

依尼奧小单孢菌抗性基因 *sisR* 的克隆研究

Study on Cloning of Sisomicin-resistant Gene (*sisR*) from *Micromonospora inyoensis*

洪文荣¹, 陈代杰², 刘 靖¹, 朱宝泉^{3*}

HONG Wen-Rong¹, CHEN Dai-Jie², LIU Jing¹ and ZHU Bao-Quan^{3*}

1. 福州大学生物科学与工程学院, 福州 350002

2. 上海来益生物药物研发中心, 上海 201203

3. 上海医药工业研究院, 上海 200040

1. College of Biologic Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China

2. Shanghai Health Creation Center for Biopharmaceuticals R&D, Shanghai 201203, China

3. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China

摘 要 从产西索米星的依尼奧小单孢菌中克隆高抗性新基因 *sisR*, 借助计算机设计 PCR 引物, 从西索米星的产生菌依尼奧小单孢菌的染色体 DNA 中, 经 PCR 扩增获得 DNA 序列长度不等的 DNA 片段。将这些 DNA 片段克隆至 pUC19 载体质粒并导入大肠杆菌, 从中筛选到 5 个抗西索米星的转化子 (其中一个命名为 *sisR*) 显示对西索米星的高抗性 (超过 1000 µg/mL)。经 DNA 测序并通过互联网 Blast 比对, 确认对该抗性负责的 DNA 片段是一个未见报道的新基因。

关键词 *sisR* 基因, 依尼奧小单孢菌, 西索米星, 基因克隆

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0149-05

Abstract A new sisomicin resistance gene *sisR* was cloned from sisomicin-producing *Micromonospora inyoensis*. The *sisR* fragment was obtained by PCR amplification. The primer pairs were designed based on *grm* gene sequence from gentamicin-producing *Micromonospora purpurea*. The template DNA was isolated from *Micromonospora inyoensis*. A series of different DNA fragments were amplified by PCR, which were sub-cloned to vector pUC19 for further identification. It was found that five specific transformants containing target DNA fragments could resist high concentrations of sisomicin (over 1000 µg/mL sisomicin). One of them designated as *sisR*, was then sequenced, and the alignment among *sisR* and other related genes showed that *sisR* gene differs from any known genes. It was concluded that *sisR* gene is a sequence that has not been reported so far.

Key words *sisR* gene, *Micromonospora inyoensis*, sisomicin, cloning

微生物是生物制药的重要源泉, 放线菌位居这源泉之首。放线菌中的小单孢菌是氨基糖苷类抗生素产生菌中具有重要商业意义的产生菌。如产生庆大霉素 C 的棘孢小单孢菌和绛红色小单孢菌; 产生西索米星的伊尼奧小单孢菌 (*Micromonospora inyoensis*) 等^[1-4]。可遗憾的是, 几种小单孢菌生物合成抗生素的水平 (如庆大霉素、小诺霉素、西索米星

和福提米星) 远远低于常见链霉菌产生抗生素的水平 (如链霉素和四环素类等)。虽然国内外学者采取了许多方法对小单孢菌进行多样化的菌种改良, 但收效甚微。因此, 很有必要利用现代分子生物学技术进行探索, 研究开发它们生物合成的潜力。已有的知识认为, 抗生素产生菌的生物合成基因几乎总是与其抗性基因相连锁。因此, 研究抗性基因与研究

Received: May 10, 2004; Accepted: August 4, 2004.

