

## 生技霉素稳定型基因工程菌的构建\*

尚广东 戴剑澍 王以光\*\*

(中国医学科学院 中国协和医科大学医药生物技术研究所以 北京 100050)

**摘 要** 运用同源重组技术将异戊酰基转移酶基因整合至螺旋霉素产生菌(*Streptomyces spiramyceticus* F21)的染色体上,构建了稳定的生技霉素基因工程菌。在不加压的情况下传代,菌种携带选择性遗传标记情况、生长、发酵效价及发酵产物的 TLC 分析均表明此基因工程菌有较好的遗传稳定性,且发酵效价及产物的组分均得到改善。Southern 杂交证明外源基因在螺旋霉素产生菌染色体上的整合情况。

**关键词** 生技霉素,同源重组,基因工程菌

分类号 Q939.92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(1999)02-0171-75

生技霉素为利用生物工程技术研制的螺旋霉素 4'位酰化衍生物,即将碳霉素产生菌中 4'位异戊酰基转移酶基因克隆至螺旋霉素产生菌,该基因编码的酰化酶将螺旋霉素转化为以异戊酰螺旋霉素为主组分的 4'位酰化螺旋霉素。药效学研究表明生技霉素的抗菌活性及治疗效果优于乙酰螺旋霉素、麦迪霉素和红霉素。目前已按一类新药标准进行临床前药理研究,为了早日投入生产,本研究在原来获得的生技霉素基因工程菌的基础上,构建了稳定、高产的基因整合型菌种。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**螺旋霉素产生菌 *S. spiramyceticus* F21 为本所所有。*E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>[1]</sup>为在大肠杆菌中基因克隆的受体菌,八叠球菌(*Sarcina lutea*)用于工程菌发酵产物的活性检测,皆为本室保存。生技霉素基因工程菌 F21(pWHM1)为含异戊酰基转移酶基因(*ist*)的螺旋霉素产生菌克隆菌株,*ist*在质粒上,本实验所得;WSJ-1为含*ist*整合型的螺旋霉素产生菌克隆菌株,为本实验所获。

**1.1.2 基因和质粒:**4'异戊酰基转移酶基因<sup>[2]</sup>来源于 pWHM1 *Bam*HI-*Bam*HI 2.3kb 片段。硫链丝菌素抗性基因(*tsr*)来源于链霉菌/大肠杆菌柯斯穿梭载体 pNJ1(*amp*<sup>R</sup>和 *tsr*为美国 Abbott 公司赠送)的 *Bgl* II-*Pst* I 1.2kb 片段。pKC113 $\phi$ <sup>[6]</sup>温敏型链霉菌/大肠杆菌穿梭载体。pBluescript(SK-),大肠杆菌克隆载体,购自 GIBCO-BRL 公司。pCN3H8<sup>[4]</sup>为用 pNMJ1<sup>[4]</sup>构建的含螺旋霉素产生菌基因片段的重组质粒。

**1.1.3 培养基:**生技霉素基因工程菌菌种斜面培养基、种子培养基、发酵培养基、生物检

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 3950003)和首都科技集团有限公司资助。

\*\* 通讯作者。

收稿日期:1998-05-14,修回日期:1998-10-10。

定培养基按文献 [2]。链霉菌原生质体制备及再生培养基按文献 [5]。

**1.1.4 试剂和仪器：**PEG-1000 为英国 Koch-Light 公司产品，IPTG、X-gal 购自 Promega 公司，限制酶购自中国医学科学院友谊公司，硫链丝菌素(Thiostrepton, Thio)由 Squibb & Sons 公司赠送。阿普霉素(Apramycin, Am)由韩国明知大学 Suh Joo-won 教授赠送。日本 HITACHI 高速冷冻离心机，FOTO DYNE/UV21 型紫外检测仪，超声波破碎仪为美国 Cole Parmer 公司 Ultrasonic homogenizer。

## 1.2 方法

**1.2.1 *S. spiramyceticus* F21 原生质体制备、DNA 转化基本按文献 [5]。**

**1.2.2 DNA 提取、酶切、连接按文献 [1]；DNA 回收按 USA Bio101 GeneClean II<sup>R</sup>kit。**

**1.2.3 Southern blotting 按德国 Boehringer Mannheim DIG DNA Labeling and Detection Kit 说明书进行，杂交温度根据链霉菌 GC% 高的特点升至 50℃。**

**1.2.4 发酵及产物的组分检测：**菌种在含 Thioc(25 μg/mL)的斜面上 28℃ 培养 10~14d，挖块至种子培养基，28℃ 培养 58~60h，转种发酵培养，取样测定生物效价。发酵液用 1mol/L NaOH 调至 pH8.5~9.0，用等体积乙酸乙酯提取，提取液浓缩后，在 0.1mol/L NaOH 处理过的硅胶板点样，用苯：丙酮 2:1 展开，碘熏显迹，与螺旋霉素和生技霉素标准品进行比较，测定生技霉素的形成情况。

