

利用同源重组建立地中海拟无枝菌酸菌 U32 染色体的 基因置换/中断系统

丁晓明 张 霓 田永强 姜卫红* 赵国屏* 焦瑞身

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘 要 地中海拟无枝菌酸菌 U32 是力复霉素 SV 的工业产生菌,其遗传操作一直是一个难题。在该菌株 DNA 高效电转化的基础上,利用同源重组的原理,建立了地中海拟无枝菌酸菌染色体的基因置换/中断系统。通过大肠杆菌重组质粒 pDK110 构建、转化及两步重组筛选,成功地用 α -淀粉酶基因(*amy*)取代了地中海拟无枝菌酸菌 U32 染色体上的 3-氨基-5-羟基苯甲酸合成酶基因(*ahbas*)。第一步单交换和第二步双交换的频率分别是 0.5%~0.7% 和 2%。将质粒 pDK110 变性后转化可显著提高重组频率,在第二步筛选双交换前对单交换重组子进行电击也能够提高其双交换重组的频率。此外,通过转化构建的两端带同源区段的线性 DNA 片段及一步重组筛选,我们在地中海拟无枝菌酸菌 U32 染色体的 *amrD*, *rifO* 基因中间插入了阿普拉霉素抗性基因(*apr*),其效率约为 30~50 转化子/ μ gDNA。

关键词 地中海拟无枝菌酸菌,同源重组,基因置换/中断

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0431-07

力复霉素(Rifamycin)是一种安莎类(Ansamycins)抗生素,由革兰氏阳性菌地中海拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*)产生,可治疗由分枝杆菌(*Mycobacterium*)和肺炎球菌(*Pneumococcus*)引起的各种病症^[1],具有良好的疗效,并且在抑制肿瘤方面亦具有一定的作用^[2]。安莎类抗生素的生物合成都由 C₇N,即 3-氨基-5-羟基苯甲酸(AHBA)起始。合成力复霉素时,多聚酮依次连接到这个核心单位上,其末端最后折回与氨基基团连接成为一个大环内酯。在已经克隆的达 95kb 的力复霉素生物合成基因簇中,可清楚的看到 1 个合成 AHBA 的亚基因簇及由 10 个模块组成的多聚酮合成酶(PKSs)亚基因簇。此外,还有几个可能的调节和修饰基因也存在于基因簇中^[3]。这种基因簇的有序排列模式非常利于进行基因操作及改造。我们可以参照红霉素及拉普霉素生物合成基因簇遗传工程的技术路线^[4],对力复霉素生物合成基因簇的一个或多个多聚酮合成酶模块进行操作,产生出新的力复霉素类似物,也可对其调

节基因或限速酶进行功能分析,构建工业高产菌。

上述研究的开展,需要用到染色体基因阻断/置换技术。在抗生素产生链霉菌的遗传工程中,这被证明是一种非常有效的方法。然而,由于力复霉素产生菌 *Amycolatopsis mediterranei* 的遗传操作系统并不完备,转化效率低,这方面工作的开展比较困难。我们在建立了地中海拟无枝菌酸菌 DNA 高效转化方法的基础上,结合利用一些方便筛选的抗性报告基因,建立了地中海拟无枝菌酸菌的染色体基因阻断/置换系统。并且在实验中对一些影响其重组频率的因素进行了优化。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

实验所用的菌株和质粒见表 1。

1.2 培养基

大肠杆菌的培养用 LB 培养基,培养温度为 37℃。抗生素使用浓度为:氨苄青霉素 100 μ g/mL,阿

普拉霉素为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 。地中海拟无枝菌酸菌 U32 用本氏培养基或 YEME^[5], 抽提染色体 DNA 时用 S 培养基^[6], 培养温度为 28°C 。阿普拉霉素使用浓度 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 。制备地中海拟无枝菌酸菌电击感受态时

