

斑贝链霉菌接合转移系统的构建及透明颤菌血红蛋白基因的表达对其次级代谢的影响

凌华云¹ 闵勇¹ 熊伟¹ 吕和平² 喻子牛¹ 郑应华^{1,2*}

(华中农业大学微生物国家重点实验室 武汉 430070)¹

(北京生物医药研究所 北京 100091)²

摘要: 以 pSET152 和 pHZ1358 为出发质粒, 通过供体大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002) 和 S17-1 接合转移斑贝链霉菌 (*Streptomyces bambergiensis*), 构建和优化了接合转移体系。采用 OOE-PCR 技术构建含 *ermEp** 与 *vhb* 结构基因融合片段的整合型表达载体 pBIB2005, 转化 ET12567 (pUZ8002) 后, 属间接转移至斑贝链霉菌。通过 PCR、CO 结合差光谱验证 *vhb* 基因在斑贝链霉菌中整合表达。摇瓶发酵显示 Vhb 蛋白能改善菌体对氧的需求, 一定程度上促进细胞生长, 提高抗生素产量。

关键词: 斑贝链霉菌, 接合转移, *vhb* 基因, OOE-PCR, CO 结合差光谱

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0059-06

Construction of Conjugal Transfer System of *Streptomyces bambergiensis* and the Effects of Expression of Vitreoscilla Hemoglobin on its Secondary Metabolites

LING Hua-Yun¹ MIN Yong¹ XIONG Wei¹ LI He-Ping²
YU Zi-Niu¹ ZHENG Ying-Hua^{1,2*}

(National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology,

Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)¹

(Beijing Institute of Biomedicine, Beijing 100091)²

Abstract: Intergeneric transfer of plasmid vectors pSET152 and pHZ1358 from Donor *E. coli* ET12567 (pUZ8002) and S17-1 to *Streptomyces bambergiensis* was demonstrated and optimized. Integrating plasmid pBIB2005 containing *ermEp** and construction gene of *vhb*, constructed by OOE-PCR, was transformed to ET12567 (pUZ8002), and then transferred to *Streptomyces bambergiensis* by conjugation. The integrating expression of *vhb* gene in *Streptomyces bambergiensis* was verified by PCR and CO binding difference spectrum. The fermentation results showed Vhb could improve oxygen demand, promote cell growth and enhance antibiotics production.

Key words: *Streptomyces bambergiensis*, Conjugal transfer, Vitreoscilla hemoglobin gene, OOE-PCR, CO binding difference spectrum

斑贝链霉菌 (*Streptomyces bambergiensis*) 是一种具有典型生长周期, 但在不同培养基与培养条件下表现不同产孢和生长特性的链霉菌。其次级代谢产物—默诺菌素, 是一类磷酸糖脂类抗生素。它主要作用于革兰氏阳性细菌, 作用机理是抑制细菌细胞壁肽聚糖合成过程中的转糖基反应, 是目前发现的唯一一种作用于 PBP_{1b} 的抗生素^[1]。斑贝链霉菌发酵是一个严格好氧的过程, 但其菌丝体的结构致密性和发酵培养基的高粘稠性, 往往使溶氧受限制, 严重制约着抗生素效价的提高。

* 通讯作者 Tel: 010-88546172, E-mail: zhengyh98@vip.sina.com.

收稿日期: 2005-12-21, 修回日期: 2006-02-16

近年来,接合转移作为一种基因转移手段已在多种链霉菌中成功应用^[2]。它不仅避开胞外核酸酶,使DNA免遭核酸酶的降解,在某种程度上克服宿主对外源DNA的限制性障碍;而且操作程序相对简单,是一种很有潜力的基因转移方法。

