

浅蓝霉素产生菌海洋异壁放线菌 WH1-2216-6 遗传操作体系的建立

林钦恒^{1,2}, 张光涛¹, 李苏梅¹, 张海波¹, 鞠建华¹, 朱伟明³, 张长生^{1*}

¹ 海洋生物资源可持续利用重点实验室, 中国科学院海洋微生物研究中心, 广东省海洋药物重点实验室, 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301

² 中国科学院研究生院, 北京 100049

³ 中国海洋大学医药学院, 青岛 266003

摘要 【目的】建立二联吡啶类抗生素浅蓝霉素的产生菌海洋异壁放线菌 *Actinoalloteichus* sp. WH1-2216-6 的遗传操作体系, 以便对浅蓝霉素的相关生物合成基因进行体内敲除和基因回补等遗传操作。【方法】以整合型质粒 pSET152 为外源 DNA, 探索和优化了异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株与大肠杆菌进行接合转移实验的方法和条件, 以此为基础, 利用 PCR-targeting 系统在体外构建了一个浅蓝霉素二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因敲除的 cosmid 质粒 pCSG2104, 并在优化后的条件下通过接合转移将其转入异壁放线菌 WH1-2216-6 野生型菌株。【结果】获得了异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的浅蓝霉素二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因缺失的双交换突变株, 发酵结果显示该突变株失去了产生浅蓝霉素 A 和浅蓝霉素 D 的能力。【结论】高浓度的 $MgSO_4$ 对大肠杆菌与异壁放线菌的接合转移有促进作用, 介导了异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的遗传操作体系的成功建立, 为进一步研究浅蓝霉素的生物合成基因和对浅蓝霉素结构进行组合生物合成改造奠定了基础, 同时也为其他类似放线菌的遗传操作体系的建立提供了借鉴和参考。

关键词: 异壁放线菌, 遗传体系, 浅蓝霉素, 生物合成, 二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 08-1032-10

浅蓝霉素 (Caerulomycins) 是一种二联吡啶类抗生素 (图 1), 由 Funk A 和 Divekar PV 于 1959 年从蓝色链霉菌 (*Streptomyces caeruleus*) 中首先分离发现了浅蓝霉素 Caerulomycin A^[1], 并于 1967 年确定了其化学结构 (图 1)^[2]。之后科学家们又从同一菌株中先后发现、分离和鉴定了浅蓝霉素 D 等数个类似物^[3–6]。异壁放线菌 *Actinoalloteichus* sp. WH1–

2216-6 是从威海沿海采集的海泥样品中分离得到的一株海洋放线菌, 主要能积累生产浅蓝霉素 A 和浅蓝霉素 D (图 1)^[7]。

浅蓝霉素主要具有较强的抗真菌活性和中等的抗细菌活性^[3]。Chatterjee 和 Chandran 等人发现浅蓝霉素也具有抗变形虫活性和植物性毒性^[8]。最近的研究表明, 浅蓝霉素 A 也具有免疫抑制作

基金项目: 国家自然科学基金 (31070045); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2010CB833805); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX2-YW-G-065, KZCX2-YW-JC202, LYQY200805); 中国科学院百人计划项目 (08SL111002)

* 通信作者。Tel: +86-20-89023038; Fax: +86-20-89023100; E-mail: czhang@scsio.ac.cn

作者简介: 林钦恒 (1985–), 男, 广东陆丰人, 硕士, 主要研究方向为微生物天然产物生物合成。E-mail: linqinheng@163.com

收稿日期: 2011-02-24; 修回日期: 2011-03-24

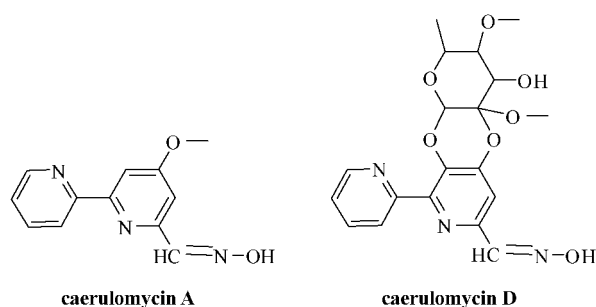


图1 浅蓝霉素 A 和浅蓝霉素 D 的化学结构式

Fig.1 Chemical structure of Caerulomycin A and Caerulomycin D.

用^[9],其机制是通过上调 T 细胞上的细胞毒 T 淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)的表达和抑制 CD28 的表达,以及抑制白介素-4(IL-4)和干扰素- γ (IFN- γ)的分泌,同时,相对于著名的免疫抑制剂环孢霉素 A,浅蓝霉素 A 能更加有效地抑制白细胞增殖^[9]。由于浅蓝霉素家族成员具有新颖的二联吡啶的结构特征和较强的免疫抑制活性,美国 Nostrum 药物公司正致力于将浅蓝霉素 A 开发为免疫抑制剂方面的新药。

