

地中海拟无枝菌酸菌 U32 染色体特性的脉冲场电泳分析

马 伟 姚玉峰 姜卫红 焦瑞身 赵国屏*

(中国科学院上海植物生理生态研究所 上海 200032)

摘 要 地中海拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*) U32 是产力复霉素 SV 的工业生产菌株。采用脉冲场电泳分析发现,地中海拟无枝菌酸菌 U32 仅有一条约 10 Mb 的线性染色体,没有内源性质粒。利用 Southern 杂交法,对 11 个编码力复霉素生物合成、相关初级、次级代谢关键酶以及调控蛋白的基因,在 U32 染色体 DNA 的 *Psh*BI 酶切片段上进行了定位。分析发现在一条长度约 700kb 的 *Psh*BI 酶切片段上,分别存在着力复霉素合成基因簇(*rif*)、氮代谢的亚硝酸还原酶小亚基基因(*nasD*)、衔接初级与次级代谢的甲基丙二酰变位酶基因(*mcm*)、脂肪酸代谢的乙酰辅酶 A 羧化酶生物素载体蛋白基因(*accA*)以及一套核糖体 RNA 转录单元。同时还发现 U32 至少有 5 套核糖体 RNA 转录单元。其余定位的基因均只出现单一杂交信号。

关键词 地中海拟无枝菌酸菌 U32 基因组大小 染色体构型 基因定位

中图分类号:Q754 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)06-0769-07

物种的基因组特征包括基因组大小、染色体构型、以及保守基因在染色体上的排列规律等,这些特点往往与物种类型、代谢与营养方式等生物学特性密切相关。微生物是种类最丰富、适应性最为广泛的一大类群,其基因组的多样性尤为突出。直到 20 世纪 90 年代初,人们还普遍认为真核生物的染色体为线性,原核生物只拥有一条环状染色体,自从 Baril 等人^[1]首先在 *Borrelia burgdorferi* 中发现线性染色体之后,在链霉菌属^[2]、红菌球菌属^[3]以及土壤杆菌等属^[4]中也发现了线性染色体的存在。线性染色体的复制以及基因组稳定性保持机制目前仍不十分清楚。本工作所选用的地中海拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*) U32 属于拟无枝菌酸菌属,该属于 20 世纪 80 年代发表,在分类上与链霉菌属、诺卡氏菌属以及分支杆菌属相近,分类地位较为特殊。同时,U32 是重要抗生素——力复霉素的产生菌,国内外多个实验室已分别完成了该菌的 60 余个重要基因的测序和功能研究工作^[5],这些基因中有初级代谢、次级代谢和力复霉素合成的调控基因等。本工作拟对 U32 在染色体水平上进行研究,以期进一步了解该菌的基因组特征,以及与力复霉素合成关系密切的初级、次级代谢关键基因在染色体上的分布规律等。

1 材料和方法

1.1 菌种

地中海拟无枝菌酸菌 U32 (*A. mediterranei* U32, 以下简称 U32)为力复霉素 SV 的产

基金项目 国家自然科学基金重点资助项目(10039630010)

* 通讯作者。Tel: 86-21-64042090; Fax: 86-21-64062385; E-mail: wjiang@iris.sipp.ac.cn 或 gpzhao@sibs.ac.cn

作者简介:马 伟(1965-)男,上海市人,博士,现在上海交通大学生命学院从事植物功能基因组研究。E-mail: wma@sjtu.edu.cn

收稿日期 2003-03-12, 修回日期:2003-07-11

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

生菌 ,*Escherichia coli* S17-1、 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 等为本实验室保存。

1.2 培养基

E. coli 采用 LB 液体或固体培养基于 37℃ 培养 ,U32 的固体培养基为本氏培养基^[6]、液体培养基为 YEME 培养基 ,*S. coelicolor* A3(2) 固体培养基为 R₂YE ,液体培养采用 YEME^[7]。

1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Dra*I、*Psh*BI 购自 TaKaRa 公司 ;探针标记采用 Promega 公司的 Prime-a-gene labeling system ;同位素[α -³²P]-dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司 ;尼龙膜购自 Boehringer Mannheim 公司 ;高分子量 DNA marker 购自 Bio-Rad ;其余生化试剂购自 Promega、华美、Sangon 等公司。PFGE 采用 Bio-Rad CHEF DR III 型脉冲场电泳仪(Richmond , California)进行。