* Corresponding author. Tel: 86-21-50803366; E-mail: hongwr56@tom.com

生物合成基因同样重要,而从抗性基因入手更为方便。一旦抗性基因和生物合成基因的奥秘被揭开,则有望从根本上提高小单孢菌生物合成抗生素的能力。国外学者在这方面投入了大量的智力和物力^[1-6],而我国在小单孢菌基因克隆方面的研究还少见报道。研究选用极有工业价值的依尼奥小单孢菌,采用分子生物学技术,首先从该菌中克隆抗性基因,期望以抗性基因为基础,进一步进行生物合成基因的克隆研究,从根本上揭示小单孢菌生物合成调控的奥秘,为提高小单孢菌的生物合成潜力开拓新的研究方向。

本研究已成功地从依尼奥小单孢菌的全基因组 DNA 中扩增出对西索米星抗性的 DNA 片段 LY102(*sisR*),并克隆到 pUC19 载体上,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,经西索米星抗性筛选,得到抗性转化子,并从抗性转化子中提取抗性质粒 pLY102,经限制性酶切、琼脂糖凝胶电泳检测,观察到 847bp 的外源 DNA 片段。该外源 DNA 片段经证明确实是扩增自依尼奥小单孢菌的全基因组 DNA,序列测定为 847bp,计算机分析含 1 个 ORF。同源性比对分析不仅确定了 RBS 位点,而且推测属于甲基化酶抗性基因。通过互联网 Blast 比对,确认是未见报道的功能性序列。已经证明该功能性序列自带启动子,基因的抗性调控在翻译水平上体现。本文先报道第一部分,从依尼奥小单孢菌中克隆编码西索米星抗性新基因的研究结果,基因调控研究随后报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒:依尼奥小单孢菌 TS388 由福州大学提供;大肠杆菌 BL21(DE3)、JM110、C600(BNN93)和 DH5 α (pUC19)均由上海来益生物药物研发中心提供;pUC18 为华美生物工程公司产品;其它重组质粒自己构建。

1.1.2 培养基:LB 培养基^[8],根据需要添加氨苄青霉素(终浓度 100 μ g/ml)和西索米星;用于依尼奥小单孢菌 TS388 生长的培养参见文献^[7]。

1.1.3 工具酶及其它:所有的工具酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;RNase A 和硫链丝菌素(thiostrepton, thio)为 Sigma 公司产品;氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)为华美公司产品;西索米星为中国药品生物制品检定所产品;琼脂糖为 Pharmacia 产品;PCR 引物委托上海博亚生物技术有限公司合成;DNA 序列委托宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)测定。

1.2 方法

1.2.1 DNA 操作:依尼奥小单孢菌 TS388 染色体 DNA 的提取参照相关文献^[9];质粒 DNA 采用碱裂解法提取^[8],DNA 酶切、连接等均按公司产品说明书进行;转化采用 CaCl₂ 方法制备感受态细胞^[8],在含有抗生素的选择性培养基上筛选转化子。

1.2.2 PCR 扩增反应:

引物 1: Sense Primer: 5' GAGCTC GCCGGTTCAGGATC-TTTC' 下划线为 *Sac* I 位点; Antisense Primer: 5' GGATC-CGGCGGCGATCC3' 下划线为 *Bam* H I 位点。

引物 2: Sense Primer: 5' GCGGAGCTCCTATTCTGAA3';

Antisense Primer: 5' GCGGATCCTTCGGAGGACT3'

PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 1.5min, 59 $^{\circ}$ C 1.0min, 72 $^{\circ}$ C 3.0min, 30 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 保持 10min。通过 PCR 扩增,从依尼奥小单孢菌全基因组 DNA 中扩增到一系列长短不等的 DNA 片段,然后经酶切、克隆、转化、平板蓝白斑筛选和电泳鉴别克隆子。

2 结果

2.1 重组子的构建和克隆

引物设计策略:国内对小单孢菌抗性基因的研究未见报道,国外对依尼奥小单孢菌的研究,唯一见到报道的是美国先令公司 Goldberg SL 等研究人员,他们选择不同的限制性酶,对依尼奥小单孢菌的全基因组进行随机性限制性酶切,反复克隆、反复尝试,终于从中筛选到抗性基因 *sisA*,其困难可想而知,因此,出于公司的商业需要,只见报道,未见抗性基因的序列公布^[4]。此外,由于国内外菌株的差异,即使有了公布的 DNA 序列,也不一定设计出符合本研究需要的匹配引物,因此引物设计是研究开始面临的最大困难,是决定研究能否展开的关键。为了尽量减少盲目性,经反复比较,选择了与依尼奥小单孢菌亲缘关系比较接近的、产庆大霉素的绛红色小单孢菌的抗性基因 *grm* 作为引物设计的参考模板,通过改变引物的长度和选择不同的酶切位点,反复扩增,反复克隆,反复筛选,以期获得抗性基因。

