

肠杆菌膜蛋白基因的研究

IV. 大肠杆菌染色体 DNA *Hind* III 酶解片段 上存在有与脂蛋白信号肽同源序列

黄耀煌 邬光惠

(北京军区总医院肝病研究所)

摘要 大肠杆菌野生株 JE5506 (*lpp*⁺) 和突变株 JE5505 (*lpp*⁻) 的染色体 DNA 的 *Hind* III 酶解片段,与一带有大肠杆菌外膜脂蛋白信号肽基因的 107bp 探针,在 20℃ 下进行 DNA-DNA 杂交,在 25kb 和 3.4kb 处各出现一杂交带。该两片段与载体质粒 pBR322 在体外进行 DNA 重组,分别得到 pHWO14 和 pHWO15 两个重组质粒。该两重组质粒的限制性内切酶酶切图谱, Southern 印迹及与 107bp 探针杂交的实验结果,进一步证明了上述两个 DNA 片段上存在有与脂蛋白信号肽基因同源的序列。pHWO15 质粒编码的蛋白质经鉴定证明是脂蛋白(见另文发表)。pHWO14 质粒在微细胞内的表达产物虽不是脂蛋白,但 DNA 序列分析证明它与脂蛋白信号肽基因同源的序列是信号肽断裂位点周围高度保守的 15 个碱基对。

关键词 脂蛋白基因;信号肽

由于生物探针和 DNA-DNA 分子杂交技术的应用,大大促进了不同来源 DNA 之间同源序列的探测、基因的定位、基因克隆株的筛选以及 DNA 的结构与功能关系的研究。我们用仅有 107bp 长的上带有大肠杆菌脂蛋白信号肽基因的 DNA 探针,在不严格条件下 (12℃),与大肠杆菌突变株 JE5505 (*lpp*⁻) 染色体 DNA 的 *Hind* III 酶解片段进行杂交,观察到有 7 个杂交带^[1]。我们将杂交温度提高到 20℃,发现只在 25kb 和 3.4kb 处各现一杂交带,将这两个 *Hind* III 片段分别与 pBR322 载体质粒进行重组,转入大肠杆菌得到克隆株。带有 25kb *Hind* III 片段的重组质粒 pHWO15 和带有 3.4kb 片段的 pHWO14 的限制性内切酶酶切图谱和 Southern 印迹 DNA 杂交结果,证明上述两个片段的确存在有与脂蛋白信号肽基因同源的序列^[2]。pHWO15 在大肠杆菌中指令合成的蛋白质经生化和免疫学鉴定证明是脂蛋白,为其编码的是一新的脂蛋白基因^[3]。pHWO14 在微细胞中的表达产物经聚丙烯酰胺凝胶

电泳分析表明在 pBR322 质粒编码的 β -内酰胺酶蛋白区带之上多一清晰的蛋白带,但经进一步鉴定证明不是脂蛋白。pHWO14 质粒 DNA 的 *Msp* I 酶解物中能与探针杂交的片段进行序列分析,结果表明 JE5505 株 DNA 的 3.4kb *Hind* III 片段与脂蛋白信号肽基因同源的序列是信号肽断裂位点前高度保守的 15 个碱基对。

材料与方法

(一) 菌株和质粒

本文所用的大肠杆菌 K-12 菌株有: JE5506 F⁻ pps his proA argE thi gal lac xyl mtl tsx, JE5505 F⁻ *lpp*-1 pps his proA argE thi gal lac xyl mtl tsx, JE221 *hsdM*⁺ *hsdR*⁻ recA leuB6 lacY trpE5 *lpp*⁻/F' *lacI*^q *lac*⁺ pro⁺, 载体质粒 pBR322 是自己制备的,重组质粒 pKENO15 是 N. Kenzo 博士赠送的。

(二) 探针的制备

带有大肠杆菌外膜脂蛋白信号肽基因的

107bp 探针,是从重组质粒 pKENO15 上获得该 DNA 片段而制成的。pKENO15 是以 pBR 322 为载体构建成的,上带有脂蛋白的启动子和前脂蛋白编码区的一部分。在该质粒上因有一 *Eco* RI 人工接头插在脂蛋白基因 DNA 序列第 123 碱基的 *Sau* 3A 位点上,故用 *Xba* I 和 *Eco* RI 双酶解可得到跨含脂蛋白基因 23-123 区加上 *Eco* RI 接头 3' 末端 6 个碱基对的共有 107bp 的 DNA 片段,用缺刻翻译法标以 ^{32}P 制成探针^[4]。

