

Fostriecin 产生菌 *Streptomyces pulveraceus* 遗传转化体系的建立与优化

刘雪娇 牛铭山 邱荣国 唐莉*

(大连理工大学 化工与环境生命学部分子药物研究中心 辽宁 大连 116023)

摘要: 【目的】建立并优化链霉菌 Fostriecin 产生菌 *Streptomyces pulveraceus* 的遗传转化系统。【方法】以整合型质粒 pSET152 为出发质粒, 通过供体菌 *E. coli* ET12567/pUZ8002 与受体菌 *Streptomyces pulveraceus* 进行接合转移。【结果】确定了链霉菌 *Streptomyces pulveraceus* 的最佳接合转移条件: 培养基为终浓度含 15% 甘氨酸的 MS 培养基; 孢子热激条件为 50 °C 10 min; 阿伯拉霉素覆盖的时间为 18 h, 终浓度为 20 mg/L。同时, 把组成型启动子 *ermE*⁺ 与绿色荧光蛋白基因(*gfp*)克隆到 pSET152 载体上, 通过接合转移整合到该链霉菌中, *gfp* 获得表达。【结论】建立 Fostriecin 产生菌的遗传转化系统, 并发现甘氨酸能显著提高链霉菌的接合转移效率。

关键词: 链霉菌 *Streptomyces pulveraceus*, pSET152, 接合转移, 链霉菌表达

Establishment and optimization of the conjugal transfer system of fostriecin producer *Streptomyces pulveraceus*

LIU Xue-Jiao NIU Ming-Shan QIU Rong-Guo TANG Li*

(Research Center for Molecular Medicine, Faculty of Chemical, Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: [Objective] Establishment and optimization of the gene transfer system of *Streptomyces pulveraceus* which produces fostriecin based on normal conjugal transfer method. [Methods] Intergeneric genetic transfer system was based upon integrative plasmid pSET152

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(No. 30688003)

*通讯作者: Tel: 86-411-84706740; 信箱: tangli63@yahoo.com

收稿日期: 2011-09-05; 接受日期: 2011-11-07

from donor *E. coli* ET12567/pUZ8002 to *Streptomyces pulveraceus*. **[Results]** The maximum transformation efficiency of *Streptomyces pulveraceus* by conjugation was obtained when MS medium containing 15% glycine was used, with the spores heat-shocked at 50 °C for 10 min before mixing with *E. coli*, using a final 20 mg/L concentration of apramycin for overlay after incubation of 18 h. Simultaneity, pSET153::gfp was constructed from pSET152 by combining the constitutive ermE+ promoter with green fluorescent protein gene (*gfp*). Green fluorescent protein gene was expressed. **[Conclusion]** In summary, intergeneric genetic transfer system was demonstrated and optimized, and glycine can increase the efficiency of exconjugates.

Keywords: *Streptomyces pulveraceus*, pSET152, Conjugal transfer, *Streptomyces* expression

Fostriecin (福司曲星)是 1983 年从巴西采集的土壤标本中一种放线菌的发酵液中首次分离得到的,属于天然内酯类化合物^[1-2],它们的产生菌为 *Streptomyces pulveraceus*。Fostriecin 具有良好的抗肿瘤活性,与 17 种临床应用药物比较,Fostriecin 是活性最好的化合物之一^[3-4]。目前已完成了 Fostriecin 的临床 I 期研究,结果理想,但由于其化合物在体内外的不稳定性及材料来源困难而导致临床研究中断。Fostriecin 的生物合成是由聚酮化合物合成酶(Polyketide biosynthase, PKS)和一些后修饰酶介导的,可以通过基因重组和组合生物合成等方法来改造 Fostriecin 产生菌获得新型衍生物。对抗生素生产菌进行组合生物合成改造的一个重要前提是建立合适的遗传操作体系。一直以来国际上研究者在试图通过对 Fostriecin 合成基因簇进行遗传改良来提高 Fostriecin 的产量或是得到其类似物,然而目前为止均未成功。

链霉菌中常用的外源遗传物质导入的方法有 PEG 介导的原生质体转化法、接合转移法和电穿孔法^[5-7]。由于不同菌株的特性不一样,不同菌株适用的外源遗传物质导入方法也差别很大。pSET152 是一种整合型的质粒^[8],含阿泊拉霉素抗性基因,能通过染色体上噬菌体 ϕ C31 的 *attB* 位点特异性整合到链霉菌染色体上^[9],是研究链霉菌转移方法常用的质粒。

