

# 海洋链霉菌分离株 M095 遗传转化体系的建立

侯艳华<sup>1,2</sup>, 王淑军<sup>3</sup>, 李富超<sup>1</sup>, 秦松<sup>1</sup>

(1.中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院 研究生院, 北京 100039; 3.淮海工学院, 江苏 连云港 222005)

**摘要:** 研究了海洋链霉菌分离株 M095 的基因转移系统。利用属间接转移将具有 *oriT* 的大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pIJ8600 转入 *Escherichia coli* ET12567(pUZ8002)中, 获得供体菌。将供体菌与预萌发的菌株 M095 的孢子进行接合转移, 将质粒 pIJ8600 转入菌株 M095 中, 其转化率为  $1.99 \times 10^{-4}$  个接合转化子/受体。Southern 杂交证明质粒 pIJ8600 已经整合到菌株 M095 的染色体上。同时, 将来自 *Spirulina maxima* (Cyanophyta) 的别藻蓝蛋白基因(*apc*)克隆在质粒 pIJ8600 的 *XbaI* 和 *BglII* 位点, 产生质粒 pAPIJ。用接合转移法将质粒 pAPIJ 转入菌株 M095。通过 SDS-PAGE 分析, 得到 2 个大小为 22 ku 和 17 ku 的蛋白, 分别对应于别藻蓝蛋白的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基。这些结果进一步证明菌株 M095 的遗传转化体系已经成功建立起来, 这将为其他海洋放线菌遗传转化工作的研究奠定基础。

**关键词:** 转化; 全霉素; 属间接转移; 海洋链霉菌

中图分类号: Q34 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096 (2006) 10-0012-05

20 世纪 80 年代兴起的链霉菌基因工程的研究, 已在抗生素生物合成基因的克隆、产量提高、组分改善及杂合抗生素产生等方面取得长足的进步<sup>[1]</sup>。而海洋链霉菌的研究现主要集中于次级代谢产物新颖结构化合物的分离, 因此作者尝试将基因工程新技术应用于海洋链霉菌的研究, 以阐明抗生素的生物合成途径, 为利用基因工程技术改造菌株奠定基础。这一研究不仅具有重要的应用价值, 而且将拓展人们对海洋放线菌次级代谢途径调控的认知范围, 因而具有重要的理论意义。在对一个链霉菌进行基因改造时, 首要的问题就是建立所研究菌株的基因转移系统, 这是对抗生素生物合成基因的鉴定、分析和其它遗传操作的前提<sup>[2]</sup>。作者从胶州湾海泥中分离出 256 株海洋链霉菌, 通过对其抑菌活性的筛选, 从菌株 M095 的次级代谢产物中分离到全霉素<sup>[3]</sup>。本试验旨在建立菌株 M095 的基因转移系统, 研究通过接合转移的方法向菌株 M095 中转入外源 DNA 的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

*Escherichia coli* Top10 被用作克隆的宿主菌。 *E.*

*coli* 菌株 ET12567 (pUZ8002) 和大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pIJ8600 (*tipAp*, *tsr*, *acc* (3) IV, *oriT*, *attP*) 由英国 John Innes 研究中心 Chater 教授惠赠。海洋链霉菌 M095 分离自胶州湾的海泥中, 根据菌株的形态、生理生化特征以及 16S rDNA 序列系统学分析表明菌株 M095 属于灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*)。

### 1.2 培养基和培养条件

添加 25 mg/L 氯霉素 (Amresco) 和 50 mg/L 卡那霉素 (Amresco) 的 LB 培养基用于培养 *E. coli* ET12567 (pUZ8002)。M<sup>2+</sup> 固体培养基<sup>[4]</sup>用于菌株 M095 孢子的培养。SGGP 液体培养基<sup>[5]</sup>用于菌株 M095 接合转化子的培养。M<sup>2+</sup> 固体培养基中添加 30

收稿日期: 2005-08-08; 修回日期: 2005-12-20

基金项目: 中国科学院知识创新工程资助项目 (KZCX3-SW-223); 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题 (2005HS002)

