

硫霉素环化酶基因在变铅青链霉菌 TK24 中的表达及基因定位

李戎锋 王以光

(中国医学科学院协和医科大学医药生物技术研究所 北京 100050)

摘要 将含有硫霉素环化酶基因的重组质粒 p6BC12 转化变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) TK24, 含有 p6BC12 的转化子细胞抽提液分别与硫霉素生物合成阻断变株 Y₁ 发酵液以及纯化的 Y₁ 中间产物经过体外共培养可产生活性物质, 化学分析表明与 Y₁ 发酵液混合后产生的是硫霉素, 与纯化的 Y₁ 中间产物混合产生的是一种不稳定的活性物质, 说明硫霉素环化酶基因在 *S. lividans* TK24 中得到了表达, 其产物以 Y₁ 中间产物为底物并弥补了 Y₁ 中的缺陷。对 p6BC12 中 4.5kb 外源片段进行了限制酶酶切分析, 建立了酶切图谱。利用含硫霉素环化酶基因的 *S. lividans* TK24 转化子体外转化 Y₁ 的应用体系, 将硫霉素环化酶基因定位在 0.9kb Hinc I-Pst I 片段上, 并证明了硫霉素环化酶的活性与 IPNS 同源片段无关。以上实验为进一步研究硫霉素环化酶基因的结构打下了基础。

关键词 环化酶基因, 基因表达, 基因定位, 硫霉素

硫霉素 (Thienamycin) 是临床上很有应用潜力的新型 β -内酰胺类抗生素, 对于硫霉素生物合成的分子生物学研究至今尚未有报道, 克隆硫霉素合成酶基因是今后通过基因工程手段获得稳定高产硫霉素衍生物的基础。我们从筛选硫霉素生物合成阻断变株入手, 通过对变株中间产物的分析以及研究变株原生质体形成、再生和 DNA 转化的条件, 建立了硫霉素合成酶基因克隆的受体系统, 利用此系统从硫霉素产生菌 *Streptomyces cattleya* 中克隆, 得到了外源片段上含有与硫霉素环化有关基因的重组质粒 p6BC12^[1,2]。本文就该基因在 *S. lividans* TK24 中的表达及基因定位进行研究。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

所用菌种与质粒见表 1。

表 1 菌种与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Sources
<i>S. cattleya</i>	cephamycin C, pen N thienamycin producer	This laboratory
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 11	thienamycin bioassay	

续表 1

Strains and plasmids		Characteristics	Sources
Strains	<i>S. lividans</i> TK24	Detection organism Sm ^r	This laboratory
	<i>E. coli</i> DH-5 α	Sup E44, Δ lac U169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsd R17, rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, rel A1	This laboratory
	Y ₃	thienamycin cyclase gene block mutant	This laboratory
Plasmids	p6BC12	Thio ^r , containing thienamycin cyclase gene	This laboratory
	pIJ680	Thio ^r	This laboratory
	pWHM3	Thio ^r , Amp ^r	[3]
	pUC18	Amp ^r	This laboratory

1.2 培养基和缓冲液

1.2.1 LB 培养基^[4]用于大肠杆菌 DH-5 α 的培养。

1.2.2 *S. cattleya* 种子培养及发酵分别使用 SGGP 培养基和硫霉素发酵培养基^[1]。

1.2.3 *S. lividans* TK24 培养使用 R2YE 培养基^[5]。

1.2.4 生物检定培养基(%)：用于生物活性检定，Peptone 0.6；Yeast extract 0.3；Glucose 0.1；Agar 1.5；pH7.2。

1.2.5 TDE 缓冲液：用于超声波破碎时悬浮及洗涤菌体，Tris-HCl (pH7 \wedge 2) 0.05mol/L；DTT 0.1mmol/L；EDTA 0.01mmol/L；PMSF1mmol/L。

1.3 材料

限制酶，T4DNA 连接酶，CIAP 为中国医学科学院友谊开发公司、华美生物工程公司及美国 Promega 公司产品。溶菌酶、RNase 和氨苄青霉素为美国 Sigma 公司产品。GeneClean I Kit 为美国 Bio 101 公司产品。硫链丝菌素 (Thiostrepton) 由美国 Squibb & Son 公司提供。丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺、TEMED 和过硫酸胺为美国 GIBCO-BRL 公司产品。PEG 1000 为英国 Koch-Light 公司产品。IPTG, X-gal 为德国 Boehringer-Mannheim 公司产品。

