

链霉菌基因克隆载体及基因文库的构建

唐 莉 王以光

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京)

利用麦迪霉素产生菌中分离的质粒pSMY1 (10.8kb), 将pIJ30的硫链丝菌素抗性基因(tsr)克隆到pSMY1上, 获得了具有硫链丝菌素抗性选择标记质粒pSJ10。通过DNA体外缺失, 片段插入, λ -COS片段的插入及与大肠杆菌质粒的重组等基因技术, 获得了一系列pSMY1衍生质粒, 包括双标记质粒pSM3, 大肠杆菌/链霉菌穿梭质粒pBMJ2和穿梭粘粒pNMJ1。通过对这些质粒的分析, 确定了质粒pSMY1的复制必需区为3.06kd的EcoRI-SphI片段。质粒pSJ10、pSM3、pNMJ1具有可选择标记, 多个单一确切的克隆位点, 有一定范围的宿主并能在链霉菌中稳定存在等特点, 故可作为链霉菌基因克隆的载体。其中pNMJ1 (11.15kb) 是大肠杆菌/链霉菌穿梭粘粒, 能有效地运载28—38kb的外源DNA片段, 并能在体外包装 λ -噬菌体外壳, 转导大肠杆菌。利用载体pNMJ1, 通过 λ -噬菌体蛋白体外包装, 在大肠杆菌中建立了螺旋霉素产生菌的基因文库, 其基因覆盖率达90%。重组DNA分子可通过转化转移到链霉菌中。

关键词 质粒; 粘粒; 基因载体; 链霉菌; 基因文库

链霉菌基因工程技术的兴起为抗生素菌种改造和新抗生素的开发提供了有力的手段。而合适的基因克隆载体是链霉菌基因工程技术最首要具备的条件。近几年来, 国外对质粒的研究进展较快, 已建立了一系列的链霉菌基因载体^[1]。但这些载体大多是从实用价值不大的菌中发展起来的(如变铅青链霉菌, 天蓝色链霉菌), 由于链霉菌属种间的限制障碍, 使这些载体在实际应用中特别是在抗生素基因工程应用中, 受到了限制。另外, 链霉菌的基因组较大(约 10^4 kb), 抗生素又为多基因产物, 据目前所知大多数抗生素生物合成基因是成簇存在的, 因此在抗生素基因工程研究中, 就需要能运载大片段DNA的载体。粘粒一般能克隆约45kb的外源DNA片段。大肠杆菌/链霉菌穿梭载体的建立, 不仅简化了DNA的操作, 并为异源基因的表达研究提供了可能。目前关于应用于链霉菌的粘粒载体的报道还较少, 但其在链霉菌中的应用价值是很明显的^[2]。

pSMY1是我们实验室从大环内酯类抗生素——麦迪霉素产生菌中分离出的质粒^[3]。过去的研究表明, 它具有较易提取纯化, 拷贝数中等等特点, 将其构建成质粒载体, 有可能在大环内酯类抗生素及其他抗生素产生菌的研究中得到应用。本文报道用pSMY1通过体外缺失、选择性标记片段、 λ -cos片段的插入以及与大肠杆菌质粒DNA的重组等技术, 获得了一系列pSMY1衍生质粒载体, 并利用pSMY1构建的穿梭粘粒载体建立了螺旋霉素产生菌的基因文库, 为大环内酯类抗生素基因工程研究打下了基础。

材 料 和 方 法

(一) 菌株和质粒

1. 大肠杆菌DH1, 大肠杆菌DH5

本文于1988年5月13日收到。

中国医科院基础研究所强伯勤同志热情提供 λ 噬菌体包装蛋白。C.R.Hutchinson及D.A.Hopwood教授提供菌株及标记基因。美国Abbott公司提供pNI1质粒。Squibb & Son公司提供硫链丝菌素, 特此致谢。

(LacZ⁻)由美国C.R.Hutchinson教授提供。

2. 变铅青链霉菌TK24(*Str. lividans* TK24, Str^f), 变铅青链霉菌1326; 天蓝色链霉菌TK17, TK18 (*S. coelicolor* TK17, TK18) 为放线紫红素生物合成阻断变株(Act1⁻, ActIII⁻); 兰卡杀菌素产生菌GSF (*S. griseofuscus*) 以上菌株均由D.A.Hopwood教授惠赠。

