

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(8):1014–1022; 4 August 2010  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 台勾霉素生产菌指孢囊菌 NRRL 18085 遗传操作体系的建立

肖毅, 李苏梅, 马亮, 张改云, 鞠建华, 张长生\*

(海洋生物资源可持续利用重点实验室, 中国科学院海洋微生物研究中心, 广东省海洋药物重点实验室, 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

**摘要:**【目的】建立新型大环内酯类抗生素台勾霉素的生产菌指孢囊菌 *Dactylosporangium aurantiacum* NRRL 18085 的遗传操作体系, 实现台勾霉素相关生物合成基因的敲除突变。【方法】以整合型质粒 pSET152 为载体, 建立了外源 DNA 通过接合转移进入指孢囊菌 NRRL 18085 的操作方法和培养条件, 利用 PCR-targeting 系统在体外构建了一个台勾霉素卤化酶基因敲除的 cosmid 质粒, 通过接合转移转入到指孢囊菌 NRRL 18085 野生菌中。【结果】获得了台勾霉素卤化酶基因敲除的指孢囊菌 NRRL 18085 的双交换突变株, 该突变株失去了产生台勾霉素的能力。【结论】成功建立和优化了指孢囊菌 NRRL 18085 菌株的遗传操作体系, 使得在体内分析和鉴定台勾霉素生物合成基因的功能成为可能, 同时也为建立其他类似放线菌的遗传操作体系提供了参考。

**关键词:** 指孢囊菌; 遗传体系; 台勾霉素; 生物合成; 卤化酶

**中图分类号:** Q933   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-09-1014

台勾霉素 (tiacumicins, 又称 lipiarmycins) 是一系列 18 元环大环内酯类抗生素的总称, 具有抗各种革兰氏阳性细菌病原体的活性, 特别是针对艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 有明显的抗菌活性<sup>[1-2]</sup>, 其主要由放线菌指孢囊菌 *Dactylosporangium aurantiacum* subsp. *hamdenensis* NRRL 18085, 游动放线菌 *Actinoplanes deccanensis* ATCC 21983 和小孢链菌 *Catellatospora* sp. Bp3323-81 等产生<sup>[3-5]</sup>。研究发现台勾霉素中 tiacumicin B 是最好的活性组分, 拥有两个脱氧糖基和一个芳香环支链, C-18 为 R-羟基 (图 1), 对艰难梭菌具有较低的最小抑制浓度 (MIC) 值, 体外对艰难梭菌的抗菌活性为万古霉素的 8–10 倍<sup>[6]</sup>。美国的 Optimer 公司通过对指孢囊菌 NRRL 18085 进行发酵优化, 开发了名为“OPT-80”的药物, OPT-80 是含有 70%–90% R-tiacumicin

B 及其相关化合物的一个混合物。目前该药物已经进入三期临床试验阶段<sup>[7-8]</sup>。最近有报道表明, 台勾霉素 B 具有很好的抗结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 活性<sup>[3]</sup> 和体外抗癌活性<sup>[9]</sup>。因此, 这种针对革兰氏阳性细菌的高效新型抗生素具有很大的潜力开发成新药<sup>[10]</sup>。由于指孢囊菌 NRRL 18085 产生的台勾霉素是包含多种组分的混合物, 通过发酵分离得到 R-tiacumicin B 的纯品比较困难。而且鉴于该化合物结构复杂, 化学合成也未见报道, 因此, 如何改造台勾霉素生产菌, 使之高产或定向积累高活性组分 R-tiacumicin B, 简化发酵后的分离纯化工艺, 是一个值得探讨的课题。

近年来蓬勃发展起来的组合生物合成技术, 为改造台勾霉素的生产菌指孢囊菌 NRRL 18085 带来了新的机遇。采用组合生物合成技术对抗生素的生

**基金项目:** 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX2-YW-216); 国家自然科学基金青年科学基金 (30900035); 中国博士后科学基金 (20090460836); 中国科学院百人计划项目 (08SL111002)

\* 通信作者。Tel: +86-20-89023038; Fax: +86-20-89023100; E-mail: czhang2006@gmail.com, czhang@scsio.ac.cn

**作者简介:** 肖毅 (1981–), 男, 湖南怀化人, 博士, 主要研究方向为微生物天然产物生物合成。E-mail: huazhong\_xy@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2010-01-29; **修回日期:** 2010-04-30

物合成基因、调控基因进行体内敲除、突变、置换和重组等操作,不但能够生产“非天然”的天然产物结构类似物,而且还可以提高天然产物的产量,或定向积累所需要的产物<sup>[11-12]</sup>。对抗生素生产菌进行组合生物合成改造的一个重要前提是建立合适的遗传操作体系,但是目前还没有关于指孢囊菌遗传操作体系的报道。本文以台勾霉素的生产菌指孢囊菌 NRRL 18085 为对象,采用 PCR-targeting 技术<sup>[13-14]</sup>和接合转移的方法,首次建立了这株指孢囊菌的遗传操作体系,并成功构建了台勾霉素相关生物合成基因的阻断突变株,致使该突变株不再生产 tiacumicin B。