1.4 脉冲场电泳(Pulse Field Gel Electrophoresis ,PFGE)样品制备

按照文献 [2] 方法加以改进 ,采用比色法对包埋的菌体浓度进行定量 ,一般包埋在 1% 低熔点琼脂糖中菌体终浓度控制在 OD₆₀₀ 1.0~6.0 ,使制成的样品中的 DNA 浓度适合后续的原位酶切和 PFGE 实验。经 2mg/mL 的溶菌酶在 37℃ 水浴中轻轻振荡 2h ,以消化细菌的细胞壁 ,然后采用 1mg/mL 的蛋白酶 K 或 SDS 在 60℃ 条件下处理 48h ,中间视样品透明程度更换 1~3 次缓冲液。最后用 TE 缓冲液洗涤 4 次每次轻摇 1h。

1.5 染色体构型分析样品的制备

按照文献 [2,8] 方法 ,对包埋于低熔点琼脂糖中的 S17-1、U32、A3(2) 样品经相同的溶菌酶处理后 ,分别采用蛋白酶 K、1% SDS、1% SDS + 蛋白酶 K 等在 60℃ 条件下处理 48h ,以分别获得保留染色体上共价结合蛋白(SDS 处理)和完全去除染色体上共价结合蛋白(蛋白酶 K 处理)的样品。

1.6 基因定位

转膜按照文献 [9] 方法操作 ,样品在 PFGE 结束后 ,经脱嘌呤和碱变性后 ,在碱性条件

表 1 U32 基因定位的探针

Gene	Abbreviation	Source or GenBank Number
Acetyl CoA carboxylase BCCP	<i>accA</i>	AF486580
Alanine dehydrogenase	<i>alh</i>	This work
Glutamine synthetase	<i>glnA</i>	AF050112
3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthase	<i>ahbA</i>	AF040570
16S ribosome RNA	16S rDNA	X76957
3-deoxy D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase isoenzymes	<i>dahp</i>	AF336847
6-phospho-glucose dehydrogenase	<i>g6p</i>	This work
Methylmalonyl-CoA mutase	<i>mcm</i>	AF117980
Nitrite reductase small subunit	<i>nasD</i>	AF331073
Recombination repairing protein	<i>recA</i>	AF208682
Rifamycin biosynthesis negative regulatory protein (putative)	<i>rifO</i>	AF040570

下用毛细管转移法将 DNA 转移至尼龙膜,在本实验室已克隆的基因中挑选了 11 个基因进行了定位,具体见表 1。探针采用随机引物法进行同位素标记(Promega 公司的 Prime-a-gene labeling system),然后按照文献[10]方法,进行 Southern 杂交。

2 结果

2.1 地中海拟无枝菌酸菌 U32 染色体拓扑学结构分析

对包埋于低熔点胶中的菌体在消化细胞壁后,分别用蛋白酶 K 和 1% 的 SDS 进行处理,就能够获得仍保留共价结合蛋白(SDS 处理)和完全去除各种蛋白(蛋白酶 K 处理)的完整染色体 DNA 样品^[2]。在 PFGE 过程中,线性 DNA 大分子能够在凝胶中运动,而高分子量的环状超螺旋 DNA(大于 500kb)则无法离开上样孔进入凝胶^[4,11],利用线性与环状超螺旋 DNA 分子在 PFGE 时所表型出来的不同运动特征,可以鉴定 DNA 分子的构型^[8]。

已知 *E. coli* 和 *S. coelicolor* A3(2)的染色体分别为环状和线性结构^[4,12]。从图 1 可以看到除了在 1、2、7、8 泳道可以在 2.2 Mb 处看到一条 DNA 带外,其余泳道均无 DNA 带出现。说明 U32 采用蛋白酶 K 制备的染色体的 PFGE 规律与 *S. coelicolor* A3(2)相一致,可以确定 U32 的基因组由一条线性的染色体组成。同时,由于 SDS 制备的 U32 与 *S. coelicolor* A3(2)染色体 DNA 样品的 PFGE 运动规律又与 *E. coli* 一致,即当保留染色体上的共价结合蛋白时,即 U32 与 *S. coelicolor* 的染色体是环状超螺旋的, U32 的线性染色体很可能与多数链霉菌一样是通过染色体末端序列与末端蛋白共价结合,而使染色体成为环状^[2,6]。

