

nisZ 启动子结构与功能的研究*

杨 巍¹ 陈秀珠¹ 袁 静^{1**} 还连栋^{1 2***}

(中国科学院微生物研究所¹ 分子微生物学研究中心和² 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

摘 要 应用 β -Glucuronidase 基因(*gusA*)作为报告基因,通过定点突变方法分别缺失 *nisZ* 编码区上游两个启动子结构(promoter1 和 promoter2)中的一个,发现只有靠近编码区的 promoter2 是 *nisZ* 启动子诱导表达所必需。将 promoter2 中-10 区及其上游的一个碱基突变为乳酸菌中典型的组成型启动子的-10 区结构,该改变使 *nisZ* 启动子诱导功能下降。将 promoter2 的-10 区和-35 区的间隔区由 20 个碱基缺失突变为 17 个碱基,则 *nisZ* 启动子失去诱导功能。据此认为该间隔区的结构与 *nisZ* 启动子的诱导表达密切相关。

关键词: *nisZ* 启动子, 功能, *gusA*

中图分类号: Q754 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)02-0194-06

乳链菌肽(nisin)是由某些乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)产生的一种小肽。它对许多革兰氏阳性菌,包括对严重危害食品的腐败菌有强烈抑制作用,对人体安全无毒,是人们广泛应用的一种天然食品防腐剂^[1]。NisinZ 的生物合成涉及 11 个基因 *nisZBTCIPRKFE*, 在其生物合成基因簇中有 3 个启动子,其中 *nisZ* 启动子和 *nisF* 启动子可被 *nisin* 诱导^[2]。1995 年, Kuipers 等^[3]提出了一个 *nisin* 生物合成自我调节模型。首先,起传感蛋白作用的 NisK(组氨酸激酶)识别 *nisin*, 然后 NisK 自我磷酸化后将磷酸基团转移给 NisR, NisR 作为一个应答调节物激活 *nisZ* 启动子,从而使下游基因转录。在乳酸菌中,这种诱导作用与诱导物 *nisin* 的浓度在一定范围内成正比例,诱导效率可达 1 000 倍以上。

本实验室在构建 *nisin* 高产突变株 *L. lactis* AL2 基因文库的基础上,从中筛选到含有完整 *nisinZ* 生物合成基因簇的 λ HJ-3,并克隆和表达了编码 *nisinZ* 前体的结构基因^[4,5]。DNA 序列分析揭示在 *nisinZ* 前体基因上游的启动子序列中包含两个-10 区和两个-35 区,这一结构特征与 *nisinZ* 的时空表达和 *nisZ* 的诱导功能具有什么关系,这是人们十分感兴趣的问题。本文选用 *gusA* 作为报告基因,对本实验室克隆到的 *nisZ* 启动子进行了缺失和定点突变,对 *nisZ* 启动子的表达和诱导功能进行了初步探索。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒(表 1)

1.2 培养基和试剂

1.2.1 培养基:大肠杆菌的培养用 LB 培养基,使用前根据需要加入 100 μ g/mL 的 Amp 或

* 国家“十五”科技攻关项目(2001BA708B05-07)中国科学院创新项目和中国科学院微生物研究所所长基金资助

** 西北农林科技大学博士研究生

*** 通讯作者。 E-mail: huanld@sun.im.ac.cn

作者简介: 杨 巍(1975-)男,湖北潜江人,中国科学院微生物研究所硕士研究生,从事乳酸菌分子遗传学研究。

收稿日期: 2002-06-18, 修回日期: 2002-11-08

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Relevant properties	Sources
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA</i> , <i>supE44</i> , <i>endA</i> , $\Delta(\text{lac-proA1B})\text{F}'$	Our lab.
<i>L. lactis</i> NZ9800	Tr5276, ΔnisA , non-nisin producer	NIZO
pNZ8010	Cm^r , <i>gusA</i>	NIZO
pMG36e	Expression vector, Em^r	J Kok
pUC19	Cloning vector, Amp^r	Our lab.
pHJ201	pMG36e carrying the <i>nisZ</i> gene	Our lab.
pYG01	pUC19 carrying the <i>gusA</i> gene transnationally fused to the <i>nisZ</i> promoter	This paper
pYG02	pMG36e carrying the <i>gusA</i> gene transnationally fused to the <i>nisZ</i> promoter	This paper
pYG01p	pYG02 derivative without the promoter2 of the <i>nisZ</i> promoter	This paper
pYG02p	pYG02 derivative without the promoter1 of the <i>nisZ</i> promoter	This paper
pYG10p	pYG02 derivative with the mutation of -10 region of the promoter2 region of the <i>nisZ</i> promoter	This paper
pYG03p	pYG02 derivative with the mutation of the spacer between the -10 and -35 region of the promoter2 region of the <i>nisZ</i> promoter	This paper