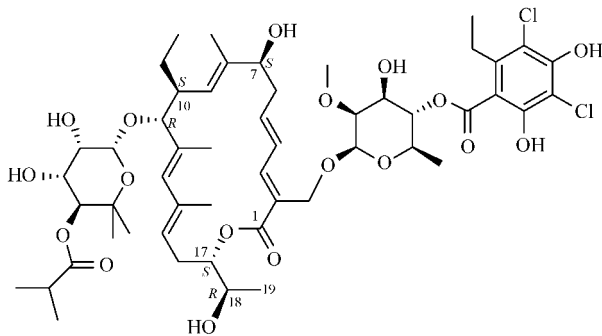


图1 台勾霉素 B 的化学结构式

Fig.1 Chemical structure of tiacumicin B.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及培养条件:**指孢囊菌 *Dactylosporangium aurantiacum* subsp. *hamdenensis* NRRL 18085 由美国农业研究菌种保藏中心 (NRRL) 提供,用 ISP2 或 YMS 培养基在 28℃ - 30℃ 培养。大肠杆菌 *E. coli* 菌株由本实验室保存,包括 *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* BW25113/pIJ790, *E. coli* DH5 $\alpha$ /pIJ773, *E. coli* ET12567/pUZ8002 和 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pSET152,用 LB 培养基在 37℃ 培养。本文中质粒列在表 1 中。

**1.1.2 培养基:**LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母抽提物 5 g,NaCl 10 g,加水至 1 L;ISP2 培养基:酵母抽提物 4 g,麦芽抽提物 10 g,葡萄糖 4 g,加水至 1 L,pH 7.2;YMS 培养基:酵母抽提物 4 g,麦芽抽提物 10 g,可溶性淀粉 4 g,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 mg,加水至 1 L,pH 7.2 - 7.4;ISP4 培养基:可溶性淀粉 10 g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g,NaCl 1 g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g,CaCO<sub>3</sub> 2 g,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg,MnCl<sub>2</sub> 1 mg,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg,加水至 1 L,pH 7.0

-7.4;2CMY 培养基:可溶性淀粉 10 g,胰蛋白胨 2 g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g,NaCl 1 g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g,CaCO<sub>3</sub> 2 g,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg,MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 mg,ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg,加水至 1 L,pH 7.2;指孢囊菌发酵培养基:葡萄糖 20 g,鱼粉 10 g,酵母抽提物 2.5 g,酸水解酪蛋白 2.5 g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g,KCl 0.3 g,CaCO<sub>3</sub> 3 g,加水至 1 L,pH 7.0。以上对应的固体培养基加入 2% 的琼脂粉。

表 1 所用质粒列表

Table 1 Plasmids used in this study		
Plasmids	Relevant genotype or characteristic(s)	Sources
pIJ790	$\lambda$ -RED ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ), <i>cat</i> , <i>araC</i> , <i>rep101</i> <sup>ts</sup>	[13]
pIJ773	<i>aac(3)IV</i> , <i>oriT</i>	[13]
pUZ8002	<i>tra</i> , <i>neo</i> , RP4	[15]
pSET152	<i>aac(3)IV</i> , <i>oriT</i> , <i>att</i> <sup>ΦC31</sup>	[16]
SuperCos 1	<i>bla</i> , <i>neo</i> , <i>cos</i>	[17]
pCSG14	<i>bla</i> , <i>neo</i> , <i>cos</i> , a ca. 40 kb fragment containing a putative halogenase inserted into cosmid Supercos 1	Unpublished
pCSGM	<i>bla</i> , <i>neo</i> , <i>cos</i> , a fragment of <i>aac(3)IV</i> ( <i>Apra</i> <sup>R</sup> ) + <i>oriT</i> inserted into pCSG14 to replace the halogenase gene	This study

**1.1.3 主要试剂和仪器:**DNA 聚合酶 rTaq, 高保真 DNA 聚合酶 Pyrobest, T4 连接酶等酶试剂为 TaKaRa 公司产品。溶菌酶和蛋白酶 K 等试剂购自北京鼎国公司。PCR 纯化试剂盒, DNA 胶回收试剂盒来自 Axygen 生物技术有限公司。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, DNA 测序由上海 Invitrogen 公司完成。Tiacumicin B 标准样品由瑞士 Novartis 公司惠赠。主要仪器包括, Eppendorf 5331 梯度 PCR 仪, Hitachi 公司的 L-2000 高效液相色谱并配备 DAD 检测器, 高效液相色谱柱为 Phenomenex C18 柱 (5  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  4.6 mm)。

### 1.2 指孢囊菌 NRRL 18085 的抗生素敏感性检测

将各种抗生素氨苄青霉素 (Ampicillin)、壮观霉素 (Spectinomycin)、氯霉素 (Chloramphenicol)、卡那霉素 (Kanamycin)、阿泊拉霉素 (Apramycin)、硫链丝菌素 (Thiostrepton)、链霉素 (Streptomycin)、甲氧苄氨嘧啶 (Trimethoprim) 和萘啶酮酸 (Nalidixic acid) 按终浓度 1 mg/L, 5 mg/L, 20 mg/L 和 50 mg/L 加入到 YMS 培养基平板上。取新鲜菌丝体划线展开于各个抗生素浓度梯度的固体平板上, 置于 30℃ 培养箱中培养, 从第 4 天至第 10 天进行生长情况观察。

### 1.3 大肠杆菌和指孢囊菌 NRRL 18085 的接合转移实验

指孢囊菌 NRRL 18085 菌株在 50 mL YMS 液体培养基中培养 3-5 天, 3220 × g 离心 10 min 收集菌体, 弃上清, 用 YMS 培养基清洗菌丝体 2-3 遍, 悬浮于约 3-5 mL YMS 中, 作为接合转移的受体菌。供体菌 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pSET152 在 50 mL 含 25 mg/L 卡那霉素, 25 mg/L 氯霉素和 50 mg/L 阿泊拉霉素的 LB 液体培养基中于 37°C 生长至  $OD_{600}$  值约为 0.6-0.8 时, 离心收集菌体 (3220 × g, 10 min), 用 LB 清洗菌体 2-3 遍, 悬浮于 300 μL LB 培养基中, 作为接合转移的供体菌。将上述受体菌和供体菌各取 100 μL 混合均匀涂布于不含任何抗生素但添加了 10 mmol/L  $MgSO_4$  的 YMS、ISP4 和 2CMY 固体培养基上, 吹干后, 置于 30°C 培养 13-18 h。将平板取出后用 2-3 mL 无菌水覆盖, 用灭菌涂棒轻刮平板, 吸出液体, 去掉刮出来的菌体。清洗完毕后, 用使其终浓度为 35 mg/L 阿泊拉霉素和 50 mg/L 甲氧苄氨嘧啶 (或者 25 mg/L 萘啶酮酸) 的无菌水覆盖平板, 吹干后, 置于 30°C 培养箱中, 培养 5 d 后观察。

