

# 透明颤菌血红蛋白基因在金色链霉菌中的克隆与表达<sup>\*</sup>

孟春<sup>1,2</sup> 叶勤<sup>2</sup> 石贤爱<sup>1</sup> 邱荔<sup>1</sup> 宋思扬<sup>3</sup> 郭养浩<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup> 福州大学生物与食品科学系 福州 350002)

(<sup>2</sup> 华东理工大学生物反应器国家重点实验室 上海 200237)

(<sup>3</sup> 厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

**摘 要**: 分别用质粒 pJJ699 与 pUC19(*vhb*), pIJ702 与 pBR322(*vhb*) 构建大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒, 将透明颤菌血红蛋白基因转入金色链霉菌。在低溶解氧浓度下, 透明颤菌血红蛋白的表达, 可提高金色链霉菌的利用效率, 产物合成比原始菌株提高 40% ~ 60%。在局部低氧的环境中, 采用四环素抗性基因启动子带动血红蛋白基因表达, 可有效发挥透明颤菌血红蛋白的氧传递效率, 优于透明颤菌血红蛋白基因受溶解氧调控的天然启动子。

**关键词**: 透明颤菌血红蛋白基因, 金色链霉菌, 四环素抗性基因启动子, 天然启动子

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)03-0305-06

在贫氧环境中, 透明颤菌血红蛋白基因(*Vitreoscilla hemoglobin gene, vhb*) 的表达, 能促进微生物细胞胞内氧的传输, 提高氧的利用效率<sup>[1]</sup>。在限氧条件下, 透明颤菌血红蛋白(VHb) 对许多宿主细胞的生长都有明显的促进作用<sup>[2]</sup>。VHb 在大肠杆菌中表达, 在贫氧环境中对 *E. coli* 的生长最大促进量可达两倍以上, 并能促进工程菌(*E. coli*) 中青霉素酰化酶及 IFN 等产物的产量。VHb 在限氧条件下对哺乳动物细胞产物生成的促进作用也较明显, 能刺激中国仓鼠卵母细胞内促红细胞生成素的产量增加 40% ~ 100%<sup>[3]</sup>。更有意义的是, VHb 的表达对抗生素生产具有促进作用<sup>[4,5]</sup>, 在低氧环境下对放线菌紫素的促进作用可达 10 倍之多(与同样限氧条件下的参照相比), 限氧条件下对头孢菌素 C 的产量较参比菌株提高 5 倍之多。链霉菌发酵过程是一个高耗氧过程, 在链霉菌细胞内表达透明颤菌血红蛋白, 在溶氧受限的条件下, 对菌体生长和产物合成会产生积极的促进作用。本文在金色链霉菌中克隆透明颤菌血红蛋白基因, 分别利用透明颤菌血红蛋白基因的天然启动子和四环素抗性基因启动子(*P<sub>tet</sub>*) 表达透明颤菌血红蛋白基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与质粒

金色链霉菌菌株(*Streptomyces aureofaciens*) 为本教研室保存; *E. coli* JM109 购自华美公司; 质粒 pBR322、pUC19 购自华美公司; 质粒 pBR322(*vhb*): 中国科学院上海生物工程中心

<sup>\*</sup> 福建省科委资助项目(99-H-46)

<sup>\*\*</sup> 通讯联系人

作者简介: 孟春(1972-) 山东蒙阴县人, 福州大学侨兴轻工业学院讲师, 华东理工大学在职博士研究生, 主要从事生物化工及分子生物学方向的研究。

收稿日期: 2001-07-16, 修回日期: 2001-10-16

杨胜利院士馈赠 ;pIJ702、pIJ699 厦大学生物技术学院苏文金教授馈赠。

## 1.2 工具酶及试剂

实验所需限制性内切酶、T4DNA 连接酶、抗生素及试验所需试剂分别购自华美、Promega 公司和 Sigma 公司。

## 1.3 质粒构建及转化方法

大肠杆菌的质粒构建方法及转化方法参照文献 [6] 进行 ;链霉菌质粒提取及构建方法参照文献 [6, 7] ;金色链霉菌原生质体制备、转化及再生见文献 [7]。

## 1.4 培养基及培养方法

培养基 :LB 培养基<sup>[6]</sup>、YEME 培养基<sup>[7]</sup>、金色链霉菌再生培养基<sup>[7]</sup>。金色链霉菌发酵培养基组成 (g/L):可溶性淀粉 40,玉米浆 10,黄豆饼粉 20,蛋白胨 6,酵母粉 3, CaCO<sub>3</sub> 6, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, MgSO<sub>4</sub> 0.1, pH 调至 6.5。摇瓶培养条件 31℃, 摇床转速 280r/min, 培养 72h。

