

# 链霉菌 *Streptomyces tenebrarius* H6 中与抗生素有关的糖生物合成基因的克隆

李天伯<sup>1</sup> 尚广东<sup>2</sup> 夏焕章<sup>1</sup> 王以光<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>(沈阳药科大学 沈阳 110015)

<sup>2</sup>(中国医学科学院 中国协和医科大学医药生物技术研究所 北京 100050)

关键词 黑暗链霉菌, dTDP-葡萄糖-4,6-脱水酶基因, 糖生物合成基因

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0329-03

链霉菌 *S. tenebrarius* H6 产生多种氨基糖甙类抗生素, 主要有阿普霉素、妥普霉素及卡那霉素 B, 其中阿普霉素因含有 8 碳糖的一种特殊结构引人注目, 它的抗菌谱广, 特别是对革兰氏阴性菌有较强的抗菌活性, 不容易产生耐药性, 对已有的耐药菌产生的氨基糖苷转移酶等失活酶仍有抵抗力。主要用于牛、猪、鸡等的大肠杆菌、沙门氏菌和支原体所引起的白痢、腹泻和肺炎等疾病。迄今有关八碳糖生物合成基因簇的研究在国内外尚无报道, 在该菌株开展有关糖合成代谢基因的研究有着一定的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种: 链霉菌 *S. tenebrarius* H6 源自沈阳药科大学; *E. coli* DH1 为构建基因文库时  $\lambda$  噬菌体包装蛋白受体菌, *E. coli* DH5 $\alpha$  为质粒受体菌, 由医药生物技术研究所保存。

1.1.2 质粒: 链霉菌/大肠杆菌穿梭柯斯质粒 pKC505 为构建基因文库载体<sup>[1]</sup>, 由医药生物技术研究所保存。

1.1.3 培养基: *E. coli* 培养基为 LB; *S. tenebrarius* H6 培养基为 SGGP<sup>[2]</sup>;

1.1.4 试剂和仪器: PEG1000 为英国 Koch-Light 公司产品; IPTG X-Gal 购自 Promega 公司; 限制酶、LA-Taq 酶购自 TakaRa 公司;  $\lambda$  噬菌体包装蛋白为 Promega 公司产品; 硫链丝菌素 (Thiostrepton, Thio) 由 Squibb&Sons 公司赠送; 阿普霉素 (Apramycin, Am) 由韩国明知大学 Suh Joo-won 教授赠送; 日本 HITACHI 高速冷冻离心机; 中科院 PCR-90A 型 DNA 扩增仪; DNA 回收采用 Geneclean 公司 Bio101<sup>R</sup> kit;  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 购于北京亚辉生物医学工程公司; 地高辛探针标记试剂盒为 Roche (B.M.) 公司 DIG DNA Labeling & Detection Kit; Southern 杂交尼龙膜购自 Amersham 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 链霉菌总 DNA 的提取按文献 [2], *E. coli* 质粒 DNA 的提取、酶切、连接按分子克隆手册<sup>[3]</sup>进行。

1.2.2 DNA 片段的分离采用琼脂糖凝胶电泳, 回收小于 10kb 片段采用玻璃乳吸附及洗脱法, 按 USA Bio101 Gene-clean<sup>R</sup> II Kit 说明书操作。

1.2.3 *E. coli* 感受态的制备、转化、转染按分子克隆手册<sup>[3]</sup>进行。

1.2.4 PCR 方法: 采用 LA-Taq 酶 40 $\mu$ L 体系, 98 $^{\circ}$ C 2min 热启动, 96 $^{\circ}$ C 变性 1min, 56 $^{\circ}$ C 复性 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s, 30 个循环。取 10 $\mu$ L 电泳检查。

1.2.5 放射性探针的标记按照分子克隆手册<sup>[3]</sup>进行; 地高辛探针的标记按照试剂盒说明书进行。菌落杂交按 Kit 说明书进行, 杂交温度根据链霉菌 GC% 高的特点升至 50 $^{\circ}$ C (杂交液含 50% 甲酰胺)。

## 2 结果及讨论

### 2.1 链霉菌 *S. tenebrarius* H6 基因文库的构建

pKC505 为能在大肠杆菌和链霉菌中复制的双功能柯斯质粒, 在其中插入的外源片段可以较大且稳定<sup>[1]</sup>, 是较理想的构建基因文库载体<sup>[7,8]</sup>。选用 *recA*<sup>-</sup> 表型且恢复突变率极低的 *E. coli* DH1 为构建基因文库受体菌。提取链霉菌 *S. tenebrarius* H6 的总 DNA, 经 *Sau* 3AI 部分酶切, 蔗糖梯度超速离心。收集合并 20 ~ 30kb 的片段。载体 pKC505 质粒 DNA 经 *Hpa*I 酶切, CIAP 去磷酸化, *Bam*HI 酶切后乙醇沉淀、纯化、浓缩。