2.2 U32 染色体全长测定及稀有切点酶酶切谱分析

由于 U32 基因组的(G+C)%含量在 70% 以上,故选用 *Ase* I、*Dra* I、*PhsB* I、*Swa* I 和 *Pac* I 等识别 6~8 个 AT 碱基的内切酶对 U32 完整染色体 DNA 进行了原位酶切,然后进行脉冲场电泳分析。每种样品分别采用涵盖 2 kb~6.0 Mb 的 4~5 种脉冲场电泳条件进行分析。每种条件至少重复 3 次。实验发现 *Dra* I 和 *PshB* I 的酶切片断的数量及大小范围较为合适,故染色体全长测定及基因定位主要使用这两种内切酶。*Dra* I 酶切结果见图 2,限于篇幅,仅显示部分电泳结果,*Dra* I 酶切片断中最小的 2.6 kb,未显示。图 2

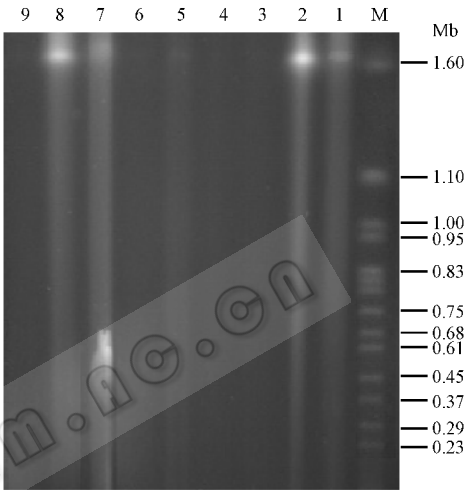


图 1 *A. mediterranei* U32 染色体构型分析
Fig.1 Analysis of *A. mediterranei* U32 chromosome topological structure

M: *S. cerevisiae* DNA marker; 1. Chromosome DNA of *S. coelicolor* A3(2) prepared by proteinase K; 2. Chromosome DNA of *A. mediterranei* U32 prepared by proteinase K; 3. Chromosome DNA of *E. coli* S17-1 prepared by proteinase K; 4. Chromosome DNA of *S. coelicolor* A3(2) prepared by SDS; 5. Chromosome DNA of *A. mediterranei* U32 prepared by SDS; 6. Chromosome DNA of *E. coli* S17-1 prepared by SDS; 7. Chromosome DNA of *S. coelicolor* A3(2) prepared by SDS and proteinase K; 8. Chromosome DNA of *A. mediterranei* U32 prepared by SDS and proteinase K; 9. Chromosome DNA of *E. coli* S17-1 prepared by SDS and proteinase K.

经 *Psh*B I 酶切的结果见图 3。在 *Psh*B I 酶切片段的电泳结果中,发现 471.1 kb 和 309.9 kb 位置的 DNA 片段的亮度和带宽明显高于附近的其他片段,经定量分析确定它们的 DNA 量是其他大小相近片段的两倍,因此推测 471.1 kb 和 309.9 kb 各由两条大小相同或相似的片段组成。

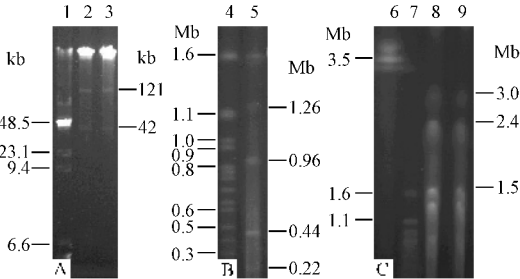


图 2 U32 染色体 DNA *Dra* I 酶切的 PFGE
Fig.2 PFGE of U32 chromosomal DNA digested by *Dra* I
A : PFGE at :120°, 6 V/cm , 10 ~ 50 s , 11 h ;
B : PFGE at :120°, 6 V/cm , 60 ~ 120 s , 24 h ;
C : PFGE at :106° 3 V/cm , 1800 s , 72 h .
1. λDNA + λDNA/*Hind* III marker ;
4 and 7. *S. cerevisiae* marker ;
6. *S. pombe* marker ;
2 , 3 , 5 , 8 and 9. U32 Chromosome digested by *Dra* I .

