

圈卷产色链霉菌分化相关基因-*samR* 调控的初步研究

杨艳玲 杨海花* 谭华荣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要: 在野生型的圈卷产色链霉菌中, 增加单个或多个拷贝数的 *samR*, 观察该基因对野生株表型和形态的影响。结果表明, *samR* 的拷贝数的增加会使孢子形成提前, 但是增加单拷贝的菌株与增加多拷贝的菌株所表现的增效作用相同。在大肠杆菌中对 *samR* 进行了 GST 融合表达和纯化, 通过凝胶阻滞实验证明, *SamR* 蛋白可与其上游的调控区特异性结合。由此推测 *samR* 是一个自调控基因。

关键词: 链霉菌分化, *samR* 基因, 自调控

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)01-0010-04

发育分化是现代生物学的研究热点之一。链霉菌(*Streptomyces*)因具有类似于丝状真菌的复杂生命周期, 无与伦比的合成次生代谢产物的能力及遗传物质结构相对简单等特点^[1,2], 而成为研究微生物发育分化的良好模式材料。

链霉菌发育分化过程的调控不是一个简单的线性级联调控, 而是一个多基因参与、多水平调控的复杂网络^[3~5]。转录调控因子在该网络中起着重要的多效调控作用^[5]。IcR 家族是典型的原核生物转录调控因子, 最早发现于大肠杆菌, 调控编码乙醛酸代谢酶的 *aceBAK* 操纵子的表达^[6~9]; 同时, *icR* 基因产物也与自身启动子结合, 抑制自身的转录^[10]。但是到目前为止, 还没有发现 *icR* 其他成员参与发育分化调控的报道。

本实验室的早期研究发现, 圈卷产色链霉菌中 *icR* 类似基因-*samR* 对链霉菌的发育分化起正向调控作用^[11]。在此基础上, 开展了对该基因在链霉菌发育分化中调控的分子机制的研究。本文首次报道 *samR* 基因在链霉菌中存在自调控的一些初步研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基: 圈卷产色链霉菌 7100 为野生型菌株, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为常规的基因克隆的受体菌株, ET12567(*dam*, *dcm*, *hsdS*)用于获得非甲基化的 DNA 以高效转化链霉菌^[12], 蛋白酶缺陷型菌株为 *E. coli* BL21(DE3)用于异源蛋白的高表达, 上述菌株均由本实验室保存。

大肠杆菌高表达载体 pGEX-4T-3, 链霉菌单拷

贝整合载体 pSET152^[12], 链霉菌高拷贝载体 pES101 (含有来自 pUC18 和 pIJ702 的复制子, 由本实验室徐建勇构建, 未发表), 都由本实验室保藏。

链霉菌培养基 YEME、R2YE、基本培养基及 MM 等配制参见文献[12], 大肠杆菌培养基 LB 配制参见文献[13]。

1.1.2 抗生素、酶及试剂: 氨苄青霉素、Apramycin, 在 LB 培养基中, 使用浓度均为 100 μ g/mL; 在 R2YE 培养基中, Apramycin 的使用浓度为 50 μ g/mL; 在 YEME 和基本培养基中, Apramycin 的使用浓度为 10 μ g/mL。5XTBE、1XPBS 配制参见文献[13]。实验室所用的各种限制性内切酶购自 TaKaRa 和 Roche, 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶及 dNTP 均购自华美生物工程公司; T4 DNA 激酶、Poly (dI-dC) 和还原型谷胱甘肽、GST 亲和层析柱 GSTRATTM FF(17-5130-01) 分别购自 Promega、Sigma、Amersham-pharmacia Biosciences。DNA Sephadex-G50 chromatography, pfu DNA 聚合酶均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.1.3 引物合成: 用于本研究的 4 条引物由三博远志生物公司合成。

1.1.4 序列测定: 由六合通公司完成

1.2 菌株的培养、转化和 DNA 的基本操作

链霉菌培养、原生质体转化、总 DNA 和质粒提取参见文献[12]; 大肠杆菌的培养、转化和质粒提取参见文献[13]。

1.3 单拷贝重组质粒 pR01 和高表达重组质粒 pR02 的构建

将含 *samR* 完整基因和可能的转录调控区的约 1.48kb 的 *Pvu* II 酶切的 DNA^[11] 片段, 分别连接到单拷贝整合型载体 pSET152^[12] 和高拷贝载体 pES101

基金项目: 国家自然科学基金(301705100); 国家“863 计划”(2004AA214130)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62558248; Fax: 86-10-62636851; E-mail: yanghh@sun.im.ac.cn

