

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(9):1251-1257; 4 September 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

大肠杆菌-链霉菌穿梭表达载体 pMF 的构建及其应用

全梅芳, 余凯, 夏立秋*, 丁学知, 曾凡军, 寇笑笑, 王海龙, 胡胜标, 余子全, 李敬业
(湖南师范大学生命科学学院, 微生物分子生物学湖南省重点实验室, 长沙 410081)

摘要:【目的】构建能定点整合到链霉菌(*Streptomyces*)染色体上的高效表达载体。【方法】以链霉菌自杀型表达载体 pLSB2 为基础, 通过插入链霉菌噬菌体 Φ C31 整合酶基因 *int* 和 *attP* 位点(Phage attachment site), 构建了能在大肠杆菌和链霉菌之间进行接合转移并定点整合到链霉菌染色体上的表达载体 pMF。将 pMF 转化大肠杆菌 ET12567(pUZ8002), 并分别接合转移天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor* M145)、变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans* TK24)和红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea* 2338), 挑取接合子进行 PCR 和 Southern 杂交检测。将来自刺糖多孢菌 S08-4 的 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶基因(*SAM-s*)克隆到载体 pMF 的启动子下游, 接合转移到天蓝色链霉菌中。【结果】表明 pMF 成功整合到链霉菌染色体, 并且检测到目的蛋白的表达。【结论】构建的 pMF 载体可作为外源基因定点整合表达的有效工具, 为后续的基因功能研究以及链霉菌的遗传改造奠定了基础。

关键词: 链霉菌; 整合酶; 表达载体; 接合转移

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1251-07

链霉菌(*Streptomyces*)是一种革兰阳性的丝状土壤细菌, 它们能产生许多具有药理活性的次生代谢产物, 包括目前已知大约 70% 的抗生素^[1]。然而针对一些抗生素生产菌所进行的以提高次生代谢产物产量为目的的遗传改造难于进行, 这是因为有些工业菌株缺乏有效的基因转移系统和合适的表达载体。在这些能被转移的外源质粒中, 有一类是由链霉菌温敏噬菌体 Φ C31 的定点重组系统衍生而来, 如被广泛使用的质粒 pSET152^[2]。链霉菌噬菌体 Φ C31 整合酶属于丝氨酸重组酶家族中的成员之一, 它能介导噬菌体的 *attP* 位点(phage attachment site)和宿主 *attB* 结合位点(Bacterial attachment site)的特异性重组反应从而将噬菌体 DNA 整合到宿主的基因组^[3], 所以 Φ C31 整合酶是一个介导外源基因插入的有效工具, 这种稳定整合成功避免了多拷

贝质粒的不稳定性等许多缺点。

质粒 pLSB2 是一个自杀型大肠杆菌-链霉菌穿梭表达载体^[4], 它含有大肠杆菌复制子、接合转移起始位点 *oriT*、阿泊拉抗性标记、来自天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)的途径专一性激活基因 *act II-ORF4* 以及 *Pact I/Pact III* 双向启动子^[5,6], 能有效地启动外源基因表达, 但是唯一的缺点是它既不含链霉菌复制子, 也没有整合原件, 因此限制了应用范围。本研究利用 PCR 技术扩增载体 pSET152 上的整合酶基因 Φ C31 *int*, *attP* 片段, 然后通过 *Spe I* 酶切位点插入到 pLSB2 质粒上, 构建了能定点整合到链霉菌染色体上的新的整合型表达载体 pMF。

S-腺苷甲硫氨酸合成酶(*S*-adenosylmethionine synthetase, 简称 SAM-s)广泛存在于动、植物和微生物

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA02Z187, 2006AA10A212); 国家自然科学基金(30870064, 30670052); 教育部博士后基金(20060542006); 湖南省教育厅资助项目(04C381)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-731-8872298; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

作者简介: 全梅芳(1985-), 女, 湖南衡阳县人, 硕士研究生, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: quanmeifang@yeah.net