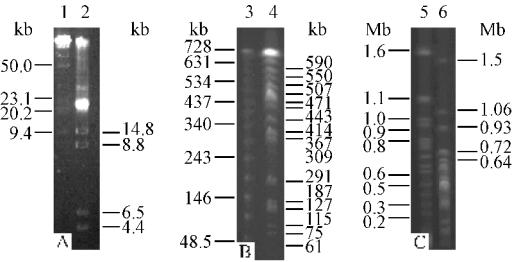


图 3 U32 染色体 DNA *Psh*B I 酶切的 PFGE
Fig. 3 PFGE of U32 chromosomal DNA digested by *Psh*B I
A : PFGE at :120°, 6 V/cm , 10 ~ 50 s , 11 h ;
B : PFGE at :120°, 6 V/cm , 50 ~ 90 s , 22 h ;
C : PFGE at :106° 6 V/cm , 60 ~ 120 s , 24 h .
1. λDNA + λDNA/*Hind* III marker ; 3. λDNA ladder ;
5. *S. cerevisiae* marker ;
2 , 4 and 6. U32 Chromosome digested by *Psh*B I .

表 2 U32 染色体全长测定		
Table 2 U32 chromosome size		
Enzyme	Number of fragments	Sum of all fragments /kb
<i>Psh</i> B I	25	10174.8
<i>Dra</i> I	10	9988.0
Average length of U32 Chromosome kb		10081.4

根据两种酶切的 PFGE 结果,参照高分子量标准 DNA Marker ,可以计算出 U32 染色体大小(表 2),实验结果表明 U32 染色体大小约为 10Mb。

2.3 基因定位

在本实验室和国内外其他实验室已克隆的地中海拟无枝菌酸菌基因^[5]中,选择编码初级代谢、次级代谢中的关键酶及其调控蛋白的基因,采用 Southern 杂交方法对这些基因进行了酶切片段的定位。首先采用 4 种不同的脉冲场电泳条件分别分离经 *Psh*B I 酶切的 U32 染色体 DNA 样品,在碱性条件下转膜,再用同位素标记的探针分别进行杂交,以确定各基因所在的酶切片段。基因定位探针见表 1,结果见表 3 和图 4。从图 4 中可以看到,在长为 700 kb 的 D 片段上出现了 *acc*、*ahbas*、16S rDNA、*nasD*、*mcm*、*rifO* 等基因的杂交信号。16S rDNA 基因出现了多个杂交信号,经对其他 3 种不同分离条件的杂交结果(结果未显示)的分析确认,共有 5 个杂交信号。对 *S. coelicolor*、*S. lividans*^[13,14]等核糖体转录单元(*rrn*)序列分析确认,在 *S. coelicolor* 和 *S. lividansrrn* 的 *rrn* 基因序列中不存在 *Psh*B I 酶切位点,根据 *rrn* 的高度保守性以及放线菌核糖体基因成簇排列的特性,可以推断 U32 至少有 5 套 *rrn* 转录单位。而定位的其余 10 个基因均只

出现一个杂交信号。

表 3 在 *PshB* I 片段上的 U32 基因定位

Table 3 Gene localization on *PshB* I fragment of U32

Gene	Location on <i>PshB</i> I fragment
<i>accA</i>	D
<i>alh</i>	A
<i>glnA</i>	R
<i>ahbas</i>	D
16S rDNA	C , D , R , T , V
<i>dahp</i>	E
<i>g6p</i>	F
<i>mcm</i>	D
<i>nasD</i>	D
<i>recA</i>	E
<i>rifO</i>	D

