

林可链霉菌黑色素生物合成 基因的克隆与表达

张惠展 姚 峰 孙丽萍

(华东理工大学大学生化工程系 上海 200237)

摘要 以 pIJ702 的 *melC1-C2* 基因为探针杂交林可链霉菌 (*Streptomyces lincolnensis*) 78-11 染色体 DNA, 呈现出 3.2kb 的 BamHI 片段和 2.6kb 的 SphI 片段等一系列阳性条带。构建了含 3.0~3.5kb BamHI 片段的林可链霉菌 78-11 基因文库, 从中分离克隆了黑色素生物合成基因 *melC1* 和 *melC2*, 并测定了含有 *mel* 基因的重组子 pRSB336 插入片段的全部 DNA 序列。3152bpBamHI 片段含有 5 个开放阅读框架, 其中 *melC1* 和 *melC2* 与链霉菌属三个种的相应基因具有较高的同源性。此外, 林可链霉菌 78-11 的 *melC2* 基因产物与人和鼠的酪氨酸酶轻微同源, 分别为 17.3% 和 24.5%。种种迹象表明, *melC1*, *melC2* 和 *orf3* 组成黑色素生物合成操纵子结构。为了进一步鉴定上述克隆的林可链霉菌 78-11 黑色素生物合成基因, 构建了分别含有新霉素抗性基因启动子和正反方向 *mel* 基因的重组质粒 pPZ518 和 pPZ519, 并转化变铅青链霉菌 TK23。随机挑选的 12 个 pPZ518 转化子在 R2YE 培养基上均能分泌淡褐色色素, 而所有的 pPZ519 和 pES1 转化子则都呈白色。

关键词 林可链霉菌, 黑色素生物合成基因, DNA 序列测定, 异源表达

分类号 Q78

黑色素是一类异源多聚芳香族化合物, 广泛存在于细菌乃至高等哺乳动物的体内, 具有重要的生理功能。在链霉菌属中, 黑色素的生物合成以 L-酪氨酸为起点, 经过多步反应最终形成高分子聚合物。前两步反应均由酪氨酸酶催化, 后续反应则在有氧条件下自发进行^[1]。前期链霉菌属黑色素生物合成遗传学的研究结果表明, 链霉菌属中存在着 Mell 和 MelII 两类不产黑色素的突变株, 前者胞内胞外均无酪氨酸酶活性^[2], 而后者仅丧失了酪氨酸酶的分泌功能^[3]。Mell 型突变株有三个相互独立的遗传位点与黑色素生物合成有关, 其中 *melA* 和 *melB* 参与调控, *melC* 则编码酪氨酸酶^[4]。抗生素链霉菌 (*Streptomyces antibioticus*) 和淡青链霉菌 (*Streptomyces glaucescens*) *melC* 操纵子已经被克隆鉴定, 它们的基因序列和 DNA 序列高度同源, 两个结构基因分别编码酪氨酸酶 (*melC2*) 和反式激活蛋白 (*melC1*), 后者对铜离子传递以及酪氨酸酶分泌都是必需的^[5]。

在林可链霉菌 (*Streptomyces lincolnensis*) 中, 黑色素和林可霉素的生物合成途径均以 L-酪氨酸为起点。为了研究这两个代谢途径之间的关系, 我们从林可霉素生产菌林可链霉菌 78-11 中克隆了黑色素生物合成基因, 并进行了序列测定和异源表达。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

1.1.1 菌株: 大肠杆菌 *E. coli* JM83[F⁻, ara, Δ(*lac*-*proAB*), *rpsL*, (Srf^t)], F80, d, Δ(*lacZ*), M15], 林可霉素生产菌林可链霉菌 78-11 (*Streptomyces lincolnensis*) [Pr], 变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) TK23[*spc*-1, *mel*⁻] 均系本教研室保存。

1.1.2 质粒: 大肠杆菌质粒 pSPORT1[*sp6*, T7, *lacZ*, *amp*], pUC18/ 19[*amp*, *lacZ*-α], pIJ702[*tsr*, *mel*] 由本教研室收藏。用来提供链霉菌核糖体结合位点 (RBS) 的重组质粒 pRBS1[*amp*, *lacZ*, *lacI*] 和大肠杆菌 / 链霉菌穿梭质粒 pES-1[*bla*, *tsr*, *neo*] 均来源于德国 U. Peschke 博士。

