

研究报告

麦迪霉素生物合成基因克隆研究

王以光

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京)

利用穿梭粘粒载体pNJ1组建了麦迪霉素产生菌*Streptomyces mycarofaciens* 1748的基因文库, 用与麦迪霉素生物合成有类似途径的放线紫红素聚酮合成酶基因 Act I, Act II 为探针, 从麦迪霉素产生菌的基因文库中, 获得了与Act I, Act II 基因有同源性的阳性克隆, 对其中PCN8B12、6C5及11E11克隆DNA进行了酶切分析, 其分子量分别为 36kb, 48.5kb及 41.6kb。PCN6C5 DNA中包含有PCN 8B12的全部DNA片段, PCN 11E11与PCN 8B12及PCN 6C5有 6.75kb的重叠区。通过分子杂交实验, 初步将麦迪霉素聚酮合成酶基因定位在PCN 8B12 DNA的EcoRI -BamHI 4.02kb片段上(与Act II 基因有同源性)及PCN 8B12 (6C5), PCN11E11DNA BglII -BglII 2.42kb与PCN11E11 BglII -BglII 10kb 片段上(与Act I 基因有同源性)。PCN 8B12及PCN 6C5 克隆DNA 在麦迪霉素聚酮合成酶基因缺陷型变株 *Streptomyces mycarofaciens* var.68 及不产抗生素的变铅青链霉菌 *Streptomyces lividans* TK24受体菌的表达产物, 经TLC及HPLC等分析表明与麦迪霉素标准品相似。

关键词 麦迪霉素; 生物合成基因; 聚酮合成酶基因

麦迪霉素是临床上广泛应用的大环内酯类抗生素。为了研究其生物合成基因的调控, 探索创造新型大环内酯类抗生素的途径, 或提高其产率, 我们拟克隆麦迪霉素生物合成基因。近几年来抗生素生物合成基因克隆研究有了较大的进展, 如克拉维酸生物合成基因^[1]及放线紫红素生物合成基因^[2], 利用突变克隆技术克隆了次甲基霉素生物合成基因^[3], 利用抗生素抗性基因往往是与生物合成基因连锁的特点, 克隆抗生素抗性基因同时分离与之连锁的生物合成基因, 克隆了杀草剂二丙胺磷^[4]及红霉素生物合成基因^[5]等等。最近D.A.Hopwood 等人报道了不同聚酮类抗生素中聚酮合成酶基因有同源性^[6], 因而推测利用 DNA 同源序列, 有可能克隆其他有类似生物合成途径的酶基因。麦迪霉素属于聚酮类抗生素。拟利用已克隆化的放线紫红素聚酮合成酶基因 (Act I,

Act II) 作为探针, 克隆麦迪霉素生物合成基因。

材料及方法

(一) 材料

1. 菌种: 生米加链霉菌 1748 (*Streptomyces mycarofaciens* 1748) 为麦迪霉素产生菌, 由本所提供。生米加链霉菌 No.68 变株, 为本实验室通过诱变筛选获得的麦迪霉素无活性变株。变铅青链霉菌 TK24 (*Streptomyces lividans* TK24) 为受体菌。大肠杆菌 DH-1 (*recA*⁻) 为受体菌。天蓝色链霉菌 TK17, TK18 (*Streptomyces coelicolor* TK17; TK18)

本文于1988年6月21日收到。

本实验主要在美国威斯康辛大学药学院 C.R.Hutchinson 教授实验室完成。

刘伯宁同志协助筛选 No.68 无活性变株, 特此致谢。

(Act I⁻, Act III⁻) 为放线紫红素生物合成聚酮合成酶基因缺陷型菌株, 由 D.A. Hopwood 教授提供。金黄色葡萄球菌硫链丝菌素 (Thiostrepton 简称 thio) 抗性菌株 (*Staphylococcus aureus* Thio^R), 为测定抗菌活性试验菌, 由 C.R. Hutchinson 教授提供。

