

麦迪霉素4"酰化酶基因的克隆及在螺旋霉产生菌中的表达

王以光 金莲舫 金文藻 张秀华 曾 应
徐小敏 姚 军

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京)

从含麦迪霉素生物合成基因^[1]的初级克隆 pCN6C5 中, 发现并分离了麦迪霉素 4"酰化酶基因, 与质粒载体 pIJ680 相连, 获得重组质粒 p66B, 在螺旋霉产生菌中得到表达, 其主要产物为 4"异戊酰螺旋霉素。以 p66B DNA BamHI-BamHI 2.3kb 插入片段为探针, 从麦迪霉素产生菌基因文库中获得了另一阳性克隆 pCN10F5, Southern 分子杂交确定 pCN10F5 BamHI-BamHI 8.0kb 为同源片段。以 pWHM3 及 pIJ680 为载体, 获得重组质粒 pWF5 及 p6F5, 分子大小分别为 15.2kb 及 13.3kb。通过 DNA 转化, 并经分子杂交实验证明, 获得含重组质粒的螺旋霉产生菌克隆菌株。其主要产物经分离、纯化后, 分析其理化性质和光谱数据, 鉴定为丙酰螺旋霉素 I 和 II。研究还表明, 麦迪霉素基因文库中只有 pCN10F5 DNA 与碳霉素产生菌的 4"异戊酰化酶基因同源, 提示 pCN6C5 克隆携带的麦迪霉素 4"酰化酶基因与 pCN10F5 的 4"丙酰化酶基因及碳霉素 4"异戊酰化酶基因有一定的区别。

关键词 麦迪霉素 4"酰化酶基因; 丙酰螺旋霉素; 异戊酰螺旋霉素

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 螺旋霉素产生菌 *S. ambofaciens* 由 C. R. Hutchinson 教授提供; *S. spiramyceticus* 371 由许菊彦教授提供。

2. 变铅青链霉菌 *S. lividans* TK24 (SM^R) 由 D. A. Hopwood 教授提供。

3. 八叠球菌 *Sarcina*: 由本所提供。

4. 质粒载体 pIJ680 (硫链丝菌素 tsr^R): 由 D. A. Hopwood 教授提供; pWHM3 (Amp^R, tsr^R) 质粒载体由 C. R. Hutchinson 教授提供。

5. 麦迪霉素产生菌 *S. mycaroiaciens* 1748 基因文库^[1]: 为本实验室构建。

6. 碳霉素产生菌 4"异戊酰化酶基因

(CarE): 由 C. R. Hutchinson 教授提供。

7. 螺旋霉素及丙酰螺旋霉素对照样品由本所提供; 薄层层析用的硅胶 GF254 是青岛海洋化工厂产品; 限制酶系中国医学科学院基础所产品; ³²P- α -dCTP 用 Amersham 公司产品; 硫链丝菌素由美国 Squibb & Sons 公司提供。

(二) 方法

1. 大肠杆菌培养与 DNA 转化: 按照 T. Maniatis^[2] 方法。

2. 链霉菌培养、原生质体形成、再生、DNA 转化: 基本按照 D. A. Hopwood 等^[3] 方法。

3. DNA 提取及一般操作: 基本按照文献^[2, 3] 方法。

本文于 1990 年 12 月 30 日收到。

4. DNA 酶切与连接: 按产品说明进行。

5. DNA 片段分离: 从琼脂糖凝胶中按照S&S公司产品说明, 用S&S NA-45 DEAE膜回收。

6. DNA片段缺口翻译及分子杂交: 基本按照文献〔3〕方法。

7. 麦迪霉素4"酰化酶基因在变铅青链霉菌中的表达分析: 先根据 *tsr*^R 抗性挑取转化子, 将单菌落挑到含10 μ g/ml *tsr*^R 的合成培养基〔1〕上, 于28 $^{\circ}$ C培养7天后, 接种到微生物转化培养基(%) : 淀粉2.0, 葡萄糖2.0, (NH₄)₂SO₄ 0.3, 酵母粉0.5, 黄豆饼粉1.0, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.02, CaCO₃ 0.5。培养基装量为30-50ml/250ml三角瓶, 28 $^{\circ}$ C培养24-36h后, 加入200 μ g/ml 螺旋霉素, 再培养2天, 培养液滤液调至pH8.0, 用1/2体积乙酸乙酯提取, 浓缩后在硅胶板上层析, 溶媒系统为苯: 甲醇(9:1), 用碘熏显色, 或用八叠球菌生物显迹, 以丙酰螺旋霉素及螺旋霉素样品的迁移率(Rf值)为对照, 根据转化子是否具有将外源加入的螺旋霉素转化为酰化螺旋霉素的能力, 判断重组质粒中麦迪霉素4"酰化酶基因的存在。

8. 麦迪霉素4"酰化酶基因在螺旋霉素产生菌中的表达分析: 先根据 *tsr* 抗性挑选含麦迪霉素4"酰化酶基因重组质粒的螺旋霉素产生菌转化子, 将单菌落挑到含10 μ g/ml *tsr* 的斜面培养基(%): 葡萄糖1.0, 淀粉2.0, 黄豆饼粉1.0, NaCl 0.4, CaCO₃ 0.5, 琼脂2.0。30 $^{\circ}$ C培养7天, 接种到种子培养基(%): 葡萄糖1.0, 淀粉3.0, 黄豆饼粉2.0, NaCl 0.4, CaCO₃ 0.5。培养基装量为50ml/250ml三角瓶, 28 $^{\circ}$ C培养48h, 转种发酵培养基(%): 葡萄糖2.0, 淀粉4.0, 鱼粉2.0,

玉米浆1.0, NH₄NO₃ 0.6, CaCO₃ 0.5, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.1, NaCl 1.0。装量为50ml/500ml三角瓶, 28 $^{\circ}$ C培养96-120h, 发酵液滤液调至pH8.0, 用方法7进行提取及层析, 确定麦迪霉素4"酰化酶基因在螺旋霉素产生菌中的表达。

9. 酰化螺旋霉素基因工程菌的发酵: 与方法8基本相同。

10. 酰化螺旋霉素的化学提取、分离与纯化: 发酵液加0.5%草酸调至pH2.0—3.0, 过滤, 再用NaOH将pH调至8.0—9.0, 用1/2体积乙酸乙酯分三次提取, 乙酸乙酯提取液用少量水洗后, 用1/2体积pH2.0—2.5的1%KH₂PO₄分三次提取, 将pH调至8.0—9.0后, 用1/2体积二氯甲烷分三次提取, 用少量水洗后干燥脱水, 浓缩二氯甲烷提取液, 在硅胶板GF254上层析, 溶媒系统为苯: 丙酮(2:1), 以丙酰螺旋霉素样品为对照, 从层析板上分离相应的酰化螺旋霉素区带, 分离纯化后得精品。用JEOL DX-300与MAT-711仪测质谱。用JEOL FX-100与AM-500仪测核磁共振谱。

