

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(3):406–410; 4 March 2010  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 委内瑞拉链霉菌秦岭变种属间接合转移系统的构建及透明颤菌血红蛋白的表达

高峰<sup>1</sup>, 王斌<sup>1</sup>, 陈太春<sup>1</sup>, 汪志军<sup>2</sup>, 安德荣<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100)

(<sup>2</sup> 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200030)

**摘要:**【目的】构建委内瑞拉链霉菌秦岭变种属间接合转移系统及透明颤菌血红蛋白的表达。【方法】以链霉菌广泛使用的整合型质粒 pSET152 和复制型 pHZ1358 为出发质粒, 通过供体大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ET12567 (pUZ8002) 进行属间接合转移委内瑞拉链霉菌秦岭变种。【结果】确定了该变种的最佳接合转移条件; 通过 SOE-PCR (Splicing by overlap extension PCR) 技术构建含 *Perm E* 和 *vhb* 结构基因融合片段的整合型表达载体 pJD100, 转化 ET12567 (pUZ8002) 后属间接合转移委内瑞拉链霉菌秦岭变种。通过 PCR 和 CO 结合差光谱验证了 *vhb* 基因在委内瑞拉链霉菌秦岭变种中的整合表达。【结论】本文首次探索了委内瑞拉链霉菌秦岭变种接合转移系统, 确定了委内瑞拉链霉菌秦岭变种的最佳接合转移条件, 并采用基因工程手段使 *vhb* 基因在委内瑞拉链霉菌秦岭变种中获得表达。

**关键词:** 委内瑞拉链霉菌秦岭变种; 接合转移; *vhb* 基因; CO 结合差光谱

**中图分类号:** Q786      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0406-05

瑞拉菌素 (Zuelaemycin) 是在进行土壤拮抗微生物筛选和利用研究过程中, 从秦岭太白山区原始森林土壤中, 分离得到一种编号为 S-5120 的放线菌所产生的一种具有自主知识产权的新型微生物农用抗生素, 通过对该编号为 S-5120 的放线菌进行生物特征鉴定和生理生化分析, 认为 S-5120 是委内瑞拉链霉菌的一个新变种, 定名为委内瑞拉链霉菌秦岭变种 (*Streptomyces venezuelae* var. *qinlingensis*. n. Var.)<sup>[1]</sup>。瑞拉菌素对水稻稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae* Cav.)、梨黑星病菌 (*Fusicladium virescens* Bon.)、苹果腐烂病菌 (*Valsa mali* Miyabe et Yamada.)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea* Pers.) 等多种引起植物病害的病原真菌具有很强的抑制作用<sup>[1]</sup>。温室盆栽试验还表明, 瑞拉菌素对黄瓜霜霉病菌 (*Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Cert.)

Rostr.)、番茄早疫病菌 (*Alternaria solani* (Ell. et Mart) Jones et Grout.) 也具有良好防效<sup>[2]</sup>。

委内瑞拉链霉菌秦岭变种的发酵过程是一个严格的好氧过程, 发酵过程中菌丝体的结构致密性和发酵培养基的粘稠性, 往往使溶氧受到限制, 严重制约着抗生素发酵效价的提高, 严重影响瑞拉菌素的规模化生产。

透明颤菌血红蛋白是一种应用广泛的原核生物血红蛋白。研究发现 VHB 蛋白具有与氧接合和传递氧的能力, 使透明颤菌能生存于贫氧环境中, 基于这一特性, *vhb* 基因已在多种异源宿主, 包括细菌、酵母、动植物细胞中成功表达, 它能明显改善异源宿主在限氧条件下的生长, 提高宿主生物量和促进次级代谢。

