

小单孢菌 40027 菌株质粒 pJTU112 复制区的克隆与序列特性

耿旭梅, 陈鑫, 杨晓潼, 郭佳, 翟贵发, 李晓华*

中南民族大学生命科学院, 生物技术国家民委重点实验室, 武汉 430074

摘要: 福堤霉素 A 产生菌——小单孢菌 40027 菌株含有两个质粒 pJTU101 和 pJTU112。【目的】对质粒 pJTU112 复制区进行克隆, 并对质粒 pJTU112 复制区序列进行测定和分析。【方法】克隆质粒 pJTU112 的不同 DNA 片段导入消除质粒的小单孢菌 40027 菌株, 通过复制功能的测定, 确定质粒 pJTU112 的复制区, 并进行测序和生物信息学分析。【结果】质粒 pJTU112 的复制区定位在约 4.7 kb 的 *SacI-KpnI* DNA 片段上, 测序和生物信息学分析表明: 4.7 kb 的 *SacI-KpnI* DNA 片段包含 5 个 ORFs (open reading frames), 其中 pJTU112.1 和 pJTU112.2 与质粒接合转移有关, pJTU112.3、pJTU112.4 和 pJTU112.5 与质粒复制有关。【结论】质粒 pJTU112 的复制区定位在约 4.7 kb 的 *SacI-KpnI* DNA 片段上。

关键词: 小单孢菌 40027 菌株, 质粒 pJTU112, 复制区, 克隆

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013)06-0623-05

小单孢菌属于放线菌目, 是小单孢菌科中的一个属。小单孢菌产生了 740 多种生物活性物质, 小单孢菌不仅能产生多种多样的抗生素, 包括氨基糖苷类、大环内脂类等^[1-2], 而且能产生具有独特化学结构的生物活性物质, 对肿瘤细胞有靶向识别作用, 并能有效的杀死肿瘤细胞。其中最引人注目的是从陆地或海洋小单孢菌中分离到的烯二炔类抗肿瘤抗生素, 是迄今发现的活性最强的一类抗肿瘤抗生素^[3]。然而关于小单孢菌的质粒研究还很少, 谭华荣等人从庆大霉素产生菌——棘孢小单孢菌降红变种 AS4890 中分离到一个 6.8 kb 的质粒 pME1^[4], Hasegawa 从小单孢菌中分离了 2 个质粒^[5], Thomas 从小单孢菌中分离到质粒 pMR2^[6], Natasa 从小单

孢菌中分离到质粒 pMZ1^[7]。

小单孢菌 40027 菌株^[8]由上海医药工业研究院从云南省的土壤中分离得到, 是氨基糖苷类抗生素福堤霉素 A 的产生菌。本文以小单孢菌 40027 菌株为研究对象, 分离小单孢菌 40027 菌株内源质粒, 并对质粒复制区进行克隆、测序和分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本实验所用菌株和质粒见表 1。

基金项目: 国家自然科学基金(31070087, 30570046); 湖北省自然科学基金重点项目(2011CDA079, 2008CDB076); 国家大学生创新创业训练项目(GCX12012)

* 通信作者。Tel: +86-27-67843541; Fax: +86-27-67842689; E-mail: lixiaohua@mail.scuec.edu.cn.

