

黑暗链霉菌 DNA 转移系统的建立^{*}

夏焕章 吴 胜

(沈阳药科大学生物制药系 沈阳 110016)

摘 要 :研究了黑暗链霉菌的基因转移系统,探索了通过 PEG-介导的原生质体转化、接合转移向黑暗链霉菌中转入外源 DNA 的可能性。多次尝试用质粒 pIJ702 转化黑暗链霉菌 9904 原生质体均未成功。对原生质体进行“热处理”后转化、利用单链 DNA 转化等都不能将质粒导入黑暗链霉菌中,表明黑暗链霉菌对外源 DNA 有很强的限制修饰作用。利用接合转移将具有 *oriT* 的大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pHZ132 转入大肠杆菌 ET1256(λ pUZ8002)中,获得供体菌 ET1256(λ pUZ8002, pHZ132)。将供体菌与预萌发的黑暗链霉菌 9904 的孢子进行接合转移,成功地将 pHZ132 转入黑暗链霉菌 9904 中。质粒 pHZ132 经黑暗链霉菌自身修饰后也可转入黑暗链霉菌 9904 菌株的原生质体中,转化率约为 $10^3/\mu\text{g DNA}(\text{pHZ132})$ 。

关键词 :黑暗链霉菌,转化,接合转移

中图分类号 :Q933 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2002)02-0181-05

黑暗链霉菌可以产生多组分氨基糖苷类抗生素,主要是安普霉素、氨甲酰妥布霉素和氨甲酰卡那霉素 B 三个组分,其中安普霉素具有独特的八碳糖结构。为了克隆安普霉素生物合成基因和研究基因的功能,有必要建立其 DNA 转移系统。建立宿主自身的基因转移系统是抗生素生物合成基因的鉴定、分析和其它遗传操作的前提。对抗生素生物合成基因簇中单个基因的功能进行分析需要将基因导入到亲本宿主中,破坏或置换其中的某个基因,然后观察和检测该基因被破坏后的亲本菌株产生抗生素的情况。本论文旨在建立黑暗链霉菌的基因转移系统,研究通过原生质体转化和接合转移的方法向黑暗链霉菌中转入外源 DNA 的可能性。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 ET1256(λ pUZ8002)由本校何建勇副教授惠赠。黑暗链霉菌 H6 为安普霉素产生菌,本实验室保藏。黑暗链霉菌 9904 为本研究通过 NTG 诱变获得。变铅青链霉菌 TK24。链霉菌质粒 pIJ702(λ *mel*⁺, *tsr*^R)、大肠杆菌—链霉菌双功能穿梭质粒 pHZ132(λ *Ap*^R, *tsr*^R, *oriT*, *rep*^{ts})由医科院医药生物研究所王以光教授惠赠。

1.2 培养基和缓冲液

CP 菌丝培养基参见文献 [1], R₂ YE 培养基参见文献 [2], MS 培养基:甘露醇 20,黄豆粉 20,琼脂 20, H₂O 1000mL,使用前加入终浓度为 10mmol/L 的 MgCl₂。P 缓冲液和 T 缓冲液参见文献 [2]。

^{*} 国家自然科学基金资助项目(39700003)

作者简介:夏焕章(1965-)男,辽宁省清原县人,博士,副教授,主要从事微生物药物生物合成基因的研究。

收稿日期:2001-07-13,修回日期:2001-10-30

1.3 试剂

抗生素 硫链丝菌素为 Sigma 公司产品。限制性内切酶、T4-DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品。PEG-1000 为日本进口分装。

1.4 原生质体制备、再生和质粒 DNA 的提取^[1,2]

1.5 质粒的转化

按 Hopwood 的方法^[2]用质粒 DNA 转化原生质体。

1.6 接合转移的方法

将含有 *oriT* 的大肠杆菌—链霉菌穿梭质粒 pHZ132 转入大肠杆菌 ET12567(pUZ8002) 中,得到供体菌株大肠杆菌 ET12567(pUZ8002 ,pHZ132)。挑取大肠杆菌 ET12567(pUZ8002 , pHZ132)单菌落,接种于 3mL LB 培养基(加入作用浓度为 25 μ g/mL 卡那霉素 B 和氯霉素以及 50 μ g/mL 氨苄青霉素)中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,按 0.1% 的比例转接到 20mL 新鲜的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$,离心沉淀菌体,用新鲜的 LB 培养基洗涤菌体两次,最后将菌体悬浮于 1mL 培养基中。制备黑暗链霉菌 9904 单孢子悬液,用 2 \times YT 培养基洗涤 2 次,50 $^{\circ}$ C 热激活 10min,冷却至室温。将处理好的供体与黑暗链霉菌 9904 孢子悬液各 0.5mL 于 eppendorf 管中混合,离心沉淀,用少量的残液悬浮后涂布在 MS 培养基上。28 $^{\circ}$ C 培养 24h,用 1mL 含硫链丝菌素和蔡啶酸(作用浓度均为 50 μ g/mL)的水溶液覆盖。28 $^{\circ}$ C 培养 6d 后检查平板上长出的菌落。