作者简介: 杨艳玲(1978-), 女, 山东汶上人, 硕士研究生, 主要从事链霉菌发育分化的分子调控的研究。

收稿日期: 2004-06-16, 修回日期: 2004-11-15

的 *EcoRV* 位点上 构建重组质粒 pSET152::*samR* 和 pES101::*samR* ,分别命名为 pR01 和 pR02。

1.4 PCR 扩增用于高效表达的 *samR* 及其上游调控区

用于在大肠杆菌中进行 *samR* 融合表达的引物为 p1 和 p2 ,上游引物 p1 : 5'-CGTGGATCCGTGACCGCGGAGACCTCT-3'(下划线处为 *Bam*HI 位点 ,黑体 GTG 为翻译起始密码子);下游引物 p2 : 5'-TCGAGCGGCCGCGGTCAGCGCAGTGCTTCG-3'(下划线处为 *Not*I 位点 ,黑体 TCA 对应终止密码子)。分别引入的 *Bam*HI 和 *Not*I 限制酶识别位点 ,确保克隆片段以正确的读框插入到表达载体 pGEX-4T-3 的相应位点上。反应体系 (25 μ L):模板 DNA 约 1ng , 10 \times *Taq* 酶缓冲液 2.5 μ L , 2.5mmol/L dNTP 2.5 μ L ,引物各 5pmol , *Taq* DNA 聚合酶 1U。反应条件 :94 $^{\circ}$ C 4min , 94 $^{\circ}$ C 50s , 54 $^{\circ}$ C 50s , 72 $^{\circ}$ C 1min30s , 30 个循环 ; 72 $^{\circ}$ C 8min。用高保真 Pfu 酶进行扩增 ,PCR 反应产物的纯化参见文献 [12]。

用于扩增 *samR* 基因上游调控区 DNA 片段的一对引物为 p3 和 p4。p3 : 5'-GACGAATGCAGCCAGG-3'(-263bp ~ -248bp); p4 : 5'-CGACCGTCTGAGAGGTCT-3'(+76bp ~ +92bp)。反应体系 (25 μ L):质粒模板 DNA 约 1ng , 10 \times *Taq* 酶缓冲液 2.5 μ L , 2.5mmol/L dNTP 2.5 μ L ,引物各 5pmol ,分析纯 DMSO 1 μ L , *Taq* DNA 聚合酶 1U。反应条件 :94 $^{\circ}$ C 3min , 94 $^{\circ}$ C 40s , 54 $^{\circ}$ C 30s , 72 $^{\circ}$ C 30s , 30 个循环 ; 72 $^{\circ}$ C 6min。PCR 产物用 DNA Sephadex-G50 chromatography 纯化(按说明书进行)。

1.5 *samR* 融合表达质粒的构建

用 p1、p2 为引物 ,已经测序的包含完整 *samR* 基因的 1.48kb 的 DNA 片段为模板进行 PCR 扩增 ,电泳检测并用 DEAE 膜回收 PCR 产物 ,用 *Bam*HI 和 *Not*I 酶切并纯化 ,与用相同的限制酶酶切的 pGEX-4T-3 片段连接 ,转化大肠杆菌 DH5 α ,构建含完整 *samR* 的大肠杆菌表达质粒 pRX3(pGEX-4T-3::*samR*)。经质粒提取并酶切验证后 ,随机选取两个插入正确的克隆进行序列测定 ,证明所得到的阳性克隆的序列完全正确。

1.6 *samR* 基因在大肠杆菌中的表达和纯化

将上述构建好的重组质粒 pRX3 转入 *E. coli* BL21(DE3) ,随机挑取 3 个单菌落接入含有氨苄青霉素 (Amp) 抗性的 LB 培养液中 ,按照 Apha-macia GST 亲和层析试剂盒的常规操作手册 [17-5130-01] 制备 GST::SamR。SDS-PAGE 检测 *samR* 基因的表达和 GST::*samR* 蛋白的纯化。

1.7 SamR 蛋白与自身调控区 DNA 片段的结合

用 γ -³²P-ATP 500 μ Ci 和 1 单位的 T4 DNA 激酶标

记 10 pmol 的 P4 引物 ,37 $^{\circ}$ C 标记 30min 后于 90 $^{\circ}$ C 2min 终止反应。按照 1.4 中的体系和作用条件进行基因上游序列的 PCR 扩增。

