

顶头孢霉 *pcbAB-pcbC* 双向启动子区域的克隆与应用

张丕燕 朱春宝* 朱宝泉

(上海医药工业研究院 上海 200040)

摘 要 :用 PCR 方法从丝状真菌顶头孢霉中克隆出全长 1.3kb 的 *pcbAB-pcbC* 双向启动子 DNA 片段,通过转化子对博莱霉素的抗性证明了该启动子在顶头孢霉中的双向启动功能。另外,利用所克隆的 *pcbAB-pcbC* 双向启动子构建了一个用于顶头孢霉转化的质粒 pYG13,并成功地将该质粒转化入顶头孢霉。pYG13 含有博莱霉素抗性基因和透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*),Southern 杂交和 CO 结合实验分析显示 *vgb* 整合到顶头孢霉的基因组 DNA 中并表达了有活性的透明颤菌血红蛋白。

关键词 :顶头孢霉, *pcbAB-pcbC* 双向启动子区域, 转化

中图分类号 :Q933 **文献标识码** :A **文章编号** 0001-6209(2004)02-0255-03

顶头孢霉是工业上用于发酵生产头孢菌素 C 的重要丝状真菌,过去的 30 年来,诱变技术、生化筛选技术和原生质体融合技术的应用使得头孢菌素的产量有了大幅度的提高。在 β -内酰胺产生菌产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、巢巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和顶头孢霉(*Cephalosporium acremonium*)中,基因 *pcbAB* 和 *pcbC* 分别编码 δ (L- α -氨基己二酰)-L-半胱氨酰-D-缬氨酸合成酶[δ (L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase]和青霉素合成酶,用于催化 β -内酰胺抗生素生物合成途径中前两步的反应。这两个基因的转录方向相反,中间有一段 1.3kb 的双向启动子区,负责启动和调节上述两个合成基因的表达^[1]。Menne 等^[2]将 *lacZ* 编码 β -半乳糖苷酶)和 *gusA*(编码 β -葡糖醛酸酶)基因分别连接在 *pcbAB-pcbC* 双向启动子的下游,研究了该双向启动子的功能。Schmitt 等^[3]利用报告基因对来自于顶头孢霉的 *pcbC* 启动子也进行了功能分析。到目前为止,*pcbC* 启动子已多次用于异源基因在顶头孢霉中表达^[4-6]。

为建立有效的顶头孢霉转化系统,用 PCR 方法克隆顶头孢霉 *pcbAB-pcbC* 双向启动子区域,并利用博莱霉素抗性基因证明这一段 DNA 区域具有双向启动功能,利用该双向启动子及博莱霉素抗性基因作筛选标记,构建了一个顶头孢霉的转化载体 pYG13,并利用该载体将透明颤菌血红蛋白(*vgb*)基因转化进入顶头孢霉中。与本实验室先前构建的顶头孢霉转化质粒 pYG715 相比,转化率有大幅度提高。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

顶头孢霉(*Cephalosporium acremonium*)84-3-87 为一株工业生产菌株,由本院菌种选育组提供,培养条件见文献[4];带 *vgb* 基因的质粒 pHZ1250 由上海交通大学邓子新教授惠赠,大肠杆菌 DH5 α 及其它一些质粒均为本实验室保藏。

1.2 酶和试剂

限制性内切酶、绿豆芽核酸酶、Klenow 酶和 DNA 连接酶

均购自大连 TaKaRa 公司;Taq DNA 聚合酶购自华美公司;Southern 印迹试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II)购自 Roche 公司;Lysing 酶为 Sigma 产品;PEG6000 购自中国医药集团上海化学试剂公司,博莱霉素由日本传染病研究所 Dr. Hotta 惠赠。

1.3 DNA 操作

DNA 酶切、电泳、连接、转化大肠杆菌均参照文献[7]。

1.4 顶头孢霉原生质体的制备和转化

顶头孢霉原生质体的制备和 PEG 介导的转化方法参照文献[4]并略作改动,本研究中用 Lysing 酶代替文献中的 No-vozyme 234 作为制备原生质体的破壁酶。

1.5 引物设计、合成和 PCR 扩增

根据 *pcbAB-pcbC* 双向启动子区域的序列设计了 PCR 扩增的正向和反向引物。为便于扩增片段的亚克隆,在正向引物 PP1 的 5'端添加内切酶 *EcoR* I 识别位点,引物序列为 5'-GGAATTCGGAATAGGGGCGAGACATCG-3',在反向引物 PP2 的 5'端添加内切酶 *Spe* I 识别位点,引物序列为 5'-GACTAG-TGCTCAGCCCGCTCAGATCGC-3'。扩增 *vgb* 基因的引物根据其开放阅读框两端的序列设计而成,分别在正向和反向引物的 5'端添加内切酶 *Hind* III 和 *EcoR* I 的识别位点,正向引物 PV1 的序列为 5'-CCCAAGCTTGGGCGAGCTCGGTACCTATG-3';反向引物 PV2 的序列为 5'-CCGGAATTCGGTTCGATCCCCTAGAAAGCG-3'。上述引物由上海生工生物工程技术服务公司合成。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,共 28 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

