

丙酰螺旋霉素基因工程菌构建的研究

李元 刘伯英 李晓平 杨毓芬 王硕昌

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京)

将含有丙酰化酶基因的pIJM9重组质粒转化至螺旋霉素生产菌株*S. spiramyceticus*获得的转化子, 经菌落原位杂交和Southern分子杂交表明, No.61转化子含有pIJM9重组质粒, 其发酵产物经薄层层析, 生物显迹试验证明, 含有与丙酰螺旋霉素标准品Rf值相类似的组分, 高压液相色谱分析也证明其产物中有与丙酰螺旋霉素保留时间基本一致的成份, 质谱分析结果表明产物中含有与丙酰螺旋霉素I相同的组分, 这说明No.61克隆菌株是能够直接产生丙酰螺旋霉素的基因工程菌。

关键词 丙酰化酶基因; 转化; 原位杂交; 分子杂交; 丙酰螺旋霉素

4"-O-丙酰螺旋霉素是我们研究所研究成功的一种新抗生素, 初步药理实验结果表明其体内外抗菌活性优于目前临床应用的半合成抗生素——乙酰螺旋霉素, 我们以往的工作^[1]已经证实了生米卡链霉菌变株丙酰化酶基因在变铅青链霉菌中的克隆和表达。本文报道了生米卡链霉菌变株丙酰化酶基因在螺旋霉素生产菌株*S. spiramyceticus*中克隆和表达的结果。

材料与方 法

(一) 菌种

螺旋霉素生产菌株 *Streptomyces spiramyceticus*, 藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*) 为本所保存菌种。

(二) 培养基

1. SASM(%): 淀粉 4.0, 黄豆饼粉 2.0, 氯化钠 0.4, 碳酸钙 0.5, 琼脂 1.5, pH7.5。

2. 螺旋霉素产生菌种子培养基(%): 淀粉 4.0, 黄豆饼粉 2.5, 碳酸钙 0.5, 氯化钠0.4, 蛋白胨 1.0, 自来水, 自然pH。

3. 螺旋霉素产生菌发酵培养基(%): 淀粉6.0, 葡萄糖2.0, 玉米浆1.0, 鱼粉2.5, 硝酸铵0.6, 氯化钠 1.0, 硫酸镁0.1, 碳酸钙 0.5, 磷酸二氢钾 0.05, pH6.5—7.0。

4. 螺旋霉素产生菌可溶性培养基(%): 牛肉膏 0.2, 蛋白胨 0.6, 酵母膏 0.4, pH7.1。

5. R₂ (%): 蔗糖 10.3, 硫酸钾 0.025, 酵母膏 0.4, 蛋白胨0.4, 酪蛋白水解物 0.01, 葡萄糖1.0, 三羟甲基氨基甲烷 0.3, 磷酸氢二钾 0.0025, 氯化钙 0.735, 氯化镁 1.012, 微量元素溶液 0.2ml/L (氯化锌0.004, 氯化铜0.001, 硼酸钠 0.001, 氯化铁 0.02, 氯化锰 0.001), 琼脂1.5, pH7.5。

6. 八叠球菌斜面培养基(%): 蛋白胨0.5, 酵母膏0.15, 牛肉膏 0.15, 葡萄糖0.1, 氯化钠0.35, 磷酸氢二钾 0.37, 磷酸二氢钾0.13, 琼脂1.5, pH7.0。

