

链霉菌-大肠杆菌穿梭质粒载体 pSGLgpp 的构建及应用^{*}

张 华 李 元

(中国医学科学院 协和医科大学 医药生物技术研究所 北京 100050)

摘 要 质粒 pSGL1(7.4kb)是从球孢链霉菌(*Streptomyces geobisporus*)中分离得到的一个高拷贝质粒,已测定其最小复制子序列。从球孢链霉菌总 DNA 中采用 PCR 方法扩增获得编码 C1027 前蛋白信号肽的 DNA 片段 gpp。将 gpp 克隆至 pSGL1 的衍生质粒 pSGLN 中,获得新的链霉菌表达型质粒载体 pSGLgpp。应用该质粒进行了人的可溶性白细胞介素 1 受体 I 型的表达。

关键词 质粒,信号肽,链霉菌

中图分类号:Q753 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2000)06-0605-09

链霉菌是一种丝状革兰氏阳性细菌。关于链霉菌的重组 DNA 技术在过去的十几年里发展迅速。在链霉菌中已经发现了大量的质粒存在。对这些质粒进行功能分析后已发展为许多有用的载体系统,如质粒载体 pIJ101 系列。同时新型的载体也在不断地构建中,通过在新的质粒系统中加入其它元件,如编码强启动子、高效的分泌信号肽、强终止子的 DNA 片段,以促使克隆的外源基因的高效表达。

质粒 pSGL1 是本室从抗肿瘤抗生素 C-1027 的产生菌,球孢链霉菌(*Streptomyces geobisporus*)中分离得到的一个高拷贝质粒^[1]。已测定其最小复制子序列^[2,3]。C-1027 由一发色团和一辅基蛋白组成,已确定该蛋白 N 端 33 个氨基酸为其信号肽,本文所使用的 gpp 序列含有该信号肽及其调控序列,以此为基础,构建获得了含有 gpp 信号肽的新型链霉菌和大肠杆菌穿梭载体 pSGLgpp。白细胞介素 1 是一种重要细胞因子,只有通过与其受体结合才能具有生物活性,本文采用上述载体,在变铅青链霉菌 TK54 中表达了白细胞介素 1 可溶性受体 hsIL-IRI,以考查该信号肽和载体在外源基因表达上的应用前景。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 *E. coli* JM109,重组变铅青链霉菌 *S. lividans* TK54 为本室保存。质粒 pUC18, pSGLN 为本室保存。

1.2 培养基

YEME^[4]用于 *S. lividans* TK54 液体培养。R2^[4]用于 *S. lividans* TK54 斜面培养。LB^[5]用于 *E. coli* 培养。

^{*} 国家自然科学基金资助项目(39670016)

作者简介 张 华(1973-),女,四川岳池人,博士生

收稿日期:1999-07-26,修回日期:2000-03-06

1.3 质粒的提取及 DNA 片段回收

大肠杆菌质粒和链霉菌质粒大量提取采用碱裂解法^[5]。质粒及 DNA 片段回收采用 QIAGEN 公司 Quickprep Kit 进行。

1.4 大肠杆菌和链霉菌的转化

按文献 4,5 进行。

1.6 PCR 扩增

1.6.1 引物设计 根据已知的 C1027 前蛋白序列^[6]设计引物 1 和引物 2 从球孢链霉菌总 DNA 中扩增含有该基因的启动子和编码信号肽的 289bp DNA 片段 gpp。

Primer1 5' GGGGCCGAGGAGGTG 3'

Primer2 5' GGCGAAGGCGACGGACTGTGC 3'

1.6.2 PCR 扩增 :在 50μL 反应体系中 ,采用 2.0mmol/L 的 MgCl₂ ,在 94℃ 变性 4min 后 ,开始进行循环。共进行 30 个循环 :94℃ 变性 1min ,55℃ 退火 1min ,72℃ 延伸 1min。30 个循环后 72℃ 再延伸 10min。

1.7 质粒 pSGLgpp 的构建

将 gpp 片段用 T4 聚合酶修补成平末端 ,与 pUC18/*Sma*I 片段连接后转化大肠杆菌得到重组质粒 pUCgpp。pUCgpp/*Xba*I 片段与 pSGLN/*Xba*I 片段连接后转化大肠杆菌得到重组质粒 pSGLgpp。

