

圈卷产色链霉菌分化关键基因——*saw1* 的克隆及酶切分析*

谭华荣 王 垒 田宇清 杨海花

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

链霉菌是现代生物学研究中一种重要的微生物,它有两个突出的特征:其一,有无与伦比的合成次生代谢产物的能力,世界上所知数千种抗生素的 70% 由其产生。其二,有一个复杂的发育分化的生命周期,是微生物分化研究的一个最好的模式材料。链霉菌分化主要为形态分化和生理分化,两者彼此独立又相互关联,构成复杂的分化调控网络^[1],研究分化基因的调控不但有重要的理论意义,而且可用于控制抗生素的生物合成,因此弄清合成途径的分子机制,也有潜在的应用价值。圈卷产色链霉菌是从我国东北土壤中分离的尼可霉素(Nikkomycin)产生菌,它有链霉菌典型的分化生命周期,为了在分子水平研究分化基因的时空表达及调控机制,进行分化中关键基因的克隆至关重要,本文报道这方面的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株及质粒

圈卷产色链霉菌(*Streptomyces ansochromogenes*) 7100,天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)孢子形成缺陷的白色突变株 C71,大肠杆菌(*E. coli*) JM109,质粒 pIJ702(Thio^R,含有硫链丝菌素抗性基因) pUC18 和 Bluescript M13 均由本研究组保存。圈卷产色链霉菌孢子形成缺陷的白色突变株 W51 由本研究组诱变获得。

1.2 培养基

原生质体再生培养基(R2YE),基本培养基(MM)以及液体培养基(YEME)均按文献[2]配制。

1.3 酶、抗生素及试剂

所用限制性内切酶 Bgl II、EcoR I、EcoR V、Hind III、Kpn I、Pst I、Apa I、BamH I、Sph I、Sac I、Sal I 和 Sma I 均为华美生物工程公司产品。T4 DNA 连接酶为 Boehringer 公司产品。羧苄青霉素(Cb, Carbencillin)贮存液浓度为 100 μ g/ml,使用浓度为 50 μ g/ml。硫链丝菌素(Thio, Thiostrepton)贮存液浓度为 100mg/ml,在 R2YE 中使用浓度为 50 μ g/mL,在 MM 中使用浓度为 10 μ g/mL,上述抗生素贮存液均置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。非同位素地高辛(Digoxigenin-11-dUTP)是 Boehringer Mannheim 公司产品。

1.4 质粒 DNA 的提取及 PCR 扩增

质粒 DNA 的提取按文献[3,4]方法进行。多聚酶链式反应(PCR)扩增按常规方法进行。DNA 模板的使用浓度为 100 ng,两个引物的使用浓度分别为 20 pmol。反应条件按文献[4]方法进行。

1.5 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化^[5]

1.6 链霉菌原生质体制备、再生及转化^[2]

* 国家自然科学基金和中国科学院“百人计划”基金资助项目。

本文于1997年2月3日收到。

1.7 紫外诱变

由于紫外照射使 DNA 链上的胸腺嘧啶形成嘧啶二聚体,使细胞在 DNA 复制过程中出现错误而引起突变。把含有 10^5 的孢子悬浮液涂布在 MM 平板上,用 15W 紫外灯,距 30 cm,照射 20 s,致死率近 99%。

1.8 形态分化的观察

连续观察接种在 MM 及 R2YE 培养基上的菌株形成的基质菌丝、气生菌丝、孢子和色素。成熟的孢子有其特有的灰色色素,肉眼易观察。同时在接种的 MM 平板的培养基表面插上盖玻片,由于气生菌丝生长是向培养基表面的空中延伸,用光学相差显微镜可观察到盖玻片上气生菌丝到孢子形成的连续过程。

2 结果

2.1 突变株的鉴定及稳定性

紫外诱变后的菌株置于暗处培养,在 MM 平板上挑出白色菌落,选出的菌落经转接培养后大部分恢复野生型灰色表型。在 MM 平板上经 12 次传代培养后,得到了 20 株稳定的白色突变株,并对这些突变株进行了形态显微观察。其中,白色突变株 W51 经培养 8d 后进行观察只有长而直的气生菌丝,有不明显的分隔,不产色素和不能形成孢子(图略)。结果表明 W51 突变株相关的基因可能阻断在分化的早期,即分化的起始阶段。W51 能制备成原生质体,并能再生。可被来自变铅青链霉菌的质粒 pJ702 所转化。因此,鉴于该菌株的特性可做克隆分化基因的受体菌株。

2.2 *saw1* 基因的克隆

从圈卷产色链霉菌 7100 野生型菌株中提取的总 DNA,用 *Sau3A* I 部分酶切,使大部分片段位于 4~10 kb 处,载体 pJ702 用 *Bgl* II 酶切。上述酶切片段和 pJ702 用 T4 DNA 连接酶连接后转化孢子形成缺陷白色突变株 W51,在含有硫链丝菌素的 R2YE 的 40 个平板上得到了近 3 000 个转化子。当把这些转化子影印到 MM 平板,经 7 d 培养后在构建的文库中找到了一个具有野生型 7100 灰色表型和能形成孢子的转化子。从该转化子中进行了质粒 DNA 的提取,得到了比载体约大 7 kb 的重组质粒,此质粒被命名为 pSAW1,其中与分化有关的基因被称为 *saw1* (*Streptomyces ansochromogenes* 1),即圈卷产色链霉菌白基因 1。当把 pSAW1 再转化到 W51 后,转化子都有灰色的孢子。

2.3 *saw1* 基因的亚克隆及酶切分析

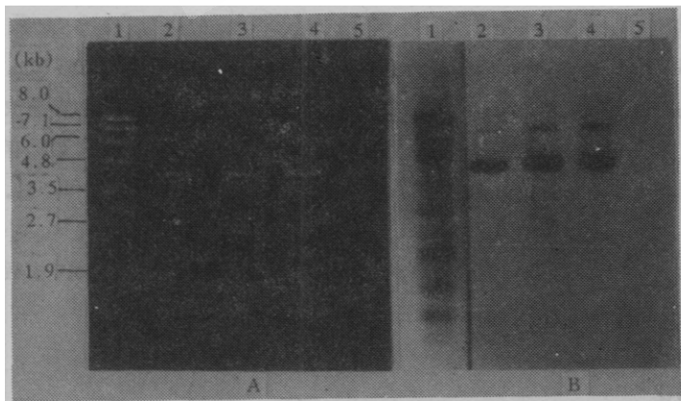


图1 pTH1000酶切的琼脂糖凝胶电泳(A)和Southern blot杂交(B)

1. *Ssp*I-*Eco*R I 酶切; 2~4. pTH1000 *Pst* I 和 *Kpn* I 酶切;

5. pUC18 *Pst* I 和 *Kpn* I

由于含有 *saw1* 基因的 DNA 片段约为 7.0 kb, 这样大的片段不利于基因组成元件的结构分析和基因表达的研究, 因此质粒 pSAW1 用 *Kpn* I 和 *Pst* I 酶切后除去了约 2.5 kb 的 DNA 片段。由于获得的圈卷产色链霉菌孢子形成缺陷的白色突变株 W51 与天蓝色链霉菌白色突变株 C71 的形态及表型的类似性, 可以推测可能由类似的或同源性高的基因控制这一阶段的分化。因此根据天蓝色链霉菌和金霉素链霉菌相关的分化基因 *whiG* 的 DNA 保守序列设计了引物, 用 pSAW1 质粒上的 *saw1*

DNA 片段为模板 PCR 扩增了约 0.5 kb 的 DNA 片段，此片段用非同位素地高辛进行了标记。Southern 杂交结果表明上述酶切后的 2.5 kb 的 DNA 片段没有杂交信号，而约 4.5 kb 的 DNA 片段给出了强的阳性杂交信号带。从琼脂糖凝胶分离和纯化后的 4.5 kb 的 DNA 片段被亚克隆到 *Pst* I 和 *Kpn* I 酶切后的 pUC18 质粒载体上构建的重组质粒被命名为 pTH1000，经 *Pst* I 和 *Kpn* I 再次酶切 pTH1000 得到了约 2.6 kb 和 4.5 kb 的两条带（图 1-A），用制备的 0.5 kb 的探针进行 Southern 杂交，结果表明 4.5 kb 的 DNA 片段仍给出了强的阳性杂交信号带，而 2.6 kb 的载体没有杂交信号带（图 1-B）。

为了进一步缩小 pTH1000，该重组质粒用一系列限制性内切酶进行了酶切分析。结果表明 *Bgl* II、*Eco* R I、*Eco* R V、*Hind* III、*Kpn* I 和 *Pst* I 在 4.5 kb DNA 片段内部没有切点，但 *Sac* I 有一个切点（图略）。*Sal* I 酶切后给出了四条带说明有四个位点（亚克隆时，用 *Pst* I 和 *Kpn* I 双酶切 pUC 18 去掉了 *Sal* I 和 *Sma* I 等位点），*Sma* I 有六个位点（图 2）。

根据上述结果用载体上的 *Hind* III 和 4.5 kb DNA 片段上的 *Sac* I 进行了进一步酶切，得到了 2 kb 和 2.5 kb

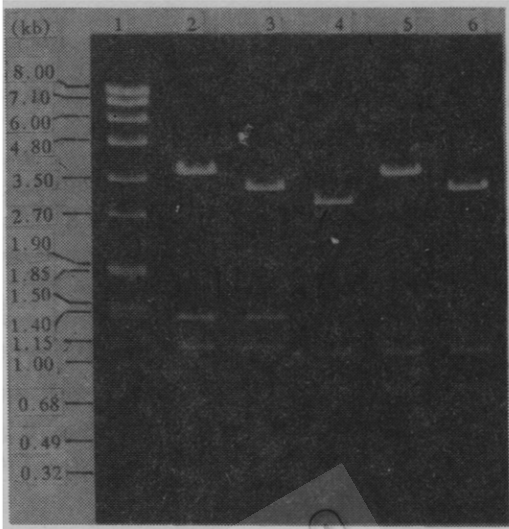


图2 重组质粒pTH1000的酶切电泳图

1. *Spp* I - *Eco* R I 酶切；
2. *Sal* I 酶切；
3. *Sal* I + *Pst* I 酶切；
4. *Sma* I + *Pst* I 酶切；
5. *Sma* I 酶切；
6. *Sma* I + *Kpn* I 酶切。

的两个片段，Southern 杂交结果表明只有 2.5 kb 的 DNA 片段给出了阳性杂交信号带（图略），而 2 kb 的片段没有杂交信号带。因此，可以把与分化有关的 *saw1* 基因定位在 2.5 kb 的 DNA 片段内，4.5 kb

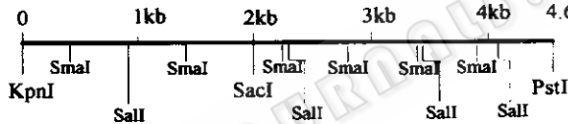


图3 *saw1* DNA片段的酶切图谱

DNA 片段的相关酶切位点见图 3。

2.4 *saw1* 基因的表达

当含有 *saw1* 的 2.5 kb 的 DNA 片段亚克隆到链霉菌质粒载体 pIJ702 后，得到的重组质粒 (pIJ702::*saw1*) 转化天蓝色链霉菌孢子形成缺陷的突变株 C71 后，得到的转化子在 MM 平板上培养 7 d 后进行观察，转化子都能形成有灰色色素的孢子。而 C71 含有 pIJ702 载体仍是白色气生菌丝的表型。结果表明圈卷产色链霉菌 2.5 kb 的 DNA 片段中的 *saw1* 基因能互补天蓝色链霉菌 C71 的突变基因，使其恢复野生型的表型。此外，当 pIJ702::*saw1* 再次转化圈卷产色链霉菌孢子形成缺陷突变株 W51 时，得到的转化子都能形成灰色孢子。进一步表明与孢子形成有关的 *saw1* 基因确在 2.5 kb 的 DNA 片段中。

3 讨论

在进行的实验中，曾以多个孢子形成缺陷的白色突变株为受体，试图通过互补克隆技术得到与分化有关的基因，多次试验结果表明在构建的文库中都未能得到在功能上互补的转化子。这可能是由于紫外诱变得到的分化阻断突变株非单基因突变，与分化有关的其它基因也有突变。因此不能得到有野生型表型的转化子。此外，按照天蓝色链霉菌和其它链霉菌与孢子形成起始有关的 *whiG* 基因的序列设计了引物，想用 PCR 方法在圈卷产色链霉菌中扩增出类似于天蓝色链霉菌 *whiG* 的基因^[6]，但都未能成功。这可

能是由于在圈卷产色链霉菌中控制这一分化阶段的类似基因的同源性很低。

有关 *saw1* 基因组成元件的结构特性、与其它链霉菌来源的分化基因的同源性比较等研究将被正在进行的全序列分析所揭示。同时,该基因的表达调控及通过基因破坏 (Gene disruption) 策略进一步研究 *asw1* 功能的深入研究正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Chater K F. *Annu Rev Microbiol.* 1993, 47:685~713.
- [2] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual. Norwich, England: John Innes Foundation, 1995.
- [3] 谭华荣, 吴 畏, 田宇清, 等. 微生物学报, 1994, 34(5): 398~402.
- [4] 谭华荣, 田宇清, 杨海花, 等. 中国科学(B辑), 1995, 25(11): 1167~1171.
- [5] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [6] Chater K F, Bruton C J, Plaskitt K A *et al.* *Cell*, 1989, 59: 133~143.

CLONING AND RESTRICTION ANALYSIS OF *saw1*—A KEY GENE FOR DIFFERENTIATION OF *STREPTOMYCES ANSOCHROMOGENES*

Tan Huarong Wang Lei Tian Yuqing Yang Haihua

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract *saw1*—a essential gene for sporulation of *Streptomyces ansochromogenes* was cloned, 7 kb of DNA fragment in *Streptomyces* plasmid pIJ702 could recover the sporulation of *saw1*-deficient strain W51 which could not form spore with white phenotype of aerial hyphae. The recombinant plasmid was deleted by some restriction enzymes, the result showed that 2.5 kb DNA fragment in pIJ702 still has function to recover sporulation of W51. The sequencing and expression of *saw1* gene is carrying out at present.

Key words *Streptomyces ansochromogenes*, Differentiation, Gene cloning