基于浅蓝霉素具有良好的药物开发前景,我们试图通过组合生物合成策略对浅蓝霉素进行结构改造,以期发现生物活性更好的新结构类似物或者增加其产量,从而更适合工业化开发。组合生物合成技术依赖于通过对抗生素生物合成中的一些关键基因进行替换、阻断、重组等遗传操作,改变原有的生物合成途径,或产生新的代谢旁路,从而利用天然产物生物合成机制获取新的“非天然”天然产物^[10-11]。可是,成功建立抗生素生产菌的遗传操作体系是对抗生素结构进行组合生物合成改造的前提条件。目前还未有任何关于异壁放线菌遗传操作体系的报道。本文旨在建立浅蓝霉素产生菌异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的遗传操作体系,利用 PCR-targeting 技术和接合转移的方法^[12-13],对浅蓝霉素生物合成途径中的相关生物合成基因进行阻断突变。本文在了解海洋异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的抗生素敏感性的基础上,利用整合型载体 pSET152 摸索出了该菌株进行接合转移的较佳条件,发现了高浓度镁离子对接合转移的促进作用,成功实现了浅蓝霉素生物合成基因的敲除突变,从而建立了异壁放线菌 WH1-2216-6 遗传操作体系。该体系的建立为进一步研究浅蓝霉素的生物合成奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 异壁放线菌 *Actinoalloteichus* sp. WH1-2216-6 由中国海洋大学天然药物化学研究室提供,用 TSB 或高氏一号培养基在 28-30℃ 培养。大肠杆菌 *E. coli* 系列菌株来自本实验室,除了 *E. coli* BW25113/pIJ790 于 30℃ 培养外,其他均用 LB 培养基在 37℃ 培养。本文中所用质粒列在表 1 中。

表1 所用质粒列表

Plasmids	Relevant genotype or characteristic(s)	Sources
pIJ790	λ -RED (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>) , <i>cat</i> , <i>araC</i> , <i>rep101</i> ^{ts}	[13]
pIJ773	<i>aac</i> (3) <i>IV</i> , <i>oriT</i>	[13]
pUZ8002	<i>tra</i> , <i>neo</i> , RP4	[14]
pSET152	<i>acc</i> (3) <i>IV</i> , <i>oriT</i> , <i>att</i> ^{ΦC31}	[15]
SuperCos 1	<i>bla</i> , <i>neo</i> , <i>cos</i>	[16]
pCSG2016	<i>bla</i> , <i>neo</i> , <i>cos</i> , a ca. 40 kb fragment containing a putative 2 , 3-dihydroxybenzoate-AMP ligase inserted into cosmid Supercos 1	Unpublished
pCSG2104	<i>bla</i> , <i>neo</i> , <i>cos</i> , a fragment of <i>aac</i> (3) <i>IV</i> (<i>Apra</i> ^R) + <i>oriT</i> inserted into pCSG2016 to replace the dihydroxybenzoate-AMP ligase gene	This study

1.1.2 培养基: (1) LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母抽提物 5 g, NaCl 10 g, 加水至 1 L, pH 7.0; (2) TSB 培养基: 大豆蛋白胨 5 g, 胰蛋白胨 15 g, 蔗糖 100 g, 葡萄糖 2.5 g, K₂HPO₄ 2.5 g, 加入人工海水至 1 L, pH 7.0; (3) 高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20 g, K₂HPO₄ 0.5 g, KNO₃ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 10 mg, 加入人工海水至 1 L, pH 7.0; (4) ISP4 培养基: 可溶性淀粉 10 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, NaCl 1 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, CaCO₃ 2 g, FeSO₄·7H₂O 1 mg, MnCl₂ 1 mg, ZnSO₄·7H₂O 1 mg, 加入人工海水至 1 L, pH 7.0-7.4; (5) 放线菌二号培养基: 可溶性淀粉 10 g, 葡萄糖 20 g, 酵母浸膏 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, CaCO₃ 2 g, 加入人工海水至 1 L, pH 7.0。以上对应的固体培养基加入 2% 的琼脂粉。

1.1.3 试剂和主要仪器: 酶类和 DNA marker 等均购自 TaKaRa 公司, DNA 回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自 Axygen 生物技术有限公司, 溶菌酶和蛋白

酶 K 等试剂购自北京鼎国公司,其它常规试剂均为国产分析纯级产品,各种抗生素购自国内试剂公司,使用浓度为氨苄青霉素(Ampicillin) 100 mg/L,卡那霉素(Kanamycin) 50 mg/L,阿泊拉霉素(Apramycin) 50 mg/L,氯霉素(Chloramphenicol) 50 mg/L,甲氧苄氨嘧啶(Trimethoprim) 50 mg/L。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,DNA 测序由上海美季公司完成。Eppendorf 5331 梯度 PCR 仪,Eppendorf 5810R 台式大容量多功能冷冻离心机,Eppendorf 5418 小型台式高速离心机,Heidolf Laborota4000 eco/WB/G3 旋转蒸发仪,Varian Pro star 半制备液相色谱,高效液相色谱柱为 Luna 150 × 4.6 mm(phenomex)。

1.2 异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的抗生素敏感性检测

采用 TSB 培养基 配制一系列的各种抗生素终浓度为 6.25、12.5、25、50、100 mg/L 的平板,包括氨苄青霉素、壮观霉素(Spectinomycin)、氯霉素、卡那霉素、阿泊拉霉素、硫链丝菌素(thiostrepton)和甲氧苄氨嘧啶。用竹签挑取新鲜孢子采用划线法接种于各个抗生素浓度梯度固体平板上,于 30℃ 培养,在 14 天内观察其生长情况。

1.3 大肠杆菌和异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的接合转移实验方法和条件的探索

E. coli ET12567/pUZ8002/pSET152 在 50 mL 含 25 mg/L 卡那霉素,25 mg/L 氯霉素和 50 mg/L 阿泊拉霉素的 LB 液体培养基中于 37℃ 生长至 OD_{600} 值约为 0.6–0.8 时,离心收集菌体(3220 × g 5 min),用 LB 清洗菌体 2–3 遍后,重悬于 1 mL LB 培养基中,作为接合转移的供体菌。

异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株于 TSB 固体培养基上培养约 14 天至孢子成熟,用无菌棉签将孢子收集到 TSB 液体培养基中,涡旋震荡 1 min 充分分离孢子,棉花过滤后以 3220 × g 离心 5 min 去除上清,将孢子重悬于约 5 mL TSB 液体培养基中,50℃ 热激 10 min,于 28℃ 培养萌发后,作为接合转移的受体菌。为了确定孢子萌发的较佳时间,我们探索了萌发 1.5–13 h 后的孢子与大肠杆菌的接合效率。

