

天蓝色链霉菌孢子形成的关键基因—— *whiG* 的诱导表达*

董可宁 杨海花 田宇清 吴 畏 谭华荣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 与链霉菌分化有关的 *whiG* 结构基因已亚克隆到链霉菌表达载体 pAK203 的 *tipA* 启动子下游。该启动子能被硫酸链霉素诱导。*whiG* 基因的诱导表达不仅可使天蓝色链霉菌孢子形成缺陷突变株 C71 恢复产生孢子的能力,而且也能使天蓝色链霉菌野生型菌株 J1501 和变铅青链霉菌 TK54 的孢子形成更为丰满。Western 杂交也进一步证实了诱导表达后 *whiG* 基因产物—— σ^{whiG} 产量的增加。这为依赖于 σ^{whiG} RNA 多聚酶的发育调控启动子体外转录的研究提供了有利条件。

关键词 链霉菌分化,孢子形成,基因表达

链霉菌是产生抗生素的主要微生物类群,同时也产生许多其他种类的次生代谢产物,因此它在工业微生物中占有十分重要的位置。链霉菌是革兰氏阳性的原核生物,复杂的分化过程和生活周期使它成为研究分化调控的良好模式材料,也可用以研究发育分化和次生代谢(如抗生素合成)的调控关系。天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) A3(2) 的形态突变体有两类:一类是光秃型突变株 (*bld*),不能产生气生菌丝及孢子、菌落光秃;另一类是白色突变株 (*whi*),能形成白色的气生菌丝,但不能形成正常的孢子^[1]。*S. coelicolor* A3(2) 气生菌丝的正常分化包括:菌丝分隔,孢壁加厚并形成孢子链,菌落表面也由白色转变为成熟孢子特有的灰褐色。在 *S. coelicolor* A3(2) 中,至少有八个基因 (*whiA*—*whiH*) 与孢子形成的形态分化有关^[1,2]。其中 *whiG* 的研究比较深入。*whiG* 在 *S. coelicolor* A3(2) 的气生菌丝起始形成孢子时起重要作用,但不影响菌丝正常生长。*whiG* 突变阻断了早期阶段的孢子形成,只能形成直的、不卷曲的气生菌丝,不能分隔和形成孢子。*whiG* 基因已被克隆^[3],序列分析及转录研究表明其产物为 Sigma 因子,称之为 σ^{whiG} ^[4,5]。本文报道 *whiG* 结构基因亚克隆到 *tipA* 启动子下游后,*whiG* 基因的诱导表达对 *S. coelicolor* 野生型菌株,孢子形成缺陷株以及变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 发育分化和孢子形成的影响。

1 材料与方 法

1.1 菌株及质粒

S. coelicolor J1501 (*hisA1*, *wraA1*, *Pgl*⁻, *SCP1*⁻, *SCP2*⁻), *S. coelicolor* C71 (*whiG71*, 孢子形成阻断突变株,保持白色的气生菌丝),以上菌株由 Chater 教授赠送。

* 中国科学院“八五”重点项目基金及国家自然科学基金支持。

本文于 1994 年 5 月 12 日收到。

S. lividans TK54 (*his*-2, *leu*-2, *spc*-1, SLP2⁻, SLP3⁻) 由 Hopwood 教授赠送。质粒 pIJ4412 (*thio*^r, 约 3.3kb 含 *whiG* 基因的 DNA 片段插入 pIJ702) 由 Chater 教授惠赠; pAK203 (*thio*^r, *km*^r, 含 *tipA* 启动子片段^[6,7]) 由 Takano 博士赠送。pIJ4474 (*thio*^r, *km*^r, 从 pIJ4412 来源的 2.7kb 的 DNA 片段插入 pAK203 的 *tipA* 启动子下游^[8])。

1.2 菌体培养及抗生素抗性检测培养基

R2YE、YEME 及 MM 培养基按文献[9]配制, R2YE 培养基用于常规的菌株培养, 制备孢子和原生质体再生; YEME 用于液体培养, 收集的菌体用于原生质体制备或质粒的提取; MM 培养基用于菌落形态分析。在 MM 培养基中以 0.5% 甘露醇代替葡萄糖。卡那霉素 (Km, Kanamycin) 使用浓度为 100μg/ml (R2YE) 或 7μg/ml (MM 及 YEME)。硫链丝菌素 (Thio, Thiostrepton) 的使用浓度为 50μg/ml (R2YE), 或 7μg/ml (MM 及 YEME)。

