

酪蛋白水解物对雷帕霉素产生菌 *Streptomyces hygroscopicus* ATCC29253 接合转移效率的影响

张万垚, 鲁慧囡, 何璟*

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070

摘要:吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) ATCC29253 能够产生非常丰富的次级代谢产物,除了雷帕霉素外,还可以分泌尼日利亚菌素、洋橄榄叶素、六烯类抗生素等多种具有生物活性的物质,具有重要的研究价值和前景。**【目的】**而建立高效的遗传操作系统是研究该链霉菌相关代谢产物合成机理和构建基因工程菌株的基础。**【方法】**我们测试了不同培养基及供体菌对吸水链霉菌及其它链霉菌接合转移效率的影响。**【结果】**我们发现酪蛋白水解物和镁离子能显著提高 *S. hygroscopicus* ATCC29253 接合转移效率。通过随机组合试验,筛选出最佳的 $MgCl_2$ 和酪蛋白水解物浓度组合,使得 *S. hygroscopicus* ATCC29253 接合转移效率达到 1.5×10^{-4} 。同时我们还发现酪蛋白水解物可以明显改变 *S. lividans*、*S. albus*、*S. avermitilis* 的接合转移效率。**【结论】**本研究首次发现酪蛋白水解物不光对 *S. hygroscopicus* ATCC29253 接合转移有作用,对其它常用的链霉菌如 *S. lividans*、*S. albus*、*S. avermitilis* 等的接合转移效率都有显著的影响。

关键词:吸水链霉菌 ATCC29253, 接合转移, 酪蛋白水解物

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 02-0198-08

Streptomyces hygroscopicus ATCC29253 是 20 世纪 70 年代 Vezina 等从复活岛土壤中分离获得,由于能产生雷帕霉素而引起广泛关注。*S. hygroscopicus* 拥有非常丰富的次级代谢产物除了雷帕霉素 (rapamycin)^[1] 以外,还有尼日利亚菌素 (nigericin)^[2]、六烯类抗生素 (hexaenes)^[3]、洋橄榄叶素 (elaiophylin)^[4]、安莎类抗生素 hygrocins^[5] 等。其中,雷帕霉素具有良好的药用价值,除了能抗真菌外,还具有抗肿瘤抗增殖,甚至有抗衰老^[6] 的作用,在器官移植的抗排斥反应中有广泛的应用,是一种

新型强效免疫抑制剂^[7]。*S. hygroscopicus* ATCC29253 能产生如此多的活性物质,具有重要的研究价值和前景。

为了研究链霉菌中相关代谢产物的合成机理,构建基因工程菌株及提高代谢产物的产量,首先需要在产生菌中建立一个合理高效的遗传操作系统。将外源 DNA 导入链霉菌的方法有很多,如电转化、转染、原生质体转化、接合转移等^[8]。链霉菌是一个高度分化的菌属,菌株之间遗传背景差异较大,因此不同的菌株所适用的遗传操作方法也不尽相

基金项目:国家自然科学基金项目(30800020, 30970059);教育部留学回国人员科研启动基金项目([2009]1590);教育部新世纪人才支持计划项目(NCET-08-0779);中央高校基本科研业务费专项资金项目(2009PY006)

* 通信作者。Tel: +86-27-87280163; E-mail: hejingj@yahoo.com

作者简介:张万垚(1987-),男,湖北省荆门人,硕士研究生,研究方向为微生物天然产物的生物合成。E-mail:664730892@qq.com

收稿日期:2011-11-03;修回日期:2011-11-27

同^[9]。

本研究通过寻找影响接合转移效率的因子,建立起高效的 *S. hygroscopicus* ATCC29253 接合转移的方法,并且在研究中发现酪蛋白水解物可能对链霉菌接合转移效率存在着广泛的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒:克隆宿主大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和 ET12567 接合转移供体菌大肠杆菌 S17-1 和 ET12567 (pUZ8002) 由本室收藏; *S. hygroscopicus* ATCC29253 购自 American Type Culture Collection (ATCC); 转移质粒 pJTU2554^[10] 由上海交通大学陶美凤教授馈赠,含有安普拉霉素抗性基因、 Φ C31 整合功能区和接合转移起始位点 *oriT*。