我们通过初期预实验,发现原生质体转化法和电穿孔法均未能获得 pSET152 质粒转化子,接合转移方法可以获得转化子但效率不高。因此,本研究采用接合转移法研究外源基因进入 Fostriecin 产生菌的遗传转化体系并进行优化,并且是首次将外源基因导入该链霉菌中,因此这一研究对于链霉菌 *Streptomyces pulveraceus* 进行基因遗传操作以开发新的衍生物具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养条件:链霉菌(*Streptomyces pulveraceus*)由本实验室保存,用 ISP2^[8]或 YPD^[8]培养基在 30 °C 培养;大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* ET12567/pUZ8002 用 LB^[10]培养基 37 °C 培养,这些菌株均由本实验室保存。

1.1.2 质粒:pSET15 是一种整合型质粒,含阿泊拉霉素抗性基因,能通过染色体上噬菌体 ϕ C31 的 *attB* 位点特异性整合到链霉菌染色体上。

1.1.3 培养基及抗生素:大肠杆菌培养基为 LB,于 37 °C 培养;链霉菌液体培养基为 YPD,固体培养基为 ISP2 琼脂^[8],于 30 °C 培养;用于大肠杆菌-链霉菌接合转移的培养基为 MS^[8];2 \times YT 用于接合转移过程中孢子热激处理的培养基^[10];ISP2 琼脂同时用于表型观察。抗生素使用浓度为

氯霉素(Cml) 25 mg/L, 卡那霉素(Kan) 50 mg/L, 阿伯拉霉素(Apr) 50 mg/L。

1.2 方法

1.2.1 质粒及链霉菌基因组 DNA 的提取: 质粒提取等基本操作参见文献[11]。链霉菌培养及链霉菌总 DNA 提取方法参照链霉菌手册^[8]。

1.2.2 大肠杆菌和链霉菌 Fostriecin 之间的接合转移: 将含有 oriT 的整合型质粒 pSET152 转入大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)中, 得到供体菌株大肠杆菌 ET12567(pUZ8002/ pSET152)。挑取单菌落, 接种于 3 mL LB 液体培养基(加入浓度为 50 mg/L 阿伯拉霉素和 25 mg/L 卡那霉素以及 12.5 mg/L 氯霉素)中, 37 °C 培养过夜, 按 1:50 的比例转接到 30 mL 新鲜 LB 培养基中(加入相应的抗生素), 37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6, 离心收集菌体沉淀, 用新鲜 LB 培养基洗涤菌体 2 次, 最后将菌体悬浮于 1.5 mL LB 培养基中。用接种环从 ISP2 固体培养基上刮下培养 6 d 的新鲜孢子至装有玻璃珠的 2×YT 培养基中, 漩涡振荡打散孢子, 孢子悬液过滤后 50 °C 热激 10 min, 冷却至室温。将处理好的供体与链霉菌孢子悬液各 0.5 mL 于 Eppendorf 管中混合, 离心沉淀, 用少量的残液悬浮后涂布 MS 平板。30 °C 培养 17 h, 用 1 mL 含阿伯拉霉素和萘啶酮酸的水溶液覆盖, 继续培养 3–4 d 后长出接合子。所有实验中供体大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)量都为 10^8 , 接合效率用接合子量/受体孢子量来表示, 数据取 3 次实验平均值。

1.2.3 PCR 扩增反应验证接合转移子: 用含阿伯拉霉素的 ISP2 培养基培养接合转移子, 刮取新鲜孢子接种于含有阿伯拉霉素的液体培养基 YPD 中培养约 24 h。收集菌丝体, 提取总 DNA 作为模板。以野生型链霉菌的总 DNA 为阴性对照, 以 pSET152 质粒为阳性对照, 根据质粒 pSET152 阿伯拉霉素抗性基因设计一对引物, 扩

增 *aac(3)* IV 抗性基因大小为 963 bp 的片段。所用的 PCR 条件反应程序为: 97 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

引物序列如下:

AMF: 5'-CTCACGTTAAGGGATTTTG-3';

