

阿维链霉菌 *bkdF* 的基因中断对阿维菌素合成的影响

朱浩君¹ 梁运祥^{1*} 周俊初¹ 郑应华²

(¹ 华中农业大学农业微生物重点实验室 武汉 430070)

(² 北京生物医药研究所 北京 100091)

摘 要: 以阿维菌素 B 组分菌株 *Streptomyces avermitilis* Bjbm0006 为出发菌株, 用 PCR 方法构建支链 α -酮酸脱氢酶基因 *bkdF* (Branched-chain α -keto acid dehydrogenase gene) 的重组质粒 pHJ5816 (pHZ1358/*bkdF*&Erm^r) 对其进行基因中断, 得到重组菌株 Bjbm5816。经 HPLC 检测和核磁共振分析发现, Bjbm5816 发酵产物产生的单一组分新化合物为 OligomycinA。

关键词: 阿维菌素 支链 α -酮酸脱氢酶基因 基因中断

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2004) 02-0194-04

阿维菌素是由阿维菌 (*Streptomyces avermitilis*) 产生的一类十六碳大环内酯齐墩果糖衍生物, 共 8 个组分, 分别为 A1a、A1b、A2a、A2b、B1a、B1b、B2a 和 B2b。C-25 位的基团是阿维菌素合成的起始单元, 由异亮氨酸或缬氨酸降解转化而来, 分别得到 a 组分和 b 组分, 支链 α -酮酸脱氢酶 (Branched-chain α -keto acid dehydrogenase, BCDH) 复合物参与 a 组分和 b 组分的合成。

1995 年 Pfizer 公司的 Skinner 等利用 *Pseudomonas putida* 的支链 α -酮酸脱氢酶基因 (*bkd*) 为异源探针克隆到 *S. avermitilis* 的 *bkdABC* 基因, 并在 *Escherichia coli* 中得到表达产物 EII $\alpha\beta$ 。因 *bkdABC* 的基因中断没有造成 *S. avermitilis* 表现型的改变, 所以在 *S. avermitilis* 31272 的表达系统中被认为是沉默基因^[1]。同年 Pfizer 公司的 Denoya 等综合了人、鼠、*Pseudomonas putida* 和 *Bacillus stearothermophilus* 的双复合体 PDH (Pyruvate dehydrogenase) / BCDH 基因的保守区序列, 设计出 PCR 引物, 用该 PCR 产物为探针克隆了 *S. avermitilis* 的 *bkdFGH* 基因, 并对 *bkdF* 进行了基因中断, 得到添加 (X +) α -甲基丁酸后只产 a 组分阿维菌素的菌株, 并且在额外添加环己羧酸发酵后产生杀虫活性更高效的多拉菌素 (Doramectin)。 *S. avermitilis* 的支链 α -酮酸脱氢酶基因簇 *bkdABC* 和 *bkdFGH* 相隔 12kb 左右^[2], 关于 *bkdABC* 基因在 Bjbm0006 的中断对阿维菌素合成的影响另有报告。本研究的出发菌株 *S. avermitilis* Bjbm0006 是由原始菌株经过 *aveD*/Am^r 的基因置换

后得到的^[3], 本研究根据已发表的 *bkdF* 基因序列, 构建重组质粒 pHJ5816 对 Bjbm0006 进行基因置换, 得到重组菌株 Bjbm5816, Bjbm5816 只产生单一组分的新化合物。

1 材料和方法

1.1 菌株

阿维菌素 B 产生菌 *S. avermitilis* (Bjbm0006)^[3]、大肠杆菌 JM109 和 DH5 α ^[4]均由北京生物医药研究所保存, ET12567/pUZ8002^[5]由周秀芬博士惠赠。

1.2 质粒

pHZ1358^[5]大肠杆菌-链霉菌穿梭载体, 含有接合转移位点, 含硫链丝菌素和青霉素抗性基因, 在不含硫链丝菌素培养基中培养时, 不易在链霉菌中自主复制; pIJ4026^[5]大肠杆菌质粒, 含红霉素抗性基因, 均由周秀芬博士惠赠。