1.2 培养基

用于大肠杆菌培养的 LB 以及用于变铅青链霉菌培养的 YEME 及原生质体再生的培养基 R2YE 参见文献 [6]。胞外酪氨酸酶活性分析用的 AMT 琼脂培养基组成如下: Glycerol 1.5%, L-Arginine-HCl 0.5%, L-Leucine 0.1%, L-Methionine 0.03%, L-Tyrosine 0.1%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, CaCl₂ · 2H₂O 0.001%, FeSO₄ · 7H₂O 0.001%, CuSO₄ · 5H₂O 0.001%, ZnSO₄ · 7H₂O 0.001%, MnSO₄ · 4H₂O 0.004%, 琼脂 1.5%。用于林可链霉菌培养的 SM 培养基参见文献 [7]。

1.3 酶和试剂

限制性核酸内切酶和缺口平移试剂盒系 BRL 公司产品, T4-DNA 连接酶和 DNA 测序试剂盒为 Pharmacia 的产品, (α-³⁵S) dATP, (α-³²P) dCTP 及 HybondN⁺ 尼龙膜系 Amersham 公司产品。硫链丝菌素 (Thiostrepton) 为 Sigma 公司产品, 其它试剂均为国产分析纯。

1.4 一般操作

大肠杆菌质粒提取和转化均参照文献 [8] 进行。链霉菌原生质体的制备、再生及转化参照文献 [7] 进行。

1.5 DNA 片段回收

将含有 DNA 片段的琼脂糖凝胶块放入 Eppendorf 管内, 用无菌牙签捣碎, 用烧红的注射针头在 Eppendorf 管底部扎一小孔, 室温高速离心 1 min, 取出上清液, 乙醇沉淀 DNA 片段。

1.6 前移和分子杂交技术

缺口翻译依照试剂盒说明进行, DNA 杂交按文献 [7] 描述的方法进行。

1.7 DNA 序列测定

DNA 序列分析采用双脱氧末端终止法, 并依照 T4-DNA 聚合反应试剂盒上说明的操作规程进行, 测序使用 DNA 自动测序仪 ALF (Pharmacia 公司产品)。

1.8 电脑分析

DNA 序列及推测的氨基酸序列的整合、编辑、分析与比较采用 DNA-STRIDER1.1、CLUSTAL IV、SWISSPROT、PLASMID ARTIST1.13 和 Brujene II 在 Apple 公司的 Macintosh 上进行。

2 结果和讨论

2.1 黑色素生物合成基因(*melC*)在林可链霉菌78-11染色体DNA上的定位

由于来自 *S. antibioticus* 和 *S. glaucescens* 的黑色素生物合成基因(*melC*)具有很高的同源性,故采用 pIJ702 上 1.56kb 的 *Bcl*I 片段(来自 *S. antibioticus* 的 *melC* 基因)作为探针,分别杂交经多种酶水解的 *S. lincolnensis* 78-11 的染色体 DNA, 同时以 *Sst*I 水解的 *S. lividans* TK23 作为对照。表 1 结果表明, 经十一种酶水解的 *S. lincolnensis* 78-11 的染色体 DNA 片段均呈杂交阳性, 其中 *Bam*H I, *Bgl*II, *Bcl*I, *Sph*I 四种限制性片段呈单一阳性片段, 这暗示上述 DNA 片段包含了完整的 *melC* 基因。

表1 pIJ702 *melC*探针杂交 *S. lincolnensis* 78-11染色体DNA的阳性片段

Table 1 Positive fragments of *S. lincolnensis* 78-11 chromosome DNA hybridized by *melC* of pIJ702

染色体DNA来源	酶解DNA片段	杂交阳性DNA片段(kb)		
Origin of chromosome DNA	DNA fragments of digestion	Positive DNA fragments of hybridization		
<i>S. lincolnensis</i> 78-11	<i>Bam</i> H I	3.2		
	<i>Bcl</i> I	12.0		
	<i>Bgl</i> II	15.2		
	<i>Sph</i> I	2.6		
	<i>Sal</i> I	1.3	2.6	
	<i>Sma</i> I	1.0	1.7	
	<i>Sst</i> I	5.5	7.0	
	<i>Pst</i> I/ <i>Bss</i> H I	0.6	1.6	2.2
	<i>Nru</i> I/ <i>Eco</i> RI	1.8	4.4	
<i>S. lividans</i> TK23	<i>Sst</i> I	—		

