

尤马马杜拉放线菌染色体复制区的克隆及功能分析

夏海洋^{1,2} 林开春² 杨长举² 覃重军^{1*}

(¹中国科学院上海植物生理生态研究所 上海 200032)

(²华中农业大学植物科学技术学院 武汉 430070)

摘 要 尤马马杜拉放线菌(*Actinomadura yumaensis*) NRRL12515 产生马杜拉霉素,用于防治禽类球虫病。试验以放线菌 *dnaA* 与 *dnaN* 基因保守区设计的简并引物进行 PCR 扩增,获得了包含尤马马杜拉放线菌的染色体复制区 *oriC* 的片段,并进行了序列分析和复制功能的研究。尤马马杜拉放线菌染色体的 *oriC* 全长为 919 碱基对,含有 14 个 DnaA 盒子和 2 个 AT 富含区,DnaA 盒子的保守序列是(T/C)(T/C)GTCC(A/C)CA,与已发表的 3 个属的放线菌染色体 *oriC* 的序列特征不同。携带该 *oriC* 片段的大肠杆菌质粒可以在天蓝色链霉菌中复制并以低拷贝方式遗传,表明这是一段有复制功能的序列。比较来自放线菌 4 个属的 *oriC*,发现以 *oriC* 序列和以 16S rRNA 基因序列构建的进化树十分相似,表明 *oriC* 序列也可以体现放线菌物种之间的关系。

关键词: 马杜拉放线菌;染色体复制区

中图分类号: S852.65,Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)03-0529-04

放线菌具有复杂的发育和分化周期,作为革兰氏阳性细菌的一个重要类群,产生了约 8700 种以上的抗生素和生理活性物质^[1]。与大肠杆菌等细菌一样,放线菌的染色体有一个复制起始区(origin of chromosomal replication, *oriC*),位于保守基因 *dnaA* 与 *dnaN* 之间^[2,3]。目前,在放线菌中已鉴定了 *oriC* 的属有链霉菌(*Streptomyces*)、分枝杆菌(*Mycobacterium*)和拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis*)^[4-6]。变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)的 *oriC* 含有 19 个 DnaA 盒子(9 个碱基对的保守序列)以及短而分散的富含 AT 序列的区域^[5]。麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)的 *oriC* 有 3~5 个 DnaA 盒子和 1 个 AT 富含区^[4]。地中海拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*)的 *oriC* 有 19 个 DnaA 盒子和 2 个 AT 富含区^[6]。

马杜拉霉素(Maduramicin)是重要的防治禽类球虫病的聚醚(polyether)类抗生素,其产生菌尤马马杜拉放线菌(*Actinomadura yumaensis*)属于马杜拉放线菌属^[7,8]。该试验克隆和测序了尤马马杜拉放线菌 NRRL12515 的染色体复制起始区,通过体内转化实验证明它具有复制功能。此外,通过比较来自放线菌 4 个属的 *oriC*,发现以 *oriC* 序列构建的进化树和以 16S rRNA 基因序列构建的进化树极其相似。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 、ET12567(pUZ8002)和质粒 pBluescript II SK(+)为上海植物生理生态研究所分子微生物实验室保存。天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) M145 由 Hopwood 教授提供。尤马马杜拉放线菌(*Actinomadura yumaensis*) NRRL12515 由 Jim Swezey (ARS Patent Culture Collection, USA)提供。复制子探针质粒 pHY642 包含大肠杆菌质粒 RK2 的接合转移起点 *oriT*、以及可以在链霉菌中选择的硫链丝菌素抗性基因 *tsr*、大肠杆菌

ColE1 质粒的复制区和氨苄青霉素抗性基因 *bla*。

1.1.2 主要试剂:所用抗生素氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素及硫链丝菌素均购于 Sigma 公司(USA),所用生化试剂:蛋白胨、酵母粉、葡萄糖、NaCl、甘露醇、IPTG、X-gal 等均购于上海 Sangon 公司。所用限制性内切酶 *Hind* III、*Eco* RI、T4 DNA 连接酶及 DNA 1kb 分子量标准物均购于 MBI(Canada)公司。Pyrobest™ DNA 聚合酶购于大连 TaKaRa 公司。