1.3 DNA 体外操作及重组质粒的转化

限制性内切酶酶切、琼脂糖凝胶电泳、DNA 从凝胶上洗脱、牛小肠碱性磷酸酯酶 (CIAP) 脱磷、DNA 片段末端的补平及原生质体的制备和重组质粒的转化均按文献[9]方法进行。

1.4 形态分化的观察

连续观察接种于 MM 及 R2YE 培养基上的菌株形成的基质菌丝、气生菌丝、孢子和色素。成熟的孢子具有其特有的灰褐色, 肉眼容易观察, 同时以相差显微镜检测形成孢子链和孢子的情况。

1.5 Western 杂交

Western blot 杂交基本按文献[10]方法进行。*whiG* 基因编码的两个寡聚多肽由 Nigel Davis 博士合成。经纯化后的两个多肽抗原注射到兔子体内, 三个月后从兔子中获得抗血清。高表达后的 *whiG* 经总蛋白提取及 SDS-PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 后电转移蛋白带到尼龙膜上。用适当的缓冲液洗膜后加上抗血清过夜培养。尼龙膜用适当的缓冲液清洗后, 加上羊抗兔二抗进行结合反应, 并进行显色观察。

2 结果

2.1 *whiG* 结构基因的亚克隆

为了将 *whiG* 结构基因置于 *tipA* 启动子调控之下, 我们将含有 *whiG* 的质粒 pIJ4412 以 MstII 酶切去除 *whiG* 上游原有的启动子序列, 切口以 Klenow 片段补齐, 再以 PstI 酶切, 分离纯化含有 *whiG* 基因的 2.7kbDNA 片段。以 BamHI 酶切载体 pAK203, 并以 Klenow 片段补平末端, 再以 PstI 酶切。将酶切后的载体与分离纯化的 *whiG* 片段连接, 转化 *S. lividans* TK54 得到重组质粒 pIJ4474 (图 1)。

2.2 含有 *whiG* 基因的重组质粒的转化

为了观察 *whiG* 结构基因在体内的表达, 将带有 *whiG* 基因的重组质粒 pIJ4474 和载体 pAK203 分别转化 *S. coelicolor* J1501、*S. coelicolor* C71 及 *S. lividans* TK54。选择 Km 抗性的转化子, 碱裂解法提取转化子的质粒 DNA, 并电泳检查。提取的重组