## 1.5 测定方法

透明颤菌血红蛋白测定采用 Western blotting 及 CO 差光谱法<sup>[8]</sup>。金霉素含量测定采用 HPLC 测定 (BACKMAN SYSTEM GOLD (R) HPLC, BACKMAN C18 反相柱, 流动相为乙腈及 9mmol/L 磷酸盐, 用 1mol/L NaOH 将 pH 调至 6.5, 流速为 1mL/min)<sup>[9]</sup>。

# 2 结果和讨论

## 2.1 含 *vhb* 基因的大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒的构建 (见图 1)

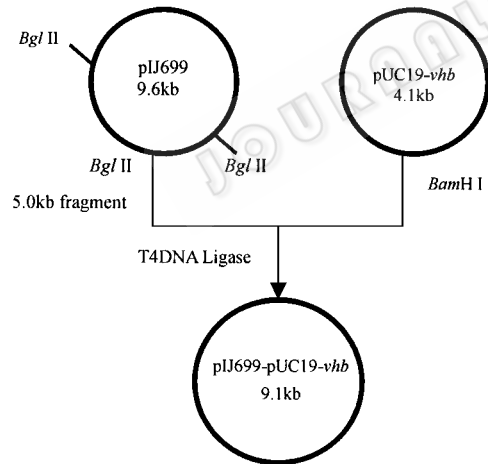


图 1 含 *vhb* 大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒的构建

Fig. 1 Construction of *E. coli*-*Streptomyces* shuttle plasmid with *vhb*

利用 pUC19 (*vhb*) 和 pIJ699 构建穿梭质粒 (图 1)。利用 *vhb* 的天然启动子, 研究 *vhb* 在金色链霉菌内进行表达。

对转化后得到的克隆子在低溶解氧条件培养后, Western blotting 及 CO 吸收检测表明, 在 420nm 处有一明显的吸收峰, 表明 *vhb* 在金色链霉菌内实现了表达 (图 2)。在 30mL 和 60mL 装量的摇瓶培养条件下, 对随机挑出的 50 株克隆子进行产物合成及溶解氧敏感度研究。

## 2.2 工程菌发酵特性的研究

表 1 表明, 在本实验条件下 (280r/min), 60mL 装量导致溶解氧偏低, 对金色链霉菌的生长代谢产生了负影响。原始菌株与 30mL 装量的条件相比, 金霉素产量下降了 50%, 此条件下溶氧水平成为金霉素合成的主要限制因素。经

过原生质体制备、外源基因转入等操作后, 部分金色链霉菌的产物合成量发生了变化。在所研究的 50 株克隆子中, 有 38% 的金色链霉菌菌株金霉素产量大幅度降低 (42% ~ 50%), 可能在操作过程中发生负突变。

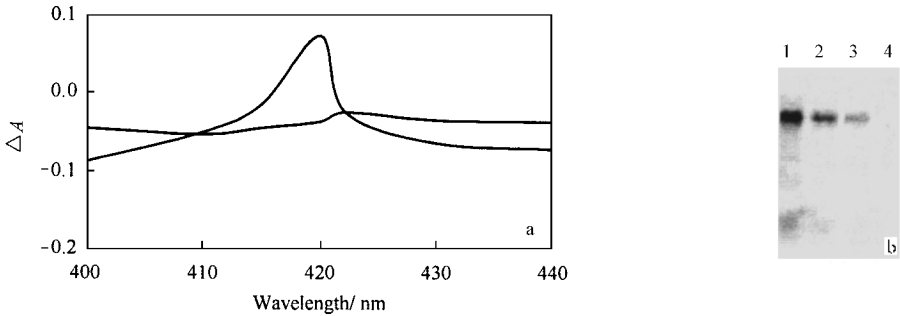


图2 金色链霉菌工程菌 Vhb 的 CO 差光谱 (a) 和 *S. aureofaciens* 细胞粗提物 Western blotting 分析 (b)

a :CO difference spectrum of Vhb expressed in *Streptomyces aureofaciens* ;

b :Western blotting analysis of crude cell extracts of *S. aureofaciens* ;

1. *E. coli* JM109 :vhb 2. *S. aureofaciens* pIJ699-pUC19-vh 3. *S. aureofaciens* pIJ702-vhb 4. *S. aureofaciens* ( vhb-free ).

