

硫霉素生物合成酶基因克隆的研究

李戎锋 王以光 曾 应

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

利用NTG诱变从硫霉素产生菌中获得了生物合成阻断变株Y₃。通过对Y₃变株原生质体形成、再生条件及DNA转化的研究,初步建立了以变株为受体的克隆系统,以pIJ680为载体,从硫霉素产生菌*S.cattleya*中鸟枪克隆,获得了能使Y₃变株恢复产生硫霉素的酶基因。根据对Y₃积累的中间产物的分析,认为该酶基因可能与硫霉素生物合成过程中肽的环化作用有关。重组质粒分子大小为9.8kb左右,插入片段大小为4.5kb,分子杂交试验证明插入片段来源于硫霉素产生菌*S.cattleya*。

关键词 硫霉素; 生物合成酶基因; 阻断变株; 克隆受体系统。

硫霉素(thienamycin)是一种具有碳青霉烯结构的β-内酰胺类抗生素^[1],在临床上具有潜在的应用价值。但是,硫霉素分子中游离的氨基可以使硫霉素本身发生氨解作用,因此,它的化学性质极不稳定,从而影响了在临床上的应用。近年来抗生素生物合成酶基因克隆的研究进展迅速^[2-5],但目前尚无关于硫霉素生物合成酶基因克隆的报道。

材料与方 法

(一) 材料

1. 硫霉素产生菌(*S.cattleya*)、绿脓杆菌11(*Pseudomonas aeruginosa*11)、肺炎杆菌Kp(*Klebsiella pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌209p(*Staphylococcus aureus*)由本所提供。变铅青链霉菌 [*S.lividans* TK24(SM^R)]由D.A.Hopwood教授提供。

2. pIJ680 质粒载体由 D.A.Hopwood教授提供。

3. *S.cattleya*种子培养采用改良的SGGP培养基,组成为(%):

tryptone 0.4; yeast extract 0.4; casamino acid 0.4; MgSO₄·7H₂O 0.05; glucose 1; K₂HPO₄ 0.136; pH 7.0—7.2。

*S.cattleya*发酵培养基(%): glucose 1.5, soluble starch 4.5, soybean meal 1.5, corn steep liquor 1.5, KH₂PO₄ 0.025, K₂HPO₄ 0.06, CoCl₂·6H₂O 0.0002, pH 7.0。

4. 硫链丝菌素(thio)由美国Squibb & Son 公司提供。PEG1000 为 Koch-light公司产品。微晶纤维素为美国Merck公司产品。α-³²P-dCTP 为信通公司产品。

(二) 方法

1. DNA分离、提取及操作、原生质体的制备及DNA转化:基本按照D.A.Hopwood^[6]方法及产品说明进行。

DNA 探针的标记根据试剂盒说明进行。印迹杂交和斑点杂交按Sambrook等所述方法^[7]进行。

2. 菌种培养及发酵: *S.cattleya*的一般培养采用改良SGGP培养基,自斜面

本文于1991年12月26日收到。

接种, 容量为 50ml/250ml 三角瓶, 经 30℃, 200r/min 旋转摇床培养 48h, 以 1/10 体种转种发酵培养基, 容量为 100ml/500ml 三角瓶。30℃, 200r/min 旋转摇床发酵 72h 后进行活性测定。

3. 诱变: 参照 Ikon Kotima^[8] 的方法, 将孢子悬液在 pH9.0, 0.05mol/L Tris-马来酸缓冲液中以终浓度 1.5mg/ml 的 NTG, 37℃ 条件下处理 30min, 经洗涤, 稀释后涂布 SGGP 培养基。

4. 生物活性测定: 无活性阻断变株用固体挖块法和发酵液杯碟法检出。诱变孢子培养 72—96h 后, 挑单菌落至 SGGP 斜面, 30℃ 培养 72h 直接挖块进行生物活性测定, 无活性菌株经纯化、复试, 以与 *S. cattleya* 相同的条件进行发酵, 发酵液同时在绿脓杆菌 11、肺炎杆菌 Kp 和金黄色葡萄球菌 209p 检定培养基上进行活性测定。

5. 产物的分离、纯化和分析: 发酵液经冷冻离心, 上清液用 28% NH₄OH 调至 pH7.0, 冷冻干燥浓缩, 加入 1/2 体积冷丙酮混合, 离心后在微晶纤维素层析板上以乙醇:水(70:30)为流动相进行层析, 收集产物部分, 溶于水, 冷冻干燥, 得纯品。

