

RAPD 技术在抗生素生物合成基因克隆表达中应用的研究

毛晓华 李元* 石莲英

(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 抗肿瘤抗生素 C-1027 具有极强抗肿瘤活性,其分子结构由一个酸性蛋白和脂溶性发色团构成,本文首次将 RAPD 技术(随机扩增的多态性 DNA 技术)运用于抗生素生物合成基因克隆表达研究。采用 7 种引物对 5 种 C-1027 无活性阻断变株总 DNA 进行扩增,其中引物 GA2 扩增 C-1027 原株及阻断变株后,琼脂糖凝胶电泳结果表明,F2DNA 片段存在于原株而在变株 AF67 中缺失,采用载体质粒 pIJ459 将该 DNA 片段 F2 克隆至变铅青链霉菌,获得含重组质粒 pIF2 的菌株 No155。No155 菌株和无活性阻断变株 AF67 共培养后,发酵产物恢复了抗菌活性及抗瘤作用。SDS-PAGE 及紫外光谱证实产物为 C-1027。这表明 F2DNA 片段含有编码 C-1027 生物合成的基因。

关键词 RAPD, C-1027, 生物合成基因克隆表达

抗肿瘤抗生素 C-1027 由我所从湖北潜江县土壤中分离的链霉菌 *Streptomyces globisporus* 所产生。分子量 15000Da, 由辅基蛋白和发色团两部分组成。辅基蛋白由 110 个氨基酸构成,发色团为九员环烯二炔结构,具有极强的抗瘤作用,对多种肿瘤细胞的半数杀伤浓度(IC₅₀) 在 $10^{-17} \sim 10^{-16}$ mol/L 之间,较阿霉素,丝裂霉素强 10 000 倍以上,具有重要的临床应用前景。本文采用 RAPD 技术应用于研究抗生素 C-1027 生物合成基因的克隆表达,将有助于对该抗生素生物合成途径的深入了解,从而为提高其发酵单位创造条件。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

S. globisporus, *E. coli* DH5 α *Sarcina lutea* 菌种为本所保存菌株。*S. lividans* TK54, 质粒 pIJ459 由英国 D. A. Hopwood 教授馈赠。

1.2 无活性变株

将斜面菌种接种于玉米浆-甘油培养基摇瓶 28℃ 振荡 24h 后,以 5% 接种量转种于含不同浓度吡啶黄的玉米浆-甘油培养基摇瓶,28℃ 继续振荡培养 4d,离心收集菌丝,用无菌水洗 2 次,以玻璃珠打碎菌丝,再稀释分离于玉米浆-甘油平板,28℃ 培养 5d 后,将单菌落分别点种于玉米浆-甘油琼脂块,28℃ 恒温恒湿培养 5d,用藤黄八叠球菌检定平板测定

本工作由国家自然科学基金资助。

* 负责本文修改。

本文于 1996 年 4 月 8 日收到。

生物活性,无活性菌株经摇瓶培养检测生物活性,不产 C-1027 菌株确定为无活性菌株。

1.3 DNA 的提取和制备

链霉菌总 DNA 及质粒 pIJ459 的提取按 Hopwood^[1]的方法进行。*E. coli* 质粒采用 Sambrook^[2]方法进行。

1.4 培养基

YEME(%):蛋白胨 0.5,酵母粉 0.3,麦芽提取物 0.3,葡萄糖 1.0,蔗糖 34.0, MgCl₂·6H₂O 0.1, pH7.0。R2(%):蔗糖 10.3,酵母粉 0.4,酪蛋白水解物 0.01,蛋白胨 0.4,葡萄糖 1.0, Tris 0.3, K₂SO₄ 0.025, CaCl₂ 2H₂O 0.735, MgCl₂ 6H₂O 1.012, KH₂PO₄ 0.0025,微量元素溶液 0.2ml, pH7.5。*S. globisporus* 发酵培养基(%):糊精 2.0,蛋白胨 0.2,甘油 1ml,玉米浆 0.5, pH7。

1.5 转化及引物设计

E. coli 转化按 Sambrook^[2]方法进行,链霉菌原生质体制备及转化依 Hopwood^[1]报道方法进行。随机设计单引物 7 种,每种含 10 个核苷酸,GC 含量 > 50%,引物见表 1。

表 1 用于 RAPD 的引物

Table 1 Arbitrary primers tested for RAPD

Primer	Sequence	GC content/%
GA1	5'AAGAGCCCGT3'	60
GA2	5'GCGATCCCCA3'	70
GA3	5'GTTTCGCCCC3'	70
GA4	5'AACGCGCAAC3'	60
GA5	5'TCGCCCCATT3'	60
GA6	5'AAGCGGCCTC3'	70
GA7	5'ACGCAGGCAC3'	70

