

生米卡链霉菌变株丙酰化酶基因的克隆和表达

李元 孙亚萍* 石莲英 李晓平 李焕娄

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京)

麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌(*Streptomyces mycarofaciens*)变株具有丙酰化酶活性, 可以将螺旋霉素转化为丙酰螺旋霉素。为了进行丙酰化酶基因克隆, 本实验以质粒 pIJ702 为载体通过鸟枪克隆法将变株 DNA 片段克隆至变铅青链霉菌 TK54(*Streptomyces lividans* TK54), 经薄层层析和高压液相色谱分析结果表明, 在转化子中, No.9 菌株可以将螺旋霉素转化为丙酰螺旋霉素, 这证明丙酰化酶基因已在变铅青链霉菌 TK54 中克隆并得到初步表达, No.9 重组质粒插入 DNA 片段为 4.16kb, 经 Southern 杂交表明确实来源于变株。此外还构建了 No.9 重组质粒的限制酶酶切图谱。

关键词 鸟枪克隆; 分子杂交; 限制酶酶切图谱; 丙酰螺旋霉素

4"-O-丙酰螺旋霉素是我所研究成功的一种新抗生素, 是通过麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌变株对螺旋霉素进行生物转化而获得的。该抗生素对金黄色葡萄球菌、福氏痢疾杆菌及乙型链球菌 A12 的体外抗菌活性和小鼠体内实验治疗效果 (LD_{50}) 均优于目前临床上应用的乙酰螺旋霉素。本文报道麦迪霉素产生菌变株丙酰化酶基因在变铅青链霉菌中克隆和表达过程。在此基础上, 我们可以进一步定向将丙酰化酶基因克隆至螺旋霉素生产菌株, 以便获得直接产生丙酰螺旋霉素的基因工程菌株。

材料和方法

(一) 菌种

麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌变株 (*S. mycarofaciens*) 为本所保存菌种; 变铅青链霉菌 TK54 (*S. lividans* TK54) 菌株由 D.A. Hopwood 教授赠送; 藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*) 为本所保存菌种。

(二) 培养基

1. YEME(%): 酵母膏 0.3, 蛋白胨 0.5, 麦芽提取物 0.3, 葡萄糖 1, 蔗糖 34, 氯化镁 0.1, pH7.0—7.2。

2. R2 (%): 蔗糖 10.3, 硫酸钾 0.025, 酵母膏 0.4, 蛋白胨 0.4, 酪蛋白水解物 0.01, 葡萄糖 1, 三羟甲基氨基甲烷 0.3, 磷酸氢二钾 0.0025, 氯化钙 0.735, 氯化镁 1.012, 微量元素溶液 2ml/L (氯化锌 0.004%, 氯化铜 0.001%, 硼酸钠 0.001%, 氯化铁 0.02%, 氯化锰 0.001%) 琼脂 1.5, pH7.5。

3. SGYS (%): 淀粉 2, 硫酸铵 0.3, 蛋白胨 0.5, 葡萄糖 2, 酵母膏 0.5, 磷酸氢二钾 0.05, 自然 pH。

4. 麦迪霉素产生菌斜面培养基 (%) : 麦芽糖 1, 酵母膏 0.4, 葡萄糖 0.4, 琼脂 1.5, 自然 pH。

5. 八叠球菌斜面培养基 (%) : 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.15, 牛肉膏 0.15, 葡萄

本文于 1989 年 7 月 29 日收到。

* 现在地址: 厦门大学抗瘤研究中心。

糖0.1, 氯化钠0.35, 磷酸氢二钾 0.37, 磷酸二氢钾0.13, 琼脂1.5, pH7.0。

6. 八叠球菌检定培养基(%): 蛋白胨1, 酵母膏0.3, 牛肉膏 0.15, 葡萄糖0.1, 琼脂1.5, pH8.0。

(三) 酶

限制酶 EcoR I, Hind III, Xho I, BamH I, T4-DNA 连接酶为医学科学院基础医学研究所产品; Kpn I, Pvu II, Xba I 为 BRL (美) 产品; RNA 酶、链霉蛋白酶为 Boehringer (西德) 产品; 溶菌酶为上海生物化学研究所东风厂产品。