结果与讨论

(一) 麦迪霉素4"酰化酶基因初级克隆的检测

根据一般抗生素生物合成基因连锁成簇的特点, 我们首先研究了已克隆的麦迪霉素生物合成基因〔1〕的片段中含麦迪霉素4"酰化酶基因的可能性, 将以往研究中获得的可能含麦迪霉素生物合成基因的克隆pCN8B12(36kb)、pCN6C5(48.5kb)及pCN11E11(41.5kb)等分别转入变铅青链霉菌*S. lividans* TK24。根据 *tsr*^R 抗性挑取转化子, 转化子经斜面、种子培养转到

转化培养基中, 28℃振荡培养 24—36h后, 加入螺旋霉素200mg/ml 再培养48h。培养液经乙酸乙酯抽提后, 在TLC板上层析, 以丙酰螺旋霉素及螺旋霉素样品为对照, 结果表明含pCN6C5 DNA 的变铅青链霉菌转化子能将外源加入的螺旋霉素转化为酰化螺旋霉素(图1)。推测 pCN6C5 DNA

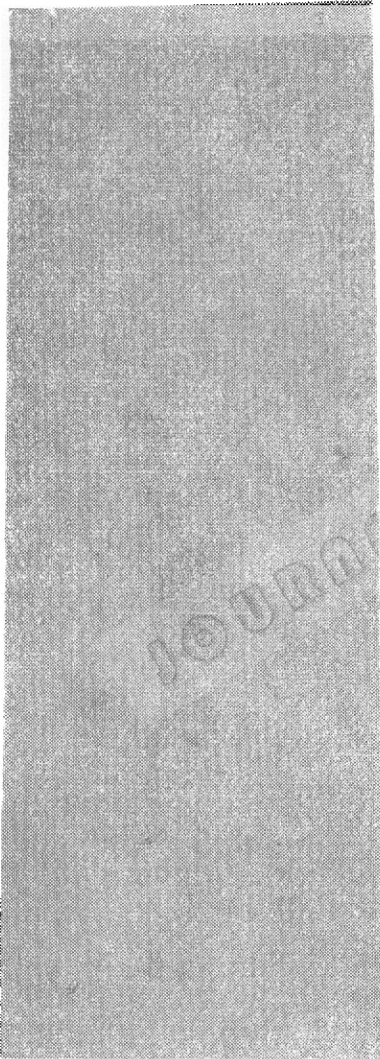


图1 含pCN6C5 DNA 的变铅青链霉菌转化子对螺旋霉素微生物转化后的TLC碘熏显色

Fig.1 TLC of the products after bioconversion of spiramycin by *S. lividans* Tk24 transformants (pCN6C5)

1. Spiramycin;
2. *S. lividans*(pCN6C5);
3. Propionylspiramycin

中含麦迪霉素4"酰化酶基因, 并在变铅青链霉菌中获得表达。

(二) 麦迪霉素4"酰化酶基因的亚克隆

以链霉菌质粒 pIJ680 为载体, 用 BamHI 酶切, 并经碱性磷酸酶处理, 在 T4 连接酶作用下与 pCN6C5 DNA BamHI 酶切片段连接, 转化变铅青链霉菌原生质体, 挑取 tsr 抗性转化子 (约 300 个)。按方法 7 进行微生物转化实验, 以在 TLC 层析板上出现类似酰化螺旋霉素的结果作为指标, 筛选含麦迪霉素4"酰化酶基因的亚克隆。结果表明转化子 No.311 培养液的产物类似酰化螺旋霉素 (图略)。从 No.311 转化子分离提取质粒 DNA 得到重组质粒 p66B, 酶切分析结果表明, p66B DNA 在 pIJ680 质粒载体的 BamHI I 位点上插入了两个 BamHI 片段, 分子大小为 2.3kb 和 0.6kb, 在插入片段上还有一个 PvuII 位点。p66B 重组质粒酶切图谱见图 2。

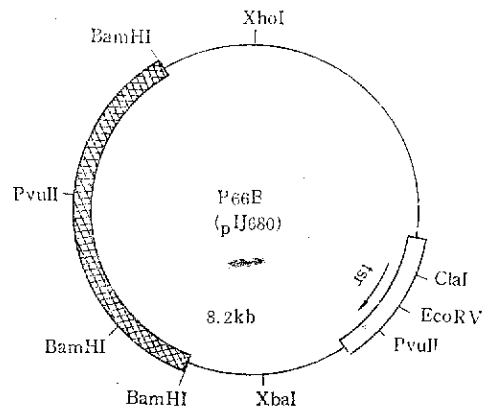


图2 p66B DNA 重组质粒酶切图谱

Fig 2 Restriction map of recombinant DNA p66B

(三) 麦迪霉素4"酰化酶基因在螺旋霉素产生菌中的表达

为了获得直接产生酰化螺旋霉素基因工程菌株, 我们将携带麦迪霉素4"酰化酶

基因的重组质粒p66B在 PEG 媒介下, 转入螺旋霉素产生菌 (*S. ambofaciens*) 及生产菌株 (*S. spiramyceticus* 371) 的原生质体, 挑取 *tsr* 抗性转化子, 经斜面、种子发酵培养及对产物的提取、分离纯化后, 对产物进行薄层层析, 结果见图 3。质谱分析结果见图 4。从质谱图及酰化螺旋霉素结构和可能裂解方式(图 5), 可以证明分子离子峰968为 4"-异戊酰螺旋霉素 II, 982为 4"-异戊酰螺旋霉素 III。质谱中碳霉糖碎片峰229为 4"-异戊酰碳霉糖, 215 为 4"-丁酰碳霉糖, 201 为 4"-丙酰碳霉糖。根据质谱中 4"-酰化碳霉糖碎片峰相对丰度, 推算 4"-异戊酰螺旋霉素约占 55—60%, 其余为 4"-丙酰, 4"-丁酰螺旋霉素。由此可见, 麦迪霉素 4"-酰化酶基因在螺旋霉素产生菌中得到了表达。含麦迪霉素 4"-酰化酶基因的螺旋霉素生产菌株——基因工程菌, 经传代及在 80L 发酵罐进行了 10 批小试, 均获得成功, 可进入中试研究。