1.6 RAPD-PCR

采用上述引物分别以 C-1027 原株及 5 种无活性阻断变株 DNA 为模板进行扩增,反应体积 50 μ l,反应条件如下:Tris·HCl 10mmol/L, KCl 50mmol/L, MgCl₂ 2.5mmol/L, 明胶 0.001%, dNTPs 各 0.2mmol/L,模板 DNA 50~150ng,引物 0.2 μ mol/L,混和各组份至总体积 49 μ l,95 $^{\circ}$ C 变性 10min 后,迅速冰浴 5min,离心,加入 Ampli TagDNA 聚合酶 1 μ l(1u),覆盖 Chill-out^{MT}溶液石蜡,按下列程序循环 35

次:95 $^{\circ}$ C 变性 1min,36 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,循环结束后 72 $^{\circ}$ C 保温 10min,扩增产物进行 1.4% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色后分析结果。

1.7 Southern 杂交

DNA 探针标记采用辣根过氧化物酶直接标记法,试剂盒是英国 Amersham 公司 HRP 标记试剂盒,按公司提供方法进行。杂交步骤按 Sambrook^[2]方法进行。

1.8 重组菌株与 C-1027 阻断变株互补共合成

自斜面接种重组菌株 No155 至 50ml YEME 培养基,同时接种 C-1027 无活性阻断变株 AF67 至 50ml C-1027 发酵培养基,28 $^{\circ}$ C 分别培养 48h,按 10% (重组菌株)和 5% (AF67)体积将两菌株培养液同时转种于 C-1027 发酵培养基,28 $^{\circ}$ C 混合培养 96h,离心,取上清液进行 C-1027 活性测定。

1.9 C-1027 生物活性检测

抗菌活性检测用杯碟法,以藤黄八叠球菌为指示菌。抗瘤活性采用精原细胞法。

1.10 C-1027 的制备

在 4 $^{\circ}$ C 条件下进行,取共合成发酵液,离心,取上清液, pH 调至 4.0,加 50% 硫酸铵进

行沉淀, pH 仍调至 4.0 过夜, 离心, 沉淀溶于水, 对 0.001mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.8) 透析, 离心, 上清液进行羟基磷灰石柱层析, 以 0.005~0.5mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.8) 梯度洗脱, 收集活性部分, 冷冻干燥, 溶于水中, 进行 SephadexG75 柱层析, 以水洗脱, 合并活性部分, 再进行 Sephadex G50 柱层析, 合并活性部分, 冷冻干燥, -20℃ 避光保存。

2 结 果

2.1 无活性阻断变株

按前述方法获得的无活性阻断变株共有 5 株, 这些菌株经斜面连续传代 8 代以上, 摇瓶检测不再恢复产抗生素的能力。

2.2 RAPD-PCR

按前述方法进行。采用 7 种引物, 分别以 C-1027 原株及 5 种无活性阻断变株 DNA 为模板进行扩增, 图版 I-A 表示引物 GA2 的扩增结果, 由图可见, 原株有一条约 0.9kb 特异扩增带 F2, 而变株 AF67 缺失这一条带, 我们推测这一 DNA 片段可能与 C-1027 生物合成有关, 以 F2DNA 为模板, 进行了 PCR 再扩增, 结果见图版 I-B。

2.3 转化

将 PCR 扩增后获得的 F2DNA 片段经 Klenow 大片段酶进行修补, 插入经 HindⅢ酶切后由 Klenow 大片段酶修平的质粒 pIJ459, 按前述方法对变铅青链霉菌 TK54 原生质体进行转化, 以硫链丝菌素筛选抗性转化子, 其中 No155 含有重组质粒 pIF2, 见图版 I-C。

2.4 互补共合成

按前述方法, 对发酵液进行了活性测定, 图 1 为对藤黄八叠球菌的抗菌实验结果。由图可见, No155 重组菌株与无活性阻断变株 AF67 共培养物有抗菌活性, 与此相比 No155

