

地中海拟无枝菌酸菌 U32 中生物素羧基载体蛋白 结构基因的克隆、表达及转录*

卢 捷 姚玉峰 姜卫红 焦瑞身**

(中国科学院上海生命科学研究院 植物生理生态研究所
微生物次生代谢分子调控开放实验室 上海 200032)

摘 要:乙酰辅酶 A 羧化酶(Acetyl CoA Carboxylase EC 6.4.1.2, ACC)催化依赖于 ATP 的乙酰辅酶 A 羧化形成丙二酸单酰辅酶 A,该反应是脂肪酸生物合成途径中的第一步,也是受到调控的关键一步。根据结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)和天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)中 ACC- α 亚基的氨基酸保守序列和地中海拟无枝菌酸菌 U32 对氨基酸密码子的使用偏好,设计简并引物以 U32 基因组 DNA 为模板扩增出一条约 250bp 的片段,并以此片段作探针成功地从 U32 基因组 cosmid 文库中克隆到相应的 ACC- α 亚基的编码基因 *accA*。该基因对应的 ORF 长 1797bp,编码一个 598 个氨基酸的蛋白,推算出的分子量是 63,714Da,基因 G+C mol% 含量为 70.1%,符合 U32 基因结构特征,距起始密码子 GTG 上游 6 个碱基处有链霉菌典型的 RBS 序列 AGGAGG,并有生物素羧化酶特征的 ATP 结合区。利用 pET28(b)系统构建表达载体,在 *E. coli* BL21(DE3)中实现了 *accA* 的诱导表达,产物大部分以可溶形式存在,并通过 Western Blot 证明该蛋白上确有共价结合的生物素。Northern Blot 分析了各种氮源对 *accA* 基因转录水平的不同影响。

关键词:地中海拟无枝菌酸菌,乙酰辅酶 A 羧化酶,生物素羧基载体蛋白,转录调节

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)01-0056-09

乙酰辅酶 A 羧化酶(EC 6.4.1.2)催化乙酰辅酶 A 羧化形成丙二酸单酰辅酶 A,该反应是脂肪酸合成途径的第一步,也是受到关键调控的一步。丙二酸单酰辅酶 A 不仅是生物体中脂肪酸合成的二碳单位供体,而且在许多产抗生素的放线菌中它还参与聚酮体的合成^[1]。

乙酰辅酶 A 羧化酶是一类以生物素为辅基,以碳酸氢根作羧基供体的羧化酶,同时需要 Mg^{2+} 和 ATP。ACC 催化的反应可分为 2 个独立的半反应^[2]。*E. coli* 的 ACC 是由三个部分组成的酶复合体,包括生物素羧化酶(Biotin Carboxylase,BC),生物素羧基载体蛋白(Biotin Carboxyl Carrier Protein,BCCP)和羧基转移酶(Carboxyl Transferase,CT)。由于脂肪酸是所有细胞膜脂的组成成分,在多细胞生物中还是重要的能量储备物,而 ACC 所催化的反应又是脂肪酸生物合成途径的第一步,因此对 ACC 的研究广受关注。在高等哺乳动物^[3]、高等植物^[4]及微生物^[5]中,ACC 的结构与功能均得到详尽而系统的研究。仅今年 1

* 国家自然科学基金重点项目资助(10039630010)

** 通讯作者,上海市枫林路 300 号,E-mail:wjiang@iris.sipp.ac.cn 或 jschiao@iris.sipp.ac.cn

作者简介:卢捷(1978-),女,河北邯郸人,99 级硕士。

收稿日期:2002-04-27,修回日期:2002-08-22

~4 月, *J Biol Chem* 上就连续发表了 8 篇有关 ACC 的文章。

地中海拟无枝菌酸菌 U32 是一株力复霉素 SV 的高产菌株, 我们实验室自八十年代以来就对 U32 产抗机制作了深入而系统的研究, 发现硝酸盐对 U32 力复霉素 SV 的生物合成有全局性影响: 当以硝酸盐作氮源时, 力复霉素产量显著提高。但与此同时, 也观察到另一个有趣的现象: KNO_3 还会影响菌体的脂肪含量, 当培养基中加入 0.8% KNO_3 时, 菌体的脂肪含量为 5.7%, 若不加 KNO_3 则高达 13.6%^[6]。

为了从分子水平理解硝酸盐影响菌体脂肪含量的原因, 我们克隆了 U32 中乙酰辅酶 A 羧化酶的一个亚基——生物素羧基载体蛋白的编码基因(*accA*), 通过序列分析发现该蛋白不仅有生物素结合位点, 同时还有在各种羧化酶中高度保守的序列。在 *E. coli* 中实现了对该蛋白的诱导表达, 用 Western Blot 进一步证实了该蛋白上确有共价结合的生物素。Northern Blot 分析了各种氮源对 *accA* 转录水平的影响。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

