

# 阿维链霉菌中 *aveD* 基因缺失对阿维菌素合成的影响\*

陈 芝 文 莹 宋 渊 李季伦

( 中国农业大学生物学院微生物学系 北京 100094 )

**摘 要** 利用 *aveD* 基因的缺失载体 pCZ8( pKC1139:: $\Delta$ *aveD* )对阿维菌素( Avermectin )产生菌阿维链霉菌( *Streptomyces avermitilis* )76-9 的 *aveD* 基因进行缺失获得 *aveD* 缺失突变株。经摇瓶发酵和 HPLC 检测 ,发现该突变株只产生阿维菌素 B 组分。说明将阿维链霉菌的 *aveD* 基因缺失 ,并不影响下游 *aveF* 的表达。缺失突变株的阿维菌素的总产量与出发菌株的总产量基本相同 ,突变株中 B1 的产量略有提高 ,阿维菌素 B2 的含量显著提高。

**关键词** 阿维链霉菌 , *aveD* 基因缺失 , 阿维菌素 B

中图分类号 :Q939.13 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209( 2002 )05-0534-05

阿维菌素是由阿维链霉菌产生的一类结构相似的十六元环大环内酯齐墩果糖双糖衍生物 ,共有八个组分 ,分别命名为 A1a ,A1b ,A2a ,A2b ,B1a ,B1b ,B2a 和 B2b ,其中 a 组分含量占 80% 以上 ,b 组分含量少于 20%<sup>[1]</sup>。阿维菌素 B1 的杀虫活性最强 ,但毒性较大 ,阿维菌素 B1 的 C22-23 位加氢还原产物称为伊维菌素( Ivermectin ) ,具有相同的杀虫活性 ,但毒性低<sup>[2]</sup>。由于阿维菌素和伊维菌素具有高效、低毒、广谱的杀虫特性 ,自 80 年代上市以来被广泛用于农业和畜牧业 ,产生了巨大的经济效益。

大约 50% 的阿维菌素在 C5 为 OH 基团 ,即阿维菌素 B 组分 ,其余的在 C5 为氧甲基 ,即为阿维菌素 A 组分。阿维菌素 B 组分向 A 组分的转化是由 *aveD* 基因编码的阿维菌素 B 5-O-甲基转移酶催化的 ,由 S-腺苷甲硫氨酸提供甲基<sup>[3]</sup>。由于阿维菌素 B 组分的杀虫活性高于 A 组分 ,阿维菌素 B1 组分又是伊维菌素的原料药 ,因此阿维菌素 B 组分在工业上有更大的应用价值。我们曾企图通过 *aveD* 的插入失活来获得仅产阿维菌素 B 组分的突变株 ,但 *aveD* 与 *aveF* 属于同一个顺反子 ,由于极性效应 ,插入失活也造成了下游的 *aveF* 基因也不能表达 ,形成的是产生 C5-氧-阿维菌素 B 的突变株<sup>[4]</sup>。为避免极性效应 ,我们对 *aveD* 进行了基因缺失 ,结果获得了仅产阿维菌素 B 的突变株。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒** :大肠杆菌质粒 ,pMD 18-T vector ,T 载体 ,由 pUC18 衍生 ,TaKaRa 公司产品。pKC1139<sup>[5]</sup> ,大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 ,安普霉素抗性对大肠杆菌和链霉菌均有选择作用 ,链霉菌的复制子为温敏型 ,温度高于 34℃ 不能进行自主复制 ,*lacZ'* 基因在大肠杆菌中

\* 国家“九五”科技攻关项目( 96-C01-02-03 )

作者简介 陈 芝( 1974 - ) ,女 ,江苏邳州人 ,中国农业大学生物学院微生物系博士生 ,主要从事链霉菌发酵和遗传学研究。

收稿日期 2001-11-23 ,修回日期 2002-01-08

可用于蓝白筛选。

**1.1.2 菌株** :大肠杆菌 DH5 $\alpha$  ,阿维链霉菌 76-9 均由本室保存。

**1.1.3 工具酶** :限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、Taq 酶和连接酶购自华美生物工程公司、MBI 公司、Promega 公司和大连 TaKaRa 公司。

