

透明颤菌血红蛋白在肉桂地链霉菌中的表达 对其细胞生长及抗生素合成的影响

文 莹* 宋 渊 李季伦

(中国农业大学生物学院微生物学系, 北京 100094)

摘 要 肉桂地链霉菌(*S. cinnamonensis*)是莫能菌素(Monensin)的产生菌。大肠杆菌-链霉菌穿梭表达载体 pHZ1252 中的透明颤菌血红蛋白基因(*vhb*)位于硫链丝菌素诱导启动子 P_{tipA} 之下,它在肉桂地链霉菌中的结构不稳定,发生了重组缺失,缺失的片段包括大肠杆菌质粒部分和 *vhb* 基因。但来自阿维链霉菌(*S. avermitilis*)中缺失了大肠杆菌质粒部分却保留了完整的 *vhb* 基因及 *tipA* 启动子的 pHZ1252,可在肉桂地链霉菌中稳定复制,不再发生缺失,经硫链丝菌素诱导表达出了有生物活性的 VHb 蛋白。摇瓶发酵实验证明, VHb 蛋白在氧限条件下可明显促进肉桂地链霉菌的菌体生长和抗生素合成。

关键词 透明颤菌血红蛋白, 肉桂地链霉菌, *vhb* 基因表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0024-05

透明颤菌血红蛋白(VHb)存在于专性好氧,但可生活在贫氧环境中的透明颤菌(*Vitreoscilla* sp.)中^[1],由于它具有结合氧的特性,从而暗示着在好氧的生物过程中具有潜在的应用价值,因此自它被发现之日起便引起了各国学者的广泛关注。它是迄今为止研究得最为深入的原核生物血红蛋白,其基因已被克隆和测序,并在多种异源宿主中得到了表达^[2],目前关于 *vhb* 基因表达的氧调控特性及调节机制, VHb 蛋白的空间结构、生理功能和应用等方面的研究都取得了一些重要进展^[3]。研究表明, VHb 蛋白在大多异源宿主中的表达都可降低重组细胞对溶氧的敏感程度,使之适应较低的溶氧水平,有利于重组细胞的生长和一些目的产物的合成,因而在发酵工程中具有良好的应用前景,可以用来降低能耗,提高产品产量。

链霉菌(*Streptomyces*)是产生抗生素的最重要的来源,由于它是丝状体,发酵液比较粘稠,加上氧在水中的低溶解特性,因此在大规模深层发酵中溶氧常成为限制因素,供氧不足会导致菌体生长不良和抗生素产量的下降。肉桂地链霉菌是多醚类离子载体抗生素莫能菌素的产生菌,它在发酵生产中要以豆油作为碳源,发酵液非常粘稠,而脂肪酸的分解代谢又需要较高的溶氧条件,溶氧问题尤为突出,传

统的通过提高搅拌速度和通气量增加溶氧的方法,需要消耗大量能量,从而增加了生产成本。为此我们试图将 *vhb* 基因引入到肉桂地链霉菌中,使其表达 VHb 蛋白,以期解决以植物油为碳源的一类工业用链霉菌在发酵中的高耗氧问题。本文报道这一研究的结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:大肠杆菌质粒:pRK404^[4],含 *vhb* 基因及其自身启动子,可在大肠杆菌中表达出 VHb 蛋白。大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒:pHZ1252 是由 500bp *vhb* 结构基因插入到穿梭表达载体 pHZ1272 中构建而成,其中 *vhb* 基因置于受硫链丝菌素诱导的链霉菌强启动子 P_{tipA} 之下^[4],由杨闰英博士构建并提供;pWY1252 为将 pHZ1252 引入阿维链霉菌中发生了缺失大肠杆菌质粒部分,但保留了 *vhb* 完整的结构基因和 P_{tipA} ,且在阿维链霉菌中稳定遗传和表达的质粒^[10],本室获得并保存。DH5 α 和肉桂地链霉菌 A-10,本室保存。

