

阿维链霉菌 *bkdAB* 的基因中断对阿维菌素合成的影响

朱浩君¹ 梁运祥^{1*} 周俊初¹ 郑应华²

¹(华中农业大学农业微生物重点实验室, 武汉 430070)

²(北京生物医药研究所, 北京 100091)

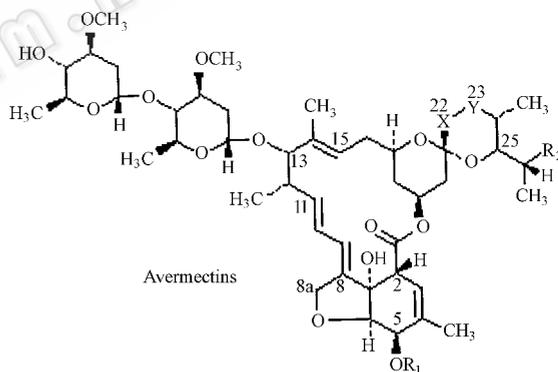
摘要 以阿维菌 B 组分菌株 *Streptomyces avermitilis* Bjbm0006 为出发菌株, 用 PCR 的方法构建 *bkdAB* 基因簇 (Branched-chain α -keto acid dehydrogenase gene AB) 的基因置换质粒 pHJ5821 (pHZ1358:: *bkdAB&erm*) 并对其进行了基因中断, 得到重组菌株 Bjbm5821。Bjbm5821 的发酵产物经 HPLC 检测发现, 除了产生 B1a 和 B2a 外, 还产生一种原菌株没有的新组分, 3 个组分的总含量只有出发菌株 Bjbm0006 的 25%。结果表明 *bkdAB* 的中断不仅部分阻断了阿维菌素的合成, 还阻断了阿维菌素 b 组分的合成, 可以推测 *bkdAB* 的产物在阿维菌素合成途径中主要承担了 α 酮基异戊酸脱氢酶 (α -ketoisovaleric acid dehydrogenase) 角色。

关键词 阿维菌素, 支链 α -酮酸脱氢酶基因, 基因中断

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0269-05

阿维菌素是由 *S. avermitilis* 产生的一类十六碳大环内酯齐墩果糖衍生物, 共 8 个组分, 分别为 A1a、A1b、A2a、A2b、B1a、B1b、B2a 和 B2b (图 1)。阿维菌素形成 8 个衍生物的原因主要在其生物合成过程中由 3 个关键的酶使得代谢途径出现了分支, 支链 α -酮酸脱氢酶复合物就是其中之一。该酶的缺失导致阿维菌素合成起始单元的合成能力丧失, 使得外添起始单元就可以得到理想的产物 a 组分。C-25 位的基团是阿维菌素合成的起始单元, 由异亮氨酸或缬氨酸降解转化而来, 分别得到 a 组分和 b 组分。支链 α -酮酸脱氢酶 (Branched-chain α -keto acid dehydrogenase, BCDH) 复合物参与 a 组分和 b 组分的合成, C-25 位存在两种基团的替代物, a 组分的替代物是 α -丁基残基, 由 $(S+)$ - α -甲基丁酸辅酶 A 转化而来, b 组分的替代物是异丙基残基, 由异丁基辅酶 A 转化而来。支链氨基酸异亮氨酸和缬氨酸通过支链氨基酸转氨酶和支链 α -酮酸脱氢酶作用合成 α -支链脂肪酸起始单元, 另外 α -支链脂肪酸酰基辅酶 A 可以由 α -支链酮酸通过从头合成得到 (图 2)。

1995 年 Pfizer 公司的 Skinner 等利用 *P. putida* 的支链 α -酮酸脱氢酶基因 (*bkd*) 为异源探针克隆了



		R ₁	R ₂	X-Y
Avermectin	Ala	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=CH
	A1b	CH ₃	CH ₃	CH=CH
	A2a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
	A2a	CH ₃	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)
	B1a	H	C ₂ H ₅	CH=CH
	B1b	H	CH ₃	CH=CH
	B2a	H	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
	B2b	H	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)