地中海拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*)U32(以下简称 U32)为力复霉素 SV 的产生菌, *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 、BL21(DE3)及质粒 pET28(b)、pBluescript II KS + 、pUC18 均为本实验室保存。U32 基因组 cosmid 文库由本实验室彭文涛博士构建。

1.2 培养基

E. coli 采用 LB 培养基^[7], 抗生素的使用浓度为氨苄青霉素(Amp)100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 卡那霉素(Kan)50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。U32 生长的本氏培养基组成(g/L): 葡萄糖 10, 牛肉膏 1, 蛋白胨 2, 酵母粉 1, 甘油 10, pH 调至 7.0。U32 生长的氮源调节培养基组成(g/L): 葡萄糖 40, K_2HPO_4 1, MgSO_4 1, NaCl 1, CaCO_3 5, 微量元素溶液 1mL, 微量元素溶液为: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, 过滤除菌; 氮源分别为各实验所需浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及 KNO_3 过滤除菌。

1.3 酶、试剂

TA 克隆载体 pMD18-T 及限制性内切酶均购自 Takara 公司; 探针标记采用 Promega 公司的 Prime-a-gene labeling system; 同位素 α - ^{32}P dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司; 普通 Taq 酶及高保真 *Pfu*-Taq 酶购自 Sangon 公司; 正电荷尼龙膜购自 Boehringer Mannheim 公司, 用于 Northern Blot 分析; Western Blot 使用的硝酸纤维素膜为 Amersham 公司的 Hybond-C Nitrocellulose (0.45 Micron); 与链霉素亲和素偶连的碱性磷酸酶(Streptavidin-AP)及其显色底物 NBT/BCIP 购自 Promega 公司; 其余生化试剂购自 Sigma、华美等公司。

1.4 DNA 操作

DNA 的酶切、电泳、连接、转化大肠杆菌、Southern Blot、杂交和洗膜均按文献[7]。

1.5 Northern Blot

U32 在本氏液体培养基或补加了不同氮源的氮源调节培养基中生长至对数后期, 收集菌体, 抽提 RNA^[8], 按照标准步骤^[7]进行 Northern Blot 分析。

1.6 引物合成与序列分析

由上海基康生物技术有限公司进行。

1.7 蛋白的诱导表达

在添加了抗生素的 LB 培养基中过夜培养单菌落,次日晨按 1% 接种量转种,待菌体生长至 OD_{600} 为 0.6 ~ 1.0 时,加入终浓度为 0.1mmol/L 的 IPTG 诱导,2h 后离心收集菌体。菌体或是直接用 $1 \times$ SDS-PAGE 上样缓冲液重悬,或是用 PBS^[7] 缓冲液重悬后超声波破碎细胞,细胞裂解液经 12 000r/min 室温离心 10min 后分为上清、沉淀两部分,再分别用 SDS-PAGE 上样缓冲液重悬,沸水浴中煮沸 10min 变性样品。

1.8 Western Blot

将蛋白样品以 10% SDS-PAGE 分离后电转移至硝酸纤维素膜上,用碱性磷酸酶(AP)的底物 NBT/BCIP 显色分析。具体操作按照 Promega Streptavidin-AP 产品说明书。

2 结果

2.1 U32 中生物素羧基载体蛋白结构基因的克隆

由本室克隆的一些基因的序列分析表明,不论是在初级代谢还是次级代谢途径中,U32 的基因都与结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)和天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)的基因有着很高的同源性。因此根据这两种放线菌中 ACC 含生物素亚基 ACC-A 或 ACC- α (*M. tuberculosis*: NP-000962.1; *S. coelicolor*: AL512667.2)的氨基酸序列同源比较的结果,找到 2 个同源区段 KVLV(I)AN 和 YGFLA(S)E,并考虑到 U32 对氨基酸密码子的使用频率及第 3 位对 GC 的偏好,设计一对简并 PCR 引物,并在 5' 端加入酶切位点及一个保护碱基:

上游 primer A 5'—CAAGCTTCCGGT(G/C)CT(G/C)GT(G/C)G(G/C)AA—3'

Hind III

下游 primer B 5'—CTCTAGAT(G/C)G(G/C)AGGAAGCCGTA—3'

Xba I

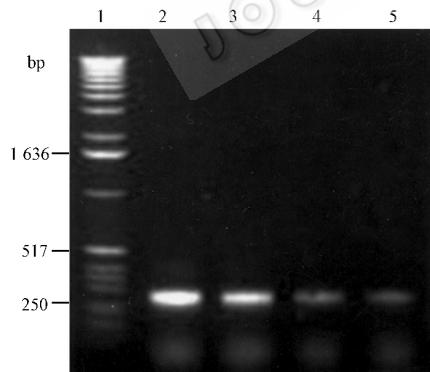


图 1 用简并引物 A、B 扩增得到的 DNA 片段电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of PCR products amplified with a pair of degenerate primers A and B.