**1.2.5 菌丝浓度测定：**将菌种接种于种子培养基，28℃ 培养 48h，转种培养 24h，在 φ1cm × 9cm 试管中取定量培养液 3 000r/min，20min，测定沉淀菌丝体体积，以百分数表示。

**1.2.6 遗传稳定性的检测：**在不加压的情况下，连续转种，菌丝体用超声波破碎后，经适当稀释，分别涂布于加压及不加压(Thio)平板，28℃ 培养 5~7d，比较加压和不加压平板下的菌落数。

**1.2.7 生技霉素效价生物检定：**以八叠球菌为检定菌，螺旋霉素标准品制定标准曲线，按文献 [2] 进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 用于同源重组整合型质粒的构建

pKC1139 具有链霉菌温度敏感的复制子，利用其在 34℃ 以上不能自主复制的特点，可将外源目的基因通过同源重组整合到宿主菌的染色体上。首先将 *ist* 基因克隆至 pKC1139 获得 pKB2。利用其 *EcoRI-EcoRV* 位点，连接 pCN3H8 *EcoRI-EcoRV* 1.0kb 片段，构建 pKB2VI。pCN3H8 来自本实验室构建的 *S. spiramyceticus* F21 基因文库，其外源片段与聚酮合成酶 PKS II 型基因同源，现已证明与螺旋霉素生物合成无关。故利用 pCN3H8DNA 与宿主菌染色体进行整合时可确保不破坏螺旋霉素的产生。从 pNJ1 质粒 *PstI-BglII* 酶切获得 *tsr* 克隆至 pKS(-) 获得 pSW1，利用 pSW1 *HindIII-XbaI* 位点切下 *tsr* 连至 pKB2VI 的左侧构建 pSW2。最后在 pSW2 的 *tsr* 基因左侧分别连入 pCN3H8 的 *BglII-HindIII* 2.0kb、*BglII-BglII* 2.0kb、*BamHI* 1.4kb 得到重组质粒 pSW4、pSW5、pSW6。具体构建路线如图 1。