(四) 染色体 DNA 和质粒 DNA 的制备

变株的染色体 DNA 制备采用 Saito^[11] 方法, 质粒 DNA 制备基本采用 Katz^[12] 等方法。

(五) DNA 的酶切和连接

酶切反应条件依公司提供条件进行。变株染色体 DNA 和质粒 DNA, pIJ702 分别用限制酶 Bgl II 酶切, 二者混合浓度比为 5:1, 在 T4-DNA 连接酶和连接反应液作用下, 于 14°C 过夜进行连接反应。

(六) 转化

采用上述连接 DNA 以 TK54 菌株为受体按 Hopwood 等^[8] 方法进行, 用含硫链丝菌素 (25 µg/ml) 的 R2 琼脂平板筛选转化子。由于载体质粒 pIJ702 具有硫链丝菌素抗性标记和产生黑色素的标记, Bgl II 酶切点位于黑色素标记区, 外源基因片段插入后则消除了黑色素形成的能力, 因此凡在含硫链丝菌素 R2 平板上长出且呈白色的菌落则为含重组质粒的转化子和含有 pIJ702 质粒、产生黑色素的菌落极易区分。

(七) 琼脂糖凝胶电泳

采用 1% 琼脂糖凝胶水平平板电泳, 使用 Loening 缓冲液 (三羟甲基氨基甲烷-盐酸 0.036 mol/L, NaH₂PO₄ 0.036 mol/L,

乙二醇四乙酸 0.001 mol/L pH7.8), 电压为 3.5 V/cm。

(八) 限制酶酶切片段分子量的测定

将重组质粒酶切片段与同一琼脂糖凝胶电泳平板上泳动的 DNA-Hind III 酶切片段的泳动距离进行比较, 确定各片段分子量大小。

(九) Southern 杂交

(α -³²P)-dATP 为英国 Amersham 公司产品, 采用 Maniatis^[4] 方法, 但有修改。采用 No.9 重组质粒 DNA 作为探针与 Bgl II 酶切后的变株 DNA 和 No.9 质粒 DNA 杂交。

(十) 丙酰化酶基因的表达

1. 螺旋霉素的生物转化: 将含 No.9 重组 DNA 的转化子接种于 YEME 培养基中, 28°C 培养 48h 后, 加入螺旋霉素, 继续再培养 48h, 上述发酵液经离心取上清液, 在碱性 pH 条件下用乙酸乙酯进行抽提, 将有机溶剂相干燥浓缩。

2. 产物的分析检定: 薄层层析采用硅胶 GF254 碱性板, 以乙酸乙酯: 甲醇 = 9:1 展层, 以碘显迹和生物显迹进行检定, 生物检定菌为八叠球菌; 高压液相色谱采用国产 C-18 柱, 流动相为乙腈: 0.2 mol/L 醋酸胺: 水 = 53:10:37, 柱温 30°C, 在 232 nm 紫外光下检测。

实 验 结 果

(一) 重组质粒的检测

采用快速碱变性方法对抗硫链丝菌素而不产生黑色素的转化子进行检测, 部分转化子质粒分子量和 No.9 重组质粒用 Bgl II 酶切的结果分别见表 1 和版图 1-A。

(二) 丙酰化酶基因的表达

用含重组质粒的转化子对螺旋霉素进行生物转化实验, 经薄层层析及生物显迹

(以八叠球菌为指示菌)初步实验结果表明, No.9 转化子对螺旋霉素有生物转化

表 1 部分重组质粒分子量测定

Table 1 Molecular weight of recombinant plasmids

重组质粒 Recombinant plasmids	分子量 M. W. (kb)	插入片段 Insert frag- ments (kb)
pIJ702	5.84	
No.8	8.80	2.96
No.9	10.00	4.16
No.23	8.15	2.31
No.35	10.50	4.66
No.41	10.34	4.50

的活性, 从图版 I-B 可见 No.9 转化子对螺旋霉素进行生物转化后, 薄层层析碘显迹表明出现了一个与标准丙酰螺旋霉素 Rf 值相同的显迹点, 该点具有抑制八叠球菌生长的活性(见图版 I-C)。