7. 八叠球菌检定培养基(%): 蛋白胨1.0, 酵母膏0.3, 牛肉膏0.15, 葡萄糖 0.1, 琼脂1.5, pH8.0。

本文于1990年12月22日收到。

(三) 酶

限制酶 Bgl II、缺刻翻译试剂盒为 Bcehringer (西德) 产品; 溶菌酶为上海生物化学研究所东风厂产品, 酶切条件按公司提供的说明书进行。

(四) 染色体 DNA 和质粒 DNA 的制备

S. spiramyceticus 菌株, Na61 克隆菌株总DNA的制备采用 Saito^[2]方法, pIJM9重组质粒制备基本采用 Katz^[3]等方法, 并采用氯化铯密度梯度超速离心提纯制备^[4]。

(五) 转化

以螺旋霉素生产菌株 *S. spiramyceticus* 作为受体菌, 按照 Hopwood 等^[5]方法转化含有丙酰化酶基因的 pIJM9 重组质粒, *S. spiramyceticus* 形成原生质体需 3h 左右, 溶菌酶用量为 10mg/ml, 以含有硫链丝菌素 (25μg/ml) 的 R₂ 培养基琼脂平板筛选转化子。

(六) 琼脂糖凝胶电泳

采用 1% 琼脂糖凝胶水平平板电泳, 使用 TAE 缓冲液^[4] (三羟甲基氨基甲烷-冰醋酸 0.04mol/L, 乙二胺四乙酸二钠 0.002mol/L), 电压为 3.5V/cm。

(七) 菌落原位杂交

(α-³²P)-dATP 为美国 Dupont 公司产品, 以 pIJM9 重组质粒为探针, 与固定于硝酸纤维素膜上, 经过溶菌和碱变性处理的转化子 DNA 进行杂交, 基本采用 Hopwood^[5]等方法。

(八) Southern 分子杂交

基本采用 Maniatis^[4]方法, 以 pIJM9 重组质粒为探针, 与 Bgl II 酶切过的 *S. spiramyceticus* 和 Na61 克隆菌株总 DNA 进行杂交。

(九) 丙酰螺旋霉素的检测

对 Na61 克隆菌株进行发酵实验, 28℃

振荡培养 96h, 在碱性条件下, 以乙酸丁酯进行提取。采用薄层层析和高压液相色谱分析其发酵产物。薄层层析采用硅胶 GF₂₅₄ 碱性板, 溶剂系统为乙酸乙酯: 甲醇 = 9:1, 层析毕以碘显迹, 并以八叠球菌为检定菌进行生物显迹。高压液相色谱采用 μ Bondapak TM C18 柱 (美国), 流动相为甲醇: 水 (用磷酸调至 pH2.8—2.9) = 67:33, 室温操作, 于 232nm 进行紫外光检测。

实验结果

(一) 原位杂交

按照前述方法转化后, 28℃ 培养 7—10 天, 获得近千株抗硫链丝菌素 (25μg/ml) 的 *S. spiramyceticus* 转化子, 随机挑选约 150 株按上述方法进行菌落原位杂交, 实验结果见图 1, 其中 Na61 转化子为杂交阳性, 我们曾对该转化子进行过质粒提取, 未获十分肯定结果, 选取该转化子进行进一步详尽的研究。

