

链霉菌发育控制启动子— P_{TH4} 对孢子形成的影响*

谭华荣 贾君永 聂丽平 杨海花 田宇清

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 启动子 P_{TH4} , 链霉菌, 分化

分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)04-0373-75

在原核生物发育分化的分子遗传学研究中,链霉菌因其复杂的分化生命周期,无与伦比的合成次级代谢产物的能力(目前世界上所知的数千种天然抗生素的 70% 由链霉菌产生),使之成为原核生物乃至微生物发育与分化研究的最好模式系统^[1],为研究基因时空表达和阐明分化调控网络的分子机制提供了有利条件^[2]。

链霉菌发育调控启动子— P_{TH4} 是国际上首次克隆的两个启动子之一^[3]。对该启动子进行了结构分析,体内外转录调控的研究,结果表明 P_{TH4} 依赖于链霉菌分化关键基因 *whiG*, 即 *whiG* 的编码产物 σ^{whiG} 特异性地识别启动子 -10 区和 -35 区。以 P_{TH4} 及其下游部分序列为转录模板时,在体外能被 RNA 聚合酶全酶($\beta\beta'\alpha\sigma^{whiG}$)所识别,从而获得 UTP 标记的 mRNA 产物。在同样条件下,另一启动子 P_{TH270} 在体外不能转录。因此对启动子 P_{TH4} 进行深入的研究有重要的意义。本文报道启动子 P_{TH4} 在高拷贝质粒载体上启动报告基因时,对细胞内相关物质的合成及细胞分化的影响。

1 材料和方法

1.1 菌种及质粒

天蓝色链霉菌 J1501 (*Streptomyces coelicolor* J1501) (*hisA1*, *uraA1*, *str1A*, *SCP1*⁻, *SCP2*⁻, *Pgl*⁻)^[4], 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 *xylE*) 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)由英国 John Innes 研究所 K. Chater 教授惠赠,贮存液浓度为 50mg/mL (-20℃ 冰箱保存),在 R2YE 培养基中使用浓度为 50 μ g/mL,在 MM 中为 10 μ g/mL。Sau3AI, 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 M. Buttner 博士提供。

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 质粒及总 DNA 的提取

按文献[4]方法进行。

1.6 链霉菌形态和生理分化的观察

链霉菌培养条件,超薄切片及染色等均按文献[6]方法进行。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39670396)

收稿日期:1998-05-28, 修回日期:1998-12-04

2 结果和讨论

2.1 重组质粒 pIJ4470 的构建

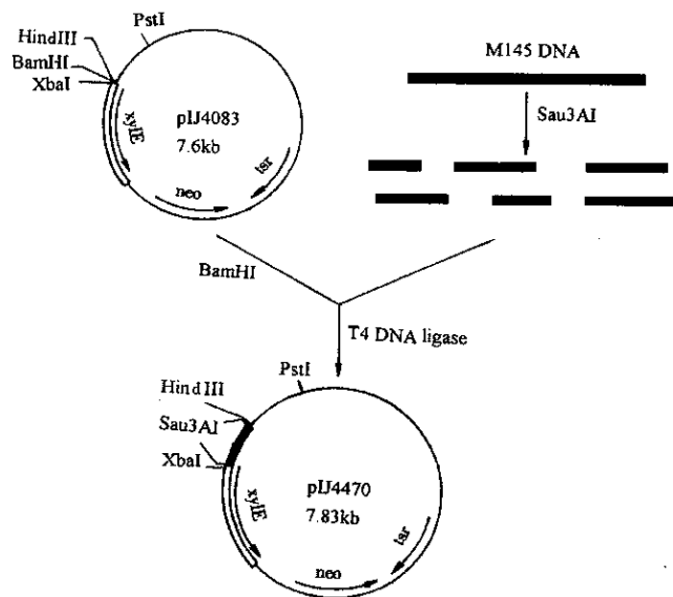


图1 重组质粒 pIJ4470 的构建

培养基的表面有铅染的深黑色的圆形孢子(图 2A)。在同样条件下, J1501/p(pIJ4470) 未观察到孢子, 只有浅色的气生菌丝片段(图 2B)。结果表明高拷贝的启动子(P_{TH4})在胞内能被 σ^{whiG} RNA 聚合酶全酶所结合, 影响了 σ^{whiG} 去识别染色体上的靶位基因, 于是靶位基因不能正常转录。因此, P_{TH4} 在启动儿茶酚加氧酶报告基因表达的同时影响了链霉菌的孢子形成。