2.2 林可链霉菌78-11黑色素生物合成基因(*melC*)的克隆

根据上述杂交结果, 采用鸟枪法克隆 *melC* 基因。*S. lincolnensis* 78-11 染色体 DNA 经 *Bam*H I 水解, 从琼脂糖凝胶上直接回收 3.0~3.5kb 范围的 DNA 片段, 并将之克隆到 pSPORT1 的 *Bam*H I 位点上, 转化大肠杆菌 *E. coli* JM83, 得到大约 500 个白色转化子, 然后仍采用同一探针进行菌落原位杂交, 得到 1 个阳性克隆, 由此克隆抽取的重组质粒命名为 pRSB336, 其限制性酶切图谱与染色体 DNA 的杂交数据相一致。

2.3 重组质粒 pRSB336 上 3.2kb *Bam*H I 插入片段的序列测定及分析

根据 pRSB336 的精细酶切图谱, 将其 3.2kb 的 *Bam*H I 插入片段用多种酶切成大小适宜的片段, 并克隆入 pUC18 的相应位点上, 获得十数个亚克隆, 然后分别测定其 DNA 序列(图 1)。将所测得的 3152bp 的 DNA 序列依照链霉菌密码子组成规则^[9]进行分析, 共发现五个开放阅读框架, 其中与 *melC1* 和 *melC2* 相对应的 *orf1* 和 *orf2* DNA 序列见(图 2)。*orf1* 和 *orf2* 分别编码 140 和 273 个氨基酸的蛋白质, 所对应的分子量分别为 14.2kD 和 30.8kD。3152bp 的 DNA 序列中 GC 含量为 70.2%, *orf1* 和 *orf2* 密码子 1,2,3 位上的 GC 含量分别为 80.9%, 56.0%, 87.2% 和 65.0%, 53.3%, 91.2%, 上述数据均与文献报道的链霉菌染色体 DNA 上 GC 含量相吻合(图 3)。

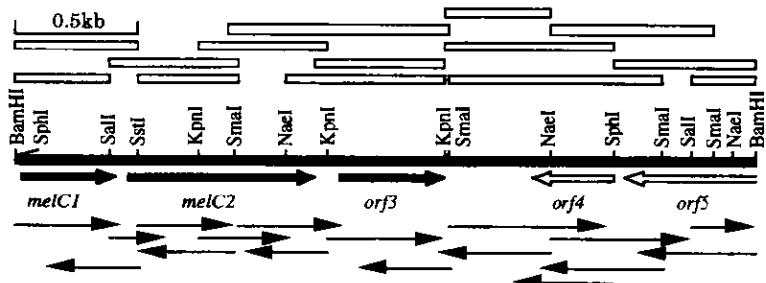


图 1 pRSB336 上 3.2kb BamHI DNA 的序列测定

Fig. 1 Sequencing of 3.2kb BamHI DNA fragment in pRSB336

 用于测序的亚克隆 Subclones for sequencing
 开放阅读框架 Open reading frame
 亚克隆的测序策略 Sequencing strategies of subclones

BamHI SphI
AGTCCTGGCCGACCTGGCCGACTCCCGCAGCCGCAGCTGAGCCGCCGACCTGCGCTCGGGGCGGAGGCCGAGCCGGAGCCGGCTCGCCGCGCTCGGGCGGAGCCCGCCCTGGCGCTCGCCGCGCTCGGGCGGAGCCGGCC

P G A A A A C H D G S P D V P L P C S L L D L L C P L L P L L L D E V
CGCGGGGCGCCGCCCGCAGACCAAGCGTCACCGGCAGCTTGTCCCCCTCTCTGGCTCTCCGAGCTCTCCCTCCCTCTCCCTCTCTGAGGAGT

