

# 玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株的构建

沈凤英<sup>1,2</sup>, 吴伟刚<sup>2</sup>, 张艳杰<sup>1</sup>, 寇宏达<sup>3</sup>, 冀红柳<sup>1</sup>, 李亚宁<sup>1</sup>, 刘大群<sup>1</sup>

1 国家北方山区农业工程技术研究中心 河北省植物病虫害生物防治工程技术研究中心 河北农业大学植物保护学院, 河北 保定 071001

2 河北北方学院, 河北 张家口 075000

3 河北农业大学国际合作处, 河北 保定 071001

沈凤英, 吴伟刚, 张艳杰, 等. 玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株的构建. 生物工程学报, 2015, 31(12): 1741-1752.

Shen FY, Wu WG, Zhang YJ, et al. Construction of *nsdA<sub>mgh</sub>* gene disruption mutant in *Stremomyces roseoflavus* Men-myco-93-63. Chin J Biotech, 2015, 31(12): 1741-1752.

**摘要:** 为研究从玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中克隆到的, 与天蓝色链霉菌 M 145 中的一个重要负调控基因 *nsdA* 基因同源的 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因的功能, 本文构建了 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因破坏型重组质粒 pSRNA2500 (pKC1139::1.5 kb *nsdA<sub>mgh</sub>*::1.0 kb *Km<sup>r</sup>*), 转化 ET12567 (pUZ8002) 获得接合转移供体菌 ET12567 (pUZ8002, pSRNA2500), 通过接合转移将重组质粒导入玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中。在高温和抗生素双重筛选压力下, 筛选得到表型为 *Am<sup>s</sup>Km<sup>r</sup>* 的 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株, 通过 PCR、Dot blotting 和 Southern blotting 验证了突变株中的 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因已被正确阻断。与出发菌株相比, 突变株在摇瓶水平上对棉花黄萎病菌的抑制能力提高了一倍。

**关键词:** 玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63, pKC1139, *nsdA* 基因, 基因阻断, 同源重组

**Received:** January 25, 2015; **Accepted:** June 12, 2015

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31171894), Technology System of Traditional Chinese Medicine Industry in Hebei Province (No. 1004029).

**Corresponding authors:** Yaning Li. Tel/Fax: +86-312-7528500; E-mail: yaning22@163.com

Daqun Liu. E-mail: ldq@hebau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31171894), 河北省中药材产业技术体系 (No. 1004029) 资助。

## Construction of *nsdA<sub>mgh</sub>* gene disruption mutant in *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63

Fengying Shen<sup>1,2</sup>, Weigang Wu<sup>2</sup>, Yanjie Zhang<sup>1</sup>, Hongda Kou<sup>3</sup>, Hongliu Ji<sup>1</sup>, Yaning Li<sup>1</sup>, and Daqun Liu<sup>1</sup>

1 College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding 071001, Hebei, China

2 North University of Hebei, Zhangjiakou 075000, Hebei, China

3 International Cooperation Department, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei, China

**Abstract:** Insertional mutagenesis is a widely used method to determine the function(s) of a gene. To study the function(s) of the gene *nsdA<sub>mgh</sub>* in *Streptomyces roseoflavus*, a homologous recombination vector pSRNA2500 was structured in this paper. The recombination donor vector was then transformed into *Streptomyces roseoflavus* strain Men-myco-93-63 by conjugative transfer. The transformants were subjected to selection under the pressure of high temperature and appropriate antibiotics. As a result, several disrupted mutants of *nsdA<sub>mgh</sub>* gene, with a phenotype of *Am<sup>s</sup>Km<sup>r</sup>*, were isolated and verified using PCR and Dot-blotting and Southern blotting hybridization methods. Functional analysis showed that the disrupted mutants of *nsdA<sub>mgh</sub>* had a two-fold higher inhibition against *Verticillium dahlia* Kleb than that of the wild strain Men-myco-93-63, which all will provide a new study route for future research about positive and negative regulator in Men-myco-93-63.

**Keywords:** *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63, pKC1139, *nsdA* gene, gene disruption, homologous recombination

*nsdA* (Negative regulator of *Streptomyces* differentiation) 是普遍存在于大多数链霉菌中的全局性负调控基因<sup>[1]</sup>, 对链霉菌抗生素的合成和产孢形态分化具有负调控作用。该基因最先在天蓝色链霉菌中发现, *nsdA* 基因被阻断后, 天蓝色链霉菌的放线紫红素 (Act) 等 4 种抗生素的产量明显提高, 孢子产量也明显提高, 突变株产孢量是天蓝色链霉菌 M 145 的 20 倍<sup>[2]</sup>。在变铅青链霉菌 ZX64 中, *nsdA* 基因的阻断可激活沉默的放线紫红素生物合成基因簇的表达<sup>[3]</sup>。阿维链霉菌 NRRL8165 中阻断该基因后, HPLC 分析表明突变株阿维菌素的效价提高了约 3–5 倍<sup>[4]</sup>。肉桂地链霉菌 *nsdA* 中断菌株 BIB309 与出发菌株相比, 莫能菌素产量提高了 2.7 倍<sup>[5]</sup>。

玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 是分离自马铃薯疮痂病自然衰退土壤中的一株拮抗菌。该菌株及其发酵液对棉花黄萎病菌、瓜类白粉病菌等多种重要的植物病原菌具有很强的抑制作用, 有良好的生防应用潜力<sup>[6]</sup>。本实验室已克隆得到玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中的与天蓝色链霉菌 M 145 *nsdA* 同源的基因——*nsdA<sub>mgh</sub>*<sup>[7]</sup>。为进一步明确该基因在玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 抗生素合成代谢途径中起到的作用, 本文利用基因破坏策略, 以 pKC 1139 为载体构建重组质粒, 阻断 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因, 对比 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株与玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 野生型菌株的抑菌活性, 从而探明 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因对玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 抗生素生物合成的调控作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

玫瑰黄链霉菌 *Streptomyces roseoflavus* Men-myc-93-63, 质粒 pMDNA1500、pUC119::*Km<sup>r</sup>*、pKC1139、pSRNA1500 由河北农业大学生物防治实验室保存。天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* M 145 由中国科学院微生物所谭华荣教授惠赠。

### 1.2 载体、限制性内切酶和试剂

DNA Blunting Kit I 试剂盒、DNA 回收试剂盒、酶类均购自 TaKaRa 公司; DNA 分子量标准物购自北京泽星公司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche 公司。NC 膜购自上海生物工程有限公司。其他常规试剂参见文献[8]和[9]。

### 1.3 培养基和抗生素

大肠杆菌培养基为 LA 和 LB, 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 与大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002, pSRNA2500) 的接合转移选用 MS 培养基, 发酵培养基采用 PDA 液体培养基不加琼脂粉。棉花黄萎病菌培养基采用 Czapek 培养基, 链霉菌液体培养基为 YEME。LB 中氨苄青霉素 (Ampicillin, *Amp*) 使用量为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 安普霉素 (Apramycin, *Am*) 为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 氯霉素 (Chloramphenicol, *Cm*) 为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 卡那霉素 (Kanamycin, *Km*), 储存浓度 25  $\text{mg}/\text{mL}$ , 在链霉菌中的使用浓度是 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在大肠杆菌中是 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 接合转移培养基中安普霉素使用量为每平板 1 000  $\mu\text{g}$ 。

### 1.4 基因阻断载体 pSRNA2500 的构建方法

用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切 pMDNA1500 质

粒, 产生 1.5 kb 的 *Hind* III-*Xba* I DNA 片段, 其中包含了完整的 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因, 回收该片段并克隆到 pKC1139 的 *Hind* III 和 *Xba* I 位点上构建成 pSRNA1500 质粒。在 pSRNA1500 质粒上 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因中找到单一的 *Sca* I 酶切位点, 用 *Sca* I 酶切 pSRNA1500, 回收该 8.0 kb 大小的片段; 同时用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切重组质粒 pUC119::*Km<sup>r</sup>*, 回收约 1.0 kb 的卡那霉素抗性基因片段; 用 DNA Blunting Kit I 试剂盒使卡那霉素抗性基因片段末端平滑化, 然后连接以上两个 DNA 片段, 将连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 从转化子中提取质粒, 进行酶切验证, 获得用于基因阻断的质粒 pSRNA2500。

### 1.5 基因中阻断菌株的获得

用热激的方法将 pSRNA2500 转入 *E. coli* ET12567 (pUZ8002) 以获得接合转移供体 *E. coli* ET12567 (pUZ8002/ pSRNA2500), 在含有安普霉素和卡那霉素的 LB 平板上筛选转化子, 对转化子进行质粒提取、酶切验证。然后再通过接合转移的方法转化玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 的孢子, 在含有安普霉素和卡那霉素的 MS 平板上筛选转化子, 对转化子进行质粒提取、酶切验证。

将转化子转接至含有卡那霉素和/或安普霉素的 PDA 培养基上, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 d, 制备孢子悬液。经适当稀释后, 以每个平皿  $10^4$  个孢子的浓度涂布在含有卡那霉素的基本培养基平板上, 于 42  $^{\circ}\text{C}$  高温培养。将生长出来的菌落同时影印到 PDA/*Km* 和 PDA/*Am* 平板上, 筛选发生双交换 (*Km<sup>r</sup>Am<sup>s</sup>*) 的 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株。随机选择 3 株 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株接种于无任何选择压力的基本培养基上, 28  $^{\circ}\text{C}$  下培养,

传 3 代后重新转接至分别含有卡那霉素和安普霉素的基本培养基上, 验证其稳定性。

### 1.6 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断株的 PCR 验证

将 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株接种至含有卡那霉素的 YEME 培养基中, 28 °C、250 r/min 培养 48 h 后提取基因组 DNA。用引物 *nsdAWZ-R*、*nsdAWZ-L* 进行扩增验证。

#### 1.6.1 PCR 反应中所用引物

PCR 反应中所用引物<sup>[10]</sup>由上海生工生物工程有限公司合成 (表 1)。

#### 1.6.2 PCR 反应条件

95 °C 预变性 8 min, 94 °C 变性 1 min, 复性 55 s, 72 °C 延伸 10 min, 30 个循环。PCR 反应中所用的酶均为 LA *Taq* DNA 聚合酶, 缓冲液为 2 × GC I。