纸层析条件与薄层层析相同。

HPLC 用 Waters 590 高压液相仪, C₁₈ 反相柱, 流动相为 5% 甲醇的 0.01 mol/L pH7.0 磷酸缓冲液, 流速 1ml/min, 用 279nm 紫外光检测。

6. 环化酶反应的测定: 分别将 p6BC12 和 pIJ680 的变铅青链霉菌 TK24 接种至含 25μg/ml thio 的 SGGP 培养基中, 容量为 50ml/250ml 三角瓶, 30℃ 旋转摇床 72h。Y₃ 变株接种 SGGP 培养基, 容量为 50ml/250ml 三角瓶, 30℃ 旋转摇床 72h 后, 以 1/10 体积转种发酵培养基, 发酵

72h。将发酵液分别与含 p6BC12 和 pIJ680 的培养液等体积混合, 30℃ 旋转摇床 12h。以 Y₃、pIJ680 和 p6BC12 为对照, 杯碟法进行活性测定。

结果与讨论

(一) 基因克隆受体系统的建立

1. 无活性阻断变株的筛选: 比较不同条件下 NTG 对 *S. cattleya* 孢子的诱变效果(表 1), 在所采用的实验条件下最合适条件为 pH9.0, 0.05mol/L Tris-马来酸缓冲液, 终浓度为 1.5mg/ml 的 NTG, 37℃ 作用 30min。共得到 9 株无活性阻断变株 (X₂、Y₃、53、166、167、227、231、235、305) 经 5 代以上传代无回复突变, 它们对 3 株检定菌均无活性, 均为光秃型。

表 1 不同条件下 NTG 对 *S. cattleya* 孢子诱变结果

Table 1 Results of mutagenesis of *S. cattleya* spores by NTG treatment in different conditions

pH	NTG (mg/ml)	Treatment time (min)	Survival rate (%)	Mutagenic rate (%)
9.0	1.5	30	0.225	0.72
		60	0.1	0.35
6.0	1.5	30	50	NT
		60	20	NT
Control		—	100	NT

2. 变株原生质体形成和再生条件的研究: 变株在含不同浓度的甘氨酸的 SGGP 培养基中生长 18—24h, 用不同浓度溶菌酶处理, 结果表明, 在含 0.6% 甘氨酸的 SGGP 中生长, 以终浓度为 2mg/ml 的溶菌酶, 37℃ 处理 90—120min 原生质体的形成情况最好。

比较变株原生质体在不同再生培养基上的再生情况, 发现只有在 SGGP 中加入 10.3% 蔗糖形成的高渗培养基上变株原生

质体可以获得较好的再生。再生培养基的含水量对变株原生质体的再生无显著影响, 变株原生质体的再生率差异较大(表2)。

表2 变株原生质体的再生率

Table 2 Regenerative rate of block mutant protoplast

Protoplast (No.)	167	231	235	Y ₃	305
Regenerative rate (%)	17.7	4.7	8.0	8.0	0.2

3. 变株作为 DNA 转化受体条件的研究: 167和Y₃变株原生质体对 thio 的抗性水平进行了测定, 它们对 thio 的最高耐受浓度分别为20μg/ml、2μg/ml。

以变株235为代表研究了 Koch-light 和Sigma两公司生产的PEG1000在25%和50%两种浓度下对pIJ680 DNA转化的影响, 发现Koch-light公司的PEG1000在25%浓度下, DNA转化率最高。

在较高温度下对原生质体进行处理可以削弱链霉菌体内对外源DNA的限制作用^[9]。对167和Y₃变株在一定温度下处理10min后, 进行再生菌落计数, 发现167变株在45℃, Y₃变株在40℃处理后再生率无显著下降。经处理的原生质体DNA转化率明显高于未经处理的原生质体(表3)。

表3 热处理变株原生质体对DNA转化的影响

Table 3 Effects of heat treatment of mutant protoplast on DNA transformation

Protoplasts		Y ₃	167
Transformation rate (No/μg DNA)	Before treatment	0.5 × 10 ²	1.0 × 10 ²
	After treatment	5.0 × 10 ²	8.0 × 10 ²

(二) 硫霉素生物合成酶基因的克隆

1. 生物合成酶基因的克隆: 链霉菌质粒载体pIJ680经BamHI酶切得到线性载体, 用CIAP处理。插入片段为*S. cattleya*总体DNA经MboI随机部分切割的片

段, 经T4 DNA连接酶连接后, 用0.4μg DNA转化Y₃。原生质体, 从再生平板上共得到50个thio抗性转化子, DNA转化率为2 × 10²/μgDNA。全部转化子在含5μg/ml thio的SGGP斜面上培养96h, 采用固体挖块法检出具有生物活性的转化子, 再经纯化、复试, 最后筛选出稳定的耐thio转化子12号。