Em 。乳酸菌的培养用 GM17 培养基,需要时加入 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Em 。在筛选表达 β -Glucuronidase(GUS)的乳酸菌转化子时,加入 $5\text{ng}/\text{mL}$ 的 Nisin 和终浓度为 $0.5\text{mmol}/\text{L}$ 的 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide(X-Gluc)。

1.2.2 工具酶和试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 多核苷酸激酶购自 TaKaRa 公司。Site-directed Mutagenesis Kit 购自 Clontech 公司。ATP、MUG、Nisin 购自 Sigma 公司。X-Gluc 购自上海生化试剂厂。*pfu* *Taq* 酶、DNA 纯化回收 Kit 购自 BioDev 公司。

1.3 DNA 的提取和转化

大肠杆菌质粒 DNA 提取和转化按文献 [6] 方法进行。乳酸菌质粒 DNA 的提取按文献 [7] 方法进行,电击转化按文献 [8] 方法进行。

1.4 引物设计和 PCR 扩增

1.4.1 GUS 结构基因:根据 *gusA* 基因的 DNA 序列,设计以下两条引物扩增 GUS 结构基因 5'端引物(P1):5'-TCCCCCATGGTACGTCCTGTAGAAACCCC-3',引入 *Nco* I 酶切位点,3'端引物(P2):5'-CGAGAAGCTTTTATCATTGTTTGCCCTCCC-3',引入 *Hind* III 酶切位点,同时在 GUS 结构基因终止密码子 TGA 后再加一个 TAA 终止密码子。用质粒 pNZ8010 作模板,PCR 反应条件:95℃变性 1min,54℃退火 1min,72℃延伸 3min,反应进行 30 个循环。

1.4.2 *nisZ* 启动子片段:根据本实验室得到的 *nisZ* 基因序列设计以下两条引物,扩增 *nisZ* 启动子片段:5'端引物(P3):5'-CGCGAATTCGATATAGGTTTATTGAGT-3',引入 *Eco* RI 酶切位点,3'端引物(P4):5'-GTACCCATGGTGAAGTGCCTCCTTATA-3',引入 *Nco* I 酶切位点。用质粒 pHJ201 作模板,PCR 反应条件:95℃变性 1min,53℃退火 1min,72℃延伸 30 s,反应进行 30 个循环。

1.4.3 *nisZ* 启动子的 promoter2 片段:5'端引物 P8:5'-CGCGAATTCCTGTGCGATAACGCGAGC-3',3'端引物 P4。用质粒 pHJ201 作模板,PCR 反应条件:95℃变性 1min,53℃退火 1min,72℃延伸 30 s,反应进行 30 个循环。

1.5 启动子的定点突变

启动子定点突变都是以 pUC19 为载体在 *E. coli* JM109 中完成。各突变引物如下：

P5 : 5'-CTTGAGAAAGTATTGGTAATAATATTATGATTTTCGTTCCAAGGAACTAG-3'

P6 : 5'-CGGCTCTGATTAATAAATTAAGTTTGTAGATAC-3'

P7 : 5'-CTGAAGTTTGTGTTGATATAATGATTTTCGTTTCG-3'

操作按 Clontech 公司的产品说明书进行。

1.6 总蛋白质含量的测定

按文献 [9] 方法进行。

1.7 GUS 的诱导表达

用 0.02mol/L 的盐酸溶解 nisin 配成浓度为 50 μ g/mL 的母液作为诱导剂。4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) 为 GUS 作用底物。按 1% 接种量接种过夜培养物于 4mL GM17 液体培养基中 30 $^{\circ}$ C 培养使 OD_{600} 达 0.5 加入终浓度为 5ng/mL, 20ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 200ng/mL, 500ng/mL, 1000ng/mL 的 nisin, 同时用不加 nisin 的培养物作对照, 30 $^{\circ}$ C 继续培养 1.5 h。

1.8 GUS 活性测定

12 000r/min 离心 1min 收集菌体, 用 2mL 的 PBS 缓冲液悬浮菌体, 超声波破碎细胞后, 离心收集上清, 立即按文献 [10] 方法进行 GUS 活性测定, 测定仪器为 Hoefer 公司 Dyna Quant 200 Fluorometer。GUS 活性单位 (U) 定义为 37 $^{\circ}$ C 条件下, 1min 内 1mg 总蛋白产生 1 μ mol 的 MU。