### 1.4 指孢囊菌基因组的提取

采用改进后的文献报道方法<sup>[18]</sup>进行指孢囊菌基因组的提取: 菌株在 YMS 液体培养基中培养 3-6 d, 离心收集菌体 (12400 × g, 5 min), 弃上清, 加入等体积的含 0.2 g/L 溶菌酶和 0.5 g/L 蛋白酶 K 的 TE 溶液 (10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 重悬菌体, 于 37°C 孵育 15-30 min; 加入 1/10 体积 10% SDS 和 1/10 体积 0.5 mol/L EDTA 后在 55°C 孵育 0.5-1 h; 加入 2/3 体积预冷的 7 mol/L 乙酸铵溶液混合均匀, 离心 (12400 × g, 10 min) 弃沉淀; 取上清, 加入 2 倍体积无水乙醇, 离心 (12400 × g, 10 min) 沉淀 DNA, 弃上清; 用 70% 乙醇洗涤管底沉淀, 小心弃上清, 真空抽干后, 将基因组 DNA 溶于适量双蒸无菌水中, 置于 -20°C 备用。

### 1.5 台勾霉素卤化酶基因片段的扩增和阳性克隆子的获取

利用文献报道的次级代谢产物卤化酶基因的简并引物 Halo-B4-FW: 5'-TTCCSCGSTACCASATCGGSGAG-3' 和 Halo-B7-RV: 5'-GSGGGATSWMCCAGWACCASCC-3'<sup>[19]</sup>, 从指孢囊菌 NRRL 18085 的基因组中扩增出一个约 550 bp 的 DNA 片段, PCR 反应条件为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 1 min, 58°C ↓ 1 min, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 延

伸 10 min。PCR 产物纯化后连接入 T-载体, 进行序列测定, 将获得的 DNA 序列 (GenBank 编号: GU292810) 转化为蛋白质序列, 通过 blastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行比对分析, 证实该基因编码的多肽链的确与催化合成次级代谢产物的卤化酶高度同源。根据所得 DNA 序列设计一对检测引物 7s (5'-CTGTCGGGCAG CAGTTCG-3'), 7a (5'-TCGGGGAGTCCATCACG-3'), 该对引物能从野生型基因组中扩增得到约 470 bp 的 DNA 条带。利用该对引物, 成功从 NRRL 18085 菌株的 SuperCos 1 基因组文库中筛选到数个阳性克隆子 (未发表), 挑选出一个阳性克隆, 其质粒命名为 pCSG14, 准备利用 PCR-targeting 技术进行下一步的基因阻断突变研究。

### 1.6 通过 PCR-targeting 获得重组质粒 pCSGM

根据如上获得的卤化酶基因片段的 DNA 序列, 参照文献报道的 PCR-targeting 系统<sup>[13-14]</sup>, 设计一对卤化酶基因的敲除引物 PD7s (5'-CAGTTCGGTCCGACACCCGCTCCTGGCAGGTCGACCGCattccgggggattccgtcgacc-3', sense), PD7a (5'-GCCGAGGCGTCGATGACGTAATCCGCCGTCTCCGTCCGtgtagctggagctgcttc-3', antisense)。引物的 5' 端 39 bp 大写字母部分序列与台勾霉素卤化酶基因相匹配, 而 3' 端小写字母部分的序列分别与 pIJ773 中包含转移起始序列 *oriT* 和阿泊拉抗性基因 *aac(3)IV* 的 DNA 片段两侧的序列相匹配。然后参照 PCR-targeting 系统的要求准备接合转移体系的大肠杆菌供体菌, 步骤如下: (1) 将阳性克隆 pCSG14 转入大肠杆菌 *E. coli* BW25113/pIJ790 中得到 *E. coli* BW25113/pIJ790/pCSG14, 于 30°C 添加终浓度为 10 mmol/L 的 L-阿拉伯糖诱导 λ/red 重组系统, 并将该菌制备成为电感受态细胞。(2) 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切质粒 pIJ773, 回收 1.4 kb 含有转移原点 *oriT* 和阿泊拉霉素抗性基因 *aac(3)IV* 的 DNA 片段, 作为 PCR 模板, 用 PD7s 和 PD7a 作为引物扩增出 1.4 kb 的片段, 50 μL 反应体系 10 × Buffer 5 μL, 高保真 DNA 聚合酶 Pyrobest 3 U, dNTPs 0.5 mmol/L, DMSO 2.5 μL, 引物各 0.5 μmol/L, DNA 模板约 1 ng, 加水至 50 μL。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 45 s, 55°C ↓ 45 s, 72°C 延伸 90 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。最后将 1.4 kb 的 PCR 产物回收纯化待用。(3) 将纯化后的 1.4 kb 的 PCR 产物电转入 *E. coli* BW25113/pIJ790/pCSG14 的感受态细胞使其发生重组, 在 LB 平板 (含 100 mg/L 氨