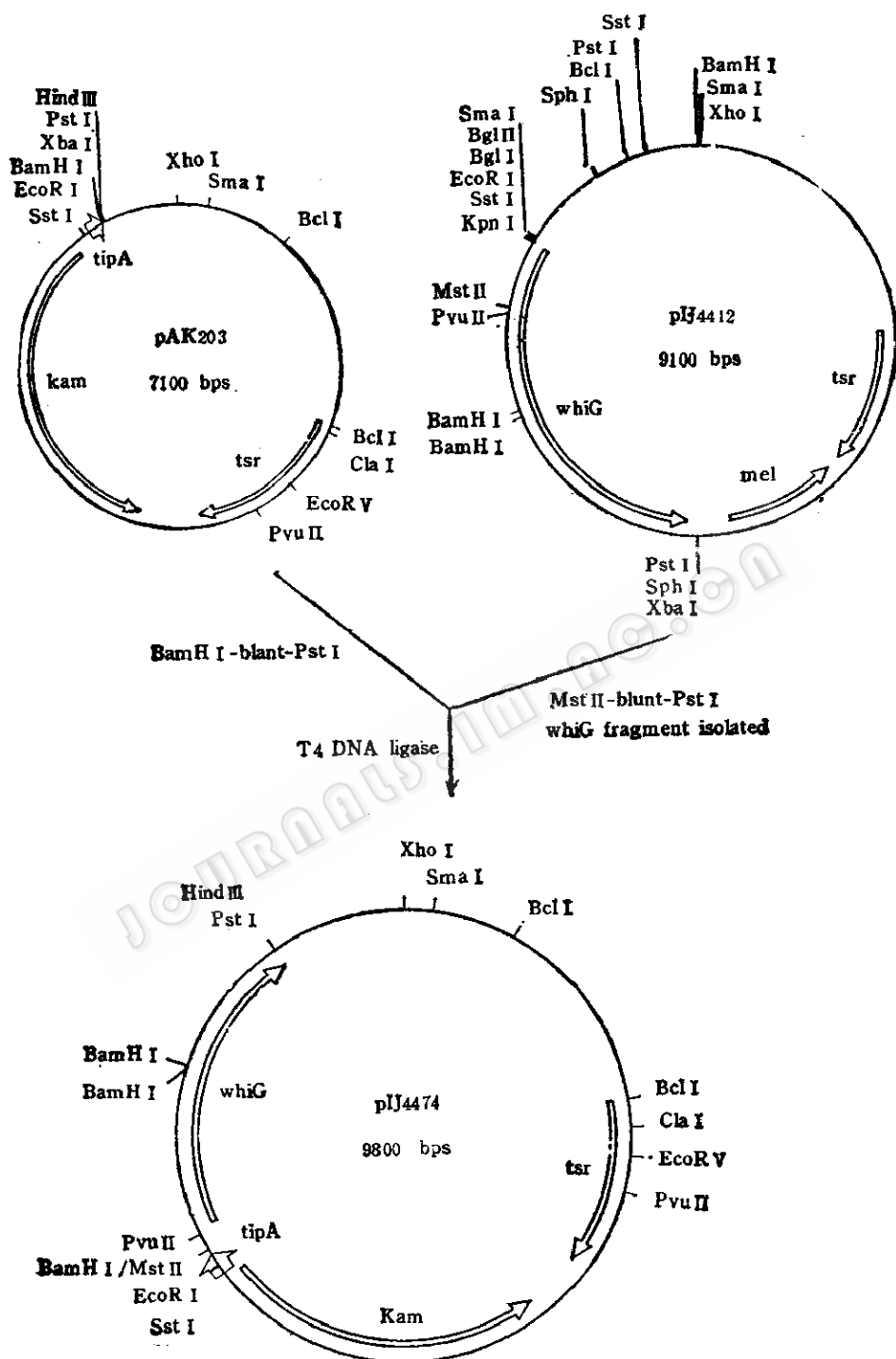


图1 pIJ4474 的构建

Fig. 1 The construction of pIJ4474

质粒 pIJ4474 以 PstI、EcoRI 或 HindIII、EcoRI 双酶切可以切除插入的 2.7kb 含有 *whiG* 基因的 DNA 片段。从宿主 *S. coelicolor* C71 及 *S. lividans* TK54 中提取的载体及重组质粒也得到同样的结果(图片未示)。

2.3 *whiG* 基因的诱导表达促进了 *S. coelicolor* J1501 的孢子形成

S. coelicolor J1501 为野生型菌株, 可以形成正常的成熟孢子, 但是比较 *S. coelicolor* J1501/pIJ4474 和 *S. coelicolor* J1501/pAK203 在 MM 培养基上生长、气生菌丝和孢子形成情况, 可以看到在没有硫链丝菌素诱导的情况下, 这两者的生长和孢子产生没有明显的区别(图 2)。当在基本培养基上添加硫链丝菌素诱导的情况下, *tipA* 启动子下游的 *whiG* 基因得到高效表达, 使 J1501/pIJ4474 形成丰满的灰褐色孢子(图 3)。

