

## 圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成 基因—*sanL* 的结构与功能\*

聂丽平<sup>1,2</sup> 张集慧<sup>1</sup> 谭华荣<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(<sup>2</sup> 辽宁师范大学生物系 大连 116029)

**摘要** 利用染色体步移策略,以尼可霉素生物合成相关的基因片段为探针,从圈卷产色链霉菌中克隆到了一个大约 10kb 的 DNA 片段。序列分析表明此片段中除含有 *sanK* 外,在 *sanK* 的上游还有一个完整开放阅读框——*sanL*。*sanL* 与 *sanK* 的转录方向相同,具有 1281 个核苷酸,起始密码子为 345 位的 ATG,终止密码子为 1623 位的 TGA。利用 Blastx 程序进行的分析揭示,此基因可能编码一个赖氨酸-2-氨基转移酶。基因功能研究表明,该基因是圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成所必需的。

**关键词**: 圈卷产色链霉菌,尼可霉素,生物合成,赖氨酸-2-氨基转移酶

中图分类号: Q939.13 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2001)01-0059-06

尼可霉素(Nikkomycins)为核苷肽类抗生素,由肽基和核苷两部分组成<sup>[1]</sup>。到目前为止,已经分离到的尼可霉素生物活性组分超过了 20 种,其中,主要的生物活性组分为尼可霉素 X、Z、I 和 J。尼可霉素是几丁质合成酶底物 UDP-N-乙酰葡萄糖胺的结构类似物,对几丁质合成酶具有强烈的竞争性抑制作用<sup>[2]</sup>;因此,表现出高度的抗真菌、抗昆虫和抗螨虫活性。此外,由于尼可霉素对蜜蜂及哺乳动物几乎无毒性,而且在自然界中极易降解,因此是一种比较理想的农用抗生素。作为抗真菌药物,尼可霉素在人体深部真菌感染的治疗中也有良好的效果。

圈卷产色链霉菌(*Streptomyces ansochromogenes*)是从我国东北土壤中分离到的尼可霉素产生菌。田间试验结果表明,它所产生的尼可霉素对许多植物真菌病具有良好的防治效果,如:黄瓜叶霉病、灰霉病和菌核病,番茄叶霉病和灰霉病,苹果轮斑病及梨黑斑病等。同时,对有害昆虫也具有一定的防治作用<sup>[3]</sup>;其作为抗真菌药物的开发工作正在进行中。有关尼可霉素生物合成基因表达调控的研究,无疑将为其应用开发提供有益的理论依据。

通过标记前体物质和突变株中间产物分析等方法,对尼可霉素生物合成途径的研究取得了一些进展<sup>[4]</sup>。但是,有关尼可霉素生物合成分子调控机理的研究仍处于初始阶

\* 本研究工作获国家自然科学基金重点项目(39830010)资助及微生物资源前期开发国家重点实验室支持

\*\* 通讯联系人

作者简介:聂丽平(1961-),女,吉林省辽源市人,辽宁师范大学生物系副教授,博士,主要从事微生物遗传学研究。

收稿日期:1999-04-05 修回日期:1999-06-01

段。近年来,本实验室开展了尼可霉素生物合成相关基因结构与功能方面的研究工作<sup>[3]</sup>,已经克隆到了尼可霉素生物合成相关的完整基因簇,有关基因功能及表达调控方面的研究正在进行之中。本文报道了圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成基因—*sanL* 的研究进展。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和培养基:**圈卷产色链霉菌 7100(*Streptomyces ansochromogenes* 7100),*E. coli* DH5 $\alpha$  限制与修饰系统缺陷的 *E. coli* ET12567(*dam*<sup>-</sup> *dcm*<sup>-</sup> *hrdM*<sup>-</sup>)为本实验室保存,质粒载体 pBluescripM13<sup>-</sup> pKC1139 及重组质粒 pCW18(M13-*sanL-sanG*)为本实验室保存。圈卷产色链霉菌 7100 的 cosmid 文库由本实验室构建并保存。赤星灰霉由中国科学院微生物研究所宋幼新研究员赠送。