### 2.2 基因整合型工程菌的筛选

将所构建的 pSW4、pSW5、pSW6 通过 PEG 介导转入螺旋霉素产生菌 *S. spiramyceticus*

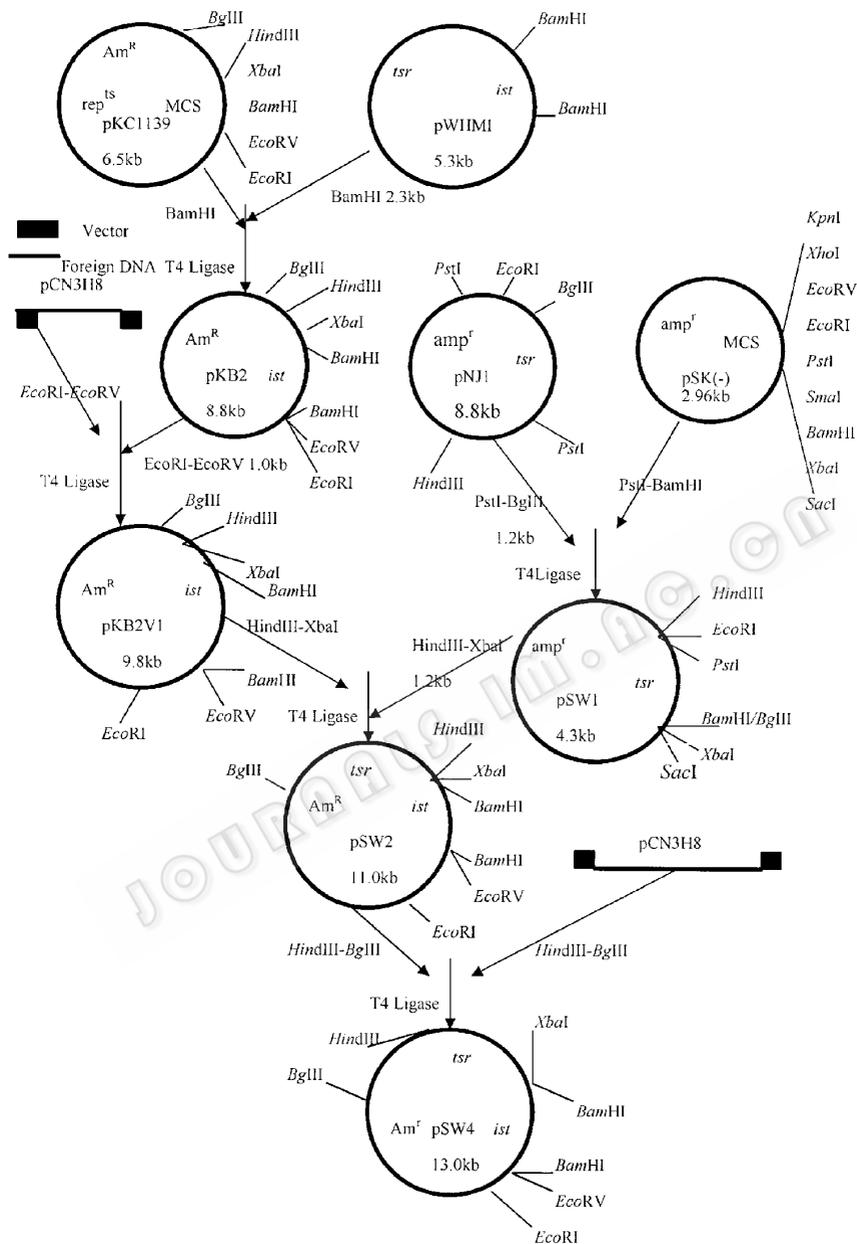


图 1 同源重组整合型质粒的构建路线

Fig. 1 Construction of integrated plasmids for homologous recombination

F21 的原生质体, 只有 pSW4 能获得稳定的转化子, 经反复筛选, 验证获得转化子 No. 28, 将 No. 28 孢子涂布平皿在 37°C 培养, 以硫链丝菌素 (Thio) 为抗性标记, 经反复纯化, 未获得仅在含 Thio (25 μg/mL) 平皿上生长, 而在含 Am (50 μg/mL) 平皿上完全不生长的菌株。所获得的菌株 WSJ-1 在含 Am 的平皿上仍有少量生长, 其生长量约为在含 Thio 平皿上的

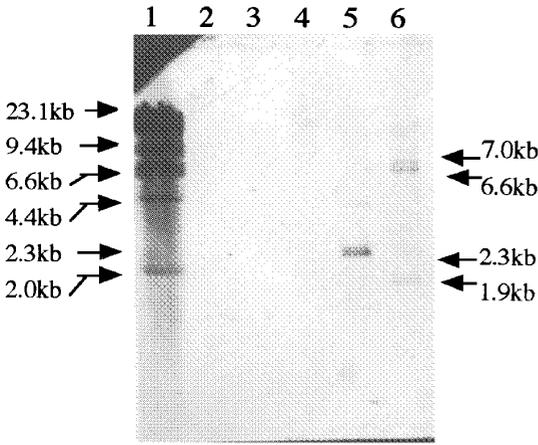


图 2 WSJ-1DNA 与异戊酰基转移酶基因 Southern 杂交分析

Fig. 2 Analysis of the chromosomal DNA of strain WSJ-1 by Southern hybridization using *ist* gene as a probe

1.  $\lambda$ DNA/*Hind* III ; 2. DNA of F21 ; 3. *Bam*HI-digested DNA of F21 ; 4. DNA of WSJ-1 ; 5. *Bam*HI-digested DNA of WSJ-1 ; 6. *Pst*I-digested DNA of WSJ-1

表 1 WSJ-1 菌种生长及发酵情况

Table 1 Growth status and fermentation potency of WSJ-1

No. of passages	Concentration of mycelium/ %	Fermentation potency/( $\mu$ g/mL)
F1	33	823
F2	35	950
F3	37	835
F4	28	803
F5	33	780
X $\pm$ SD	33.2 $\pm$ 3.35	838 $\pm$ 65.9
F2I(pWHMI)		450 $\pm$ 70.8

表 2 WSJ-1 菌种连续转种后在含 Thio 平皿上的菌落数

Table 2 Number of colony on the Thio-containing plates after successive passages of WSJ-1 strain

No. of passages	ThiC( + )	ThiC( - )
F1	760	740
F2	188	211
F3	101	91
F4	560	570
F5	440	470
X $\pm$ SD	409 $\pm$ 269	416 $\pm$ 264
F2I(pWHMI)	201	560

1/100( 7/800 ) 表明该株中大部分含异戊酰基转移酶基因的重组质粒已通过双侧的同源序列整合到宿主菌的染色体上,含质粒的细胞量极少。文献 6 曾报道有些菌株由于某些未知的因素,在利用温敏型质粒( pSG5 系列)进行同源重组实验时,不能得到完全的整合,本实验所用 *S. spiramyceticus* F21 可能属于这种情况。

