

螺旋霉素聚酮合成酶基因和抗性基因的克隆与表达的研究

唐莉 王以光 朱学蔚*

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京)

根据不同聚酮合成酶基因DNA的同源性, 利用放线紫红素聚酮合成酶基因 act I, act II 作探针, 从螺旋霉素产生菌 *Str. spiramyceticus* U-1941 基因文库中检测并分离了螺旋霉素聚酮合成酶基因 pCN3H8。限制酶酶切分析表明, 其分子量为 44kb。通过分子杂交实验, 将螺旋霉素聚酮缩合酶基因 (与 act I 有同源性) 及聚酮氧化还原酶基因 (与 act II 有同源性) 进行了定位。pCN3H8 DNA 在麦迪霉素产生菌变株 *Str. mycarofaciens* subsp. 68 中的表达产物, 经紫外光谱分析与麦迪霉素相似。pCN3H8 在放线紫红素聚酮缩合酶基因缺陷型变株 *Str. coelicolor* TK17 中的表达产物, 不具有放线紫红素的色素, 其纸层析谱型与螺旋霉素有显著差别。pCN3H8 在变青链霉菌 *Str. lividans* TK24 中的表达产物, 也具有抗菌活性。

将 pCN3H8 DNA 转化对螺旋霉素敏感的 *Str. griseofuscus* 原生质体, 获得了螺旋霉素抗性的表达。从转化子中分离得到了质粒 DNA pSG3, 其分子量为 7.0kb, 可能是 pCN3H8 DNA 转化 *Str. griseofuscus* 时在体内缺失而形成。再转化实验证明, 宿主菌对螺旋霉素的抗性, 确实是由于 pSG3 DNA 作用的结果。含质粒 pCG4, pSG3 的螺旋霉素产生菌 *Str. ambofaciens* 转化子螺旋霉素的产率明显提高。

关键词 螺旋霉素; 聚酮合成酶基因; 抗性基因

八十年代以来, 随着基因克隆技术在链霉菌中的迅速发展, 人们企图通过基因克隆技术选育高产菌株, 获得新抗生素产生菌。目前利用抗生素抗性基因提高抗生素产率已有了可能^[1]。螺旋霉素是具有重要临床价值的抗生素。螺旋霉素产生菌 (*Str. ambofaciens*) 的三个抗性基因 (srmA srmB srmC) 已被克隆^[2], 并发现含 srmB 基因片段 DNA 与螺旋霉素碳霉氨基糖或碳霉氨基糖苷生物合成酶有关^[3]。我们拟从我国螺旋霉素产生菌 *Str. spiramyceticus* U-1941 中克隆螺旋霉素生物合成基因, 并按照抗生素生物合成基因往往与抗性基因连锁的特点, 获得螺旋霉素抗性基因。探讨利用螺旋霉素生物合成关键酶——聚酮合成酶基因及抗性基因, 提高螺旋霉素发酵产率并获得杂合新抗生素

的可能性。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌株: 螺旋霉素产生菌 *Str. spiramyceticus* U-1941 由本所提供, *Str. ambofaciens* 由美国 C. R. Hutchinson 教授提供; 放线紫红素产生菌生物合成阻断变株 *Str. coelicolor* TK17、变青链霉菌 *Str. lividans* TK24 由英国 D. A. Hopwood 教授提供; 麦迪霉素生物合成阻断变株 *Str. mycarofaciens* No. 68 由本实验室

本文于1989年11月8日收到。

本所徐小敏同志协助螺旋霉素发酵效价测定。美国 C. R. Hutchinson 及英国 D. A. Hopwood 教授提供菌种及基因, 在此一并致谢。

* 现在浙江医科大学工作。

诱变筛选获得(待发表); 蓝杀卡菌素产生菌 *Str. griseofuscus*, 由 C. R. Hutchinson 教授提供。

2. 质粒: pWHM3^[4] 由 C. R. Hutchinson 教授提供; 放线紫红素聚酮合成酶基因 act I, act III 由 D. A. Hopwood 教授提供。