1.4 方法

1.4.1 大肠杆菌的培养，DNA 提取与 DNA 的转化按照 Sambrook J^[4]报道的方法。

1.4.2 链霉菌的培养、原生质体的形成、再生、DNA 提取与 DNA 转化基本按照 Hopwood D. A^[6]报道的方法进行。

1.4.3 DNA 的酶切与连接：按产品说明书进行。

1.4.4 DNA 片段的分离：根据美国 Bio 101 公司 GeneClean 试剂盒说明书所述进行。

1.4.5 蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳：按文献 [4] 所述进行。

1.4.6 *S. cattleya* 及 Y₃ 阻断变株的培养和发酵：均按文献 [1] 所述进行。

1.4.7 发酵产物的分离：按照文献 [2] 方法进行。

1.4.8 链霉菌菌丝的破碎: 使用日本 TOMY SEIKO 公司 UR-200P 型超声波粉碎仪。在 0℃ 条件下以 50Hz 频率, 20s×8, 将菌丝破碎。

2 结果与讨论

2.1 硫霉素环化酶基因在变铅青链霉菌 TK24 中的表达

Y₃ 是硫霉素环化酶基因缺陷的阻断变株, 以往的研究结果已证明重组质粒 p6BC12 含有与硫霉素环化有关基因并可在 Y₃ 变株中表达使其恢复产生硫霉素的能力^(1,2)。我们进一步对该基因能否在 *S. lividans* TK24 进行异源表达进行了研究。分别将含有重组质粒 p6BC12 和载体 pIJ680 的 *S. lividans* TK24 斜面挖块接种含 25mg/ml thio 和 SGGP 种子培养基, 28℃ 振荡培养 48h, 转种相同培养基, 再培养 48h, 4℃ 离心收集菌丝, 用 0℃ 预冷的 TDE 缓冲液将菌丝洗涤一次, 重新悬浮于 25ml TDE 中, 用超声波破碎仪将菌丝破碎, 4℃ 离心, 取抽提液备用。将 Y₃ 斜面挖块接种 SGGP 种子培养基, 28℃ 振荡培养至菌丝生长旺盛, 以 1/10 体积转种硫霉素发酵培养基, 28℃ 振荡培养 72h, 与 *S. lividans* TK24 菌丝抽提液等体积混合, 28℃ 振荡培养 24h, 在绿脓杆菌检定培养基上进行生物活性检定, 结果表明, 含有重组质粒 p6BC12 的 *S. lividans* TK24 菌丝抽提液与 Y₃ 发酵液混合培养后能产生生物活性物质, 而含 pIJ680 的 *S. lividans* TK24 则不能 (图版 I -A)。将转化产物以乙醇/水 (70:30) 为流动相进行纸层析, 生物显迹和茚三酮显迹以及用特异性使硫霉素失活的 NH₂OH 处理均证明该活性物质是硫霉素 (图版 I -B), 此结果说明硫霉素环化酶基因在 *S. lividans* TK24 中得到了表达, 表达的蛋白在体外“接通”了 Y₃ 变株中被阻断的合成途径, 因此得到了终产物硫霉素。但是通过聚丙烯酰胺凝胶电泳却未能观察到 *S. lividans* TK24 中表达蛋白的特异性条带, 这可能是由于蛋白表达量很低, 达不到凝胶分辨所需要的量, 或是由于蛋白的表达是瞬间进行的, 类似现象在以往的研究中也有过报道⁽⁷⁾。

以往对 Y₃ 变株的研究结果表明其阻断部位在硫霉素合成的环化步骤⁽²⁾, 根据对硫霉素合成途径的研究⁽⁸⁾, 环化后的产物应具有生物活性, 因此, 硫霉素环化酶基因的表达产物应该可以将 Y₃ 积累的二肽转化为有活性的产物。为了验证以上推断, 在 0.79ml 含 p6BC12 的 *S. lividans* TK24 菌丝抽提液中, 加入 0.16ml 纯化的 Y₃ 中间产物⁽²⁾、终浓度为 80mmol/L 的 FeSO₄ 溶液和终浓度为 0.5mmol/L 的 DTT, 25℃ 条件下缓慢摇动 60min, 在绿脓杆菌检定平板上, 以反应起始时的混合物为对照进行检定, 结果表明, 含 p6BC12 的 *S. lividans* TK24 菌丝抽提液能将 Y₃ 中间产物转化为一种生物活性物质 (图略)。但其化学性质极不稳定, 一直未能分离纯化, 以上结果进一步说明 p6BC12 上外源基因可以在 *S. lividans* TK24 中表达, 所克隆的是与硫霉素环化有关的基因。