(二) Southern 分子杂交

按照前述方法提取 *S. spiramyceticus*

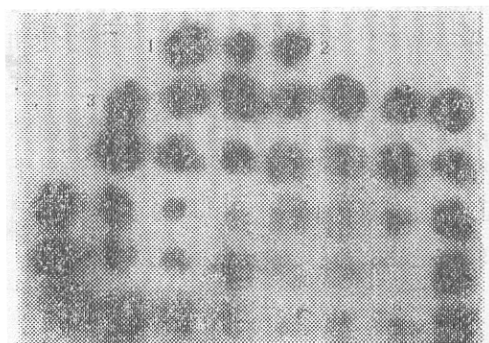


图 1 原位杂交放射自显影图

Fig.1 The autoradiography of colony hybridization

1. Positive control: pIJM9 recombinant plasmid DNA
2. Negative control: *S. spiramyceticus*
3. No.61 transformant

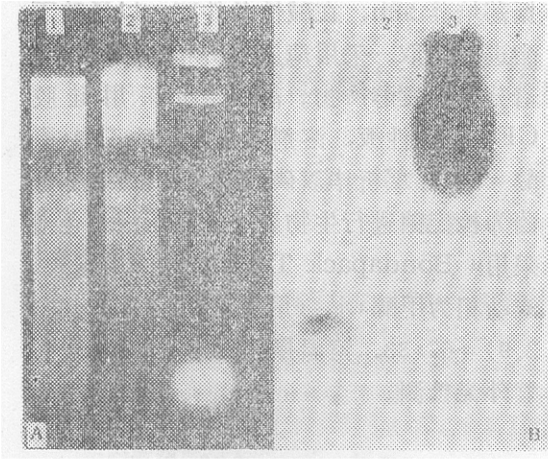


图 2 Southern 分子杂交

Fig.2 Southern hybridization

- A. Agarose gel electrophoresis before hybridization
 B. Autoradiography of hybridization patterns
1. No.61 transformants DNA digested by Bgl I
 2. *S. spiramyceticus* DNA digested by Bgl I
 3. pIJM9 recombinant plasmid

菌株和 No.61 克隆菌株的总 DNA，考虑到含有丙酰化酶基因的 DNA 片段在 pIJM9 重组质粒中是在 Bgl II 酶切位点插入的，因此用 Bgl II 限制酶对上述两菌株总 DNA 进行酶切，以 pIJM9 重组质粒作为探针进行分子杂交，结果表明 pIJM9 重组质粒和 *S. spiramyceticus* 总 DNA 没有同源杂交带，而与 No.61 克隆菌株总 DNA 有同源杂交带（图 2），因此确证这种同源性来自于 pIJM9 重组质粒，说明 pIJM9 重组质粒已经转化进入 No.61 克隆菌株。

（三）丙酰螺旋霉素的检测

No.61 克隆菌在 28℃ 发酵培养 96h 后，按上述方法进行了提取、纯化。薄层层析碘显迹结果表明，发酵产物中含有与丙酰螺旋霉素标准品 *R_f* 值相近的组分（图 3）；薄层层析后对八叠球菌进行生物显迹也表明类似的结果（图 4）；高压液相色谱分析

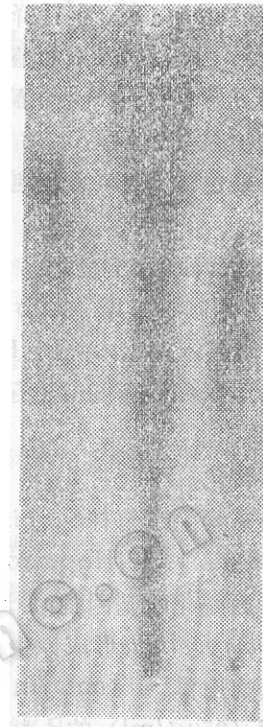


图 3 No.61 转化子发酵产物薄层层析图

Fig.3 TLC of fermentation products of No.61 transformant

1. Propionylspiramycin
2. Fermentation products of No.61 transformant
3. Spiramycin

结果表明，发酵产物中具有与丙酰螺旋霉素标准品保留时间基本一致的成份（图 5，6）。高压液相色谱吸收峰积分面积百分数结果说明，No.61 克隆菌株发酵产物中丙酰螺旋霉素占 12% 左右，大约相当于螺旋霉素产生量的 1/3—1/4。我们曾采用 HPLC 分析过 *S. spiramyceticus* 发酵产物，未发现与丙酰螺旋霉素保留时间相似的组分（图从略）。FAB 质谱分析结果表明，发酵产物在 943 处有一分子离子峰，与丙酰螺旋霉素标准品中丙酰螺旋霉素 II 分子离子峰 942 相同（图 7，8）。综上所述，No.61 是可以直接形成丙酰螺旋霉素的基因工程菌。