(二) 方法

1. 链霉菌一般培养: 用 R2YE 改良培养基^[5] 及斜面孢子培养基^[6]。原生质体制备和 DNA 转化基本按照 D. A. Hopwood^[7]

2. 菌落杂交及 Southern 分子杂交: 对螺旋霉素产生菌基因文库中的大肠杆菌菌落杂交, 采用王以光报道的方法^[8] 进行。Southern 分子杂交基本按照 D. A. Hopwood 的方法^[7] 进行。利用 BRL 公司的缺口翻译试剂盒。

3. DNA 操作及酶反应: 均按唐莉等^[5] 报道进行。

4. 含 pCN 3H8, pCG4 DNA 的 *Str. coelicolor* TK17 *Str. lividans* TK24 及 *Str. mycarofaciens* No. 68 转化子发酵, 提取和产物分析

种子培养基组成(%): 葡萄糖 3.0, 黄豆饼粉 2.0, 淀粉 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.05, CaCO_3 0.3。发酵培养基组成(%): 黄豆饼粉 1.0, 葡萄糖 1.0, NaCl 0.1, CaCO_3 0.1。

液体发酵培养 48h 后, 发酵液 pH 调至 3.0 用正丁醇提取, 或调至 pH 8.0, 用乙酸乙酯提取。提取物作纸层分析。溶剂系统采用: (1) 水饱和的正丁醇 (2) 水饱和的正丁醇 + 2% 对甲苯磺酸 (3) 丁醇: 醋酸: 水 (2:1:1) (4) 水饱和正丁醇 + 2% 六氢吡啶 (5) 0.5 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液 (6) 正丁醇饱和水 + 2% 对甲苯磺酸 (7) 苯: 甲醇 (4:1), 滤纸用 0.5 mol/L

pH 7.0 磷酸缓冲液处理 (8) 75% 甲醇, 25% 水 (内含 3% NaCl), 滤纸用 5% 硫酸钠处理。硅胶薄层层析溶剂系统为苯: 甲醇 (9:1)。

5. 含 pCG4, pSG3 DNA *Str. ambofaciens* 转化子发酵, 提取及螺旋霉素发酵效价及检测螺旋霉素的方法

种子培养基组成 (%): 葡萄糖 1.0, 淀粉 3.0, 黄豆饼粉 2.0, NaCl 0.4, CaCO_3 0.5。发酵培养基组成 (%): 葡萄糖 2.0, 淀粉 4.0, 鱼粉 2.0, 玉米浆 1.0, NH_4NO_3 0.6, CaCO_3 0.5, KH_2PO_4 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, NaCl 1.0。

发酵培养 96—120h 后测定发酵液中螺旋霉素效价。以八叠球菌为检定菌, 用标准曲线法计算效价。发酵液 pH 调至 8.0 用乙酸乙酯提取, 再转入 pH 2.0 水中, 再在 pH 8.0 的条件下转入乙酸乙酯中。提取物进行硅胶板薄层层析, 溶媒系统为苯: 丙酮 (2:1), 用碘熏或生物显迹, 检测螺旋霉素。用标准螺旋霉素作对照。

6. 螺旋霉素抗性的测定

(1) 蓝杀卡菌素产生菌转化子螺旋霉素抗性的测定: 用 DNA 转化原生质体, 在 R2YE 培养基上 30°C 培养 1 天后, 用硫链丝菌素 (Thio) 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和螺旋霉素 (Sp) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 直接覆盖, 3 天后挑取抗 Thio 及 Sp 的转化子, 或先用 Thio 覆盖, 挑选抗 Thio 的转化子, 再在含不同浓度螺旋霉素的 R2YE 或合成培养基^[6] 上, 检测对螺旋霉素的抗性。