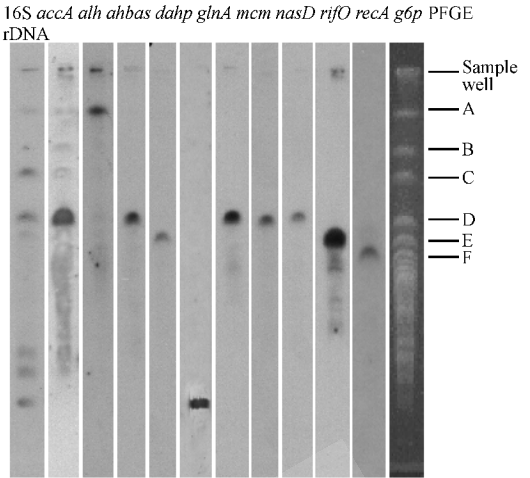


图 4 U32 基因定位 Southern 杂交

Fig. 4 Southern blot of U32 gene localization analysis by genomic

3 讨论

采用脉冲场电泳技术分析地中海拟无枝菌酸菌 U32 染色体发现 ,该菌仅含有一条染色体 ,染色体大小约为 10 Mb。链霉菌属的基因组一般在 8Mb 左右 ,如已完成全基因组测序的 *S. coelicolor* A3(2)基因组大小为 8.6Mb。Redenbach 2000 年报导^[15] ,同一属的 *A. orientalis* 基因组在 7 Mb 以上。U32 基因组大小在已报导的放线菌基因组中是最大的 ,比 A3(2)的基因组大了 16.3%。但由于 U32 是经长期人工选育的工业生产菌株 ,因此尚不能确定地中海拟无枝菌酸菌野生型菌株基因组的大小是否亦为 10 Mb。进一步对 U32 染色体的拓扑学结构分析发现 U32 染色体的构型为线性 ,同属的 *A. orientalis* 染色体亦为线性^[15] ,因此 ,线性染色体可能是拟无枝菌酸菌属所共有的特征。Redenbach 在研究了多种放线菌的染色体构型后 ,提出了一个菌体形态与染色体构型之间关系的假说 ,Redenbach 认为菌体呈丝状的放线菌 ,其染色体构型为线性 ,若菌体呈球形或索状则染色体为环状构型^[15]。U32 菌体为丝状 ,染色体为线性 ,该结果支持了 Redenbach 的观点。

August 等^[5]1998 年报导了地中海拟无枝菌酸菌的力复霉素合成基因簇的序列 ,基因簇全长近 95kb ,其中 *ahbs*、*rifO* 两个基因的位置靠近基因簇的两端 ,由于 *ahbs*、*rifO* 同时位于 U32 *PshB* I 酶切的 D 片段上 ,因此初步可以确定力复霉素合成基因簇位于该片段上 ,该酶切片段长度约为 700kb。在该片段上同时存在编码亚硝酸盐还原酶小亚基的基因 (*nasD*) \ 编码衔接初级与次级代谢的甲基丙二酰变位酶的基因 (*mcm*) \ 编码脂肪酸代谢关键酶的乙酰辅酶 A 羧化酶生物素载体蛋白的基因 (*accA*) ,以及一套核糖体 RNA 转录单元。这说明不仅力复霉素的合成基因成簇分布 ,同时编码与力复霉素合成关系密切的初级、次级代谢中的关键酶及其调控蛋白的基因也分布于力复霉素合成基因簇的附近。相关基因的这种空间分布格局可能与基因表达与调控有关。

16S rDNA 基因定位实验显示,在 U32 染色体的 5 条 *Psh*B I 酶切片段出现了杂交信号。根据 *rrn* 的保守性其他几种链霉菌 *rrn* 基因序列推测 U32 至少有五套 *rrn* 转录单位。文献报导 *S. lividans*、*S. coelicolor* 均有 6 套核糖体基因转录单元^[13,14]。本实验结果说明 U32 核糖体基因转录单元拷贝数与链霉菌属的情况接近。

