

链霉菌工业菌种 HS007 的基因组标记

黄隽, 王海彬*, 罗家立, 白骅

(浙江海正集团技术中心, 台州 318000)

摘要: 通过小片段基因组文库的构建获得工业生产菌 HS007 的若干基因组片段, 并以大肠杆菌—链霉菌穿梭质粒 pHJL400 为载体, 构建了 5 个插入了特异性标记序列及抗性筛选标记的重组质粒 pHJL02AFOH, pHJL07AFOH, pHJL08AFOH, pHJL10AFOH 和 pHJL12AFOH。利用这些质粒转化工业生产菌株 HS007, 获得具有特异性标记序列和相应抗性的标记菌株 02-72, 07-44, 08-02, 10-81 和 12-58, 其中 02-72 和 12-58 的生产能力不受插入片段的影响。利用重组质粒 pSP02AFOH 上抗性标记两端两个 FRT 序列的分子内重组去除抗性标记, 并以大肠杆菌—链霉菌穿梭质粒 pGH112 替换该质粒的载体部分, 得到重组质粒 pGH02FH。以 pGH02FH 转化标记菌株 02-72, 获得具有特异性标记序列而没有相应抗性的菌株 02-72-36。发酵结果表明, 标记片段的插入不影响菌株 02-72-36 的生产能力。本方法建立了链霉菌工业菌种基因组标记的技术平台。

关键词: 接合转移; 特异性标记序列; 同源重组; 生产菌种

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 02-0141-06

微生物菌种资源是制药公司用于发酵类产品生产的资源基础和命脉, 也是制药公司竞争力的重要保证, 一旦流失, 将对制药公司造成不可估量的损失。因此, 全球各大制药公司都在通过各种方法和渠道保护自己的生产菌种。基因组标记技术是通过同源重组的方法, 将一段人为设计的包含特殊信息的 DNA 序列插入到需标记菌种的染色体上稳定遗传, 并通过发酵水平的验证来筛选最终不影响菌种生产能力的不同插入位点的标记菌株。这一技术可以为菌种的产权问题提供有力的证据, 同时也为菌种的专利申请提供重要的数据。

目前世界药物市场上 67% 的抗生素是微生物的发酵产品, 常用的抗生素除青霉素和头孢霉素类外, 约 66.7% 都是放线菌的代谢产物^[1], 而这其中 87.5% 是由链霉菌属 (*Streptomyces*) 产生的^[2]。海正药业是国内最大的抗生素和抗肿瘤药物的生产基地, 而且大部分生产菌种都属于链霉菌属, 因此, 本研究欲建立

工业生产链霉菌的基因组标记技术平台, 为微生物生产菌株的产权保护提供有有效的工具。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株: 克隆载体 pSP-Sim 由质粒 pSP72 切除 *XhoI* 到 *EcoRV* 之间的多克隆位点, 仅保留一个 *BglIII* 位点, 实验室构建。质粒 pIJ773h 含有安普霉素 (Apramycin, Am) 抗性基因 *aac(3)IV*, 两个 *FLP* 重组酶的识别序列 FRT (FLP recombinase target), 接合转移起点 *oriT* 以及海正英文字母 HISUN 遗传密码标记, 由质粒 pIJ773 (Gust B *et al*, 2002) 构建而来。链霉菌—大肠杆菌穿梭质粒 pHJL400、pGH112^[3] 和大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 由中国科学院微生物研究所杨克迁研究员惠赠。温度敏感型 *FLP* 重组酶表达质粒 BT340 由实验室保存。工业生产菌 HS007 为吸水链霉菌 (*Streptomyces Hygroscopicus*), 是海正药业具有

*通讯作者。+86-576-88820587; Email: hbwang@hisunpharm.com

作者简介: 黄隽(1978-), 男, 浙江台州人, 工程师, 硕士, 从事工业生产菌种的基因改良工作。E-mail: huangj@hisunpharm.com

收稿日期: 2007-06-13; 修回日期: 2007-11-07

自主产权的菌种。

1.1.2 抗生素与培养基: 常规的大肠杆菌培养基为 LB^[4], 培养基中使用的氨苄青霉素(Ampicillin, Ap)终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 卡那霉素(Kanamycin, Km)和安普霉素(Apramycin, Am)的终浓度均为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 氯霉素(Chloramphenicol, Cm)的终浓度均为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 链霉菌固体产孢子培养基为 YMS(酵母抽提物 0.4%, 可溶性淀粉 0.4%, 麦芽抽提物 1.0%, 琼脂粉 1.8%), 培养基中使用的硫链丝菌素(Thiostrepton, Thio)、萘啶酮酸(Nalidixic acid, Nal)的终浓度均为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Am 的终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 接合转移使用 MS 培养基^[5]; 链霉菌的液体培养基为胰酶大豆肉汤(Tryptic Soy Broth, TSB)培养基, BD 公司产品。