1.6 Southern blot

Southern blot 按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 说明书进行。

1.7 CO 结合试验分析

分析方法参照文献[8]并略作改动,离心收集培养 4d 的基因工程菌和对照菌的菌丝体,置液氮速冻处理后研碎,分别取相同重量的细胞裂解液重悬于 2mL 0.1mol/L 过硫酸钠

基金项目:国家 863 计划(2001AA214201)

* 通讯作者。Tel 86-21-62479808 转 323;Fax 86-21-62890729;E-mail:zhuchb@sipi.com.cn

作者简介:张丕燕(1969-),男,江苏沛县人,博士研究生,研究方向为丝状真菌的基因工程研究。Tel 86-21-62479808 转 304;E-mail:zhang-piyan@hotmail.com

收稿日期:2003-06-23,修回日期:2003-10-27

溶液中(pH 7.4)通 CO 20min,用紫外分光光度计扫描分析。

2 结果

2.1 *pcbAB-pcbC* 双向启动子的扩增和鉴定

以顶头孢霉基因组 DNA 为模板,用合成的 *pcbAB-pcbC* 双向启动子的正向和反向引物扩增出 1.3kb 的 DNA 片段,将该片段用 *Spe* I 和 *Eco* R I 双酶切,连接于经相同酶处理的 pBluscript II KS 上,构建成质粒 pYG11,由上海博亚公司进行测序。经序列比对,扩增出的 DNA 片段与已发表的 *pcbAB-pcbC* 双向启动子序列完全一致,证明没有发生变异。

2.2 质粒的构建

用 *Spe* I 和 *Eco* R I 双酶切质粒 pYG11,将 *pcbAB-pcbC* 双向启动子片段切下,用绿豆芽核酸酶进行末端平滑化。pYG714 是一个含博来霉素抗性基因的真菌启动子探针质粒,将上述 *pcbAB-pcbC* 双向启动子片段经电泳分离后插入质粒 pYG714 博来霉素抗性基因开放阅读框上游的 *Eco* R V 位点,用酶切反应鉴定双向启动子插入的方向,得到不同插入方向的质粒 pYG8 和 pYG9,用于双向启动子的功能分析。

质粒 pHZ1250 的 *Eco* R I-*Hind* III 片段含有 *vgb* 基因,将该片段定向连接到质粒 pYG11 中 *pcbC* 启动子下游的 *Eco* R I 和 *Hind* III 位点上,得到质粒 pYG12;用内切酶 *Spe* I 和 *Hind* III 双酶切 pYG12,得到含有 *pcbAB-pcbC* 双向启动子和 *vgb* 基因的 DNA 片段,用 Klenow 片段将其末端平滑化后插入到质粒 pYG714 的 *Eco* R V 位点,通过酶切鉴定插入方向,最后得到质粒 pYG13。

2.3 顶头孢霉的转化和博来霉素抗性分析

将 pYG8 和 pYG9 用 PEG 介导法转化顶头孢霉原生质体^[4],在含有 10 μ g/mL 博来霉素的再生培养基上筛选,只筛选到质粒 pYG8 的转化子,转化率平均为每 μ g DNA 19.5 个转化子。将再生培养基中博来霉素浓度降到 5 μ g/mL 后,能筛选到 pYG9 的转化子,转化率平均为 11.3 个/ μ g DNA。从上述两种质粒获得的转化子再分别在含有和不含博来霉素的平板上连续培养 5 代后,再转接到含相应浓度的博来霉素的平板上,74%~90%的转化子能保持对博来霉素的抗性。

为了将外源基因导入顶头孢霉,以 *vgb* 基因为例构建了质粒 pYG13,并用 PEG 介导法将该基因转入顶头孢霉中,转化子在含 5 μ g/mL 博来霉素的再生平板上进行筛选,转化率与 pYG9 相似,平均为每 μ g DNA 9.8 个,与本实验室先前利用构巢曲霉的 *TrpC* 基因的启动子构建的顶头孢霉转化质粒 pYG715/*vgb*^[9]相比,转化率有了显著的提高(表 1)。

