

林可链霉菌中的同源重组*

唐雅琄 吴海珍 叶 江 张惠展

(华东理工大学国家生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘 要:为研究链霉菌中的同源整合频率和机制,采用不能在链霉菌中复制的大肠杆菌质粒转化链霉菌 *Streptomyces lincolnensis* B48。质粒 pYYE04a1 上携带的被硫链丝菌素抗性基因灭活的林可霉素生物合成基因与染色体 DNA 上的同源基因发生重组,经过低抗筛选,得到两个突变子 *S. lincolnensis* YY1 和 *S. lincolnensis* YY2。进一步以硫链丝菌素抗性基因为探针杂交染色体 DNA *Sma* I 片段,*S. lincolnensis* YY1 和 *S. lincolnensis* YY2 都得到 1.5kb 的阳性条带;而以缺失的 *lacZ* 基因为探针杂交染色体 DNA *Hind* III 和 *Sma* I 联合酶切片段,只有 *S. lincolnensis* YY2 得到 4.4kb 的阳性条带。Southern 杂交结果表明 *S. lincolnensis* YY1 是由同源交换或二次重组产生的,而 *S. lincolnensis* YY2 为同源整合的结果。为验证同源整合子上大肠杆菌复制子和氨苄抗性基因的存在,用 *Sph* I 酶切染色体 DNA 后连接,连接液转化 *E. coli* JM83 感受态细胞,在氨苄抗性板上得到 2 个转化子,命名为 pSLE1。对其进行酶切鉴定的结果表明它是转化质粒 pYYE04a1 的一部分。

关键词: 林可链霉菌, 同源重组, 同源整合, 同源交换

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 05-0559-08

利用 DNA 重组技术改良抗生素生产菌可以采用基因回转化的战略^[1],即将携带抗生素生物合成关键酶基因的质粒转化回生产菌中,通过与染色体的同源整合增加关键酶基因的拷贝数。为了进一步探讨这种方法的可靠性,我们研究了林可链霉菌 B48 株林可霉素生物合成基因的同源整合现象。目前已有几种利用质粒在染色体上引入同源重组基因的方法:Hamiton 等人利用对 DNA 复制的温度敏感型质粒和 *E. coli* 染色体基因之间的同源性在 30℃ 发生重组,随后在质粒复制不允许温度的 (44℃) 下筛选重组子^[2];Hillemann 等人利用单链 DNA 整合载体转化 *Streptomyces viridochromogenes*,被 *ts'* 灭活的 *pat* 基因置换了染色体上的同源基因,产生无法合成 PTT 的突变子^[3];Gutterson 等人利用缺失 DNA 聚合酶 I (*polA*) 的菌株无法复制含 ColE1 的复制子的特性,用大肠杆菌复制子转化沙门氏菌,染色体的 *che* 基因与质粒上被抗性基因灭活的 *che* 基因之间发生同源重组并得到突变子,同时随着培养基中抗生素浓度的提高,整合到染色体上的质粒序列可以扩增 30 倍^[4]。本文利用不被链霉菌 DNA 聚合酶识别的大肠杆菌质粒转化林可霉素生产菌 *Streptomyces lincolnensis* B48,质粒上被抗性基因灭活的林可霉素合成基因与染色体的同源基因重组得到突变子,并用低硫链丝菌素抗性、杂交及回连染色体酶切片段的方法验证了同源重组的发生。

* 国家自然科学基金资助项目 (29476235)

作者简介:唐雅琄 (1977-),女,安徽省人,硕士,毕业于华东理工大学应用生物学系,主要从事分子生物学方面的研究。

收稿日期: 2000-12-20, **修回日期:** 2001-03-04

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

1.1.1 菌株:大肠杆菌 *E. coli* JM83[F⁻, *ara*, Δ(*lac-proAB*), *rpsL*, (Srt'), F80, d, Δ(*lacZ*), M15], *E. coli* JM110[*dam*, *dcn*, *supE44*, *hsdR17*, *thi*, *leu*, *rpsL1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *thr*, *tsx*, Δ(*lac-proAB*)/F']和林可霉素生产菌 *S. lincolnensis* B48[pr]系本实验室收藏。