2 结果

2.1 对硫链丝菌素敏感的黑暗链霉菌 9904 的获得

黑暗链霉菌 H6 产生安普霉素、氨甲酰妥布霉素和氨甲酰卡那霉素 B 三个组分,对链霉菌载体上的常用的选择性标记如:硫链丝菌素、红霉素、紫霉素、博来霉素、卡那霉素等都有较高的抗性。为了获得一株合适的受体菌株,采用 NTG 对黑暗链霉菌 H6 进行诱变处理,经大量筛选获得一株对硫链丝菌素敏感的菌株 9904,而且该菌株只产生安普霉素,不产生氨甲酰妥布霉素和氨甲酰卡那霉素 B,可用于分析安普霉素生物合成基因功能。以该菌株作为 DNA 转化的受体菌。

2.2 pIJ702 转化黑暗链霉菌 9904 原生质体

用从变铅青链霉菌 TK24 中分离的质粒 pIJ702 按 Hopwood 的方法^[2]转化黑暗链霉菌 9904 原生质体,没有得到转化子。鉴于广泛宿主的质粒 pIJ702 不能直接转化黑暗链霉菌 9904,对影响原生质体转化的各种因素以及热休克衰减 DNA 酶活力等因素进行了系统的试验,结果见表 1。

上述结果说明链霉菌属中常用的 DNA 转化原生质体法对于黑暗链霉菌并不适合,需要利用和建立其他方法。

2.3 利用接合转移将质粒 pHZ132 转入黑暗链霉菌 9904

用 1.6 节所述方法将质粒 pHZ132 接合转移入黑暗链霉菌 9904 中,将在含硫链丝菌素和蔡啶酸(作用浓度均为 50 μ g/mL)平板上长出的菌落传代,接种到含硫链丝菌素和蔡啶酸(作用浓度均为 50 μ g/mL)的液体 CP 培养基中,28 $^{\circ}$ C 培养 48h。收集菌丝体,按碱变性

表 1 质粒 pIJ702 转化黑暗链霉菌 9904 原生质体的条件试验

Table 1 Transformation conditions of *S. tenebrarius* 9904 protoplasts with plasmid pIJ702

Factor	Condition	Transformant
Standarding transformation	protoplast transformation was carried out as described by Hopwood ^[2] .	No
Concentration of PEG1000	25%, 30%, 40%, 50% PEG1000 concentration.	No
Buffer	transformation protoplast with P buffer or T buffer.	No
Heat treatment	protoplast was treatmented 5, 10, 15min at 55℃ differencely before transformation protoplast.	No
Transformation with single strand DNA	transformation protoplast after pIJ702 was denatured to single strand DNA.	No

方法提取质粒,电泳检测没有发现明显的质粒区带。用此提取液转化黑暗链霉菌 9904 原生质体,仍没有获得转化子。但用此提取液转化大肠杆菌 DH-5α 感受态细胞时,得到了少量氨苄青霉素抗性菌株,从这些菌株提取到质粒,大小与 pHZ132 相同,经 *Eco*RI-*Hind*Ⅲ 双酶切证实该质粒就是 pHZ132(图 1)。以上结果证明利用接合转移法已经成功地将 pHZ132 从大肠杆菌转入到黑暗链霉菌 9904 中。

为进一步确证上述结果,将报告基因 *xylE* 连同红霉素抗性基因(*erm*)从 pXZ1 上用 *Bgl*Ⅱ 切入,回收 3.0kb 的片段。将此片段插入到 pHZ132 的 *Bam*HI 位点,构建重组质粒 pXZ2(图 2)。将此质粒转入大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002) 中,获得供体菌大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002, pXZ2)。将供体菌大肠杆菌 ET12567(pUZ8002, pXZ2)和黑暗链霉菌 9904 进行接合转移,获得了硫链丝菌素抗性菌株。将无色的邻苯二酚溶液滴加到接合转移获得的黑暗链霉菌 9904 硫链丝菌素抗性菌落上,菌落很快变成黄色(图略),而黑暗链霉菌 9904 菌落不变色。颜色反应直观地表明质粒 pXZ2 已转入黑暗链霉菌 9904 菌株中,*xylE* 基因在黑暗链霉菌中获得表达。