链黑菌素产生菌F114 (*Streptomyces* sp. 1A-CAS isolate NO. 114) 由本所提供; 生米卡链霉菌变株 No.68 (*S. mycarofaciens* var.No.68) 为麦迪霉素生物合成阻断变株, 由本实验室诱变筛选获得。

上述菌株皆为DNA受体菌。

3. 螺旋霉素产生菌U-1941 (*S. spiramyceticus* N.sp.Yan et Yu U-1941) 提供总体DNA作为外源DNA片段, 由本所提供。

4. 质粒 pSMY1 来自于生米卡链霉菌1748 (*S. mycarofaciens* 1748)^[21] 由本所提供; 大肠杆菌质粒 pIJ30 提供硫链丝菌素抗性基因 (tsr), 由D.A.Hopwood赠送 (未发表)。链霉菌质粒 pIJ702 提供 mel1 基因; 大肠杆菌质粒 pBR322 用于构建穿梭质粒。质粒 pNJ1 用于提供 λ-cos 片段, 构建粘粒, 由美国 Abbott 公司提供 (未发表)。

5. 培养基: 大肠杆菌培养主要用 L-培养基, 其组成 (%): 酵母膏 0.5, 精解蛋白胨 0.5, 葡萄糖 0.1, pH7.0。

链霉菌培养主要用 R2YE 改良培养基, 其组成 (%): 蔗糖 10.3, 硫酸钾 0.025, MgCl₂·6H₂O 1.012, 精解蛋白胨 0.2, 葡萄糖 1.0, 酪蛋白氨基酸 0.1, 蛋白胨 0.4, 酵母膏 0.4; 三羟甲基氨基甲烷(Tris) 缓冲液 pH7.2 (0.025mol/L) 10ml, KH₂PO₄ 0.005, CaCl₂·2H₂O 0.29, 微量元素溶液 (ZnCl₂ 0.004%, FeCl₃·6H₂O 0.02%,

CuCl₂·2H₂O 0.001%, MnCl₂·4H₂O 0.001%, NaB₄O₇·10H₂O 0.001%, (NH₄)₆MO₇O₂₄·4H₂O 0.001%) 0.2ml, 琼脂 1.5% pH7.2。

(二) 方法

1. 质粒DNA的分离纯化及DNA片段的分离: 大肠杆菌质粒DNA的提取采用 Promega Biotec 产品说明所载方法进行。链霉菌质粒DNA提取按 C.R.Hutchinson 实验室的方法 (未发表) 略加改进, 离心收集 50ml 培养液菌体, 用 7.5ml TSE 缓冲液 (0.3mol/L 蔗糖, 25mmol/L Tris, 25mmol/L EDTA pH8.0) 悬浮, 加入 2 mg/ml 溶菌酶, 37℃ 保温 45-60min, 再加入 4.5ml 0.3mol/L NaOH-2% SDS 溶液, 轻轻混匀直至溶液透明变粘, 60℃ 保温 15min, 冷却至室温, 加入 8ml 酚:氯仿 (1:1), 充分混匀后离心 (15000rpm, 0℃) 15min, 吸取上清, 加 1/10 体积的 NaAc (3 mol/L, 自然pH) 及等体积的异丙醇, 置室温 10min, 离心 (15000rpm) 15min, 去上清, 沉淀用 1 ml 30mmol/L Tris-HCl 50mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA 溶液溶解, 用酚:氯仿 (1:1) 及氯仿各抽提一次。加入 100μg/ml RNA 酶, 37℃ 保温 1 h。再用酚:氯仿 (1:1) 抽提一次。上清液用 1/10 体积 5 mol/L NaCl, 在 10% 聚乙二醇 6000 沉淀, 置 4℃ 冰箱过夜, 离心 (9000rpm) 10min, 弃上清, 真空干燥器中减压抽干。沉淀物溶于 100μl TE 溶液中, 低温保存。

大量DNA样品采用 CsCl 密度梯度离心法提取纯化^[4]。

DNA片段的分离采用 Schleicher & Schuell 产品说明的方法, 完全酶切 DNA 后, 用 1% 琼脂糖凝胶水平平板电泳, 利用 S&S NA-45DEAE 膜回收所需 DNA 片段。

