

黑暗链霉菌 *aprF-G* 基因功能的研究

朱碧银, 洪文荣*, 李辉

(福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350108)

摘要: 以研究黑暗链霉菌 Tt-49 中生物合成基因 *aprF-G* 生理功能为目标, 利用接合转移法, 将同源重组质粒 pFD10 导入黑暗链霉菌 Tt-49, 最终获得同源双交换菌株 Tt-49G53, 并对其生理特性进行考察。结果显示: 其生长速度明显比亲株慢, 产抗水平比亲株低 100 倍, 仅为 13 U/mL。采用薄层层析法对其代谢产物进行分析, 未检测到安普霉素。

关键词: 黑暗链霉菌; 基因重组; 分子遗传工程

中图分类号: Q 781 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)04-0391-05

Study on Gene Functions of *aprF-G* in *Streptomyces tenebrarius*

ZHU Bi-yin, HONG Wen-rong*, LI Hui

(College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: In order to block biosynthesis genes *aprF* and *aprG* of apramycin in *Streptomyces tenebrarius* Tt-49, recombinant plasmid pFD10 was introduced to *S. tenebrarius* Tt-49 by conjugation. And double crossover mutant Tt-49 G53 was obtained finally. Preliminary research on physiological characteristics for double crossover mutant Tt-49 G53 was conducted. The results showed that double crossover mutant Tt-49G53 grew more slowly than parent strain, the level of antibiotic production was 13 u/mL, which was 100 times lower than the level of parent strain. The metabolic products were analyzed by TLC. A pre-judgment of the result was that double crossover mutant Tt-49 G53 couldn't produce apramycin. It was supposed that *aprF* and *aprG* were not closely related to secondary metabolism of *S. tenebrarius* only, but also was associated with the growth and development of producing strain.

Key words: *Streptomyces tenebrarius*, gene recombinant, molecular genetic engineering

黑暗链霉菌产生 3 种主要组分: 氨基酰妥布霉素、安普霉素及氨基酰卡那霉素 B。由于上述 3 种化合物都含有巴龙霉素结构, 因此, 推测 3 种组分的生物合成基因簇可能存在部分重叠, 都有共同的巴龙霉素生物合成途径, 之后再分支生成 3 种不同的化合物^[1-4]。基因阻断和基因替换技术^[5]的发展

和应用, 特别是安普霉素和妥布霉素生物合成基因簇的公布及部分基因功能的陆续确定, 加速了在分子水平上对黑暗链霉菌进行定向改造的步伐。理想的策略就是阻断妥布霉素或者安普霉素生物合成的任一途径, 获得主合成安普霉素或者妥布霉素工程菌。本研究期望采用基因工程技术对妥布霉

收稿日期: 2011-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070093); 国家“十二五”科技攻关重大专项资助项目(2012ZX09201-101-008); 福建省教育厅科研项目(2007F5070)。

* 通信作者: 洪文荣(1956-), 男, 福建莆田人, 教授, 理学博士, 硕士研究生导师, 主要从事微生物制药方面的研究。

E-mail: hongwr56@163.com

素工业化生产菌株黑暗链霉菌 Tt-49 进行品质改良,构建其同源重组系统、以期阻断其安普霉素的生物合成,最终获得不产安普霉素的工程菌。同时,期望以黑暗链霉菌为模型,建立实用型基因打靶操作平台,为重要药用工业微生物的品质改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

大肠杆菌 链霉菌穿梭质粒 pFD10:作者所在实验室构建,结构见图 1。含有用于黑暗链霉菌 Tt-49 染色体中基因 *aprF-G* 同源重组的两侧交换臂,分别为 *aprF-G* 的上游同源区段 JHB1(2 165 bp)和下游同源区段 JHB2(1 853 bp);两侧同源交换臂之间为红霉素启动子基因 *ermE** 和绿色荧光蛋白基因 *gfp*;JHB1 外侧连接的是红霉素抗性基因(用于同源交换菌株的筛选);含安普霉素抗性基因、接合转移起点 *oriT* 和温敏型复制子。该质粒不仅可在大肠杆菌中自主复制,而且能在链霉菌中复制。

