

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(4) 0471-0478; 4 April 2009  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

## *ste7* 与 *ste15* 双基因敲除对依博素生物合成的影响

白利平<sup>1</sup>, 姜蓉<sup>1</sup>, 单俊杰<sup>2</sup>, 郭连宏<sup>1</sup>, 张洋<sup>1</sup>, 李元<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

(<sup>2</sup>军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要**【目的】研究 *ste7* 和 *ste15* 基因双敲除对依博素生物合成的影响。【方法】通过基因同源重组双交换, 对 *ste15* 基因缺失突变株 *Streptomyces* sp. 139 (*ste15*<sup>-</sup>) 再进行 *ste7* 基因的敲除, 经 Southern 杂交验证, 获得了 *ste7* 和 *ste15* 双基因缺失突变株 *Streptomyces* sp. 139 (*ste7 ste15*<sup>-</sup>)。对该突变株进行了基因互补。气相色谱分析 *ste7* 和 *ste15* 双基因缺失突变株及互补株产生的胞外多糖单糖组分, 排阻色谱测定衍生物的重均分子量, ELISA 法测定衍生物的 IL-1R 拮抗活性, 并与依博素进行比较分析。【结果】获得 *ste7* 和 *ste15* 双基因缺失株 *Streptomyces* sp. 139 (*ste7 ste15*<sup>-</sup>) 及互补株。双基因缺失株产生的胞外多糖与依博素相比, 葡萄糖与岩藻糖含量明显降低, 分子量变小, 生物活性明显下降。基因互补株产生的胞外多糖中葡萄糖与岩藻糖含量恢复。【结论】*ste7* 和 *ste15* 基因编码产物参与了依博素生物合成中单糖重复单元序列的形成过程, 在依博素的生物合成中起重要作用, 突变株产生的依博素新衍生物体内活性有待进一步研究。

**关键词:** *ste7* 基因; *ste15* 基因; 基因双敲除; 链霉菌 139; 依博素新衍生物

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)04-0471-08

近年来, 越来越多的细菌胞外多糖 (Exopolysaccharide, EPS) 生物合成基因簇被克隆和鉴定, 所有这些被确定的基因簇中都包括编码特异糖基转移酶的基因, 该类酶在多糖生物合成中, 能特异性从核苷酸糖中将单糖转移至微生物细胞膜上脂质受体, 参与多糖的单糖重复单元合成, 在多糖的生物合成中起重要作用<sup>[1-3]</sup>。

本实验室从链霉菌 139 发酵产物中分离出一种新型胞外多糖, 命名为依博素, 研究显示该胞外多糖体外具有对白细胞介素 1 受体 (IL-1R) 的拮抗作用, 体内有显著抗类风湿性关节炎的活性, 目前已申报临床研究, 有可能发展成为具有我国自主知识产权的新药。我们已确定了依博素的生物合成基因

簇<sup>[4]</sup>, 其包含 27 个开放阅读框 (opening reading frame, ORF) 并已确定其中 *ste7* 基因编码产物为岩藻糖糖基转移酶 (结果待发表), 而 *ste15* 基因编码产物为葡萄糖糖基转移酶<sup>[5]</sup>。本研究拟对上述两种糖基转移酶的编码基因进行双敲除, 进一步观察 *ste7* 和 *ste15* 基因对依博素生物合成的作用, 并对双基因敲除菌株产生的依博素新衍生物进行初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 依博素产生菌链霉菌 139 (*Streptomyces* sp. 139) *ste15* 基因缺失突变株

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30530830)

\* 通信作者。Tel: +86-10-63013336; Fax: +86-10-63017303; E-mail: yuanwli@263.net

作者简介: 白利平 (1973-) 男, 内蒙古包头人, 博士, 助理研究员, 从事微生物分子生物学研究。E-mail: lippingbai1973@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-20; 修回日期: 2008-12-26

(*Streptomyces* sp. 139 *ste15*<sup>-</sup>) 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) 大肠杆菌 ET12567(*E. coli* ET12567)<sup>[6]</sup> 为本实验室保存; pKC1139<sup>[7]</sup>及 pIJ680<sup>[8]</sup>为本实验室保存。pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

**1.1.2 酶和试剂:**限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 分子量标准均购自 TaKaRa 公司; IPTG、硫链丝菌素、氨基青霉素、安普霉素购自 Sigma 公司; 卡那霉素购自中国药品生物制品检定所; DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程公司; Southern 杂交试剂盒购自 Amersham 公司。

## 1.2 基因同源重组双交换质粒的构建

**1.2.1 PCR 扩增 *ste7* 基因上游片段(F1)和下游片段(F2):**以 *Streptomyces* sp. 139 总 DNA 为模板, 以 P1: 5'-AGCAAGCTTTGTTTCGGGCTGTCTCGTTCAAG-3' (*Hind* III) 和 P2: 5'-GCATCTAGACCATCACGCC AGGTAGC-3' (*Xba* I) 为引物, PCR 扩增获得了 *ste7* 基因的上游片段 F1(1030 bp); 利用引物 P3: 5'-ACGTCTAGATGGCGGAGCAGGTGGAGTTC-3' (*Xba* I) 和 P4: 5'-CTGGAATTCACCGTCTGCCGAGTTCG-3' (*Eco* R I) PCR 扩增获得 *ste7* 基因的下游片段 F2(899 bp)。PCR 的扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min; 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