### 1.7 基因阻断株的杂交验证

#### 1.7.1 探针制备

参照 Roche 公司试剂盒所示方法, 将酶切片段用 Digoxigenin-dUTP 标记。

用含有卡那霉素 (*Km*) 基因片段的质粒 pUC119:*Km<sup>r</sup>* 合成探针, 质粒 pUC119:*Km<sup>r</sup>* 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切和琼脂糖电泳后, 回收约 1.0 kb 卡那霉素抗性基因片段, 经 1% 琼脂糖电泳分析初步确定回收产物的含量。然后按探针标记试剂盒标明的方法标记探针, 标记好

的探针经梯度稀释后, 取 1 μL 稀释溶液准备在杂交膜上点样使用, 标记探针于 -20 °C 保存。

用含有 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因片段的质粒 pMDNA 1500 合成探针, 用 *Hind* III-*Xba* I 双酶切产生 1.5 kb 的 DNA 片段, 其中包含了完整的 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因, 回收该片段, 经 1% 琼脂糖电泳分析初步确定回收产物的含量。然后按探针标记试剂盒标明的方法标记探针, 标记好的探针经梯度稀释后取 1 μL 稀释溶液准备在杂交膜上使用, 标记探针于 -20 °C 保存。

#### 1.7.2 Dot blotting 杂交

杂交点样、预杂交、Dot blotting 杂交及显色方法参考文献[11]。将 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株和玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 野生型菌株分别接种至含有卡那霉素的 TSB 培养基中, 28 °C、250 r/min 培养 48 h 后提取染色体 DNA 点 NC 膜。试验中用玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 染色体 DNA 作为阴性对照。pUC119:*Km<sup>r</sup>* 质粒上含 1.0 kb 的 *Km<sup>r</sup>* 抗性基因 DNA 片段, 因此选用 pUC119:*Km<sup>r</sup>* 质粒为阳性对照, 以 pUC119:*Km<sup>r</sup>* 质粒上 1.0 kb 的 *Km<sup>r</sup>* 抗性基因 DNA 片段为探针, 进行 Dot blotting 杂交验证。

#### 1.7.3 Southern blotting

Southern 转移、预杂交、杂交及显色方法参考文献[12]和[13]。将 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株和玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 野生型菌株分别接种至含有卡那霉素的 TSB 培养基中, 28 °C、250 r/min 培养 48 h 后提取染色体 DNA, *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株和玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 野生型菌株的染色体 DNA, 电泳, EB 染色, 照相, 转移 DNA, 紫

表 1 PCR 反应中 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因扩增所用引物

Table 1 *nsdA<sub>mgh</sub>* gene amplification primer in PCR reaction

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>nsdAWZ-R</i>	GTGAGTGGCAACGGCGGAAGC
<i>nsdAWZ-L</i>	TCAGACCGCTTCGGCGGTCTCC

外照射使 DNA 与膜交联; 试验中用玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 野生型菌株中 1.5 kb 的 DNA 片段作为阳性对照, 以 pSRNA1500 质粒上 1.5 kb 的 *Hind* III-*Xba* I DNA 片段为探针, 进行 Southern blotting 验证。

### 1.8 基因阻断株的稳定性

挑取 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因突变株单菌落接种到不含卡那霉素的 PDA 培养基上生长, 连续传代 3 次, 再挑取 100 个单菌落分别转接到含有卡那霉素的 PDA 培养基上, 观察是否有抗性消失的菌落。

### 1.9 抑菌试验

以棉花黄萎病菌 *Verticillium dahlia* V<sub>41</sub> 为检测菌株, 测定菌株代谢产物的生物活性。将玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 和 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株分别接种在发酵培养基中, 28 °C 培养 5 d 后, 将发酵液离心, 菌丝沉淀以丙酮萃取过夜, 40 °C 减压蒸馏, 最后用 5 mL 甲醇溶解。以纸碟法进行抑菌试验, 取棉花黄萎病菌孢子悬浮液 0.1 mL 涂布于 Czapek 培养基上, 把抗生素粗品定量滴加到滤纸片上, 将滤纸片置于涂布有指示菌的平板上, 培养 3 d 后观察结果, 检测抑菌圈大小。

## 2 结果

### 2.1 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因的 PCR 扩增

用引物 *nsdAWZ-R* 和 *nsdAWZ-L*, 以玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 在紫外透射仪观察电泳结果, 与标准 DNA 分子量相比, 在约 1.5 kb 处各可见一特异性条带, 与模式菌株天蓝色链霉菌

M 145、变铅青链霉菌 TK54 中预期片段大小一致, 而基因阻断载体 pKC1139 质粒中不含有此片段 (图 1)。

### 2.2 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断载体构建

在 pSRNA1500 质粒上 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因中找到单一的 *Sca* I 酶切位点, 将该基因切成了 730 bp 和 773 bp 两段作为交换臂, 交换臂中间插入约 1.0 kb 的卡那霉素抗性基因片段作为筛选 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株的抗性标记, 用温度敏感型质粒 pKC1139 为载体构建得到正确的重组质粒, 将其命名为 pSRNA2500, 即为用于 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因双交换的重组质粒, 构建过程见图 2。

