

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
52(7):916-920; 4 July 2012  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 链霉菌小质粒 pDYM4.3k 的复制与接合转移

周敏, 代玉梅, 钟莉, 覃重军\*

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所合成生物学重点实验室, 上海 200032

**摘要:** 【目的】链霉菌 (*Streptomyces*) X335 是从西藏高原活拉山口分离到的, 其中含有一个大小为 4.3 kb 的环型质粒 pDYM4.3k。克隆、测序和分析 pDYM4.3k, 以及鉴定复制和接合转移的基因。【方法】通过克隆和引物延伸获得 pDYM4.3k 的全序列, 利用比对分析推测基因的功能, 通过 Southern 杂交检测复制中间体, 利用平板杂交实验证明接合转移功能。【结果】克隆和测序获得了全长为 4346 bp 的 pDYM4.3k 序列, 预测仅有 3 个基因, 其中 1 个基因与链霉菌主要接合转移基因同源, 另外 2 个为功能未知。鉴定新的基因 *orf1* 及其上游的约 300 bp 构成了质粒的基本复制区域。检测到质粒存在单链的复制中间体, 表明它以滚环方式进行复制。实验证明 pDYM4.3k 在变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 中具有接合转移功能。【结论】质粒 pDYM4.3k 可以滚环方式进行复制和在链霉菌之间进行接合转移。这是目前报道的最小的、具有游离复制和接合转移功能的链霉菌质粒。

**关键词:** 链霉菌, 质粒, 复制, 接合转移

**中图分类号:** Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 07-0916-05

链霉菌属于高 GC 含量的革兰氏阳性细菌, 是放线菌 (actinomycetes) 中的一个大的类群, 具有复杂的发育和分化周期。更重要的是, 从链霉菌的不同种中已报道约 6000 种抗生素或药理或生理活性物质<sup>[1]</sup>。链霉菌的菌株中常常含有环型质粒, 大小为 8-120 kb, 此外, 链霉菌中还在线型结构的质粒<sup>[2]</sup>。

微生物可以在许多极端环境, 如高温、极端酸碱、高盐、高压、高辐射等中生存。由于适应极端环境的结果, 极端微生物在生长特性、营养需求、繁殖规律、细胞结构、蛋白及酶的结构、基因表达、调控、修复等可能与正常环境中的微生物有所不同。目前对极端环境中的放线菌研究多集中在分类学、生态

学、生理学及酶学方面, 分子遗传方面较少<sup>[3]</sup>, 质粒的研究对开发和利用极端环境放线菌资源具有重要的意义。本论文报道对一个分离自西藏高原的小的链霉菌环型质粒的分子遗传学方面的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒:** 实验所用的菌株、质粒见表 1。

**1.1.2 主要试剂金额仪器:** 所用抗生素氨基青霉素、壮观霉素、硫链丝菌素均购于 Sigma 公司, 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、环型 DNA 分子量标准物购于 MBI 公司。随机引物标记试剂盒购自大连宝

基金项目: 国家“973 项目”(2011CBA00801); 国家自然科学基金(31121001); 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-EW-G-13)

\* 通信作者。Tel: +86-21-54924171; Fax: +86-21-54924176; E-mail: qin@sibs.ac.cn

作者简介: 周敏(1981-), 男, 湖南祁阳人, 博士研究生, 主要从事链霉菌分子遗传学研究。E-mail: zhoumin1108@gmail.com

收稿日期: 2012-02-10; 修回日期: 2012-03-20

生物公司。放射性同位素 [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP 购自北京 盒购自上海华舜生物技术有限公司。  
市福瑞生物工程公司核酸研究室。DNA 回收试剂