1.1.3 主要试剂: 核酸内切酶和分子量标准购自 TaKaRa 和 Fermentas。DNA Ligation Kit, DNA Blunting Kit 和碱性磷酸酶(Bacterial Alkaline Phosphatase, BAP)购自 TaKaRa。

1.2 扩增特异性标记序列的引物设计

HSF: 5'-TGCAGTAACATATCTCCG-3' 和 HSR: 5'-TCACTATAATTCAGCGTG-3' 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 特异性标记序列——海正药业英文字母 HISUN 遗传密码标记的设计

HISUN 遗传密码标记的序列为: 5'-TGCAGTAA-CATATCTCCGTTAACTAGCCTCATGCTCGCATG-GCCTGTGAAGTCACTATTTGTGCGTTGTGATCC-ACACGCGCCATAAATTAACACGCGTGCCACGCTG-AATATAGTGA-3', 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成单链。以合成的单链为模板, 以 HSF/HSR 扩增得到双链。序列中粗体部分按“密码子表”翻译成氨基酸序列并用单字母表示即为“HISV(U)N-PHARMACEV(U)TICAL”, 即“海正药业”的英文。

1.4 HS007 小片段基因文库的构建

按文献[7]的方法提取 HS007 总 DNA, 以 *Bgl* 酶切过夜, 回收 3~7 kb 片段, 与同样经 *Bgl* 酶切并去磷酸化的质粒 pSP-Sim 连接, 连接产物转化大肠杆菌, 随机挑选转化子提质粒, 以 *Bgl* 酶切检验得到重组子。

1.5 转化方法

大肠杆菌感受态制备和转化使用 CaCl_2 法^[4]; 重组质粒到 HS007 的转化用接合转移^[3]。

1.6 FLP 重组酶介导的抗性基因的去除^[6]

将含有 FRT-*aac(3)IV*-oriT-FRT 片段的重组质粒

pHJL02AFOH 转化到大肠杆菌 DH5 α (BT340), 在含 Cm 和 Am 的 LB 平板上 30 $^\circ\text{C}$ 培养 2 天长出转化子。挑一个单菌落于无抗生素的 LB 平板上划线, 42 $^\circ\text{C}$ 培养过夜, 使质粒 BT340 表达 FLP 重组酶继而丢失。由于表达的 FLP 重组酶能使质重组质粒上的两个 FRT 序列发生分子内重组, 从而去除两个 FRT 序列之间的 DNA 片段, 因此, 将长出的单菌落分别在添加和不添加 Am 的 LB 平板上划线, 筛选 Am^s 的转化子, 即为去除了 *aac(3)IV* 和 oriT 的重组子。

1.7 摇瓶发酵及产物检测

孢子接种于种子培养基(淀粉 1.5%, 葡萄糖 1.5%, 酵母粉 0.3%, 花生饼粉 1.0%, CaCO_3 0.2%, pH 6.5~6.8), 28 $^\circ\text{C}$, 250 r/min 培养 42~48 h。以 5% 的接种量转接到发酵培养基(淀粉 4.0%, 葡萄糖 0.5%, 花生饼粉 2.0%, 酵母粉 1.0%, NaCl 0.35%, K_2HPO_4 0.5%, pH 7.2~7.5), 28 $^\circ\text{C}$, 250 r/min 培养 5~6 d。发酵液以丙酮浸泡过夜后过滤, 滤液以 HPLC 检测。HPLC 条件: 流动相为甲醇:水(85:15), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 240 nm。

2 结果

2.1 HS007 小片段基因文库的筛选

随机挑取基因文库中重组质粒 14 个, 经 *Bgl*III 酶切鉴定, 有 12 个插入了大小分别为 2.5~6 kb 的外源片段。选其中 8 个外源片段为 3.5~6 kb 的重组质粒测序, 结果有 5 个符合做下一步实验的要求, 即在外源片段的内部有一个单酶切位点, 该位点两侧的片段均不小于 1 kb, 这样有利于此后构建的重组质粒与 HS007 的基因组发生双交换。5 个重组质粒的特征见表 1。