透明颤菌血红蛋白(Vitreoscilla hemoglobin, Vhb)是一种研究透彻,应用广泛的原核生物血红蛋白,其来源于一种能在厌氧环境中生存的专性好氧菌—透明颤菌(*Vitreoscilla* sp.)^[3]。研究发现Vhb蛋白具有与氧接合和传递氧的能力,使透明颤菌能生存于贫氧环境中,基于这一特性,vhb基因已在多种异源宿主,包括细菌,酵母,动植物细胞中成功表达,它能明显改善异源宿主在限氧条件下的生长,提高宿主生物量和促进次级代谢^[4,5]。

本研究首次探索了斑贝链霉菌的接合转移系统,并进行了优化;随后采用基因工程手段,使vhb基因在斑贝链霉菌中整合表达,利用Vhb蛋白很好的氧结合与载氧能力来解决斑贝链霉菌发酵过程中溶氧供求矛盾,以期能促进菌体的生长和提高默诺菌素效价。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株、质粒:斑贝链霉菌实验菌株由中牧实业股份有限公司提供;大肠杆菌JM109为基因克隆受体菌,大肠杆菌S17-1(recA RP4)和大肠杆菌ET12567(pUZ8002)(recF dam⁻ dcm⁻ cml)为接合转移供体菌,以上大肠杆菌均为本实验室保存。整合型载体pSET152和复制型载体pHZ1358^[6]由本实验室保存。整合载体pBIB2004(ermEp^{*} + vhb)由本实验先前构建。

1.1.2 培养基:斑贝链霉菌液体培养基TSB配制参见文献[6],产孢培养基SMK,摇瓶培养基和发酵培养基由中牧实业股份有限公司提供,大肠杆菌培养基LB、LA参见文献[7]。

1.1.3 抗生素,酶和试剂:LB中氨苄青霉素使用终浓度为100μg/mL,安普霉素为50μg/mL,氯霉素为25μg/mL,卡那霉素为50μg/mL;接合转移培养基中安普霉素为30μg/mL;硫链丝菌素为10μg/mL;萘啶酮酸为25μg/mL。本研究中所用的各种限制性内切酶和T4DNA连接酶均购自TaKaRa,DNA回收试剂盒购自SBS公司。默诺菌素标准品由中牧实业股份有限公司惠赠。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌与斑贝链霉菌属间接接合转移体系的构建及优化:参见文献[6]。

1.2.2 重组质粒pBIB2005构建:根据GenBank公布的vhb基因和ermEp^{*}序列设计引物CP1,CP2,MP1,MP2,均由上海生物工程技术有限公司合成。为了便于基因克隆,在CP1和CP2引物5'端分别引入Xba I和EcoR I位点(下划线部分):CP1:CGT CTA GAG GTA CCA GCC CGA CCC GAG CAC;CP2:CGG AAT TCA TGC CAA GGC ACA CCT GAA G;MP1: AAC CGG CAC GAT TGT GCC CAC AAC AGC ATC;MP2: ATG CTG TTG TGG GCA CAA TCG TGC CGG TTG。根据OOE-PCR(One-step Overlap Extension PCR)定点诱变原理扩增得到ermEp^{*} + vhb基因片断。经EcoR I和Xba I双酶切后连接到pSET152上,蓝白斑筛选得克隆子,酶切分析,并经测序验证。序列测定由上海生物工程技术有限公司完成。PfuDNA聚合酶PCR条件为:PCR1:98℃ 2min;98℃ 30s,61℃ 45s,72℃ 30s,30个循环;72℃,5min。PCR2:98℃ 2min;

98℃ 30s, 61℃ 45s, 72℃ 60s, 30个循环; 72℃, 5min。PCR3: 98℃ 2min; 98℃ 30s, 61℃ 45s, 72℃ 90s, 30个循环; 72℃, 5min。