1.2 DNA 基本操作

链霉菌培养、染色体和质粒 DNA 提取、以及 PCR 扩增等操作技术参照文献[9]。大肠杆菌培养、转化和质粒提取等基本操作技术参考文献[10]。大肠杆菌和链霉菌进行“两亲本杂交”接合转移的方法参见文献[11]。

1.3 DNA 序列的克隆、测定和分析

根据放线菌染色体基因 *dnaA* 和 *dnaN* 的保守区序列设计一对简并引物 5'-ATCCGSGAGCTGGAGGSGC-3' 和 5'-GTGTCGTCSCGGCCSGCGG-3',PCR 扩增条件参照 Pyrobest™ DNA 聚合酶使用说明。DNA 引物合成和测序均由英骏生物技术公司完成。序列的编辑使用 BioEdit Sequence Alignment Editor (Department of Microbiology, North Carolina State University, USA)。放线菌 DNA 开放阅读框分析软件为“Frameplot 3.0 beta”(http://watson.nih.gov/~jun/cgi-bin/frameplot-3.0b.pl)^[12]。使用 GCG 软件(Genetics Computer Group, http://www.biosino.org/pages/lab.htm)查找目标序列中与变青链霉菌(*Streptomyces lividans*) DnaA 盒子 TTGTCCACA 相似的序列。

1.4 基于复制起始区序列的系统进化分析

从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) GenBank 数据库中选取已经证明其复制功能并有明确边界的真细菌及与它们序列相似的细菌复制起始序列为材料进行分析,系统进化树采用 MEGA 3.1 (Center for Evolutionary

基金项目:国家杰出青年科学基金(3025003);中科院知识创新工程项目(KSCX2-SW-329-3, KSCX2-YW-G-014)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-21-54924171, E-mail: qin@sibs.ac.cn

作者简介:夏海洋(1979-),男,湖北浠水人,在读博士研究生,主要从事放线菌分子遗传及次生代谢调控研究。E-mail: haiyangxia@163.com

收稿日期:2006-09-20;接受日期:2006-10-30;修回日期:2006-11-06

Functional Genomics, USA)中的 Neighbour-Joining 构建,制作发育树以 *Thermus thermophilus* 的序列作为外群,用 Bootstrap 分析评估树的稳定性^[13]。

2 结果和分析

2.1 尤马马杜拉放线菌染色体的复制区的克隆

目前已鉴定的 3 株放线菌染色体复制起始区均位于保守基因 *dnaA* 与 *dnaN* 之间^[4-6]。利用基因 *dnaA* 与 *dnaN* 保守区设计的引物,以尤马马杜拉放线菌 NRRL12515 的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增和凝胶电泳。结果检测到 1 条大小约 1.3kb 的特异性 DNA 带(图片未列出)。

2.2 染色体复制区的测序和分析

将 PCR 扩增的约 1.3kb 的 DNA 片段克隆到大肠杆菌质粒 pBluescript II SK⁺ 的 *EcoRV* 位点。利用质粒上的 T3 和 T7 序列为引物进行测序,获得全长为 1265bp,其中在 *dnaA* 及 *dnaN* 之间序列为 919bp。利用放线菌蛋白读框分析软件“Frameplot3.0 beta”分析在该段 DNA 序列中没有发现可能编码蛋白的基因,而利用软件 GCG 分析可能的 *oriC*,发现了 14

个 DnaA 盒子以及 2 个 13bp 的富含 AT 的区域(249 位的 GAAAAATCCCAAG,761 位的 AAGAAAAAAGTCA,图 1),DnaA 盒子的保守序列是(T/C)(T/C)GTCC(A/C)CA(表 1)。因此,该 919bp 的序列可能是尤马马杜拉放线菌 NRRL12515 的染色体的复制区。

表 1 尤马马杜拉放线菌 NRRL12515 *oriC* 中

DnaA 盒子的碱基组成

Table 1 The nucleotides usage in DnaA-Boxes of *A. yumaensis* NRRL12515 *oriC*

Nucleotide	The position No. and nucleotide usage of DnaA-boxes(%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	7	0	7	0	0	7	36	0	72
T	64	79	7	100	0	0	14	0	0
C	29	21	7	0	100	93	36	100	14
G	0	0	79	0	0	0	14	0	14

The bold numbers are the highest frequency of used-nucleotides.