1.1.2 培养基:大肠杆菌培养基为 LA 固体和 LB 液体培养基,链霉菌培养基为 TSB、2CM、ISP-4、SC、M10、MS、PS5 等培养基。①2CM^[8]: NaCl 1.0 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, 可溶性淀粉 10 g/L, 无机盐溶液 1 ml/L, MgSO₄·7H₂O 2.0 g/L, 蛋白胨 2.0 g/L, CaCO₃ 2.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/L, 琼脂 22.0 g/L, pH 7.2。无机盐溶液: FeSO₄·7H₂O 1.0 g/L, MgCl₂·6H₂O 1.0 g/L, ZnSO₄·7H₂O 1.0 g/L。用 2CM 测定镁离子对接合转移效率影响时,事先不添加镁离子。②ISP-4: 可溶性淀粉 10 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, NaCl 1.0 g/L, MgSO₄ 1 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/L, CaCO₃ 2.0 g/L, 酵母提取物 0.5 g/L, 蛋白胨 1 g/L, 无机盐溶液 1 ml/L, 琼脂 20 g/L。无机盐溶液: FeSO₄ 1 g/L, MnCl₂ 1 g/L, ZnSO₄ 1 g/L。③SC: 可溶性淀粉 10 g/L, 酪蛋白水解物 1 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, 琼脂粉 15 g/L, pH 7.4。用 SC 测定酪蛋白水解物浓度对接合转移效率影响时,事先不添加酪蛋白水解物;用 SC 测定镁离子对接合转移效率影响时,事先不添加镁离子。④TSB: Oxoid tryptone soya borth power 30 g/L。⑤MS: 甘露醇 20 g/L, 黄豆粉 28 g/L, 琼脂 20 g/L。⑥M10: 酵母提取物 4.0 g/L, 麦芽提取物 10.0 g/L, 葡萄糖 4.0 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 7.3。⑦PS5: 黄色棉籽粉 5 g/L, 可溶性淀粉 5 g/L, 琼脂粉 20 g/L, pH 7.0。

1.1.3 抗生素及生化试剂:酪蛋白水解物购自美国 BD, 主要为酪蛋白经酸水解后的产物, 富含 21 种氨基酸及微量的 NaCl 和铁离子。安普拉霉素在大肠杆菌中使用浓度为 50 mg/L, 在链霉菌中使用浓度为 20 mg/L。接合转移平板另外用 50 mg/L 萘啶酮酸覆盖, 以抑制供体大肠杆菌的生长。安普拉霉素购自 sigma, 其余试剂均购自国药集团。

1.2 吸水链霉菌的培养

链霉菌培养及总 DNA 的提取参照文献 [8]。 *S. hygroscopicus* ATCC29253 的产孢培养基为 2CM, 液体培养基为 10.3% YEME 和 TSB。

1.3 抗生素最低抑菌浓度的确定

制备含不同浓度安普拉霉素的 2CM 平板, 在每个平板表面均匀涂布等量的浓度约为 10⁸ 的 *S. hygroscopicus* ATCC29253 孢子, 每天观察平板生长情况, 连续观察 10 天, 根据链霉菌的生长与否确定最低抑菌浓度为 5 mg/L。

1.4 大肠杆菌-链霉菌属间接接合转移

供体菌为大肠杆菌 S17-1/pJTU2554 或 ET12567 (pUZ8002)/pJTU2554, 受体菌为 *S. hygroscopicus* ATCC29253 新鲜孢子。将 5 μ L 大肠杆菌菌种接种到 5 mL 含有相应抗生素的新鲜 LB 中 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。取 500 μ L 过夜培养物接种到 50 mL 含有相应抗生素的新鲜 LB 中 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4-0.6。3186 \times g 离心 4 min 收集菌体, 用 LB 清洗 3 次, 并最终用 2 mL LB 悬浮。取适量链霉菌孢子 12396 \times g 离心 2 min 除去甘油, 用 TSB 清洗 2 次, 并用 TSB 悬浮。50 $^{\circ}$ C 热激 10 min 后 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h。温育后用 LB 清洗 3 次, 用 LB 悬浮。取 100 μ L 供体大肠杆菌 (2.0 \times 10⁷) 和 100 μ L 受体孢子 (3.5 \times 10⁷) 混合均匀, 涂布于接合转移平板上, 或在液体接合转移中, 将混合物在 30 $^{\circ}$ C 下 50 r/min 轻轻摇晃培养 16 h 后再涂布于接合转移平板上。平板上培养 16 h 后, 用含有 20 mg/L 安普拉霉素及 50 mg/L 萘啶酮酸的无菌水 1 mL 覆盖整个平板, 3-5 天后出现接合子。