图 1 阿维菌素的结构图

Fig.1 Structure of avermectins

S. avermitilis 的 *bkdAB* 基因簇, 并在 *E. coli* 中得到表达产物 E1[$\alpha\beta$]^[1]。*bkdAB* 在 *S. avermitilis* 31272 的表达系统中被认为是一沉默基因, 在离该基因

12kb 处还有一同功酶基因簇 *bkdFGH*^[2]。本研究的出发菌株 *S. avermitilis* Bjbm0006 是由多次改造的生产菌株经过 *aveD::Amr* 的基因置换后得到的^[3], 所以 *bkdAB* 在 Bjbm0006 中可能已经表达。本文利用已发表的 *bkdAB* 的基因序列, 构建基因置换质粒 pHJ5821 对阿维菌素 B 组分菌株 Bjbm0006 进行基因置换, 得重组菌株 Bjbm5821。在不添加任何前提物条件下, Bjbm5821 的发酵产物除了只产生 B1a 和 B2a 外, 还产生了一种新的组分 oligomycin A。

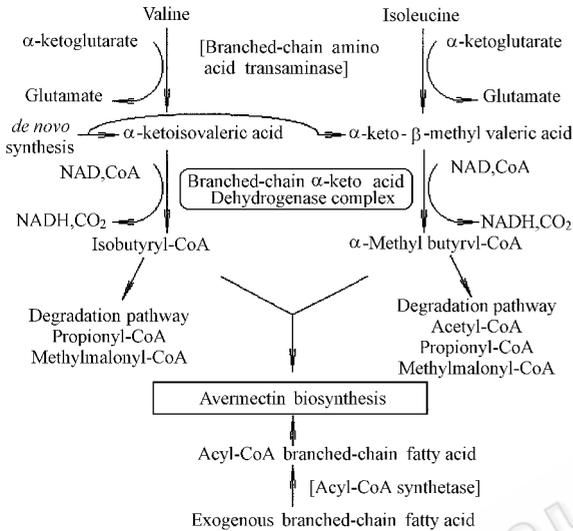


图 2 缬氨酸和异亮氨酸的代谢途径以及参与阿维菌素合成的推测

Fig.2 Pathways of valine and isoleucine catabolism and their postulated relationship to avermectin biosynthesis

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:阿维菌素 B 产生菌 *S. avermitilis* Bjbm0006^[3], 大肠杆菌 *E. coli*: JM109, DH5 α , 均由北京生物医药研究所保存。ET12567::pUZ8002 由上海交通大学周秀芬博士惠赠。

1.1.2 质粒:pHZ1358^[4], 大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒, 含有接合转移位点, 含硫链丝菌素和青霉素抗性基因, 在不含硫链丝菌素培养基中培养时, 不易在链霉菌中自主复制; pIJ4026^[4] 大肠杆菌质粒, 含红霉素抗性基因, 均由周秀芬博士惠赠。pHX5801, pHX5821, pHJ5821 为大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒, 均由本研究构建。

1.1.3 试剂:本研究所所用酶类均购于 Gibco BRL 和 Promega 公司; DNA 分子量标准物为 λ -pUC Mix Maker, 购于 MBI 公司; 本研究涉及的其它常规试剂

参见文献 5 和文献 6]

1.1.4 培养基和抗生素:大肠杆菌培养基为 LB^[5]; *S. avermitilis* 与大肠杆菌的接合转移培养基、*S. avermitilis* 的种子培养基和发酵培养基参见文献 [3]; *S. avermitilis* 固体产孢培养基为 YMS^[3]; 液体培养基为 YEME^[6]。LB 中氨苄青霉素使用量 100 μ g/mL, 红霉素使用量为 10 μ g/mL, YMS 中红霉素使用量为 10 μ g/mL, 硫链丝菌素使用量为 10 μ g/mL, 接合转移培养基中硫链丝菌素使用量为每平板 500 μ g。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养、转化和 DNA 基本操作:链霉菌培养、染色体 DNA 和质粒 DNA 提取等操作技术见文献 [6]; 大肠杆菌培养、转化和质粒提取等基本操作技术见文献 [5]; 大肠杆菌和链霉菌的属间接合转移方法见文献 [4]。