I K G R G I Q G G P H R G G G H H H G T G Y A V F L D G V E L H V
CATCAAGGGCCGCGGATACAGGGCGGCCCTCACCGCGGGGCGGTACCCACCAACGGCAGCGCTACCGGGTGTCTGGACGGCTGGACGTGACGTG
GTAGTCTCCGGCGCCCTAGTCTCCGGCGGAGTGGCGCCCCGCGCACTGGTGTCGGCTGGCGATGGCCACAGAACCTGGCCACCTGGACCTGGAC
SalI

ATGGCGCACCGCCGACGGCGACTGAGTCAGCGCTCGTCAACCCACTACGACGCCGGTGCCACCCGGCGCCGGCAGCTGCGGGGTGACGAACTTCAGG
TACCGCTTGTGCGCTGCGCTGACACTAGTCGCAAGCAGTGGGTGATGCTGGGCACGGGTGCGGCGCAGCGCGCAGCTGCTTGAAGTCC

TGTGCGCTTGGCCGGTGCAAGTGGAGCAAGGACGGGCCTGGCGCTAAAGGACGACTCAANGCTTGCCTGGGAAGTCAGGCCACTACGGAG
 KpnI
 V A L P Y W D H S T D R S A R S S L W A P D F L G G T G R S R N G

R V T D G P F F R A A T G V W P I T V R L D G R A T Y L R R A L G G A G

CCGGCTTGTGCGCCGGGAGGTTGACTTCGGCTGTCTCATCCAGCTACGACATGCCGCTTGAGACAGGGCTCCTGGAGCTTCCGGCAACCCA
 SGGGACTCTGGCTGGCCGGAAACGGCGGGCTGGCCGAGCAGCCCTAGTGCGCACATAGCGCTGCCGCATAGCAGTCGCGGCCGCGCGCG
 CG
 CG
 R E L P T R A E V D S V L S I P T Y D H A P W N S A C G D F R P R H

L E G W R G V N T H V V W V V G G Q H A T G V Y S P N D P F V F W
TCTGGGAGGCTGGCAGGGCCTCAACCTGCACAAACAGGGTGATGTCCTGGGCGGGCAGATGGGCCACCGGGGTTCTGCCAACGAGCAGGGCTTGCTGG
AGACCTCCGACGGCCCCCGACTGGAGCTTGTGCTCCAGCTACAGCCCCAGCGCCCCCTAACCGGTTGGCCCCAGAGCGGCTTGCTGGCCCCAACGACC

NaeI

L	H	H	A	Y	I	D	K	L	W	A	Q	W	Q	R	R	H	R	T	P	A	Y	V	P	A	A	G	T	P	D	V	V	D	L									
CTG	CAT	ACCGC	G	TAC	ATC	GAC	AG	GTC	TGG	CCG	AG	TG	CG	AG	CC	CG	TAC	CCG	GAC	GCG	GG	GTA	TG	GC	GG	CC	GCG	GAC	GCG	GG	ACT	TGG	TGG	ACC								
GAC	GCT	AG	TAC	GCG	ATG	CGC	ATG	TGT	TTC	GAC	AC	CC	GGG	T	CC	GT	CG	GG	AG	GG	CT	TG	CG	GG	CC	CA	TAC	AC	GGG	CC	GCG	CC	TG	CG	GG	CT	TG	CA	CC	AC	CTT	GG

TGACGAGACGATGAAGCCCTGGCACGACGCTCCCGGGGACCTCTGGACCAACAGGCCACTAACCTTCAGCAGGACTGACGCTCCGGGGTACAGCTGCTCTGCCTACTCGAGGGGGCGCTTGACGACTTGGTGTGGCGGTGATGTGGAACTGTGCTACTCGAGGGCGCAGTG

图2 *S. lincolnensis* 78-11中 $melC1$ 和 $melC2$ DNA序列

Fig.2 DNA sequences of *melC1* and *melC2* in *S. lincolnensis* 78-11.