引物设计:公布的 *grm* 基因特征见图 1。



图 1 绛红色小单孢菌甲基化酶(*grm*)基因

Fig. 1 *M. purpurea* methylase (*grm*) gene

基于以上引物设计策略,初步以 *grm* 作模板,选择保证在 PCR 扩增能覆盖 *grm* 的 ORF 序列,进行反复酶切位点变换,并反复设计出不同的引物,进行 PCR 扩增。PCR 扩增获得的 DNA 片段,经琼脂糖凝胶电泳分离,分别回收大小不同的 DNA 片段,经相应的限制性酶切割,并与受同样双酶切的 pUC19 载体进行连接,然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,构建含 DNA 扩增片段长短不等的文库。最终是在以带 *Sac* I + *Bam* H I 酶切位点的引物 P1(*grm* 的 97~114bp 和 1366~1377bp)的扩增、克隆和筛选试验过程中得到抗性基因的以引物 P1 扩增的产物,经琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 2。

从图 2 可以看出,采用引物 P1 扩增得到的不是单一条带,呈现连续片状,说明扩增到的是一系列长短不等的 DNA 片段。因为为原创性研究,属尝试性试验,是采用尝试性引物,而不是完全匹配的引物进行扩增,因此得到这样的结果被认为是可以接受的。只要这个扩增产物中包含了微量的目的 DNA 序列,经克隆筛选,就有希望得到包含抗性基因的 DNA 序列,后续的研究工作证明了这一推测是合理的。

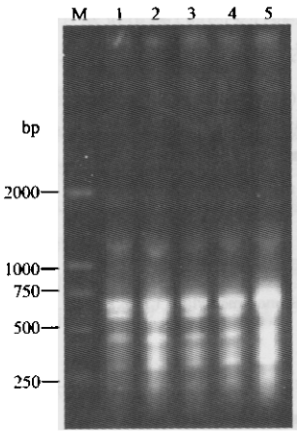


图 2 用引物 1 从依尼奥小单孢菌基因组中扩增 DNA 的电泳图
Fig.2 The map of PCR-products by primer-pairs1 from genome-DNA of *Micromonospora inyoensis*
M: DL2000 marker; 1~5: the PCR-products 1~5.

1 GGATCCTTCG GAGGACTCGA TGACGACATC TACGGGCGAC GACCGTATCG ACCAGATTCA GCAGGCCATC ACCAAGAGCC
81 GGCGCTATCA GACGGTGGCC CCGGCCACCG TGCGTCGCCT GGCCCGGGCC GCCCTGGTCG CCTCGCGGGG GGACGTGCCG
161 GACGCGGTGA AGCGCACGAA GCGCGGGCTG CACGAGATCT ACGGCGCCTT CCTGCGGCCG AGTGGCGCTA ACTACACAGC
241 GTTGTTCGGG CAGCTCGACA CCGCAGTCGA GGCCGGGGGT GAAGCGGTCC GTTCGGCCCT GTCTCGTGCG ATGTCGGTGC
321 ACATGTCCAC TCGGGAGCGG CTGCCGACCC TCGACGAGTT CTACCGGGAG ATCTTCGGTC ACGTTCGCCG GCCAACACAG
401 CTGCGTGACC TGGCGTGTGG CCTCAACCCG CTGCCGCGAC CCTGGATGGG CCTGTCCGAC GAGACCGTCT ACGTCGCCCT
481 CGACATCGAC GCGCGCTGTA TGGACTTCGT GGGCGCGGCC CTGACGAGGC TGGGGGTGGC GCATGTACG AGCGTGCTCG
561 ACCTCTGGA GCGCCGCTT GACGAGCGGG CCGACGTCAC GCTATTGCTG AAGACGCTCC CCTGTCTGGA GACTCAGCAA
641 CGAGGCTCCG GCTGGGAAGT GATTGACATT GTCAACTCGC CGATTATCGT GGTAACCTTC CCGACCAAGT CTCTCGGTCA
721 GCGATCGAAG GGAATGTTTC AGAACTATTC ACAGAGTTTT GAGTCCGAGG CCAGCGAAGC ATCGTCCGCG ATTCAGCGAC
801 TGGAGATCGG CAACGAGCTG ATTTACGTCA TTCAGAAATA GGAGCTC; GGATCC: *Bam*H I; GAGCTC: *Sac*I

