

无机盐对阿维链霉菌接合转移及异源表达放线紫红素的影响

余姣姣¹, 陶美凤^{1,2*}

(¹ 华中农业大学农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070)

(² 上海交通大学生命科技学院微生物代谢实验室, 上海 200030)

摘要:【目的】阿维链霉菌可作为异源表达抗生素生物合成基因簇的良好宿主,但是需要优化含有大片段DNA质粒的接合转移效率。【方法】我们选取 $MgCl_2$ 、 $NaCl$ 、 $Ca(NO_3)_2$ 和 $CaCl_2$ 等4种无机盐,在0-200 mmol/L浓度范围内分别研究其对大质粒向阿维链霉菌接合转移的影响,再设计完全随机试验筛选最佳条件。【结果】 $CaCl_2$ 对阿维链霉菌接合转移有极明显的促进作用, $MgCl_2$ 也有一定提高作用。通过完全随机试验筛选出最佳的 $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$ 浓度组合,使大质粒的接合转移效率提高11倍。同时,本研究还发现阿维链霉菌异源表达放线紫红素的最适培养基,成功表达放线紫红素。【结论】特定无机盐对阿维链霉菌接合转移效率有明显提高作用,并且能促进放线紫红素在阿维链霉菌中的表达。

关键词: 阿维链霉菌;接合转移;异源表达;放线紫红素

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1556-06

链霉菌能产生多种多样的次级代谢产物,如抗生素、抗癌药物等而受到广泛关注。对特定次级代谢途径进行深入研究是开展抗生素菌种理性选育的基础,在抗生素产生菌中开展这些研究需要建立实用的遗传操作体系^[1]。由于链霉菌限制修饰系统及其它未知原因,很多抗生素产生菌仍然很难进行有效的遗传操作,需要系统地探索、优化现有的技术体系。将基因簇转到容易操作的异源宿主中表达,在异源宿主中研究次级代谢及其调控是一个很好的替代选择^[2]。

阿维链霉菌产生重要的杀虫抗生素阿维菌素,经过长期工业化生产实践,其发酵工艺已很成熟;阿维链霉菌的全基因组已经完成测序,有详细的基因组注释,有利于后续的次级代谢基因簇表达调控研究^[3];阿维链霉菌产生聚酮类抗生素阿维菌素,体内必然能产生丰富的聚酮类抗生素合成所需前体和辅因子;阿维链霉菌已经建立了较完善的遗传操作

系统^[3]。综上所述,采用阿维链霉菌作为异源宿主表达聚酮类抗生素基因簇有明显优点。但是我们用含放线紫红素基因簇的大质粒进行尝试时发现,在常用的条件下,大质粒向阿维链霉菌接合转移效率很低,不利于异源表达研究。因此,本研究试图优化阿维链霉菌的接合转移体系,提高大质粒的接合转移效率,在此基础上尝试异源表达聚酮类抗生素放线紫红素基因簇。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:阿维链霉菌 NRRL8165、大肠杆菌 DH5 α 和 ET12567/pUZ8002 均由华中农业大学农业微生物国家重点实验室链霉菌室保存。

1.1.2 质粒:pMM1 是含有放线紫红素生物合成基因簇的 pSET152 衍生质粒,约 45 kb,含阿泊拉霉素抗性基因 *aac(3)IV*、大肠杆菌复制子、链霉菌噬菌

基金项目:自然科学基金(30870073)

* 通信作者。Tel: +86-21-62933765-2051; Fax: +86-21-62932418; E-mail: tao_meifeng@sjtu.edu.cn

作者简介:余姣姣(1985-),女,湖北武汉人,硕士研究生,研究方向为链霉菌分子生物学。

收稿日期:2010-04-07;修回日期:2010-05-16

体 Φ C31 的整合功能区、接合转移起始区 (*oriT*) 和完整的放线紫红素基因簇 (王业民, 陶美凤, 未发表)。pUZ8002 为 RP4 衍生质粒, 与含 *oriT* 的质粒共存于同一个大肠杆菌细胞时可促进后者向合适受体菌接合转移, 常用作大肠杆菌-链霉菌属间接转移的辅助质粒^[1]。

