

头状链轮丝菌染色体复制起始区的克隆和对变铅青链霉菌的转化

马 伟 茅 翔 卢 捷 姜卫红 焦瑞身 覃重军 赵国屏*

(中国科学院上海生命科学研究院 植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘 要 头状链轮丝菌(*Streptovorticillum caespitosus*) ATCC27422 是抗肿瘤药物——丝裂霉素 A 的产生菌, 根据高 GC 含量革兰氏阳性菌染色体复制起始区两端基因序列的保守性, 采用 PCR 方法从该菌中克隆了一段包含染色体复制起始区(*oriC*)的 1.3 kb 片段。序列分析发现, 克隆片段与天蓝色链霉菌的 *oriC* 及邻近区域的同源性达 80% 以上; 头状链轮丝菌 *oriC* 中含有 22 个 DnaA-box, 保守序列为 TTGTCCACA。以克隆片段构建的质粒可以跨属转化变铅青链霉菌(*S. lividans*) ZX7, 原生质体转化效率为 3.2×10^2 个/ μgDNA , 质粒在 *S. lividans* ZX7 中能以低拷贝形式稳定存在, 转化子的菌落和菌丝形态均正常。头状链轮丝菌 *oriC* 序列与几种链霉菌的 *oriC* 有较高的同源性, 以及在变铅青链霉菌中仍具有复制起始活性等说明链轮丝菌属与链霉菌属在系统发生上关系较近, 但采用最大似然法分析 *oriC* 序列构建的头状链轮丝菌与几种链霉菌的系统进化树表明, 头状链轮丝菌与几种链霉菌之间的分化距离远大于链霉菌之间的分化距离。该证据支持链轮丝菌属的独立分属。

关键词 头状链轮丝菌, 复制起始区(*oriC*), 跨属复制起始活性

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0662-05

染色体复制起始区(*oriC*)是涉及 DNA 复制起始发生的一段序列, DNA 复制复合体装配, 双链 DNA 的解链, DNA 复制的 RNA 引物合成以及最初的 DNA 合成等过程均在此发生, 因此, 对 *oriC* 的研究具有重要的理论意义^[1, 2]。同时, 由于 *oriC* 是一顺式作用元件, 理论上, 任何与其连接的 DNA 片段, 在适当的宿主菌内都可以复制, 因此可以用于构建遗传操作系统, 因此 *oriC* 又具有实际应用的价值。*oriC* 序列的结构特点包括: 1) 是一段非编码区; 2) 序列中含有多个长度为 9 个碱基对的复制起始蛋白(DnaA)的识别结合位点(DnaA-box); 3) 在 GC 含量较高的革兰氏阳性菌中, DnaA-box 的保守序列为 TTGTCCACA^[2, 3]。

对链霉菌^[4, 5]和分枝杆菌^[6]复制起始区及附近基因的研究揭示, 这两类高 GC 含量的革兰氏阳性菌染色体复制起始区(*oriC*)均位于 *dnaA* 与 *dnaN* 基因之间。Jakimowicz 等人利用这一特性, 通过对 *oriC* 两端的 *dnaA* 基因的 3' 端和 *dnaN* 基因的 5' 端的保

守序列分别设计简并引物, 成功地克隆了包括 *S. antibioticus* ETH7451 在内的 3 种链霉菌的复制起始区^[7]。头状链轮丝菌(*S. caespitosus*)属于链轮丝菌属, 该属是 80 年代才从链霉菌属分离出来的新属, 其细胞壁成份与链霉菌属有明显差别^[8], 但同时两属还存在许多相似之处, 因此其分类地位仍有争论。

对该属种类在分子水平上的深入研究, 可以为高 GC 含量革兰氏阳性菌系统演化研究提供新的证据。头状链轮丝菌是丝裂霉素 A 的主要产生菌之一, 丝裂霉素是当前应用较为广泛的用于治疗消化道肿瘤、肝癌、慢性白血病等的主要癌症治疗药物^[9]。但到目前为止, 在头状链轮丝菌中还没有较为完善的遗传操作系统, 为此本实验室开展了头状链轮丝菌 *oriC* 的克隆及功能等的研究。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

收稿日期 2002-06-27, 修回日期 2002-09-03

基金项目 本研究由国家自然科学基金重点项目资助(批准号:10039630010)。

* 通讯作者。Tel: 86-21-64042090 x 4791; Fax: 86-21-64042385; E-mail: wjiang@iris.sipp.ac.cn 或 gpzhao@sibs.ac.cn