图 3 克隆 DNA 片段 LY102 的 *Bam*H I - *Sac*I 区核苷酸序列
Fig.3 Nucleotide sequence of *Bam*H I - *Sac*I region of the cloned DNA LY102

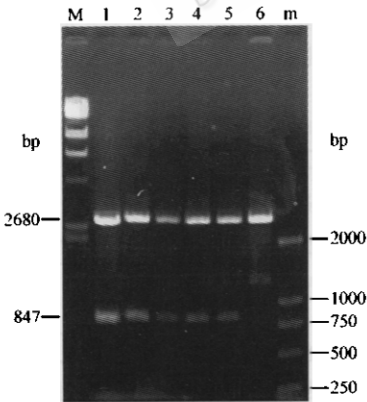


图 4 目的转化子双酶切鉴定电泳图
Fig.4 Gel analysis of the recombinant plasmids by *Sac*I + *Bam*H I double digestion
M: λ DNA/*Hind*III marker; m: DL2000 marker;
1~5: recombinant plasmid pLY101~pLY105 digested by *Sac*I + *Bam*H I
6: pUC19 cut by *Sac*I + *Bam*H I (control).

2.2 特定重组质粒 pLY102 的鉴定及其分析

克隆过程采用载体 pUC19,转化采用 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。经蓝白斑筛选共获得 5 组转化子(见表 1),其中一组有 5 个目的转化子 pLY101~pLY105(见图 4),其外源 DNA 片段 LY102 的限制性酶切位点见图 5(*sisR*)。如图 5 所示,有 1 个开放阅读框(ORF)。随机取 pLY102 作进一步研究。重组转化子具有很强的抗西索米星能力(见表 1)。LY102 的 DNA 序列见图 3。

1992 年 Milorad K 等报道^[6]从兹昂小单孢菌中克隆到抗西索米星的 *sgm* 基因,经载体 pUC19 转入大肠杆菌,引起了宿主对西索米星类抗生素产生了抗性,其对西索米星的抗性水平在 300 μ g/mL 左右。本研究同样是用载体 pUC19 克隆、转化和抗性检测,但从表 1 的试验结果可以看出,pLY102 的抗性高达 1000 μ g/mL,比 *sgm* 基因高出 3 倍。从报道的人工构建质粒与本研究构建的人工质粒进行西索米星抗性比较可以看出,菌株不同,抗性基因的 DNA 序列不同,对同样的代谢产物的抗性水平也不同。

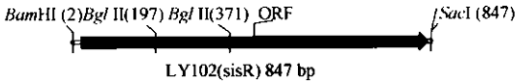


图 5 基因 *sisR* 及其酶切限制位点图
Fig.5 Gene *sisR* and its restriction endonuclease site

表 1 重组质粒及其抗性特征					
Table 1 The recombinant plasmids and their characteristics					
Recombinant plasmids	Level of sisomicin resistance /(μ g/mL)	Size of insert (bp)	Recombinant plasmids	Level of sisomicin resistance /(μ g/mL)	Size of insert (bp)
pLY102	> 1000	847	pLY119	0	1852
pLY114	0	1217	pLY120	0	1135
pLY115	0	1135			