2 结果和讨论

2.1 含有 *nisZ* 启动子和 *gusA* 结构基因的重组质粒 pYG02 的构建

为了最大程度的保持 GUS 结构基因和 *nisZ* 启动子的完整性, 我们采用 *nisZ* 启动子与 GUS 结构基因的翻译融合。该融合使 GUS 的第一个氨基酸由 Leu 改变为 Val, 同时使 *nisZ* 启动子的最后两个碱基由 AA 变为 CC, 但这些改变不会影响 GUS 的活性^[11]和 *nisZ* 启动子诱导表达功能^[12]。PCR 扩增得到预期大小的扩增产物, 将 GUS 的 PCR 产物经 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切与经 *Eco* R I 和 *Hind* III 双酶切的 pUC19 载体按摩尔比 3:1 比例连接反应 12h 后, 再加入经 *Eco* R I 和 *Nco* I 双酶切的 *nisZ* 启动子 PCR 产物, 继续连接反应 16h, 将连接混合物转化 *E. coli* JM109, 得到的重组质粒命名为 pYG01。经酶切 (图 1) 和测序验证 (部分序列见图 2) 结果与预期相符。

为了构建能在乳酸菌中复制和表达的重组质粒, 用 *Eco* R I 和 *Hind* III 双酶切 pYG01, 回收含 *nisZ* 启动子和 GUS 结构基因的大片段, 与经同样双酶切的乳酸菌载体

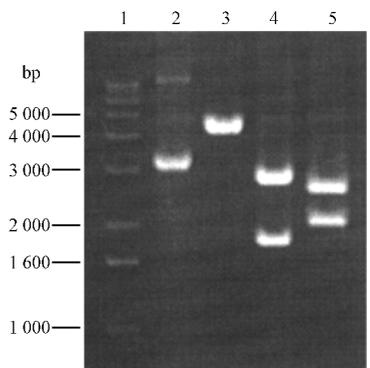


图 1 pYG01 酶切分析

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of pYG01

1. 1kb DNA ladder ;
2. pYG01 ;
3. pYG01/*Hind* III ;
4. pYG01/*Nco* I + *Hind* III ;
5. pYG01/*Eco* R I + *Hind* III.

```

1  GATATAGGTTTATTGAGTCTTAGACATACTTGAATGACCTAGTCTTATAACTATACTGAC   60
61  AATAGAAACATTAACAAATCTAAAACAGTCTTAATTCATCTTGAGAAAGTATTGGTAAT   120
121  AATATTATTGTGCGATAACGCGAGCATAATAAACGGCTCTGATTTAAATTCGAAGTTTGT   180
181  AGATACAAAATGATTCGTTTCGAAGGAACTACAAAATAAATTATAAGGAGGCACTCACCATG   240
                                     M
241  GTACGTCCTGTAGAAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTC   300
      V R P V E T P T R E I K K L D G L W A F

```

图 2 *nisZ* 启动子与 GUS 结构基因的翻译融合部分序列

Fig.2 The partial nucleotide sequence of the transnational fusion of *nisZ* promoter to *gusA*

The two -10 and -35 regions are underlined. The first promoter region from positions 102 to 128 is named promoter1, and the second promoter region from positions 129 to 189 is named promoter2.

pMG36e 大片段连接,得到重组质粒 pYG02。将 pYG02 电击转化 *L. lactis* NZ9800,分别于加 nisin 和不加 nisin 的选择培养基上培养,含 nisin 的选择培养基上产生蓝色菌落,而不加 nisin 诱导的没有观察到蓝色菌落,说明所构建的重组质粒 pYG02 完整保存了 *nisZ* 启动子诱导和表达功能从而使 GUS 结构基因获得诱导表达。

2.2 *nisZ* 启动子不同部位缺失突变体的功能研究

2.2.1 pYG01p 和 pYG02p 两个启动子突变体质粒的构建及其在 *L. lactis* NZ9800 的诱导表达

如图 2 所示, *nisZ* 启动子含有两个 -10 区和两个 -35 区,我们将上游的 -35 区和 -10 区称为 promoter1,下游的 -35 区和 -10 区称为 promoter2。为了研究 promoter1 和 promoter2 各自在诱导和表达中的作用,我们构建了只含有 promoter1 和只含有 promoter2 的两个重组质粒。只含有 promoter1 的突变体删除了从 129 位到 189 位的 61bp,突变引物为 P5。只含有 promoter2 启动子突变是通过 5'端引物 P8 和 3'端引物 P4,应用 PCR 方法删除从 1 到 156 位的 156bp,并引入 *EcoR* I 酶切位点。PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Nco* I 双酶切与经同样双酶切的 pYG01 大片段连接。测序验证正确后,将两个缺失突变片段亚克隆于质粒 pMG36e 上,分别转入 *L. lactis* NZ9800,其中只含有 promoter1 的重组质粒命名为 pYG01p,只含有 promoter2 的重组质粒命名为 pYG02p。