作者简介: 侯艳华 (1977-), 女, 在读博士研究生, 主要从事海洋放线菌遗传转化的研究, 电话: 0532-82898863, E-mail: houyanhua@ms.qdio.ac.cn; 秦松, 通讯作者, 电话: 0532-82898500, E-mail: Sqin@ms.qdio.ac.cn

mg/L 安普霉素 (Sigma) 和 50 mg/L 萘啶酮酸 (Sigma) 用于接合转化子的传代。除 LB 以外的培养基都用半海水配制。

### 1.3 菌株 M095 与大肠杆菌之间的接合转移以及接合转化子的验证

接合转移参照 Flett 等<sup>[6]</sup>的方法。转化后, 平板在 28 °C 培养 24 h, 用含有 50 mg/L 萘啶酮酸和 30 mg/L 安普霉素的 1 mL 无菌水覆盖表面, 并在 28 °C 培养至长出接合转化子。接合转化率是接合转化子的数目与受体细胞数目之间的比值。质粒 pIJ8600 在接合转化子中的遗传稳定性指在含抗生素和不含抗生素条件下连续经过 3 次传代后保持抗性的克隆数与总孢子数的比值 (百分比)。

菌株 M095 及其接合转化子基因组 DNA 提取参照 Kieser 等<sup>[7]</sup>的方法进行。通过 Southern 杂交验证接合转化子。首先由 PCR 扩增得到硫链丝菌素抗性基因 (*tsr*), 扩增引物 P1: 5'-gttgacaccatcgcaaatc-3', P2: 5'-gaggatcgacaggaatctcgc-3', 模板为菌株 M095 接合转化子的基因组 DNA。PCR 反应程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min; 72 °C 10 min; 30 个循环。PCR 产物用的高辛进行标记, Southern 杂交根据 DNA 标记与检测试剂盒 (Roche) 的方法进行操作。

### 1.4 菌株 M095 染色体上 *attB* 位点的克隆

由于质粒 pIJ8600 不含有链霉菌的复制起始位点, 而是借助于其载体本身所携带噬菌体  $\phi$ C31 的整合酶基因和 *attP* 位点与菌株 M095 染色体的特定重组位点 (*attB*) 结合。质粒 pIJ8600 在菌株 M095 上的整合也就表明菌株 M095 上一定存在着 *attB* 位点, 而且该位点可以被整合酶基因所识别。用引物 ATTB1: 5'-CGGGATCCGACCC(G/C)TTCATCATGATGGAC, ATTB2: 5'-TGGAATTCAGGTT(G/C)ACCCA(C/G)AG-CTG(G/C)AG<sup>[7]</sup>对菌株 M095 染色体上的 *attB* 位点进行 PCR, PCR 产物与 pMD18-T 载体连接后转化 *E. coli* Top10, 然后对筛选到的阳性克隆进行测序, 并对测序结果进行比对。

### 1.5 含有别藻蓝蛋白基因 (*apc*) 表达质粒的构建

*apc* 基因由作者所在的实验室从 *Spirulina maxima* 中克隆<sup>[8]</sup>, 并将其连入 pET28a (携带有一个 N 端组氨酸标签) 的 *EcoRI* 位点。用引物 5'-CAITCTAGA GGCAGCAGCCA-3' 和 5'-CCTAGATCTTTAGCTC-AAGCCGA A-3' (划线部分分别对应于 *XbaI* 和 *BglIII* 限制性酶切位点) 进行 PCR 扩增获得融合了组氨酸标签的 *apc*。用 *XbaI/BglIII* 酶切 PCR 产物。pIJ8600

在多克隆位点的上游有硫链丝菌素诱导型启动子 (*tipAp*), 启动子的两侧均有转录终止子<sup>[9]</sup>。在多克隆位点中包括 *XbaI* 和 *BglIII* 位点, 可以使克隆的外源基因高效表达。因此, 将酶切的 PCR 产物片断连入质粒 pIJ8600 的 *XbaI* 和 *BglIII* 位点之间, 得到质粒 pAPIJ。在质粒 pAPIJ 中, 硫链丝菌素诱导型启动子调控 *apc* 基因的表达。

