

大肠杆菌 AS1.76 青霉素 G 酰化酶基因的克隆和定位*

张其玖 张兰芳 韩恒湘

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

陈兰香 韩建洪 刘 琼

(宜昌市生物技术开发中心, 宜昌)

通过 DNA 体外重组,由 *E. coli* AS 1.76 菌株染色体 DNA 获得了青霉素 G 酰化酶基因克隆。测定了 pPGA20 质粒的限制性内切酶图谱,并构建了若干个 pPGA20 的变种。这些变种的酶活力及其酶切位点关系的分析结果表明,青霉素 G 酰化酶基因定位在 *Hind*III 和 *Sma*I 酶切位点之间小于 2.8Kb DNA 片段上。

关键词 青霉素 G 酰化酶;限制性内切酶图谱;基因定位

半合成抗生素是当前医药工业发展的一个十分活跃的领域。6-氨基青霉烷酸(6-APA)是半合成青霉素的重要原料。大肠杆菌青霉素 G 酰化酶(EC3.5.1.11),不仅能催化青霉素 G 生成 6-APA,而且在一定条件下,可以催化合成半合成青霉素。所以这个酶在医药生产上具有重要的经济意义^[1,2]。为了获得产青霉素 G 酰化酶高产菌株,常规育种方法发挥了重要作用。近年来,分子克隆技术已经得到了广泛地运用。有关青霉素 G 酰化酶基因克隆的研究已有了报道^[3,4]。本文介绍以大肠杆菌 AS 1.76 菌株为材料进行的青霉素 G 酰化酶的基因克隆和 pPGA20 质粒 DNA 限制性酶切图谱以及该酶基因定位的研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌株和质粒

大肠杆菌 AS 1.76 青霉素 G 酰化酶生产菌由中国科学院微生物研究所酰化酶小组提供^[5]。大肠杆菌 HB 101 和 MC 106 为转化时的受体菌。载体质粒 pWR 13 由中国科学院上海细胞

生物学研究所郭礼和同志提供^[6]。芽孢杆菌噬菌体 SppI DNA 为中国科学院微生物研究所郑文尧同志赠给。SppI DNA 经 *Eco*RI 酶切后,作为标准分子量。

(二) 培养基和培养条件

LB 培养基^[7]:作为受体菌培养用。LBP 培养基的营养成分与 LB 培养基相同,但加入 0.15% 的苯乙酸作为青霉素 G 酰化酶的诱导物。

AS 培养基:组成成分(%): KH_2PO_4 1.36, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, CaCl_2 0.008, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, 乳酸 1.0, 酵母粉 0.1, NaOH 0.4 和苯乙酸 0.15。调 pH7.2。

LBP 和 AS 培养基供作检定青霉素 G 酰化酶基因克隆用。

与青霉素 G 酰化酶的基因克隆有关菌株,通常在 28℃ 或 24℃ 培养 26 到 34 小时后,检测其酶活性。

(三) DNA 制备

质粒 DNA 的制备基本上参考文献[8],所得 DNA 制品再经 RNase A 和 RNase T₁ 水解 RNA 后,经 Sepharose 2B 分离,即得纯净的 DNA。

* 本文于 1986 年 9 月 27 日收到。

赵丁奎同志参加部分工作,特此致谢。

大肠杆菌 AS1.76 染色体 DNA 的制备按文献[9]进行。

酶切 DNA 大片段的分离与制备均采用本实验室建立的陷井法。即在制胶时, 在点样孔泳动前进方向的适当位置, 予制一个比点样孔稍宽、稍长、稍深的槽孔。电泳时, 当所需的 DNA 片段接近陷井时(约 1cm), 换以高浓度 TBE 缓冲液, 并提高电压, 在紫外光灯下, 观察样品进陷井、停电, 收集样品。用乙醇沉淀, 并以 70% 乙醇洗 DNA 沉淀三次。最后将样品悬浮于适量的 TE 缓冲液中备用。