**1.1.2 培养基:**用于培养圈卷产色链霉菌的 YEME 培养基, R2YE 培养基和 MM 基本培养基均按文献 [5] 配制。

**1.1.3 工具酶和生化试剂:**本实验所用的各种限制性内切酶购自 Promega 公司。T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司,安普霉素(Apramycin)为加拿大 Albert 大学 B. Leskiw 博士赠送。PEG1000 购于 Merck Schuchard 公司。非放射性地高辛试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司。DEAE-DE81 滤纸购于 Whatman 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 常规的链霉菌分子生物学操作方法按文献 [5] 进行。**

**1.2.2 DNA 序列分析:**采用 Ampli Tag<sup>R</sup> DNA Polymerase 和 ABI PRISM<sup>TM</sup> 377XL DNA 序列分析仪进行。

**1.2.3 基因功能研究:**质粒 pKC1139 具有温度敏感型复制起点,在 40℃ 生长条件下不能正常复制。在本实验中,将结构基因内部的部分 DNA 片段插入到质粒 pKC1139 上,得到的重组质粒转化野生型圈卷产色链霉菌,通过同源重组交换而获得插入阻断突变株(破坏子),并通过测定破坏子的抗生素产生研究基因的功能。

**1.2.4 尼可霉素测定方法参见文献 [3]**

## 2 结果

### 2.1 1.9kb 的 *Pvu* II -*Bgl* II 片段的序列分析

在本实验室的前期工作中,采用染色体步移策略,以 pCW18 中 1.1kb 的 *Sal* I -*Bam* H I DNA 片段为探针,通过菌落杂交,从圈卷产色链霉菌 7100 的 cosmid 文库中已经克隆到了一个 10kb 的 DNA 片段(聂丽平等,待发表);部分序列分析结果揭示,该 DNA 片段中含有一个完整的开放阅读框—*sanK*。本实验中,对 *sanK* 上游 1.9kb 的 *Pvu* II -*Bgl* II DNA 片段进行了序列测定,得到了 1934bp 的核苷酸序列(如图 1)。利用 Frame-Plot2.3 程序对其进行了分析,结果揭示出一个完整的开放阅读框(图 2);起始密码子为 345 位的 ATG,终止密码子为 1623 位的 TGA,其大小为 1281bp。此开放阅读框具有典型的链霉菌密码子使用特征。G+C% 为 72.0%,在起始密码子上游,相距 7 个核苷酸处有

```

CAGCTGGAGGTCCTGGTGCCGGTCTGGAACGGCTGGGGTTCCGGACGGGCATCGACCTG 60
TACCGCTCCTGGACGGCGGGACATCGCCGGGGGAGCTGATCGCGGGCCGGCCACC 120
ATCGACTCCGTCPCATCGTCAGCGGGCTGGCCGGGGTGTCTCCGGATTCAAGAAACCG 180
GTGCTCGACATCGCGGGCGGGGAAGGGGTGCATCCGCGCGACGCTTCTTTCGAACTCGGC 240
AGGCGTCAGGTGCTCGCGGGCCAGGAGGACCTGATCGTGGAGGTGGCGCTGCCCTGCGC 300
                                RBS          sanL →
GCCGCCCGGGACGGGGGAAGCCCGCGGGCAGTGGGACCGGCTCATGCTGACCGTGAACG 360
                                M L T V N
GGAACTCCCGGTACCTCGTGCCGGCCCCCGGTTGGGAAGCATCTCGGGGGCGCCGAGC 420
G N S R Y L A P A P A V G S I L G G A E
TGGCCCGCTGGGCGAGGTCGTCCGGTCCGGCGAGAGCCTCGCAAGGGCGGTGGCCGG 480
L A A L G E V R S G E S L S Q G R W R
AGGCGTTCGAGCAGGCGATGCGCGAGCACGTGGCAGCCGGTACGCGATGACCGTACCA 540
E A F E Q A M R E H V G S R Y A M T V T
GCGGAACGTCGCGCTCGCGTCCGCGTGCACCTGCTGGACCTGCSCCCCGCGGACGAG 600
S G T V A V A L A V H L L D L A P G D E
TCATCGTGACCCCGCAGACCTTCAAGGCCACCGCCGCCCTGCTGGCCCCAGCAGCTGA 660
