

大肠杆菌棉子糖操纵子 α -半乳糖苷酶表达的调节控制

苏悌之 元珊 运文慧 徐铃

(北京市营养研究所, 北京)

大肠杆菌棉子糖操纵子 (*raf*) 位于质粒, 其第一结构基因 *rafA* 编码的 α -半乳糖苷酶为诱导酶。 *raf* 操纵子比乳糖操纵子 (*lac*) 或蜜二糖操纵子 (*mel*) 对诱导物有更严格的结构特异性。该酶被蜜二糖或棉子糖诱导, 也被 D-半乳糖微弱诱导, 但不受乳糖、PNPG 等结构相近糖所诱导。 α -半乳糖苷酶的酶诱导形成能力在对数生长末期出现高峰。 *raf* 操纵子基因结构组成及调节与乳糖操纵子相似。以阻遏物为中介的负调控在 *raf* 操纵子调节中起主要作用, 同时以环腺苷-代谢降解物基因激活蛋白 (cAMP-CAP) 为中介的正调控也参与调节。当 0.4% 葡萄糖加入到其它碳源培养基时, 该酶表达水平下降至原活力的 1/2—1/3。无论诱导或组成型酶的葡萄糖抑制均未见瞬时抑制。腺苷环化酶 (*cya*) 缺失或环腺苷受体蛋白 (*crp*) 和 *cya* 双缺陷菌株的酶表达则分别下降到原活力的 9% 和 2.5%。 *cya* 突变株或葡萄糖对 *raf* 操纵子表达的抑制可被 cAMP 解除, 但 *cya* 和 *crp* 双缺陷菌株仍有葡萄糖抑制, 而且这种抑制不为 cAMP 抵消, 表明通过降低 cAMP 而影响 cAMP-CAP 复合体形成还不能解释代谢降解物抑制的全部机制。尚无证据说明喹啉类小分子化合物和低浓度尿素对 *raf* 操纵子表达的明显作用。

关键词 棉子糖操纵子; α -半乳糖苷酶; 基因调节

大肠杆菌有两种与 α -半乳糖苷酶形成有关的操纵子^[1], 即位于染色体的蜜二糖操纵子 (*mel*) 和位于质粒的棉子糖操纵子 (*raf*)。遗传学证据阐明^[2,3] *raf* 操纵子由位于结构基因上游的调节基因 R 及一个由三个基因即 A、B、D 组成的多顺反子所构成。*rafA* 为编码 α -半乳糖苷酶的结构基因。许多与碳源代谢有关的操纵子, 如乳糖操纵子 (*lac*)、半乳糖操纵子 (*gal*) 及阿拉伯糖操纵子 (*ara*) 等的结构与调节已有较详尽研究, 但有关 *raf* 操纵子的调节控制, 迄今未见系统报道。

α -半乳糖苷酶在制糖及食品工业上有一定应用前景^[4]。为了阐明其超量生产的规律, 我们使用不同表达水平质粒, 就 *raf* 操纵子的诱导及代谢降解物抑制等调控进行了研究。

材料和 方法

(一) 材料

1. 菌株与质粒: 本研究使用的菌株及质粒分别由 Schmitt、Beckwith 和 Mooi 馈赠 (表 1)。质粒 PRSD2-1 为野生型质粒 PRSD2 的组成型自然突变。PRU613 由上述质粒的 Sall-EcoRI 片段与质粒 PACYC184 重组后获得。菌株 CA8404 为抗代谢降解物抑制突变株。

2. 试剂: 对硝基苯基 α -D-半乳糖苷 (PNPG)、间硝基苯基 β -D-半乳糖苷 (ONPG)、异丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自 SIGMA; 棉子糖、乳糖、半乳糖、蜜二糖购自 Fluka; cAMP 购自 Boehringer Mannheim。