取上述的受体菌 1 mL 和供体菌 200 μL 混合均匀,涂布于 ISP4 固体培养基上,并辅以不同浓度的 $MgSO_4$ (终浓度分别为 10、30、50、75、100 mmol/L),观察镁离子对接合转移效率的影响;另取受体菌

1 mL 涂布于相应的 ISP4 固体培养基上作为对照。吹干后置于 30℃ 培养 20 h 后,直接用终浓度为 40 mg/L 阿泊拉霉素和 60 mg/L 甲氧苄氨嘧啶的无菌水覆盖平板,吹干,置于 30℃ 培养箱中,培养约 5 天后进行观察。并以所形成肉眼可辨的接合转移子为准,用接合转移子数除以孢子量计算接合效率,数据取 3 次重复试验的平均值,上述所用的受体菌孢子量(按稀释涂布平板后长出的单菌落数换算)约为 8.0×10^7 。

1.4 异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株基因组 DNA 的提取

采用李翔等报道的方法^[17]提取异壁放线菌的基因组 DNA。将菌株在 TSB 液体培养基中培养 3–5 天,12400 × g 离心 2 min,弃上清,收集菌丝体,或者从平板上直接刮取适量孢子提取基因组 DNA。加入等体积的含 0.2 g/L 溶菌酶和 0.5 g/L 蛋白酶 K 的 TE 溶液(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA, pH 8.0)重悬菌体,于 37℃ 温育 30 min;加入 1/10 体积 10% SDS 和 1/10 体积 0.5 mol/L EDTA 后于 55℃ 温育 1 h;加入 2/3 体积预冷的 7 mol/L 乙酸铵溶液混合均匀,12400 × g 离心 5 min,取上清加入 2 倍体积无水乙醇,12400 × g 离心 10 min,弃上清;用 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次,小心弃上清,风干,将基因组 DNA 溶于适量双蒸无菌水中,置于 -20℃ 备用。

1.5 浅蓝霉素生物合成相关的二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因及其阳性克隆子的获取

利用微生物次级代谢产物生物合成途径中赖氨酸氨基转移酶基因的保守序列,设计一对简并性引物 nikC-F (5'-GTSATMGYSACCCCGCAGAC-3') 和 nikC-R (5'-CCGAGSGTSGTGATGTTCTT-3'),以异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,获得的 PCR 产物(340 bp)经克隆测序、比对分析后确定该产物包含了可能与浅蓝霉素生物合成相关的赖氨酸氨基转移酶基因的部分序列。并以此为探针成功从 WH1-2216-6 菌株的 SuperCos 1 基因组文库中筛选到数个阳性克隆子(未发表),挑选出一个阳性克隆,其质粒命名为 pCSG2016,对其进行部分测序并分析,得到一个二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因(2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase)的全序列,以该基因作为对象,利用 PCR-targeting 技术进行基因阻断突变研究。

1.6 通过 PCR-targeting 获得重组质粒 pCSG2104

根据浅蓝霉素二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因的 DNA 序列,设计 DALP-F (5'-GAACGG GTCACCCACACCACCTCGTCCCCGCCCTGGTCATT CCGGGGATCCGTCGACC-3',正向)和 DALP-R (5'-GGCGACGGCCGCCGCCGCCGATCGAGGGGTGCT CGGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3',反向)作为该基因的敲除引物。按照文献的方法和流程进行 PCR-targeting 的操作^[12-13],步骤如下:(1)将阳性克隆 pCSG2016 转入大肠杆菌 *E. coli* BW25113/pIJ790 中得到 *E. coli* BW25113/pIJ790/pCSG2016,于 30℃ 添加终浓度为 10 mmol/L 的 L-阿拉伯糖诱导 λ /Red 重组系统,并将该菌制备成为电转感受态细胞;(2)用 *Eco*RI 和 *Hind* III 酶切质粒 pIJ773,回收 1.4 kb 左右含有转移原点 *oriT* 和阿泊拉霉素抗性基因 *aac*(3) IV 的 DNA 片段,作为 PCR 模板,用 DALP-F 和 DALP-R 作为引物扩增出 1.4 kb 的片段。50 μ L 反应体系包含 10 \times Buffer 5 μ L,高保真 DNA 聚合酶 Pyrobest 3 U,dNTPs 0.5 mmol/L,DMSO 2.5 μ L,引物各 0.5 μ mol/L,DNA 模板约 1 ng,加水至 50 μ L。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,60℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 90 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。最后将 1.4 kb 的 PCR 产物回收纯化待用;(3)将纯化后的 1.4 kb 的 PCR 产物电转入 *E. coli* BW25113/pIJ790/pCSG2016 的感受态细胞中使其发生重组,在 LB 平板(含 100 mg/L 氨苄青霉素,50 mg/L 卡那霉素,50 mg/L 阿泊拉霉素)上于 37℃ 过夜培养,从平板上挑出单菌落,抽提质粒,并命名为 pCSG2104,该质粒中的二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因的部分片段被 *oriT* 和 *aac*(3) IV 取代;(4)将构建好的重组质粒 pCSG2104 电转到 *E. coli* ET12567/pUZ8002 中,构建成 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pCSG2104,作为接合转移的供体菌。

1.7 异壁放线菌 WH1-2216-6 双交换突变株的获得

异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的孢子 50℃ 热激 10 min 后于 28℃ 摇菌萌发 13 h,作为受体菌,*E. coli* ET12567/pUZ8002/pCSG2104 作为供体菌,按照第 1.3 节中所描述的方法,在 ISP4(添加 75 mmol/L 的 $MgSO_4$) 固体培养基上进行了接合转移实验。30℃ 培养 6-8 天后,用牙签将平板上长出的接合转移子菌落划线转接到 TSB 丰富培养基平板(含 50 mg/L