(四) 麦迪霉素 4"-丙酰化酶基因的发现与克隆

由于在我们以往的研究(未发表的内部资料)中没有发现麦迪霉素产生菌生卡链霉菌 (*S. mycarofaciens* 1748) 产生 4"-异戊酰麦迪霉素这一组份, 日本的麦迪霉素产生菌 (*S. mycarofaciens* ATCC 21454) 中只报道过产生 4"-丁酰麦迪霉素 (midecamycin A₂, A₄)^[5]。为了研究 pCN6C5 中含麦迪霉素 4"-酰化酶基因的完整性, 及探讨麦迪霉素产生菌中存在另一 4"-酰化酶基因的可能性, 我们以 p66B DNA 插入片段 BamHI-BamHI 2.3kb 为探针, 与麦迪霉素产生菌基因文库进行菌落杂交, 结果除了 pCN6C5 克隆以外, 得到另一阳性克隆 pCN10F5, Southern 分子杂交证明 pCN10F5 DNA

中 BamHI-BamHI 8.0kb 及 BglII-BglII 10.0kb 为同源片段(图 6)。

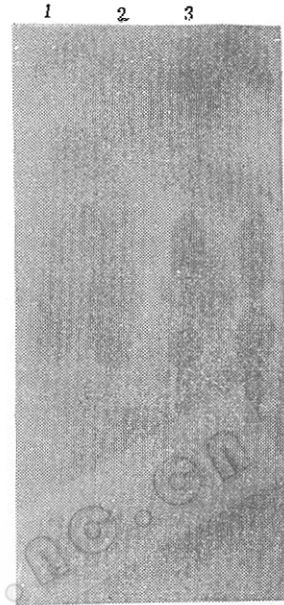


图 3 含 p66B 重组质粒螺旋霉素产生菌 *S. spiramyceticus* 371 产物的 TLC 生物显迹

Fig.3 Bioautography of TLC of the transformants from *S. spiramyceticus* (p66B DNA)

1. Propionyl spiramycin; 2. Product of *S. spiramyceticus* (p66B DNA);
3. Spiramycin

大肠杆菌/链霉菌质粒载体 pWHM3, 经 BamHI 酶切线性化以后, 用碱性磷酸酶处理, 亚克隆 pCN10F5 DNA BamHI-BamHI 8.0kb 片段, 转化大肠杆菌 *E. coli* DH-5, 得到重组质粒 pWF5, 酶切后证明分子大小为 15.2kb 限制酶图谱见图 7。

将 pWF5 重组质粒转化螺旋霉素产生菌 *S. ambofaciens* 原生质体, 以 *tsr* 抗性为标记, 挑选转化子, 转化子发酵液经乙酸乙酯提取后, 在 TLC 层析板上显示生物活性, 结果显示含 pWF5 重组质粒的螺旋霉素产生菌 *S. ambofaciens* 产生与丙酰螺旋霉素相当的产物(图 8)。说明 pWF5 重组质粒的插入片段 BamHI-BamHI

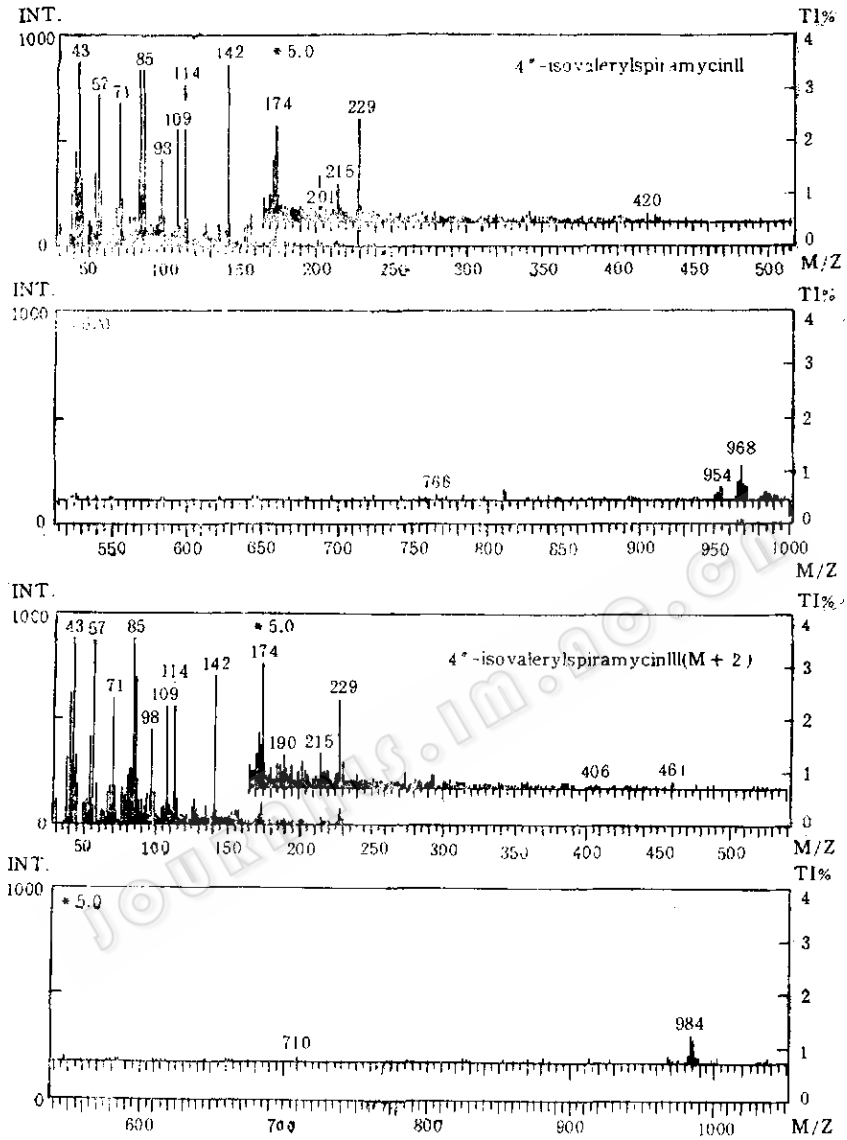


图 4 含 p66 B 重组质粒螺旋霉素产生菌 *S.ambofaciens* 产物的质谱图

Fig.4 Mass spectrometric spectrum of the products of transformants from *S.ambofaciens*

8.0kb 部份，可能携带麦迪霉素4"丙酰化酶基因。以pWF5 DNA插入片段BamHI-BamHI 8.0kb为探针的Southern分子杂交结果表明，螺旋霉素产生菌克隆菌株中确实含有pWF5 DNA的BamHI-BamHI 8.0kb片段。

目前我们已将麦迪霉素4"-丙酰化酶

基因 pWF5 DNA BamHI-BamHI 8.0kb片段与质粒载体 pJ680相连，获得了重组质粒p6F5。并将 p6F5 DNA转化螺旋霉素生产菌株*S. spiramyceticus* 371原生质体，获得含 p6F5 DNA重组质粒的克隆菌株该克隆菌株经连续传代及在80L发酵罐中进行试验，均可稳定地产生