用 MYM(改良的 YEME)培养基培养, 在这种培养基中除 YEME 的基本组分外, 再添加 $5\text{mmol}/\text{L}$ 的 MgCl_2 、 $5\text{mmol}/\text{L}$ 的 CaCl_2 、1% 的甘氨酸、0.6% 的 KNO_3 。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains, bacterio- Phage or plasmids	Relevant characteristics	Sources/ references
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>ecA1 supE44 F'</i> [<i>lacI^qlacZΔM15</i>]	Yanisch-perron
JM110	<i>dam dem F'</i> [<i>lacI^qlacZΔM15</i>]	Yanisch-perron
<i>A. mediterranei</i>		
U32	an industrial producer of rifamycin SV	This laboratory
DK120	U32 <i>ahbas</i> :: pDK110	This work
DK131	U32 <i>ahbas</i> :: <i>amy</i>	This work
DO131	U32 <i>rifO</i> :: <i>apr</i>	This work
DP131	U32 <i>amrA</i> :: <i>apr</i>	This work
Plasmids		
pBluescript KS	<i>lacZα</i> Ap ^r	Stratagene
pUC19	<i>lacZα</i> Ap ^r	
pULAM2	<i>N. lactamdurans</i> - <i>E. coli</i> Shutter plasmid Km ^r α-amylase	Martin
pKC1139	<i>apr</i>	Bierman
pBCAm	<i>apr</i> cloned in pBC	This work
pKSAMY	<i>amy</i> cloned in pBluescriptIIKS(-)	This work
pHJQ2.5	<i>ahbas</i> cloned in pBluescriptIIKS(-)	Huang
pKS1.2P	<i>amrA</i> cloned in pBluescriptIIKS(-)	Cui
pUCRIFO	PCR fragment of <i>rifO</i> from U32 cloned in pUC19, based on the sequence of August <i>et al.</i> (1998)	This work
pDK110	pUC-derived <i>apr</i> ; <i>hbas</i> :: <i>amy</i>	This work
pDP110	pKS1.2P <i>amaA</i> :: <i>apr</i>	This work
pDO110	pUCRIFO <i>rifO</i> :: <i>apr</i>	This work

1.3 酶和试剂

限制酶、T4 DNA 连接酶、CIAP 等为 Promega 公司产品, 溶菌酶、RNase 为 Sigma 公司产品。[α -³²P]-dCTP 为北京市亚辉生物医学工程公司产品。尼龙膜购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.4 DNA 操作

地中海拟无枝菌酸菌 U32 总染色体及质粒 DNA 的提取参照《链霉菌遗传操作手册》^[5,6], 总 DNA 的完全酶切参照《分子克隆》^[7]; 质粒抽提采用碱变性法, 质粒的酶切、脱磷、连接、电泳、Southern 杂交等参照《分子克隆》; DNA 片段的回收采用回收柱(华舜公司)或电洗脱回收法。探针的制备采用 Prime-a-Gene 标记系统(Promega 公司)。

1.5 电击转化地中海拟无枝菌酸菌 U32

用来自本氏固体培养基的新鲜种子接种于经改良的 MYM 培养基中, 培养 40~48h 至菌体生长稳定, 按 5% 的接种量转接 1 次至同样成分的培养基中培养 24h。然后离心收集菌体, 用重蒸水洗涤 2~3 次, 再用含 15% 甘油、10.3% 蔗糖的电击缓冲液洗涤菌体 2 次。保存于 -70°C 备用。转化时, 取 $30\mu\text{L}$ 电击感受态细胞与 $1\mu\text{L}$ DNA ($0.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 混合, 转移到 1mm 电击杯中, $9\text{kV}/\text{cm}$ 、13.5ms 电击, 然后在本氏液体中培养 2~3h, 铺抗性平板, 7~10d 后挑取转化子验证。

1.6 碱变性制备单链 DNA

将 $1\mu\text{g}$ DNA 置于 $20\mu\text{L}$ 变性缓冲液 ($0.2\text{mol}/\text{L}$ NaOH 、 $0.2\text{mmol}/\text{L}$ EDTA) 中 25°C 温育 5min, 然后加