分别测定含质粒 pMG36e、pYG02、pYG01p 和 pYG02p 的 *L. lactis* NZ9800 的总蛋白质含量和 GUS 活性(图 3)。从图 3 中可以看出含 pMG36e 的 *L. lactis* NZ9800,不管是否加入诱导剂 nisin,均没有 GUS 活性,说明 *L. lactis* NZ9800 本身及载体 pMG36e 不表达 GUS。比较含 pYG02、pYG01p 和 pYG02p 的 *L. lactis* NZ9800 的诱导水平和表达强度,发现 pYG01p 和 pMG36e 一样检测不到 GUS 活性,而 pYG02 和 pYG02p 两个均有 GUS 本底表达并均可被 nisin 所诱导。尽管 promoter1 的 -35 和 -10 区的碱基组成较之 promoter2 更接近典型序列,但结果表明单独的 promoter1 没有启动子功能。pYG02 和 pYG02p 达到最大诱导表达量时的 nisin 诱导浓度分别为 50ng/mL 和

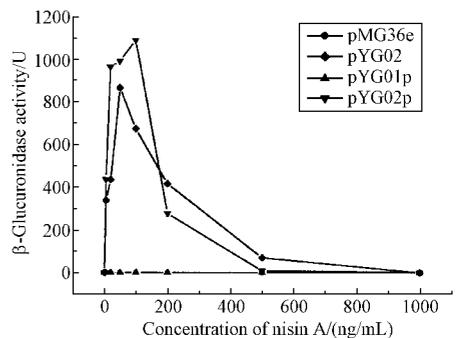


图 3 不同 nisin 浓度诱导条件下的 GUS 活性

Fig.3 Dose response of nisin as inducers of *gusA* expression in *L. lactis* NZ9800 harboring different plasmids

100ng/mL,含有完整 *nisZ* 启动子(pYG02)的 GUS 活性值为 1084U,而只含有 promoter2 的 *nisZ* 启动子(pYG02)的最大 GUS 活性值为 864U,似乎 promoter1 抑制了 *nisZ* 启动子诱导作用,具体原因有待进一步验证。

2.2.2 pYG10p 和 pYG03p 两个启动子突变体质粒的构建和诱导表达 :为了进一步探讨 *nisZ* 启动子中 promoter2 的表达和诱导功能,对 promoter2 进行了定点突变。*L. lactis* 中的组成型启动子-10 区上游的碱基组成大部分为 TGA,而 promoter2 中为 AGA。为了验证这一差异是否与诱导功能有关,将 *nisZ* 启动子的 promoter2 的-10 区突变为组成型启动子的典型-10 区结构,即将-10 区由 TACAAT 突变为 TATAAT,并将-10 区上游的 AGA 变为 TGA,突变引物是 P7。另外,通过比较乳酸菌中一些诱导调控启动子,发现其间隔区碱基长度通常大于 17bp,推测间隔区与启动子诱导调控有关^[13]。与 *nisin* 生物合成基因簇中另一个诱导型启动子 *nisF* 启动子比较,其间隔区同样为 20bp,发现它们的间隔区有 14 个碱基相同,de Ruyter 推测这 14 个碱基与 *nisZ* 启动子的调控密切相关^[14]。采用突变引物 P6,将间隔区 AAATTCTGAAGTTTGTAG 下划线的 3 个碱基缺失。测序正确后,亚克隆于载体 pMG36e 上,转入 *L. lactis* NZ9800,两个启动子突变重组质粒分别命名为 pYG10p 和 pYG03p。