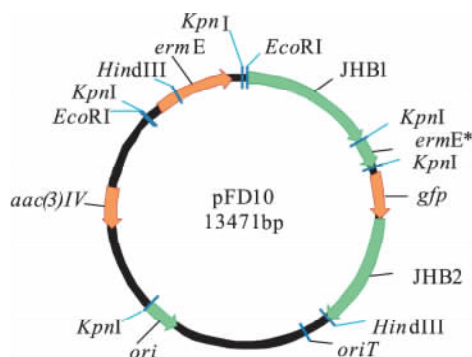


图 1 pFD10 质粒图谱

Fig. 1 Map of plasmid pFD10

大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 、*E. coli* ET12567/pUZ8002 和黑暗链霉菌 Tt-49 均为作者所在实验室保存。

1.2 抗生素和培养基

E. coli 培养基为 LB,根据特性添加抗生素,相应培养基中使用的氨苄青霉素终质量浓度为 100 μ g/mL,卡那霉素和安普霉素的终质量浓度均为 50 μ g/mL,红霉素与氯霉素终质量浓度均为 25 μ g/mL;黑暗链霉菌斜面培养基(HSB)、种子和发酵培养基见文献[6],培养基中使用的红霉素抗性和萘啶酸的终质量浓度为 25 μ g/mL;接合转移使用 MS 培养基[7]。

1.3 主要试剂

限制性内切酶、*Taq* 酶、*T₄*DNA 连接酶和 DNA marker;购自 TaKaRa 公司;DNA 回收试剂盒、蛋白胨、肉浸液和牛肉浸膏;购自上海生工生物工程技术有限公司;732 阳离子交换树脂;购自长沙市大禹化工有限公司;薄层层析硅胶 GF254;购自安徽良臣硅胶源材料有限公司;其它化学试剂均为国产分析纯或色谱纯。

1.4 转化方法

穿梭质粒 pFD10 导入黑暗链霉菌 Tt-49 采用接合转移法,具体参见文献[7-8]。

1.5 发酵代谢产物分析方法

发酵效价采用生物检定法[6,9]。采用薄层层析法[10],用硅胶 GF254 薄层层析测定发酵液中抗生素成分的组成。取发酵样品、安普霉素和妥布霉素标准品,分别加水制成每 1 mL 含 10 mg 的溶液,吸取上述两种溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶层析板,以氯仿-乙醇-浓氨溶液(1:7:4)为展开剂,展毕晾干,进行碘吸附显影。