AMR: 5'-ATGAGCTCAGCCAATCGA-3'。

1.2.4 绿色荧光蛋白 GFP 表达载体的构建: 根据组合型 *ermE*⁺ 启动子序列设计一对引物, 以 *pwhm3-ermE*⁺ 质粒为模板, 扩增含有启动子 *ermE*⁺ 的大小为 302 bp 的片段。引物序列为:

FermE: 5'-GCTCTAGAAGCCCGACCCGAGCACGC-3';

RermE: 5'-CCGGAATTCGGATCCACTAGTTCCTCCTACCAACCGGCACGA-3'。

上游引物带有 *Xba* I 酶切位点, 下游引物带有 RBS 位点及 *Spe* I 和 *Eco* R I 两个酶切位点, 均带有相应的保护碱基。扩增的 PCR 片段回收后, 用 *Xba* I 和 *Eco* R I 限制性内切酶消化, 同时消化 pSET152 质粒, 然后用 T4 连接酶将 PCR 片段连入 pSET152 质粒的多克隆位点上, 构成链霉菌表达载体 pSET153。在 pSET153 载体的 *Spe* I 和 *Eco* R I 两个酶切位点之间连入绿色荧光蛋白 *gfp* 基因, 得到 *gfp* 表达载体 pSET153::gfp。

2 结果与分析

2.1 接合转移系统的建立和优化

2.1.1 接合转移培养基的选择: 实验中我们选用了不同的接合转移培养基, 包括 MS、TSB、YPD 和 R₂YE 培养基, 结果表明: 在 MS 培养基上接合转移效率为 10^{-7} – 10^{-6} , 而在其他培养基上得到的接合转移子少或者得不到接合子。因此, 选择 MS 培养基作为链霉菌 *Streptomyces pulveraceus* 接合转移最适培养基。

2.1.2 热激温度对接合转移效率的影响: 热激处理的目的是为了促进孢子萌发, 而孢子萌发又是高效率接合转移的必要条件^[12], 所以热激温

度对接合转移效率有一定的影响。为了确定孢子萌发的最适温度,选取3个温度,分别为:45 °C、50 °C 和 55 °C。每个温度处理 10 min,然后与大肠杆菌 ET12567(pUZ8002, pSET152)供体混合涂布于MS平板,30 °C培养3-4 d,可观察到接合转移子的出现。结果如表1所示:在50 °C 10 min热激条件下接合转移效率最高为 1.43×10^{-6} ,当温度在55 °C时无接合转移子出现。因此,选择50 °C热激10 min作为孢子的热激条件,并用于后续所

有的实验。

2.1.3 抗生素覆盖时间及覆盖浓度对接合转移效率的影响:研究发现,抗生素覆盖时间对接合转移效率影响明显。在这个实验条件下,18 h覆盖效果最佳,见表2。覆盖时间少于16 h时,接合转移不完全,菌丝生长不牢固,覆盖抗生素时菌丝容易被刮掉,且接合效率低。若时间长于18 h(如在20 h),菌丝体生长旺盛,大肠杆菌与孢子容易混在一起,难于分辨单菌落。

表1 热激温度对接合转移效率的影响
Table 1 Influence of heat treatment on conjugation frequency

质粒 Plasmid	热激温度 Heat temperature (°C)	受体孢子量 Quantity of receptor-spores	接合子量 Numbers of exconjugants	接合效率 Conjugation frequency
pSET152	45	10^8	96	9.60×10^{-7}
pSET152	50	10^8	143	1.43×10^{-6}
pSET152	55	10^8	0	-

表2 抗生素覆盖时间对接合转移效率的影响
Table 2 Influence of on conjugation frequency

质粒 Plasmid	覆盖时间 Time-flooding (h)	受体孢子量 Quantity of receptor-spores	接合子量 Numbers of exconjugants	接合效率 Conjugation frequency
pSET152	12	10^8	83	8.30×10^{-7}
pSET152	14	10^8	106	1.06×10^{-6}
pSET152	16	10^8	147	1.47×10^{-6}
pSET152	18	10^8	165	1.65×10^{-6}
pSET152	20	10^8	-	-

以大肠杆菌 ET12567(pUZ8002, pSET152)作为供体菌时,选用阿伯拉霉素和萘啶酮酸这2种抗生素进行覆盖。结果表明:当培养基中萘啶酮酸的终浓度为25 mg/L或50 mg/L时,对链霉菌的生长及接合转移效率均没有影响,而阿伯拉霉素的浓度对接合转移效率却有一定的影响。阿伯拉霉素的覆盖终浓度为50 mg/L时,接合效率为 1.52×10^{-6} ;覆盖终浓度为30 mg/L时,接合效率为 1.89×10^{-6} ;而当阿伯拉霉素的覆盖终浓度降为