1.2.2 PCR 反应引物的合成及反应条件:根据目前已发表的 *bkdAB* 序列^[1], 按图 3 合成两对引物: F1: 5'-ccagatctcgcctccctcggc-3' (12, 下划线为 *Bgl* II 位点), R1: 5'-ccggatccacgagcgtcggc-3' (1031, 下划线为 *Bam* HI 位点); F2: 5'-aagatccggcgcgatgaccac-3' (1431, 下划线为 *Bam* HI 位点), R2: 5'-caagatctggtcgacaccggg-3' (2396, 下划线为 *Bgl* II 位点)。以 Bjbm0006 的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 105s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

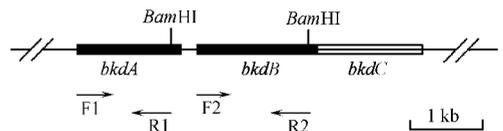


图 3 编码 *S. avermitilis* 的支链 α -酮酸脱氢酶 ABC 复合体基因区的 *Bam* HI 图谱

Fig.3 *Bam* HI map of the region of the *S. avermitilis* genome containing the genes encoding the components of the BCDH ABC complex

The arrows below the map indicate the location of PCR products.

1.2.3 基因置换:按图 4 的路线构建自杀型置换质粒 pHJ5821。pHJ5821 缺失了 *bkdAB* 的 400bp 的序列用 pIJ4026 中的 1.7 kb 的 *erm* 替代。按文献 [4] p249 中描述的方法将基因置换质粒 pHJ5821 从 ET12567::pUZ8002 接合转移到 *S. avermitilis* Bjbm0006 中。双交换菌株的筛选方法参见文献 [3]。用 PCR 扩增验证发生双交换的菌株, 引物为上述的 F1 和 R2, PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 45s, 58 $^{\circ}$ C

105s, 72°C 3min, 10 个循环, 95°C 45s, 55°C 105s, 72°C 3.5min, 20 个循环。

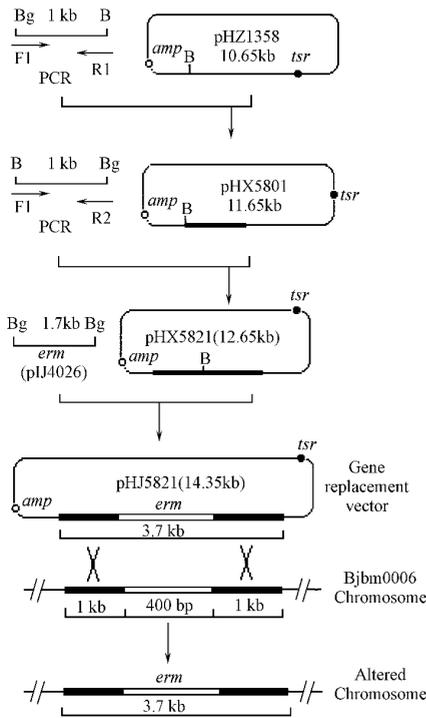


图4 重组质粒的构建和对 *S. avermitilis* Bjbm0006 的 *bkdAB* 进行基因中断

Fig.4 Construction of the recombination plasmid (pHJ5821) and disruption of *bkdAB* in Bjbm0006

Abbreviations: *amp*, ampicillin resistance gene; *tsr*, thiostrepton resistance gene; *erm*, erythromycin resistance gene; Bg, *Bgl* II; B, *Bam*HI

1.2.4 HPLC 测定产物 将发酵液的菌丝体用甲醇浸泡 30min 后离心, 取上清液, 进行 HPLC 测定、紫外扫描和质谱分析。HPLC 条件, 流动相: 甲醇: 水 (85:15), 流速 0.8mL/min, 检测波长: 246nm。质谱分析由北京微量化学研究所承担。

2 结果

2.1 PCR 克隆 *bkdAB* 的相关片段

以 Bjbm0006 的总 DNA 为模板, F1 和 R1 为引物, 按 1.2.2 的条件合成 *bkdA* 的前部分 1kb 片段, F1 带有 *Bgl* II 位点, R1 带有 *Bam*HI 位点, PCR 产物用 *Bgl* II 和 *Bam*HI 双酶切后插入 pHX5801 的 *Bam*HI 位点, 再用 PCR 的方法直接从转化的菌落筛选阳性克隆子, 得 pHX5801 (图 5 泳道 2), 其 PCR 产物大小为所期望的 1kb 左右, pHX5801 存在一个 *bkdA* 下游 *Bam*HI 位点。再以 Bjbm0006 的总 DNA

