

一种适用于链霉菌异源合成基因簇同框缺失的高效方法

林琛, 罗祥坤, 邓子新, 贺新义*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200030

林琛, 罗祥坤, 邓子新, 贺新义. 一种适用于链霉菌异源合成基因簇同框缺失的高效方法[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3657-3670

Lin Chen, Luo Xiangkun, Deng Zixin, He Xinyi. An efficient method for in-frame deletion of heterologous synthetic gene clusters in *Streptomyces*[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3657-3670

摘要:【背景】对抗生素生物合成途径的阐明有助于提高目标化合物的产量并开发具有更高活性的新化合物。基因的同框缺失是天然产物生物合成研究的常规手段,通过分析突变菌株积累的中间产物,可以帮助推导天然产物的合成途径及相关基因的功能。天然产物生物合成基因簇的大小一般在 20 kb 以上,对每个基因进行同框缺失耗时耗力,因此,优化链霉菌来源的基因同框缺失的方法有重要的意义。【目的】基于 PCR-targeting 重新设计了一套在链霉菌柯斯文库质粒上进行基因同框缺失的方法,实现链霉菌基因在大肠杆菌中快速、高效的基因同框缺失的技术体系。【方法】使用氨苄青霉素抗性基因 *bla* 作为 PCR-targeting DNA 片段的筛选标记,同时使用体外的 *Pac I* 酶切和酶连系统代替体内的 Flp/FRT 系统来介导同框缺失的构建。【结果】利用这种方法,在 6 d 内完成了米多霉素生物合成基因簇中 14 个基因的同框缺失。【结论】此方法与传统的 PCR-targeting 方法相比,构建同框缺失载体的效率明显提高;*Pac I* 识别序列在链霉菌基因组上的稀有性使得此方法在构建抗生素生物合成基因簇必需基因的同框缺失载体上具有普适性。

关键词: 链霉菌; PCR-targeting; 同框缺失; 米多霉素

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901200)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901200)

*Corresponding author: E-mail: xyhe@sjtu.edu.cn

Received: 2022-01-21; Accepted: 2022-03-03; Published online: 2022-04-12

An efficient method for in-frame deletion of heterologous synthetic gene clusters in *Streptomyces*

LIN Chen, LUO Xiangkun, DENG Zixin, HE Xinyi*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: [Background] Elucidation of antibiotic biosynthetic pathways can help improve the yields of target compounds and create new compounds with more effectiveness. In-frame deletion of genes is a routine method in the study of natural product biosynthesis. By analyzing the intermediate products accumulated by mutant strains, we can deduce the synthetic pathways of natural products and the functions of involving genes. The biosynthetic gene clusters for natural products are generally more than 20 kb in size, which make the in-frame deletion of each gene time-consuming and labor-intensive. Therefore, it is of great significance to optimize the method for in-frame deletion of genes derived from *Streptomyces*. [Objective] On the basis of the principle of PCR-targeting, we redesigned a method for gene in-frame deletion in cosmids from *Streptomyces* gene library and established a technical system for rapid and high-precision in-frame deletion of *Streptomyces* genes in *Escherichia coli*. [Methods] We used the ampicillin resistance gene *bla* as a marker for the screening of PCR-targeting DNA fragments and replaced the *in vivo* F₁/FRT system by the *in vitro* Pac I digestion and ligation system to mediate the construction of in-frame deletion vectors. [Results] Using this method, we completed the in-frame deletion of 14 genes in the mildiomycin biosynthetic gene cluster within 6 days. [Conclusion] Compared with the traditional PCR-targeting method, the established method demonstrates improved efficiency of constructing in-frame deletion vectors. The rarity of the Pac I recognition sequence in the *Streptomyces* genome makes this method universal for constructing in-frame deletion vectors of essential genes in antibiotic biosynthesis gene clusters.

Keywords: *Streptomyces*; PCR-targeting; in-frame deletion; mildiomycin

链霉菌是土壤中重要的微生物类群, 其因具有复杂的形态分化并能够产生丰富的活性天然产物而被人们所熟知和研究。据统计, 自然界中约有三分之二的已知抗生素从链霉菌中被分离和发现^[1]。此外, 链霉菌还是生物界中 GC 含量最高的物种之一, 基因组平均 GC 含量高达 74%^[2], 有些次级代谢生物合成基因簇的 GC 含量甚至接近 90%^[3]。参与抗生素生物合成的基因总是成簇排列, 抗生素完整生物合成基因簇的克隆及生物合成机制的阐明, 是合成生物学策略创造具有新生物活性“非天然化合物”的基础^[4-5],

也有助于解决目前所面临的细菌耐药性不断增加和抗生素生物合成产量低下的难题。研究抗生素生物合成机制的常规手段是对其生物合成基因簇中的必需基因分别进行突变, 根据突变株积累的中间产物来推断抗生素的生物合成途径。

在原核生物中, 抗生素生物合成基因簇的基因往往以操纵子的形式存在, 抗性基因的插入突变在很多情形下会造成极性效应, 同时引起目标基因和下游基因的功能失活, 不利于研究某一特定基因在生物合成途径中的真正功能。为了排除极性效应的影响, 解决方法是对

靶标基因分别进行同框缺失。然而抗生素生物合成基因簇大小一般在 20–200 kb 范围内^[6], 簇内包含的开放阅读框(open reading frame, ORF)数量多达十几甚至几十个, 对它们分别进行同框缺失耗时耗力, 如何快速和高效地构建抗生素生物合成必需基因的同框缺失载体对研究抗生素的生物合成途径具有重要意义。

目前, 对链霉菌进行基因同框缺失的常见方法根据操作对象的不同可分为两类: (1) 以链霉菌染色体上的基因为对象, 这需要宿主链霉菌具有高效的遗传操作体系。传统的方法是利用自杀质粒(如温敏型质粒 pKC1139^[7])通过同源双交换的方法来介导基因的同框缺失, 但是这种方法效率很低, 费时费力。为了进一步提高构建效率, 人们陆续引入了位点特异性重组的 Cre/loxp^[8]、归位内切酶的 I-Sce I^[9]等系统, 先是通过同源重组的方式将含有筛选标记(抗性基因)和功能识别位点的载体整合到链霉菌的基因组上, 然后往链霉菌中导入蛋白表达载体并诱导表达, 把筛选标记和目标基因给抹去, 最终达到同框缺失的目的。