1.1.2 工具酶和抗体:实验用酶购自 Promega 公司, VHb 抗体,由杨闰英博士提供,系由表达 VHb

蛋白的大肠杆菌细胞粗提物免疫兔子制备而得, 效价 1:16。

1.1.3 试剂盒: Southern 杂交试剂盒 DIG DNA Labeling and Detection Kit 购自 B. M. 公司。

1.1.4 培养基和抗生素: 肉桂地链霉菌液体培养用改良的 TSB^[5] (制原生质体加 0.8% 的甘氨酸); 原生质体再生培养基为 HF^[6]; 固体产孢培养基为高氏一号/种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 豆饼粉 15, 玉米浆 5, CaCO₃ 2, pH 自然; 发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 豆饼粉 20, 玉米浆 1, K₂HPO₄·3H₂O 0.2, MnCl₂·4H₂O 0.3, CaCO₃ 1, 豆油 40, pH 8~9。肉桂地链霉菌固体培养使用卡那霉素 (Km) 和硫链丝菌素 (Th) 的浓度分别为 10 μg/mL 和 70 μg/mL; 液体培养中使用 Km 和 Th 的浓度分别为 3 μg/mL 和 5 μg/mL, 诱导 *vhb* 基因表达所用 Th 的浓度为 5 μg/mL。

1.2 方法

1.2.1 链霉菌中常规遗传操作基本按文献 [7] 有关章节进行; Southern 杂交按 DIG DNA Labeling and Detection Kit 中的有关说明进行; Vhb 蛋白的表达用 Western blotting 检测^[8,9]; Vhb 蛋白活性分析采用 CO 结合实验^[8,9]。

1.2.2 莫能菌素的摇瓶发酵: 将肉桂地链霉菌于高氏一号斜面上培养 7d 左右, 待长出丰富的白色孢子后, 转接种于摇瓶, 30℃、200r/min 培养 48~72h, 按 1% 接种量转接发酵摇瓶, 培养 7~8d 后放瓶测定。摇瓶装量为 70mL 培养基/500mL 三角瓶。

1.2.3 莫能菌素发酵单位的测定: 采用硫酸香草醛试剂, 加热显色后以分光光度计进行比色测定^[3]。

2 结果与分析

2.1 表达载体 pWY1252 在肉桂地链霉菌中的应用

2.1.1 pWY1252 在肉桂地链霉菌中的结构稳定性: pWY1252 是 pHZ1252 引入阿维链霉菌中发生了部分结构缺失的 *vhb* 表达载体, 其缺失部分是在大肠杆菌中起作用的复制起始区和选择标记, 但保留着 *vhb* 基因和需硫链丝菌素诱导的启动子 P_{tipA}, 它能在阿维链霉菌中稳定表达, 但不能再转化大肠杆菌^[10], 为了区分完整的 pHZ1252, 命名为 pWY1252。用 pWY1252 转化肉桂地链霉菌 A-10, 从转化子 A-10(pWY1252) 的 1 代和 6 代培养物中提出的质粒, 经电泳显示其大小均与阿维链霉菌中的 pWY1252 一致 (图 1)。Southern 杂交分析表明, 来自 A-10 中的 pWY1252 上仍含有 *vhb* 基因 (图 2)。上述试验说明 pWY1252 可在肉桂地链霉菌 A-

10 中稳定遗传, 不再发生结构变化。

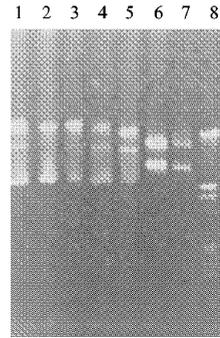


图 1 来自肉桂地链霉菌 A-10 的 pWY1252 的电泳图谱
Fig.1 Electrophoresis of pWY1252 from *S. cinnamonensis* A-10

1 2. pWY1252 from 1st generation culture of *S. cinnamonensis* A-10 transformant; 3 4. pWY1252 from 6th generation culture of *S. cinnamonensis* A-10 transformant; 5. pWY1252 from *S. avermitilis* 76-9; 6. pHZ1252 from *E. coli* DH5α; 7. pHZ1272 from *E. coli* DH5α; 8. λ /HindIII + EcoRI.