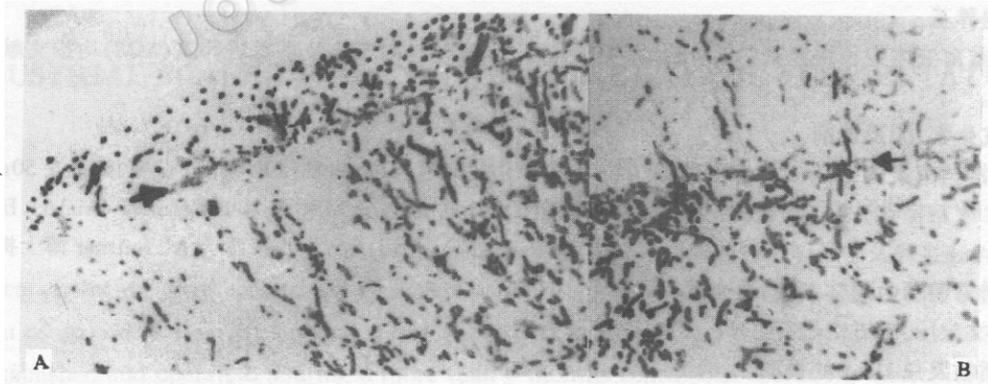


图2 J1501/pIJ4083 和 J1501/pIJ4470 超薄切片后的孢子观察

2.3 P_{TH4} 对糖原合成的影响

J1501/IJ4083 超薄切片后, 在电子显微镜下可观察到蛋白银染后深黑色的糖原颗粒(图 3-A), 而 J1501/IJ4470 菌株在相同条件下, 除个别细胞有少量的糖原外, 大部分细胞都没有糖原产生(图 3-B)。这表明高拷贝的启动子(P_{TH4})在链霉菌中不但限制了发育分化中孢子的正常形成, 而且对糖原的生物合成也有调控作用。糖原的合成与链霉菌孢子形成有密切的关系^[6], 这可能是由于糖原合成为细胞分

总 DNA 从天蓝色链霉菌 M145 中提取后, 用 *Sau3AI* 进行完全酶切, 然后连接到 *BamHI* 酶切后的质粒载体 pIJ4083 上, 并转化天蓝色链霉菌 J1501, 在硫链丝菌素抗性选择下得到了约 3000 个转化子的文库。从中筛选到了两个转化子, 它们在儿茶酚加氧酶报告基因表达的同时, 不能形成正常的灰色孢子而呈现白色菌丝的表型。其中之一的重组质粒命名为 pIJ4470(图 1), DNA 序列分析结果表明插入的 DNA 片段为 233bp。

2.2 pIJ4470 对孢子形成的影响

J1501/pIJ4083 及 J1501/pIJ4470 两菌株在含有 $10\mu\text{g/mL}$ 硫链丝菌素的 MM 上培养 6d 后, 制备超薄切片, 在电子显微镜下分别观察了两菌株的细胞分化特征。图 2 中箭头所示处为固体培养基表面层, 上层为气生菌丝或孢子, 下层是基质菌丝。结果表明 J1501/pIJ4083 在培

化提供了所需的能量。链霉菌分化是复杂的多水平调控,弄清 P_{TH4} 在分化中调控的分子机理可为分化中复杂调控网络的阐明提供更多的理论依据。

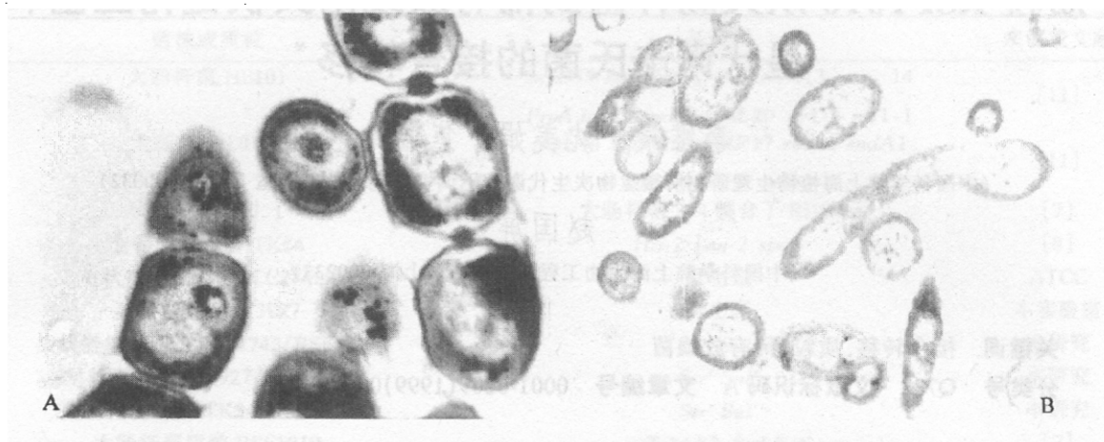


图3 J1501/pIJ4083 和 J1501/pIJ4470 超薄切片后的糖原观察

参 考 文 献

- [1] Chater K F. *Annu Rev Microbiol*, 1993, 47:685~713.
- [2] Chater K F. *Trends in Genetics*, 1989, 5:372~376.
- [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* John Innes Foundation, Norwich, England, 1985.
- [5] 谭华荣, 何 松, 庄增辉等. 遗传学报, 1990, 17(5):390~397
- [6] 谭华荣, 杨海花, 田宇清等. 微生物学报, 1997, 37(1):58~61.

EFFECT OF PROMOTER- P_{TH4} ON *STREPTOMYCES* SPORULATION

Tan Huarong Jia Junyong Nie Liping Yang Haihua Tian Yuqing

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

Abstract 233bp of promoter- P_{TH4} was subcloned into *Streptomyces* plasmid pIJ4083. pIJ4470 was obtained after recombinant plasmid was introduced into *Streptomyces coelicolor* J1501. Both *Streptomyces coelicolor* J1501/pIJ4083 and J1501/pIJ4470 were grown on minimal medium (MM) agar containing mannitol and 10 μ g/mL thiostrepton for 6 days, and then ultrathin sections of colonies were prepared and stained with silver proteinate to observe glycogen biosynthesis in cell by the electron microscope. Result showed that the glycogen was produced by J1501/pIJ4083, whereas little glycogen was produced by J1501/pIJ4471. The dark color spores were not observed in J1501/pIJ4470 with lead stain in contrast with dark color spores which were produced by J1501/pIJ4083, indicating that promoter P_{TH4} may play an important role in physiological and morphological differentiation of *Streptomyces*.

Key words Promoter P_{TH4} , *Streptomyces*, Differentiation

Project Granted by National Natural Science Foundation of China(No.39670396)