阿泊拉霉素和 50 mg/L 甲氧苄氨嘧啶)上,30℃ 培养 4-6 天,待其长成小菌苔并产孢,直接刮取适量孢子抽取各个突变株的基因组 DNA,设计检测引物 DAL-F(5'-GGGACGCGTCGTCCTGGGA-3'),DAL-R(5'-GTAGCGGGCTTGTAGCGGGC-3'),利用 PCR 扩增来判断接合转移子的基因型(单交换或者双交换突变株)。20 μ L 反应体系为:10 \times Buffer 2 μ L,DNA 聚合酶 rTaq 1.5 U,dNTPs 0.5 mmol/L,DMSO 2 μ L,引物各 0.5 μ mol/L,DNA 模板约 1 ng,加水至 20 μ L。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,65℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 90 s,32 个循环;72℃ 延伸 10 min。

1.8 异壁放线菌野生菌及其突变株的发酵和高效液相色谱(HPLC)分析

将异壁放线菌 WH1-2216-6 野生菌或突变株的适量孢子直接接种 50 mL 放线菌二号发酵培养基(250 mL 三角瓶装),于 28℃,200 r/min 条件下摇菌发酵。培养第 9 天后取 3 mL 发酵液,加入 10 mL 的丁酮进行萃取,吸取上清萃取液用旋转蒸发仪将丁酮蒸干得到萃取浓缩物样品,溶于 500 μ L 的甲醇中,进行高效液相色谱(HPLC)检测。检测条件为:流动相 A 相为 10% 乙腈,含 0.08% 甲酸,流动相 B 相为 90% 乙腈;流速为 1 mL/min,检测波长为 254 nm。HPLC 进样程序:0-20 min,流动相比比例为 A 相/B 相(体积比)为 95:5-0:100;20-21 min,A 相/B 相为 0:100;21-22 min,A 相/B 相为 0:100-95:5;22-30 min,A 相/B 相为 95:5。

2 结果和分析

2.1 异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的抗生素敏感性试验及遗传筛选标记的选择

为了建立异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的遗传操作系统,我们首先检测了 WH1-2216-6 菌株对多种抗生素的敏感性,以便寻找合适的抗性筛选标记。结果表明 WH1-2216-6 菌株对氯霉素和阿泊拉霉素非常敏感,在 6.25 mg/L 的最低浓度下菌株都无法生长,而对壮观霉素、卡那霉素、硫链丝菌素和甲氧苄氨嘧啶等抗生素都具有明显的抗性(表 2)。因此,我们选择阿泊拉霉素作为 WH1-2216-6 突变株的筛选标记,并将甲氧苄氨嘧啶作为接合转移实验中大肠杆菌的抑制剂。

表 2 WH1-2216-6 菌株对不同抗生素的敏感性

Table 2 The sensitivity of *Actinoalloteichus* sp.

WH1-2216-6 to various antibiotics

Antibiotics/(mg/L)	6. 25	12. 5	25	50	100
Ampicillin	+	+	+	+	+
Spectinomycin	+	+	+	+	nt
Chloramphenicol	-	-	-	-	-
Kanamycin	+	+	+	- / +	- / +
Apramycin	-	-	-	-	-
Thiostrepton	+	+	+	+	+
Trimethoprim	+	+	+	nt	nt

- , no growth; - / + , poor growth; + , growth; nt , not tested

2.2 WH1-2216-6 菌株中二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因的获得

利用简并引物 nikC-F and nikC-R ,我们从 WH1-2216-6 菌株的 SuperCos 1 基因组文库中筛选到 8 个阳性克隆子 ,并获得了其中一个阳性克隆 pCSG2016 的部分序列 ,生物信息学分析发现一个可能编码二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶的基因 (GenBank 序列号为 JF419316) ,与来自于 *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 的 2 ,3-二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因 (序列号为 ZP_04696968) 最为相似 ,一致性 (Identities) 达到 55% ,与来自 *Streptomyces ansochromogenes* 的 SanJ (adenylate-forming enzyme , GenBank 序列号为 AAL85694) 也很相似 ,一致性达到 54% 。因此 ,我们将该基因作为阻断突变的研究对象 ,检测其与浅蓝霉素的生物合成的相关性。

2.3 异壁放线菌与大肠杆菌接合转移实验方法和条件的探索

接合转移是目前将外源 DNA 导入链霉菌等放线菌的首选技术手段 ,具有简便、快捷、成功率高等特点^[18-19]。由于孢子为单倍体 ,接合转移中一般选择放线菌的孢子作为受体菌 ,虽然本实验室也有直接利用菌丝体进行接合转移并成功建立遗传操作体系的例子^[20] ,但鉴于 WH1-2216-6 菌株生产的孢子十分丰富 ,我们最终选择利用菌株的孢子通过接合转移的方法来探索异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的遗传操作体系的建立。为优化 WH1-2216-6 菌株的孢子与大肠杆菌进行接合转移实验的方法和条件 ,我们首先以整合型载体 pSET152^[15] 为研究对象 ,摸索将外源 DNA 通过接合转移方法进入 WH1-2216-6 菌株的条件。

2.3.1 异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株孢子预萌发

时间对接合转移效率的影响的探索: 孢子的预萌发时间对接合转移效率具有显著影响^[21] ,处于最佳萌发状态的孢子更容易接受外源的 DNA。因此我们进行了 WH1-2216-6 菌株孢子的预萌发时间梯度试验。将新鲜收集的孢子热激后于 28℃ 分别摇菌萌发 1.5 h ,5 h ,9 h 和 13 h 之后与大肠杆菌进行接合转移实验 (所用的 ISP4 固体平板添加 10 mmol/L 的 MgSO₄)。抗生素覆盖后培养 5 天 ,观察到平板上都长出了 WH1-2216-6 菌株的白色单菌落 ,由于阴性对照平板上并没有菌落生长 ,说明这些菌落都是接合转移子 ,接合转移效率约为 10⁻⁶。随着孢子萌发时间的延长 ,平板上的接合转移子数目也相应增长 ,但预萌发 9 h 和 13 h 的孢子的接合转移效率接近一致 (表 3)。