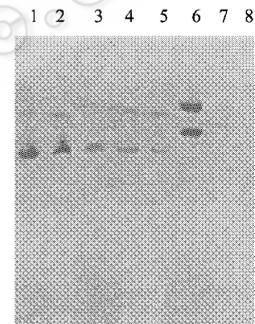


图 2 来自肉桂地链霉菌 A-10 的 pWY1252 的 Southern 杂交分析 (对应于图 1)

Fig.2 Southern blotting analysis of pWY1252 from *S. cinnamonensis* A-10

1 2. pWY1252 from 1st generation culture of *S. cinnamonensis* A-10 transformant; 3 4. pWY1252 from 6th generation culture of *S. cinnamonensis* A-10 transformant; 5. pWY1252 from *S. avermitilis* 76-9; 6. Positive control: pHZ1252 from *E. coli* DH5α; 7. Negative control: pHZ1272 from *E. coli* DH5α; 8. λ /HindIII + EcoRI.

2.1.2 *vhb* 基因在肉桂地链霉菌中的表达: 将转化子 A-10(pWY1252) 的 1 代和 6 代孢子分别接入改良的 TSB 培养基中, 30℃ 摇床培养 16~20h 至菌丝长起, 加 Th 诱导后继续培养 24h, 离心收集菌丝体, 制备原生质体, 用加样缓冲液直接悬浮原生质体沉淀, 经 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析表明, 诱导后的 A-10(pWY1252) 细胞粗提物和阳性对照在 16kD 处均出现了特异的杂交带 (图 3), 说明 pWY1252 中的 *vhb* 基因在肉桂地链霉菌 A-10 中表达出 Vhb 蛋白。图 3 的 4、2 泳道在 16kD 上面还有

其它条带,这是由于 1、2 泳道上是大肠杆菌细胞粗提物样品,而我们所用的 VHb 抗体是由表达 VHb 蛋白的大肠杆菌细胞粗提物免疫兔子制备而成的, VHb 抗体中混有针对大肠杆菌细胞中其它主要蛋白的抗体,所以大肠杆菌样品在 Western blotting 中会出现明显的非特异性条带。CO 结合试验显示,转化子 A-10(pWY1252)经 Th 诱导后,其蛋白粗提物在 420nm 处有明显的特征性吸收峰(图 4),说明肉桂地链霉菌中表达出的 VHb 蛋白是有生物活性的。

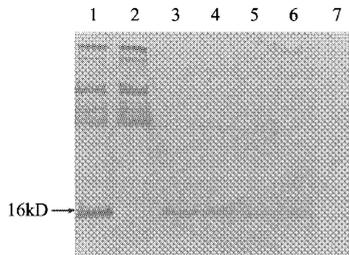


图 3 肉桂地链霉菌 A-10(pWY1252) 细胞粗提物的免疫检测

Fig.3 Western blotting analysis of crude cell extracts from *S. cinnamonensis* A-10(pWY1252)

1. Positive control: Cell extract from *E. coli* DH5α(pRK404); 2. Negative control: Cell extract from *E. coli* DH5α no plasmid; 3. 4. Cell extract from induced 1st generation culture of *S. cinnamonensis* A-10(pWY1252); 5, 6. Cell extract from induced 6th generation culture of *S. cinnamonensis* A-10(pWY1252); 7. Cell extract from non-induced *S. cinnamonensis* A-10(pWY1252).

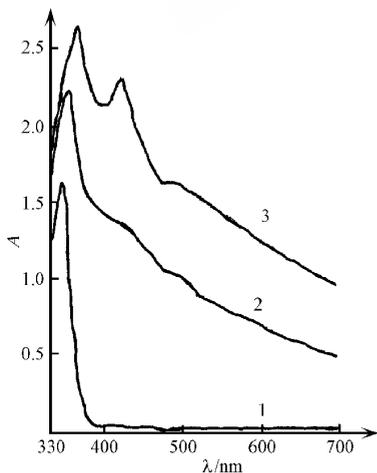


图 4 肉桂地链霉菌 A-10(pWY1252) 细胞粗提物的 CO 结合光谱

Fig.4 CO binding spectra of crude cell extracts from *S. cinnamonensis* A-10(pWY1252)

1. MPBS buffer 2. Cell extract from non-induced *S. cinnamonensis* A-10(pWY1252) 3. Cell extract from induced *S. cinnamonensis* A-10(pWY1252).