分别测定含质粒 pMG36e、pYG02、pYG02p、pYG10p 和 pYG03p 的 *L. lactis* NZ9800 的总蛋白质含量和 GUS 活性(图 4)。从图 4 可见,含 pYG10p 的 *L. lactis* NZ9800 与含 pYG02 的 *L. lactis* NZ9800,其本底表达水平和诱导水平均有下降,但达到最大诱导活性时 *nisin* 诱导剂量与 pYG02 同为 50ng/mL,该结果说明-10 区的碱基差异对 *nisZ* 启动子的诱导功能虽有影响但不严重。pYG03p 在不加 *nisin* 诱导和加入 *nisin* 诱导的情况下都有极少的 GUS 本底表达,表达的 GUS 活性相对值不随加入的诱导剂 *nisin* 浓度而变化,与 pYG02 的本底 GUS 活性大致相等。显然,该间隔区的 3 个碱基缺失突变使 *nisZ* 启动子仅具有微弱的组成型表达功能,诱导功能完全丧失。本研究结果提示 *nisZ* 启动子中 promoter2 的间隔区与 *nisZ* 的诱导和表达功能密切相关,具体碱基在其中的作用需要进一步的定点突变研究。

参 考 文 献

- [1] 还连栋. 乳酸链球菌肽. 见: 尤新主编. 功能性发酵制品. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- [2] 陈秀珠, 张振中, 贾士芳, 等. 乳链菌肽的生物合成及其分子结构与功能的关系. 微生物学报, 2002, 42(5): 628 ~ 633.
- [3] Kuipers O P, Beerthuyzen M M, de Ruyter P G G A, et al. Autoregulation of *nisin* biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem*, 1995, 270: 27299 ~ 27304.
- [4] 陈秀珠, 胡海菁, 贾士芳, 等. 乳酸乳球菌 AI2 基因文库的构建及乳链菌肽生物合成基因簇的筛选. 微生物学报, 2000, 40(5): 465 ~ 469.

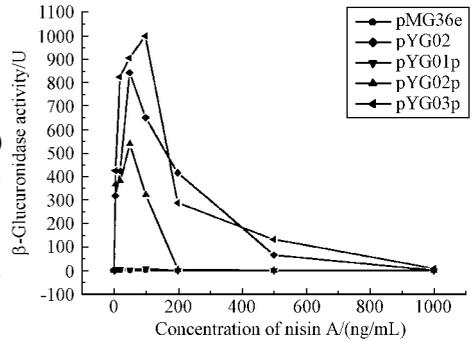


图 4 不同 *nisin* 浓度诱导条件下的 GUS 活性
Fig. 4 Dose response of *nisin* as inducers of *gusA* expression in *L. lactis* NZ9800 harboring different plasmids

- [5] 陈秀珠, 胡海菁, 杨 巍, 等. 乳链菌肽前体基因(*nisZ*)在乳酸乳球菌中的克隆和表达. 遗传学报, 2001, 28(3): 285 ~ 290.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [7] Anderson D G, McKay L L. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol* , 1983 , 46 : 549 ~ 552.
- [8] Holo H, Nes I F. High-frequency transformation , by electroporation , of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl Environ Microbiol* , 1989 , 55 : 3119 ~ 3123.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* , 1976 , 72 : 248 ~ 254.
- [10] Jefferson R A, Assaying chimeric genes in plants : the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* , 1987 , 5 : 387 ~ 405.
- [11] de Ruyter P G G A , Kuipers O P , de Vos W M. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol* , 1996 , 62 : 3662 ~ 3667.
- [12] Geoffroy M C , Guyard C , Quatannens B , et al . Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , 66 : 383 ~ 391.
- [13] Gasson M J , de Vos W M. Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. London : Chapman and Hall , 1994.
- [14] de Ruyter P G G A , Kuipers O P , Beerthuyzen M M , et al . Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* . *J Bacteriol* , 1996 178 : 3434 ~ 3439.

Studies on Structure and Function of *nisZ* Promoter*

Yang Wei¹ Chen Xiuzhu¹ Yuan Jing¹ Huan Liandong^{1,2**}

(¹ Molecular Microbiology Research Center and ² State Key Laboratory of Microbial Resource , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : β -Glucuronidase(*gusA*) gene was used as reporter gene for analyzing *nisZ* promoter. Two promoter regions(promoter1 and promoter2) upstream of *nisZ* code region were deleted respectively by site-directed mutagenesis. Only promoter2 , the promoter region near the code region , was involved in the induction and expression of *nisZ* promoter. *nisZ* promoter induction level was reduced when -10 region of promoter2 was mutated to a constitutive -10 region. *nisZ* promoter lost function when the spacer of the -10 and -35 regions of promoter2 was reduced from 20bp to 17bp. The results indicate the spacer play an important role on induction and expression of *nisZ* promoter.

Key words : *nisZ* promoter , Function , *gusA*

* Supported by Chinese National Programs for Science and Technology Development(2001BA708B05-07)

** Corresponding author. E-mail : huanld@sun.im.ac.cn