

噬菌体T7溶菌酶工程菌的构建

崔道珊 宋兰芝 许永瑞 李殿君

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

将噬菌体T7溶菌酶基因克隆到含有可诱导性启动子LacUV 5的表达载体 pAR1206 中。在没有诱导剂存在情况下, LacUV 5 启动子的转录受到抑制。当带有重组质粒的转化菌生长到适当浓度, 向培养液中加入 0.4mmol/L IPTG, LacUV 5 启动子受到诱导, 从而使插入的基因高水平表达, 并积累大量具有生物活性的溶菌酶。噬菌体 T7 溶菌酶在大肠杆菌中表达的产量平均约22mg/L。

关键词 T7 溶菌酶; LacUV 5 启动子; 表达

溶菌酶的研究在理论上和实际应用上都具有重要意义^[1,2]。随着分子生物学的发展, 有关溶菌酶的研究不断取得新进展。继噬菌体T4溶菌酶基因的克隆表达并被改造成功之后^[3], 鸡卵溶菌酶基因的克隆表达^[4]及人的溶菌酶基因的克隆及表达均获得成功^[5]。我们采用含有可诱导性启动子LacUV5的表达载体构建了噬菌体T7溶菌酶工程菌。

材料和方法

(一) 菌种和质粒

E. coli HMS 174 (rK⁻ 12 mK⁺ 12 recAI Rif^R su⁻)作为本实验转化菌, F. W. Studier教授惠赠。*E. coli* B及溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeiklicus* AS 1.634)来自中国科学院微生物研究所。

质粒 pAR1206 构建于美国布鲁凯文国立研究所 F. W. Studier 实验室。该质粒是由质粒 pMC1^[6], 经 HincII 酶解得到1724bp长的DNA片段(该片段包括大肠杆菌乳糖操纵子启动子 LacUV 5), 采用人工接头将该片段插入pBR322的HindIII位点构成。LacUV 5 promoter的转录要

通过异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导。

(二) 酶及重要试剂

限制酶, T4DNA连接酶, T4多聚核苷酸激酶, 碱性磷酸酯酶, *E. coli* DNA聚合酶Klenow片段, BamHI, Linker等分别来自 New England Biolabs 或 Boehringer Mannheim。

异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 及卵清蛋白溶菌酶购自 Sigma 公司, DEAE-纤维素(DE-52)及CM-纤维素(CM-52)为 Whatman产品, 2-N-吗啡乙磺酸(MES)为中国科学院上海生物化学研究所制造。

两组低分子量标准蛋白: 一组为 Sigma 产品, 另一组为上海生物化学研究所东风生化试剂厂产品。

(三) 基因克隆及凝胶电泳

细菌培养, 质粒 DNA 抽提纯化, 连接反应条件, 细菌转化, 琼脂糖凝胶电泳, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳均按以前文章所述^[5]。蛋白样品制备, 系取200μl待测菌离心(1000rpm, 2min)收集菌体加入30μl裂解缓冲液(50mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 2 mmol/L Na₂EDTA, 1%

本文于1989年9月1日收到。
国家自然科学基金资助项目

SDS, 1% 巯基乙醇, 10% 甘油, 0.03% 溴酚蓝)。沸水浴加热2min 得到细菌裂解液。

(四) 溶菌酶的分离纯化

1. 粗提液的制备: 将构建后的 pAR1206/HMS174 噬菌体 T7 溶菌酶工程菌在 10ml M_0 -蛋白胨培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 于次日转入 1L 新鲜的 M_0 -蛋白胨培养基中, 37℃ 振荡培养至 OD_{600} 达 0.8 左右, 加入诱导剂 IPTG, 最终浓度达 0.4mmol/L。继续培养 3—4 h。离心收获菌体, 将其悬浮于 6ml 缓冲溶液 A 中 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L DTT, 5% 甘油, 1 mmol/L EDTA)。菌体冻融三次。再用 MSE 超声波发生器超声处理三次。加入约 12ml 缓冲液 A 以降低菌体稠度, 离心 (15000rpm, 15min)。取上层悬浮液即为酶的粗提液。