(四) DNA 操作

DNA 的酶切、连接和转化均参考文献 [7]。实验中所用的酶均按供货单位说明书进行。

(五) 青霉素 G 酰化酶基因克隆的检定^[10]。

(六) 酶和化学试剂

本文用的限制性内切酶, 除 *EcoRI* 和 *PstI* 为自制产品外, 其余的均购自美国 Biolabs 和西德 Boehringer 公司。T₄ DNA 连接酶和 T₄ 多核苷酸激酶为我所生化厂产品; S₁ 核酸酶系 Boehringer 公司产品; DNA 聚合酶 I Klenow 片段和 Bal31 核酸酶系 Biolabs 公司产品。

2-硝基-5-苯乙酰胺苯甲酸(NIPAB)购自上海东风试剂厂。其它化学试剂均系市售分析纯产品。

结果和讨论

(一) 青霉素 G 酰化酶基因克隆

大肠杆菌 AS1.76 染色体 DNA 经 *EcoRI* 酶切后, 连接到高拷贝的 pWR13 质粒上, 转化到大肠杆菌 HB101 细胞中。转化细胞涂在 LBP 培养基平皿上(含有 50u/ml 氨苄青霉素), 28℃ 培养 36 小时。将 NIPAB 试纸盖在平皿的菌落上, 纸片湿透后取出, 放在无菌平皿内, 37℃ 保温约 15 分钟, 即可记录实验结果。凡菌落呈黄色者即表示具有青霉素 G 酰化酶活性; 菌落仍为本色者表示无该酶活性。我们在不到 1000 个转化子中获得一个 NIPAB 阳性反应菌株(pPGA10)。经酶切分析证

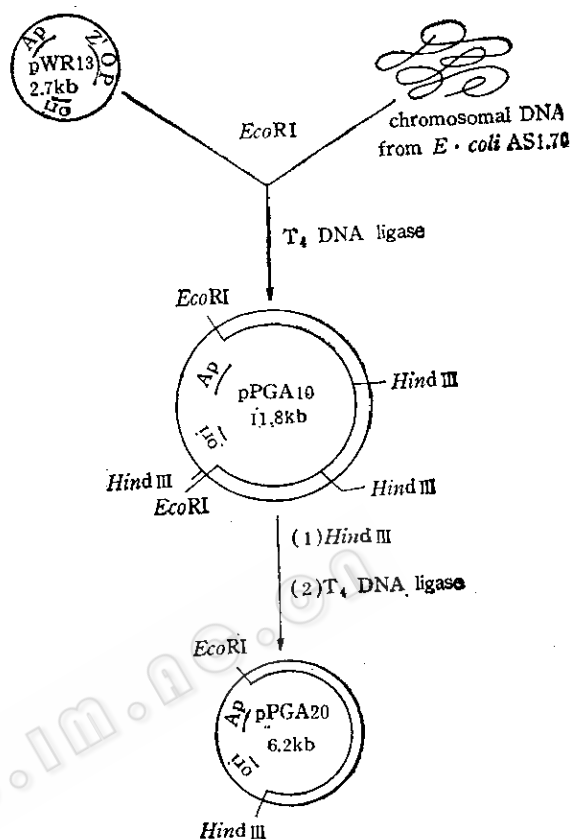


图1 pPGA10 和 pPGA20 质粒的构建

Fig. 1 Construction of plasmids pPGA10 and pPGA20

细线代表质粒载体, 空心线代表 *E. coli* AS1.76 克隆 DNA 片段。

Thin lines symbolize plasmid vector and open area cloned DNA fragments from *E. coli* AS1.76.

明, pPGA10 质粒含有一个约 9.0Kb 的克隆 DNA 片段。此结果与文献[4]报告的 pPA1 质粒插入片段相似。pPGA10 DNA 经 *HindIII* 酶切、连接、转化, 分离得到 pPGA20 重组质粒。经酶切和青霉素 G 酰化酶活性测定证明, 该质粒含编码青霉素 G 酰化酶基因的 3.5kb DNA 片段。有关 pPGA10 和 pPGA20 质粒的构建操作程序如图 1 所示。