作者简介: 耿旭梅(1986-), 女, 内蒙古通辽人, 硕士研究生, 主要从事分子微生物学研究。E-mail: gengxumei@163.com

收稿日期: 2012-11-15; **修回日期:** 2013-01-09

表 1. 菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Characteristics	Source or reference
<i>Micromonospora</i> sp. 40027	Wild type	[8]
<i>Micromonospora</i> sp. LXH20	40027 cured of both free and integrated pJTU112	[8]
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>recA supE44 hsdR17</i>	[9]
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>dam dcm hsdS Cml^R Str^R Tet^R Km^R</i>	[10]
pJTU112	A plasmid in <i>Micromonospora</i> sp. 40027	This work
pHZ199	<i>rep^{pucc} oriT bla tsr hyg</i>	Z. Hu, unpublished data
pOJ260	<i>rep^{pucc} oriT bla acc(3) IV</i>	[11]
pJTU111	A 6.0 kb <i>SacI</i> fragment of pHZ199 inserted into <i>SacI</i> site of pJTU112	This work
pJTU113	A 12.7 kb <i>BamHI</i> fragment of pJTU112 inserted into <i>BamHI</i> site of pOJ260	This work
pJTU116	A 11.5 kb <i>PvuII</i> fragment of pJTU112 inserted into <i>EcoRV</i> site of pOJ260	This work
pSCU206	A 4.7 kb <i>SacI-KpnI</i> fragment of pJTU112 cloned in pIJ2925 (<i>SacI-KpnI</i>)	This work
pSCU207	A 4.7 kb <i>BglII</i> fragment of pSCU206 inserted into <i>BamHI</i> site of pOJ260	This work

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶、Lambda/*Hind* III、氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素均购自大连 TaKaRa 公司;阿泊拉霉素和硫链丝菌素购自美国 Sigma 公司;蛋白胨、酵母粉、葡萄糖、NaCl、甘露醇等均购于上海国药集团。

1.1.3 培养基和培养条件: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 使用 LB 培养基,于 37℃ 培养。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],于 30℃ 培养。

1.2 质粒 DNA 的分离和纯化

大肠杆菌质粒的分离参照文献 [12] 的方法,小单孢菌质粒的分离参照文献 [13] 的方法。酶切后的 DNA 使用 DNA Gel Extraction Kit 回收纯化。

1.3 重组质粒的转化

重组质粒的构建参照文献 [12] 的方法。大肠杆菌的常规转化采用氯化钙法,小单孢菌采用接合转移法。

1.4 序列测定和分析

DNA 序列测定由大连 TaKaRa 公司完成,DNA 开放阅读框分析程序为“FramePlot 4.0”(http://nocardia.nih.gov/jp/fp4/),序列比对和分析程序为(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)。

2 结果和分析

2.1 小单孢菌 40027 菌株质粒的分离

提取小单孢菌 40027 菌株的总 DNA,检测到 2 个质粒(图 1),分别命名为 pJTU101 和 pJTU112,质粒 pJTU112 为 13.7 kb。对染色体 DNA 与质粒

pJTU112 DNA 带进行积分计算,初步确定质粒 pJTU112 拷贝数为 1-2,在小单孢菌 40027 菌株液体培养的后期,加入 5 μ g/mL 链霉素,与未加链霉素比较,发现质粒 pJTU112 DNA 的量增加了 5-7 倍(图 1)。

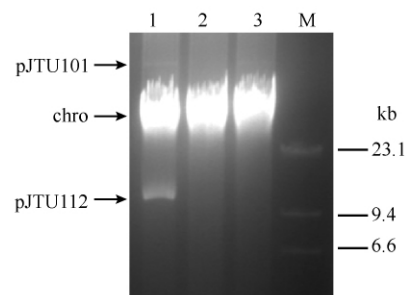


图 1. 小单孢菌 40027 菌株的总 DNA

Figure 1. Total DNA of *Micromonospora* sp. 40027. Lane 1 (addition of streptomycin) gave a thicker band of pJTU112 DNA than lane 3 (no addition of streptomycin). No band corresponding to the position of pJTU112 in lane 2 (plasmid had been cured) can be seen. Lane M gave the λ DNA/*Hind* III molecular weight marker.

2.2 质粒 pJTU112 复制区的克隆

为了克隆质粒 pJTU112 复制区,将质粒 pJTU112 不同 DNA 片段克隆到 pHZ199 或 pOJ260,构建了不同质粒(表 1),转入消除质粒的小单孢菌 LXH20 菌株,结果如图 2 所示:包含 1.4kb *BamHI* DNA 片段的质粒(如: pJTU111、pJTU116 和 pSCU207),转入消除质粒的小单孢菌 LXH20 菌株,获得硫链丝菌素或阿泊拉霉素抗性接合转移子,并从接合转移子中分离到相应质粒。而不含 1.4 kb *BamHI* DNA 的片段的质粒(如: pJTU113),转入消

除质粒的小单孢菌 LXH20 菌株, 未获得阿泊拉霉素抗性接合转移子。表明 1.4 kb *Bam*HI DNA 片段为质粒 pJTU112 复制必需区。质粒 pSCU207 能在消