** 克隆序列 GenBank/EMBL 登录号: AJ458440。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Genotype and characteristics	Sources or references
Strain		
<i>S. caespitosus</i> ATCC27422	Wild type	ATCC
<i>S. lividans</i> ZX7	<i>pro str-6 rec-46</i>	10
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44, ΔlacZU 169 (φ80 lacZΔM15), hasdR17, recAI, endAI, gyrA96, thiI, relAI</i>	11
Plasmids		
pMD18-T	Ap ^r	TaKaRa
pQC156	Ap ^r , <i>tsr</i> , <i>mel</i>	Stored in this lab
pMJ8	pMD18-T carrying 1.3 kb PCR fragment from <i>S. caespitosus</i>	This study
pMJ9	pQC156 carrying 1.3 kb PCR fragment from <i>S. caespitosus</i>	This study

1.2 培养基及培养条件

E. coli 以固体或液体 LB 培养基培养, *E. coli* 转化子培养时, 培养基中加相应的抗生素, 浓度为 100 μg/mL 的 氨苄青霉素。变铅青链霉菌和头状链轮丝菌固体培养基为 R2YE 和 YEME, 转化子在培养基中加硫链丝菌素, 固体 R2YE 中终浓度为 50 μg/mL, YEME 液体培养基中的终浓度为 5 μg/mL^[12]。

1.3 试剂与材料

限制酶等工具酶为 TaKaRa 公司产品。溶菌酶为华美公司进口分装产品。转化使用 Bio-Rad 公司的 Gene Pulser 及配套的电击杯, 电转化条件为: 0.1 cm 的电击杯, 25 μF, 800 Ω, 9 kV/cm。从凝胶中回收 DNA 片段采用上海华舜生物技术公司的(小量)胶回收试剂盒。其余生化试剂购自上海生工生物技术公司的进口分装超纯级生化试剂。探针标记采用 Promega 公司的 Primer-a-gene 试剂盒, 同位素购自北京亚辉生物技术公司。杂交用尼龙膜为 Boehringer Mannheim 公司的 HybondN。

1.4 方法

1.4.1 变铅青链霉菌的原生质体转化 :变铅青链霉菌(*S. lividans* ZX7)的原生质体制备及转化方法参照文献[12]进行。

1.4.2 *E. coli* 电转化 :*E. coli* 电转化感受态细胞制备以及电转化参照文献[13]进行。转化使用 Bio-Rad 公司的 Gene Pulser 及配套电击杯。

1.4.3 DNA 操作 :头状链轮丝菌和变铅青链霉菌总 DNA 的提取参照文献[12]方法; DNA 的体外操作, 如质粒提取、酶切、连接、电泳、Southern 杂交等参照公司使用说明书及文献[14]操作。

1.4.4 PCR :PCR 使用德国 Biometra 公司的 T Gradient Thermoblock。根据 *S. coelicolor*、*S. lividans*、*S.*

antibioticus 和 *S. chrysomallus* 等 *dnaA* 的 3' 端、*dnaN* 基因的 5' 端保守序列以及链霉菌密码子的偏好, 设计了用于扩增头状链轮丝菌 *oriC* 的简并引物如下:

P1: 5' AGCTGACCAACSGCATCAAG, P2: 5' CAGCGSCGSGTACTSCTS (S = G 或 C); PCR 条件如下 95°C 3min; 95°C 1min; 57°C 1min; 72°C 1.5min, 30 个循环; 72°C 10min, 扩增 1.0~1.5kb 的片段。

1.4.5 DNA 序列测定与分析 :PCR 引物和 DNA 序列测定由基康生物技术公司进行。引物设计使用软件 Primer 进行^[15]; 序列分析采用 Biosino 的基于网络的序列分析软件 SEQWEB (BIOSINO)^[13]进行序列分析、BioEdit^[16]等分析软件进行。

2 结果

2.1 头状链轮丝菌 *oriC* 的克隆及 Southern 杂交验证
用 P1、P2 作引物、头状链轮丝菌总 DNA 作模板进行 PCR 扩增, 得到一条 1.3 kb 的特征片段, 经电泳、胶回收后, 采用 pMD18-T 进行 TA 克隆, 得到重组质粒 pMJ8; 将 pMJ8 酶切检验和 Southern 杂交验证(见图 1)后送测序。