1.8 表达产物生物学活性测定

进行 SDS-PAGE 电泳 ,分离胶浓度为 12%。上样缓冲液不加 DTT ,样品不煮沸。蛋白电泳结束后将蛋白印迹转移至硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂牛奶 4℃ 封闭过夜 ,漂洗后转入杂交袋中 ,加入生物素标记的重组人 IL-1β ,于 10℃ 杂交 4 h。用 PBS 漂洗 ,将硝酸纤维素膜转入新的杂交袋中 ,加入 1:5000 稀释的 Streptavidin-HPR ,10℃ 保温 1 h。TBS 漂洗 ,DAB 显色。

2 结果

2.1 链霉菌-大肠杆菌穿梭载体质粒 pSGLgpp 的构建

2.1.1 信号肽的克隆 设计引物 1 和引物 2 从球孢链霉菌的总 DNA 中扩增含有该基因的启动子和编码信号肽的 289bpDNA 片段(图 1)。将该片段用 T₄DNA 聚合酶修补成平末端 ,与 pUC18/*Sma*I 片段连接得到重组质粒 pUCgpp。提取 pUCgpp 进行测序 ,结果与文献报道一致。

2.1.2 pSGLgpp 的构建 构建过程见图 2。

质粒 pSGL1 是质粒 pSGL1 的衍生质粒 ,它含有质粒 pSGL1 的最小复制子。将 pUCgpp/*Xba*I 片段与 pSGLN/*Xba*I 片段连接后转化大肠杆菌得到重组质粒 pSGLgpp。用 *Eco*RI/*Hind*Ⅲ 酶切得到 2.7kb 和 5.9kb 片段 ;用 *Sac*I 酶切获得四个片段 ,其中一个为 1.4kb ,表明插入方向与抗性基因 *aph* 复制方向相反 ;用 *Xba*I 酶切得到 3.0kb 和 5.6kb 片段 ,证明 pSGLgpp 的构建与设计一致 ,见图 3。

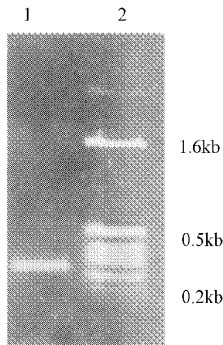


图 1 gpp 信号肽片段扩增产物的凝胶电泳

Fig.1 Agrose gel eletrophoresis of PCR product of gpp signal peptide-encoding sequence and its upstream sequence

- 1. PCR products of 289bp DNA fragment ;
- 2. pBR233/*Hin*fl.

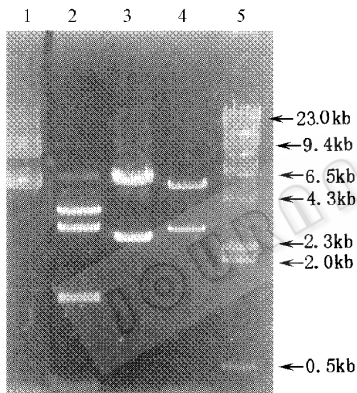


图 3 质粒 pSGLgpp 的酶切鉴定

Fig.3 Restriction endonuclease analysis of plasmid pSGLgpp

- 1. pSGLgpp ; 2. pSGLgpp/*Sac*I ;
- 3. pSGLgpp/*Eco*RI + *Hind*III ;
- 4. pSGLgpp/*Xba*I ; 5. λ DNA/*Hind*III .