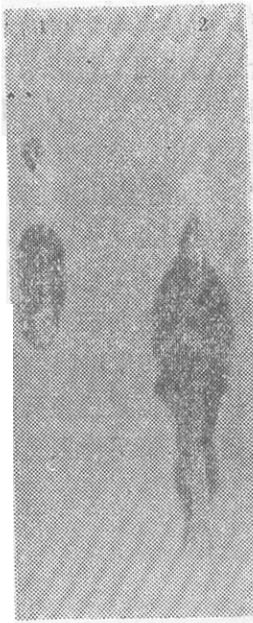


图 4 No.61转化子发酵产物生物显迹图
Fig.4 Bioautography of fermentation product of No.61 transformant

1. Propionylspiramycin
2. Fermentation product of No.61 transformant

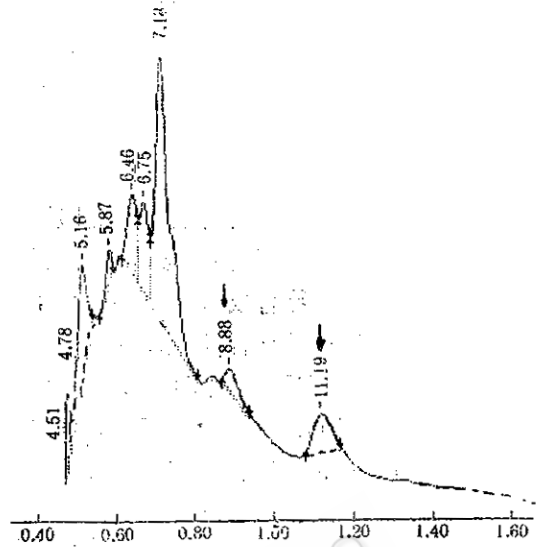


图 6 No.61转化子发酵产物高压液相色谱
Fig.6 HPLC of fermentation product of No.61 transformant

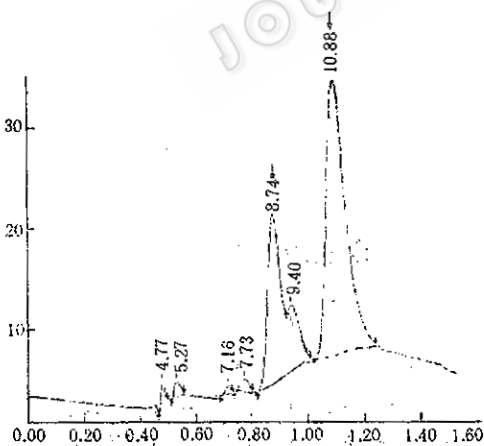


图 5 丙酰螺旋霉素高压液相色谱
Fig.5 HPLC of propionylspiramycin

(四) 基因工程菌遗传稳定性研究

本基因工程菌生长于加有 5 μ g/ml 硫链丝菌素的斜面培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 3 周方可使用, 依斜面转种一次为一代计算迄今

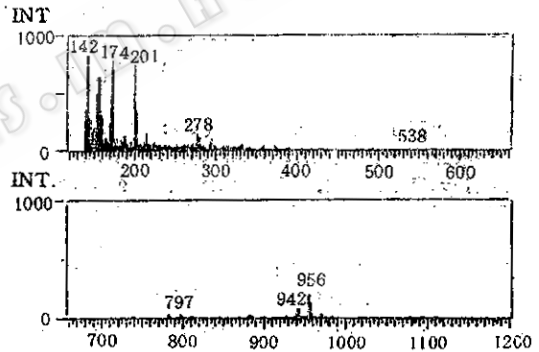


图 7 丙酰螺旋霉素质谱分析图
Fig.7 Mass spectrum of propionylspiramycin

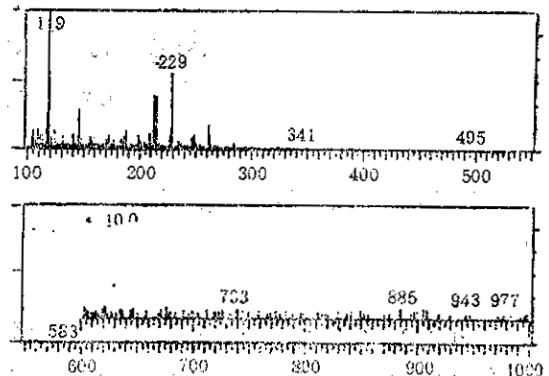


图 8 No.61转化子发酵产物质谱分析图
Fig.8 Mass spectrum of fermentation products of No.61 transformant