2.2 VHb 蛋白对肉桂地链霉菌细胞生长和抗生素合成的影响

将肉桂地链霉菌 A-10 及其转化子 A-10(pWY1252) 分别在 200r/min、偏心距 4.0cm 的大摇床上和 180r/min、偏心距 2.0cm 的小摇床上于 30℃ 进行摇瓶发酵,发酵前期每隔 12h 向 A-10(pWY1252) 的发酵摇瓶中加入 Th 诱导 VHb 蛋白的表达,每个处理设两个重复,发酵 6d 放瓶测定,结果见表 1。

由上表可见,溶氧水平明显影响菌体的生长和抗生素的合成,在通气状况不良的小摇床上,发酵摇瓶中的最终菌丝干重和莫能菌素产量,均低于大摇床上的相应摇瓶,而 VHb 蛋白的表达,可促进菌体生长和抗生素的合成,而且通气状况越差, VHb 蛋白的作用效果越明显,即在小摇床中,表达 VHb 蛋白的细胞与未表达 VHb 蛋白的细胞相比,最终菌丝干重和莫能菌素产量的增长幅度大于在大摇床上的增长幅度,说明 VHb 蛋白不但可以克服由于它的表达和质粒负载给菌体带来的不良影响,而且还减弱了菌体生长和抗生素合成对溶氧的敏感程度。

3 讨论

我们曾试用完整的 pHZ1252 转化肉桂地链霉菌 A-10 的原生质体,虽然获得了几个转化子,但从中提取的质粒都发生了缺失。琼脂糖凝胶电泳和 Southern 杂交分析结果表明,所缺失的 DNA 片段中不仅包括大肠杆菌质粒部分(即在大肠杆菌中起作用的复制起始区和选择标记),同时还包括 *vhb* 基因,因此无法表达 VHb 蛋白^[3]。而用完整的 pHZ1252 转化阿维链霉菌原生质体所获得的转化子的质粒中,虽也缺失了大肠杆菌质粒部分,但却保留了硫链丝菌素诱导启动子 P_{tipA} 和 *vhb* 结构基因,并能在该菌中表达出 VHb 蛋白和稳定遗传^[10],这种缺失的 pHZ1252 质粒称为 pWY1252。在本研究中我们利用 pWY1252 转化肉桂地链霉菌,也表达出了有生物活性的 VHb 蛋白,并通过摇瓶发酵试验显示出 VHb 蛋白对菌体生长和莫能菌素生物合成有促进作用。

然而我们所构建的基因工程链霉菌并不适于在大规模发酵生产中应用,原因是(1)pWY1252 中 *vhb* 基因的表达必须靠 Th 的诱导,而 Th 非常昂贵,这会大大增加生产成本,得不偿失;(2)pWY1252 是一个多拷贝的表达质粒载体,在发酵中如果不加卡那霉素作为选择压力,会导致质粒的丢

失,而添加卡那霉素无疑也会提高生产成本(3)高拷贝的表达载体表达出的 VHb 蛋白量较高,而蛋白质的表达是一个高耗能的生物过程,这势必会与菌体的正常生长代谢竞争有限的能量,从而影响 VHb 蛋白作用的发挥。基于以上弊端,我们考虑重新构建携带 *vhb* 基因的整合型表达载体,将它整合于染

色体上,随染色体 DNA 一起复制,虽然在筛选转化子时需用抗生素,但在以后培养过程中则不必添加抗生素作为选择压力,仍可使外源基因稳定存在,这对大规模发酵有利,不仅可以排除因添加抗生素而造成的成本增加,还可以避免高拷贝的表达载体所带来耗能的负面效应。

表 1 VHb 对肉桂地链霉菌的菌体生长和抗生素合成的影响

Table 1 Effects of VHb on cell growth and antibiotic synthesis of *S. cinnamonensis*