入 $2\mu\text{L}$ 的醋酸氨 (2mol/L , $\text{pH}4.6$) 和 $75\mu\text{L}$ 乙醇 (100%), -70°C 沉淀 30min , 最后离心收集 DNA 溶于 $10\mu\text{L}$ TE 缓冲液中。力复霉素和 α -淀粉酶活力测定方法参照文献 [8, 9] 进行。

2 结果与讨论

2.1 两步同源重组进行地中海拟无枝菌酸菌 U32 的基因置换

3-氨基-5-羟基苯甲酸合成酶, 催化合成 3-氨基-5-羟基苯甲酸 (AHBA) 的最后一步反应, 是安莎类抗生素合成的一个关键酶^[10, 11]。其 *ahbas* 基因被阻断后, 可导致力复霉素合成的终止。我们选择这个基

因作为靶位点, 结合选用质粒 pULAM2^[12] 上的一段包含无启动子的 α -淀粉酶基因, 以及 pKC1139^[13] 上的阿普拉霉素抗性基因作为筛选标记, 进行了建立地中海拟无枝菌酸菌的基因置换/中断系统的工作。图 1 为重组质粒 pDK110 的构建示意图。该质粒上 α -淀粉酶基因的两端分别为 *ahbas* 编码序列的上下游区域, 利用它们就可实现 pDK110 与地中海拟无枝菌酸菌 U32 总染色体 DNA 的同源重组。阿普拉霉素抗性基因可用作选择标记来筛选质粒整合及载体脱离染色体的重组菌株, α -淀粉酶基因作为第二选择标记来确认该过程。