(二) 方法

1. α -半乳糖苷酶活力测定: 参照 Schmitt 方

本文于 1987 年 7 月 9 日收到。

表 1 使用的菌株、质粒及其特性

Table 1 Characteristics of the strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strain/plasmid	特 性 Characters	来 源 Origin
菌株 Strain		
G7	F', K ₈₈ ab ⁺ , Raf ⁺ , LT ⁺ , ST ⁺	Mooni
M1900	F ⁻ , Lac-96(i ⁺ z ⁺ y ⁻), mel-4, metA, str ^r	Schmitt
D1021	M1900(PRSD2)	Schmitt
DS25-91	Raf ^c , M1900(PRSD2-1)	Schmitt
RN107	M1900(PRU613)	
CA8000	HfrH, thi	Beckwith
CA8306	HfrH, thi, Δ cya	Beckwith
CA8445	HfrH, thi, Δ cya, crp45, rpsI	Beckwith
CA8404	HfrH, thi, Δ cya, crp04	Beckwith
质粒 Plasmid		
pRSD2	Raf/H ₂ S	Schmitt
pRSD2-1	Raf ^c /H ₂ S	Schmitt
pRU613	RafA, Amp ^r	Schmitt

法^[1],但改用 pH 7.5 含 35mmol/L 巯基乙醇的 0.1mol/L 磷酸缓冲液。反应液组成: 0.27ml 磷酸缓冲液, 15 μ l 20mmol PNPG, 15 μ l 酶液。测定前,在细胞悬液中加入 1 滴氯仿,2 滴 1% SDS,振荡 10 秒钟。以 0.45ml Na₂CO₃(0.2mol) 终止反应。37℃ 每分钟催化产生 1 μ mol 对硝基苯酚的酶量为 1 个酶活单位。

2.培养条件: 采用 LBT 培养基^[13]或 M9 限制培养基。以 1% 过夜种子培养液接种,使其 OD₆₀₀ 为 0.2—0.3 后供各种条件试验。

3. α -半乳糖苷酶诱导比活增加: 当菌体密度至 OD₆₀₀ = 0.1 时,加入诱导物,每间隔 15min 取样,立即加入 255 μ g/ml 氯霉素终止反应,测定 OD₆₀₀ 及酶活。取样 6 次,以酶活对 OD₆₀₀ 作图求出斜率 ($r > 0.99$) 作为该反应条件下之比活,其与对照差值为比活增加,以酶活单位/OD₆₀₀ 表示。

结 果 和 讨 论

(一) α -半乳糖苷酶诱导

大肠杆菌质粒编码的 α -半乳糖苷酶是一种诱导酶,在棉子糖操纵子的调控中

表 2 不同表达水平 α -半乳糖苷酶比活及代谢降解物抑制(单位/OD₆₀₀)

Table 2 The specific activity of α -galactosidase at different expression levels and catabolite repression(unit/OD₆₀₀)

菌 株 Strain	-葡萄糖 -Glu	+葡萄糖 +Glu(0.4%)
D1021	7.3	40.0
DS25-91	946.7	442.0
BN107	5332.3	2150.7

诱导亦占居主要地位。从表 2 不难看出,组成型突变株 DS2591 的酶比活比野生型 D1021 高 129.7 倍。将含 α -半乳糖苷酶基因 rafA 的 DNA 片段与高考贝质粒 PACYC 184 重组,含此杂合质粒的菌株 BN 107 的酶水平可进一步提高 4.6 倍。Barton 法^[1]酶活测定表明,其摇瓶水平的产酶能力已比迄今报道的最佳工业用 α -半乳糖苷酶生产菌^[4]高 1.7 倍。

1. 诱导物: 表 3 中所列 D-半乳糖衍生物中,仅蜜二糖和棉子糖有强诱导作用,

表3 糖苷键及结构相近糖对 α -半乳糖苷酶的诱导*

Table 3 The α -galactosidase induction by raffinose and structurally related sugars*

