

地中海拟无枝菌酸菌 U-32 的 3-氨基 5-羟基苯甲酸合成酶 (AHBAS) 基因的克隆与序列分析*

黄健强 姜卫红 赵国屏 杨蕴刘** 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 微生物次生代谢分子调控开放实验室 上海 200032)

摘 要 地中海拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*) U-32 是一种临床上重要的抗生素——力复霉素 SV 的产生菌。研究表明,在地中海拟无枝菌酸菌的力复霉素生物合成过程中 3-氨基 5-羟基苯甲酸合成酶(AHBAS)是合成中间体 C₇N 母核(又称 AHBA)的关键酶。通过筛选以广宿主粘粒(Cosmid) pLAFR3 为载体构建的地中海拟无枝菌酸菌 U-32 的基因文库,获得 6 个阳性克隆子。将含有 AHBAS 基因的约 2.5kb 的片段克隆到 pBluescript II SK 和 KS 上,进行酶谱分析得到其在染色体上的初步定位。序列测定表明地中海拟无枝菌酸菌 U-32 中的 AHBA 合成酶基因,由 1167bp 组成,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA,共编码 388 个氨基酸,所克隆到的 AHBA 合成酶基因在大肠杆菌的启动子控制下获得诱导表达,蛋白分子量约为 43kD。

关键词 地中海拟无枝菌酸菌 3-氨基 5-羟基苯甲酸合成酶基因 克隆 定位 序列测定 表达
分类号 Q 78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(1999)02-0160-65

安莎类抗生素(Ansamycins)是一大类抗生素。它们在结构上有共同的特点,即一个脂肪族链在一芳香核结构的不相邻位置上首尾相接,形成一环桥结构^[1],此类抗生素通过抑制 RNA 聚合酶来干扰 RNA 的合成,在临床上有着广泛的应用价值,如力复霉素就能有效地治疗肺结核等病症^[2]。另外,在井冈霉素(Validamycin),丝裂霉素(Mitomycin)等非安莎类抗生素中,也存在上述的芳香核结构^[3]。研究表明此芳香化合物为 3-氨基 5-羟基苯甲酸(AHBA),又称 C₇N,是上述抗生素的共同合成前体^[4-6],而 AHBA 合成酶在 AHBA 的形成途径中,则起着最为关键的作用^[7]。目前,华盛顿大学的 Heinz G. Floss^[8]及马里兰大学的 Kevin A. Reynolds^[9]已分别从产力复霉素 B 的地中海拟无枝菌酸菌和山丘链霉菌(*Streptomyces collinus*)中克隆到 AHBA 合成酶基因并进行了序列分析。本实验室多年来致力于力复霉素 SV 生产菌 U-32 的研究,它不同于其他地中海拟无枝菌酸菌的特殊的硝酸盐效应,在添加硝酸盐的情况下,力复霉素产量获得成倍提高^[10]。本实验对产力复霉素 SV 的地中海拟无枝菌酸菌 U-32 的 AHBA 合成酶基因的克隆和序列分析,不仅有助于对该酶及其编码基因的分子生物学性质的了解,而且也助力复霉素合成基因簇,乃至其它安莎类抗生素合成基因簇的克隆提供了一条可供选择的路线。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39630010)。

** 通讯联系人。

收稿日期:1998-03-09,修回日期:1998-04-28。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

