

球孢链霉菌一种抗生素生物 合成基因的核苷酸序列分析*

毛晓华 李元**

(中国医学科学院协和医科大学医药生物技术研究所 北京 100050)

摘要 C-1027是一种具有极强抗肿瘤活性的新型抗生素,由球孢链霉菌(*Streptomyces globisporus*)产生。F2 DNA 片段含有一种编码 C-1027生物合成的基因。以质粒 pUC18 为载体,对其进行了亚克隆,并对该片段进行了核苷酸序列分析,发现一编码 122 个氨基酸的开放阅读框架,经检索可能是一种新的序列。

关键词 C-1027抗肿瘤抗生素,生物合成基因,核苷酸序列分析

分类号 Q939.13

C-1027是由球孢链霉菌产生的一种新型抗生素,对肿瘤有极强的杀伤作用,其结构由一个发色团和一个酸性辅基蛋白组成。该抗生素抗肿瘤作用主要由九员烯炔环为中心的发色团所决定^[1-3]。采用引物 GA2 分别对球孢链霉菌及其阻断变株 AF67 总 DNA 进行 RAPD-PCR 扩增后,已经获得了一个参与 C-1027生物合成的基因^[4],该基因存在于 F2 DNA 片段中。对 F2DNA 片段进行了亚克隆,并对其进行了核苷酸序列分析,本研究将有助于从分子水平对该抗生素生物合成途径进行深入研究。

1 材料和方法

1.1 试剂

T4DNA 连接酶, Bgl II 和 BamHI 为德国 Boehringer 公司产品, Tag DNA 多聚酶为美国 Promega 公司产品。

1.2 菌种和培养基

1.2.1 菌种: 球孢链霉菌, 大肠杆菌 DH5 α 为本所保存菌种。

1.2.2 培养基 1(球孢链霉菌)(%): 糊精 2.0, 蛋白胨 0.2, 甘油 1ml, 玉米浆 0.5, pH7.0。

1.2.3 培养基 2(LB)(%): 胰蛋白胨 1.0, 酵母粉 0.5, NaCl 1.0, pH 7.0。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取和分离: 球孢链霉菌及无活性阻断变株 AF 67 总 DNA 的提取, 按 Hopwood 等方法进行^[5], 大肠杆菌质粒 pUC18 依 Sambrook 方法^[6]进行。

*国家自然科学基金资助项目。

**负责本文修改。

收稿日期: 1996-08-30

1.3.2 RAPD-PCR引物的设计: GA2 引物序列为 5' GCGATCCCCA3'。

1.3.3 RAPD-PCR: 采用引物 GA2 分别以球孢链霉菌及其阻断变株 AF67 总 DNA 为模板进行扩增, 反应体积 50 μ l, 反应条件如下: Tris-HCl 10 mmol / L, KCl 50 mmol / L, MgCl₂ 50 mmol / L, 明胶 0.001%, dNTPs 各 0.2 mmol / L, 模板 DNA 50~150ng, 引物 0.2 μ mol / L, 混合物各组分总体积为 49 μ l, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后, 迅速置于冰浴 5 min, 离心, 加入 Ampli Tag DNA 聚合酶 1 μ l (1u) 覆盖 Chill-out™ 液体石蜡, 依下列程序循环 35 次, 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环结束后, 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 扩增引物以 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.4 F2 DNA 片段的再扩增: 将上述 RAPD-PCR 扩增获得的 F2 DNA 片段, 经电泳制备回收, 以其为模板用 GA2 为引物, 按前述条件再次扩增, 以获得足够量 DNA 样品。