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

| Strain and plasmid           | Genotype or description  | Sources   |
|------------------------------|--|-----------|
| <i>Streptomyces</i> sp. X335 | Harbors plasmid pDYM4. 3k  | This work |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$  | F <sup>-</sup> $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-mk <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44</i> $\lambda^{-}$ <i>thi-1</i><br><i>gyrA96 relA1</i> | This lab  |
| <i>S. lividans</i> ZX7       | <i>pro-2 str-6 rec-46</i> $\Delta$ <i>dnd</i> HAU3 <sup>S</sup> SLP2 <sup>-</sup> SLP3 <sup>-</sup>  | [4]       |
| <i>S. lividans</i> TK23      | <i>str<sup>R</sup></i> SLP2 <sup>-</sup> SLP3 <sup>-</sup>   | [5]       |
| pBluescriptII SK             | <i>Amp</i> , <i>lacZ</i>   | This lab  |
| pSP72                        | <i>Amp</i> , <i>lacZ</i>   | This lab  |
| pQC156                       | <i>Thetsr</i> and <i>melC</i> genes from pIJ702 cloned into an <i>E. coli</i> plasmid pSP72  | [6]       |
| pQC578                       | A 6-kb <i>MluI</i> fragment of pSLA2 which contains <i>rep/rtrA/rorA</i> genes cloned in pQC156  | [6]       |
| pDZ29                        | A 4.3-kb <i>SphI</i> fragment of pDYM4. 3k cloned in pQC156  | This work |
| pDZ38                        | A 1.5-kb fragment ( <i>SmaI/XmnI</i> ) of pDYM4. 3k cloned in pBluescript II SK ( <i>EcoRV</i> ) and then cloned in pQC156 ( <i>EcoRI/HindIII</i> )  | This work |
| pDZ41                        | A 2.6-kb fragment ( <i>SphI/ApaLI</i> ) of pDYM4. 3k cloned in pBluescript II SK ( <i>EcoRV</i> ) and then cloned in pQC156 ( <i>PstI/HindIII</i> )  | This work |
| pDZ10                        | A 1.9-kb fragment (3743-4346 bp/1-1369 bp, PCR) of pDYM4. 3k cloned in pQC156 ( <i>BamHI</i> )   | This work |
| pDZ11                        | A 1.6-kb fragment (4058-4346 bp/1-1369 bp, PCR) of pDYM4. 3k cloned in pQC156 ( <i>BamHI</i> )   | This work |
| pDZ12                        | A 1.4-kb fragment (4247-4346 bp/1-1369 bp, PCR) of pDYM4. 3k cloned in pQC156 ( <i>BamHI</i> )   | This work |
| pDZ17                        | A 4.3-kb <i>SphI</i> fragment of pDYM4. 3k cloned in pQC578  | This work |

**1.1.3 引物:** 16S rRNA 引物为 F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') 和 R(5'-TCA GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), PCR 扩增条件为: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 2 min, 35 个循环; 72°C 10 min。

## 1.2 培养和基本的遗传操作

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 培养、转化、质粒提取、Southern 杂交等基本操作见文献 [7]。链霉菌的培养、接合转移、原生质体的制备及转化参照文献 [5]。原生质体制备、转化和再生培养基为 R5, MS 培养基用于接合转移以及挑选接合转移后的链霉菌接合子。培养温度为 30°C。抗生素的使用终浓度为: 氨苄青霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硫链丝菌素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (固体) 和 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (液体培养)。

## 1.3 序列分析

利用软件 Framplot4.0beta (<http://nocardia.nih.gov/jp/fp4>) 对测序的结果进行 ORFs 预测 [8], 并且根据链霉菌基因第三位碱基密码子的偏好性进行检验。预测出的各个 ORFs 推测氨基酸序列在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行同源性分析。pDYM4. 3k 全序列已经提交 GenBank 数据库, 编号是 JQ621947。

## 1.4 质粒 pDYM4. 3k 复制区的鉴定

**1.4.1 引物:** 通过序列分析预测 pDYM4. 3k 的 ORF1 为复制基因, 围绕该基因设计了 3 对引物 (5' → CGCGGATCCACCACTACCGCCCGACCCTT3' / 5' → CGCGGATCCTTGCTTCGCACGGTCAGG3'; 5' → CGCGGATCCATGACTCAGAACGGAGAAGACG3' / 5' → CGCGGATCCTTGCTTCGCACGGTCAGG3'; 5' → CGGGATCCGGGCTTGTTACATCTGCCATAA3' / 5' → CGCGGATCCTTGCTTCGCACGGTCAGG3'), PCR 扩增后, 用 *BamHI* 酶切, 克隆到大肠杆菌质粒 pQC156 上分别得到质粒 pZH10、pZH11 和 pZH12; 用 *SphI* 和 *ApaLI* 从 pDYM4. 3k 酶切切下含 ORF1 的片段, 克隆到大肠杆菌质粒 pQC156 上分别得到质粒 pZH41。提取质粒 DNA 转化变铅青链霉菌 ZX7 的原生质体, 在 R5 平板上选择硫链丝菌抗性转化子。

## 1.5 质粒在链霉菌之间的接合转移

将构建好的重组质粒转化 ZX7 原生质体, 挑单个的转化子, 接种在 2CM 补加 thiostrepton 的斜面培养基上, 30°C 培养 5-7 d, 收集孢子, 作为供体菌。另外接种变铅青链霉菌 TK23, 制备孢子悬液, 作为受体菌。TK23 在染色体上带有壮观霉素的选择抗

性。将等量的供体菌和受体菌的孢子 ( $1 \times 10^8$  个) 的孢子悬液充分混合后, 涂布 2CM 平板,  $30^\circ\text{C}$  培养 7 d, 收获孢子, 将孢子液做梯度稀释后, 分别涂布抗性选择平板: 2CM + spectinomycin, 2CM + spectinomycin + thiostrepton。每个稀释度涂布 3 块 2CM 平板。在合适的稀释度情况下, 对平板的单菌落计数。按照以下公式计算质粒的接合转移频率: 接合转移频率 = 接合子数 ( $\text{thio}^R + \text{spc}^R$ ) / 亲本数 ( $\text{spc}^R$ )

### 1.6 Southern 杂交检测复制中间体

为了检测质粒 pDYM4.3k 在复制时是否有大量单链 DNA 的存在, 提取菌株 X335 和变铅青链霉菌 ZX7 (pIJ702) 的总 DNA, 用特异降解单链 DNA 的 S1 酶处理, 在  $20 \mu\text{L}$  酶切体系中, 加  $17 \mu\text{L}$  DNA 溶液, 1 unit 的 S1 酶,  $37^\circ\text{C}$  处理 30 min 后, 进行凝胶电泳, 凝胶用中性 pH 缓冲液处理转膜后进行 Southern 杂交检测。探针为 pDYM4.3k 和 pIJ702。

## 2 结果

### 2.1 粒 pDYM4.3k 的克隆、测序和分析

链霉菌 X335 是从西藏活拉山口 (4572 m) 分离到的, 经 16S rDNA 测序和比对, 与链霉菌属有 99% 的相似性, 因此, X335 属于链霉菌。抽提质粒 DNA, 在凝胶电泳上检测到 4 个环型质粒 (约为 50, 40, 20 和 4.3 kb), 其中最小的一个质粒, 命名为 pDYM4.3k。用多种限制性核酸内切酶对

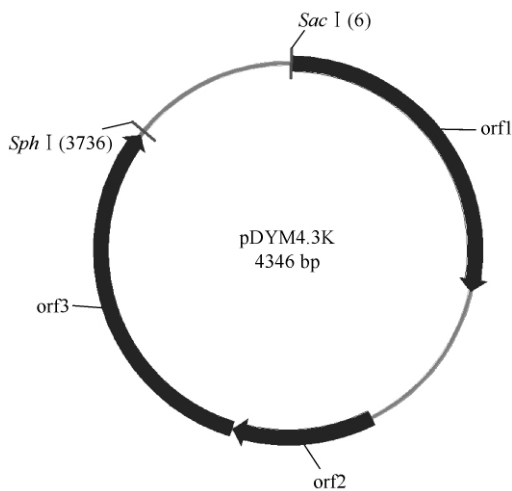


图 1 pDYM4.3k 的图谱

Fig. 1 Diagram of pDYM4.3k. Genes are indicated by filled arrowheads.

pDYM4.3k 的 DNA 进行消化, 发现 *SacI* 在该质粒上有单一的酶切位点。将 pDYM4.3k 克隆到大肠杆菌质粒 pSP72, 通过引物步移 (primer walking) 方式完成测序。pDYM4.3k 大小为 4346 bp, G + C 含量为 65.9%, 低于典型的链霉菌基因组的含量 (如天蓝色链霉菌基因组为 72.1% 的 GC 含量<sup>[9]</sup>)。从全序列推测仅有 3 个基因 (opening reading frame, orf) (图 1), 其中 *orf3* 与链霉菌主要接合转移基因 *tra* 高度相似 (相似值 27%, E. 值  $6 \times 10^{-18}$ ), 而 *orf1* 和 *orf2* 编码未知功能的蛋白, *orf2* 和 *orf3* 可能在一个转录单元内。

### 2.2 粒 pDYM4.3k 基本复制区的鉴定

为了鉴定质粒的复制区, 将 pDYM4.3k 上不同的片段克隆到复制子探针载体 pQC156, 构建了不同大小的质粒。转化变铅青链霉菌 ZX7 原生质体, 图 2 的结果显示, 含有完整的 *orf1* 及其上游约 300 bp 序列的质粒 (如 pDZ29, pDZ41, pDZ10, pDZ11), 可以转化 ZX7, 获得硫链丝菌素抗性转化子。而含有更短的上游序列 (如 100 bp, pDZ12) 或不完整 *orf1* 基因 (如 pDZ38), 没有得到抗性转化子。因此, 可以确定 *orf1* 是 pDYM4.3k 的复制基因 (命名为 *rep*), 其上游约 300 bp 的序列也参与了质粒的复制。

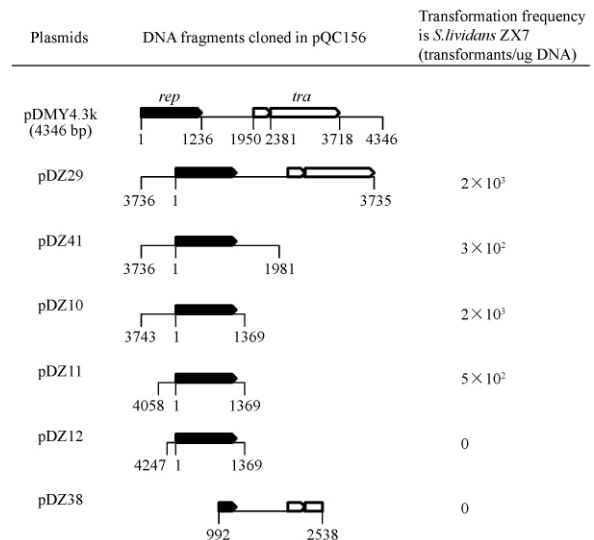


图 2 pDYM4.3k 基本复制区的鉴定

Fig. 2 Identification of a pDYM4.3k locus for replication in *Streptomyces*. Plasmids were constructed in *E. coli* and introduced by transformation into strain ZX7. Positions of these cloned fragments on pDYM4.3k and transformation frequencies are shown. *orf2* and *tra* are indicated by blank arrowheads and replication genes by filled arrowheads.

### 2.3 质粒 pDYM4. 3k 以滚环方式进行复制

细菌质粒的复制方式分为两种, theta 型和滚环型 (rolling circle, RC) [10]。与 theta 型复制不同的是, RC 型复制中会积累大量的单链 DNA 中间体 [10]。抽提菌株 X335 的总 DNA, 用单链 DNA 特异的核酸酶 S1 进行消化后进行凝胶电泳。凝胶中的 DNA 未经碱变性, 直接进行 Southern 转移和杂交。图 3 显示, 与已知 RC 复制的链霉菌质粒 pIJ101 衍生的 pIJ702 [11] 一样, X335 中的 pDYM4. 3k 也可以形成单链的 DNA, 该 DNA 可以被 S1 核酸酶降解。

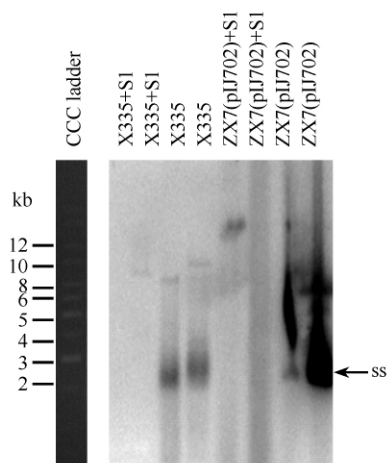


图 3 Southern 杂交检测 pDYM4. 3k 复制的单链 DNA 中间体

Fig. 3 Detection of replication intermediates of pDYM4. 3k by Southern hybridization. Aliquot DNAs were electrophoresed on agarose gels and then soaked with neutral pH buffer for transfer on nylon membranes. Southern hybridizations were performed with probes of pDYM4. 3k and pIJ702. SS (single strand) DNA is indicated.

### 2.4 质粒 pDYM4. 3k 接合转移功能的验证

序列分析显示 pDYM4. 3k 的 *orf3* 编码链霉菌主要接合转移 Tra 蛋白, 暗示该质粒为接合型质粒。将 pDYM4. 3k 克隆至不能接合转移的链霉菌质粒 pQC578 上得到 pDZ17, 转化了 ZX7 的 pDZ17 与变铅青链霉菌 TK23 进行平板杂交。结果显示, pDYM4. 3k 从 ZX7 转移到 TK23 中的效率约为 10% (接合子双抗性数量为  $1 \times 10^4$ , 受体菌  $1.1 \times 10^5$ )。

## 3 讨论

已报道的最小的、可以进行游离复制和接合转移的链霉菌质粒是 8830 bp 的模式质粒 pIJ101, 该

质粒预测编码 12 个基因 [12]。而这里报道的质粒 pDYM4. 3k, 大小为 4346 bp, 预测编码仅 3 个基因。实验证明, pDYM4. 3k 参与复制的基因 (*orf1*) 为一个新的复制基因, 通过数据库比对, 该基因没有保守的功能域, 与链霉菌的基因没有明显的同源性, 但是, 与多个分支杆菌 (*Mycobacterium*) 的未知功能的基因有高的相似性, 如基因 JDM601\_0775 (相似性 40% [166/420], 预期值  $2e-79$ ), 基因 OCU\_06970 (相似性 39% [163/419], 预期值  $1e-75$ )。pDYM4. 3k 的 *rep* 基因可以在大肠杆菌中过量表达, 但是蛋白主要在包涵体中不可溶解 (图片未列出)。通过检测复制中间体表明该质粒与 pIJ101 衍生的 pIJ702 一样, 进行滚环型复制。还证明了 pDYM4. 3k 可以在变铅青链霉菌中进行接合转移。因此, pDYM4. 3k 是目前报道的天然最小的具有游离复制和接合转移功能的链霉菌质粒。

西藏高原地处世界屋脊, 平均海拔 4000 m, 气候寒冷, 降水少, 封冻期长, 加之氧气稀薄紫外线辐射强烈, 使西藏高原成为一个十分特殊的生态区 [13]。质粒 pDYM4. 3k 的宿主菌 X335 分离自西藏高原的土壤, 可能是菌株为了适应特殊生境, 丢失了一些生存所非必需的基因, 导致质粒 pDYM4. 3k 上的功能基因高度浓缩。对于这种极端环境来源的菌株的遗传因子目前研究还不多, 深入理解其形成的分子机理以及进化具有重要意义, 对于功能基因的研究也有助于将来对极端环境放线菌的开发和利用。

## 参考文献

- [1] Berdy J. Bioactive microbial metabolites - A personal view. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58:1-26.
- [2] Hopwood DA, Kieser T. Conjugative plasmids of *Streptomyces*//Clewell DB. *Bacterial Conjugation*. New York: Plenum Press, 1993:293-311.
- [3] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术. 北京: 科学出版社. 2004. p. 213-241.
- [4] Zhou X, Deng Z, Firmin JL, Hopwood DA, Kieser T. Site-specific degradation of *Streptomyces lividans* DNA during electrophoresis in buffers contaminated with ferrous iron. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16 (10): 4341-4352.
- [5] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation Press. 2000.

- [6] Qin Z, Shen M, Cohen SN. Identification and characterization of a pSLA2 plasmid locus required for linear DNA replication and circular plasmid stable inheritance in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (22) :6575-6582.
- [7] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- [8] 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 Microbiology Letters*, 1999, 174 (2) :251-253.
- [9] Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitz E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, 417:141-147.
- [10] Khan SA. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid*, 2005, 53 (2) :126-136.
- [11] Katz E, Thompson CJ, Hopwood DA. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *Journal of General Microbiology*. 1983, 29:2703-2714.
- [12] Kendall KJ, Cohen SN. Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 and correlation of the sequence with genetic properties. *Journal of Bacteriology*. 1988, 170 (10) :4634-4651.
- [13] 邓显容, 王志杰, 陈本海, 杨丁英. 西藏高山草原土放线菌研究初探. 西昌农业高等专科学校学报 (*Journal of Xichang Agricultural College*), 2002, 16 (1) :14-16.

## Replication and conjugation of *Streptomyces* small plasmid pDYM4.3k

Min Zhou, Yumei Dai, Li Zhong, Zhongjun Qin\*

Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

**Abstract:** [Objective] *Streptomyces* sp. X335, harboring a 4.3-kb plasmid pDYM4.3k, was isolated from Tibet sample. Cloning, sequencing, analyzing and functional investigations of pDYM4.3k. [Methods] Prime walking to obtain plasmid sequence, BLAST to predict gene function, Southern hybridization to determine replication intermediates, and mating to test conjugal function of plasmid. [Results] The complete nucleotide sequence of pDYM4.3k consisted of 4346 bp, encoding 3 genes of which one resembled *Streptomyces* major conjugative gene *tra* and other two were with unknown functions. Experiments demonstrated that a new gene of pDYM4.3k and its upstream c. 300 bp were required for plasmid replication. Single-stranded pDYM4.3k as a replication intermediate was detected, indicating it rolling-circle replication mode. pDYM4.3k could conjugal transfer among *Streptomyces lividans*. [Conclusion] *Streptomyces* small plasmid pDYM4.3k was able to autonomous replication and conjugal transferring.

**Keywords:** *Streptomyces*, plasmid, replication, conjugation

(本文责编:王晋芳)

Supported by Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2011CBA00801), by the National Natural Science Foundation of China (31121001) and by the Chinese Academy of Sciences Project (KSCX2-EW-G-13)

\* Corresponding author. Tel: +86-21-54924171; Fax: +86-21-54924176; E-mail: qin@sibs.ac.cn

Received: 10 February 2012 / Revised: 20 March 2012