将载体和外源 DNA 片段以摩尔比为 2:1 的比例混合, 使体系中的 DNA 浓度为 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ L, T4 ligase 连接  $\lambda$  噬菌体包装蛋白体外包装, 转染 *E. coli* DH1 感受态细胞。在含 Am

50μg/mL 的 LB 平板上筛选得到 10 000 个转化子, 挑取 3 000 个转化子于 96 孔板培养保藏。

随机挑取 12 个转化子培养后提取质粒, BamHI 酶切分析结果表明, 每个转化子均含有不同的约 25kb 的外源片段。一般认为链霉菌染色体总 DNA 约为 6 × 10<sup>3</sup> ~ 8 × 10<sup>3</sup> kb, 所以按 Maniatis 公式<sup>[3]</sup>:  $N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f/g)$ , 以  $g = 1 \times 10^4$  kb 计算, 本研究构建的基因文库覆盖率  $P = 99.926\%$ , 已满足建库要求。

### 2.2 探针基因的获得

在大多数产生氨基糖类或含糖基类抗生素的链霉菌中, 都存在 6-脱氧己糖(6-deoxyhexose)合成途径, 因此参与 6-脱氧己糖及其中间体生物合成的基因都有着较高的同源性<sup>[4,5]</sup>。根据参与链霉素生物合成的 dTDP-glucose-4, 6-dehydratase 基因(*strE*)及其他抗生素中与己糖合成有关 dTDP-glucose-4, 6-dehydratase 基因<sup>[6]</sup>保守序列, 设计合成 1 对引物:

上游 5'-CSGGS GSSGC SGGST TCATS GG-3'

下游 5'-GGGWR CTGGY RSGGS CCGTA GTTG-3'

(其中 R = A/G, W = A/T, Y = C/T, S = C/G),

以 *S. tenebrarius* 总 DNA 为模板, 经 PCR 扩增得到约 0.6kb 的片段, 测序发现与 *strE* 有着较高的同源性, 相同性 (Identities) 为 66%。

### 2.3 从基因文库中获得与糖合成有关基因簇

将 PCR 得到的 0.6kb 片段用 α-<sup>32</sup>P-dCTP 标记后作为探针, 与点种在尼龙膜上的基因文库进行菌落杂交, 筛选得到 30 个阳性克隆。阳性克隆质粒经 BamHI 酶切、琼脂糖凝胶电泳、转膜, 再与地高辛标记的探针杂交, 确证每个阳性克隆中均含有探针基因片段 6.5kb 重叠区。

选择其中具代表性 12 个阳性克隆质粒 DNA BamHI 酶切后 (如图 1) 进行 Southern 杂交, 结果表明约 7.0kb 片段为阳性片段, 推理得出 30 个阳性克隆的 DNA 连锁图 (图 2), 连锁基因簇约 50kb。

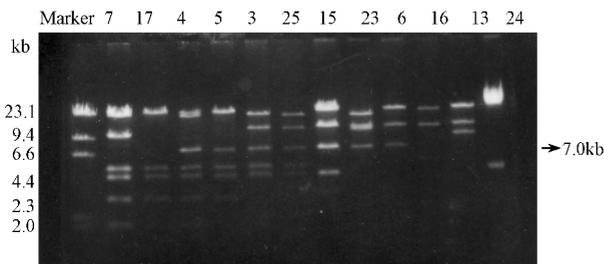


图 1 12 个具代表性阳性克隆质粒的 BamHI 酶切电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis of 12 representative positive cosmids digested with BamHI

Marker λDNA/HindIII;

7, 17, 4, 5, 3, 25, 15, 23, 6, 16, 13, 24 :cosmid DNA/BamHI

### 2.4 测序分析

2.4.1 *aprE* 基因完整序列分析: 将含有探针的 7.0kb 片段进行酶谱分析、亚克隆及测序。通过 ORF 分析得到了一段完整的基因由 1 132 个核苷酸组成, 以 ATG 为起始密码子, TGA 为终止密码子。其 (G + C)% 含量为 72%, 第三位密码

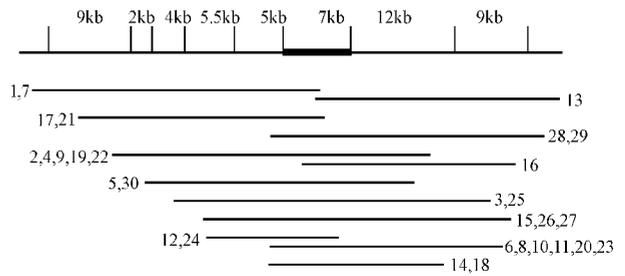


图 2 *S. tenebrarius* 中与糖有关生物合成基因连锁图

Fig.2 The putative sugar biosynthesis related gene cluster from *S. tenebrarius* H6