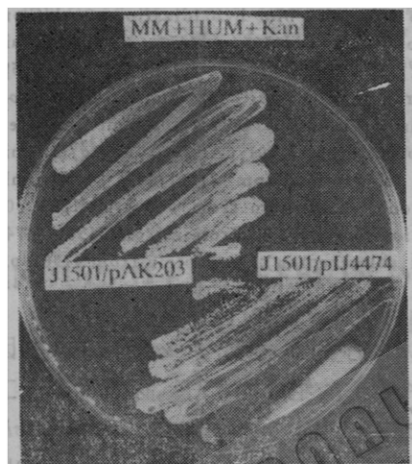


图 2 不诱导条件下的孢子形成

Fig. 2 Sporulation without thioester induction

注: HUM, 组氨酸+尿嘧啶+甘露醇

Note: HUM, Histidine + Uracil + Mannitol



图 3 硫链丝菌素诱导 *whiG* 基因的高效表达

Fig. 3 High expression of *whiG* with thioester induction

2.4 *whiG* 基因的诱导表达使 *S. coelicolor* C71 形成正常孢子

S. coelicolor C71 是 *whiG* 突变株, 不能产生 σ^{whiG} , 在缺陷突变株中克隆和表达 *whiG* 基因是鉴别其功能的直接证明。将 *S. coelicolor* C71/pIJ4474 和 *S. coelicolor* C71/pAK203 接种在含 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那霉素和 2—4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫链丝菌素的 MM 培养基上, *whiG* 基因的诱导表达明显地促进孢子形成, 而对照 C71/pAK203 仅产生白色的气生菌丝, 不形成孢子。从菌落表面取样涂片镜检, *S. coelicolor* C71/pAK203 的样品只能看到气生菌丝, 不见孢子; 而 *S. coelicolor* C71/pIJ4474 的样品可见到孢子链和大量正常孢子, 说明了 *whiG* 基因对孢子形成的作用(见图 4)。

2.5 *whiG* 基因在 *S. lividans* TK54 中的表达

将 *S. lividans* TK54/pIJ4474、*S. lividans* TK54/pAK203 和 *S. lividans* TK54 接种于固体基本培养基上于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7d, 菌落形态观察和显微检查均可看到 *S. lividans* TK54/pIJ4474 的孢子较 *S. lividans* TK54/pAK203 明显丰富。

2.6 *whiG* 基因蛋白产物的 Western blot 杂交

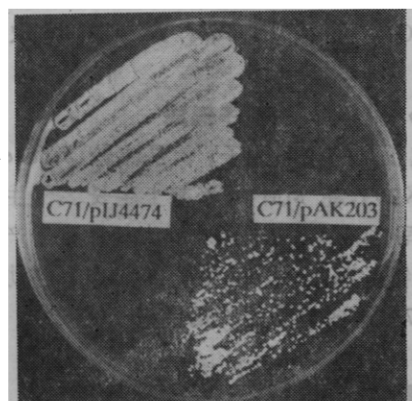


图4 硫链丝菌素诱导 *whiG* 基因在天蓝色链霉菌 C71 中的表达

Fig. 4 Expression of *whiG* in *S. coelicolor* C71 with thiostrepton induction

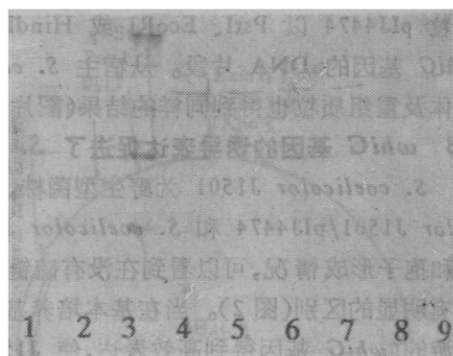


图5 *whiG* 基因蛋白产物的 Western blot 杂交

Fig. 5 Western blot hybridization of *whiG* product
1. Protein from J1501/pIJ4474 (2.5μg/ml thiostrepton); 2. Protein from J1501/pAK203 (2.5μg/ml thiostrepton); 3. *whiG* product from *E. coli*; 4. Protein from J1501/4474 (1.0μg/ml thiostrepton); 5. Protein from J1501/pAK203 (1.0μg/ml thiostrepton); 6. Protein from J1501/4474 (0.5μg/ml thiostrepton); 7. Protein from J1501/pAK203 (0.5μg/ml thiostrepton); 8. Protein from J1501/4474 (0.25μg/ml thiostrepton); 9. Protein from J1501/pAK203 (0.25μg/ml thiostrepton).

