

大肠杆菌-链霉菌高效接合载体的构建及其应用

莫宏波¹ 白林泉² 王胜兰¹ 杨克迁^{1*}

¹(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

²(上海交通大学 Bio-X 中心,上海 200030)

摘要 以链霉菌质粒 SCP2^{*} 的衍生质粒 pHJL400 为基础,构建了能够在大肠杆菌到链霉菌之间进行高效接合转移的质粒 pGH112。pGH112 含有在大肠杆菌和链霉菌中复制起始位点,以及分别在大肠杆菌和链霉菌中进行筛选的抗性标记。用 pGH112 转化 *Escherichia coli* ET12567(pUZ8002)后,与天蓝链霉菌(*Streptomyces coelicolor* A3(2))、除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)、交铅青链霉菌(*Streptomyces lividans* TK54)、毒三素链霉菌(*Streptomyces toxytricini* NRRL15443)、委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae* ISP5230)和红色糖多孢菌(*Saccharopolypora erythraea*)进行接合,发现本文构建的 pGH112 与 pKC1139 相比,接合转移效率较高,稳定性好,而且宿主范围较广。把组成型启动子 *ermE*^{*} 与绿色荧光蛋白基因(*gfp*)克隆到本文构建的 pGH112,通过接合转移到链霉菌中,*gfp* 获得表达,证明其可以用作基因接合转移的有效工具载体,这为研究链霉菌的基因功能创造了有利条件。

关键词 接合转移,接合子,接合性质粒,链霉菌

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0662-05

链霉菌是一类高 G + C 含量的革兰氏阳性菌,目前报道的 2/3 的抗生素及生物活性化合物来源于链霉菌。然而链霉菌遗传操作比较困难,要实现对其许多代谢途径的转移和调控需要有效的工具。自从 Trien-Cuot 等人^[1]证明了穿梭质粒接合转移能够在亲缘关系比较远的生物之间发生后,人们构建了许多类似的穿梭质粒,进一步证明了接合转移可以在分类学上亲缘关系遥远的细菌中发生^[2-4],李维泉等^[5]还证明了大肠杆菌天然质粒 RSF1010 可以转移至稀有放线菌头状轮丝菌和星状诺卡氏菌等。在这种接合转移中,大多数质粒具备大肠杆菌的复制起始位点和革兰氏阳性细菌的广宿主范围复制起始位点。接合转移作用依赖于顺式作用(*cis-acting*)的转移起始位点(*oriT*),和 IncP 群质粒 RK4 以反式方式(*in trans*)提供转移基因(*tra*)的转移功能^[6]。大肠杆菌-链霉菌接合转移是通过细胞之间物理接触,质粒转移至目的链霉菌中。重组质粒的构建可以在容易操作的大肠杆菌系统中进行,避免了繁杂的链霉菌原生质体转化,同时能够避开胞外核酸酶和一些重金属等对转化效率的影响,而且程序简单,适用宿主范围广,因而得到迅速发展^[7]。目前已经

应用于链霉菌的接合型质粒主要有以 SCP2^{*}、pSG5 和 pIJ101 等发展而来的质粒,如 pKC1218(SCP2^{*})、pKC1139(pSG5)、pUCS30(pSG5)和 pHZ1358(pIJ101)等。pKC1139 是目前用的较多的接合型质粒,它是一个温度敏感型质粒,在碳源缺乏或高温(42℃)培养时不是很稳定,被广泛用于基因置换等研究^[7]。但 pKC1139 宿主范围有限,不能或较难通过接合转移进入一些有重要经济价值的放线菌中,如除虫链霉菌、委内瑞拉链霉菌、毒三素链霉菌和红色糖多孢菌。因此发展这些放线菌的接合转移方法有利于它们次生代谢途径及其遗传调控的深入研究。

本文报道广泛宿主的接合转移载体 pGH112 及其相关的表达载体 pGH113 的构建,以及利用 pGH113 表达 GFP 基因的初步研究结果。

1 材料和方法

1.1 质粒及菌株

除虫链霉菌为沈阳药科大学何建勇老师提供;天蓝链霉菌 YU105 为美国华盛顿大学游廷威老师提供;天蓝链霉菌 A3(2)和大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)为谭华荣老师提供;其余所用链霉菌、大肠杆菌和质粒均为本实验室保存。

收稿日期:2004-02-17,修回日期:2004-06-15。

* 通讯作者。 Tel:86-10-62653230; Fax:86-10-62652318; E-mail:yangkq@sun.im.ac.cn

1.2 培养基与抗生素

常规的大肠杆菌培养基为 LB,培养基中使用氨苄青霉素终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,卡那霉素为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氯霉素为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$;链霉菌液体培养基用 YEME^[7],固体产孢子培养基为 MS^[7],培养时使用的硫链丝菌素终浓度为 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$;阿泊拉霉素终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$;接合转移时外加萘啶酮酸,终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 DNA 克隆与蛋白质电泳操作