1.1.3 培养基: 大肠杆菌培养用 LB 培养基^[4]; 阿维链霉菌 NRRL8165 产孢用 YMS 培养基^[5]; 大肠杆菌与阿维链霉菌接合转移培养基采用 F3 和 2CM。F3 (每升)^[6]: 可溶性淀粉 20 g, KNO₃ 1.5 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, MnSO₄·7H₂O 8.45 mg, 自然 pH。用 F3 测定无机盐对接合转移影响时不加七水硫酸镁。2CM (每升)^[7]: 可溶性淀粉 10 g, 胰蛋白胨 2 g, NaCl 1 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, CaCO₃ 2 g, 无机盐溶液 1 mL, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH7.2。其中无机盐溶液为 (每升): FeSO₄·7H₂O 1 g, MgCl₂·6H₂O 1 g, ZnSO₄·7H₂O 1 g。ISP2、ISP4、R2YE^[1] 和阿维菌素发酵培养基 1 和 2^[8] 均用于尝试放线紫红素的异源表达。YEME^[1] 用于液体培养阿维链霉菌; 2 × YT^[4] 用于阿维链霉菌热激处理。

1.1.4 抗生素与生化试剂: 在大肠杆菌中抗生素使用浓度为: 50 mg/L 卡那霉素、25 mg/L 氯霉素、50 mg/L 阿泊拉霉素 (apramycin); 链霉菌接合转移子筛选用 50 mg/L 阿泊拉霉素; 接合转移平板另外覆盖 50 mg/L 三甲氧苄氨嘧啶 (trimethoprim, TMP) 用于抑制大肠杆菌供体菌。

1.2 链霉菌的培养与总 DNA 的提取

链霉菌培养、总 DNA 提取见参考文献^[1]。

1.3 大肠杆菌-链霉菌属间接转移

大肠杆菌-链霉菌属间接转移参考 Flett 等^[9], 具体方法如下: 供体菌为 ET12567/ pUZ8002/ pMM1, 受体菌为阿维链霉菌 NRRL8165 新鲜孢子。将 ET12567/ pUZ8002/ pMM1 接种于 5 mL LB 培养基, 37 °C 培养过夜。然后按 1:100 将过夜培养物接种于含有卡那霉素、氯霉素、阿泊拉霉素的新鲜 LB 中, 于 37 °C 继续培养至 OD₆₀₀ = 0.4 - 0.6; 用等体积新鲜的 LB 洗涤菌体 2 次洗掉抗生素, 加适量新鲜 LB 悬浮大肠杆菌细胞, 分装备用。取链霉菌孢子悬浮在 500 μ L 2 × YT 中, 50 °C 水浴热激处理 10 min。将处理好的大肠杆菌和冷却至室温的阿维链霉菌孢子悬液混和, 12000 r/min 离心 30 s, 弃去上清, 用残留的液体重新悬浮细菌沉淀块, 将混合菌

液均匀涂布于含有不同种类无机盐的 2CM 或 F3 培养基的平板 (ϕ = 9 cm), 于 30 °C 培养 16 - 20 h, 用含有 TMP 和阿泊拉霉素的 1 mL 水溶液均匀覆盖平板表面, 至两种抗生素终浓度分别为 50 mg/L。接合转移阴性对照只涂布同样数量链霉菌孢子, 其它处理完全相同。将平板继续置于 30 °C 培养 2 - 10 d, 观察接合转移子, 并计数。