1.3 限制性内切酶和试剂

本研究中所用酶类均购于 Gibco BRL 和 Promega 公司, DNA 分子量标准物为 λ -pUC Mix Marker, 购于 MBI 公司, 其它常规试剂参见文献 [4] 和 [5]。

1.4 培养基和抗生素

大肠杆菌培养基为 LB^[4]; *S. avermitilis* 与大肠杆菌的接合转移培养基、*S. avermitilis* 的种子培养基和发酵培养基参见文献 [3]; *S. avermitilis* 固体产孢培养基为 YMS^[3], 液体培养基为 YEME^[5]。LB 中氨苄青霉素使用量为 100 μ g/mL, 红霉素使用量为 10 μ g/mL, YMS 中红霉素使用量为 10 μ g/mL, 硫链丝

* 通讯作者。E-mail: Vainsky@vip.sina.com

作者简介 朱浩君 (1970 -) 男, 安徽东至人, 在读博士研究生, 工程师, 从事生物化工及分子生物学研究。E-mail: zhuhaojun@yahoo.com

收稿日期 2003-06-02, 修回日期 2003-10-12

菌素使用量为 10μg/mL,接合转移培养基中硫链丝菌素使用量为每平板 500μg。

1.5 *bkdFGH* 重组质粒的构建

1.5.1 PCR 扩增 *bkdFGH* 相关基因 :根据已发表的 *bkdF* 的序列,合成一对引物: F_1 : 5'-AGAAGTCAC-CGAGCACGAC-3' (130), R_2 : 5'-GCACTCGCCTTC-CCAACGC-3' (1091)。链霉菌总 DNA 的提取方法参见《链霉菌遗传手册》^[5]。PCR 扩增以 Bjb0006 的总 DNA 为模板,反应条件: 95℃ 45s, 55℃ 1min45s, 72℃ 2min, 30 Cycles, 72℃ 延伸 7min 后电泳检测。

1.5.2 重组质粒的构建 :按图 1 的路线构建自杀型置换质粒 pHJ5816。pHJ5816 的 *bkdF* 中间插入了 1.7kb 的 *erm*。DNA 酶切、连接和大肠杆菌的 DNA 转化的方法参见文献 [4]。

双交换频率过低。筛选时先按如下方法处理 :对于重组菌株进行非抗性培养后,先用红霉素抗性培养基来富集双交换、单交换和仍含游离载体的菌株,除去未交换而载体丢失的菌株,再经无抗生素压力下培养,再富集,如此反复多次再选择单抗重组菌株。双交换菌株的 PCR 验证方法如下:PCR 反应条件为 95℃ 45s, 58℃ 1min45s, 72℃ 3min, 10 Cycles; 然后 95℃ 45s, 55℃ 1min45s, 72℃ 3min30s, 20 Cycles。

1.6.3 产物测定 :将发酵液的菌丝体用甲醇浸泡 30min 后离心,取上清液,进行 HPLC 测定、紫外扫描和质谱分析。HPLC 条件:流动相为甲醇:水 (85:15),流速为 0.8mL/min,检测波长为 246nm。质谱分析由北京微量化学研究所承担。

2 结果

2.1 PCR 克隆 *bkdF*

以 Bjb0006 总 DNA 为模板, F_1 和 R_2 为引物,PCR 合成 *bkdF* 的约 1kb DNA 片段,然后直接钝连到 pHZ1358 的 *BamH* I 位点中 (*BamH* I 酶切后补平)。再用 PCR 的方法直接从转化的菌落中筛选阳性克隆子,得 pHX5816, pHX5816 存在一个 *bkdF* 本身的 *BamH* I 位点,位于片段的 504bp 处。以 F_1 为引物对 pHX5816 进行一个反应的测序,结果和发表序列高度同源。

2.2 用于基因置换重组质粒的构建

置换质粒 pHJ5816 按图 1 所示的路线构建 :用 *Bgl* II 酶切质粒 pJ4026,回收 1.7kb 的红霉素抗性基因片段,插入 pHX5816 的 *BamH* I 位点,得质粒 pHJ5816,以 F_1 和 R_2 为引物,用 PCR 的方法筛出阳性克隆子,PCR 产物为预期的 2.7kb 左右。