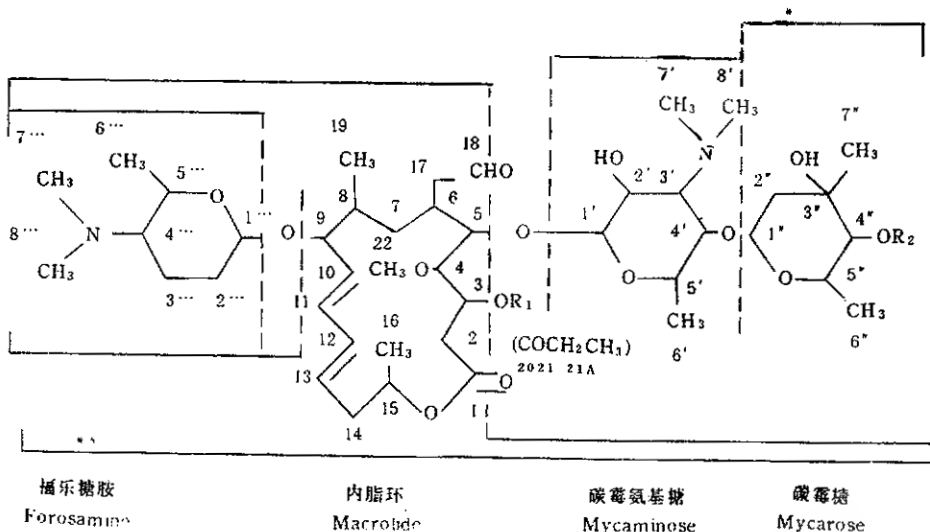


图 5 4''-酰化螺旋霉素结构和可能裂解方式

Fig.5 The possible fragmentation of the structure of the 4''-acylspiramycin

R ₁ -COCH ₃	spiramycin I	R ₂ -COCH ₂ CH ₃	4''-propionylspiramycin
-COCH ₂ CH ₃	spiramycin II	-COCH ₂ CH(CH ₃) ₂	4''-isovalerylspiramycin
		-COCH ₃	4''-acetylspiramycin

- * 187 4''-acetyl
- 201 4''-propionyl
- 215 4''-butyryl
- 229 4''-isovaleryl
- ** 954 4''-propionylspiramycin II
- 940 4''-propionylspiramycin II / 4''-acetylspiramycin III
- 982 4''-isovalerylspiramycin II
- 968 4''-isovalerylspiramycin I

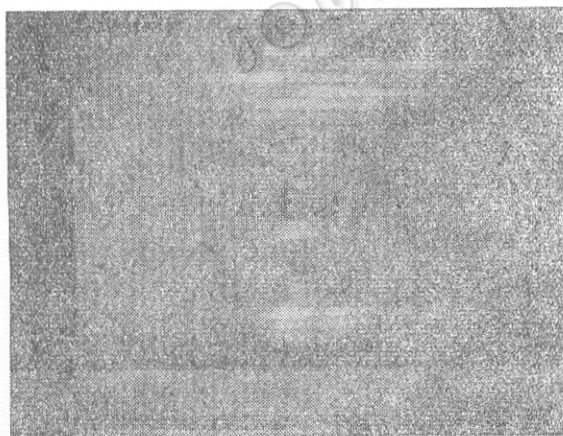


图 6 pCN10F5 DNA与p66B质粒DNA BamHI-BamHI 2.3kb 片段为探针的分子杂交结果

Fig.6 Southern hybridization of pCN10F5 DNA with p66B DNA BamHI-BamHI 2.3kb fragment as a probe

1. pCN6C5 BamHI;
2. pCN10F5 BglII;
3. pCN10F5 BamHI

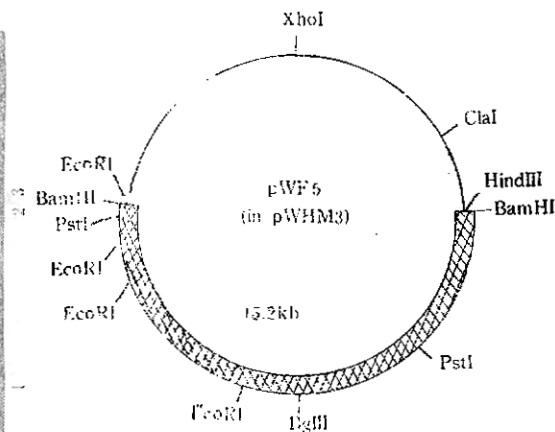


图 7 pWF5重组质粒限制酶酶切图谱

Fig.7 Restriction map of recombinant plasmid DNA pWF5

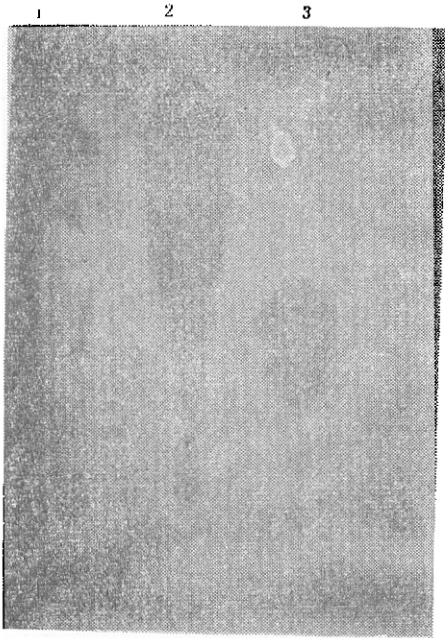


图8 含pWF5重组质粒螺旋霉素产生菌 *S.ambofaciens* 克隆菌株产物薄层层析生物显迹图
 Fig.8 Bioautography of TLC of products from spiramycin producing strain (*S.smbofaciens*) harboring pWF5 DNA
 1. 4"-propionyl spiramycin; 2. Transformant of *S.ambofaciens* (pWF5); 3. Spiramycin

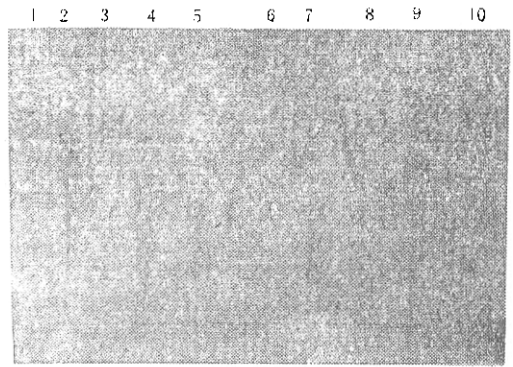


图9 含p6F5重组质粒的螺旋霉素产生菌 *S.spiramyceticus* 371在连续传代及80L发酵罐中产生丙酰螺旋霉素TLC层析图

Fig.9 Bioautography of TLC of the 4"-propionylspiramycin produced by the transformants of *S.spiramyceticus* 371 (p6F5) in successive transfer and in the 80L fermentor
 1. Spiramycin; 2. *S.spiramyceticus* 371(pWF5); 3. *S.spiramyceticus* 371(p6F5); 4-7. *S.spiramyceticus* 371(p6F5) the first, the second, the third and the fourth transformants, respectively; 8,9. *S.spiramyceticus* 371 (p6F5) in 80 L fermentor; 10. Propionylspiramycin