1.4 供体菌和阿维链霉菌 NRRL8165 孢子计数

利用稀释涂平板法计数得到菌体的菌落形成单位 (cfu), 具体方法见文献^[10]。

1.5 接合转移频率计算

根据链霉菌遗传操作手册, 接合转移频率 = 接合转移子数目/受体菌落形成单位 (cfu)^[1]。

1.6 接合转移子验证

挑选接合转移子到含阿泊拉霉素和 TMP 的 F3 培养基上培养, 初步验证它们对阿泊拉霉素具有抗性。生长 5 d 后, 将菌丝体转接到含有阿泊拉霉素和 TMP 的液体培养基 YEME 中培养 36 - 48 h, 收集菌丝体, 抽提总 DNA 作为模板, 扩增 pMM1 携带的 *act II-orf4* (0.8 kb) 片段。以野生型菌株的总 DNA 为阴性对照。 *act II-orf4* 扩增引物为 pHind III: CAAGCTTCTACACGAGCACCTTCTC 和 pNcoI: CCCATGGGATTCAACTTATTGGGACGT。PCR 反应条件为: 95 °C, 5 min; 95 °C, 30 s; 55 °C, 50 s; 72 °C, 1 min; 30 个循环; 72 °C, 10 min。

2 结果和分析

2.1 F3 上添加不同无机盐对大肠杆菌-链霉菌接合转移频率的影响

采用 F3 为接合转移培养基, 分别添加不同浓度的 MgCl₂、NaCl、Ca(NO₃)₂ 和 CaCl₂, 每个浓度 3 个平板, 即 3 个重复。每个接合转移使用的链霉菌孢子数目为 1.88 × 10⁷ cfu, 大肠杆菌细胞数目为 1.27 × 10⁷ cfu, 供受比为 0.68。接合转移平板覆盖抗生素后继续培养, 第 3 - 5 天观察接合转移子。观察结果如下: 阴性对照没有长出菌落; 不额外添加无机盐的 12 个平板中, 只有两个分别生长出 3 个抗性菌落; 额外添加 4 种无机盐的平板分别长出数目不同的阿泊拉霉素抗性接合转移子。根据接合转移子数计算得到接合转移频率 (表 1), 从表 1 中可以看出, 4 种盐对接合转移频率都有极显著影响 ($P < 0.01$)。添加 20 mmol/L MgCl₂ 显著提高接合转移效率, 与文献一致^[11], 以此条件作为接合转移的常

规条件对照。与常规条件相比, CaCl_2 的提高作用最显著, 添加浓度为 120 mmol/L 时接合转移频率最高, 提高 6.8 倍, 达到 4.48×10^{-6} 接合子/cfu; 浓度在 80 - 180 mmol/L 之间时, 接合转移频率均 $> 3 \times$

10^{-6} 接合子/cfu, 提高 4.5 倍以上。其次为 MgCl_2 , 在浓度为 40、60、80 和 120 mmol/L 时每个平板上都有近 30 个接合转移子, 接合转移频率 $> 1.17 \times 10^{-6}$ 接合子/cfu, 是常规条件的近 2 倍。

表 1 F3 上不同无机盐对大肠杆菌-链霉菌接合转移频率的影响

Table 1 Effects of different salt in the F3 medium on the *E. coli-Streptomyces* conjugation efficiency

Concentration of salt/(mmol/L)	<i>E. coli-Streptomyces</i> conjugation frequency on F3 medium supplemented with different Salt/($\times 10^{-6}$ /cfu) [*]			
	MgCl_2	NaCl	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	CaCl_2
0	0.07 (0.07)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
20	0.66 (0.12)	0.01 (0.02)	0.85 (0.24)	1.33 (0.32)
40	1.12 (0.22)	0.04 (0.04)	0.90 (0.27)	2.07 (0.14)
60	1.11 (0.06)	0.16 (0.10)	0.68 (0.25)	2.32 (0.20)
80	1.04 (0.18)	0.18 (0.05)	0.75 (0.16)	3.25 (0.22)
100	0.60 (0.12)	0.13 (0.06)	0.48 (0.10)	3.88 (0.60)
120	0.77 (0.14)	0.27 (0.07)	0.31 (0.14)	4.48 (0.11)
140	1.17 (0.10)	0.82 (0.26)	0.27 (0.17)	3.72 (0.61)
160	0.30 (0.16)	0.87 (0.52)	ND	3.35 (0.78)
180	0.78 (0.07)	0.40 (0.04)	ND	3.80 (0.51)
200	0.26 (0.06)	0.56 (0.16)	ND	ND

* Numerical values in parentheses are standard deviation. ND = no data.