当 pDK110 被转化进入 U32 时, 由于该载体的

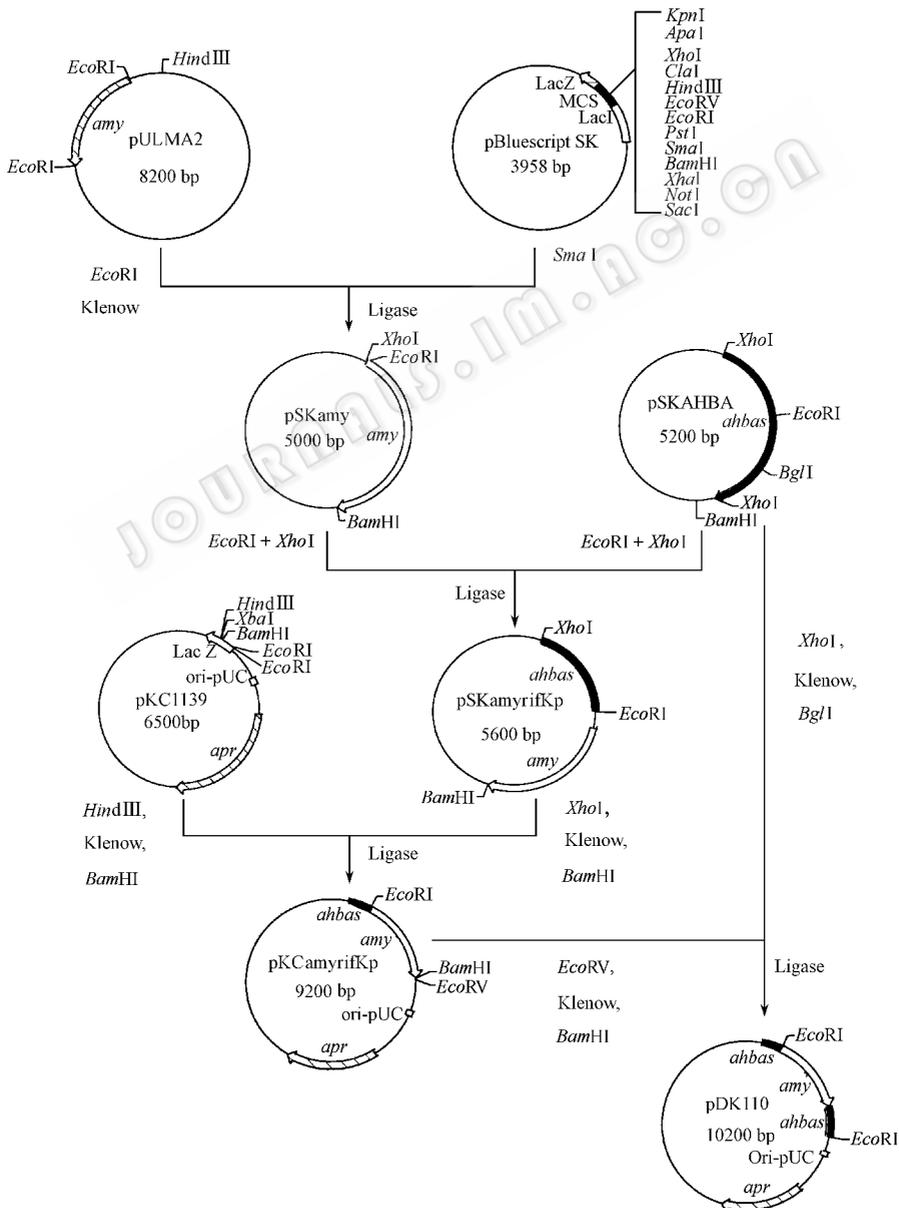


图 1 重组质粒 pDK110 的构建

复制子不能在地中海拟无枝菌酸菌中自主复制,在选择压力下将会整合到染色体上。我们首先筛选了载体上的抗性标记,得到抗阿普拉霉素的重组子。这些菌株表型都为 $Apr^r Rif^+ Amy^+$,表明为单交换重组子。选择其中一抗性重组子,命名为 DK120,继续进行了第二步重组筛选。将 DK120 在无选择性的液体培养基中培养,打散成单孢,让其在 YEME 平板上长成单菌落。然后分别在抗性平板和添加 1% 淀粉的 MM 平板上测试阿普拉霉素抗性和淀粉酶活力。具有淀粉酶活性、且对阿普拉霉素敏感的 6 个菌落被命名为 DK131-1 到 DK131-6。

第一步同源重组发生时,无论交换发生在 *ahbas* 基因的上游还是下游区域,其表型都为 $Apr^r Amy^+ Rif^+$ 。而第二次交换发生时有两种情况:一是与第一次交换在同一区域,即回复到野生型状态,此时表型为 $Apr^s Amy^- Rif^+$;二是与第一次交换在不同区域,此时淀粉酶基因取代了 *ahbas* 基因的编码区,表型为 $Apr^s Amy^+ Rif^-$ 。总染色体酶切后杂交的实验结果表明,在突变株 DK120 中,质粒 pDK110 正好整合在 *ahbas* 基因的染色体下游,而在 DK131-1 到 DK131-6 这些双交换重组子中,*ahbas* 基因都被 *amy* 基因片段所取代(图 2)。

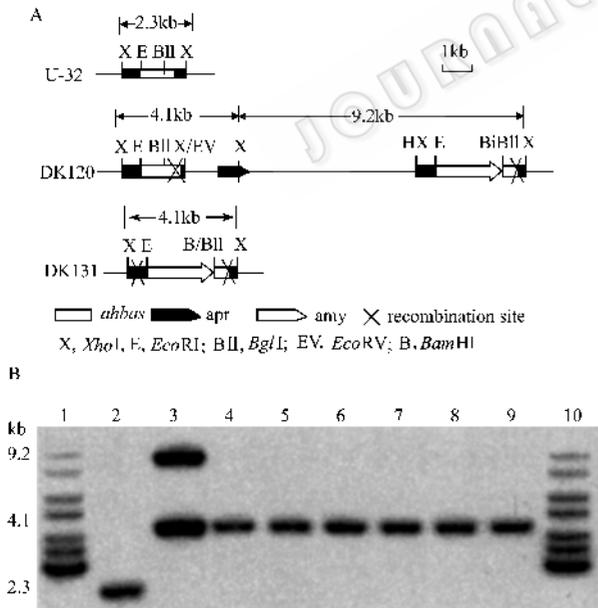


图 2 淀粉酶基因(*amy*)对 *A. mediterranei* U32 *ahbas* 基因的重组替换

Fig.2 Verification of replacement of *ahbas* by *amy* in *A. mediterranei* U32

A. Relevant features of genomic organization. B. Southern analysis of genomic DNA isolated from recombinants. 1 and 10.1kb marker from MBI; 2. Parental strain U32; 3. putative single-crossover recombinant DK120; 4-9. Putative double-crossover recombinant DK131-1 to DK131-6. All samples were digested with *Xho* I. The probe was radioactively labeled *ahbas* gene