1.2.3 *vhb* 基因整合表达的 PCR 验证及表达产物 VHb 蛋白的 CO 结合差光谱: 按参考文献 [6], 提取斑贝链霉菌总 DNA 为模板, 以 CP1, CP2 为引物 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳分析验证; VHb 定性分析用 CO 结合差光谱分析方法, 参见参考文献 [3]; 定量参考公式: $C_v (\text{nmol/g}) = \Delta A \times 10^6 / (\Delta \epsilon b C_0)$ (其中 C_v 为湿菌体中所含 VHb 的量, $\Delta \epsilon = 274/\text{cm} \cdot \text{mol/L}$, $b = 1\text{cm}$, C_0 为湿菌体质量浓度 mg/mL) [3]。

1.2.4 VHb 蛋白对斑贝链霉菌菌体生长和产素水平的影响: 菌丝体浓度的检测采用核磁值测定法, 参见文献 [8]。抗生素效价测定采用 HPLC 法。HPLC 条件: 色谱柱为 C_{18} ; 检测波长: 258nm; 流速: 1 mL/min; 流动相: 0.1% 的甲酸铵、55% 的乙腈溶液。

2 结果

2.1 斑贝链霉菌接合转移系统的建立和优化

以孢子和菌丝体为受体形式, 分别选取 TSB 琼脂, R_2 YE, R_6 , MS, SMK 等为接合转移培养基, 结果显示菌丝体在任何培养基上几乎不长出接合子, 而孢子则在 SMK 上可长出上百个接合子, 其它培养基上几乎不长或仅长出零星几个 (数据略)。所以 SMK 为最佳的接合转移培养基。

实验还发现, 抗生素覆盖时间对接合转移效率影响明显。在本实验条件下, 19h 覆盖效果最佳。时间少于 19h, 接合转移还不完全, 而且基内菌丝生长还不牢固, 容易刮除; 时间长于 19h, 如果菌丝体生长过旺, 容易混在一起, 难于分辨单菌落, 而当大肠杆菌生长过旺时, 则抑制了菌丝体的生长, 使接合效率偏低。

选取细胞量为 10^8 的 ET12567 (pUZ8002) 和 S17-1 分别与孢子浓度为 $10^6 \sim 10^9$ 的斑贝链霉菌进行接合转移。实验结果 (表 1) 表明: 以 S17-1 为供体菌几乎没有接合子; 以 ET12567 (pUZ8002) 为供体接合效率则明显高于 S17-1, 说明采用非甲基化的大肠杆菌接合转移效果好, 可能是有效避免了受体菌的特异性甲基化限制系统的缘故, 这与 Zotchev 等的报道一致 [9]。所以无论是整合型载体还是复制型载体, 通过非甲基化供体大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002), 接合转移效率都明显高于供体 S17-1 是可以解释的。在以 ET12567 (pUZ8002) 为供体情况下, 复制型载体 pHZ1358 接合效率低于整合型载体 pSET152, 可能是因为 pHZ1358 是高不稳定 Sti^+ 载体的缘故。

表 1 ET12567 (pUZ8002) 和 S17-1 为供体的接合转移比较

供体 ¹	质粒载体	受体孢子量 ²	接合子量	接合效率 ³
ET12567 (pUZ8002)	pSET152	10^8	282	2.82×10^{-6}
	pHZ1358	10^9	118	1.18×10^{-7}
S17-1	pSET152	10^9	0	$< 1 \times 10^{-9}$
	pHZ1358	10^9	0	$< 1 \times 10^{-9}$

1 所有实验中供体大肠杆菌量为 10^8 , 2 选取接合平板上肉眼可分辨的、单菌落在 30 ~ 300 间的受体孢子量进入统计, 3 接合转移效率用接合子数/受体孢子量表示, 数据均取 3 次实验的平均值

经实验确定, 适合的属间接合转移为大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002) / 斑贝链霉菌。以 pSET152 为出发质粒时, 其优化体系为: 选取供体菌/受体孢子为 10^8 ; 10^8 。供体大肠杆菌过夜培养转接含抗生素的 LB 中, 37℃ 培养至 OD_{600} 为 0.6, 收集菌体, 新鲜 LB 洗涤两次, 再用 0.1 倍体积 LB 悬浮备用; 链霉菌孢子悬浮于 500 μL 2 × YT 中, 50℃ 热

