

# 圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成基因-*sanK* 的克隆及功能研究

聂丽平<sup>1,2</sup> 李文利<sup>1</sup> 谭华荣<sup>1\*</sup>

(中国科学院微生物研究所 北京 100080) (辽宁师范大学生物系 大连 116029)

**摘要** 利用染色体步移策略,以尼可霉素生物合成相关的基因片段为探针,从圈卷产色链霉菌中克隆到了一个大约 10kb 的 DNA 片段。对其中 1.8kb 的 *Pvu* II-*Sac* II 片段进行了序列分析,结果表明:此片段中含有一个具有 1170 个核苷酸的完整开放阅读框,起始密码子为 447 位的 ATG,终止密码子为 1614 位的 TGA,推测其编码一个 389 个氨基酸的蛋白质产物。利用 BLASTX 程序进行的分析揭示,此基因编码一个肌氨酸单体氧化酶。基因功能研究结果表明,此基因与圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成直接相关,命名为 *sanK*。

**关键词** 圈卷产色链霉菌,尼可霉素生物合成,基因破坏,肌氨酸单体氧化酶

中图分类号 Q753 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0667-04

链霉菌(*Streptomyces* spp.)是一类革兰氏阳性的土壤细菌,它具有复杂的形态分化周期及独特的生理分化周期。链霉菌产生抗生素的能力十分引人注目,在目前已知的大约 1 万种抗生素中,一半以上是由链霉菌产生的<sup>[1]</sup>,其中包括许多在医药、农业和工业上有重要应用价值的抗生素,它们对人类的贡献是毋庸置疑的。然而,随着抗生素的使用也产生了一个重大的难题,即:病原菌的抗药性问题,这大大地削弱了人类对付传染性疾病的能力。因此,从开始使用抗生素时起,人类一直面临着对新的,更有效的抗生素的需求问题。为了满足这种需求,科学家们在广泛开发自然界中天然抗生素的同时,也在不断地改造和合成新的抗生素,令人欣慰的是,随着分子生物学研究方法的不断发展,人类对生物合成相关基因的结构与功能的了解日益深入,利用遗传工程手段创造新型抗生素已经成为可能<sup>[2]</sup>。因此,阐明链霉菌抗生素生物合成基因的功能及其表达调控的分子机制,可为进一步提高链霉菌的抗生素生产力和新型药物的开发提供可靠的理论依据。

尼可霉素(Nikkomycins)为核苷肽类抗生素,由肽基和核苷两部分组成。尼可霉素是几丁质合成酶底物 UDP-N-乙酰葡萄糖胺的结构类似物,对几丁质合成酶具有强烈的竞争性抑制作用<sup>[3]</sup>;因此,表现出高度的抗真菌、抗昆虫和抗螨虫活性。此外,由于尼可霉素对蜜蜂及哺乳动物几乎无毒性,而且在

自然界中极易降解,因此是一种比较理想的农用抗生素。作为抗真菌药物,尼可霉素在人类深部真菌感染的治疗中也有良好的应用前景。

目前,有关尼可霉素生物合成相关基因的研究还较少<sup>[4]</sup>。本文报道了圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成相关基因 *sanK* 的克隆、序列分析及基因功能研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和培养基:**圈卷产色链霉菌 7100 (*Streptomyces ansochromogenes* 7100),*E. coli* DH5 $\alpha$  和 *E. coli* ET12567 为本实验室保存,质粒载体 pBluescrip M13- pKC1139 及重组质粒 pCW18 为本实验室保存。圈卷产色链霉菌 7100 cosmid 文库由本实验室构建并保存。赤星灰霉由中国科学院微生物研究所宋幼新研究员赠送。

**1.1.2 培养基:**用于培养圈卷产色链霉菌的 YEME 培养基、R2YE 培养基和 MM 基本培养基均按文献<sup>[5]</sup>配制。

**1.1.3 工具酶和生化试剂:**本实验所用的各种限制酶购自 Promaga 公司,T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司,Apramycin 为加拿大 Albert 大学 B. Leskiw 博士赠送。PEG1000 购于 Merck Schuchard 公司。非放射性地高辛试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司。DEAE-DE81 滤纸购于 Whatman