(三) 杂交

菌细胞提取总 DNA,用 *Hind* III 内切酶 (BRL 产品) 进行酶解后进行琼脂糖电泳分离,然后用 Southern 印迹法将琼脂糖凝胶上的 DNA 片段转移到硝酸纤维素膜上,在 $5 \times \text{SSC}$ 和 50% 甲酰胺中,不同温度下按文献 [5] 方法与上述探针进行杂交。

(四) 基因表达产物的鉴定

微细胞的制备及其合成的蛋白质放射标记^[6]、 $[3\text{H}]$ 甘油和 $[3\text{H}]$ 棕榈酸标记^[7]及免疫沉淀^[8]等均按文献的方法进行。

(五) DNA 序列分析

按 Maxam 和 Gilbert 化学法进行^[9]。

结果与讨论

(一) 大肠杆菌总 DNA 的 *Hind* III 酶解片段与脂蛋白信号肽基因探针的杂交

当我们用 ^{32}P 标记的带有大肠杆菌信号肽基因的 107bp DNA 片段作为探针与大肠杆菌 JE5506 (*lpp*⁺) 和 JE5505 (*lpp*⁻) 的染色体 DNA 的三种内切酶酶解片段在 30℃、 $5 \times \text{SSC}$ 和 50% 甲酰胺条件下杂交时,只有 JE5506 脂蛋白基因所在的 DNA 片段出现杂交带,JE5505 不出现任何杂交带 (图版 I-1)、但当温度降至 20℃ 时,JE5505 有两个 *Hind* III 片段 (25kb 和 3.4kb) 与探针杂交^[10]。

同源性低的 DNA-DNA 杂交只有在比较稳定时才能被检出,但在此条件下出现非特异杂交带的可能性也较大。Denhardt 等报告 DNA 片段转到滤膜上后,如先以白蛋白溶液保

温,则可去除非特异的单链 DNA 粘合,我们将上述结合有 JE5505 菌细胞 DNA 酶切片段的滤膜用 Denhardt 溶液 (0.02% Ficoll、PVP 和白蛋白,用 $3 \times \text{SSC}$ 配成) 在 60℃ 保温 5 小时后和经变性的 ^{32}P 标记探针放在一起,在 20℃ 下进行杂交,结果与不经 Denhardt 溶液处理的相同。野生株 JE5506 的脂蛋白基因在 10 kb *Hind* III 片段,突变株 JE5505 因缺失脂蛋白基因,故在 10kb 处不出现杂交带。但是 25kb 和 3.4kb *Hind* III 片段能与 107bp 探针形成杂交带,说明这两个片段存在有与脂蛋白基因同源的序列。

(二) 25kb *Hind* III 片段的重组质粒 pHWO15 的酶切图谱及其与脂蛋白基因探针的杂交

JE5505 株的 25kb *Hind* III 片段与 pBR 322 体外重组构成重组质粒 pHWO15,克隆到大肠杆菌中得到表达。该表达产物用 $[3\text{H}]$ 甘油和 $[3\text{H}]$ 棕榈酸标记及 Globomycin 处理使脂蛋白前体堆积,与抗脂蛋白血清产生免疫沉淀等试验结果证明它是脂蛋白,而且它的电泳泳动率与 Braun 脂蛋白相同^[11]。

25kb *Hind* III 片段是一大片段。为了进一步了解该片段与脂蛋白基因同源的序列,本文对 pHWO15 的酶切图谱和杂交进行了研究。如图版 I-2ab 所示,pHWO15 质粒的 *Hind* III 位点丢失,但可为 *Eco* RI、*Xba* I、*Pst* I、*Sal* I、*Hpa* I、*Pvu* II、*Hae* III 等内切酶所切开。Southern 印迹和分子杂交等技术的应用,揭示了每一种酶的酶切片段中都有一片段能与探针产生杂交带,其中以 *Hae* III 酶解能与探针杂交的片段为最小。这些结果进一步证实了 25kb *Hind* III 片段上存在有与脂蛋白信号肽基因同源的序列,而且因为 Braun 脂蛋白基因 *Hae* III 片段在 2kb 以上,而上述新脂蛋白基因 *Hae* III 片段只有 1.6kb 左右大小,这表明新脂蛋白基因结构不同于 Braun 脂蛋白。

