

吸水链霉菌 NND-52-C 基因工程宿主载体系统的构建*

江 曙¹ 陈代杰² 戈 梅² 黄为一^{1**}

(南京农业大学微生物学系 南京 210095)¹ (上海来益生物药物研究开发中心 上海 201203)²

摘要: 吸水链霉菌 NND-52-C 菌株是大环内酯类抗生素-阿扎霉素 B 的高产菌株。采用原生质体转化技术, 将来自变铅青链霉菌 TK24 菌株的 pU702 质粒转化吸水链霉菌 NND-52-C 菌株的原生质体, 建立了吸水链霉菌 NND-52-C 菌株的基因工程宿主载体系统。确定了 NND-52-C 菌株原生质体制备和再生的条件, 其原生质体形成率达到 10^8 个/mL, 再生率约为 0.2%, 转化率为 $10^2 \sim 10^3$ 个转化子/ μg 质粒 DNA。

关键词: 吸水链霉菌 NND-52-C 菌株, 阿扎霉素 B, 原生质体转化, 宿主载体系统

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0038-05

Establishment of Host and Vector System for Genetic Engineering of *S. hygroscopicus* NND-52-C

JIANG Shu¹ CHEN Dai-Jie² GE Mei² HUANG Wei-Yi^{1**}

(Department of Microbiology, NanJing Agriculture University, NanJing 210095)¹

(Shanghai Health-Creation Centre for Biopharmaceutical R&D, Shanghai 201203)²

Abstract: *S. hygroscopicus* NND-52-C is a high production strain of azalomycin B. A transformator was obtained when pU702 from *S. lividans* TK24 was used to transform the protoplast of *S. hygroscopicus* NND-52-C by the protoplast transformation technology. So host and vector system for genetic engineering of NND-52-C strain was established. And the protoplast formation and regeneration conditions were determined. As a result, protoplast formation rate and regeneration rate reached 10^8 /mL and 0.2%, respectively. Transformation rate was $10^2 \sim 10^3$ / μg plasmid DNA.

Key words: *S. hygroscopicus* NND-52-C strain, Azalomycin B, Protoplast transformation, Host and vector system

链霉菌是抗生素的主要产生菌, 近年来链霉菌细胞融合技术以及链霉菌基因克隆系统的建立为链霉菌的研究或培育新的菌株开辟了广阔的前景。其中链霉菌原生质体转化技术的建立以及载体系统的发展, 大大促进了链霉菌基因克隆的研究, 目前许多链霉菌的抗性基因、抗生素生物合成基因都得到了克隆和表达^[1, 2]。

吸水链霉菌 NND-52-C 菌株是由本研究室从土壤中分离并经多次诱变育种而获得的一株阿扎霉素 B (Azalomycin B) 的高产菌株^[3]。吸水链霉菌是抗生素的主要产生菌之一, 有关该菌基因工程方面的研究报道较少, 而关于阿扎霉素 B 生物合成的分子生物学研究目前还未见有报道。本文主要是通过建立 NND-52-C 菌株的基因工程宿主载体系统, 从而为大环内酯类抗生素生物合成基因的克隆, 为导入强化有氧代谢的外源基因——血红蛋白 vgb 基因的研究奠定基础, 从而改善菌株的生物学特性, 提高抗生素的产量。

* 国家教委高教司博士学科点专项科研基金资助 (No. 93021)

** 联系人 Tel: 025-84395647, E-mail: microb@hjan.edu.cn

收稿日期: 2003-11-12, 修回日期: 2003-12-12

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 见表1。

表1 菌株和质粒的特征与来源

| 菌株和质粒 | 有关特征 | 来源 |
|---|---|----------------|
| 吸水链霉菌 NND-52-C (<i>S. hygroscopicus</i> NND-52-C) | 产阿扎霉素 B | 南京农业大学微生物学系 |
| 变铅青链霉菌 TK24 (<i>S. lividans</i> TK24) | 链霉菌基因克隆标准宿主菌 | 上海来益生物药物研究开发中心 |
| pIJ702 | 复制类型为 pIJ101 复制子, 5.6 kb, 拷贝数 40~300, Thio ^f mel ⁺ | 上海来益生物药物研究开发中心 |

1.1.2 培养基: R₂YE 培养基, 软琼脂培养基^[1]; YMB 培养基 (g/L): 酵母提取物 4, 麦芽抽提物 10, 葡萄糖 4, 微量元素 200 μL, 定容至 1L, pH 7.2; YMA 培养基: 在 YMB 培养基中加入纯化琼脂 2%。