除质粒的小单孢菌 LXH20 菌株中复制, 表明质粒 pJTU112 复制区定位在约 4.7 kb 的 *Sac*I-*Kpn*I DNA 片段上。

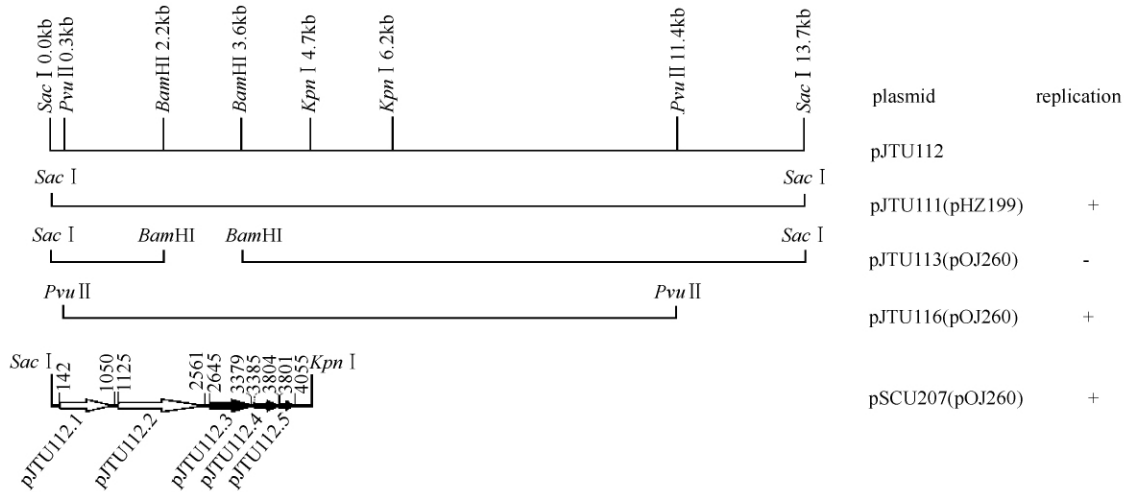


图 2. 质粒 pJTU112 复制区的定位

Figure 2. Identification of the pJTU112 replication region. Plasmids were constructed in *E. coli* and introduced by conjugation into *Micromonospora* sp. LXH20. A map of pJTU112 along with relevant restriction sites (positions in kb are indicated) is shown at the top. A solid line represents each pJTU112 DNA fragment present in various plasmids. On the right, the pJTU112 deletion derivatives and their replication properties are indicated. Five ORFs in the 4.7kb *Sac*I-*Kpn*I DNA fragment were indicated by arrows, while replication region was shown by solid arrows.

2.3 质粒 pJTU112 复制区的序列分析

对质粒 pJTU112 复制区 *Sac*I-*Kpn*I DNA 片段进行序列测定, 测定结果表明: 质粒 pJTU112 复制区 *Sac*I-*Kpn*I DNA 片段长度为 4727 bp, GC% 含量为 74.1%, 具有放线菌 DNA 高 GC% 含量的特点。经 FramePlot4.0beta 程序分析发现该 DNA 片段包含 5 个编码框(表 2), 分别编码 302 个、478 个、244 个、139 个和 84 个氨基酸组成的蛋白质。氨基酸序列分析表明: pJTU112. 1 (302aa) 和 pJTU112. 2 (478aa) 与 Cell division protein FtsK/SpoIIE 相似, 在放线菌中, 质粒编码的含有 FtsK/SpoIIE 结构域的蛋白常常是接合转移的主要蛋白^[14], 暗示 pJTU112. 1 (302aa) 和 pJTU112. 2 (478aa) 与质粒 pJTU112 接合转移功能相关; pJTU112. 4 (139aa) 功能未知;