2.2 2CM 上添加不同无机盐对大肠杆菌-链霉菌接合转移频率的影响

用 2CM 为接合转移培养基, 分别添加不同浓度的 MgCl_2 、NaCl、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 CaCl_2 和 MnCl_2 , 每个浓度做 3 个重复。每个接合转移使用的链霉菌孢子数目为 2.56×10^7 cfu, 大肠杆菌细胞数为 5.17×10^7 cfu, 供受比为 2.02。接合转移平板覆盖抗生素后继续培养, 第 3 - 5 天观察接合转移子, 结果如下: 阴性对照没有长出菌落; 2CM 平板上接合转移效率较高, 不额外添加无机盐的大部分平板都能长出约 20 个抗性菌落; 额外添加 MgCl_2 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 CaCl_2 能使接合转移子数增加 2 倍以上 ($P < 0.01$); 添加

NaCl 增加 1 倍以上 ($P < 0.05$); 添加 MnCl_2 反而严重抑制接合转移。根据接合转移子数计算得接合转移频率(表 2), 从表 2 中可以看出, CaCl_2 的作用最显著, 添加浓度为 100 mmol/L、120 mmol/L 时接合转移频率最高, 大于 8×10^{-6} 接合子/cfu; 其次为 MgCl_2 , 在浓度为 40、60 和 80 mmol/L 时接合转移频率接近或超过 5×10^{-6} 接合子/cfu; 添加 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 浓度为 40 和 80 mmol/L 时, 频率也接近或超过 5×10^{-6} 接合子/cfu。与添加 20 mmol/L MgCl_2 的常规接合转移条件相比, 添加 100 mmol/L CaCl_2 使效率提高 2.7 倍, 添加 40 mmol/L MgCl_2 使效率提高 1.7 倍。

表 2 2CM 上添加不同无机盐对大肠杆菌-链霉菌接合转移频率的影响

Table 2 Effects of different salt in the 2CM medium on the *E. coli-Streptomyces* conjugation efficiency

Concentration of salt/(mmol/L)	<i>E. coli-Streptomyces</i> conjugation frequency on 2CM medium supplemented with different salt/($\times 10^{-6}$ /cfu) [*]				
	MgCl_2	NaCl	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	CaCl_2	MnCl_2
0	1.08 (0.03)	1.38 (0.35)	1.29 (0.77)	0.59 (0.32)	1.17 (0.35)
20	3.26 (0.92)	2.45 (0.33)	5.11 (0.37)	3.88 (0.92)	0.01 (0.11)
40	5.62 (0.66)	2.85 (0.56)	4.32 (0.85)	3.79 (0.75)	0 (0)
60	4.77 (0.45)	2.59 (0.40)	4.89 (0.21)	7.52 (1.26)	0 (0)
80	5.09 (0.17)	2.55 (0.14)	3.19 (0.42)	6.06 (1.02)	0 (0)
100	3.79 (0.55)	2.52 (0.35)	2.78 (0.40)	8.65 (1.46)	0 (0)
120	4.01 (0.44)	2.55 (0.59)	1.09 (0.63)	8.19 (1.74)	0 (0)
140	4.38 (0.31)	2.14 (0.75)	ND	7.53 (1.72)	0 (0)
160	2.62 (0.59)	2.43 (0.53)	ND	7.28 (1.20)	0 (0)
180	2.57 (0.60)	2.27 (0.62)	ND	ND	0 (0)
200	1.17 (0.32)	ND	ND	ND	0 (0)

* Numerical values in parentheses are standard deviation. ND = no data.