(2) 螺旋霉素产生菌转化子对螺旋霉素抗性水平的测定: 在含不同浓度螺旋霉素的 R2YE 或合成培养基上直接进行。

结果和讨论

(一) 螺旋霉素生物合成基因的分离

与初步表达

我们曾利用穿梭粘粒载体 pNJ1 在大肠杆菌中建立了螺旋霉素产生菌 *Str. spiramyceticus* U-1941 的基因文库^[6]。鉴于不同的聚酮合成酶基因的 DNA 序列有同源性^[6]，拟利用已克隆的放线紫红素聚酮合成酶基因 act I (聚酮缩合酶基因)，act III (聚酮氧化还原酶基因) 从螺旋霉素产生菌基因文库中，分离螺旋霉素生物合

成基因。首先以 act I, act III 基因为探针与螺旋霉素产生菌 U-1941 总 DNA 进行分子杂交，结果表明在 U-1941 总 DNA 中有与 act I, act III 基因同源的 DNA 序列、(分子杂交图从略)。继而以 act I 片段为探针，与螺旋霉素产生菌基因文库中含重组 DNA 的大肠杆菌菌落进行杂交，得到与 act I 同源的阳性菌落 pCN3H8 (图1)。对 pCN3H8 DNA 进行了初步的限制酶切分析，确



图1 用 act I 基因为探针与螺旋霉素产生菌基因文库进行菌落杂交
Fig.1 Colony hybridization of genomic library from *Str. spiramyceticus*, U-1941 with act I gene as a probe

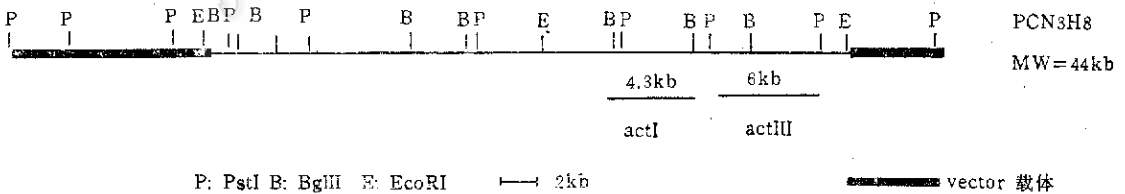


图2 pCN3H8 DNA 限制酶切图谱及与 act I, act III 基因同源区的定位

Fig.2 The restriction map of pCN3H8 DNA and its homology with act I, act III genes

定分子量为 44kb。酶切图谱 见图 2。用 act I, act III 基因作探针与 pCN3H8 DNA 的 Bgl II, Pst I 酶切片段进行 Southern 分子杂交的结果见图版 I -1—3。据此我们可以将螺旋霉素聚酮缩合酶基因定位在 pCN3H8 的 Bgl II - Bgl II 4.3kb 片段上，将聚酮氧化还原酶基因定位在 pCN3H8 的 Pst I -Pst I 6kb 片段上(见图 2)。

将 pCN3H8 DNA 分别转化到麦迪霉
素生物合成阻断变株 *Str. mycarofaciens* No.68、放线紫红素聚酮缩合酶基因缺陷型变株天蓝色链霉菌 *Str. coelicolor* TK17 及不产抗生素的变青链霉菌 *Str. lividans* TK24 中，转化子在一定发酵培养条件下均产生抗菌活性物质。含 pCN3H8 DNA 的 *Str. mycarofaciens* No.68 转化子的发酵产物与原株产生的麦迪霉素性质相似，在 pH8.0 条件下可被乙酸乙酯

萃取，并可转入pH2.0的水中，产物经纯化后紫外吸收光谱与麦迪霉素A₄相似(图3)。含 pCN3H8 DNA 的天蓝色链霉菌 TK17 转化子的发酵产物，不具有原株产

生的放线紫红素所特有的色素^[10]。八个溶媒系统的纸层析图谱也与螺旋霉素极不相似(图4-A,C)。含pCN3H8 DNA的变青链霉菌TK24 转化子发酵产物的八个溶媒系统纸层析图谱见图4-B。