**1.2.2 PCR 扩增硫链丝菌素抗性基因:**以质粒 pIJ680<sup>[8]</sup> 为模板, 采用引物 P5: 5'-GCTCTAGAAGGCGAATACTTCATATG-3' (*Xba* I) 和 P6: 5'-GCTCTAGATGATCATCACTGACGAAT-3' (*Xba* I) PCR 扩增硫链丝菌素抗性基因(*tsr* 1062 kb), PCR 的扩增条件同上。

**1.2.3 构建用于基因同源重组双交换的质粒 pKC7T:**用 *Hind* III-*Xba* I 酶切 DNA 片段 F1, *Eco* R I-*Xba* I 酶切 F2, *Xba* I 酶切扩增的 *tsr* 片段, 将 F1、F2 和 *tsr* 三片段与 *Hind* III-*Eco* R I 酶切的质粒 pKC1139 进行连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 提取后获得用于 *ste7* 基因阻断的重组质粒 pKC7T。

## 1.3 *ste7* 和 *ste15* 基因双敲除变株的获得

将质粒 pKC7T 转化甲基化缺失的 *E. coli* ET12567, 以消除重组质粒在大肠杆菌中可能发生的甲基化修饰。提取质粒, 在聚乙二醇(PEG 6000)介导下, 转化至 *ste15* 基因缺失变株 *Streptomyces* sp. 139 (*ste15*<sup>-</sup>) 的原生质体<sup>[9]</sup>, 28 $^{\circ}$ C 培养 20 h 后, 在平板上层加铺含 Thio<sup>Ⓢ</sup> (Thiostrepton 50  $\mu$ g/mL) 和 Km<sup>Ⓢ</sup>

(Kanamycin 100  $\mu$ g/mL) 的 R2 软琼脂培养基(0.6% 琼脂)。由于重组质粒 pKC7T 的母本质粒 pKC1139 带有一个来自 *Streptomyces ghanaensis* 温度敏感型复制子, 因此高于 34 $^{\circ}$ C pKC7T 不能正常复制<sup>[7]</sup>。所以先将转化平板置于 28 $^{\circ}$ C 培养 2 d, 待麻点状菌落出现后再于 37 $^{\circ}$ C 继续培养 7 d, 总共得到约 100 个转化子, 将生长出来的菌落同时分别影印至含有卡那霉素-硫链丝菌素和安普霉素(Apramycin Am)的 *Streptomyces* sp. 139 斜面培养基, 挑选对卡那霉素和硫链丝菌素有抗性对安普霉素敏感的菌株(Km<sup>r</sup>Thio<sup>r</sup>Am<sup>s</sup>)。

## 1.4 *ste7-ste15* 双基因缺失变株互补株的获得

**1.4.1 启动子 *ermE*<sup>\*</sup> 的获得:***ermE*<sup>\*</sup> 是链霉菌的一种强启动子, 以 *Eco* R I-*Bam* H I 双酶切质粒 pGEM-3zf-*ermE*<sup>\*</sup>(0.45 kb 的 *Eco* R I/*Sac* I 酶切的 *ermE*<sup>\*</sup> 启动子与 *Eco* R I/*Sac* I 酶切的 pGEM-3zf 载体连接) 获得 0.45 kb 的 *ermE*<sup>\*</sup> 启动子片段。

**1.4.2 *ste15* 基因的扩增:**以 P9: 5'-GCGGATCCGGTGGCGTGAGCATGCAC-3' (*Bam* H I) 和 P10: 5'-GGCTCTAGATTATCATCTGTTTCCCCCATC-3' (*Xba* I) 为引物, *Streptomyces* sp. 139 基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增获得扩增 *ste15* 基因。PCR 的扩增条件同上。

**1.4.3 *ste7* 基因的扩增:**以 *Streptomyces* sp. 139 基因组 DNA 为模板, 采用引物 P7: 5'-GCTCTAGAGTGAGAACCTGTCCGGT-3' (*Xba* I) 和 P8: 5'-GC AAGCTTCAAGGGACG-3' (*Hind* III) 进行 *ste7* 的 PCR 扩增。PCR 的扩增条件同上。

**1.4.4 互补质粒 pKC7-15c 的构建:**以 *Bam* H I-*Xba* I 双酶切 *ste15* 基因扩增片段, *Xba* I-*Hind* III 酶切 *ste7* 基因扩增片段, 上述二片段和经 *Eco* R I-*Bam* H I 双酶切由质粒 pGEM-3zf-*ermE*<sup>\*</sup> 分离的 *ermE*<sup>\*</sup> 启动子片段连接, 连接片段克隆至 *Eco* R I-*Hind* III 双酶切的 pKC1139, 得到互补质粒 pKC7-15c。