1 ~ 30 :DNA fragment of positive clones

子 (G + C)% 含量 95% 以上, 符合链霉菌基因结构特征。其编码蛋白由 332 个氨基酸组成, 经比较发现与许多链霉菌属的葡萄糖 4, 6 位脱水酶基因都有着较高的同源性, 其中同源性最高的为来自链霉菌产生菌六碳糖生物合成基因簇的 *strE* 基因编码的 dTDP-glucose-4, 6-dehydratase, 推测本研究所获得的基因应为 *S. tenebrarius* H6 中的 dTDP-4, 6-dehydratase, 将其命名为 *aprE*。GenBank accession No. AF306787。

2.4.2 糖合成基因簇的连锁和分析: 根据链霉菌生物合成基因的成簇连锁性, 将已得到的 *aprE* 基因序列的两端做进一步延伸测序, 共测定了 2500bp, 经 Frameplot 分析显示均符合链霉菌结构基因中第三位密码子 (G + C)% 含量高的特征。

与 *aprE* 基因链锁的一端经部分测序显示与链霉菌产生菌 *strI* (dTDP-4-dehydrorhamnose reductase) 具有很高的同源性。而另一端基因尚未得出较好的同源性比较, 可能为 *S. tenebrarius* H6 菌株中与糖生物合成有关的新基因, 进一步测序及有关基因功能的研究正在进行中。

### REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Richardson M A, Kuhstoss S, Solenberg P *et al.* A new shuttle cosmid vector pKC505 for streptomycetes. *Gene*, 1987, **61**: 231 ~ 241

[ 2 ] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* Genetic Manipulation of Streptomycetes, A Laboratory Manual, Norwich ( England ): John Innes Foundation, U K, 1985

[ 3 ] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N Y, 1989

[ 4 ] Piepersberg W. Pathway engineering in secondary metabolite-producing actinomycetes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1994, **14**( 3 ): 251 ~ 285

[ 5 ] Pissowotzki K, Mansouri K, Piepersberg W *et al.* Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes strELMB2N. *Mol Gen Genet*, 1991, **231**: 113 ~ 123

[ 6 ] Decker H, Gaissner S, Pelzer S *et al.* A general approach for cloning and characterizing dNDP-glucose dehydratase genes from actinomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, **141**: 195 ~ 201.

[ 7 ] Rosa A, Lacalle, Jose A, Tercero, Jimenez A *et al.* Cloning of the complete biosynthetic gene cluster for an aminonucleoside antibiotic, puromycin, and its regulated expression in heterologous hosts. *The EMBO Journal*, 1992, **11**( 2 ): 785 ~ 792

[ 8 ] Xiang L, Wang Y, Dai J *et al.* The genomic library construction of Thienamycin producing strain-*Streptomyces cattleya* A520. *Chinese Journal of Antibiotics*, 1998, **23**( 3 ): 161 ~ 165

## Cloning of the Sugar Related Biosynthesis Gene Cluster from *Streptomyces tenebrarius* H6

LI Tian-Bo<sup>1</sup> SHANG Guang-Dong<sup>2</sup> XIA Huan-Zhang<sup>1</sup> WANG Yi-Guang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>( Shenyang Pharmaceutical University ,Shenyang 110015 ,China )

<sup>2</sup>( Institute of Medicinal Biotechnology ,CAMS & PUMC ,Beijing 100050 ,China )

**Abstract** *Streptomyces tenebrarius* H6 produces a complex of aminoglycoside antibiotics such as apramycin ,tobramycin and kanamycin B etc . To study the apramycin biosynthetic genes the genomic library from the *Streptomyces tenebrarius* H6 was established using *E. coli*/ *Streptomyces* shuttle vector pKC505 by in vitro packing. The probability of finding a specific gene from the library composed of 3 000 colonies was over 99.9% . According to the highly conserved sequence of the genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis ,primers were designed and 0.6kb fragment homologous to *strE* gene was obtained by PCR. 30 positive clones were found from the genomic library of *S. tenebrarius* H6 with the 0.6kb fragment as a probe. Overlapped regions were localized by Southern hybridization and putative sugar related biosynthetic gene cluster was mapped by restriction enzyme digestions. An ORF of dTDP-glucose-4  $\beta$ -dehydratase gene consisted of 1 132bp ,designated as *aprE* ,was obtained and submitted to GenBank under the accession number of AF306787. A DNA sequence highly homologous to *strL* coding dTDP-4-dehydrorhamnose reductase was found linked with *aprE* gene.

**Key words** *S. tenebrarius* , dTDP-glucose-4  $\beta$ -dehydratase ,sugar biosynthetic gene cluster

Received :November 1 ,2000

This work was supported by Grant from NSF( 39700030 ).

\* Corresponding author. Tel 86-10-63038137 ; Fax 86-10-63017302 ; E-mail wangyh456@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>