和 AF67 单独培养物均无抗菌活性, 表 2 表明了精原细胞法测定的结果。由表可见, No155 和 AF67 共培养物精原细胞法测定结果为阳性, 而 No155 重组菌株和 AF67 变株单独培养物为阴性。No66 实际为含质粒 pIJ459 的变铅青链霉菌对照, 其单独及与 AF67 共培养均无抗菌活性。综上所述, F2DNA 片段补偿了变株 AF67 的生物合成阻断途径, 使共培养物具有了抗菌和抗癌作用, 可以确认 F2DNA 片段与 C-1027 生物合成基因有关。

2.5 Southern 杂交

为了验证 pIF2 重组质粒中外源 DNA 片段 F2 的来源, 以质粒 pIF2 为探针, 与 C-1027 产生菌 *S. globisporus* 及阻断变株 AF67 分别经酶切的总 DNA 进行杂交, 结果见图版 I-D、E。由菌图可见在 C-1027 产生菌和变株 AF67 中, 均出现杂交带 (箭头所指), 这表明 pIF2 质粒的外源 DNA 片段 F2 来自 C-1027 产生菌 *S. globisporus*, pIF2 和原株及变

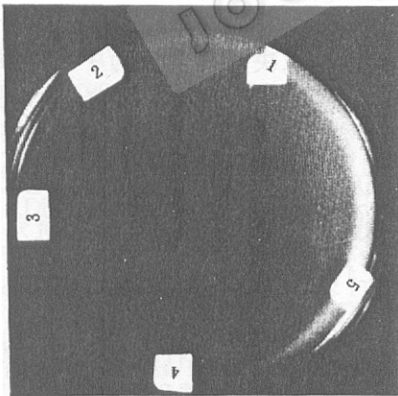


图 1 共合成发酵产物的抗菌活性实验结果
Fig.1 Bioassay results of cobiosynthesis fermentation product

(1) AF67, (2) No66, (3) No155, (4) No66/AF67, (5) No155/AF67

株 AF67 总 DNA 均出现杂交带,说明引物 GA2 扩增 AF67 基因组 DNA 不能产生 F2DNA 片段原因在于引物结合点的突变而非相应片段的缺失。

2.6 共合成培养物的提取

图版 I-F 表明,提取品经 SDS-PAGE 检测与 C-1027 标准品相同。紫外光谱分析结果表明(图 2),提取品在 340nm 有特征吸收峰,与 C-1027 吸收峰一致^[3]。因此可以确定,共培养提取物为 C-1027。

3 讨论

抗生素作为微生物的重要次生代谢产物在保证人类健康方面起到了极其重要的作用,有关抗生素生物合成基因的克隆表达研究正在不断发展,迄今为止,已有 20 多种生物合成基因获得了成功克隆和表达^[4],其主要采用的方法有(1)阻断变株互补^[5],(2)突变克隆^[6],(3)用人工合成的寡核苷酸作探针探测基因文库^[7],(4)通过抗性基因筛选抗生素生物合成基因^[8],(5)用已知的一种抗生素合成基因为探针探测待研抗生素的同源基因^[8]。

C-1027 是一种大分子的新型烯炔类抗生素,其抗瘤活性取决于九员环为中心的发色团,辅基蛋白起稳定保护和控制发色团释放的功能。Sakata^[9]已经报道了有关辅基蛋白编码基因的克隆和表达。我们曾以该基因为探针试图对发色团部分的生物合成基因进行研究,也曾想通过克隆抗性基因来获得有关生物合成基因,但是均未获得成功。RAPD 技术是 90 年代初由 Williams^[10]等报道的 PCR 新方法,目前已广泛用于植物的分类研究,在微生物分类中的应用也已日渐增多,但尚未见用于次生代谢产物基因克隆研究的报道。已经知道吡啶类染料是有效的移码突变诱变剂,据此我们采用吡啶黄诱变 C-1027 原株,获得了 5 株无活性阻断变株,我们试图采用 RAPD 技术,利用合成的 7 种引物分别以原株及阻断变株 DNA 为模板进行 PCR 扩增,发现在 GA2 引物作用下,原株和阻断变株 AF67 的 DNA 扩增图谱相似但有差异,F2DNA 片段存在于原株而在 AF67 中缺失,这显然是由于移码诱变所致。为了探索 F2DNA 片段是否与 C-1027 生物合成有关,我们将其分别克隆至 *S. lividans* TK54 及原株产生菌 *S. globisporus*,在前种菌获得了含有重组质粒 pIF2 的克隆菌株 No155,而在 *S. globisporus* 中未获得成功克隆,可能与限制修饰作用有关。No155 与阻断变株 AF67 共培养互补共合成的发酵产物恢复了生物活性,对藤黄八叠球菌有抗菌活性,精原细胞阳性结果表明有抗瘤活性,Southern 杂交实验表明,F2DNA 来源