对12号等转化子进行质粒小量提取, 电泳后未能观察到质粒。将12号转化子总体DNA转化铅青链霉菌TK24原生质体, 得到抗性转化子, DNA转化率为2.5 × 10³。经质粒提取, 全部得到分子大小为9.8kb的质粒, 命名为p6BC12。p6BC12经BamHI酶切后, 共得到4个片段, 其中一个片段大小与pIJ680相同, 另3个片段大小分别为3.4kb, 0.66kb, 0.43kb(图1)。

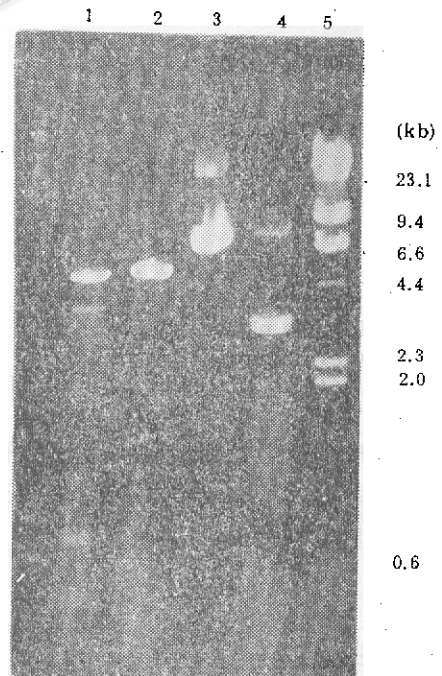


图1 p6BC12 BamHI酶切分析

Fig.1 BamHI digestion analysis of p6BC12

1. p6BC12/BamHI,
2. pIJ680/BamHI
3. p6BC12,
4. pIJ680
5. λDNA/HindIII

以pIJ680为探针,与12号转化子总体DNA和p6BC12进行分子杂交,结果见图2,12号转化子总体DNA及p6BC12与pIJ680均杂交。因此可以证明,12号转化子中存在有p6BC12重组质粒,可能由于拷贝数低而未能在电泳中观察到。

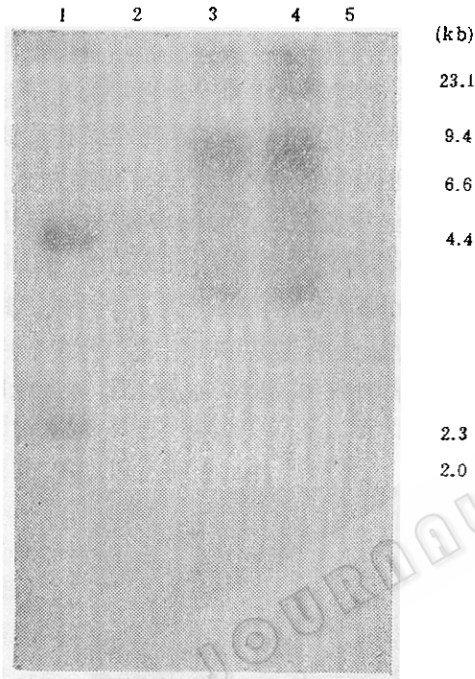


图2 以pIJ680为探针的分子杂交结果

Fig.2 Southern hybridization of p6BC12 DNA with pIJ680 as a probe

1. pIJ680 as a control; 2. Total DNA of *Y₃* mutant; 3. Total DNA of transformant No.12;
4. p6BC12; 5. Total DNA of *S.cattleya*

以p6BC12中4.5kb插入片段为探针,与产生菌*S.cattleya*总体DNA进行斑点杂交,证实4.5kb外源片段来源于*S.cattleya*。

2. 12号转化子发酵产物的分析:12号转化子进行的固体挖块和液体发酵液生物活性检定的结果表明,它的产物对3株检定菌都有生物活性,这与*Y₃*变株不同。12号转化子产物的发酵周期与硫霉素基本相同(数据从略)。12号转化子对thio的抗