2 结果与分析

2.1 阻断突变株的筛选

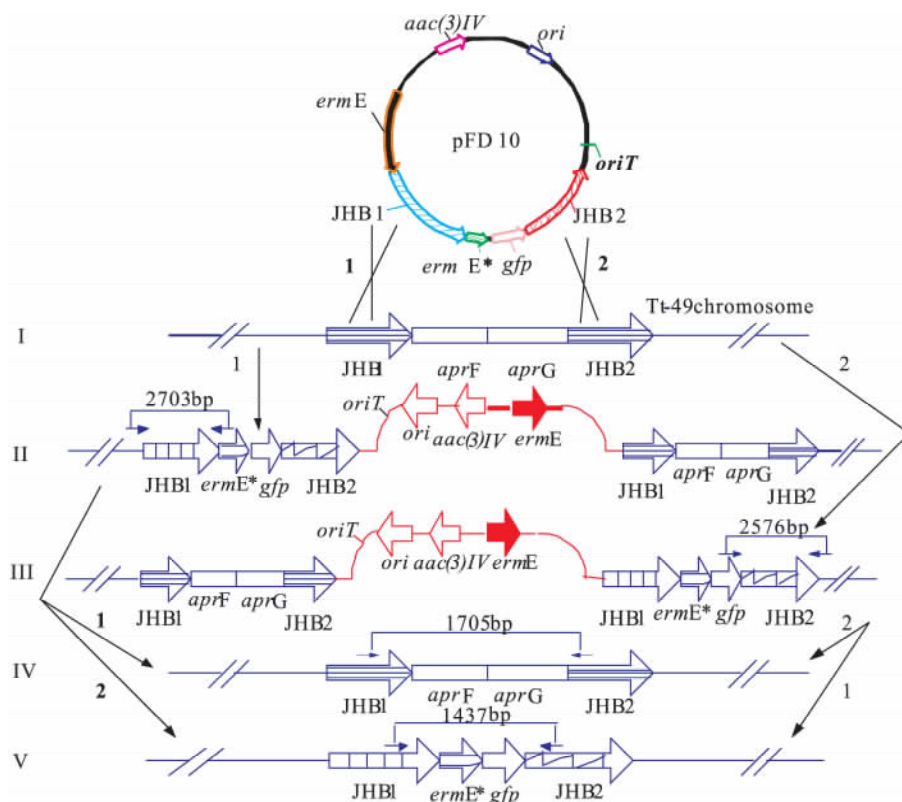
将穿梭质粒 pFD10 转化 *E. coli* ET12567/pUZ8002,再通过接合转移将其导入黑暗链霉菌 Tt-49。由于穿梭质粒 pFD10 拥有温敏型复制启动子,当培养温度超过 34 $^{\circ}$ C 时,该游离质粒在链霉菌中不能自我复制[11]。因此,转化后直接在 35 $^{\circ}$ C 下培养,17 h 后在培养的平板上覆盖红霉素和萘啶酸,长出的菌落可能为穿梭质粒 pFD10 插入到染色体上。筛选到的抗性重组菌存在两种可能,即不同的交换臂进行单交换(图 2 II、III)。将筛选到的阳性转化子,在含萘啶酸和红霉素的 HSB 平板培养基上经 3 次传代培养,彻底清除 *E. coli* ET12567/pUZ8002 后,在无抗性平板上松弛传代培养 1~2 代,分离单菌落,分别在无抗性平板和抗性平板上进行影印培养,得到的菌株可能有两种状态:回复突变株(图 2 IV)和双交换菌株(图 2 V)。

2.2 阻断突变株的验证

穿梭质粒 pFD10 的红霉素抗性基因位于交换臂外侧,便于双交换筛选。但由于双交换菌株和野生型菌株的表型相同(均对红霉素敏感),因此,通

过红霉素抗性筛选首先获得单交换菌株,共获得单交换菌株 9 株,分别命名为 Tt-49G11~19,再由单交换菌株 Tt-49G11~19 发生第二次交换,通过单菌落分离和影印培养,获得双交换菌株 Tt-49G53。提取 Tt-49G53 染色体 DNA,进行 PCR 验证。PCR 验证引物分别为 Py1/Py2(图 2 II 中箭头所示)、Py3/Py4(图 2 IV、V 中箭头所示)和 Py5/Py6(图 2 III 中箭头所示),Py1/Py2 和 Py5/Py6 的序列参见文献^[11],Py3/Py4 的序列分别为:5'-CGTTGAGC-CGATATCCGT -3';5'-CGTCGAGACGATGCG-TAA -3'。如图 2 所示,用 Py1/Py2 和 Py5/Py6 进

行 PCR,*aprF-G* 基因被 *gfp* 和 *ermE** 替换后的突变株扩增分别得到 2 703 bp 和 2 576 bp 的单一一条带;用引物 Py3/Py4 进行 PCR,发生单交换的重组菌 PCR 结果得到 1 705 bp 和 1 437 bp 两条扩增条带,以亲株基因组为模板进行 PCR 得到单一的 1 705 bp 条带,而 *aprF-G* 基因被 *gfp* 和 *ermE** 替换后的突变株扩增得到单一的 1 437 bp。结果见图 3。回收引物 Py3/Py4 的 PCR 扩增产物,将其克隆到 pMD19-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α ,大肠杆菌菌体呈绿色,将该克隆子进行测序,结果与预测相符,进一步证实菌株 Tt-49 G53 为双交换菌株。