2.2 克隆片段的序列分析

将克隆片段的序列与 EMBL/GenBank 核酸数据库进行 BlastN 序列比对分析, 发现该克隆片段与几种链霉菌的复制起始同源性较高, 其中与 *S. coelicolor* 的 *oriC* 序列同源性超过 80%(见图 2)。

经第 3 位密码子偏好分析确认克隆片段为非编码区。进一步的序列分析发现, 克隆片段中包含有 22 DnaA-box 结构, DnaA-box 的保守序列为 TTGTC-CACA; 与典型的 *oirC* 的特征相吻合, 从而初步确定所克隆的片段为头状链轮丝菌的 *oriC*。

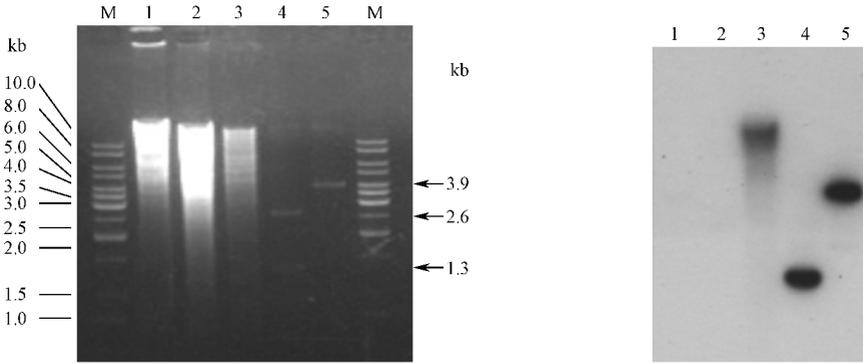


图 1 克隆片段与头状链轮丝菌等总 DNA 的 Southern 杂交

Fig.1 *S. caespitosus* genomic DNA Southern hybridization with the cloned fragment

- M . 1 kb DNA marker (MBI)
- 1. *A. mediterranei* U32 genomic DNA *
- 2. *S. caespitosus* genomic DNA *
- 3. pMJ8 digested by *Bam* HI and *Hin* d III
- 4. pMJ8 digested by *Bam* HI
- 5. pMJ8 digested by *Bam* HI
- * . All genomic DNA digested by *Bam* HI

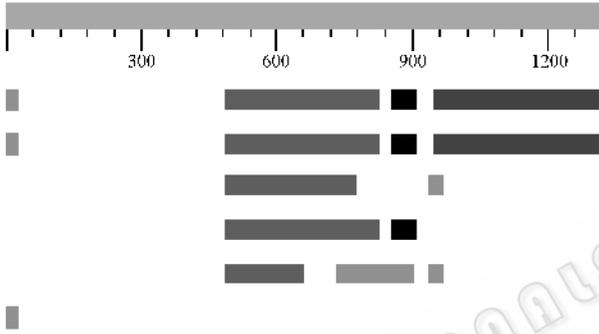


图 2 1.3 kb 克隆序列与 EMBL/GenBank DNA 数据库的 BlastN 比对结果

Fig.2 Result of 1.3 kb fragment alignment analysis against DNA database

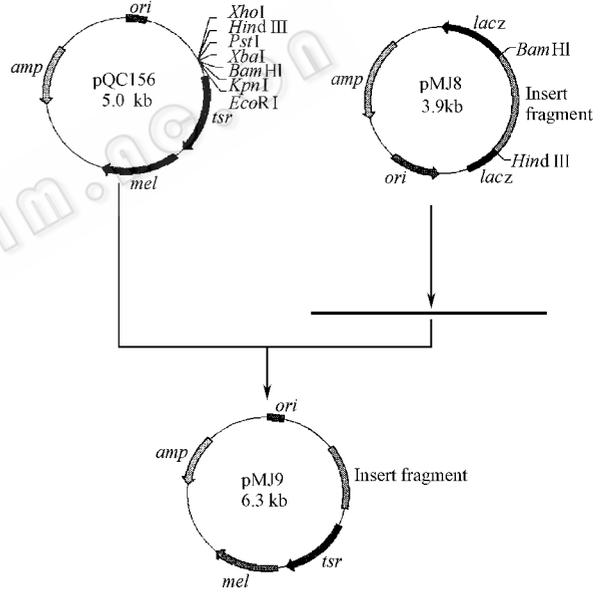


图 3 包含头状链轮丝菌 *oriC* 的 pMJ9 质粒的构建

Fig.3 Construction of pMJ9 containing *S. caespitosus oriC*

2.3 头状链轮丝菌 *oriC* 克隆片段的复制起始活性分析

pQC156 质粒带有硫链丝菌素抗性基因和黑色素基因,但不能在链霉菌中复制。只有当插入 pQC156 质粒多克隆位点的片段具有在链霉菌中复制,链霉菌转化子才能在含有 *tsr* 的培养基上生长,并有黑色素产生。详见图 3。