### 2.3 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因的同源重组

将 pSRNA2500 质粒转入 *E. coli* ET12567

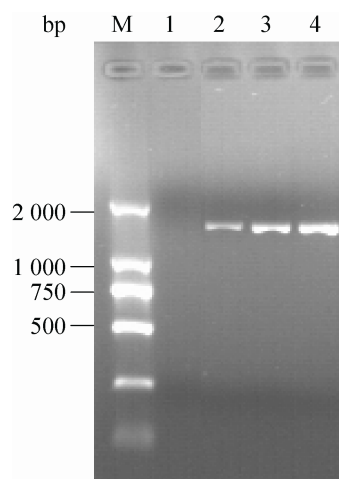


图 1 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因的扩增

Fig. 1 PCR amplification of the gene related to *nsdA<sub>mgh</sub>*. M: DL2 000 marker; 1: PCR product using pKC1139 plasmid DNA as template; 2: PCR product from Men-myc-93-63 genomic DNA; 3: PCR product from M145 genomic DNA; 4: PCR product from TK54 genomic DNA as template.

(pUZ8002) 获得接合转移供体 *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSRNA2500), 经对转化子进行质粒提取、酶切验证, 证实 pSRNA2500 已转入 *E. coli* ET12567 (pUZ8002) 中, 共得到约 150 个转化

子。接着转化玫瑰黄链霉菌 *Men-myco-93-63* 的孢子, 在含有安普霉素和卡那霉素的 MS 平板上共得到约 20 个转化子, 对转化子进行了质粒提取和酶切验证, 证实 pSRNA2500 已转入到

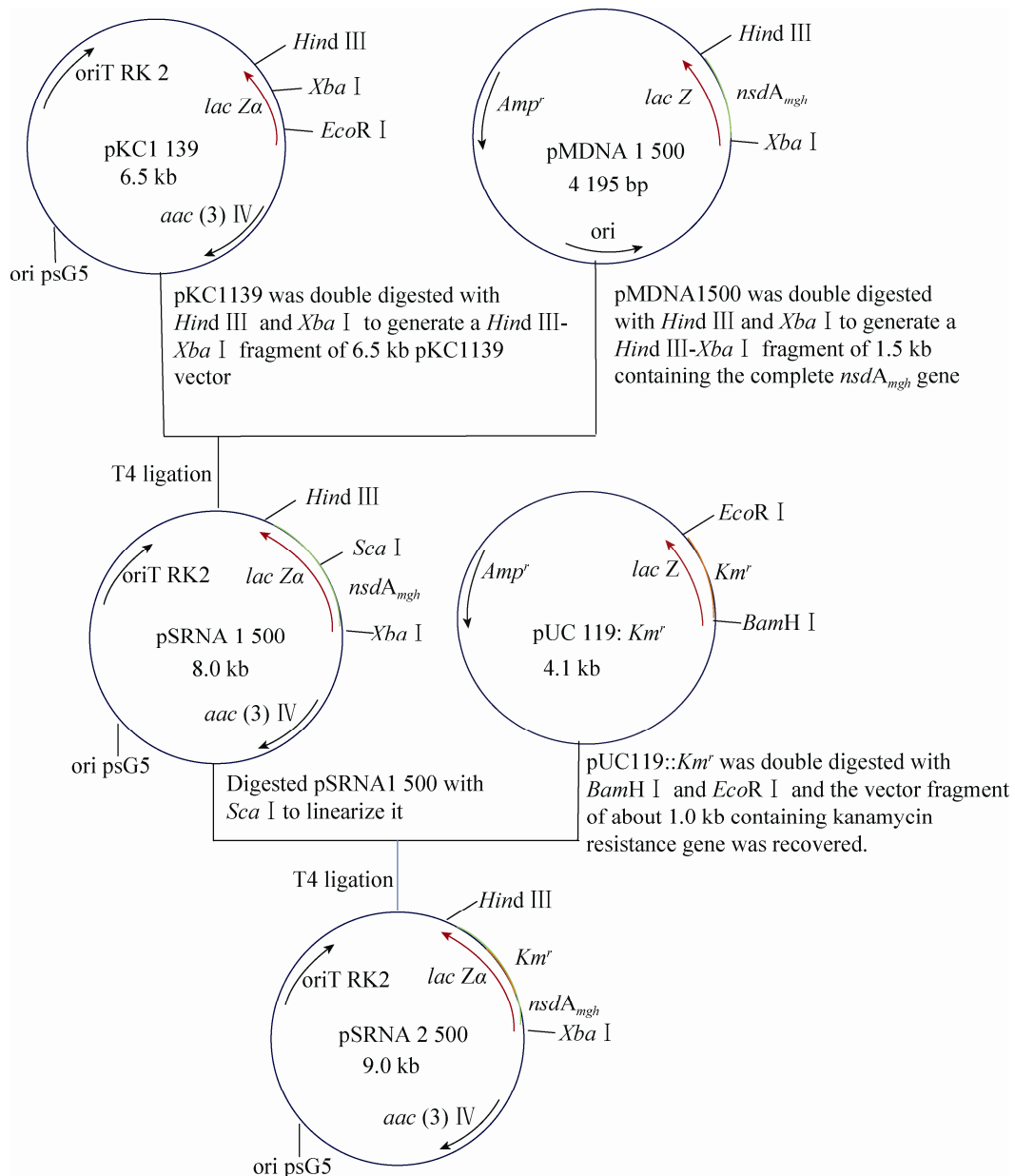


图 2 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断双交换载体的构建流程图

Fig. 2 Flowchart of construction of *nsdA<sub>mgh</sub>* gene double cross disruption vector.