1. Gibco 1kb DNA ladder; 2, 3, 4, 5. PCR products of ACC250 with Mg^{2+} concentration of 1, 2, 3, 4mmol/L, respectively.

用 primer A 和 B 以 U32 基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 条件为 94℃ 变性 3min,随后进行如下循环:94℃ 变性 1min,51℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min,共 30 个循环。PCR 得到约 250bp 的单一产物(见图 1),与设计引物时预期的产物大小相吻合。将此 PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体中,测序后发现该 250bp 的片段翻译出的氨基酸序列与结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)酰基辅酶 A 羧化酶的 α 链及天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)的酰基辅酶 A 羧化酶 A 亚基同源性高达 70% 以上,并在其两端找到 primer A、B,说明此 PCR 产物很可能就是我们希望得到的 U32 中 ACC 编码基因的一部分。

用这 250bp 的 DNA 片段(以下简称 ACC250)作探针,采用斑点杂交法筛选 U32 基因组 cosmid 文库(约 5200 个克隆),得到 4 个阳性克隆,分别命名为 17-76、19-D-6、49-E-1 和 51-B-10,选取其

中的 17-76 作进一步的分析。17-76 中外源片段约 25kb, Southern Blot 证明此外源片段确实来自于 U32(结果未列出)。

用各种限制性内切酶对阳性克隆 17-76 酶切、电泳、Southern 转移,与 ACC250 探针杂交,通过对杂交片段大小的计算与分析,初步排出了 17-76 中外源片段的酶切图谱(见图 2)。按照这一酶谱以 pBluescript II KS 为载体,构建一系列的亚克隆质粒,测序后拼接得到完整的 U32 生物素羧基载体蛋白结构基因 *accA* 的全序列(见图 3)。

生物素羧基载体蛋白结构基因(以下简称 *accA*)有一个全长为 1797bp 的开放读码框,起始密码子为 GTG,终止密码子为 TAG,共编码 598 个氨基酸,推算出的分子量为 63,714Da。在起始密码子前方存在一个典型的链霉菌基因的核糖体结合位点(RBS)AGGAGG,整个基因的 G+C mol% 为 70.1%,密码子第三位碱基 G+C 含量为 91.7%,符合 U32 基因编码区的结构特点(Genbank Accession No. AF486580)。

2.2 序列同源性分析

U32 *accA* 基因翻译出的蛋白与 SwissProt Data Bank 中已知序列的蛋白进行同源性分析,发现从蛋白全序列上来看,我们的蛋白与结核分枝杆菌乙酰辅酶 A 羧化酶 α 链有 71% 相同性(80% 相似性);与麻风分枝杆菌中的这一蛋白有 70% 的相同性(79% 相似性);与天蓝色链霉菌的酰基辅酶 A 羧化酶 A 亚基有 66% 相同性(75% 相似性)。

各种生物素羧化酶在蛋白水平上有 2 处特别保守,其一位于蛋白的羧基端,共价结合生物素的 Lys 残基周围的四肽 Ala-Met-Lys-Met 高度保守,在 U32 的 *AccA* 中也发现了这段序列。在许多依赖于生物素的羧化酶中,结合生物素的 Lys 一般距蛋白的羧基端 35 个氨基酸残基,研究用的菌中这一长度也为 35。在这个四肽序列的周围有一系列高度保守的 Gly 残基,Browner 认为这些 Gly 残基可能参与酶的构象变化^[9]。用谢氏丙酸杆菌(*P. shermanii*)BCCP 蛋白作的研究发现邻近 C 端处的疏水性氨基酸,如 Ile,对生物素正确结合到 Lys 残基上非常重要。在 U32 中这些特点均已发现(见图 4B)。

依赖于生物素的羧化酶另一个高度同源的区段见于蛋白的 N 端,有高含量的 Gly,这样一连串的 Gly 在酵母的丙酮酸羧化酶^[10]和鸡肝的乙酰辅酶 A 羧化酶^[11]都有找到,这些 Gly 被认为与 ATP 和碳酸氢根的结合有关(见图 4A)。事实上,*AccA* 蛋白中 Gly 含量高达 10.85%,仅次于 Ala(12.02%)。

2.3 *AccA* 蛋白在 *E. coli* 中的诱导表达和 Western Blot 分析

在 *accA* 基因起始密码子上游 30bp 处设计引物 C,并在其 5' 端加上酶切位点 *Nde* I 在终止密码子下游约 30bp 处设计引物 D,并在 5' 端加上酶切位点 *Eco*R I(引物 C、D 位置见图 3)。

primer C: 5' - CATATGAATGCAGCTGTCCGACC - 3'

Nde I

primer D: 5' - GAATTCGGCGCAGCACTCTGTA - 3'

*Eco*R I

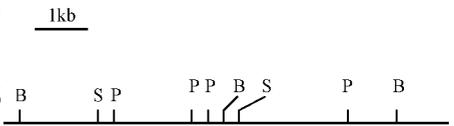


图 2 *cosmid* 17-76 中外源片段的限制性内切酶图谱

Fig.2 The restriction enzyme map of the insert fragment in *cosmid* 17-76
B: *Bam*HI; S: *Sal*I; P: *Pst*I.

