

棒状链霉菌 *lat* 基因的中断对棒酸产量的影响

王永华^{1,2} 荆琛峰² 陶美凤¹ 杨 博³ 徐安龙^{2*}

(¹华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

(²中山大学生命科学院生物化学系 广州 510275)

(³华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

摘 要 :从棒状链霉菌中克隆 1.8kb 的 *lat* 基因片段,构建了基因置换质粒 pXAL1 和 pXAL2。运用接合转移方法把中断载体导入棒状链霉菌中进行 *lat* 的中断,得到 1 株接合转移子 Am^rThio^s,命名为 XAL 863。通过 Southern 杂交分析及赖氨酸转氨酶活性测定,证明此菌株的 *lat* 基因被中断。通过发酵培养, HPLC 方法检测棒酸含量,发现棒酸产量明显提高,约为原产量的 1.8 倍。

关键词 :棒状链霉菌,棒酸,*lat*,基因中断

中图分类号 :Q756 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)04-0500-04

棒酸,也称克拉维酸(Clavulanic acid),是由棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligerus*)产生的一种 β -内酰胺酶抑制剂,其结构主要由 β -内酰胺环(C_3 结构)和唑烷环(C_5 结构)构成^[1]。它可与 β -内酰胺酶的丝氨酸活性位点不可逆结合,从而保护 β -内酰胺类抗生素的活性^[2]。在医药生产中,棒酸和青霉素、头孢等 β -内酰胺类抗生素复配使用,可解除这些抗生素的抗药性。我国所使用的棒酸主要依靠进口,国内也曾有一些厂家生产过,但由于菌种产量较低,造成生产成本较高,无法与国外产品相竞争。获取高产菌株是降低生产成本的关键。传统的菌种选育是通过随机诱变的方法筛选高产菌株,随机性大、筛选工作量大、耗时长。随着链霉菌分子生物学技术的发展,以及抗生素合成代谢途径和相应基因簇的进一步揭示,通过抗生素代谢途径的基因工程改造来获取高产菌株成为可能,从而使育种效率提高,育种周期大为缩短。

棒状链霉菌可产生多种抗生素,如异青霉素 N、去乙酰基先锋霉素 C、头孢霉素 C、棒酸和棒烷类衍生物等。其中,异青霉素 N 和去乙酰基先锋霉素 C 属于头霉素 C 合成代谢途径的中间产物,此途径的基因簇已经被阐释^[3-5]。棒酸合成具有另外独立的代谢途径,它以 3-磷酸甘油和精氨酸为前体物质,依次在 *ceaS*、*bls*、*pah* 和 *cas* 等基因编码酶的作用下合成^[6]。虽然头霉素 C 合成代谢途径和棒酸合成代

谢途径相互独立,但是基因簇相毗邻,而且共同受 *CcaR* 调节蛋白的调控。有研究表明,在发酵生产中头霉素 C 产量和棒酸产量呈反比关系,降低或者消除棒酸生产菌中头霉素 C 的合成能够提高棒酸产量^[7]。

lat 基因编码赖氨酸氨基转移酶,参与赖氨酸转化为 α -氨基己二酸的第一步反应,是头霉素 C 合成途径中的关键酶。*lat* 基因中断的菌株失去了合成头霉素 C 的能力,含多 *lat* 拷贝数的菌株,可以提高赖氨酸氨基转移酶的活性和头霉素 C 的产量^[7,8]。

本研究选取头霉素 C 的早期合成基因 *lat* 为目标基因,构建了基因置换载体 pXAL1,对棒状链霉菌进行 *lat* 的定域基因置换,得到重组菌株 XAL863。并对重组菌株和原始菌株的产棒酸能力进行了比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 :棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligerus* 27064)由中山大学高科技海洋生物功能基因开放实验室保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、ET12567(pUZ8002)^[9]由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存。