2. 柱层析纯化: 将全部酶的粗提液置于预先用缓冲液 A + 10mmol/L NH_4Cl 平衡过的 DEAE-Cellulose (DE-52) 柱上, 用相当于柱体积的缓冲液淋洗, 收集下柱液。合并含有 A_{280} 吸收的下柱液, 加入 0.1mmol/L MES, 调整 pH, 使达 6.0, 再将其全部置于预先用缓冲液 B (10mmol/L MES-NaOH pH 6.0, 20 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 5% 甘油), 平衡过的 CM-Cellulose (CM-52) 柱上, 用缓冲液 B 淋洗 2 个柱体积后, 用 20—520mmol/L NaCl 进行梯度洗脱, 分部收集。紫外分光光度计测定 A_{280} 以确定溶菌酶洗脱部分, 应为纯的噬菌体 T7 溶菌酶。

(五) 溶菌酶活力测定

采用浊度检测法, 选择适当的底物菌, 以酶作用前后透光率的变化来表示酶活力。我们使用溶壁微球菌的丙酮干粉^[8]及大肠杆菌 B 的冷冻干燥细胞^[9]两

种底物。分别用 50mmol/L 磷酸缓冲液。pH6.7 制成 450nm 光吸收为 0.5 左右的悬液。取 3ml 底物与适量待测酶液, 测定在 25℃ 情况下酶与底物结合后 450nm 光吸收下降 0.1 所需的时间, 以平均每分钟 A_{450} 下降 0.001 为一个酶活力单位。根据待测酶液蛋白含量计算出单位酶活/毫克蛋白。测定时以商品卵清蛋白溶菌酶为对照。

结 果

(一) 噬菌体 T7 溶菌酶工程菌的构建

由于我们已成功地将噬菌体 T7 溶菌酶基因克隆到 pBR322 及含有噬菌体 T7-RNA 聚合酶强启动子 $\phi 10$ 的 pBR322 衍生质粒中去^[10], 得到 pLA1 及 pLA2 重组质粒。这就提供了方便的 T7 溶菌酶基因的来源。用 BamHI 完全酶解纯化过的 pLA1, 经电泳分离纯化切割下来的 DNA 片段, 该片段含有完整的 T7 溶菌酶编码序列及噬菌体 T7 RNA 聚合酶弱启动子 $\phi 3.8$ 的编码序列。作为载体的 pAR1206 质粒具有单一的 BamHI 酶切位点, 位于 LacI-LacUV5 的下游。同样用 BamHI 完全酶解。用碱性磷酸酯酶处理以防载体自身环化, 然后与上述片段连接, 转化大肠杆菌 HMS174 (图 1)。挑选具有抗氨苄能力的转化菌。从 50 多株转化菌中取 12 个菌株, 进一步用限制酶分析。BamHI 切割后释放出长度为 632bp 长的插入片段, 即证明插入基因的完整性。用能同时切割 LacI-LacUV5 及插入片段的 RsaI 及 HindIII 双酶切割得到 1051 bp 的新片段, 计算确定克隆的基因是以顺时针方向插入载体, 与 LacUV5 启动子的方向一致。我们将该重组质粒定名为 pLA3 即噬菌体 T7 溶菌酶工程菌 (图版 I-(A))。经传代检验, 工程菌是稳定的。