的, 但是这种方法的周期很长(因为链霉菌生长周期很长, 接种到产孢往往需要 7 d 以上)且操作烦琐(需要 2 次将载体导入链霉菌中); 直到最近, CRISPR-Cas9^[10]系统在链霉菌上的成功应用才一定程度上弥补了上述不足。(2) 以含有合成特定天然产物基因簇的柯斯质粒或 BAC 质粒上的基因为对象, 适合构建有柯斯质粒或 BAC 质粒文库的遗传操作困难的非模式链霉菌。一般使用 PCR-targeting 方法^[11]来介导目标基因的同框缺失, 其主要原理是: 先使用设计好的引物扩增出两端带有同源臂且包含一个特定的筛选标记(抗性基因)的 DNA 线性片段; 然后通过诱导 λ RED 重组酶把线性片段上的筛选标记替换靶标基因, 实现基因敲除; 最后, 通过诱导 Flp/FRT 位点特异性重组系统进行目标基因的同框缺失, 其会将 2 个 FRT (Flp 识别靶点)之间的选择性标记基因抹去, 留下 81 bp 的“疤痕”(图 1)。

PCR-targeting 方法中进行同框缺失所使用的 Flp/FRT 系统是一种来源于酵母位点特异性的重

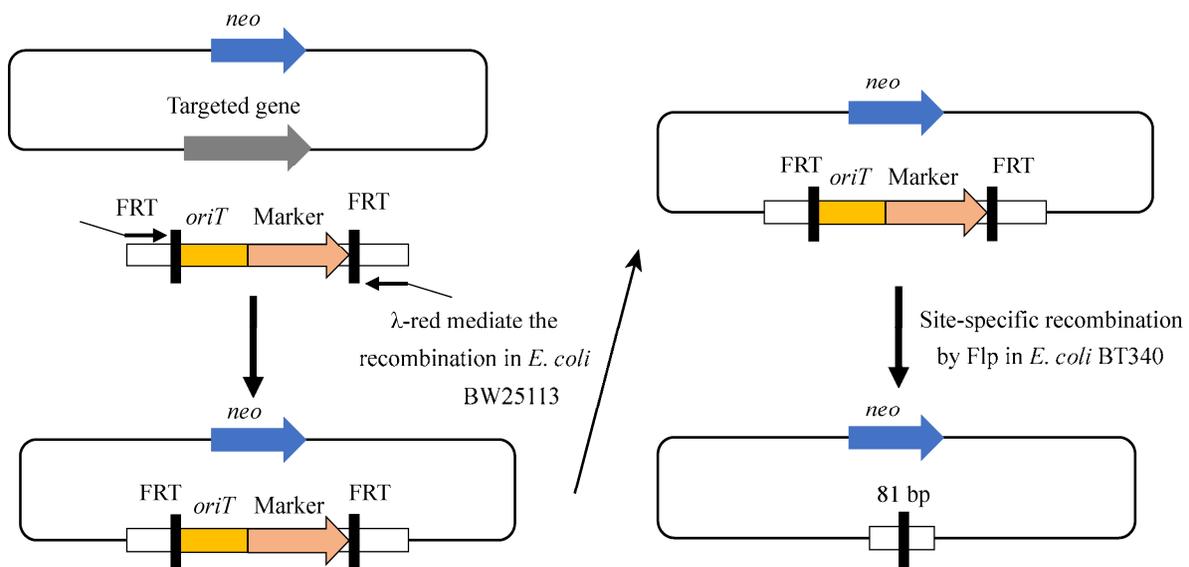


图 1 PCR-targeting 的操作流程示意图^[11]

Figure 1 Schematic diagram of the operation flow of PCR-targeting^[11].

组系统, 由于其重组过程中的可逆性导致了重组效率的低下^[12]。同时这个系统是在细胞体内操作的, 其操作时长受限于细胞的生长周期。为了摆脱这方面的影响, 可以用稀有的酶切位点来替代 FRT 的序列, 前提是柯斯质粒和 BAC 文库质粒上无该酶的识别位点。在获得抗性敲入的质粒后, 直接在体外用酶切酶连的方式获得基因同框缺失的载体, 通过接合转移的方法导入到链霉菌中进行(异源)表达, 分析菌株的代谢产物来研究相关的生物合成途径和基因的功能。

以往所有基于 PCR-targeting 的基因缺失载体的构建设计中, 选择的抗性基因主要针对的是氨基糖苷类抗生素, 因为这些抗性基因既能够在大肠杆菌中表达, 也能在链霉菌中表达, 可以在两种宿主菌中作为筛选标记进行筛选, 例如 *aac(3)IV* (阿伯拉霉素抗性基因)、*aadA* (壮观霉素/链霉素抗性基因) 和 *vph* (紫霉素抗性基因)。氨基糖苷类抗生素的作用机制是与细菌的核糖体结合进而抑制蛋白质的合成^[13]。然而, 氨基糖苷类抗生素由于抗性机制的类似性, 会出现抗性的交叉干扰。因此在进行多基因敲除时, 同时使用不同氨基糖苷类抗生素抗性基因作为筛选标记, 假阳性会大大提高。另外, 氨基糖苷类抗生素长时间在 37 °C 培养条件下容易失效, 导致假阳性菌株的生长。氨基青霉素是一种 β -内酰胺类抗生素, 其抗性机制是通过抑制胞壁粘肽合成酶从而抑制细菌细胞壁的合成来达到抑菌效果^[14], 使用它不仅能够避开氨基糖苷类抗生素抗性基因的影响, 而且在 37 °C 条件下筛菌只会出现卫星菌落而不出现假阳性菌落。

本研究选取氨基青霉素抗性基因 *bla* 作为 PCR-targeting 的筛选标记, 在链霉菌柯斯质粒上直接进行基因敲除, 大大降低了使用氨基糖苷类

抗生素筛选出现假阳性克隆的风险。为了进一步缩短同框缺失载体的构建时间, 我们把同框缺失的过程由体内转移到体外, 采用体外酶切酶连的方式代替体内的 Flp/FRT 系统, 同时在 *bla* 的两侧各引入一个 *Pac I* 位点(5'-TTAATTAA-3'), 通过酶切自连以期获得用于异源表达的基因同框缺失载体。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种和质粒

研究所用的菌株为大肠杆菌 DH10B、BW25113/pIJ790^[11], 由上海交通大学分子微生物学实验室保存。

研究所用的质粒 pETDuet-1 和柯斯质粒 14A6^[15]来自实验室, 由 pSET152 和 pOJ446 组装成的 pJTU2554 衍生而来, 内含有完整的米多霉素生物合成基因簇, 而且具有阿伯拉霉素抗性基因 *aac(3)IV*、*attP*、*oriT* 等可在链霉菌中进行穿梭与整合的关键元件。

1.1.2 培养基^[16]

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 蒸馏水定容至 1 000 mL, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min; LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基中加入 15g/L 的琼脂粉; YENB 液体培养基(g/L): 牛肉浸膏提取物 3.0, 胰蛋白胨 5.0, 酵母提取物 7.5, 蒸馏水定容至 1 000 mL, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