根据pCN3H8 DNA 在以上这些菌株中初步表达的结果，可以认为 pCN3H8 DNA 至少包含有螺旋霉素聚酮合成酶基因在内的部分生物合成基因。*Str. mycarofaciens* No.68 变株为麦迪霉素聚酮合成酶基因缺陷变株(待发表)。螺旋霉素与麦迪霉素两者化学结构十分相似，合成聚酮体部分的前体物类同。含螺旋霉素聚酮合成酶基因的pCN3H8 DNA在 No.68 变株中，能互补变株的基因缺陷，而产生与麦迪霉素相似的物质。*Str. coelicolor*

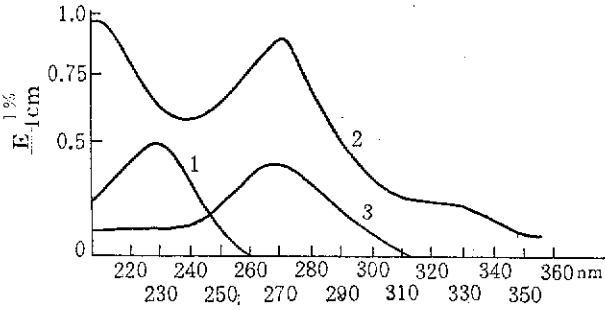


图3 pCN3H8-No.68 转化子发酵产物紫外吸收光谱
Fig.3 UV absorption curve of fermentation product from pCN3H8 DNA in *Str. mycarofaciens* No.68

- 1. Midecamycin A₁, 2. Fermentation product of pCN3H8 No.68, 3. Midecamycin A₄

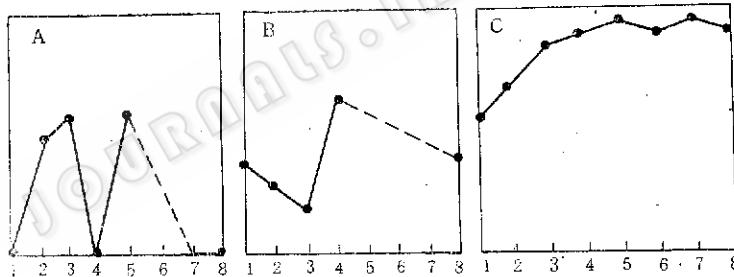


图4 pCN3H8 DNA转化子发酵产物八个溶媒系统纸层析谱型*
Fig.4 Paper chromatography of fermentation products from pCN3H8 DNA transformants in *Str. coelicolor* Tr17 and *Str. lividans* TK24
A. pCN3H8DNA-TK17, B. pCN3H8 DNA-TK24, C.螺旋霉素Spiramycin

* 根据1—8八个溶媒系统中的迁移位点画连线
Line is joined line of moved point in 8 solvents

TK17 为放线紫红素聚酮合成酶基因缺陷变株。放线紫红素与螺旋霉素均属聚酮类抗生素。生物合成途径中有共同的中间体——聚酮体，但两者结构相差很大，因而推测pCN3H8 DNA在 TK17 变株中的表达产物，可能以变株的代谢物作为底物，其合成产物既与放线紫红素不同，又与螺旋霉素有别。变青链霉菌为链霉菌基因克隆研究中广为采用的受体菌。它本身不产

生抗菌活性物质。含pCN3H8 DNA 的变青链霉菌TK24 转化子产生与螺旋霉素不同的抗菌物质，说明pCN3H8可能不包括完整的螺旋霉素生物合成基因，也可能是pCN3H8 DNA 与宿主菌基因的协同产生一种新的抗菌物质。这些问题的解释将有待于对产物化学性质的进一步分析。

(二)螺旋霉素聚酮缩合酶基因的亚克隆

由于pCN3H8 DNA分子量太大，且在链霉菌宿主中不很稳定，因此我们对螺旋霉素聚酮缩合酶基因进行亚克隆。将pCN3H8 DNA用BglII完全酶切后，利用SS NA-45 DEAE膜分离与actI同源的4.3kb片段，与穿梭质粒载体pWHM3-