根据溶解氧对菌株的影响,与原始菌株相比,克隆子可分为3种类型。第一类与原始菌株类似,产物合成对溶解氧较敏感,60mL的装量导致产物合成降低约50%;第二类与原始菌株相比,对氧的敏感度降低,在本实验条件下,溶解氧的下降对产物合成的负作用比原始菌株低,60mL装量下降20%左右;第三类克隆子的产物合成对氧的敏感程度同样比原始菌株低,60mL装量的产物合成量同原始菌株相比,高40%~60%。

对第一类工程菌在低溶氧条件下的Vhb表达进行了CO吸收检测,检测结果(未列出)表明,Vhb表达量极低,几乎检测不出。但此类菌仍有硫链丝菌素(tsr)抗性,这表明转入的外源基因可能发生了缺失或其他原因,从而导致vhb的表达受到影响。

Vhb在第二类工程菌成功表达,30mL装量与60mL装量的产物合成与原始菌株相比相差不大,但细胞的生产能力却比原始菌株降低。这表明对链霉菌细胞进行原生质体制备、转化和外源基因的转入等操作影响了其生长代谢特性。在链霉菌生长代谢及保存过程中,链霉菌基因组易产生缺失或扩增,影响其原有的生长代谢特性,产生新的遗传特征。在外源DNA转化过程中,原生质体制备及PEG的处理都可能导致链霉菌发生突变<sup>[10]</sup>,对其生长代谢特性带来影响。同时,转入的外源DNA的表达也可能影响细胞原有的生长代谢特性。因此,在本实验条件下,操作过程可能导致链霉菌发生突变,影响产物的合成。

第三类工程菌的产物合成能力在溶解氧较高的条件下与原始菌株相比,没有发生改变。但在低氧条件下,Vhb的表达,促进了氧的传输,有效地提高了氧的利用,对金霉素的合成起了积极的促进作用,工程菌的产物合成比原始菌株有显著提高。

Magnolo<sup>[5]</sup>报道用天然启动子在链霉菌内进行表达Vhb,在限氧条件下促进了菌体生长和产物合成。崔风文报道<sup>[11]</sup>,vhb天然启动子在链霉菌中不能表达,pIJ699-pUC19-vgb构成的穿梭质粒在链霉菌中表达Vhb,是因为vhb位于Plac启动子下游,由Plac启动子表达VHB,而非vhb天然启动子表达Vhb。

### 2.3 利用 *Ptet* 在金色链霉菌中表达 Vhb

质粒 pBR322 带有一个四环素抗性 (*ret<sup>r</sup>*) 基因,编码一 399 个氨基酸的膜结合蛋白,可阻止四环素进入细胞。在 *Hind* III 与 *Bam* HI 酶切位点之间,长 346bp 的基因片段为四环素抗性基因启动子<sup>[12]</sup>,将其替代 vhb 的天然启动子(从 *trp* 基因中切去 *Hind* III 与 *Afl* II 之间

片段) ,利用抗性基因启动子表达透明颤菌血红蛋白。利用质粒 pBR322( *vhb* )和质粒 pIJ702 构建大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒(图 3)。实验结果表明(图 2b,图 4) ,利用 *Ptet* 在金色链霉菌中可表达 VHb 蛋白。

表 1 工程菌与原始菌株的发酵特性比较

Table 1 Comparison of fermentation characteristics between engineering strain and control strain

No.	CTC yield( u/mL )		Classification	No.	CTC yield( u/mL )		Classification
	a	b			a	b	
Control	5100	2640		26	3200	2730	2
1	5080	3920	3	27	5200	3850	3
2	5210	2800	1	28	3200	2650	2
3	4920	2530	1	29	4500	2650	1
4	2800	2650	2	30	3120	2930	2
5	5260	4020	3	31	5320	4010	3
6	3120	2890	2	32	5000	2500	1
7	4980	2400	1	33	5200	3600	3
8	2980	2700	2	34	5300	3420	3
9	3210	2820	2	35	4200	3100	3
10	5100	3820	3	36	2300	1600	1
11	5230	4260	3	37	3200	1300	1
12	3900	3100	2	38	5250	3820	3
13	4500	2500	1	39	5230	2650	1
14	5300	3650	3	40	5120	3500	3
15	4100	3100	2	41	5060	4020	3
16	5310	2830	1	42	4800	2600	1
17	4500	3200	3	43	2900	1960	1
18	3500	2730	2	44	3800	2780	2
19	5000	2610	1	45	4980	3500	3
20	5400	3820	3	46	5240	3760	3
21	3900	2630	1	47	3120	2700	2
22	5100	3500	3	48	5620	4050	3
23	4990	3460	3	49	3250	2010	1
24	2600	2300	2	50	5320	2600	1
25	5300	2620	1				

a 30mL content in 250mL shake flasks ;b 60mL content in 250mL shake flasks .