实验所用菌种和质粒见表 1。

表 1 细菌菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources/references
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ 80 Φ dlac ZDM151(<i>lac</i> ZYA ⁻ <i>argF</i> λ U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR1</i> λ rk ⁻ mk ⁺) <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	GIBCO-BRL
XL1-Blue	<i>supE44</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA46</i> <i>thi</i> <i>relA1</i> <i>lacF</i> [<i>proAB</i> ⁺ λ <i>lacI</i> ^Q Tn10(<i>tet</i> ^r)]	Stratagene
BL21	DE3F ['] omp TrB ⁻ m β	Stratagene
<i>A. mediterranei</i> U-32	a high-yield producer of rifamycin SV	This laboratory
<i>A. mediterranei</i> ATCC21789	a producer of rifamycin B	ATCC
<i>A. mediterranei</i> NB	a producer of rifamycin B	This laboratory
<i>S. caespitosum</i> ATCC27422	a producer of mitomycin MC ^r	ATCC
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	a producer of undecylprodigiosin and actinorhodin	Hopwood D. A.
Plasmids		
pBluescript II KS ⁺	pUC18-derived cloning vector	Stratagene
pBluescript II SK ⁺	pUC18-derived cloning vector	Stratagene
pBE25	1.6kb <i>EcoRI</i> & <i>Bam</i> HI AHBAS gene probe in pUC119	Floss G. H.
pLAFR3	<i>cos</i> <i>Mob</i> ⁺ <i>Tra</i> ⁻ <i>IncP</i> <i>Tc</i> ^r	Staskawicz
pET28-b	Kan ^r λ T7 <i>lac</i> promoter, His-tag sequence	Novagen
pHJQ1-6	6 cosmid clones with AHBAS gene in pLAFR3	This work
pHJQ-SK-X2.5	2.5kb <i>XoI</i> subclone, orientation 1 in pBluescript II SK ⁺	This work
pHJQ-KS-X2.5	2.5kb <i>XoI</i> subclone, orientation 2 in pBluescript II KS ⁺	This work
pHJQ-E0.8	0.8kb <i>EcoRI</i> subclone, in pBluescript II KS ⁺	This work
pHJQ-B1.3	1.3kb <i>EcoRI</i> subclone, in pBluescript II KS ⁺	This work
pHJQ-S1.8	1.8kb <i>EcoRI</i> subclone, in pBluescript II KS ⁺	This work
pAHBAS	1.3kb PCR subclone, in pET28-b Kan ^r	This work

1.2 培养基

固体和斜面培养为本氏培养基,液体培养用 S 培养基,参照文献 [11]。

1.3 材料

限制酶, T4DNA 连接酶和碱性磷酸脂酶 (CIAP) 为 Promega 公司产品,溶菌酶,蛋白酶 K 和 RNase 为 Sigma 公司产品 [α -³²P]-dCTP 为北京市亚辉生物公司产品。

1.4 方法

1.4.1 DNA 操作:染色体总 DNA 的提取参照文献 [11]。总 DNA 部分酶切、蔗糖密度梯度离心、从低熔点凝胶回收 DNA 片段以及质粒 DNA 抽提、酶切、脱磷、连接、电泳、Southern 杂交等均参照文献 [12]。体外包装参照 Boehringer 公司的产品说明书进行。

1.4.2 地中海拟无枝菌酸菌 U-32 基因文库的构建:分离提取总 DNA,经 *Sau*3A 部分

酶切, 10%~40%蔗糖密度梯度离心, 收集 20~30kb 大小的 DNA 片段。将供体 DNA 片段与经 *Bam*HI 酶切、CIAP 处理的粘粒载体 pLAFR3 连接, 并用 λ -噬菌体包装蛋白体外包装, 转染大肠杆菌 DH5 α , 在含有四环素、X-gal、IPTG 的 LB 平板上筛选白色的含外源片段的重组质粒菌落。随机取样抽提质粒 DNA, 凝胶电泳表明库里的重组质粒包含的外源片段的平均大小为 25kb。一共得到 5000 多株白色的菌落, 覆盖机率为 99%^[13]。

1.4.3 ³²P 同位素探针的制备: 采用 Promega 公司的 Prime-a-Gene 标记系统。

1.4.4 DNA 序列分析: 用单链模板 DNA 按照 Sanger 双脱氧末端终止法。

2 实验结果

2.1 从地中海拟无枝菌酸菌 U-32 基因文库中筛选 AHBAS 基因及鉴定

从 U-32 基因文库中转移 4000 多个菌, 对应点种于四环素抗性平板和硝酸纤维素膜, 每张膜约 450 个菌落。用来源于力复霉素 B 产生菌 *Amycolatopsis mediterranei* S699 并被克隆在 pBE25 上的 1.6kb AHBAS 基因作探针。进行菌落原位杂交, 筛选获得 6 个阳性克隆子。重组质粒分别定名为 pHJQ1 2 3 4 5 6。

抽提 U-32, ATCC21789(产力复霉素 B), 头状轮生链霉菌 ATCC27422(产丝裂霉素) 及天蓝色链霉菌 A3(2) 的总染色体 DNA 与阳性克隆子的重组质粒 DNA, 并分别进行 *Xho*I(图 1) 或 *Eco*RI 和 *Bam*HI(图 2) 酶切、电泳、Southern 转移, 以 pBE25 中 1.6kb 的



图 1 地中海拟无枝菌酸菌、头状轮生链霉菌的总 DNA 及阳性克隆子的重组质粒 DNA 经 *Xho*I 酶切后与探针的 Southern 杂交

Fig.1 Southern hybridization of *A. mediterranei* U-32, ATCC21789 and *S. caespitosum* ATCC27422 genomic DNA and pHJQ 1 and 2, digested completely with *Xho*I