图10 pCN10F5 DNA与碳霉素4"-异戊酰化酶基因分子杂交图
 Fig.10 Southern hybridization of pCN10F5 DNA with CarE gene as a probe
 1. 10F5 BamHI, 2. λ HindIII

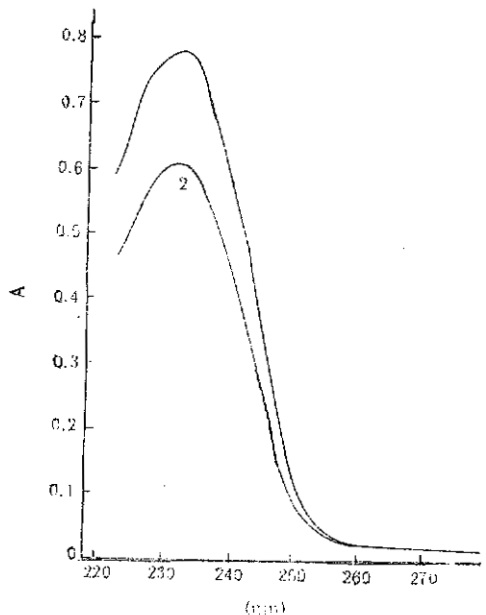


图11 组份 I、II 的紫外光谱
 Fig.11 UV spectra of component I and II

丙酰螺旋霉素。结果见图9。

此外我们还发现用碳霉素4''-异戊酰化酶基因(C.R.Hutchinson实验室所得,未发表)作探针,与麦迪霉素产生菌(*S. mycarofaciens* 1748)基因文库进行菌落

杂交,结果证明只有pCN10F5为阳性克隆。Southern杂交亦证明pCN10F5 DNA BamHI -BamHI 8.0kb与之同源(图10)。说明pCN10F5 BamHI-BamHI 8.0kb所携带的麦迪霉素4''-丙酰化酶基

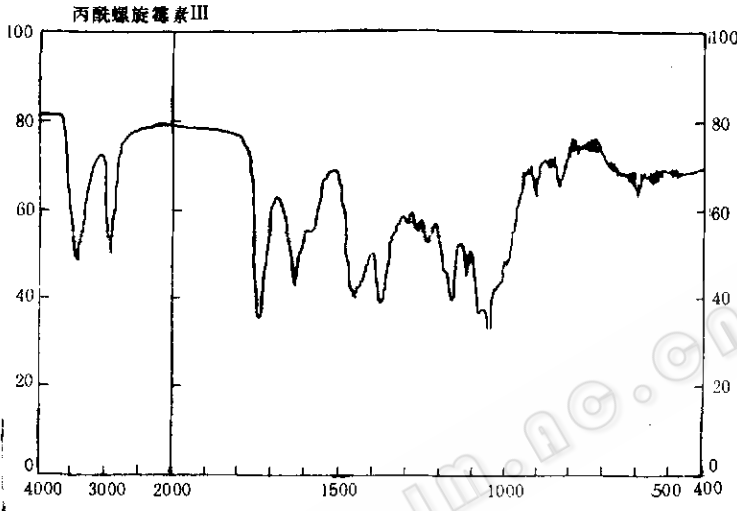


图12 组份 I、II 的红外光谱(kBr)
Fig.12 IR spectra of component I and II (kBr)