激 10min, 冰上冷却后与备用大肠杆菌混匀, 涂布于含安普霉素终浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SMK 培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 19h 后, 用无菌水洗下表面的大肠杆菌, 可见菌丝仍粘附在琼脂上, 接着用含安普霉素为 1,000 μg , 萘啶酮酸为 800 μg 的 1mL 无菌水覆盖, 吹干后继续培养 30h 长出潜在接合子。

2.2 重组载体 pBIB2005 的构建

根据报道^[10], 在 *ermE* 启动子-35 区 TGG 密码子缺失后, 启动子活性明显增强。利用 OOE-PCR 定点诱变原理^[11] (图 1) 产生-35 区 TGG 缺失的 *ermEp** + *vhb* 基因片断。以 pBIB2004 为模板, 利用 Pfu DNA 聚合酶, 以 CP1 和 MP1 为引物扩增出 274bp 的 PCR1; 以 CP2 和 MP2 为引物扩增出 655bp 的 PCR2。再以 PCR1 和 PCR2 纯化产物为模板, CP1 和 CP2 为引物扩增出 900bp 左右的 *ermEp** + *vhb* (图 2), 酶切克隆到 pSET152 上, 蓝白斑筛选得到克隆子 pBIB2005 (图 3), 酶切分析 *vhb* 基因已成功克隆到载体上 (图 4)。以 CP1 为引物对 pBIB2005 进行反应的测序, 与预期结果完全一致。

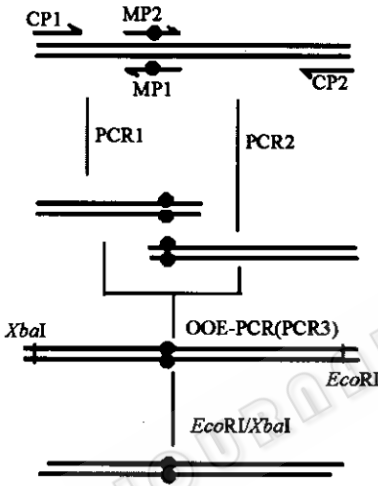


图 1 OOE-PCR 定点诱变示意图
TGG 缺失

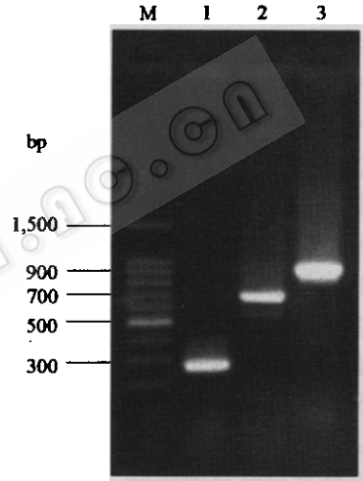


图 2 OOE-PCR 产物分析
M 100bp DNA ladder marker, 1 PCR1 产物, 2 PCR2 产物, 3 PCR3 产物

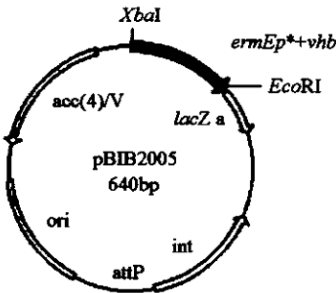


图 3 质粒 pBIB2005 图谱

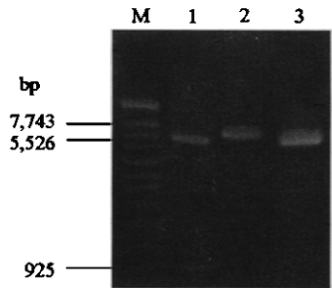


图 4 质粒 pBIB2005 酶切分析
M Lambda-pUC mix marker, 1 pBIB2005 *EcoRI*/*XbaI* 双酶切产物, 2 pBIB2005 *EcoRI* 酶切产物, 3 pSET152 *EcoRI* 酶切产物