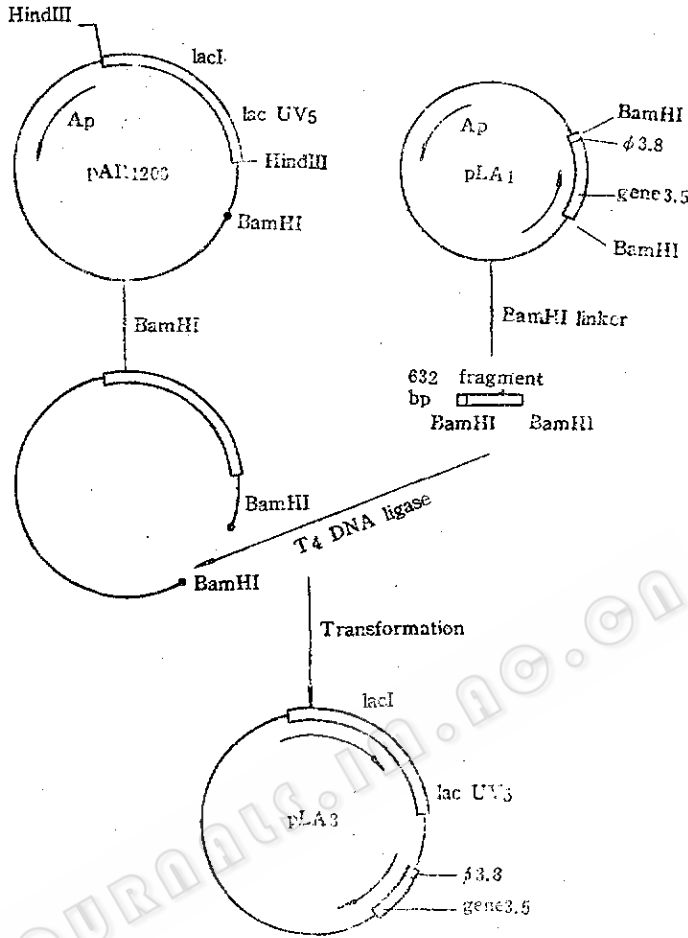


图 1 重组质粒pLA3的构建
 Fig.1 Construction of recombinant plasmid pLA3

(二)噬菌体T7溶菌酶工程菌的表达

由于克隆载体带有可诱导的LacUV5启动子，要在IPTG存在的情况下才能去阻遏。为此，我们测定了加入诱导剂不同时间后pLA3基因表达的情况。以只携带质粒pAR1206的转化菌(pAR1206/HMS174)为对照，分别测定每组加与不加诱导剂IPTG在0、1、2、3、和4h后，溶菌酶蛋白的积累。从不同时间取样，制备蛋白样品，置SDS聚丙烯酰胺电泳的结果可以看出pLA3经IPTG诱导1h后即有一定量的溶菌酶积累，3h已达高峰，4h已无明显增加。不加IPTG诱导的培养菌只产生少量溶菌酶。而对照菌，不论加与不加IPTG

诱导，都无溶菌酶蛋白产生〔图版I-(C)〕。

(三)噬菌体T7溶菌酶分离纯化

收获2L经IPTG诱导3h的培养物。按材料和方法所述制备粗酶提取液，共计22ml。通过DE-52柱(φ2×50cm)，将含有酶蛋白(图2)的下柱液全部置于CM-52柱上(φ1.5×21cm)，用20—520mmol/L NaCl梯度洗脱，分部收集下柱液。测定结果表明，噬菌体T7溶菌酶蛋白在250—370mmol/L NaCl下被洗脱(图3)(以上操作全部在0—4℃下进行)，合并收集液，用含有1mmol/L巯基乙醇，0.05mol/L磷酸缓冲液(pH6.7)透析，冷冻干燥保存。

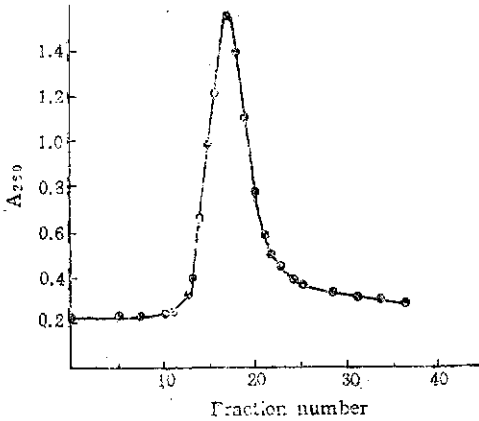


图 2 噬菌体 T7 溶菌酶经 DE-52 初步纯化
Fig.2 The first chromatography of T7 phage lysozyme on DE-52 column

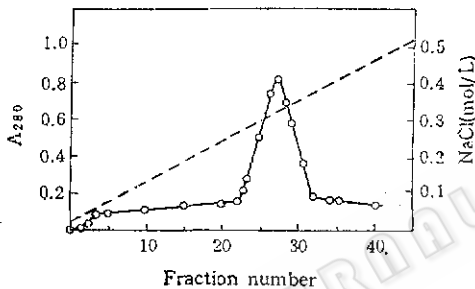


图 3 噬菌体 T7 溶菌酶经 CM-52 柱再次纯化
Fig.3 The second chromatography of T7 phage lysozyme on CM-52 column

测定冷冻干燥后的噬菌体 T7 溶菌酶样品活力, 以溶壁微球菌为底物时, 活力为 1000u/mg 蛋白。以大肠杆菌 B 为底物时活力为 2800u/mg 蛋白。商品卵清蛋白溶菌酶对两种底物敏感程度相差不多, 活

力为 900—1000u/mg 蛋白。

用含有 5% 堆积胶的 10—20% 梯度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分离纯化各阶段所得产物的纯度和分子量, 结果表明粗酶抽提液经 DE-52 柱纯化后还含有少量杂蛋白。经 CM-52 柱纯化后即可得到单一条带电泳纯的噬菌体 T7 溶菌酶。分子量为 1680 道尔顿 [图版 I-(B)]。