质粒提取试剂: Solution I: 葡萄糖 50 mmol/L, Tris-HCl (pH 8.0) 25 mmol/L, EDTA (pH 8.0) 10 mmol/L; Solution II: NaOH 0.2 mol/L, SDS 溶液 10 g/L; Solution III: 乙酸钾(pH 4.8) 2.55 mol/L; 核酸脱盐胶: 葡萄糖 100 mmol/L, 琼脂糖 10 g/L。

1.1.3 PCR-targeting 所用引物

研究中 PCR-targeting 所用的引物见表 1。

表 1 本研究所用 PCR-targeting 的引物信息

Table 1 Information of the primers used for PCR-targeting in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequences (5'→3')	同源臂序列 GC 含量 The GC content of homologous arm sequences (%)	两同源臂 GC 含量平均值 The average GC content of two homologous arm sequences (%)	两同源臂 GC 含量 Δ 值 The Δ value of GC content of two homologous sequences
milD-PT-F	cgccggctccggcgcgctgagggagagaaggaagcgtgTTAA TTAATTACCAATGCTTAATCAGTG	72	68.5	7
milD-PT-R	cgcaccteggagatctcgccgaggtcatcgccgtgcaaTTAATT AAGAAGATCCTTTGATCTTTTC	65		
milE-PT-F	acgccctcgtggcgctgctcaagggatgacacggcgatTTAATT AATTACCAATGCTTAATCAGTG	67	70.5	7
milE-PT-R	ggatcagcggctcggccgccgactccggtcaggcaacgTTAAT TAATTAGCAGAGCGAGGTATGTA	74		
milF-PT-F	ggccgggctgtcccggggaggtgacccgtgctgacTTAAT TAATTACCAATGCTTAATCAGTG	77	79.5	5
milF-PT-R	ggccgcccgtcgccgcccgtcgccgggtgctcatgaTTAAT TAATTAGCAGAGCGAGGTATGTA	82		
milG-PT-F	acgcaccccgacggggcccgcagggcgcccgatTTAA TTAATTACCAATGCTTAATCAGTG	85	81.0	8
milG-PT-R	gacggggcgtgagcaaaaggcgtggcggcccgatTTAA TTAATTAGCAGAGCGAGGTATGTA	77		
milH-PT-F	ccgcccgcacgtcctcctccgccgaagccgaacatgTTAATT AATTACCAATGCTTAATCAGTG	69	69.0	0
milH-PT-R	cgtgggtccggtggtcgggtcgtgtagtgctgtcacTTAATT AATTAGCAGAGCGAGGTATGTA	69		
milI-PT-F	acccgtcggcccagcagcagggacgtgctgtgacaTTAAT TAATTACCAATGCTTAATCAGTG	72	73.0	2
milI-PT-R	cgatccgtccaccggatggccgtgccccccacgtcacTTAATT AATTAGCAGAGCGAGGTATGTA	74		
milJ-PT-F	cgcgctgaccggctcgcctcgtggggatgatgatTTAATT AATTACCAATGCTTAATCAGTG	72	74.5	5
milJ-PT-R	gcgcccgcgaggacggctcgggtccggggcgttctcatTTAATT AATTAGCAGAGCGAGGTATGTA	77		
milK-PT-F	gatcgaagactccacgaccggcgaggaccgatgagaTTAAT TAATTACCAATGCTTAATCAGTG	62	62.0	0
milK-PT-R	gagacggggagtcagccctggtggtcatggtgttctcacTTAATT AAGAAGATCCTTTGATCTTTTC	62		
milL-PT-F	caccgacaccaccagcgggagtgagaacaccatgTTAAT TAATTACCAATGCTTAATCAGTG	62	64.5	5
milL-PT-R	cgctcaaggacgtgacaggaccggcgacggttcagTTAAT TAATTAGCAGAGCGAGGTATGTA	67		
milM-PT-F	cctccggggcgtccccacgcaaaggtatggatggcatgTTAATT AATTACCAATGCTTAATCAGTG	67	68.0	2

(待续)

(续表 1)

milM-PT-R	gggtgaccagcgggagcgatgaggccgggctcacgcatag <u>TTAAT</u> <u>TAATTAGCAGAGCGAGGTATGTA</u>	69		
milN-PT-F	tggccccgctcgggacgcttctcggccgctatgctgag <u>TTAATT</u> <u>AATTACCAATGCTTAATCAGTG</u>	72	64.0	16
milN-PT-R	attcatggtcactcccatttccgtacggtgggggtcac <u>TTAATTA</u> <u>ATTAGCAGAGCGAGGTATGTA</u>	56		
milO-PT-F	cccgcgccagcggcgggaaacccacggcgggtcag <u>TTAA</u> <u>TTAATTACCAATGCTTAATCAGTG</u>	82	82.0	0
milO-PT-R	ggtggaggcggcggcaggccggccgatgaccggcgtg <u>TTAA</u> <u>TTAATTAGCAGAGCGAGGTATGTA</u>	82		
milP-PT-F	ggtcagccggcctccgtcaggggacacgccggtcat <u>TTAAT</u> <u>TAATTACCAATGCTTAATCAGTG</u>	74	66.5	15
milP-PT-R	ctcttgaagacgtctcctcagagtggcgaggcagtg <u>TTAATT</u> <u>AATTAGCAGAGCGAGGTATGTA</u>	59		
milQ-PT-F	cccgttggggggcccgtttcccgtaggggtgacgcgtg <u>TTAATT</u> <u>AATTACCAATGCTTAATCAGTG</u>	74	79.5	11
milQ-PT-R	ccccacccgccccgccccaccggcggcggcgtcat <u>TTAAT</u> <u>TAATTAGCAGAGCGAGGTATGTA</u>	85		

注: *Pac* I 识别序列用下划线标注; 同源臂部分用小写字母表示; Δ 值代表差值的绝对值

Note: The *Pac* I recognition sequences is underlined; the homology arm sequences is indicated by lowercase letters; Δ value is the sum of absolute difference.

1.1.4 验证用引物

研究中验证所用的引物见表 2。

1.1.5 主要试剂和仪器

PCR 试剂和 DNA 连接酶, TaKaRa 公司; *Pac* I 限制性内切酶, NEB 公司; 胶回收试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司。PCR 仪, 北京东胜创新生物科技有限公司; 电转化仪, Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 普通电转感受态细胞的制备

对保存的 BW25113/pIJ790 在 LB 平板上进行划线活化, 然后挑取单菌落于 3 mL 的 LB 液体培养基中 30 °C、200 r/min 培养过夜, 以 1:100 的比例将上述菌液接入 200 mL 的 LB 培养基中并于 30 °C、200 r/min 培养至菌液的 OD_{600} 为 0.6。然后将菌液置于冰上冷却 15 min, 随后于预冷的离心机上 3 500 r/min 离心 10 min, 弃上清; 之后用 10 mL 预冷的 10% 甘油轻柔地重悬菌体, 3 500 r/min 离心 10 min, 弃上清; 重复上述步

