

# 利用 ORF438 启动子在链霉菌中表达透明颤菌血红蛋白

崔凤文 杨胜利

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

1988 年,由原核的透明颤菌(*Vitreoscilla* spp.)克隆到血红蛋白基因(vgb)<sup>[1]</sup>,其后 Magnolo 等在天蓝链霉菌及变青链霉菌中表达了透明颤菌血红蛋白(VHb),表明 VHb 对放线紫素的产生和菌体的生长有促进作用<sup>[2]</sup>。pIJ702 质粒上带有与次生代谢有关的酪氨酸酶基因(mel)<sup>[3]</sup>,mel 由 ORF438 启动子(P<sub>ORF438</sub>)带动转录<sup>[4]</sup>。本文尝试利用 P<sub>ORF438</sub> 表达 vgb。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

变青链霉菌(*Streptomyces lividans*)TK24 由上海医药工业研究院朱宝泉先生惠赠,质粒 pOK12-vgb' 为本研究组收藏。质粒 pIJ699 和 pIJ702 由上海植物生理研究所焦瑞身先生惠赠。

### 1.2 培养基和抗生素

YEME、R<sub>2</sub>YE 培养基的配制按文献[5]。硫链丝菌素由朱宝泉先生和美国 E. R. Squibb and Sons 公司的 Lucania S J 先生惠赠,按文献[5]使用。

### 1.3 酶和试剂

限制酶和 Klenow 酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、琼脂糖均为 Promega 公司产品。

### 1.4 方法

1.4.1 链霉菌转化,链霉菌质粒提取和 DNA 操作:按文献[5]进行。

1.4.2 无细胞抽提液的制备:收集菌体,悬浮于 100mmol/L、pH7.5 的磷酸盐缓冲液中,于冰上超声破碎,10 000r/min 离心 10min 后取上清。

1.4.3 一氧化碳差分光谱的测定:按文献[6]进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质粒的构建

质粒的构建见图 1。pOK12-vgb' 上带有 800bp 的 vgb ORF,其天然启动子已经去掉(称为 vgb'),方向为 Sph I 到 BamH I。Sph I 和 BamH I 双酶切 pOK12-vgb',冻融回收 800bp 的 vgb ORF 片段并与经 Sph I 和 Bgl II 双酶切 pIJ202 连接,转化变青链霉菌 TK24 得到 pIJ702-vgb'。Hind III 和 sph I 双酶切 pIJ702-vgb',T4 DNA 多聚酶切平与补平大片段两端,连接后转化 TK24 得到 pFW2。Bcl I 酶切 pFW2,回收 2.19kb 的含 P<sub>ORF438</sub> 和 vgb ORF 片段,EcoR I 和 Bgl II 双酶切 pIJ699,回收 5kb 的 Bgl II-Bgl II 片段,将二者连接,转化 TK24 后得到 pFW201。

### 2.2 在 TK24 中表达 VHb

由图 2 可见与对照 TK24(pIJ699)相比,TK24(pFW201)的一氧化碳差光谱在 420nm 有特征吸收峰,表明有 VHb 活力。TK24(pIJ702-vgb')和 TK24(pFW2)中也能检测到 VHb 的活力(图未给出),表明是 P<sub>ORF438</sub> 带动了 vgb 的表达<sup>[4]</sup>。

将不带启动子的 vgb ORF 克隆至 pIJ702 上 ORF438 内的 Sph I-Bgl II 位点<sup>[4]</sup>,vgb 与 ORF438 同向,