1:JHB1 端的同源交换;2:JHB2 端的同源交换

图 2 同源重组示意图

Fig. 2 Sketch map of homologous recombination

2.3 双交换菌株 Tt-49G53 的菌落形态

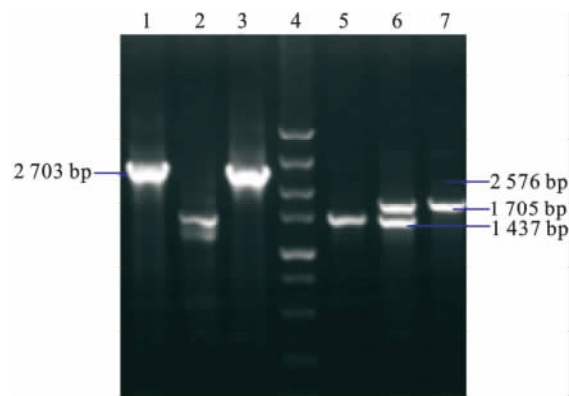
双交换菌株 Tt-49G53 菌落(图 4 a)产米白色孢子,但孢子量明显少于亲株(图 4 b),表面粗糙,有皱褶,中间凹陷,产红棕色色素,于 37℃ 恒温培养 5 d 后,菌落形态与亲株接近,由此可见,双交换菌株 Tt-49G53 相较于亲株来说,生长周期明显要

长。这可能是因为 *aprF* 和 *aprG* 的破坏在一定程度上影响了菌丝的生长和孢子的形成。

2.4 双交换菌株 Tt-49G53 的发酵结果

2.4.1 缺陷型工程菌与亲株发酵单位的比较 将缺陷型工程菌(双交换菌株 Tt-49G53)和亲株分别传至斜面培养基培养,37℃ 恒温培养 5 d 后,待缺

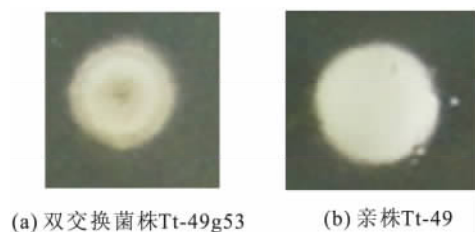
陷型工程菌和亲株孢子长出后,转接种子培养基,经过种子培养和发酵培养后,收集缺陷型工程菌和亲株的发酵产物,测定缺陷型工程菌和亲株发酵处理液的效价,亲株的发酵单位为 1 309 U/mL,缺陷型工程菌的发酵单位为 13 U/mL,缺陷型工程菌的发酵单位明显低于亲株。王新路等^[9]采用单交换的方法对 *aprF* 和 *aprG* 分别进行破坏,虽然结果显示 *aprF* 阻断突变株和 *aprG* 阻断突变株均不合成安普霉素,但是未指出上述两种阻断突变株的生产能力有如此明显的下降。此外,本研究在同时破坏安普霉素生物合成基因簇中 *aprF*、*aprG* 以外的 6 个 ORF 时,获得的缺陷型菌株生长周期和菌落形态与亲株相似,生产能力可维持在 500 U/mL 左右。本研究同时破坏了 *aprF* 和 *aprG*,却导致缺陷型菌株生长缓慢,产孢子能力明显低于亲株,且生产能力大幅度下降。由此可以推测,*aprF*、*aprG* 和黑暗链霉菌的次级代谢产物的合成密切相关。



1: Tt-49G53 Py1/Py2 PCR 产物; 2/5: Tt-49G53 Py3/Py4 PCR 产物; 3: Tt-49G53 Py5/Py6 PCR 产物; 4: DL5000 DNA Marker; 6: Py3/Py4 PCR products of single crossover strain; 7: Py3/Py4 PCR products of parent strain Tt-49

图 3 双交换菌株 Tt-49G53 的 PCR 验证

Fig. 3 PCR verification of double crossover strain Tt-49G53

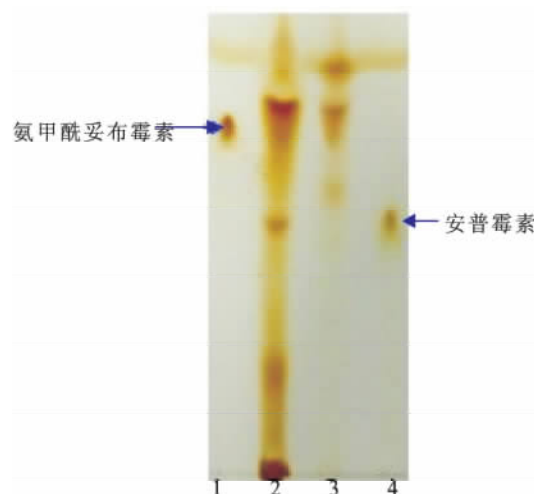


a: 双交换菌株 Tt-49G53; b: 亲株 Tt-49

图 4 双交换菌株 Tt-49G53 和亲株 Tt-49 菌落形态比较

Fig. 4 Comparative of colony morphology of double crossover strain Tt-49G53 and parent strain Tt-49