2.3.1 头状链轮丝菌 *oriC* 的跨属复制起始活性: 以头状链轮丝菌 *oriC* 构建的微型染色体对 *S. lividans* ZX7 进行原生质体转化时,转化效率为 $3.2 \pm 0.12 \times 10^2$ 个/ μg DNA。说明头状链轮丝菌的 *oriC* 在链霉菌属中也能够复制。进一步对 ZX7 转化子的菌落形态和菌丝形态观察表明,转化子的菌落形态和菌丝形态均基本正常(见图 4 和图 5)。这说明人工微型染色体的导入,未对 ZX7 染色体复制造成显著的影响。

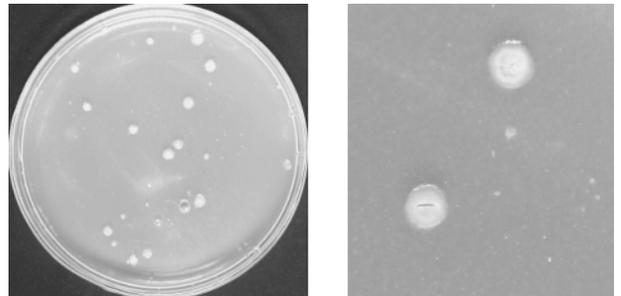


图 4 pMJ9 转化变铅青链霉菌 ZX7 原生质体所得转化子的菌落形态

Fig.4 Colony morphology of *S. lividans* ZX7 transformants (pMJ9)

2.3.2 从头状链轮丝菌 *oriC* 构建的质粒的稳定性分析 :对 *S. lividans* ZX7 转化子菌体进行直接质粒抽提 ,未获得质粒。转化子总 DNA 转化 *E. coli* DH5 α 后 ,可以从转化子中回收质粒。对回收质粒进

行酶切分析 结果发现回收质粒的大小、酶切谱等未发生变化(见图 6),说明 pMJ9 在 *S. lividans* ZX7 中以低拷贝形式存在 ,且未发生重组和片段丢失。

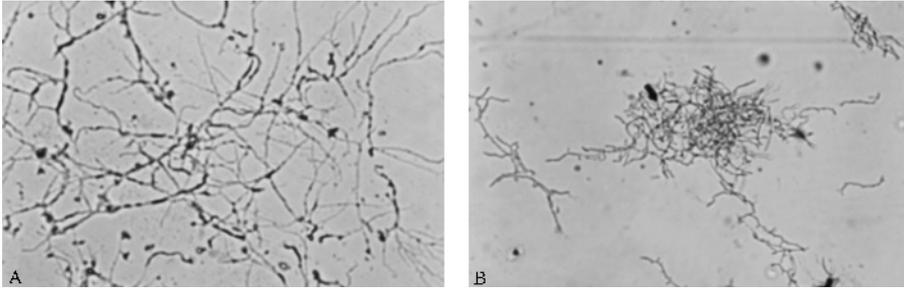


图 5 pMJ9 转化 *S. lividans* ZX7 原生质体所得转化子的菌丝显微照片

Fig.5 Mycelium morphology of *S. lividans* ZX7 transformants (pMJ9)

A. Mycelium morphology of *S. lividans* ZX7 transformants of pMJ9 ;B. Mycelium morphology of *S. lividans* ZX7 Mycelium fixed by OsO4 , Stained by Giemsa Stain (Purple dots are nuclear body)

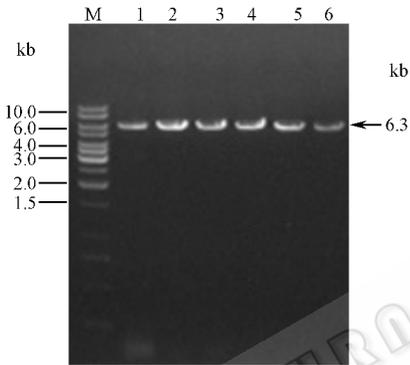


图 6 从 ZX7 转化子中回收的 pMJ9 质粒 *Bam* HI 酶切图谱
Fig.6 Plasmid recovered from *S. lividans* ZX7 transformants digested by *Bam*HI

