



图2 Trp P-O 区的结构

处附着便能启动结构基因的依次转录。假使 P 发生负突变,便无法启动转录,所以转录速度首先取决于 P。在 P 前有调节基因 R,它产生无活性的阻遏蛋白。阻遏蛋白是一种变构蛋白,与辅阻遏物 Trp 结合之后,结构改变,便能使复合物与位于 P 后的操纵基因 O 上的特殊核苷酸序列相结合(图2)。即活性阻遏蛋白具有识别 O 的能力,从而关闭整套结构基因。不过若核糖体事先结合时则仍能往下转录,说明活性阻遏蛋白只是关闭 O 区,使结合在 P 上的核糖体无法通过。

若调节基因 R 发生 *trpR* 突变,不能产生阻遏蛋白,或者不能被活化,则结构基因一直打开。*trpR⁻* 对 *trp R⁺* 是隐性,在这种突变株中 Trp 合成酶系的合成是组成型的。若发生 *trp R^{SR}* 突变,将产生即使没有 Trp 也具有活性的阻遏蛋白,O 区便一直关闭,*trp R^{SR}* 对 *trp R⁺* 为显性。另一类突变 *trp O^c*,使 O 区丧失与活性阻遏蛋白结合的能力,即 O 区一直开启,Trp 合成酶系的形成也是组成型的。

实际上,Trp 本身并不能与阻遏蛋白结合。它须先经色氨酸基-tRNA 合成酶活化,后者由 *trpS* 基因编码。若编码该酶的基因突变,过量终产物 Trp 便不能成为辅阻遏物,也就不能起到抑制 Trp 继续合成的作用。

以上是启动转录的负反馈调节的主要机制。除此之外还需要在终止转录上加以调节,才能得到符合要求的产物。结构基因前往往有衰减区,其功能是减弱启动讯号,以对转录作更精细的调节(图3)。在一定条件下 RNA 聚合酶到此中止转录,而形成 132bp 外加 8bpU,再接上 22bp 的 mRNA。在 Trp 存在下指令一条 14 个氨基酸多肽链的合成,而无 Trp 时则合成 12 肽。

大肠杆菌 Trp 操纵子体内转录高频率地终止在称为 *trp t* 的位点上。许多原核细胞终止子的初级结构显示出有同一性,转录以几个尿嘧啶核苷酸残基终结,在终止位点前有一个二重对称的富 GC 区。然而 *trp t* 只有 25% 的终止效力。当不存在 P 因子时,转录部份在 *trp t* 处停止,但大部份通读到末端。存在 P 蛋

白时则大部份越过 *trp t* 而终止在 *trp t'* 处。体外转录表明,这两个终止子无论是串连结构,或者分别克隆都能独立运转。

三、Trp 操纵子的基因分离与重组^[10]

在噬菌体 $\phi 80$,及 λ 转导的大肠杆菌之染色体中,虽然 Trp 操纵子两侧的序列不尽相同,但因都有限制性内切酶 *EcoRI*、*BamHI* 及 *SmaI* 的作用位点,而不能将完整的 Trp 操纵子切下。可是噬菌体 *trp EA51* 的 Trp 操纵子紧靠左右两侧的碱基序列却可被 *SmaI* 裂解。为此先用 *EcoRI* 消化得到 16 kb 片段,再用 *SmaI* 进一步得到 8.7kb 片段,然后与 pBR313 重组。选择 *trp⁺ Ap^r Tc^r*,得到 pHP3。

利用 *HpaI* 位点正好在 Trp 操纵子启动基因中的特点,可以判断 Trp 操纵子在杂合质粒上的方向。pHP3 的 8.7kb 片段有 4 个 *HpaI* 切点。在一定条件下 RNA 多聚酶能选择性地结合到启动子上,而使启动基因免受 *HpaI* 的裂解。对有无 RNA 多聚酶存在时的 *HpaI* 酶切图谱进行比较,发现 0.23kb 片段被 6.1kb 片段代替,后者是 0.23kb 与 5.9 kb 两片段连接而成的。因此 Trp 启动基因正好位于 *HpaI* 切点上,而这一位点处于 0.23 和 5.9 kb 片段之间,并且转录为顺时针方向。

四、结构基因的分离^[10,11]

将 pHP3 用 *SmaI* 消化,连上 *EcoRI* 接头 CCGA-AT TCGG,与 pBR345 一起用 *EcoRI* 消化。pBR345 很小,但有复制区且不带抗药性标记。结果分离到携带 pHP12 及 pHP39 的 *trp⁺* 转化菌。改造 pHP12 得到 pEP121 (12.5kb),带 *Ap^r*,有完整的 *trpA* 和 *E*,并具有 7 个内切酶单切点。由于该质粒缺失 *trpC*,*trpB*、*D* 也不完整,因此可用于克隆外源 *trp B*、*C*、*D*。

pHP39 为 9.8 kb。经改造得到 pHP3921 与 pHP3923。pHP3921 为 2.8 kb,有完整的 *trp E*、*A*,有 6 个单裂解点。pHP3923 为 7.4kb,有 5 个单切点,有完整的 *trp A*、*B*,可用于克隆外源 *trp C*、*D* 或 *E* 基因。