1	TTCACCTCTCACTCAAGAGACTCCGACGTCATATCCGTAGACTTCCCTGATGCCGCGTGGCGGTCAGCAATCGACGCTG	80
	primer C	
81	TCGGACGCAAGGAGTGGGGGTGCGCGAGCAGGTGGCGAAACACCGGGTGGTCCGGTGACCAAGATCTGGTTCGCCAAC	160
	RBS V A E Q V G E T T G G P V T K I L V A N	
161	CGTGGCGAATCGCGGTACGCGTCAAGAGCCGGAAGGACGCTGGCCGTGACAGTGTCCGCGGTACCGCCGACCCGGG	240
	primer A	
241	RDAPHVRLADEEAFALGGTTAAESYLN	320
	TCCGACGCGCCACACGTCGGGTGGCCGACGAAGCCTTCCGCTGGCGGACGACGGCGGCCGAAAGCTACCTGAACT	
321	FDKLLDAAKRS GADSVHPGYGFLSENA	400
	TGCACAAGCTCCTGGACGCCGCAAGCGCTCGGGCCGCGACTCGGTGCACCCGGGTACCGCTTCTCTCCGAGAATGCG	
401	DFAQAVALVDAGLTLWIGPSPQAIRDLGDK	480
	GACTTCGCCCAAGCGTCTCGACGCGGGGTGACCTGGATCGGGCCGAGCCCGCAGGCCATCCGCGACCTCGGGGACAA	
481	VTARHIAMRAGAPLVPGTKEPVKDA	560
	GGTACCGCCCGCCACATCGCCATGCGCGCGGGCGCCGCTGGTCCGCGGACCAAGGAGCCGCTCAAGGACGCTCCG	
561	EIVAFADEHGLPVAIKTAFGGGGRGLK	640
	AAATCGTCCGGTTCGCGACGAGCACGGGCTGCCGCTGCCATCAAGACCGGTCGCGGGTGGTGGCCGCGCCCTCAAG	
641	VARTREEIPELFESEATREAVAAFGRGE	720
	GTCCGCGCACCCGCGAAGAGATCCCGAGCTGTTGAGTCGGCCACGCGGAGCGGTCGCCGCTTCGGCCGCGGGA	
721	CFVEREYRLDKPRHVKAQVLADMDHGTAI	800
	GTGCTTCGTCCGAGCGCTACCTGGACAAGCCCGCCACGTCGAAGCGGAGTGTCCGCGGACACGCGCACCCGCGCTCG	
801	VVGTRDCLSRLQRHRHQKLVEEAPAPFLND	880
	TGTCGCGCACCCGCGACTGCTCGCTGACGCGACCGCACAGAGCTCGTGAAGAGCGCCCGCCGCGTCTCTGAAGGAC	
881	EQRKRRIHESAKAICKKEAGYYGAGTV EY	960
	GAGCAGCGCAAGCGCATCCACGAGTCGCGAAGGGGATCTGCAAGGAGCCGGCTACTACGGCCGCGGACCGTCCGATG	
961	LVATDGTISFLEVENTRLQVEHPVSE	1040
	CCTCGTCCGACCCGAGCGCATCTCTCTCGAGGTCAACCGCGGTCGAGGTGAGACACCCGCTGTCGGAAGAGA	
1041	T T G L D L V R E M F R I A R G E K L R I T E D P E P	1120
	CGACCGGTCTCGACTCGTCCGGAGATGTTCCGGATCGCCCGTGGCGAGAAGTCCGGATCACCGAGGATCCCGAGCCG	
1121	R G H S I E F R I N G E D A G R G F L P A P G T V T K	1200
	CCCGCGCCTCGATCGAGTTCGCGATCAACCGCGAGGACCGCGCCGCGGCTCTCTGCCCGCGCCGGCACCGTGGCGAA	
1201	T F V A P S G P P G V R V D S G V E S G S V I G G Q F T	1280
	GTTCTGCGCGAGCGCGCCGGCGTGGCGTGCAGTCCCGGTCGAATCCGGGACGCTCATCGGGGCGGTCGACT	
1281	S M L A K L I V T G S D R N N A L E R S R R A L A E M	1360
	CGATGCTGGCCAAAGCTGATCGTACCAGGTCGAGCCGGAACAACGCCCTCGAAGCGACCGCGCGCCCTGGCCGAGATG	
1361	V V E G M A T V L P F D R V I V D D P A F I G D E N G	1440
	GTCTGCAAGGATGGCCAGGTCGCTGCCGTTGACCCGCGTATCGTGCAGCACCCGGGTTTCATCGGCGACGAGAACGG	
1441	F S V H T R W I E T E F D N K I E P F V A P D I E A	1520
	CTTCAGCGTGACACGCGCTGGATCGAGACGGAGTTCGACAACAAGATCGAGCCGTTCTGGCCCGCGACATCGAGGCCA	
1521	T E E E P R Q N V V V E V G G R R L E V S L P G G F A	1600
	CCGAGGAAGACCCGCGCAGAAGCTCGTGGTCCGAGGTCCGCGCGCGCGGCTCGAGGTGTCCGTCGCGCGGCTCGCG	
1601	L E G G G G R G G V T V K R S P A S A P R H Q G R G	1680
	CTCGAAGGTGGCGCGGTCGCGGTGGCGGGTCACTGTCAGCGAAGCCCGCAAGCGCGCCGCGGACCAAGGCGCGG	
1681	E R R A V T A P M Q G T I V K V A V E E G Q T V E A	1760
	TGAGCGCGAGCCGTCACCGCGCGATGCAGGGCACGATCGTGAAGGTGGCGGTGCAAGAGGGCCAGACGCTGGAAAGCCG	
1761	G E L I V V L E A M K K M E N P V T A H K A G T V T G L	1840
	GTGAGCTGATCGTCTCGAGGCGATGAAGTGGAAACCCGCTCACCGCACCAAGCGCGGACCGTCCCGGGGCTT	
1841	S V E V A A A V T Q G T Q L L E I K *	1920
	TCCGTCGAGGTCCGCGCCCGCTGACGCAAGGCGACGAGCTTCTCGAGATCAAGTACGCGAGTTCCTACAGAGTTCGCT	
1921	GCGCCCTGGGGCGCCCTACCATCGACACCGTGACCGAAGTCCCGTCTCCGACGTCGGGATCAGCGACCAAGAACCGCGAG	2000
	primer D	
2001	TCCGCGTGTCCGCGCTCGGTGAGCACATGAGAATTCATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGCGCGTTT	2080
2081	ACCCAGCTG 2089	