参 考 文 献

- [1] Baril C , Richaud C , Baranton G , *et al.* Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi* . *Res Microbiol* , 1989 , **140** : 507 ~ 516 .
- [2] Lin Y H , Kieser H M , Hopwood D A , *et al.* The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear . *Mol Microbiol* , 1993 , **10** : 923 ~ 933 .
- [3] Crespi M , Messens E , Caplan A B , *et al.* Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokin synthesis gene . *EMBO J* , 1992 , **11** : 795 ~ 804 .
- [4] Allardet-Servent A , Michaux-Charachon S , Jumas-Bilak E , *et al.* Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome . *J Bacteriol* , 1993 , **175** : 7869 ~ 7874 .
- [5] August P R , Tang L , Yoon Y J , *et al.* Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin : deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699 . *Chem Biol* , 1998 , **5** (2) : 69 ~ 79 .
- [6] 黄健强 姜卫红 赵国屏 , 等 . 地中海拟无枝菌酸菌 U32 的 AHBAS 基因的克隆、测序和高效表达 . 生物工程学报 , 1999 , **15** : 160 ~ 165 .
- [7] Hopwood D A , Bibb M J , Chater K F , *et al.* Genetic Manipulation of *Streptomyces* : A Laboratory Manual . Norwich : John Innes , 1985 .
- [8] Lezhava A , Mizukami T , Kajitani T , *et al.* Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus* . *J Bacteriol* , 1995 , **177** : 6492 ~ 6498 .
- [9] Burmeister M , Ulanovsky L . Methods in Molecular Biology . In : Barlow D . ed . Preparation , restriction and hybridization analysis of mammalian genomic DNA for pulsed-field gel electrophoresis . Totowa : The Humana Press Inc , 1996 . 107 ~ 127 .
- [10] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular Cloning : A Laboratory Manual . 2nd ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 .
- [11] Walker E , Arnett M J K , Heath J D , *et al.* *Treponema pallidum* subsp *pallidum* has a single circular chromosome with a size of ~ 900 kilobase pairs . *Infect Immun* , 1991 , **59** : 2476 ~ 2478 .
- [12] Smith C L , Econome J G , Schutt A , *et al.* A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome . *Science* , 1987 , **236** (4807) : 1448 ~ 1453 .
- [13] Redenbach M , Kieser H M , Denapate D , *et al.* A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A 3 (2) chromosome . *Mol Microbiol* , 1996 , **21** : 77 ~ 96 .
- [14] Leblond P , Redenbach M , Cullum J . Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A , 3 (2) . *J Bacteriol* , 1993 , **175** : 3422 ~ 3429 .
- [15] Redenbach M , Scheel J , Schmidt U , *et al.* Chromosome topology and genome size of selected actinomycetes species . *Leeuwenhoek* , 2000 , **78** : 227 ~ 235 .

Characterization of *Amycolatopsis mediterranei* U32 Chromosome by Pulse-field Gel Electrophoresis

Ma Wei Yao Yufeng Jiang Weihong Jiao Ruishen Zhao Guoping*

(The Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology , Shanghai Institute of Biological Sciences ,
Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200032 , China)

Abstract : *Amycolatopsis mediterranei* U32 is an industrial strain with high yield of rifamycin SV . Its chromosome structure was characterized by pulse-field gel electrophoresis . The tonological structure

of U32 chromosome was linear and its genome size was about 10 Mb. There was no internal plasmid found. Gene encoding several enzymes involved in rifamycin bio-synthesis and relevant primary metabolism as well as protein related to metabolic regulation were localized by Southern blot. The results revealed that there were at least five copies of *rnn* operon in U32. The rifamycin bio-synthesis gene cluster was located on one about 700 kb *Psh*BI fragment where several other important genes related to primary and secondary metabolism were also situated. They were the *nasD* gene , the *mcm* gene encoding methylmalonyl CoA mutase , the *accA* gene encoding acetyl CoA carboxylase biotin carrier protein and one copy of the *rnn* operons .

Key words : *A. mediterranei* , Genome size , Chromosome topological structure , Gene localization

Foundation item : National Natural Science foundation of China (10039630010)

* Corresponding author . Tel : 86-21-64042090 ; Fax : 86-21-64042385 ; E-mail : wjiang@iris.sipp.ac.cn or gpzhao@sibs.ac.cn

Received date : 03-12-2003



The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

EDITOR-IN-CHIEF

Li Jilun Academician
(*College of Biology , Chinese Agricultural University , Beijing 100094 , China*)

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

Tan Huarong Professor
(*Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China*)

Lu Deru Professor
(*Institute of Genetics , Second Military Medical University , Shanghai 200433 , China*)

Wang Aoquan Professor
(*Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China*)

Qu Yinbo Professor
(*School of Life Science , Shandong University , Jinan 250100 , China*)

Xu Jianguo Professor
(*National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control , Chinese Center for Disease Control and Prevention , Beijing 102206 , China*)

MEMBERS OF THE BOARD

Cai Yongfeng	Chen Yongqing	Cheng Chi	Dong Xiuzhu	Fan Yunliu
Guo Jun	Hu Fuquan	Hu Yuanyang	Huang Li	Lu Chengping
Min Hang	Qian Shijun	Shao Yiming	Sheng Jun	Tang Hong
Tien Po	Wang Ping	Wang Huaming(USA)	Xie Hong	Yang Susheng
Zhai Zhonghe	Zhang Yaoping(USA)	Zheng Tianling	Zhu Baoquan	Zhuge Jian

MANAGING EDITORS

Wang Jinfang Wang Min