PvuII 裂解能把 41bp 从质粒中释放出来。将 41bp 片段以 T₄ DNA 连接酶处理, 然后插到 pBR 322 的 PvuII 位点中, 可以得到多重 41 bp 的衍生质粒。从 β -内酰胺酶活性看, 这些质粒都有类似的拷贝数, 并不因多重 trp P—O 片段的插入而受影响。

具有 trpO 活性的 41bp 片段, 除了在 -4 和 -18 处有差异外, 从 -2 到 -21 的碱基呈现出完美的对称。若从 HpaI 处切开, 将左右两半各自连接, 并插到 pBR 322 的 HpaI 处。得到的 pDR 36 (O 右 O 右) 有与 pDR 11 或 pDR 12 相类似的 β -半乳糖苷酶活性, 但 pDR 63 (O 左 O 左) 却测不到活性, 而且转化菌长得又慢又小。为进一步剖析 41 bp 片段中哪一部份比较重要, 将其用 RsaI 裂解, 并插到 pBR322 的 SmaI 处。结果这个新的序列没有 trpO 活性, 从而表明从 -6 到 -3 附近的序列对于 trpO 是重要的。一般说来, trpO 至少需要 -20 到 -3 这一段序列, 才能被 Trp-阻遏物识别。

七、终止子的克隆^[11]

转录的终止, 其实质是 RNA 聚合酶对 DNA 模板上译成密码的讯号的识别, 因此基因表达也在终止区受到调节。

pEP165 的 Tc 结构基因处于 trpP 的控制之下, 在 Tc 结构基因之前有个 HindIII 位点, 可用于克隆终止讯号。假如把 pEP162 的 2.9 kb 之 HindIII-HindIII 片段插到 pEP165 的 HindIII 位点中, 转化菌便变得对 Tc 敏感, 说明 Tc 结构基因的表达被阻断; 也就是说, 一个 trp t 已被克隆到 Tc 结构基因之前。

然而 trp t 只有 25% 的终止效力, 证明这一点的是下面的实验。从 pLD 102 分离出 HinfI-HaeIII 的 380bp, 与 pBR322 的 EcoRI 片段重组成 pTP119。从 trpA 后 387bp 处切取包含 500bp 的片段插到 pTP119 的 EcoRI 位点中产生 pWU5。在缺乏 P 蛋白时, 部份转录在 trp t 处中止, 产生 245bp mRNA; 其余通读到末端, 产生 545bp。当存在 P 因子时 trp t 仍有 25% 终止效力, 但其余并不通读到末端, 由此发现了依赖 P 的第二个终止子 trp v'。

把 pWU5 的 HincII 的 200 bp 片段插到 pTP 119 中, 便产生只有 trp v' 的 pWU15。同样, 将 ART38 的 HaeIII 的 315bp 片段插到 pTP119 的 EcoRI 位点, 就产生只有 trp t 的 pWU11。体外转录表明, trp t 或 trp v' 均有终止功能, 证明这两个终止子在体外无论是串连结构, 或者分别克隆都独自发挥作用。通过 DNA 序列分析, 以及对转录生成的 mRNA 的消化图谱的分析, 将 trp v' 定位于 trp t 后大约 250bp 处。

八、Trp 基因的表达^[4, 11-13]

已经报导了许多氨基酸合成基因之分离、克隆, 并以 DNA-RNA 杂交法证明了重组基因已经表达。然而检验表达与否, 最根本的是看有无相应产物形成。

获得一个强有力的启动子, 往往是研究者所盼望的。除了将 trpP 与 Tc 或 Lac 融合的报导外, Windass 等人工化学合成了含有大肠杆菌 trpP—O 序列, 以及编码 trp 操纵子的第一个 SD 序列的 82 bp DNA 片段。该片段两端为 EcoRI 和 ClaI/TaqI 粘性末端。将其克隆到源于 pBR322 的 pAT153 中, 改造成 pSTP 2。然后与载有合成的干扰素 α -1 基因的 pJDW22 重组成 pJDW30。去掉小片段后借助合成的寡核苷酸使 trpP 与 IFN 融合。这样就在 IFN- α 1 启动子位点上产生一个完全天然的、高度有效的细菌翻译起始讯号。携带这些重组质粒 pIFS 201—204 的 *E. coli* 转化菌几乎组成型地表达 IFN- α 1 活性, 而且其效率明显地比以 Lac UV5 启动子为基础的系统高。