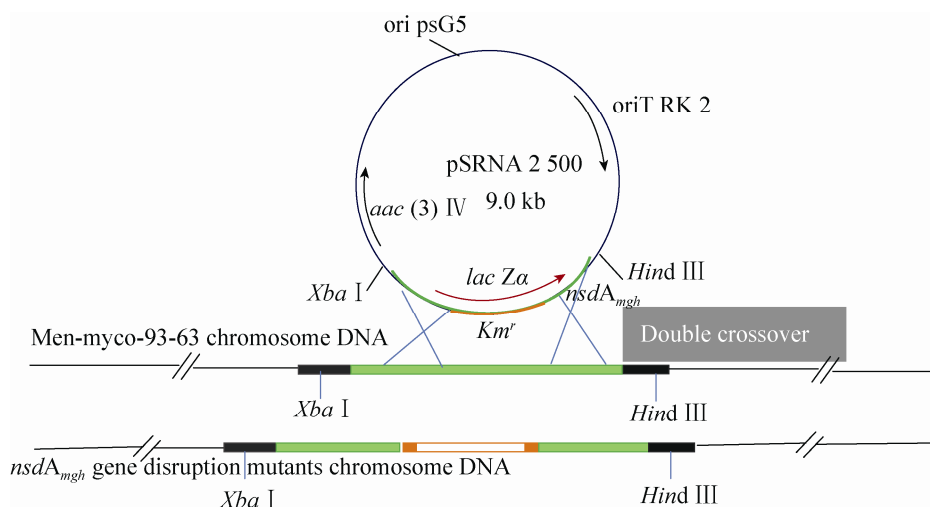


图 3 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因双交换及酶切位点示意图

Fig. 3 Construction of *nsdA<sub>mgh</sub>* gene disruption via double crossover and the sketch map of the restriction sites.

玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 中。

将玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 转化子于 42 °C 高温培养。质粒 pKC1139 具有温度敏感型复制子，高于 34 °C 条件下不能正常复制。因此 pSRNA2500 在 42 °C 时不能自主复制，只有 pSRNA2500 上 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因侧翼序列与玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 染色体发生了同源重组单交换或双交换的菌株才能在含有卡那霉素的 PDA 基本培养基上生长。若发生了双交换，则 *Km<sup>r</sup>* 正确地插入到 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因内部，此时菌落表现为 *Km<sup>r</sup>Am<sup>s</sup>*。将生长出来的菌落同时影印到 PDA/*Km* 和 PDA/*Am* 平板上，约 90% 的菌落为 *Km<sup>r</sup>Am<sup>s</sup>*，说明转化子是发生了双交换的 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株 (图 3)。将 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株接种于无任何选择压力的基本培养基上，传 3 代后重新转接至分别含有卡那霉素和安普霉素的基本培养基上，结果仍然是 *Km<sup>r</sup>Am<sup>s</sup>*，说明通过双交换得到的这些 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株在遗传上是稳定的。

#### 2.4 *nsdA<sub>mgh</sub>* 阻断突变株的 PCR 验证

将 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株接种至含有卡那霉素的 YEME 培养基中，因为 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因中插入 1.0 kb 的 *Km<sup>r</sup>* 抗性基因，扩增预期片段为 2 503 bp，而玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 野生型菌株中仍为 1 503 bp。扩增结果与预期一致 (图 4)。

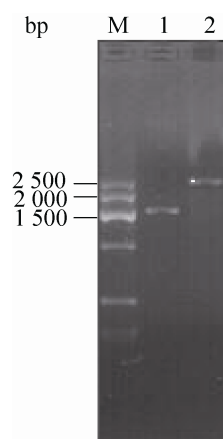


图 4 *nsdA<sub>mgh</sub>* 阻断突变株的 PCR 验证结果

Fig. 4 Verification of the *nsdA<sub>mgh</sub>* disruption by PCR. M: DNA marker VII (300–2 500 bp); 1: PCR products of wild type strain; 2: PCR products of disrupted mutants.

## 2.5 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株的 Dot blotting 验证

### 2.5.1 探针的制备

在 pUC119::*Km<sup>r</sup>* 质粒中含有 1.0 kb 的 *Hind* III 和 *Eco*R I 之间的 DNA 片段, 该 DNA 片段是卡那抗性基因片段。利用 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切 pUC119::*Km<sup>r</sup>*, 用 DEAE 回收 1.0 kb 的 *Km<sup>r</sup>* 抗性基因片段 (图 5), 用非放射性地高辛将其标记为基因克隆用探针。



图 5 用作探针的 DNA 片段的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 5 A garose gel electrophoresis of probe DNA. M: marker DL2 000; 1: 1.0 kb DNA fragment from pUC119::*km<sup>r</sup>*.