**1.4.5 *ste7-ste15* 双基因缺失变株互补株的获得:**利用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的原生质体转化将质粒 pKC7-15c 转化至 *ste7-ste15* 双基因缺失突变株得到互补菌株。

## 1.5 Southern 杂交

按试剂盒(Amersham)提供操作步骤进行。分别以 *Bam* H I 酶切 *ste15* 基因缺失变株 *Streptomyces* sp. 139(*ste15*<sup>-</sup>) 总 DNA 和 *ste7-ste15* 双基因缺失突变株的总 DNA, 以 *ste7* 基因下游片段(F2)DNA(899 kb)

为探针进行 Southern 杂交。

### 1.6 双基因阻断株及互补株胞外多糖的提取

发酵液离心, 滤液经 X5 大孔树脂柱层析, 流出液再行 007x7 阳离子交换树脂柱层析, 流出液以 60% 乙醇沉淀, 反复两次。离心去上清, 沉淀物经挥发去除乙醇, 以适量水溶解, 经 DEAE-Dextran A-25 柱层析, 蒸馏水洗脱, 洗脱液经超滤 (Mw 80000 超滤膜) 后冷冻干燥, 白色絮状固体 4℃ 保存。

### 1.7 胞外多糖的单糖组分分析

按报道方法<sup>[10]</sup>将胞外多糖水解并衍生化后, 进行气相色谱 (GC) 分析 (气相色谱仪: 惠普 HP5890, 色谱柱 HP-5), 对糖醛酸采用改良的 Bitter 氏法分析<sup>[11]</sup>。

### 1.8 胞外多糖的分子量测定

采用排阻色谱法测定胞外多糖的重均分子量 (HPLC Waters 600 层析柱 TSK-GEL G5000PW<sub>XL</sub>, 流动相

0.1 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 示差检测器 SF = 20, SENS = 32)

### 1.9 胞外多糖 IL-1R 拮抗活性的测定

采用已报道的 ELISA 法<sup>[12]</sup>测定依博素衍生物对 IL-1R 拮抗活性。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pKC7T 和 pKC7-15c 的酶切验证

采用前述方法构建重组质粒 pKC7T, 转化 *E. coli* ET12567 感受态细胞, 经提取获得用于对 *ste15* 基因缺失株 *Streptomyces* sp. 139 (*ste15*) 进行 *ste7* 基因阻断的重组质粒 pKC7T (图 1-A), 采用 *EcoR* I - *Hind* III 双酶切结果显示, 该重组质粒产生一个 3.0 kb 的酶切片段, 其大小和 F1 (1030 bp) + F2 (899 bp) 和 *trs* 抗性基因 (1062 bp) 之和相当, 表明上述三 DNA 片段已成功插入质粒 pKC1139, 重组质粒 pKC7T 中含有上述三 DNA 片段 (图 1-B)。

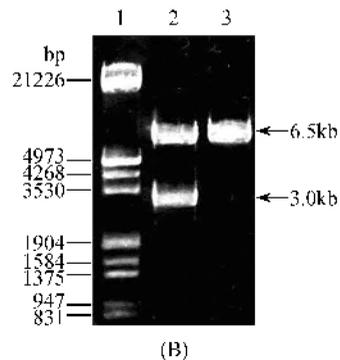
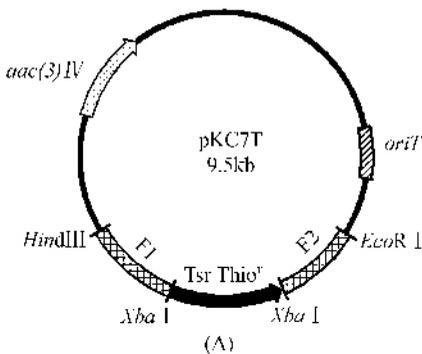


图 1 重组质粒 pKC7T

Fig. 1 Recombinant plasmid pKC7T. A: Restriction enzyme map of pKC7T. B: Restriction enzyme analysis of plasmid pKC7T. 1. Marker ( $\lambda$ DNA/*EcoR* I & *Hind* III) 2. pKC7T/*EcoR* I & *Hind* III 3. pKC1139/*EcoR* I & *Hind* III.