2. 酶反应及电泳: 限制性内切酶 BamHI, EcoRI, Pst I, XhoI, BclI 为美国 BRL 公司产品, Pvu II, Cla I, Sph I, Sst I 为华美公司产品, Hind III 为 Biolabs 产品。酶切反应条件依产品说明。酶切反应 4—16h, 用酚:氯仿 (1:1) 抽提, 两倍体积无水乙醇沉淀。

T4 DNA 连接酶为 Biolabs 产品, 连接反应在室温下进行, 反应 4—16h。

碱性磷酸酶 (CIP) 为华美产品, 酶反应条件按 BM Biochemica 产品说明所述。

电泳采用 0.6—1.0% 琼脂糖凝胶水平平板电泳。电泳缓冲液为 10mmol/L Tris, 20mmol/L NaAc, 2 mmol/L EDTA-Na, pH 8.0, 电压梯度 4V/cm, 电泳毕用 0.5μg/ml 溴化乙锭溶液染色, 250nm 紫外光下观察结果并照相。以 λ/Hind III DNA 片段作为电泳分子量标准。

3. 总 DNA 的制备: 链霉菌总 DNA 的提取, 主要采用 K.F. Chater (1982) 的方法^[5]。

4. DNA 转化: 大肠杆菌 DNA 的转化采用 T. Maniatis 的方法^[4]。以 50μg/ml 氨基青霉素筛选氨基青霉素抗性 (Amp^r) 转化子。

链霉菌原生质体制备和转化基本按照 D.A. Hopwood 的方法^[6]进行。以 25—50μg/ml 硫链丝菌素筛选抗性转化子。

5. λ-噬菌体蛋白体外包装及转导: 体外包装按 A.G. Dillela 的方法^[7]加以改进: 取出包装蛋白 (FTL、SE) 放在冰上, 将连接 DNA (≤1μg) 加入 FTL 液中 (10μl), 再一起迅速加入仍处于冰冻状态的 SE 液 (15μl), 轻轻混匀, 融化, 在台式离心机上离心 3 秒, 置 25℃ 水浴反应 2.5h。用 0.5ml SM 缓冲液 (10mmol/L Tris, 10mmol/L MgSO₄, 0.01% 明胶) 终止反应, 再加入数滴氯仿, 4℃ 保存。

包装颗粒转导用 L-培养基 (加 0.4% 麦芽糖) 培养的对数生长后期的 DH1 菌体, 将菌体悬浮在冰上预冷的 15ml MgCl₂ (10mmol/L) 溶液中, 取 0.2ml 菌液, 进行 DNA 吸收 (37℃, 1h), 然后加 L-培养基, 37℃ 静置 1h, 使其表达。以 50μg/ml 氨基青霉素筛选 Amp^r 转导子。

6. 质粒在链霉菌中的稳定性: 稳定性实验参照 S. Nabeshima 的方法^[8]。

实验结果

(一) 带硫链丝菌素抗性 (Thio^r) 标记质粒载体 pSJ10, pSJ2 的构建

为了使质粒 pSMY1 带有可选择标记, 利用 pIJ30 的 tsr 基因, 将 pSMY1 的 BamHI 部分酶切片段与 pIJ30 的 BamHI 酶切片段混合, 使其随机连接, 用此连接 DNA 转化变铅青链霉菌 TK24 原生质体, 获得了 40 个硫链丝菌素抗性转化子 (抗性水平为 > 50μg/L), 从中分离得到质粒 DNA pSJ10, pSJ2。酶切分析表明: pSJ10 (12.7kb) 包含了全部的 pSMY1 分子及 pIJ30 的 tsr 基因片段 (1.9kb)。pSJ2 (8.05kb) 是由 pSMY1 的两个 BamHI 片段与 pIJ30 的 tsr 基因片段重组而成 (图 1, 表 1)。

(二) Thio^r 及产黑色素双标记质粒载体和穿梭质粒载体的构建

将 pSJ10 用 BamHI 酶切后的片段与 pIJ702 用 BclI 酶切后分离的 mel 基因片段 (1.56kb), 在 T4 连接酶作用下连接, 转化变铅青链霉菌 1326 原生质体, 获得 Thio^r 及产黑色素双标记转化子。分离得到质粒 pSM3。酶切分析表明, pSM3 (8.8kb) 是由 pSMY1 的一个 BamHI 大片段与 tsr, mel 基因片段重组而成 (图 2, 表 1)。