1.1.2 质粒:大肠杆菌质粒 pUC18[*amp*, *lacZ-α*], pSPORT1[*amp*, *lacOPZ'*, *sp6*, T7], pESE701[Δ*lmb*F*lmb*G*lmb*H*lmb*I*lmb*J*lmb*KΔ*lmb*L, *amp*, Δ*lacZ-α*]和链霉菌质粒 pIJ702[*tsr*, *mel*]由本课题组收藏。

1.2 培养基

大肠杆菌培养基 LB、林可霉素生产菌培养基 SMA、液体培养基 SM 和 YEME,原生质体再生培养基 R₂YE 的成分参见文献[5]。

1.3 试剂和酶

限制性内切酶及其缓冲液、连接酶及其缓冲液为 TaKaRa 公司产品。硫链丝菌素系 Sigma 公司产品。RNA 酶和蛋白酶 K 购自上海实生生物技术公司,氨苄青霉素系苏州益良药业有限公司产品。原生质体转化和再生所用的 P 缓冲液、T 缓冲液及链霉菌染色体抽提的 A 缓冲液均按 Hopwood 方法^[5] 配制。

1.4 一般操作

限制性内切酶酶切,DNA 沉淀,DNA 体外连接及大肠杆菌质粒抽提和转化,琼脂糖凝胶电泳,大肠杆菌的培养方法,感受态的制备等均参考文献^[6]。链霉菌的培养方法,原生质体的制备、再生和转化以及质粒抽提参考文献^[5]。用于转化 *Streptomyces lincolnensis* B48 的大肠杆菌质粒 pYYE04a1 的抽提使用 LIFE TECHNOLOGIES 的 Concert™ Rapid Plasmid Purification Systems^[cat series 11453]。

1.5 DNA 片段回收

Southern 杂交中作为探针的待标记 DNA 片段的回收使用 LIFE THCHONOLOGIES 公司的 Concert™ Gel Extraction Systems^[cat series 11456]。

1.6 Southern 杂交

标记探针和杂交检测使用 Boehringer Mannheim 公司的非放射性 DNA 标记和检测试剂盒 DIG DNA Labeling and Detection kit^[cat.No. 1093657]。

2 结果和分析

2.1 林可霉素生产菌 *S. lincolnensis* B48 对硫链丝菌素的抗性

用含不同浓度硫链丝菌素的 SMA 培养基测定了 *S. lincolnensis* B48 对硫链丝菌素的抗生(表 1)。

表 1 *S. lincolnensis* B48 在含不同硫链丝菌素的 SMA 平板上的生长

Table 1 Growth of *S. lincolnensis* B48 on SMA medium containing different concentration of thiostrepton

Thiostrepton/(μg/mL)	0	5	15	20	35	45	50
<i>S. lincolnensis</i>	+	-	-	-	-	-	-

+ :indicates good growth; - :indicates no growth

根据上表,选用 5μg/mL 作为低抗筛选同源重组子的硫链丝菌素抗性浓度。

2.2 大肠杆菌质粒 pYYE04a1 的构建与鉴定

构建大肠杆菌质粒 pYYE04a1;以 pSPORT1 为载体克隆 pESE701 上 4.1kb 的林可霉素生物合成基因,得到大小为 8.21kb 的重组质粒 pYYE03。将 1.1kb 的硫链丝菌素抗性基因先后克隆到载体 pUC21 和 pUC18 上,得到质粒 pYYE02a;分别为 Sac I 酶切 pYYE02a 和 pYYE03,将 pYYE02a 1.1kb 的外源片段与 pYYE03 8.1kb 的载体相连接,得到含被硫链丝菌素抗性基因灭活的部分林可霉素生物合成基因($\Delta lmbF lmbG lmbH lmbI lmbJ lmbK \Delta lmbL$)的重组质粒 pYYE04a1(图 1)。pYYE04a1 的酶切鉴定电泳图谱如图 2 所示。