2.4 以 *oriC* 序列分析头状链轮丝菌与几种链霉菌的进化关系

由于 *oriC* 功能上的重要性 ,使其在进化过程中趋于保守 ,因而符合系统进化分析的要求。采用最大似然法^[18]对头状链轮丝菌、天蓝色链霉菌、变青链霉菌、抗生素链霉菌等的 *oriC* 进行了系统进化分析 结果见图 7。

从图 7 中可以看到 ,根据 *oriC* 的分子进化分析 ,头状链轮丝菌与链霉菌属物种之间的距离远大于链霉菌属内各物种之间的距离 ,即链轮丝菌属与链霉菌属的分化早于链霉菌属的内部分化。

3 讨论

本研究通过对头状链轮丝菌 *oriC* 的克隆、序列分析及复制起始活性分析 ,证明 *oriC* 两侧基因保守性除了在分枝杆菌属和链霉菌属中存在 ,在链轮丝

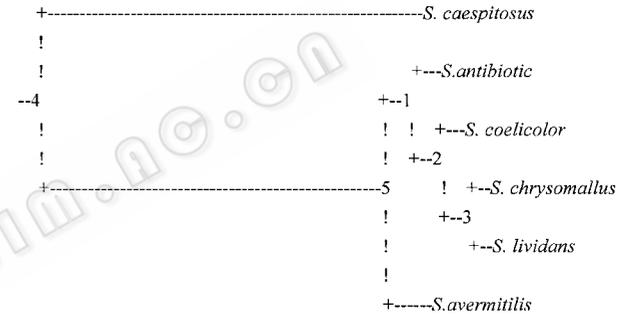


图 7 采用最大似然法分析 *oriC* 序列构建的头状链轮丝菌和几种链霉菌的进化树
Fig.7 Phylogenetic tree of *S. caespitosus* and *Streptomyces* spp based on ML analysis

菌属中亦存在 ,该现象在高 GC 含量的革兰氏阳性菌中可能普遍存在。链霉菌属种类的 *oriC* 中 *DnaA*-box 多为 19 个^[7] ;分枝杆菌多为 7 个^[6]。头状链轮丝菌 *oriC* 中有 22 个 *DnaA*-box ,是迄今为止发现的 *oriC* 中最多的 ,其特殊性有待进一步的研究。以头状链轮丝菌 *oriC* 构建的质粒 ,可以在变铅青链霉菌中复制 ,说明链轮丝菌属与链霉菌染色体复制机制是相似的。质粒回收实验证明 ,该质粒在链霉菌宿主内没有发生重组和修饰 ,可以稳定地以低拷贝形式复制和存在。通过对 *S. lividans* ZX7 转化子的形态观察 ,转化子菌落形态、菌丝形态均较正常 ,因此 ,质粒的导入并没有严重干扰 *S. lividans* ZX7 的染色体复制。该质粒有希望通过系统改造 ,发展成为广宿主载体 ,应用于链霉菌属、链轮丝菌属的遗传操作。

头状链轮丝菌 *oriC* 与链霉菌种类的 *oriC* 有很

高的同源性,且头状链轮丝菌的 *oriC* 在链霉菌中有复制起始活性,说明链轮丝菌属与链霉菌属在进化上有较近亲缘关系;采用最大似然法分析 *oriC* 序列构建进化树显示,头状链轮丝菌与链霉菌的分化距离要远大于链霉菌内部的分化距离。这一结果支持了链轮丝菌属应独立分属的学术观点。

REFERENCES (参考文献)

[1] Konberg A, Baker T. DNA replication, 2nd edn. New York: W. H. Freeman, 1992

[2] Messer W, Weigel C. Initiation of chromosome replication. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, pp. 1579 ~ 1601. Edited by F C Neidhardt, M L Ingraham, K Brooks Low, B Magasanik, M Schaechter, H E Umbarger. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1996

[3] Yoshikawa H, Ogasawara N. Structure and function of DnaA and DnaA-box in eubacteria: evolutionary relationship of bacterial replication origins. *Mol Microbiol*, 1991, **5**: 2589 ~ 2597

[4] Zakrzewska-Czerwinska J, Schrepf H. Characterization of an autonomously replicating region from *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 2688 ~ 2693