本文是首次探索了委内瑞拉链霉菌秦岭变种接

**基金项目:** 国家“863 计划” (2007AA021503); 西北农林科技大学创新团队资助项目 (B07049)

\* 通信作者。Tel: +86-29-87092434; E-mail: anderson323@163.com

**作者简介:** 高峰 (1983–), 男, 山东日照人, 硕士, 研究方向为分子植物病理及植保资源利用。E-mail: gaofeng007xfg@163.com

**收稿日期:** 2009-09-22; **修回日期:** 2009-11-10

合转移系统,确定了委内瑞拉链霉菌秦岭变种的最佳接合转移条件,并采用基因工程手段使 *vhb* 基因在委内瑞拉链霉菌秦岭变种中获得表达的报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 委内瑞拉链霉菌秦岭变种、质粒 pUC57,由本实验室分离和保存;质粒 pSET152、pSET152 衍生质粒 pIB139、pHZ1358、大肠杆菌 DH10B 和 ET12567(pUZ8002)由上海交通大学生命科学技术学院邓子新院士实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA Ligase、1kb Ladder 均购自大连 TaKaRa 公司。硫链丝菌素、安普霉素、卡那霉素、氯霉素、壮观霉素和氨苄青霉素购自美国 Sigma-Aldrich Co.;潮霉素购自瑞士 F. Hottmainn-La Roche Ltd.;链霉素和红霉素购自美国 Amresco Inc.;地高辛杂交试剂盒购自瑞士 F. Hottmainn-La Roche Ltd。PCR 仪购自美国 Bio-Rad Laboratories,杂交炉购自美国 Thermo Electron Corporation,分光光度计采用美国 Beckman Coulter 的 Beckman DU800。

1.1.3 培养基: 大肠杆菌培养基为 LA、LB;委内瑞拉链霉菌秦岭变种的固体培养基为高氏 1 号,液体培养基为 TSBY;委内瑞拉链霉菌秦岭变种与大肠

杆菌的接合转移培养基选用了 TSB 琼脂、R2YE、高氏 1 号和 SFM 培养基。LB 中氨苄青霉素使用量为 100 μg/mL,安普霉素为 50 μg/mL,氯霉素为 25 μg/mL;卡那霉素在链霉菌中的使用浓度是 25 μg/mL,在大肠杆菌中是 50 μg/mL;接合转移培养基中安普霉素使用量为每 20 ml 平板 1000 μg。

1.2 DNA 操作

大肠杆菌质粒提取、Southern 杂交和 DNA 探针的标记参照文献[3],链霉菌 DNA 提取参照文献[4]。

1.3 委内瑞拉链霉菌秦岭变种对抗生素的敏感性检测

参见文献[5]进行操作。

1.4 大肠杆菌与委内瑞拉链霉菌秦岭变种属间接转移体系的构建

委内瑞拉链霉菌秦岭变种孢子和菌丝体的接合转移参见文献[6-8]进行操作。

1.5 重组质粒 pJD100 的构建

质粒 pUC57 上含有红霉素抗性基因(*erm E*),*Perm E* 是能在链霉菌中组成型表达且较强的启动子。根据 GenBank 上公布的 *vhb* 基因和 *erm E* 序列,设计引物 GP1、GP2、GP3、GP4,均由上海生工合成,在 GP1 和 GP4 引物的 5'端引入 *EcoR I* 和 *Nde I* 位点(下划线部分)。引物序列如表 1 所示:

表 1 基因扩增引物序列

Table 1 Primer used in competence and sporulation associated genes PCR

Primer	Sequence(5'→3')	Size/bp	Restriction site
GP1	CGGAATTAGGTACCAGCCCGACCCGAGCAC	30	<i>EcoR I</i>
GP2	TGGTTTGCTGCTCTAACATGCGCTGGATCCTACCA	35	
GP3	TGGTAGGATCCAGCGCATGTTAGACCAGCAAACCA	35	
GP4	GCGAATTCCATATGTTATTCAACCGCTTGAGCGT	34	<i>Nde I</i>

2 结果

2.1 委内瑞拉链霉菌秦岭变种对抗生素的敏感性

为了确定用于委内瑞拉链霉菌秦岭变种进行遗传操作的选择标记,检测了委内瑞拉链霉菌秦岭变种对安普霉素、卡那霉素、硫链丝菌素、壮观霉素、氯霉素、潮霉素、链霉素、红霉素和氨苄青霉素 9 种抗生素的抗性水平。结果如表 2 所示,委内瑞拉链霉菌秦岭变种对硫链丝菌素特别敏感,在浓度大于等于 0.1 μg/mL 的平板上就不生长;对安普霉素、链