### 1.6 重组别藻蓝蛋白 (rAPC) 的表达

用接合转移法将质粒 pAPIJ 转入菌株 M095 中。通过安普霉素抗性筛选接合转化子。将接合转化子培养在 SGGP 液体培养基中, 24 h 后加入 5 mg/L 诱导剂硫链丝菌素, 继续培养 48 h 后, 收集菌体并用超声波破碎, 通过 SDS-PAGE 电泳检测破碎的蛋白提取物中重组别藻蓝蛋白的表达情况<sup>[10]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 菌株 M095 的遗传转化及 Southern 杂交

通过接合转移将质粒 pIJ8600 转入菌株 M095 中, 所得转化率为  $1.99 \times 10^{-4}$  接合转化子/受体细胞。PCR 反应得到的硫链丝菌素抗性基因 (*tsr*) 大小约为 750 bp (图 1a), 与已知的 *tsr* 大小一致。将 *tsr* 基因用的高辛标记, 与 *EcoRI* 和 *SacI* 酶切的菌株 M095 及其接合转化子的基因组 DNA 杂交 (质粒 pIJ8600 中 *tsr* 两侧的酶切位点为 *EcoRI* 和 *SacI*), 杂交结果见图 1b, 的高辛标记的 *tsr* 与菌株 M095 的结合转化子杂交得到明显的条带, 而在相同的条件下野生型的菌株 M095 未得到杂交信号。在连续三代不含选择抗性的条件下含 pIJ8600 的接合转化子表现出 80%~95% 稳定性。

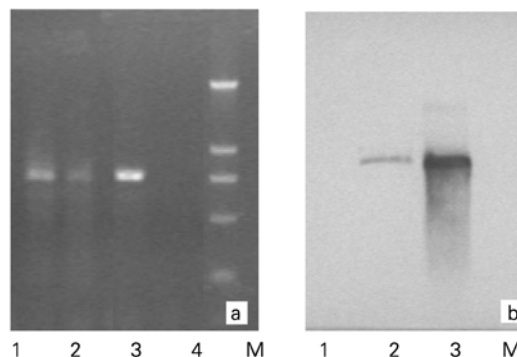


图 1 硫链丝菌素抗性基因 (*tsr*) 的 PCR 以及接合转化子的 Southern 杂交验证

Fig.1 The PCR of thiostrepton-resistant gene and Southern blot analysis of exconjugants of strain M095

a. 硫链丝菌素抗性基因的 PCR。其中 1, 2, 3 为以菌株 M095 接合转化子的基因组 DNA 为模板扩增的产物; 4 为阴性对照; M 为 DL2000 分子量标准

b. 菌株 M095 接合转化子基因组 DNA 的 Southern 杂交验证。其中 1 为阴性对照; 2 为 *EcoRI* 和 *SacI* 酶切后的菌株 M095 接合转化子基因组 DNA; 3 为阳性对照

a. The product of thiostrepton-resistant gene. Line 1-3 were the products of *tsr* gene, which was amplified by PCR using the genome of M095/pAPIJ as template; Line 4, negative control; Line M, DL2000 as size standard

b. Southern blot analysis of genomic DNA (*EcoRI/SacI*-digested) from M095/pAPIJ. Lane 1, negative control(wild type M095); Lane 2, sample (transformed M095); Lane 3, positive control; Lane M, DL2000 as size marker