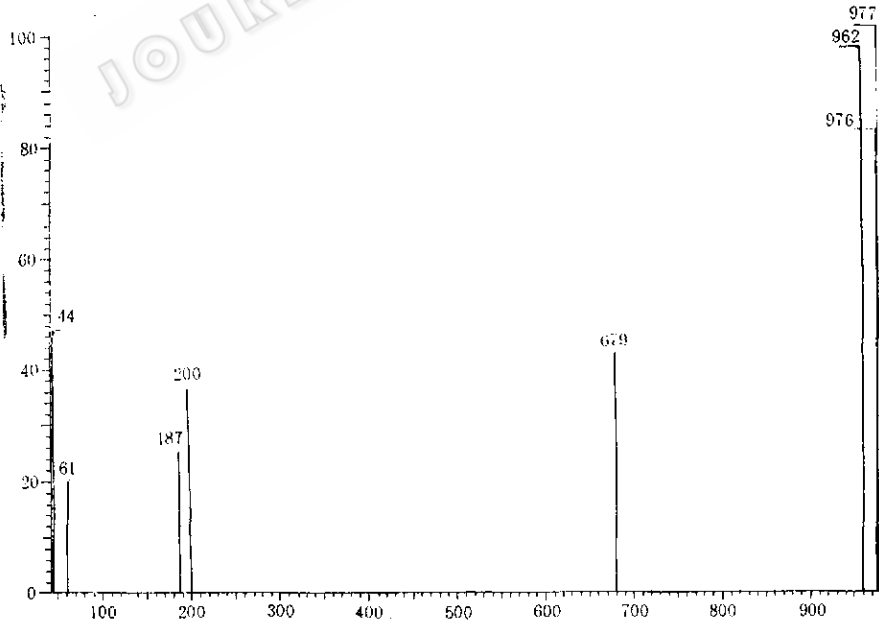
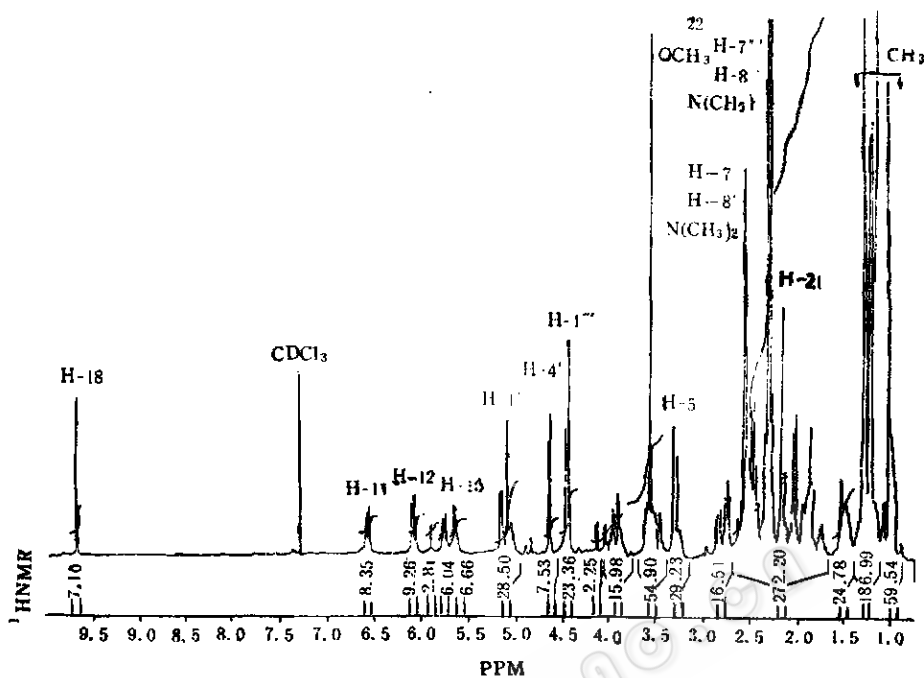
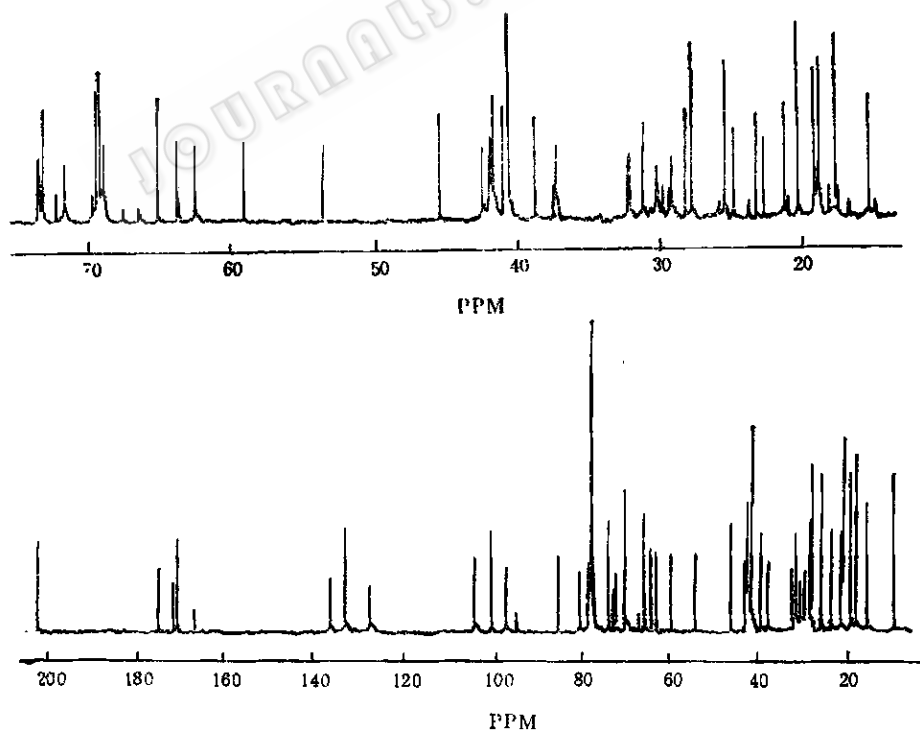
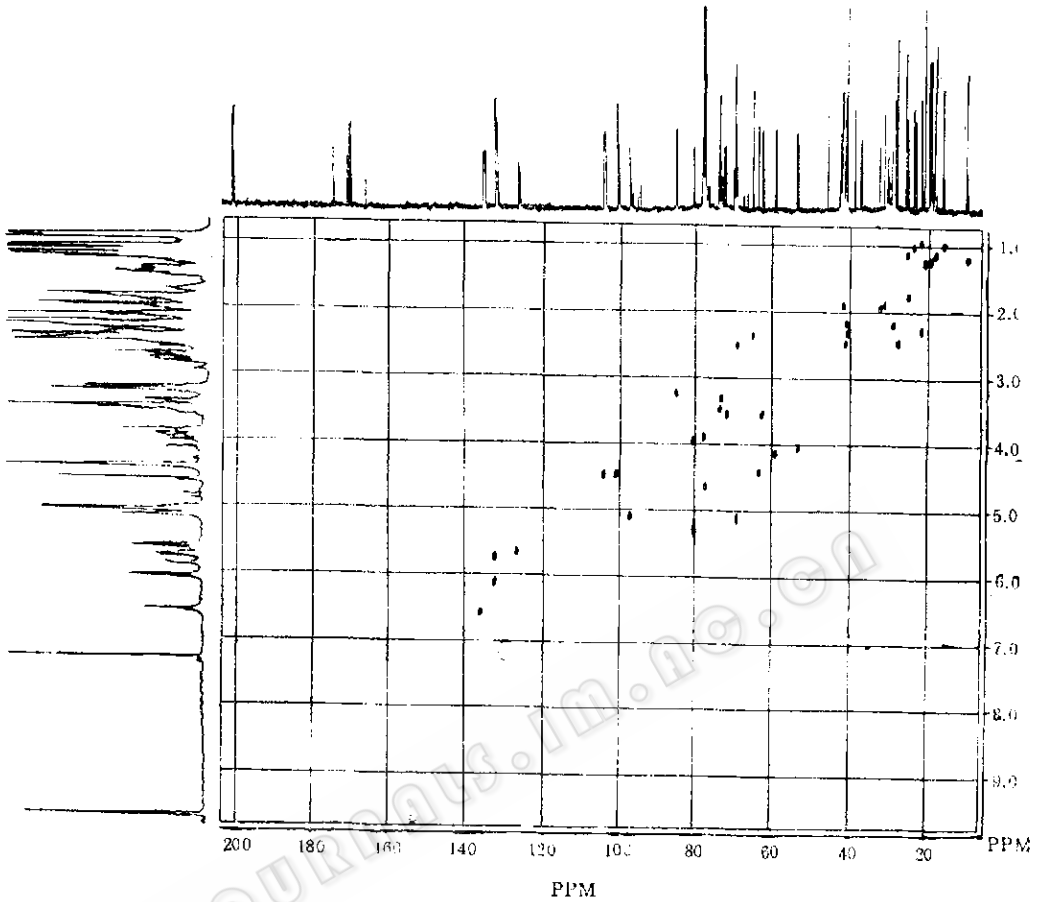


图13 组份 I、II 的场解吸质谱
Fig.13 FDMS of component I and II

图14(1) 组份 I 的 ^1H -核磁共振谱Fig.14(1) ^1H -NMR spectrum of component I图14(2) 组份 I 的 ^{13}C -核磁共振谱Fig.14(2) ^{13}C -NMR spectrum of component I