### 2.5.2 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株的 Dot blotting 验证

将 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株 1-1、1-2、1-3 分别接种至含有卡那霉素的 TSB 培养基中, 提取染色体 DNA 点 NC 膜 (图 6 行 2)。玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 染色体 DNA 为阴性对照 (图 6 行 1), pUC119::*Km<sup>r</sup>* 质粒为阳性对照 (图 6 行 3), 以 pUC119::*Km<sup>r</sup>* 质粒上 1.0 kb 的 *Km<sup>r</sup>* 抗性基因 DNA 片段为探针, 进行 Dot blotting 杂

交验证。因为 pUC119::*Km<sup>r</sup>* 质粒上含有作为探针的 1.0 kb 的卡那抗性基因 DNA 片段, 所以应显示出阳性杂交信号; 而玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 染色体 DNA 不含有 1.0 kb 的卡那霉素抗性基因 DNA 片段, 故应无杂交信号。玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株若存在 1.0 kb 的 *Km<sup>r</sup>* 抗性基因, 则应显示出斑点杂交信号。结果表明, 杂交信号与上述预期值一致, 说明卡那霉素抗性基因已插入到玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 的 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因中, 这 3 株 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株都是经过正确同源交换而得到的 (图 6)。

### 2.5.3 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株的 Southern blotting 验证

通过 Dot blotting 验证卡那霉素抗性基因正确插入到了 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因内部, 为了进一步在分子水平上验证 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株 1-1、1-2、1-3 的正确性, 通过 Southern blotting 杂交对 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株进行验证。

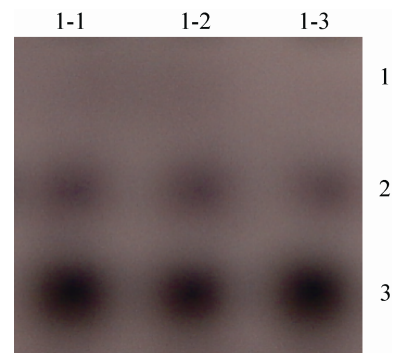


图 6 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株中卡那霉素的 Dot blotting 验证

Fig. 6 Dot blotting of *km<sup>r</sup>* from chromosome DNA of *nsdA<sub>mgh</sub>* disruption mutants. 1: plasmid of pUC119::*km<sup>r</sup>*; 2: chromosome DNA from *nsdA<sub>mgh</sub>* disruption mutants; 3: chromosome DNA from Men-myco-93-63.



将 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株 1-1、1-2、1-3 和玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 野生型菌株分别接种至含有卡那霉素的 TSB 培养基中, 28 °C、250 r/min 培养 48 h 后提取染色体 DNA, 用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株和玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 野生型菌株的染色体 DNA, 以 1.5 kb 的 *Hind* III-*Xba* I DNA 片段为探针, 进行 Southern blotting 验证。从理论上推测, 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 野生型染色体 DNA 经 *Hind* III-*Xba* I 双酶切后, 1.5 kb 的 DNA 片段应给出阳性杂交信号, 而 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株染色体 DNA 经相同酶切后, 由于在 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因中插入了 1.0 kb 大小的 *Km<sup>r</sup>* 基因, 故杂交信号应在 2.5 kb 处。杂交结果显示, *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株 1-1、1-2、1-3 杂交信号均与预期值一致, 这 3 株 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株都是经过正确同源重组得到的 (图 7)。

## 2.6 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株的稳定性检测

为了检测 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株的稳定

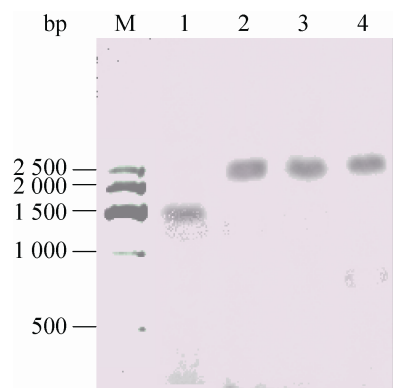


图 7 *nsdA<sub>mgh</sub>* 阻断突变株的 Southern blotting 验证  
Fig. 7 Southern blotting of chromosome DNA from *nsdA<sub>mgh</sub>* disruption mutants. M: DNA marker VII (300–2 500 bp); 1: hybridization signal of wild type strain; 2–4: hybridization signal of *nsdA<sub>mgh</sub>* gene disrupted strains 1-1, 1-2 and 1-3.