收稿日期: 2010-03-08; **修回日期:** 2010-04-21

粒 pSET152 为模板扩增含有 Φ C31 *int* 和 *attP* 位点的 2.4 kb 片段, 将该片段连 pMD18-T 载体得到重组质粒 pMDint 后测序, 结果与文献报道一致。将质粒

pMDint 的 *Spe* I 酶切片段与 pLSB2 的 *Spe* I 单酶切片段相连后转化大肠杆菌 Top10 得到重组载体 pMF。质粒 pMF 的构建过程如图 1 所示。

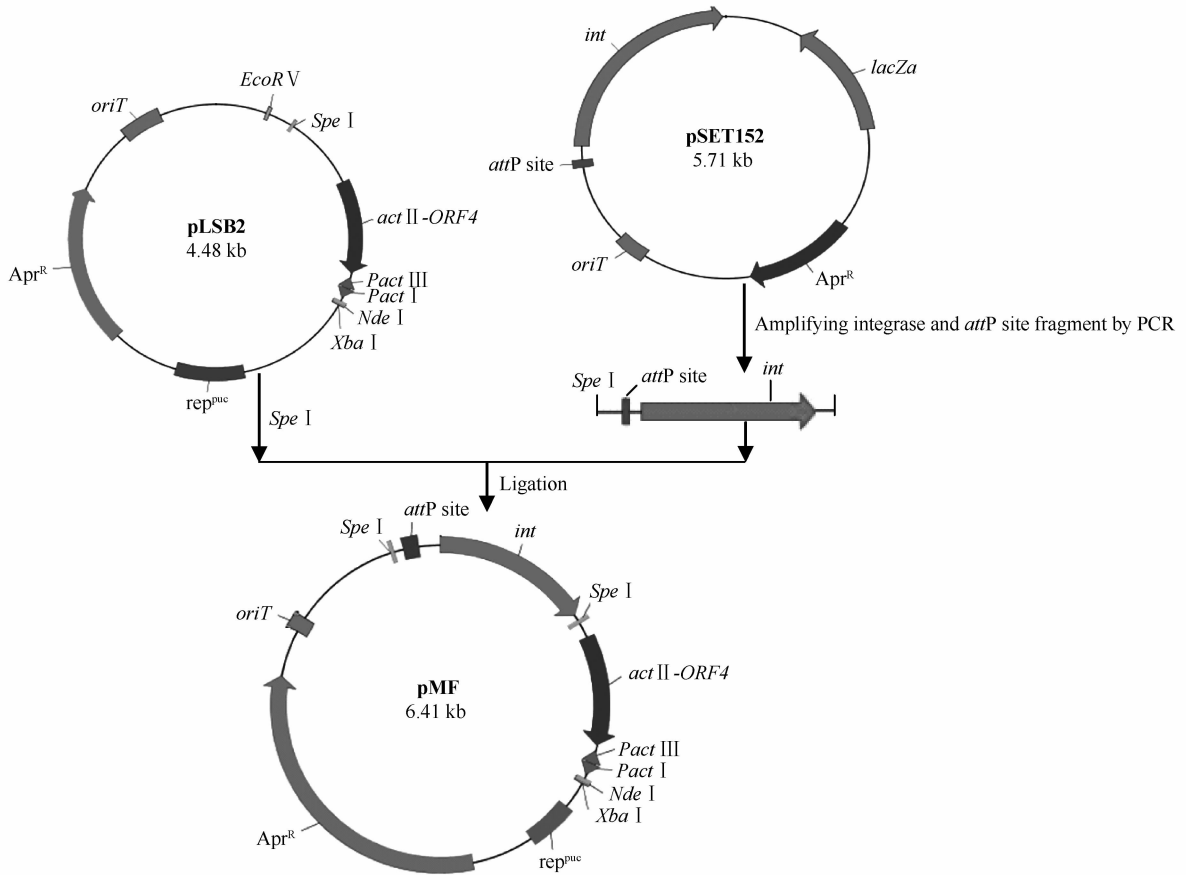


图 1 质粒 pMF 的构建

Fig. 1 Construction of pMF.