1.5 接合子的验证

将可能的接合子转接到含有 20 mg/L 安普拉霉素的平板上, 划线分离单菌落。将纯化好的接合子接种到 10.3% YEME 中, 抽提链霉菌的总 DNA。以野生型菌株总 DNA 为阴性对照, 质粒 pJTU2554

DNA 为阳性对照,使用引物 AprF:CGCTCGTCATGC CCTCGTGGTC 和 AprR:CGGCATCGCATTCTTCGCA TCC 通过 PCR 扩增 588 bp 的安普拉霉素抗性基因条带。

1.6 受体菌的孢子计数

利用稀释涂平板法得到链霉菌的菌落形成单位^[11]。

1.7 接合转移频率计算

接合转移频率 = 接合子数目 / 受体菌落形成单位,接合子数目取值 3 次平行实验的平均值。

表 1 不同培养基对接合转移效率的影响

Table 1 Effects of different media on conjugation frequency

Donor	<i>E. coli-Streptomyces</i> conjugation frequency on different media / ($\times 10^{-5}$ / cfu) *					
	2CM	SC	ISP4	PS5	MS	M10
<i>E. coli</i> S17-1 / pJTU2554	1.71 (0.16)	3.71 (0.13)	0.19 (0.14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002) / pJTU2554	0.23 (0.20)	0.12 (0.18)	0.03 (0.18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

* Values are presented as the average intergeneric conjugation frequencies per recipient and the standard deviation (shown in brackets) from three independent experiments.

含有无机盐成分较多的培养基(2CM、SC 和 ISP4)上得到了接合子,在有机成分较多的培养基(MS、PS5 和 M10)上基本上没有接合子出现。

实验中采用了 2 种不同特性的大肠杆菌供体菌 *E. coli* S17-1 富含甲基化修饰, *E. coli* ET12567 (pUZ8002) 为甲基化缺陷菌株。以 S17-1 / pJTU2554 为供体菌时接合转移效率远高于供体菌为 ET12567 (pUZ8002) / pJTU2554 时的接合转移效率。在 2CM 培养基上前者的接合转移效率为后者的 7.4 倍,在 SC 培养基上为 30.9 倍,在 ISP-4 培养基上为 6.3 倍,表明 *S. hygroscopicus* ATCC29253 偏好于选择来源于 *E. coli* S17-1 的质粒。

2.2 SC 中添加不同浓度酪蛋白水解物对大肠杆菌-吸水链霉菌接合转移效率的影响

S. hygroscopicus ATCC29253 在 2CM 和 SC 培养基上获得的接合转移效率最高。比较这两种培养基,发现其组成成分非常相似,最大不同在于 SC 培养基中有酪蛋白水解物而 2CM 培养基中没有此类物质。2 种培养基上接合转移效率的差别是否由酪

2 结果

2.1 培养基对大肠杆菌-吸水链霉菌接合转移效率的影响

S. hygroscopicus ATCC29253 在 2CM 培养基上产孢情况最好,所以我们优先选用此培养基,同时还分别选取含有较多无机盐成分和含有较多有机组分的培养基进行接合转移实验。结果如表 1 所示。在

蛋白水解物造成? 为解答这一问题,我们测试了不同浓度酪蛋白水解物对 *S. hygroscopicus* ATCC29253 接合转移效率的影响。

以 SC 为接合转移培养基,添加浓度分别为 0、0.1、0.5、1.0、2.0、3.0 g/L 酪蛋白水解物,进行接合转移实验,结果如表 2 所示。无论是以 S17-1 / pJTU2554 还是 ET12567 (pUZ8002) / pJTU2554 为供体菌时,在一定浓度范围内酪蛋白水解物均能提高接合转移效率。达到最佳浓度后,接合转移效率会随着酪蛋白水解物浓度的升高而呈现降低的趋势。

以供体菌 S17-1 / pJTU2554 为例,酪蛋白水解物浓度范围在 0-2 g/L 时,随着浓度的增加,接合转移效率增加,在 2 g/L 时接合效率达到最高为 5.06×10^{-5} ,是没有添加酪蛋白水解物的 7.3 倍。达到最佳浓度后,继续增加酪蛋白水解物的浓度会抑制接合转移的效率,当酪蛋白水解物浓度达到 3 g/L 时,没有接合子出现。供体菌为 ET12567 (pUZ8002) / pJTU2554 时,酪蛋白水解物最佳浓度为 1 g/L,接合效率是不添加酪蛋白水解物时的 6 倍。

表 2 SC 中添加不同浓度酪蛋白水解物对接合转移效率的影响

Table 2 Effects of different concentration of casamino acid supplemented in SC medium on conjugation frequency