1. 2. ATCC 21789 genomic DNA; 3. ATCC 27422 genomic DNA; 4. U-32 genomic DNA; 5. Plasmid pHJQ1; 6. Plasmid pHJQ2; 7. λ /*Hind* III marker; 8. 1.6 kb probe

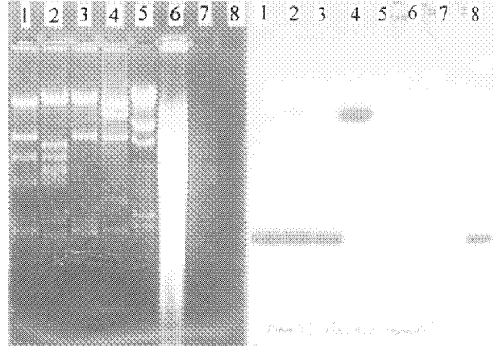


图 2 地中海拟无枝菌酸菌、天蓝色链霉菌的总 DNA 及阳性克隆子的重组质粒 DNA 经 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切后与探针的 Southern 杂交

Fig.2 Southern hybridization of *A. mediterranei* U-32 and *S. coelicolor* A3(2) genomic DNA and pHJQ plasmids all digested completely with *Eco*RI & *Bam*HI

1. Plasmid pHJQ1; 2. Plasmid pHJQ3; 3. Plasmid pHJQ5; 4. Plasmid pHJQ6; 5. λ /*Hind* III marker; 6. U-32 genomic DNA; 7. A3(2) genomic DNA; 8. 1.6kb probe

AHBAS 探针片段进行分子杂交, 结果表明 AHBAS 基因在产力复霉素和丝裂霉素的菌中均有较强的杂交带, 说明 AHBAS 基因在这类菌中具有较高的保守性。同时, U-32 的总 DNA 与 pHJQ 系列的重组质粒 DNA 有相同大小的杂交带, 这就证明了 pHJQ 中的外源片段确实来自 U-32。

2.2 AHBAS 基因的定位和酶切图谱分析

将 pHJQ1-6 用多种不同的限制酶进行酶切、电泳、Southern 转移, 与 AHBAS 的 1.6kb 探针杂交, 通过对杂交片段大小的计算与分析, 初步排出了这些质粒中外源片段在供体菌 U-32 染色体 DNA 上的相对位置(如图 3), 大小均在 19~26kb 之间。回收重组质

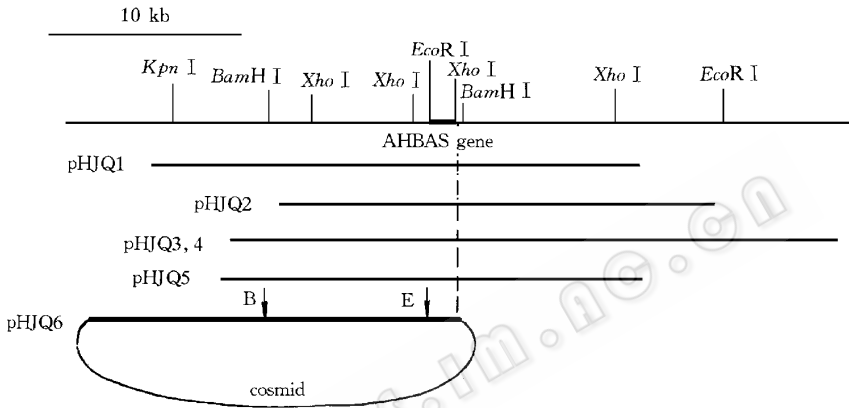


图 3 阳性克隆子中外源片段和 AHBAS 基因在染色体上的相对位置

Fig. 3 The relative location of the cloned DNA fragment in U-32 chromosome DNA and the position of AHBAS gene

粒上的 2.5kb *Xho*I (AHBAS 基因) 片段, 并分别克隆到 pBluescript II SK⁺ 和 pBluescript II KS⁺ 上, 得到正反两个方向的亚克隆, 命名为 pHJQ-SK-X2.5 和 pHJQ-KS-X2.5。综合酶切分析、Southern 杂交和亚克隆等方面的工作, 初步确定 2.5kb *Xho*I 片段的酶谱如图 4。