2.2 pMF 在大肠杆菌与链霉菌属间接转移及在染色体上的整合

将构建好的质粒 pMF 转化大肠杆菌 ET12567

(pUZ8002), 得到大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002, pMF) 作为供体菌分别与天蓝色链霉菌 M145、变铅青链霉菌 TK24 和红色糖多孢菌 2338 接合, 得到的

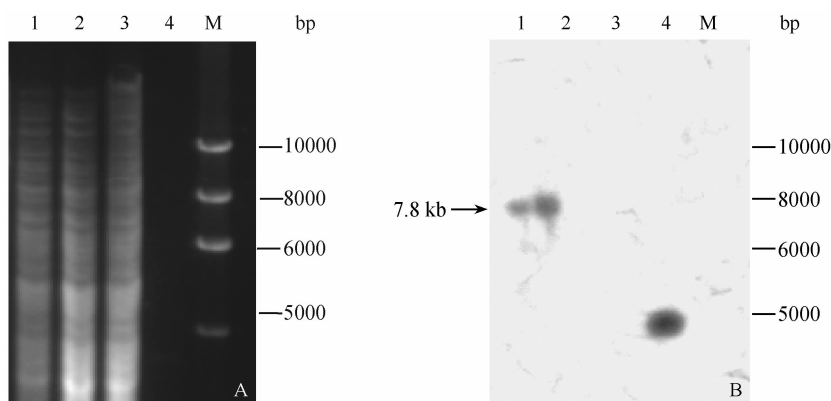


图 2 变铅青链霉菌 MF1,2 的 Southern 杂交验证

Fig. 2 Southern blotting analysis of recombinants of *S. lividans* TK24. DIG-labelled *Apr* gene used as probe hybridized with total DNA of MF1 and 2 digested with *Pst* I. A: the agarose gel stained with ethidium bromide; B: the result of hybridization. M. DNA marker; 1. Total DNA of MF2/*Pst* I; 2. Total DNA of MF1/*Pst* I; 3. Total DNA of TK24/*Pst* I; 4. positive control (4.48kb).

接合子能在含有阿泊拉霉素的 BHI 平板上传代生长。挑取两个变铅青链霉菌的转化子命名为 MF1 和 MF2, 提取基因组 DNA, 用 *Pst* I 进行单酶切, 质粒 pLSB2 为阳性对照, 以地高辛标记的阿泊拉抗性基因作为探针进行 Southern 杂交, MF1 和 MF2 经杂交后在 7.8 kb 处均可见明显的阳性信号, 而泳道 2 为 *S. lividas* TK24 总 DNA 作为阴性对照没有出现阳性信号(图 2)。

2.3 刺糖多孢菌 *SAM-s* 基因的克隆和表达载体 pMFsam 的构建

以刺糖多孢菌 S08-4 的全基因组为模板, 设计引物 SAMs-F 和 SAMs-R 进行 *SAM-s* 基因的扩增, 得到 700 bp 目的片段。将 PCR 片段连接载体 pMD18-T, 转化大肠杆菌后得到重组质粒 pMDSam, 测序结果与 GeneBank 序列一致。用 *Nde* I 和 *Xba* I 分别酶切质粒 pMF 和 pMDSam, 回收目的片段并连接后转化大肠杆菌 TOP10, 得到重组表达质粒 pMFsam。

