因缺陷型菌株 *E. coli* JRG1728,研究 FNR 对 *pac* 基因表达的影响,结果表明 FNR 对 *pac* 基因表达的影响不显著。由此可见,可能存在其他的与氧偶联的调控因子,调节 *pac* 基因表达。

参 考 文 献

- [1] Robas N *et al.* 8th International Biotech, 1988, 104—110.
- [2] Christine W K G *et al.* Gene, 1988, 68: 297—305.
- [3] Shaw D J *et al.* Mol Gen Genet, 1981, 181: 95—100.
- [4] Shaw D J *et al.* Nucleic Acids Res, 1982, 10: 6119—6130.
- [5] Maniatis T *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Sping Harbor Laboratory, 1982, p. 90.
- [6] Maniatis T *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Sping Harbor Laboratory, 1982, p. 250
- [7] 张启先等. 微生物学报. 1979, 19(3): 302
- [8] Spiro S *et al.* Microbiol Rev, 1990, 75: 399—428.
- [9] Julio Collado-Vides, J *et al.* Microbiol Rev, 1991, 55: 371—394.
- [10] 杨胜利等. 生物工程学报. 1985, 1(3): 12—19.
- [11] Spiro S *et al.* Molecular Microbiology, 1990, 4(11): 1831—1838.
- [12] Jeffrey V *et al.* Gene, 1991, 100: 189—194.

The Regulation of Penicillin G Acylase Gene(*pac*) Expression by CRP and FNR

Jianglan Yang Shengli

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

Abstract pJL11 and pJL12 were obtained by cloning of *crp* gene from plasmid pCRP to pOK12 and *fnr* gene from pFNR to pRK404. pPA4, pPA6, pJL11+pPA4, pJL11+pPA6 were transformed to *E. coli* M182(*crp*⁻) and pPA4, pPA6, pJL12+pPA4, pJL12+pPA6 to *E. coli* JRG1728(*fnr*⁻), then activities of PAC were measured after fermentation. It can be found that the activities of PAC in *E. coli* M182(pPA4+pJL11) is more than that in *E. coli* M182(pPA4), the activities of PAC in *E. coli* M182(pPA6+pJL11) is similar to that in *E. coli* M182(pPA6). The data indicated that CRP protein activated the expression of *pac*. About 2.7kb DNA segment upstream to the *pac* structure gene was cloned to BM20. It was found that two possible binding sites of CRP protein upstream to *pac* promoter by DNA sequencing. On the other hand, the activities of PAC in *E. coli* JRG1728 (pPA4+pJL12) is similar to that in *E. coli* JRG1728(pPA4), activities of PAC in *E. coli* JRG1728(pPA6+pJL12) is similar to that in *E. coli* JRG1728(pPA6). The data indicated that FNR protein is not involved in the expression regulation of the *pac* gene.

Key words FNR protein, CRP protein, penicillin G acylase, gene regulation