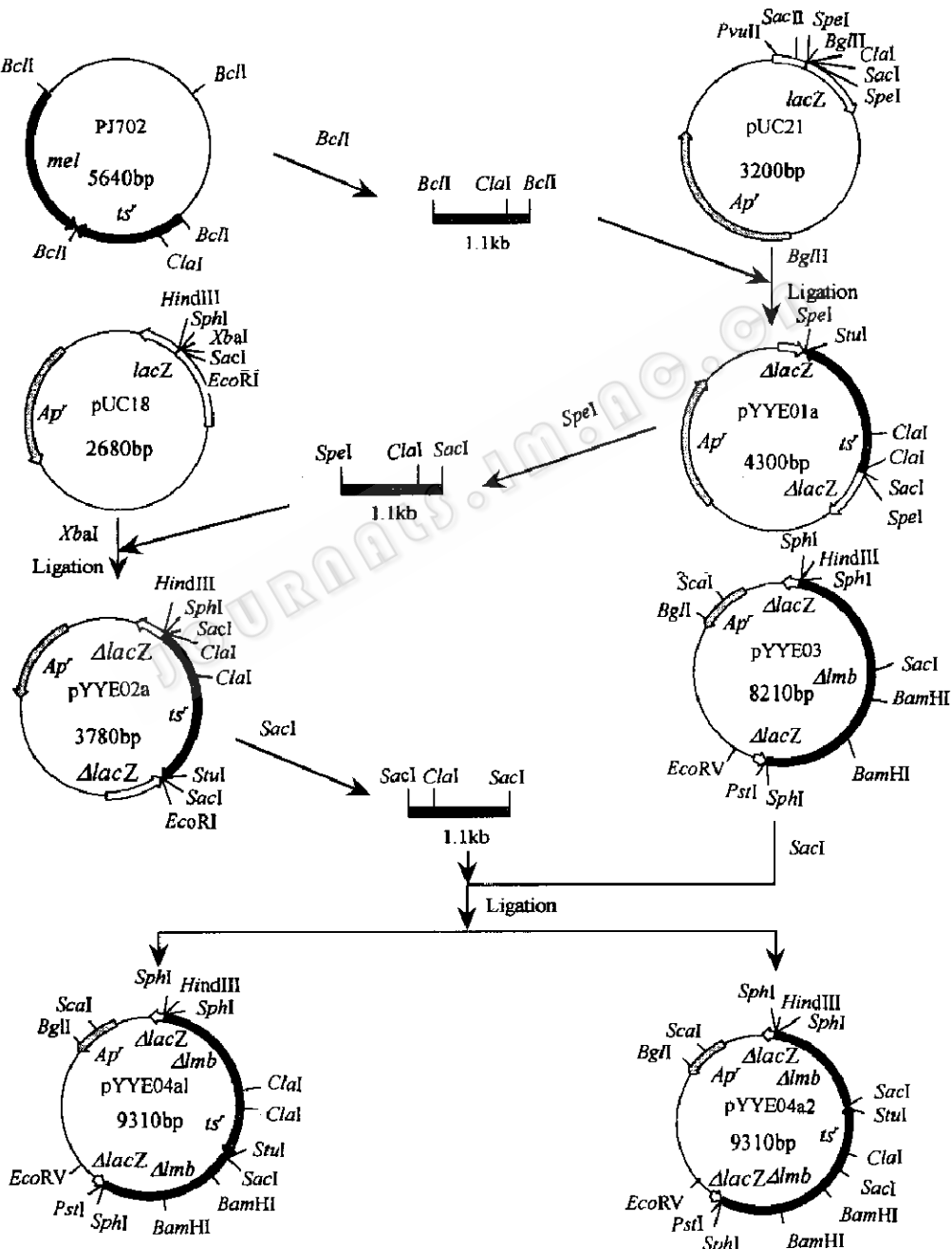


图 1 重组质粒 pYYE04a1 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pYYE04a1

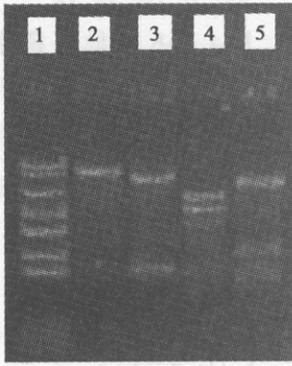


图 2 质粒 pYYE04a1 的酶切电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis of restriction fragments of pYYE04a1

pYYE04a1 enzymatic fragments:
1. Maker: 1.1kb + 1.6kb + 2.6kb + 4.1kb + 6.8kb + 10kb + 17kb; 2. *Pst* I : 9.3kb;
3. *Sac* I : 1.1kb + 8.2kb;
4. *Hind* III + *Pst* I : 4.1kb + 5.1kb;
5. *Bam* HI: 0.8kb + 1.5kb + 6.95kb.