2.2 重组质粒 p6BC12 限制酶酶切图谱的构建

p6BC12 是由链霉菌质粒载体 pIJ680 和含有与硫霉素环化有关基因的外源片段 (BamHI-BamHI 4.5kb) 所构成的重组质粒。对该重组质粒分别用 15 种限制酶进行酶切, 在 0.7%~1.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 得出每种限制酶在 p6BC12 上的切点数, 如表 2 所示, 4.5kb 外源片段上不存在 EcoRI, HindIII, ClaI 和 XbaI 的切点; StuI, SalI, XhoI 和 BclI 各有 1 个切点; KpnI, SmaI 和 BssHI 各有 2 个切点; BamHI 和 PstI

各有 3 个切点。根据需要将不同限制酶配对进行双酶切,电泳后按片段的迁移率计算出酶切片段的大小和相对位置,再参照 DNA 序列分析结果(另行发表),建立了重组质粒 p6BC12 的限制酶酶切图谱(图 1)。

表 2 p6BC12 酶切位点分析

Table 2 Restriction sites on plasmid p6BC12

Enzyme	Total sites	Sites on vector	Size of fragment/kb
EcoR I	0	0	---
Hind I	0	0	---
Cla I	1	1	9.8
EcoRV	1	1	9.8
Xba I	1	1	9.8
BssH I	2	0	9.3, 0.5
Stu I	1	0	9.8
Hinc I	4	0	0.3, 0.7, 1.0, 7.8
Bcl I	4	3	1.1, 1.4, 2.7, 4.6
Xho I	2	1	3.5, 6.4
Kpn I	4	2	0.2, 0.3, 4.0, 5.4
Sma I	6	4	0.23, 0.4, 1.1, 2.1, 2.4, 3.6
Pst I	5	2	0.6, 0.9, 1.3, 2.6, 4.5
Sal I	4	3	1.1, 2.2, 2.4, 4.1
BamH I	4	1	0.4, 0.6, 3.5, 5.3

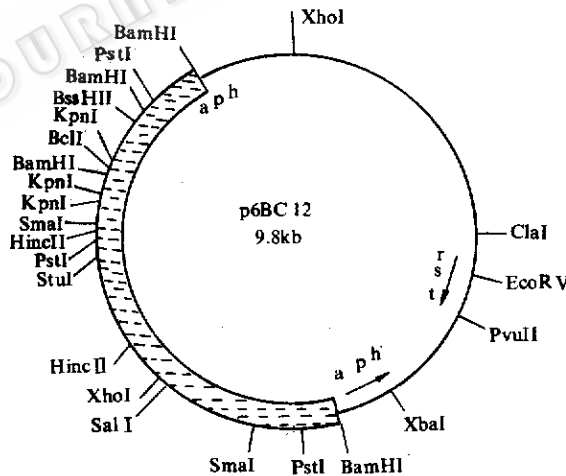


图 1 p6BC12 限制性酶切图谱

Fig. 1 Restriction map of plasmid p6BC12

2.3 p6BC12 中 4.5kb 外源片段的亚克隆及硫霉素环化酶基因的定位

p6BC12 中 4.5kb 片段上的硫霉素环化酶基因可以在 *S. lividans* TK24 中表达,利用含有重组质粒的 *S. lividans* TK24 菌丝抽提液体外转化 Y_3 发酵液产生硫霉素的方法,对

硫霉素环化酶基因进行定位。亚克隆的设计见图 2。p6BC12 用 Sal I 完全酶切后以 BamH I 进行部分酶切, 得到大小分别为 2.8kb 和 1.7kb 二个片段, 各与载体 pUC18 重组, 得到重组质粒 pUSB1 和 pUSB2。用 EcoR I /Hind III 将外源片段切下, 与大肠杆菌/链霉菌穿梭载体 pWHM3 重组, 转化 *S. lividans* TK24 原生质体, 得到含有重组质粒 pCEH1 和 pCEH2 的转化子, 分别用以上二个转化子的菌丝抽提液体外转化 *Y.* 发酵液, 产物以硫霉素为对照进行生物显迹分析。结果表明含 pCEH1 的转化子可将 *Y.* 发酵液转化产生硫霉素, 而后者不能, 说明环化酶基因在 2.8kb BamH I -Sal I 片段上。pCEH1 用 Pst I /EcoR I 双酶切得到大小分别为 1.6kb 和 1.2kb 的片段, 与 pWHM3 重组后转化 *S. lividans* TK24, 分别得到含重组质粒 pCPE、pCP1 和 pCP2 的转化子, 其中含 pCP1 和 pCP2 的转化子菌丝抽提液分别可转化 *Y.* 发酵液产生硫霉素, 由于 1.2kb 片段的插入方向相反因而基因表达的强度不同, pCP1 的表达较强。至此, 环化酶基因进一步被定位在 1.2kb Pst I -Pst I 片段上。将 1.2kb Pst I -Pst I 片段与 pUC18 重组, 得到重组质粒 pUP1, 用 Hinc I 将 1.2kb 片段切成 0.9kb 和 0.3kb 二段, 0.9kb 片段与 pUC18 重组, 得到重组质粒 pUPH1, 将 0.9kb 片段用 EcoR I /Hind III 切下, 与 pWHM3 重组, 转化 *S. lividans* TK24 原生质体, 筛到含重组质粒 pCPH1 的转化子, 其菌丝抽提液也能将 *Y.* 发酵液转化成硫霉素。根据以上结果我们最终将硫霉素环化酶基因定位在 0.9kb Pst I -Hinc I 片段上。不同亚克隆转化 *Y.* 的生物显迹结果见图版 I -C。

