

棒状链霉菌 *lat* 基因的中断对棒酸产量的影响

王永华^{1,2} 荆琛峰² 陶美凤¹ 杨 博³ 徐安龙^{2*}

(¹华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

(²中山大学生命科学学院生物化学系 广州 510275)

(³华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

摘 要 :从棒状链霉菌中克隆 1.8kb 的 *lat* 基因片段 ,构建了基因置换质粒 pXAL1 和 pXAL2。运用接合转移方法把中断载体导入棒状链霉菌中进行 *lat* 的中断 ,得到 1 株接合转移子 Am^rThio^s ,命名为 XAL 863。通过 Southern 杂交分析及赖氨酸转氨酶活性测定 ,证明此菌株的 *lat* 基因被中断。通过发酵培养 ,HPLC 方法检测棒酸含量 ,发现棒酸产量明显提高 ,约为原产量的 1.8 倍。

关键词 :棒状链霉菌 ,棒酸 ,*lat* ,基因中断

中图分类号 :Q756 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)04-0500-04

棒酸 ,也称克拉维酸(Clavulanic acid) ,是由棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligerus*)产生的一种 β -内酰胺酶抑制剂 ,其结构主要由 β -内酰胺环(C₃结构)和唑烷环(C₅结构)构成^[1]。它可与 β -内酰胺酶的丝氨酸活性位点不可逆结合 ,从而保护 β -内酰胺类抗生素的活性^[2]。在医药生产中 ,棒酸和青霉素、头孢等 β -内酰胺类抗生素复配使用 ,可解除这些抗生素的抗药性。我国所使用的棒酸主要依靠进口 ,国内也曾有一些厂家生产过 ,但由于菌种产量较低 ,造成生产成本较高 ,无法与国外产品相竞争。获取高产菌株是降低生产成本的关键。传统的菌种选育是通过随机诱变的方法筛选高产菌株 ,随机性大、筛选工作量大、耗时长。随着链霉菌分子生物学技术的发展 ,以及抗生素合成代谢途径和相应基因簇的进一步揭示 ,通过抗生素代谢途径的基因工程改造来获取高产菌株成为可能 ,从而使育种效率提高 ,育种周期大为缩短。

棒状链霉菌可产生多种抗生素 ,如异青霉素 N、去乙酰基先锋霉素 C、头孢霉素 C、棒酸和棒烷类衍生物等。其中 ,异青霉素 N 和去乙酰基先锋霉素 C 属于头霉素 C 合成代谢途径的中间产物 ,此途径的基因簇已经被阐释^[3-5]。棒酸合成具有另外独立的代谢途径 ,它以 3-磷酸甘油和精氨酸为前体物质 ,依次在 *ceaS*、*bls*、*pah* 和 *cas* 等基因编码酶的作用下合成^[6]。虽然头霉素 C 合成代谢途径和棒酸合成代

谢途径相互独立 ,但是基因簇相毗邻 ,而且共同受 *CcaR* 调节蛋白的调控。有研究表明 ,在发酵生产中头霉素 C 产量和棒酸产量呈反比关系 ,降低或者消除棒酸生产菌中头霉素 C 的合成能够提高棒酸产量^[7]。

lat 基因编码赖氨酸氨基转移酶 ,参与赖氨酸转化为 α -氨基己二酸的第一步反应 ,是头霉素 C 合成途径中的关键酶。*lat* 基因中断的菌株失去了合成头霉素 C 的能力 ,含多 *lat* 拷贝数的菌株 ,可以提高赖氨酸氨基转移酶的活性和头霉素 C 的产量^[7,8]。

本研究选取头霉素 C 的早期合成基因 *lat* 为目标基因 ,构建了基因置换载体 pXAL1 ,对棒状链霉菌进行 *lat* 的定域基因置换 ,得到重组菌株 XAL863。并对重组菌株和原始菌株的产棒酸能力进行了比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 :棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligerus* 27064)由中山大学高科技海洋生物功能基因开放实验室保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、ET12567(pUZ8002)^[9]由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室保存。

1.1.2 质粒 :pIJ2925 为大肠杆菌克隆载体^[9]。pSET151 含有接合转移起始位点(*RK2 oriT*)、硫链丝

基金项目 :华中农业大学微生物重点实验室开放课题

* 通讯作者。Tel :86-20-84113655 ; Fax :86-20-84038377 ; E-mail :ls36@zsu.edu.cn

作者简介 :王永华(1973-) ,女 ,山西人 ,副教授 ,博士 ,研究方向为酶工程及微生物制药。E-mail :yonghw@263.net

收稿日期 :2004-11-09 ,修回日期 :2005-04-04

菌素抗性基因(*tsr*)和氨苄青霉素抗性基因(*bla*),不含有链霉菌复制起点,为链霉菌自杀性质粒^[9]。pHL212与pSET151相似,但含有遗传不稳定的链霉菌复制起点,用于在链霉菌中中断基因(私人通讯)。pHL240中的阿泊拉霉素抗性基因(*aacC4*)可以用*Kpn* I切下,其中的*aacC4*来自pHP45Ω。