图14(3) 组份 I 的 ^{13}C - ^1H 二维相关谱Fig.14(3) ^{13}C - ^1H COSY spectrum of component I

因,与pCN6C5克隆中能使螺旋霉素4''-异戊酰基化的酶基因,可能有一定区别。这些问题有待更深入的工作才能解决。

(五)丙酰螺旋霉素的化学鉴别

按上述方法10得到的酰化螺旋霉素,再经制备薄层层析[硅胶GF254,苯:丙酮(2:1)展层]分离,得到Rf值分别为0.46和0.43的I, II两个组份,用此两个样品进行了有关理化性质和光谱数据的测定。

1. 组份I, II的紫外光谱:组份I、II的 $\text{uv}_{\text{max}}^{\text{M}^+:\text{H}^+\text{nm}}$ 均为232(图11)

2. 组份I、II的红外光谱:组份I、II的红外光谱相同。3420 cm^{-1} 为

-OH吸收峰, 2930 cm^{-1} 为-CH₂-的吸收峰,

1738 cm^{-1} 为内酯结构 $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{O}-\text{R} \end{matrix}$ 的吸收峰, 1615 cm^{-1} 为-CH=CH-CH=CH-的吸收峰。(图12)

3. 组份I、II的场解吸质谱(FD-MS):组份I由FD质谱测得分子离子峰为977($\text{M}^+ + \text{Na}^+$),故分子量为954(977-23),和4''-丙酰螺旋霉素III相同。见图5(酰化螺旋霉素结构)和图13。组份II由FD质谱测得分子离子峰为962($\text{M}^+ - \text{H} + \text{Na}^+$),故分子量为940(962-23+1),此

表 1 组份 I 和丙酰螺旋霉素 II 的¹³C-NMR中的化学位移Table 1 Assignments of ¹³C-NMR spectra of component I and Pr-SPM II

碳原子 Carbon No.	组份 I Component I δ(ppM)	Pr-SPM II δ(ppM)	碳原子 Carbon No.	组份 I Component I δ(ppM)	Pr-SPM II δ(ppM)
C1	169.9	169.9	C1'	104.0	104.0
C2	37.3	37.2	C2'	69.2	69.2
C3	71.5	71.7	C3'	69.4	69.2
C4	77.8	77.8	C4'	76.7	74.9
C5	84.7	84.5	C5'	73.0	73.0
C6	29.0	28.9	C6'	19.0	19.0
C7	30.1	30.2	C7'	42.0	42.0
C8	32.0	31.9	C8'	42.0	42.0
C9	80.0	79.7	C1''	96.9	96.4
C10	126.6	126.7	C2''	41.0	41.0
C11	135.4	135.4	C3''	69.7	69.5
C12	132.4	132.3	C4''	77.0	76.4
C13	131.9	131.9	C5''	66.4	66.1
C14	40.6	40.6	C6''	18.2	18.3
C15	69.0	68.9	C7''	25.4	25.4
C16	20.3	20.3	C1'''	100.2	100.3
C17	42.5	42.5	C2'''	31.0	31.2
C18	201.3	201.3	C3'''	18.8	18.3
C19	15.4	15.4	C4'''	64.9	64.9
C20	170.9	170.8	C5'''	73.3	73.7
C21	27.7	27.7	C6'''	18.9	18.7
C21a	9.3	9.0	C7'''	41.6	41.0
C22	62.4	62.4	C8'''	41.6	41.0

表 2 组份 I、II 的其他理化性质

Table 2 Some of physico-chemical properties of component I and II

组 份 Components	I	II
名 称 Names	丙酰螺旋霉素 II Propionyl spiramycin II	Propionyl spiramycin I and acetyl spiramycin II
外 观 Appearance	淡黄色粉末 Pale yellow powder	淡黄色粉末 Pale yellow powder
性 状 Nature	弱碱性 Weakly basic	弱碱性 Weakly basic
分 子 量 Molecular weight	954	940
熔 点 Melting point (°C)	135—136	124—125
旋 光 Optical Rotation (α) _D ²⁰ (C=1.0, CHCl ₃)	-52.7	-68.0

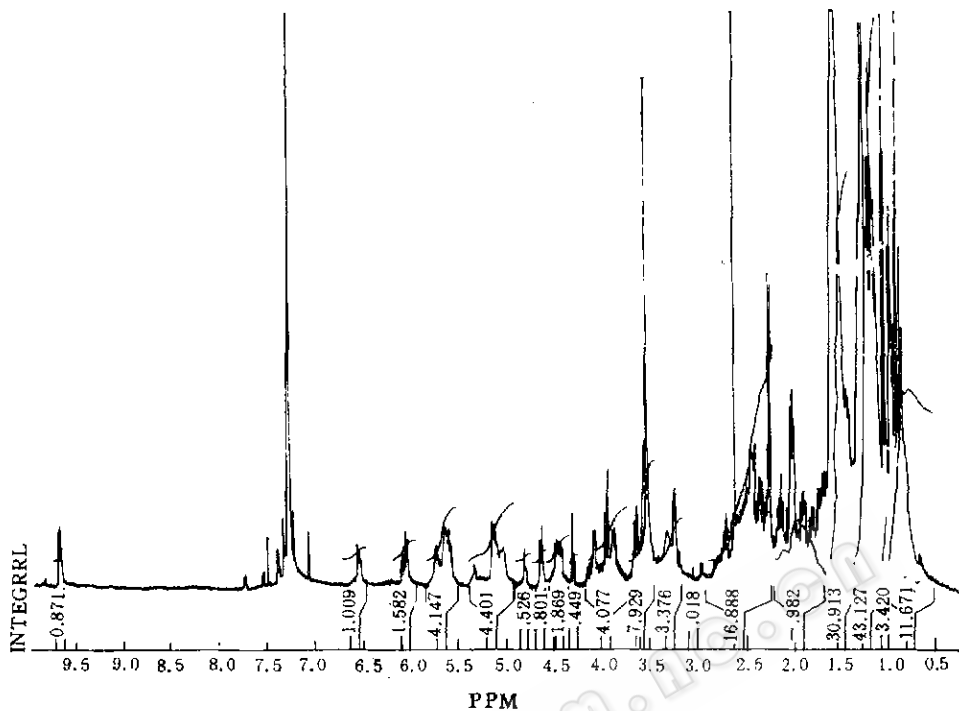
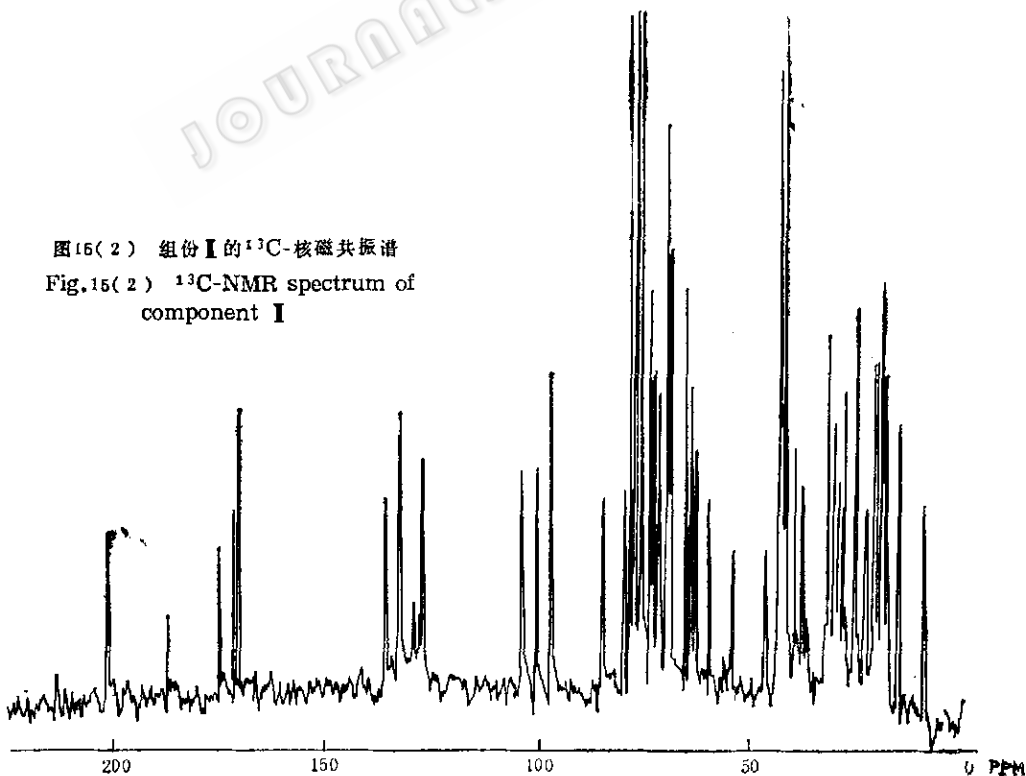
图15(1) 组份I的 ^1H -核磁共振谱Fig.15(1) $^1\text{H-NMR}$ spectrum of component I