性水平达到20 μ g/ml。

12号转化子产物经纯化后进行纸层析,用茚三酮溶液喷雾和生物显迹进行分析,结果表明,12号产物的Rf值与硫霉素是一致的,与*Y₃*变株的产物不同(图3,图4)。

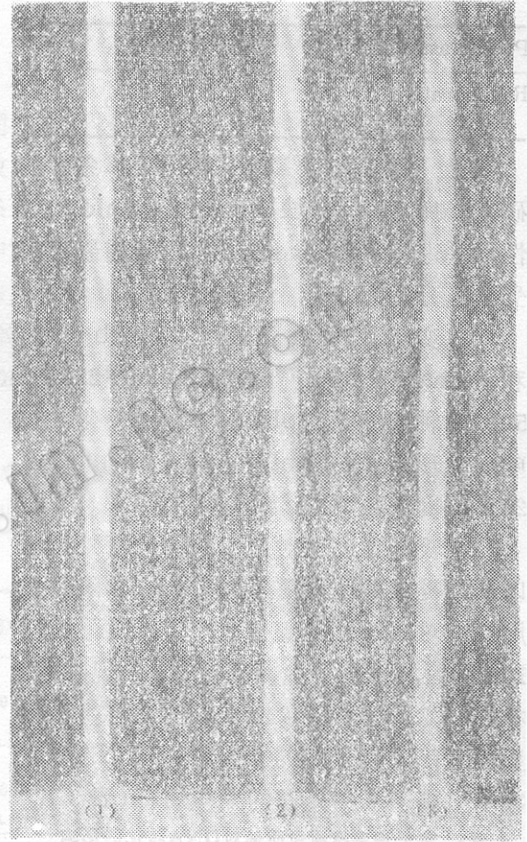


图3 12号转化子产物纸层析的生物显迹

Fig.3 Bioactivity identification of product of No. 12 transformant

- (1) Product of *Y₃* mutant
- (2) Product of transformant No.12
- (3) Thienamycin

高压液相分析表明,12号产物与硫霉素的保留时间是一致的(图5)。

因此,12号转化子的产物是硫霉素,它的产生是由于p6BC12上携带的外源基因弥补了*Y₃*变株的基因缺失,使*Y₃*变株恢复了产生硫霉素的能力,说明p6BC12上的外源基因与硫霉素的生物合成有关。

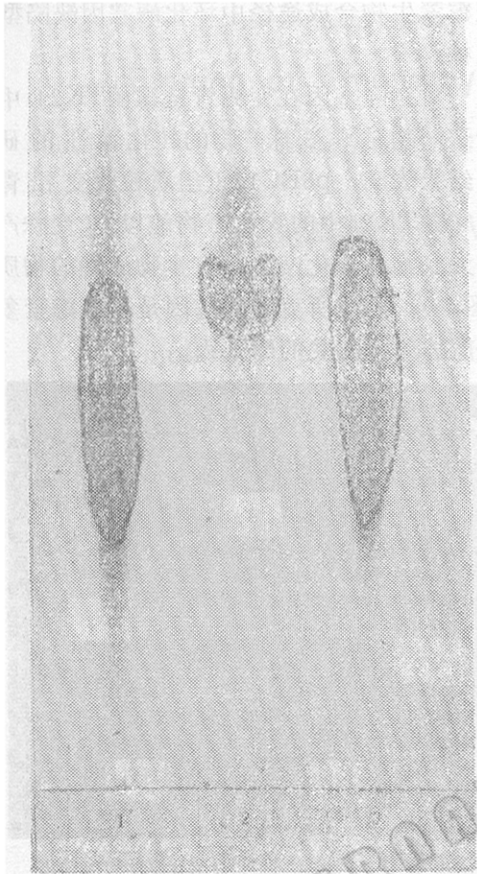


图4. 12号转化子产物纸层析的茚三酮喷雾显迹

Fig.4 Ninhydrin spray identification of product of No.12 transformant

- 1. Product of Y₃ Mutant
- 2. Product of No.12 transformant
- 3. Thienamycin

3. 克隆基因的分析：为确定所克隆基因的性质，须对 Y₃ 变株在硫霉素生物合成中的阻断部位进行研究。根据以往的研究^[10,11]，硫霉素生物合成途径中第一个具有生物活性的中间物碳青霉烯(carbopenem)是由多肽经环化后形成的，该反应由环化酶催化。而且 Y₃ 变株产物茚三酮反应呈阳性，因此对 Y₃ 变株中间产物的分析是以多肽或氨基酸为目的。

将 1 克 Y₃ 变株产物纯品在浓盐酸中水解后，以甲醇：丙酮：水 (2:2:1) 为流动



图5 12号转化子产物的HPLC分析
Fig.5 HPLC analysis of product of No.12 transformant

- (1) Product of Y₃ mutant
- (2) Thienamycin

相进行纸层析，茚三酮喷雾显迹，结果见图 6。Y₃ 变株产物水解后，产生 4 种 R_f 值不同的物质。因此，可以认为 Y₃ 变株中间产物可能是一个多肽。根据报道的有