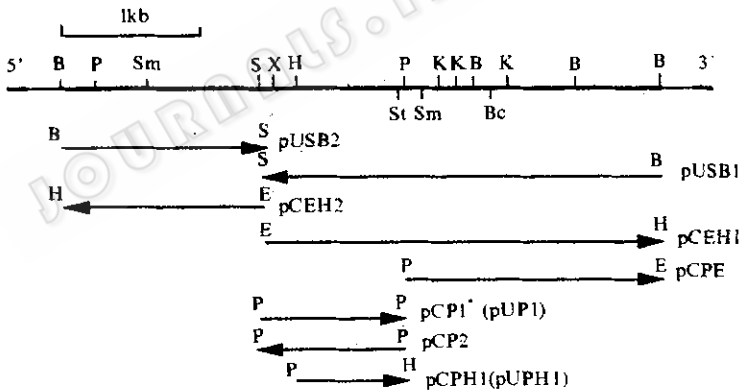


图 2 基因定位亚克隆策略图

Fig. 2 The subcloning strategy of cyclase gene localization

B. BamH I, P. Pst I, S. Sal I, K. Kpn I, X. Xho I, Sm. Sma I, St. Stu I, Bc. Bcl I, H. Hinc I

需要指出的是我们另外的研究表明重组质粒 pCPE 上存在一段大小为 1.0kb 的异青霉素 N 合成酶 (IPNS) 基因同源片段⁽⁹⁾, 以上基因定位试验的结果说明该片段与硫霉素环化酶的活性无关, 推测可能是参与青霉素和头霉素 C 合成的 IPNS 基因, 因此, *S. cattleya* 中青霉素环化酶和硫霉素环化酶是分别由各自的基因所编码的。硫霉素环化酶基因的定位为对其结构的研究打下了基础。

参 考 文 献

- [1] 李戎锋, 王以光, 曾 应. 生物工程学报, 1993, 9 (1): 1~7.
[2] 李戎锋, 王以光. 中国抗生素杂志, 待发表.
[3] Vara J, Lewandowska-skarbet M, Wang Y G *et al.* J. Bacteriol, 1989, 171 (11), 5872.
[4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, A. 1.
[5] 龚利民, 王以光. 生物工程学报, 1986, 2 (2): 24.
[6] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F, *et al.* Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, 1985.
[7] Petrich A K, Wu X N, Roy K L *et al.* Gene. 1992, 111: 77~84.
[8] Williamson J M, CRC Crit Revi Biotechnol. 1986, 4: 111-131.
[9] 王以光, 李戎锋. 微生物学报, 1996, 36 (2): 87~92.

Gene Localization and Expression of Thienamycin Cyclase Gene in *Streptomyces lividans* TK24