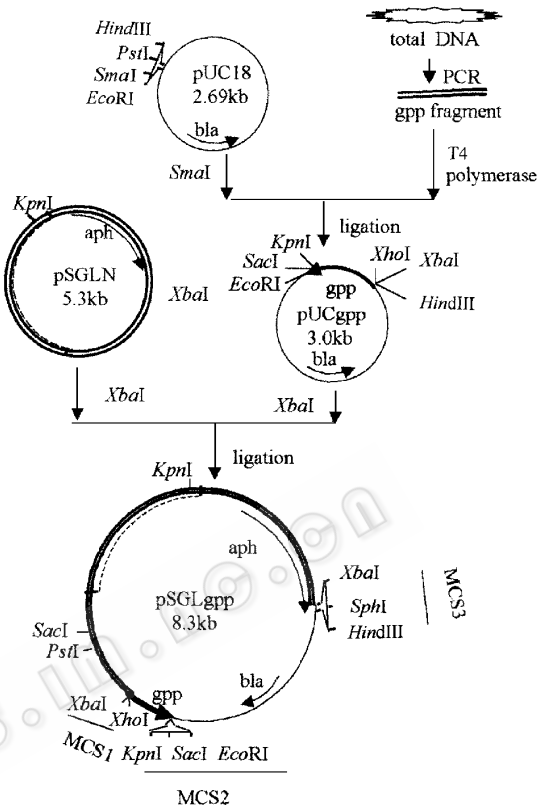


图 2 质粒 pSGLgpp 的构建

Fig.2 The construction of plasmid pSGLgpp

2.2 利用 pSGLgpp 表达 sIL-IRI

2.2.1 重组表达载体 pSGLgpp/sIL-1RI 的构建 :将 hsIL-1RI cDNA 片段用 *Eco*RI 和 *Hind*III 酶切后 ,与 pSGLgpp/*Eco*RI + *Hind*III 的 5.6kb 片段连接 ,转化至链霉菌得到重组质粒 pSGLgpp/sIL-1RI。Southern 杂交表明重组质粒 pSGLgpp/sIL-1RI 插入的 DNA 片段是 hsIL-1RI cDNA(图 4)。

2.2.2 重组表达载体 pSGLgpp/sIL-1RI 在链霉菌中的表达 :将重组菌株培养 72h ,取上清液进行 SDS-PAGE 电泳 ,转膜后进行受体配基结合实验。结果表明重组菌株 *S. lividans* [pSGLgpp/sIL-1RI] 72h 发酵液上清液显示了特异性的杂交带 ,该杂交带的分子量约为 66kDa 和 43kDa 说明表达产物都具有与配基结合的生物学活性(图 5)。

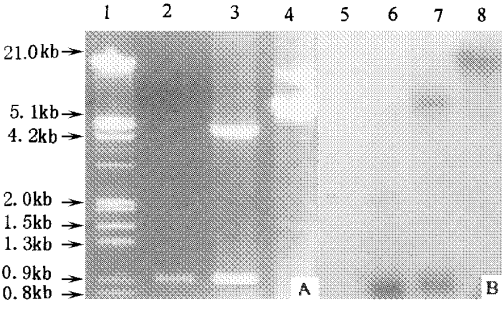


图 4 质粒 pSGLgpp/sIL-1RI 的 Southern 杂交分析
Fig.4 Southern blot analysis of the plasmid pSGLgpp/sIL-1RI
1 and 5 λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III (negative control);
2 and 6 PCR product of hsIL-1RI cDNA (positive control); 3 and 7 pSGLgpp/sIL-1RI/*Eco*RI + *Hind*III;
4 and 8 pSGLgpp/sIL-1RI/*Eco*RI.

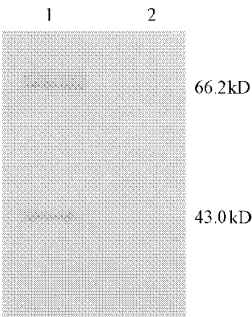


图 5 表达产物 HsIL-1RI 的受体配基结合分析
Fig.5 Binding assay of receptor-ligand for hsIL-1RI
expressed in the recombinant strains
1. The recombinant strain *S. lividans* [pSGLgpp/sIL-1RI];
2. The control strain *S. lividans* [pSGLgpp]

3 讨 论

链霉菌是一种丝状革兰氏阳性细菌。关于链霉菌的重组 DNA 技术在过去的十几年里发展迅速,已经建立了有效的转化系统。到目前为止根据不同的需要已经在链霉菌中构建了大量的质粒载体,例如用于外源基因表达的克隆载体如 pIJ702, pIJ680 等,启动子探针载体如 pIJ459 等。