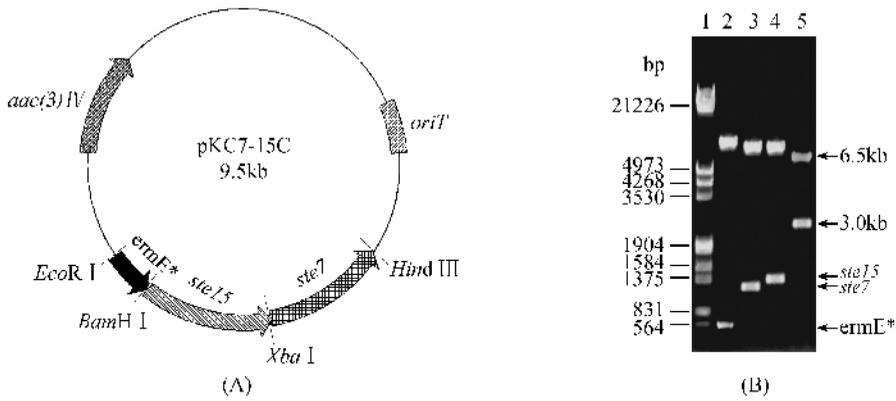
采用前述方法, 将 *ermE*\* 启动子片段、*ste15*、和 *ste7* 基因连接后插入质粒 pKC1139, 获得重组质粒 pKC7-15c (图 2-A), 重组质粒转化至 *ste7-ste15* 双基因缺失突变株得到互补菌株 *Streptomyces* sp. 139 (pKC7-15c), 提取重组质粒 pKC7-15c 进行酶切鉴定, 如图 2-B 所示, *EcoR* I - *Bam* H I 酶切 pKC7-15c 获得 DNA 片段大小与 *ermE*\* 相当 (0.450 kb), *Xba* I - *Hind* III 酶切 pKC7-15c 获得 DNA 片段大小与 *ste7* 相当 (1.215 kb), *Bam* H I - *Xba* I 酶切 pKC7-15c 获得 DNA 片段大小与 *ste15* 一致 (1.27 kb), 而 *EcoR* I - *Hind* III 酶切 pKC7-15c 获得两片段, 大片段为线性

pKC1139, 而小片段相当于 *ermE*\*、*ste15* 和 *ste7* 之和 (约 3 kb), 表明 pKC7-15c 克隆有上述三基因片段。

在 pKC1139 中, *ste15* 和 *ste7* 均在启动子 *ermE*\* 作用下, 两基因间具有终止子各自表达。

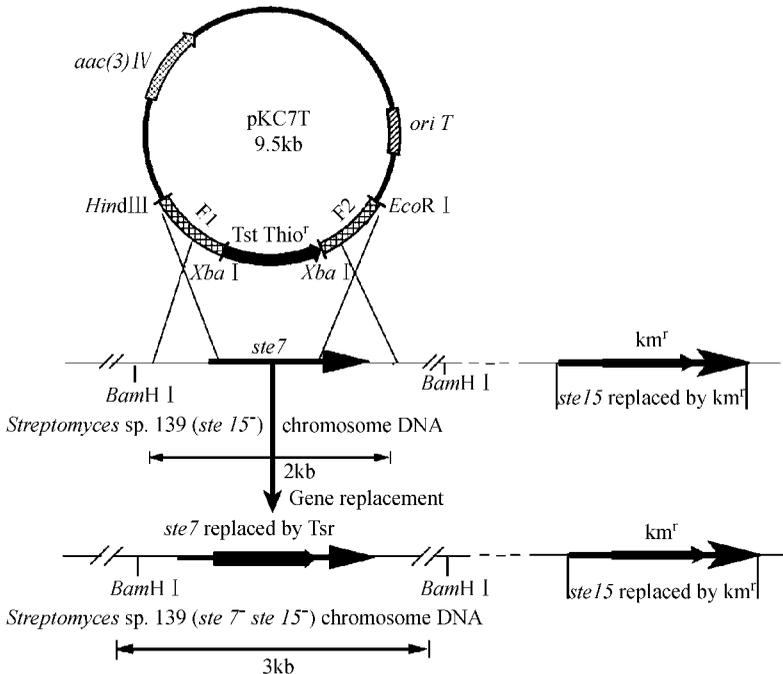
### 2.2 获得 *ste7* 和 *ste15* 基因双敲除菌株

2.2.1 基因双敲除株的获得: 按前述方法采用重组质粒 pKC7T, 经基因同源重组双交换, 对 *ste15* 基因缺失株 *Streptomyces* sp. 139 (*ste15*) 进行 *ste7* 基因阻断, *ste7* 基因同源重组双交换过程如图 3 所示。采用如前筛选步骤, 获得 1 个 Km<sup>r</sup>Thio<sup>r</sup>Am<sup>s</sup> 克隆 (对阿普霉素敏感, 抗卡那霉素和硫链丝菌素)。



2.2 pKC7-15c 重组质粒

Fig.2 Recombinant plasmid pKC7-15c. A :Restriction enzyme map of pKC7-15c ;B :Restriction enzyme analysis of plasmid pKC7-15c. 1. Marker (  $\lambda$  DNA/ *EcoR* I & *Hind* III ) 2. pKC7-15c/ *EcoR* I & *Bam* H I 3. pKC7-15c/ *Xba* I & *Hind* III 4. pKC7-15c/ *Bam* H I & *Xba* I 5. pKC7-15c/ *EcoR* I & *Hind* III .



2.3 重组质粒 pKC7T 介导的 ste7 基因的同源重组双交换示意图

Fig.3 Disruption of *ste7* via double crossover.