凝胶阻滞试验参考文献 [5] 进行。反应体系为 30 μ L::10mmol/L Tris (pH7.5) , 1mmol/L EDTA , 50mmol/L NaCl , 5% glycerol , 1mmol/L DTT 和 2 μ g poly (dI-dC) 。加入探针 DNA 和 SamR 蛋白 ,其中 1-8 加入反应的蛋白量为 0、20、40、60、80、100、200、400ng , 25 $^{\circ}$ C 温浴 20min ,用 4% 的聚丙烯酰胺胶电泳 ,制干胶 ,压片 ,放射自显影。

1.8 Southern blot

将 PCR 的 *samR* 完整 DNA 片段回收 ,用 Roche 的 DIG DNA labeling and detection kit 进行标记 ,提取野生菌株 7100 和增加一个拷贝的重组菌株 SAR11 的总 DNA ,经 *Pst*I 酶切 ,电泳和 Southern blot 杂交 ,验证 pR01 确实整合在特定的位点上。具体方法见文献 [11]。

2 结果

2.1 *samR* 基因多拷贝菌株的获得

早期结果表明 ,*samR* 基因破坏使得圈卷产色链霉菌不能正常分化形成孢子 [11]。由此推测 *samR* 基因可能在发育分化过程中起正向调控作用。为了从另一个角度对此结果进行验证 ,分别在野生型中增加一个和多个拷贝的 *samR* ,以观察基因 *samR* 的剂量增加是否会使发育分化的生命周期加快。pSET152 为链霉菌中单拷贝整合型载体、pES101 为本实验室构建的高拷贝、大肠杆菌-链霉菌穿梭载体 ,将带有完整 *samR* 基因及其启动子序列的 1.48kb 片段分别连到 pSET152 和 pES101 载体上 ,构建成重组质粒 pR01 和 pR02 ,转入 *E. coli* ET12567 以去除限制性修饰 ,通过原生质体转化法转入圈卷产色链霉菌 7100 中 ,以 Apramycin 为筛选标记得到转化子。经总 DNA 提取、Southern blot 杂交证明 pR01 整合到染色体上 ,质粒提取实验验证得到了正确的含有 pR02 的链霉菌转化株 ,分别命名为 SAR11 和 SAR22 (图版 I -A) ,其中分别增加了一个和多个 *samR* 基因拷贝。

2.2 *samR* 基因多拷贝菌株的表型观察

以野生型为对照 ,将 SAR11 和 SAR22 接种在以甘露醇为碳源的基本培养基上 ,28 $^{\circ}$ C 培养并连续观察。在 60h 前基质菌丝和气生菌丝的分化没有区别 ,但之后的孢子形成受到了明显的调控。60h 时多拷贝菌株 SAR11、SAR22 均产生丰富的灰色孢子 ;而野生型 7100 在相同培养条件下 ,白色气生菌丝还没有完全变成灰色的孢子 (图版 I -B) ;延长培养时间至 72h ,三者均已完全变为灰色孢子 ,但野生型

7100 产生的灰色孢子不如 SAR11 和 SAR22 丰富,延长培养时间到 96h 时,则三者表型一致。经光学显微镜观察菌丝和孢子,结果与上述一致:SAR11 和 SAR22 较野生型 7100 产生灰色孢子的时间稍早,而 SAR11 和 SAR22 两者没有明显差异,表明当野生型中增加一个 *samR* 拷贝时,圈卷产色链霉菌发育分化中孢子形成稍快一些,但进一步增加其拷贝数,圈卷产色链霉菌分化并没有进一步的加快和增强,意味着 *samR* 可能存在自调控作用或者受到其他途径的严格调控。

2.3 *samR* 基因在大肠杆菌中的表达及 GST::SamR 蛋白的纯化

用 *Bam*HI 和 *Not*I 处理的 p1-p2 PCR 产物,连接到用同样酶处理的 pGEX-4T-3 上得重组质粒 pRX3 (图版 I-C)。用 *Bam*HI 和 *Not*I 酶切 pRX3 得到 639bp 的目的片段,说明该片段已克隆到表达载体上。随机挑选两个克隆测序,证明所得到的克隆是正确的。

将构建好的融合表达质粒 pRX3 转化 *E. coli* BL21DE3,按照操作手册进行蛋白纯化^[14]。SDS-PAGE 结果显示所得纯化蛋白约为 50kD,与预算大小相近,且电泳带单一,纯化产物的浓度约为 1 μ g/ μ L (图 1,第 5 泳道)。

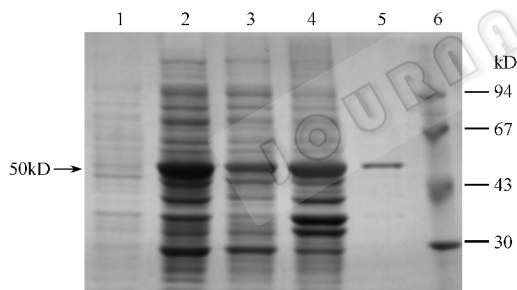


图1 *samR* 在大肠杆菌中的表达及纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of expression and purification of GST::*samR* in *E. coli*

1. Crude protein before induction ; 2. Crude protein after 3h induction ;
3. Supernatant after sonification ; 4. Pellet after sonification ;
5. Purification of SamR::GST protein ; 6. Protein molecular marker.