为模板, F2 和 R2 为引物, 按 1.2.2 的条件合成 *bkdB* 的后部分 1kb 片段, F2 带有 *Bam*HI 有位点, R2 带有 *Bgl* II 位点, PCR 产物用 *Bgl* II 和 *Bam*HI 双酶切后插入 pHX5801 的 *Bam*HI 位点, 以 F1 和 R2 为引物, 用 PCR 的方法直接从转化的菌落筛选 *bkdA* 和 *bkdB* 同方向阳性克隆子, 得 pHX5821 (图 5 泳道 3), PCR 产物大小为所期望的 2kb 左右。这样 pHX5821 存在一个位于 *bkdA* 和 *bkdB* 中间的 *Bam*HI 位点。以 F1 和 R2 为引物对 pHX5821 进行一个反应的测序, 结果和发表序列一致。

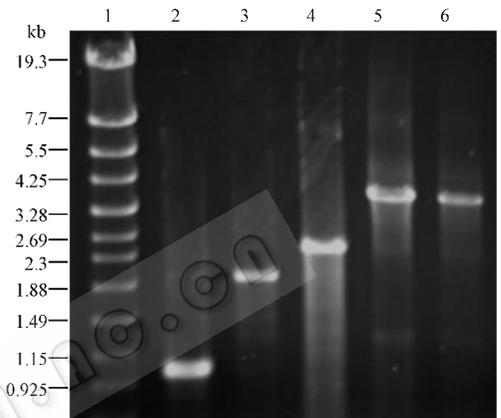


图5 PCR 产物分析基因克隆和基因置换

Fig.5 PCR products analysis of gene cloning and replacement
1: marker; 2: template from pHX5801; 3: template from pHX5821;
4: template from Bjbm0006 total DNA; 5: template from pHJ5821;
6: template from Bjbm0006 total DNA

2.2 基因置换重组质粒的构建

置换质粒 pHJ5821 如图 4 路线构建: *Bgl* II 酶切质粒 pIJ4026, 回收 1.7kb 的红霉素抗性基因片段, 插入 pHX5821 的 *Bam*HI 位点, 得质粒 pHJ5821, 以 F1 和 R2 为引物, 用 PCR 的方法筛出阳性克隆子 (图 5, 泳道 5), PCR 产物大小为所期望的 3.7kb 左右。

2.3 支链 α -酮酸脱氢酶基因簇相关基因的基因置换

2.3.1 重组菌株的筛选 将 pHJ5821 转化大肠杆菌 ET12567::pUZ8002, 然后接合转移到 Bjbm0006 中。经验证的 Bjbm0006/pHJ5821 在不含任何抗生素的 YMS 平板上 28°C 培养, 收集孢子转接不含任何抗生素的 YMS 平板, 28°C 培养, 再收集孢子, 将孢子梯度稀释涂布只含红霉素的 YMS 平板, 挑选孢子丰度合适的平板上的单菌落, 在含硫链丝菌素的 YMS 平板上检验, 硫链丝菌素抗性丢失的即为发生双交换的单抗菌株。这是由于 Bjbm0006/pHJ5821 在培养过程中, pHJ5821 所携带的插入 *erm* 片段的 2kb *bkdAB* 基因与染色体的同源区域发生同源双交换 (图 4), 把

破坏的 *bkdAB* 基因(被插入的 *erm* 破坏)置换到染色体上去,完整的 *bkdAB* 基因置换下来。通过无抗生素压力的放松培养,游离的 pHJ5821 极易丢失,通过红霉素的 YMS 平板,可以筛选出发生单交换和双交换的菌株,再通过硫链丝菌素的 YMS 平板,便可以筛选出红霉素的 YMS 平板上单抗红霉素的双交换菌株,得置换菌株 Bjbm5821。