1.1.2 质粒 :pIJ2925 为大肠杆菌克隆载体^[9]。pSET151 含有接合转移起始位点(*RK2 oriT*)、硫链丝

基金项目 :华中农业大学微生物重点实验室开放课题

* 通讯作者。Tel :86-20-84113655 ; Fax 86-20-84038377 ; E-mail :ls36@zsu.edu.cn

作者简介 :王永华(1973-)女,山西人,副教授,博士,研究方向为酶工程及微生物制药。E-mail :yonghw@263.net

收稿日期 :2004-11-09,修回日期 :2005-04-04

菌素抗性基因(*tsr*)和氨苄青霉素抗性基因(*bla*),不含有链霉菌复制起点,为链霉菌自杀性质粒^[9]。pHL212与pSET151相似,但含有遗传不稳定的链霉菌复制起点,用于在链霉菌中中断基因(私人通讯)。pHL240中的阿泊拉霉素抗性基因(*aacC4*)可以用 *Kpn* I 切下,其中的 *aacC4* 来自 pHP45Ω。

1.1.3 试剂: 本研究所用酶类均购于 Gibco 公司; DNA 分子量标准购于华美生物工程公司;其它试剂均购于 Sigma 公司;DIG DNA Labeling and Detection Kit 购于 Roche 公司。

1.1.4 培养基: 固体产孢采用 YD 培养基^[9]; ET12567 培养基是在 LB 培养基加入阿泊拉霉素(Am)、氯霉素(Cml)和卡那霉素(Km),使其终浓度分别为 50μg/mL、25μg/mL 和 50μg/mL,筛选接合转移子是在 YD 培养基中加入硫链丝菌素(Thio),使其终浓度为 10μg/mL。棒状链霉菌种子培养和发酵培养分别采用高氏天冬素和大豆培养基^[10]。

1.2 DNA 提取和转化

链霉菌总 DNA 提取、大肠杆菌和链霉菌属间接接合转移方法参照文献[9]进行;大肠杆菌质粒提取和转化参照文献[11]进行。

1.3 引物设计和 PCR 反应

以棒状链霉菌的总 DNA 为模板,利用 PCR 扩增技术获得 *lat* 的基因及部分侧翼片段。设计上下游引物:上游引物(*lat-up*): 5'-ACCGGAATTCCTTGAACACGA-3';下游引物(*lat-down*)为: 5'-TGGATCCATTCGTGGGCTCTCCGTGC-3'。PCR 反应条件: 96℃ 1min, 45℃ 1min, 72℃ 3min20s, 26 个循环; 72℃ 延伸 10min。

1.4 *lat* 基因中断菌株的构建和筛选

采用基于同源重组的靶向基因敲除技术中断棒状链霉菌的 *lat* 基因^[9]。将 *lat* 基因及其侧翼序列克隆到合适的载体,将阿泊拉霉素抗性基因 *aacC4* 插入到 *lat* 基因中得到基因中断载体,通过接合转移将基因中断载体引入棒状链霉菌中,通过抗性筛选获得发生双交换的 *lat* 基因中断菌株。

1.5 Southern 杂交验证双交换菌株

Southern 杂交操作方法参照文献[11]进行。探针用 Digoxin 标记。

1.6 赖氨酸转氨酶活性检测和蛋白含量检测

赖氨酸转氨酶活性检测方法参照文献[12,13],蛋白含量检测方法(Lowery 法)参照文献[14]进行。

1.7 发酵液中棒酸含量的测定

采用 HPLC 方法检测,具体步骤参照文献[10]