2.3 支链 α-酮酸脱氢酶复合物相关基因的中断

2.3.1 重组菌株的筛选 :将 pHJ5816 转化大肠杆菌 ET12567/pUZ8002,然后通过属间接合转移到 Bjb0006。Bjb0006/pHJ5816 在不含任何抗生素的 YMS 平板 28℃ 培养,收集孢子 Bjb0006/pHJ5816,按 1.6 方法处理后再按以下程序 :转接不含任何抗生素的 YMS 平板,28℃ 培养,收集孢子,将孢子梯度稀释涂布只含红霉素的 YMS 平板,挑选孢子丰度合适的平板上的单菌落,在含硫链丝菌素的 YMS 平板上检验,硫链丝菌素抗性丢失的克隆,即为发生了基因中断的单抗菌株。Bjb0006/pHJ5816 在培养过程中, pHJ5816 所携带 1kb 的 *bkdF* 基因与染色体的同源区域会发生同源双交换 (图 1),完整的 *bkdF* 基因被置换下来。通过无抗生素压力的放松培养,游离

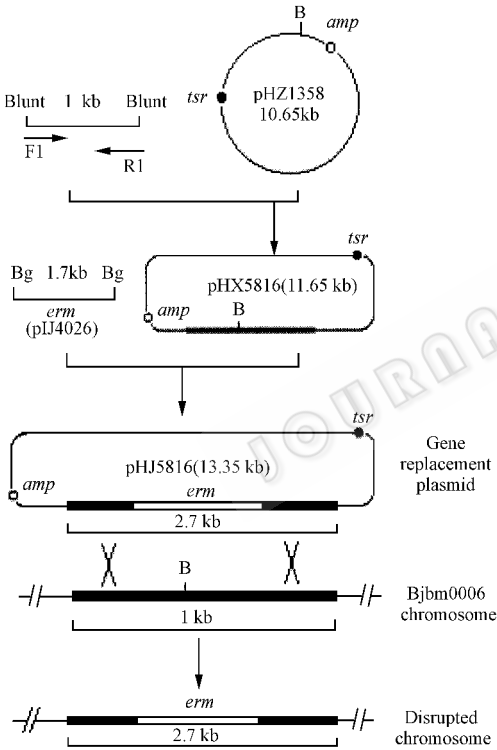


图 1 *S. avermitilis* Bjb0006 *bkdF* 基因的中断

Fig.1 Disruption of *bkdF* in Bjb0006

Sizes of relevant restriction fragments are indicated in kilobases. Abbreviations: *amp*, ampicillin resistance gene; *tsr*, thiostrepton resistance gene; *erm*, erythromycin resistance gene; Bg, *Bgl* II; B, *BamH* I.

1.6 基因置换

1.6.1 接合转移 :按文献 [5] 中描述的方法将穿梭置换质粒从 ET12567/pUZ8002 接合转移到 *S. avermitilis* 中。

1.6.2 基因置换 :双交换菌株的筛选方法参见文献 [3],由于 *erm* 两端的同源序列过短 (370 ~ 500bp),

的 pHJ5816 极易丢失,通过红霉素的 YMS 平板,可以筛选出发生单交换和双交换的菌株,再通过硫链丝菌素的 YMS 平板,便可以筛选出红霉素的 YMS 平板上单抗红霉素的双交换菌株。从而得置换菌株 Bjbm5816。

2.3.2 PCR 验证基因置换:分别提取 Bjbm0006 和 Bjbm5816 的总 DNA,用引物 F₁ 和 R₂ 进行 PCR 验证。F₁ 位于 *bkdF* 发表序列 5'端的 130bp 处,R₂ 位于 5'端的 1091bp 处,所以 F₁ 和 R₂ 的扩增片段应为 960bp,在 503bp 的 *Bam*H I 位点插入 1.7kb 大小的 *erm*,发生置换的片段应为 2.7kb 左右(图 1)。用出发菌株 Bjbm0006 总 DNA 和 pHJ5816 为模板作对照,Bjbm5816 的总 DNA 和 pHJ5816 为模板的 PCR 扩增产物均为 2.7kb,比 Bjbm0006 的产物正好大出相当于 *erm* 大小的 1.7kb 片段。