2.2.2 Southern 杂交验证基因双敲除株 :采用前述方法进行 Southern 杂交 ,结果显示 *ste15* 基因缺失株 *Streptomyces* sp. 139( *ste15*<sup>-</sup> )总 DNA 处出现一条2.0 kb 的阳性杂交信号条带 ,而在上述双基因缺失突变株的总 DNA 处出现一条 3.0 kb 阳性杂交条带( 图 4 ) ,与预期相符。表明通过基因同源重组双交换 *Streptomyces* sp. 139( *ste15*<sup>-</sup> )中的 *ste7* 基因的部分片段已被 *thio*<sup>r</sup> 抗性基因片段( *tsr* )取代 ,确认该菌株为 *ste7* 和 *ste15* 双缺失株 ,命名为 *Streptomyces* sp. 139 ( *ste7 ste15*<sup>-</sup> )。

2.3 基因互补株的获得

采用如前方法将质粒 pKC7-15c 转化至 *ste7*-

*ste15* 双基因缺失突变株 *Streptomyces* sp. 139( *ste7 ste15*<sup>-</sup> )提取质粒如图 2-B 所示 ,确证 pKC7-15c 已克隆至双基因缺失突变株 ,获得基因互补株 *Streptomyces* sp. 139( pKC7-15c )。

2.4 依博素衍生物的单糖组分分析

采用报道方法 ,分别提取 *ste7-ste15* 双基因缺失株 *Streptomyces* sp. 139( *ste7 ste15*<sup>-</sup> )产生的依博素衍生物 EPS15-7m ,及互补株 *Streptomyces* sp. 139( pKC7-15c )产生的依博素衍生物 EPS15-7c。采用气相色谱 ( GC )进行单糖分析 ,各单糖含量如表 1 所示。

由于已经确定 *ste7* 编码产物为岩藻糖糖基转移酶( 待发表结果 ) ,*ste15* 编码产物为葡萄糖糖基转

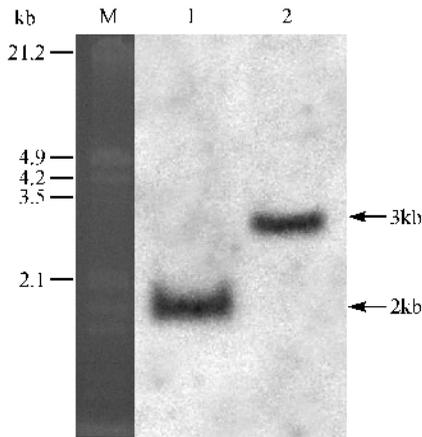


Fig. 4 *ste7-ste15* 双基因缺失株的 Southern blot 验证

Fig. 4 Southern blot of *Streptomyces* sp. 139 (*ste7 ste15*). 1. Chromosome DNA of *Streptomyces* sp. 139 (*ste15*); 2. Chromosome DNA of *Streptomyces* sp. 139 (*ste7 ste15*).

移酶,因此主要对葡萄糖和岩藻糖含量进行了比较。由结果可见,和依博素相比 EPS15-7 m 葡萄糖含量降低约 61.7%,岩藻糖含量降低约 65.3%。而 EPS15-7c 葡萄糖恢复至依博素水平,岩藻糖则较 EPS15-7 m 提高一倍,恢复至依博素的 73.3%。表明上述两基因敲除明显降低了依博素衍生物的葡萄糖和岩藻糖含量。基因互补后得到显著恢复。

表 1 Ebosin、EPS15-7m 和 EPS15-7c 的葡萄糖和岩藻糖含量分析

Table 1 The analysis of glucose and fucose composition of Ebosin, EPS15-7 m and EPS15-7c

Monosaccharide	Monosaccharide contents/%		
	Ebosin	EPS15-7m	EPS15-7c
Glucose	0.81	0.31	0.83
Fucose	3.49	1.21	2.56
Rhamnose	5.34	3.32	4.31
Arabinose	20.77	20.27	23.61
Xylose	2.01	1.47	0.94
Mannose	2.15	3.60	0.51
Galactose	55.26	63.10	61.10
Galacturonic acid	10.17	6.72	6.14

## 2.5 依博素衍生物的分子量测定

采用前述方法测定依博素衍生物 EPS15-7m 和 EPS15-7c 的重均分子量 ( $M_w$ ),分别为  $51.2 \times 10^4$  和  $55.2 \times 10^4$  (图 5),低于依博素的重均分子量 ( $66 \times 10^4$ )。结果显示双基因敲除后对依博素生物合成重复单元序列聚合度有一定影响。

## 2.6 依博素衍生物的 IL-1R 拮抗活性测定

如表 2 所示,分别在浓度  $3.2 \mu\text{g/mL}$  和  $0.64 \mu\text{g/mL}$  测定依博素、EPS15-7 m 和 EPS15-7c 对 IL-1R

的拮抗活性,结果显示双基因敲除后,依博素衍生物对 IL-1R 的拮抗活性明显降低,基因互补后也未能有效恢复。

表 2 ELISA 分析 Ebosin、EPS15-7m、EPS15-7c 的 IL-1R 拮抗率

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Antagonist rate/%		
	Ebosin	EPS15-7m	EPS15-7c
3.2	54.51	7.1	4.24
0.64	46.2	2.99	4.57