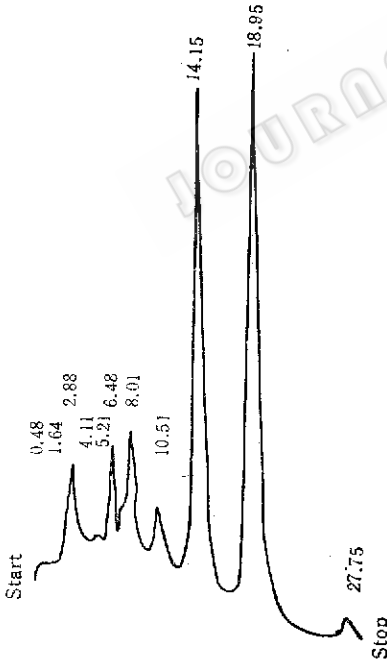


图 1 丙酰螺旋霉素高压液相色谱
Fig 1 HPLC of propionyl spiramycin

化学提纯 No.9 转化子螺旋霉素生物转化产物经高压液相色谱分析表明, 其保

留时间与丙酰螺旋霉素标准品保留时间基本一致(图 1, 2)。根据上述结果表明, 丙酰化酶基因已在变铅青链霉菌 TK54 中克隆并初步表达。

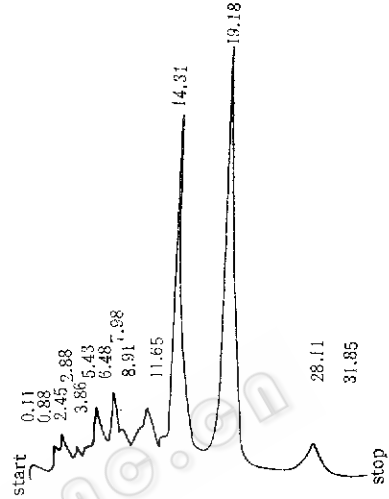


图 2 含 No.9 重组质粒转化子转化产物高压液相色谱
Fig2. HPLC of bioconversion product of transformant containing No. 9 recombinant plasmid

(三) 分子杂交

为确证 No.9 转化子所含重组质粒 DNA 插入片段确来源于麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌变株, 故进行 Southern 分子杂交实验, 以 No.9 重组质粒为探针, 对经 Bgl II 酶切的变株 DNA 进行分子杂交, 结果见图版 I-D。结果表明变株 DNA 与 No.9 重组质粒有杂交带, 该杂交带与 No.9 重组质粒插入片段分子量相同, 这说明该插入片段确实来源于麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌变株。

(四) No.9 重组质粒酶切图谱

酶切实验结果表明, No.9 重组质粒插入片段上 Kpn I 有一个切点。BamH I 有两个切点, EcoR I, Hind III, Xho I, Pvu II 和 Xba I 无酶切位点; 采用 Kpn I - Pvu II, Pvu II - BamH I, Kpn I - BamH I 一系列双酶切, 从而确定了插入片段上

BamH I 和 Kpn I 位点的相对位置(表2, 图3)。

表2 No.9 重组质粒的酶切结果

Table 2 Results of enzyme digestion of No.9 recombinant plasmid

酶 Enzyme	片段数 Number of fragments	分子量 M.W. (kb)
BamH I	3	5.00 3.35 1.65
Kpn I	2	6.65 3.35
Pvu I	1	10.00
Kpn I -Pvu I	3	3.55 3.35 3.10
Pvu I -BamH I	4	3.35 3.05 1.95 1.65
Kpn I -BamH I	5	5.0 2.20 1.15 1.15 0.50