糖 Sugar	比活增加 Differential rate (unit/OD ₆₀₀)
诱导物 Inducer	
蜜二糖 Melibiose	53.5±4.6
棉子糖 Raffinose	41.3±4.8
半乳糖 Galactose	2.9±1.0
非诱导物 Non-inducer	
乳糖 Lactose	0.1±0.3
麦芽糖 Maltose	-0.4±0.1
葡萄糖 Glucose	-0.6±0.1
甘露糖 Mannose	-0.2±0.0
果糖 Fructose	0.2±0.5
阿拉伯糖 Arabinose	0.0±0.2
α -PNPG	-0.4±0.6
β -ONPG	-0.2±0.6
β -IPTG	-0.6±0.4

* 野生菌株 G7 在含 1mmol 各种糖的 LBT 培养基中诱导 30min。重复 2—3 次。 α -PNPG: 对硝基苯基 α -D-半乳糖苷; β -ONPG: 间硝基苯基 β -半乳糖苷; β -IPTG: 异丙基 β -D-噻半乳糖苷。

The wild type strain G7 was induced by 1mmol sugar for 30min in LBT medium, 2—3 duplicated to triplicated.

α -PNPG: p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside; β -ONPG: o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside; β -IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside.

其中蜜二糖诱导作用最强。棉子糖比蜜二糖分子结构中增加了果糖基，而诱导作用明显减弱。与蜜二糖糖苷键构型不同的乳糖和配糖基为硝基苯取代的 PNPG 无诱导作用。因此棉子糖操纵子比乳糖操纵子^[6]或蜜二糖操纵子^[7]对诱导物有更强的立体结构选择性。后二种操纵子可互为糖

苷键构型不同的乳糖和蜜二糖所诱导。

2. 酶诱导形成能力 (EFC): 菌体生长不同时期因细胞生理状态差异, α -半乳糖苷酶诱导形成能力有明显差别 (图 1)。酶诱导形成能力的峰值出现在对数生长末期。未经诱导的菌株在对数生长初期随菌体量增加, 酶比活下降, 然而这一时期的酶诱导形成能力急剧增高。进入对数生长期后, 新酶合成速度超过生长速度, 对照组的比活缓慢增加。这时酶诱导形成能力持续上升, 直至对数生长末期达到高峰。菌体

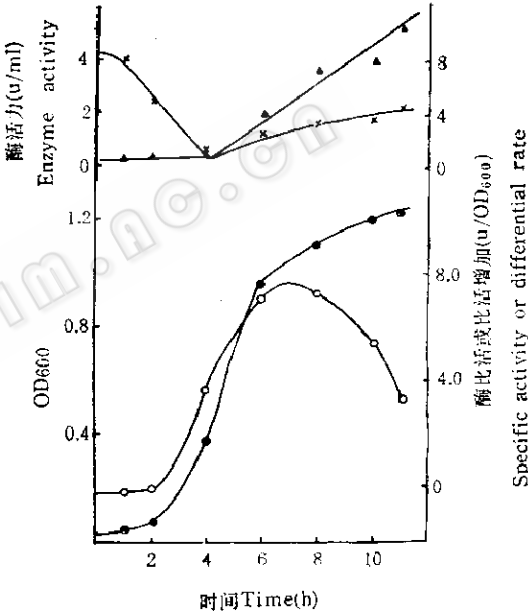


图1 α -半乳糖苷酶诱导形成能力与细胞生理状态关系

菌株 D1021 培养于 LBT 培养基, 每间隔 1h 取样并加入 0.4% 蜜二糖诱导 30min。×-×: 未诱导时酶的比活; ●-●: 菌体生长曲线; ▲-▲: 未诱导时的酶活; ○-○: 诱导后酶比活增加

Fig. 1 The relationship between enzyme-formation capacity of α -galactosidase and the physiological state of the cells

The strain D1021 was grown in LBT medium and aliquot was withdraw every 60 min with 0.4% melibiose induction for 30 min. ×-×: Specific activity without induction; ●-●: Growth curve; ▲-▲: enzyme activity without induction; ○-○: Differential rate with induction

表 4 厌氧条件对 α -半乳糖苷酶诱导的影响*
Table 4 The effect of anaerobiosis on α -galactosidase induction*

培养条件 Growth condition	振 荡 Shaking	静 止 Without shaking	振 荡 Shaking
α -半乳糖苷酶活增加 Increase of α -galactosidase activity	177.9	59.9	132.3
菌体增加 Increase of bacterial mass	0.454	0.081	0.401
比活增加 Differential rate	386	717	348

* 菌株 D1021 过夜种子接入含 0.4% 棉子糖 LBT 培养基,振荡培养 30min,静止 30min,再振荡培养 30min。间隔 10min 取样。
The strain D1021 cultured overnight was inoculated into LBT medium containing 0.4% raffinose according to the scheme of shaking \rightarrow still culture \rightarrow shaking, 30min for each. Aliquot was withdraw every every 10min.

