

# 柔红霉素产生菌 SIPI-DM 中 *dnmV* 的基因置换

尚珂<sup>1</sup> 张伟<sup>2</sup> 朱春宝<sup>1</sup> 朱宝泉<sup>1</sup> 胡又佳<sup>1\*</sup>

(1. 上海医药工业研究院创新药物与制药工艺国家重点实验室(筹) 上海 200437)

(2. 福州大学生物科学与工程学院 福建 福州 350108)

**摘要:** *dnmV* 基因编码柔红霉素生物合成途径中 TDP-柔红糖胺 C4 酮基还原酶。阻断基因组上的 *dnmV* 基因并导入源于阿维菌素生物合成途径的 *aveBIV* 基因可构建得到表柔红霉素工程菌。本文从高产的柔红霉素产生菌 SIPI-DM 中分别扩增 *dnmV* 基因两侧同源交换臂, 并在两侧交换臂中插入 *aveBIV* 基因构建用于置换 *dnmV* 基因的同源双交换重组质粒。经筛选及验证得到 *aveBIV* 基因直接置换 *dnmV* 基因的表柔红霉素工程菌, 且该工程菌基因组上不引入抗性基因, 有利于进一步的基因改造。

**关键词:** 表柔红霉素, *dnmV*, 基因置换

## Gene Replacement of *dnmV* in Daunorubicin Producer SIPI-DM

SHANG Ke<sup>1</sup> ZHANG Wei<sup>2</sup> ZHU Chun-Bao<sup>1</sup> ZHU Bao-Quan<sup>1</sup> HU You-Jia<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China)

(2. College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

**Abstract:** C4-keto reduction in the TDP-daunosamine pathway of daunorubicin biosynthesis was catalyzed by DnmV ketoreductase. Epidaunorubicin producer has been constructed previously by disruption of *dnmV* gene and integration of *aveBIV* originated from biosynthesis pathway of avermectin. In this work, *dnrIJ* and *dnmZU* were amplified from genome of SIPI-DM, a high-daunorubicin producer. Recombinant plasmid pYG838 was constructed with *aveBIV* insertion between these two genes, which used as homologous recombinant arms. After screening and validation, an epidaunorubicin producer with *dnmV* replacing by *aveBIV* which is genetically and metabolically stable was obtained. The lack of antibiotic resistant marker in chromosome of this mutant will be helpful for further gene disruption.

**Keywords:** Epidaunorubicin, *dnmV*, Gene replacement

柔红霉素及其为原料合成的阿霉素 (Doxorubicin) 及表阿霉素 (Epirubicin) 是目前临床上

十分重要的抗肿瘤抗生素。目前工业生产表阿霉素主要采用以柔红霉素为原料, 化学半合成方法生产,

工艺较复杂, 技术难度较大, 环保达标成本较高<sup>[1]</sup>。如果以表柔红霉素代替柔红霉素作为合成原料可以节省合成中十分繁琐的一步——C4 羟基对映异构体分离。因此, 表柔红霉素就成为表阿霉素合成过程中的一个重要中间体。

在之前的工作中我们曾经通过同源重组单交换使柔红霉素产生菌 SIPI-1482 中 *dnmV* 基因功能阻断, 同时将 *aveBIV* 基因及安普霉素抗性基因整合入染色体得到表柔红霉素工程菌<sup>[2]</sup>。但由于单交换菌株在传代过程中可能发生回复突变, 且在染色体上引入抗性基因会限制工程菌的进一步基因改造, 因此我们采用新的重组策略, 在相对高产的柔红霉素产生菌 SIPI-DM 中通过筛选双交换菌使 *aveBIV* 直接替代 *dnmV* 在染色体上的位置, 得到稳定遗传的表柔红霉素工程菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒:** pMD19-T 购自大连 TaKaRa 公司; pYG816: 参见文献<sup>[2]</sup>(红霉素抗性基因启动子+*aveBIV* 基因+安普霉素抗性基因, *dnmV* 基因交换臂); pYG813: 安普霉素抗性基因克隆至 pUC18 中, 本实验室保存。