2.3 *S. lincolnensis* B48 同源重组子的筛选与鉴定

2.3.1 pYYE04a1 转化 *S. lincolnensis* B48 及低硫链丝菌素抗性筛选: 用纯化的大肠杆菌质粒 pYYE04a1 约 200 μ L 分次转化 *S. lincolnensis* B48 原生质体, 将转化液涂布于 R₂ YE 平板上, 于 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 16 ~ 20h. 用 2.5 ~ 3.0mL 含 50 μ g/mL 硫链丝菌素的 SNA 覆盖后, 30 $^{\circ}$ C 继续培养 5 ~ 6d, R₂ YE 平板上长出转化子菌落。将转化子挑至无抗 SMA 平板上, *S. lincolnensis* B48 作为对照。30 $^{\circ}$ C 培养待长出孢子后, 将转化子挑至含 5 μ g/mL 硫链丝菌素的 SMA 平板上。培养 3 ~ 4d 后, 其中两个菌落已长出浓密的孢子, 分别命名为 *S. lincolnensis* YY1 和 *S. lincolnensis* YY2, 而其它菌落(包括标准对照菌)则生长不良(可能是在低抗环境下产生的诱导抗性)。

2.3.2 Southern 杂交: 从 *S. lincolnensis* YY2、*S. lincolnensis* YY1、*S. lincolnensis* B48 对照菌及从转化子中随意挑出的菌落 *S. lincolnensis* YYc 四个链霉菌菌株中制备原生质体。分别抽提四个菌株的染色体 DNA。

用 *Cla* I 酶切质粒 pYYE01a 得到 0.8kb 和 3.5kb 的两个片段, 其中 0.8kb 的片段中含有硫链丝菌素抗性基因并用 DIG 标记试剂盒进行标记。用 *Sma* I 分别酶切四种染色体 DNA 和 pIJ702 (图 3)。68 $^{\circ}$ C 杂交 5h(杂交液中含有 8 μ L 硫链丝菌素抗性基因探针), 检测显色(图 3)。与含硫链丝菌素抗性基因的探针杂交,

pIJ702 的 *Sma* I 酶切片段得到 4.2kb 的阳性条带, *S. lincolnensis* YY1 和 *S. lincolnensis* YY2 的酶切指纹图谱都得到 1.5kb 大小的阳性带, 而对照 *S. lincolnensis* 和 *S. lincolnensis* YYc 却无任何阳性条带。与 pYYE04a1 质粒图谱(图 1)的对比, 用 *Sma* I 酶切 pYYE04a1 确实得到 1.5kb 大小含硫链丝菌素抗性基因的片段, 这说明 *S. lincolnensis* YY1 和 *S. lincolnensis* YY2 的染色体上都含有硫链丝菌素抗性基因, 证明它们为同源重组子。

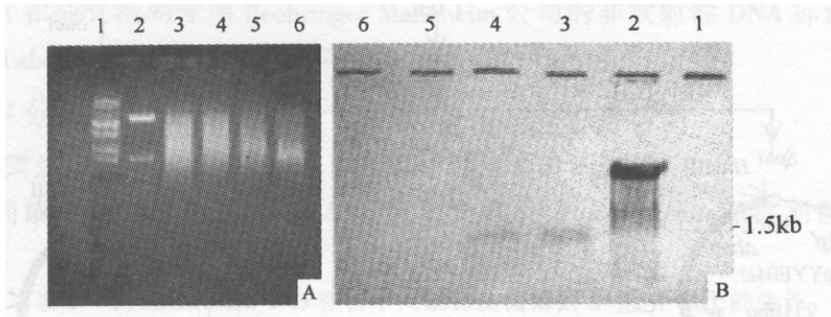


图 3 酶切图谱(A)和以 *ts'* 为探针的 Southern 杂交分析(B)