进入生长停滞期后酶诱导形成能力明显下降。这一结果与以往对乳糖操纵子的 β -半乳糖苷酶的酶诱导形成能力的报道有所不同,后者的酶诱导形成能力曲线分别在停滞期和静止期出现两个高峰^[7]。至于差别的原因及酶诱导形成能力与细胞生理状况的内在联系尚不清楚。

3. 诱导与有氧代谢: 据 Burstein 报道^[8],厌氧环境及 NaN_3 存在均使蜜二糖操纵子编码的 α -半乳糖苷酶产量下降,并以此作为该酶必需辅酶 NAD 的佐证之一。我们发现,棉子糖操纵子编码的 α -半乳糖苷酶虽不需 NAD 作辅酶^[1],但产酶过程同样受到通氧条件影响(表 4),而且 10 mmol/L NaN_3 即可使酶诱导形成能力抑制 97% (资料未列出)。厌氧环境对生长的影响明显超过对产酶过程影响,因此静止培养时的比活反而高。以上结果说明,有氧代谢对产酶的影响还包括通过影响生长和代谢而产生的间接作用,不是需要 NAD 辅酶的证据。

(二) 代谢降解物抑制

1. 瞬时抑制和永久抑制: 葡萄糖加入到以甘油等为碳源的培养基中之后,菌体在约 1/2 倍增时间内产酶急剧降低。这一现象称作瞬时抑制。此后产酶能力恢复到

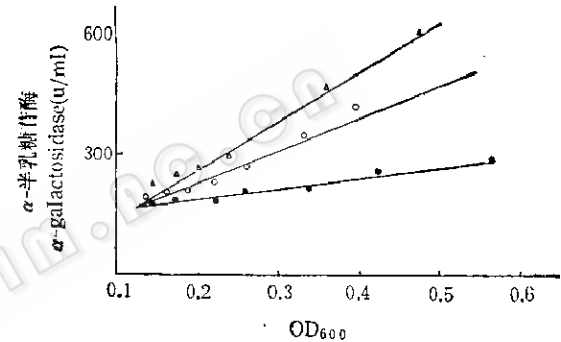


图 2 代谢降解物抑制对 α -半乳糖苷酶形成的影响
菌株 BN107 培养于不同碳源 M9 + 胸腺嘧啶培养基中。 Δ — Δ : 0.4% 甘油; \bigcirc — \bigcirc : 甘油 + 0.4% 葡萄糖 + 5mmol cAMP; \bullet — \bullet : 0.4% 甘油 + 0.4% 葡萄糖。
Fig. 2 The effect of catabolite repression on the α -galactosidase forming
The stain BN107 was grow in M9 + thymine with different carbon sources.
 Δ — Δ : 0.4% Glycerol; \bigcirc — \bigcirc : 0.4% Glycerol + 0.4% Glucose + 5m mol cAMP; \bullet — \bullet : 0.4% Glycerol + 0.4% Glucose.