芑青霉素, 50 mg/L 卡那霉素, 50 mg/L 阿泊拉霉素) 上于 37℃ 过夜培养, 从平板上挑出单菌落, 抽提质粒, 并命名为 pCSGM (图 2), 该质粒中的卤化酶基因的部分片段被 *oriT* 和 *aac(3)IV* 取代。(4) 将构建好的重组载体 pCSGM 电转到 *E. coli* ET12567/pUZ8002 中, 构建成 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pCSGM, 作为接合转移的供体菌。

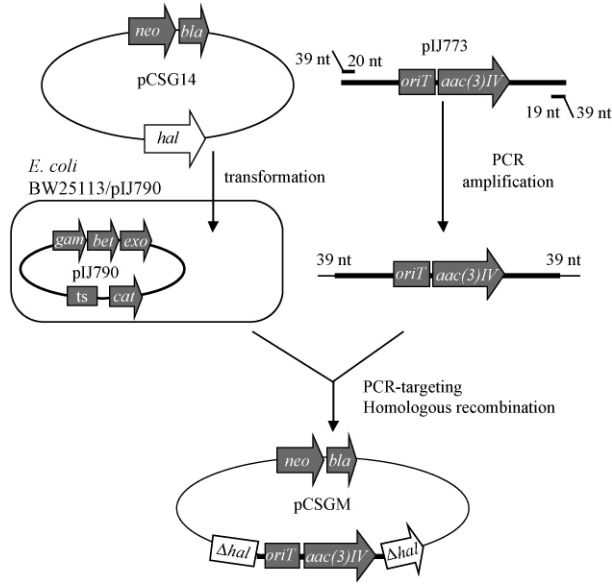


图 2 通过 PCR-targeting 获取重组质粒 pCSGM 的示意图

Fig. 2 The flowchart of constructing pCSGM by PCR-targeting.

### 1.7 指孢囊菌 NRRL 18085 双交换突变株的获得

以指孢囊菌 NRRL 18085 的菌丝体为受体菌, *E. coli* ET12567/pUZ8002/pCSGM 为供体菌, 参照第 1.3 节中所描述的方法, 在 2CMY (或者 ISP4) 固体平板上进行了接合转移实验。当接合转移平板上长出小菌落后, 用针头将其转接到含有 35 mg/L 阿泊拉霉素和 50 mg/L 甲氧苄氨嘧啶的 YMS (或者 ISP2) 丰富培养基平板上, 30℃ 培养 3-5 天后, 将长成大菌落的突变菌株接种到含同样抗生素的 2.5 mL YMS (或者 ISP2) 液体培养基中, 于 30℃ 培养 3-5 d。抽取各个突变株的基因组 DNA, 用检测引物 7s 和 7a 做诊断 PCR 来判断其是否为双交换突变株。20 μL 反应体系为: 10 × Buffer 2 μL, DNA 聚合酶 rTaq 1.5 U, dNTPs 0.5 mmol/L, DMSO 1 μL, 引物各 0.5 μmol/L, DNA 模板约 1 ng, 加水至 20 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 延伸 100 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

### 1.8 指孢囊菌野生菌及其突变株的发酵、产物分离及高效液相色谱 (HPLC) 分析

将指孢囊菌 NRRL 18085 野生菌或突变株按

5% 的接种量分别接入到 250 mL 三角瓶的 50 mL 发酵培养基中, 于 28℃ 培养 6-10 天后, 离心收集发酵液上清, 用 2 倍体积的乙酸乙酯萃取上清液, 萃取液用旋转蒸发器将乙酸乙酯蒸干, 提取物以二甲基亚砜 (DMSO) 作为溶剂配成浓度为 20 mg/L 的样品, 进行高效液相色谱 (HPLC) 检测, 检测条件为: 流动相 A 相为 10% 乙腈, 含 0.08% 三氟乙酸 (TFA), 流动相 B 相为 90% 乙腈; 流速为 1 mL/min, 检测波长为 250 nm。HPLC 走样程序: 0-20 min, 5% - 100% B 相; 20-21 min, 100% B 相; 21-22 min, 100% - 5% B 相。

## 2 结果和分析

### 2.1 指孢囊菌 NRRL 18085 菌丝体对不同抗生素敏感试验

由于指孢囊菌 NRRL 18085 菌株产生的孢子很少, 很难培养出大量的孢子用于遗传体系操作, 所以选择菌丝体研究其遗传操作系统的建立。遗传操作系统的建立需要适当的遗传筛选标记, 因此我们首先检测了指孢囊菌 NRRL 18085 对不同抗生素的敏感性。结果表明 (表 2), NRRL 18085 的菌丝体对氨芑青霉素、氯霉素、阿泊拉霉素、硫链丝菌素较为敏感, 在 20 mg/L 的浓度下菌丝体完全不能生长, 而对壮观霉素、卡那霉素、链霉素、甲氧苄氨嘧啶、萘啶酮酸都表现出抗性。因此, 我们选择阿泊拉霉素作为 NRRL 18085 突变株的筛选标记, 以及甲氧苄氨嘧啶、萘啶酮酸作为接合转移实验中大肠杆菌的抑制剂。

表 2 指孢囊菌 NRRL 18085 菌株对不同抗生素的敏感性

Table 2 The sensitivity of *D. aurantiacum* NRRL 18085 to various antibiotics

Antibiotics	1 mg/L	5 mg/L	20 mg/L	50 mg/L
Ampicillin	+	-/+	-	-
Spectinomycin	+	+	+	nt
Chloramphenicol	-/+	-	-	nt
Kanamycin	+	+	+	nt
Apramycin	+	-/+	-	-
Thiostrepton	+	-/+	-	nt
Streptomycin	+	+	-/+	-
Trimethoprim	+	+	+	+
Nalidixic acid	+	+	-/+	-/+