2.4 利用 pMF 载体表达 *SAM-s* 基因

将质粒 pMF、pMFsam 分别转化大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002), 得到大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002, pMF)、ET12567 (pUZ8002, pMFsam) 作为供体, 分别接合转移天蓝色链霉菌 M145, 接合子转接到含阿泊拉霉素和萘啶酮酸的 BHI 平板上生长, 至少转接 2 次, 挑取接合子至含阿泊拉霉素的 YEME 液体培养基中, 培养 72 h 后收集菌体, 超声波裂解后得到的蛋白粗提物经 15% SDS-PAGE 电泳后转膜, 进行 Western 杂交试验, 杂交所用一抗为抗 His6-tag 的小鼠单克隆抗体。结果显示, 接合子均在 25 kDa 处出现特异性杂交带, 而 M145 对照株未出现杂交带, 这表明 *SAM-s* 蛋白得到表达(图 3)。

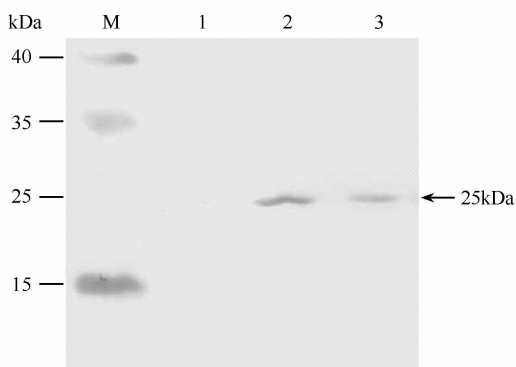


图 3 天蓝色链霉菌及其转化子蛋白粗提物的 Western 杂交分析

Fig. 3 Western blot analysis of crude cell extracts from conjugates of *S. coelicolor* M145. M. protein marker; 1. *S. coelicolor* M145; 2 and 3. *S. coelicolor* M145/pMFsam.

2.5 *SAM-s* 蛋白表达对天蓝色链霉菌生长和抗生素合成的影响

将 M145/pMFsam、M145/pMF 和 M145 分别接种到 GYM 和 R4C 培养基上, 30°C 培养观察孢子和抗生素形成情况。结果显示, 在 GYM 平板上 30°C 培养两天, M145/pMFsam 菌株的十一烷基灵菌红素 (Red) 产量较 M145/pMF 空载体对照和原始菌 M145 有很大提高(图 8-A)。在 R4C 平板上培养 4 d, 发现都能正常形成孢子, 但是与对照株相比, M145/pMFsam 的孢子形成受到了明显的抑制; 从平板背面观察, M145/pMFsam 产生的放线紫红素 (Act) 颜色比对照株更深(图 8-B、C)。这种情况与 Kim 等所报道的来自于 *S. spectabilis* 的 *SAM-s* 基因在 *S. lividans* 中表达后所产生的效果一致。

3 讨论

本研究从质粒 pLSB2 出发, 该质粒由大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pCJR24 衍生而来, 它含有来自天蓝色链霉菌放线紫红素生物合成基因簇的途径专一性激活基因 *act II-ORF4*, 以及 *Pact III/Pact I* 双向启动子。其中 *Pact I* 及其核糖体结合位点位于 *Nde* I (5'-CATATG-3') 酶切位点的上游, 并且这一酶切位点包含了 *Pact I* 的起始密码子 ATG, 当外缘基因通过 *Nde* I/*Xba* I 连接到启动子下游时, 能在 *Act II-ORF4* 激活子的作用下进行高水平表达。*act II-ORF4/Pact I* 这一激活-启动模式已在许多放线菌中得到应用。Rowe^[5] 等用 *act II-ORF4/Pact I* 取代红霉素生物合成基因簇的原始启动子, 发现工程菌的红霉素及许多前体物质产量是原始菌的 10 倍。Sheehan^[4] 等利用质粒 pLSB2 构建的同源重组载体, 成功地用 *Pact I* 和阿维菌素的起始模块分别替代了多杀菌素生物合成基因簇原始启动子和起始模块, 工程菌产生了预期的多杀菌素衍生物 21-desethyl-21-isopropylspinosyns A 和 D, 21-desethyl-21-sec-butylspinosyns A 和 D。