三次实验统计结果, 噬菌体 T7 溶菌酶工程菌纯品产量分别为 30, 16, 20 mg/L。

讨 论

本文报道, 用含有大肠杆菌乳糖操纵子可诱导性启动子的高表达载体构建成功噬菌体 T7 溶菌酶工程菌。在此之前, 我们已将噬菌体 T7 溶菌酶基因克隆到 pBR322 及其衍生质粒 pAR951 中^[10], 而且不论以 pBR322 为载体, 还是以其衍生物 pAR951 为载体都只获得反时针方向的克隆。虽然在载体 pAR951 中的克隆有较高表达, 但令人遗憾的是克隆基因表达产物不随时间延长而大量积累。我们推测可能因为溶菌酶对宿主细胞来说是有害的。如果克隆基因以顺时针方向插入并充分表达, 将会造成宿主细胞的死亡。本工作结果对这一推论提供了必要的证据。

参 考 文 献

- [1] Fleming, A., *Proc. Roy. Soc. B*, 93:306, 1922.
- [2] 赤塚慎一郎等, *New Food Industry*, 19:17—21, 1977.
- [3] Perry, L. J. and Wetzel, R., *Science*, 266:555—557, 1984.
- [4] Oberto, J. et al., *Gene*, 40:57—65, 1985.
- [5] Castanon, M. J. et al., *Gene*, 66:223—234, 1988.
- [6] Calos, M. P., *Nature*, 274:762—765, 1987.
- [7] 崔道珊等, *生物化学杂志*, 4:48—55, 1988.
- [8] 陈俊民等, *微生物学报*, 19:14—17, 1979.
- [9] Akira, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 243:391—397, 1968.
- [10] 崔道珊等, *生物工程学报*, 6(2):91—95, 1990.

Construction of Recombinant Strains of Bacteriophage T7 Lysozyme

Cui Daoshan Song Lanzhi Xu Yongrui Li Deanjun
(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

The Bacteriophage T7 lysozyme gene was cloned in expression vector pAR 1206 which contains inductive promoter Lac UV5. Promoter is inhibited without inducer, when strain *E. coli* (HMS 174) harbouring the recombinant plasmid grown to an optical density, the Lac UV5 promoter is induced by adding 0.4 mmol/L isopropyl β -d-thioga lactoside (IPTG) to growing cultures. So that inserted gene is expressed at high levels and large amounts of active lysozyme can be accumulated in *E. coli* the expression level of T7 lysozyme in *E. coli* was 10u/mg or about 22 mg per liter of culture.

Key words

T7 lysozyme; Lac UV5 promoter; expression

图 版 说 明

Explanation of plate

(A) 重组质粒 pLA3 的酶切电泳分析

The electrophoresis analysis of recombinant plasmid pLA3

1. Marker (HindII digested T7 DNA)
2. BamHI digested pLA3; 3. BamHI digested pBR322;
4. RsaI-HindII digested pBR322; 5. RsaI-HindII digested pLA3

(B) 噬菌体 T7 溶菌酶纯化过程中各步产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of T7 phage lysozyme from different step of purification

- a. Albumin (67000); b. Actin (43000); c. Carbonic anhydrase (30000);
- d. TMV capsid protein (17500); A. Albumin; B. Ovalbumin (67000); C. Carbonic anhydrase; D. Trypsin inhibitor (21000); E. α -lactalbumin (14400)

1. 标准蛋白 I Standard proteins mixture I

2. 粗提液 Crude extract

3. 经过 DE-52 柱纯化的 T7 溶菌酶蛋白 T7 lysozyme proteins purified by DE-52 column

4. 经过 CM-52 柱纯化的 T7 溶菌酶蛋白 T7 lysozyme proteins purified by CM-52 column

5. 经过冰冻干燥的 T7 溶菌酶 Lyophilized T7 lysozyme protein

6. 标准蛋白 I Standard proteins mixture I

(C) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 pLA3 基因表达产物积累

SDS-polyacrylamide gel showing the T7 lysozyme accumulation in pLA3

A. 载体 pAR1206 转化菌对照组 pAR1206/HMS174 as control

B. 重组质粒转化菌 pLA3/HMS174

“+” 加入诱导剂 Adding inducer IPTG

“-” 未加诱导剂 None inducer IPTG

Cui Daoshan et al.: Construction of recombinant strains bacteriophage T7 lysozyme