Donor	<i>E. coli-Streptomyces</i> conjugation frequency in SC medium supplemented with different concentration of casamino acid (g/L) / ($\times 10^{-5}$ / cfu) *					
	0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
<i>E. coli</i> S17-1 / pJTU2554	0.69 (0.10)	1.9 (0.16)	2.57 (0.04)	3.71 (0.09)	5.06 (0.05)	0 (0)
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002) / pJTU2554	0.02 (0.16)	0.03 (0.26)	0.06 (0.07)	0.12 (0.11)	0.06 (0.09)	0.04 (0.20)

* Values are presented as the average intergeneric conjugation frequencies per recipient and the standard deviation (shown in brackets) from three independent experiments.

2.3 2CM 中添加不同浓度酪蛋白水解物对大肠杆菌-吸水链霉菌接合转移效率的影响

SC 中的酪蛋白水解物浓度的改变明显影响了 *S. hygroscopicus* ATCC29253 的接合转移效率。为了进一步确证酪蛋白水解物可以促进 *S. hygroscopicus* ATCC29253 接合转移效率,本研究以本身不含酪蛋白水解物成分的 2CM 为培养基,添加不同浓度的酪蛋白水解物,进行接合转移实验,结果如表 3 所示。

表 3 2CM 中添加不同浓度酪蛋白水解物对接合转移效率的影响

Table 3 Effects of different concentration of casamino acid supplemented in 2CM on conjugation frequency

Donor	<i>E. coli-Streptomyces</i> conjugation frequency in 2CM medium supplemented with different concentration of casamino acid (g/L) / ($\times 10^{-5}$ /cfu) *					
	0	0.1	0.5	1.0	2.0	4.0
<i>E. coli</i> S17-1 /pJTU2554	1.54 (0.22)	1.60 (0.17)	3.00 (0.19)	5.14 (0.21)	4.46 (0.13)	0 (0)
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002) /pJTU2554	0.07 (0.16)	0.11 (0.18)	0.17 (0.11)	0.09 (0.30)	0.09 (0.25)	0.08 (0.17)

* Values are presented as the average intergeneric conjugation frequencies per recipient and the standard deviation (shown in brackets) from three independent experiments.

2.4 SC 中添加不同浓度 $MgCl_2$ 对大肠杆菌-吸水链霉菌接合转移效率的影响

据文献报道,在培养基中添加镁离子能显著提高接合转移效率^[12]。以 SC 为接合转移培养基,添加浓度分别为 0、2.5、5、7.5、10、20、30 mmol/L 的 $MgCl_2$,进行接合转移实验,结果如表 4 所示。以 S17-1 /pJTU2554 为供体菌时,SC 中最佳镁离子浓度为 2.5 mmol/L,这正好是原有 SC 培养基配方中镁

供体菌为 S17-1 /pJTU2554 时,酪蛋白水解物最佳浓度为 1 g/L,接合转移效率为 5.14×10^{-5} ,是未添加酪蛋白水解物时接合转移效率的 3.3 倍,与在 SC 上添加最佳浓度的酪蛋白水解物时获得的接合转移效率 (5.06×10^{-5}) 几乎一致。供体菌为 ET12567 (pUZ8002) /pJTU2554 时,酪蛋白水解物最佳浓度为 0.5 g/L,接合转移效率为 1.7×10^{-6} ,是未添加酪蛋白水解物时接合效率的 2.4 倍。

离子的浓度。不含镁离子则没有转化子出现,但是同时 $MgCl_2$ 浓度过高也会明显降低接合转移效率。以 ET12567 (pUZ8002) /pJTU2554 为供体菌进行接合转移时也需要镁离子存在,但镁离子的浓度对接合转移效率没有明显影响。从以上结果可以看出,当以 SC 为接合转移培养基时,所需镁离子的浓度较低,额外添加 $MgCl_2$ 会降低接合转移的效率。

表 4 SC 中添加不同浓度镁离子对接合转移效率的影响

Table 4 Effects of different concentration of $MgCl_2$ supplemented in SC on conjugation frequency

Donor	<i>E. coli-Streptomyces</i> conjugation frequency in SC medium supplemented with different concentration of $MgCl_2$ (mmol/L) / ($\times 10^{-5}$ /cfu) *						
	0	2.5	5	7.5	10	20	30
<i>E. coli</i> S17-1 /pJTU2554	0 (0)	3.75 (0.32)	0.20 (0.20)	0.29 (0.22)	0.65 (0.24)	0.50 (0.27)	0.29 (0.16)
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002) /pJTU2554	0 (0)	0.13 (0.02)	0.02 (0.10)	0.07 (0.06)	0.12 (0.04)	0.13 (0.04)	0.13 (0.16)

* Values are presented as the average intergeneric conjugation frequencies per recipient and the standard deviation (shown in brackets) from three independent experiments.