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis (A) and Southern hybridization analysis with the probe of *ts'* (B)

1. Marker: 1.1kb + 1.6kb + 2.6kb + 4.1kb + 6.8kb + 10kb + 17kb; 2. pIJ702(*Sma* I); 3. *S. lincolnensis* YY2(*Sma* I);
4. *S. lincolnensis* YY1(*Sma* I); 5. *S. lincolnensis* YYc(*Sma* I); 6. *S. lincolnensis* B48(*Sma* I).

用 *Hind* III 和 *Bgl* II 联合酶切质粒 pSPORT1, 得到 0.2kb、1.26kb 和 2.6kb 大小的片段, 按上法制得含 $\Delta lacOPZ'$ 的 0.2kb 的探针。与含 $\Delta lacOPZ'$ 基因的探针杂交(杂交液中含有 $10\mu L \Delta lacOPZ'$ 基因探针), pSPORT1 的 *Hind* III 和 *Sma* I 酶切片段得到 4.1kb 的阳性条带, *S. lincolnensis* YY2 的酶切指纹图谱得到 4.4kb 大小的阳性条带, 而其它皆无阳性(图 4), 对比 pYYE04a1 的质粒图谱(图 1), 若它整合到染色体上, 那么用 *Hind* III 和 *Sma* I 联合酶切将得到以上阳性带, 说明 *S. lincolnensis* YY2 的染色体上含有基因 $\Delta lacOPZ'$, 证明它是同源整合子。

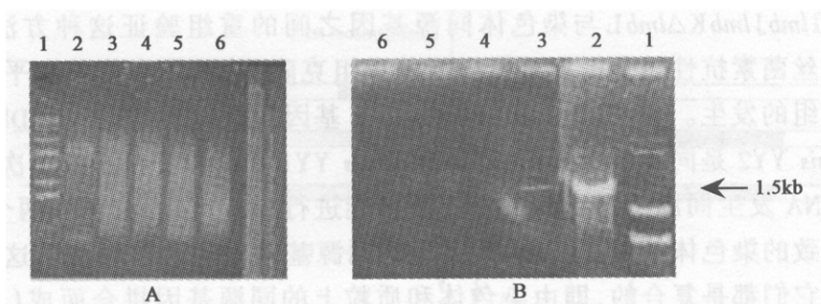


图 4 酶切图谱(A)和以 $\Delta lacZ'$ 为探针的 Southern 杂交分析(B)

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis(A) and Southern hybridization analysis with the probe of $\Delta lacZ'$

1. Marker: 1.1kb + 1.6kb + 2.6kb + 4.1kb + 6.8kb + 10kb + 17kb; 2. pSPORT1 (*Hind* III + *Sma* I);

3. *S. lincolnensis* YY2 (*Hind* III + *Sma* I); 4. *S. lincolnensis* YY1 (*Hind* III + *Sma* I);

5. *S. lincolnensis* YYc (*Hind* III + *Sma* I); 6. *S. lincolnensis* B48 (*Hind* III + *Sma* I)

2.3.3 整合染色体上大肠杆菌质粒的

回收: 取 *S. lincolnensis* YY2 的染色体 $78\mu L$, 用 *Sph* I 酶切后取 $10\mu L$ 电泳鉴定, 染色体呈指纹图谱状, 沉淀后用 $12\mu L$ 无菌双蒸水溶解, 加入连接酶 $4^\circ C$ 连接反应 12h, 取 $8\mu L$ 连接液转化新鲜制备的大肠杆菌感受态细胞, 转化液涂布含 $100\mu g/mL$ 的氨苄板过夜培养, 第二天发现氨苄板上长出了两个单克隆, 划线扩增后快抽质粒, 酶切鉴定。图 5 为质粒图谱与酶切鉴定图谱。结果表明, 染色体回收的质粒含有大肠杆菌复制子及氨苄抗性基因, 能够在氨苄板上生长, 且质粒的酶切位点分布与理论预测一致。