BAMHI相连，转化大肠杆菌DH-5，在含Amp, X-gal, IPTG的LB培养基平板上挑选有外源DNA插入重组质粒的白色菌落，经质粒提取及酶切分析，确证为重组质粒pCG4，分子量为11.5kb。亚克隆技术路线见图5。

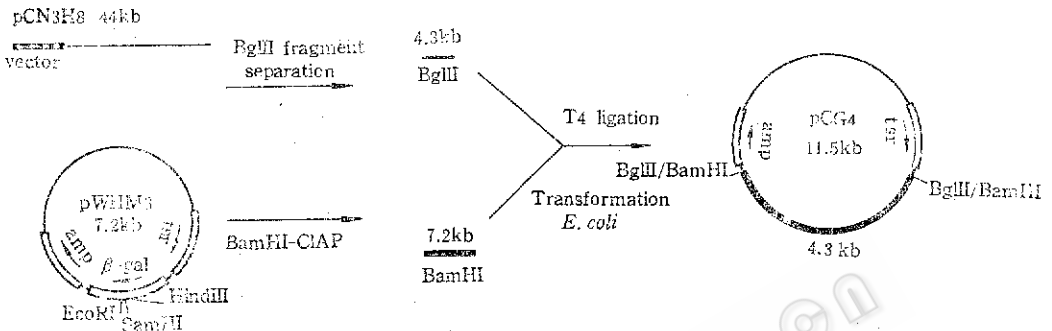


图5 螺旋霉素聚酮缩合酶基因亚克隆
Fig.5 Scheme for subcloning of spiramycin polyketide condensing gene

将pCG4 DNA转化放线紫红素聚酮缩合酶基因缺陷变株天蓝色链霉菌 *Str. coelicolor* TK17，转化子经发酵培养产生抗菌活性物质，在pH3.0条件下用正丁醇萃取，并进行纸层析，结果见图6。该谱型与pCN3H8 DNA-TK17转化子发酵产物谱型有些类同，与螺旋霉素差别很大，也不具有放线紫红素所特有的色素反应。据此我们认为从pCN3H8 DNA中亚克隆了螺旋霉素聚酮缩合酶基因 pCG4。该基因能互补TK17变株的基因缺陷，产生与原株不同的新抗生素。质粒pCG4 DNA可以从转化子中回收，基因表达比较稳定。

(三) 螺旋霉素抗性基因的克隆

抗生素生物合成基因往往与抗性基因连锁。为了研究pCN3H8 DNA中包含有螺旋霉素抗性基因的可能性，我们将pCN3H8 DNA转化蓝杀卡菌素产生菌(对螺旋霉素抗性小于10μg/ml)的原生质体中。转化子用Thio 25μg/ml和 Sp 10

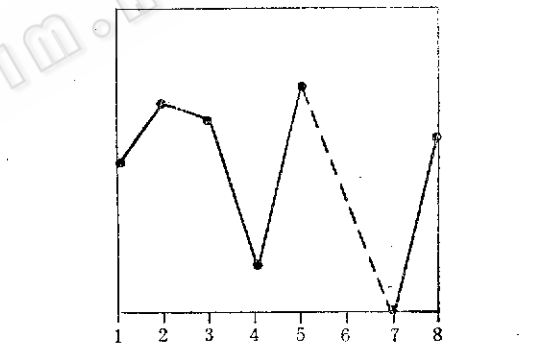


图6 pCG4-TK17转化子发酵产物八个溶剂系统纸层析谱型
Fig.6 Paper chromatography of fermentation product from pCG4 transformant in *Str. coelicolor* TK17

μg/ml筛选，获得两株双抗性转化子，经复试对螺旋霉素抗性高于100μg/ml。从抗性转化子中分离获得质粒 pSG3，分子量约为7.0kb。酶切分析表明pSG3 DNA的3kb部分来源于载体pNMJ1，4kb来源于pCN3H8外源DNA部分(图7)，pSG3 DNA可能是 pCN 3H8 DNA转化 *Str. griseofuscus* 时发生体内缺失所致。为了证明 *Str. griseofuscus* 转化子对螺旋霉素