图6 Y_3 变株中产物水解后的茚三酮喷雾显迹

Fig.6 Ninhydrin spray identification of intermediate product of Y_3 mutant hydrolysis by HCl

1. Gln, 2. Cys, 3. Glu, 4. Gly
5. Product of Y_3 mutant hydrolyzed by HCl
6. Y_3 product

关硫霉素生物合成途径研究, Y_3 可能是

硫霉素生物合成途径中环化酶基因缺陷型变株。

对克隆基因在变铅青链霉菌TK24中表达产物对 Y_3 变株产物的转化活性的研究表明, p6BC12重组质粒在变铅青链霉菌TK24中的表达产物能以 Y_3 变株产物为底物, 催化产生具有生物活性的物质(图7)。因此所克隆的基因是与硫霉素多肽前体环化有关的酶基因。

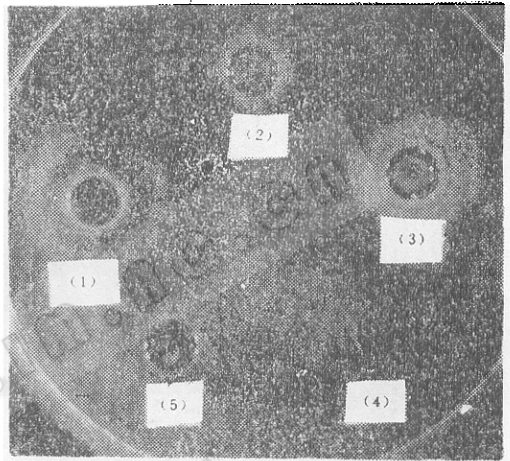


图7 p6BC12表达产物对 Y_3 变株中产物的转化

Fig.7 Bioconversion of Y_3 mutant product by p6BC12 expression product in *S. lividans* TK24
 (1) *S. lividans*TK24(containing p6BC12/ Y_3 ;
 (2) *S. lividans*TK24(containing pIJ680)/ Y_3 ;
 (3) Y_3 product as control; (4) *S. lividans* TK24(containing p6BC12)as control; (5) *S. lividans* TK24(containing pIJ680)as control

参 考 文 献

- [1] Kahan J. S. et al.:*J. Antibiot.*, 32:1-12, 1979.
- [2] James R. et al.:*Genetic & Molecular Biology of Industrial Micro-organisms*, pp.246-255, 1989.
- [3] Dor. Shiffman et al.:*Mol. Gen. Gene*, 214:562-569, 1988.
- [4] Fishman S. E. et al.:*Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8748-8752, 1987.
- [5] Jacqueline P. et al.:*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32:560-567, 1990.
- [6] Hopwood D. A. et al.:*Genetic Manipulation of Streptomyces, A laboratory Manual*, 1985.
- [7] Sambrook J. et al.:*Molecular cloning, A laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Ikuo Kojima et al.:*J. Antibiot.*, 41:899-907, 1988.
- [9] Christopher R. Bailey et al.:*J. Gene. Microbiol.*, 132:2945-2947, 1986.
- [10] Joanne M. W. et al.:*CRC Crit. Revi. Biotechnol.*, 4:111-131, 1986.
- [11] Joanne M. W. et al.:*J. Biolog. Chem.*, 4637-4647, 1985.

Cloning of Thienamycin Biosynthetase Genes from *Streptomyces cattleya* ATCC39203

Li Rongfeng Wang Yiguang Zeng Ying

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

A mutant Y_3 blocked in thienamycin biosynthetic pathway was obtained from thienamycin producing strain *S. cattleya* ATCC39203 by NTG treatment. Preliminary cloning system has been established on the basis of studies on the conditions for protoplast formation, regeneration, as well as DNA transformation for Y_3 mutant strain. The shot-gun cloning was carried out from *S. cattleya* using pIJ680 as a vector and the Y_3 mutant as a host. A transformant No.12 that can produce thienamycin like substance by paper chromatography and HPLC analysis was obtained. A recombinant plasmid p6BC12 has molecular size of 9.8kb and an insert of 4.5kb could be recovered from *S. lividans* TK24 by transforming the DNA from transformant No.12 into it. The intermediate accumulated by Y_3 mutant was identified as a tetrapeptide. We presume that a cyclase gene from *S. cattleya* was cloned according to the function of the gene product. Southern and DNA dot hybridization confirmed that the transformant No.12 harbors the recombinant plasmid p6BC12 and the insert in p6BC12 was come from *S. cattleya* genome.

Key words Thienamycin; biosynthetase genes; blocked mutant; host system of cloning; shot-gun cloning