1.3.5 DNA 酶切和连接: 依厂家提供条件进行。

1.3.6 转化: 大肠杆菌 DH 5 α 转化依 Sambrook^[6] 方法进行。

1.3.7 核苷酸序列测定: 采用 ABI 自动测序仪对 DNA 样品进行分析

2 结果

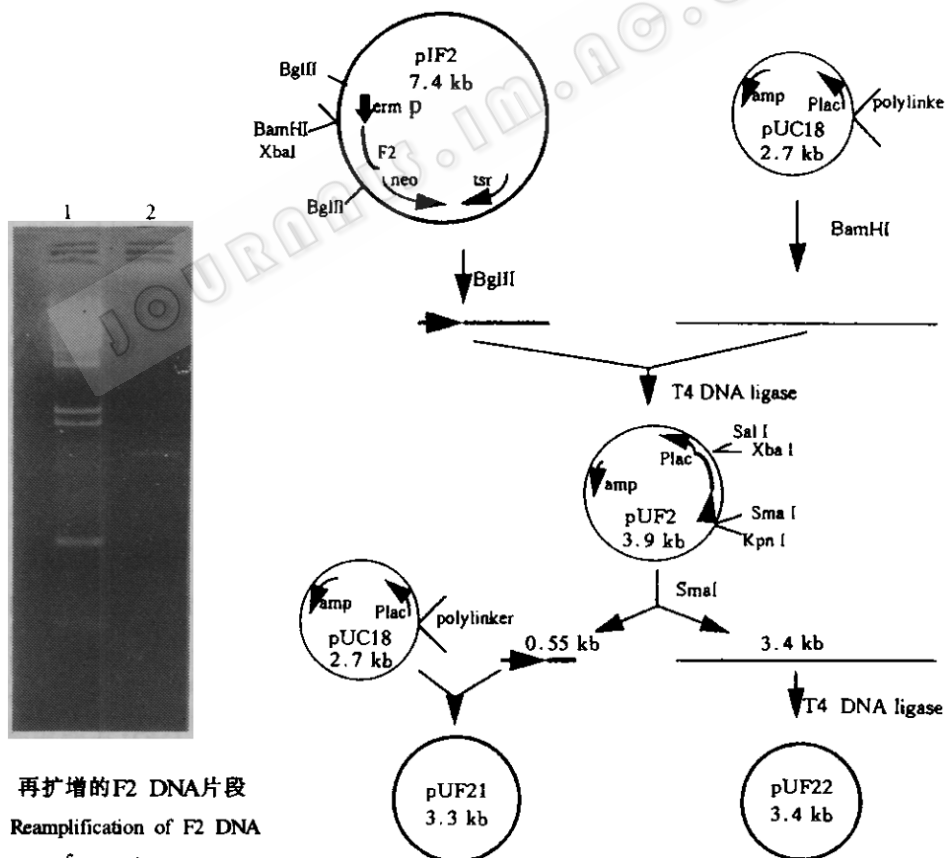


图1 再扩增的F2 DNA片段

Fig.1 Reamplification of F2 DNA fragment

1. λ DNA digested by Hind III;

2. F2 DNA fragment.

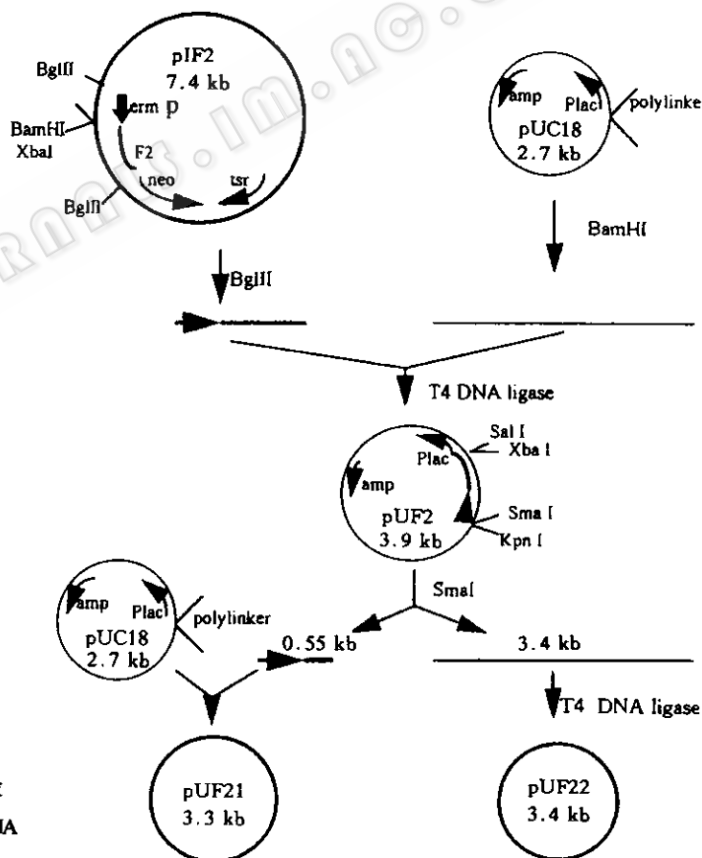


图2 F2 DNA片段亚克隆

Fig.2 The subcloning scheme of F2 DNA fragment

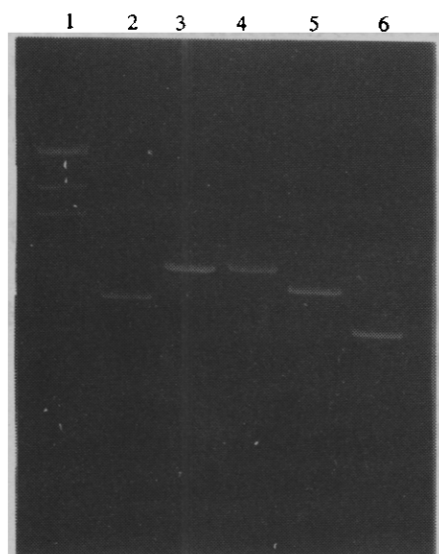


图3 限制性内切酶酶切重组质粒 pUF2 的电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of plasmid pUF2 digested by restriction enzymes

1. λ DNA digested by HindIII; 2. pUF2 digested by Pst I; 3. pUF2 digested by EcoRI; 4. pUF2 digested by Kpn I; 5. pUF2 digested by Sma I; 6. Recombinant plasmid pUF2.