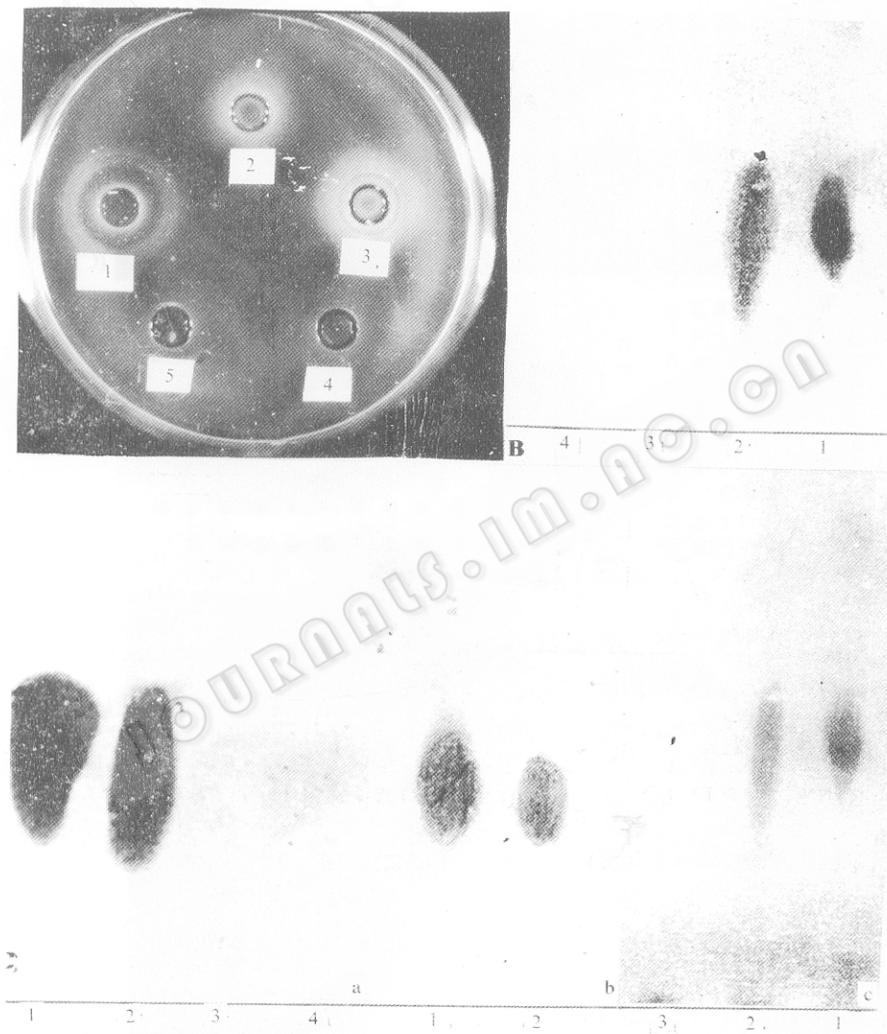
Li Rongfeng Wang Yiguang

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

Abstract The transformants of *S. lividans* TK24 were obtained by transforming of the recombinant plasmid p6BC12 harboring the thienamycin cyclase gene into it. An antibacterial substance could be detected by conversion of fermentation broth of Y_3 block mutant and purified Y_3 mutant intermediate with cell-free extract of *S. lividans* TK24 transformant, respectively. Paper chromatographic analysis showed that the cell-free extract could convert Y_3 fermentation broth to thienamycin and purified Y_3 intermediate product to an antibacterial substance in vitro. This indicated that the thienamycin cyclase gene could be expressed in *S. lividans* TK24 and the cyclase gene could complement the deficiency in Y_3 block mutant. Restriction analysis of p6BC12 was carried out and the restriction map was constructed. The thienamycin cyclase gene was localized on a Pst I - Hinc I 0.9kb fragment from bioconversion result. The 1.0kb IPNS homologous DNA fragment in plasmid p6BC12 of cyclase gene was excluded from the cyclase activity.

Key words Cyclase gene, gene expression, gene localization, thienamycin

Li Rongfeng *et al.*; Gene localization and expression of thienamycin
 cyclase gene in *Streptomyces lividans* TK24



Bioconversion of Y_3 broth by *S. lividans* TK24 containing p6BC12 or its subclones.

- A. 1. *S. lividans* TK24 (p6BC12) / Y_3 , 2. *S. lividans* TK24 (pIJ680) / Y_3 , 3. Y_3 product, 4. *S. lividans* TK24 (p6BC12), 5. *S. lividans* TK24 (pIJ680)
- B. 1. Thienamycin, 2. *S. lividans* TK24 (p6BC12) / Y_3 , 3. Y_3 product, 4. *S. lividans* TK24 (pIJ680) / Y_3
- C. a. 1. Thienamycin, 2. *S. lividans* TK24 (pCEH1) / Y_3 , 3. Y_3 product, 4. *S. lividans* TK24 (pCS5) / Y_3 ,
 b. 1. Thienamycin, 2. *S. lividans* TK24 (pCP1) / Y_3 ,
 c. 1. Thienamycin, 2. *S. lividans* TK24 (pCPH1) / Y_3 , 3. *S. lividans* TK24 (pCPE) / Y_3