## 2.7 依博素衍生物的生成量分析

按照前述胞外多糖提取方法分别提取 EPS15-7m 和 EPS15-7c,其生成量分别为  $98.4 \text{ g/L}$  和  $72.5 \text{ g/L}$ ,明显低于依博素产量  $450 \text{ g/L}$ 。

## 3 讨论

不同微生物产生的胞外多糖尽管结构各不相同,但其生物合成途径基本类似,即通过糖基转移酶 (Glycosyltransferase, GTF) 将单糖从核苷酸糖顺序性转移而装配至脂类载体上形成重复单元,随后这些重复单元经聚合后输出胞外,形成胞外多糖<sup>[2,3]</sup>。

本实验室已确定依博素的生物合成基因簇 (*ste*),该基因簇由 27 个开放阅读框架组成<sup>[4,5]</sup>,其中 *ste7* 和 *ste15* 的编码产物已分别确定为岩藻糖糖基转移酶 (待发表结果) 和葡萄糖糖基转移酶<sup>[5]</sup>,在依博素的生物合成中,分别具有能从各自核苷酸糖将岩藻糖和葡萄糖转移至依博素产生菌 *Streptomyces* sp. 139 的细胞膜脂质接受体,从而使单糖向重复单元序列增长链转移,因此在依博素生物合成中起重要作用。

通过改变多糖的单糖重复单元序列组分以改造 EPS 结构,是糖生物工程研究的目标之一,在 EPS 基因簇中替代或敲除特定的糖基转移酶基因,可以得到含不同单糖组分的 EPS 衍生物,这是获得新生物活性多糖的有效途径之一<sup>[2]</sup>。基于上述目的,本文对编码糖基转移酶的 *ste7* 和 *ste15* 基因进行了双敲除研究,以期获得依博素的新衍生物,通过对其性质分析进一步研究上述两种基因在依博素生物合成中的作用。

本文结果表明 *ste7-ste15* 双基因缺失株产生的 EPS15-7m 所含岩藻糖和葡萄糖均较依博素有显著降低,而基因互补株产生的 EPS15-7c 两种单糖明显回升。鉴于我们已确定 *ste7* 编码岩藻糖糖基转移