2.3.4 同源重组率的计算: 以每 30ng pIJ702

转化 *S. lincolnensis* B48 约得到 10^3 个转化子计, $2\mu g$ 大肠杆菌质粒转化 *S. lincolnensis* B48 应得到 $7 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ 个转化子, 经过鉴定后确证有 2 个同源重组子, 因此同源重组率为 $1.2 \times 10^{-5} \sim 1.4 \times 10^{-5}$ 。

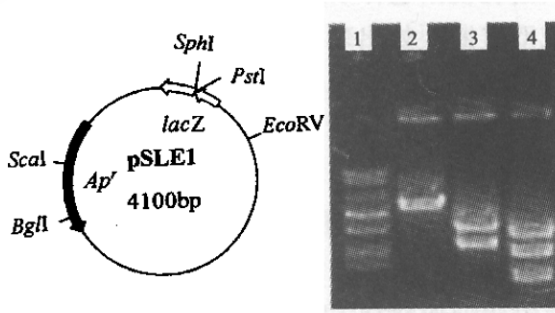


图 5 pSLE1 的质粒图谱与酶切电泳图谱

Fig. 5 Restriction map of pSLE1 and electrophoresis of restriction fragments of pSLE1

pSLE1 enzymatic fragments 1. Marker: 1.1kb + 1.6kb

+ 2.6kb + 4.1kb + 6.8kb + 10kb + 17kb; 2. *pst* I: 4.1kb;

3. *Sca* I + *Eco* RV: 2.47kb + 1.65kb; 4. *Bgl* I + *Eco* RV:

0.7kb + 1.3kb + 2.1kb.

3 讨论

用同源重组的方法增加林可霉素合成关键酶基因的拷贝数,建立了一个有效并可普遍应用的同源重组系统,以无法在链霉菌中复制的大肠杆菌质粒转化林可霉素生产菌 *S. lincolnensis* B48 原生质体,这种方法要求:(1)质粒上携带的基因与染色体的基因具有同源性;(2)利用插入同源基因中部使之灭活的抗性基因作为标记筛选发生同源重组的菌株。

本文以被硫链丝菌素抗性基因灭活的林可霉素生物合成基因 $\Delta lmbF lmbG lmbH lmbI lmbJ lmbK \Delta lmbL$ 与染色体同源基因之间的重组验证这种方法的可行性。对于在低硫链丝菌素抗性转化板上可能出现的重组克隆,从遗传和分子水平等不同角度验证了同源重组的发生。分别以 ts' 和缺失的 *lacZ* 基因为探针杂交染色体 DNA 的结果表明 *S. lincolnensis* YY2 是同源整合子而 *S. lincolnensis* YY1 是同源交换子或二次重组子。质粒和染色体 DNA 发生同源重组得到的整合子可能进行二次重组,它产生两个结果,即与发生重组前一致的染色体结构及含被 ts' 灭活的同源基因的染色体结构。这两种结构共同的特点在于它们都是复合的,即由染色体和质粒上的同源基因拼合而成(图 6)。由于我们尚未确定重组发生的精确位点,因而无法判断 *S. lincolnensis* YY1 是同源整合子发生二次重组的产物还是同源交换子,因为它们可能属于模式图中的(a)。

从分子水平上讲,以 RecA 蛋白促进 DNA 形成稳定的同源重组产物要求至少一个底物具有自由的单链末端。质粒在细胞中主要以环状双链 DNA 的形式存在,也有很少部分的线性形式。对于染色体而言,在复制和修复过程中可能出现瞬时单链切口或缺口,在旋转酶促使染色体 DNA 负超螺旋化的过程中会形成瞬时双链断裂处。当以上的切口、缺口或双链断裂处出现在同源基因内部时,自由的 3'-OH 为同源重组提供了充分条件,质粒和染色体之间主要通过 RecERecF 途径进行重组。