1.1.3 试剂:本研究所用酶类均购于Gibco公司;DNA分子量标准购于华美生物工程公司;其它试剂均购于Sigma公司;DIG DNA Labeling and Detection Kit购于Roche公司。

1.1.4 培养基:固体产孢采用YD培养基^[9];ET12567培养基是在LB培养基加入阿泊拉霉素(Am)、氯霉素(Cml)和卡那霉素(Km),使其终浓度分别为50μg/mL、25μg/mL和50μg/mL,筛选接合转移子是在YD培养基中加入硫链丝菌素(Thio),使其终浓度为10μg/mL。棒状链霉菌种子培养和发酵培养分别采用高氏天冬素和大豆培养基^[10]。

1.2 DNA提取和转化

链霉菌总DNA提取、大肠杆菌和链霉菌属间接合转移方法参照文献[9]进行;大肠杆菌质粒提取和转化参照文献[11]进行。

1.3 引物设计和PCR反应

以棒状链霉菌的总DNA为模板,利用PCR扩增技术获得*lat*的基因及部分侧翼片段。设计上下游引物:上游引物(*lat-up*):5'-ACCGGAATTCCTTGAACACGA-3';下游引物(*lat-down*)为:5'-TGGATCCATTCGTGGGCTCTCCGTGC-3'。PCR反应条件:96℃ 1min,45℃ 1min,72℃ 3min20s,26个循环;72℃延伸10min。

1.4 *lat*基因中断菌株的构建和筛选

采用基于同源重组的靶向基因敲除技术中断棒状链霉菌的*lat*基因^[9]。将*lat*基因及其侧翼序列克隆到合适的载体,将阿泊拉霉素抗性基因*aacC4*插入到*lat*基因中得到基因中断载体,通过接合转移将基因中断载体引入棒状链霉菌中,通过抗性筛选获得发生双交换的*lat*基因中断菌株。

1.5 Southern杂交验证双交换菌株

Southern杂交操作方法参照文献[11]进行。探针用Digoxin标记。

1.6 赖氨酸转氨酶活性检测和蛋白含量检测

赖氨酸转氨酶活性检测方法参照文献[12,13],蛋白含量检测方法(Lowery法)参照文献[14]进行。

1.7 发酵液中棒酸含量的测定

采用HPLC方法检测,具体步骤参照文献[10]

进行。

2 结果

2.1 PCR克隆*lat*及中断载体构建

按图1所示技术路线构建基因中断载体pXAL1和pXAL2。以棒状链霉菌27064的总DNA为模板,*lat-up*和*lat-down*为引物,PCR扩增出*lat*基因及其侧翼序列,然后用*Eco*R I和*Bam*H I双酶切PCR产物,与*Eco*R I、*Bam*H I双酶切的pIJ2925质粒连接,得到重组质粒pHL241。经*Eco*R I和*Kpn* I双酶切验证pHL241结构正确。用*Kpn* I酶切pHL240,回收1.9kb的*aacC4*基因片段,然后插入到pHL241中*lat*片段的*Kpn* I位点,得到质粒pHL242。用*Bgl* II酶切鉴定pHL242结构正确。用*Bgl* II酶切pHL242,回收3.7kb左右的基因片段,插入到pSET151和pHL212的*Bam*H I位点,得到基因的中断载体pXAL1和pXAL2。经*Xba* I和*Eco*R I酶切验证pXAL1和pXAL2结构正确。

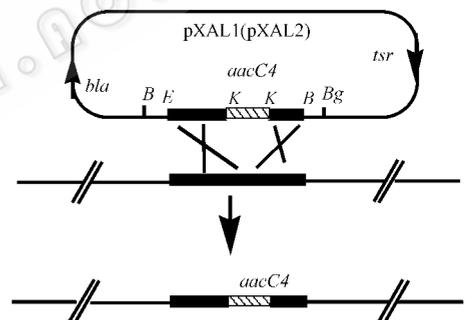


图1 染色体上的*lat*基因中断示意图

Fig.1 Disruption of *lat* on *S. clavuligerus* chromosome

Abbreviations: *bla*, Ampicillin resistance gene; *tsr*, Thiostrepton; *E*, *Eco*R I; *B*, *Bam*H I; *K*, *Kpn* I; *Bg*, *Bgl* II.