2.3.3 重组菌发酵产物组分的色谱、质谱和紫外吸收分析:用 Bjbm5816 和 Bjbm0006 进行 20L 罐发酵实验,甲醇提取发酵液,进行高压液相色谱(HPLC)分析。Bjbm0006 发酵产物含 B2b,B2a,B1b 和 B1a 4 个组分的阿维菌素 B(图 2),重组菌 Bjbm5816 在相同的发酵条件下只产生单一组分(图 3),新组分和阿维菌素 8 个组分保留时间(RT)都不一致。对新组分的质谱(MS)分析结果表明其分子量为 790.8(图 4,除去一个 Na⁺),与阿维菌素的分子量相差太远,且其紫外扫描结果是吸收峰值为 225nm,与阿维菌素的 246nm 也完全不一致。Bjbm0006 阿维菌素的总产量为 1200μg/mL 左右,Bjbm5816 新化合物的产量为 1000μg/mL 左右。

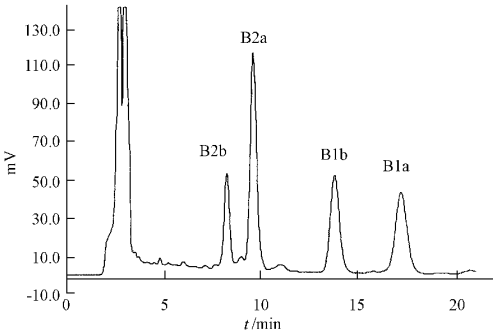


图 2 Bjbm0006 发酵产物的高效液相图谱
Fig.2 HPLC of fermentation products from Bjbm0006

3 讨论

目前发现支链 α-酮酸脱氢酶基因簇在阿维链霉菌中有两个^[1,2],本研究得到的重组菌 Bjbm5816 中

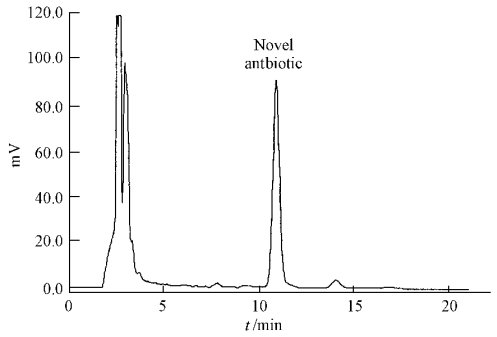


图 3 Bjbm5816 发酵产物的高效液相图谱
Fig.3 HPLC of fermentation products from Bjbm5816

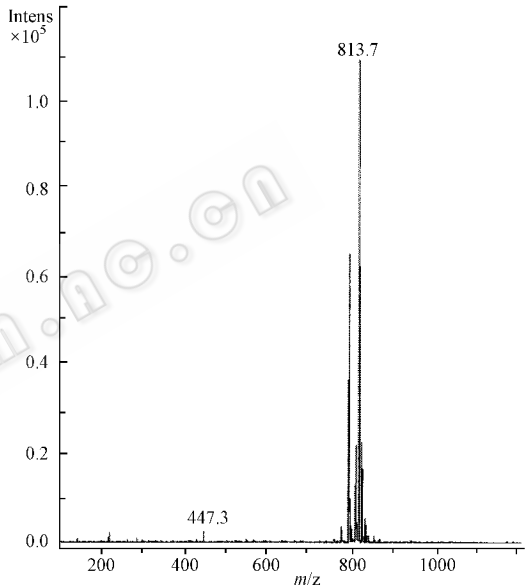


图 4 Bjbm5816 发酵产物的质谱图
Fig.4 Ms of fermentation products from Bjbm5816

断了第二个支链 α-酮酸脱氢酶基因簇 *bkdFGH*。Bjbm5816 所产生这一新化合物和 *bkdAB* 的基因中断重组菌所产生的新组分一致(另有报道)。经精制结晶后溶于氘代丙酮,通过 1H-NMR、13C-NMR 和二维 NMR,鉴定该化合物为 OligomycinA。OligomycinA 的产生可能和 *erm* 有关,因为 *erm* 是一种双甲基化酶基因,可能承担了 C25 位基团的转化作用。Bjbm5816 传代 10 次后,抗性标记和发酵产物都十分稳定。