V I V T P Q T F K A T A D P L L A H D V
CGGTCCGTTTCTGCGACGTGGAGCCGGACACCTGACCGTGGACGTCGACTCGTTCGAGT 720
T V R F C D V E P D T L N V D V D S F E
                                SmaI ApaI
CGCTGATCACCCCGCGGACCCCGGCCCTGATCCTGGTCCACTACGGCGGCCGGCCGGCCC 780
S L I T P R T R A L I L V H Y G G R P A
GCATGGACGATCATGCGGGTGGCCGTCGGCACGGCGTCCGGGTGATCGGACTGCGG 840
R M D E I M R V A R R B G V R V I E D C
CGCACGGCTGGGCGCCCTTACCCTGGCCGGCGCCGGGCGTGTCTGGCGCATCGGGT 900
A H A L G A L Y R G L R R P G P L G D I G
GCTTCAGCTTCCACTCCAGCAAGAACATCACGACCTCGGCGAGGGCGGCATGCTCACCT 960
C F S F H S S K N I T T L G E G G M L T
TCGACGATCCCGAGTGGGGCGAGCGCTCGACCGCATCCGCTCCAACGCCCGCGACGGG 1020
F D D P E W A E R L D R I R S N A A D G
TCCTCATCCCGTCCCGCTGTCGGCCGGGCGTACGAGCACTCGGAGCCCTGGATGATGT 1080
V L I P S P L S A G P Y E H S E P W M M
                                SmaI
GGGCGGGGATCGTAGAGAAGGAGTGCCTGGCATCCGGCACCCCGGGAGCAACGCCA 1140
W A G D S Y E K E C L R I R H P G S N A
CGCTCAGCGAGGCCGGGGCGGCTGTGGGGCTCGTCCAGCTGGAGCGTCTCGGGGAGCTGG 1200
T L S E A G A A V G L V Q L E R L G E L
CCGGCCGGCGCGATGGATGCCGGGGCGCTCGCCCGGACGCTGGCGGAGGTGCCGCAGG 1260
A G R R R W I A G R L A R T L A E V P Q
TGCGGCTGGCCGAGTCCCGGAGGACGCTCCTCCACCCCTACCACCTGTTACCTTCTTCG 1320
V R L A D V P E D V L H P Y I T F F
TCCGGCCGGGACAGGGCGTGAGCCGCGACGAGTTCATCCACGCCCTGGCGGACGCCGGG 1380
V R P G Q G V S R D E V I H A L A D A G
TCCAGGTGACGGTTCGTTACTTCCCTTGCACCTGCGCCCGAGTGGCGGGGTTCGGGGG 1440
V Q V Q V R Y F P L H L R P E W R G R G
ACCGGCTCGCGAGTGTCCGGTACCAGCGGCTCTGGTTCACAGCAGGTCACCTGCG 1500
H R L G E C P V T E R L W F H E Q V T L
CCTGCTACCCGTCGATGACCGACGGCCAGTGGAGCACCTGGTGTGGCCCTGAAGTCCG 1560
P C Y P S M T D G Q V E H L V L A L K S
CGCTACCCGGACGGCGGACACCGCGGACGTCGAGTTCAGGTTACGAGGAGGCGCCGGG 1620
A L T G R R D T G E R G T S S Y E E A R
                                ApaI
CATGACCGAATCCTATGACGTGGTGGTCTGTTGGAGGCGGGCCCTGGGCCTGGCCACCGC 1680
A *
CTGGCAGGTCGCCAAGCGCGCCACCGGGTACTGGTCTGGAGCGGCACACGTTCTTCAA 1740
CGAGAACGGGGACACCGCGCCGCGGACTGGCGGCTCCAGTACACCGAGGAGGA 1800
CCTGTTCCCGCTGACGCTGGAGACCTTCCGCTGTGGCGCGCGCTGGAGAGCCGCTGCGA 1860
GCGCCGCTCATCCACGAGATCGGCACGCTCTGGTTCGGGGACACCGACGTCGTCACCAA 1920
CGAGGGCCAGATCT