2. 质粒: pNJ1 为穿梭粘粒载体 (未发表), 由美国 Abbott 公司提供。

(二) 方法

1. 培养方法: 链霉菌培养及原生质体再生, DNA 转化基本按照 D.A. Hopwood 等方法^[7]。

No.68 无活性变株原生质体形成方法如下: 将 No.68 菌株从斜面挖块种入 5ml TSB 培养基^[8], 在试管摇床 30℃ 培养 2—3 天, 转种 SGGP 培养基^[9], 同时加入 1% 的甘氨酸, 30℃ 培养 24h, 收集菌丝, 用 10.3% 蔗糖溶液洗涤菌丝, 将菌丝悬浮于改良的 P 溶液中^[9], 加入溶菌酶 1 mg/ml, 37℃ 保温 30—60min, 用相差显微镜观察原生质体形成情况, 通过玻璃棉过滤原生质体, 离心 3600 rpm 7min, 将原生质体悬浮在含 10% 二甲基甲酰胺的改良的 P 溶液中, 置冰上预冷后, 在 -80℃ 冰箱中保存。

大肠杆菌培养与 DNA 转化按照 T. Maniatis 方法^[10]。

2. DNA 提取及一般操作: 基本按照文献[7,10]方法。

3. DNA 酶切, 碱性磷酸酯酶处理, DNA 连接: 均用 BRL 公司产品, 按产品说明操作。

4. DNA 片段从琼脂糖凝胶分离: 按照 S&S 公司产品说明, 利用 S&S NA-45 DEAE 膜回收。

5. DNA 片段³²P 同位素标记及分子杂交: 按照文献[7]方法, 利用 BRL 公司

的缺口翻译套件。

6. DNA 片段蔗糖梯度离心: 基本按照文献[7]方法, 有些改进。5.5ml 40% 蔗糖溶液 (10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1mmol EDTA, 1mol/L NaCl), 加入 5.5 ml 10% 蔗糖溶液, 将离心管平放 4h, 使之形成蔗糖梯度溶液, 在其上部小心加入 200μg 左右总 DNA Mbo I 部份酶切样品, 用 Beckman SW41 转头离心 35000rpm, 17℃ 16h, 从离心管顶部依次收集 400μl 样品, 用 5μl 样品进行电泳, 检测各部份 DNA 片段的分子量, 取相应于 30—40kb DNA 片段的部份, 每 400μl 蔗糖梯度溶液样品加入 200μl TE 缓冲液 (0.01mol/L Tris, 0.001mol/L EDTA pH8.0), 加 600μl 异丙醇沉淀 DNA 样品。

7. 粘粒载体 DNA 体外包装: 用体外包装 λ 噬菌体包装蛋白, 按照 Promega Biotech Madison WI 产品说明。

8. 菌落原位杂交: 基本按照 Maas R. 方法^[11]有些改进, 杂交溶液用 5 × SSC 0.02mol/L Na₃PO₄, 50% 甲酰胺, 加入非同源 DNA 0.1mg/ml。杂交温度 42℃ 杂交时间 16—24h, 杂交后, 滤纸用 5 × SSC 含 0.05% Na₃PO₄ 溶液, 在 42℃ 洗二次。

9. 转化子发酵, 提取及产物分析: 转化子先根据对 Thio 抗性的表达, 将单菌落挑到含有 Thio 10μg/ml 的 R₂YE 固体琼脂块上, 培养 7 天后检测转化子抗菌活性, 用对 Thio 耐药的金黄色葡萄球菌作检定菌, 固体培养基上表现有活性的转化子, 用文献[8]描述的培养基进行液体发酵培养, 28℃ 培养 2 天后, 滤液在 pH8.0 条件下用乙酸乙酯提取, 浓缩后在 Merck 硅胶板上层析, 溶媒系统为氯仿: 甲醇 (97: 3), 用金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 生物显迹, 或用显色剂 (茴香