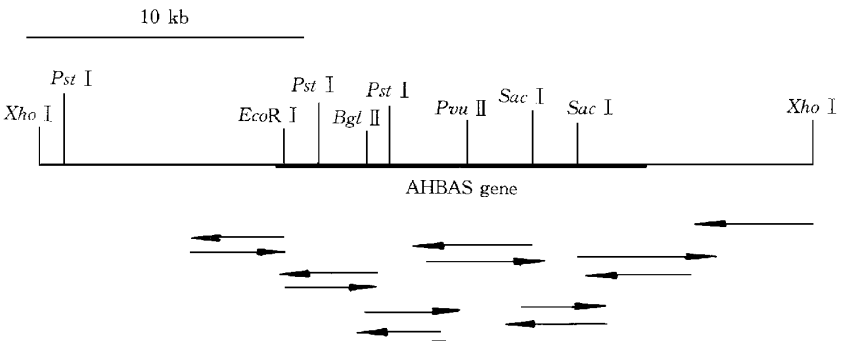


图 4 带有 AHBAS 基因的 2.5kb *Xho*I 片段的限制性酶切图谱、亚克隆及序列分析策略

Fig. 4 Restriction map, subcloning and sequencing strategy of 2.5kb *Xho*I fragment with AHBAS gene

E : *Eco*R I ; P I : *Pst* I ; B : *Bgl* II ; P II : *Pvu* II ; Sc : *Sac* I ; SI : *Sal* I ; Sm : *Sma* I ; X : *Xho* I

2.3 地中海拟无枝菌酸菌 AHBAS 基因的序列分析

选择 AHBAS 基因和载体 pBluescript II KS 的多克隆位点酶切 pHJQ-KS-X2.5 构建亚克隆子测序策略见图 4。用 M13 感染带有亚克隆质粒的 XL1-Blue 抽提单链, 双脱氧链终止法测得的序列长 1461bp, 此外源片段中存在一长度为 1167bp 的完整的开放阅读框架(ORF), 起始密码子为 160bp 处的 ATG。在 152~156bp 处, 推测的核糖体接合位点为 GGAGA。整个序列 G+C 含量为 72.1%, 符合放线菌 DNA G+C 较高的特点。密码子第三位碱基 G+C 含量为 96.6%, 符合放线菌基因编码区的结构特点。终止密码子为 1324bp 处的 TGA。

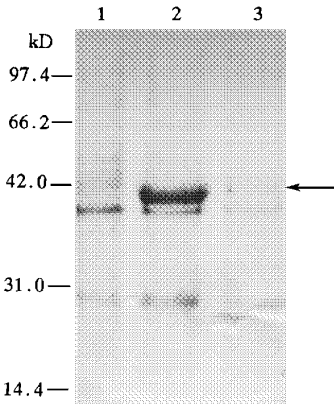


图 5 AHBAS 基因在大肠杆菌中诱导表达的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 5 Expression of AHBAS gene by IPTG induction in *E. coli*

1. *E. coli* BL21(DE3) pET28-b, 2. *E. coli* BL21(DE3) pAHBAS, 3. *E. coli* BL21(DE3)

2.4 地中海拟无枝菌酸菌 AHBAS 基因在大肠杆菌中的表达

从起始密码子 ATG 开始, 设计含 *Nde*I 酶切位点的引物, 用 PCR 方法从克隆子中扩增获得完整的 AHBAS 基因, 将其克隆到表达载体 pET28b 的大肠杆菌启动子下游, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 测序鉴定重组子, 含重组质粒的菌经 IPTG 诱导后, 表达产物经 SDS-PAGE 电泳分离, 染色可观察到一条约 43kD 的特异性蛋白质带, 其大小与编码顺序的长度相符(见图 5), 并占菌体总蛋白量的 42%。因此含有重组质粒的大肠杆菌经诱导能够表达 AHBA 合成酶基因。

3 讨 论

Kibby 等人^[14]根据安莎类抗生素的结构特点, 推测 3-氨基 5-羟基苯甲酸是安莎类抗生素的合成前体, 并用化学方法合成了 C_7N , 同位素标记实验证明, $^{14}C-C_7N$ 能参入到 Actamycin 中去, 饲喂实验证明, C_7N 能明显地提高丝裂霉素的发酵产量, Ghisalba 等人^[15]利用地中海诺卡氏菌突变株也证明 C_7N 是合成力复霉素的前体。本实验室通过诱变筛选获得了积累 AHBA 的阻断变种 A32 及能与 A32 共合成而将 AHBA 转化为力复霉素的阻断变种 NG131, 进一步肯定了 AHBA 的前体作用^[16]。