在突变株 DK131 中, α -淀粉酶基因是从力复霉素生物合成基因的启动子开始转录和表达的,淀粉酶活力也可作为检测力复霉素生物合成基因启动子的活力的标志。因此,突变株 DK131 可以用来分析力复霉素生物合成的转录调控和用作克隆力复霉素生物合成调控基因的宿主菌。

2.2 影响地中海拟无枝菌酸菌染色体同源重组频率的因素

在进行体内 DNA 同源重组时,由于许多种类的放线菌,包括地中海拟无枝菌酸菌 U32 都有一些很强的限制系统(未发表数据),这给外源 DNA 的稳定带来了许多困难。即使采用相对易于转化的分离自 JM110(*dam dcm*)的质粒 DNA,其整合效率仍然很低(低于 10 个转化子/ μ gDNA)。使用变性的单链 DNA 可能对同源重组有利,Oh & Chater 曾在链霉菌同源重组时作过这方面的报道^[14]。在地中海拟无枝菌酸菌 U32 中,当使用变性的 pDK110 质粒时,整合频率增加了 7~10 倍。使用同源区域大小为 700~1000bp 抽提自 JM110 的整合质粒 pDK110,每微克 DNA 可得到 50~70 个整合转化子,而每微克同样来源的复制质粒 pULVK2A 则可有 10^4 个转化子(未发表数据),对应单交换的重组频率约为 0.5%~0.7%。

当单交换突变子在无选择性培养基上培养 7 d 后,第二次交换的频率是 0.4%(表 2)。这与我们的预测不符,因为这次重组发生在染色体上非常邻近的区域,但其重组频率甚至低于第一次单交换的频率。对第一步重组发生时的一些因素检测后,我们将单交换突变子进行电击,然后再筛选双交换重组子,结果发现,其发生重组的频率增加到大约为 2.0%(表 2)。对于这种现象的解释,推测可能是由于电击导致了 DNA 的不稳定或重排,进而激发了菌体的重组酶系,提高了双交换的频率。

2.3 地中海拟无枝菌酸菌 U32 染色体基因的一步阻断

虽然两步重组可以较为成功地实现对地中海拟无枝菌酸菌 U32 的基因置换、阻断和缺失,但实验步骤较多,加之放线菌生长较慢,周期较长。前面的统计结果说明,在地中海拟无枝菌酸菌中,同源交换的频率较高,有可能同时实现两步交换,所以,我们在研究一些新基因的功能时,又进行了地中海拟无枝菌酸菌染色体基因中断一步完成的方法设计。

如图 3,我们选择 U32 的 2 个基因 *amrD*, *rifI* 提供同源区段,分别构建了用于重组交换的质粒

pDK110, pDO110, 并且在 2 个基因内部都插入了 *apr* 抗性基因作为筛选标记。

表 2 DK120 菌株在非选择性平板上生长 7d 后不同表型菌落的统计
Table 2 Statistic distribution of colonies with different phenotypes/genotypes after DK120 grew in non-selective medium for 7 days

Treatment of DK120 cell before incubation	Number of colonies with indicated phenotypes			Total number of cells for test
	Apr ^s Amy ⁺ Rif ⁻	Apr ^s Amy ⁻ Rif ⁺	Apr ^r Amy ⁺ Rif ⁺	
Without electric shock	2	7	491	500
With electric shock	4	6	190	200