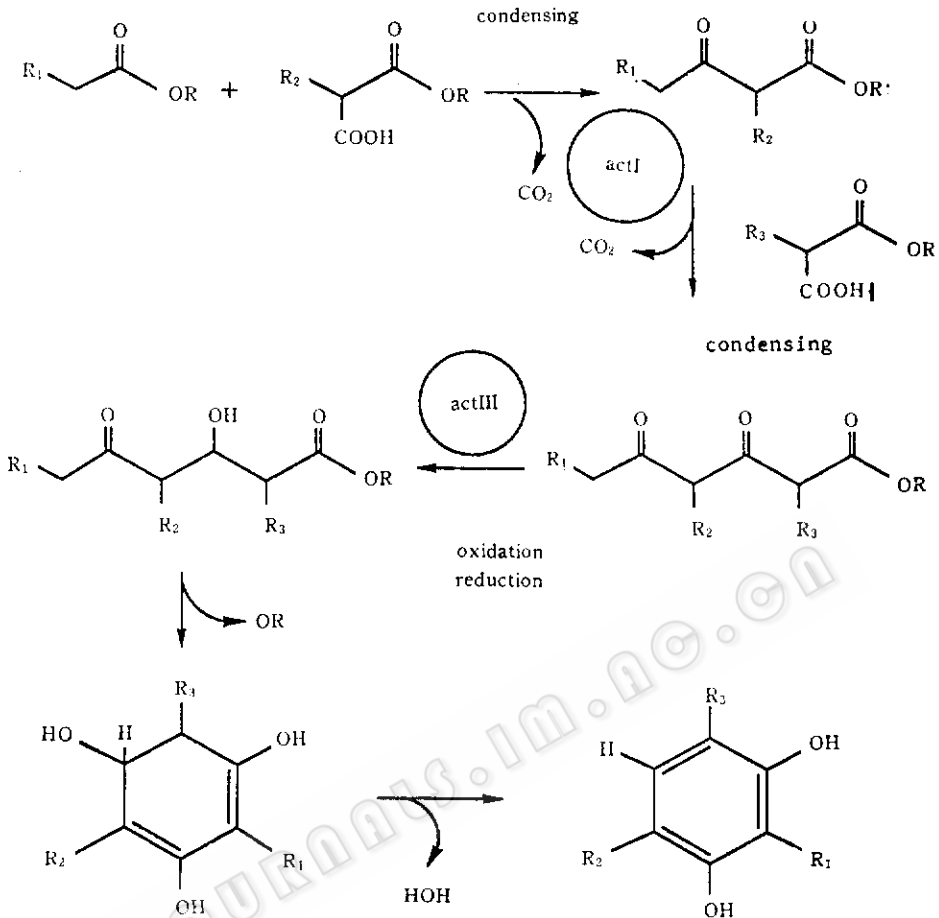


图 3 酮合成酶基因产物的功能
 Fig.3 Functions of polyketide synthase gene products
 $R = \text{CoA}, R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{C}_2\text{H}_5, R_3 = \text{C}_3\text{H}_7$

醛：浓硫酸：乙酸乙酯 1:1:9) 喷雾。高压液相层析用 Waters HPLC, C_{18} 反相层析柱, 流动相为甲醇：乙腈： H_2O :15%： NH_4Ac (pH 7.0) 30:40:10:20, 样品的紫外吸收波长为 232nm。

结果与讨论

(一) 麦迪霉素产生菌基因文库的建立

建立麦迪霉素产生菌基因文库所采用的技术路线如图 1。将麦迪霉素产生菌的总 DNA 用 Mbo I 限制性内切酶部份酶切,

在蔗糖梯度溶液中离心, 收集 30—40kb 的 DNA 片段, 粘粒载体 pNJ1 用 Bgl II 酶切, 并用硷性磷酸酯酶处理, 在 T4 连接酶作用下, 载体与插入片段相连, 用 λ 噬菌体包装蛋白在体外包装, 继而感染大肠杆菌 DH-1, 重组 DNA 在大肠杆菌细胞中环化, 并表现对 Amp 抗性。共挑选 1700 个左右对 Amp 抗性菌落, 20 个菌落质粒 DNA 曾被提取出来, 用酶切后电泳测定分子量的大小, 其中 90% 以上为重组子, 含插入 DNA 片段 30—45kb 左右, 根据链霉菌染色体分子量的估测为 10^4kb , 所建立的基因文库可以概括麦迪霉素产生菌基因组的

95%以上。

(二) 麦迪霉素生物合成基因的检测与分离

麦迪霉素与放线紫红素均属于聚酮类抗生素,其结构式如图2。在它们的分子中均含有聚酮体部份。已有的研究表明^[1,2]聚酮体为聚酮合成酶催化而形成,放线紫红素的聚酮合成酶基因主要由二个部份组成,Act I 基因产物参与聚酮体的缩合过程,Act III 基因产物参与聚酮体氧化还原反应(图3所示)。鉴于不同聚酮合成酶的DNA序列有同源性,拟利用已克隆的放线紫红素聚酮合成酶基因(Act I, Act III)^[6]检测和分离麦迪霉素生物合成基因。