为了检定青霉素 G 酰化酶基因克隆,

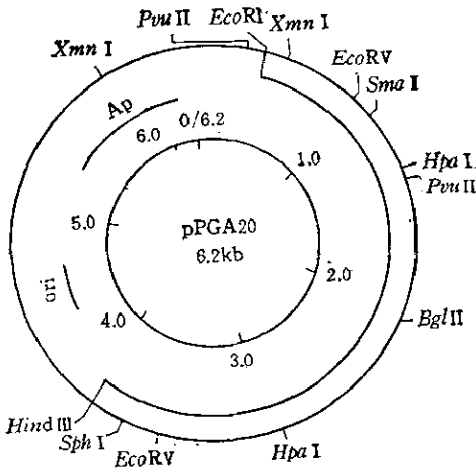


图2 pPGA20 质粒的限制性内切酶图谱
Fig. 2 Restriction endonuclease map of plasmid pPGA20

我们采用 NIPAB 试纸法, 与 Mayer 等^[3]建立的敏感指示菌平皿复盖法比较, 本法具有简便、快速、重复性好等优点, 大大提

高了工作效率。

(二) pPGA20 质粒的限制性内切酶图谱

为了确定青霉素G酰化酶结构基因的大小与定位, 我们分析了 pPGA20 质粒的限制性酶切图谱。在测试的 14 种限制酶中, 除 *Bam*HI *Cl*aI, *Pst*I, *Kpn*I *Bst*II 和 *Sal*I 无切点外, *Eco*RI, *Hind*III, *Pvu*II, *Sph*I, *Sma*I 和 *Xmn*I 各有一个切点, *Eco*RV 和 *Hpa*I 各有两个切点。将上述有切点的酶, 以交叉组合酶切 pPGA20 DNA, 经电泳得出酶切 DNA 片段的数目和大小, 从而绘制出质粒酶切图谱 (图2)。pPGA20 质粒限制性内切酶图谱比文献 [11] 中的 pPA1 酶切图谱描述的较详细。此外, 我们在 pPGA20 质粒的 3.5Kb 克隆 DNA 片段上发现有 *Sma*I 和 *Sph*I 切点各一个。他们在 pPA1 质粒的 9.1Kb 克隆