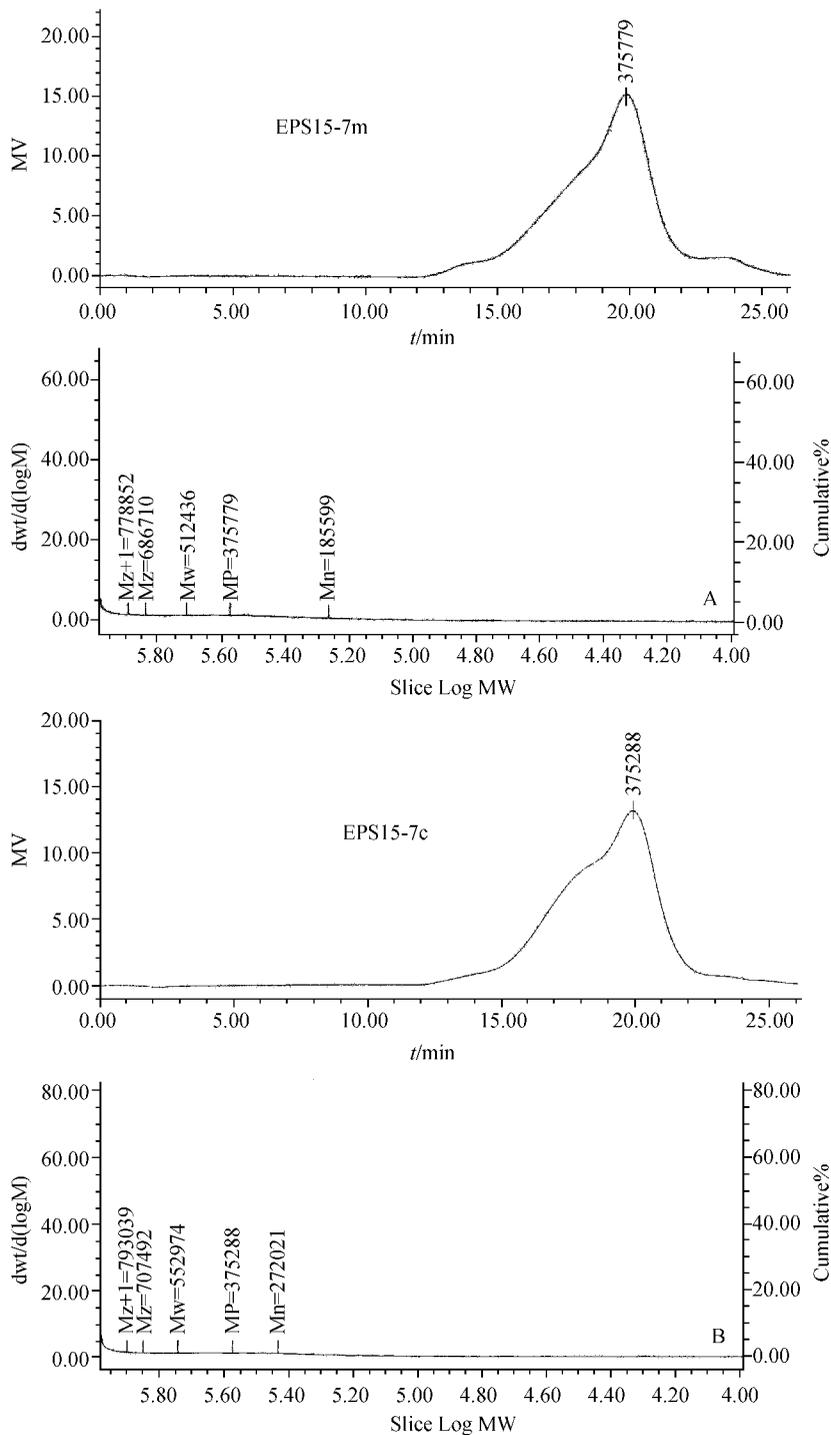


图5 依博素衍生物的分子量测定

Fig.5 Determination of the molecular mass of EPSs. A :EPS15-7m ; B :EPS15-7c.

酶 *ste15* 编码葡萄糖基转移酶,因此本文结果进一步确认了上述研究结果。此外还表明我们所采用的以 *ermE\** 为启动子,串联表达 *ste7* 和 *ste15* 基因的互补质粒 pKC7-15c 在基因互补株中成功进行了表达,起到了有效互补作用。双基因敲除株产生的 EPS15-7m 仍有少量岩藻糖和葡萄糖存在,其他单糖在敲除株和互补株中比例也有不同程度改变,推测

可能是因为微生物糖代谢网络复杂,因基因敲除导致一些单糖丧失可能会通过网络适当转化补偿<sup>[13]</sup>。基因互补株产生的胞外多糖中,岩藻糖未能恢复至依博素水平,可能和互补质粒采用启动子 *ermE\** 及表达的目的基因 *ste7* 产物性质有关,为了提高互补水平,需进一步采用不同启动子进行研究。此外也可能因技术操作原因影响单糖测定结果。

研究结果显示 EPS15-7<sub>m</sub> 的分子量较依博素明显降低,对 IL-1R 生物活性大部丧失且生成量显著减少,这说明双基因敲除对依博素的单糖重复单元聚合度有影响。文献报道<sup>[14-15]</sup>多糖的结构分为初级结构和高级结构,一级结构为初级结构,二、三、四级结构为高级结构。多糖的一级结构是指糖基的组成、糖基排列顺序、相邻糖基的连接方式、异头碳构型以及糖链有无分支、分支的位置与长短等。多糖的二级结构是指多糖主链间以氢键为最主要次级键而形成的有规则的构象。多糖的三级结构和四级结构是指以二级结构为基础,由于糖单位之间的非共价相互作用,导致二级结构在有序的空间里产生的有规则的构象。多糖生物活性与其高级结构的关系更为密切,因此推测本文 EPS15-7<sub>m</sub> 活性丧失除了和一级结构岩藻糖和葡萄糖比例降低有关外,主要可能是基因双敲除对依博素高级结构有较大影响,因此互补株产生的 EPS15-7<sub>c</sub> 未能恢复对 IL-1R 的拮抗活性。

我们以往研究表明 *ste15* 基因敲除株产生的依博素衍生物 EPS-15<sub>m</sub>,其葡萄糖含量接近零,分子量降至  $48.0 \times 10^4$  明显低于依博素,生物活性丧失,这和本文双基因敲除获得的 EPS15-7<sub>m</sub> 结果基本相当。

综上所述,本文通过对 *ste7-ste15* 双基因敲除,进一步确定了作为糖基转移酶基因在依博素生物合成中起重要作用。所生成的依博素衍生物尽管丧失了对 IL-1R 的拮抗活性,但是否具有其他新生物活性尚待进行深入研究。