图3 U32 生物素羧基载体蛋白编码基因(*accA*)的核苷酸全序列及其对应的蛋白序列

Fig.3 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the U32 biotinylated protein gene *accA*

The putative ribosome binding site (RBS) and the tetrapeptide containing the lysine site for the biotinylation are indicated. Two pairs of primers mentioned in the paper are also delineated.

A.	
M. tuber	152DEVVAFAEYGLPIAIIKAAHGGGGKGMKVARTIDEIPELYESAVREA198
U32	153SEIVAFADHGLPVAIKTAFGGGGRLKVARTREEIPELFESATREA199
yeast- <i>pyc</i>	162EEALDFVNEYGYPVIIKAAFGGGGGRMVRVREGDDVADAFQRATSEA208
	. * : * . : * * * : ** : * . ***** : * : * . * : : . . : : * . **
B.	
M. tuber	537PMQGTIVKFAVEEGQEVVAGDLVVVLEAMKMPVTAHKDGTITGL
U32	535PMQGTIVKVAVEEGQTVEAGELIVVLEAMKMPVTAHKAGTITGL
yeast- <i>pyc</i>	1106PMAGVIVEVKVHKGSLIKKGGPVAVLSAMKMEMIISPSDGVQVKEV
	** * . : * . * . : * . : * : . : ** . ***** : : . . * : . :
M. tuber	AVEAGAAITQGTVLAEIK600
U32	SVEVAAA VTQGTQLLEIK598
Yeast- <i>pyc</i>	FVSDGENVDSSDLLVLE1169
	* . . : . . * : :

图 4 三种来源的含生物素的蛋白同源性分析

Fig. 4 CLUSTAL alignment of the deduced amino acid sequences of the U32 and *M. tuberculosis* biotinylated proteins(*AccA*) with pyruvate carboxylase from *S. cerevisiae*

(A) CLUSTAL alignment of putative ATP-bicarbonate interaction sites of U32(amino acids 153 - 199) and *M. tuberculosis AccA* protein(amino acids 152 - 198) with *S. cerevisiae* pyruvate carboxylase(amino acids 162 - 208); (B) CLUSTAL alignment of the C termini of the U32(amino acids 535 - 598) and *M. tuberculosis AccA* protein(amino acids 537 - 600) with *S. cerevisiae* pyruvate carboxylase(amino acids 1106 - 1169). The gene accession numbers of *M. tuberculosis AccA* , U32 *AccA* and *S. cerevisiae* pyruvate carboxylase are NC - 000962.1 , AF486580.1 and J03889.1 , respectively.