骤; 最后向清洗好的菌体中加入适量预冷的 10% 甘油重悬菌体并进行分装, 置于 -80 °C 的冰箱中保存。

1.2.2 电转化

从 -80 °C 冰箱中取出电转感受态/高效电转感受态细胞于冰上化冻, 加入适量预冷的质粒, 轻弹混匀后转入预冷的电转杯中, 根据电转杯的厚度选取合适的电压(1 mm: 1 800 V; 2 mm: 2 500 V)和电阻, 于电转仪中进行电击; 电转结束后迅速加入预冷的 1 mL LB 培养基, 然后在 30 °C、220 r/min 的恒温摇床上预培养 40 min, 最后均匀地涂布于含有相应抗生素的 LB 平板上, 吹干后倒置于 37 °C 恒温培养箱中培养过夜。

1.2.3 高效电转感受态细胞的制备

挑取 BW25113/pIJ790/14A6 单菌落于 3 mL LB 液体培养基, 30 °C、200 r/min 培养过夜, 按照 1:100 的比例将上述菌液接入 200 mL YENB 培养基中, 同时加入浓度为 1 mol/L 的阿拉伯糖 2 mL (至终浓度为 10 mmol/L), 在摇床中培养约

表 2 本研究所用的验证引物信息

Table 2 Information of primer used for mutant validation in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	14A6 扩增片段大小 The fragment length amplified with 14A6 vector (bp)	14A6 敲除突变 扩增片段大小 The fragment length amplified with 14A6 disrupted mutation vector (bp)	14A6 同框缺失 扩增片段大小 The fragment length amplified with 14A6 in-frame deletion vector (bp)
milA-con-F	AGTGATGGAAACCCATACGTTC	1 032	—	—
milA-con-R	CCGAGGTCAGGAGCCGATC			
milD-con-F	AATCGCAGGGACGGATCACC	1 361	1 224	181
milD-con-R	GCAGTTCCCGTTCTCCCTGA			
milE-con-F	CGACTGGCTGGTTCGAGGCGATGGTC	1 395	1 857	594
milE-con-R	GCGGCAGCACGCGTCGAGGAAACCG			
milF-con-F	CACGGCGACTTCCGCACGCCAACC	930	1 779	516
milF-con-R	ACCGGACGTATCGCACGCCGACTCC			
milG-con-F	TCTCGGGCCACCCGGACGTACCCG	1 331	1 640	377
milG-con-R	ACCAGCGGGTCACCAGCACGTCCAGC			
milH-con-F	GCACGCCGAGGAGTTCAAGCAGCAG	2 644	1 699	436
milH-con-R	CGAGTCGAGCGAGCCGAAGAGCGCGT			
milI-con-F	ATGCAGTGCGGGGACTACGCCAGG	1 793	1 991	728
milI-con-R	AACACCGTGCAGCCCTAGGCCCTCCC			
milJ-con-F	AGCTCGAATGGCTGCTGGAACCTCGAC	1 280	1 604	341
milJ-con-R	AGCAGGAAGAGGACGAACACGCCCC			
milK-con-F	GTCCCTGTGGGTGACGGAAGGCGTGC	1 877	1 608	566
milK-con-R	CACCGGACCGCCCGAAGACGATCAC			
milL-con-F	CTGTGACCGAGCGTGCTCACCTTCGC	1 458	1 749	486
milL-con-R	GCAGGGAGTCCACGATGAGCTGCTGG			
milM-con-F	CGGCGGGTCCTGTACGTCCTTGAG	1 331	1 425	162
milM-con-R	GCGCCCGTACGCACGCTCCGAGAC			
milN-con-F	TCCGGCCACGGCATCCACGTCCTGC	1 149	1 656	393
milN-con-R	GATCAGCGCGGCCACCCGGTCAAGC			
milO-con-F	GGCTGATCTCTTCGCGGTGCCTGCCT	1 553	1 760	497
milO-con-R	CCAACAGGCCCGCTTCCTCATCCTCC			
milP-con-F	CCCGCGGTCCGTGTGCTGGATCAGG	2 094	1 791	528
milP-con-R	CACGCGTCCACCCTACGGGAAACGG			
milQ-con-F	GGCTCTTGATCTCGTGTGCGCCAG	1 125	1 632	369
milQ-con-R	CTGAAGGCAGGCACCGCGAAGAGC			

Note: -: No data.

3 h 至菌液 OD_{600} 的值约为 0.5, 再加入浓度为 2 mol/L 的 $MgCl_2$ 或 $MgSO_4$ 1 mL (至终浓度为 10 mmol/L), 在摇床中继续培养 10 min 后于水浴锅中 42 °C 热激 3 min, 再置于摇床中 30 °C、220 r/min 培养 20 min。得到培养好的菌液后,

接下来的处理与方法 1.2.1 相同。

1.2.4 质粒提取

取 2–3 mL 培养过夜的菌液于 12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体。弃上清后加入 150 μ L 的溶液 I 并充分振荡重悬菌体, 然后加入 400 μ L

的溶液 II，轻柔混匀 8–10 次，待溶液变澄清后加入 350 μL 的溶液 III 进行中和，轻柔振荡混匀。随后加入 500 μL 的氯仿，充分振荡混匀后，于 12 000 r/min 离心 10 min，取上清于另一干净离心管中。加入等体积的异丙醇，充分振荡混匀后于冰上放置 15–20 min，然后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的离心机中 12 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀。往 DNA 沉淀中加入 600 μL 75% 乙醇清洗 2 次，并置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中 5 min 使乙醇完全挥发，最后加入 50 μL ddH₂O 溶解 DNA。

1.2.5 酶切、盐沉、酶连与脱盐

(1)酶切:本研究特指用 *Pac* I 酶切抗性基因插入后的柯斯质粒。根据产品说明书，配制了 100 μL 的反应体系,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下反应 3 h。

(2)盐沉:向反应完成的酶切体系中加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钾,充分混匀;后加入等体积的异丙醇,充分混匀后置于冰上冷却 30 min,然后于预冷的离心机中 12 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀;之后使用 500 μL 75%乙醇清洗 DNA 沉淀 2 次,于 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中放置 10 min 使乙醇挥发,最后加入 30 μL ddH₂O 对 DNA 沉淀进行溶解。

(3)酶连:根据产品说明书,配制 10 μL 的反应体系,在 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 3 h。

(4)脱盐:吸取 1 mL 脱盐胶至 1.5 mL 离心管中,并往胶中插入 PCR 管;待脱盐胶凝固后小心拔出 PCR 管;将酶连完成的体系小心吸取至管洞内,后将脱盐胶放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 1 h,即脱盐完成,脱盐完成的酶连体系即可进行后续的电转化。