2.2 *lat*基因双交换菌株筛选

将质粒pXAL1和pXAL2转化到大肠杆菌ET12567(pUZ8002),与棒状链霉菌27064进行属间接合转移。结果发现,pXAL1不能得到硫链丝菌素抗性(Thio^r)接合转移子,而同样条件下pXAL2得到大量接合转移子。挑取Thio^r接合转移子,划线转接到含有20μL/mL的萘啶酮酸培养基上进行纯化。将纯化后的接合转移子在无抗生素的YD培养基上进行松弛培养至充分产孢。收集孢子,进行系列梯度稀释。选择合适浓度的孢子涂布在含有20μL/mL抗生素Am的YD培养基上培养产孢,然后影印到含有抗生素Thio的培养基上,筛选得到Am^rThio^S菌株1株,命名为XAL 863。pXAL1和pXAL2中带有*aacC4*的*lat*基因与出发菌株的染色体同源区域发

生同源双交换的示意图如图 1 所示。

2.3 Southern 杂交验证双交换菌株

用 Southern 杂交验证菌株 XAL 863 是否发生正确的基因中断。采用双探针进行杂交,两个探针分别为 pH1242 用 *Kpn* I - *Eco*R I 双酶切后回收的 1.9kb 含 *aacC4* 的 *Kpn* I 片段及 1.0 kb 含部分 *lat* 基因的 *Eco*R I - *Kpn* I 片段,混合用 Digoxin 标记。用 *Bam*H I 酶切的棒状链霉菌 27064 和 XAL 863 基因组 DNA 经凝胶分离,用双探针杂交后,前者给出一条约 9kb 的杂交带,后者给出约 4.7kb 和 1.8kb 的杂交带(图 2),与预期结果相符,表明 XAL 863 为 *lat* 基因中断菌株。

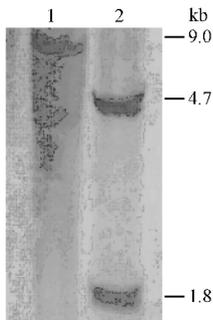


图 2 中断菌株 Southern 杂交分析

Fig.2 Southern analysis of the mutant

1. *Streptomyces clavuligerus* 27064; 2. XAL863.

2.4 赖氨酸转氨酶活性检测

lat 编码赖氨酸转氨酶 (Lys- ϵ -aminotransferase, LAT)。如果 *lat* 基因被中断,则应无 LAT 酶活性。本研究分别检测了在不同培养时间棒状链霉菌 27064 和 XAL863 菌株的赖氨酸转氨酶活性(表 1),在 XAL863 中不再具有 LAT 酶活性,表明 *lat* 基因已经被中断失活。

表 1 棒状链霉菌 27064 和 XAL 863 赖氨酸转氨酶活性比较

Table 1 Comparison of the LAT activity between *S. clavuligerus* 27064 and XAL 863 culture

Strain	LAT(U/mg of protein)		
	48h	60h	84h
<i>S. clavuligerus</i> 27064	1.85	2.50	0.10
XAL863	-	-	-

- . Not detected; LAT. Lys- ϵ -aminotransferase.

2.5 棒状链霉菌 27064 和 XAL 863 发酵生产棒酸能力比较

以原始菌株棒状链霉菌 27064 为对照菌株,对 XAL863 进行发酵研究,探讨菌株合成棒酸的能力。选用大豆培养基为发酵培养基,于 28℃、200r/min 培养,分别在不同培养时间取样检测棒酸含量。每组

试验分别有两个平行样(表 2)。改造后的菌株 XAL 863 与原始菌株 27064 相比,其产量大幅度提高。当培养 72h 时,棒酸产量达到最大,XAL863 菌株的产量约为原菌株的 1.8 倍。

表 2 棒状链霉菌 27064 和 XAL 863 合成棒酸产量比较

Table 2 Comparison of the clavulanic acid production between *S. clavuligerus* 27064 and XAL 863 culture

Incubation time/h	Sample (duplicate)	Sc 27064 (mg/L)	XAL 863 (mg/L)	Times
48	1	59.96	236.55	3.95
	2	63.01	213.66	3.39
54	1	75.16	290.23	3.86
	2	90.24	304.60	3.38
66	1	162.79	333.54	2.05
	2	184.53	405.11	2.20
72	1	372.19	651.34	1.75
	2	416.91	771.08	1.85
84	1	258.69	385.67	1.49
	2	280.98	448.82	1.60