**1.1.4 培养基和抗生素** :大肠杆菌培养基为 LB<sup>[6]</sup>。阿维链霉菌高渗液体培养基为改良 YEME(蔗糖浓度为 25%) ,原生质体再生培养基为 RM14<sup>[7]</sup> ,阿维链霉菌固体产孢培养基为 YMS<sup>[8]</sup> 种子培养基 :可溶性淀粉 30 克 酵母膏 4 克 大豆蛋白胨 2 克 ,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 mg ,定容至 1L。发酵培养基 :可溶性淀粉 酵母粉 ,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O ,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ,CaCO<sub>3</sub> ,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O。LB 培养基中含氨苄青霉素 100 $\mu$ g/mL ,或安普霉素 100 $\mu$ g/mL ,安普霉素也可为 10 $\mu$ g/mL 的 G-418 代替。YMS、YEME 和 RM14 培养基中安普霉素的含量分别为 10 $\mu$ g/mL、5 $\mu$ g/mL 和 20 $\mu$ g/mL。

## 1.2 方法

**1.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化及常规的 DNA 克隆操作**见《分子克隆》<sup>[6]</sup>。链霉菌的质粒提取和总 DNA 的提取见《链霉菌遗传操作手册》<sup>[9]</sup>。阿维链霉菌原生质体制备及转化见文献<sup>[7]</sup>。DNA 的序列测定由 TaKaRa 公司完成。

**1.2.2 引物设计及 PCR 技术** :设计引物扩增自 *aveD* 起始密码子上游 107bp 至终止密码子下游 63bp 的序列。引物 1 :5'-GGGGTGTCTGCATAGCTCG-3' ,引物 2 :5'-GTGAGCG-GCGCGTCGACAG-3' 扩增产物为 987bp。由大连 TaKaRa 公司合成。PCR 条件 :96 $^{\circ}$ C ,1min ; 60 $^{\circ}$ C ,1min 72 $^{\circ}$ C ,1min。25 个循环。

**1.2.3 出发菌株和缺失突变株的阿维菌素发酵产物的单位**采用 HPLC 法进行检测<sup>[10]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 *aveD* 基因缺失载体的构建和转化

以 76-9 的总 DNA 为模板 ,PCR 扩增出 987bp 的 *aveD* 基因。连接于 pMD18-T 载体的 *lacZ'* 基因的多克隆位点上 ,得质粒 pCZ4。测序验证后 ,*Nae* I 酶切去除 *aveD* 基因内部的约 260bp 的 *Nae* I 片段 ,余下 *aveD* 基因的 5'端为 350bp ,3'端为 370bp ,自连得质粒 pCZ6。*Eco*RI 和 *Hin*dIII 双酶切 ,回收约 0.75kb 的酶切片段与经 *Eco*RI 和 *Hin*dIII 双酶切的载体 pKC1139 相连得 *aveD* 基因缺失载体 pCZ8(质粒的构建过程见图 1)。将在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中构建好的 pCZ8 转化 *S. avermitilis* 76-9 的原生质体 ,在 RM14 再生培养基上生长 18h 后 ,加入安普霉素 28 $^{\circ}$ C 培养 10d。挑取转化子在 YMS + 安普霉素平板上培养恢复产孢。提取质粒 ,酶切验证与来自 *E. coli* DH5 $\alpha$  的质粒完全相同。

### 2.2 缺失突变株的筛选

经验证的 76-9/pCZ8 在 YMS + 安普霉素的平板上培养 ,收集孢子 ,制备孢子悬液。以每培养皿约 100 个孢子涂布于 YMS + 安普霉素的平板上 ,28 $^{\circ}$ C 培养 48 ~ 72h ,菌落直径约 2mm 左右。即将形成气生菌丝时 ,将平板移至 39 $^{\circ}$ C 培养 7 ~ 10d。长出的菌落为单交换突变株 ,将单交换突变株在不添加抗生素的 YMS 平板上传代 ,筛选 Apm<sup>s</sup> 的双交换重组体。