Shaker	Strain	Dry weight/(g/100mL)	Titer/(μ g/mL)	
Big shaker (200r/min 4.0cm)	A-10 (pWY1252)	Non-induced	4.76	1083
		0 h induced	5.08	1172
		12th h induced	5.18	1255
		24th h induced	5.14	1230
		36th h induced	5.10	1246
		48th h induced	4.98	1208
	A-10		4.80	1104
Small shaker (180r/min 2.0cm)	A-10 (pWY1252)	non-induced	4.12	917
		0 h induced	4.62	1156
		12th h induced	4.72	1163
		24th h induced	4.74	1215
		36th h induced	4.66	1196
		48th h induced	4.60	1204
	A-10		4.17	928

透明颤菌 *vhb* 基因的自身启动子受低氧条件诱导,安全经济,且在天蓝色链霉菌和变铅青链霉菌中表达出了 VHb 蛋白,应是首选的启动子,但是用它构建的 VHb 蛋白氧调控表达载体,在肉桂地链霉菌和阿维链霉菌中却未能表达出 VHb 蛋白^[3,10],这种氧控的表达载体在链霉菌不同种中表现差异的原因尚待研究。此外,还应研究试用链霉菌自身的组成型启动子来代替诱导型启动子,或使用温控启动子,使所构建的工程菌更适用于工业化生产的需要。

REFERENCES(参考文献)

[1] Tyree B, Webster D A. Electron-accepting properties of cytochrome *o* purified from *Vitreoscilla*. *J Biol Chem*, 1978, **253**: 6988-6991

[2] Bailey J E, Sburlati A, Hatzimanikatis V *et al*. Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **52**: 109-121

[3] WEN Y(文莹). Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin gene in *Streptomyces avermitilis* and *Streptomyces cinnamonensis*. Ph. D. thesis. College of Biological Sciences, China Agricultural University Beijing, China. 1999

[4] YANG R Y(杨闰英), HU Z H(胡志浩), DENG Z X(邓子新) *et al*. Construction of *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vectors for gene expression in *Streptomyces*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1998, **14**(1): 6-12

[5] GONG L M(龚利民), WANG Y G(王以光). Isolation and characterization of plasmid pSMY1 from midcamycin-producing strain *streptomyces mycarofaciens* 1748. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1986, **2**(2): 24-30

[6] Ikeda H, Inoue M, Omura S. Improvement of macrolide antibiotic-producing *Streptomyces* strains by the regeneration of protoplasts. *J Antibiot*, 1983, **36**(3): 283-288

[7] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al*. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom, 1985

[8] Magnolo S K, Leenutaphong D L, DeModena J A *et al*. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology*, 1991, **9**: 473-476

[9] DeModena J A, Gutierrez S, Velasco J *et al*. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology*, 1993, **11**: 926-929

[10] WEN Y(文莹), LI J L(季季伦). Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Streptomyces avermitilis*. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报) 2000, **40**(1): 50-56

The Effects of *Vitreoscilla* Hemoglobin Expression on Growth and Antibiotic Production in *Streptomyces cinnamonensis*

WEN Ying* SONG Yuan LI Ji-Lun

(College of Biological Science ,China Agricultural University ,Beijing 100094 ,China)

Abstract *Streptomyces cinnamonensis* A-10 is a monensin producing strain. pHZ1252 is an *E. coli*-*Streptomyces* shuttle vector for expressing VHb, in which *vhb* structural gene is controlled by thiostrepton-inducible promoter P_{tipA}. pHZ1252 was unstable in *S. cinnamonensis* occurring deletion recombination. The deletion DNA fragment of pHZ1252 included not only part of *E. coli* plasmid but also *vhb* gene. However, plasmid pHZ1252 isolated from *S. avermitilis* transformants, which lost part of *E. coli* plasmid but still contained *vhb* gene and P_{tipA} was stable in *S. cinnamonensis* and expressed VHb with biological activity after thiostrepton induction. Shake flask fermentation experiments showed that the presence of VHb in *S. cinnamonensis* efficiently enhanced cell growth and improved antibiotic production under aeration-poor conditions.

Key words *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb), *Streptomyces cinnamonensis* *vhb* gene expression

Received :April 4 2000

* Corresponding author. Tel 86-10-62891329 ; Fax 86-10-62891332 ; E-mail: dong.won@263.net

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>