用表达引物 C、D 对 U32 基因组 DNA 进行高保真 PCR 扩增(*Pfu-Taq*), PCR 条件为 94℃ 变性 3min 随后进行如下循环 94℃ 变性 1min 56℃ 退火 1min 72℃ 延伸 2min 共 30 个循环 得到特异性较好的约 2kb 的单一一条带 与 *accA* 基因长度相符。该 2kb 片段与 pBlue-Script II KS/*EcoR* V 相连 构建质粒 pKS-ACC 酶切鉴定正确后测序 证实确为 *accA* 基因。用 *Nde* I 和 *EcoR* I 共同处理 pKS-ACC 回收约 2kb 的外源片断 与 pET-28(b)用 *Nde* I + *EcoR* I 酶切后的载体相连 可将 *accA* 基因克隆到 pET-28(b)的大肠杆菌 T7 启动子下游 质粒命名为 pET-ACC 经鉴定正确后转化 *E. coli* BL21(DE3) 结果未列出。

含重组质粒的菌经 IPTG 诱导 2h 后 表达产物以 10% SDS-PAGE 电泳分离(平行上样 2 块) 其中一块用考马氏亮兰染色 另一块转膜后与 Streptavidin-AP 温育 对 AP 的底物 NBT/BCIP 显色后检测蛋白上是否有共价结合的生物素(图 5)。由图 6A 可以看出在约 66kD 处有诱导表达的目的蛋白条带 分子量大小与我们所预期的相同 主要的诱导产物见于上清 说明该蛋白以可溶形式存在 在未诱导的泳道(Lane 4)也可看见这一条带 应该这是由于 *AccA* 的组成型表达引起的。应用与链霉亲和素偶联的碱性磷酸酶系统 通过与其底物 NBT/BCIP 显色后就可特异性检出有共价结合生物素的蛋白 由图 6B 可见约 66kD 处确有生物素化蛋白 而已知 *E. coli* 中只有一个生物素化的蛋白 即其 BCCP 大小为 17kD(位于硝酸纤维素膜的下沿) 因此在 66kD 处的条带应为诱导表达的目的蛋白 用作蛋白诱导表达的宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 无论携带何种质粒 *E. coli* 内源的 BCCP 在 BL21(DE3) 中总是存在的 因此在 1 - 6 泳道最下沿均可见到这个 BCCP 的检出带 而 *E.*

coli 的 BCCP 以可溶形式存在的,故在第 7 道(菌体超声波破碎后的沉淀部分)看不到。

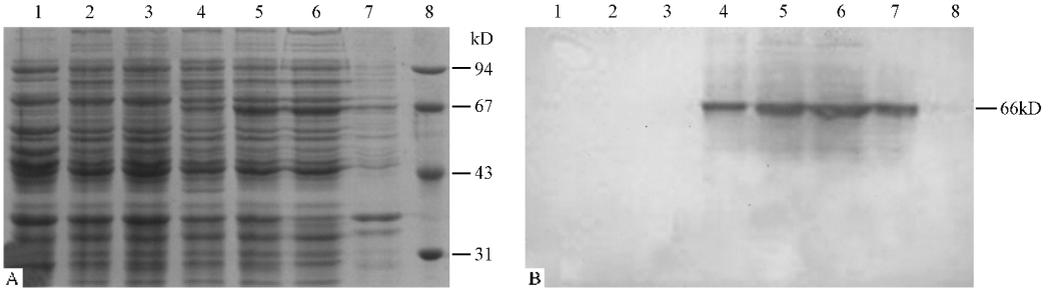


图 5 U32 生物素羧基载体蛋白(AccA)经诱导表达后的凝胶电泳图及 Western Blot 分析

Fig. 5 A, B SDS-PAGE and Western blot analysis of induced biotinylated protein(AccA) of U32

A. Proteins were fractionated by 10% SDS-PAGE and stained with Commassie bright blue R-250

B. After electrophoresis and Western blotting, biotinylated polypeptides were detected as described in materials and methods.

Lane 1 : BL21(DE3) induced by IPTG for 2h ; 2 : BL21(DE3)pET28(b), not induced ; 3 : BL21(DE3)pET28(b) induced by IPTG for 2h ; 4 : BL21(DE3)pET-ACC, not induced ; 5 , 6 and 7 : BL21(DE3)pET-ACC induced by IPTG for 2h ; 5 : whole cell lysate ; 6 : supernate ; 7 : pellet ; 8 : molecular mass standards.

