

## 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 顺序。3152bp BamHI 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<sup>[1]</sup>。前期链霉菌属黑色素生物合成遗传学的研究表明, 链霉菌属中存在着 MelI 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<sup>[2]</sup>, 而后者仅丧失了酪氨酸酶的分泌功能<sup>[3]</sup>。MelII 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<sup>[4]</sup>。抗生链霉菌 (*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<sup>[5]</sup>。

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株林可链霉菌 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<sup>-</sup>, *ara*,  $\Delta$ (*lac*<sup>-</sup> *proAB*), *rpsL*, (Srt<sup>r</sup>), F80, d,  $\Delta$ (*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*<sup>-</sup>]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*- $\alpha$  ], 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%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02%, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.001%, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001%, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.001%, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001%, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 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, ( $\alpha$ -<sup>35</sup>S) dATP, ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dCTP 及 HybondN<sup>+</sup> 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 1min, 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-STRIDER 1.1、CLUSTAL IV、SWISSPROT、PLASMID ARTIST 1.13 和 Brujone 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 *BclI* 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 *SstI* 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 *BamHI*, *BglII*, *BclI*, *SphI* 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>BamHI</i>               | 3.2                                     |     |     |
|                              | <i>BclI</i>                | 12.0                                    |     |     |
|                              | <i>BglII</i>               | 15.2                                    |     |     |
|                              | <i>SphI</i>                | 2.6                                     |     |     |
|                              | <i>SalI</i>                | 1.3                                     | 2.6 |     |
|                              | <i>SmaI</i>                | 1.0                                     | 1.7 |     |
|                              | <i>SstI</i>                | 5.5                                     | 7.0 |     |
|                              | <i>PstI/BssHI</i>          | 0.6                                     | 1.6 | 2.2 |
|                              | <i>NruI/EcoRI</i>          | 1.8                                     | 4.4 |     |
| <i>S. lividans</i> TK23      | <i>SstI</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 *BamHI* 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 *BamHI* 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 *BamHI* 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 *BamHI* 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<sup>[9]</sup>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)。





### 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)。

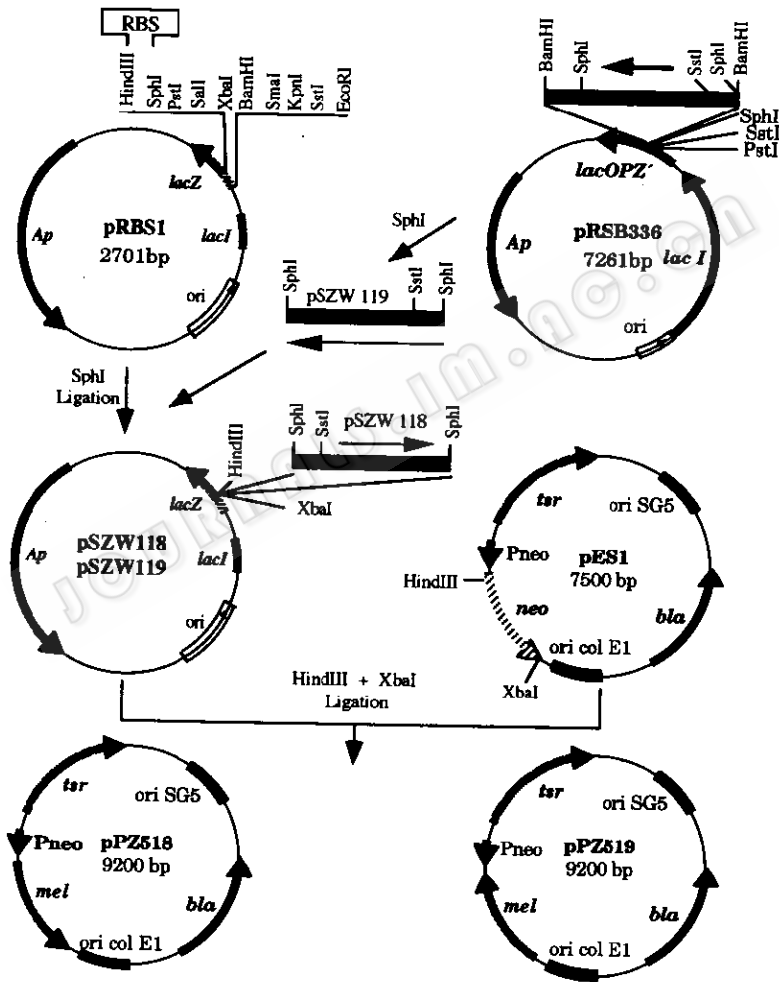


图5 重组质粒pPZ518和pPZ519的构建

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

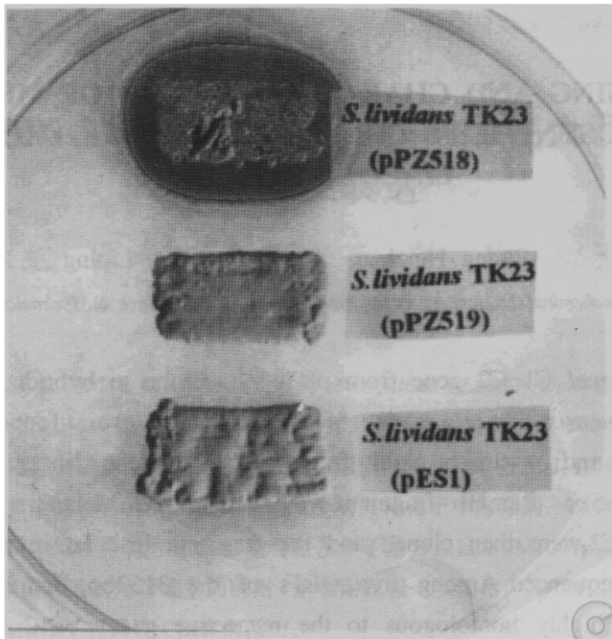


图6 *Slincolnensis* 78-11的*melC*基因在*S. lividans* TK23中的表达

Fig.6 Expression of *melC* of *Slincolnensis* 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] Cramer R, Ettliger L, Hutter R *et al.* *J Gen Microbiol*, 1982, **128**:371~379.
- [4] Hintermann G, Zaichej 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 Huizhan 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 *Bam*HI fragment and a 2.6kb *Sph*I fragment. So a gene library of *S. lincolnensis*, containing 3.0~3.5kb *Bam*HI fragment, was constructed. Melanin biosynthesis genes, *mel* C1 and *mel* C2, were then cloned and the fragment inserted in recombinant plasmid pRSB336 were sequenced. Among five ORFs of the 3152bp *Bam*HI fragment, *mel* C1 and *mel* C2 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