首先用放线紫红素聚酮合成酶基因(Act I, Act III)作为探针,与麦迪霉素产生菌——生米卡链霉菌1748的总DNA进行分子杂交,结果表明在生米卡链霉菌1748的总DNA中有与这些基因同源的DNA序列。继而从麦迪霉素产生菌的基因文库中,将1700个含有重组DNA的大肠杆菌菌落,用放线紫红素聚酮合成酶基因(Act III)片段作探针,进行菌落原位杂交,得到5个阳性菌落(如图4所示)。对其中PCN 8B12, PCN 6C5, PCN11E11等克隆DNA进行限制性内切酶分析,其分子量分别为36、48.5、41.6kb,酶切分析图谱见图5。酶切分析表明PCN 6C5 DNA中包含有PCN 8B12的全部DNA片段(见图版I-1),PCN11E11 DNA与PCN 8B12, PCN 6C5等DNA有6.75kb的重叠区。

用放线紫红素聚酮合成酶基因(Act I及Act III)作探针,与PCN 8B12, PCN 6C5及PCN11E11等DNA的Bgl II酶切片段分子杂交,检测与Act I及Act III基因同源的部位,结果表明PCN 8B12, PCN 6C5

及PCN11E11 DNA Bgl II-Bgl II 2.42kb的重叠部位与Act I 基因有同源性, PCN 11E11 DNA Bgl II-Bgl II 10kb的片段亦与Act I 基因有同源性(图版I-2)。PCN 8B12及PCN 6C5 DNA的Bgl II-Bgl II 10kb片段与Act III 基因有同源性(图版I-3)。将PCN 8B12 DNA用EcoR I-BamH I 双酶切后与Act III 基因分子杂交,表明PCN 8B12 DNA与Act III 基因同源的部位在EcoR I-BamH I 4.02kb片段上(图从略)。PCN 8B12, PCN 6C5及PCN11E11 DNA的相互关系以及与Act I及Act III 基因同源的情况见图5。根据DNA的同源性,初步将麦迪霉素聚酮合成酶基因(包括缩合酶及氧化还原酶基因)定位在PCN 8B12 EcoR I-BamH I 4.02kb片段及PCN 8B12, PCN 6C5, PCN11E11 Bgl II-Bgl II 2.42kb和PCN11E11 Bgl II-Bgl II 10kb片段上。

(三) 麦迪霉素生物合成基因的初步表达



图4 用Act III 基因作为探针与麦迪霉素产生菌基因文库菌落杂交结果

Fig.4 Colony hybridization of genomic library from *Streptomyces mycarofaciens* 1748 with Act III gene as a probe

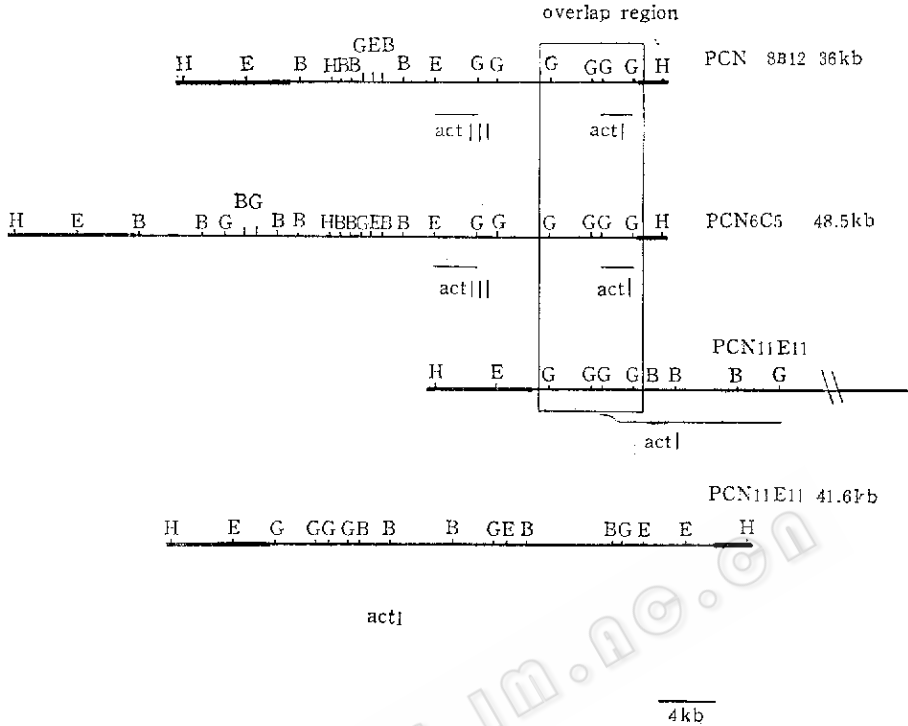


图5 PCN8B12, PCN6C5, PCN11E11 DNA酶切图谱, 它们之间的相互关系以及与Act I, Act II基因同源情况

Fig.5 Restriction maps of PCN8B12, PCN6C5, PCN11E11 DNA, the relationship between them and their homology with Act I, Act II, gene