1.1.3 抗生素、酶与主要试剂: 硫链丝菌素 (Thiostrepton, Thio), 在液体和固体培养基中的使用浓度分别为 5 μg/mL 和 50 μg/mL; 各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶来自大连 TaKaRa 公司, 溶菌酶来自上海生工生物工程有限公司; 主要生化试剂 TES、Tris 等均购自 Sigma 公司。

1.1.4 主要仪器设备: FR-200 紫外与可见分光分析装置 (复旦复日公司), DK-8D 型电热恒温水槽, 电泳仪 (双恒定时 DF-C II 型), 台式高速离心机 TGL-16G。

1.2 方法

1.2.1 链霉菌原生质体的制备与再生: 按文献 [1] 方法进行。

1.2.2 链霉菌质粒的分离与转化: 按文献 [1] 方法进行。

2 结果与分析

2.1 吸水链霉菌 NND-52-C 菌株原生质体制备及再生条件的建立

2.1.1 甘氨酸浓度: 甘氨酸在细胞生长过程中能取代细胞壁肽聚糖中的 D-丙氨酸残基, 破坏细胞壁肽聚糖链的交联, 引起细胞壁结构的不完整以便于酶解破壁, 并释放原生质体^[4]。在放线菌原生质体的制备中, 甘氨酸的添加浓度通常在 0.2%~4% 之间, 多数链霉菌在原生质体的制备过程中, 一般只添加 0.5% 的甘氨酸^[5], 而 NND-52-C 菌株能够耐受较高浓度的甘氨酸, 在甘氨酸浓度为 1.0% 时, 原生质体的形成率约达到 10⁸ 个/mL, 但随着甘氨酸浓度的提高, 菌丝生长受到不同程度的抑制 (表 2)。

表2 甘氨酸浓度对 NND-52-C 原生质体形成的影响

| 甘氨酸浓度 (%) | 菌丝湿重 (g/30 mL) | 原生质体产生量 (×10 ⁷ 个/mL) |
|-----------|----------------|---------------------------------|
| 0 | 1.12 | - |
| 0.5 | 1.23 | 0.80 |
| 1.0 | 1.04 | 7.90 |
| 1.5 | 0.82 | 0.60 |
| 2.0 | 0.51 | 0.01 |

2.1.2 菌龄:不同菌龄的菌丝体对溶菌酶的敏感程度不一样,其中对数生长期的菌丝体细胞壁对溶菌酶敏感,此时菌丝体内源性溶壁酶的分泌量可能加大,有利于原生质体的释放,此外对数期的菌丝活力高,制备的原生质体中内含物及细胞器缺损少,修复能力高,再生效果好,这一时期的菌丝体酶解释放的原生质体直径多为 $5-8\ \mu\text{m}$ ^[6];处于稳定期和衰老期的菌体,由于菌体老化,生理活性低,此时期制备的原生质体大小差异很大,再生能力差^[7]。本研究表明,NND-52-C菌株在摇瓶培养48 h后,开始进入对数生长期,从实验结果来看,用培养48 h的菌丝体制备的原生质体可获得最高的原生质体得率 8.5×10^7 个/mL。

2.1.3 溶菌酶:溶菌酶的浓度、处理时间以及处理温度会直接影响到原生质体的形成率。浓度过高,处理时间过长,都会造成原生质体的破裂;同时浓度太低以及处理时间过短,会造成对菌丝体的酶解不完全。随着溶菌酶浓度的提高,原生质体的形成率增大,当大于 $4\ \text{mg/mL}$ 时,则由于过高的浓度导致部分原生质体的裂解,从而降低了原生质体的产生量。链霉菌的酶解时间一般为 $1-2\ \text{h}$ ^[8],在本实验中,通过显微镜观察发现,酶解破壁30 min,仅有少量的原生质体形成;破壁60 min后形成的原生质体较多,但与菌丝体相连;破壁90 min时,几乎全是游离的原生质体;当再延长破壁时间,则会导致原生质体量的下降。由于实验用的溶菌酶在 35°C 以上酶活大大降低^[9],因此选择 $26^\circ\text{C}-34^\circ\text{C}$ 不同的温度进行菌丝体的脱壁实验。结果表明,随着酶解温度的上升,原生质体的形成率增大,最佳的酶解温度为 32°C 。当溶菌酶的浓度为 $4\ \text{mg/mL}$,酶解时间达到90 min以及酶解温度为 32°C 时,NND-52-C菌株的原生质体的生成量最高,达到了 1.0×10^8 个/mL。