转化实验结果表明, 质粒 pSM3 除可以转化变铅青链霉菌 1326 以外, 还可以

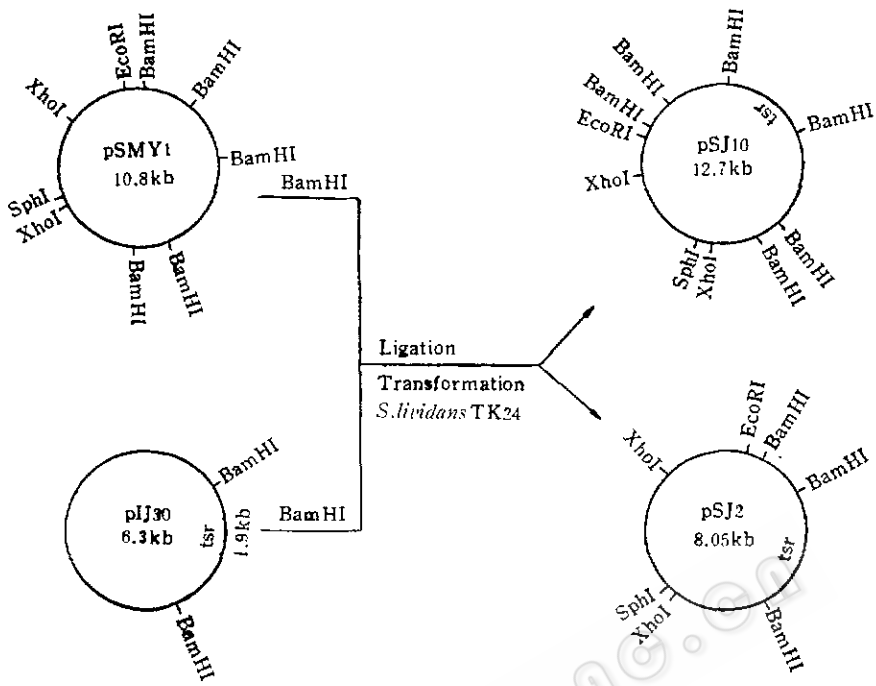


图 1 质粒pSMY1带tsr基因的构建

Fig.1 Scheme for construction of plasmids carrying tsr gene from pSMY1

表 1. pSMY1衍生质粒经不同限制性内切酶酶切所得片段数及分子量

Table 1 Number and molecular weight of derivatives of the pSMY1 plasmids DNA fragments after restriction endonuclease digestion

质 粒 Plasmid	限制性内切酶 Restriction endonuclease	片段数 Number of fragments	分子量 Molecular weight(kb)
pSJ10	BamHI	6	5.4, 2.6, 1.9, 1.16, 0.9, 0.7
	Cla I -Sph I	4	4.5, 3.95, 2.2, 2.05
	PvuII-Sst I	4	5.2, 4.6, 2.2, 0.7
	PstI-Bcl I	3	7.2, 4.4, 1.1
pSJ2	Xho I -EcoRI	3	9.5, 2.0, 1.2
	Xho I -BamHI	5	2.0, 1.9, 1.8, 1.6, 0.7
	EcoRI-XhoI	3	4.8, 2.0, 1.2
pSM3	BamHI-PstI	4	4.6, 1.9, 0.8, 0.7
	BamHI-BglII	2	6.5, 2.3
	Sst I	2	7.0, 1.8
	EcoRI-BamHI	2	8.5, 0.3
pBMJ2	Xho I -BglII	3	3.6, 3.2, 2.0
	PvuII-BglII	3	4.4, 3.6, 0.8
	Xho I -PstI	2	6.8, 3.1
	PvuII	3	5.9, 3.2, 0.8
pNMJ1	EcoR I	2	6.3, 3.6
	Xho I -HindIII	3	6.2, 2.9, 2.04
	PvuII-EcoR I	2	5.9, 5.3
	Cla I -EcoR I	3	5.7, 4.5, 1.0
	Sst I -EcoR I	2	4.55, 6.6
	Sph I -HindIII	3	6.0, 3.1, 2.04
Pst I	3	4.85, 4.5, 1.85	