表 1 含单一酶切位点插入片段的重组质粒的特征
Table 1 Characters of recombinant plasmids

Plasmids	Size of ISes ^{a)} /kb	Single RSes ^{b)}	Arms ^{c)} size/ kb
pSP02B	3.5	<i>Sal</i> I	1.2/2.3
pSP07B	3.7	<i>Pst</i> I	1.8/1.9
pSP08B	3.3	<i>Nor</i> I	1.5/1.8
pSP10B	5.5	<i>Xba</i> I	2.0/3.5
pSP12B	5.2	<i>Pst</i> I	2.2/3.0

a) IS: Inserted Sequence; b) RS: Restriction Site; c) arms: the two fragments of the inserted sequence flank the single restriction site

2.2 HS007 基因组中标记序列的插入

以 *Eco*RI 和 *Pst*I 从 pIJ773h 上切下含有 FRT, Am 抗性基因 *aac(3)IV*, oriT 以及 HISUN 标记的片段, 平

末端化；同时，将前面筛选到的 5 个重组质粒 pSP02B, pSP07B, pSP08B, pSP10B 和 pSP12B 分别以 *Sal*I, *Pst*I, *Not*I, *Xba*I 和 *Pst*I 酶切，去磷酸化后平末端化，与上述标记片段连接，分别得到重组质粒 pSP02AFOH, pSP07AFOH, pSP08AFOH, pSP10AFOH

和 pSP12AFOH。以 *Bgl*III 分别从上述重组质粒上切下插入片段部分，与经 *Bam*HI 酶切并去磷酸化的 pHJL400 连接，分别得到重组质粒 pHJL02AFOH, pHJL07AFOH, pHJL08AFOH, pHJL10AFOH 和 pHJL12AFOH。重组质粒的构建过程见图 1。图示