2.5 2CM 中添加不同浓度 $MgCl_2$ 对大肠杆菌-吸水链霉菌接合转移效率的影响

选用 2CM 培养基,添加浓度分别为 0、10、20、30、40、50 mmol/L 的 $MgCl_2$,观察镁离子浓度对接合转移效率的影响,结果如表 5 所示。当不添加 $MgCl_2$ 时,两种供体菌均不能产生接合子。在一定浓度范围内, $MgCl_2$ 对 2 种供体菌的接合转移效率均有显著提高。其中供体菌为 S17-1 /pJTU2554 时, $MgCl_2$ 最佳浓度为 40 mmol/L,接合转移效率达到 4.65×10^{-5} 。供体菌为 ET12567 (pUZ8002) /

pJTU2554 时, $MgCl_2$ 最佳浓度为 50 mmol/L,接合转移频率达到 1.45×10^{-5} 。

2.6 寻找优势组合

以上试验中酪蛋白水解物和 $MgCl_2$ 均能显著提高 *S. hygroscopicus* ATCC29253 在 2CM 培养基上的接合转移效率,因此设计实验将两个单因素进行组合,希望能够进一步提高接合转移效率。选取 0、0.5、1、2 g/L 酪蛋白水解物和 0、10、20、30、40、50 mmol/L $MgCl_2$ 进行组合,以 S17-1 /pJTU2554 为供体菌,接合转移结果如表 6 所示。当 $MgCl_2$ 与酪蛋

白水解物都不添加时,没有接合子产生;当不添加 $MgCl_2$ 时,随着酪蛋白水解物浓度增加,在 2 g/L 时, *S. hygroscopicus* ATCC29253 接合转移效率最高,达到 0.63×10^{-4} ;当不添加酪蛋白水解物时,随着 $MgCl_2$ 浓度增加,在 40 mmol/L 时, *S. hygroscopicus* ATCC29253 接合转移效率最高,达到 0.45×10^{-4} ;

两者的最佳组合为酪蛋白水解物浓度 2 g/L, $MgCl_2$ 浓度为 40 mmol/L,此条件下 *S. hygroscopicus* ATCC29253 接合转移效率为 1.5×10^{-4} ; $MgCl_2$ 浓度在 20 – 50 mmol/L 范围内变化时,各种组合条件下的接合转移效率变化不大。

表 5 2CM 中添加不同浓度镁离子对接合转移效率的影响

Table 5 Effects of different concentration of $MgCl_2$ supplemented in 2CM on conjugation frequency

Donor	<i>E. coli-Streptomyces</i> conjugation frequency in 2CM medium supplemented with different concentration of $MgCl_2$ (mmol/L) / ($\times 10^{-5}$ /cfu)*					
	0	10	20	30	40	50
<i>E. coli</i> S17-1/pJTU2554	0 (0)	1.29 (0.27)	2.86 (0.16)	3.81 (0.17)	4.65 (0.25)	4.29 (0.10)
<i>E. coli</i> ET12567(pUZ8002)/pJTU2554	0 (0)	0.18 (0.10)	0.41 (0.18)	0.82 (0.20)	1.33 (0.15)	1.45 (0.16)

* Values are presented as the average intergeneric conjugation frequencies per recipient and the standard deviation (shown in brackets) from three independent experiments.

表 6 不同浓度酪蛋白水解物和镁离子组合对接合转移效率的影响

Table 6 Effects of the combination of different concentration of casamino acid and $MgCl_2$ on the conjugation frequency

Concentration of casamino acid in 2CM/(g/L)	Concentration of $MgCl_2$ in 2CM/(mmol/L)					
	0	10	20	30	40	50
0	0 (0)	0.15 (0.11)	0.40 (0.02)	0.42 (0.09)	0.45 (0.21)	0.44 (0.13)
0.5	0.30 (0.33)	0.30 (0.18)	1.25 (0.17)	1.25 (0.22)	1.25 (0.10)	1.23 (0.17)
1.0	0.32 (0.24)	0.52 (0.20)	1.35 (0.16)	1.42 (0.13)	1.25 (0.19)	1.30 (0.14)
2.0	0.63 (0.16)	0.52 (0.11)	1.46 (0.10)	1.44 (0.15)	1.5 (0.13)	1.45 (0.20)

* *E. coli-Streptomyces* conjugation frequency on 2CM medium supplemented with the combination of different concentration of casamino acid and $MgCl_2$ / ($\times 10^{-4}$ /cfu). Values are presented as the average intergeneric conjugation frequencies per recipient and the standard deviation (shown in brackets) from three independent experiments.