2.3 完全随机实验寻找优势组合

从上述实验中观察到 CaCl_2 、 MgCl_2 对 2 种接合转移培养基上的接合转移频率均具有极显著影响, 因此设计完全随机实验以期寻找到优势组合。对 CaCl_2 选取浓度为 0、60、80、100 mmol/L; 对 MgCl_2 选取浓度为 0、40、60、80 mmol/L; 每个组合 3 个平板, 即 3 个平行重复进行试验。组合表及接合转移结果如表 3 所示, 实验中供体细胞大肠杆菌数目为 0.9×10^6 cfu, 受体细胞链霉菌孢子数目为 9.45×10^8 cfu, 供受比为 0.95×10^{-3} 。从表中实验看出, 不同组合的接合转移效率区别显著, 其中最高组为 60 mmol/L CaCl_2 和 60 mmol/L MgCl_2 , 其效率分别是添加单一组份 MgCl_2 40 mmol/L、60 mmol/L 和 80 mmol/L 试验组的 6 倍、11 倍和 9 倍 ($P < 0.01$), 是单一组份 CaCl_2 60 mmol/L、80 mmol/L 和 100 mmol/L 试验组的 3 倍、2 倍和 1.7 倍 ($P < 0.05$)。

表 3 不同浓度 CaCl_2 、 MgCl_2 组合对接合转移效率的影响

Table 3 Effects of combinations of different concentration of CaCl_2 , MgCl_2 on the conjugation frequency			
Group	CaCl_2 / (mmol/L)	MgCl_2 / (mmol/L)	Conjugation Frequency / ($\times 10^{-7}$ / cfu) *
1	0	0	0 (0)
2	0	40	2.89 (0.68)
3	0	60	1.55 (0.32)
4	0	80	1.83 (0.49)
5	60	0	5.29 (1.48)
6	60	40	9.66 (0.95)
7	60	60	17.35 (3.92)
8	60	80	6.98 (0.73)
9	80	0	7.83 (2.24)
10	80	40	10.09 (0.88)
11	80	60	9.31 (1.53)
12	80	80	10.44 (1.53)
13	100	0	10.17 (0.99)
14	100	40	4.15 (1.10)
15	100	60	3.53 (0.61)
16	100	80	0 (0)

* Numerical values in parentheses are standard deviation.

2.4 放线紫红素在阿维链霉菌的异源表达

随机挑选 6 个接合转移子, 抽提总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 都扩增出预期大小的阳性信号 (图 1), 表明 pMM1 接合转移到链霉菌中。

在上述各种接合转移平板上观察放线紫红素在阿维链霉菌的异源表达。2CM 平板上均没有观察到明显的放线紫红素表达。在 F3 接合转移平板上放线紫红素的表达有两种情况: (1) 在大多数 F3 接

合转移平板上, 只有约 1% 的菌落能看到浅蓝色的色素产生, 这些产色菌落在滴加微量醋酸后蓝色变成红色, 可能是表达了放线紫红素; 其余绝大多数菌落没有表达。(2) 然而, 在添加 80 和 100 mmol/L CaCl_2 的 F3 的培养基上, 大多数接合子都表达出蓝色的放线紫红素, 其中部分菌落产生较多色素, 表达量明显高于其它菌落; 一些抗生素分泌出来使培养基呈浅蓝色 (图 2)。

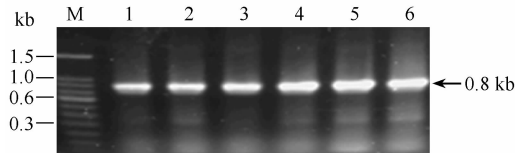


图 1 接合转移子的 PCR 验证

Fig. 1 Confirmation of selected transconjugants by PCR.