### 2.3 缺失突变株的验证

随机挑取缺失突变株 4 个 ,分别在不加抗生素的 YEME 培养基中于 39 $^{\circ}$ C 振荡培养

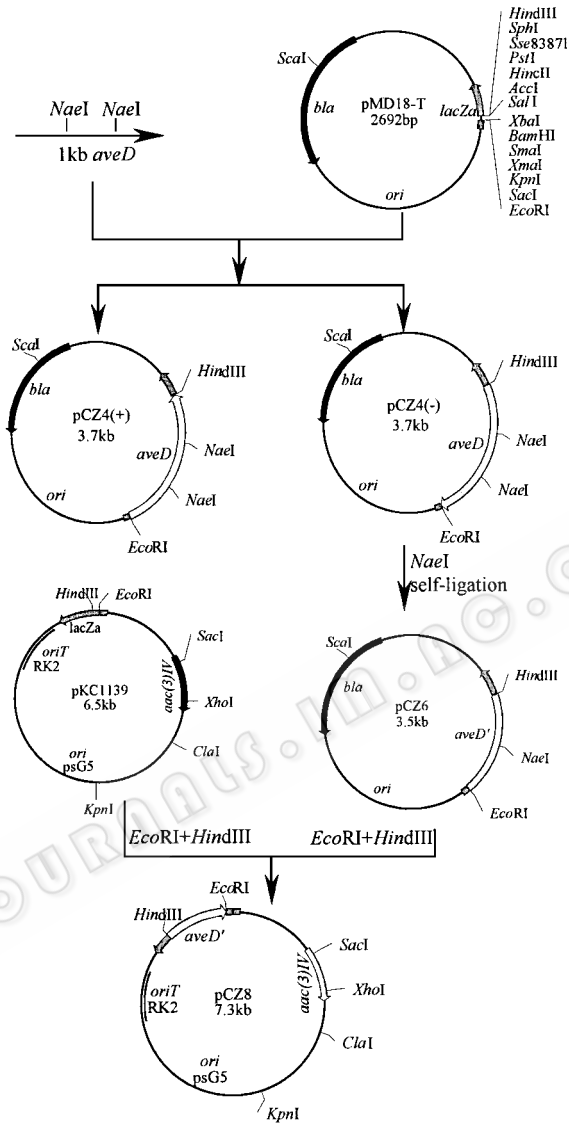


图1 质粒 pCZ8 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pCZ8

48h,同时在不加抗生素的 YEME 中接种 76-9,28℃培养 48h,均未能从突变体的菌丝体中提取出 质粒,说明质粒已通过同源重组整合到染色体上。提取 76-9 和缺失突变株的总 DNA,分别以各突变株及 76-9 的总 DNA 为模板,以 *aveD* 的引物进行 PCR 扩增,76-9 的 PCR 产物约为 1kb,缺失突变株的 PCR 产物应为 0.72kb,证明所选的均为正确的缺失突变株。如图 2。

### 2.3 破坏子的发酵结果

将经 PCR 验证后的 *aveD* 的缺失突变株与 76-9 分别进行摇瓶发酵实验,结果是 76-9 产生 8 个组分的阿维菌素, A1a, A1b, B1a, B1b, A2a, A2b, B2a, B2b (图 3A)。基因缺失突变

株均仅产生四种组分,分别为阿维菌素 B1a, B1b, B2a, B2b(图 3B)。

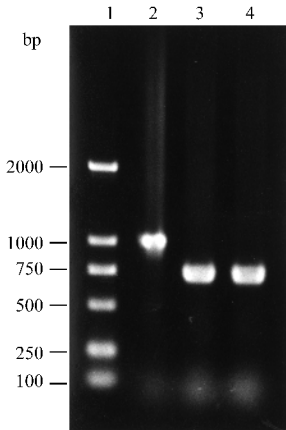


图 2 76-9 和 *aveD* 缺失突变株的 PCR 产物电泳图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR product from *aveD* gene deletion mutants and 76-9

1. DL 2 000 marker ; 2.76-9 ;  
3~4. Gene deletion mutants.

缺失突变株的阿维菌素总产量为  $1688\mu\text{g/mL}$  ,其中阿维菌素 B1 为  $754\mu\text{g/mL}$  ,与出发菌株 76-9 的阿维菌素总产量和阿维菌素 B1 相比稍高,分别是 76-9 的 112.5%和 116.2%。在缺失突变株中,阿维菌素的 B2 组分由 76-9 中总产量的 15% 骤然上升至总产量的 50%。这是由于在 76-9 的发酵产物中, A1 为少量组分,占 8.6%, A2 为大量组分,占 34.5% ,在缺失突变株中,由于 *aveD* 基因不能表达,发酵产物阻断在阿维菌素 B 组分。B1 由于不能向 A1 转化,产量稍有提高,而 B2 不能向 A2 组分转化,产量提高显著。

### 3 讨论

Ikeda 等用 NTG 对 *aveD* 诱发点突变,使其编码的 C5-氧-甲基转移酶的第 23 位 Thr 为 Ile 取代,该突变株仅产生阿维菌素 B<sup>[31]</sup>。在阿维菌素的生物合成过程中,*aveF* 基因编码的酮基还原酶先将 C5 位酮基还原成 OH,然后再由 *aveD* 基因编码的 C5-氧-甲基转移酶对 OH 进行甲基化而生成阿维菌素 A。*aveD* 基因点突变造成甲基化酶的失活,并未影响 *aveF* 的共转录,因而只产生阿维菌素 B。本试验对 *aveD* 基因内部进行缺失,并不影响下游的 *aveF* 的共转录和表达,产物也是阿维菌素 B,而且缺失突变株的阿维菌素的总产量和阿维菌素 B 的产量均较出发菌株高。突变株仅在 *aveD* 基因内引入缺失,并不影响其它的性状,由于缺失突变是通过同源双交换完成的,菌株不会发生进一步的重组,因此比较