在 250mL 摇瓶中 ,分别在 30mL 和 60mL 装量条件下 ,研究了 VHb 表达对金色链霉菌的影响。结果表明 ,在 30mL 装量的条件下 ,可保证氧的充分供给 ,工程菌株与原始菌株相比(分别为 5200u/mL ,5220u/mL) ,金霉素产量无明显差异。以四环素抗性基因启动子带动的 *vhb* 在高氧条件下仍有表达 ,不受溶解氧浓度调控。在本实验条件下的表达量对金霉素的产生未产生干扰。CO 吸收实验表明 ,天然启动子在此条件下 ,未见 *vhb* 的表达。

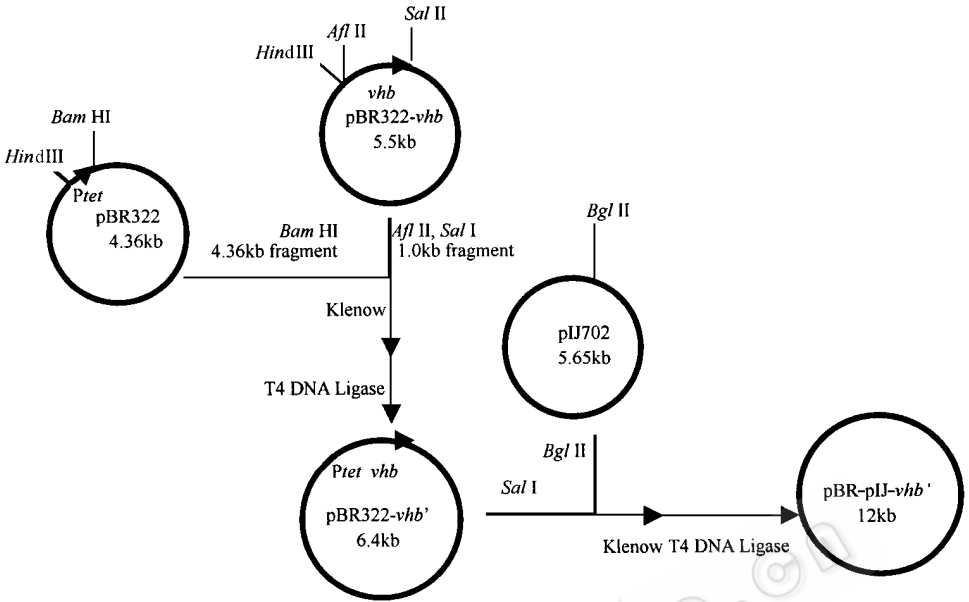


图 3 含 *Ptet* 穿梭质粒的构建

Fig.3 Construction of shuttle plasmid with *Ptet*

### 2.4 局部供氧不足条件下 *VHb* 表达对金霉素合成的影响

在实际发酵过程中,由于搅拌、通气或发酵罐结构等因素,可能造成局部供氧不足,通过 *vhb* 的表达,可降低由于局部供氧不足带来的影响。虽然在低氧条件下, *vhb* 天然启动子在金色链霉菌中可诱导透明颤菌血红蛋白表达,提高氧的传递效率。但由于低氧诱导至产物生成需一定的时间,而局部缺氧区内的菌体处于不断交替状态,因此仅通过低氧诱导 *vhb*,对于存在局部供氧不足的发酵过程提高供氧的效果可能不显著。本研究根据金色链霉菌在发酵过程产生一定量四环素的特点,利用四环素抗性基因启动子替换 *vhb* 的天然启动子,在发酵过程中 *vhb* 始终存在一定的表达,在低氧条件下可保证 *VHb* 较迅速地发挥氧传递作用。

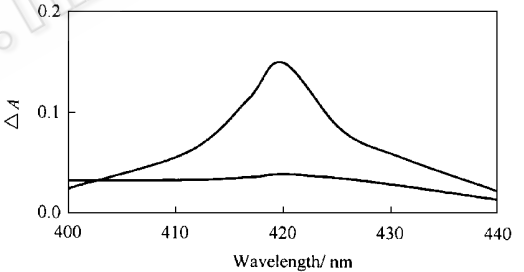


图 4 金色链霉菌中利用 *Ptet* 表达的 *VHb* 的 CO 差光谱

Fig.4 CO difference spectrum of *VHb* expressed by *Ptet* in *Streptomyces aureofaciens*