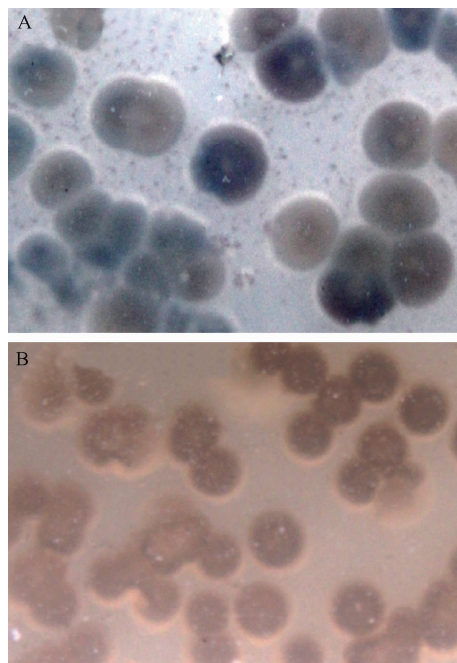


图 2 放线紫红素在阿维链霉菌中的表达

Fig. 2 Expression of actinorhodin in *S. avermectilis*. A: NRRL8165::pMM1; B: NRRL8165::pSET152.

但是, 将来自 2CM 和 F3 培养基的接合子转接到 ISP2、ISP4、放线紫红素发酵培养基 R2YE 以及阿维菌素发酵培养基 1, 2 上培养, 观察产色素情况, 均未观察到明显的放线紫红素表达。只有在含 80 - 100 mmol/L CaCl_2 的 F3 上可以观察到明显的表达。作为阳性对照, 放线紫红素的天然产生菌天蓝色链霉菌在上述培养基上都能大量合成放线紫红素。

3 讨论

链霉菌体内遗传操作的手段有接合转移、电转化和原生质体转化等。电转化和原生质体转化条件激烈,对细胞伤害大,使链霉菌基因组很容易发生突变;大肠杆菌-链霉菌双亲本接合转移条件温和,不易产生突变,逐渐成为最常采用的手段。不同的链霉菌接合转移效率不一样,有高有低。影响接合转移效率的因素有很多,如供体菌、受体菌、供受体菌比例、质粒大小以及接合转移培养基等,培养基中补加 $MgCl_2$ 能够显著提高接合转移效率^[11]。本研究发现,补加 $CaCl_2$ 能极显著提高接合转移效率,其作用甚至比 $MgCl_2$ 好;将 $CaCl_2$ 、 $MgCl_2$ 进行组合效果最佳。另外,在添加浓度为 20 - 100 mmol/L 时,还观察到 $CaCl_2$ 对链霉菌生长和产孢都有轻微的促进作用,菌落变大且产孢更好;在添加 $MgCl_2$ 或 $CaCl_2$ ≥ 120 mmol/L 时,链霉菌生长受到一定程度的抑制,体现为菌落变得很小。因此,在不同链霉菌中应用本研究结果时,需要注意。

由于次级代谢基因簇一般包含十几个到几十个基因,携带完整基因簇的质粒比载体质粒大得多,其接合转移效率急剧降低。如本研究中用到的 pMM1 比 pSET152 的接合转移效率低 10 - 100 倍,常常只得到少数的接合转移子。在各种培养基上观察到不表达放线紫红素的情况下,我们很难判断是由于培养基不合适,还是由于这少数的接合子中 pMM1 携带的基因簇没有完整进入宿主、或是发生了变异所导致。优化条件后,每个平板上有几百个接合子,而且在含 80、100 mmol/L $CaCl_2$ 的 F3 培养基上绝大多数接合子均表达放线紫红素,表明基因簇的所有必需基因都进入到宿主菌,也暗示在其它条件下不表达是培养基不合适所导致的。至于阿维链霉菌需要在含高浓度 $CaCl_2$ 的 F3 培养基中才表达放线紫红素,在阿维菌素发酵培养基 1,2 和放线紫红素发酵培养基 (R2YE) 均不能表达,表明其生物合成在原始产生菌和异源宿主中受到很不同的调控,其机理尚需要深入研究才能阐明。