2 结果与分析

2.1 氨基糖苷类抗生素与氨基青霉素在转化子筛选时的稳定性比较

为了验证在前言中提到的两类抗生素的稳定性,我们比较了常见的氨基糖苷类抗生素(壮观霉素、阿伯拉霉素)和氨基青霉素在筛选转化子方面的差异性。转化了 pET44b(*bla*)质粒的大肠杆菌 DH10B 在含壮观霉素和阿伯拉霉素 LB 平板以及转化了 pCDF-Duet(*aadA*)质粒的大肠杆菌 DH10B 在含阿伯拉霉素和氨基青霉素 LB 平板,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后均无单菌落生长,这说明所使用的抗生素是有效的(图 2A)。但是随着培养时间增加到 30 h,转化了 pET44b(*bla*)

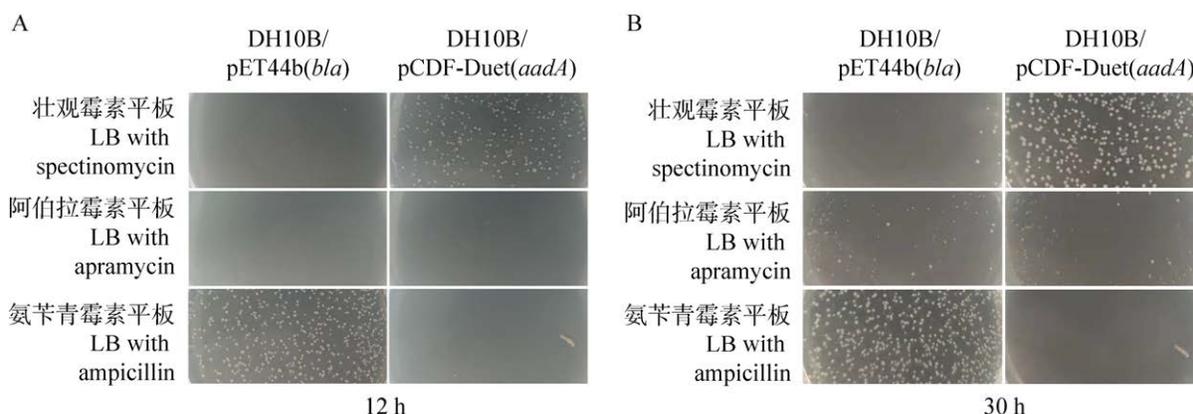


图 2 含 pET44b(*bla*)和 pCDF-Duet(*aadA*)的 *E. coli* DH10B 转化子不同抗生素平板下的生长情况 *bla*: 氨基青霉素抗性基因; *aadA*: 壮观霉素抗性基因

Figure 2 Growth of *E. coli* DH10B transformants with pET44b(*bla*) and pCDF-Duet(*aadA*) under different antibiotic plates. *Bla*: Ampicillin resistance gene; *aadA*: Spectinomycin resistance gene.

质粒的大肠杆菌 DH10B 在含壮观霉素和阿伯拉霉素 LA 平板以及转化了 pCDF-Duet(*aadA*)质粒的大肠杆菌 DH10B 在含阿伯拉霉素平板上出现了较多的假阳性菌落(图 2B), 但转化了 pCDF-Duet(*aadA*)质粒的大肠杆菌 DH10B 在含氨基青霉素平板上未出现假阳性菌落(图 2B)。这充分说明在筛选转化子时氨基青霉素比另外 2 种常用的氨基糖苷类抗生素更加可靠和稳定。

2.2 同框缺失引物的设计逻辑

使用 SnapGene 软件进行序列比对, 发现本实验中用到的柯斯质粒 14A6 (米多霉素生物合成基因簇) 不含有 *Pac I* 的识别位点(5'-TTAATTAA-3'); 同时实验室中常见的模式链霉菌如天蓝色链霉菌[*Streptomyces coelicolor* A3(2)]、变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans* TK24)、白色链霉菌(*Streptomyces albus* NBRC 13014)和阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis* MA4680)的基因组上也均不存在 *Pac I* 的识别位点, 这说明利用 PCR 引入 *Pac I* 位点对链霉菌来源的基因簇进行同框缺失具有普适性。

由于 *Pac I* 酶切位点是 8 个碱基, 为了达到同框的目的, 需要再补充一个额外的碱基使得酶切酶连后留下“疤痕”的长度为 9 个碱基(3 的倍数)。这个额外的碱基加在 *Pac I* 酶切位点的 5'端, 形成 5'-NTTAATTAA-3', 此序列的最后一个三联体密码子是终止密码子(TAA)。因此这个额外的碱基加在 *Pac I* 酶切位点的 3'端来避免上述问题, 形成 5'-TTAATTAAN-3'。

14A6 衍生于 pJTU2554 且包含了完整的米多霉素生物合成基因簇^[15], 由于该载体上包含了 *oriT* 序列(大肠杆菌向链霉菌接合转移起始位点), 我们在扩增氨基青霉素的抗性基因 *bla* 时, 可以略去 *oriT* 序列。综合上述信息, 设计了 *milD* 至 *milQ* 的 PCR-targeting 引物(序列如表 1 所示),

并以 pETDuet-1 质粒(含有氨基青霉素抗性基因 *bla*)为模板进行 PCR 扩增得到氨基青霉素抗性标记的基因盒。同时, 为了方便后面的 PCR 检测, 在设计同框缺失时, 尽量使插入的基因盒(同源序列-*Pac I*位点-*bla*-*Pac I*位点-同源序列)和缺失片段的长度有较大区别, 以利于后续的验证观察。因此设计了两种大小的插入基因盒, 其中插入基因盒 1 的长度为 1 050 bp (图 3), 用来替换 *milD* (1 188 bp)和 *milK* (1 329 bp); 而插入基因盒 2 的长度为 1 271 bp, 用来替换 *milE* (822 bp)、*milF* (474 bp)、*milG* (1008 bp)、*milH* (2 223 bp)、*milI* (1 083 bp)、*milJ* (954 bp)、*milL* (987 bp)、*milM* (1 170 bp)、*milN* (777 bp)、*milO* (1 071 bp)、*milP* (1 584 bp)和 *milQ* (771 bp)。

2.3 柯斯质粒 14A6 上米多霉素生物合成基因抗性插入突变

把包含完整米多霉素生物合成基因簇的柯斯质粒 14A6 转入到大肠杆菌 BW25113/pIJ790, 中。pIJ790 表达 λ RED 重组酶, 可以介导 DNA 线性片段与质粒或染色体同源片段之间的重组。将菌株 BW25113/pIJ790/14A6 制备成电转感受态细胞。然后把扩增得到的带有 *bla* 的基因盒 1 或基因盒 2 导入到该感受态细胞中(图 4A), 通过氨基青霉素筛选和 PCR 扩增验证(验证引物序列如表 2 所示), 在 14A6 上, 对 *milD* 至 *milQ* 进行了单基因的 *bla* 插入突变。