公司。

### 1.2 方法

常规的微生物学和分子生物学操作方法均按文献 [5] 进行。DNA 序列分析采用 Ampli Tag<sup>R</sup> DNA Polymerase 和 ABI PRISM<sup>TM</sup> 377XL DNA 序列分析仪进行。基因功能破坏方法及尼可霉素测定方法参见文献 [4]。

## 2 实验结果

### 2.1 10 kb DNA 片段的克隆

本实验采用染色体步移策略,以尼可霉素生物合成相关的 1.1kb 的 *SalI*-*Bam*HI 片段为探针(陈蔚,待发表),通过菌落杂交初筛,斑点杂交复筛,对圈卷产色链霉菌 7100 cosmid 文库进行筛选,从中筛选到一个阳性克隆—cosmid2451。对 cosmid2451 进行 *Pst*I 酶切,并利用相同的探针进行 Southern blot 杂交分析。结果发现,只有一个 10kb 的 *Pst*I 片段给出了阳性杂交信号(图 1),而且,此阳性信号的大小与总 DNA 的 Southern blot 杂交结果一致(图略)。用 DEAE 膜回收这一 10kb 的 DNA 片段,并将之克隆到 pBluescript M13 的 *Pst*I 位点中,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,筛选到了 42 个大小正确的转化子,随机挑取其中 2 个转化子提取质粒,并进行限制酶分析和 Southern blot 杂交实验,结果表明,来自两个转化子的重组质粒均给出了 10kb 的阳性杂交信号(图 2),进一步验证它们均为正确的重组质粒,命名为 pNL5400。

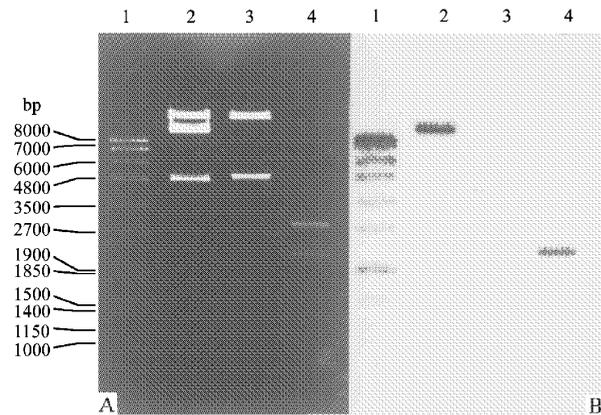


图 1 cosmid2451 的琼脂糖凝胶电泳(A)和 Southern blot 杂交分析(B)

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis(A) and the Southern blot hybridization(B) of cosmid2451

1. sppI/*Eco*RI ; 2. cosmid2451/*Pst*I ;  
3. pKC505/*Pst*I ; 4. pCW18/*Sal*I

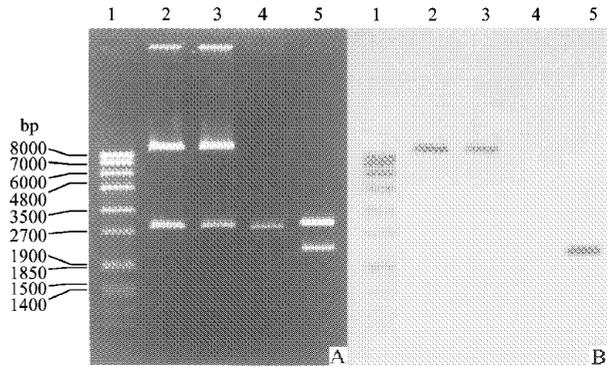


图 2 重组质粒的琼脂糖凝胶电泳(A)和 Southern blot 杂交验证(B)

Fig. 2 The agarose gel electrophoresis(A) and the Southern blot hybridization(B) of recombinants

1. sppI/*Eco*RI ; 2. Recombinant ; 3. Recombinant ;  
4. M13-/*Pst*I ; 5. pCW18/*Sal*I