pJTU112. 3 (244aa) 和 pJTU112. 5 (84aa) 分别仅与疣孢菌 AB-18-032 菌株 pVMKU 质粒编码的假定蛋白相似^[15]。进一步对 pJTU112. 3 和 pJTU112. 5 进行核苷酸序列分析发现: pJTU112. 3 核苷酸序列与疣孢菌 AB-18-032 菌株 pVMKU 质粒中 DNA 片段 (12948-13679bp) 序列相似 (期望值为 0, 相似性为 83% [605/732])^[12], pJTU112. 5 核苷酸序列与疣孢菌 AB-18-032 菌株 pVMKU 质粒中另一个 DNA 片段 (12670-12916bp) 序列相似 (期望值为 3×10^{-66} , 相似性为 84% [208/248])^[15]。pJTU112. 5 下游有一段 473bp 非编码区序列, 该区域富含 AT (GC% 含量仅为 62%, 低于平均 GC% 含量 74%)。综上分析, 推测 pJTU112. 3、pJTU112. 4 和 pJTU112. 5 可能与质粒复制有关。

表 2. 质粒 pJTU112 *Sac*I-*Kpn*I DNA 片段编码的 ORFs

Table 2. Predicted open reading frames (ORFs) of *Sac*I-*Kpn*I DNA fragment of plasmid pJTU112

ORFs	Position/bp	Size/aa	3rd-letter GC%	E value	Functions/Homology
pJTU112. 1	142 - 1050	302	91.1%	8×10^{-9}	Cell division protein ftsK/spoIIE (<i>Propionibacterium acnes</i> SK137)
pJTU112. 2	1125 - 2561	478	97.3%	0.0	Cell division protein ftsK/spoIIE (<i>Micromonospora</i> sp. ATCC 39149)
pJTU112. 3	2645 - 3379	244	95.1%	5×10^{-110}	Hypothetical protein VAB18032_30149 (<i>Verrucosipora maris</i> AB-18-032)
pJTU112. 4	3385 - 3804	139	95.7%		Unknown
pJTU112. 5	3801 - 4055	84	98.8%	2×10^{-38}	Hypothetical protein VAB18032_30144 (<i>Verrucosipora maris</i> AB-18-032)

2.4 重组质粒的稳定性检测

为了检测质粒 pJTU111、pJTU116 和 pSCU207 在小单孢菌 LXH20 菌株中的稳定性,将含有质粒 pJTU111、pJTU116 和 pSCU207 的小单孢菌 LXH20 菌株分别接种在没有加抗生素的贝奈特培养基上生长,产孢后,转接到新的不含抗生素的贝奈特培养基上生长,这样连续转接 5 次后,挑取 200 个单菌落分别转接到含有抗生素和不含抗生素的贝奈特培养基上,没有发现抗性消失的菌落。表明质粒 pJTU111、pJTU116 和 pSCU207 在小单孢菌 LXH20 菌株中可稳定遗传。

3 讨论

福堤霉素 A 产生菌——小单孢菌 40027 菌株含有两个质粒 pJTU101 和 pJTU112。本研究通过克隆质粒 pJTU112 的不同 DNA 片段导入消除质粒的小单孢菌 40027 菌株,将质粒 pJTU112 的复制区定位在约 4.7 kb 的 *SacI-KpnI* DNA 片段上,测序和生物信息学分析结果表明:4.7 kb 的 *SacI-KpnI* DNA 片段编码 5 个 ORFs,其中 pJTU112.1 和 pJTU112.2 与质粒接合转移有关,pJTU112.3、pJTU112.4 和 pJTU112.5 与质粒复制有关。

序列分析结果显示,pJTU112.3 和 pJTU112.5 仅仅与疣孢菌 AB-18-032 菌株 pVMKU 质粒中 DNA 片段相似^[15],但这些 DNA 片段功能尚未阐明,暗示小单孢菌 40027 菌株 pJTU112 质粒与疣孢菌 AB-18-032 菌株 pVMKU 质粒可能存在相似复制蛋白,但不同于其它微生物。

小单孢菌 40027 菌株 pJTU112 质粒具有自主复制、接合转移和整合功能^[8],在放线菌中,质粒编码的含有 FtsK/SpoIIE 结构域的蛋白常常是接合转移的主要蛋白^[14],pJTU112.1 和 pJTU112.2 与 Cell division protein FtsK/SpoIIE 相似,暗示 pJTU112.1 和 pJTU112.2 与质粒 pJTU112 接合转移功能相关。