图15(2) 组份I的 ^{13}C -核磁共振谱
Fig.15(2) $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of component I



分子量与4''-丙酰螺旋霉素Ⅱ及4''-乙酰螺旋霉素Ⅲ相同, 又据碎片峰200〔(M⁺-H), 4''为丙酰基的碳霉糖碎片峰〕和187(4''为乙酰基的碳霉糖碎片峰)的峰强之比为10:7的结果分析, 组份Ⅱ是以4''-丙酰螺旋霉素Ⅱ为主, 4''-乙酰螺旋霉素Ⅲ为次的同分异构体。见图13。

4. 组份Ⅰ、Ⅱ的核磁共振谱和其它理化性质:

(1)组份Ⅰ: 将组份Ⅰ在¹³C-NMR中各碳原子的化学位移和文献^[6]中丙酰螺旋霉素Ⅲ的碳原子的化学位移进行比较(表1), 表明其相应碳原子的化学位

移是基本相同的。从核磁共振谱的分析证明, 组份Ⅰ和丙酰螺旋霉素Ⅲ相同。〔图14(1)~(3)〕

(2)组份Ⅱ: 组份Ⅱ的核磁共振谱见图15(1)和图15(2)。

(3)组份Ⅰ、Ⅱ的其他理化性质: 见表2。

通过对麦迪霉素4''-酰化酶基因在螺旋霉素产生菌中表达产物的化学鉴别, 确认该基因工程菌主要产生的螺旋霉素酰化产物——组份Ⅰ和Ⅱ分别为丙酰螺旋霉素Ⅲ和Ⅱ。发酵液中的次要成分尚有乙酰、丁酰、异戊酰螺旋霉素。

参 考 文 献

- [1] 王以光: 生物工程学报 6(4), 261, 1989.
 [2] Maniatis T et al., Molecular Cloning, A Lab. Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
 [3] Hopwood D. A. et al., Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual The John Innes Foundation, Norwich, 1985.
 [4] 龚利民, 王以光: 生物工程学报 2(2), 24, 1986.
 [5] Takashi T. et al., J. of antibiotics, 24(7): 476, 1971.
 [6] S. Omura et al., J. Am. Chem. Soc., 97, 4001-4009, 1975.

Cloning of Midecamycin 4''-acyltransferase and Its Expression in Spiramycin Producing Strains

Wang Yiguang Jin Lianfang Jin Wenzao Zhang Xiuhua
 Zeng Ying Xu Xiaomin Yao Jun

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

A midecamycin 4''-acyltransferase gene was discovered from primary clone pCN6C5 (48.5 kb), containing midecamycin biosynthetic gene^[1]. Subcloning of pCN6C5 DNA into plasmid vector pIJ680 BamHI site resulted in obtaining of recombinant plasmid p66B. Transformation of p66B DNA into spiramycin producing strains resulted in direct production of 4''-isovalerylspiramycin. In order to identify the completeness of cloned midecamycin 4''-isovaleryltransferase gene on plasmid p66B from pCN6C5

DNA and the possible existence of other 4"-acyltransferase gene in the midcamycin producing strain *S.mycarofaciens* 1748 genome. Colony hybridization of genomic library of *S.mycarofaciens* 1748 was performed by using the BamHI-BamHI 2.3kb insert on p66B DNA as probe. Another positive clone pCN10F5 was obtained. A BamHI-BamHI 8.0kb homologous region on pCN10F5 was determined by Southern hybridization and was subcloned into plasmid pWHM3 as well as pIJ680. Recombinant plasmids pWF5 and p6F5 were obtained. Transformation of these plasmids into spiramycin producing strains resulted in production of two major acylspiramycin components. Based on their physicochemical properties and spectral evidences, component I has been identified as 4"-propionylspiramycin III, component II as 4"-propionylspiramycinII. Southern hybridization confirmed that the BamHI-BamHI 8.0kb fragment was cloned in the spiramycin producing strain. Only pCN10F5 clone was identified from genomic library of *S.mycarofaciens* 1748 when the 4"-isovaleryltransferase gene of carbomycin producing strain *S.thermotolerans* was used as a probe in colony hybridization, that suggested there is a difference between the 4"-acyltransferase genes in the pCN6C5 and in pCN10F5 clones.

Key words

Midcamycin 4"-acyltransferase gene; propionylspiramycin; isovalerylspiramycin