表 2 共合成发酵产物精原细胞法活性测定结果

Table 2 Spermatogonial assay results of cobiosynthesis fermentation product

Strains	Activity
<i>S. lividans</i> TK54	-
No 155	-
AF 67	-
No 155/AF67	+

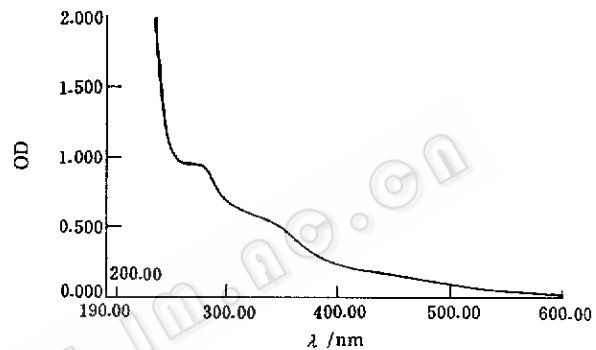


图 2 共合成发酵提取物的紫外光谱分析

Fig. 2 UV spectrum analysis of purified cobiosynthesis product

于 C-1027 产生菌 *S. globisporus*。SDS-PAGE, 紫外光谱分析证明表达产物为 C-1027。

综上所述 F2DNA 片段带有编码 C-1027 生物合成的基因。我们已对该片段进行了核苷酸序列分析, 结果表明其中含有一编码 122 个氨基酸的开放阅读框架(另文发表)。该序列与 Sakata^[9]报道的辅基蛋白基因完全不同, 因此可以确定, 该基因是参与发色团生物合成的基因, 其编码酶蛋白在生物合成中的作用尚有待进一步进行研究。

本文探索了一种新的以随机扩增的多态性 DNA 技术为基础, 研究抗生素生物合成基因的策略。它简单易行, 无需深入了解研究对象的分子生物学背景, 是现有基因克隆手段的有益补充。

参 考 文 献

- [1]Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* A Laboratory manual. The John Innes Foundation. 1985, 72~81.
- [2]Sambrook J, Fritsch E F, Molecular cloning. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory manual. 1989, 1:74.
- [3]Toshio Otani, Yoshinori Minami and Teruyoshi Marunaka, J. Antibiot, 1988, 41:1580~1585.
- [4]Chater K F. Bio/Tech, 1990, 8:115~121.
- [5]Malpartida F, Hopwood D A. Nature, 1984, 309:452~464.
- [6]Chater K F, Bruton C J, Gene, 1983, 26:67~68.
- [7]Fishman S E, Cox K, Larson J L *et al.* Proc Natl Acad, USA. 1987, 84:8248~8252.
- [8]Malpartida F, Hallam S E, Kieser H M, *et al.* Nature, 1987, 325:818~821.
- [9]Sakata N, Ikeno S, Hamada M *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1992, 56(10):1592~1595.
- [10]Williams J G K, Kubelik A R K, Livek K J *et al.* Nucleic Acids Reserch, 1990, 18(22), 6531~6535.