2.4 *orf1* 和 *orf2* 推测编码产物的性质鉴定

将 *orf1* 和 *orf2* 编码的蛋白质的氨基酸序列与来自 *S. antibioticus*、*S. glaucescens* 和 *S. galbus* 的相对应的 *melC1* 和 *melC2* 基因编码产物相比较,发现 *orf1* 与三种来源 *melC1* 的

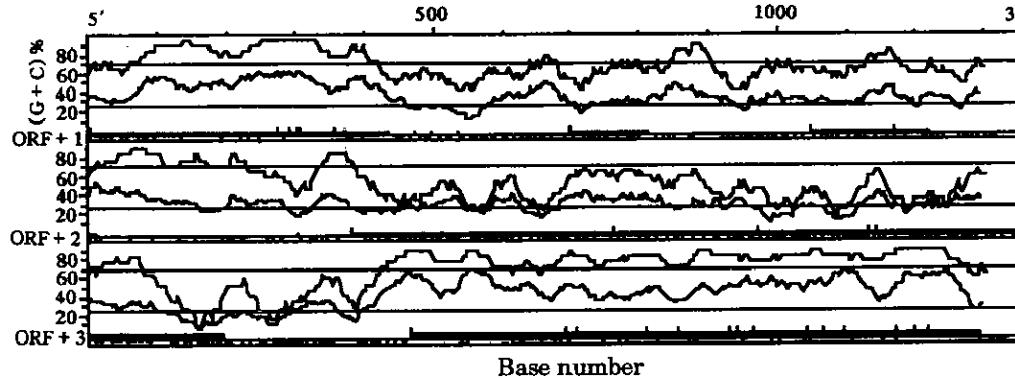


图3 林可链霉菌78-11 *melC1*和*melC2*的阅读框架分析

Fig.3 Coding Regions Analysis of *melC1* and *melC2* from *S.lincolnensis* 78-11

meIC1

melC2

S.lin. MTVRKQNAQT~~L~~TADEKRRFVTA~~V~~S-SSAARYDFTV~~H~~N~~E~~F~~I~~VA~~D~~T~~D~~NGERTG--HRSP-SFLPWHRRFLLEFERALQSVDASVA
S.ant. MTVRKQNAQLT~~E~~RAA~~V~~EL~~R~~KR~~G~~YD~~F~~V~~T~~HN~~E~~F~~I~~MS~~P~~RT~~T~~GR~~G~~PG~~H~~RLPLP~~L~~FLPWHRRFLLE~~Q~~ALQSVDSSVA
S.gal. MTVRKQNAAL~~T~~ADEKRRFVA~~A~~VEL~~R~~KR~~G~~YD~~F~~V~~T~~HN~~E~~F~~I~~MS~~P~~RT~~T~~GR~~G~~PG~~H~~RLPLP~~L~~FLPWHRRFLLE~~Q~~ALQSVDSSVA
S.gla. MTVRKQNAQT~~L~~TV~~D~~KE~~R~~R~~F~~V~~A~~EL~~R~~KR~~G~~YD~~F~~V~~T~~HN~~E~~F~~I~~MS~~P~~RT~~T~~GR~~G~~PG~~H~~RLPLP~~L~~FLPWHRRFLLE~~Q~~ALQSVDSSVA

S.lin. PWHDSSPADLLDHTGHYT~~F~~DTD
S.ant. PWNDTTPAALLDHTRHYT~~F~~DV-
S.gal. PWNDVVRPADLLTHTAHYT~~F~~DV-
S.gla. PWNDTSPADLLDHTAHYT~~F~~DTD
* * * * *

*: 相同氨基酸 identical amino acids

S. lin.: *S. lincolnensis* *S. ant.*: *S.*

S.gal.: *S.galbus* *S.gla.*: *S.glaucus*

-4 Comparison of amino acid sequences of products coded

Fig. 7. Comparison of amino acid sequence of protein coded by *mel* genes from four different *streptomyces* species

相同性为 45.1%，相似性为 58.6%，而 *orf2* 与三种来源 *melC2* 的相同性和相似性分别高达 70.3% 和 85.3%（图 4）。由此可见，四种来源的酪氨酸酶（*melC2* 编码）氨基酸序列的同源性远远大于其激活蛋白（*melC1* 编码）。另外，就 *melC* 基因及其编码产物的序列而言，*S. lincolnensis* 78-11 与上述三种链霉菌的亲缘关系分别为：*S. glaucescens*, *S. galbus*, *S. antibioticus*。