2.4 米多霉素生物合成必需基因同框缺失载体的构建

提取米多霉素生物合成基因敲除突变质粒 DNA 后, 再用 *Pac I* 进行酶切消化后自连, 酶连产物转化大肠杆菌 DH10B 后, 挑取在含阿伯拉霉素平板(14A6 载体所带抗性基因)上长出来的单菌落进行 PCR 验证。利用上述方法, 成功地在 6 d 内获得了 *milD* 至 *milQ* 的同框缺失载体(图 5B, 部分结果)。

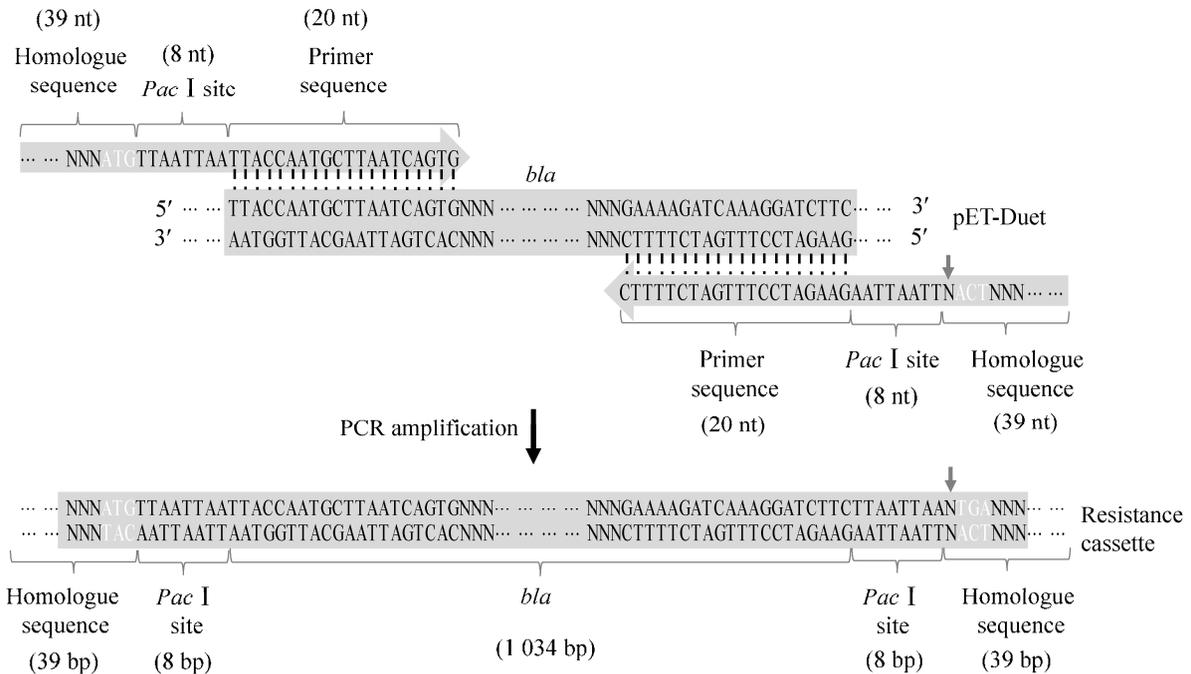


图3 同框缺失引物的设计示意图(以 *milD* 的同框缺失引物设计为例) N: ATCG 四种碱基中的一种; 扩增 *bla* 抗性基因的 DNA 模板是 pETDuet-1 的质粒 DNA; 灰色箭头: 在 *Pac* I 酶切位点后加上一个碱基

Figure 3 Representation of primer design for gene in-frame deletion (Take the primer design of in-frame deletion of *milD* as an example). N: One of the four bases of ATCG; the DNA template for amplifying the *bla* resistance gene is the plasmid DNA of pETDuet-1; Gray arrow: A base is added after the *Pac* I restriction site.

Pac I 酶切后再酶连会出现两种情况: 一种是酶切出来的片段又重新连上载体, 或者片段反转 180 度再连接回载体; 另外一种情况是酶切后的载体自连。所需的目标载体是后一种, 为了统计本方法获得酶切自连载体的比例, 把酶连产物的转化菌株分别涂布在含阿伯拉和氨苄青霉素的 LB 平板上, 统计发现得到自连同框缺失阳性克隆的比例非常高, 阳性率为 $94.6\% = (295 - 16) / 295$ (阿伯拉平板上菌落数为 295, 氨苄青霉素平板上菌落数为 16), 远高于体内 FLP/FRT 系统介导的 40% 同框缺失效率^[17]。

3 讨论与结论

阿伯拉霉素是一种广谱抗生素, 因其独特的

结构能对大肠杆菌和链霉菌起作用且不易产生耐药性, 被越来越广泛地用于链霉菌基因文库质粒的构建和筛选。然而阿伯拉霉素的抗性基因 *aac(3)IV* 对其他氨基糖苷类底物也可以起作用, 其存在和表达会影响其他氨基糖苷类抗生素的效果^[18], 使得后续操作中可供选择的替换片段的筛选标记变得十分有限。本方法选取了氨苄青霉素抗性基因 *bla* 作为基因插入替换的筛选标记, 由于氨苄青霉素的抗性机制与阿伯拉霉素的抗性机制完全不同, 避开了阿伯拉霉素抗性基因 *aac(3)IV* 的影响。同时, 氨苄青霉素(β -内酰胺类抗生素)与阿伯拉霉素(氨基糖苷类抗生素)的联用所产生的协同效应会加强两者的药效^[19], 从而减少氨苄青霉素耐药菌对阳性结