### 2.2 1.8kb 的 *Pvu*II-*Sac*II DNA 片段的序列分析

对重组质粒 pNL5400 进行了一系列的酶切分析,可知在 10kb 的插入片段中含有 1 个 *Eco*RV, 一个 *Kpn*I 位点, 2 个 *Pvu*II 位点, 3 个 *Bam*HI, 4 个 *Apa*I, 5 个 *Bal*II 位点和多个 *Sac*II, *Sal*I 和 *Sma*I 位点, 但无 *Eco*RI, *Hind*III 和 *Sac*I 位点(图略)。据此,对 pNL5400 进行一系列的亚克隆,并对其中 1.8kb 的 *Pvu*II-*Sac*II 片段进行了核苷酸序列测定,得到了 1801bp 的核苷酸序列(图 3)。利用 Plot 2.3 程序对此序列进行了分析,结果揭示出一个完整的开放阅读框,起始密码子为 447 位的 ATG,终止密码子为 1614 位的 TGA,此开放阅读框具有典型的链霉菌密码子使用特征 (G+C)% 为 71.9%。此外,在起始密码子上游,相距 7 个核苷酸处有一个嘌呤富集的序列 GAGGAGG,推测可能是核糖体结合位点。根据 DNA 序列推测,此基因可能编码一个含有 389 个氨基酸的蛋白质产物。利用 BLASTX 程序在蛋白质数据库中进行了同源比较,发现其与唐德链霉菌的肌氨酸单体氧化酶(Monomeric sarcosine oxidase)具有较高的同源性,一致性为 92%;由此推测,此基因可能编码一个肌氨酸单体氧化酶。