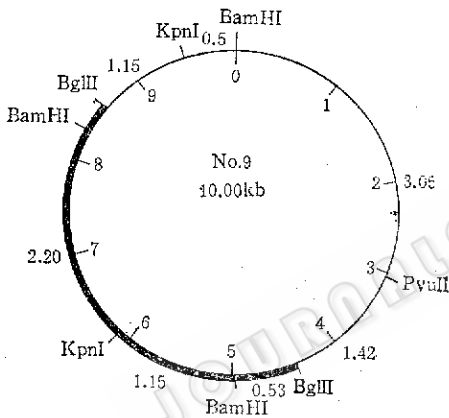


图3 No.9重组质粒的限制酶酶切图谱
Fig 3 Restriction map of recombinant plasmid No.9

讨 论

近年来, 链霉菌基因克隆和表达研

发展十分迅速, 通过 DNA 重组技术已获得若干新的杂合抗生素^[5,6]。一些抗生素生物合成基因簇也得到成功的克隆^[7-10]。

丙酰螺旋霉素是通过麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌变株转化螺旋霉素而产生的新抗生素。是 4"-O-单丙酰螺旋霉素。为了用 DNA 重组技术得到直接产生丙酰螺旋霉素的菌种, 我们采用质粒 pIJ702 为载体, 通过鸟枪克隆将变株的 DNA 片段克隆至变铅青链霉菌 TK54 菌株中。实验结果确认, No.9 转化子转化螺旋霉素的产物是丙酰螺旋霉素, 变株的丙酰化酶基因已经在变铅青链霉菌 TK54 中得到克隆和表达。Southern 分子杂交表明, No.9 重组质粒的插入片段确实来源于变株, 片段大小为 4.16 kb, 其中包括有编码丙酰化酶的基因。此外, 我们还构建了 No.9 重组质粒对 BamH I 和 Kpn I 切点相对位置的限制酶酶切图谱。

No.9 转化子对螺旋霉素的生物转化率尚待提高。丙酰化酶基因在 No.9 重组质粒插入片段中需进一步定位, 将丙酰化酶基因直接在螺旋霉素生产菌株中克隆和表达的工作正在进行之中, 本工作为直接通过发酵获得丙酰螺旋霉素奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Saito, H. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 72:619, 1983.
- [2] Katz, E. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 129:2703, 1983.
- [3] Hopwood, D. A. et al.: *Genetic Manipulation in Streptomyces*. The John Innes Foundation, Norwich, p.110, 1985.
- [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, p.382, 1982.
- [5] Hopwood, D. A. et al.: *Nature*, 314:642, 1985.
- [6] McAlpine, J. B. et al.: *J. Antibiot.*, 40:1115, 1987.

- [7] Malpartida, F. et al.: *Nature*, 309:462, 1985.
[8] Stanzak, R. et al.: *Bio/Teck*, 4(11):229, 1986.
[9] Murakami, T. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 205:42, 1986.
[10] Hopwood, D. A. et al.: *Trend in Biotechnology*, 1:42, 1983.

Gene Cloning and Expression of Propionyl Acylase of *Streptomyces mycarofaciens* Mutant