-, no growth; -/+, poor growth; +, growth; nt, not tested

### 2.2 NRRL 18085 菌株中可能的卤化酶基因片段的获得

台勾霉素 B 中的芳香环支链上有两个氯原子

(图 1),这暗示有卤化酶参与了台勾霉素 B 的生物合成。我们采用文献报道的次级代谢产物卤化酶的简并引物 Halo-B4-FW 和 Halo-B7-RV<sup>[19]</sup>,从 NRRL 18085 的基因组 DNA 中扩增获得了约 550 bp 的 DNA 片段。序列测定 (GenBank 序列号为 GU292810) 和 Blast 结果,显示该 DNA 片段所对应的蛋白多肽序列跟一系列的次级代谢产物的卤化酶有高度相似性,其中与来自于 *Catenulispora acidiphila* DSM 44928 中的 FADH<sub>2</sub> 依赖型卤化酶 (FADH<sub>2</sub>-dependent halogenase, 序列号为 ACM44452) 相似度最高<sup>[20]</sup>,其一致性高达 70%。这个结果表明,通过简并引物从 NRRL 18085 基因组 DNA 中所扩增和克隆得到的基因片段很可能与次级代谢产物的卤化酶基因相关。

### 2.3 指孢囊菌与大肠杆菌接合转移实验条件的探索

通过接合转移的方式将外源 DNA 高效转入放线菌,已经有了多个成功的案例<sup>[16, 21]</sup>。因此,我们选用接合转移的方法来探索指孢囊菌 NRRL 18085 菌株的遗传操作体系的建立。首先,我们研究了链霉菌的整合型载体 pSET152<sup>[16]</sup> 通过接合转移进入野生菌株 NRRL 18085 的可能性。接合转移的效率往往跟所用培养基有密切关系,因此,我们选用三种不同的固体培养基 YMS、ISP4 和 2CMY 进行了接合转移实验。用阿泊拉霉素和大肠杆菌抑制剂 (甲氧苄氨嘧啶或萘啶酮酸) 覆盖接合转移平板并培养 10 d 后,在 YMS 平板上长出了大肠杆菌的菌苔,但没有观察到指孢囊菌的生长,而与此相反,在 ISP4 和 2CMY 上出现了密集的橘黄色的指孢囊菌菌落。这个结果说明,在丰富培养基 YMS 上,即使使用了大肠杆菌抑制剂,大肠杆菌的生长也没有受到很好的控制,仍能长成菌苔,这些菌苔可能抑制了指孢囊菌的生长,导致接合转移子没有长出。而在营养较少且不利于大肠杆菌生长的培养基 ISP4 和 2CMY 上,大肠杆菌的生长受到了明显的抑制,外源 DNA (pSET152) 在这种条件下能够通过接合转移进入指孢囊菌 NRRL 18085,并整合到其基因组中,从而赋予宿主菌阿泊拉霉素抗性。因此,选用 ISP4 和 2CMY 培养基作为指孢囊菌与大肠杆菌间接转移的筛选培养基较为合适。

### 2.4 利用 PCR-targeting 系统和接合转移获得突变株

以卤化酶基因的阳性克隆子 pCSG14 为模板,通过 PCR-targeting 操作流程,获得了 *E. coli*

ET12567/pUZ8002/pCSGM。为了验证在 pCSGM 中确实发生了预期的双交换突变,我们以质粒 pCSGM 作为模板,用引物对 (7s, 7a) 进行 PCR 扩增,结果获得了 1640 bp 的 DNA 片段 (图 4,泳道 4),而在野生型中,利用该引物对应该获取约为 470 bp 的片段 (图 4,泳道 2)。这充分表明在质粒 pCSGM 中的确发生了预期的双交换突变。

用 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pCSGM 作为供体菌,指孢囊菌 NRRL 18085 的菌丝体作为受体菌进行接合转移,培养 5 - 10 d 后,在每个 9 cm 平板 (2CYM 或 ISP4) 上一般都有 20 个以上的突变株出现。我们同时观察到使用甲氧苄氨嘧啶的平板一般 5 - 8 d 长出突变株,而使用萘啶酮酸的平板上至少 10 d 以后才长出突变株。这可能是因为浓度达 20 mg/L 以上的萘啶酮酸对指孢囊菌 NRRL 18085 有一定的抑制作用 (表 2)。因此选择甲氧苄氨嘧啶作为大肠杆菌的抑制剂更为理想。

### 2.5 NRRL 18085 菌株的双交换突变株的筛选和发酵产物的高效液相色谱分析

我们从接合转移子中挑选了 7 株独立的阿泊拉霉素抗性突变株 (分别命名为 CSG-m1 至 CSG-m7) 进行了下一步的筛选。将突变子挑出并接种于含有甲氧苄氨嘧啶和阿泊拉霉素的 YMS 或 ISP2 丰富培养基上进行传代培养,抽取各个突变株的总 DNA,利用检测引物对 7s, 7a 进行 PCR 扩增,预期从双交换突变株中扩增出 1640 bp 的 DNA 片段 (图 3),结果如图 4 所示。从野生型菌株获得了预期的 470 bp 的 DNA 片段 (图 4,泳道 2); 从突变株 CSG-m1, CSG-m3, CSG-m4 和 CSG-m7 中,PCR 扩增获得