### 2.3 基因功能研究

2.3.1 基因破坏:采用基因破坏策略,对 1.8kb DNA 片段所包含的完整基因进行了功能研究。将其内部 426bp 的 *Eco*RV-*Sma*I 片段(图 3)插入到质粒载体 pKC1139 的 *Eco*RV 位点上,构建了用于同源重组进行基因破坏的重组质粒 pKC1139:: $\Delta$ ... (图 4)。首先,用此质粒载体转化大肠杆菌

```

CAGTGGAGCGTCTCGGGAGCTGGCCGGGCGCGCGATGGATCGCCGGCGCTCGCC 60
CGGACGCTGGCGAGTGGCCAGTGGCGTGGCGAGTGGCCGAGGACGCTCCAC 120
CCCTACCACCTGTTCACCTTCTTCGTCGGCCGGGACAGGGCGTGAGCCGGCAGGGT 180
ATCCACGCCCTGGCCGAGCCGGGGTCCAGGTGCAGGTGGTACTCCCTTGCACCTG 240
CGCCCGAGTGGCGGTTGGGGCCACCGCTGGCGAGTGTCCGGTACCAGAGCGGCT 300
TGGTCCACGAGAGTCACTCCCTGCTACCCCTCCATGCCAGCCAGCCAGTGGAG 360
CACTGGTGTGGCCCTGAAGTCCCGCTACCCGAGCGGGGACCCGGCAGGCGCCG 420
RBS sanK +
ACGTTCAGTTCACGAGGCGCCGGGACGAGCCGATCTATGACGTGGTGGTCTGGGAG 480
M T E S Y V G
ApaI
GGCGCCCTGGGCTGGCCACCCGCTGGAGGTCCGCCAACCGGCCACCGGCTACTGG 540
G G P V G L A T A W Q V A E R G H R V L
TCCTGAGGGGACACGTTCTTCAACGAGAGCGGGGACCCAGCGCGCCGAGCGGCACT 600
Y L E R H T F F A E N G G T S G A E R H
GGCGGCTCCAGTACAGCAGGAGGACCTGTTCCGCTGACGCTGGAGACCTTCCGCTGT 660
W R L Q Y T Q E D L F R L T L E T L P L
GGCGCGCTGGAGAGCCGCTCGAGCGCGCTCATCCAGAGATCGGAGCCTCTGCT 720
W R A L E S R C E R R L I H E I G S L W
TCGGGACACCGAGCTGCTCACCAACGAGGGCAGATCTCGGGGACCCGCGATGATGG 780
F G D T D V V T N E G Q I S G T A A M M
EcoRV
ACAAGTCTTCGGTGGCTACGAGTGGCTCAAGTCCGCGATATCGAGCGCGGTTCGGGT 840
D K L S V R Y E W L K S A D I E R R F G
TCGGGCTCCCGCGGACTACGAGGGTTCCTCCAGCCGAGCGGGGAGCAGTCTGAG 900
F R G L P R H Y E G F L Q P D G G T I D
TCAGGGAACTGGCGGCTGTTCACCTCCGCCAGCGCGCGGTGACCCCTGGCGCT 960
V R G T L A A L E T L A Q A A G C C T L R
CGGGGAGAGCGGTGACGCACTGTCGCCGACCGGAGCGGGTGGCCTCACCCGACC 1020
A G E T V T E L V F D A D G A S V T T D
GGGCGACCTACCGGCGGCAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 1080
R G T Y R A G K V V L V C G P Y T N D L
TGGAACCGCTGGCGCGGCTCGGCTACTCGGTGACGAGATGGCCATCGGGGCTACC 1140
L E P L G A R L A Y A S V Y E M A I A A Y
GGCAGGCGACCGGCTGACGAGCGCGCTTCTGTTCCGCTCCAGCAGCCGCGCGCG 1200
R Q A T P V T Q A P F W F A F Q Q P T P
SamI
AGGACACCAACTGTTCTACGGGTTCGGCCACAACCCGTGGCGCCCGGGAGTTCGTGC 1260
E D T N L F Y G F G H N P W A D G E F V
GCTGCGGCGGACTTCGAGGTGGACCCGCTCGACCCCTCGGGCCACCCGCGCTCG 1320
R C G G P T F E V D P L D H P S A A T G V
SalI
CCGACCGCGCCAGACCGGCTCTCGGGTGGTGGGACCATCTGCCACGGTCCG 380
A D R R Q T D R L S G W L R D H L P T V
ACCCGACCCGCTGGGACCTCGACTGCTGGCGCTGCTGCCAGCGACCCGAGCGG 1440
D P D P V R T S T C L A V L L T P D P E R
AGTTCCTTCGGCAGTGGCGGACTGATGACGACGAGGAGAGCTCTCTGCTTACG 1500
Q F F L G T A R D L M T H G E K L V V Y
GGCGGGCTGGCGTTCAATTCGCTCCGCTTTCGGCGGACTGCTCCGCGACTGGCG 1560
G A G W A F K F P V L F G R I C A D L A
TGGAGACTCCACCGCTACGACATCTCGCGCTCGCCCGCAGTGGCTCTCTGACG 1620
V E D S T A Y D I S R L A P Q S A L *
GCCCGGAAAGGAGGTGACAGAGCGTGAGTTCATTCGTCGCGAGGATCCCGGCTCC 1680
CGAGGATCCACCGGATCGCGCGGGAGTACCGGACCGGGGTGGTGGCTCCCGAGC 1740
GGCTGACCGGCTGGTCTCGGCACTGGCCGAGGATCCCGAGAGGAGCGCTCCGCG 1800
G

```

图3 1.8kb *Pou*II-*Sac*II DNA 片段的核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

Fig.3 The whole sequence of 1.8kb *Pou*II-*Sac*II DNA fragment and its predicted amino acid sequence