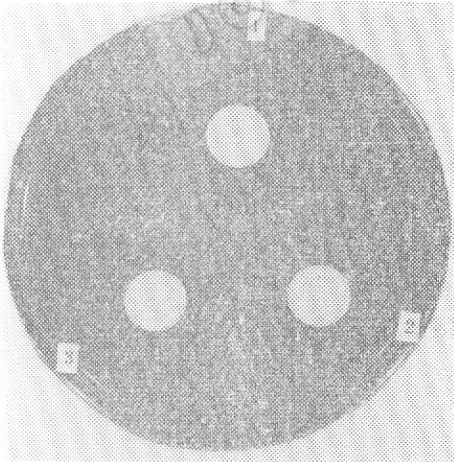


图6 PCN 8B12, PCN 6C5 DNA在No.68变株转化子发酵液中的抗菌活性

Fig. 6 The bioassay of fermentation broth of transformants from PCN 8B12 and PCN 6C5 DNA in No.68 mutant

- 1. No.68变株
- 2. PCN 6C5转化子
- 3. PCN 8B12转化子

将与 Act I 及 Act II 有同源序列的 PCN 8B12, PCN6C5 DNA 分别转化到麦迪霉素生物合成阻断变株No.68及不产抗生素的变铅青链霉菌 TK24 的原生质体中, 在含25μg/ml 硫链丝菌素的培养皿上选择转化子。将转化子经斜面, 种子培养转到发酵培养基中28℃培养 48h以后, 检测发酵液的生物活性, No.68 变株的转化子发酵液对金黄色葡萄球菌 (Thio^R) 有抗菌活性 (图6)。变铅青链霉菌 TK24 转化子发酵液活性较低, 经乙酸乙酯提取后, 在 TLC 层析板上显示生物活性, 其迁移位置与麦迪霉素标准品相当(图从略), No.68 变株及变铅青链霉菌 TK24 转化子发酵提取物经初步纯化后, 在 TLC 层析板上的显色反应亦与麦迪霉素标准品类似