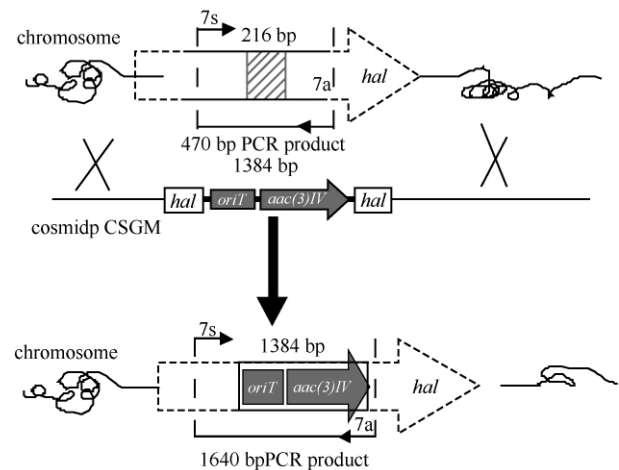


图 3 双交换重组敲除基因示意图

Fig. 3 Gene disruption by double cross-over recombination. The gene encoding halogenase was abbreviated as *hal*. The sizes of PCR products were indicated.

了 470 bp 和 1640 bp 两个 DNA 片段(图 4, 泳道 5, 7, 8, 11), 这是因为在这些菌株中发生了整合型的单交换突变; 而从突变株 CSG-m2, CSG-m5 和 CSG-

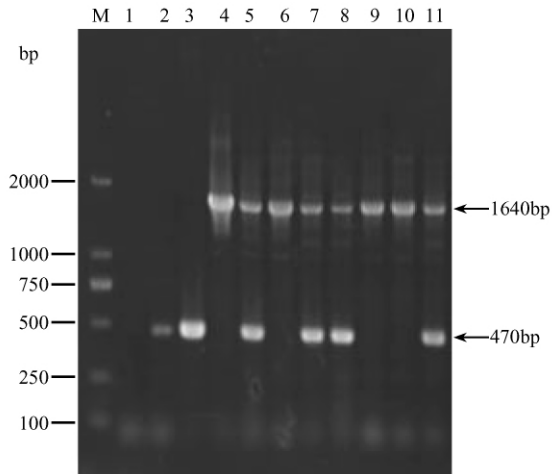


图 4 指孢囊菌 NRRL 18085 野生型和突变株的 PCR 产物的电泳分析

Fig. 4 Gel electrophoresis analyses of PCR products from wild type and mutant strains of *D. aurantiacum* NRRL 18085. PCR was conducted using the primer pairs 7s, 7a, and the DNA templates were from: ddH<sub>2</sub>O (negative control, lane 1); wild type NRRL 18085 (lane 2); pCSG14 (lane 3); pCSGM (lane 4); mutants CSG-m1 - CSG-m7 (lanes 5 - 11). DNA marker was indicated in lane M

m6 中, PCR 扩增获得了 1640 bp 的单个 DNA 片段(图 4, 泳道 6, 9, 10), 表明这 3 个突变株中发生了双交换突变。将该 1640 bp 的 DNA 片段进行回收测序, 结果与预期完全一致, 这充分证实了 CSG-m2, CSG-m5 和 CSG-m6 为双交换突变株, 而且双交换突变率接近 50% (7 个里面有 3 个)。

将获取的 3 个双交换的突变株 (CSG-m2, CSG-m5 和 CSG-m6) 进行发酵培养, 与野生型的发酵产物进行比对分析, 结果如图 5 所示。通过与 tiacumicin B 标准样品比较表明野生型的确能生产 tiacumicin B 及其类似物, 其中 tiacumicin B 标准样品的保留时间是 19.8 min (图 5-E, “◆” 所对应的峰), 然而野生型的发酵产物比较复杂, 既有与标准品相对应的 HPLC 峰(图 5-A, 19.8 min, “◆” 所对应的峰), 也有一系列 tiacumicin 类似物(根据峰所对应的紫外吸收特征图谱推测)的 HPLC 峰(图 5-A, 保留时间 18.7 - 19.6 min, “●” 所对应的峰)。而 3 个双交换的突变株的发酵产物几乎是一致的, 在 tiacumicin B (“◆”) 和 tiacumicin 类似物 (“●”) 相对应的保留时间处都没有 HPLC 峰, 表明突变株都失去了产生 tiacumicin B 的能力(图 5B-D)。这个结果证明我们获得了正确的双交换突变株, 同时说