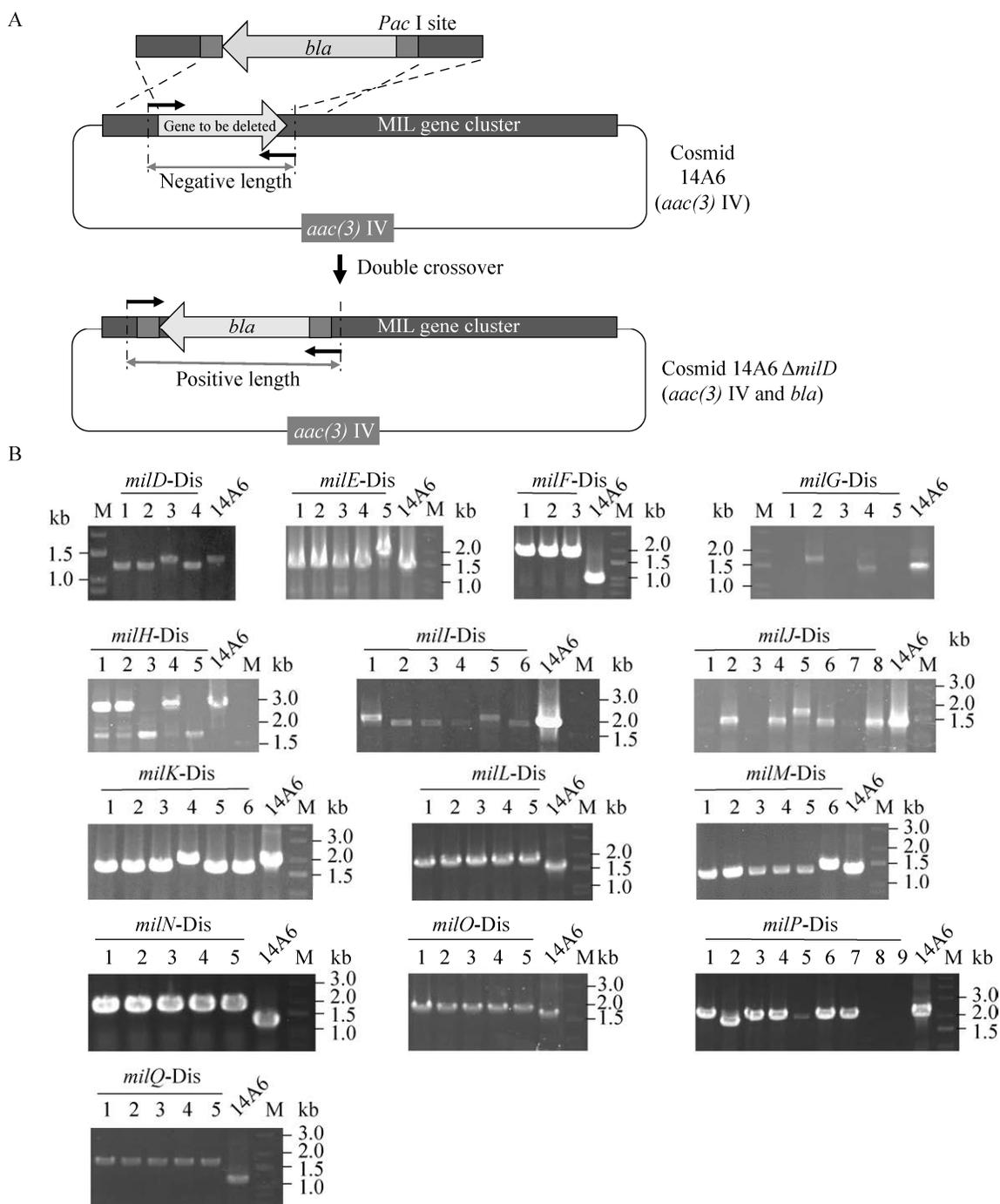


图 4 米多霉素生物合成基因敲除突变载体的构建与 PCR 验证 凝胶图片展示的是 PCR 扩增检测的 DNA 片段；图片上方的数字代表不同的氨苄青霉素抗性菌落；14A6：初始柯斯质粒 DNA 模板，作为参照；M：DNA 分子量标准

Figure 4 Construction and PCR validation of mildiomycin biosynthesis gene knockout mutation vector. The gel picture shows the DNA fragments detected by PCR amplification; The numbers above the picture represent different ampicillin-resistant colonies; 14A6: The starting cosmid DNA template, as a reference; M: The DNA molecular weight standard.

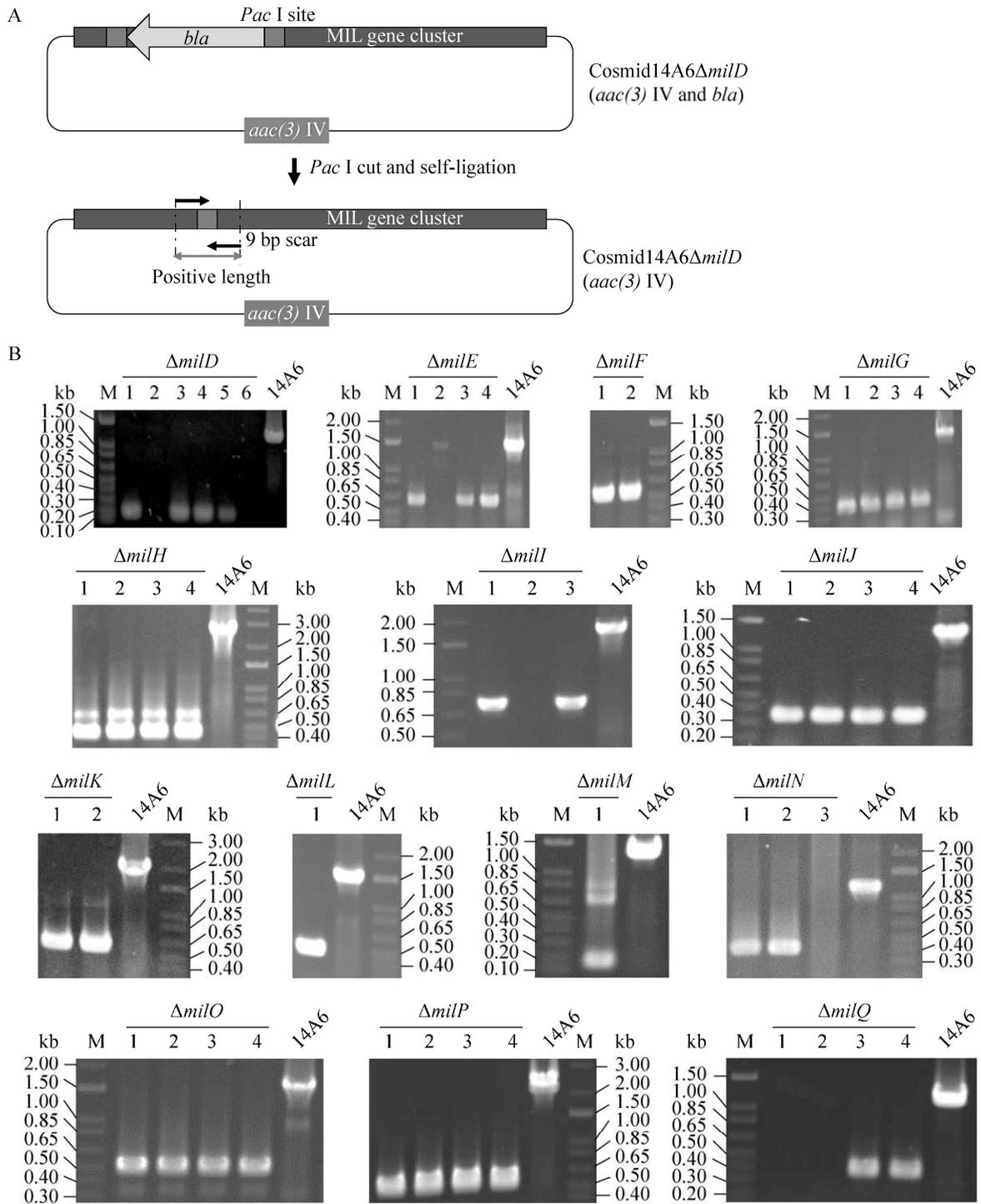


图5 14A6上进行米多霉素生物合成基因同框缺失载体的构建与验证 A: *Pac* I 酶切米多霉素合成基因上带有 *bla* 插入突变的 14A6 及自连; B: PCR 验证 *bla* 丢失后的同框缺失载体

Figure 5 Construction and validation of gene in-frame deletion on cosmid 14A6. A: Schematic diagram of *Pac* I digestion and ligation-mediated elimination of resistance genes; B: PCR verification of the *milD*–*milQ* in-frame deletion vector.