性, 挑取 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株单菌落接种到不含卡那霉素的 PDA 培养基上, 待产孢后, 转接到不含卡那霉素的 PDA 培养基上, 连续传代 3 次, 再挑取单菌落转接到含有卡那霉素的 PDA 培养基上, 未发现抗性消失的菌落。表明 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株可以稳定遗传。

## 2.7 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株代谢产物的生物活性检测

以棉花黄萎病菌 *Verticillium dahlia* V<sub>41</sub> 为指示菌, 测定玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 野生菌株与 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株代谢产物的生物活性。玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 野生菌株对棉花黄萎病菌的抑菌圈直径约为 1.6 cm, 而 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株对棉花黄萎病菌的抑菌圈直径约为 3.5 cm。结果表明, 在同样条件下, *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株和玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 野生型菌株均能抑制棉花黄萎病菌的生长, *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因阻断突变株的抑菌活性高于野生株 (图 8)。

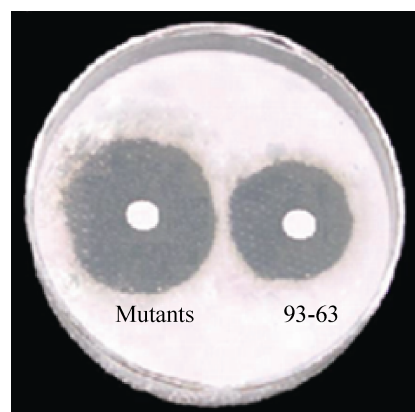


图 8 *nsdA<sub>mgh</sub>* 阻断突变株和玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 野生型菌株对棉花黄萎病菌的抑制作用对比

Fig. 8 Antibiotics assay of *nsdA<sub>mgh</sub>* disruption mutants, genetically complement *nsdA<sub>mgh</sub>* disruption mutants and wild-type strain Men-myc-93-63 against *Verticillium*.

### 3 讨论

基因置换载体的构建是实现基因阻断的关键步骤之一。经典方法是在目的基因序列中选择合适的酶切位点,然后将标记基因插入其中,以构建该基因的阻断载体。对于链霉菌而言,这种依赖于酶切、酶连反应的构建方法受诸多因素制约。首先,插入抗性标记可能会引起极性效应(Polar effect),使位于被阻断基因下游的共转录基因的表达受到影响。其次,链霉菌的高G+C含量使选择合适的酶切位点变得困难,而且,如果选择的酶切位点靠近基因的3'端,还可能造成基因阻断的不彻底。另外,链霉菌的同源重组频率与交换片段的长度有关,一般同源臂的长度应不短于500 bp,且两同源臂的长度应大致相等,否则会对双交换菌株的筛选造成困难<sup>[14-17]</sup>。本实验在pSRNA1500质粒上 $nsdA_{mgh}$ 基因中找到单一的Sca I酶切位点,将该基因切成了730 bp和773 bp两段作为交换臂,交换臂中间插入约1.0 kb的卡那霉素抗性基因片段作为筛选突变株的抗性标记。用温度敏感型质粒pKC1139为载体构建得到正确的重组质粒。

抗生素生物合成基因簇是由含有各自独立调控元件的多个基因簇合并而成的,其代谢途径能够使用不同的初级代谢产物作为合成的起始物质,因此需要复杂的调控体系<sup>[18-21]</sup>。多肽部分某些基因破坏后可能会导致某个抗生素组分肽链合成受阻或种类变化,研究 $nsdA_{mgh}$ 基因阻断突变株发现,在抑菌试验中,突变株比出发菌株对棉花黄萎病菌的抑制圈明显增大,即突变株代谢发生变化,对棉花黄萎病菌的抑制能力提高,这表明 $nsdA_{mgh}$ 基因在玫瑰黄链霉菌抗生素的生物合成中可能起到重要的负调控作

用。需要进一步通过对抗生素组分进行高效液相色谱分析,比较基因阻断对抗生素代谢的影响,从而更加明确 $nsdA_{mgh}$ 基因在玫瑰黄链霉菌抗生素代谢中的调控作用。

### REFERENCES

- [1] Yu Z, Wang Q, Deng ZX, et al. Activation of silent antibiotic synthesis in *Streptomyces lividans* by disruption of a negation regulator *nsdA*, a gene conserved in *Streptomyces*. Chin J Biotech, 2006, 22(5): 757-762 (in Chinese).  
余贞, 王茜, 邓子新. 负调节基因 *nsdA* 在链霉菌中同源性及激活沉默抗生素合成基因簇的研究. 生物工程学报, 2006, 22(5): 757-762.
- [2] Takano E, Tao M, Long F, et al. A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol, 2006, 50: 475-486.
- [3] Li W, Ying X, Guo Y, et al. Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Bacteriol, 2006, 188: 8368-8375.
- [4] Wang Q. Application of *nsdA*, a negative regulator of *Streptomyces* differentiation in antibiotic breeding[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2004 (in Chinese).  
王茜. 链霉菌分化负调节基因 *nsdA* 在抗生素高产育种上的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.
- [5] Chen F, Xiong W, Min Y, et al. Construction of the conjugal transfer system of *Streptomyces cinnamonensis* and effect of PCR-mediated *nsdA* gene disruption on its secondary metabolism. J Agric Biotechnol, 2007, 15(6): 1042-1047 (in Chinese).  
陈芬, 熊伟, 闵勇, 等. 肉桂地链霉菌接合转移体系的构建及 *nsdA* 基因中断对其次级代谢的影