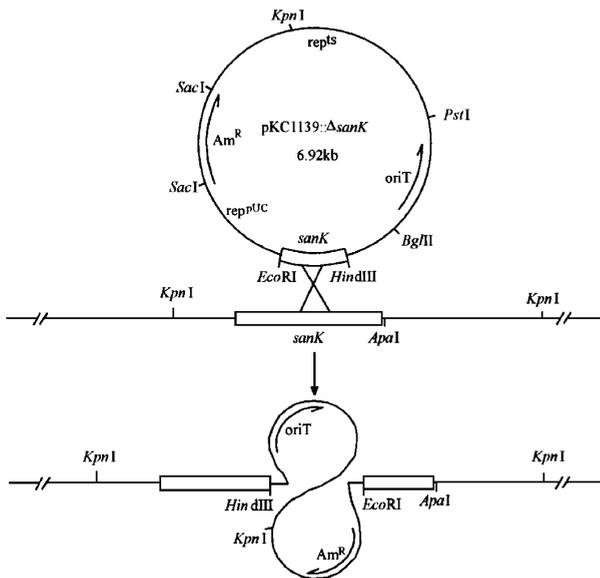


图4 基因破坏用载体 pKC1139:: $\Delta$ *sanK* 及基因破坏原理示意图

Fig.4 The plasmid pKC1139:: $\Delta$ *sanK* and the strategy of gene disruption

ET12567 然后从这个限制修饰系统缺陷的菌株中提取质粒 转化圈卷产色链霉菌 7100 ,随机挑取其中一个正确的转化子接种到含有 Apramycin 的基本培养基上 ,于 30℃ 培养 5d 后 ,制备孢子悬液 ;经适当稀释后 ,以每个平皿 10<sup>6</sup> 个孢子的浓度涂布于含有 Apramycin 的基本培养基上 ,40℃ 培养 4d ;利用 pKC1139 携带温度敏感型复制起点这一特性 ,筛选到了经单交换后可以在 40℃ 正常生长并具有 Apramycin 抗性的“破坏子”。

2.3.2 “破坏子”产生尼可霉素的测定 :从上述“破坏子”中随机挑选出 24 个 ,接种到含有 Apramycin 的 R2YE 培养基上 ,分别培养 3d、5d 和 7d ,测定它们产生 Nikkomycin 的能力。结果全部 24 个破坏子在所测定的时间内均不产生 Nikkomycin ,图 5 所示为其中 6 个破坏子的测定结果 ,在相同培养条件下 ,野生型圈卷产色链霉菌可以正常产生 Nikkomycin。综上所述可知 ,位于 1.8kb DNA 片段中的基因与圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成直接相关 ,并命名该基因为 *sanK* ( *Streptomyces ansochromogenes* nikkomycin synthesis gene K )。

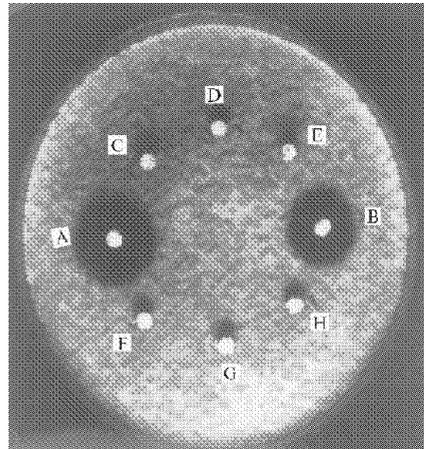


图5 破坏子产生尼可霉素的测定

Fig.5 The test of nikkomycin production by disruptants

- A. *S. ansochromogenes* 7100 ;
- B. *S. ansochromogenes* 7100 containing pKC1139 ;
- C~H. Disruptants

2.3.3 *sanK* 基因破坏的 Southern 杂交验证 :为进一步确证上述“破坏子”中 *sanK* 已经被破坏 ,在实验中分别从野生型圈卷产色链霉菌和 3 个随机选择的“破坏子”中提取总 DNA。用 *Kpn*I 彻底酶切后 ,以 898bp 的 *Eco*RV-*Sal*I 片段 (参见图 3) 为探针 ,进行 Southern blot 杂交验证 (图 6)。结果表明 ,野生型菌株只给出了一个 7.5kb 的信号带 ,而破坏子均

给出了 9.2kb 和 5.3kb 二个信号带,这一结果与理论计算结果相一致(图 4)。表明在所有 3 个破坏子中都进行了正确的交换,即 *sanK* 确已被破坏。

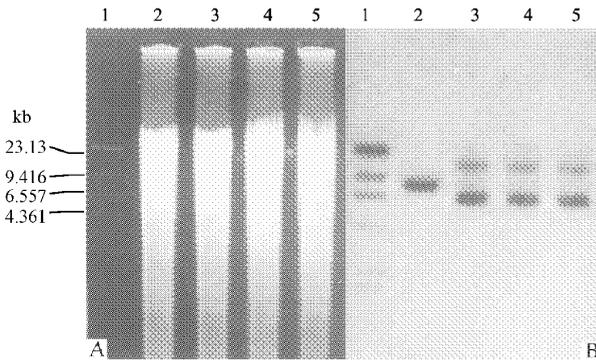


图 6 破坏子染色体 DNA 的 Southern blot 杂交验证

Fig.6 The Southern blot hybridization of *sanK* disruptants

A. The agarose gel electrophoresis of the total DNA digested with *Kpn* I

B. The Southern blot hybridization

1.  $\lambda$ DNA/*Hind*III ; 2. *S. ansochromogenes* 7100 wild type strain ; 3~5. Disruptants