果的干扰,提高了筛选阳性菌株的效率。本方法成功构建了米多霉素生物合成必需基因敲除突变载体,说明了 *bla* 基因作为替换片段中筛选标记的可行性,为含有阿伯拉抗性基因 *aac(3)IV* 的质粒进行同框缺失操作时提供了一个很好的备选方案。

其次,本方法选取了体外的 *Pac I* 酶切和酶连体系代替了体内的 *FLP/FRT* 系统来介导载体的同框缺失,使得进行同框缺失载体的操作时不再受细胞生长周期的影响,提高了同框缺失载体的构建效率。*Pac I* 酶切识别位点(5'-TTAAT TAA-3')是个稀有的序列且不含 GC 碱基,其在 GC 含量最高物种——链霉菌基因组中出现的概率极低,减少了因链霉菌基因组中天然存在的 *Pac I* 位点对体外酶切干扰的概率,使得 *Pac I* 体外酶切和酶连构建链霉菌基因同框缺失操作具有普适性。虽然 *I-Sce I* 的识别序列(5'-TAGGG ATAACAGGGTAAT-3')也满足上述要求,但是 *I-Sce I* 作为一种归位内切酶(homing endonucleases),与一般 II 型限制酶不同的是其识别序列并不严格^[20-21];此外, *Pac I* 识别位点的碱基数比 *I-Sce I* 位点少,这让引物的长度可以更短,合成成本更低。

在构建米多霉素生物合成必需基因的敲除突变载体过程中,不同基因被整合替换的效率不同,其中 *milD*、*milE*、*milH* 重组效率明显要高于 *milO*、*milP*、*milQ*,通过分析 *milD*-*milQ* 的替换片段两端同源序列的 GC 平均含量及其 GC 含量的差异,替换片段两端同源序列的 GC 含量过高(80%)或过低(60%)及两臂 GC 含量的差异过大均会影响 PCR-targeting 的重组效率。构建同框缺失载体的最终目的是实现基因簇在链霉菌中的表达,分析被突变基因在体内的功能。本方法构建同框缺失载体是在体外进行并完成验证的,在后续接合转移所得到的接合子中,只需

要验证质粒有无转进去即可,无需再次验证同框缺失的成功与否,这意味着后续各个同框缺失接合子的检测均无需局限于目标基因,而可以使用同一个引物来进行验证,更加符合高通量操作的需求。

REFERENCES

- [1] Zhang HR, Wang Y, Pfeifer BA. Bacterial hosts for natural product production[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2008, 5(2): 212-225
- [2] Wright F, Bibb MJ. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome[J]. *Gene*, 1992, 113(1): 55-65
- [3] Park HJ, Kim ES. An inducible *Streptomyces* gene cluster involved in aromatic compound metabolism[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 226(1): 151-157
- [4] Hopwood DA. Genetic contributions to understanding polyketide synthases[J]. *Chemical Reviews*, 1997, 97(7): 2465-2498
- [5] Challis GL. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways[J]. *Microbiology: Reading, England*, 2008, 154(6): 1555-1569
- [6] 王婷婷, 邓子新, 陈文青. 抗生素生物合成基因簇克隆策略的研究进展[J]. *生物加工过程*, 2016, 14(2): 70-74
Wang TT, Deng ZX, Chen WQ. Progress in strategies for cloning of antibiotics biosynthetic gene clusters[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2016, 14(2): 70-74 (in Chinese)
- [7] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schonher BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.[J]. *Gene*, 1992, 116(1): 43-49
- [8] Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane DE, Ikeda H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism[J]. *PNAS*, 2010, 107(6): 2646-2651
- [9] Lu ZQ, Xie PF, Qin ZJ. Promotion of markerless deletion of the actinorhodin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2010, 42(10): 717-721
- [10] Cobb RE, Wang YJ, Zhao HM. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(6): 723-728
- [11] Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a

- protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. PNAS, 2003, 100(4): 1541-1546
- [12] 谷欣, 黎燕. 位点特异性重组技术研究进展[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(4): 417-419
Gu X, Li Y. The development of site-specific recombination[J]. Letters in Biotechnology, 2005, 16(4): 417-419 (in Chinese)
- [13] Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(12): 3249-3256
- [14] Waxman DJ, Strominger JL. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics[J]. Annual Review of Biochemistry, 1983, 52: 825-869
- [15] Wu J, Li L, Deng ZX, Zabriskie TM, He XY. Analysis of the mildiomycin biosynthesis gene cluster in *Streptovorticillum remofaciens* ZJU5119 and characterization of MilC, a hydroxymethyl cytosyl-glucuronic acid synthase[J]. ChemBioChem, 2012, 13(11): 1613-1621
- [16] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. 2nd ed. Norwich: The John Innes Foundation, 2000
- [17] Fedoryshyn M, Petzke L, Welle E, Bechthold A, Luzhetskyy A. Marker removal from actinomycetes genome using Flp recombinase[J]. Gene, 2008, 419(1/2): 43-47
- [18] Magalhaes MLB, Blanchard JS. The kinetic mechanism of AAC3-IV aminoglycoside acetyltransferase from *Escherichia coli*[J]. Biochemistry, 2005, 44(49): 16275-16283
- [19] Bliziotis IA, Samonis G, Vardakas KZ, Chrysanthopoulou S, Falagas ME. Effect of aminoglycoside and beta-lactam combination therapy versus beta-lactam monotherapy on the emergence of antimicrobial resistance: a meta-analysis of randomized, controlled trials[J]. Clinical Infectious Diseases, 2005, 41(2): 149-158
- [20] Gimble FS, Wang J. Substrate recognition and induced DNA distortion by the PI-SceI endonuclease, an enzyme generated by protein splicing[J]. Journal of Molecular Biology, 1996, 263(2): 163-180
- [21] Argast GM, Stephens KM, Emond MJ, Monnat RJ Jr. I-PpoI and I-CreI homing site sequence degeneracy determined by random mutagenesis and sequential *in vitro* enrichment[J]. Journal of Molecular Biology, 1998, 280(3): 345-353