表 3 WH1-2216-6 菌株孢子预萌发时间和培养基

的 Mg²⁺ 离子浓度对接合转移效率的影响

Table 3 Effects of spore germination timing of WH1-2216-6 and Mg²⁺ concentration in medium on the conjugation efficiency

Spore germination timing/h	Amounts of spores	Amounts of exconjugants	Conjugation efficiency
1. 5	0. 8 × 10 ⁸	132	1. 65 × 10 ⁻⁶
5		263	3. 29 × 10 ⁻⁶
9		456	5. 70 × 10 ⁻⁶
13		470	5. 88 × 10 ⁻⁶
Concentration of Mg ²⁺ in Meidium /(mmol/L)	Amounts of spores	Amounts of exconjugants	Conjugation efficiency
10	0. 8 × 10 ⁸	470	5. 88 × 10 ⁻⁶
30		1592	1. 99 × 10 ⁻⁵
50		2792	3. 49 × 10 ⁻⁵
75		> 10 ⁴	> 10 ⁻⁴
100		> 10 ⁴	> 10 ⁻⁴

2.3.2 培养基中 Mg²⁺ 离子浓度对于接合转移效率的影响: 由于 Mg²⁺ 离子在 DNA 的复制和修复以及 DNA 双螺旋结构的稳定性等方面具有重要作用^[22] ,因此 ,我们也探索了培养基中 Mg²⁺ 离子浓度对于接合转移效率的影响。将 WH1-2216-6 菌株的孢子萌发 13 h 后 ,以整合型质粒 pSET152 为外源 DNA 进行接合转移实验 ,ISP4 固体平板上分别在添加了不同浓度 (30 ,50 ,75 和 100 mmol/L) 的 MgSO₄。培养 5 天后 ,观察和计算接合转移效率 (表 3)。结果表明 ,提高 Mg²⁺ 离子浓度能够有效地促进接合转

移的效率。在含有50 mmol/L Mg^{2+} 离子的接合转移培养基中,接合转移效率比含有10 mmol/L Mg^{2+} 离子的培养基提高了10倍左右,达到了 3.49×10^{-5} 。而含有75和100 mmol/L Mg^{2+} 离子的ISP4平板上,菌落的生长接近菌苔状态($>10^4$ 个接合转移子),接合转移效率提高到 10^{-4} 。

这些实验结果表明整合型载体 pSET152 比较容易通过接合转移进入 WH1-2216-6 菌株,并且在孢子预萌发9 h或13 h和ISP4平板含有75或100 mmol/L Mg^{2+} 离子的条件下能够达到较高的接合转移效率。因此,我们选择将 WH1-2216-6 菌株的孢子进行13 h的预萌发后,在添加75 mmol/L的 $MgSO_4$ 的ISP4平板上进行接合转移实验。

2.4 利用 PCR-targeting 技术和接合转移实验获得突变株

利用 PCR-targeting 的方法,我们成功敲除了 pCSG2016 上的二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因,获得了 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pCSG2104。使用检测引物对 pCSG2104 进行 PCR 扩增,获得了1634 bp的DNA片段(图2泳道4),而以出发质粒 pCSG2016 为模板则扩增出预期的763 bp的DNA片段(图2泳道3)。该结果证明了在质粒 pCSG2104 中发生了预期的双交换突变。将 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pCSG2104 作为供体菌,WH1-2216-6 菌株的孢子作为受体菌按照上述优化后的实验条件进行接合转移,培养8天后,观察到在每个9 cm平板(ISP4)上只出现了4-5个接合转移子,接合转移效率仅约为 5×10^{-8} 。

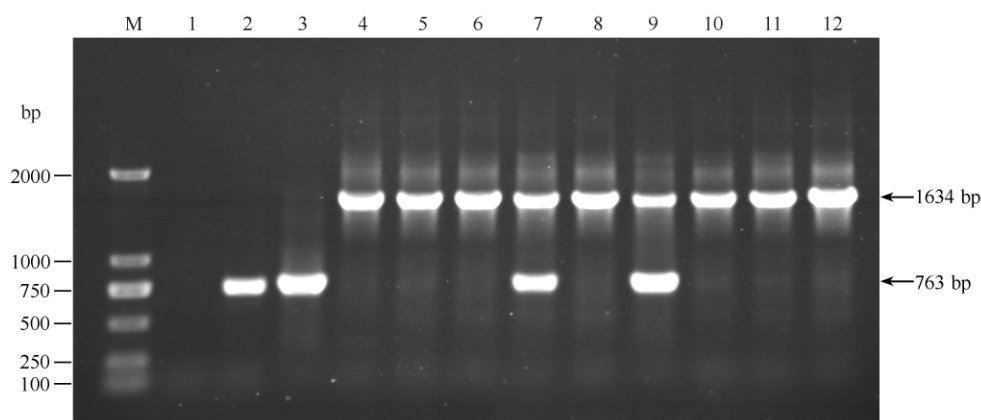


图2 WH1-2216-6 菌株野生型和突变株的PCR产物的电泳分析

Fig. 2 Gel electrophoresis analyses of PCR products from the wild type strain and mutants of *Actinoalloteichus* sp. WH1-2216-6. PCR was conducted using the primer pairs DAL-F, DAL-R, and the DNA templates were from: ddH₂O (negative control, lane 1); wild type WH1-2216-6 (lane 2); pCSG2016 (lane 3); pCSG2104 (lane 4); mutants CRM-m1 –CRM-m8 (lanes 5 –12). DNA marker was indicated in lane M.