### 2.3 分子杂交对同源重组的证明

提取 WSJ-1 的总 DNA,用 *Bam*HI, *Pst*I 酶切后,以 *ist* 基因作探针 Southern 杂交,结果见图 2, *ist* 基因与 *S. spiramyceticus* F21 总 DNA 及其 *Bam*HI 酶切片无杂交信号,而与 WSJ-1 的总 DNA 有杂交信号,

1 2 3 4 5 6 7 8

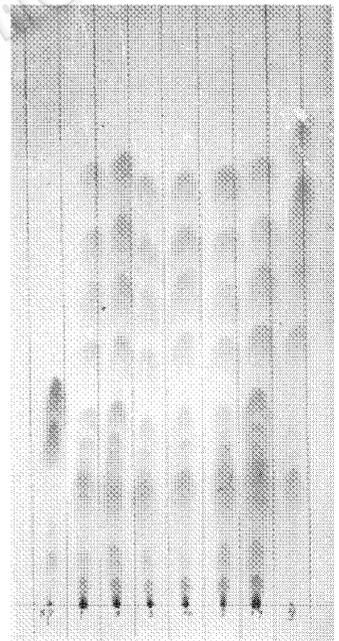


图 3 WSJ-1 转种不同代数发酵产生技霉素组分的薄层分析

Fig. 3 TLC of the fermentation products-biotechnycin of WSJ-1  
1. Spiramycin ; 2. F1 ; 3. F2 ; 4. F3 ; 5. F4 ; 6. F5 ; 7. F1 cultured in 37°C ; 8.

Biotechnycin

WSJ-1 DNA *Bam*HI 酶切 2.3kb 处出现强杂交信号,WSJ-1PstI 酶切杂交显示,除与游离质粒相同在 1.9kb 和 6.6kb 片段处有杂交信号外,约 7.0kb 处有一明显杂交带,表明外源基因以整合状态存在。

## 2.4 WSJ-1 遗传稳定性实验

**2.4.1 WSJ-1 的发酵稳定性:**将 WSJ-1 在不加压的情况下连续转种 5 代,测定菌丝生长浓度和发酵效价,结果见表一。并检测生技霉素的组分情况,结果(见图 3)。表明 WSJ-1 在不加压情况下连续转种其发酵情况不受影响,所产生的组分稳定,比较生技霉素原菌种 F21(*pWHM1*)发酵平均效价为 450 $\mu$ g/mL 左右,说明外源基因在 WSJ-1 中的稳定表达对生技霉素发酵效价的提高及组分的稳定均有促进作用。

**2.4.2 WSJ-1 所携带外源基因的稳定性:**菌种在不加压的情况下连续转种,然后在加 Thio 的平皿中计算其菌落数,结果见表 2。

结果表明 WSJ-1 在不加压情况下连续转种 5 次后,在加 Thio 和不加 Thio 的平皿上菌落数基本一致,生技霉素原菌种在加 Thio 平皿上菌落仅占未加药的 36.1%,说明外源基因在 WSJ-1 菌种中得到了稳定表达。

生技霉素稳定型基因工程菌的构建成功,是今后菌种进一步优化选育及开发研究的重要前提,也为生技霉素将来的产业化生产打下了良好基础。

## 参 考 文 献

- [1] J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, N Y, 1989.
- [2] 王以光,金莲舫,金文藻等. *生物工程学报* 1992, 8(1):1~14.
- [3] M. Bierman, R. Logan, K. O'Brien *et al.* *Gene*, 1992, 116:43~49.
- [4] 唐 莉,王以光,朱学蔚. *生物工程学报*, 1991, 7(1):24~31.
- [5] D. A Hopwood, M. J. Bibb, K. F Chater *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*, Norwich John Innes Foundation, U K, 1985.
- [6] Ginther Muth, Bernhard Nubaumer, Wolfgang Wohlleben *et al.* *Mol. Gen. Genet.*, 1989, 219:341~348.

## Construction of a Stable Bioengineered Strain of Biotechnycin\*

Shang Guangdong Dai Jianlu Wang Yiguang

(*Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS & PUMC, Beijing 100050*)

**Abstract** A stable bioengineered strain WSJ-1 of biotechnycin was constructed through homologous recombination using a temperature sensitive plasmid pKC1139. The ability of maintaining the *tsr* selective marker in the mycelium of WSJ-1 on the non-selective medium upon successive passages indicated that WSJ-1 was genetically stable. The growth status, fermentation potency as well as the fermentation product-biotechnycin components were greatly improved. Southern hybridization demonstrated the integrated status of the exogenous gene, the 4" isovaleryltransferase gene, into the chromosome of *S. spiramyceticus* F21.

**Key words** Biotechnycin, homologous recombination, bioengineered strain