**1.1.2 菌株:** 大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$ , 柔红霉素产生菌天蓝淡红链霉菌(*Streptomyces coeruleorubidus*) SIPI-DM, 本实验室保存。

**1.1.3 工具酶:** 限制性内切酶, *Taq* 酶、LATAq 酶和连接酶购自 TaKaRa 公司。

**1.1.4 培养基和抗生素:** 大肠杆菌的培养基为 LB。抗生素浓度为: 氨苄青霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  或安普霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。链霉菌液体培养基采用 YMB, 原生质体再生培养基为 R<sub>2</sub>YE, 固体培养基为高氏 1 号。用于链霉菌转化子选择的抗生素浓度为安普霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。SIPI-DM 种子培养基及发酵培养基参见文献<sup>[3]</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 基础方法:** 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化及常规的 DNA 克隆操作参照文献<sup>[4]</sup>, 链霉菌的总染色体和质粒 DNA 的提取参照文献<sup>[5]</sup>。质粒碱变性条件参照文献<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 引物设计与 PCR 条件:** 重组质粒中 *dnmV* 基因上游同源区段 *dnmZU* 及部分 *dnmV* 基因连锁片段扩增引物 ZUV1: 5'-GTCCACCGCGCTAGAGATGT-3', ZUV2: 5'-ATGTCTGCCTCACCCGTC-3'。*dnmV* 基因

下游同源区段 *dnmIJ* 连锁基因片段扩增引物 IJ1: 5'-GGACTCCGTCCACAGCATGT-3', IJ2: 5'-GAAATATGCCACCTGCTGACG-3'。PCR 反应条件: 97°C 变性 5 min; 95°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。

**1.2.3 重组质粒的构建:** PCR 扩增得到的 *dnmV* 基因上游及下游同源片段分别连入载体 pMD19-T 中得质粒 pYG833 及 pYG832。在质粒 pYG832 中 *dnrIJ* 基因上游 *Kpn* I 与 *Xba* I 位点之间依次连入 *dnmV* 基因上游同源片段 *dnmZU* 及来源于质粒 pYG816 的 *aveBIV* 基因和安普霉素抗性基因。构建所得质粒命名 pYG836。限制性内切酶 *EcoR* I 部分酶切 pYG836 质粒后回收约 8 kb 片段并自身环化连接, 再以 pYG813 质粒中安普霉素抗性基因片段(*Sca* I-*Xba* I) 替代所得质粒对应区段, 以安普霉素及氨苄青霉素作为筛选标记共同筛选目的克隆。

**1.2.4 阻断株验证:** PCR 验证采用扩增引物分别为 *dnmUV1*、*dnmUV2* 参见文献<sup>[7]</sup>。PCR 反应条件: 97°C 变性 5 min; 95°C 1 min, 61°C 1 min, 72°C 3 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。选用 LATAq 酶及其推荐的反应体系。Southern blotting 杂交验证将出发菌株 SIPI-DM 以及双交换株 11-12 的基因组提取后分别用 *Nco* I 和 *Xba* I 酶切, 同时未酶切的基因组与 pYG838 质粒(单酶切)作为对照一起电泳后转膜, 再以 *aveBIV* 基因中约 200 bp 片段扩增后作为探针进行杂交, 步骤参见文献<sup>[4]</sup>。

**1.2.5 发酵过程及发酵产物的提取:** 参见文献<sup>[3]</sup>。

**1.2.6 HPLC 分析方法:** 色谱柱: Waters Symmetry® C18 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 150 mm; 流动相: 甲醇:水=56:44 (V/V), 含 1.25% 的冰醋酸, 0.25% 的三乙胺。样品用孔径 0.22  $\mu\text{m}$  的偏氟膜过滤。流速: 1 mL/min, 检测波长: 254 nm, 柱温: 35°C。

## 2 结果

### 2.1 *dnmV* 基因上下游同源片段的 PCR 扩增

柔红霉素生物合成基因在染色体上成簇分布, *dnmV* 基因两侧基因分布如图 1 所示<sup>[8]</sup>, 通过同源重组双交换阻断 *dnmV* 基因需分别克隆其上下游足够长度的同源片段作为两侧交换臂。根据已发表的国外柔红霉素产生菌波赛链霉菌 *Streptomyces peucetius* 中 *dnmZUV* 基因片段序列 (Accession number: AF006633) 设计上游片段扩增引物, 理论扩增片段

