

链霉菌发育调控启动子—— P_{TH270} 对细胞分化的影响*

谭华荣 杨海花 田宇清 吴畏

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

Chater K. F.

(英国约翰纳斯研究所 诺里季)

在原核生物发育分化的分子生物学研究中,以枯草杆菌为模式系统进行了许多研究^[1,2],但其生命周期特别是分化过程比较简单,不象链霉菌有基质菌丝、气生菌丝、菌丝分隔形成多细胞,然后断裂形成单孢子的过程。链霉菌的这一性状与真核生物丝状真菌的分化相似。因此在原核生物中,链霉菌是研究分化基因表达调控的良好模式材料,为在时空上研究发育分化基因的多水平调控提供了有利条件。

链霉菌的发育调控启动子(P_{TH270})是国际上首先克隆的两个启动子之一^[3]。一些研究结果表明该启动子依赖于链霉菌分化关键基因——*whiG*。虽然该启动子的序列已被测定,启动子的-10区和-35区已被精确定位^[3],但该启动子在链霉菌发育分化中是如何调控的,当它以高拷贝数的形式存在时对细胞内含物的组份有何影响,这种影响怎样与分化关联,这些都是有待解决的重要问题。本文报道这方面的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌种及质粒

天蓝色链霉菌 J1501 (*Streptomyces coelicolor* J1501) (*hisA* 1, *uraA* 1, *strA* 1, *SCP1*⁻, *SCP2*⁻, *PgI*⁻), 天蓝色链霉菌 M145 和质粒 pIJ4083 (带有无启动子的儿茶酚加氧酶报告基因 *xyIE*) 均为本实验室收藏。

1.2 培养基

链霉菌液体生长培养基 (YEME), 原生质体再生培养基 (R2YE) 及基本培养基 (MM) 均按文献[4]方法配制。

1.3 抗生素、酶及试剂

硫链丝菌素 (Thiostrepton) 由美国 SQUIBB 医学研究所惠赠, 贮存液浓度为 100mg/ml (-20℃ 冰箱保存), 在 R2YE 培养基中使用浓度为 50μg/ml, 在 MM 中为 7μg/ml。Sau 3AI, BamHI, T4 DNA 连接酶及牛肠碱性磷酸酯酶 (CIAP) 为 Boehringer 公司产品。儿茶酚为 Chater 教授提供。

1.4 链霉菌原生质体制备、再生及转化

按文献[4,5]方法进行。

1.5 质粒 DNA 和总 DNA 的提取

按文献[4]方法进行。

1.6 链霉菌细胞形态及组分观察

在固体基本培养基上培养 5d 后的链霉菌, 通过细胞固定, 染色 (孢子切片用铅染色, 胞内糖原的观察用蛋白银染色) 及超薄切片的制备, 用电子显微镜观察了细胞形态及胞内的有关内含物, 尤其对与孢子形成有关的糖原进行了观察。

* 中国科学院基金资助项目及英国皇家学会合作研究项目的部分工作。

本文于 1996 年 2 月 13 日收到。

2 结果和讨论

2.1 重组质粒 pIJ4471 的构建

将已克隆的 758bp 的启动子 P_{TH270} 亚克隆到 pIJ4083 上, 转化天蓝色链霉菌 J1501 后, 通过硫链丝菌素的抗性及儿茶酚报告酶基因的表达筛选到了转化菌株。经液体菌丝体培养, 提取了重组质粒, 并命名为 pIJ4471。经限制性内切酶酶切实验验证, 其片段大小和方向都是正确的(图略)。

2.2 pIJ4471 对天蓝色链霉菌孢子形成的影响

当质粒 pIJ4083 及重组质粒 pIJ4471 分别转化 J1501, 并在含有 $7\mu\text{g/ml}$ 硫链丝菌素的 MM 上培养 5d 后, 制备超薄切片, 用电子显微镜分别观察了 J1501 / pIJ4083 和 J1501 / pIJ4471 两菌株的形态。结果表明 J1501 / pIJ4083 在培养基的表面有大量的铅染深黑的圆形孢子(图 1-A)。而 J1501 / pIJ4471 在同样条件下未观察到培养基表面有孢子, 只有浅色的气生菌丝片段(图 1-B)。表明高拷贝的启动子 (P_{TH270}) 在胞内被 σ^{wbc} RNA 多聚酶结合, 从而影响了 σ^{wbc} 去识别基因组上真正的靶位基因, 使靶位基因不能正常转录, 因此该启动子使儿茶酚报告酶基因表达的同时, 使链霉菌中孢子的形成受到抑制。