霉素、红霉素比较敏感,在浓度为 1.0 μg/mL 板上生长缓慢,在浓度大于等于 2.0 μg/mL 的平板上不生长;对卡那霉素、壮观霉素、氯霉素在浓度为 2.0 μg/mL 的平板上生长缓慢;对潮霉素在浓度为 10.0 μg/mL 的平板上生长缓慢,但在浓度为 50.0 μg/mL 的氨苄青霉素平板上仍能正常生长。本实验结果表明硫链丝菌素、安普霉素、链霉素、红霉素、壮观霉素、氯霉素和卡那霉素可以作为委内瑞拉链霉菌秦岭变种进行遗传操作的选择标记。

表 2 委内瑞拉链霉菌秦岭变种对抗生素的敏感性

Table 2 Antibiotic Sensitivity of *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis*

Antibiotics	Antibiotics concentration in MM medium/( $\mu\text{g/mL}$ )							
	0	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0	50.0
Thiostrepton	+	+	—	—	—	—	—	—
Apramycin	+	+	+	+	—	—	—	—
Streptomycin	+	+	+	+	—	—	—	—
Erythromycin	+	+	+	+	—	—	—	—
Spectinomycin	+	+	+	+	+	—	—	—
Chloramphenicol	+	+	+	+	+	—	—	—
Kanamycin	+	+	+	+	+	—	—	—
Hygromycin	+	+	+	+	+	+	+	—
Ampicillin	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Normal growth; + : Slow growth; + / - : Light growth; - : No growth.

2.2 委内瑞拉链霉菌秦岭变种的接合转移系统的建立和优化

分别以委内瑞拉链霉菌秦岭变种的孢子和菌丝体做为受体,选用了TSB琼脂、R2YE、高氏1号和SFM培养基进行接合转移。结果表明,以菌丝体为受体的接合转移实验中,在任何培养基上均未得到的接合子;而孢子在高氏1号培养基上长出了上百个接合子,在其他培养基上不生长或仅长出零星几个。因此高氏1号培养基是委内瑞拉链霉菌秦岭变种接合转移的首选培养基。

实验发现热激温度对孢子萌发的影响如图1所示,45℃处理20 min时,热激孢子的萌发率最高,显著高于没有热激孢子的萌发率(未热激的孢子活力定为100%),因此确定了委内瑞拉链霉菌秦岭变种孢子在45℃时处理20 min的热激条件作为接合转移的最佳条件,可用于后继实验。

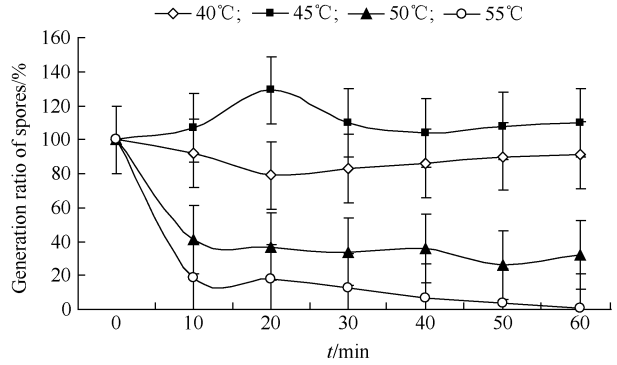


图 1 不同热激温度对包子萌发的影响

Fig. 1 Influence of heat treatment on spore germination.