因此本文在充分利用载体 pLSB2 优点的基础上, 通过插入整合酶 Φ C31 int 和 *attP* site, 构建了能在大肠杆菌和链霉菌间进行接合转移, 并能整合到链霉菌染色体上的高效表达载体 pMF。该质粒将具有一些重要特点, 不需抗生素的选择能在宿主中稳定存在; 含有 *act II-ORF4/Pact I* 高效启动子, 已有文献报道能在多种放线菌中工作; 含有 *oriT* 可进入尚未建立转化系统或转化困难的链霉菌。用 pMF 转化大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002) 后, 分别与天蓝色

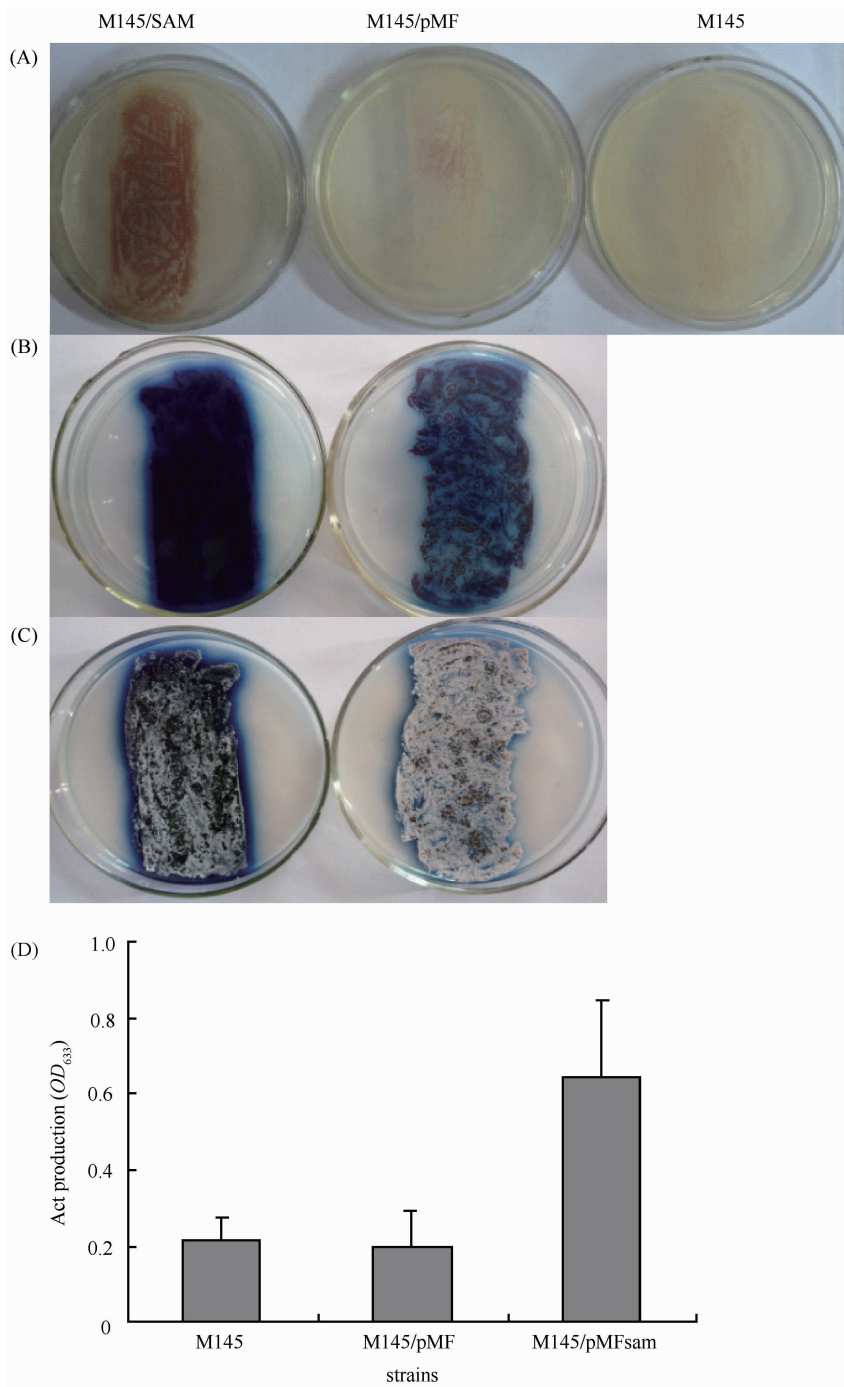


图 4 *SAM-s* 基因表达对天蓝色链霉菌生长及抗生素合成的影响

Fig. 4 Effect of introduction of the putative *SAM-s* gene on the production of Red and Act in *S. coelicolor* M145. (A) Red production in strains M145/pMFsam, M145/pMF and M145. Strains were inoculated on GYM agar medium, followed by inoculated for 2 days at 30°C. M145/pMF represents the vector control. (B) Act production in strains M145/pMFsam and M145/pMF. Strains were inoculated on R4C agar and grown at 30°C for 4 days. The reverse side of the plate showing Act production, (C) the front side showing