2.4.2 工程菌发酵组分的考察 将双交换菌株 Tt-49G53 与亲株同时在不添加抗生素的种子以及发酵培养基中发酵,并在发酵结束时对发酵液的组分进行薄层层析分析,结果见图 5。实验结果显示,双交换菌株 Tt-49G53 阻断了安普霉素的合成。



1: 氨甲酰妥布霉素标准品组成; 2: 亲株 Tt-49 发酵液组分; 3: 双交换菌株 Tt-49G53 发酵液组分; 4: 安普霉素标准品组成

图 5 双交换菌株 Tt-49G53 和亲株发酵液薄层层析图谱

Fig. 5 TLC results of double crossover strain Tt-49G53 and parent strain Tt-49

3 结 语

质粒 pFD10 通过 *E. coli* ET12567/pUZ8002 去甲基化修饰后,经接合转移进入黑暗链霉菌 Tt-49,利用红霉素抗性筛选,得到了 9 株 pFD10 阻断突变株中间体—单交换菌株,依次命名为 Tt-49 AG11~19;以这些单交换菌株的混合物,进行双交换筛选,最终获得发生同源交换的双交换菌株 Tt-49G53。

通过对双交换菌株 Tt-49G53 生理特性的考察,发现其生长速度明显比亲株慢,其产抗水平仅为 13 U/mL,比亲株低约 100 倍。采用薄层层析的方法对其代谢产物进行分析,实验结果表明,双交换菌株 Tt-49G53 未检测到安普霉素。由此推测,*aprF*-*G* 不仅与黑暗链霉菌的次级代谢产物合成密切相关,而且与产生菌的生长发育密切相关。

参考文献(References):

- [1] Park J W, Park S R, Han A R, et al. The nebramycin aminoglycoside profiles of *Streptomyces tenebrarius* and their characterization using an integrated liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometric analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 661: 76—84.
- [2] Borodina I, Scholler C, Eliasson A, et al. Metabolic network analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces* species with an active entner-doudoroff pathway[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(5): 2294—2302.
- [3] Kharel M K, Basnet D B, Lee H C, et al. Isolation and characterization of the tobramycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces tenebrarius*[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2004, 230: 185—190.
- [4] Higgins C F, Kastner R E. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. II. description of *Streptomyces tenebrarius*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1967; 324—331.
- [5] 许杨,涂追. 丝状真菌基因敲除技术研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(1): 120—126.
XU Yang, TU Zhui. Application and progress of filamentous fungi gene targeting[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(1): 120—126. (in Chinese)
- [6] 林玉双,洪文荣,林烨,等. 氨基酰妥布霉素高产菌株选育及其发酵特性研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2008, 33(7): 442—445.
LIN Yu-shuang, HONG Wen-rong, LIN Ye, et al. Study on the breeding and fermentation characteristics of tobramycin by *Streptomyces tenebrarius*[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2008, 33(7): 442—445. (in Chinese)
- [7] Kieser T, Bibb M J, Mark J, et al. Practical streptomyces genetics[M]. Norwich, England: The John Innes Foundation, 2000.
- [8] 白林泉. 链霉菌基因组中 DNA 大片段的基因置换与克隆[D]. 武汉: 华中农业大学, 1998.
- [9] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [10] 王新路. 黑暗链霉菌抗生素生物合成相关基因的克隆和功能研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- [11] 朱碧银,洪文荣,严绍德,等. 黑暗链霉菌 DNA 同源重组系统的构建[J]. *生物技术通报*, 2011, (4): 162—166.
ZHU Bi-yin, HONG Wen-rong, YAN Shao-de, et al. Construction of DNA homologous recombination system in *Streptomyces tenebrarius*[J]. *Bulletin of Biotechnology*, 2011, (4): 162—166. (in Chinese)