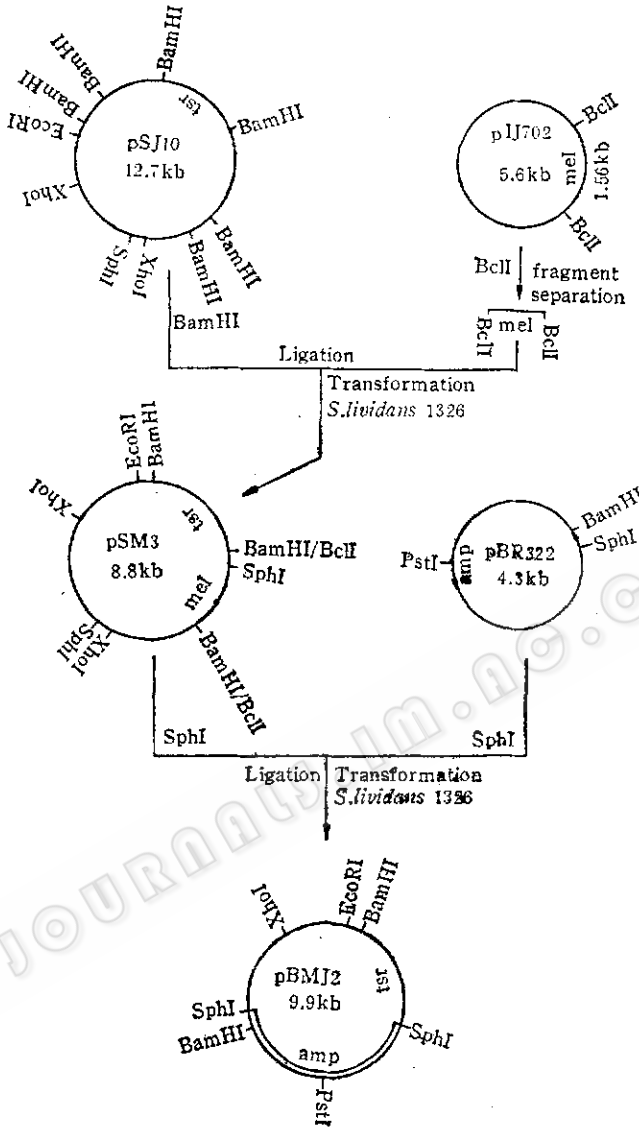


图2 质粒pSM3, pBMJ2的构建

Fig.2 Scheme for construction of pSM3, pBMJ2 plasmids

转化变铅青链霉菌TK24及链霉菌F114; 稳定性实验(结果未列出)和多次传代实验证明质粒pSM3在链霉菌中稳定存在。其单一酶切位点(BamHI, EcoRI, PstI), 可以插入外源DNA片段, 因而BamHI、EcoRI、PstI可作为pSM3质粒载体的可克隆位点。

大肠杆菌/链霉菌穿梭质粒pBMJ2的构建, 是将SphI分别酶切pSM3和pBR322

后的片段随机连接, 转化变铅青链霉菌1326原生质体, 筛选Thio^r转化子, 分离获得质粒pBMJ2(9.9kb)。pBMJ2转化大肠杆菌获得Amp^r表达。pBMJ2含有大肠杆菌及链霉菌的复制区, 并分别在大肠杆菌及链霉菌中有可选择标记(大肠杆菌中以Amp^r, 链霉菌中以Thio^r为标记)。同时pBMJ2转化变铅青链霉菌TK24及1326获得成功(转化频率分别为 4.5×10^4 和

7×10^4 个转化子/ μg DNA), 因而有可能作为基因工程中的大肠杆菌/链霉菌穿梭质粒载体(图2、表2)。

(三) 穿梭粘粒 pNMJ1 的构建

用 S&S NA-45DEAE 膜分离 EcoRI-BamHI 双酶切 pSMY1 的 5.1kb 片段及 pNJ1 EcoRI-Bgl II 双酶切的 6.05kb 的片段(携带 λ -cos 区及 Amp, tsr 和大肠杆菌复制子基因), 将两个 DNA 片段连接后转化大肠杆菌 DH5, 获得重组质粒 pNMJ1,