### 3 讨 论

本实验结果表明, *sanK* 编码一个肌氨酸单体

氧化酶。已知肌氨酸单体氧化酶广泛地存在于各种生物细胞中<sup>[6,7]</sup>,它们均为单亚基酶,分子大小在 372~390 个氨基酸左右,以 FAD 为辅酶催化仲氨或叔氨的氧化反应。1997 年,Reuber 等人从家兔肝脏中提取到了肌氨酸单体氧化酶<sup>[8]</sup>,除肌氨酸外,它还可以催化 L-脯氨酸, L-六氢吡啶羧酸为底物的氧化反应,产生吡咯-5-羧酸和哌啶-6-羧酸。哌啶-2-羧酸是这两个化合物的结构类似物,同时也是尼可霉素肽基合成过程中一个重要的中间产物<sup>[9]</sup>。因此可以推测,在尼可霉素肽基合成过程中可能存在类似的氧化反应。在本实验中, *sanK* 编码产物具有 389 个氨基酸残基,并且在 321 位上具有此类酶共有的半胱氨酸残基(此残基为 FAD 的结合位点)。 *sanK* 的破坏导致相应的圈卷产色链霉菌突变株丧失了尼可霉素生物合成能力。这表明, *sanK* 编码的肌氨酸单体氧化酶是圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成所必需的。到目前为止,有关尼可霉素生物合成相关基因的研究尚处于初始阶段, *sanK* 的克隆和功能研究,为我们揭示尼可霉素生物合成途径及阐明基因表达调控的分子机制提供了可靠的证据。

### 参 考 文 献

- [1] Hopwood D A. *Microbiology*, 1999, **145**: 2183~2202
- [2] Marsden A F A, Wilkinson B, Cortes J *et al.* *Science*, 1998, **279**: 199~202
- [3] Hector RF, Schaller K. *Antimicrob Agents chemother*, 1992, **36**: 1284~1289
- [4] Jia J, Li W, Chen W *et al.* *Science in China (Series C)*, 2000, **43**: 30~38
- [5] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces- a Laboratory Manual*. Norwich, UK: The John Innes Foundation, 1985
- [6] Wagner M A, Khanna P, Jorns M S. *J Biochem*, 1999, **38**: 5588~5595
- [7] Wagner M A, Jorns M S. *Arch Biochem Biophys*, 1997, **342**: 176~181
- [8] Reuber B E, Karl C, Reimann S A *et al.* *J Biol Chem*, 1997, **272**: 6766~6776
- [9] Bormann C, Mattern S, Schrepf H *et al.* *J Antibiot*, 1989, **42**: 913~918

## Cloning and Function of *sanK*-a Gene Involved in Nikkomycin Biosynthesis of *Streptomyces ansochromogenes*

NIE Li-Ping<sup>1,2</sup> LI Wen-Li<sup>1</sup> TAN Hua-Rong<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080

<sup>2</sup> Department of biology, Liaoning Normal university, Dalian 116029

**Abstract** The chromosome walking strategy has been used in this experiment and a 10kb DNA fragment was cloned from the cosmid library of *Streptomyces ansochromogenes* using a partial DNA fragment involved in the nikkomycins biosynthesis as a probe. The nucleotide sequence of 1.8kb *Pvu* II-*Sac* II DNA fragment was determined and analysed. The result indicated that the 1170bp DNA fragment contains one complete open reading frame (ORF). The start codon is ATG at 447 bp position and the stop codon is TGA at 1614bp position, the predicted product is a monomeric sarcosine oxidase using BLASTX programme. The experiment of gene disruption showed that the gene is closely related to nikkomycins biosynthesis of *Streptomyces ansochromogenes*. This gene was designated as *sanK*.

**Key words** *Streptomyces ansochromogenes*, nikkomycin biosynthesis, gene disruption, monomeric sarcosine oxidase