长度 2097 bp, 根据 *dnrIJ* 基因片段序列 (Accession number: M80237) 设计下游片段扩增引物, 理论片段长度 2058 bp。按照方法 1.2.2 扩增得到目的片段, 如图 2 所示, 并克隆测序。经软件分析与发表 DNA 序列同源性均在 98% 以上, 结合我们所克隆的其它基因测序结果, 表明 SIPI-DM 与波赛链霉菌非常接近。

**2.2 重组质粒的构建及转化**

按照方法 1.2.3 构建得到用于转化的同源重组质粒 pYG838, 如图 3 所示, 所得质粒在大肠杆菌中可自主复制, 并具有氨基青霉素及安普霉素双重抗性标记, 但不具有在链霉菌体内复制的功能, 因此可作为链霉菌同源重组的自杀性质粒。

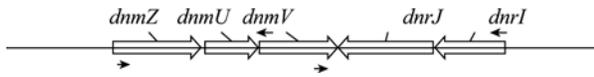


图 1 *dnmV* 基因两侧基因分布图  
Fig. 1 physical map of gene cluster around *dnmV*

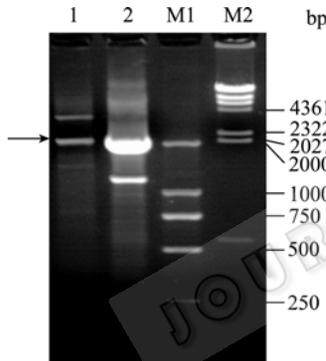


图 2 PCR 扩增 *dnmV* 两侧同源片段  
Fig. 2 PCR amplification of homologous fragments around *dnmV*

1: 扩增 *dnmZU* 段基因产物; 2: 扩增 *dnrIJ* 段基因产物; M1: DL2000 (DNA marker, 购自 TaKaRa); M2:  $\lambda$ /Hind III DNA marker.  
1: *dnmZU* PCR product; 2: *dnrIJ* PCR product; M1: DL2000 DNA marker (TaKaRa); M2:  $\lambda$ /Hind III DNA marker.

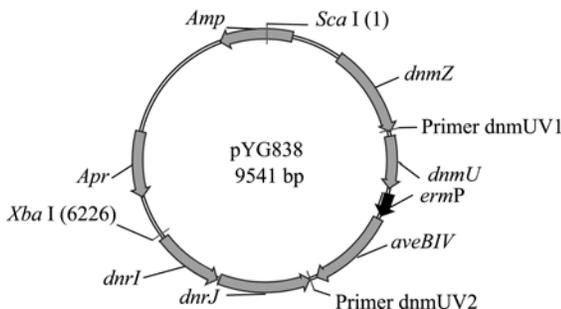


图 3 pYG838 质粒图  
Fig. 3 Plasmid pYG838

**2.3 阻断株的筛选**

质粒 pYG838 经碱变性处理以后, 转化新鲜制备的天蓝淡红链霉菌 SIPI-DM 的原生质体。次日以加安普霉素的软琼脂上层筛选 7 d 后抗性平板上长出的转化子。由于选用的重组质粒为自杀型质粒, 只有当质粒通过同源重组整合入链霉菌的染色体后才能表现出抗生素抗性。因此抗性平板上得到的重组菌应是单交换菌株。挑取单交换菌株, 在不含抗生素的高氏平板上进行放松培养, 3 代后随机挑取单菌落分别至高氏平板及高氏含安普霉素的平板上, 筛选在高氏平板上生长而抗生素平板上不能生长的单菌落。得到的应为发生了二次交换的菌株。同源重组及筛选示意图如图 4 所示。