其分子量为 11.15kb, 酶切图谱见图 3。

pNMJ1 具有大肠杆菌和链霉菌的复制子, 因而它能在大肠杆菌和链霉菌中复制表达。在大肠杆菌中以 Amp^r 为选择性标记, 在链霉菌中以 Thio^r 为选择性标记。它具有多个可克隆位点(表 2), 另外它携带了 λ -cos 区, 能利用 λ -噬菌体蛋白进行体外包装, 且其分子量较小, 能运载大片段 DNA, 因此可作为有效的穿梭粘粒载体。

表 2 载体的特性

Table 1 Characteristics of vectors

载体 Vector	分子量 Molecular weight(kb)	可克隆位点 Cloning sites	选择性标记 Selective markers
pSJ10	12.7	Pst I, EcoR I, Sst I, Sph I	tsr
pSM3	8.8	BamH I, EcoR I, Pst I, Bgl II	tsr, mel(Bgl II Insertional inactivation)
pNMJ1	11.15	EcoR I, Sst I, Hind II	tsr(in <i>Streptomyces</i>) amp (in <i>E.coli</i>)

表 3 载体 pNMJ1 对链霉菌的转化及稳定性

Table 3. Transformation and stability of plasmid pNMJ1 in *Streptomyces*

菌株 Strain	转化频率 (转化子/ μg DNA) Transformation frequency (Transformants/ μg DNA)	稳定性 Stability(%)
变青链霉菌 TK24 <i>S. lividans</i>	2×10^4	90
变青链霉菌 1326 <i>S. lividans</i>	4×10^5	100
天蓝色链霉菌 TK18 <i>S. coelicolor</i>	1.7×10^3	100
天蓝色链霉菌 TK17 <i>S. coelicolor</i>	3×10^3	100
链霉菌 GSF <i>S. griseofuscus</i>	1.2×10^3	100
链霉菌 F114	1.4×10^3	50
链霉菌 No.68	2×10^3	未测

(四) 粘粒 pNMJ1 在链霉菌中的宿主范围及稳定性

为了进一步探索 pNMJ1 的宿主范围及稳定性, 从大肠杆菌 DH5 中分离 pNMJ1 DNA, 分别转化变铅青链霉菌 TK24, 1326; 天蓝色链霉菌 TK17、TK18; 链霉菌 GSF, F114; 生米卡链霉菌变株 No.68 的原生质体。获得了硫链丝菌素抗性转化子, 转化频率见表 3。并从转化子中分离

获得了质粒 pNMJ1 DNA。通过对这些转化子的稳定性试验表明, pNMJ1 能转化所有试验的链霉菌原生质体, 故有一定宿主范围, 并能在链霉菌中稳定存在。

(五) 质粒 pSMY1 复制必需区的确定

通过对所获得的 pSMY1 衍生质粒的分析, 发现所有这些能在链霉菌中自主复制的质粒都包含有 pSMY1 的 EcoR I-Sph I 3.06kb 的区域(见图 4)。由此可

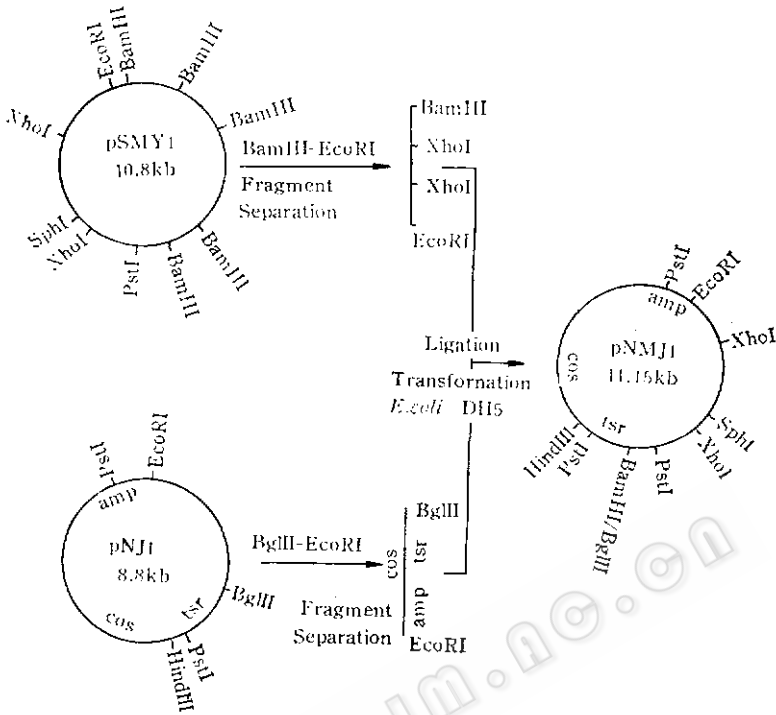


图 3 穿梭粘粒 pNMJ1 的构建

Fig.3 Scheme for construction of shuttle cosmid cosmid uector pNMJ1;