## 2.2 菌株 M095 染色体上重组位点的克隆

菌株 M095 染色体上的 *attB* 位点, 其大小约为 250 bp。经测序与来自 *S. coelicolor*, *S. hygrosopicus*, *S. cinnamomensis*, *S. aureofaciens*, *S. longisporoflavus* 的 *attB* 片段进行比对, 比对结果见图 2。Kuhstoss 等<sup>[11]</sup>通过 *attB* 位点与 *attP* 位点进行比较表明核心序列(即交换发生区域)是 5'TTG。也有研究证明其核心序列可以缩短为 5'TT<sup>[7]</sup>。对菌株 M095 的 *attB* 位点的序列比对结果表明其序列是高度保守的, 同样含有 5'TT 序列(以 X 指示), 因此可以被噬菌体的整合酶基因所识别, 从而将含有 *attP* 位点的质粒定点整合到染色体的 *attB* 位点。



图 2 菌株 M095 *attB* 重组位点序列比对

Fig. 2 Alignment of sequences of attachment sites in strain M095 and in various species of *Streptomyces*

## 2.3 异源 *apc* 在海洋链霉菌分离株 M095 中的表达

通过接合转化子基因组 DNA 进行 PCR 验证, PCR 产物获得的大片段大小约为 1 100 bp, 与融合了组氨酸标签的 *apc* 基因大小一致, 这表明菌株 M095 接合转化子的基因组上存在 *apc* 基因(图 3a), 然后

M 为 DL2000 分子量标准。b. SDS - PAGE 分析菌株 M095 中 rAPC 的表达。可溶性的细胞提取物从以下菌株中获得: 1 为菌株 M095/pAPIJ, 得到对应于 APC 两个亚基的两条蛋白带(用箭头指示); 2 为 M095 野生菌株; 3 为阴性对照; 4 为阳性对照; M 为蛋白分子量标准

a. Agarose gel analysis of PCR products. Lanes 1, 2, sample (transformed isolate M095); Lane 3, negative control (wild type M095); Lane M, DL2000 as size marker

b. SDS-PAGE analysis of the heterologous rAPC expressed. Lane 1, the sample. Two bands, corresponding rAPC  $\alpha$  and  $\beta$  subunits, were found; Lane 2, wild type M095; Lane 3, negative control (M095/pIJ8600); Lane 4, positive control; Lane M, protein size marker

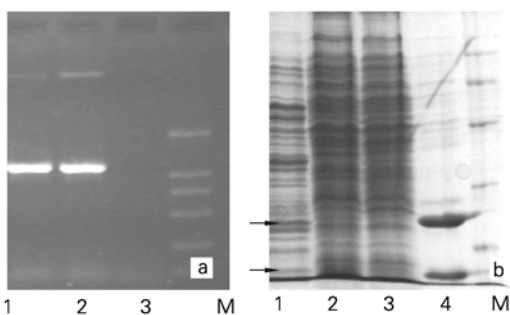


图 3 菌株 M095/pAPIJ 接合转化子的 PCR 验证以及 SDS-PAGE 分析重组别藻蓝蛋白基因的表达

Fig. 3 PCR fragment of exconjugant of strain M095/pAPIJ and SDS-PSGE analysis expression of rAPC

a. 转化子的 PCR 验证。1, 2 为接合转化子的 PCR 产物; 3 为阴性对照;

将该转化子进行摇瓶发酵培养, 24 h 后添加诱导剂硫链丝菌素 5 mg/L。对蛋白提取物通过 SDS-PAGE 表明硫链丝菌素诱导了重组别藻蓝蛋白(rAPC)的表达(图 3b), 得到两个蛋白大小分别约为 22 ku 和 17 ku, 其分别对应于 APC 的  $\alpha$  和  $\beta$  亚基。而野生型菌株和转化了质粒 pIJ8600 的接合转化子均未得到相应的蛋白带。

### 3 讨论

本研究用接合转移的方法建立海洋链霉菌分离株 M095 的遗传转化体系,不仅可以避开因为菌株本身存在的限制修饰系统而难于通过 PEG-介导的原生质体转化法转入 DNA,而且较为简单、省时,避免了制备原生质体的繁琐操作,是对于尚未建立转化系统或转化困难链霉菌的一种重要的导入 DNA 的方法。