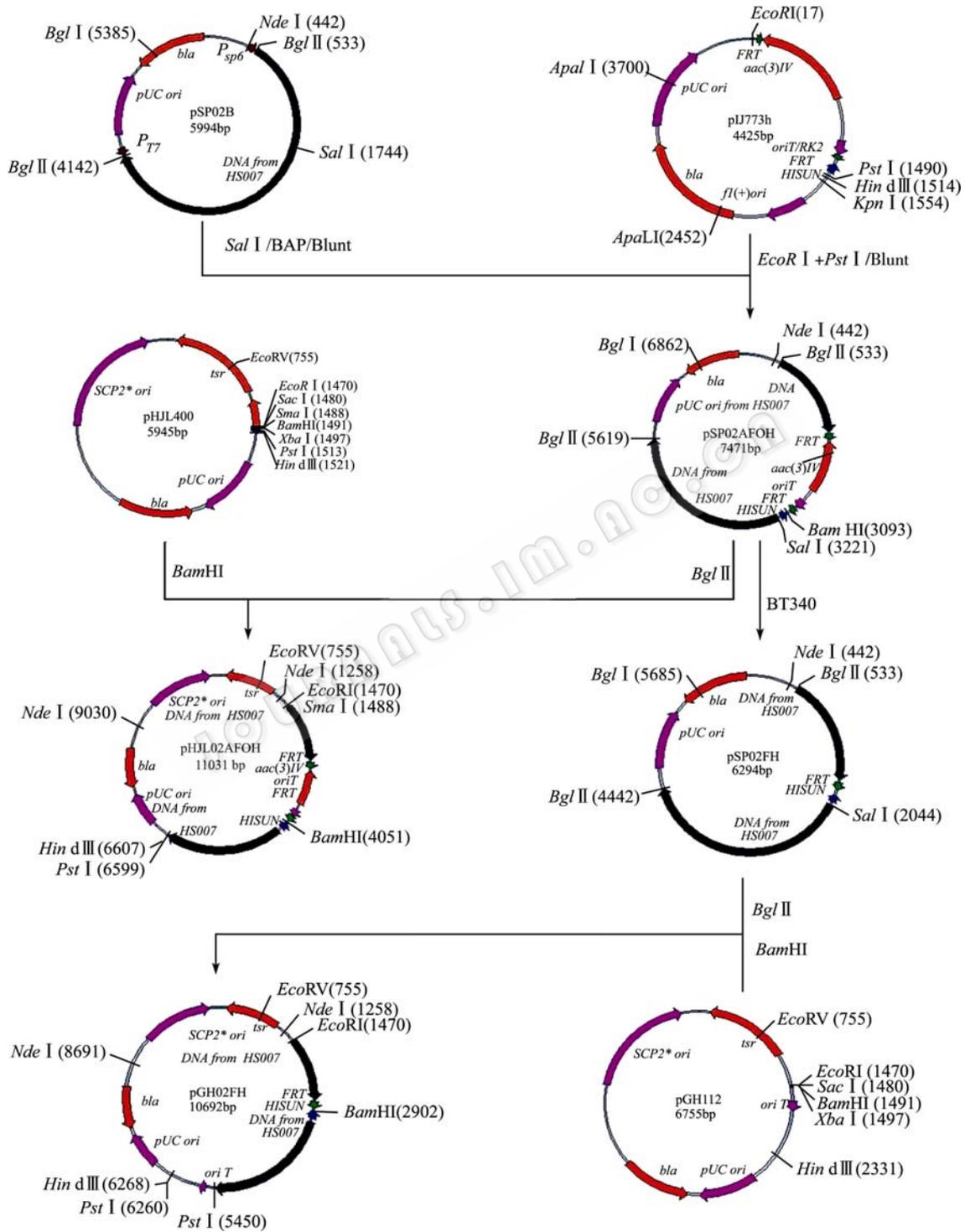


图 1 重组质粒 pHJL02AFOH 和 pGH02FH 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmids pHJL02AFOH and pGH02FH.

pHJL02AFOH 和 pGH02FH 的构建过程, 其它重组质粒的构建过程与此类同。

通过接合转移将上述重组质粒分别转化到 HS007, 筛选到的转化子在含 NaI 和 Am 的 YMS 培养基上传代 1 次, 以彻底清除大肠杆菌 ET12567, 再在无抗生素的 YMS 平板上传代 2 次, 使重组质粒与 HS007 基因组发生双交换丢失。最后分别在含 Thio 和 Am 的 YMS 平板上点种, 筛选得到 Thio^sAm^r 的双交换子 02-72, 07-44, 08-02, 10-81 和 12-58。

2.3 双交换子验证

2.3.1 PCR 验证: 将候选的双交换子单菌落于 3 mL TSB 中培养 2 天, 菌液以无菌水洗涤 2 遍后作模板, 以引物 HSF 和 HSR 扩增基因 HISUN 标记序列, 结果得到 118 bp 的目的片段(见图 2), 测序结果表明与设计 HISUN 标记序列一致。

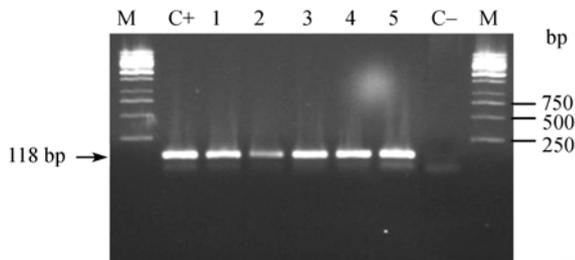


图 2 被标记菌株的菌落 PCR

Fig. 2 PCR analysis of genetically marked strains. C+: plasmid pHJL02AFOH; 1-5: Strains 02-72, 07-44, 08-02, 10-81 and 12-58, respectively; C-: Strain HS007.

2.3.2 发酵验证: 对得到的双交换重组子进行发酵, 结果见表 2。与对照菌株 HS007 相比, 用重组质粒 pHJL02AFOH 和 pHJL12AFOH 进行的标记对菌种的发酵产能基本没有影响; 用 pHJL10AFOH 进行的标记对发酵有很大程度的影响; 而用 pHJL07AFOH 和 pHJL08AFOH 进行的标记则使菌种完全丧失了产物的能力。

表 2 使用不同重组质粒获得的重组子的发酵结果

Table 2 Fermentation of insertional recombinant strains from different plasmids

Strains	Recombinant plasmids been used	Relative fermentation levels / %
02-72	pHJL02AFOH	101.1
07-44	pHJL07AFOH	0.0
08-02	pHJL08AFOH	0.0
10-81	pHJL10AFOH	20.0
12-58	pHJL12AFOH	97.8
HS007	None	100.0

2.4 标记片段中抗性基因的去除^[3]

选择重组质粒 pSP02AFOH 作进一步研究。将重组质粒 pSP02AFOH 转化到 DH5 α (BT340), 通过 FLP 重组酶介导去除 *aac(3)IV* 和 *oriT* 得到重组质粒 pSP02FH。以 *Bgl*III 切下含 HISUN 标记的外源片段连接到经 *Bam*HI 酶切的 pGH112 上, 得到重组质粒 pGH02FH。质粒构建过程如图 1。