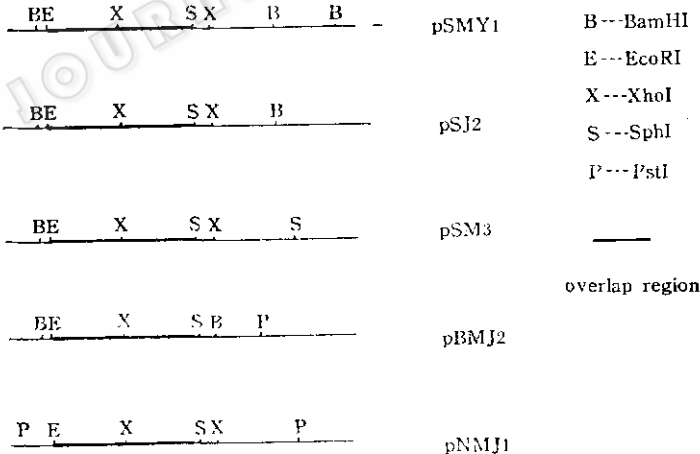


图 4 pSMY1 复制必需区的确定

Fig.4 Essential region of pSMY1

知质粒 pSMY1 的复制必需区在 EcoR I - Sph I 的 3.06kb 的区域内。

(六) 螺旋霉素产生菌基因文库的建立

基因文库的建立是以穿梭粘粒 pNMJ1

为载体，经 EcoR I 完全酶切后用碱性磷酸酶处理，以免载体自身环化。插入 DNA 片段是以螺旋霉素产生菌 U-1941 的总 DNA，在适当条件下经 EcoR I 部分酶切，酶解片段大小以 20--40kb 为主，将线性载