表 2 间歇停摇床转动对不同菌株产物合成的影响

Table 2 Effect of intermission of shaker rotation on biosynthesis of product

Strains	CTC production rate( u/mL·h )	
	Control	No shaking intermittently
Strain( control )	97.6	68.2
Engineering strain( with <i>Pvhb</i> )	96.8	76.5
Engineering strain( with <i>Ptet</i> )	98.0	83.3

在产物合成期(45h),在摇床条件下,采用中间停搅拌的方式(每 1h 将摇床停 5min),模拟发酵过程中局部溶氧不足的现象。实验结

果表明(表 2) ,在产物合成期 ,间歇停搅拌对金霉素的合成产生了一定的影响 ,原始菌株的金霉素合成速率降低了约 30%。1 号克隆子的金霉素合成速率降低了 21% ,而采用四环素抗性基因启动子表达 *vhb* 的 2 号克隆子 ,金霉素的合成速率仅降低 15%。表明 Vhb 对氧传递速率有明显的促进作用 ,同时 ,在菌体内维持一定含量(低水平)的 Vhb(采用组成型或其他类型诱导的启动子) ,对于在发酵过程中存在局部供氧不足的情况 ,具有更显著的作用。与天然启动子相比 ,可缩短由于 Vhb 重新合成所需的时间 ,更有效及时地发挥其促进氧传递的作用。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 于慧敏 ,沈忠耀 . 微生物学报 ,1999 ,39( 5 ) :478 ~ 482.
- [ 2 ] 吴 奕 ,杨胜利 . 生物工程学报 ,1996 ,12( 2 ) :177 ~ 182.
- [ 3 ] Girish J , James E B. *Biotech and Bioeng* ,1994 ,44 :1367 ~ 1370.
- [ 4 ] 文 莹 ,李季伦 . 微生物学报 ,2000 ,40( 1 ) :50 ~ 56.
- [ 5 ] Magnolo S K , Leenutaphong D L , Denodena J A , et al. *Biol Tecnology* ,1991 ,9 :473 ~ 476.
- [ 6 ] J. 萨姆布鲁克 ,E F 弗里奇 ,T 曼尼阿蒂斯著(金冬雁 ,黎孟枫 等译). 分子克隆实验指南 ,第二版 . 北京 :科学出版社 ,1998.
- [ 7 ] 霍普伍德著(邓子新 等译) 链霉菌遗传操作实验手册 . 长沙 :湖南科学技术出版社 ,1988.
- [ 8 ] 朱怡非 ,朱春宝 ,朱宝泉 . 中国医药工业杂志 ,1998 ,29( 6 ) :253 ~ 257.
- [ 9 ] Gontier E G , Asanza Teruel M L , Nava Saucedo J E , et al. *Biotechnol Tech* ,1996 ,10 :443 ~ 448.
- [ 10 ] 崔大鹏 ,石莲英 . 中国抗生素杂志 ,1999 ,24( 4 ) :265 ~ 268.
- [ 11 ] 崔风文 ,杨胜利 . 生物工程学报 ,1998 ,14( 1 ) :91 ~ 95.
- [ 12 ] 董可宁 ,还连栋 . 生物工程学报 ,1990 ,6( 3 ) :175 ~ 180.

## Cloning and Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin in *Streptomyces aureofaciens* \*

Meng Chun<sup>1,2</sup> Ye Qin<sup>2</sup> Shi Xian 'ai<sup>1</sup> Qiu Li<sup>1</sup> Song Siyang<sup>3</sup> Guo Yanghao<sup>1\* \*</sup>

( <sup>1</sup> Department of Food Science and Biotechnology , Fuzhou University , Fujian 350002 , China )

( <sup>2</sup> State Key Laboratory of Bioreactor , ECUST , Shanghai 2000237 , China )

( <sup>3</sup> College of Life Science , Xiamen University , Xiamen 361005 , China )

**Abstract :** *Vitreoscilla* hemoglobin Gene was cloned in *Streptomyces aureofaciens* through *E. coli*-*Streptomyces* shuttle plasmids constructed by both pIJ699-pUC19( *vhb* ) and pIJ702-pBR322( *vhb* ). Under low dissolved oxygen conditions , expression of hemoglobin enhanced CTC yield of engineering strain more about 40% ~ 60% that that of control by improving oxygen transmission in cells . Hemoglobin expression by Promoter of tetracycline resistance gene was more effective for oxygen transmission than that by its native promoter regulated by dissolved oxygen concentrations in environments of locally low concentrations of dissolved oxygen .

**Key words :** *Vitreoscilla* hemoglobin Gene , *Streptomyces aureofaciens* , Promoter of tetracycline resistance gene , Native promoter

\* TProject supported by Fujian Kewei ( 99-H-46 )

\*\* Correspondence author