2.7 酪蛋白水解物对不同链霉菌接合转移效率的影响

以上实验表明,酪蛋白水解物对 *S. hygroscopicus* ATCC29253 接合转移效率有明显的促进作用。为了探究酪蛋白水解物是否对大肠杆菌—链霉菌接合转移效率具有广泛的影响,我们选取常用的链霉菌,如白色链霉菌 (*S. albus*)、除虫链霉菌 (*S. avermitilis*)、变铅青链霉菌 (*S. lividans* ZX1) 等进行接合转移实验,结果如表 7 所示。当受体菌为

S. avermitilis S17-1 或 ET12567 为供体菌时,酪蛋白水解物能促进接合转移效率,当其浓度为 2 g/L 时,接合转移效率分别为没添加酪蛋白水解物时的 9.5 倍和 2.1 倍。当受体菌为 *S. lividans* ZX1, S17-1 或 ET12567 为供体菌时,酪蛋白水解物对接合转移呈抑制作用。当受体菌为 *S. albus*, 供体菌为 S17-1 时,酪蛋白水解物对其接合转移效率具有促进作用,而供体菌为 ET12567 时,酪蛋白水解物对接合转移表现为抑制作用。

表 7 酪蛋白水解物对不同链霉菌接合转移效率的影响

Table 7 Effects of different concentration of casamino acid supplemented in media on conjugation frequency of different *Streptomyces* strains

Concentration of casamino acid (g/L)	Different recipients					
	<i>S. albus</i>		<i>S. avermitilis</i>		<i>S. lividans</i> ZX1	
	S17-1	ET12567	S17-1	ET12567	S17-1	ET12567
0	3.1 (0.11)	5.0 (0.15)	0.6 (0.02)	10.0 (0.13)	90.0 (0.24)	50.0 (0.15)
0.5	12.0 (0.23)	0.5 (0.16)	1.8 (0.14)	15.0 (0.17)	50.0 (0.13)	30.0 (0.11)
1.0	13.2 (0.22)	0.5 (0.07)	3.0 (0.09)	20.0 (0.16)	46.5 (0.19)	23.0 (0.21)
2.0	15.1 (0.17)	0.4 (0.19)	5.7 (0.22)	21.0 (0.03)	40.0 (0.08)	10.0 (0.07)

* *E. coli-Streptomyces* conjugation frequency / ($\times 10^{-5}$ /cfu). Values are presented as the average intergeneric conjugation frequencies per recipient and the standard deviation (shown in brackets) from three independent experiments. Conjugation media for *S. lividans* ZX1 and *S. avermitilis* are 2CM, while conjugation medium for *S. albus* is ISP4.

3 讨论

我们在建立雷帕霉素产生菌 *S. hygroscopicus* ATCC29253 的接合转移方法时,发现孢子的热激及温育的温度与时间,供受体比例,抗生素覆盖的时间等因素对该链霉菌接合转移效率没有太大的影响,供体菌和培养基的组成对接合转移效率的影响较大。结论如下。

(1)在以往的研究中发现非甲基化的质粒接合转移效率要明显高于甲基化的质粒^[13]。但是当以 *S. hygroscopicus* ATCC29253 为受体菌时,甲基化的质粒接合转移效率远高于非甲基化的质粒,前者接合转移频率为后者的 57 倍。*S. hygroscopicus* ATCC29253 表现出对甲基化外源质粒的偏好,这可能与其特殊的限制修饰系统有关。

(2)接合转移是一个很复杂的过程,供体菌与受体菌间的物理接触是发生接合转移的必要条件^[14]。增加供体菌与受体菌接触的时间与几率,将有可能增加接合转移的效率。将供体菌与受体菌混合均匀后,并不直接涂布平板,而是将混合菌体以 50 r/min 的转速,在 30℃ 中培养 16h,使得供体菌与受体菌有足够的机会接触,大大增加了发生接合转移的几率。结果发现无论是以 S17-1 还是 ET12567 为供体菌,液体接合转移均得到了较多的接合子。可能原因有两种:其一,供体菌与受体菌在混合培养的过程中,接触几率增加,确实提高了接合转移的效率;其二,就是在混合培养的过程中,接合子出现后又进行了复制,使得最后得到的接合子数目增多。