进行。

2 结果

2.1 PCR 克隆 *lat* 及中断载体构建

按图 1 所示技术路线构建基因中断载体 pXAL1 和 pXAL2。以棒状链霉菌 27064 的总 DNA 为模板, *lat-up* 和 *lat-down* 为引物,PCR 扩增出 *lat* 基因及其侧翼序列,然后用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切 PCR 产物,与 *Eco*R I、*Bam*H I 双酶切的 pIJ2925 质粒连接,得到重组质粒 pHL241。经 *Eco*R I 和 *Kpn* I 双酶切验证 pHL241 结构正确。用 *Kpn* I 酶切 pHL240,回收 1.9kb 的 *aacC4* 基因片段,然后插入到 pHL241 中 *lat* 片段的 *Kpn* I 位点,得到质粒 pHL242。用 *Bgl* II 酶切鉴定 pHL242 结构正确。用 *Bgl* II 酶切 pHL242,回收 3.7kb 左右的基因片段,插入到 pSET151 和 pHL212 的 *Bam*H I 位点,得到基因的中断载体 pXAL1 和 pXAL2。经 *Xba* I 和 *Eco*R I 酶切验证 pXAL1 和 pXAL2 结构正确。

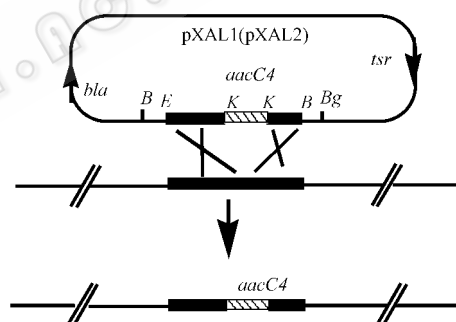


图 1 染色体上的 *lat* 基因中断示意图

Fig.1 Disruption of *lat* on *S. clavuligerus* chromosome

Abbreviations: *bla*, Ampicillin resistance gene; *tsr*, Thiostrepton; *E*, *Eco*R I; *B*, *Bam*H I; *K*, *Kpn* I; *Bg*, *Bgl* II.

2.2 *lat* 基因双交换菌株筛选

将质粒 pXAL1 和 pXAL2 转化到大肠杆菌 ET12567(pUZ8002),与棒状链霉菌 27064 进行属间接合转移。结果发现, pXAL1 不能得到硫链丝菌素抗性(Thio^r)接合转移子,而同样条件下 pXAL2 得到大量接合转移子。挑取 Thio^r接合转移子,划线转接到含有 20μL/mL 的萘啶酮酸培养基上进行纯化。将纯化后的接合转移子在无抗生素的 YD 培养基上进行松弛培养至充分产孢。收集孢子,进行系列梯度稀释。选择合适浓度的孢子涂布在含有 20μL/mL 抗生素 Am 的 YD 培养基上培养产孢,然后影印到含有抗生素 Thio 的培养基上,筛选得到 Am^r Thio^s 菌株 1 株,命名为 XAL 863。PXAL1 和 pXAL2 中带有 *aacC4* 的 *lat* 基因与出发菌株的染色体同源区域发

生同源双交换的示意图如图 1 所示。

2.3 Southern 杂交验证双交换菌株

用 Southern 杂交验证菌株 XAL 863 是否发生正确的基因中断。采用双探针进行杂交,两个探针分别为 pHL242 用 *Kpn* I - *Eco*R I 双酶切后回收的 1.9kb 含 *aacC4* 的 *Kpn* I 片段及 1.0 kb 含部分 *lat* 基因的 *Eco*R I - *Kpn* I 片段,混合用 Digoxin 标记。用 *Bam*H I 酶切的棒状链霉菌 27064 和 XAL 863 基因组 DNA 经凝胶分离,用双探针杂交后,前者给出一条约 9kb 的杂交带,后者给出约 4.7kb 和 1.8kb 的杂交带(图 2),与预期结果相符,表明 XAL 863 为 *lat* 基因中断菌株。

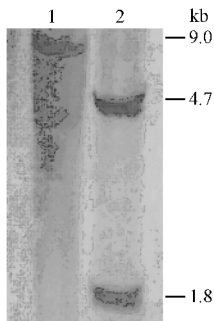


图 2 中断菌株 Southern 杂交分析

Fig.2 Southern analysis of the mutant

1. *Streptomyces clavuligerus* 27064 ; 2. XAL863.