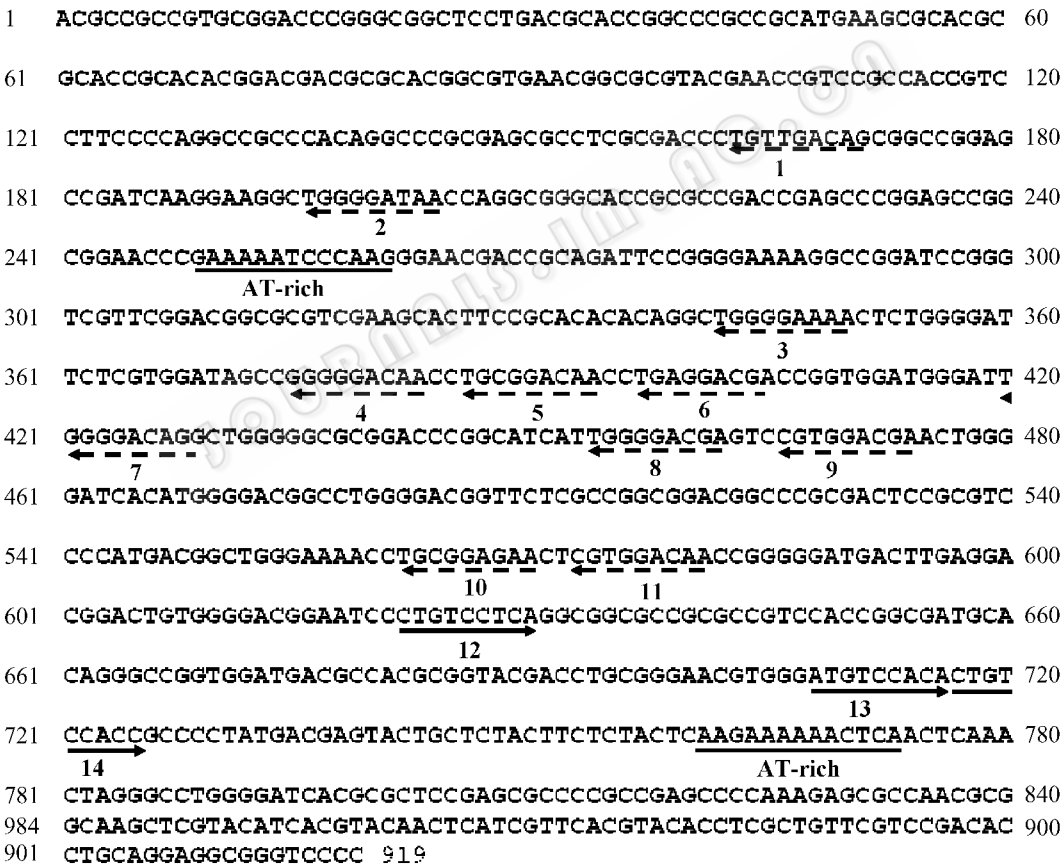


图 1 *A. yumaensis* NRRL12515 基因组 *dnaA* 和 *dnaN* 之间的 DNA 片段的序列分析

Fig.1 Characterization of DNA sequence between the *dnaA* and *dnaN* genes of *A. yumaensis* NRRL12515.

Solid and dash arrowheads indicate the numbered DnaA-boxes. Underlined parts show two AT-Rich regions.