(3)在 2CM 培养基上,添加 $MgCl_2$ 能显著增加 *S. hygroscopicus* ATCC29253 接合转移频率。

(4)当酪蛋白水解物与 $MgCl_2$ 均不添加时,接合转移频率为 0。当在 2CM 培养基中任意添加二者之一均可以明显提高接合转移效率,但是两者都有一个最佳浓度,超过最佳浓度后接合转移效率会受到抑制。将两种组分组合后添加,接合转移效率会更高。

(5)酪蛋白水解物能显著提高 *S. hygroscopicus*

ATCC29253 接合转移的效率。而且酪蛋白水解物对接合转移效率的影响具有一定的广泛性。实验结果表明酪蛋白水解物的添加可以明显改变白色链霉菌、除虫链霉菌和变铅青链霉菌的接合转移效率。

接合转移是原核生物基因水平转移的普遍机制,这个复杂的生理过程由一系列酶参与完成:首先由解旋酶复合物在接合转移起始位点进行切割产生一个缺口,随后 DNA 从缺口处开始复制产生一条单链 DNA,该单链 DNA 在连接蛋白的作用下,经由分泌系统在供体菌与受体菌之间形成的通道进入到受体菌内^[15]。进入的外源 DNA 往往会被受体菌的限制修饰系统识别而降解,如果能够避开受体菌的限制修饰系统,就可形成完整的环状双链质粒,稳定存在于受体菌内。本研究发现镁离子能显著提高吸水链霉菌接合转移效率。众所周知,镁离子是微生物生长过程中重要的无机盐离子,能参与一系列酶活中心的形成^[16],而接合转移这一复杂的生理过程需要一系列酶的参与,因此我们推测镁离子是通过参与这些酶的活性中心的形成而提高接合转移效率。在链霉菌中广泛的存在对外来 DNA 起限制作用的限制修饰系统,不同的链霉菌对于外来 DNA 有不同的偏好性,不同的限制修饰系统对非甲基化或不同位点甲基化的质粒接合转移效率有较大影响^[17]。酪蛋白水解物对不同供体菌(经过不同修饰系统修饰的 DNA)及受体菌(不同的限制修饰系统)接合转移效率的影响呈现多样性与复杂性,因此我们推测酪蛋白水解物对大肠杆菌—链霉菌间的接合转移效率的影响是通过参与到限制修饰系统中发挥作用的,其具体机制有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*, 1975, 28(10): 727-732.
- [2] Steinrauf LK, Pinkerton M, Chamberlin JW. The structure of nigericin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1968, 33(1): 29-31.

- [3] Furumai T , Yamakawa T , Yoshida R , Igarashi Y. Clethramycin , a new inhibitor of pollen tube growth with antifungal activity from *Streptomyces hygrosopicus* TP-A0623 I. Screening , taxonomy , fermentation , isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics* , 2003 , 56(8) : 700-704.
- [4] Gerlitz M , Hammann P , Thiericke R , Rohr J. The biogenetic origin of the carbon skeleton and the oxygen atoms of elaiophyllin , a symmetric macrodiolide antibiotic. *The Journal of Organic Chemistry* , 1992 , 57(14) : 4030-4033.
- [5] Cai P , Kong F , Ruppen ME , Glasier G , Carter GT. Hygrocins A and B , Naphthoquinone Macrolides from *Streptomyces hygrosopicus*. *Journal of natural products* , 2005 , 68(12) : 1736-1742.
- [6] Harrison DE , Strong R , Sharp ZD , Nelson JF , Astle CM , Flurkey K , Nadon NL , Wilkinson JE , Frenkel K , Carter CS , Pahor M , Javors MA , Fernandez E , Miller RA. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* , 2009 , 460(7253) : 392-395.
- [7] Abraham RT. Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Current opinion in immunology* , 1998 , 10(3) : 330-336.
- [8] Kieser T , Bibb MJ , Buttner MJ , Chater KF , Hopwood DA. Practical streptomyces genetics: The John Innes Foundation Norwich , UK , 2000.
- [9] 赫卫清 , 王以光. 吸水链霉菌 17997 格尔德霉素部分生物合成基因簇的克隆和分析. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)* , 2006 , 22(006) : 902-906.
- [10] Li L , Xu Z , Xu X , Wu J , Zhang Y , He X , Zabriskie TM , Deng Z. The Mildiomycin Biosynthesis: Initial Steps for Sequential Generation of 5-Hydroxymethylcytidine 5'-Monophosphate and 5-Hydroxymethylcytosine in *Streptovorticillium rimofaciens* ZJU5119. *Chembiochem* , 2008 , 9(8) : 1286-1294.
- [11] 赵斌 , 生物学 , 何绍江. 微生物学实验: 科学出版社 , 2002.
- [12] 余姣姣 , 陶美凤. 无机盐对阿维链霉菌接合转移及异源表达放线紫红素的影响. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* , 2010 , 50(11) : 1556-1561.
- [13] Flett F , Mersinias V , Smith CP. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA restricting streptomycetes. *FEMS microbiology letters* , 1997 , 155(2) : 223-229.
- [14] Grohmann E , Muth G , Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* , 2003 , 67(2) : 277-301.
- [15] Thomas CM , Nielsen KM. Mechanisms of , and barriers to , horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology* , 2005 , 3(9) : 711-721.
- [16] Cowan J. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biometals* , 2002 , 15(3) : 225-235.
- [17] González-Cerón G , Miranda-Olivares OJ , Servín-González L. Characterization of the methyl specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and of the role played by laterally acquired nucleases. *FEMS microbiology letters* , 2009 , 301(1) : 35-43.