20 mg/L时,接合效率是覆盖终浓度为50 mg/L的1.5倍(图1),且20 mg/L的阿伯拉霉素可以完全抑制住野生型链霉菌的生长。

2.1.4 甘氨酸浓度对接合转移效率的影响:通常情况下,接合转移培养基MS中加入10 mol/L MgCl₂以提高接合转移的效率。本实验在添加10 mol/L MgCl₂的基础上加入一定浓度的甘氨酸,并对添加不同浓度甘氨酸后的接合效率进行比较,研究其对接合转移效率的影响。

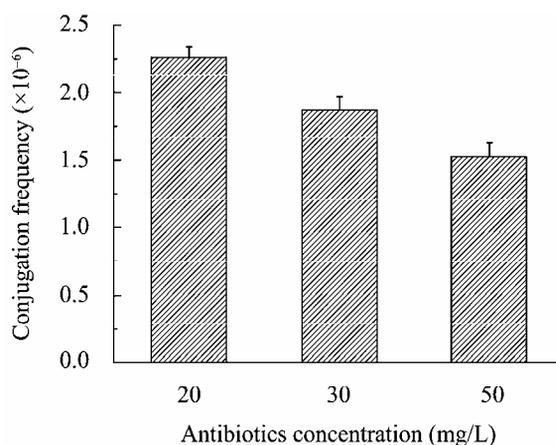


图1 抗生素覆盖浓度对接合转移效率的影响

Fig. 1 Influence of antibiotics concentration on conjugation

在加入 10 mol/L $MgCl_2$ 浓度不变的条件下, 分别加入终浓度为 1.0%、2.5%、5.0%、7.5%、10.0%的甘氨酸。结果如表 3 所示。

结果表明: 当加入一定浓度的甘氨酸后提高了接合转移的效率, 但并不是甘氨酸添加的浓度越大, 接合转移效率越高, 甘氨酸能使菌丝体片段更短, 当添加的甘氨酸终浓度大于 5%后却抑制了链霉菌孢子的产生, 使其生长速度减慢, 反而降低了接合转移效率。

2.2 pSET152 在链霉菌中的稳定性及接合子的 PCR 鉴定

为了检测质粒 pSET152 在链霉菌中的稳定

性, 将转化子接种在没有阿伯拉霉素的 ISP2 培养基上生长, 待产孢后, 继续转接到不含阿伯拉霉素的 ISP2 培养基上生长, 连续转接 5 次, 再随机挑取 100 个单菌落分别转接到含有阿伯拉霉素和不含抗生素的 ISP2 培养基上, 未发现抗性消失的菌落, 表明质粒 pSET152 在链霉菌中可以稳定遗传。

pSET152 属于基因整合型质粒, 转入链霉菌后, 不能单独存在于细胞质中, 而是整合到菌株的基因组上^[13]。随机挑取 4 个单菌落, YPD 培养基液体培养, 提取基因组 DNA, 用阿伯拉霉素的抗性基因引物分别扩增 4 个单菌落的 DNA, 用野生型链霉菌 *Streptomyces pulveraceus* DNA 作阴性对照, 以 pSET152 质粒为阳性对照。PCR 结果表明(图 2), 整合上 pSET152 质粒的基因组 DNA 及 pSET152 质粒均扩增出 963 bp 的条带, 而野生型链霉菌 DNA 没有扩增片段, 由此证实了 pSET152 质粒成功转入到链霉菌 *Streptomyces pulveraceus* 中。

2.3 gfp 基因在链霉菌中的表达

为了检测所构建的接合表达载体 pSET153 是否具有表达基因的功能, 在载体的 *Spe* I 和 *Eco*R I 两个酶切位点之间连入绿色荧光蛋白 *gfp* 基因。将构建好的质粒 pSET153::gfp 转入大肠杆

表 3 甘氨酸浓度对接合转移效率的影响
Table 3 Influence of Gly concentration on conjugation frequency