2.1.4 渗透压:原生质体的再生都需要有较高的渗透压,一般通过调节蔗糖的浓度来改变培养基的渗透压。在蔗糖浓度为10.3%时,NND-52-C菌株的原生质体的再生率最高,达到了0.18%。

2.1.5 再生温度:过高的再生温度对原生质体再生不利,结果以菌体最佳生长温度 28°C 较好,3 d就出现了再生菌落,4 d时就可见白色菌丝(表3)。

表3 NND-52-C原生质体再生温度的比较

| 培养温度($^\circ\text{C}$) | 20 | 28 | 37 |
|--------------------------|------|------|------|
| 再生率(%) | 0.08 | 0.16 | 0.02 |
| 再生时间(d) | 5 | 3 | 3 |

2.1.6 再生方式:比较了玻棒涂布和软琼脂方法对NND-52-C菌株原生质体再生的影响,后者的再生率达到0.200%,明显高于前者0.019%的再生率,这可能是由于玻棒涂布会造成原生质体的机械损伤,导致原生质体的破裂,而软琼脂可以形成均一的包围原生质体的高渗透压和营养的环境,所以更有利于原生质体的再生。

2.2 pIJ702质粒转化NND-52-C菌株原生质体的转化条件

2.2.1 硫链丝菌素加入的时间:硫链丝菌素添加过早,由于抗性基因尚未表达,即使转化子中含有质粒也尚未表达抗性,而此时添加的抗生素就会抑制细胞的生长;而在28 h添加抗生素较为合适,可以筛选出较多的抗性转化子,这可能是由于再生已经基本完成,质粒已能够表达抗性;硫链丝菌素添加时间过晚,大量不含质粒的再生菌落已经长成,它们对所用的选择压力已不敏感,难以选出真正的阳性转化子。

2.2.2 NND-52-C孢子及原生质体对硫链丝菌素(Thio)的耐受性:在本次实验中,分

别设置了5种浓度的 Thio (10、20、30、40、50 $\mu\text{g/mL}$), 结果发现孢子在无 Thio 的对照平板上2~3 d就出现了大量的白色菌落, 而在含有 Thio 的平板上直到第7 d才看到少数的菌落; 原生质体在 Thio 浓度为40 $\mu\text{g/mL}$ 时, 完全抑制了菌落的生长(图1)。

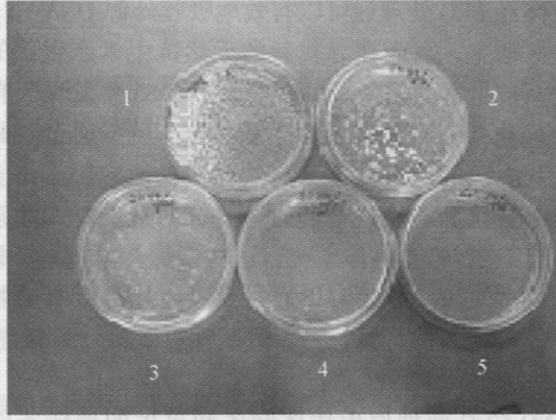


图1 原生质体对 Thio 的耐受性

Thio 浓度 ($\mu\text{g/mL}$): 1 10, 2 20, 3 30, 4 40, 5 50

2.2.3 pIJ702 对 NND-52-C 菌株原生质体的转化: 将 pIJ702 转化 NND-52-C 菌株原生质体的软琼脂快速而均匀地倒在再生平板上, 结果长出了抗性菌落(图2)。挑取抗性菌落经液体培养, 收集菌丝, 并进行质粒的提取、电泳和酶切验证, 结果表明电泳图谱中第5号为阳性克隆, 与标准 pIJ702 质粒的条带完全一致, 并经过 *Bam*HI 单酶切后, 条带大小为5.6 kb左右(图3, 图4), 从而获得了一株转化子 NND-T。以上这些研究为将血红蛋白 *vgh* 基因导入 NND-52-C 菌株原生质体的进一步研究奠定了基础。

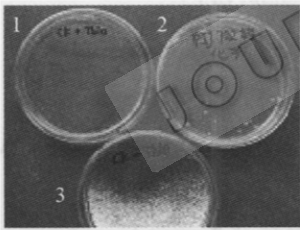


图2 pIJ702 对 NND-52-C 原生质体的转化

1 未经转化的 NND-52-C 原生质体再生平板(含 Thio), 2 已转化的 NND-52-C 原生质体再生平板(含 Thio), 3 未经转化的 NND-52-C 原生质体再生平板(无 Thio)