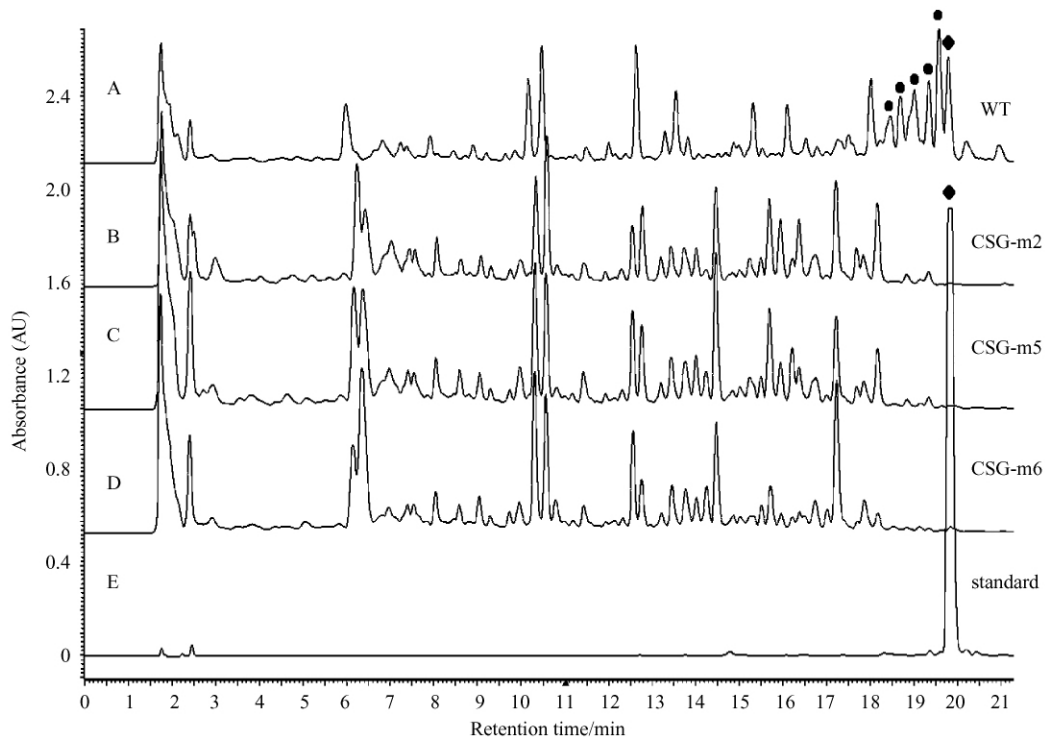


图 5 指孢囊菌 NRRL 18085 野生型和突变株的发酵产物的高效液相色谱分析

Fig. 5 HPLC analyses of fermentation products from wild type and mutant strains of *D. aurantiacum* NRRL 18085. Extracts were from (A) wild type NRRL 18085, tiacumicin B (◆), tiacumicin B analogs (●); (B) CSG-m2; (C) CSG-m5; (D) CSG-m6 and (E) tiacumicin B standard (◆).

明我们可以利用指孢囊菌 NRRL 18085 的菌丝体直接进行接合转移试验,将外源 DNA 从大肠杆菌中顺利导入该菌并发生同源重组,从而成功建立起了该菌的遗传操作体系。

### 3 讨论

指孢囊菌 (*Dactylosporangium*) 与小单孢菌 (*Micromonospora*) 同属于小单孢菌科 (*Micromonosporaceae*),它们有着较近的亲缘关系。小单孢菌科因为能够产生如庆大霉素等多种类型的重要抗生素而受到人们的关注<sup>[22]</sup>。相对于遗传操作系统已经发展得比较成熟的链霉菌,有关小单孢菌科遗传操作体系的研究鲜有报道。通过接合转移的方式,我国学者成功建立起了小单孢菌 *Micromonospora* sp. 40027 的基因克隆系统<sup>[23]</sup>,但是到目前为止,还未见有指孢囊菌遗传操作系统的报道。指孢囊菌 NRRL 18085 产生的台勾霉素 B 是一种极具前景的药物候选物,目前正在三期临床试验中<sup>[7-8]</sup>,但由于该菌所产的相同类型的代谢产物众多,给下游的分离纯化带来了很大不便。因此,建立指孢囊菌 NRRL 18085 的遗传操作体系,利用组合生物合成技术进行生产菌的优化,简化台勾霉素 B 的发酵分离工艺,具有广泛的应用前景。

在链霉菌的基因敲除实验中,接合转移多以萌发的链霉菌孢子作为受体,很少有用菌丝体作为受体的成功案例。由于指孢囊菌 NRRL 18085 产生的孢子太少,因此只能尝试以菌丝体直接作为受体进行相应的接合转移实验,类似于已报道的小单孢菌 *Micromonospora* sp. 40027 的接合转移操作<sup>[23]</sup>。利用整合型载体 pSET152,我们建立了外源 DNA 通过接合转移进入指孢囊菌 NRRL 18085 的遗传操作条件和培养条件,发现 ISP4 和 2CMY 作为培养基,更适合指孢囊菌接合转移子的生长,同时发现高浓度萘啶酮酸对指孢囊菌的生长有抑制作用,从而选择甲氧苄氨嘧啶作为接合转移试验中大肠杆菌的抑制剂。利用 PCR-targeting 技术和接合转移方法,我们针对指孢囊菌 NRRL 18085 所产生的台勾霉素的生物合成基因进行体内敲除等遗传操作,成功获得了台勾霉素卤化酶基因“框内敲除”(in-frame deletion)的双交换突变株,导致该突变株不再能产生 tiacumicin B。本研究成功建立了指孢囊菌 NRRL 18085 的遗传操作体系,为其他难以进行遗传操作的小单孢菌科菌种的类似研究提供了参考实例。另外,指孢囊菌 NRRL 18085 中台勾霉素卤化酶基因

的成功敲除,也为利用组合生物合成技术对台勾霉素的生物合成基因,包括结构基因、抗性基因和调控基因等进行遗传操作,构建台勾霉素高产菌株,或者产生其他新的高活性类似物的工程菌提供了很好的实验基础。目前我们正在进行台勾霉素相关生物合成基因簇的序列测定和基因突变株的发酵产物的分离鉴定。