表 1 顶头孢霉转化载体 pYG13 与 pYG715/*vgb* 的特征比较

Plasmid	Size/kb	Promoter	Bleomycin (μ g/mL)	Transformation efficiency (\times transformants/ μ g DNA)
pYG13	5.1	<i>pcbAB-pcbC</i> bidirectional promoter	5	9.8
pYG715/ <i>vgb</i>	6.3	<i>PtrpC</i>	5	0.5

2.4 Southern blot 和 PCR 分析

为进一步证明转化子在基因组中存在经 pYG13 转化而导入的 *vgb* 基因,用地高辛标记的 *vgb* 探针对携带质粒 pYG13 的重组顶头孢霉和未经转化的顶头孢霉的基因组 DNA 进行 Southern blot 分析(图 1),图中阳性对照为 *Eco* R I 和 *Hind* III 消化的 pYG13,重组菌和出发菌均经过过量的 *Eco* R I 和 *Hind* III 消化处理,结果在含 *vgb* 基因的 510bp 的片段处,阳性对照和重组菌均出现了杂交条带。同时还进行了 PCR 扩增 *vgb* 基因的试验,从 3 个转化子基因组 DNA 中都扩增出大小与 *vgb* 基因一致的 DNA 片段。

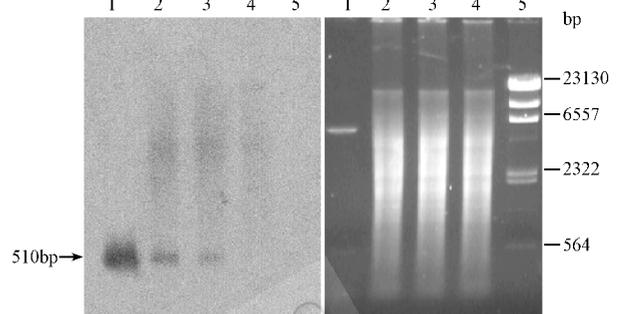


图 1 Southern blot 分析

Fig.1 Southern blot analysis

1. pYG13 2. Transformant 1318 3. Transformant 1303 4. Original *Cephalosporium acremonium* 5. λ DNA/*Hind* III marker

2.5 CO 结合试验分析

CO 与还原态的透明颤菌血红蛋白结合后,在 420nm 处具有最大光吸收值。为证明转化菌株能够表达透明颤菌的血红蛋白基因,以通 CO 的出发菌株的重悬液为阴性对照,用紫外分光光度计对通 CO 的基因工程菌细胞裂解液进行扫描,在 420nm 处显示特征性的光吸收,差光谱扫描见图 2。

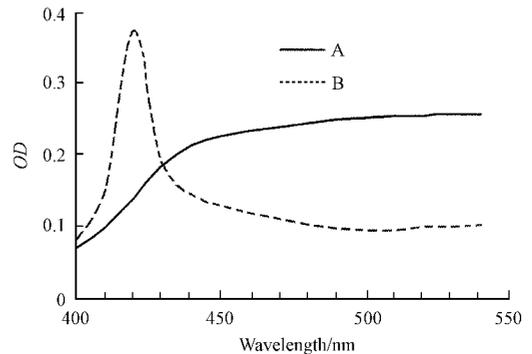


图 2 一氧化碳结合差光谱分析

Fig.2 Carbon monoxide-binding difference spectrum analysis

- A. Cell lysates of original *Cephalosporium acremonium*;
B. Cell lysates of transformant 1318.

3 讨论

试验显示顶头孢霉对博来霉素的最低抑菌浓度(MIC)为 0.1 μ g/mL。我们用含高浓度博来霉素的再生平板筛选转化子,用 pYG8 所获得的转化子能够在含 10 μ g/mL 博来霉素的培养基上生长,用 pYG9 获得的转化子能够在含 5 μ g/mL 的博来霉素的培养基上生长,这表明双向 *pcbAB-pcbC* 启动子在两个方向上都能够启动基因的转录,并赋予顶头孢霉抗博来

霉素的性能。另外,由于转化子抗性的强弱在一定程度上反映了启动子的启动能力,可以认为 *pcbC* 启动子的启动功能强于 *pcbAB* 启动子,这与文献 [3] 中的报道相符。