析,其结果见图4。

该序列全长 1232bp, 5' 端 327 个碱基除两端多克隆位点外,是红霉素抗性基因的启动子区,对 F2 DNA 片段序列分析表明,存在一个 369bp 的完整开放阅读框架 ORFX,编码 122 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA,在 ATG 前 11 个核苷酸的 GGGGG 序列可能是 SD 位点。F2 DNA 片段 GC 含量为 65%,ORFX GC 含量为 63%。

3 讨论

球孢链霉菌产生的抗肿瘤抗生素 C-1027 具有极强的抗肿瘤活性,是一种极具应用前景的新型抗生素。我们以往的工作表明,F2 DNA 片段中,含有参与 C-1027 生物合成的基因。本文对 F2 DNA 片段进行了核苷酸序列分析,结果表明,其中包含一编码 122 个氨基酸的完整开放阅读框架 (ORFX),起始编码为 ATG,终止编码为 TGA,在起始编码 ATG 11 个核苷酸前的 GGGGG 可能是 SD 序列。ORFX 的 GC 含量为 63%,较链霉菌基因平均 GC 值略低 (72%),但这种现象在其他链霉菌中也可以见到,如 *S. azureus* 硫链丝菌素基因 GC 含量为 62%^[7],*S. griseus* 中 StrR、StrN 和 StrD 基因的 GC 含量不足 60%^[8]。本文 F2 DNA 片段中 ORFX 密码子第 3 位碱基 GC 含量为 88.5%,符合链霉菌一般特点。ORFX 旁侧区可能是与 C-1027 生物合成有关的其他结构基因或调节基因的不完整框架。在 EMBO

2.1 F2 DNA 片段的获得

经过 RAPD-PCR 扩增后,获得 F2 DNA 片段,进行再扩增,获得了足够数量的 F2 DNA 片段 (图 1),F2 DNA 片段分子量约为 0.9kb。将该片段插入质粒 pIJ459,获得重组质粒 pIF2。

2.2 F2 DNA 片段的亚克隆

亚克隆步骤见图 2。

将含有 F2 DNA 片段的重组质粒 pIF2 以 Bgl II 酶切,获得一 1.2kb DNA 片段 (含 F2 加 ermEp 片段),将该片段插入 pUC18 的 Sma I 位点,转化至 *E. coli* DH5 α 后,从转化子中获得了重组质粒 pUF2,经 Sma I 酶切后,获得 0.55kb 和 3.4kb 两片段 (图 3)。将 0.55kb 片段插入 pUC18 质粒 Sma I 位点,经转化后获得重组质粒 pUF21。3.4Kb DNA 片段在 T4 DNA 连接酶作用下,自身环化获得质粒 pUF22。