注: 以上所有数据都为 3 次重复试验平均结果。

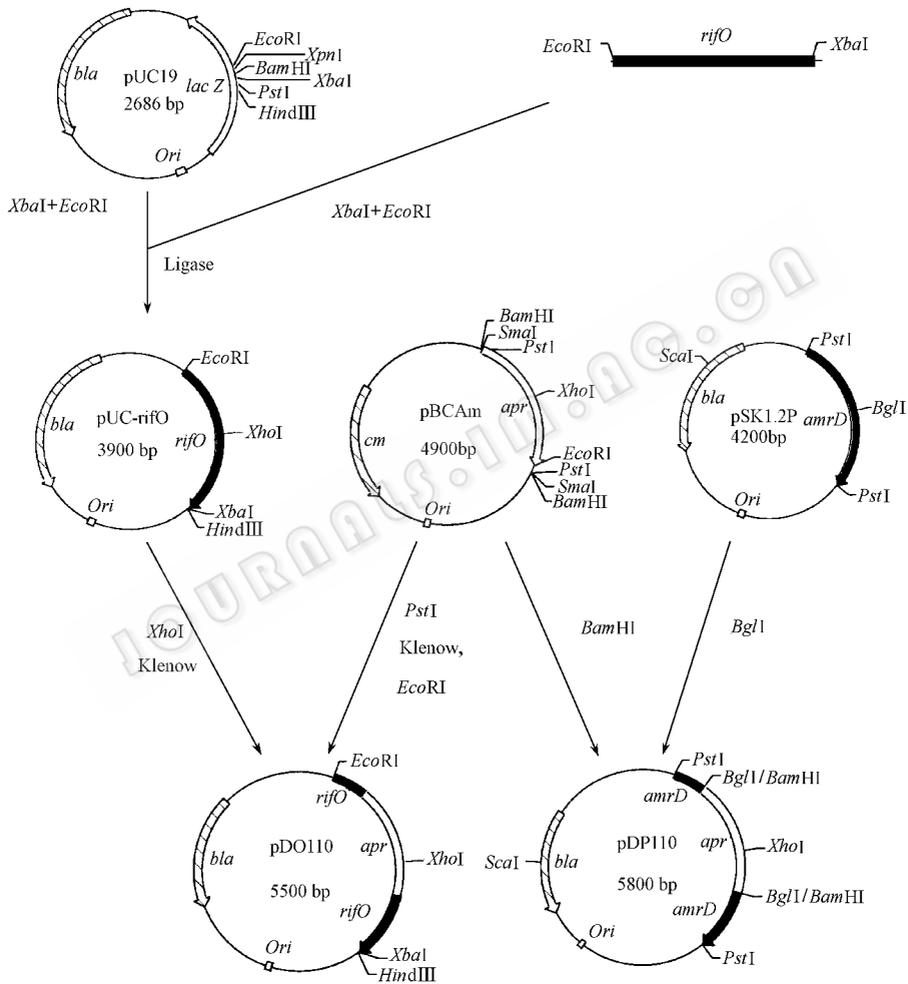


图 3 重组质粒 pDP110 和 pDO110 的构建

Fig.3 Plasmids pDP110 and pDO110 constructed for recombination

在一步重组置换实验中, 先将构建好的质粒酶切, 回收两端为同源重组序列、中间携带抗性基因的 DNA 片段。在导入地中海拟无枝菌酸菌之前, 对这些线性 DNA 片段充分变性, 制备用于重组转化的单链 DNA, 然后电击转化, 通过抗性平板筛选。由于是线性 DNA, 抗性基因无法通过单交换整合到染色体上, 只能通过双交换整合到染色体上。所以, 抗性

转化子都应该为双交换的结果。

染色体杂交实验结果证明, 这种方法是可靠和高效的。我们将 6 株 *amrD* 阻断变株, 8 株 *rifO* 阻断变株的总染色体 DNA 酶切, 进行杂交验证后表明, 所有重组子都为预测中的 *amrD*, *rifO* 基因插入突变(图 4)。这种方法的效率也较高, 每微克 DNA 可转化得到 30~50 个重组子。*rifO* 阻断变株的力复