2.5 异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的双交换突变株的筛选和发酵产物的高效液相色谱分析

挑选8个接合转移子于TSB培养基(含50 mg/L阿泊拉霉素和25 mg/L甲氧苄氨嘧啶)进行划线培养,6天后,从培养基上直接刮取适量菌丝体,提取各个接合转移子的基因组DNA,并利用检测引物(DAL-F和DAL-R)进行PCR验证。从接合转移子 CRM-m3 和 CRM-m5 的基因组中扩增出了736 bp和1634 bp两个DNA片段(图2泳道7,9),表明二者是单交换突变株,发生了整合型突变。而从接合转移子 CRM-m1、CRM-m2、CRM-m4、CRM-m6、CRM-m7 和 CRM-m8 的基因组中均只扩增出了

大小为1634 bp特异性片段(图2泳道5,6,8,10,11,12),经PCR产物测序验证后,确认了这些都是发生了二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因缺失的双交换突变株。这个结果表明双交换的概率较高(75% 8个中有6个)。

随机挑取2个双交换突变株 CRM-m2 和 CRM-m7 进行发酵培养,同时发酵培养野生型菌株异壁放线菌 WH1-2216-6 作为对照,用高效液相色谱(HPLC)检测发酵产物。浅蓝霉素A标准样品的保留时间是6.7 min(图3-D,“●”所对应的峰),浅蓝霉素D标准样品的保留时间是7.9 min(图3-E,“*”所对应的峰),与标准样品对比发现,野生型菌

株主要积累浅蓝霉素 A (图 3-A, 保留时间是 6.7 min, “●”所对应的峰), 而浅蓝霉素 D (图 3-A, 保留时间是 7.9 min, “*” 所对应的峰) 的产量相对较低。两个双交换突变株的发酵产物情况基本一致 (图 3-B, C), 都没有发现对应于浅蓝霉素 A (“●”) 和浅蓝霉素 D (“*”) 的 HPLC 峰, 说明这两个突变株都不再能够产生浅蓝霉素 A 和浅蓝霉素 D。这些

结果表明我们将外源 DNA 通过接合转移从大肠杆菌中导入到了异壁放线菌 WH1-2216-6 中, 并发生了预期的同源重组, 成功地获得了二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因缺失的双交换突变株。由于这些突变株不再能产生浅蓝霉素, 表明这个二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因可能参与了浅蓝霉素的生物合成。

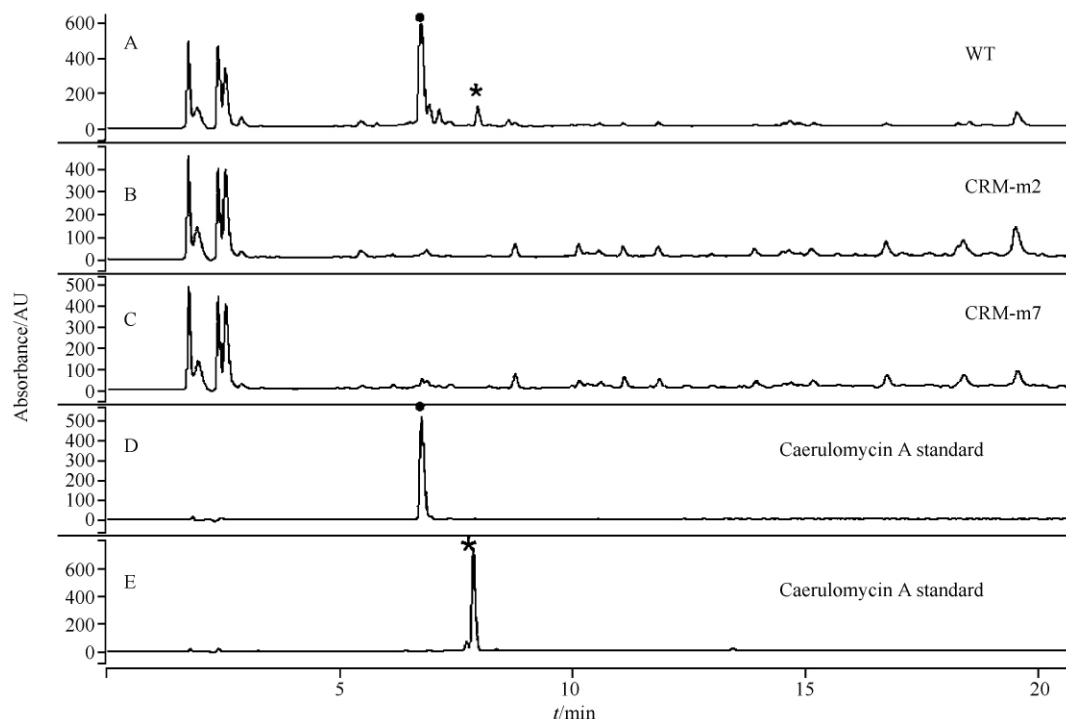


图 3 WH1-2216-6 菌株野生型和突变株的发酵产物的高效液相色谱分析

Fig. 3 HPLC analyses of fermentation products from wild type and mutant strains of *Actinoalloteichus* sp. WH1-2216-6. Extracts were from (A) wild type WH1-2216-6, Caerulomycin A (●), Caerulomycin D (*); (B) CRM-m2; (C) CRM-m7; (D) Caerulomycin A standard (●) and (E) Caerulomycin D standard (*).