Southern 杂交证明质粒 pIJ8600 已经整合到菌株 M095 染色体上。质粒 pIJ8600 含有噬菌体  $\phi$ C31 的整合酶 (*int*) 基因以及 *attP* 位点。噬菌体  $\phi$ C31 的整合酶基因是丝氨酸重组酶家族中的一员,可以催化位点特异性重组,因此  $\phi$ C31 *int/attP* 被广泛应用于整合载体 (例如 pSET152 和 pIJ8600),并用于对链霉菌种属的遗传分析<sup>[7]</sup>。有研究证明  $\phi$ C31 或者含 *int/attP* 的整合型质粒整合于染色体上特定位点 *attB*<sup>[7]</sup>。质粒 pIJ8600 在菌株 M095 染色体上的 *attB* 位点已经得到克隆,序列比对的结果表明此 *attB* 位点是高度保守序列。这些结果表明在菌株 M095 的 *attB* 位点可被噬菌体  $\phi$ C31 的整合酶所识别从而将质粒整合到菌株 M095 的染色体上,同时也表明噬菌体的 *attP* 位点在菌株 M095 中是有活性的。

通过用接合转移法将连有 *apc* 基因的质粒 pAPIJ 转入菌株 M095 中,在菌株 M095 中检测到重组别藻蓝蛋白的表达。SDS-PAGE 分析转化株中有两条分子量大小为 22ku 和 17 ku 的蛋白产生,与天然 APC 蛋白的大小相近。天然 APC  $\alpha$  和  $\beta$  亚基大小约为 19.5 和 17.4 ku<sup>[12]</sup>,而本研究在 *apc* 基因  $\alpha$  亚基的 N 端引入组氨酸标签和一段柔性臂,使其分子量比天然的  $\alpha$  亚基大了约 3 ku。而野生型菌株中未发现这两条蛋白。这表明 *tipAp* 启动子在该菌株中可以行使其功能。*rAPC* 的表达进一步表明通过接合转移法建立的全霉素产生菌 M095 的 DNA 转移系统是有效的。全霉素属于二硫吡咯酮类化合物,最初是从灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 的发酵产物中分离得到的<sup>[13]</sup>,之后于诱变的带小棒链霉菌 (*S. clavuligerus*) 的代谢产物分离到<sup>[14]</sup>。同时全霉素表现出较广的抑菌活性和抗肿瘤特性<sup>[15]</sup>。对该链霉菌菌株的遗传操作可以进一步通过诱导或抑制与全霉素合成有关基因而了解此抗生素生物合成途径和调节机制,从而通过增加调控基因的拷贝数来增加全霉素活性。同时这种遗传转化技术还可以提供更为直接的方式对这个菌株进行直接操作而合成新的杂合抗生素。

自 20 世纪 70 年代东京微生物化学研究所从海洋放线菌 (*Chainia* sp.) 分离到抗生素 SS-228Y 以来<sup>[16]</sup>,

从海洋放线菌中发现的结构新颖的具有强的生理活性的物质已达 100 多个,其中 90% 以上产生于放线菌中的链霉菌属。因此海洋链霉菌已经成为工业筛选新的活性化合物的主要源泉。由于海洋环境的高盐和低营养物质的特性赋予海洋链霉菌代谢和生理上均不同于陆地链霉菌。因此建立海洋链霉菌的基因转移系统将具有重要意义。作者首次报道了海洋链霉菌遗传转化方法,这将为开展海洋链霉菌的 DNA 转移工作奠定基础。

参考文献:

- [1] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, *et al.* Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [2] 吴胜, 夏焕章. 链霉菌基因转移的方法[J]. 生物工程进展, 2002, 22(1): 91-95.
- [3] 崔洪霞. 胶州湾海洋链霉菌抑菌活性筛选: 2 株抑菌活性菌株的鉴定及次级代谢产物的研究[D]. 中国科学院海洋研究所博士论文, 2004.
- [4] Rajendra R M, Li F C, Song Q, *et al.* Chandrananimycins A-C: Production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. Isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions[J]. *J Antibiot*, 2003, 56: 622-629.
- [5] Lambalot R H, Cane D E. Isolation and characterization of 10-deoxymethynolide produced by *Streptomyces venezuelae* [J]. *J Antibiot*, 1992, 45: 1 981-1 982.
- [6] Flett F, Mersinias V, Smith C P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA restricting *Streptomyces*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 155: 223-229.
- [7] Combes P, Till R, Bee S, *et al.* The streptomyces genome contains multiple pseudo-*attB* sites for the  $\phi$ C31-Encoded Site-Specific Recombination System[J]. *J Bacteriol*, 2002, 184:5 746-5 752.
- [8] Qin S. Cloning and sequencing of the allophycocyanin genes from *Spirulina maxima* (Cyanophyta)[J]. *Chinese Journal of Oceanology Limnology*, 1998, 16 (Suppl): 6-11.
- [9] Takano E, White J, Thompson C J, *et al.* Construction of thioStrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *Streptomyces* spp.[J]. *Gene*, 1995, 166: 133-137.
- [10] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [11] Kuhstoss S, Rao R N. Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage phi $\phi$ 31[J]. *J Mol Biol*, 1991,

- 222: 897-908.
- [12] Sun L, Wang S M. Allophycocyanin complexes from the phycobilisome of a thermophilic blue-green alga *Myxosarcina concinna* Printz[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2003, 72: 45-53.
- [13] Eitlinger L, Gaumann E, Hutter R, *et al.* Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, Holomycin[J]. *Helv Chim Acta*, 1959, 42:563-569.
- [14] Okamura K, Soga K, Shimauchi Y, *et al.* Holomycin and N-propionylholothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer[J]. *J Antibiot*, 1977, 30:334-336.
- [15] Webster J M, Li J, Chen G. Anticancer properties of dithiopyrrolones[P]. U.S. patent : 6020360. 2000.
- [16] Kitahara T, Naganawa H, Okazaki T, *et al.* The structure of SS-228Y, an antibiotic from *Chainia* sp.[J]. *J Antibiot*, 1975, 28(4):208-215.

## Gene transfer system for the marine *Streptomyces* sp. isolated M095

HOU Yan-hua<sup>1,2</sup>, WANG Shu-jun<sup>3</sup>, LI Fu-chao<sup>1</sup>, QIN Song<sup>1</sup>

(Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

**Received:** Aug. 8, 2005

**Key words:** Transformation; holomycin; intergeneric conjugal transfer; marine *Streptomyces*

**Abstract:** We established a gene transfer system for marine *Streptomyces* sp. M095. A recombinant *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002, pIJ8600) was obtained by transforming *E. coli* ET12567 (pUZ8002) with *oriT*-containing *E. coli-Streptomyces* shuttle plasmid pIJ8600. In conjugal transfer experiments, *E. coli* ET12567 (pUZ8002, pIJ8600) was the donor, and the recipient was marine *Streptomyces* sp. M095 spore after pregerminating by heat shock. Mating between donor and recipient was conducted. Plasmid pIJ8600 was introduced into strain M095 by conjugation from *E. coli* ET12567. The transformation frequency for this system was approximately  $1.99 \times 10^{-4}$  exconjugants /recipient. Southern hybridization analysis indicated that plasmid pIJ8600 integrated at a unique site in the chromosome of marine *Streptomyces* sp. M095. In addition, the Allophycocyanin gene (*apc*) originating from *Spirulina maxima* (Cyanophyta) was cloned between *Xba*I and *Bgl*II sites of pIJ8600, yielded the plasmid pAPIJ. Plasmid pAPIJ was transferred into marine *Streptomyces* sp. M095 by conjugation, which was used to demonstrate this transformation system. By SDS-PAGE analysis, two proteins with molecular masses of 22 and 17 ku, which were corresponding to the alpha and beta subunits of APC, were expressed in strain M095/pAPIJ. These results indicated that a genetic transformation system for marine *S.* sp. isolated M095 was successfully established.

( 本文编辑 : 张培新 )