2.3 *vhb* 基因在斑贝链霉菌中的整合表达

重组质粒 pBIB2005 含有整合位点 attP, 可特异性整合于斑贝链霉菌染色体上 attB 位点, PCR 验证 *vhb* 基因已成功整合到染色体上, 并将重组菌株在无选择压力下连续传代 10 次后提取总 DNA, 以此为模板, PCR 验证表明 *vhb* 基因仍稳定整合在染色体上 (图 5)。CO 结合差光谱检测细胞粗提物 Vhb 蛋白活性, 发现在 420nm 处均有一个特征吸收峰 (图 6), 表明表达的 Vhb 蛋白具有生物活性。

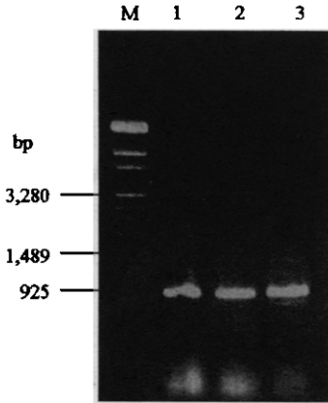


图 5 *vhb* 基因整合表达验证

M Lambda-pUC mix marke, 1 pBIB2005 为模板 PCR 产物, 2 工程菌株总 DNA 为模板 PCR 产物, 3 传代 10 次工程菌株总 DNA 为模板 PCR 产物

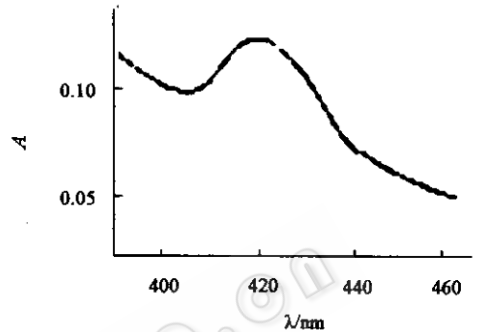


图 6 重组斑贝链霉菌细胞粗提物 CO 差光谱实验

2.4 Vhb 蛋白对斑贝链霉菌生长及次级代谢的影响

在斑贝链霉菌接合转移平板上挑取接合子, 扩大培养后, 以原工业菌株 F 为对照, 采用摇瓶发酵生测法初筛得到工程菌株 B₁。CO 结合差光谱测吸光值为 0.038, 通过公式计算得 Vhb 表达量为 10.55nmol/g 湿菌丝体。在 500 mL 三角瓶中, 以 50mL、75mL、100mL 三种不同装量来检测 Vhb 蛋白对菌丝体生长及产素的影响。在 37℃, 转速为 220r/min 的摇床上发酵 7d 后, 检测核酸值与效价。结果表明 (表 2): 溶氧水平对菌体生长和抗

表 2 原工业菌株和工程菌株摇瓶发酵比较*

菌株	摇瓶装量 (mL)	核酸值 (g/L)	效价 (μg/mL)
F	50	1.37	5400
	75	1.22	5025
	100	1.04	4050
B ₁	50	1.40	5525
	75	1.30	5350
	100	1.15	4725

* 表中数据为 3 次重复实验结果的平均值

生素合成有很大影响。不同装量水平, 核酸值和效价差异明显, 随着装量增加, 工程菌株 B₁ 与对照菌株 F 的核酸值和效价都呈下降趋势, 但 B₁ 的下降趋势明显比 F 缓和。在同一装量下, 工程菌株 B₁ 的核酸值和效价都比对照菌株 F 相应高, 说明 Vhb 蛋白对菌体生长和抗生素的合成有促进作用。