sporulation. (D) Comparison of Act production in GYM liquid medium. Cultures were incubated at 30°C for 5 days. The experiment was averaged from 3 different extractions.

链霉菌 M145 及其 *ssgA* 基因阻断株 GSA3^[14]、变铅青链霉菌 TK24、红色糖多孢菌 2338 接合, 均能得到数量很多的接合子, 说明构建的质粒载体 pMF 有着较广范围的宿主菌, 都能成功整合到链霉菌的染色体上。

在上述研究的基础上, 本文首次将来自刺糖多孢菌的 *SAM-s* 基因通过 *Nde* I/*Xba* I 酶切位点克隆至 pMF 的 *act* II-*ORF4*/*Pact* I 启动元件下游, 通过接合转移转入天蓝色链霉菌 M145 中。将接合子转接 GYM 和 R4C 平板培养, 观察色素和孢子形成情

况,发现转化子 M145/pMFsam 的孢子形成受到了明显的抑制,并且 Act 和 Red 两种色素的形成起始时间比两株对照菌都要早。摇瓶发酵结果显示转化子 M145/pMFsam 的 Act 产量是对照株 M145/pMF 的 3.2 倍,而两株对照株之间并没有很大差别(图 8-C)。这可能是由菌株内 *SAM-s* 基因的过量表达导致 SAM 水平升高引起的,关于具体的调节机制,Okamoto^[7]等和 Kim^[8]等证明 SAM 是作为一种信号分子通过激活放线紫红素生物合成基因簇的专一性调节基因 *act II-ORF4*,增强了生物合成途径中第一个基因 *act I* 的转录水平,导致放线紫红素产量提高。而对于多杀菌素、红霉素这一类具有重要经济价值的大环内酯类抗生素来说,他们合成过程中所需要的甲氧基均来自于 SAM,因此我们下一步要做的就是利用质粒 pMF 将 *SAM-s* 基因导入这类抗生素生产菌中,以期提高红霉素和多杀菌素等次生代谢产物产量。