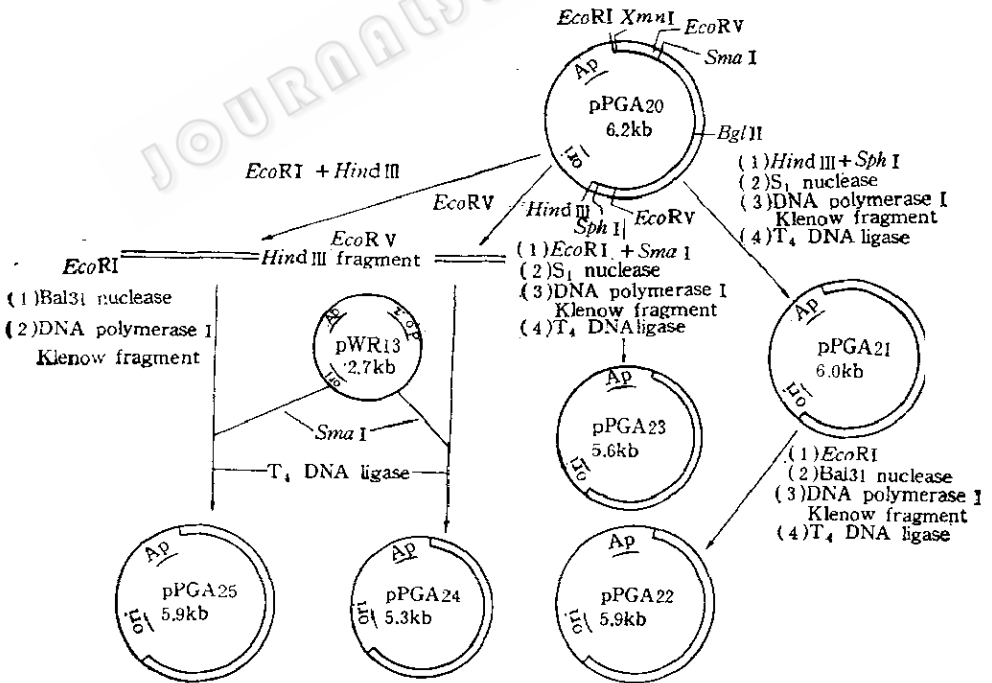


图3 pPGA21—pPGA24 质粒的构建图谱

Fig. 3 Construction scheme of plasmids pPGA21—pPGA24

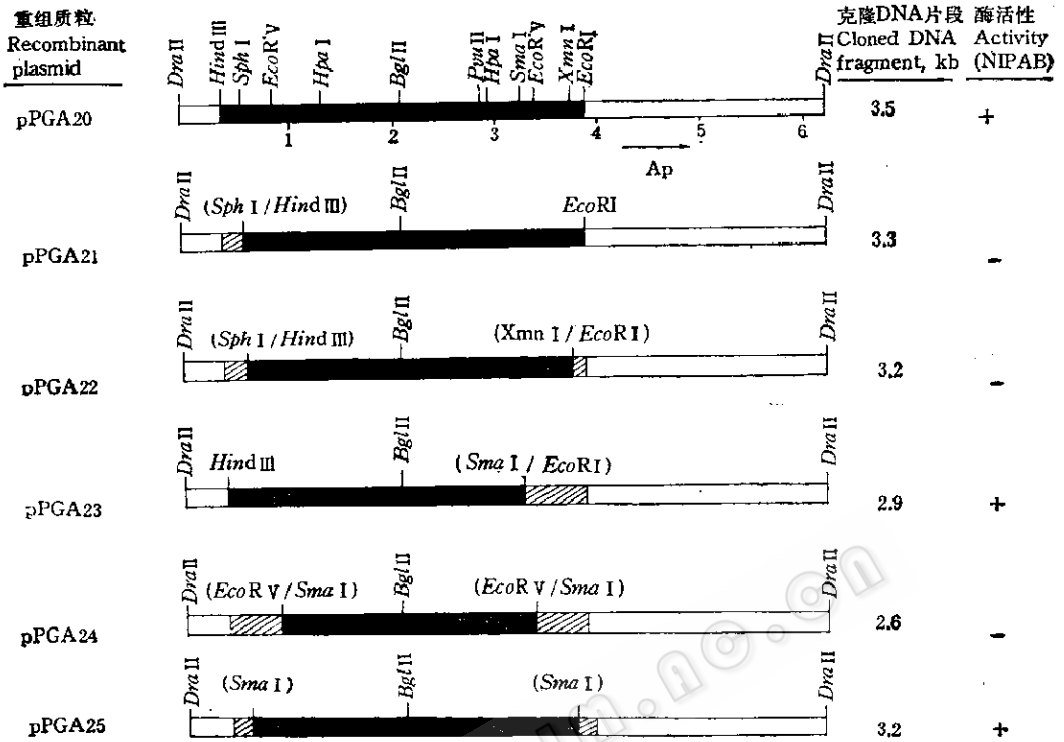


图4 pPGA21—pPGA24 质粒性的简要图示

Fig. 4 Schematic diagram summarizing properties of pPGA21—pPGA24

黑线代表 *E. coli* AS1.76 克隆的 DNA 片段;影线部分表示被删节掉的 DNA 片段;空心线代表载体质粒。
The black lines represent the cloned DNA fragments from *E. coli* AS1.76, hatched area deleted DNA fragments and open one the vector plasmids.

DNA 片段上均未发现这两个切点。他们还把 pVUII 切点定位在与青霉素 G 酰化酶结构基因无关的 B 片段上。我们的结果表明,该酶切位点是在青霉素 G 酰化酶基因上。这些差别是否由于所采用的不同菌株染色体 DNA 结构上的差异造成的,尚待进一步研究。

(三) 青霉素 G 酰化酶结构基因的大小与定位

为了确定青霉素 G 酰化酶结构基因的大小与定位,将 pPGA20 质粒 DNA 经适当酶切,作进一步克隆,获得了若干个变种。这些变种质粒的构建过程如图 3 所示。用 NIPAB 试纸测定了这些变种的青霉素 G 酰化酶活性,同时分析了变种质粒