## 参考文献

- [ 1 ] Breton C, Snajdrová L, Jeanneau C, et al. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 2006, 16(2): 29R - 37R.
- [ 2 ] van Kranenburg R, Boels IC, Kleerebezem M, et al. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(5): 498 - 504.
- [ 3 ] Welman AD, Maddox IS. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology* 2003, 21(6): 269 - 274.
- [ 4 ] Wang LY, Li ST, Li Y. Identification and characterization of a new exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters* 2003, 220: 21 - 27.
- [ 5 ] Sun QL, Wang LY, Shan JJ, et al. Knockout of the gene (*ste15*) encoding a glycosyltransferase and its function in biosynthesis of exopolysaccharide in *Streptomyces* sp. 139. *Archives of Microbiology* 2007, 188(4): 333 - 340.
- [ 6 ] MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, et al. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 1992, 111: 61 - 68.
- [ 7 ] Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, 116: 43 - 49.
- [ 8 ] Engel P. Plasmid transformation of *Streptomyces tendae* after heat attenuation of restriction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(1): 1 - 3.
- [ 9 ] Kieser T, Bibb MJ, Butter MJ, et al. *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, England, 2000.
- [ 10 ] Xu G, Chang W, Fei LH. Composition analysis of carbohydrate released from bovine sumaxillarymucin by capillary gas chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1998, 26: 922 - 926.
- [ 11 ] Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, 1962, 4: 330 - 334.
- [ 12 ] Jing C, Jianbo W, Yuan L, et al. A new IL-1 receptor inhibitor 139A: fermentation, isolation, physico-chemical properties and structure. *Journal of Antibiotics* 2003, 56: 87 - 90.
- [ 13 ] Gao M, D'Haese W, De Rycke R, et al. Knockout of an azorhizobial dTDP-L-rhamnose synthase affects lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide production and disables symbiosis with *Sesbania rostrata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2001, 14(7): 857 - 866.
- [ 14 ] Volpi N. Milligram-scale preparation and purification of oligosaccharides of defined length possessing the structure of chondroitin from defructosylated capsular polysaccharide K4. *Glycobiology* 2003, 13(9): 635 - 640.
- [ 15 ] Honda S, Suzuki S, Taga A. Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 30(6): 1689 - 1714.

## The effects of genes *ste7-ste15* double disruption in Ebosin biosynthesis

Liping Bai<sup>1</sup>, Rong Jiang<sup>1</sup>, Junjie Shan<sup>2</sup>, Lianhong Guo<sup>1</sup>, Yang Zhang<sup>1</sup>, Yuan Li<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

(<sup>2</sup> Institute of Pharmacology and Toxicology, The Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract [ Objective ]** To study the effects of genes *ste7-ste15* double disruption in biosynthesis of Ebosin. **[ Methods ]** The *ste7* gene was disrupted with a double crossover via homologous recombination in the mutant strain *Streptomyces* sp. The 139( *ste15*<sup>-</sup> ) and the mutant strain *Streptomyces* sp. 139( *ste7 ste15*<sup>-</sup> ) were identified by Southern blot. Gene complementation of the knock-out mutant was done. Monosaccharide composition of the exopolysaccharides EPS15-7m, EPS15-7c producing by *Streptomyces* sp. 139( *ste7 ste15*<sup>-</sup> ) and *Streptomyces* sp. 139( pKC7-15c ) separately were analyzed by Gas Chromatography, while their Mw and the antagonist activity for IL-1R were determined comparing with Ebosin. **[ Results ]** The mutant strain *Streptomyces* sp. 139( *ste7 ste15*<sup>-</sup> ) and complementary strain *Streptomyces* sp. 139( pKC7-15c ) were constructed respectively. The analysis results showed that both of fucose and glucose decreased remarkably in EPS15-7m and its Mw and the antagonist activity for IL-1R were much lower than Ebosin. The composition of fucose and glucose were recovered notably in EPS15-7c compared with EPS15-7m. **[ Conclusion ]** The genes *ste7* and *ste15* played essential roles in the synthesis process of sugar repeating unit during biosynthesis of Ebosin. The activities of Ebosin new derivative produced by the mutant will be studied further.

**Keywords :** *ste7* gene ; *ste15* gene ; gene double disruption ; *Streptomyces* sp. 139 ; Ebosin new derivative

( 本文责编 张晓丽 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China ( 30530830 )

\* Corresponding author. Tel : + 86-10-63013336 Fax : + 86-10-63017303 E-mail : yuanwli@263.net

Received 20 November 2008/Revised 26 December 2008

### 科学出版社新书推介(2009-04)

#### 现代工业微生物学实验技术

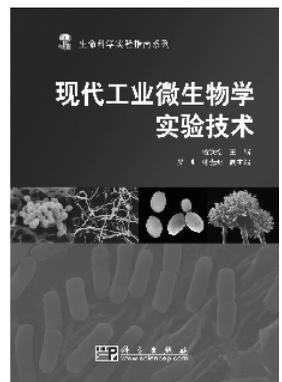
杨汝德 主编 吴虹 林晓珊 副主编

978-7-03-022865-9 ¥42.00 2009年1月出版

内容简介:本实验技术的第一章介绍了工业微生物学实验常用玻璃器皿和常用仪器设备的使用寿命、结构、性能和使用方法,并附有大量图片。第二章至第八章为本书的主要内容,涵括了工业微生物学七大实验技术:工业微生物的显微技术,工业微生物的形态观察、制片及染色技术,工业微生物的纯培养技术,工业微生物的检测技术,工业微生物生理与发酵试验技术,

工业微生物育种技术,工业微生物基因工程实验技术。本教材共设置了44个实验,主要为工业微生物学基本技能训练实验,还有部分为大型综合性实验和研究性实验。

本实验技术可作为高等教育出版社于2006年1月出版的《现代工业微生物学教程》(杨汝德主编)的配套实验用书,颇具理工科特色,适合于理工科大学的生物工程、生物技术、生物制药工程、食品科学与工程、食品质量与安全、环境工程等专业的本科生使用,也适合于高等职业技术学院相关专业的专科生使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:周文宇 联系电话:010-64031535

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