3 讨论

链霉菌是一类具有重要经济价值的革兰氏阳性细菌, 能产生多种抗生素和生物活性物质。然而大多数链霉菌具有限制修饰系统, 外源基因或质粒很难转化或转化效率很低, 而且原生质体转化操作复杂, 易受胞外核酸酶和一些重金属离子的影响, 难掌

控;在接合转移中,通过非甲基化供体菌如 ET12567 (pUZ8002),消除甲基化影响,可以明显提高基因导入效率,而且程序相对简单,宿主范围更广泛。本实验首次探索了大肠杆菌/斑贝链霉菌接合转移系统,利用大肠杆菌与链霉菌间穿梭质粒,转化 ET12567 (pUZ8002),然后接合转移斑贝链霉菌,优化接合转移条件,发现斑贝链霉菌接合转移效率很高。所以接合转移可成为斑贝链霉菌基因转移的首选方法之一。

实验中利用整合型载体将 *vhb* 基因整合入链霉菌染色体上,以有效避免外源质粒对次级代谢的抑制作用,即“质粒效应”^[12];同时也可使外源基因稳定表达,不需要抗生素选择以保持其稳定存在。

由于 *vhb* 基因自身携带的启动子在链霉菌中无法识别,所以实验中选择在链霉菌中公认的强启动子 *ermEp**。实验表明, *vhb* 基因成功在链霉菌中表达,并且表达量也达发挥生理作用水平。在摇瓶发酵实验中,当氧成为生长限制因素时, Vhb 蛋白能提高呼吸效率,促进细胞生长,一定水平上提高抗生素效价。但还需进一步大量实验筛选,才有望得到具工业应用价值的工程菌株。至于 Vhb 蛋白发挥正效应的最低表达水平,最高表达水平和最适表达水平尚未得出结论,还需进一步实验确认。

vhb 基因具有很大的应用价值,但要在发酵工业上真正应用起来还需要不断改进,如进行启动子改造,使其自身受氧调控的启动子在原核、真核生物中都发挥作用,从而直接受溶氧水平调控,经济且实用。*vhb* 基因的融合表达可使融合蛋白带有特征性红色,可用来作为外源基因表达的报告系统和纯化标签,同时,由于其在 420nm 具有特征性吸收峰和大量表达可使菌体着红色,也为发酵在线检测、环境监测等提供了一种新的检测手段。

目前,斑贝链霉菌分子遗传学研究甚少,所以从分子水平上定向改造工业菌株的困难仍然很大,因而加快其分子生物学,如抗生素合成基因簇、调控因子及其机制等方面的研究是今后工作的热点和重点之一。

参考文献

- [1] Schuricht U, Endler K, Welzel P. *et al.* J Prakt Chem, 2002, 342 (8): 761 ~ 772.
- [2] 吴胜,夏焕章. 生物工程进展, 2002, 22 (1): 91 ~ 94.
- [3] 于慧敏,沈忠耀. 微生物学报, 1999, 39 (5): 478 ~ 482.
- [4] 焦瑞身. 生物工程学报, 2003, 19 (4): 382 ~ 386.
- [5] 朱怡非,朱春宝,朱宝泉. 中国医药工业杂志, 1998, 29 (6): 253 ~ 258.
- [6] Kieser T, Bibb M J, Butter M J, *et al.* Practical Streptomyces Genetics, Norwich: the John Innes Foundation, 2000.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] 李建武,肖能庚,余瑞元,等. 生物化学实验原理和方法. 北京:北京大学出版社, 1994. 403 ~ 404.
- [9] Zotchev S B, Hutchinson C R. J Bacteriol, 1995, 177 (16): 4809 ~ 4812.
- [10] Bibb M J, White J, Ward J M. Mol Microbiol, 1994, 14 (3): 533 ~ 545.
- [11] Urban A, Neukirchen S, Jaeger K E. Nucl Acids Res, 1997, 25 (11): 2227 ~ 2228.
- [12] Baltz R H. Trends Microbiol, 1998, 6 (2): 76 ~ 83.