2.4 SamR 与自身启动子区的结合作用

首先用 T4 激酶标记引物 p4,与引物 p3 一引通过 hot-PCR 获得 355bp 的 DNA 片段,该片段含有所有 *samR* 上游的非编码区。经 Sephadex-G50 chromatography 纯化后(按说明书进行)用作与 SamR 蛋白结合的片段。

为了验证 *samR* 是否存在自调控作用,进行了 SamR 与其自身调控区的结合实验。等量的标记的 DNA 探针与纯化的蛋白 GST::SamR 进行凝胶阻滞分析,随着加入蛋白量的增加,被蛋白结合的滞后的

DNA 量也增多(图 2)。当 500ng 非标记的 *samR* 启动子区 DNA 片段加入时,可以完全消除这种结合作用(未显示),但其他区域的 DNA 片段的加入不影响该结合作用;作为对照,纯化的 GST 不能与任何浓度的标记 DNA 结合(照片未显示)。这些结果经多次重复,证明 SamR 与自身启动子区域的结合作用是特异的,不受 GST 蛋白的影响。这一结果证明 *samR* 基因可能存在自调控作用,进一步的转录水平的验证工作正在进行之中。

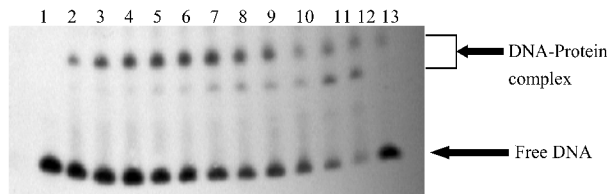


图2 SamR 与自身启动子区的结合

Fig.2 Binding of SamR with *samR* promoter

1. DNA probe with no GST::SamR protein ; 2 ~ 12. DNA probe with different concentration of SamR::GST protein (100ng, 200ng, 400ng, 600ng, 800ng, 1000ng, 1200ng, 1400ng, 1600ng, 1800ng and 2000ng respectively) ; 13. The labeled DNA fragment was added 20 min later after the non-labeled DNA reacted with the GST::SamR.

3 讨论

本实验室的前期工作克隆了 *samR* 基因^[11]。这是在链霉菌中首次克隆到 IclR 家族的基因。IclR 家族是原核生物中特有的一类转录调控因子,主要参与碳源或氮源分支代谢途径的调控。如红球菌中 *iclR* 家族的 *hppR* 基因主要参与芳香化合物的代谢调控^[15]。而大肠杆菌中的 IclR 调控 *aceBAK* 操纵子,同时调控自身的表达。但是到目前为止,除了本研究组报道的 *samR* 基因外,还未见其他的 IclR 家族蛋白参与发育分化调控的报道。因此研究和揭示 *samR* 基因调控链霉菌发育分化的分子机制具有重要的理论意义。

要揭示 *samR* 基因调控发育分化的分子机制,需要回答一系列的问题,如:链霉菌中 *samR* 是否存在类似于 IclR 的自调控机制?是否在链霉菌中也存在类似于 IclR 的靶基因?本文着重回答 *samR* 是否存在自调控的问题。关于其靶基因的克隆和研究将另文报道。

本研究从两个方面证实了圈卷产色链霉菌中 *samR* 存在自调控作用。首先通过构建含不同拷贝数 *samR* 的菌株并进行表型和形态观察,证明野生型中增加单一的 *samR* 拷贝,使孢子的成熟提前了近一天。但是在野生型中转入高拷贝的 *samR* 并没有使产孢时间进一步提前,其效果与增加单一拷贝时相同。说明 *samR* 的表达水平受到严谨的控制。

这种控制可能是其受到其它调控因子的作用而产生的,也可能是 *samR* 自身调控的结果。但从大肠杆菌中相似基因的研究结果来看,*iclR* 的自调控作用是维持其转录水平稳定的主要原因^[9,10]。因此,推测圈卷产色链霉菌中 *samR* 的自调控作用,是其完成发育分化中调控功能的重要机制。