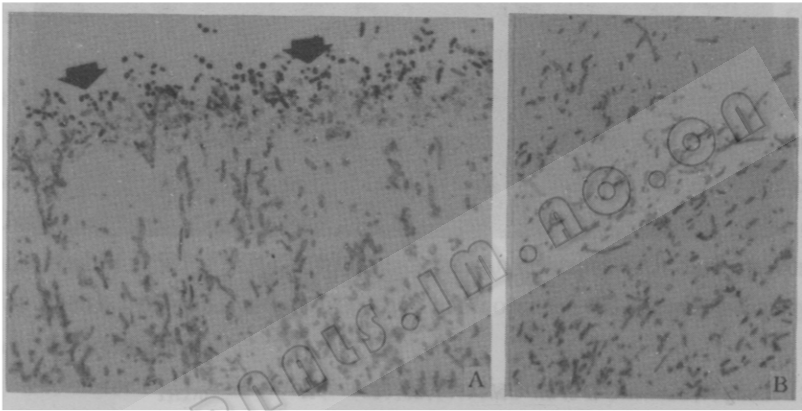


图 1 J1501 / pIJ4083 和 J1501 / pIJ4471 超薄切片后的孢子观察

2.3 P_{TH270} 对胞内糖原合成的影响

超薄切片的电子显微镜观察结果表明, J1501 / pIJ4083 的实验对照株能产生丰富的蛋白银染深黑

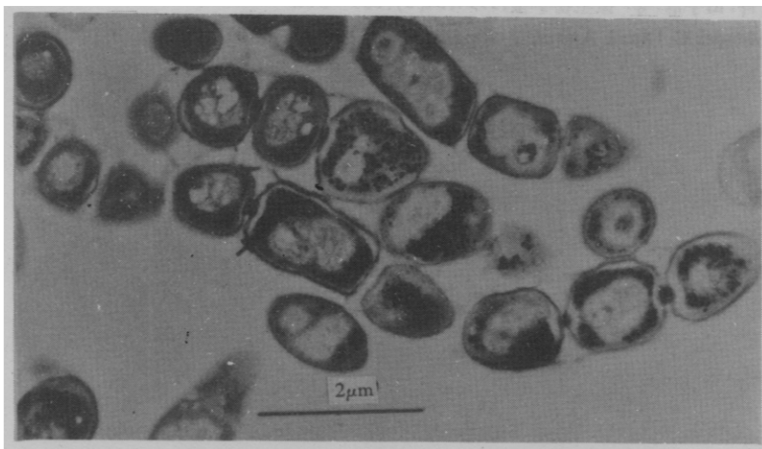


图 2 J1501 / pIJ4083 超薄切片后的糖原观察

的糖原(图 2),而在相同条件下 J1501 / pIJ4471 几乎没有糖原产生(图 3)。这表明高拷贝的启动子 (P_{TH270}) 在链霉菌中不但限制了发育分化中孢子的正常形成,而且也限制了糖原的产生。有关链霉菌中糖原的产生与孢子形成的关系已有报道^[6],糖原的合成一般是在孢子形成的早期,即在气生菌丝顶端部位开始合成糖原。糖原在细胞内的积累水平与气生菌丝发育成孢子有关,尤其在孢子成熟后期的色素合成阶段,糖原积累更丰富,这是因为糖原提供了碳源和能量。这表明高拷贝的启动子 (P_{TH270}) 在发育分化的多级调控中,既参与了孢子的形成调控又间接地调节糖原的生物合成。

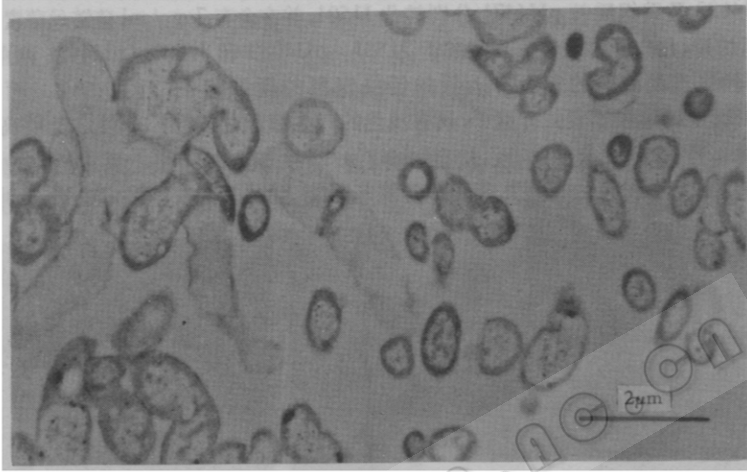


图 3 J1501 / pIJ4471 超薄切片后的糖原观察

参 考 文 献

- [1] Moran C P, Lang N, Banner C D *et al.* *Cell*, 1981, **25**: 783~791.
- [2] Helmann J D, Marquez L M, Chamberlin M J. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 1568~1574.
- [3] Tan H, Chater K F. *J Bacteriol*, 1993, **175**(4): 933~940.
- [4] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces — A Laboratory Manual*. Norwich England: The John Innes Foundation 1985.
- [5] 谭华荣, 徐冲, 田宇清, 等. *微生物学报*, 1994, **34**(5): 339~344.
- [6] Brana A F, Mendez C, Diaz L A *et al.* *J Gen Microbiol*, 1986, **132**: 1319~1326.

EFFECT OF PROMOTER—— P_{TH270} ON *STREPTOMYCES* DIFFERENTIATION

Tan Huarong Yang Haihua Tian Yuqing Wu Wei

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

Chater K. F.

(*John Innes Institute, Norwich, England*)

Abstract 758bp of promoter—— P_{TH270} was subcloned into *Streptomyces* plasmid pIJ4083. pIJ4471 was then obtained after recombinant plasmid was introduced into *Streptomyces coelicolor* J1501. *Streptomyces coelicolor* J1501 / pIJ4083 and J1501 / pIJ4471 were grown on minimal medium (MM) agar containing mannitol and $7\mu\text{g} / \text{ml}$ thiostrepton for 4 days, and ultrathin sections of colonies were stained with silver proteinate to demonstrate glycogen and observed in the electron microscope. Result indicated that the glycogen was produced by J1501 / pIJ4083, whereas glycogen was little produced by J1501 / pIJ4471. Also dark spores were not observed in J1501 / pIJ4471 with lead stain in contrast with dark spores which was produced by J1501 / pIJ4083, suggesting that promoter —— P_{TH270} was possibly related to *Streptomyces* differentiation.

Key words Promoter P_{TH270} , *Streptomyces*, Differentiation