2.3 染色体复制区的功能研究

为了测试所获得的 *dnaA-dnaN* 之间的 DNA 序列是否具有复制功能,将 PCR 扩增的 DNA 克隆到大肠杆菌质粒 pHY-642 的 *EcoRI* 和 *HindIII* 位点,得到质粒 pOR1(图 2)。将 pOR1 通过接合转移从大肠杆菌导入天蓝色链霉菌 M145,结果显示 pOR1 能够通过接合转移的方式导入到 M145,获得

接合转移子的效率为 1×10^{-6} 。抽取质粒 DNA,电泳后检测不到质粒 DNA 条带。但是,DNA 提取物可以转化大肠杆菌 DH5 α ,抽取质粒 DNA 进行酶切,与 pOR1 相同(图片未列出)。因此,来自尤马马杜拉放线菌的 919 碱基对序列可以在天蓝色链霉菌中进行复制和以低拷贝方式遗传。

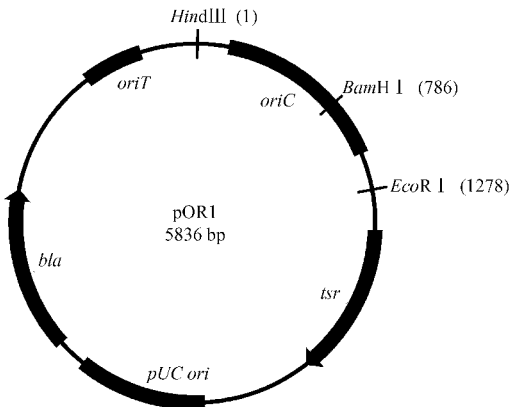


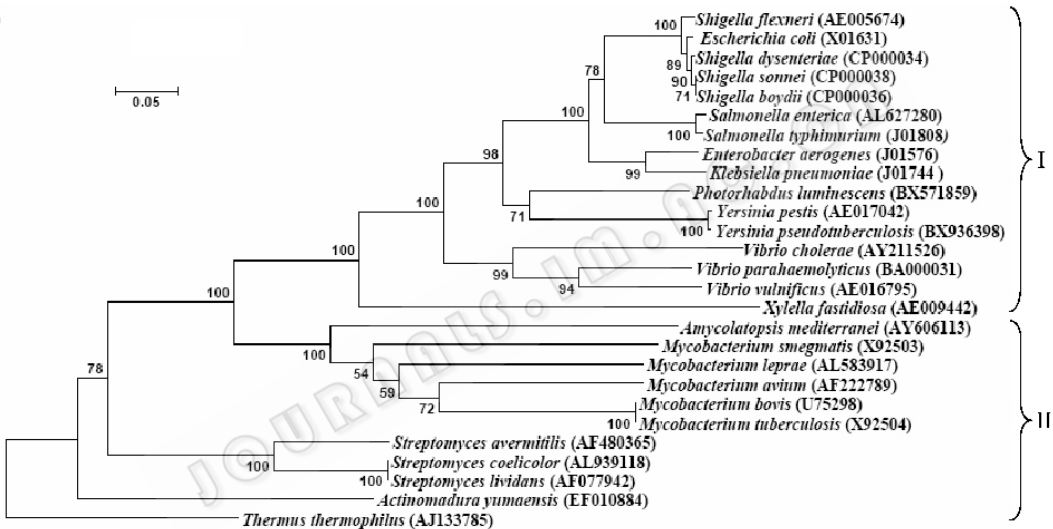
图 2 质粒 pOR1 的物理图谱

Fig.2 Physical map of plasmid pOR1.

2.4 放线菌染色体复制区的进化树分析

Tian 等^[6]的研究表明,利用链霉菌、分枝杆菌和拟无枝

(A)



(B)