(三) 3.4kb *Hind* III 片段上存在与脂蛋白信号肽断裂位点高度保守序列同源的结构

和上述 25kb *Hind* III 片段一样, 3.4kb *Hind* III 片段与 pBR322 质粒构建成 pHWO14 重组质粒, 将 pHWO14 和 pBR322 分别转化入微细胞的亲株 2984, 转化株在 ^{35}S -甲硫氨酸存在下合成蛋白质, 微细胞裂解后用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 ^{35}S 标记的蛋白质区带, 发现在 pBR322 编码的 β -内酰胺酶蛋白区带之上多一条带(图版 II-3), 但用上述鉴定 pHWO15 表达产物所用的几种方法进行分析, 结果表明该蛋白质不具有脂蛋白的活性。

3.4kb *Hind* III 片段是否存在有与脂蛋白基因同源的序列呢? 为了回答这个问题, 应用酶切图谱分析、Southern 印迹和 DNA 杂交技术, 证明了同源序列位于 1.2kb *Hind* III-*Hinc* III 片段上、然后再将后者分别用 *Msp* I、*Bst* NI、*Hinf* I、*Hae* III 和 *Alu* I 等几种酶切(图版 II-4 a、b)。杂交实验结果表明这些酶的酶解片段各仅有一个片段能与探针形成杂交带, 其中以约 300bp 的 *Msp* I 片段所形成的杂交带最深而且片段较小, 因此取它作序列分析。

用 Maxam and Gilbert 法对上述 *Msp* I 片段作序列分析, 结果确如我们所预测那样, 存在有与脂蛋白基因同源的序列。特别值得提出, 该同源序列就是脂蛋白信号肽断裂位点周围的为“-Leu-Leu-Ala-Gly-Cys-”5 个氨基酸残基编码的 15 个碱基“CTGCTGGCAGGT-TGC”。研究者们认为从脂蛋白前体转变为脂

蛋白的过程中, 修饰酶只辨认信号肽 C 端有限的几个氨基酸序列, 而不是脂蛋白的整个结构。大肠杆菌和欧文氏菌为上述 5 个氨基酸编码的前面两个密码子均为 CTGCTG^[10,11], 而我们分析亲缘关系离大肠杆菌较远的摩根菌脂蛋白基因结构, 发现它为这两个氨基酸编码的序列却是 TTATTA^[12], 虽然核苷酸序列不同, 但它们所编码的氨基酸都是 Leu-Leu, 说明这一段结构在脂蛋白分子中是高度保守的。所以 3.4kb *Hind* III 片段中为什么也存在有这样一段序列是一个很有趣的问题, 有可能它与脂蛋白基因来源于同一基因, 只是在进化过程中发生了碱基的插入、取代或缺失。至于这一片段在重组质粒 pHWO14 中所表达的产物是何种蛋白还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Huang, Y. X. et al.: FEBS LETTERS, 137 (2): 168, 1982.
- [2] Huang, Y. X. et al.: Fed. Proc., 41 (4) 1280, 1982.
- [3] 黄耀煌等: 中华微生物和免疫学杂志, 7(6):353, 1987.
- [4] Rigby, P. W. et al.: J. Mol. Biol., 113: 237, 1977.
- [5] Southern, E.: J. Mol. Biol., 93: 503, 1975.
- [6] Postle, K. et al.: J. Mol. Biol., 131: 619, 1979.
- [7] Hirashima, A. et al.: J. Biol. Chem., 248: 5654, 1973.
- [8] Halogona, S. et al.: J. Bact., 120: 1204, 1974.
- [9] Maxam, A. M. and Gilbert, W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74: 560, 1977.
- [10] Nakamura, K. and Inouye, M.: Cell, 18: 1109, 1979.
- [11] Yamagata, H. et al.: J. Biol. Chem., 256: 2194, 1981.
- [12] Huang, Y. X. et al.: J. Biol. Chem., 258(13): 8139, 1983.