2.3 DNA 序列测定

采用 AB I 自动序列分析仪分别对重组质粒 pUF21 和 pUF 进行核苷酸序列分

```

GATCTGGGGAATTTCGAGCTCGGTACCAGCCCGACCCGAGCAGCGCCGGC 50
ACGCCTGGTCGATGTTCGACCGGAGTTCGAGGTACGCGGCTTGCAGGTCC 100
AGGAAGGGACGTCCATGCGAGTGTCCGTTCGAGTGGCGGCTTGCGCCCGA 150
TGCTAGTTCGCGGTTCGATCGGCGATCGCAGGTGCACGCGGTTCGATCTTGAC 200
GGCTGGCGAGAGGTGCGGGGAGGATCTGACCGACGCGGTCCACACGTGGC 250
ACCGCGATGCTGTTCGTGGGCTGGACAATCGTGCCGGTTGGTAGGATCCTC 300
TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTGCGATCCCCACCTGTCGGTACGC 350
AGCCGTCTTCCTGCCCTTGAAGTTCAGCTCGGCGGGAAGCCCTGGATGA 400
TCGCCGCTGCTCGACAGTCAGCTTGGGTCCC GCCCGCGGAAAAGAGGTCG 450
CGCTCGGAGCTGTCTTGCCTGCTCTTCCTCTCCTCGGAGTCGTTCCGACCCC 500
GAGTCCGACGAGCGCCGAGAGCTGCCCATGGCCGGTTAGCCCGGGTCGGC 550
CCAGGTTCGGCGGCTCCCTGATTCTTGGAAACGCCAACTAGCGTGGGGGCT 600
ACCGCTTAGATGCCCTTGCCATCCCTTTGGCGCTCTCGCAGAAGGC 650
    Met Pro Cys Leu Ala Ile Pro Leu Ala Leu Ser Gln Lys Ala
GAACCAACAGCTCCAGGAGTCGCTCAGCCACCGGAACCTGCAGGGCTTCC 700
    Asn His Gln Leu Gln Glu Ser Leu Ser His Arg Asn Leu Gln Gly Phe
CCCACTGTGAGCACAGGAAGCTCTTGGCCAGCTTGAGCGAGAAGGTCGGG 750
Pro His Cys Glu His Arg Lys Leu Leu Ala Ser Leu Ser Glu Lys Val Gly
AAGGTCTGTCCGAGCAGCCAGGTGGCACTTGGCCGGAGCCGAGAACTA 800
Lys Val Leu Ser Glu Gln Pro Arg Trp His Leu Ala Gly Ala Glu Asn Tyr
CCGGGTGTCTTCGTGCCCGAGCTGCCAGCAGCAACTTCTGTACCCCGG 850
    Arg Val Ser Phe Val Pro Glu Leu Pro Ser Ser Asn Phe Cys Thr Pro
TGATCCCGAAGGTCTTGCCAGACAGGTGCTCCACGGTAGCCCTGGCAAG 900
Val Ile Pro Lys Val Leu Pro Asp Arg Leu Leu His Gly Ser Pro Gly Lys
TCGCCCCCTGGCTCACACGAACACGGCCCTTTCGCGGCTCTTCACAGCCTT 950
Ser Pro Leu Ala His Thr Asn His Gly Leu Ser Arg Leu Phe Thr Ala Leu
GGGCTCCAAGCTCGTCCAGCAAGATTGAGCATGGTTCGGGAACAGGTCACG 1000
    Gly Ser Lys Leu Val Gln Gln Asp
GTCATCGACCGGCCCCCAACTGCTTGCCGGCCACCGAGAAGGGCGGGCAG 1050
GGCACACCAACCGCCAGGAGATCAGATCCCTGGCTCCAACCCCAAGTTCC 1100
AGGCGCAGGCCCTTCGGGTCAAGCGTCGTCAGGTTCGGCCTGCTTGACCGT 1150
GCAGCCTTCCAGTCGTCATTTCTTCCACGTTTCGCCCCGAGCGTTTCCA 1200
CGGCATGGGGATCGCAGCTTGGCTGCAGATCG 1232

```

图4 F2 DNA片段的核苷酸序列分析

Fig.4 Nucleotide sequences of F2 DNA fragment

和 GeneBanks 两数据库中对这个 369 个核苷酸编码产物进行了检索分析,未发现显著同源序列,编码产物可能是一种新的酶蛋白,关于其在 C-1027 生物合成中的作用,有待进一步深入研究。由于本序列与 Sakata^[9]等报道的 C-1027 辅基蛋白编码基因完全不同,因此可以认为本基因是参与发色团生物合成的基因。

参 考 文 献

- [1] Hu Jilan, Xue Yuchuan, Xie Meiyu *et al.* *J Antibiot*, 1988, 41(11), 1575~1579.
- [2] Toshio Otani, Yoshinori Minami, Teruyoshi Marunaka. *J Antibiot*, 1988, 41(11), 1580~1585.
- [3] Zhen Yongsu, Ming Xiuying, Yu Bin. *J Antibiot*, 1989, 42(9), 1294~1298.
- [4] 毛晓华, 李元, 石蓬英. 生物工程学报, 1997, 13(2): 195.
- [5] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* Genetic manipulation of streptomyces. A Laboratory manual. The John Innes Foundation. 1985. 72~81.
- [6] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular cloning. Second edition. Laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989. 1.74.
- [7] Bibb M J. *Gene*, 1984, 30: 157~161.
- [8] Pissowotzki K. *M G G*, 1992, 231(1): 113~120.
- [9] Sakata N, Ikeno S, Hori M *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56(10): 1592~1595.

NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS OF AN ANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS GENE OF *STREPTOMYCES GLOBISPORUS*

Mao Xiaohua Li Yuan

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050)

Abstract Antitumor antibiotic C-1027 produced by *Streptomyces globisporus* has very high biological activity both *in vivo* and *in vitro*. Research works showed that one of biosynthesis gene of C-1027 is in the F2 DNA fragment. The plasmid pUC18 was used as vector to subclone the F2 DNA fragment. The nucleotide sequence analysis for F2 DNA fragment was carried out. Results showed that there is an open reading frame encoding for 122 amino acids. According to EMBO and GeneBanks data, this sequence may be a new one.

Key words Antitumor antibiotic C-1027, Biosynthesis gene, Nucleotide sequence analysis