3 讨论

异壁放线菌属的菌种最早发现于 1984 年^[23], Tamura 等于 2000 年经再分类研究将该属命名为 *Actinoalloteichus*^[24], 从而建立了异壁放线菌属。目前为止所发现的异壁放线菌属仅包含 3 个种, 分别为 *Actinoalloteichus cyanogriseus*^[24], *Actinoalloteichus spitiensis*^[25] 和 *Actinoalloteichus hymeniacidonis*^[26]。除了分类学方面之外, 对于异壁放线菌属的研究还非常少见, 所以目前还未发现任何有关异壁放线菌遗传操作系统的报道。异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株所产生的浅蓝霉素类化合物具有多种生物活性, 本

研究的目的是建立异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的遗传操作体系, 以便于通过组合生物合成技术进行浅蓝霉素的结构改造, 发现具有新颖生物活性的新型化合物。

异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株所产生的孢子十分丰富, 有利于通过使用文献描述的方法与大肠杆菌进行接合转移实验 (常用含有 10 mmol/L MgSO_4 的 ISP4 培养基)。早期我们按照文献方法多次尝试直接以质粒 pCSG2104 为外源 DNA 进行大肠杆菌与 WH1-2216-6 菌株的接合转移实验, 结果却从未成功获得过接合转移子。因此, 我们以整合型载体 pSET152 作为外源 DNA, 对 WH1-2216-6 的孢子萌发时间和接合转移培养基中的 Mg^{2+} 离子浓度进行

了探索和优化,从而确定了孢子萌发的较佳时间为 13 h,而且发现高浓度的 Mg^{2+} 离子能够有效促进接合转移效率,使用含有浓度超过 75 mmol/L $MgSO_4$ 的 ISP4 培养基,相对于文献中常用的含 10 mmol/L $MgSO_4$ 的 ISP4 培养基,接合转移效率可提高 100 倍。采用优化后的条件,我们将质粒 pCSG2104 作为外源 DNA 通过接合转移成功导入到了异壁放线菌 WH1-2216-6 中,但接合转移效率(10^{-8})远远低于同等条件下整合型载体 pSET152 的接合转移效率($> 10^{-4}$)。原因可能有两方面:首先是 pCSG2104 质粒的分子量(约 40 kb)比 pSET152 载体的(5.5 kb)大得多,相对而言更难进入异壁放线菌,影响了接合转移效率;另一方面,由于质粒 pCSG2104 在进入 WH1-2216-6 菌株后,还必须与其染色体 DNA 进行同源重组之后才能稳定遗传,产生接合转移子,这比整合型载体 pSET152 直接插入到基因组中的情况复杂得多,因而,WH1-2216-6 菌株的染色体 DNA 与外源 DNA 之间较低的同源重组效率,导致了较低的接合转移效率。尽管如此,我们还是成功敲除了异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株基因组中浅蓝霉素的一个可能的生物合成相关基因——二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶基因,获得了该基因的双交换突变株,而且双交换概率达到了 75%。经发酵检测,双交换突变株失去了生产浅蓝霉素的能力,证实了该基因与浅蓝霉素生物合成的相关性。另外,生物信息学分析表明,该基因与尼克霉素生物合成基因簇中的 *sanJ* 很相似。中科院微生物研究所谭华荣课题组的研究表明,*SanJ* 是尼克霉素生物合成中的关键酶,负责将吡啶甲酸转化为吡啶甲酸 CoA 酯,催化形成 AMP 衍生物^[27]。这也暗示了浅蓝霉素中该二羟基苯甲酸甲酯 AMP 连接酶具有与 *SanJ* 相似的功能。

综上所述,本研究成功建立了异壁放线菌 WH1-2216-6 菌株的遗传操作体系,为进一步研究浅蓝霉素的生物合成和获取浅蓝霉素的新结构类似物奠定了基础,同时也为其它难以进行遗传操作的异壁放线菌属菌种的相关遗传研究提供了借鉴和参考。

参考文献

- [1] Funk A, Divekar PV. Caerulomycin, a new antibiotic from *Streptomyces caeruleus* Baldacci: I. Production, isolation, assay, and biological properties. *Canadian Journal of Microbiology*, 1959, 5(4): 317-321.
- [2] Divekar PV, Read G, Vining LC. Caerulomycin, a new antibiotic from *Streptomyces caeruleus* Baldacci. II. Structure. *Canadian Journal of Chemistry*, 1967, 45(11): 1215-1223.
- [3] Chandran RR, Sankaran R, Divekar PV. Phytotoxic properties of Caerulomycin and some of its derivatives. *Journal of Antibiotics*, 1968, 21(3): 243.
- [4] McInnes AG, Smith DG, Wright JLC, Vining LC. Caerulomycins B and C, new 2,2'-dipyridyl derivatives from *Streptomyces caeruleus*. *Canadian Journal of Chemistry*, 1977, 55(24): 4159-4165.
- [5] McInnes AG, Smith DG, Walter JA, Wright JLC, Vining LC, Arsenault GP. Caerulomycin D, a novel glycosidic derivative of 3,4-dihydroxy-2,2'-dipyridyl 6-aldoxime from *Streptomyces caeruleus*. *Canadian Journal of Chemistry*, 1978, 56(13): 1836-1842.
- [6] Vining LC, McInnes AG, McCulloch AW, Smith DG, Walter JA. The biosynthesis of Caerulomycins in *Streptomyces caeruleus*. Isolation of a new Caerulomycin and incorporation of picolinic acid and glycerol into Caerulomycin A. *Canadian Journal of Chemistry*, 1988, 66(1): 191-194.
- [7] 王淑霞. 细胞毒活性海洋放线菌的筛选及两株目标菌株次级代谢产物的研究. 中国海洋大学硕士学位论文, 2007.
- [8] Chatterjee DK, Raether W, Iyer N, Ganguli BN. Caerulomycin, an antifungal antibiotic with marked *in vitro* and *in vivo* activity against *Entamoeba histolytica*. *Zeitschrift für Parasitenkunde-Parasitology Research*, 1984, 70(5): 569-573.
- [9] Singla AK, Agrewala JN, Vohra RM, Jolly RS. Use of bipyridine compound 'caerulomycin A' derivatives and analogs thereof as immunosuppressive agents. USA: US 2007/0078167 A1, April. 5, 2007.
- [10] Zhou H, Xie XK, Tang Y. Engineering natural products using combinatorial biosynthesis and biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(6): 590-596.
- [11] 白林泉, 邓子新. 微生物次级代谢产物生物合成基因簇与药物创新. 中国抗生素杂志(*Chinese Journal of Antibiotics*), 2006, 31(1): 80-89.
- [12] Gust B, Chandra G, Jakimowicz D, Tian YQ, Bruton CJ, Chater KF. Lambda red-mediated genetic

- manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Advances in Applied Microbiology*, 2004, 54: 107-128.
- [13] Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [14] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigma E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 204-211.
- [15] Bierman M, Logan R, Obrien K, Seno ET, Rao RN, Schoner BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, 116(1): 43-49.
- [16] Evans GA, Lewis K, Rothenberg BE. High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. *Gene*, 1989, 79(1): 9-20.
- [17] 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 李翔. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法. *生物技术 (Biotechnology)*, 2007, 17(1): 39-41.
- [18] Hou YH, Li FC, Wang SJ, Qin S, Wang QF. Intergeneric conjugation in holomycin-producing marine *Streptomyces* sp. strain M095. *Microbiological Research*, 2008, 163(1): 96-104.
- [19] Mo HB, Chen XY, Liu Y, Xia F, Yang KQ. Development of a multifunctional and efficient conjugal plasmid for use in *Streptomyces* spp. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2006, 70(6): 705-710.
- [20] 肖毅, 李苏梅, 马亮, 张改云, 鞠建华, 张长生. 台勾霉素生产菌指孢囊菌 NRRL 18085 遗传操作体系的建立. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50(8): 1014-1022.
- [21] 沈凤英, 李亚宁, 刘力强, 吴伟刚, 刘大群. 生防链霉菌 Men-myc-93-63 遗传转化体系的建立和优化. *中国农学通报 (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 2009, 25(13): 197-201.
- [22] Hartwig A. Role of magnesium in genomic stability. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2001, 475(1-2): 113-121.
- [23] 刘志恒, 张亚美, 阎逊初. 放线菌目中的一个新属. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 1984, 24(4): 295-298.
- [24] Tamura T, Liu ZH, Zhang YM, Hatano K. *Actinoalloteichus cyanogriseus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(4): 1435-1440.
- [25] Singla AK, Mayilraj S, Kudo T, Krishnamurthi S, Prasad GS, Vohra RM. *Actinoalloteichus spitiensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a cold desert of the Indian Himalayas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(6): 2561-2564.
- [26] Zhang HT, Zheng W, Huang JY, Luo HL, Jin Y, Zhang W, Liu ZH, Huang Y. *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov., an actinomycete isolated from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(10): 2309-2312.
- [27] Niu GQ, Liu G, Tian YQ, Tan HR. SanJ, an ATP-dependent picolinate-CoA ligase, catalyzes the conversion of picolinate to picolinate-CoA during Nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes*. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(3): 183-195.

Development of a genetic modification system for caerulomycin producer *Actinoalloteichus* sp. WH1-2216-6

Qinheng Lin^{1,2}, Guangtao Zhang¹, Sumei Li¹, Haibo Zhang¹, Jianhua Ju¹, Weiming Zhu³, Changsheng Zhang^{1*}

¹ Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, RNAM Center for Marine Microbiology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

² Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ School of Medicine and Pharmacy of Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: [Objective] In order to enable the caerulomycin biosynthetic study by *in vivo* gene disruptions, it is crucial to develop a genetic modification system for the producer *Actinoalloteichus* sp. WH1-2216-6. **[Methods]** The spore germination timing and the concentration of MgSO₄ in the medium were investigated for the optimal conjugal transfer of exotic pSET152 DNA into *Actinoalloteichus* sp. WH1-2216-6. Using the PCR-targeting system, we disrupted a putative caerulomycin 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase gene by “in-frame deletion” in *E. coli*, to afford the cosmid pCSG2104, which was then transferred into *Actinoalloteichus* sp. WH1-2216-6 by conjugation under optimized conditions. **[Results]**

The putative caerulomycin 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase in *Actinoalloteichus* sp. WH1-2216-6 was successfully disrupted by in-frame replacement with the *aac3IV* gene cassette. The resulting mutant strain was unable to produce caerulomycins. **[Conclusion]** The presence of high concentration of MgSO₄ in the medium can promote the conjugation efficiency between *E. coli* and *Actinoalloteichus* sp. WH1-2216-6 and lead to the successful development of a genetic modification system for *Actinoalloteichus* sp. WH1-2216-6, enabling the functional characterization of caerulomycin biosynthetic genes *in vivo*. A positive example was provided for other Actinobacteria recalcitrant to genetic modification.

Keywords: *actinoalloteichus*, genetic manipulation system, caerulomycin, biosynthesis, 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Science Foundation of China (31070045), by the 973 Program (2010CB833805), by the Funds of the Chinese Academy of Sciences for Key Topics in Innovation Engineering (KZCX2-YW-G-065, KZCX2-YW-JC202, LYQY200805) and by the 100 Talents Project of Chinese Academy of Sciences

* Corresponding author. Tel: +86-20-89023038; Fax: +86-20-89023038; E-mail: czhang@scsio.ac.cn

Received: 24 February 2011 / Revised: 24 March 2011