Southern 杂交和测序的结果表明, AHBA 合成酶基因在产力复霉素 SV, 力复霉素 B 和丝裂霉素等放线菌中都有很高的同源性。本工作从力复霉素 SV 生产菌 U-32 中所克隆的 AHBAS 基因与 Heinz G. Floss 从产力复霉素 B 的地中海拟无枝菌酸菌中所克隆的 AHBAS 基因比较, 同源性高达 97%, 并发现部分阅读框架发生移位。在 GENE BANK 中比较发现, 该基因所编码的氨基酸序列与一些参与转氨、脱水及脱氧合作用的基因产物有较高的同源性。

参 考 文 献

[1] Giancarlo Lancini. Ansamycins. In: Leo C. Cimino 科学出版社 1998 年 1 月 Genetic Regulation of Commercially Important

- tant Antibiotics. London :Addison Wesley Press , 1983 pp. 231~254.
- [2] O. Ghisalba. In Erick J. Vandamme ed , Biotechnology of Industrial Antibiotics. New York :Marcel Dekker , INC , 1984 pp. 281~327.
- [3] U. Hornemann. In Corcoran J W , Hahn F E ed. Antibiotics. Berlin Springer Verlag Press , 1981 , 4 297~302.
- [4] K. Hatano , S. Akiyama , R. W. Rickards *et al.* *J. Antibiot.* , 1982 , **35** :1415~1419.
- [5] A. L. Staley , K. L. Rinehart. *J. Antibiot.* , 1991 **44** (2) 218~223.
- [6] M. G. Anderson D. Monypenny , R. W. Rickards *et al.* *J. Am. Chem. Soc. Comm.* , 1989 , 311~317.
- [7] C. G. Kim , A. Kirschning H. G. Floss *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* , 1996 , **118** :7486~7491.
- [8] C. G. Kim , P. R. August H. G. Gloss *et al.* 10th International Symposium on Biology of *Actinomyces* , 1997.
- [9] K. A. Reynolds. Xth International Symposium on Biology of *Actinomyces* , 1997.
- [10] Jiao R. S , Liu C. J Jin Z. K *et al.* *Scientia Sinica B* , 1984 **27** (4) 380~390.
- [11] D. A. Hopwood , M. J. Bibb , K. F. Chater *et al.* Genetic Manipulation of *Streptomyces* . A Laboratory Manual. England :John Innes Foundation Press , 1985. \ = [12] J. Sambrook , E. F. Frisch , T. Maniatis. Molecular Cloning :A Laboratory Manual. 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [13] 彭文涛. 中国科学院上海植物生理研究所博士学位论文 , 1996. 11.
- [14] J. J. Kibby , I. A. Mcdonald R. W. Rickards. *J. Chem. Soc. Comm.* , 1980 , 768~769.
- [15] O. Ghisalba , J. Nuesch. *J. Antibiot.* , 1981 **34** :64~71.
- [16] 金志坤 , 刘慈俊 , 焦瑞身等. 微生物学报 , 1984 **24** (3) 210~216.

Cloning , Sequencing and Expression of AHBAS Gene from *Amycolatopsis mediterranei* U-32^{*}

Huang Jianqiang Jiang Weihong Zhao Guoping Yang Yunliu Jui-Shen Chiao

(Laboratory of Molecular Regulation for Microbial Secondary Metabolism , Shanghai Institute of Plant Physiology ,
The Chinese Academy of Science , Shanghai 200032)

Abstract *Amycolatopsis mediterranei* U-32 is the producer of rifamycin SV , an important antibiotic in clinical use. It was demonstrated that the 3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthase is the key-enzyme of rifamycin's intermediate , C7N (AHBA) , biosynthesis in the metabolic pathway. Using a broad-host-range cosmid pLAFR3 as the vector , a gene library of *A. mediterranei* U-32 was constructed. Six positive clones (pHJQ1-6) were obtained by screening this library with heterologous probe. The 2.5kb DNA fragment containing AHBAS gene was isolated , analyzed with restriction endonucleases and localized its approximate position in chromosome DNA. Sequence analysis reveals that the open reading frame of AHBAS gene is 1167bp in size , encoding 388 amino acids with ATG as start condon and TGA as stop codon. After induction of IPTG , a 43kD protein was specifically expressed in *E. coli*.

Key words *Amycolatopsis mediterranei* , AHBAS gene , cloning , sequencing , expression

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39630010).