基因置换时,如果抗性基因两边的同源序列过短对于完成双交换十分困难,虽然理论上链霉菌的染色体只要有 120bp 左右就能发生同源重组,但其频率很低,所以在构建基因置换载体时,遗传标记两臂的同源序列最好在 1kb 以上。如果确实无法实现这个条件,本研究提出了一种简单易行的方法,可以将低频重组放大许多倍(放大倍数根据载体的丢失

率计算)。

新化合物 OligomycinA 的生物学活性实验表明,该抗生素具有广谱的抗真菌和杀虫能力,可见光条件下,比阿维菌素稳定。本研究所得到的 OligomycinA 产生菌 Bjbm5816 的效价高达 1000μg/mL,而且发酵液粗提物纯度达 90%,具有良好的应用前景。

参 考 文 献

[1] Skinner D , Morgenstern M , Fedechko R , *et al.* Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding branched-chain α-keto acid dehydrogenase from *Streptomyces avermitilis* and the production of a functional E1 [αβ] component in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* , 1995 , **177** , 183 – 190.

[2] Denoya C , Fedechko R , Hafner E , *et al.* A second branched-chain α-keto acid dehydrogenase gene cluster (*bkdFGH*) from *Streptomyces avermitilis* : its relationship to avermectin biosynthesis and the con-

struction of a *bkdF* mutant suitable for the production of novel antiparasitic avermectins. *J Bacteriol* , 1995 , **177** , 3504 – 3511.

[3] Zhu H J , Zheng Y H. Study on C5-O-methyltransferase gene cloning , sequencing and replacement. *J Chin J Antibiotics* , 2003 , **28** (1) : 1 – 5.

[4] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A laboratory Manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.

[5] Tobias K , Bibb M J , Mark J B , *et al.* *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich :The John Innes Foundation , 2000.

[6] MacNeil T , Gewain K , MacNeil D. Deletion analysis of the avermectin biosynthetic genes of *Streptomyces avermitilis* by gene cluster displacement. *J Bacteriol* , 1993 , **175** : 2552 – 2563.

[7] Ikeda H , Nonomiya T , Omura S. Organization of biosynthetic gene cluster for avermectin in *Streptomyces avermitilis* : analysis of enzymatic domains in four polyketide synthases. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* , 2001 , **27** , 170 – 176.

Effects of *bkdF* Interruption on Avermectin Biosynthesis

ZHU Hao-Jun¹ LIANG Yun-Xiang^{1*} ZHOU Jun-Chu¹ ZHENG Ying-Hua²
(¹ Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China)
(² Beijing Institute of Biomedicine , Beijing 100091 , China)

Abstract : Bjbm0006 was a strain which produces four avermectin B component. *bkdF* (branched-chain α-keto acid dehydrogenase gene) gene involved in the biosynthesis of avermectin B was cloned by PCR from Bjbm0006 chromosome , and inserted with a *Erm^r* gene to construct a recombinant plasmids pHJ5816 (pHZ1358 : : *bkdF*&*Erm^r*). The *bkdF*-interrupted mutant Bjbm5816 was received through homologous double crossover between the pHJ5816 and the chromosome. The interruptant Bjbm5816 produce single novel compound and it was attested to be Oligomycin A by MS , ¹H-NMR , ¹³C-NMR and two-dimension NMR.

Key words :Avermectin , Branched-chain α-keto acid dehydrogenase complex , Gene interruption

* Corresponding author. E-mail :vainsky@vip.sina.com
Received date 06-02-2003



本期广告索引

广告单位	版位	广告单位	版位
Amersham Biosciences	封二	南京宁和生化设备有限公司	文后彩插 II
广州市华奥行仪器有限公司	文前彩插 I	镇江达森发酵设备有限公司	文后彩插 III
上海联环生物工程设备有限公司	文前彩插 II	香港徕卡仪器有限公司	封三
扬中市威柯特生物工程设备公司	文后黑白插 I	镇江东方生物工程设备技术有限公司	封底