参考文献

- [1] Wagman GH, Weinstein MJ. Antibiotic from *Micromonospora*. *Annual Review of Microbiology*, 1980, 34:537-557.
- [2] Sakai A, Mitsumori A, Furukawa M, Kinoshita K, Anzai Y, Kato F. Production of a hybrid 16-membered macrolide antibiotic by genetic engineering of *Micromonospora* sp. TPMA0041. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(11):1693-701.
- [3] Cheng Y, Zheng W. *Micromonospora* spp. and their secondary bioactive metabolites. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2006, 31(6):321-327. (in Chinese) 程元荣, 郑卫. 小单孢菌及其产生的次级生物活性代谢产物. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(6):321-327.
- [4] Tan H, Huan L, Zhu Y, Zhuang Z, Xue Y. Isolation and characterization of plasmid DNA from gentamicin producer. *Journal of Genetics and Genomics*, 1985, 12(3):170-174. (in Chinese) 谭华荣, 还连栋, 祝英芳, 庄增辉, 薛禹谷. 庆大霉素产生菌质粒 DNA 的分离和鉴定. *遗传学报*, 1985, 12(3):170-174.
- [5] Hasegawa M, Dairi T, Ohta T, Hashimoto E. A novel, highly efficient gene-cloning system for *Micromonospora* strains. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(21):7004-7011.
- [6] Hosted TJ Jr, Wang T, Horan AC. Characterization of the *Micromonospora rosaria* pMR2 plasmid and development of a high G + C codon optimized integrase for site-specific integration. *Plasmid*, 2005, 54(3):249-258.
- [7] Vukov N, Vasiljevic B. Analysis of plasmid pMZ1 from *Micromonospora zionensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 162(2):317-323.
- [8] Li XH, Zhou XF, Deng ZX. Vector systems allowing efficient autonomous or integrative gene cloning in *Micromonospora* sp. Strain 40027. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6):3144-3151.
- [9] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 1983, 166(4):557-580.
- [10] MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 1992, 111(1):61-68.
- [11] 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.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3rd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [13] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich (United

- Kingdom) : John Innes Foundation, 2000.
- [14] Grohmann E, Muth G, Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67: 277-301.
- [15] Roh H, Uguru GC, Ko HJ, Kim S, Kim BY, Goodfellow M, Bull AT, Kim KH, Bibb MJ, Choi IG, Stach JE. Genome sequence of the abyssomicin- and proximycin-producing marine actinomycete *Verrucosipora maris* AB-18-032. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (13) :3391-3392.

Cloning and sequence characterization of replication region in plasmid pJTU112 from *Micromonospora* sp. 40027

Xumei Geng, Xin Chen, Xiaotong Yang, Jia Guo, Guifa Zhai, Xiaohua Li*

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

Abstract: *Micromonospora* sp. 40027, the producer of fortimicin A, harbors two plasmids pJTU101 and pJTU112.

[Objective] Cloning and sequencing of replication region of pJTU112, analyzing replication region sequence of pJTU112.

[Methods] Different fragments of pJTU112 were cloned and introduced by conjugation into *Micromonospora* sp. LXH20. The replication region of pJTU112 was identified. **[Results]** The replication region of pJTU112 was located in the 4.7 kb *SacI-KpnI* DNA fragment. DNA sequencing and analysis revealed that the 4.7 kb *SacI-KpnI* DNA fragment encoded five open reading frames. The pJTU112.1 and pJTU112.2 were related to plasmid conjugation, pJTU112.3, pJTU112.4 and pJTU112.5 were related to plasmid conjugation. **[Conclusion]** The replication region of pJTU112 was located in the 4.7kb *SacI-KpnI* DNA fragment.

Keywords: *Micromonospora* sp. 40027, plasmid pJTU112, replication region, cloning

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070087, 30570046), by the Natural Science Foundation of Hubei province (2011CDA079, 2008CDB076) and by the National College Students Innovative Entrepreneurial Training Program (GCX12012)

* Corresponding author. Tel: +86-27-67843541; Tax: +86-27-67842689; E-mail: lixiaohua@mail.scuec.edu.cn

Received: 15 November 2012/Revised:9 January 2013