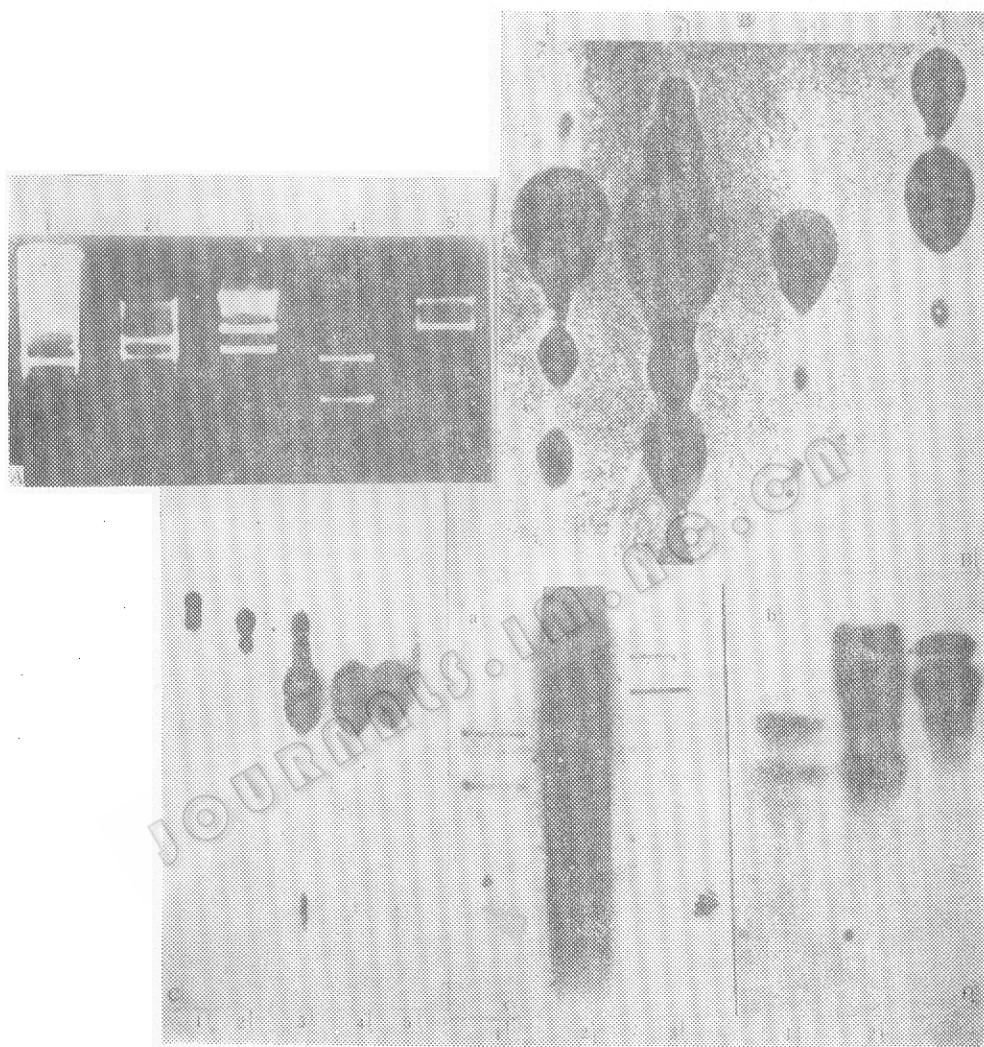
Li Yuan Sun Yaping Shi Lianying Li Xiaoping Li Huanlou
(*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

Midecamycin producer *Streptomyces mycarofaciens* mutant, which has propionyl acylase activity, can transform spiramycin into propionyl spiramycin. With shot-gun cloning strategy, we used pIJ702 plasmid as a vector to clone DNA fragments of the mutant into *Streptomyces lividans* TK54.

The results of TLC and HPLC showed that the bioconversion product of No.9 transformant is the same as the propionyl spiramycin. According to these results, the propionyl acylase gene has been cloned in *S. lividans* TK54 and expressed. Molecular weight of insert DNA fragment of No.9 recombinant plasmid is 4.16kb. Southern hybridization showed that this fragment originated from midecamycin producer mutant. The restriction map of No.9 has been constructed.

Key words

Shot-gun cloning; Southern hybridization; restriction map;
propionyl spiramycin



A. Electrophoresis of No.9 recombinant plasmid digested by BglII

1. Plasmid pIJ702 digested by BglII; 2. Plasmid pIJ702; 3. λ DNA digested by HindIII;

4. No.9 recombinant plasmid digested by BglII; 5. No.9 recombinant plasmid

B. TLC of bioconversion product of transformant containing No.9 recombinant plasmid

1. Acetyl spiramycin; 2. Propionyl spiramycin; 3. Bioconversion product of No.9 transformant; 4. Bioconversion product of *S.lividans* TK54; 5. Spiramycin

C. Bioautography of bioconversion product of transformant containing No.9 recombinant plasmid

1. Bioconversion product of *S.lividans* TK54; 2. Bioconversion product of No.9 transformant; 3. Spiramycin; 4. Propionyl spiramycin

D. Southern hybridization

a. Agarose gel electrophoresis before hybridization; b. Autoradiography of hybridization patterns; 1. No.9 recombinant plasmid digested by BglII; 2. *S.mycarofaciens* mutant DNA digested by BglII; 3. No.9 recombinant plasmid