以葡萄糖为碳源的低产酶水平。这种在葡萄糖碳源培养基中的产酶下降称之为永久抑制^[9]。棉子糖操纵子具有葡萄糖效应,但是以不同表达水平质粒的产 α -半乳糖苷酶实验未能证实瞬时抑制存在(图 2)。0.4% 葡萄糖使酶活下降 1/2 左右(表 1),这一永久抑制可被 1—5 mmol cAMP 抵

消(图 2)。

2. cAMP-CAP 正调控: 目前已知一些位于质粒的操纵子也存在代谢降解物抑制现象,其表达受 cAMP 和 CAP 影响^[10]。我们分别在腺苷酶 (cya) 缺陷型、代谢降解物受体蛋白 (crp) 缺陷型以及抗代谢降解物抑制突变遗传背景下观察产 α -半乳糖苷酶的葡萄糖效应及 cAMP 影响。从表 5 可以看出: (1) 当仅 cya 缺陷时 (CA 8306),加入 cAMP 即可使表达水平接近对照 (CA8000),而 cya、crp 双缺陷型则不受 cAMP 影响 (CA8445),说明 α -半乳糖苷酶表达需要 cAMP-CAP 复合体存在。(2) 0.4% 葡萄糖引起酶比活下降到原比活 1/2—1/3,在极端情况下,当 cya 或 crp 双缺陷时,酶比活仅为野生型的 2.5%。对照菌株 CA 8000 及 cya 缺陷菌株 CA 8306 的葡萄糖效应可被 1—5mmol 的 cAMP 基本抵消。(3) 抗代谢降解物抑制突变株的酶比活不受 cAMP 影响 (CA8404),但其

生长速度缓慢。(4) cya 和 crp 双缺陷株的产酶仍存在不被 cAMP 解除的葡萄糖效应 (CA8445),表明葡萄糖效应除通过降低 cAMP 而影响 cAMP-CAP 调节控制外,还包括其它效应。

虽然代谢降解物抑制是为人熟知的代谢调节之一,但对其作用机制至今仍有许多疑点^[11]。代谢降解物抑制时除胞内 cAMP 水平下降外,还会造成胞内诱导物浓度降低^[12]。此外, rho 因子^[13]、环鸟苷等代谢降解物调节因子 (CMF)^[14] 等也可能在葡萄糖效应中起一定作用。

棉子糖操纵子的序列分析表明,该操纵子并没有典型的“CAP-box”。但从上述结果不难看出,棉子糖操纵子确实存在代谢降解物抑制和以 cAMP-CAP 为中介的正调控。至于 CAP 的结合位点和 DNA 序列,尚有待进一步研究。

3. 代谢降解物基因调节: Kline^[15]的工作表明,吲哚乙酸等苯类小分子化合物,可

表 5 cAMP 对 α -半乳糖苷酶比活影响*

Table 5 The effect of cyclic AMP on the specific activity of α -galactosidase (u/OD₆₀₀)*

菌株 Strain	+葡萄糖 +Glu	+葡萄糖,环腺苷 +Glu, cAMP	对 照 Control	+环腺苷 +cAMP
CA8000(pRU613)	174.1	251.8 ^b	488.4	476.1 ^b
CA8306(pRU613)	12.8	203.2 ^b	44.1	372.9 ^b
CA8445(pRU613)	5.7	6.1 ^a	12.0	12.6 ^a
CA8404(pRU613)	465.4	479.0 ^a	387.2	—

* LBT 培养基培养,或加入 0.4% 葡萄糖,1mmol(a)或 5mmol (b) cAMP。

Growth in LBT with/without 0.4% glucose and 1 mmol (a) or 5 mmol (b) cAMP.

表 6 吲哚类化合物对 α -半乳糖苷酶比活影响*(u/OD₆₀₀)

Table 6 The effect of indole derivatives on the specific activity of α -galactosidase*

对 照 Control	+环腺苷 +cAMP	+吲哚乙酸 +IAA	+吲哚丙酸 +IPA	+吲哚丁酸 +IBA
15.9	133.2	11.5	5.6	17.9

* 菌株 CA8306 (pRU613) 在加有 1mmol cAMP 或 5mmol 吲哚衍生物的 M9+胸腺嘧啶的培养基中培养 40 min。

The strain CA 8306 (pRU613) was grow in M9+thymine minimum medium with 1 mmol cAMP or 5 mmol indole derivatives for 40 min.