3 讨论

对于日益严重的 β 内酰胺类抗生素的耐药问题,棒酸已作为特效药物被广泛用于临床。棒酸生产菌可产生多种抗生素,其中头霉素 C 的合成会对棒酸的合成产生负影响。本研究尝试用分子生物学的方法定向改造原始生产菌的基因组。阻断头霉素 C 的合成途径中的 *lat* 基因,使代谢流向棒酸的生物合成,从而提高棒酸产量。对 XAL863 菌株的发酵结果表明,棒酸产量得到了大幅度提高,并通过十几代的传代培养,发现菌株的发酵结果和抗性标记都非常稳定。本研究不仅为从分子水平改造菌种提供一个例证,并可能对棒酸产量的提高提供一种可行的依据。

参 考 文 献

- [1] Jun H, Terumichi N, Toyozo U. Stability of clavulanic acid in aqueous solution. *Chem Pharm Bull*, 1981, **29**: 3334 - 3341.
- [2] Aharonowitz Y, Demain A L. Catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1978, **14**: 159 - 164.
- [3] Alexander D C, Jensen S E. Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the CcaR protein. *J Bacteriol*, 1999, **180**: 4068 - 4079.
- [4] Liras P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins: cephamycins produced by actinomycetes. *Antonie Leeuwenhoek*, 1999, **75**: 109 - 124.
- [5] Perez-Liarena F J, Rodriguez-Garcia A, Enguita F J, et al. The *ped* gene encoding piperideine-6-carboxylate dehydrogenase involved in biosynthesis of α -aminoadipic acid is located in the cephamycin cluster

- of *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 4753–4756.
- [6] Mellado E, Lorenzana L M, Rodriguez-Saiz M, et al. The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus*: genetic organization of the region upstream of the *car* gene. *Microbiology*, 2002, **148**: 1427–1438.
- [7] Malmberg L H, Hu W S, Sherman D H. Precursor flux control through targeted chromosomal insertion of the lysine- ϵ -aminotransferase (*lat*) gene in cephamycin C biosynthesis. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 6916–6924.
- [8] Malmberg L H, Hu W S. Kinetic analysis of cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **38**: 941–947.
- [9] Tobias K, Bibb M J, Mark J B, et al. Practical *Streptomyces* genetic: A Laboratory Manual, 2nd ed. London: John Innes Foundation Press, 2000, 14.311–14.334.
- [10] Wang Y, Yang B, Ren J, et al. Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry*, 2005, **40**: 1161–1166.
- [11] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] Madduri K, Stuttard C, Vining L C. Lysine catabolism in *Streptomyces* spp.: Is primarily through cadaverine: β -lactam producers also make α -amino adipate. *J of Bacteriology*, 1989, **171**: 299–302.
- [13] Brian A K, David H, Edward I. L-lysine- ϵ -Aminotransferase involved in cephamycin C synthesis in *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1980, **17**: 679–685.
- [14] 郭勇. 现代生化技术. 广州: 华南理工大学出版社, 2002, 142.

Effect of *lat* disruption on clavulanic acid production

WANG Yong-hua^{1,2} JING Chen-feng² TAO Mei-feng¹ YANG Bo³ XU An-long^{2*}

(¹ Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(² Department of Biochemistry, College of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

(³ College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: A 1.8kb fragment of *lat* was obtained from *Streptomyces clavuligerus* 27064, and replacement plasmid of pXAL1 and pXAL2 were constructed. pXAL1 and pXAL2 were used to disrupt the *lat* gene by bi-parental conjugation from *E. coli* to *Streptomyces clavuligerus*. A Am^rThio^S transformant, named as XAL863, was obtained. The genome of *Streptomyces clavuligerus* 27064 and XAL863 was analyzed by southern blot technique, and the activity of lysine ϵ -aminotransferase in the two strains was also tested. Both results proved that the *lat* was disrupted in the XAL863. *Streptomyces clavuligerus* and XAL863 were cultured in the shaken flask respectively, and the production of clavulanic acid was analyzed by HPLC with the different incubation time interval, and the yield was approximately 1.8 times higher in the XAL863 at their highest production point.

Key words: *Streptomyces clavuligerus*, Clavulanic acid, *lat*, Gene disruption

Foundation item: Key Laboratory of Agricultural Microbiology in Huazhong Agricultural University

* Corresponding author. Tel 86-20-84038377; Fax 86-20-84113655; E-mail: ls36@zsu.edu.cn

Received date: 11-09-2004

本期广告索引

企业	版位	企业	版位
镇江东方生物工程设备技术有限公司	封底	上海国强生化工程装备有限公司	文前三/IV
GE Healthcare Bio-sciences(原名 Amersham Biosciences)	封二	“广东溢多利生物科技股份有限公司”诚聘启事	文前五
镇江达森发酵设备有限公司	封三	上海保兴生物设备工程有限公司	文前六
北京天为时代科技有限公司	文前一/II	扬中市威柯特生物工程设备公司	文后I