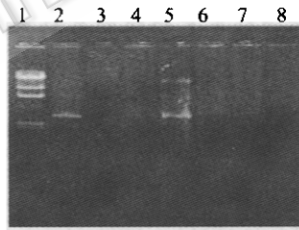


图3 转化子的电泳验证

1 Marker ($\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$), 2 TK24/pIJ702, 3 NND-52-C, 4~8 不同的抗性菌株

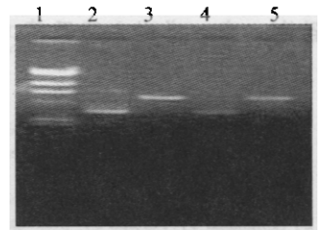


图4 转化子的酶切

1 Marker ($\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$), 2 TK24/pIJ702, 3 TK24/pIJ702 (*Bam*HI 酶切), 4 NND-52-C/pIJ702, 5 NND-52-C/pIJ702 (*Bam*HI 酶切)

2.3 转化子的稳定性

将转化子 NND-T 在无 Thio 的平板上传代5次, 并分别点种到相应的含有 Thio 的平板上, 存活率下降了36.4%; 同时将转化子 NND-T 直接在含有 Thio 的平板上传代5次, 存活率仅仅下降了7.8%。因此在基因工程菌的保存中, 加入选择性压力, 有助于保证其稳定性。

3 讨论

近年来,随着基因克隆技术的不断完善和对链霉菌基因表达研究的逐步深入,已发现链霉菌的原生质体经 PEC 处理后可以有效地吸收外源 DNA^[4],成为重组 DNA 技术中表达异源基因的良好宿主,从而在寻找新的天然抗生素产生菌的同时,又开辟了利用重组克隆技术产生新抗生素的途径。Bibb 等人于 1985 年发现当有 PEG 存在时,质粒 DNA 能以很高的频率转化变铅青链霉菌原生质体^[1],后来通过对影响转化过程的各个参数的优化以及对转化方法的改进,这一方法已成功地应用于许多种链霉菌研究,目前该方法仍然是链霉菌转化和转染的基础。通过 PEG 介导的原生质体转化技术,建立了 NND-52-C 菌株的基因工程宿主载体系统,这对于遗传学背景不清楚的链霉菌的分子生物学研究具有重要的意义,一方面可以通过克隆阿扎霉素 B 生物合成途径中的关键酶基因,从而提高阿扎霉素 B 的产量;另一方面还可以将外源有益基因导入到 NND-52-C 菌株中,改善该菌株的生物学特性。

在本实验中, NND-52-C 菌株原生质体制备和再生的最佳条件为:适宜的菌龄为 48h,甘氨酸浓度 1.0%,溶菌酶浓度 4mg/mL,溶菌酶处理时间和温度分别为 90 min 和 32℃,蔗糖浓度 10.3%,再生温度 28℃。在 NND-52-C 菌株原生质体的制备过程中,不论是甘氨酸的加入量,还是溶菌酶的使用浓度以及处理时间,比变铅青链霉菌原生质体制备的要求都较高,这说明 NND-52-C 菌株的细胞壁对溶菌酶的敏感度较低,尽量缩短溶菌酶的处理时间以防止原生质体的破裂,从而有助于提高原生质体的形成率和再生率。因此可以认为对于溶菌酶不敏感的链霉菌原生质体的制备和再生,本研究将提供有益的经验。

致谢 衷心感谢上海医药工业研究院朱春宝研究员对本论文所给予的精心指导。

参 考 文 献

- [1] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F, et al. *Genetic Manipulation of Streptomyces*, A Laboratory Manual. London: John Innes Foundation, 1985.
- [2] Shimshama T, Furuma T, Okanishi M. *Agr Biolchem*, 1981, 45 (5): 1271 ~ 1273.
- [3] 严淑玲, 黄为一, 武济民, 等. 中国抗生素杂志, 2001, 26 (3): 161 ~ 164.
- [4] 邓子新. 中国抗生素杂志, 1990, 15 (3): 231 ~ 235.
- [5] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学. 福州: 福建科学技术出版社, 1991.
- [6] Nombela C. *Microbial cell wall synthesis and autolysis*, Netherlands: Elsevier Science Publishers B. V., 1984.
- [7] 贺筱蓉, 黄小倩. 生物学通报, 1998, 33 (1): 40 ~ 41.
- [8] Baltz H R, Matsushima P. *J General Microb*, 1981, 127: 137 ~ 146.
- [9] 倪孟祥, 刘 娜, 顾觉奋, 等. 中国药科大学学报, 2001, 32 (6): 462 ~ 467.