2.5 林可链霉菌 78-11 *melC* 基因在 *S. lividans* 中的表达

为了进一步鉴定 *S. lincolnensis* 78-11 *melC* 基因产物的表达, 将 pRSB336 上 2.55kb 的 SphI 片段(含有完整的 *melC1*, *melC2* 基因), 按照图 5 所示路线装在链霉菌表达质粒 pES1 上。由于该片段不含 *melC* 基因自身的启动子和核糖体结合位点, 所以这两个结构基因的表达借助于 pES1 的新霉素抗性基因启动子(*Pneo*)和人工合成的大肠杆菌 / 链霉菌典型 RBS 片段, 其序列为 5'-AAAGAGGAGAAATAA-3'。重组子转化 *S. lividans* TK23, 共得到 27 个硫链丝菌素抗性转化子, 其中 12 个含重组质粒 pPZ518, 它们均在琼脂平板上分泌黑色素, 而另外 15 个含重组质粒 pPZ519 的转化子以及 2 个含 pES1 质粒的对照转化子都不分泌黑色素(图 6)。

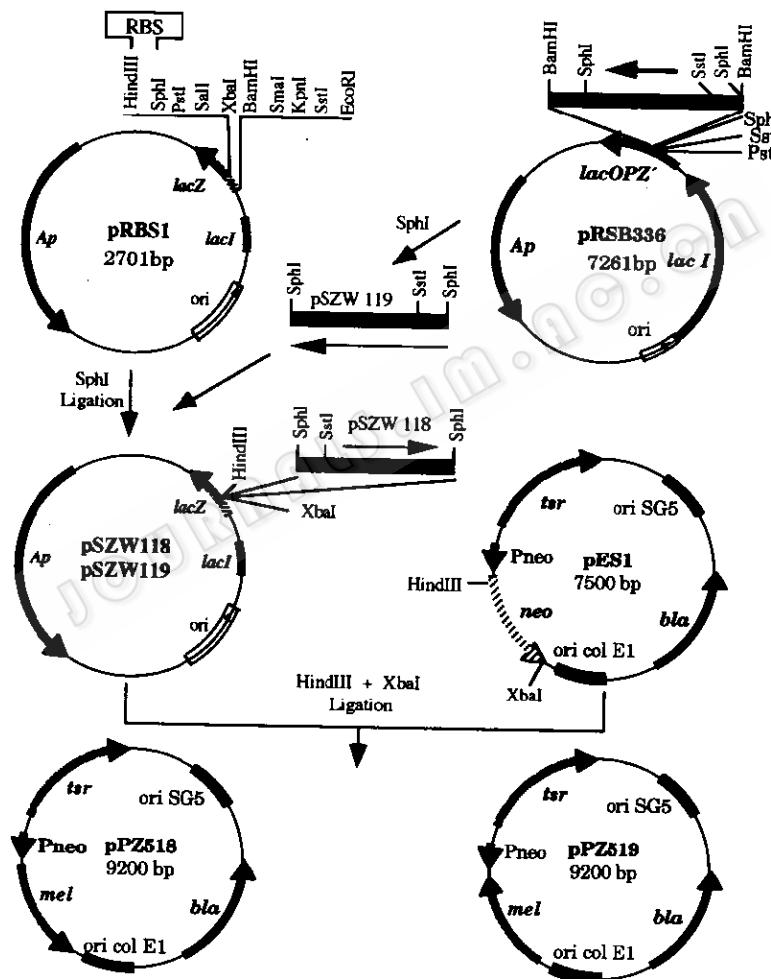


图 5 重组质粒 pPZ518 和 pPZ519 的构建

Fig.5 Construction of recombinant plasmids pPZ518 and pPZ519

melC 基因的克隆鉴定为进一步研究 *S. lincolnensis* 78-11 中黑色素与林可霉素生物合成途径之间的关系创造了条件。如果这两条途径相对独立, 则可利用 *melC* 基因体外缺