实验还发现抗生素覆盖时间对接合转移效率影响明显,在本实验条件下,11 h覆盖效果最佳。时间少于11 h,孢子萌发后还没有充分表达转移进去的抗生素,覆盖将杀死菌体;时间超过11 h,菌丝体生长过旺,没有转进质粒的菌体也将生长,不利于后

期的阳性克隆的筛选。

在同样条件下,高拷贝载体pHZ1358的接合转移效率低于整合型载体pSET152,可能是因为pHZ1358是高不稳定 $sti^+$ 载体的缘故。而且pHZ1358的链霉菌复制子是不稳定的,在没有抗生素选择下很容易丢失。

表 3 不同质粒的接合转移效率

Table 3 Effects of different donors plasmids on conjugal transfer

Donor <sup>1</sup>	Plasmid	Receptor spores <sup>2</sup>	Conjugants	Efficiency of conjugal transfer <sup>3</sup>
ET12567	pSET152	$10^7$	236	$2.36 \times 10^{-5}$
(pUZ8002)	pHZ1358	$10^8$	93	$9.3 \times 10^{-7}$

1. The quantity of donor *E. coli* in every experimental was ca.  $10^8/\text{mL}$ ;  
2. Conjugants were counted from Gause's Synthetic Agar plates;  
3. Conjugation efficiency was expressed by the number of conjugant/receptor. Data were obtained from three experimental repeats.

实验确定,以pSET152为出发质粒,委内瑞拉链霉菌秦岭变种属间接合转移的优化体系为:选取供体菌/受体孢子为 $10^8:10^7$ ,孢子的热激温度为45℃时处理20 min,在30℃培养11 h进行覆盖,吹干后继续培养72 h后可见接合子长出。

2.3 委内瑞拉链霉菌秦岭变种转化子的 Southern 杂交检测和分析

根据质粒pSET152的酶切位点,用限制性内切酶Hind III和Xho I完全酶切,回收酶切位点之间含有 $\Phi\text{C31 attP}$ 位点的约2.3 kb的片段作为探针,与接合子总DNA经BamH I酶切的片段杂交。杂交结果显示(图2),在随机提取的4个接合子样品的DNA中都出现了两条杂交信号。而以委内瑞拉链霉菌秦岭变种总DNA经BamH I酶切后的样品作为对照,在同样的条件下杂交显示阴性。结果表明质粒pSET152能以attP位点整合到委内瑞拉链霉菌秦岭变种的染色体上,说明委内瑞拉链霉菌秦岭变种具有其对应的attB位点,可作为整合型载体的衍生质粒的遗传操作对象。

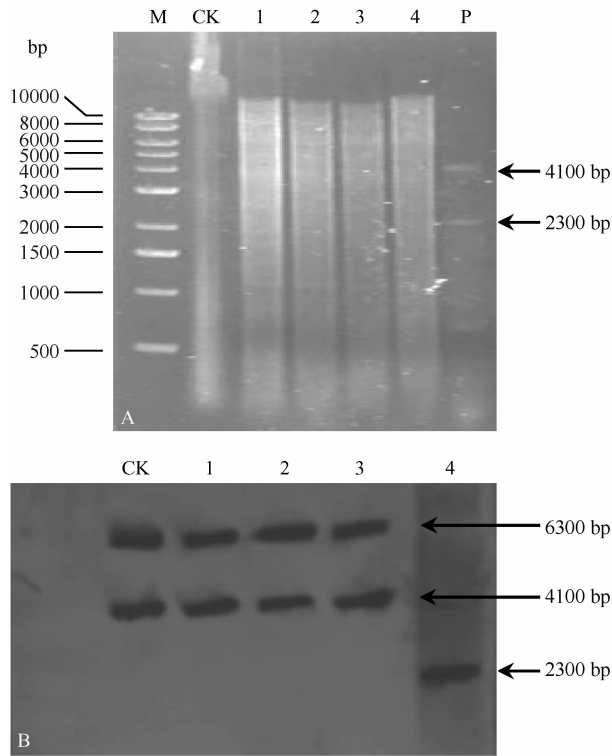


图2 委内瑞拉链霉菌秦岭变种转化子的 Southern 杂交检测

Fig. 2 Southern blotting confirmation of pSET152 integrated into *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis* chromosome. A: Agarose gel of *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis* conjugants chromosome DNA digested with *Bam*H I. B: Southern blotted gel of A. Integrated pSET152 was probed with ΦC31 *att*P containing 2.3 kb DNA of pSET152 fragment labeled by dUTP-digoxin. M: marker DNA; Lane 1 to 4: *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis* pSET152 conjugants; P: pSET152 digested with *Hind* III and *Xho* I; CK: chromosome DNA of *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis* digested with *Bam*H I as a negative control.