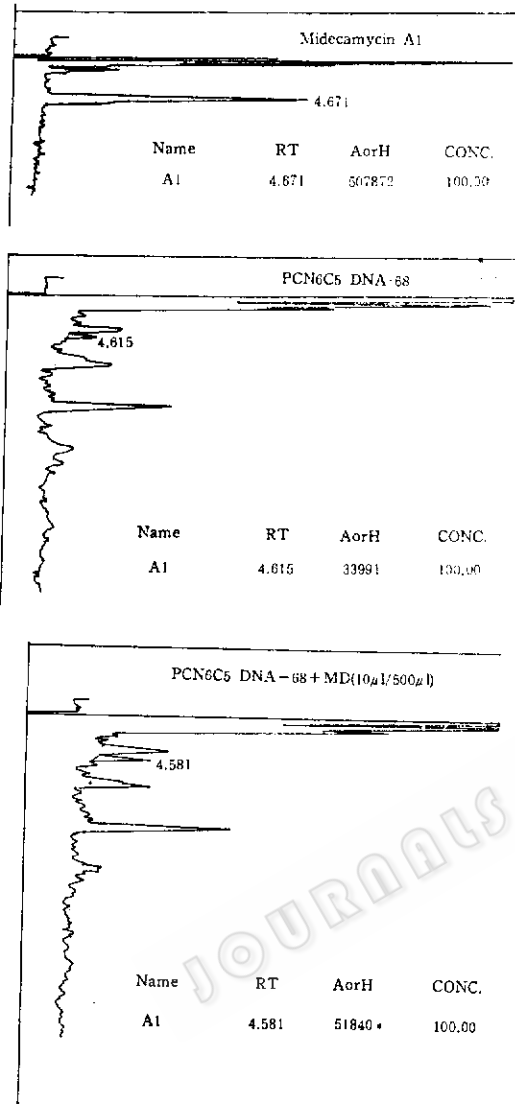


图7 PCN 6C5 DNA在 No.68 变株转化子发酵提取物的HPLC层析图

Fig.7 HPLC of fermentation product from PCN 6C5 DNA transformant in No.68 mutant

(图版 I -4)。HPLC分析表明 PCN 6C5 DNA No.68 变株转化子发酵物提取品在麦迪霉素标准品流出的保留时间 4.6 左右有一个峰,如果在提取品中加入少量麦迪霉素标准品,其HPLC层析谱与原来的相似,在相当于麦迪霉素峰的位置上,峰面积有相应的增加(图7)。PCN 6C5 DNA变铅青链霉菌 TK24 转化子显示同样的特性

(图从略)。PCN11E11DNA在No.68变株及变铅青链霉菌 TK24 的转化子发酵物没有抗菌活性。

No.68变株本身不产生麦迪霉素,但在No.68变株的培养物中外源加入聚酮体中间物 (platenolide I 和 II) 时能产生麦迪霉素,说明No.68变株为聚酮合成酶基因缺陷型变株(另文发表)

综合以上实验结果,认为 PCN 8B12 和 PCN 6C5 克隆中与放线紫红素聚酮合成酶基因同源的DNA片段,编码麦迪霉素聚酮合成酶,因而当转化到麦迪霉素聚酮合成酶基因缺陷型菌株 No.68 中,能够“互补”产生麦迪霉素。这两个克隆 DNA 中还可能基本上包含有麦迪霉素生物合成的主要基因,因而在不产生抗生素的变铅青链霉菌中有所表达,说明麦迪霉素生物合成基因是成簇存在。然而也许这两个克隆 DNA 中还缺少部分聚酮合成酶基因的某些序列(因为它们不含有与 Act I 基因有同源性的 PCN11E11Bgl II -Bgl V 10kb 的区域),也许还缺少某些调控基因,因而基因产物表达水平较低。PCN11E11克隆 DNA 中仅含有聚酮合成酶部分基因(缺少与 Act III 基因同源部份),因而不能与 No.68 变株“互补”,恢复其产素的能力。PCN11E11DNA与PCN 8B12及PCN 6C5 DNA有重叠区,又为它们的延伸部分,与麦迪霉素生物合成的关系正在研究中。

以上研究表明,利用粘粒载体克隆较大的DNA片段,所建立的基因文库基因组覆盖率较大,如有可利用的基因作探针,可以比较有效地获得抗生素生物合成基因。然而由于对链霉菌较大片段 DNA 在宿主菌中的稳定性研究得不够,抗生素生物合成基因的调控也比较复杂,抗生素生物合成基因在异种宿主菌中的高效表达尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Christopher, R.B. et al.: *Biotechnology*, Sep. p.808—811, 1984.
[2] Malpartida, F. et al.: *Nature*, 309(5967):462—464, 1984.
[3] Charter, K.F. et al.: *Gene*, 26(1):67—78, 1983.
[4] Murakami T et al.: *Mol. and Gen. Genetics*, 205:42—50, 1986
[5] Stanzak, R. et al.: *Biotechnology*, Mar. p.229—232, 1986.
[6] Malpartida, F. et al.: *Nature*, 325(6170):818—821, 1987.
[7] Hopwood, D.A. et al.: *Genetic Manipulation of Streptomyces A laboratory Manual*, The John Innes Foundation, Norwich 1985.
[8] 龚利民, 王以光: *生物工程学报*, 2(2):24—30, 1986.
[9] Yamamoto, H et al.: *J. of Antibiotics*, 39(9):1304—1313, 1986.
[10] Maniatis, T. et al.: *Mol. Cloning A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
[11] Maas, R.: *Plasmid*, 10:296—298, 1983.
[12] Malpartida, F. et al.: *Mol. Gen. Genetics*, 205:66—73, 1986.