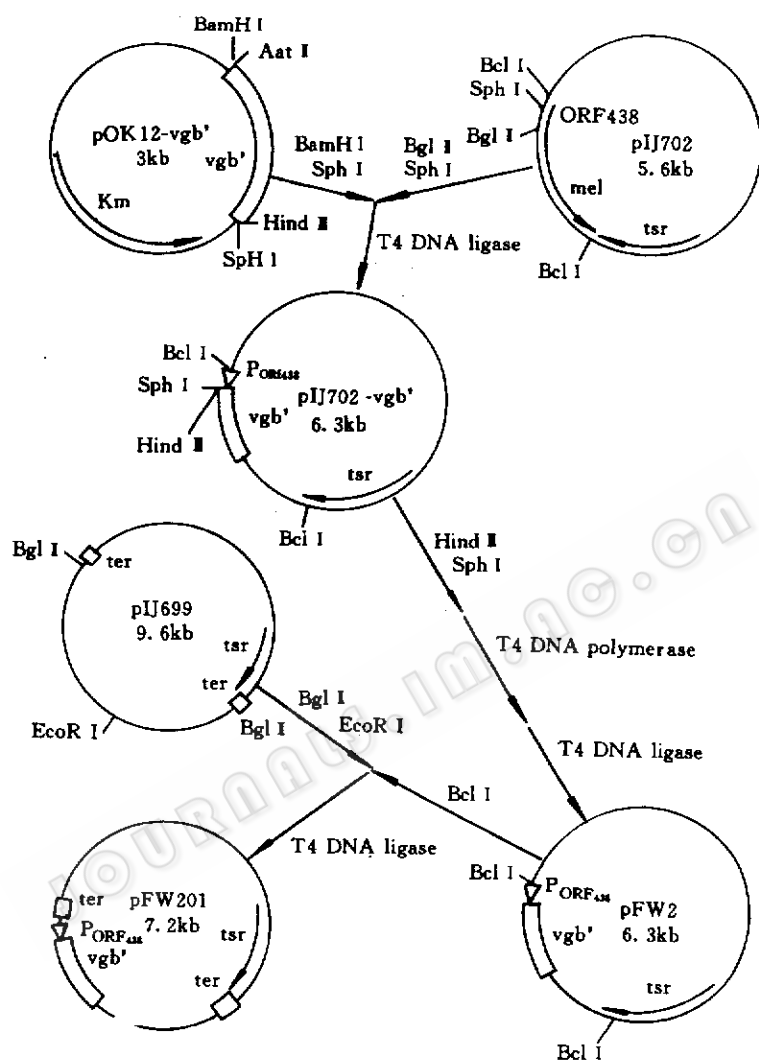


图1 质粒 pIJ702-vgb'、pFW2 和 pFW201 的构建

利用  $P_{ORF438}$  来表达 VHb。Sph I 位点内的 ATG 正好是 ORF438 的翻译起始密码, 进一步去掉  $P_{ORF438}$  与 vgbORF 之间含 ATG 的 DNA 片段, 将二者连成嵌合基因得到质粒 pFW2。在 pIJ702 质粒上由于受周围基因的影响, ORF438 的表达受到抑制, 例如比 pIJ703 低近 8 倍<sup>[3]</sup>。将  $P_{ORF438}$ -vgb ORF 这一嵌合基因克隆至 pIJ699, 利用 pIJ699 载体两端的正反向终止子<sup>[7]</sup>消除载体对  $P_{ORF438}$  的影响, 得到质粒 pFW201。此启动子可被胰蛋白酶诱导<sup>[3]</sup>, 应可以在需要时达到更高的 VHb 表达水平。

致 谢 上海生物工程中心钱福根老师帮助使用 Beckman DU7000 分光光度计, 特致谢意。

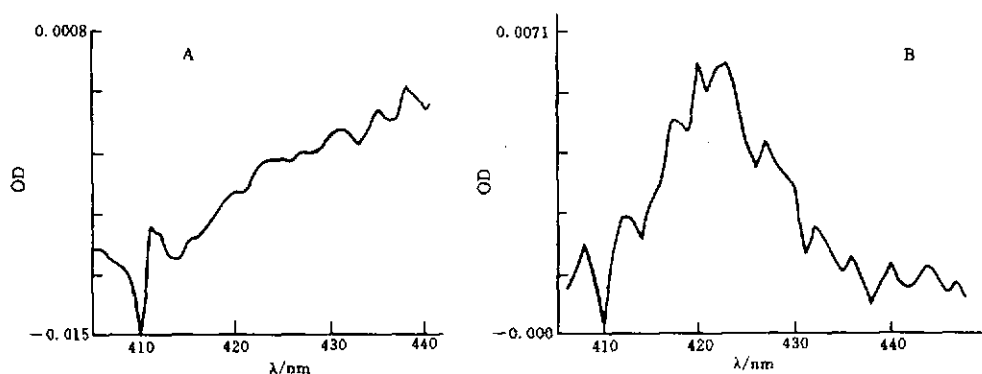


图 2 TK24(pFW201)VHb 活力的测定

A. TK24(pIJ699), B. TK24(pFW201)

### 参 考 文 献

- [1] Dikshilt K L, Webster D A. Gene, 1988, 70:377~386.
- [2] Magnolo S K, Leenutaphong D L, Denodena J A *et al.* Bio/Technology, 1991, 9:473~476.
- [3] Katz E, Thompson C J, Hopwood D A. J Gen Microbiol, 1983, 129:2703~2714.
- [4] Berman V, Filpula D, Herber W *et al.* Gene, 1985, 37: 101~110.
- [5] Hopwood D A, Bibb M J, Charter K F *et al.* Genetic Manipulation of Streptomyces. Norwich: John Innes Foundation, England, 1985.
- [6] Webster D A, Liu C Y. J Biol Chem, 1974, 249:4257~4260.
- [7] Kieser T, Melton R E. Gene, 1988, 65:83~91.

## Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin in *Streptomyces* by ORF438 Promoter

Cui Fengwen Yang Shengli

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233)

**Abstract** The ORF of *Vitreoscilla* hemoglobin gene (vgb) was cloned down stream from ORF438 promoter on pIJ702 to form pIJ702-vgb', pFW2 was derived from pIJ702-vgb' by deleting a DNA fragment containing ATG sequence between the ORF438 promoter and the vgb ORF, pFW201 was obtained by cloning the fusion of ORF438 promoter to vgb ORF to pIJ699. In *Streptomyces lividans* TK24, all of the three plasmids constructed can express *Vitreoscilla* hemoglobin.

**Key words** *Vitreoscilla* hemoglobin, *Streptomyces lividans*, heterologous expression