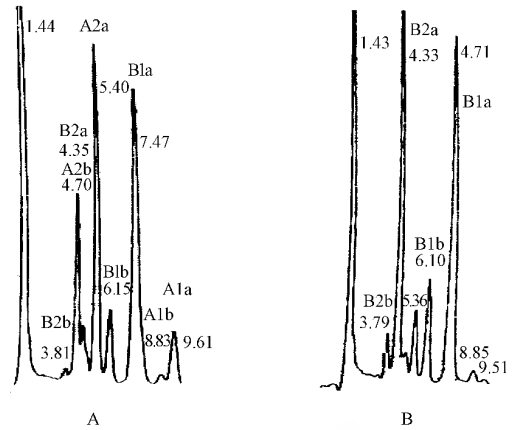


图 3 76-9 和 *aveD* 基因缺失突变株的发酵产物的 HPLC 分析图谱

Fig.3 HPLC chromatogram of mycelial extracts from 76-9 and *aveD* gene deletion mutant

- A. 76-9 ; B. Gene deletion mutant.

The mycelia from 1mL culture were extracted with 4 volume of methanol for half an hour. A portion of the extract was directly applied to HPLC. The column packed with C18 ( $10\mu\text{m}$ ;  $4.6\text{ i. d. mm} \times 150\text{mm}$ ) was developed with methanol-water (85:15) and the flow rate was 1.0 mL/minute. Avermectins were detected by UV absorption at 246nm.

稳定。此项研究为进一步遗传改造阿维菌素打下了基础。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Brug R W , Miller B M , Baker E E , *et al.* *Antimicrob Agents Chemother* ,1979 ,**15** 361 ~ 367 .
- [ 2 ] Campbell W C. Ivermectin and Abamectin. New York :Springer ,1989 .
- [ 3 ] Ikeda H , Wang R-L ,Ohta T , *et al.* *Gene* ,1998 ,**206** :175 ~ 180 .
- [ 4 ] 陈 芝 宋 渊 文 莹 等 .微生物学报 2001 **41** ( 4 ) 440 ~ 446 .
- [ 5 ] Bierman M , Logan r , O 'Brien K , *et al.* *Gene* ,1992 ,**116** :43 ~ 49 .
- [ 6 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *molecular Cloning. A Laboratory Manual* . 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor laboratory Press ,1989 .
- [ 7 ] MacNeil D J , Klapko L M. *J Ind Microbiol* ,1987 ,**2** :209 ~ 218 .
- [ 8 ] Ikeda H , Kotaki H , Tanaka H , *et al.* *Antimicrob Agents Chemother* ,1988 ,**32** ( 2 ) :282 ~ 284 .
- [ 9 ] Hopwood D A , Bibb M J , Chater K K ( 邓子新等译 ) . 链霉菌遗传操作实验手册 . 长沙 :湖南科学技术出版社 ,1985 .
- [ 10 ] 宋 渊 ,曹贵明 ,陈 芝 等 .生物工程学报 2000 ,**16** ( 1 ) 31 ~ 35 .

## Effect of Gene Deletion of *aveD* on Avermectins Production in *Streptomyces avermitilis*\*

Chen Zhi Wen Ying Song Yuan Li Jilun

( Department of Microbiology , College of Biological Sciences , China Agricultural university , Beijing 100094 )

**Abstract** : Gene deletion vector pCZ8( pKC1139:: $\Delta$ *aveD* ) was used in *Streptomyces avermitilis* 76-9. *aveD* gene in the chromosome was displaced by deletion allele on the plasmid via double crossover. Disruptants were assued by PCR. Shaking flask experiments and HPLC analysis showed that the mutants produced only four components , which were avermectin B1a , B1b , B2a , B2b. This revealed that *aveD* deletion didn 't affect the expression of *aveF* . In the mutants the production of avermectin B1 improved slightly and B2 improved greatly .

**Key words** : *Streptomyces avermitilis* , *aveD* , Gene deletion , Avermectin B

\* Project of Chinese National programs for Science and Technology Development( 96-C01-02-03 )