2.4 赖氨酸转氨酶活性检测

lat 编码赖氨酸转氨酶 (Lys- ϵ -aminotransferase, LAT)。如果 *lat* 基因被中断,则应无 LAT 酶活性。本研究分别检测了在不同培养时间棒状链霉菌 27064 和 XAL863 菌株的赖氨酸转氨酶活性(表 1),在 XAL863 中不再具有 LAT 酶活性,表明 *lat* 基因已经被中断失活。

表 1 棒状链霉菌 27064 和 XAL 863 赖氨酸转氨酶活性比较

Table 1 Comparison of the LAT activity between *S. clavuligerus* 27064 and XAL 863 culture

Strain	LAT(U/mg of protein)		
	48h	60h	84h
<i>S. clavuligerus</i> 27064	1.85	2.50	0.10
XAL863	-	-	-

- . Not detected ; LAT. Lys- ϵ -aminotransferase.

2.5 棒状链霉菌 27064 和 XAL 863 发酵生产棒酸能力比较

以原始菌株棒状链霉菌 27064 为对照菌株,对 XAL863 进行发酵研究,探讨菌株合成棒酸的能力。选用大豆培养基为发酵培养基,于 28℃、200r/min 培养,分别在不同培养时间取样检测棒酸含量。每组

试验分别有两个平行样(表 2)。改造后的菌株 XAL 863 与原始菌株 27064 相比,其产量大幅度提高。当培养 72h 时,棒酸产量达到最大,XAL863 菌株的产量约为原菌株的 1.8 倍。

表 2 棒状链霉菌 27064 和 XAL 863 合成棒酸产量比较

Table 2 Comparison of the clavulanic acid production between *S. clavuligerus* 27064 and XAL 863 culture

Incubation time/h	Sample (duplicate)	Sc 27064 (mg/L)	XAL 863 (mg/L)	Times
48	1	59.96	236.55	3.95
	2	63.01	213.66	3.39
54	1	75.16	290.23	3.86
	2	90.24	304.60	3.38
66	1	162.79	333.54	2.05
	2	184.53	405.11	2.20
72	1	372.19	651.34	1.75
	2	416.91	771.08	1.85
84	1	258.69	385.67	1.49
	2	280.98	448.82	1.60

3 讨论

对于日益严重的 β 内酰胺类抗生素的耐药问题,棒酸已作为特效药物被广泛用于临床。棒酸生产菌可产生多种抗生素,其中头霉素 C 的合成会对棒酸的合成产生负影响。本研究尝试用分子生物学的方法定向改造原始生产菌的基因组。阻断头霉素 C 的合成途径中的 *lat* 基因,使代谢流向棒酸的生物合成,从而提高棒酸产量。对 XAL863 菌株的发酵结果表明,棒酸产量得到了大幅度提高,并通过十几代的传代培养,发现菌株的发酵结果和抗性标记都非常稳定。本研究不仅为从分子水平改造菌种提供一个例证,并可能对棒酸产量的提高提供一种可行的依据。

参 考 文 献

- [1] Jun H , Terumichi N , Toyozo U . Stability of clavulanic acid in aqueous solution . *Chem Pharm Bull* , 1981 , **29** : 3334 - 3341 .
- [2] Aharonowitz Y , Demain A L . Catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus* . *Antimicrob Agents Chemother* , 1978 , **14** : 159 - 164 .
- [3] Alexander D C , Jensen S E . Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the CcaR protein . *J Bacteriol* , 1999 , **180** : 4068 - 4079 .
- [4] Liras P . Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins : cephamycins produced by actinomycetes . *Antonie Leeuwenhoek* , 1999 , **75** : 109 - 124 .
- [5] Perez-Liarena F J , Rodriguez-Garcia A , Enguita F J , et al . The *pcd* gene encoding piperidine-6-carboxylate dehydrogenase involved in biosynthesis of α -aminoadipic acid is located in the cephamycin cluster

of *Streptomyces clavuligerus* . *J Bacteriol* , 1998 , **180** :4753 – 4756.