2.3.2 PCR 验证基因置换 提取 Bjbm5821 总 DNA,利用方法中的 1.2.2 所描述的引物 F1 和 R2 对 Bjbm5821 总 DNA 做 PCR 验证。F1 位于 *bkdAB* 发表序列 3'端的 12bp 处,R2 位于 3'端的 2396bp 处,所以 F1 和 R2 之间片段为 2.4kb,而构建的置换质粒 pHJ5821 缺失了 *bkdA* 和 *bkdB* 部分片段共 400bp,插入 *erm* 为 1.7kb,发生置换的片段为 3.7kb(图 4)。用出发菌株 Bjbm0006 总 DNA 和 pHJ5821 为模板作对照,结果 Bjbm5821 的总 DNA 和 pHJ5821 为模板的 PCR 产物一样大小 3.7kb(图 5,泳道 5,6),比 Bjbm0006 的产物正好大出的 1.3kb(*erm* 1.7kb 减去 400bp 的缺失部分),Bjbm0006 为模板的产物大小也是预期的 2.4kb(图 5,泳道 4)。

2.3.3 重组菌发酵产物组分的 HPLC 和紫外吸收分析结果 对 Bjbm5821 和 Bjbm0006 进行摇瓶发酵实验,甲醇提取发酵液并进行 HPLC 分析。Bjbm0006 发酵产物含 B2b, B2a, B1b 和 B1a 4 个阿维菌素 B 组分(图 6),而重组菌 Bjbm5821 在相同的发酵条件下只产生 3 个组分(图 7),其中 2 个组分的 RT(保留时间)和阿维菌素的 B2a 和 B1a 组分完全一致,另外一个新组分和阿维菌素的 8 个组分都不一致,且其紫外扫描结果是吸收峰值为 225nm,与阿维菌素的 246nm 也完全不一致。Bjbm0006 阿维菌素的总产量为 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右,Bjbm5821 的总产量为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右。

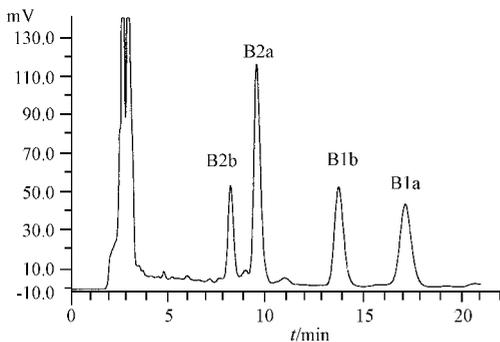


图 6 Bjbm0006 发酵产物的高效液相色谱图

Fig.6 HPLC of fermentation products from Bjbm0006

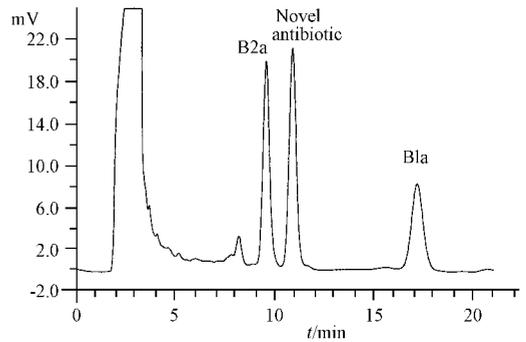


图 7 Bjbm5821 发酵产物的高效液相色谱图

Fig.7 HPLC of fermentation products from Bjbm5821

3 讨论

阿维菌素 B1a 组分的杀虫活性最强,所以阿维菌素组分改造的目的就是要消除 A 组分、2 组分和 b 组分。本研究的出发菌株 Bjbm0006 就是消除了 A 组分的菌株^[3],在 B 组分产生菌 Bjbm0006 的基础上除去其产生的 1b 和 2b 组分对于发酵生产是很有实际意义的。

中断支链 α -酮酸脱氢酶基因,使重组菌失去利用异亮氨酸和缬氨酸转化 C25 位基团的能力,只有外添 $(+)$ - α -甲基丁酸才能合成 a 组分,而不产生 b 组分,从而得到 Ba 组分(B1a, B2a)菌株。本研究通过基因置换得到的重组菌 Bjbm5821,用 PCR 验证了 *bkdAB* 基因簇已经中断,Bjbm5821 发酵产物检测中发现总产量只是出发菌株总产量的 25%,并且在没有添加 $(+)$ - α -甲基丁酸条件下,只产生 a 组分和一个新组分。这一结果表明支链 α -酮酸脱氢酶复合体中 *bkdAB* 的表达产物在阿维菌素合成代谢主要承担 α 酮基异戊酸脱氢酶的功能,*bkdAB* 的中断就可能致合成代谢中不能利用由缬氨酸转化的 α 酮基异戊酸来合成起始单元异丁酸,导致 b 组分合成代谢受阻。而另一基因簇 *bkdFGH* 的表达产物是支链 α -酮酸脱氢酶复合体的核心,它的失活将不产生任何产物^[2]。新组分的产生可能和 *erm* 有关,因为 *erm* 是一种双甲基化酶基因,可能承担了 C25 位基团的转化作用。