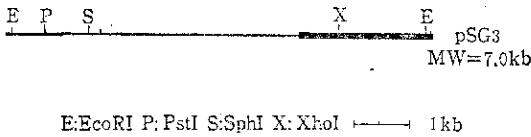


图7 pSG3 DNA限制酶酶切图谱

Fig.7 The restriction map of pSG3 DNA

抗性,确实是 pSG3 DNA 作用的结果,我们将 pSG3 DNA 再转化 *Str. griseofuscus*, 以 Thio 抗性筛选转化子。结果所有 Thio 抗性转化子均表现对螺旋霉素抗性,抗性水平可稳定在 400 μ g/ml。由此可认为, pSG3 DNA 包含有螺旋霉素抗性基因,并与螺旋霉素生物合成基因连锁位于 pCN3H8 DNA 片段上。

(四) 聚酮缩合酶基因及抗性基因对螺旋霉素发酵产率的影响

为了探索利用螺旋霉素生物合成酶基因——聚酮缩合酶基因及抗性基因提高螺旋霉素发酵产率的可能性,我们将 pCG4, pSG3 DNA 分别转化螺旋霉素产生菌 *Str. ambofaciens* (野生型) 原生质体,用 Thio 抗性筛选转化子。随机挑取 12—15 株进行发酵培养,测定螺旋霉素发酵效价,并测定转化子对螺旋霉素的抗性水平,结果见表 1、2。其中几株发酵效价较高的转化子,经在斜面培养基上传代三、四次,重复进行发酵试验,发酵效价基本稳定。转化子发酵产物经化学提取及薄层层析证明,基本上与螺旋霉素相似。从高产的转化子中均能分离到质粒 DNA (见图版 I-4)。

从表 1 可见含 pCG4 *Str. ambofaciens* 转化子的螺旋霉素发酵效价比原生质体再生株提高约 1.5—3 倍。可能是由于聚酮缩合反应在螺旋霉素生物合成过程中是限速阶段,通过高拷贝质粒载体 pWHM3 在螺旋霉素产生菌中引入聚酮缩合酶基因

表 1 pCG4-*Str. ambofaciens* 转化子螺旋霉素发酵效价的测定Table 1 Spiramycin production of pCG4 transformants in *Str. ambofaciens*

转化子 Transformants (No.)	螺旋霉素发酵效价的 增长 Increasing of spiramycin production (%)
1	286
2	153
3	344
4	168
5	153
6	147
7	231
8	226
9	203
10	222
11	203
12	154
对照 control	100

表 2 pSG3-*Str. ambofaciens* 转化子螺旋霉素发酵效价及抗性水平的测定Table 2 Spiramycin production and resistance to spiramycin of pSG3 transformants in *Str. ambofaciens*

转化子 Transformants (No.)	螺旋霉素发酵效价的 增长 Increasing of spiramycin production (%)	螺旋霉素抗性水平 Resistance to spiramycin (μ g/ml)
1	168	2000
2	168	2000
3	380	2000
4	167	2000
5	287	2000
6	258	2000
7	367	2000
8	316	2000
9	229	2000
10	314	2000
11	222	2000
12	291	2000
13	131	2000
14	220	2000
15	184	2000
对照 Control	100	1000

对照:原生质体再生株 10 株发酵效价平均值。
Control: Average value of fermentation production of 10 protoplast regenerated strains

pCG4,有可能增加聚酮缩合酶基因剂量,解除了聚酮缩合过程的“瓶颈”效应,从而使螺旋霉素产率有所提高。

含pSG3-*Str. ambofaciens*转化子螺旋霉素发酵效价比原生质体再生株提高1.8—3.8倍。斜面经传代后发酵效价基本稳定,对螺旋霉素的抗性水平比对照株高一倍。说明pSG3携带的螺旋霉素抗性基因,可能通过增强产生菌的抗性水平,提高自身产生螺旋霉素的能力。这点与Cramer所报道的通过克隆6'-N乙酰转移酶基因,扩增抗生素抗性基因剂量,提