```

图 1 1.9kb *Pvu* II -*Bgl* II DNA 片段的核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

Fig. 1 The whole sequence of 1.9kb *Pvu* II -*Bgl* II DNA fragment and the deduced amino acid sequence in ORF

一个嘌呤富集的序列 GGGGA 推测可能是核糖体结合位点。根据 DNA 序列推测,此基因可能编码一个含有 426 个氨基酸的蛋白质产物。利用 Blastx 程序在蛋白质数据库进行了同源比较,发现其与唐德链霉菌的赖氨酸-2-氨基转移酶具有较高的同源性,一致性为

91% ,由此推测 ,此基因可能编码一个类似的赖氨酸-2-氨基转移酶。

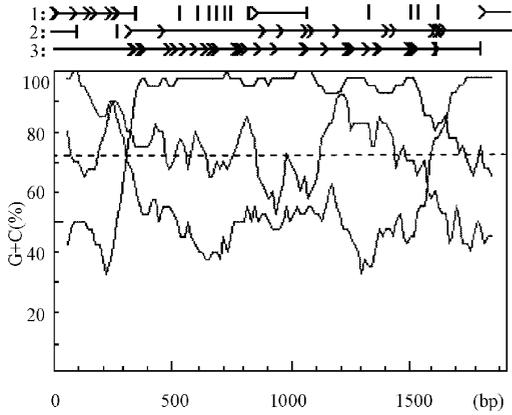


图2 1.9kb DNA 片段中的开放阅读框

Fig.2 The ORF in 1.9kb DNA fragment

### 2.2 基因功能研究

**2.2.1 基因破坏**:采用基因破坏策略,对 1.9kb DNA 片段所包含的完整基因进行了功能分析。将其内部 387bp *Sma* I 片段(图 1)插入到质粒 pKC1139 的 *Eco*RV 位点上,构建了一个用于基因同源交换的重组质粒 pKC1139 : $\Delta$ *sanL*(图 3)。首先,用这个重组质粒转化大肠杆菌 ET12567,然后,转化圈卷产色链霉菌 7100,挑取正确的转化子接种到含有安普霉素的基本培养基上,于 30℃ 培养 5d 后,制备孢子悬液,经适当稀释后,以每个平皿  $10^6$  个孢子的浓度涂布于含有安普霉素的基本培养基上,40℃ 培养 4d ;