质粒 Plasmid	Gly 终浓度 Concentration of Gly (%)	受体孢子量 Quantity of receptor-spores	接合子量 Numbers of exconjugants	接合效率 Conjugation frequency
pSET152	—	10^8	205	2.05×10^{-6}
pSET152	1.0	10^8	304	3.04×10^{-6}
pSET152	2.5	10^8	415	4.15×10^{-6}
pSET152	5.0	10^8	589	5.89×10^{-6}
pSET152	7.5	10^8	366	3.66×10^{-6}
pSET152	10.0	10^8	198	1.98×10^{-6}

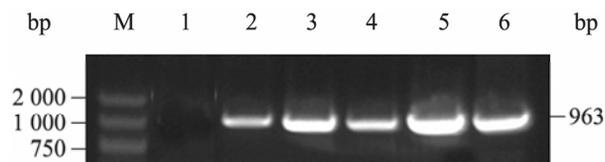


图2 接合转移子的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of exconjugants

注: M: DL2000 marker; 1: 链霉菌 *Streptomyces pulveraceus* DNA 的 PCR 扩增产物; 2-5: pSET152 接合转移子的 PCR 扩增产物; 6: 质粒 pSET152 的 PCR 扩增产物。

Note: M: DL2000 marker; 1: PCR product from *Streptomyces pulveraceus* DNA; 2-5: PCR product from *Streptomyces pulveraceus*/pSET152; 6: PCR product from pSET152.

菌 ET12567(pUZ8002)中, 以此为供体与链霉菌进行接合转移。接合子接到含有阿伯拉霉素的 ISP2 培养基上, 至少传 3 代。挑取单菌落在新的固体培养基上培养 48 h 后, 取其气生菌丝体, 在反射荧光倒置显微镜(油镜)下, 观察绿色荧光蛋白在链霉菌中的表达情况。用蓝光激发, 含有 pSET153::gfp 质粒的菌丝体经激发后发出明显的绿色荧光(图 3)。

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, 其(G+C)%含量一般高达 70%以上, 能产

生多种抗生素和生物活性物质^[14]。不同的链霉菌菌种之间有很大的差异, 转化方法及转化效率也有所不同。在链霉菌中引入外源基因的遗传操作比较困难, 这主要是大多数链霉菌存在着限制修饰系统, 一般难以转化或转化频率较低^[8,15]。链霉菌 *Streptomyces pulveraceus* 限制修饰系统比较强, 因此在一定的转化频率之上, 才有可能对该菌进行基因工程操作。

实验中通过选用 3 个孢子萌发温度 45 °C、50 °C、55 °C, 热激 10 min 的接合转移效率, 在萌发温度为 50 °C 的条件下, 接合转移效率最高; 当萌发温度为 55 °C 时, 没有长出接合子。抗生素覆盖时间少于 16 h, 接合转移还不完全, 基内菌丝生长还不牢固, 覆盖抗生素时菌丝极易被刮断, 接合效率低; 时间长于 18 h, 菌丝生长过旺, 大肠杆菌与链霉菌容易生长到一起, 难以分辨, 同时假阳性很高。而当阿伯拉霉素的终浓度降为 20 mg/L 时, 接合效率是浓度为 50 mg/L 的 1.5 倍。本研究发现在培养基中加入一定浓度的甘氨酸可以提高接合转移效率, 但添加甘氨酸的浓度并不是越高越好, 甘氨酸能使菌丝体片段更短, 当甘氨酸终浓度大于 5% 后却抑制了链霉菌孢子的产生, 使其生长速度减慢, 降低了接合转移效

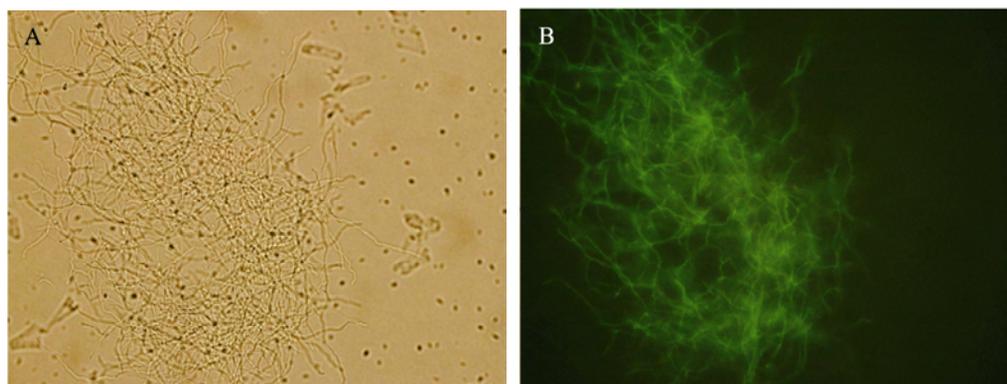


图3 绿色荧光蛋白在链霉菌中的表达

Fig. 3 Expression of green fluorescent protein gene in *Streptomyces pulveraceus*