2.3 *sisR* 基因的同源性分析

重组质粒 pLY102 委托宝生物工程(大连)有限公司测序,经 NCBI BLAST Server 查询、比对和分析,确认所克隆的、来自依尼奥小单孢菌(*Micromonospora inyoensis*)的 DNA 片段是对西索米星高抗性负责的未报道的新基因,与已发现的来

自 *M. purpurea* 和 *M. rosea* 的抗庆大霉素甲基化酶基因 (*gmr*)^[2], 以及来自 *M. zionensis* 的抗性决定 (*sgm*) 基因有很

高的同源性,但其序列中的酶切位点不同。因此,我们将这个新基因命名为 *sisR*。同源性分析结果见图 6~图 8。

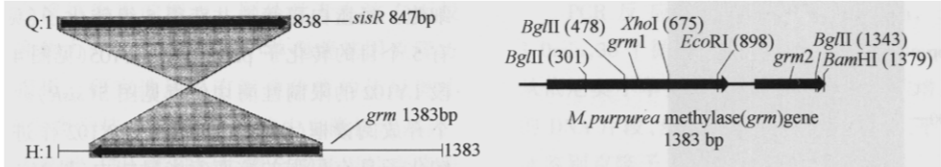


图 6 *sisR* DNA 与来自 *M. purpurea* 抗庆大霉素甲基化酶基因 *gmr* 的同源性比较

Fig.6 The alignment between *sisR* DNA and *M. purpurea* gentamicin resistance methylase (*gmr*) gene

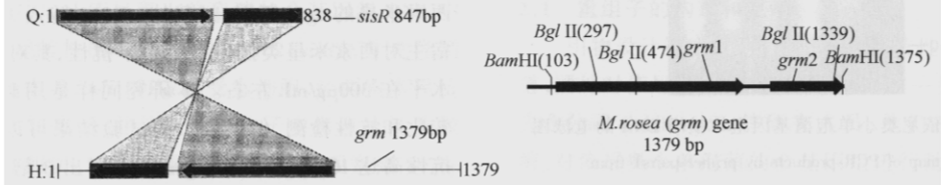


图 7 *sisR* DNA 与来自 *M. rosea* 抗庆大霉素甲基化酶基因 *gmr* 的同源性比较

Fig.7 The alignment between *sisR* DNA and *M. rosea* gentamicin resistance methylase (*gmr*) gene

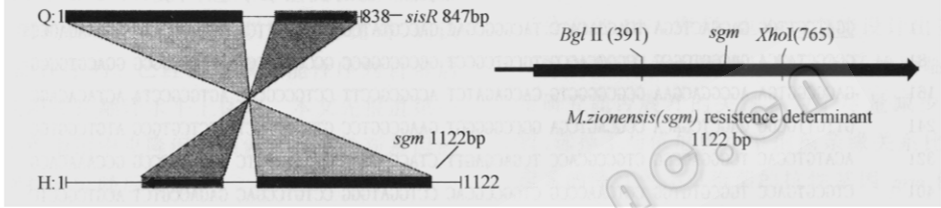


图 8 *sisR* DNA 与来自 *M. zionensis* 的抗性决定子的同源性比较

Fig.8 The alignment between *sisR* DNA and *M. zionensis* resistance determinant

经 DNA 序列测定和利用计算机进行同源性分析,已经知道 LY102 拥有 1 个 ORF,同源性分析结果是:对 *gmr* 的同源性分别为 90% (*M. purpurea*) 和 95% (*M. rosea*),对 *sgm* 的同源性为 93%。

2.4 再转化实验

DNA,经 *Sac* I 和 *Bam* H I 单酶切和双酶切,结果与质粒 pLY102 DNA 一致。其单酶切电泳图见图 9。抗性对照检测表明,其抗西索米星功能是由于导入的质粒 pLY102 所引起,即插入的外源 DNA 片段决定的。图 9 中 lane1~4 分别为来自转化子 *E. coli* BL21(DE3)/JM110/C600 和 DH5 α 的转化质粒,