[6] Mellado E , Lorenzana L M , Rodriguez-Saiz M , *et al* . The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus* : genetic organization of the region upstream of the *car* gene . *Microbiology* , 2002 , **148** :1427 – 1438.

[7] Malmberg L H , Hu W S , Sherman D H . Precursor flux control through targeted chromosomal insertion of the lysine- ϵ -aminotransferase (*lat*) gene in cephamycin C biosynthesis . *J Bacteriol* , 1993 , **175** :6916 – 6924.

[8] Malmberg L H , Hu W S . Kinetic analysis of cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus* . *Biotechnol Bioeng* , 1991 , **38** :941 – 947.

[9] Tobias K , Bibb M J , Mark J B , *et al* . Practical *Streptomyces* genetic : A Laboratory Manual , 2nd ed . London : John Innes Foundation Press , 2000 , 14.311 – 14.334.

[10] Wang Y , Yang B , Ren J , *et al* . Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* . *Process Biochemistry* , 2005 , **40** :1161 – 1166.

[11] Sambrook J , Russell D W . 分子克隆实验指南 . 黄培堂 ,等译 . 第三版 .北京 :科学出版社 2002.

[12] Madduri K , Stuttard C , Vining L C . Lysine catabolism in *Streptomyces* spp. : Is primarily through cadaverine : β -lactam producers also make α -aminoadipate . *J of Bacteriology* , 1989 , **171** : 299 – 302.

[13] Brian A K , David H , Edward I . L-lysine- ϵ -Aminotransferase involved in cephamycin C synthesis in *Streptomyces lactamdurans* . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 1980 , **17** :679 – 685.

[14] 郭 勇 . 现代生化技术 . 广州 :华南理工大学出版社 , 2002 , 142.

Effect of *lat* disruption on clavulanic acid production

WANG Yong-hua^{1 2} JING Chen-feng² TAO Mei-feng¹ YANG Bo³ XU An-long^{2*}
(¹ Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China)
(² Department of Biochemistry , College of Life Sciences , Sun Yat-Sen University , Guangzhou 510275 , China)
(³ College of Food and Bioengineering , South China University of Technology , Guangzhou 510641 , China)

Abstract : A 1.8kb fragment of *lat* was obtained from *Streptomyces clavuligerus* 27064 , and replacement plasmid of pXAL1 and pXAL2 were constructed . PXAL1 and pXAL2 were used to disrupt the *lat* gene by bi-parental conjugation from *E. coli* to *Streptomyces clavuligerus* . A Am^rThio^S transformant , named as XAL863 , was obtained . The genome of *Streptomyces clavuligerus* 27064 and XAL863 was analyzed by southern blot technique , and the activity of lysine ϵ -aminotransferase in the two strains was also tested . Both results proved that the *lat* was disrupted in the XAL863 . *Streptomyces clavuligerus* and XAL863 were cultured in the shaken flask respectively , and the production of clavulanic acid was analyzed by HPLC with the different incubation time interval , and the yield was approximately 1.8 times higher in the XAL863 at their highest production point .

Key words : *Streptomyces clavuligerus* , Clavulanic acid , *lat* , Gene disruption

Foundation item : Key Laboratory of Agricultural Microbiology in Huazhong Agricultural University
* Corresponding author . Tel 86-20-84038377 ;Fax 86-20-84113655 ;E-mail : ls36@zsu.edu.cn
Received date : 11-09-2004

本期广告索引

企 业	版 位	企 业	版 位
镇江东方生物工程设备技术有限公司	封底	上海国强生化工程装备有限公司	文前Ⅲ/Ⅳ
GE Healthcare Bio-sciences(原名 Amersham Biosciences)	封二	“ 广东溢多利生物科技股份有限公司 ” 诚聘英才	文前 V
镇江达森发酵设备有限公司	封三	上海保兴生物设备工程有限公司	文前 VI
北京天为时代科技有限公司	文前 I / II	扬中市威柯特生物工程设备公司	文后 I