Effect of casamino acid on intergeneric conjugation in rapamycin-producing *Streptomyces hygroscopicus* ATCC29253

Wanyao Zhang, Huinan Lu, Jing He*

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: [Objective] *Streptomyces hygroscopicus* ATCC29253 has attracted much interests due to its capacity of producing various secondary metabolites with strong bioactivities, including immunosuppressant rapamycin, nigericin, hexaenes, elaiophylin and hygrocins. [Objective] To investigate biosynthetic pathway of these metabolites and construct high-yield strains by genetic engineering, establishment of a highly efficient genetic manipulation system is critically required in this strain. [Methods] We tested the effects of conjugation media and donor strains on conjugal transfer from *Escherichia coli* to *S. hygroscopicus* ATCC29253 and other Streptomycetes. [Results] We found that both casamino acid and MgCl₂ supplemented in conjugation media improved conjugation frequency in *S. hygroscopicus* ATCC29253. A random experiment led to the disclosure of an optimal combination of casamino acid and MgCl₂ by which the conjugation frequency in *S. hygroscopicus* reached 1.5×10^{-4} . Meanwhile, we also found significant changes in conjugation frequencies of *S. lividans*, *S. albus* and *S. avermitilis* when casamino acid was supplemented in conjugation media. [Conclusion] Casamino acid has significant influence on conjugation frequency in not only *S. hygroscopicus* ATCC29253 but also other *Streptomyces* such as *S. lividans*, *S. albus* and *S. avermitilis*.

Keywords: *Streptomyces hygroscopicus* ATCC29253, conjugation, casamino acid

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800020 and 30970059), by the New Century Excellent Talents grant from the Ministry of Education of China (NECT-08-0779), by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (SRF for ROCS, SEM) ([2009]1590) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2009PY006)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87280163; E-mail: hejingj@ yahoo. com

Received: 3 November 2011 / Revised: 27 November 2011

厦门大学出版社书讯

赤潮控制微生物学——厦门大学南强丛书第五辑

郑天凌 等/著; 978-7-5615-3848-7; ¥48.00; 2011年4月 出版



内容简介: 本书针对全球水体富营养化问题, 聚焦于赤潮生消过程中微生物的特殊地位与作用, 旨在挖掘高效抑/杀藻微生物资源, 积极阐释其调控藻华、防治有害赤潮的途径、机理及方法。全书内容由三篇组成, 第一篇为概论, 主要介绍赤潮及赤潮成因的研究进展; 第二篇重点探讨海洋中的有效抑/杀藻微生物(细菌、放线菌及病毒)及其活性成分对有毒藻的作用方式与过程和赤潮发生水域菌-藻关系问题; 最后一篇简要叙述了赤潮防治的现状与研究展望。

本书主要读者对象包括水生生态学、微生物学、藻类学、海洋生态学、水产养殖学、海洋环境污染及水体(淡水、海水)富营养化等领域的科技人员与管理人员、高等院校的教师及学生人群。

欢迎各界人士邮购厦门大学出版社各类图书

邮购地址: 厦门市软件园望海路39号 厦门大学出版社 邮编: 361005

联系人: 陈进才(0592-2188509) 吕静琳(0592-2184866)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目