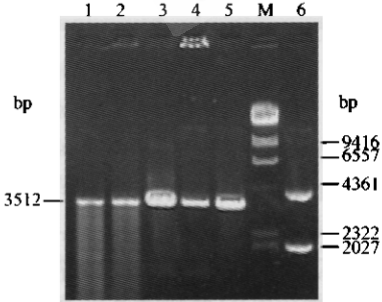


图 9 pLY102 转化 BL21(DE3),JM110,C600 和 DH5 α 四个不同宿主的电泳鉴定

Fig.9 The map of plasmids from *E. coli* BL21(DE3)/JM110/C600/DH5 α with pLY102

M: λ DNA/*Hind* III marker; 1~4: plasmids from *E. coli* BL21(DE3)/JM110/C600/DH5 α , respectively (*Sac* I); 5:pLY102/*Sac* I (control); 6:pLY102(control, not digested by any enzyme).

将提取并纯化的重组质粒 DNA pLY102 再转化大肠杆菌 BL21(DE3)、C600(BNN93)、DH5 α 和 JM110 四种新宿主均得到具有西索米星高抗性的转化子。转化后分别重新提取质粒

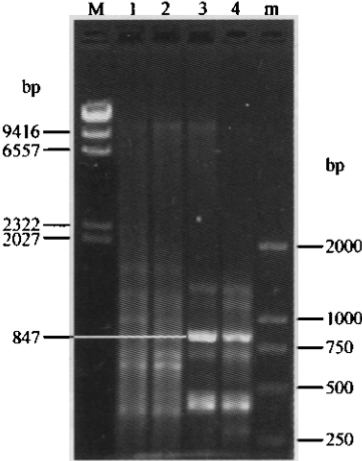


图 10 以引物 1 和 2 再从 SI-ch-DNA 扩增 *sisR* 序列的电泳验证图

Fig.10 Verification of *sisR* fragments amplified from SI-ch-DNA with primer1 and 2

M: λ DNA/*Hind* III marker; m: DL2000 marker;

1,2:PCR products amplified from SI-ch-DNA with primer1; 3,4:PCR products amplified from SI-ch-DNA with primer2

经 *Sac* I 单酶切;Lane5 为 pLY102 质粒的 *Sac* I 单酶切,作对照;Lane 6 为 pLY102 不酶切作参考对照。

2.5 亚克隆基因片段 *sisR* 来源的验证

利用克隆筛选得到的基因为模板,重新设计与新基因互补的 PCR 引物 2,保持相同的酶切位点,然后同样地以依尼奥小单孢菌的染色体 DNA(SI-ch-DNA)作模板,重复进行 PCR 扩增反应,扩增反应产物经琼脂糖凝胶电泳检测,其条带位置与克隆筛选获得的基因片段一致(见图 10),从而进一步证实克隆筛选的新基因来自依尼奥小单孢菌。

3 讨论

采用 PCR 技术,从依尼奥小单孢菌的全基因组中克隆到高抗性基因。经 DNA 序列同源性比较,与亲缘关系较近的 *M. purpurea* 和 *M. rosea* 的抗性基因有 90% 以上的同源性。*sisR* 基因的抗西索米星功能强,达到 1000 μ g/mL 以上,是已报道的抗性基因(300 μ g/mL)的 3 倍以上,是目前对西索米星抗性能力特强的抗性基因,这为下一步的取生物合成基因和开展生物合成研究奠定了良好的基础。