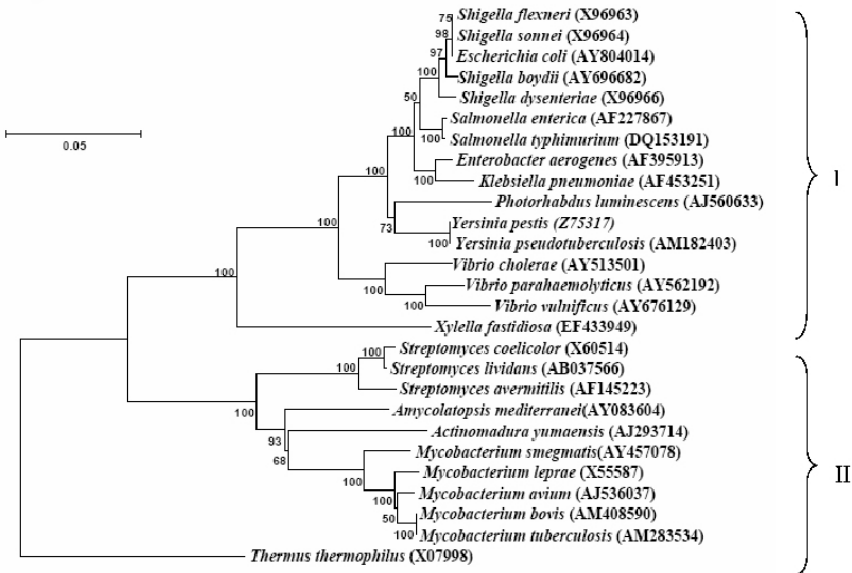


图 3 利用 oriC 序列和 16S rRNA 基因序列构建的进化树的比较

Fig.3 Comparison of phylogenetic trees based on the sequences of oriC and 16S rRNA genes. The tree was drawn by MEGA3.1 (Center for Evolutionary Functional Genomics, USA) with the Neighbour-Joining method. Numbers in parentheses represent the sequences' accession numbers in GenBank. The number at each branch point is the percentage support by Bootstrap. Bar 5% sequence divergence.

(A) The phylogenetic tree based on oriC sequences and (B) the phylogenetic tree based on 16S rRNA genes.

复制区 *oriC* 中,马杜拉放线菌的 *DnaA* 盒子的核心序列、*DnaA* 盒子的重复次数、以及 2 段富含 AT 的序列均为独特的。

表 2 放线菌 *oriC* 中 *DnaA* 盒子序列保守性比较

The position of base in <i>DnaA</i> -boxes	The nucleotide usage /%									Number of <i>DnaA</i> -boxes	Length of <i>oriC</i> /bp
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
	T	T	G	T	C	C	A	C	A		
<i>A. yumaensis</i>	64	79	79	100	100	93	36	100	72	14	919
<i>A. mediterranei</i>	63	89	295	79	73	84	79	95	89	19	884
<i>S. lividans</i>	74	79	53	95	89	100	95	100	68	19	934
<i>M. leprae</i>	100	100	50	100	100	75	100	75	100	4	521

Note: The GenBank accession numbers. : *Actinomadura yumaensis* EF010884 ; *Amycolatopsis mediterranei* ,AY606113 ; *Streptomyces lividans* ,AF077942 ; *Mycobacterium leprae* Z70722.

携带马杜拉放线菌染色体 *oriC* 片段的大肠杆菌质粒可以在天蓝色链霉菌中复制,暗示天蓝色链霉菌染色体复制的起始蛋白 *DnaA* 对于 *DnaA* 盒子序列识别的特异性不高。利用尤马马杜拉放线菌的 *oriC* 序列制作的进化树,与利用 16S rRNA 序列制作的进化树十分相似,表明 *oriC* 序列也可体现放线菌物种间的关系,同时进一步支持了 Tian 等推测^[6]。

参 考 文 献

[1] Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 2005 **58** (1) :1 - 26.

[2] Messer W. The bacterial replication initiator *DnaA*. *DnaA* and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol Rev* 2002 **26** (4) 355 - 374.

[3] Jakimowicz D ,Majka J ,Messe W ,et al. . Structural elements of the *Streptomyces oriC* region and their interactions with the *DnaA* protein. *Microbiology* ,1998 **144** (5) :1281 - 1290.

[4] Qin MH ,Madiraju MV ,Zachariah S ,et al. . Characterization of the *oriC* region of *Mycobacterium smegmatis* . *J Bacteriol* ,1997 **179** (20) 6311 - 6317.