2.4 accA 的 Northern Blot 分析结果

U32 在添加了 4 种不同氮源(0.2%(NH₄)₂SO₄ , 0.4%(NH₄)₂SO₄ , 0.8%(NH₄)₂SO₄ 及 0.8% KNO₃)的氮源调节培养基和本氏液体培养基中生长至对数后期,抽提 RNA,以 accA 全基因为探针进行 Northern Blot 分析 结果见图 6。

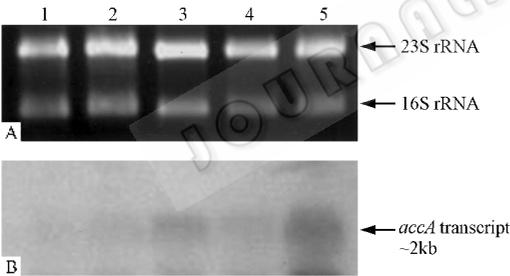


图 6 U32 中 accA 基因转录产物的 Northern 分析

Fig. 6 Northern Blot analysis of U32 accA transcript

Lane 1 : 0.2%(NH₄)₂SO₄ ; 2 : 0.4%(NH₄)₂SO₄ ; 3 : 0.8%(NH₄)₂SO₄ ; 4 : 0.8% KNO₃ ; 5 : Bennet medium. 5μg RNA was loaded into each lane to serve as control(A) ; 50μg RNA was then loaded into each lane to perform the Northern Blot(B).

由 Northern Blot 结果可见在不同氮源中 accA 的转录水平相差较大 :U32 生长在营养丰富的本氏液体培养基里时 accA 转录量最高 氮源调节培养基中添加的(NH₄)₂SO₄ 浓度逐渐升高时 ,accA 基因的转录水平也相应提高,当以 0.8% KNO₃ 作氮源时 ,U32 accA 转录量较低(明显低于以 0.8%(NH₄)₂SO₄ 作氮源时)。这一结果或许可以为焦瑞身等^[6]观察到的 KNO₃ 影响菌体脂肪含量的现象提供一个合理的解释 :KNO₃ 通过降低 U32 中 accA 的转录水平使乙酰辅酶 A 羧化酶的表达量下降,导致脂肪酸合成途径受到抑制,菌体的脂肪含量降低。

3 讨论

乙酰辅酶 A 羧化酶在各种生物中都已发现,它催化脂肪酸代谢的第一步,在其结构上一般可找到 3 个功能域,分别是生物素羧化酶(BC)、生物素羧基载体蛋白(BCCP)和羧基转移酶(CT)。BC 和 CT 各催化 2 个独立的半反应, BCCP 则作为活化羧基的供体,在 BC 和 CT 之间摆动以传递羧基。各种生物 ACC 的组织形式有所不同,一般分为 3 类^[12]: 第一

类的典型代表是 *E. coli*, *E. coli* 的 ACC 由 BC(*accC* 编码)、BCCP(*accB*)、CT(*accA*, *accD*) 3 部分组成,其中 *accB* 和 *accC* 组成一个操纵子共转录,但 *accA*、*accD* 和 *accBC* 三者染色体上均不连锁。第二类是分枝杆菌的 ACC,由 2 个蛋白组成,较大的一个约 60kD,有生物素结合位点并兼具生物素羧化酶活性,一般命名为 *AccA*,较小的一个有羧基转移酶活性,除了可识别乙酰辅酶 A 外,对丙酰辅酶 A 也有部分活力,命名为 *AccB*,编码这 2 个亚单位的基因在分枝杆菌的染色体上并不连锁。第三类是真核生物的 ACC,是由单一基因编码的多肽链,BC、BCCP、CT 三个功能域均排列在这一条多肽链上。

U32 和分枝杆菌的分类地位比较接近,本实验室已克隆的 U32 中有关碳代谢、氮代谢的基因很多都和分枝杆菌中相应的基因有较高的同源性。从研究结果看来也是这样:Western Blot 显示克隆得到的 *AccA* 蛋白上确有生物素结合位点,并在其 N 端找到生物素羧化酶中保守的 ATP 和碳酸氢根的结合位点,提示这一蛋白可能兼具生物素羧化酶和生物素羧基载体蛋白两重功能。在 U32 *accA* 基因的上游和下游各测序约 1kb,未发现与 GenBank 中羧基转移酶(CT)编码基因同源的序列,说明和分枝杆菌一样,编码 CT 亚基的基因在 U32 染色体上的其他地方。

关于 ACC 的 CT 亚基所知甚少。已知原核生物 ACC 的 CT 亚基和真核生物丙酰辅酶 A 羧化酶有较高的序列相似性,2000 年 Kimura 等在黄色粘球菌(*Myxococcus xanthus*)克隆了其 *Acc* 的羧基转移酶编码基因^[13]。利用这 2 个信息来设计简并引物从 U32 中找到编码 ACC CT 亚基的基因(记作 *accB*)然后再利用 Northern Blot 技术分析硝酸盐对 *accB* 的转录调控机制,这将是今后的工作重点。