使用大肠杆菌重组质粒转化链霉菌以获得同源重组子的优点非常明显,首先,它可以广泛应用于野生菌株,不需要使用 *polA*, *recBCsbcB* 或 *recD* 缺陷型的菌株,唯一对受体菌的要求是它应为可有效发生重组的菌株。使用无法在链霉菌内复制的大肠杆菌复制子,使得质粒只能在生长初期滞留在菌体内,同源重组就是在此时发生的。随着菌体不停生长分裂而质粒却无法复制,传代若干次后,质粒几乎消失,有利于后续利用低抗进行筛选;而且以大肠杆菌质粒为载体,使得质粒的构建转化筛选十分简单方便。其次,使用负超螺旋的环状 DNA 比线状 DNA 更有优势。因为当线状 DNA 进入细胞后易被细胞核酸酶,尤其是 RecBCD 和 *Exo I* 酶降解^[7]。在 RecA 蛋白质帮助下形成的异源双链区极不稳定,而负超螺旋通过内部贮存能量的释放使之稳定,对异源双链的形成有促进作用。而且就转化率而言,利用共价闭合质粒也可以避免线性 DNA 的低效转化。再次,用硫链丝菌素抗性基因作为筛选标记,可以简单直接地获得可能发生同源重组的菌株,以便进一步从分子水平上用杂交进行验证,为一些非表型基因或不易测活的基因重组提供了有利条件。此法还具有的一个特点就在于质粒无法以高拷贝形式存在于菌体内,对于一些高剂量会对细胞产生影响或毒害作用的基因而言,这是一个很好的解决问题的方法,而本方法的局限性也恰恰在于质粒在链霉菌内无法复制,因而使得重组率受转化频率和整合频率的共同影响。