CLONING OF MIDECAMYCIN BIOSYNTHETIC GENE FROM *STREPTOMYCES MYCAROFACIENS* 1748

Wang Yiguang

(*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy
of Medical Sciences, Beijing*)

Genomic library from midecamycin producing strain *Streptomyces mycarofaciens* 1748 has been constructed by using bifunctional cosmid vector PNJ1. According to the DNA homology between the different polyketide synthase gene, actinorhodin polyketide synthase gene Act I, Act III have been used as probes to identify biosynthetic gene from midecamycin producing strain *Streptomyces mycarofaciens* 1748. Several clones were obtained. Restriction analysis of cloned DNA PCN 8B12, PCN6C5, PCN11E11 has shown that the molecular weight of them were 36kb, 48.6kb and 41.6kb respectively. The PCN6C5 DNA contains whole PCN8B12 DNA fragment, the PCN11E11 DNA has 6.75kb overlay region with PCN8B12 and PCN6C5 DNA. Southern hybridization indicated the preliminary location of the polyketide synthase genes of midecamycin in the cloned DNA. Cloned DNA were introduced into blocked mutant of midecamycin producing strain (*Str. mycarofaciens* var. 68) and *Str. lividans*. The transformants produced an antibiotic similar to midecamycin according to TLC and HPLC analysis.

Key words

Midecamycin; biosynthetic gene; polyketide synthase gene

图 版 说 明

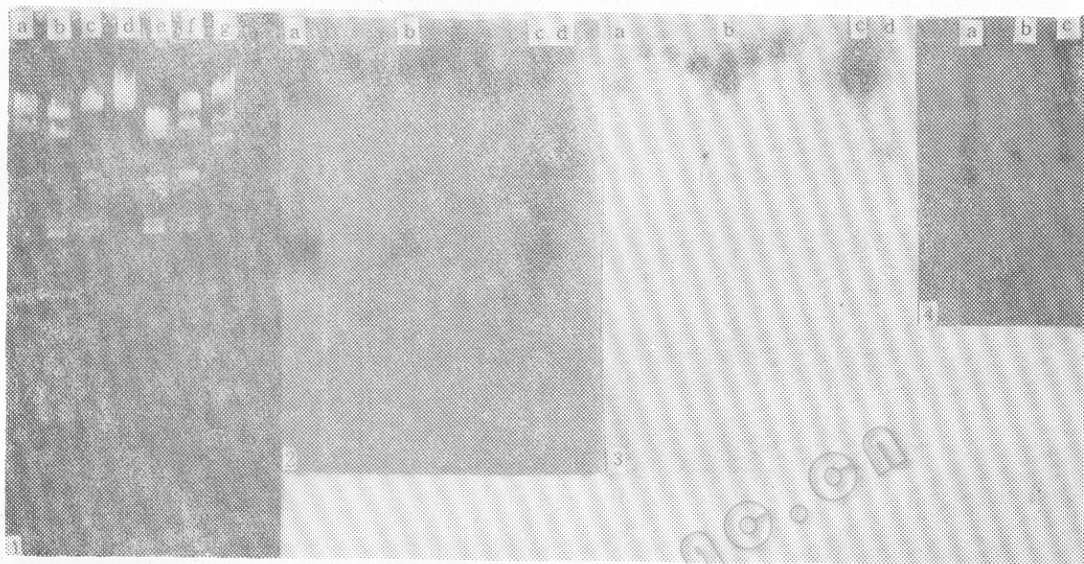
Explanation of plate

1. Electrophoretic pattern of PCN8B12, PCN6C5 DNA after digestion with Hind III, Hind III + BamH I, BamH I respectively. a, PCN8B12/Hind III b, PCN8B12/Hind III + BamH I c, PCN8B 12/BamH I d, PCN6C5/Hind III e, PCN6C5/Hind III + BamH I f, PCN6C5/BamH I g, Hind III
- 2.3. Southern hybridization of Bgl I digests of PCN8B12, PCN6C5, PCN11E11 DNA With Act I and Act II genes as probes.
 2. Act I gene as probe, 3. Act II gene as probe
 - a, PCN 11E11/Bgl I b, PCN 8B12/Bgl I c, PCN6C5/Bgl I d, vector PNJ1/Bgl I
4. Color reaction of TLC of fermentation products from PCN6C5 DNA transformants in *Str. lividans* and in No. 68 mutant.
 - a, Transformant of PCN6C5 DNA in *Str. lividans* TK24
 - b, Midecamycin
 - c, Transformant of PCN6C5 DNA in No. 68 mutant

JOURNALS.IM.AC.CN

王以光：麦迪霉素生物合成基因克隆研究

Wang Yiguang: Cloning of midecamycin biosynthetic gene from
Streptomyces mycrofacienso 1748



唐莉等：链霉菌基因克隆载体及基因文库的构建

Tang Li et al.: Construction of gene cloning vector and genomic library
for *Streptomyces*