体与酶切DNA片段(3:2)连接。连接DNA利用λ-噬菌体蛋白进行体外包装成噬菌体颗粒，转导大肠杆菌DH1，获得了740个

Amp^r 转化子 (重组 DNA 包装转导率为 $2.2 \times 10^3 / \mu\text{g}$ 插入DNA)。所采用的技术路线见图 5。

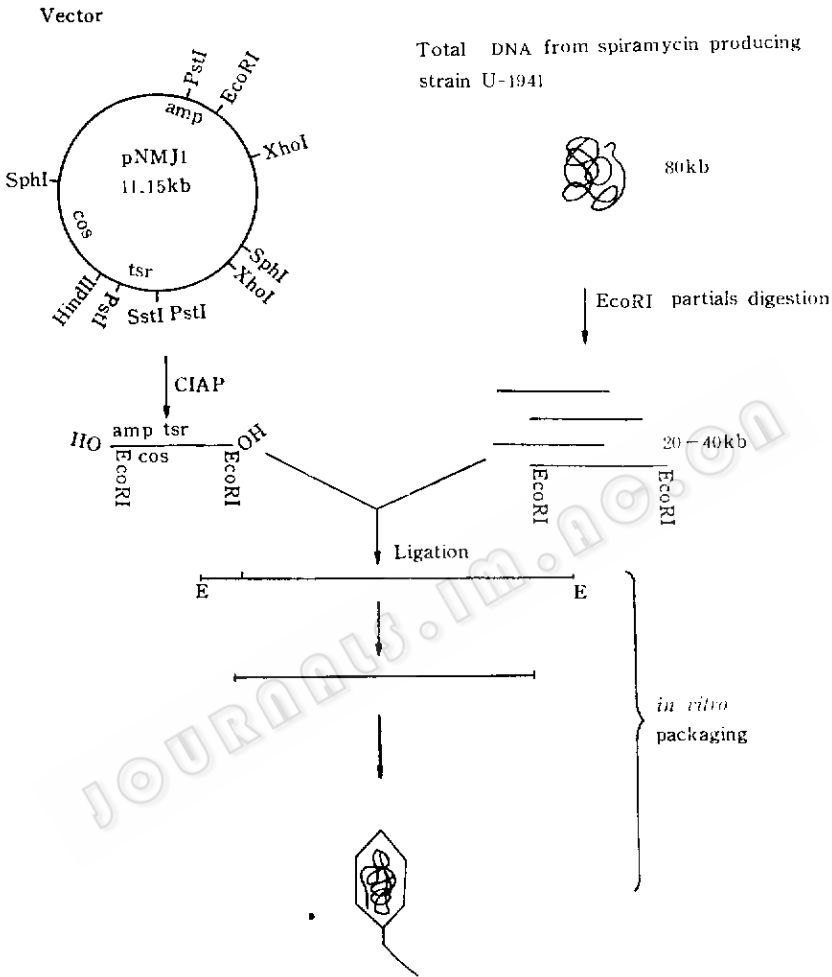


图 5. 螺旋霉素产生菌 (*Str.*1941) 基因文库的构建
 Fig. 5 Construction of genomic library from Spiramycin producing strain

随机挑取 8 个抗性转化子，利用煮沸法提取质粒，并用EcoRI酶切，根据电泳图上DNA片段大小(图版 I)，可估算出粘粒 pNMJ1 携带的外源DNA大小约为 23 — 38kb。

将携带外源 DNA 的重组质粒，转化变铅青链霉菌TK24,天蓝色链霉菌TK17, TK18和链霉菌No.68的原生质体，获得了硫链丝菌素抗性转化子，转化频率在 1×10^2 — 1×10^3 之间。

参 考 文 献

- [1] Hopwood, D.A. et al.: *Methods Enzymol.*, Vol. 153, p. 116, 1987.
 [2] Stanzak, R. et al.: *Biotechnology*, 4: 229—232, 1986.
 [3] 龚利民, 王以光: *生物工程学报*, 2(2): 24—30, 1986.
 [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning—A Lab Manual*, p. 93—94, p. 250—251, 1982.
 [5] Chater, K.F. et al.: *Gene cloning in Streptomyces* *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, Vol. 96, pp. 69—75, 1982.
 [6] Hopwood, D.A. et al.: *Genetic Manipulation of Streptomyces*, P. 178—180, 1985.
 [7] Dillela, A.G.O Woo, S.LC.: *FOCUS*, 7(2): 1—5, 1985.
 [8] Nabeshima, S. et al.: *J. Antibiotics*, 37(9): 1026—1037, 1984.

CONSTRUCTION OF GENE CLONING VECTOR AND GENOMIC LIBRARY FOR *STREPTOMYCES*

Tang Li Wang Yiguang

(*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

The BamHI-fragment, containing the thiostrepton-resistance gene obtained from pIJ30, was inserted into the plasmid pSMY1 (10.8kb) from *Streptomyces mycarofaciens* 1748 to obtain a plasmid pSJ10. A series of derivative plasmids from pSJ10 consisting both *tsr* gene and *mel* gene pSM3, shuttle plasmid pBMJ2 have been constructed. pBMJ2 was shown to replicate and express their resistance markers in both *E. coli* and *Streptomyces*. A *E. coli*/*Streptomyces* bifunctional cosmid vector pNMJ1 (11.15kb) which can accommodate up to 28—38kb of foreign DNA, has been constructed. By analysis of these plasmids, the essential regions of pSMY1 was determined to be in 3.06kb EcoRI-Sph I fragment. pNMJ1 showed a wide host range and was stably maintained in several *Streptomyces* species.

A genomic DNA library from spiramycin producing strain *S. spiramyceticus* N.sp. Yan et Yu U-1941 has been established in *E. coli* using pNMJ1 *in vitro* packaging. This recombinant DNA can be transferred into *Streptomyces*.

Key words

Plasmid, cosmid, *streptomyces*, genomic library, antibiotics

图 版 说 明

Explanation of plate

- A. pNMJ1-1941 重组DNA分子电泳图
 Electrophoresis of recombinant DNA pNMJ1-1941
 B. A中1号重组DNA分子EcoRI酶切电泳图
 B. Electrophoresis of recombinant DNA 1* in Fig. A digested with EcoRI
 1. λ /HindIII 2. pNMJ1/EcoRI 3. R-1*/EcoRI