为了从产西索米星的依尼奥小单孢菌中获得抗性基因,特收集了国外已报道的与本研究菌株亲缘关系最接近的相关抗性基因 *grm* 和 *sgm* 等,并以这些抗性基因为模板,设计了一系列带不同酶切位点的、与这些不同抗性基因的各个不同开放阅读框相匹配的 PCR 引物(这些引物未列出)。最后参照 *grm* 基因(来自 *M. purpurea*)序列,设计 PCR 引物 1,经 PCR 扩增得到系列 DNA 片段后,再分离、克隆和筛选,经长时间研究,终于得到了 *sisR* 抗性基因。从已得到的 *sisR* 基因的功能性 DNA 序列,与国外报道的相关基因 DNA 序列的比较,可以看出,尽管这些抗性基因对氨基糖苷类抗生素的抗性非常相似,它们相互间的次级代谢产物也十分接近,如庆大霉素,小诺霉素,西索米星, G-418, G-52 等,但它们之间、功能高度相近的抗性基因的 DNA 序列差异却不小,从已获得的 *sisR* 基因序列的比较说明了这一点,这是早期一系列引物扩增得不到所需抗性基因的原因之所在,也是采用 PCR 引物 1 没有得到明显的、含 LY102 DNA 电泳条带的主要原因(图 2)。但从这些基因的同源性较高(90% 以上)来分析,可以认为,它们具有较高的 DNA 序列保守性。PCR 引物 1 与 *sisR* 基因的互补性相差较大,*sisR* 基因与 *grm* 基因和 *sgm* 基因的酶切位点也不同。在已报道的这类抗性基因中,都有一个以上的 *Bgl* II 酶切位点,这提示我们在研究这类抗性基因时,应尽量不采用 *Bgl* II 限制酶,否则很可能得不到这样的抗性基因。

虽然紧接着以 *sisR* 基因为模板,设计出与其完全相匹配的 PCR 引物 2,并以同样的条件进行 PCR 扩增反应,但仍然没有得到单一的 DNA 电泳条带,这可能是依尼奥小单孢菌中存在着一定数量的、与该引物相近的卫星序列所引起,不过扩增到的其它 DNA 条带的浓度与以 PCR 引物 2 扩增到的 *sisR* 的 DNA 浓度相比要低的多。这就是图 10 中除了与 *sisR* 相符的 DNA 主泳带外,还有其它比较淡的 DNA 杂带的主要原因。

从依尼奥小单孢菌染色体中经 PCR 扩增获得的 DNA 片段,经序列测定,其长度为 847bp,具有很强的抗西索米星功能,经序列比对发现,与已报道的来自 *M. purpurea* 和 *M. rosea* 的庆大霉素甲基化酶基因,以及来自 *M. zionensis* 的抗性基因(mRNA)有很高的同源性(90% 以上),但其序列中的酶切位点不同,其功能基因长度特别短,结构与功能显得更加紧凑。是一个更具特色的新基因。

致谢:本研究工作得到朱丽、管艳等同学的大力帮助,并与朱春宝博士进行了有益的讨论,特在此致以衷心的感谢!

REFERENCES(参考文献)

- [1] Kelemen GH, Financsek I, Jarai M. Efficient transformation of *Micromonospora purpurea* with pLJ702 plasmid. *J Antibiotics*, 1989, **42** (2):325-328
- [2] Kelemen GH, Cundliffe E, Financsek I. Cloning and characterization of gentamicin-resistance genes from *Micromonospora purpurea* and *Micromonospora rosea*. *Gene*, 1991, **98**(1):53-60
- [3] Parag Y, Goedeke ME. A plasmid of the sisomicin producer *Micromonospora inyoensis*. *J Antibiotics*, 1984, **37**(9):1082-1084
- [4] Goldberg SL, Romero JC, Deo YM. Cloning and characterization of the sisomicin-resistance gene from *Micromonospora inyoensis*. *J Antibiotics*, 1990, **43**(8):992-999
- [5] Milorad K, Ljubisa T, Branka V. Translational autoregulation of the *sgm* gene from *Micromonospora zionensis*. *J Bacteriol*, 1996, **178** (18):5493-5498
- [6] Milorad K, Ljubisa T, Branka V. Cloning and characterization of an aminoglycoside resistance determinant from *Micromonospora zionensis*. *J Bacteriol*, 1992, **174**(23):7868-7872
- [7] Kieser T, Bibb MJ, Mark J et al. Practical streptomyces genetics. England: The John Innes Foundation Norwich, 2000
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989