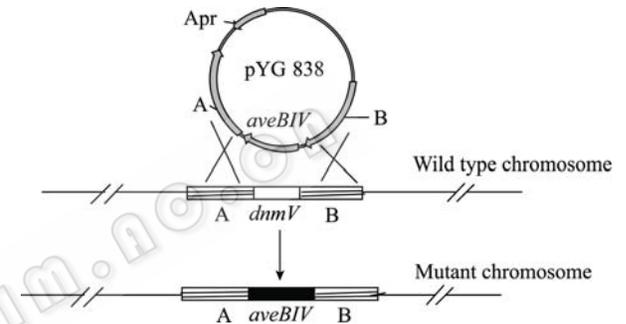


图 4 同源重组双交换示意图  
Fig. 4 Sketch map of double crossover homologous recombination

**2.4 阻断株的验证**

由单交换菌株筛得的抗性丢失的二次交换菌株, 如图 4 所示存在两种可能, *dnmV* 基因回复到出发菌株的状态或者被 *aveBIV* 基因替代。提取重组菌的基因组, 如方法 1.2.5 所示进行 PCR 验证。发生了单交换的重组菌 PCR 结果可以得到 1.7 kb 及 2.2 kb 两条扩增条带, 出发菌株及二次交换回复突变菌株基因组 PCR 可以得到一条 1.7 kb 条带, 而 *dnmV* 基因被 *aveBIV* 基因替代的突变株 11-12 扩增结果得到一条长度为 2.2 kb 的条带。结果如图 5 所示。

接着为进一步验证在阻断突变株中 *aveBIV* 基因的存在, 按 1.2.4 所述, 将 SIPI-DM 与 11-12 基因组酶切后与 pYG838 质粒一起作了 Southern blotting, 结果表明, 阳性对照 pYG838 有很强的杂交信号, 而双交换阻断株 11-12 无论是总基因组还是酶切样品均有条带, 且大小符合预期, 而 SIPI-DM 则没有信号, 证明 *aveBIV* 已经成功整合到了阻断株的基因组上, 见图 6。

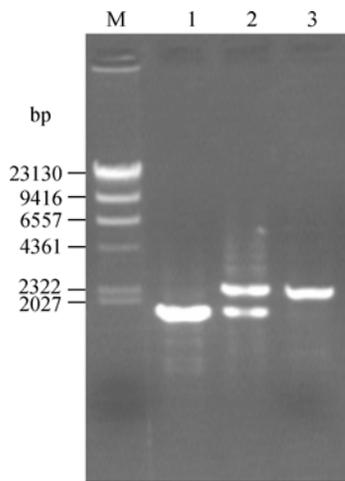


图5 PCR 分析阻断株类型

Fig. 5 PCR validation of disruptants type

M:  $\lambda$ /Hind III; 1: SIPI-DM 基因组; 2: 单交换阻断株基因组; 3: 双交换阻断株基因组.

M:  $\lambda$ /Hind III DNA marker; 1: Genomic DNA of SIPI-DM; 2: Genomic DNA of single crossover mutant; 3: Genomic DNA of double crossover mutant.



图6 双交换突变株的杂交验证

Fig. 6 Southern blotting verification of double crossover disruptant

M:  $\lambda$ /Hind III marker; 1: SIPI-DM 基因组; 2: SIPI-DM 基因组 *Xba* I-*Nco* I 酶切; 3: pYG838 质粒对照; 4: 11-12 基因组; 5: 11-12 基因组 *Xba* I-*Nco* I 酶切.

M:  $\lambda$ /Hind III DNA marker; 1: Genomic DNA of SIPI-DM; 2: SIPI-DM genomic DNA digestion with *Xba* I-*Nco* I; 3: pYG838 (positive control); 4: Genomic DNA of double crossover mutant 11-12; 5: 11-12 genomic DNA digestion with *Xba* I-*Nco* I.