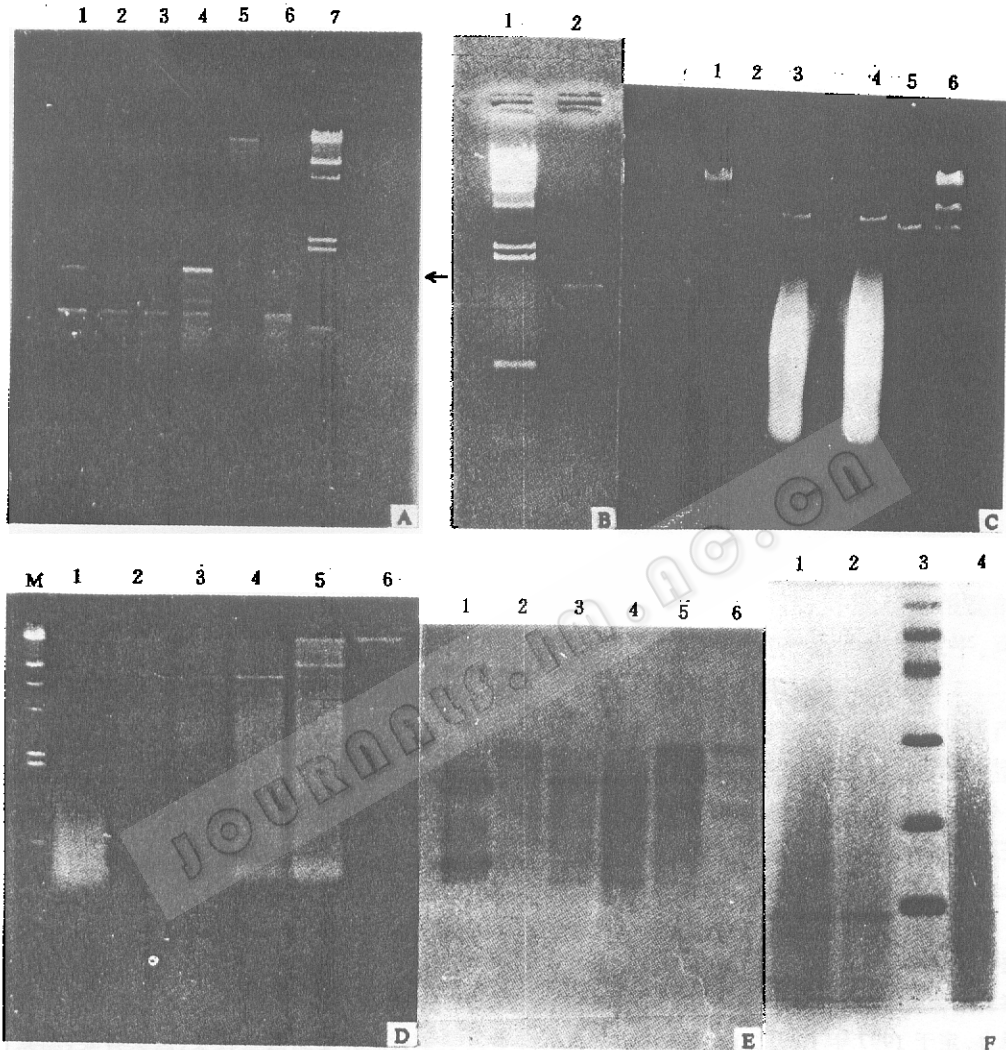
With Random Amplified Polymorphic DNA Technique to Study Antibiotic Biosynthesis Gene Cloning and Expression

Mao Xiaohua Li Yuan Shi Lianying

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

Abstract Antibiotic C-1027 has very high biological activity for tumors. It is composed of an enediyne chromophore and an apoprotein. In this paper, we first report that the RAPD technique has been used to study antibiotic biosynthesis gene cloning and expression. With 7 kinds of primers, the total DNA of t block mutants and original producer has been amplified respectively. After amplifying the DNA of AF67 block mutant and original producer with primer GA2, the results of agarose gel electrophoresis showed that there is F2 DNA fragment in original producer but not in AF67. With plasmid pIJ459 as vector to clone F2 DNA fragment into *Streptomyces lividans* TK54, the recombinant strain No155 harboring plasmid pIF2 has been selected. After cosynthesis of the recombinant strain No155 and the block mutant AF67, the fermentation product recover the biological activity of antibacterial and antitumor. The analysis results of SDS-PAGE and UV spectrum confirm that the product is C-1027. The F2 DNA fragment contains the coding gene involved in C-1027 biosynthesis pathway.

Key words RAPD, C-1027, biosynthesis gene cloning and expression



A. RAPD fingerprints generated by primer GA2 with different template DNAs

(1) AF71, (2) AF67, (3) AF44, (4) AF43, (5) AF42, (6) Wild-type strain, (7) λ /Hind III

B. Reamplification with PCR for RAPD band

(1) λ /Hind III (2) Product generated by primer GA2 using F2 as template

C. Restriction enzyme analysis of plasmid pIF2

(1) λ /Hind III, (2) pIJ459/EcoRI, (3) pIF2/EcoRI, (4) pIF2/SacI, (5) pIJ459/SacI, (6) λ /Hind III Southern hybridization

D. Agarose gel electrophoresis before Southern transfer

E. Hybridization patterns

(M) λ /Hind III, (1) pIJ459, (2) *S. globisporus* DNA digested by Bgl II,

(3) *S. globisporus* DNA digested by SacI, (4) AF67 DNA digested by ScaI,

(4) AF67 DNA digested by Bgl II, (6) *S. globisporus* DNA

F. SDS-PAGE analysis results of purified cobiosynthesis product

(1) and (2): Hydroxyapatite, Sephadex G-75 and Sephadex G-50 Chromotography preparation.

(3) Molecular weight marker,

(4) Standard sample of C-1027