2.4 整合型载体 pJD100 的构建

质粒 pUC57 上含有红霉素抗性基因 (*erm* E), *Perm* E 是能在链霉菌中组成型表达且较强的启动子。根据 GenBank 上公布的 *vhb* 基因和 *erm* E 序列,利用引物 GP1、GP2 为引物扩增出 280 bp 左右的 *Perm* E;利用引物 GP3、GP4 为引物扩增出 460 bp 左右的 *vhb* 基因;利用 SOE-PCR 将 *vhb* 基因置于的 *Perm* E 启动子之下,利用 *Perm* E 启动子表达 *vhb* 基因。将 *Perm* E + *vhb* 克隆到 pSET152 衍生质粒 pIB139 上,利用蓝白斑筛选得到克隆子 pJD100,酶切分析 *Perm* E + *vhb* 已成功克隆到载体上,并以相同的方法构建不含 *vhb* 的载体 pJD101 作为对照。

2.5 vhb 基因在委内瑞拉链霉菌秦岭变种中的整合表达

重组质粒 pJD100 含有 *att*P 整合位点,可特异性的整合到委内瑞拉链霉菌秦岭变种的染色体上,PCR 验证 *vhb* 基因已成功整合到染色体上,并将工程菌株在无抗生素压力的情况下,续传 10 代后提取 DNA,以此为模板 PCR 验证表明 *vhb* 基因仍稳定整合在染色体上。CO 结合差光谱检测工程菌株细胞粗提物,发现在 420 nm 处有一个特征吸收峰(图 3),表明 *vhb* 基因已成功的表达出具有生物活性的 VHb 蛋白。

3 讨论

接合转移作为一种基因转移手段已在多种链霉菌中成功应用,它不仅可以避开胞外核酸酶,使 DNA 免遭核酸酶的降解,在某种程度上克服宿主对外源 DNA 的限制性障碍;而且操作程序相对简单,是一种很有潜力的基因转移方法<sup>[9]</sup>。

目前,国内外大肠杆菌和委内瑞拉链霉菌属间接合转移系统并没有明确的报道,委内瑞拉链霉菌秦岭变种作为一种新型链霉菌,本实验首次探索并

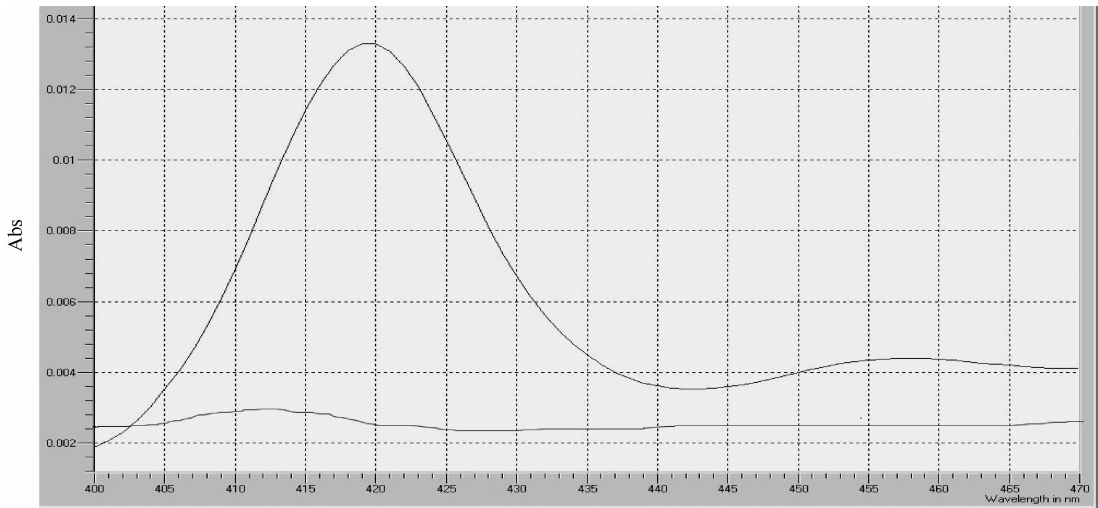


图3 工程菌株细胞粗提物的 CO 差光谱

Fig. 3 Carbon monoxide binding difference spectrum of crude cell extract from engineering strain of *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis*.