质粒 pSGLgpp 为本论文自行构建的能在大肠杆菌和链霉菌中复制的穿梭载体。它含有 C1027 前蛋白的信号肽编码序列和它的启动子序列。在该序列后有可用于插入外源片段的 *Eco*RI、*Hind* III 位点。同时预留了分离外源片段的 MCS2 区的 *Kpn*I、*Sac*I、*Eco*RI 和 MCS3 区的 *Hind*III、*Sph*I 等位点。无论从大肠杆菌提取质粒 pSGLgpp 转化链霉菌,或链霉菌提取的质粒 pSGLgpp 转化大肠杆菌,都得到大小一致的质粒, pSGLgpp 在大肠杆菌和链霉菌中反复转代未见有 DNA 缺失的现象,其稳定性为利用该载体质粒,在链霉菌体系进行外源基因表达提供了有利的基础。

球孢链霉菌产生的 C1027 是一种烯二炔类的抗生素,它由一个发色团和一个起保护作用的蛋白质组成。文献报道 C1027 前蛋白在天然状态下合成时间较早,经 Northern blot 证实在 24h 时其 mRNA 含量最高^[6]。其编码蛋白质的 N 端 33 个氨基酸残基确定为其信号肽,其信号肽酶识别切割位点为 Ala Phe Ala ↓^[6]。本文使用的 gpp 序列含有上述 33 个氨基酸的信号肽及其调控序列。利用 gpp 调控表达 hsIL-1RI 获得了成功的分泌表达,表达产物分子量为 66kD 和 43kD,按照 hsIL-1RI 蛋白序列推断,该蛋白分子量应为 36.6kD,但是在不同系统中表达分子量有较大差异,如在昆虫中表达分子量为 42~44kD,在 HeLa 细胞中表达分子量为 64kD 和 54kD,本文表达重组蛋白与文献基本一致,造成分子量差异原因可能是糖基化程度不等所致。结果表明 gpp 是一种新的分泌能力较强的信号肽,在链霉菌的异源基因表达的研究中将发挥良好作用。

参 考 文 献

- [1] 李晓平 李 元. 中国抗生素杂志 ,1992 ,17(5) 326~332.
- [2] 洪 斌 李 元. 微生物学报 ,1998 ,38(4) 265~270.
- [3] 张 华 洪 斌 李 元. 微生物学报 ,1999 ,39(4) 58~62.
- [4] Hopwood D A , Bibb M J , Chater K F , *et al.* Genetic manipulation of streptomyces. A Laboratory manual. England : The John Innes Foundation , 1985.
- [5] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular cloning : A Laboratory Manual , 2nd edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory , 1989. 1. 38
- [6] Sakata N , Ikeno S , Hori M , *et al.* Biosci Biotech Biochem , 1992 ,56(10) :1592~1595.

THE CONSTRUCTION AND APPLICATION OF *STREPTOMYCES*- *E. COLI* SHUTTLE PLASMID pSGLgpp^{*}

Zhang Hua Li Yuan

(Institute of Medicinal biochnology , Peking Union Medical College ,
Chinese Academy of Medical Sciences , Beijing 100050)

Abstract : The high-copy-number plasmid pSGL1(7. 4kb) was isolated from *Streptomyces geobisporus* . Its minimal replicon had been determined and sequenced. With the total DNA of *S. geobisporus* as template , the DNA fragment involving C1027 apoprotein signal peptide encoding sequence (gpp) was amplified by PCR. After this fragment was inserted into the plasmid pSGLN , a derivative plasmid of pSGL1 , one new *Streptomyces-E. coli* shuttle plasmid was obtained namely as pSGLgpp. Using the new vector , we carried out the expression of hsIL-1RI in *streptomyces* .

Key words : Plasmid , Signal peptide , *Streptomyces*

* Project Granded by Chinese National Natural Science Fund(39670016)

重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要 ,扩大作者学术交流渠道 ,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网” 。如作者不同意将文章编入该数据库 ,请在来稿时声明 ,本刊将做适当处理。

《微生物学报》编辑部