## 2.5 阻断株的发酵结果

将突变株 11-12 及 SIPI-DM 菌株同时在不含抗生素的培养基中发酵, 并分析发酵液的组分, 结果如图 7 所示。由 *aveBIV* 基因替代了基因组上原有的 *dnmV* 基因后发酵液中柔红霉素组分消失, 出现表柔红霉素组分。

## 2.6 阻断株的稳定性

11-12 菌株在高氏培养基上传代以验证其遗传稳定性, 5 代后分析子代基因组上引入的基因置换及

发酵产物, 结果均与筛选验证时 11-12 表现一致, 故所得阻断株遗传稳定。

## 3 讨论

通过单交换方法进行同源重组操作比较简单, 周期较短, 只需要进行一次同源重组即可以得到转化子, 设计简单。因此在进行简单的表型分析时显得十分有用。然而这种方法也有其不稳定的风险, 通过一次单交换整合入染色体的载体两端同样存在同源区段, 因此有可能通过再次的单交换将载体及插入基因丢掉, 恢复到野生型。虽然有些菌体仍然具有抗生素抗性, 但有可能其群体内已经有部分菌的染色体产生回复突变。本研究克隆 *dnmV* 基因两侧同源区段, 构建用于发生双交换的重组质粒。通过先筛选带有抗性的同源单交换的中间体, 再筛选抗性丢失的二次交换菌株, 以 PCR 区分回复突变和基因置换, 得到 *aveBIV* 基因直接替代 *dnmV* 基因的表柔红霉素工程菌。所得工程菌染色体上不存在整合载体, 也不引入同源区段, 排除不稳定因素。由于我们所采用的 SIPI-DM 菌株发酵单位较高, 此研究结果也证明了类似的交换臂及同源重组策略在高单位柔红霉素产生菌中也同样可行。

菌体内同源重组发生的频率与同源片段的长度有正相关性, 即片段长度越长越容易发生重组。同样, 在进行基因敲除实验时, 为增加成功的几率也应该尽可能的选择较长的交换片段。在设计进行双交换时如果两侧交换臂长度差异较大, 则两次交换反应均倾向于在长的一侧交换臂发生, 即易回复突变到野生型菌株。考虑到这一点, 本研究中选择的两侧交换臂长度接近相等, 而实际筛选时仅在不含抗生素的平板上培养了 3 代即得到了发生双交换的突变株也证明两侧交换臂长度接近对获得双交换菌是有利的。

选择抗性筛选标记时需要目的抗性基因在只有一个拷贝存在于染色体时就得到筛选背景清晰的重组子。目前许多链霉菌复制性质粒上的抗性选择标记都不能达到这个要求。目前从筛选背景来说最清晰的应该是安普霉素抗性, 本研究在设计重组质粒时将安普霉素抗性基因放在两条同源交换臂之外, 最后以抗性丢失筛选二次交换菌株, 得到的工程菌染色体上不带有抗性标记, 这对于进一步利用抗生素抗性作筛选标记改造该工程菌是有利的。