2.4 用经黑暗链霉菌自身修饰的质粒可以转化黑暗链霉菌 9904 的原生质体

虽然用碱变性法不能直接从黑暗链霉菌 9904 的接合转化子中分离到质粒,但用此提取液转化大肠杆菌 DH-5α 可以获得了转化子,并从中分离到质粒 pHZ132。用此经黑暗链霉菌 9904 修饰的质粒 pHZ132 与直接来自大肠杆菌的质粒 pHZ132 同时转化黑暗链霉菌

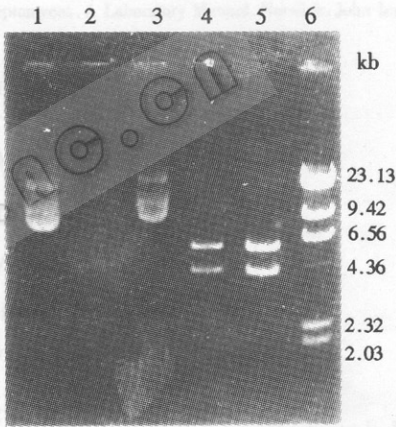


图 1 黑暗链霉菌 9904 接合子中质粒 DNA 的酶切分析

Fig. 1 Electrophoresis analysiss and restriction endonuclease analysis of *S. tenebrarius* 9904 conjugant

1. pHZ132 (control); 2. Alkaline lysates of *S. tenebrarius* 9904 conjugant; 3. The plasmid from *E. coli* DH-5α Amp^R transformants with alkaline lysates of *S. tenebrarius* 9904 conjugant; 4. *Eco*RI-*Hind*Ⅲ digested plasmid from *E. coli* DH-5α Amp^R transformants with alkaline lysates of *S. tenebrarius* 9904 conjugant; 5. pHZ132/*Eco*RI-*Hind*Ⅲ; 6. λDNA/*Hind*Ⅲ.

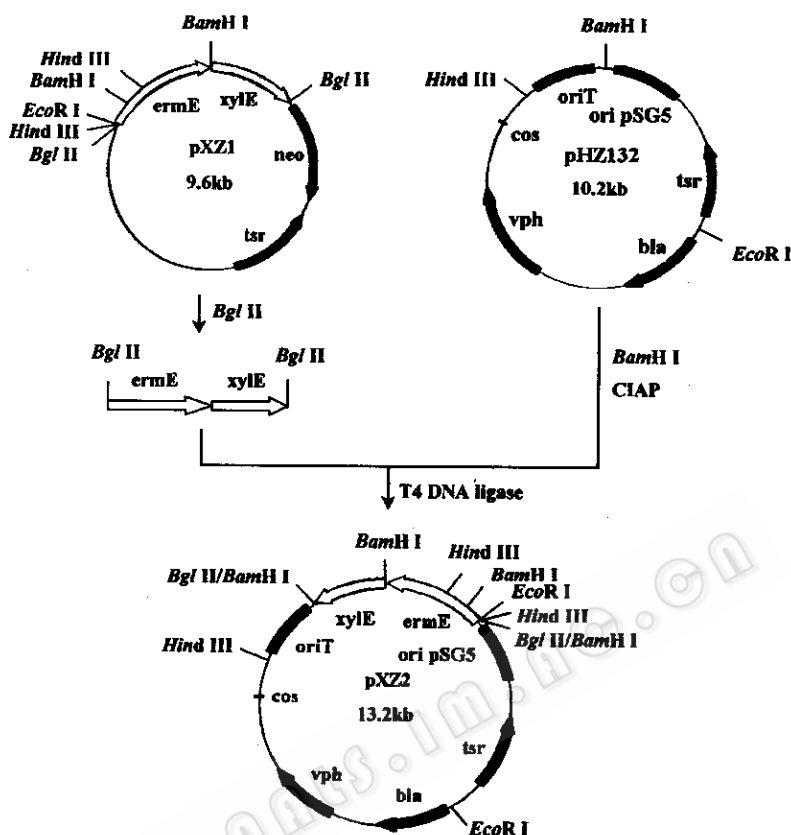


图2 重组质粒 pXZ2 的构建

Fig.2 Construction of recombinant plasmid pXZ2

9904 的原生质体,结果只有前者获得了硫链丝菌素抗性菌株。用碱变性法从这些菌株中分离质粒时,提取液经电泳检测无明显质粒带。但通过转化大肠杆菌 DH-5 α ,分离质粒,酶切鉴定,证明这些抗性菌株即转化子。转化效率约 10^3 转化子/ μ g DNA(pHZ132)。