利用 pKC1139 携带温度敏感型复制起点这一特性,筛选到了大量可以在 40℃ 正常生长并具有安普霉素抗性的破坏子。

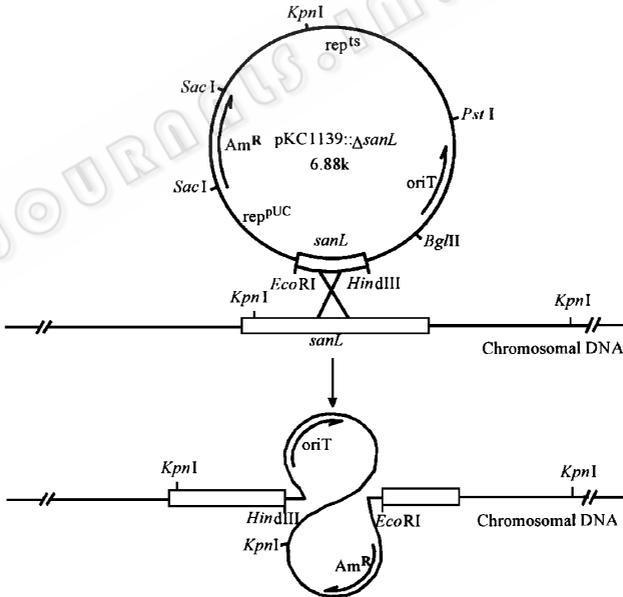


图3 基因破坏示意图

Fig.3 The diagram of gene disruption

**2.2.2 “破坏子”产生尼可霉素的测定**:从上述“破坏子”中随机挑选出 28 个,接种到含有安普霉素的 R2YE 培养基上,分别培养 3d、5d 和 7d,然后测定尼可霉素的产生。结果发现,全部 28 个破坏子在所测定的时间内均不产生尼可霉素,图 4 所示为其中 7 个破坏子

的测定结果。在同等培养条件下,野生型圈卷产色链霉菌正常产生尼可霉素(图4)。

上述结果表明位于 1.9kb DNA 片段中的基因与圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成直接相关,该基因命名为 *sanL* (*Streptomyces ansochromogenes* Nikkomycin synthesis gene L)。

**2.2.3 Southern blot 杂交验证:**为了进一步确证上述“破坏子”中 *sanL* 确实已经被破坏,在实验中分别从野生型圈卷产色链霉菌和 6 个随机选择的“破坏子”中提取总 DNA,分别用 *Kpn* I 进行彻底酶切后,以 916bp 的 *Apa*1 片段(图1)为探针,进行了 Southern blot 杂交验证;结果表明来自野生型菌株的总 DNA 只给出了一个 7.5kb 的信号带,而来自破坏子的总 DNA 均给出 4.0kb 和 10.4kb 二个信号带(图5),这一结果与理论推测的 DNA 片段的大小相一致(图3)。因此,可以确定在所有 6 个破坏子中都进行了正确的同源重组——即 *sanL* 确已被破坏。

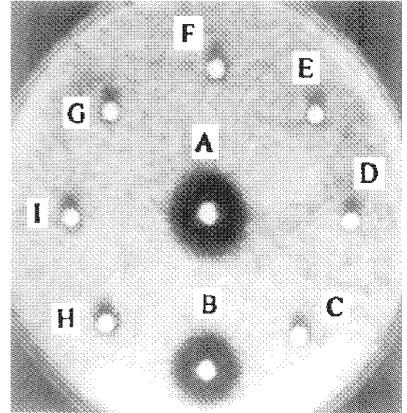


图4 破坏子产生尼可霉素的测定

Fig.4 The test of nikkomycin produced by disruptants

A. *S. ansochromogenes* 7100 ;

B. *S. ansochromogenes* 7100 containing

pKC1139 C~H. Disruptant.

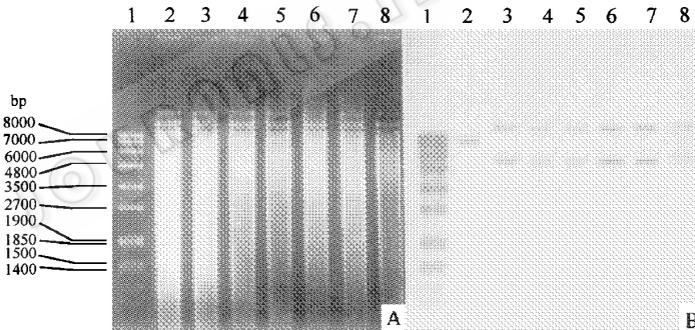


图5 *sanL* 基因破坏的 Southern blot 杂交验证

Fig.5 The Southern blot hybridization of *sanL* gene disruption

A. The agarose gel electrophoresis of the total DNA digested with *Dpn* I :

1. spp I /*Eco*R I 2. *S. ansochromogenes* 7100 wild type strain 3~8. Disruptants.