已传 60 余代, 仍能稳定形成丙酰螺旋霉素, 遗传性状基本稳定。

讨 论

近年来, 抗生素生物合成基因克隆研究工作发展迅速, 根据初步统计^[6], 目前23种抗生素的生物合成基因已经获得了成功克隆和表达^[7-10]。自Hopwood^[11]等首次报道采用 DNA 重组技术获得杂合抗生素 dihydrogranatirhodin 和 mederrhodinA和B以后, 又有Mc Alpine

等进行了报道^[12], 其他研究工作也在进行之中^[13], 但是迄今为止尚未得到具有较大应用价值的基因工程新杂合抗生素。

据报道, 在某些情况下, 不同链霉菌间基因克隆过程中, 载体在宿主菌中有不稳定现象^[6], 因此我们仍在观察Na61 克隆菌株的遗传稳定性, 为了提高丙酰螺旋霉素在发酵产物中的比例和提高产量, 正在改进发酵条件并进行菌种选育工作。丙酰化酶基因在pIJM9重组质粒 4.16kb 插入DNA 片段中的位置已经确定, 核苷酸序列测定已完成, 将另作报道。

参 考 文 献

- [1] 李元等: 生物工程学报, 7(1):32-36, 1991.
- [2] Saito, H. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 72:619, 1983.
- [3] Katz, E. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 129:2703, 1983.
- [4] Sambrook, J. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, Laboratory, p.142, 1989.
- [5] Hopwood, D.A. et al.: *Genetic Manipulation in Streptomyces*, The John Innes Foundation, Norwich, p.110, 1985.
- [6] Chater, K.F.: *Bio/Technol.*, 8(2):115, 1990.
- [7] Malpartida, F. et al.: *Nature*, 309:462, 1985.
- [8] Bailey, C.R. et al.: *Bio/Technol.*, 2(9):808, 1984.
- [9] Stanzak, R. et al.: *Bio/Technol.*, 4(11):229, 1986.
- [10] Chen, C.W. et al.: *Bio/Technol.*, 6(13):1222, 1988.
- [11] Hopwood, D.A. et al.: *Nature*, 314:642, 1985.
- [12] Mc Alpine, J.B. et al.: *J. Antibiot.*, 40:1115, 1987.
- [13] Heinz, G.F. et al.: *TIBTECH*, 5(4):111, 1987.

Construction of Genetic Engineering Strain Producing Propionylspiramycin

Li Yuan Liu Boying Li Xiaoping Yang Yufen Wang Shuochang
(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

Our work has demonstrated that the propionylacylase gene cloning and expression of *S. mycarofaciens* mutant in *S. lividans* TK54. In this paper, we report the transformation of pIJM9 recombinant plasmid containing propionylacylase gene into spiramycin producer *S. spiramyceticus*.

The results of conoly hybridization and Southern hybridization showed that N₆₁ transformant harbour the pIJM9 recombinant plasmid among the transformants. The TLC and bioautography showed that the *R_f* value of one component of N₆₁ transformant fermentation products is similar with propionyl spiramycin. The HPLC retention time of components of N₆₁ transformant fermentation product and propionylspiramycin are similar too. (FAB)-MS (*m/z* 943 *M*⁺) result showed that there is propionylspiramycin II in the fermentation product of N₆₁ transformant. According to these results, N₆₁ transformant is a genetic engineering strain producing propionylspiramycin.

Key words

Propionylacylase gene; transformation; conoly hybridization; Southern hybridization; propionylspiramycin