参 考 文 献

- [1] Shen B, Hutchinson C R. Enzymatic synthesis of a bacterial polyketide from acetyl and malonyl coenzyme A. *Science*, 1993, **262**(5139):1535 ~ 40.
- [2] Guchhait R B, Polakis S E, Dimroth P, *et al.* Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli*, Purification and properties of the biotin carboxylase, carboxyltransferase, and carboxyl carrier protein components. *J Biol Chem*, 1974, **249**(20):6633 ~ 45.
- [3] Abu-Elheiga L, Brinkley W R, Zhong L, *et al.* The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **97**(4):1444 ~ 1449.
- [4] Harwood J L. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, **1301**:7 ~ 54.
- [5] Blanchard C Z, Waldrop G L. Overexpression and kinetic characterization of the carboxyltransferase component of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*, 1998, **273**(30):19140 ~ 19145.
- [6] 焦瑞身, 陈隼美, 吴梦淦, 等. 地中海诺卡氏菌合成力复霉素代谢调节的研究. *植物生理学报*, 1979, **5**(4):395 ~ 402.
- [7] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Yao Y F, Zhang W W, Jiao R S, *et al.* Efficient isolation of total RNA from antibiotic-producing bacterium *Amycolatopsis mediterranei*. *J Microbiol methods*, 2002, **51**(2):191 ~ 195.
- [9] Browner M F, Taroni F, Sztul E, *et al.* Sequence analysis, biogenesis, and mitochondrial import of the alpha-subunit of rat liver propionyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*, 1989, **264**(21):12680 ~ 12685.
- [10] Lim F, Morris C P, Occhiodoro F, *et al.* Sequence and domain structure of yeast pyruvate carboxylase. *J Biol Chem*, 1988, **263**:11493 ~ 11497.

- [11] Takai T , Yokoyama C , Wada K , *et al.* Primary structure of chicken liver acetyl-CoA carboxylase deduced from cDNA sequence. *J Biol Chem* , 1988 , **263** : 2651 ~ 2657 .
- [12] Toh H , Kondo H , Tanabe T. Molecular evolution of biotin-dependent carboxylases. *Eur J Biochem* , 1993 , **215** (3) : 687 ~ 696 .
- [13] Kimura Y , Miyake R , Tokumasu Y , *et al.* Molecular cloning and characterization of two genes for the biotin carboxylase and carboxyltransferase subunits of acetyl coenzyme A carboxylase in *Mycococcus xanthus* . *J Bacteriol* , 2000 , **182** (19) : 5462 ~ 5469 .

Cloning , Expression and Transcriptional Analysis of Biotin Carboxyl Carrier Protein Gene (*accA*) from *Amycolatopsis mediterranei* U32 *

Lu Jie Yao Yufeng Jiang Weihong Jiao Ruishen **

(Laboratory of Molecular Regulation for Microbial Secondary Metabolism , Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology , Shanghai Institutes for Biological Sciences , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200032 , China)

Abstract : Acetyl CoA carboxylase (EC 6.4.1.2 , ACC) catalyzes the ATP-dependent carboxylation of acetyl CoA to yield malonyl CoA , which is the first committed step in fatty acid synthesis. A pair of degenerate PCR primers were designed according to the conserved amino acid sequence of AccA from *M. tuberculosis* and *S. coelicolor* . The product of the PCR amplification , a DNA fragment of 250bp was used as a probe for screening the U32 genomic cosmid library and its gene , *accA* , coding the biotinylated protein subunit of acetyl CoA carboxylase , was successfully cloned from U32. The *accA* ORF encodes a 598-amino-acid protein with the calculated molecular mass of 63.7kD , with 70.1% of G + C content. A typical Streptomyces RBS sequence , AGGAGG , was found at the - 6 position upstream of the start codon GTG. Analysis of the deduced amino acid sequence showed the presence of biotin-binding site and putative ATP-bicarbonate interaction region , which suggested the U32 AccA may act as a biotin carboxylase as well as a biotin carrier protein. Gene *accA* was then cloned into the pET28(b) vector and expressed solubly in *E. coli* BL21(DE3) by 0.1mmol/L IPTG induction. Western blot confirmed the covalent binding of biotin with AccA. Northern blot analyzed transcriptional regulation of *accA* by 5 different nitrogen sources.

Key words : *Amycolatopsis mediterranei* , acetyl-CoA carboxylase , biotin carboxyl carrier protein , transcriptional regulation

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。另外,从2002年开始,凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据—数字化期刊群”,有不同意见者,请事先声明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

《微生物学报》编辑部