以取代 cAMP 而解除代谢降解物抑制。这一现象称为代谢降解物基因调节(MGR)。然而我们用吡啶乙酸、吡啶丙酸和吡啶丁酸的实验结果并未证实棉子糖操纵子有类似的调节存在(表6)。另据同一作者报道^[15],乳糖操纵子仅当从染色体克隆到质粒之后才能看到吡啶类化合物取代 cAMP 解除代谢降解物抑制,因此认为其原因可能在于不同定位启动子的空间构型不同。但是棉子糖操纵子虽位于质粒却未见类似效应,似不能用构型不同来解释。

4. 尿素抑制:据 Brigitte 报道^[16],大肠杆菌的一些代谢物敏感操纵子的表达可被低浓度尿素(0.5—0.75mol)抑制,而菌体生长未见不同。我们用棉子糖操纵子重复相同实验,未能证实上述结论。

参 考 文 献

- [1] Schmid, K. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **67**: 95—104, 1976.
- [2] Schmitt, R. et al.: *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, p. 199—209, 1979.
- [3] Schmitt, R. et al.: *Gesellschaft Biol. Chem.*, **358**: 302, 1977.
- [4] 刘波等: *酶制剂工业*, 科学出版社, 北京, P. 780—794, 1984。
- [5] Barton, R. R. et al.: *Annal. Biochem.*, **14**: 258—260, 1966.
- [6] Koppel, J. L. et al.: *J. Gen. Physiol.*, **36**: 703—722, 1952.
- [7] Porter, C. J. et al.: *J. Gen. Physiol.*, **37**: 371—289, 1953.
- [8] Burstein, C. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **203**: 52—63, 1971.
- [9] Magasanik, B.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **26**: 249—256, 1961.
- [10] Summers, A. O. et al.: *J. Bacteriol.*, **149**: 191—197, 1982.
- [11] Alain, D. et al.: *Molec. Gen. Genet.*, **162**: 83—87, 1978.
- [12] Robert, L. P. et al.: *Nature*, **223**: 810—812, 1969.
- [13] Chantal, G. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **77**: 5799—5801, 1980.
- [14] Michael, A. et al.: *J. Bacteriol.*, **120**: 980—983, 1974.
- [15] Kline, E. L. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **193**: 340—348, 1984.
- [16] Brigitte, S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **71**: 1062—1068, 1976.

REGULATION IN THE EXPRESSION OF α -GALACTOSIDASE GENE IN RAF OPERON IN *ESCHERICHIA COLI*

Su Tizhi Qi Shan Yun Wenhui Xiu Ling

(Beijing Institute of Nutritional Resources, Beijing)

The α -galactosidase, coded for by the first structural gene *rafA* in the plasmid determined *raf* operon was an inducible enzyme. In contrast to *lac* or *mel* operon, *raf* operon has more strict structural specificity for inducers. The enzyme can be induced by melibiose and raffinose, or weakly by D-galactose, but not by structurally related sugars such as lactose, PNPG etc.. The α -galactosidase forming capacity as function of growth curve reached a single peak at the end of the logarithmic phase of the growth. The structure and regulation of *raf* operon is similar to those of *lac* operon. The repressor-mediated negative control plays a major role in the regulation of *raf* operon, and cAMP-CAP mediated positive control is also involved in the regulation.

When 0.4% glucose was added into the medium with other carbon sources, the expression of the enzyme was repressed by 2—3 fold. Transient catabolite repression has

been observed neither in inducible nor constitutive α -galactosidase expression. Based on α -galactosidase assay, in mutant strains CA8306(*cya*) and CA8445 (*cya*, *crp*) the expression level of *raf* operon was only 9% and 2.5% of that in wild type strain respectively. The glucose effect or the repression in *cya* mutant can be abolished by 1—5 mmol cAMP. The constitutive α -galactosidase expression in *cya* and *crp* double mutant (CA8445) remains repressible by glucose, but irreversible by cAMP, suggesting cAMP-CAP complex is not the exclusive mediator of the catabolic repression. No evidence showed any significant effect on *raf* operon by either indole derivatives or low concentration of urea as previous works reported in some other operons related to carbon source metabolism.

Key words

Raf operon; α -galactosidase; Gene regulation