霉素 SV 产量大幅降低(未发表数据)同样证实了一步基因置换法的有效性。

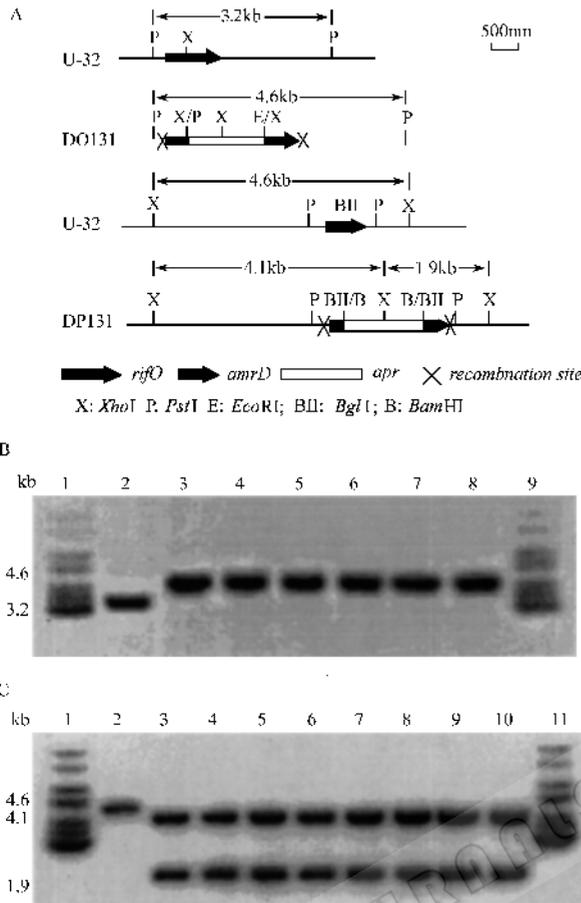


图 4 Apramycin 抗性基因(apr)对 A. mediterranei U32 rifO 和 amrB 基因的重组替换

Fig.4 Verification of replacement of rifO and amrD by apr in A. mediterranei U32

- A. Relevant features of genomic organization ;
- B. Southern analysis of genomic DNA isolated from rifO disruption mutants
 - 1 , 9. 1kb marker from MBI 2. parental strain U32 ;
 - 3 ~ 8. Six putative disruption mutants. All samples were digested with Pst I . The probe was radioactively labeled rifO gene .
- C. Southern analysis of genomic DNA from amrD disruption mutants.
 - 1 , 11. 1kb marker from MBI 2. Parental strain U32 ; 3 ~ 10. Eight putative disruption mutants. All samples were digested with Xho I . The probe was radioactively labeled amrD gene

2.4 两步基因置换法与一步基因置换法的比较

比较上述 2 种方法可见 ,两步法可以置换一些不易、甚至无法进行表型检测的外源基因片段到地中海拟无枝菌酸菌的染色体上。首先筛选载体上的抗性标记 ,证实质粒已经整合到染色体上之后 ,再通过非抗性培养 ,负筛选抗性丢失、即载体脱离染色体

的突变子 ,在这样一个群体中 ,外源 DNA 与染色体发生双交换的几率非常高。再通过总染色体杂交验证 ,就可从中挑选到基因已经发生置换的克隆。用这种方法 ,我们可以对染色体的任何区段进行适当的置换 ,而不带入抗性标记。在构建遗传工程菌产生新抗生素时 ,这一点尤其重要 ,因为我们可能只希望置换染色体上的某个结构域而不希望破坏其读框及转录。

而一步重组法构建的突变子在染色体上一般都留有抗性基因或其他筛选标记。抗生素生物合成基因簇都是成簇排列甚至共用启动子的 ,抗性基因的插入可能会影响到相邻基因的表达 ,这样就有可能发生一些预料不到的影响。尽管如此 ,由于其实验周期短 ,筛选过程简单等特点 ,在快速分析一些基因的功能时仍然非常实用。