体外结合实验进一步证明了 *samR* 可能存在自调控作用。在体外 EMSA 试验中,*SamR* 蛋白与上游调控区 355bp 的 DNA 间有特异性的结合作用,这种结合是由 *SamR* N-端特异的 DNA 结合域 α -helix-turn- α -helix 与 DNA 片段的特定区域所形成的特殊的高级结构间的共同作用完成的。自结合作用是体内自调控作用的必要条件。最新研究发现,链霉菌中的分化调控因子 *bldD* 也存在强的自结合作用^[16]。该基因是天蓝色链霉菌中调控早期分化相关基因 *whiG* 表达的重要调控因子。

关于基因自调控的最直接的证据,应该来自对野生型和 *samR* 突变株中的该基因转录水平的研究。对圈卷产色链霉菌中 *samR* 不同时间点的 mRNA 的 SI 分析正在进行之中。

本文首次报道了链霉菌中 *IclR* 家族蛋白的自调控作用,对于阐明 *samR* 在分化中的分子调控机制具有开创性的意义,同时也为链霉菌发育分化调控网络的阐明提供了新的实验证据。

参 考 文 献

- [1] 谭华荣. 链霉菌分化的分子遗传学研究的新进展. 微生物学通报, 1993, **20**: 348 - 354.
- [2] Bentley S D, Chater K F, Cerdano-Tarraga A M, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature, 2002, **417**: 141 - 147.

- [3] Chater K F. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. Trends Genet, 1989, **5**: 372 - 376.
- [4] Chater K F. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? Curr Opin Microbiol, 2001, **4**: 667 - 673.
- [5] Marie A E, Maureen J B, Mark J, et al. BldD is direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol Microbiol, 2001, **40**(1): 257 - 269.
- [6] Chung J, Klumpp D J, LaPorte D C. Glyoxylate bypass operon of *E. coli*: cloning and determination of functional map. J Bacteriol, 1988, **170**: 386 - 392.
- [7] Sunnarborg, A., Klumpp D J, Chung T, et al. Regulation of the glyoxylate bypass operon: cloning and characterization of *iclR*. J Bacteriol, 1990, **172**: 2742 - 2649.
- [8] Resnik E, Pan B, Ramani N, et al. Integration host factor amplifies the induction of aceBAK operon of *E. coli* by relieving *IclR* repression. J Bacteriol, 1996, **178**: 2715 - 2717.
- [9] Negre D, J C, Cortay A, Galinier P, et al. Specific interactions between the *IclR* repressor of acetate operon of *E. coli* and its operator. J Mol Biol, 1992, **228**: 23 - 29.
- [10] Gui L, Alden S, Bin P, et al. Autoregulation of *iclR*, the gene encoding the repressor of the glyoxylate bypass operon. J Bacteriol, 1996, **178**: 321 - 324.
- [11] Tan H, Tian Y, Yang H, et al. A novel *Streptomyces* gene, *samR*, with different effects on differentiation of *Streptomyces ansochromogenes* and *Streptomyces coelicolor*. Arch Microbiol, 2002, **177**: 274 - 278.
- [12] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [14] Pharmacia Biotech. GST Gene Fusion System. 3rd ed. Revision 1. 1997.
- [15] Barnes M R, Duetz W A, Williams P A. A 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid catabolic pathway in *Rhodococcus globerulus* PED1: cloning and characterization of the *hpp* operon. J Bacteriol, 1997, **179**: 6245 - 6153.
- [16] Marie A E, Tory R L, Claire M G, et al. BldD from *Streptomyces coelicolor* is a non-essential global regulator that binds its own promoter as a dimer. FEMS Microbiology Letters, 2003, **225**: 35 - 40.

Preliminary study on autoregulation of *samR* involved in development and differentiation of *Streptomyces ansochromogenes*

YANG Yan-ling YANG Hai-hua* TAN Hua-rong
(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The previous result showed that *samR* plays an important role in the development progress of *Streptomyces ansochromogenes*. It was reported that the differentiation progress of *S. ansochromogenes* was accelerated by a recombinant plasmid containing an extra copy of *samR* gene. However, the differentiation progress of *S. ansochromogenes* was not further accelerated by a multicopy plasmid containing *samR* gene. Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) demonstrated that *SamR* binds to its own promoter region specifically. All these results hint that *samR* is an autoregulatory gene in *Streptomyces ansochromogenes*.

Key words: *Streptomyces* differentiation, *samR* gene, Autoregulation