参考文献

- [1] Kesier T, Bibb MJ, Butter MJ, Chater KF, Hoopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, United Kingdom: John Innes Foundation, 2000.
- [2] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schonher BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, 116(1): 43-49.
- [3] Combes P, Till R, Bee S, Smith MC. The *streptomyces* genome contains multiple pseudo-*attB* sites for the (ϕ) C31-encoded site-specific recombination system. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(20): 5746-5752.
- [4] Sheehan LS, Lill RE, Wilkinson B, Sheridan RM, Vousden WA, Kaja AL, Crouse GD, Gifford J, Graupner PR, Karr L, Lewer P, Sparks TC, Leadlay PF, Waldron C, Martin CJ. Engineering of the spinosyn PKS: directing starter unit incorporation. *Journal of Natural Products*, 2006, 69(12): 1702-1710.
- [5] Rowe CJ, Cortés J, Gaisser S, Staunton J, Leadlay PF. Construction of new vectors for high-level expression in *actinomycetes*. *Gene*, 1998, 216(1): 215-223.
- [6] Jones GH. Actinomycin production persists in a strain of *streptomyces* antibioticus lacking phenoxazinone synthase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(5): 1322-1327.
- [7] Okamoto S, Lezhava A, Hosaka T, Okamoto-Hosoya Y, Ochi K. Enhanced expression of *S*-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(2): 601-609.
- [8] Kim DJ, Huh JH, Yang YY, Kang CM, Lee IH, Hyun CG, Hong SK, Suh JW. Accumulation of *S*-adenosyl-L-methionine enhances production of actinorhodin but inhibits sporulation in *Streptomyces lividans* TK23. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(2): 592-600.
- [9] Wang Y, Boghigian BA, Pfeifer BA. Improving heterologous polyketide production in *Escherichia coli* by overexpression of an *S*-adenosylmethionine synthetase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(2): 367-373.
- [10] Wang Y, Wang Y, Chu J, Zuang Y, Zhang L, Zhang S. Improved production of erythromycin A by expression of a heterologous gene encoding *S*-adenosylmethionine synthetase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(4): 837-842.
- [11] Shin SK, Xu D, Kwon HJ, Suh JW. *S*-adenosylmethionine activates *adpA* transcription and promotes streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 259(1): 53-59.
- [12] Zhao XQ, Jin YY, Kwon HJ, Yang YY, Suh JW. *S*-adenosylmethionine (SAM) regulates antibiotic biosynthesis in *streptomyces* spp. in a mode independent of its role as a methyl donor. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 16: 927-932.
- [13] Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3rd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [14] van Wezel GP, van der Meulen J, Kawamoto S, Luiten RG, Koerten HK, Kraal B. *ssgA* is essential for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and affects hyphal development by stimulating septum formation. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(20): 5653-5662.
- [15] Shima J, Hesketh A, Okamoto S, Kawamoto S, Ochi K. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(24): 7276-7284.
- [16] Zhang Q, Zhu BQ, Hu HF. Activated antibiotic production by inducing resistance to capreomycin in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2008, 6: 57-62.

Construction of *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle expression plasmid pMF

Meifang Quan, Kai Yu, Liqiu Xia*, Xuezhi Ding, Fanjun Zeng, Xiaoxiao Kou, Hailong Wang, Shengbiao Hu, Ziquan Yu, Jingye Li

(Key Lab of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: [**Objective**] To construct an *E. coli-streptomyces* shuttle vector pMF that can integrate into the genome of *streptomyces* by site-specific integration. [**Methods**] We inserted the integrase gene Φ C31 *int* and *attP* site into pLSB2, a suicidal *streptomyces* plasmid. The resulting conjugably transferable vector which contains the activator promoter system *act II -ORF4/Pact I* from *Streptomyces coelicolor* A3(2) could be integrated into the genome of *streptomyces* by site-specific integration. [**Results**] The plasmid pMF was conjugably transferred with high frequency into *S. coelicolor* M145, *S. lividans* TK24 and *Saccharopolyspora erythraea* 2338 from *E. coli*. Southern blotting results showed that pMF was able to integrate into the genome of *streptomyces*. We also confirmed functional protein expression by cloning a putative *S*-adenosylmethionine synthetase (*SAM-s*) gene from *Sacc. spinosa* S08-4 into pMF and conjugated into *S. coelicolor* M145. Protein expression were confirmed using Western blotting. [**Conclusion**] pMF can be used as an effective tool for site-specific integration expression of foreign gene in *streptomyces*.

Keywords: *Streptomyces*; integrase; expression vector; conjugation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z187, 2006AA10A212), the National Natural Science Foundation of China (30870064, 30670052), the Ph. D Programs Foundation of Ministry of Education of China (20060542006) and the Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (04C381)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-731-8872298; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

Received: 8 March 2010/Revised: 21 April 2010

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上,并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。