优化了大肠杆菌/委内瑞拉链霉菌秦岭变种属间接合转移系统,优化了接合转移条件。

本实验由于 *vhb* 基因自身携带的启动子在链霉菌中无法识别,所以试验中选择在链霉菌中可表达的强启动子 *erm E*,利用整合型载体将 *vhb* 基因整合到链霉菌的染色体上,以期通过改善工程菌株的对氧的利用率,对链霉菌次级代谢进行正向调控。本实验实现了外源基因定植于产瑞拉菌素抗生素的工程菌株中,并得了稳定表达,但要实现瑞拉菌素的大规模工业化生产还需要进一步的实验研究。

抗生素是我国最大的生物产业,但 *vhb* 基因要在发酵工业上真正应用还需要不断的改造。随着链霉菌基因工程技术的发展,使得克隆次级代谢产物的合成基因、有目的的定向改造基因、提高基因表达水平以改造菌株的生产能力、基因重组产生新化合物等多种改造成为可能。

瑞拉菌素作为一种新型的抗生素,以期通过基因重组获得高效价的工程菌株,实现瑞拉菌素的大规模工业化生产,对提高我国抗生素在国际市场上的竞争力,研发具有独立知识产权的新型农药等具有重要意义;对保护生态环境、发展绿色农业也具有一定的积极作用。

## 参考文献

- [1] 安德荣,幕小倩. 瑞拉菌素产生菌的鉴定. 微生物学杂志 (*Journal of Microbiology*),2002,22(2):5-6.
- [2] 疏秀林,安德荣. 瑞拉菌素产生菌 S-5120 菌株防治黄瓜霜霉病害的研究初报. 西北植物学报 (*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*),2004,24(11):2118-2122.
- [3] Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2002.
- [4] Pwood DA, Bibb MJ, Chater KF. 链霉菌遗传操作实验手册. 邓子新,唐纪良译. 第一版. 长沙:湖南科学技术出版社,1988.
- [5] Kieser T, Bibb MJ, Chater KF, et al. *Practical streptomyces Genetics*. Norwich: John Innes Foundation,2002.
- [6] Tobias K, Bibb MJ, Mark JB, et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: John Innes Foundation,2000.
- [7] Flett F, Mersinias V, Smith CP. High efficiency intergeneric transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl-DNA-restricting *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*,1997,155:223-229.
- [8] Biermann M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* species. *Gene*,1992,160:25-31.
- [9] 吴胜,夏焕章. 链霉菌基因转移的方法. 生物工程进展 (*Advances in Biotechnology*),2002,22(1):91-95.

# Construction of conjugal transfer system of *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis* and the expression of vitreoscilla hemoglobin

Feng Gao<sup>1</sup>, Bin Wang<sup>1</sup>, Taichun Chen<sup>1</sup>, Zhijun Wang<sup>2</sup>, Derong An<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Plant Protection and Shanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(<sup>2</sup>Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To Construct of conjugal transfer system of *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis* and express of vitreoscilla hemoglobin. [ **Methods** ] Intergeneric genetic transfer system was based upon plasmid pSET152 and pHZ1358 from Donor *E. coli* ET12567 (pUZ8002) to *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis* [ **Results** ] Our data showed that Intergeneric genetic transfer system was demonstrated and optimized. Integrating plasmid pJD100 containing *Perm E* and construction gene of *vhb*, constructed by SOE-PCR, was transformed to ET12567 (pUZ8002), and then transferred to *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis* by conjugation. The integrating expression of *vhb* gene in *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis* was verified by PCR and CO binding difference spectrum. [ **Conclusion** ] In summary, intergeneric genetic transfer system was demonstrated and optimized, and this is the first report to express *vhb* gene in *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis*.

**Keywords:** *Streptomyces venezuelae* var. *Qinlingensis*; conjugational transfer; *vhb* gene; CO binding difference spectrum

(本文责编:王晋芳)