3 讨论

黑暗链霉菌对外源 DNA 表现出很强的限制性,用质粒直接转化原生质体无法获得转化子。接合转移则可以将质粒 pHZ132 导入黑暗链霉菌中,尽管转化效率很低。用经黑暗链霉菌自身修饰的质粒转化原生质体也获得成功,转化率约 10^3 转化子/ μ g pHZ132DNA。黑暗链霉菌基因转移系统的建立,使有关基因破坏和基因置换的工作能够得以进行,为克隆和分析安普霉素生物合成基因的研究工作奠定了基础。

通过接合转移和抗药性选择获得了硫链丝菌的抗性菌株,用碱变性方法却不能从这些菌株中分离到质粒 DNA。由于一个接合平板上可获得几十个至上百个抗性菌株,检测黑暗链霉菌 9904 自发产生抗性突变的频率很低,菌株对硫链丝菌素的抗性更可能是抗性基因的获得及表达引起的,即质粒已转入到细胞中。pHZ132 上的链霉菌复制子来自

pSG5 文献报道 pSG5 及其衍生质粒在变铅青链霉菌中的拷贝数是 40 ~ 50 ,属于中等拷贝数质粒^[3] ,但 pHZ132 在黑暗链霉菌中的拷贝数很低。同一质粒在不同的宿主中拷贝数不同 ,有时甚至差别很大 ,这一现象也曾在其它的链霉菌中发现过。尽管 pHZ132 在黑暗链霉菌中拷贝数低 ,但结构稳定 ,未发现有诸如缺失等结构改变的现象发生。来自恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的 *xylE* 基因编码产生邻苯二酚 2,3-双加氧酶 ,该酶可将无色的邻苯二酚转化成黄色的 2-羟粘糖酸半醛。*xylE* 作为一种报告基因已被用于多种链霉菌中^[4]。我们的实验证明 *xylE* 可以在黑暗链霉菌表达 ,而且通过颜色反应直观地表明 pHZ132 通过接合转移可以成功地导入黑暗链霉菌中。

参 考 文 献

- [1] 吴 胜 ,夏焕章 .沈阳药科大学学报 ,2001 ,18(3) :213 ~ 216 .
- [2] Hopwood D A ,Bibb M J ,Chater K F ,et al . Genetic Manipulation of Streptomyces . A Laboratory Manual . Norwich :John Innes Foundation ,1985 .
- [3] Muth G ,Nubbaumer B ,Wohlleben W . Mol Gen Genet ,1989 ,219 :341 ~ 348 .
- [4] Ingram C ,Brawner M ,Youngman P ,et al . J Bacteriol ,1989 ,171 :6617 ~ 6624 .

Construction of DNA Transfer System of *Streptomyces tenebrarius*

Xia Huangzhang Wu Sheng

(Department of Biopharmaceutics ,Shenyang Pharmaceutical University ,Shenyang 110016 ,China)

Abstract : To establish a gene transfer system in *Streptomyces tenebrarius* , several methods including PEG-mediated transformation of protoplasts ,conjugal transfer were investigated . Many attempts were made to introduce plasmid pIJ702 into *Streptomyces tenebrarius* . It was found that plasmid pIJ702 isolated from *S. lividans* TK24 failed to transform the protoplasts of *Streptomyces tenebrarius* . No transformant was achieved even if the protoplast was inactivated by heat treatment or dsDNA was converted ssDNA before transformation . All the results suggested that *Streptomyces tenebrarius* exists a strong restriction and modification system for the transformation of foreign DNA . A recombinant *E. coli* ET12567 (pUZ8002 ,pHZ132) was obtained by transforming *E. coli* ET12567 (pUZ8002) with oriT-containing *E. coli*-*Streptomyces* shuttle plasmid pHZ132 . In mating experiments ,*E. coli* ET12567 (pUZ8002 ,pHZ132) was the donor ,and the recipient was *Streptomyces tenebrarius* 9904 spores after pregerminating by heat shock . Matings between donor and recipient were conducted . Plasmid pHZ132 was introduced into *Streptomyces tenebrarius* 9904 by conjugation from *E. coli* ET12567 . The transfer system of *Streptomyces tenebrarius* was established by conjugation . *S. tenebrarius* 9904 protoplasts were transformed by plasmid DNA modified by the host itself ,and the transformation frequency was about $10^3/\mu\text{g DNA (pHZ132)}$.

Key words : *Streptomyces tenebrarius* , Transformation , Conjugation