B. The Southern blot hybridization :1~8. They are the same as A.

### 3 讨论

1992年,德国的 Schuez 和 Fielder 等人通过标记前体物质示踪实验和阻断突变株中间产物分析等方法<sup>[6,7]</sup>,对尼可霉素生物合成途径进行了分析,结果指出,尼可霉素结构中的肽基部分和核苷部分是分开合成的,然后通过肽键相连。其中,肽基部分(即羟基吡啶同型苏氨酸亦称尼可霉素 D)的吡啶环及其与氨基酸相连的碳原子的合成前体为 L-赖

氨酸,而起始反应可能是由赖氨酸-2-氨基转移酶催化的<sup>[8]</sup>。本实验结果表明 *sanL* 编码一个赖氨酸-2-氨基转移酶,而且,这个酶与圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成直接相关。因此,综合这两方面的实验结果可以初步推断,*sanL* 编码的基因产物在圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成过程具有重要的作用,可能催化尼可霉素肽基部分合成的初始反应。

到目前为止,有关尼可霉素生物合成基因表达调控分子机制的研究仍处于初始阶段,本实验中,有关 *sanL* 功能的研究结果,为阐明圈卷产色链霉菌尼可霉素生物合成的分子调控机制提供了有益的理论依据。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Decker H , Zahner H , Heitsch H , et al . *J Gen Microbiol* ,1991 ,**137** :1805 ~ 1815 .
- [ 2 ] Debono M , Gordee M S . *Annu Rev Microbiol* ,1994 ,**48** :471 ~ 497 .
- [ 3 ] Jia J , Li W , Chen W , et al . *Science in China (Series C)* ,2000 ,**43** :30 ~ 38 .
- [ 4 ] Zheng D , Miller M J . *Curr Pharm Des* ,1999 ,**5** :73 ~ 99 .
- [ 5 ] Hopwood d A , Bibb M J , Chater K F , et al . *Genetic manipulation of Streptomyces—a laboratory manual* . Norwich ,UK : The John Innes Foundation . 1985 .
- [ 6 ] Schuez T C , Fiedler H P , Zaehner H , et al . *J Antibiot (Tokyo)* ,1992 ,**45** :2 :199 ~ 206 .
- [ 7 ] Bormann C , Mattem S , Schrempf H , et al . *J Antibiot* ,1989 ,**42** :913 ~ 918 .
- [ 8 ] Rudd B A M , Bowden A , Noble D , et al . Novel nikkomycins by mutasynthesis . In 30 th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy . Tokyo ,Japan . 1990 . 185 .

## STRUCTURE AND FUNCTION OF *sanL*—A GENE INVOLVED IN NIKKOMYCIN BIOSYNTHESIS OF *STREPTOMYCES ANSOCHROMOGENES* \*

Nie Liping Zhang Jihui Tan Huarong

(*Institute of Microbiology , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China* )

(*Department of Biology , Liaoning Wormal University , Dalian 116029 , China* )

**Abstract** : The chromosome walking strategy has been used in this experiment and a 10kb DNA fragment was cloned from the cosmid library of *Streptomyces ansochromogenes* using a partial DNA fragment involved in the nikkomycin biosynthesis as a probe. The nucleotide sequence showed that the DNA fragment contains two complete open reading frames (ORFs), they are designated as *sanK* and *sanL* respectively. The *sanL* is located on the upstream of *sanK*, it has 1281 nucleotides with ATG at 345 position as start codon and TGA at 623 position as stop codon. The deduced product is L-lysine 2-aminotransferase using Blastx program. The experiment of gene disruption indicated that this gene is closely related to nikkomycin biosynthesis of *Streptomyces ansochromogenes*.

**Key words** : *Streptomyces ansochromogenes* , Nikkomycin , Biosynthesis , L-lysine 2-aminotransferase