从结构基因的表达看, 当 λ 噬菌体 PL 插入 EcoRI, BamHI 和 SalI 位点时, trpA 基因产物分别达到细胞总蛋白量的 2.0、6.6 及 1.2%。以携带整个 trp 操纵子的 ColEI 质粒, 或以 λ trp EDC 噬菌体转染的细胞, 其 trp E 产物则占 12%。前述以 pBR322 为载体, 将含有 trp P 及 trp E 的 *E. coli* 之 HindIII 片段克隆进去, 得到 ptrp E-D₁。含该质粒的转化菌在加有 Trp 的培养基内时, trp E 基因产物很少。但加入 3 β -吡啶丙烯酸时能解除阻遏。其后 1—2 小时 trpE 蛋白合成达到最高峰, 至少增加 50 倍, 占总蛋白的 30%, 是新合成蛋白的 55%。

相应多肽的产生并不意味着一定能够过量积累相应的氨基酸。但在这方面亦进行了探索。作者构建了一些质粒, 其中有些似乎含有 trpAB 基因。在适当条件下, 转化菌能转化吡啶生成 Trp, 其转化率几达 100% (未发表资料)。

在从邻氨基苯甲酸生成 Trp 方面, 有人利用 pUM 101 (1—2 个拷贝/染色体) 及抗 Trp、抗反馈控制的受体菌; 而第一个借助于基因工程技术实现 Trp 小型发酵生产的是日本 Shuichi Aiba 等。他们发现 TSase 活性的增加与质粒拷贝数的变化相一致。但拷贝数太高时将招致不稳定, 尽管此时 TSase 增加会使生长速率降低。所以他们选择了质粒 pSC101 trp-115 (Tc^rtrp⁺), 拷贝数为 5—10 个/染色体。培养基成份 (%) 为: 葡萄糖 5, 酪蛋白水解物 1, NH₄Cl 0.3, KH₂PO₄ 0.3, K₂HPO₄ 0.7, 邻氨基苯甲酸 0.05, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, FeSO₄ · 7H₂O 0.001, 四环素 0.001。自动流加氨水维持 pH 7.0。在邻氨基苯甲酸降到 0.03% 时, 以 5mg/dl/h 速度补加至原值。通气量 1vvm, 搅拌 500rpm, 37℃。

菌体生长分为两阶段, 早期消耗氨基酸, 后期以氨为氮源。比生长率较大, 在培养 3—6 小时为 0.56/h, 最大细胞浓度为干细胞 6.9 g/l。直到葡萄糖耗尽之前, Trp 不断产生, 邻氨基苯甲酸不断消耗, 而一旦葡萄糖耗尽, Trp 亦停止产生。培养 24 小时, Trp 积累

量达 5.5g/l, 生产速率为 0.229g/l·h。这一生产速度在 Trp 发酵生产的所有报道中是最高的。

从上面的简述可以看到, 利用分子生物学和基因工程技术已经对 Trp 操纵子的结构、调控、转录及表达等问题作了比较深入的研究, 借助强有力的 trpP 使真核干扰素表达, 以及克隆出 trp 操纵子产生 Trp, 是其中比较突出的成果。在克隆外源基因时, 多利用抗生素抗性作选择标记, 而利用氨基酸作标记的质粒不会产生安全问题, 则在工业生产意义上有其明显的优点, 是值得借鉴的。不过, 目前的研究涉及调节机制的尚不多。按笔者的体验, 仅仅克隆天然基因是难以获得过量产物的。因此克隆 trpR、S 并加以改造, 应是下一步研究的重点。如此, 有可能获得积累纯氨基酸的生产菌株。

参 考 文 献

- [1] Stent, G. S.: Molecular Genetics, by Freeman, W. H. and company, San Francisco, 1971.
- [2] Smith-keary, P. F.: Genetic Structure and Function, The Macmillan press LTD, 1975, p 234.
- [3] Umbarger, J. E.: *Ann. Rev. Biochem.*, **47**: 574—99, 1978.
- [4] Windass, J. D. et al.: *Nucleic Acids Research*, **10**

- (21): 6639—6657, 1982.
- [5] Platt, T.: Cold Spring Harbor, NY, 1978, p449.
- [6] Craaford, I. et al.: *Annu. Rev. Biochem.*, **49**: 163—95, 1980.
- [7] Oppenheim, D. S. et al.: *J. Mol. Biol.* **144**: 133—42, 1980.
- [8] Gunsalus, R. P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 7117—7121, 1980.
- [9] 今本文男: 蛋白质核酸酵素, **27** (9): 1215—1226, 1982.
- [10] Enger-Valk, B. E. et al.: *Gene*, **15**: 297—305, 1981.
- [11] Russell, D. R.: *Gene*, **17**: 9—18, 1982.
- [12] Hallewell, R. A.: *Gene*, **9**: 27—47, 1980.
- [13] Wu, A. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** (5): 2913—2917, 1981.
- [14] Serlow, J. K. and Alexandra Holtaender: Genetic Engineering, Principles and Methods. New York and London, Vol 2, p145—155, 1980.
- [15] Walz, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** (12): 6172—6176, 1978.
- [16] Tribe, D. E. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 181—190. 1977.
- [17] Shiba Aiba et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* **43** (2): 289—297, 1982.
- [18] 佐野考之輔: 発酵と工業, **41**(4): 275—282, 1983.