将 pGH02FH 通过接合转移转化到菌株 02-72, 筛选具有 Thio 抗性的转化子。转化子经传代培养后使质粒丢失, 单菌落分别在含 Am 和不含 Am 的 YMS 培养基上点种, 筛选得到 6 株无 Am 抗性的菌株 02-72-14, 02-72-36, 02-72-88, 02-27-105, 02-72-142 和 02-72-159。在 pSP02B 的 *Sal*I 位点两侧相距 750 bp 处设计一对引物, 对筛选到的菌株进行 PCR 验证抗性基因的丢失。结果均得到了约 1.0 kb 的目的片段, 比对照菌株 HS007 的 PCR 产物大 250 bp 左右, 而比对照菌株 02-72 的 PCR 产物小 1.2 kb 左右, 这与预期的结果是一致的。进一步对 PCR 产物的测序结果表明, 该序列中包含与设计 HISUN 序列一致的片段。PCR 结果见图 3。

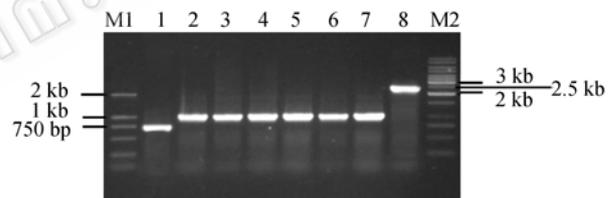


图 3 去除抗性基因标记后的被标记菌株的 PCR 验证

Fig. 3 PCR amplification of marked strains with antibiotic resistance gene removed. M1: DNA marker DL2000 (TaKaRa); M2: 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1: strain HS007; 2-7: strains 02-72-14, 02-72-36, 02-72-88, 02-27-105, 02-72-142 and 02-72-159, respectively; 8: strain 02-72.

对这些菌株进行发酵验证, 02-72-14, 02-72-36, 02-72-88, 02-27-105, 02-72-142, 02-72-159 和对照 HS007 的发酵相对水平(%)分别为: 98.0, 103.0, 95.0, 71.3, 82.2, 98.0 和 100.0。说明去除抗性基因后的标记菌种的发酵产能没有受到影响。

3 讨论

生产菌种的产权问题一直是制药企业发酵产品发展中的一个不可忽视的问题, 许多制药公司都对自己的重要菌种申请了专利保护。本实验设计了长度为 118 bp 的标记序列, 其中包含的 60 个碱基根据

“密码表”翻译成的氨基酸序列用单字符表示即为“HISUN PHARMACEUTICAL”,即“海正药业”的英文,从而能证明被标记菌种的“海正”身份。这种标记技术可以为菌种的产权问题提供有力的证据。

许多种链霉菌都具有强大的甲基化限制系统(methyl-specific restriction system),这给外源 DNA 的导入设置了一大障碍。与原生质体转化相比,接合转移的方法操作方便,而且具有更高的转化效率,并能应用于放线菌的许多属^[7]。本研究通过重组质粒转化到甲基缺陷型的大肠杆菌 ET12567 后再通过接合转移转化到宿主链霉菌,可以绕过宿主的甲基化限制系统,从而大大提高了转化的效率^[8]。

由于实验对象是生产菌种,被标记菌种的生产能力也是研究人员必须关心的问题。本实验先从提高同源重组双交换率的出发点考虑,选择由生产菌种基因组 DNA 酶切后形成长度为 3.5~6 kb,其内部具有单酶切位点且该位点两侧的片段均不小于 1 kb 的片段构建重组质粒,分别插入特异性标记序列和抗性基因。这样,由于片段选择的随机性而导致标记序列插入位点也具有随机性,就有可能使特异性标记序列插在功能基因上而影响菌株的产素能力,因而在对生产菌种进行基因组标记后,需要通过摇瓶发酵水平来评估插入位点对产素能力的影响,从而筛选不影响菌种本身生产效率的标记菌种。本实验得到的 5 个标记菌株,其特异性标记序列的插入位点各不相同。其中有 2 个标记菌株完全丧失了生产目的产物的能力,说明插入的位置可能是某个关键的合成基因;有 1 个标记菌株的生产能力大幅度降低,但并没有完全丧失,说明插入的位置可能是某个调控基因;而另有 2 个标记菌株的生产能力基本没有影响,说明插入的位置是与产物合成非相关基因。由此,实验结果中不同插入位点对产素能力的影响值对进一步研究目的产物的合成及调控途径,以及基因改造微生物菌种都具有很好的参考价值。