高卡那霉素产率的情况相一致^[1]。pSG3 DNA中螺旋霉素抗性基因的确切定位、与螺旋霉素生物合成基因的关系,以及与Richardson等人^[2]报道的螺旋霉素产生菌*Str. ambofaciens*中三个不同抗性基因的关系,值得进一步探讨。

本研究展示利用抗生素某个酶系基因或抗性基因,有可能提高抗生素产率。对其确切的机理尚待更深入的研究。本研究中所使用的受体菌为螺旋霉素产生菌实验菌种,如果今后能用生产菌种作为受体菌,将会有更重要的实际意义。

参 考 文 献

- [1] Cramer, A. et al.; *J. antibiotics*, 39(1):128—135, 1986.
- [2] Richardson, M. A. et al.; *Gene*, 61:231—241, 1987.
- [3] Richardson, M. A. et al.; Genetics of industrial microorganisms. Proceeding of the Fifth international symposium, Part B. Pliva, Yugoslavia, p.40, 1986.
- [4] Jesus, V. et al.; *J. Bact.*, 171(11):5872—5881, 1989.
- [5] 唐莉,王以光;生物工程学报,5(4):270—278,1989.
- [6] 龚利民,王以光;生物工程学报,2(2):24—30,1986.
- [7] Hopwood, D. A. et al.; Genetic manipulation of *streptomyces*, The John Innes Foundation, 1985.
- [8] 王以光;生物工程学报,5(4):261—269,1989.
- [9] Malpartida, F. et al.; *Nature*, 325(6107): 818—821, 1987.
- [10] Malpartida, F. et al.; *Nature*, 309(31): 462—464, 1984.

Cloning of Polyketide Synthase Gene and Resistance Gene from Spiramycin Producing Strain *Streptomyces spiramyceticus* U-1941

Tang Li Wang Yiguang Zhu Xuewei

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

According to the DNA homology between the different polyketide synthase gene, actinorhodin polyketide synthase genes act I and act III have been used as probes to identify biosynthetic genes from the genomic library from spiramycin producing strain *Str. spiramyceticus* U-1941. A clone pCN3H8 was obtained. Restriction analysis of cloned DNA pCN3H8 has shown that the molecular weight was 44kb, Southern hyb-