Bjbm5821 传代 10 次后,抗性标记和发酵产物都十分稳定。对重组菌 Bjbm5821 和 Bjbm0006 发酵工艺研究结果表明,重组菌 Bjbm5821 的代谢特性与出发菌株基本相同。Bjbm5821 发酵产物中新组分的质谱分析其分子量为 790.8,紫外扫描的吸收值为 225nm,结合 NMR 分析确定该组分为寡霉素 A。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Skinner D , Morgenstern M , Fedechko R *et al.* Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding branched-chain α -keto acid dehydrogenase from *Streptomyces avermitilis* and the production of a functional E1 [$\alpha\beta$] component in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* , 1995 , **177** :183 – 190
- [2] Denoya C , Fedechko R , Hafner E *et al.* A second branched-chain α -keto acid dehydrogenase gene cluster (*bkdFGH*) from *Streptomyces avermitilis* : its relationship to avermectin biosynthesis and the construction of a *bkdF* mutant suitable for the production of novel antiparasitic avermectins. *J Bacteriol* , 1995 , **177** :3504 – 3511
- [3] Zhu HJ (朱浩君) , Zheng YH (郑应华) . Study on C5-O-methyltransferase gene cloning , sequencing and replacement. *J Chin J Antibiotics* (中国抗生素杂志) 2003 **28** (1) :1 – 5
- [4] Tobias K , Bibb MJ , Mark JB *et al.* Practical Streptomyces Genetic. John Innes Foundation , 2000
- [5] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. Molecular Cloning : A laboratory Manual. 2nd ed. New York : Cold spring Harbor laboratory press , 1989
- [6] Hopwood DA , Bibb MJ , Chater KF *et al.* Genetic Manipulation of Streptomyces. the John Innes Foundation , 1985
- [7] MacNeil T , Gewain K , MacNeil D. Deletion analysis of the avermectin biosynthetic genes of *Streptomyces avermitilis* by gene cluster displacement. *J Bacteriol* , 1993 , **175** :2552 – 2563
- [8] Ikeda H , Omura S. Genetic aspects of the selective production of useful components in the avermectin producer *Streptomyces avermitilis*. *J Actinomycetol* , 1993 **7** :133 – 144

Effects of *bkdAB* Interruption on Avermectin Biosynthesis

ZHU Hao-Jun¹ LIANG Yun-Xiang^{1*} ZHOU Jun-Chu¹ ZHENG Ying-Hua²

(¹ Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China)

²(Beijing Institute of Biomedicine , Beijing 100091 , China)

Abstract In this study , *Streptomyces avermitilis* Bjbm0006 which produces four avermectin B components was used as an original test strain. A replacement plasmid containing a gene cluster *bkdAB* (branched-chain α -keto acid dehydrogenase gene) involved in the biosynthesis of avermectin B in *S. avermitilis* Bjbm0006 was constructed by means of PCR technique and then named as pHJ5821 (pHZ1358 :: *bkdAB&xerm*). A recombinant strain Bjbm5821 was obtained after the gene cluster was interrupted by double crossover. This strain was tested in laboratory conditions and analysed by PCR using the total DNA as template. The HPLC analysis showed that the strain Bjbm5821 synthesized the same ' a ' components B1a and B2a as the original strain did. However , It lost the ability for the production of ' b ' components for example B1b and B2b. A novel compound was detected in fermentation products. The results of present study suggests that the production of gene cluster *bkdAB* may play a main role similar to α -ketoisovaleric acid dehydrogenase in the pathway of avermectin synthesis.

Key words avermectin , branched-chain α -keto acid dehydrogenase gene , gene interruption

Received : 07-28-2003

* Corresponding author. E-mail : vainsky@vip.sina.com