DNA 酶切位点的变动情况,结果归纳在图 4 中。如将 *Hind* III-*Sph* I DNA 片段由 pPGA20 质粒中切除,或者将其 *EcoRV* DNA 片段克隆到 *Sma* I 酶切处理的 pWR13 质粒上,所得变种质粒 (pPGA21, pPGA22 和 pPGA24),其酶基因均不能正常表达。然而,如果将 *EcoRI*-*Sma* I DNA 片段从 pPGA20 质粒上删除,所得变种 (pPGA23) 对 NIPAB 呈阳性反应。此外,我们将含有该酶的 *Hind* III-*EcoRI* DNA 片段以 *Bal* 31 核酸酶作限制性酶切,将其片段与 *Sma* I 处理过的 pWR13 质粒连接、转化,获得了含有 pPGA25 质粒的菌株。经限制性内切酶切点分析,近 *EcoRI* 端的 *Xmn* I 酶切位点已丢失,而靠

近 *Hind* III 端的 *Sph* I 酶切位点仍保留。这些结果表明, *Eco* RI-*Hind* III DNA 片段经 *Bal* 31 酶切处理后, 两端各切除约 150 个碱基对, pPGA25 质粒含有克隆 DNA 片段约 3.2kb。此克隆株对 NIPAB 呈阳性反应, 青霉素 G 酰化酶基因仍能正常表达, 说明该酶结构基因未受到破坏。这些变种酶活力及其酶切位点关系的分析结果表明: 青霉素 G 酰化酶基因定位在 *Hind* III 和 *Sma* I 间的小于 2.8kb DNA 片段上。这与吴汝平等(第二次基因结构、克隆和表达讨论会, 1985) 报告的 2.1kb 结果不同, 而与 Schumacher^[12] 的结果 2.6kb 接近。

参 考 文 献

[1] Vandamme, E. J. et al.: *Advance in Applied*

Microbiology, 17: 311—369, 1974.

- [2] Vandamme, E. J.: *Economic Microbiology*, 5: 468—522, 1981.
- [3] Mayer, H. et al.: *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance* (eds. by Timmis, K. N., and Puhler, A.), Elsevier/North-Holland Biomedical, Amsterdam, 459—470, 1979.
- [4] 杨胜利等: 生物工程学报, 1: 29—35, 1985。
- [5] 张启先等: 微生物学报, 19: 302—308, 1979。
- [6] 郭礼和等: 生物工程学报, 1: 14—33, 1985。
- [7] Manjatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., p. 68; 102—104; 146; 250—251, 1982.
- [8] Bioboim, H. C. and J. Doly: *Nucleic Acids Research*, 7: 1513—1522, 1979.
- [9] 敖世洲等: 遗传学报, 10: 85—90, 1983。
- [10] Zhang, Q. J. et al.: *Anal. Biochem.*, 156: 413—416, 1986.
- [11] 吴汝平等: 生物工程学报, 1: 12—19, 1985。
- [12] Schumacher, G. et al.: *Nucleic Acids Research*, 14: 5713—5721, 1986.

CLONING AND LOCATION OF THE PENICILLIN G ACYLASE GENE FROM *E. COLI* AS1.76

Zhang Qijiu Zhang Lanfang Han Hengxing

(Institute of Biophysics, the Chinese Academy of Sciences, Beijing)

Chen Lanxing Han Jianhong Liu Qiong

(The Center for Development of Biotechnology, Yichang)

A clone carrying the gene encoding penicillin G acylase has been obtained from *E. coli* AS1.76 chromosomal DNA by means of *in vitro* DNA recombination. Restriction endonuclease map of plasmid pPGA20 containing 3.5 kb cloned DNA fragment has been determined. Several mutant derivatives were constructed from plasmid pPGA20 by using subcloning. Our results of assay of their enzymatic activities and analysis of restriction

endonuclease sites show that the gene encoding penicillin G acylase is located in no more than 2.8 kb DNA fragment between *Hind*III and *Sma*I sites.

Key words

Penicillin G acylase; Restriction endonuclease map; Gene location