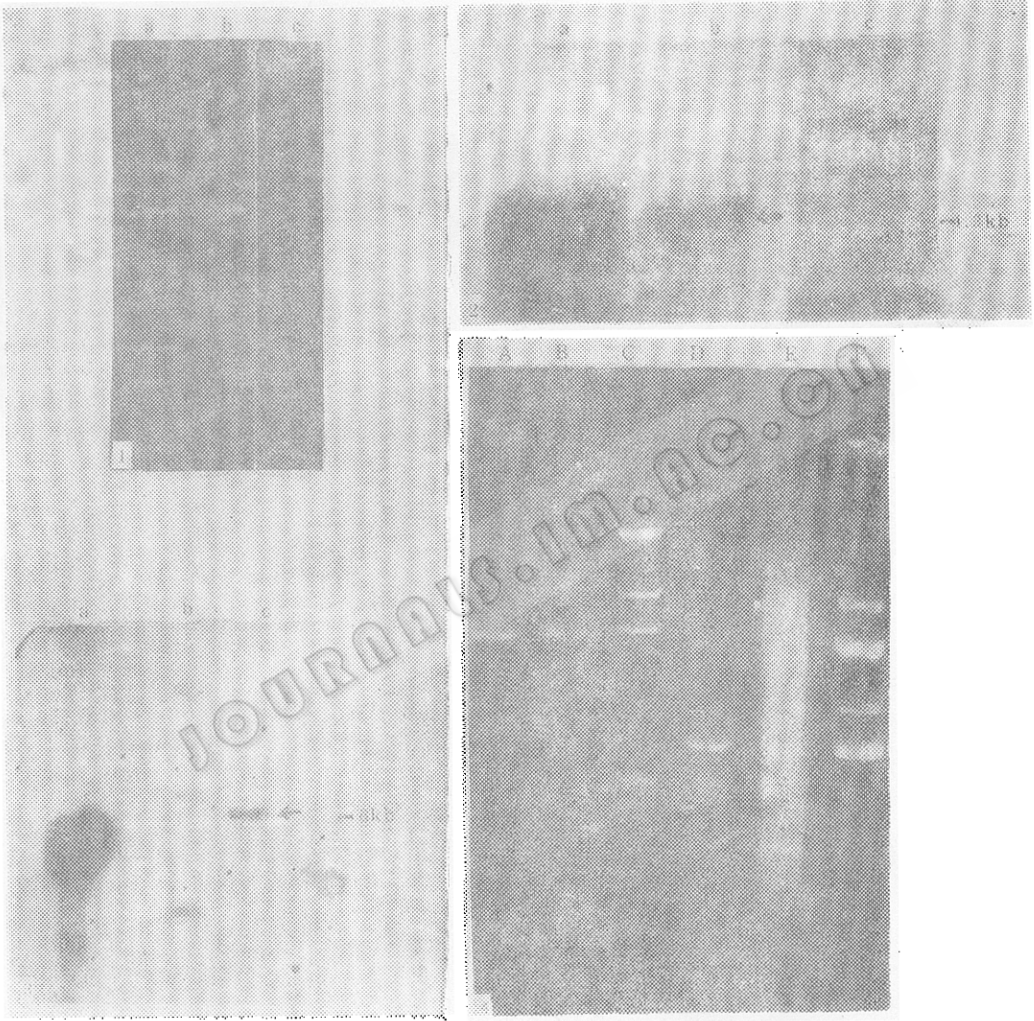
ridization indicated the preliminary location of the polyketide synthase genes in the pCN3H8 DNA. Introduction of pCN3H8 DNA into mutant of midecamycin producing strain *Str. mycarofaciens* No.68 resulted production of a midecamycin A₄ like substance according to UV analysis. The transformants of polyketide synthase gene deficient mutant of actinorhodin producer *Str. coelicolor* TK 17 from pCN3H8 produced antibacterial substance, that was different from actinorhodin in color and spiramycin in paper chromatographic pattern. Subcloning of polyketide condensing gene (act I homologous region) of spiramycin was accomplished in vector pWHM3. A recombinant plasmid pCG4 was obtained.

A spiramycin resistance gene pSG3 was obtained by transformation of pCN3H8 DNA into spiramycin sensitive strain *Str. griseofuscus*. Re-transformation of pSG3 into *Str. griseofuscus* has confirmed that the resistance of spiramycin was associated with this plasmid. The restriction enzyme analysis showed that pSG3 has molecular weight of 7kb, implying the pSG3 was formed by *in vivo* deletion of pCN3H8 in *Str. griseofuscus*. The plasmids pCG4, pSG3 were introduced to spiramycin producer *Str. ambofaciens*. The transformants containing plasmids pCG4, pSG3 showed substantially increased production of spiramycin.

Key words

Spiramycin; polyketide synthase genes; resistance gene; production of antibiotics

Tang Li et al., Cloning of polyketide synthase gene and resistance gene from spiramycin producing strain *Str. spiramyceticus* U-1941



1—3. Digestion of pCN3H8 DNA with Pst I, Bgl I (1) and Southern hybridization with act I (2), act III (3) genes as probe

1. a. pCN3H8/Bgl I, b. pCN2H8/pst I, c. λ DNA/Hind III
2. a. act I gene as control, b. pCN3H8/Bgl I, c. pCN3H8/pst I
3. a. act III gene as control, b. pCN3H8/Bgl I, c. pCN3H8/pst I
4. Electrophorogram of plasmie pCG4 and pCG3 DNA in *Str. ambofaciens* transformants

A, B. pCG4/*Str. ambofaciens*, C. λ DNA/Hind III, D, E. pSG3/*Str. ambofaciens*, F. pSG3/*Str. griseofuscus*