### 参考文献

- [ 1 ] Ackermann G, Loffler B, Adler D, Rodloff AC. In vitro activity of OPT-80 against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(6): 2280-2282.
- [ 2 ] Karlowsky JA, Laing NM, Zhanel GG. In vitro activity of OPT-80 tested against clinical isolates of toxin-producing *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(11): 4163-4165.
- [ 3 ] Kurabachew M, Lu SH, Krastel P, Schmitt EK, Suresh BL, Goh A, Knox JE, Ma NL, Jiricek J, Beer D, Cynamon M, Petersen F, Dartois V, Keller T, Dick T, Sambandamurthy VK. Lipiarmycin targets RNA polymerase and has good activity against multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 62(4): 713-719.
- [ 4 ] Hochlowski JE, Swanson SJ, Ranfranz LM, Whittern DN, Buko AM, McAlpine JB. Tiacumicins, a novel complex of 18-membered macrolides. II. Isolation and structure determination. *Journal of Antibiotics*, 1987, 40(5): 575-588.
- [ 5 ] Coronelli C, White RJ, Lancini GC, Parenti F. Lipiarmycin, a new antibiotic from *Actinoplanes*. II. Isolation, chemical, biological and biochemical characterization. *Journal of Antibiotics*, 1975, 28(4): 253-259.
- [ 6 ] Shue YK, Hwang CK, Chiu YH, Romero A, Babakhani F, Sears PS, Okumu F. 18-Membered macrocycles and analogs thereof. USA: US 20080269145A1, Oct. 30, 2008.
- [ 7 ] Louie T, Miller M, Donskey C, Mullane K, Goldstein EJ. Clinical outcomes, safety, and pharmacokinetics of OPT-80 in a phase 2 trial with patients with *Clostridium difficile* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(1): 223-228.

- [ 8 ] Shue YK, Sears PS, Shangle S, Walsh RB, Lee C, Gorbach SL, Okumu F, Preston RA. Safety, tolerance, and pharmacokinetic studies of OPT-80 in healthy volunteers following single and multiple oral doses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(4): 1391-1395.
- [ 9 ] Wu MC, Huang CC, Lu YC, Fan WJ. Derivatives of tiacumicin B as anti-cancer agents. USA: US 2009/0110718 A1, Apr. 30, 2009.
- [10] Gerber M, Ackermann G. OPT-80, a macrocyclic antimicrobial agent for the treatment of *Clostridium difficile* infections: a review. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2008, 17(4): 547-553.
- [11] Zhou H, Xie X, Tang Y. Engineering natural products using combinatorial biosynthesis and biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(6): 590-596.
- [12] 白林泉, 邓子新. 微生物次级代谢产物生物合成基因簇与药物创新. 中国抗生素杂志(*Chinese Journal of Antibiotics*), 2006, 31(1): 80-89.
- [13] Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [14] Gust B, Chandra G, Jakimowicz D, Yuqing T, Bruton CJ, Chater KF. Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Advances in Applied Microbiology*, 2004, 54: 107-128.
- [15] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigma E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 204-211.
- [16] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schoner BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, 116(1): 43-49.
- [17] Evans GA, Lewis K, Rothenberg BE. High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. *Gene*, 1989, 79(1): 9-20.
- [18] 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 李翔. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法. 生物技术(*Biotechnology*), 2007, 17(1): 39-41.
- [19] Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski A, Schneider K, Welzel K, Wohlert SE, Holzenkampfer M, Nicholson GJ, Bechthold A, Sussmuth RD, Vente A, Pelzer S. A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources. *ChemBioChem*, 2007, 8(7): 757-766.
- [20] Gao P, Huang Y. Detection, distribution, and organohalogen compound discovery implications of the reduced flavin adenine dinucleotide-dependent halogenase gene in major filamentous actinomycete taxonomic groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(14): 4813-4820.
- [21] Matsushima P, Broughton MC, Turner JR, Baltz RH. Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production. *Gene*, 1994, 146(1): 39-45.
- [22] 程元荣, 黄威. 小单孢菌产生的生物活性物质. 国外医药抗生素分册(*World Notes on Antibiotics*), 1998, 19(6): 407-418.
- [23] Li X, Zhou X, Deng Z. Vector systems allowing efficient autonomous or integrative gene cloning in *Micromonospora* sp. strain 40027. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3144-3151.



# Genetic manipulation system for tiacumicin producer *Dactylosporangium aurantiacum* NRRL 18085

Yi Xiao, Sumei Li, Liang Ma, Gaiyun Zhang, Jianhua Ju, Changsheng Zhang\*

(Research Center of Marine Microbes, Key Laboratory of Marine Bio-resource Sustainable Utilization, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

**Abstract:** [Objective] To optimize the production of tiacumicin B in *Dactylosporangium aurantiacum* NRRL 18085, we developed a genetic manipulation system for disrupting genes involved in tiacumicin biosynthesis. [Methods] We developed a method of conjugation to transfer exotic DNA pSET152 into *D. aurantiacum* NRRL 18085. Using the PCR-targeting system, we disrupted a putative tiacumicin halogenase gene *in vitro* by “in-frame deletion” in *E. coli*, and then the resulting cosmid was transferred into *D. aurantiacum* NRRL 18085 by conjugation. [Results] The putative tiacumicin halogenase gene in *D. aurantiacum* NRRL 18085 was disrupted by in-frame deletion from a double-crossover recombination event. The resulting mutant strain lost the ability to produce tiacumicin B. [Conclusion] We developed a genetic manipulation system for *D. aurantiacum* NRRL 18085, enabling the functional characterization of tiacumicin biosynthetic genes *in vivo*, and we offered a positive example for other Actinobacteria lacking an appropriate genetic manipulation system.

**Keywords:** *Dactylosporangium*; genetic manipulation system; tiacumicin; biosynthesis; halogenase

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Funds of the Chinese Academy of Sciences for Key Topics in Innovation Engineering (KZCX2-YW-216), the National Science Foundation for Young Scientists of China (30900035), the China Postdoctoral Science Foundation (20090460836) and the ‘100 Talents Project’ of Chinese Academy of Sciences(08SL111002)

\* Corresponding author. Tel: +86-20-89023038; Fax: +86-20-89023100; E-mail: czhang2006@gmail.com, czhang@scsio.ac.cn

Received: 29 January 2010/Revised: 30 April 2010

## 《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,5-7个月之内发表。

(1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。

(2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。