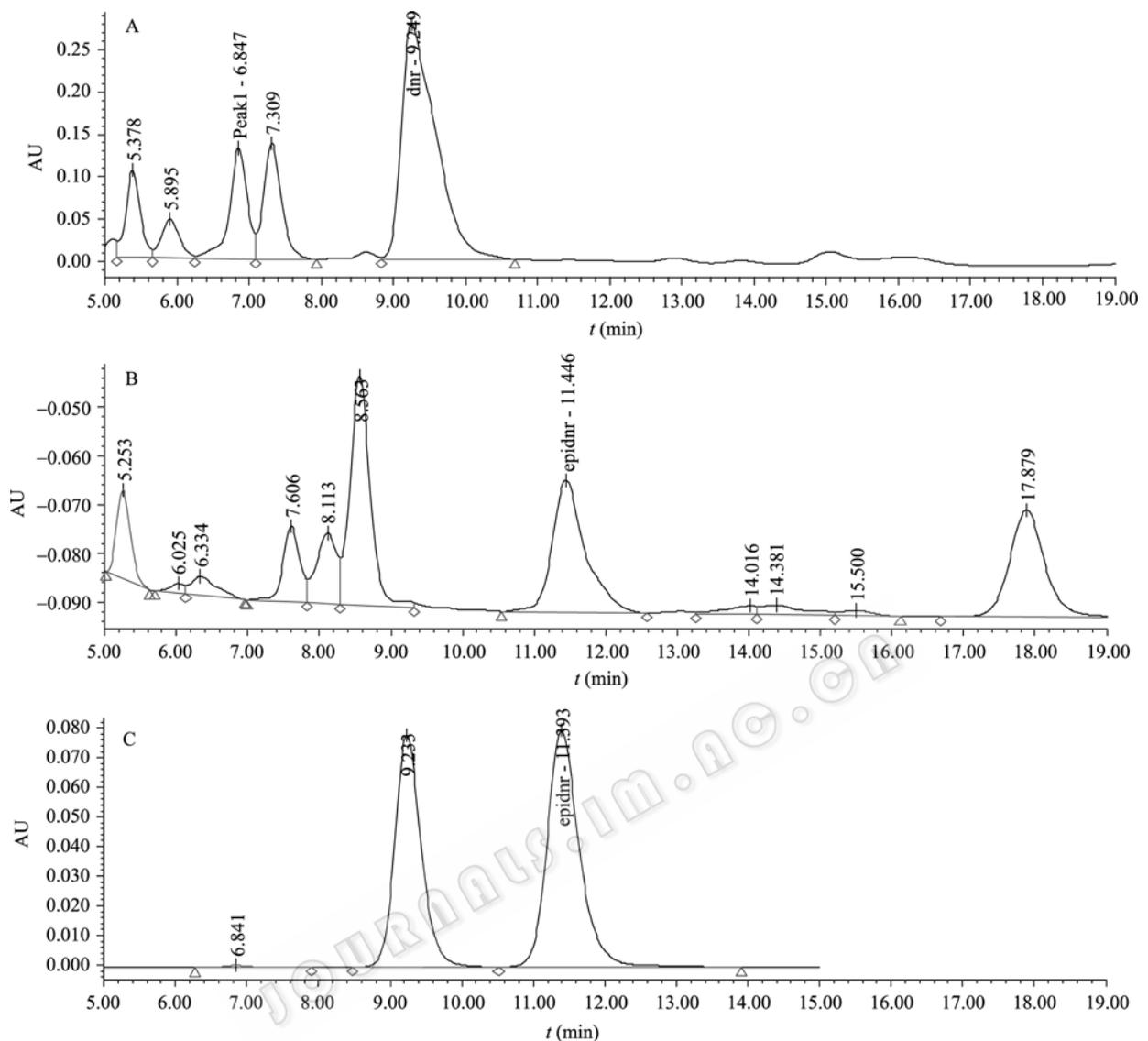


图7 发酵产物 HPLC 分析图

Fig. 7 HPLC analysis of fermentation extract

注: A: SIPI-DM 发酵产物; B: 11-12 发酵产物; C: 柔红霉素及表柔红霉素标准品.

Note: A: SIPI-DM; B: 11-12; C: Control (daunorubicin and epidaunorubicin).

## 参考文献

- [1] Pharmachemie BV. Process for preparing epirubicin or acid addition salts thereof from daunorubicin. US: 5874550. 1999-2-23.
- [2] Shang K, Hu Y, Zhu C, *et al*, Production of 4'-epidaunorubicin by metabolic engineering of *Streptomyces coeruleorubidus* strain SIPI-1482. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, **24**(7): 1107-1113.
- [3] 蒋世春, 吴建平, 白桦. 应用等离子体辐射技术选育柔红霉素产生菌—天蓝淡红链霉菌. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2001, **19**(2): 133-137.
- [4] Sambrook J, Russell DW 著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, pp.96-99, 492-509.
- [5] Hopwood D, Bibb M, Chater K. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich: John Innes Foundation, 1985, pp.168-170.
- [6] 尚珂, 宫倩, 胡又佳, 等. 柔红霉素产生菌 SIPI-1482 中 *dnmV* 基因功能的阻断及恢复. *中国生物工程杂志*, 2007, **26**(7): 64-68.
- [7] 尚珂, 谢丽萍, 胡又佳, 等. 柔红霉素产生菌 *Streptomyces coeruleorubidus* SIPI-1482 中 *dnmV* 基因的克隆及阻断. *中国医药工业杂志*, 2006, **37**(5): 307-310.
- [8] Hutchinson CR, Colombo AL. Genetic engineering of doxorubicin production in *Streptomyces peuceetius*: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, **23**(1): 647-652.