- 响. 农业生物技术学报, 2007, 15(6): 1042–1047.
- [6] Liu DQ. Biological control of *Streptomyces scabies* and other plant pathogens. Minneapolis: The University of Minnesota, 1992.
- [7] Shen FY, Liu LQ, Wu WG, et al. Cloning and sequence analysis of *nsdA<sub>mgh</sub>* gene in *Streptomyces roseoflavus* Men-myc-93-63. Acta Agric Boreali-Sin, 2009, 24(5): 77–80 (in Chinese).  
沈凤英, 刘力强, 吴伟刚, 等. 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 负调控基因 *nsdA<sub>mgh</sub>* 的克隆及序列分析. 华北农学报, 2009, 24(5): 77–80.
- [8] Tobias K, Bibb MJ, Mark JB, et al. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Chen F. Construction of the conjugal transfer system of *Streptomyces cinnamonensis* and effect of PCR-mediated *nsdA* gene disruption on yield of monensin[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007 (in Chinese).  
陈芬. 肉桂地链霉菌接合转移体系的构建及 *nsdA* 基因中断对莫能菌素产量的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [11] Shen FY, Wu WG, Ji HL, et al. The validation of *nsdA<sub>mgh</sub>* gene in *Streptomyces roseoflavus* Men-myc-93-63. Henan Agric Sci, 2010, 39(3): 59–62 (in Chinese).  
沈凤英, 吴伟刚, 冀红柳, 等. 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 *nsdA<sub>mgh</sub>* 基因的验证. 河南农业科学, 2010, 39(3): 59–62.
- [12] Wang XF, Chen XY, Zhang XM, et al. Molecular characteristics and specific PCR detection of transgenic rice containing *CryIAb*. Hereditas, 2012, 34(2): 208–214 (in Chinese).  
汪小福, 陈笑芸, 张小明, 等. 转 *CryIAb* 基因水稻分子特征及其特异性 PCR 检测方法. 遗传, 2012, 34(2): 208–214.
- [13] Shen S, Wang JJ, Tong YM, et al. Cloning and functional analysis of *StAC* gene in *Setosphaeria turcica*. Sci Agric Sin, 2013, 46(5): 881–888 (in Chinese).  
申珅, 王晶晶, 佟亚萌, 等. 玉米大斑病菌腺苷酸环化酶基因的克隆与功能分析. 中国农业科学, 2013(5): 881–888.
- [14] Schauwecker F, Pfennig F, Schro DW. Molecular Cloning of the actinomycinsynthetase gene cluster from *Streptomyces chrysomallus* and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II. J Bacteriol, 1998, 180(9): 2468–2474.
- [15] Zhu HJ, Liang YX, Zhou JC, et al. Effects of *bkdAB* interruption on avermectin Biosynthesis. Chin J Biotech, 2004, 20(2): 269–273 (in Chinese).  
朱浩军, 梁运祥, 周俊初, 等. 阿维链霉菌 *bkdAB* 的基因中断对阿维菌素合成的影响. 生物工程学报, 2004, 20(2): 269–273.
- [16] Liu ZY, Guo MJ, Qian JC, et al. Disruption of *zwf2* gene to improve oxytetracycline biosynthesis in *Streptomyces rimosus* M4018. Acta Microbiol Sin, 2008, 48(1): 21–25 (in Chinese).  
刘志勇, 郭美锦, 钱江潮, 等. 龟裂链霉菌 *zwf2* 基因阻断提高土霉素生物合成. 微生物学报, 2008, 48(1): 21–25.
- [17] Liao YL, Liu ZY, Tang ZY, et al. Effects of *zwf2* gene knock-in and disruption on oxytetracycline biosynthesis in *Streptomyces rimosus* M4018. Food Drug, 2009, 11(1): 7–10 (in Chinese).  
廖瑜玲, 刘志勇, 唐振宇, 等. 龟裂链霉菌 *zwf2* 基因敲入及阻断对土霉素合成的影响. 食品与药品, 2009, 11(1): 7–10.
- [18] Cui QQ. Construction of genetic engineering *Metarhizium anisopliae* for *Plutella xylostella* control[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013 (in Chinese).

- 崔倩倩. 防治小菜蛾高效绿僵菌工程菌的构建 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [19] Gu MZ. Gene knockout of *Saccharopolyspora erythraea* and function research on SACE\_0069[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013 (in Chinese).  
古明珠. 红色糖多孢菌基因敲除和 SACE\_0069 基因功能研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [20] Zuo Q, Zhao XQ, Liu HJ, et al. Development of genetically stable recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains using combinational chromosomal integration. *Chin J Biotech*, 2014, 30(4): 669–673 (in Chinese).
- 左頔, 赵心清, 刘海军. 等. 稳定遗传的染色体组合整合酿酒酵母重组菌株的构建. *生物工程学报*, 2014, 30(4): 669–673.
- [21] Liu JL, Zhang XB, Jia SS, et al. Construction of genetic engineering strain of introduction extra *nodD* into native *Rhizobium japonicum*. *J Nat Sci Heilongjiang Univ*, 2012, 29(1): 121–129 (in Chinese).
- 刘金玲, 张喜波, 贾珊珊, 等. *nodD* 基因的克隆及其导入大豆根瘤菌工程菌株的构建. *黑龙江大学自然科学学报*, 2012, 29(1): 121–129.

(本文责编 陈宏宇)