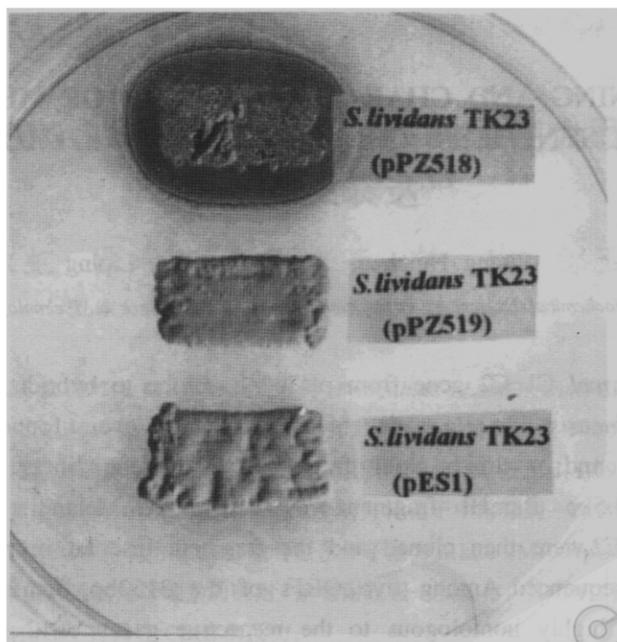


图6 *S.lincolnensis* 78-11的melC基因在*S.lividans* TK23中的表达

Fig.6 Expression of melC of *S.lincolnensis* 78-11 in *S.lividans* TK23

失和体内同源交换技术特异性阻断黑色素生物合成途径, 提高 *S.lincolnensis* 78-11 细胞内 L- 酪氨酸的有效浓度, 进而提高林可霉素的发酵水平, 同时降低发酵液的色泽。

参 考 文 献

- [1] Tripathi R K, Vincent J H, Urabe K et al. *J Biol Chem*, 1992, **267**:23707~23712.
- [2] Wyss, M A. *ETH Zurich*, 1982, 7151.
- [3] Crameri R, Ettlinger L, Hutter R et al. *J Gen Microbiol*, 1982, **128**:371~379.
- [4] Hintermann G, Zatchej M, Hutter R. *Mol Gen Genet*, 1985, **200**:422~432.
- [5] Chen Lingyun, Leu Weiming, Wang Kungtsung et al. *J Biol Chem*, 1992, **267**:20100~20107.
- [6] Hopwood D A, Bibb M J, Chater T et al. *Genetic Manipulation of Streptomyces. A laboratory Manual*. 1985.
- [7] Zhang H, Schmidt H, Piepersberg W. *Mol Microbiol*, 1992, **6**:2147~2157.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd, ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.
- [9] Bibb M J, Findlay P R, Johnson M W. *Gene*, 1984, **30**:157~166.

CLONING AND CHARACTERIZATION OF MELANIN BIOSYNTHESIS GENES FROM *STREPTOMYCES LINCOLNENSIS* 78-11

Zhang Huihan Yao Feng Sun Liping

(Department of Biochemical Engineering, East China University Of Science & Technology, Shanghai 200237)

Abstract Using *mel C1-C2* gene from pIJ702 as probe to hybridize with chromosome DNA of *S. lincolnensis* 78-11, a series of positive bands were found, including a 3.2kb BanHI fragment and a 2.6kb SphI fragment. So a gene library of *S. lincolnensis*, containing 3.0~3.5kb BamHI fragment, was constructed. Melanin biosynthesis genes, *mel C1* and *melC2*, were then cloned and the fragment inserted in recombinant plasmid pRSB336 were sequenced. Among five ORFs of the 3152bp BamHI fragment, *mel C1* and *melC2* were highly homologous to the respective genes of the other three strains of *Streptomyces*, moreover, the product of *mel C2* gene from *S. lincolnensis* 78-11 was slightly homologous to tyrosinase from human-being by 17.3% and from rat by 24.5%. All of the above results indicated that *mel C1*, *mel C2* and *orf 3* constitute the melanin biosynthesis operon of *S. lincolnensis*. In the further study of the cloned melanin biosynthesis genes of *S. lincolnensis* 78-11, recombinant plasmids, pPZ518 and pPZ519, which contain promoter of neo gene and *mel* gene in different orientation respectively, were constructed, and then were used to transform *S. lividans* TK23. 12 transformants of pPZ518, selected at random, secreted light brown pigment in R2YE culture medium, but all transformants of pPZ519 and pES1 were white.

Key words *Streptomyces lincolnensis*, Melanin biosynthesis genes, DNA sequencing, Exogenous expression