[5] Zakrzewska-Czerwinska, Nardmann J, Schrepf H. Inducible transcription of the *dnaA* gene from *Streptomyces lividans* 66. *Mol Gen Genet*, 1994, **242**: 440 ~ 447

[6] Salazar L, Fsihi H, de Rossi E *et al.* Organization of the origins of replication of the chromosomes of *Mycobacterium tuberculosis* and isolation of a functional origin from *M. smegmatis*. *Mol Microbiol*, 1996, **20**: 283 ~ 293

[7] Jakimowicz D, Majka J, Messer W. Structure elements of the *Streptomyces oriC* region and their interaction with DnaA protein. *Microbiology*, 1998, **144**: 1281 ~ 1290

[8] Witt G D, Burns A, Palmer J O *et al.* *Sys Appl Microbiol*, 1990, **13** (4): 361 ~ 371

[9] Dulhanty A M, Whitmore G F. Chinese hamster ovary cell lines resistant to mitomycin C under aerobic but not hypoxic conditions are deficient in DT-diaphorase. *Cancer Res*, 1991, **51**(7): 1860 ~ 1865

[10] Zhou X, Deng Z, Firmin J L *et al.* Site-specific degradation of *Streptomyces lividans* DNA during electrophoresis in buffers contaminated with ferrous iron. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**: 4341 ~ 4352

[11] Little J W, Edmiston S H, Pецelli L Z *et al.* Cleavage of the *Escherichia coli* *lex* protein by *recA* protease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**: 3225 ~ 3229

[12] Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF *et al.* Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. John Innes, Norwich, 1985

[13] Hanahan D, Jessee J, Bloom F R. Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning: A Practical Approach. Edited by D. M. Glover and B D Hames, 2nd ed, Oxford University Press, Walton Street, Oxford OX2 6DP, 1998

[14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, A laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[15] Primer, Primer Designer Ver 2.0, Copy Right 1990 ~ 1991, Scientific & Educational Softwar, 1990

[16] BIOSINO: <http://www.biosino.org>, SEQWEB: geg.biosino.org

[17] Hall Tom. Sequence Alignment Editor. Department of Microbiology, North Carolina State University, USA. Copy right 1997 ~ 2001, 1997

[18] Felsenstein Joseph. Maximum Likelihood method with molecular clock (version 3.573c), University of Washington, 1993

Cloning of the Replication Origin (*oriC*) of *Streptovercillum caespitosus* and Transformation of *Streptomyces lividans* ZX7

MA Wei MAO Xiang LU Jie JIANG Wei-Hong CHIAO Rui-Shen QIN Zhong-Jun ZHAO Guo-Ping*

(Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, SIBS, CAS, Shanghai 200032, China)

Abstract *Streptovercillum caespitosus* ATCC27422 is a producing strain of mitomycin A for cancer therapy. Taking the advantage of the conserved sequences of genes flanking the *oriC* of high G + C Gram-positive bacteria, a 1.3 kb DNA fragment containing *oriC* and its flanking region was cloned by PCR. Nucleotide sequence comparisons revealed that the cloned fragment is more than 80% identical to the same region of *S. coelicolor*. There are 22 DnaA-boxes in the *oriC* region, and the conserved sequence of DnaA-box is TTGTCACA.

The plasmid containing the *oriC* of *S. caespitosus* was constructed (pMJ9), and it was able to transform the protoplast of *Streptomyces lividans* ZX7 at the frequency of 3.2×10^2 transformants/ μ g plasmid DNA. The colony and mycelia's morphology of the transformants are normal. The constructed plasmid can exist stable in the host as a low copy extra-chromosome replicon. The high rate of the homology and the cross genus replication initiation activity suggests close relationship between *Streptomyces* and *Streptovercillum* in the evolution. While the maximum likelihood phylogenetic tree based upon the *oriC* of *S. caespitosus* and several *Streptomyces* spp. revealed that *S. caespitosus* differed extensively from the *Streptomyces* spp. This result supports the separation of *Streptovercillum* from *Streptomyces*.

Key words *Streptovercillum caespitosus*, replication origin (*oriC*), cross genus replication initiation activity

Received: 06-27-2002

This work was supported by Grand from National Natural Science Foundation of China (No. 10039630010).

* Corresponding author. Tel 86-21-64042090 x 4712, Fax: 86-21-64042385 E-mail: wjiang@iris.sipp.ac.cn & gpzhao@sibs.ac.cn