[5] Zakrzewska-Czerwinska J , Majka J , Schrempf H. Minimal requirements of the *Streptomyces lividans* 66 *oriC* region and its transcriptional and translational activities. *J Bacteriol* ,1995 **177**

(16) :4765 - 4771 .

[6] Tian Y ,Hao P ,Zhao G ,et al. . Cloning and characterization of the chromosomal replication origin region of *Amycolatopsis mediterranei* U32. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 **333** (1) :14 - 20.

[7] Labeda DP ,Testa RT ,Lechevalier MP , et al. . *Actinomadura yumaensis* sp. nov. . *Int J Syst Bacteriol* ,1985 **35** (3) 333 - 336.

[8] Tsou H ,Rajan S ,Fiala R ,et al. . Biosynthesis of the antibiotic maduramicin. Origin of the carbon and oxygen atoms as well as the ¹³C NMR assignments. *J Antibiot* ,1984 **37** (12) :1651 - 1663.

[9] Kieser T ,Bibb MJ ,Buttner MJ , et al. . Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich :The John Innes Foundation 2000.

[10] Sambrook J ,Russell D. Molecular Cloning :A Laboratory Manual. 3rd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.

[11] Flett F ,Mersinias V ,Smith CP. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting *Streptomyces* . *FEMS Microbiol Lett* ,1997 **155** (2) :223 - 229.

[12] Ishikawa J ,Hotta K. FramePlot :a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. *FEMS Microbiol Lett* ,1999 **174** (2) :251 - 253.

[13] Kumar S ,Tamura K ,Nei M. MEGA3 :Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 2004 **5** :150 - 163.

Cloning and functional studies of the chromosomal replication origin of *Actinomadura yumaensis*

XIA Hai-yang^{1,2} ,LIN Kai-chun² ,YANG Chang-ju² ,QIN Zhong-jun^{1*}

(¹ Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology ,Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200032 ,China)

(² College of Plant Science & Technology ,Huazhong Agricultural University ,Wuhan 430070 ,China)

Abstract :The chromosomal replication origins(*oriC*) have been investigated in Gram-positive eubacteria actinomycetes , including *Streptomyces* ,*Mycobacterium* and *Amycolatopsis* ,and reveal various *DnaA*-boxes and AT-rich sequences between the conserved *dnaA* and *dnaN* genes. *Actinomadura yumaensis* NRRL12515 is a producer of anthelmintic polyether maduramicin. In this paper ,cloning ,sequencing and functional studies of its *oriC* have been carried out. A pair of oligonucleotide primers ,based on the conserved sequences of *dnaA* and *dnaN* ,was used to PCR amplification. A ~ 1.3kb DNA band was detected on agarose gel. Subsequently cloning in an *E. coli* plasmid pBluescript II SK(+) and sequencing showed 1265bp ,which contained 919bp between *dnaA* and *dnaN* genes. 14 *DnaA*-boxes with conserved 9bp sequence (T/C)(T/C)GTCC(A/C)CA and two 13bp AT-rich regions (GAAAAATCCCAAG ,AAGAAAAAACTCA) were found on the sequence ,indicating the *oriC* of *A. yumaensis* NRRL12515. Phylogenetic trees based on the sequences of *oriC* and of 16S rRNA genes of the four actinomycetes species show a similar pattern ,suggesting that *oriC* sequences also reflected well the relationship between actinomycetes species. An *E. coli* plasmid pOR1 ,containing the *oriC* , actinomycetes selection markers *tsr* and *melC* ,was introduced into *Streptomyces coelicolor* M145 by conjugal transfer. Transformants were obtained and plasmids DNA were isolated and detected as low copy number ,suggesting a functional mini-chromosome in *Streptomyces* .

Keywords : *Actinomadura* ; origin of chromosomal replication

Foundation item :National Natural Science Funds for Distinguished Young Scholar(3025003) ,Knowledge Innovation Project of The Chinese Academy of Sciences(KSCX2-SW-329-3 ,KSCX2-YW-G-014)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-21-54924171 ,E-mail qin@sibs.ac.cn

Received 20 September 2006/ Accepted 30 October 2006/ Revised 6 November 2006