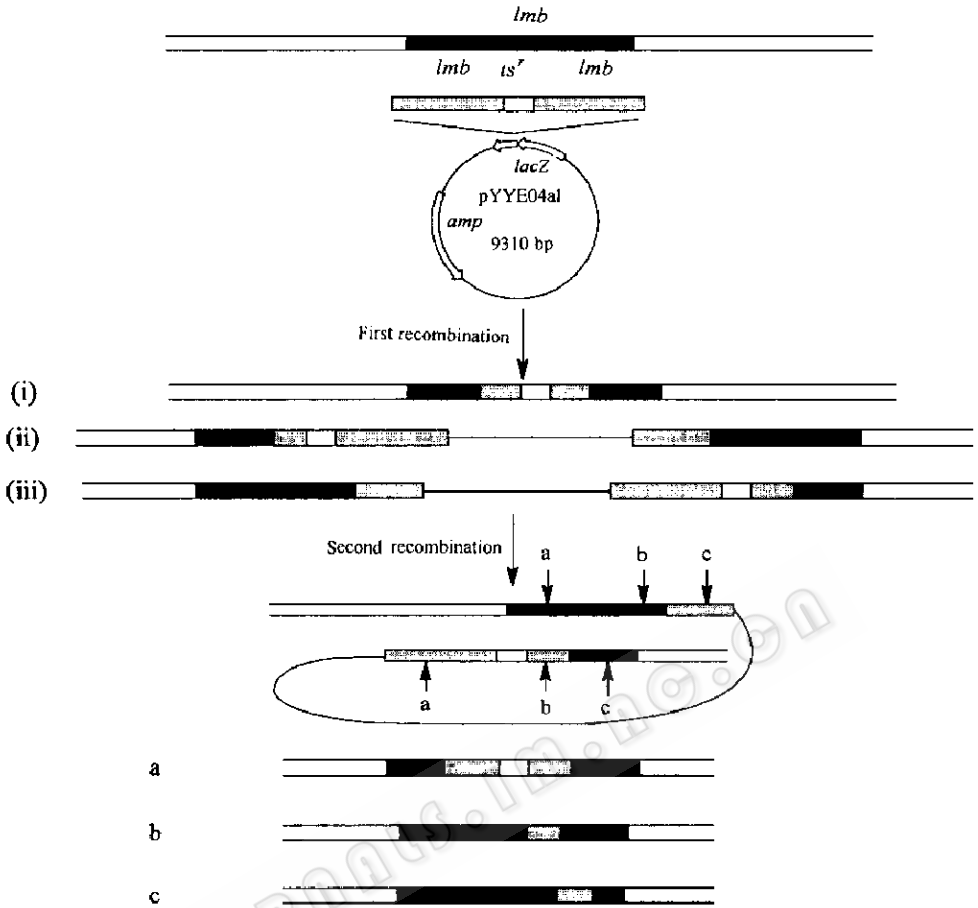


图 6 质粒和染色体的同源重组

Fig.6 Homologous recombination between plasmid and chromosome

a,b,c indicates difference sites of second recombination

本方法的应用面很广泛,例如,为研究生物体的一些复杂功能,可用突变进行遗传及生化分析及研究。为避免基因多拷贝表达的蛋白质影响细胞正常功能,要求突变的基因在无野生菌基因下以正常剂量存在,使用本方法,可用突变基因置换染色体基因进行生化或行为实验以验证基因功能。再者,还可以通过逐步提高抗生素浓度筛选出质粒以多拷贝形式整合到染色体上的菌株,以检测它对生物过程的影响^[4]。还可以利用本法中质粒和染色体间的同源重组,将原本染色体上不存在而质粒载体上携带的基因随质粒整合到染色体上,可以设计新的代谢途径,进行代谢工程的研究。

参 考 文 献

[1] 张长生,张惠展,姚 峰,等. 中国抗生素杂志,1999,24(1):90~92.
[2] Hamilton C M, Aldea M, Washburn B K, et al. J Bacteriol, 1989,171:4617~4622.
[3] Hillemann D, Puhler A, Wohlleben W. Nucleic Acids Res, 1991,19:727~731.
[4] Guttererson N I, Koshland D E. Proc Natl Acad Sci, 1983,80:4894~4898.
[5] Hopwood D A, Bibb M J, Chater T, et al. Genetic Manipulation of Streptomyces. A laboratory Manual. London: The John Innes Foundation, 1985.

- [6] Zhang H, Schmidt H, Piepersberg W. *Mol Microbiol*, 1992, 6: 2147 ~ 2157.
- [7] Hanahan D. Mechanisms of DNA transformation. In: Neidhardt F C. ed. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987. 1177 ~ 1183.

HOMOLOGOUS RECOMBINATION IN *STREPTOMYCES* *LINCOLNENSIS* B48

Tang Yajun Wu Haizhen Ye Jiang Zhang Huizhan

(State Key Laboratory of Bio-reactor and Engineering, ECUST, Shanghai 200237, China)

Abstract: To study frequency and mechanism of homologous recombination in *Streptomyces*, an *E. coli* plasmid which cannot replicate in *Streptomyces* was transformed into *Streptomyces lincolnensis* B48. After homologous recombination between delta lincomycin biosynthetic genes inactivated by thiostrepton resistant gene (*ts'*) carried on pYYE04a1 and homologous sequences on the chromosome, *S. lincolnensis* YY1 and *S. lincolnensis* YY2 were obtained on SMA with low thiostrepton concentration. Hybridization of chromosomal DNA samples of *S. lincolnensis* YY1, *S. lincolnensis* YY2, standard *S. lincolnensis* and *S. lincolnensis* YYc digested with *Sma*I with the probe of *ts'* gene gave signal corresponding to a fragment of 1.5kb in the former two; Nevertheless, hybridization of chromosomal DNA digested with *Hind*III and *Sma*I using the probe of $\Delta lacZ'$ gene resulted in positive fragment of 4.4kb only in *S. lincolnensis* YY2. Southern hybridizations indicate that *S. lincolnensis* YY1 is the result of homologous exchange while *S. lincolnensis* YY2 comes from homologous recombination. To prove the existence of *E. coli* replicon and ampicillin resistant gene on the chromosome of *S. lincolnensis* YY2, its DNA digested with *Sph*I was ligated and then transformed into *E. coli* JM83 competent cell. Two transformants named pSLE1 grew on the plate containing ampicillin. It's confirmed that pSLE1 is a part of pYYE04a1 from its digestion with different enzymes.

Key words: *Streptomyces lincolnensis*, Homologous recombination, Homologous integration, Homologous exchange