另外,抗性基因的组成型表达不可避免地会在发酵产物中产生了新的杂质。去除标记片段中的抗性基因一方面可以减少生产菌种产生不必要的杂质的可

能性,同时也方便对生产菌种做进一步的基因改良,更重要的是使被标记的菌种具有更高的保密性。从 pIJ773h 上切下的抗性基因-标记片段中,抗性基因和 oriT 位于两个 FRT 之间,而标记序列则位于两个 FRT 之外。BT340 表达的 FLP 重组酶特异地识别 FRT 序列,并在两个 FRT 之间发生分子内重组,导致抗性基因和 oriT 被移除,而标记序列由于位于两个 FRT 之外而得到保留。再次进行的发酵验证表明,去除了抗性基因后的标记菌株,其生产能力几乎不受影响。

本文的研究为生产菌种的分子标记提供了技术平台,同时也为生产菌种的进一步基因改造提供了有效的方法和手段。

致谢 中国科学院微生物研究所杨克迁研究员和中国科学院上海植物生理生态研究所覃重军研究员对本研究给予了指导和帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 刘志恒,姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术. 北京:科学出版社,2004.
- [2] 周德庆. 微生物学教程. 北京:高等教育出版社,1991.
- [3] 莫宏波,白林泉,王胜兰. 大肠杆菌-链霉菌高效接合载体的构建及其应用. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*). 2004, 20(5): 662-666.
- [4] Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [5] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ *et al.* *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [6] Gust B, Kieser T, Chater KF. REDIRECT Technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. Norwich: John Innes Centre. 2002.
- [7] Matsushima P, Broughton MC, Turner JR *et al.* 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.
- [8] Flett F, Mersinias V, Smith CP. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 155: 223-229.

Genome labeling of the *Streptomyces* strain HS007

Jun Huang, Haibin Wang*, Jiali Luo, Hua Bai

(Zhejiang HISUN Group, R&D center, Taizhou 318000, China)

Abstract: By construction of small fragments genome bank, several different fragments from chromosomal DNA of streptomyces production strain HS007 were cloned into cloning vector pSP-SIM. According to the sequencing results, five of them, which were 3- to 7- kb in size with single restriction sites in the middle, were cut down and re-cloned into bacteria-streptomyces shuttle vector pHJL400. Subsequently, the marker cassette, composed of special labeling sequence, oriT, 2 FLP recognition target sites and apramycin resistance gene, was inserted into the single restriction sites to create recombinant plasmids pHJL02AFOH, pHJL07AFOH, pHJL08AFOH, pHJL10AFOH and pHJL12AFOH. These recombinant plasmids were then transformed into target production strain HS007 by conjugal transfer method, and corresponding marked mutants named 02-72, 07-44, 08-02, 10-81 and 12-58 were screened. Two of these mutants, 02-72 and 12-58, did not show changes in fermentation ability, whereas the others lost partially or completely fermentation ability. The apramycin resistance gene and oriT, flanked by two FLP recognition target sites, were then removed by FLP-mediated deletion from recombinant plasmid pSP02AFOH to give pSP02F, whereas the special labeling sequence was still reserved in pSP02F because of being located out of the two FLP recognition target sites. Finally, replacement plasmid pGH02FH was constructed by replacing the vector part of pSP02F with bacteria-streptomyces shuttle vector pGH112 and transformed into mutant 02-72. By selecting apramycin sensitive colonies, marked mutant 02-72-36, whose chromosome was inserted by special labeling sequence without apramycin resistance gene, was screened. Fermentation confirmed that its production ability was not reduced. Such genome labeling technique might be used in other strains of streptomyces to protect the property marks.

Keywords: conjugal transfer; special labeling sequence; homologous recombination; production strain

*Corresponding author. Tel: +86-576-88820587; Email: hbwang@hisunpharm.com

Received: 13 June 2007/ Revised: 7 November 2007

2008年起《微生物学报》改为月刊

自2004年《微生物学报》改为大开本(8个印张128页)以来,已经连续两次扩版(2005~2006年为160页,2007年为176页),发表周期有了明显的缩短。但是,由于近年来稿量不断增长,发表周期不得不再度延长,目前的双月刊已无法满足广大作者和读者的需要。为了加快科技信息更新速度,与国际接轨,在编辑部提议下,经主办单位同意并报主管部门正式批准,本刊自2008年开始将1989年以来一直沿用了19年的双月刊改为月刊(9个印张144页),发行日还是4日。

希望广大作者和读者一如既往地支持《微生物学报》!