致谢 J. F. Martin 为本实验提供质粒 pULAM2 ,特此致谢。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Lal R , Khanna M , Kaur H , Srivastava N , Tripathi K K , Lal S. Rifamycins : strain improvement program. *Crit Rev Microbiol* , 1995 , 21 : 19 ~ 30
- [2] Clinical update. Impact of HIV protease inhibitors on the treatment of HKV-infected tuberculosis patients with rifamycin. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* , 1996 , 45(42) : 921 ~ 925
- [3] August P R , Tang L , Yoon Y J , Ning S , Muller R , Yu T-W , Taylor M , Hoffmann D , Kim C-G , Zhang X , Hutchinson C R , Floss H G. 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin : deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of A. mediterranei S699. *Chem Biol* , 1998 , 5 : 69 ~ 79
- [4] Staunton J. Biosynthesis of erythromycin and rapamycin. *Chem Rev* , 1997 , 97 : 2611 ~ 2629
- [5] Hopwood D A , Bibb M J , Chater K F *et al* . Genetic Manipulation of Streptomyces : A Laboratory Manual. John Innes Foundation , Norwich , UK , 1985
- [6] PENG W T(彭文涛). Cloning , sequencing , expression and transcriptional analysis of the glutamine synthetase gene (glnA) from *Amycolatopsis mediterranei* U32. Ph. D. thesis(博士论文). Shanghai institute of plant physiology , Academia Sinica , China , 1996
- [7] Maniatis T , Fritsch E F , Sambrook J. Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory , New York , USA , 1989
- [8] NI L Y(倪榴英) , LIU C J(刘慈俊) , JIN Z K(金志坤) *et al* . A positive Correlation between Rifamycin SV Biosynthesis and the Activity of Glutamine Synthetase. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报) , 1984 , 24(3) : 217 ~ 223

- reporter gene for promoter activity in *N. lactamdurans*: comparison of promoters of the cephamycin cluster. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 2977 ~ 2982
- [10] Kim C C, Yu T W, Fryhle C B, Handa S, Floss, H G. 3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthase, the terminal enzyme in the formation of the precursor of mC₇N units in rifamycin and related antibiotics. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 6030 ~ 6040
- [11] HUANG J (黄健强), JIANG W H (姜卫红), ZHAO G P (赵国屏) *et al.* Cloning, sequencing and expression of AHBAS gene from *Amycolatopsis mediterranei* U32. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1999, **15**: 160 ~ 165
- [12] Kumar C V, Coque J J R, Martin J F. Efficient transformation of the cephamycin C producer *Nocardia lactamdurans* and development of shuttle and promoter-probe cloning vectors. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 4086 ~ 4093
- [13] 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** (1) : 43 ~ 49
- [14] Oh S H, K F Charter. Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): possible relevance to other organisms. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 122 ~ 127

Establishment of Gene Replacement/disruption System Through Homologous Recombination in *Amycolatopsis mediterranei* U32

DING Xiao-Ming ZHANG Ni TIAN Yong-Qiang JIANG Wei-Hong* ZHAO Guo-Ping* JIAO Rui-Sheng

(Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract A gene replacement/disruption system of *Amycolatopsis mediterranei* U32 was developed based on the established electroporation conditions as well as appropriate selective markers. Through two-step selection, *ahbas* gene in U32 was replaced by a promoterless α -amylase gene constructed on the plasmid pDK110 of *E. coli*. The first single-crossover and the second double-crossover frequencies were approximately 0.5% ~ 0.7% and 2%, respectively. Denaturation of the plasmid pDK110 increased the integration frequency about 7 ~ 10 folds, while electric shock treatment of the single-crossover recombinants increased the frequency of second crossover recombination about 5 folds. Employing denatured DNA fragments containing an apramycin-resistance gene flanked with regions of the respective genes, One-step disruption of *rifO* and *amrA* genes of U32 was also achieved with an efficiency of 30 ~ 50 transformants per microgram of DNA.

Key words *Amycolatopsis mediterranei*, homologous recombination, gene replacement/disruption

Received: 12-17-2001

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 39970007) and the Youth Fund of National Science Foundation of China (No. 30125002).

* Corresponding author. Tel: 86-21-64170709; Fax: 86-21-64042385; E-mail: wjiang@iris.sipp.ac.cn or gpzhao@sibs.ac.cn

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn