

链霉菌质粒 pSET152 电转化稀有放线菌小单孢菌的研究

李晓华¹, 龙慈凡¹, 周秀芬², 邓子新^{2*}

(¹ 中南民族大学生命科学院 国家民委生物技术重点实验室 武汉 430074)

(² 上海交通大学生命科学技术学院 教育部微生物代谢重点实验室 上海 200030)

摘 要 利用链霉菌(*Streptomyces*)噬菌体 ΦC31 所构建的整合型载体 pSET152 作为供体质粒,分别以小单孢菌(*Micromonospora*)40027 菌株的萌发孢子和新鲜菌丝体作为受体菌,在不同的电场强度下进行电转化实验,结果表明:以小单孢菌 40027 菌株萌发孢子为受体菌,未获得电转化子;以小单孢菌 40027 菌株新鲜菌丝体为受体菌,获得了电转化子。电场强度为 13kV/cm 时可获得最高转化效率。Southern 杂交结果表明:质粒 pSET152 可通过菌丝体电转化法导入小单孢菌 40027 菌株,并整合到小单孢菌 40027 菌株的染色体上,暗示链霉菌噬菌体 ΦC31 的整合酶基因和整合位点在异源宿主小单孢菌 40027 菌株中仍具有相同的功能。质粒稳定性检测实验表明:质粒 pSET152 可稳定地存在于小单孢菌 40027 菌株中。

关键词: 小单孢菌 40027 菌株;电转化;质粒

中图分类号:Q78;Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)04-0718-03

小单孢菌可产生庆大霉素、紫苏霉素、福堤霉素 A 等多种抗生素^[1]。近年来,就找到的新抗生素数目而言,它已超过链霉菌而跃居首位。小单孢菌所产生的抗生素结构类型多种多样,其中还包括一些具有独特结构的抗生素,如含有不饱和双键结构的紫苏霉素、含有 1,4-二氨基环多醇假双糖结构的福堤霉素 A^[2],此外,小单孢菌属还是众多医药上有活性化合物的搜索对象^[3],因此建立小单孢菌遗传操作体系,从分子水平上研究小单孢菌显得非常必要。然而,关于建立小单孢菌遗传操作体系的研究报道较少。

小单孢菌 40027 菌株是由上海医药工业研究院从云南省土壤中分离得到的,它是具有广谱抗菌活性、毒性较小的氨基糖苷类抗生素——福堤霉素 A 的产生菌^[3,4]。为了建立小单孢菌遗传操作体系,试图将在链霉菌遗传操作中常用的原生质体转化法用于小单孢菌 40027 菌株,未能成功。电转化法在链霉菌基因克隆操作中的应用包括:链霉菌菌丝体电转化法和链霉菌萌发孢子电转化法两种方法^[5,6]。电转化法在小单孢菌遗传操作中的应用尚未见报道。本研究尝试将电转化法应用到小单孢菌中,试图利用电转化法将链霉菌质粒 pSET152^[7]导入小单孢菌 40027 菌株,并在分子水平上进行验证,同时检测质粒 pSET152 在电转化子中的稳定性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 小单孢菌 40027 菌株为福堤霉素 A 的产生菌,由上海医药工业研究院从云南省土壤中分离得到^[3]。质粒 pSET152 由链霉菌噬菌体 ΦC31 发展而来的整合型质粒,包含阿泊拉霉素的抗性基因[*acc(3)*IV], pUC18 的复制子、oriT 以及噬菌体 ΦC31 的整合酶基因(*int*)和整合位点(*attP*)^[7]。

1.1.2 培养基 小单孢菌 40027 菌株固体培养基为贝奈特培养基^[8]。液体培养基为菌丝体培养基^[8]。小单孢菌 40027

菌株对抗生素敏感性检测培养基为 MM 培养基^[9]。

1.1.3 主要试剂和仪器 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、Lambda/*Hind* III、1kbLadder 均购自大连 TaKaRa 公司;阿泊拉霉素购自美国 Sigma 公司。Micro pulser 电转化仪购自美国 Bio-Rad 公司;CR22G 型高速冷冻离心机购自日本日立公司;电泳仪购自北京六一仪器厂。

1.2 DNA 基本操作

小单孢菌总 DNA 的提取采用链霉菌总 DNA 的提取方法^[9];大肠杆菌(*Escherichia coli*)质粒提取、Southern 杂交和 DNA 探针的标记参见文献[10]。

1.3 小单孢菌对抗生素的敏感性检测、孢子预萌发、新鲜菌丝体的制备

参见文献[9]进行。

1.4 小单孢菌电转化

取小单孢菌新鲜菌丝体或预萌发的孢子 100μL、质粒约 50ng 加入到预冷的 2mm 电转化杯中(阴性对照只加小单孢菌新鲜菌丝体或预萌发的孢子不加质粒)在 Bio-Rad 电穿孔仪上,设置电容 25μF,电阻 200Ω,在不同电场强度下电击,然后将转化体系转入 30℃ 温浴的 900μL 菌丝体培养基中。30℃ 250r/min 培养 1h。将菌液用菌丝体培养基按不同的比例稀释后取 100μL 涂布在贝奈特培养基上,24h 后用含阿泊拉霉素 15μg/mL 的水溶液覆盖,30℃ 培养 5~7d。阴性对照除不加质粒外,其余过程与其他样品完全相同。统计转化子数,计算电转化效率。

$$\text{电转化效率 (CFU/}\mu\text{g DNA)} = \frac{\text{转化子数目} \times \text{稀释倍数}}{\text{DNA 量}(\mu\text{g})}$$

2 结果

2.1 小单孢菌 40027 菌株对抗生素的敏感性

为了确定有可能用于小单孢菌 40027 菌株进行遗传操作的选择标记,检测了小单孢菌 40027 菌株对硫链丝菌素、

基金项目:国家自然科学基金(30570046);湖北省自然科学基金(2004ABA129);中南民族大学自然科学基金(YZZ04003)

* 通讯作者。Tel: 86-21-62933404; E-mail: zxdeng@mail.sjtu.edu.cn

作者简介:李晓华(1968-),男,安徽省天长人,副教授,博士,研究方向为分子微生物学与基因工程。E-mail: lixiaohua@mail.scuec.edu.cn

收稿日期:2007-01-22;接受日期:2007-03-29;修回日期:2007-05-15

阿泊拉霉素、卷曲霉素、链霉素、卡那霉素、潮霉素和庆大霉素 7 种抗生素的抗性水平。结果如表 1 所示,小单孢菌 40027 菌株对硫链丝菌素非常敏感,在浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫链丝菌素的平板上就不能生长,对阿泊拉霉素和链霉素比较敏感,在浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的阿泊拉霉素或链霉素的平板上生长非常缓慢,对卷曲霉素敏感,在浓度为 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卷曲霉素的平板上小单孢菌 40027 菌株生长受到严重抑制。而小单孢菌 40027 菌株对卡那霉素、潮霉素和庆大霉素表现抗性,在浓度为 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素和庆大霉素的平板上小单孢菌 40027 菌株可以生长。表明阿泊拉霉素、硫链丝菌素和链霉素的抗性基因有可能发展为小单孢菌 40027 菌株进行遗传操作的选择标记。

表 1 小单孢菌 40027 菌株对不同抗生素的敏感性

Table 1 Sensitivity to antibiotics for *Micromonospora* sp. 40027

Antibiotics	Antibiotics concentration in MM medium($\mu\text{g}/\text{mL}$)								
	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0	50.0	
Thiostrepton	++	-	-	-	-	-	-	-	
Apramycin	++	++	+	+/-	-	-	-	-	
Streptomycin	++	++	+	+/-	-	-	-	-	
Capreomycin	++	++	++	+	+	+/-	-	-	
Kanamycin	++	++	++	++	++	++	++	++	
Hygromycin	++	++	++	++	++	++	++	++	
Gentamycin	++	++	++	++	++	++	++	++	

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

2.2 小单孢菌 40027 菌株的电转化

选用链霉菌质粒 pSET152 作为供体质粒,质粒 pSET152 含有链霉菌噬菌体 ΦC31 的整合酶基因和整合位点,能以整合状态存在于链霉菌的染色体上,并含有阿泊拉霉素的抗性基因[*acc(3)*IV]。分别以小单孢菌 40027 菌株的萌发孢子和新鲜菌丝体作为受体菌进行电转化实验,结果表明:在以小单孢菌 40027 菌株萌发孢子为受体菌的电转化的实验中,未得到阿泊拉霉素的抗性菌落;在以小单孢菌 40027 菌株新鲜菌丝体为受体菌的电转化的实验中,获得了阿泊拉霉素的抗性菌落。

2.3 不同的电转化条件对电转化效率的影响

当受体细胞置于电场中,细胞膜起着电容器的作用,电流不能通过细胞膜(离子通道除外)随着电压升高,细胞膜组分被极化,并在细胞膜两边产生电位差。当电位差超过某一临界水平,细胞膜局部被击穿,形成一些瞬时的孔洞,使得大分子和小分子进入或从细胞中排出。随着电场强度的不断增强,虽然可增加 DNA 的导入,但也不可避免地造成细胞的大量死亡。有文献报道^[5,6]:当细胞死亡率 $\leq 70\%$ 时,电转化效率呈上升趋势;当细胞死亡率 $> 70\%$ 时,电转化效率呈下降趋势。为了达到最高电转化效率,需要找到最适电场强度。

设置电容为 25 μF ,电阻为 200 Ω ,分别测定了 10kV/cm、13kV/cm、15kV/cm 和 18kV/cm 4 种不同电场强度下小单孢菌 40027 菌株菌丝体电转化的电转化效率。结果显示,电场强度为 10kV/cm 或 15kV/cm 时,电转化效率为 20CFU/ μgDNA ;电场强度为 13kV/cm 时,电转化效率为 200CFU/ μgDNA ;表明小单孢菌 40027 菌株菌丝体电转化最适电场强度为 13kV/cm。

2.4 小单孢菌 40027 菌株电转化子的检测和分析

质粒 pSET152 含有 *Bam*H I 单一酶切位点。随机挑取 5 个电转化子,提取其总 DNA,用限制性内切酶 *Bam*H I 酶切电转化子总 DNA,质粒 pSET152 经限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 完全酶切,回收 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点之间含 $\Phi\text{C31 attP}$ 位点 2.3kb 片段作为探针,与电转化子总 DNA *Bam*H I 酶切片段杂交。杂交结果(图 1)显示,在 5 个电转化子总 DNA 经 *Bam*H I 酶切后的样品(c、d、e、f、g)都出现两条杂交信号。而小单孢菌 40027 菌株的总 DNA 经 *Bam*H I 酶切后的样品(b)在同样条件下则显示杂交阴性,表明质粒 pSET152 以链霉菌噬菌体 ΦC31 的 *attP* 位点整合到小单孢菌 40027 菌株的染色体上。暗示链霉菌噬菌体 ΦC31 的整合酶基因和整合位点在异源宿主小单孢菌 40027 菌株中仍具有相同的功能。

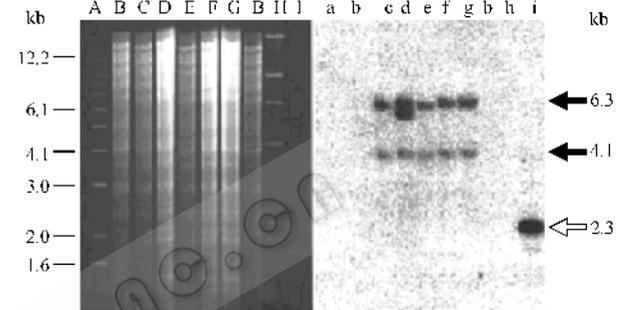


图 1 质粒 pSET152 电转化小单孢菌 40027 菌株的 Southern 杂交验证

Fig. 1 Southern hybridization with ³²P-labeled 2.3kb fragment containing phage $\Phi\text{C31 attP}$ as a probe shows pSET152 can be introduced by electrotransformation into *Micromonospora* sp. 40027 via the *attP* site of the *Streptomyces* phage ΦC31 . Lanes with lowercase letters are autoradiographs of the lanes with the corresponding uppercase letters. Six samples (from lanes B [b] to G [g]) were digested with *Bam*H I. lanes I [i] was pSET152 digested with *Hind* III and *Xho* I. Five independent isolates of transformant (from lanes C [c] to G [g]) evidently contain an integrated pSET152, mediated by site-specific recombination via a 2.3kb *Hind* III-*Xho* I fragment (open arrow) carrying phage $\Phi\text{C31 attP}$, with concurrent generation of 4.1 kb and 6.3kb *Bam*H I fragments (solid arrows) flanking the integration site (*attB*) of the chromosome. No positive signal was detected in the *Micromonospora* sp. 40027 total DNA digested with the same enzyme as negative control. Phage λ digested with *Hind* III (H) and 1kb ladder (A) were used as size standard. Numbers on the left are molecular sizes in kilobases.

2.5 pSET152 在小单孢菌 40027 菌株电转化子中的稳定性

为了检测质粒 pSET152 在电转化子中的稳定性,将电转化子接种在没有阿泊拉霉素的贝乃特培养基上生长,产孢后,转接到新的不含阿泊拉霉素的贝乃特培养基上生长,这样连续转接 5 次,然后挑取 200 个单菌落分别转接到含有阿泊拉霉素和不含抗生素的贝乃特培养基上,没有发现抗性消失的菌落。表明质粒 pSET152 在小单孢菌 40027 菌株中可稳定遗传。

3 讨论

建立小单孢菌 40027 菌株的遗传操作体系是对其产生的氨基糖苷类抗生素生物合成及其遗传调控进行分子水平

研究的必要前提。为此,利用在链霉菌中常用的原生质体转化方法将多种自主复制型质粒和整合型质粒导入小单孢菌 40027 菌株,但均未成功。在此基础上,将质粒(pIJ702、pHZ1358、pSET152等)电转化小单孢菌 40027 菌株的萌发孢子和新鲜菌丝体,发现质粒 pSET152 可通过菌丝体电转化法导入小单孢菌 40027 菌株,而 pIJ702 和 pHZ1358^[11]未能导入小单孢菌 40027 菌株,推测是由于链霉菌质粒 pIJ702 和 pHZ1358 的复制子不能在小单孢菌 40027 菌株中复制,有待进一步的实验证实。

质粒 pSET152 是由链霉菌噬菌体 Φ C31 发展而来,包含噬菌体 Φ C31 的整合酶基因和整合位点,通过菌丝体电转化将质粒 pSET152 导入小单孢菌 40027 菌株中,通过 Southern 杂交实验表明,质粒 pSET152 已整合到小单孢菌 40027 菌株的染色体上。暗示链霉菌噬菌体 Φ C31 的整合酶基因和整合位点在异源宿主小单孢菌 40027 菌株中仍具有相同的功能。但噬菌体感染实验表明链霉菌噬菌体 Φ C31 不能感染小单孢菌 40027 菌株。推测是由于小单孢菌 40027 菌株表面没有噬菌体所识别的受体蛋白。

质粒 pSET152 仅能导入小单孢菌 40027 菌株新鲜菌丝体,而不能导入小单孢菌 40027 菌株萌发孢子,推测是由于小单孢菌 40027 菌株新鲜菌丝体和萌发孢子在表面结构不同造成的,有待于进一步实验证实。用阿泊拉霉素筛选电转化子并获得成功,表明阿泊拉霉素的抗性基因[*acc*(3)]^[4]可作为小单孢菌 40027 菌株遗传操作的抗生素标记。

致谢 衷心感谢上海医药工业研究院朱宝泉研究员慷慨提供供试菌株。

参 考 文 献

- [1] Wagman GH, Weinstein MJ. Antibiotic from *Micromonospora*. *Annu Rev Microbiol*, 1980, **34**: 537-557.
- [2] 王 狱,方金瑞. 抗生素. 北京: 科学出版社, 1988.
- [3] 马加生,杨昭中,石光敏,等. 小单孢菌 SIP436 及其代谢产物福堤霉素 A. 抗生素, 1986, **11**(2): 11-18.
- [4] Nara T, Yamamoto M, Kawamoto I, et al. Fortimycin A and B, new aminoglycoside antibiotics. I Producing organisms, Fermentation and biological properties of Fortimycins. *J Antibiotics*, 1977, **30**: 533-540.
- [5] Pigac J, Schrempf H. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other *Streptomyces* by electroporation. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(1): 352-356.
- [6] Mazy-Servais C, Baczkowski D, Dusart J. Electroporation of intact cells of *Streptomyces parvulus* and *Streptomyces vinaceus*. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, **151**(2): 135-138.
- [7] Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.. *Gene*, 1992, **116**(1): 43-49.
- [8] Li XH, Zhou XF, Deng ZX. Vector systems allowing efficient autonomous or integrative gene cloning in *Micromonospora* sp. strain 40027. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(6): 3144-3151.
- [9] Kieser T, Bibb MJ, Chater KF, et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, United Kingdom: John Innes Foundation, 2000.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Sun YH, Zhou XF, Liu J, et al. *Streptomyces nanchangensis*, a producer of the insecticidal polyether antibiotic nanchangmycin and the antiparasitic macrolide meilingmycin, contains multiple polyketide gene clusters. *Microbiology*, 2002, **148**: 361-371.

Study on electroporation of rare Actinomycete *Micromonospora* sp.40027 with *Streptomyces* plasmid pSET152

LI Xiao-hua¹, LONG Ci-fan¹, ZHOU Xiu-fen², DENG Zi-xin^{2*}

(¹ Key Lab for Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

(² Key Laboratory of Microbial Metabolism of Education Ministry, School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: Electroporation of *Micromonospora* sp. 40027 isolated from soil was studied with *Streptomyces* plasmid pSET152, an integrative vector commonly used in *Streptomyces* genetic manipulation. Transformant was not obtained by electroporation with germinated spores of *Micromonospora* sp. 40027 as recipient, but plasmid pSET152 can be electroporated into the fresh mycelium of *Micromonospora* sp. 40027, and the highest electroporation efficiency was yielded under the electric field strength of 13kV/cm. Plasmid stability experiment and southern blot showed that pSET152 could stably exist in the *Micromonospora* sp. 40027, and was integrated into its chromosome via the *attP* site, originated from *Streptomyces* phage Φ C31. These data suggested that plasmid pSET152 was successfully electroporated into *Micromonospora*, and that the integrase gene and *attP* site of *Streptomyces* phage Φ C31 could play the same role in *Micromonospora*.

Keywords: *Micromonospora* sp. 40027; electroporation; plasmid

Foundation item: Chinese Natural Science Foundation (30570046); Natural Science Foundation of Hubei Province (2004ABA129); Natural Science Foundation of South-Central University for Nationalities (YZZ04003)

* Corresponding author. Tel 86-21-62933404; E-mail: zxdeng@mail.sjtu.edu.cn

Received: 22 January 2007/Accepted: 29 March 2007/Revised: 15 May 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>