参考文献

- [1] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, United Kingdom: The John Innes Foundation, 2000.
- [2] Ute G, Shen B. Expression of biosynthetic gene clusters in heterologous hosts for natural product production and combinatorial biosynthesis. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2006, 1: 409-437.
- [3] Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 2003, 21:526-531.
- [4] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [5] H Ikeda, H Kotaki, H Tanaka, S Omura. Involvement of glucose catabolism in avermectin production by *Streptomyces avermitilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1988, 32:282-284.
- [6] 张和春,季文明,王武.天蓝色链霉菌产蓝色素的工业化培养基优化.无锡轻工大学学报 (*Journal of Wuxi University of Light Industry*), 2002, 19(2):138-141.
- [7] 袁丽蓉.抗生素 (*Antibiotics*), 1983, 8:380-387.
- [8] Song Y, Cao GM, Chen Z, Li JL. Selection of high avermectins producing strain and identification of avermectin B1. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2000, 16(1):31-35.
- [9] Flett F, Mersinias V, Smith CP. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *Federation of European Microbiological Societies. FEMS Microbiology Letters*, 1997, 155(2):223-239.
- [10] 赵斌,何绍江.微生物学实验.第二版.北京:科学出版社, 2002, 69-73.
- [11] Choi SU, Lee CK, Hwang YI, Kinoshita H, Nihira T. Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B 1 producer. *Archives of Microbiology*, 2004, 181: 294 - 298.

Effect of inorganic salts on the conjugation and heterologous expression of actinorhodin in *Streptomyces avermitilis*

Jiaojiao Yu¹, Meifeng Tao^{1,2*}

(¹ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(² Laboratory of Microbial Metabolism and School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: [**Objective**] *Streptomyces avermitilis* NRRL8165 could serve as a good host for heterologous expression of antibiotics biosynthetic gene clusters. However, it needs to improve its conjugation frequency to accept large plasmids.

[**Methods**] We chose MgCl₂, NaCl, Ca(NO₃)₂ and CaCl₂, to test whether they affected the conjugation frequency of large plasmids at salt concentration from 0 - 200 mmol/L. A complete random experiment was designed for optimization.

[**Results**] We found that CaCl₂ promoted conjugation dramatically, and MgCl₂ did significantly too. The complete random experiment led to disclosure of an optimal combination of MgCl₂ and CaCl₂ by which the conjugation frequency was improved by 11 fold. In addition, a supplemented medium was found to lead to successful heterologous expression of actinorhodin in *S. avermitilis*. [**Conclusion**] Some inorganic salts can not only significantly improve the conjugation frequency of *Streptomyces avermitilis* NRRL8165 but also promote the expression of actinorhodin in *Streptomyces avermitilis* NRRL8165.

Keywords: *Streptomyces avermitilis*; conjugation; heterologous expression; actinorhodin

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870073)

* Corresponding author. Tel: +86-21-62933765-2051; Fax: +86-21-62932418; E-mail: tao_meifeng@sjtu.edu.cn

Received: 7 April 2010/Revised: 16 May 2010

科学出版社书讯(2010-9)

微生物资源学(第二版)

研究生创新教育系列丛书

徐丽华 娄恺 张华 等著

978-7-03-029002-1 ¥88.00 2010年9月出版

内容简介:微生物资源学是研究微生物资源的种类和分布、微生物资源与环境的关系、微生物资源合理开发利用的战略和策略、微生物资源有效保护的措施等的科学。本书在第一版的基础上,汇集了最近十多年国内外本领域的新进展、新思想、新技术、新成就,其内容更加丰富。

本书可供微生物学及相关学科的研究人员,大专院校教师、学生、研究生及工程技术人员和管理人员学习参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目