质粒 pYG13 中不带有真菌的复制子,在重组菌中不可能存在有 pYG13。当我们用完整的基因组 DNA 进行 Southern blot 分析时,杂交条带出现于大分子量的基因组 DNA 区域,表明转化载体 pYG13 整合于基因组 DNA 中;当用 *EcoR*I 和 *Hind*III 对重组菌基因组 DNA 进行消化后再进行 Southern blot 分析(图 1),两个重组菌的 DNA 杂交条带均与经相同酶处理的 pYG13 的 *vgb* 基因条带的位置相同,这表明重组菌的基因组 DNA 中带有插入的 *vgb* 基因。CO 结合试验中 420nm 处的特征性吸收峰显示在重组菌中存在有活性的血红蛋白^[8],说明在重组菌中表达了一定量的有活性的 *vgb* 基因。

pYG715/Vgb 是本实验室以前构建的转化 *vgb* 基因的顶头孢霉的转化质粒^[9],它利用来自构巢曲霉的 *TrpC* 基因的启动子调控博来霉素抗性基因和 *vgb* 基因的表达,虽然也已成功地将 *vgb* 基因导入顶头孢霉菌中,但是转化率较低,平均仅有 0.5 个/ μ g DNA。另外,由 pYG715/Vgb 转化获得的转化子是在含 5 μ g/mL 博来霉素再生平板上筛选得到的,而且转化子不稳定,传代后,对博来霉素的抗性下降。我们利用从顶头孢霉中克隆的 *pcbAB-pcbC* 双向启动子构建了与 pYG715/Vgb 结构相似的质粒 pYG13,对顶头孢霉的转化率提高了将近 20 倍,而且同样在含 5 μ g/mL 博来霉素再生平板上筛选转化子,由 pYG13 获得的 63 个转化子分别在含有和不含有博来霉素的培养基上经过 5 次传代后,有 50 个转化子仍然保持对博来霉素相同的抗性水平,占全部转化子的 80%。其原因可能是 *pcbAB-pcbC* 启动子是顶头孢霉自身的启动子,pYG13 通过启动子与顶头孢霉的染色体 DNA 发生同源重组,使质粒更容易稳定地整合到基因组中;另外,顶头孢霉自身的 *pcbAB-pcbC* 启动子也可能有着与外源启动子不同的调节功能。因此,在顶头孢霉的转化系统的构建中,使用其自身启动子往往优于外源启动子。*pcbAB-pcbC* 双向启动子区域约为 1.3kb,它可以从一个方向启动标记基因的表

达,从另一个方向启动外源目的基因的表达,从而可减小所构建的重组质粒的大小,这对质粒在丝状真菌中的成功转化也是非常有利的。

参 考 文 献

- [1] Martin J F. Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *J Bacteriol*, 2000, **250**: 367-374.
- [2] Menne S, Walz M, Ktich U. Expression studies with the bidirectional *pcbAB-pcbC* promoter region from *Acremonium chrysogenum* using reporter gene fusions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **42**: 57-66.
- [3] Schmitt E K, Kempken R, Ktich U. Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol Genet Genomics*, 2001, **265**: 508-518.
- [4] Skatrud P L, Queener S W, Carr L G, et al. Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium*. *Curr Genet*, 1987, **12**: 337-348.
- [5] Radzio R, Ktich U. Efficient synthesis of the blood-coagulation inhibitor hirudin in the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**: 58-65.
- [6] Skatrud P L, Tietz A J, Ingolia T D, et al. Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Biotechnology*, 1989, **7**: 477-485.
- [7] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989.
- [8] DeModena J A, Gutiérrez S, Velasco J, et al. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of bacterial hemoglobin. *Biotechnology*, 1993, **11**: 926-929.
- [9] 郑荣,朱春宝,朱宝泉,等.带 *TrpC* 启动子的质粒 pYG715/Vgb 对顶头孢霉的转化.中国抗生素杂志,1998, **24**(4):269-272.

Cloning of Bidirectional *pcbAB-pcbC* Promoter Region from *Cephalosporium acremonium* and Its Application

ZHANG Pi-Yan ZHU Chun-Bao ZHU Bao-Quan

(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China)

Abstract: 1.3kb DNA fragment containing the full-length bidirectional *pcbAB-pcbC* promoter region was cloned from filamentous fungus *Cephalosporium acremonium* by PCR amplification, and the function of the promoter region was confirmed with the expression of bleomycin resistant gene. Using the bleomycin resistance as dominant selective marker, plasmid pYG13 which contains *Vitreoscilla* hemoglobin gene(*vgb*) was constructed with the bidirectional promoter, and successfully transformed into *Cephalosporium acremonium*. Southern blotting and Carbon monoxide-binding analysis reveal that *vgb* gene is integrated into the genomic DNA of *Cephalosporium acremonium* and functional *vgb* gene was expressed in *Cephalosporium acremonium*.

Key words: *Cephalosporium acremonium*, Bidirectional *pcbAB-pcbC* promoter region, Transformation

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2001AA214201)

* Corresponding author. Tel: 86-21-62479808Exe323; Fax: 86-21-62890729; E-mail: zhuch@sipi.com.cn

Received date: 06-23-2003