率。甘氨酸通常在电转化方法, 做链霉菌电转感受态时加入, 起到润滑细胞壁的作用。但是关于甘氨酸在链霉菌接合转移中的应用, 还未见报道, 本研究发现甘氨酸的加入能显著提高接合效率。实验室将甘氨酸应用到其它几种链霉菌, 也能提高接合效率, 但对个别菌种无作用。甘氨酸提高接合转移效率可能由于干扰链霉菌细胞壁的形成, 提高细胞壁的通透性, 但其具体作用机制, 有待进一步研究。

本实验构建的链霉菌表达载体 pSET153 是由 pSET152 发展而来, 它含有强的组成型 *ermE*⁺ 启动子, 在其下游有 3 个单一的酶切位点, 因此可以作为表达载体。将 *gfp* 基因克隆到表达载体 pSET153 中, 通过接合转移转入链霉菌中进行表达研究, 在倒置荧光显微镜下可以清晰地看到 *gfp* 被激发后发出的绿色荧光, 初步证明 pSET153 可以作为链霉菌表达载体, 为研究基因在链霉菌中的表达提供了工具载体。

链霉菌 *Streptomyces pulveraceus* 接合转移体系的建立及优化为利用组合生物合成技术对 Fostriecin 产生菌的生物合成基因, 包括结构基因、抗性基因和调控基因等进行遗传操作, 产生其他新的高活性类似物的工程菌提供了良好的实验基础; 为利用组合生物合成技术解决 Fostriecin 的临床应用问题提供了良好的平台。

参 考 文 献

- [1] Hokanson GC, French JC. Novel antitumor agents CI-920, PD 113 270, and PD 113 271.3 structure determination[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1985, 50(4): 462–466.
- [2] Tunac JB, Graham BD, Dobson WE. Novel antitumor agents CI-920, PD113,270 and PD113,271 I. taxonomy, fermentation and biological properties[J]. The Journal of Antibiotics, 1983, 36(12): 1595–1600.
- [3] Fry DW, Boritzki TJ, Jackson RC. Studies on the biochemical mechanism of the novel antitumor agent, CI-920[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1984, 13(3): 171–175.
- [4] Maki K, Motoki R, Fujii K, et al. Catalyst-controlled asymmetric synthesis of Fostriecin and 8-*epi*-Fostriecin[J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(48): 17111–17117.
- [5] 吴胜, 夏焕章. 链霉菌基因转移的方法[J]. 生物工程进展, 2002, 22(1): 91–95.
- [6] Veal DA, Stokes HW, Daggard G. Genetic exchange in natural microbial communities[J]. Advances in Microbial Ecology, 1992, 12: 383–430.
- [7] Christensen BB, Sternberg C, Molin S. Bacterial plasmid conjugation on semi-solid surfaces monitored with the green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea victoria* as a marker[J]. Gene, 1996, 173(1): 59–65.
- [8] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [9] Kuhstoss S, Rao RN. Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage Φ C31[J]. Journal of Molecular Biology, 1991, 222(4): 897–908.
- [10] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] 孔会利, 王超, 肖亮, 等. 高 G+C 含量模板进行 PCR 扩增的高效缓冲液体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(2): 106–109.
- [13] 李晓华, 龙慈凡, 周秀芬, 等. 链霉菌质粒 pSET152 电转化稀有放线菌小单孢菌的研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 718–720.
- [14] 陈芬, 熊伟, 闵勇, 等. 肉桂地链霉菌接合转移体系的构建及 *nsdA* 基因中断对其次级代谢的影响[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6): 1042–1047.
- [15] Deng ZX, Zhou XF. Intergeneric plasmid conjugal transfer between *E. coli* and *Streptomyces*[J]. Hereditas, 1994, 16(6): 7–10.