根据已测定的 *whiG* 结构基因序列推导氨基酸序列^[4], 合成了 *whiG* 结构基因所编码的第 2—17 氨基酸组成的 16 肽和第 210—224 氨基酸组成的 15 肽, 以这两个人工合成的多肽为抗原免疫家兔, 制备抗体, 并和从 *S. coelicolor* J1501/pIJ4474 和 *S. coelicolor* J1501/pAK203 提取的蛋白进行 Western 杂交。从图 5 的杂交结果可以看出, 当以 0.5—2.0μg/ml 的硫链丝菌素诱导 *S. coelicolor* J1501/pIJ4474 时, 得到的 σ^{whiG} 的 30ku 蛋白区带的杂交信号均较对照 *S. coelicolor* J1501/pAK203 强。这进一步证明了硫链丝菌素的诱导确实增强了 *whiG* 的表达, 增加了 σ^{whiG} 的产量。

3 讨论

whiG 结构基因在 *S. coelicolor* 野生型菌株 J1501 以及 *S. lividans* TK54 中的诱导表达, 明显地促进了分化过程, 丰富了孢子的形成。*whiG* 结构基因在孢子形成缺陷株 *S. coelicolor* C71 中的表达, 结果尤为明显。使不产生孢子的 C71 产生孢子, 可更明确地看到 *whiG* 基因的功能。

Chater KF 等^[4]曾报道将含有 *whiG* 基因及其上下游序列的 3.3kb 片段克隆到高拷贝质粒 pIJ702 转化 *S. coelicolor* J1501, 转化子 *S. coelicolor* J1501/pIJ4412 的孢子形成期提早, 甚至基质菌丝也能形成孢子。过早的细胞分化反而影响了菌落生长。本文的工作是将 3.3kb 含有 *whiG* 基因的 DNA 片段进一步缩小, 去除 *whiG* 基因的上下游序列及其自身的启动子, 将 *whiG* 基因置于可诱导的 *tipA* 启动子下游。据文献报道^[7]在变铅青链霉菌中 *tipA* 诱导表达可使某些基因表达产物增加 200 倍左右。我们在 *S. coelicolor* J1501/pIJ4474 生长早期不加诱导, 当细胞生长量足够时, 再以硫链丝菌素

诱导,这样可以更有效地表达 *whiG* 基因,得到更多的 *whiG* 产物—— σ^{whiG} , 这为 *whiG* 基因产物的提取纯化及进行依赖于 σ^{whiG} 的启动子(如 P_{TH4} , P_{TH270} , P_{28-1}) 的体外转录等的深入研究提供了必要的条件。

参 考 文 献

- [1] 谭华荣. 微生物学通报, 1994, 20(6): 348—354.
- [2] Chater K F. *J Gen Microbiol*, 1972, 72: 9—29.
- [3] Mendez C, Chater K F. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5715—5720.
- [4] Chater K F, Bruton C J, Plasyic K A *et al*. *Cell*, 1989, 59: 133—143.
- [5] Tan H, Chater K F. *J Bacteriol*, 1993, 175: 933—940.
- [6] Kuhstoss S, Rao R N. *Gene*, 1991, 103: 97—99.
- [7] Murakami T, Hole T G, Thompson T J. *J Bacteriol*, 1989, 171: 1459—1466.
- [8] Tan H. Ph. D. Thesis, University of East Anglia, England. 1991.
- [9] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al*. *Genetic Manipulation of Streptomyces*, A Laboratory Manual. Norwich, England: Joun Innes Foundation, 1985. 123—167, 231—241.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory manual*. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Soliveri J, Vijgenboom E, Granozzi C *et al*. *J Gen Microbiology*, 1993, 139: 2569—2578.

INDUCED EXPRESSION OF *whiG*, A GENE CRUCIAL FOR SPORULATION OF *STREPTOMYCES COELICOLOR*

Dong Kening Yang Haihua Tian Yuqing Wu Wei Tan Huarong

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract *whiG* gene has been subcloned into *Streptomyces* expression vector pAK203 containing inducible promoter *tipA*. The expression of *whiG* gene promoted the spore formation of *S. coelicolor* J1501 and recovered the sporulation ability of *whiG*-deficient *S. coelicolor* C71. Increased amount of *whiG* gene product was detected by Western blot hybridization after induction of thiostrepton. It will be helpful for the future study of in vitro transcription of *whiG*-dependent promoters.

Key words *Streptomyces* differentiation, Sporulation, Gene Expression