DNA 和蛋白质常规操作按文献[8]。

1.4 接合转移及接合频率的计算

大肠杆菌-链霉菌属间接合转移操作见文献[7];接合转移频率计算方法按如下步骤:用接种环刮下培养好的新鲜孢子至装有 500 μL 2 × YT 培养基聚丙烯管中,振荡混匀(悬液中孢子数约为 10⁸/mL),50℃水浴,热激 10 min,取 10 μL 按 10³ 倍数稀释涂板,培养,计数长出的菌落数,然后换算成孢子悬液中孢子数/mL(A);同时热激后取一定体积的孢子悬液,与含有接合转移质粒的大肠杆菌(浓度约为 10⁸/mL)混匀后涂板培养,加含有萘啶酮酸的抗生素溶液筛选,计数长出的链霉菌菌落数,然后换算成接合转移的菌落数/mL(B)。接合率 = B/A。

1.5 主要试剂

各种限制性内切酶, klenow 片段和连接酶购自大连宝生物公司;碱性磷酸酶(CIP)购自 Promega;硫链丝菌素和萘啶酮酸购自 Sigma;质粒提取及 DNA 回收试剂盒购自上海生工;其它试剂和材料均为国产。

2 结果

2.1 链霉菌接合转移克隆载体 pGH112 及表达载体 pGH113 的构建

用 *Pst* I 酶切 pOJ446^[7],用 klenow 片段补平粘末端,电泳回收 0.76 kb 片段,该片段含有顺式作用(*cis*-acting)的转移起始位点(*oriT*);用 *Pst* I 酶切 pHJL400^[9],用碱性磷酸酶去磷酸化,用 klenow 片段补平粘末端,电泳回收,然后连接上面两部分得到 pGH112(图 1)。用 *Xba* I 酶切 pGH112,部分补平粘末端,电泳回收酶切质粒;用 *Eco* R I 和 *Xba* I 酶切 pSE34,部分补平粘端,凝胶电泳回收约 180bp 左右的含有 *ermE*⁺ 的片段;连接这两部分,得到 pGH113(图 1)。pGH112 和 pGH113 含有革兰氏阳性菌广泛宿主质粒 SCP2⁺ 和大肠杆菌质粒 pBR322 的复制起始位点,以及在大肠杆菌和链霉菌中作为筛选标记

的氨苄青霉素和硫链丝菌素抗性基因,同时含有 IncP 类群的 RK2 转移起始位点(*oriT*),因此,这些质粒能在大肠杆菌和链霉菌中穿梭复制,又能够在携带整合态质粒 RP4 或各种诱动质粒(如 pUZ8002)的 *E. coli* ET12567 供体细胞作用下接合转移到链霉菌中。

2.2 pGH112 在大肠杆菌与链霉菌属间接合转移

pGH112 在大肠杆菌 DH5 α 构建好后,提取质粒,转化大肠杆菌 ET12567(pUZ8002),得到大肠杆菌 ET⁺。同时也把 pKC1139 转化大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)得到大肠杆菌 ET⁺。用这两株菌作为供体菌分别与天蓝链霉菌、除虫链霉菌、变铅青链霉菌、毒三素链霉菌、委内瑞拉链霉菌和红色糖多孢菌接合,结果见表 1。由表 1 可以看出,构建的质粒 pGH112 能够在诱动转移质粒 pUZ8002 的协助下从大肠杆菌 ET12567 接合转移至上述放线菌中;而在相同条件下,pKC1139 接合转移至委内瑞拉链霉菌、毒三素链霉菌和红色糖多孢菌中频率很低或根本不能转移。虽然,pKC1139 能接合转移至除虫链霉菌中,但接合频率较低,每个平板有 6 到 20 个单菌落不等,而且不能在含有阿泊拉霉素的平板上传代生长。pGH112 和 pKC1139 两者均难通过接合转移至天蓝链霉菌 YU105 中。

2.3 pGH112 在链霉菌中的稳定性

分别在加有硫链丝菌素的 MS 平板上连续传 5 代,含有质粒 pGH112 的接合子能够稳定生长,而含有 pKC1139 的除虫链霉菌接合子(0~20 克隆/平板)不能稳定地在含有阿泊拉霉素的 MS 平板传代。挑取含有 pGH112 接合子至无抗生素的 YEME 液体培养基中培养 4 天,然后接种至含有硫链丝菌素的 MS 平板上,结果表明,细菌能够表达硫链丝菌素抗性。分别将含有 pGH112 稳定传代的接合子接种到含有硫链丝菌素的 YEME 液体培养基中培养,按文献[7]提取质粒。用不含质粒的相应宿主在 YEME 液体培养基中作为对照培养,按文献[7]提取基因组 DNA。由于质粒拷贝数不高,无法在电泳上观察到质粒,本实验利用 PCR 扩增硫链丝菌素抗性基因来检测质粒在链霉菌的存在。按照文献[10]设计一对引物 *tsrp1*: 5'-CATATGACTGAGTTGGACACAT-3', *tsrp2*: 5'-AAGCTTATCGGTTGCCCGCGAG-3'。以提取的质粒 DNA 和基因组(对照)为模板扩增 *tsr* 基因,对照组都没有扩增出相应的产物,电泳检测结果见图 2;同时,用从链霉菌接合子中提取的质粒和基因组 DNA(对照),转化大肠杆菌 DH5 α ,然后提取质粒,酶切鉴

定(图3),相应的对照组转化后,没有得到转化子。菌并在其中稳定遗传。
通过上述检测证明,pGH112能够通过接合转入链霉

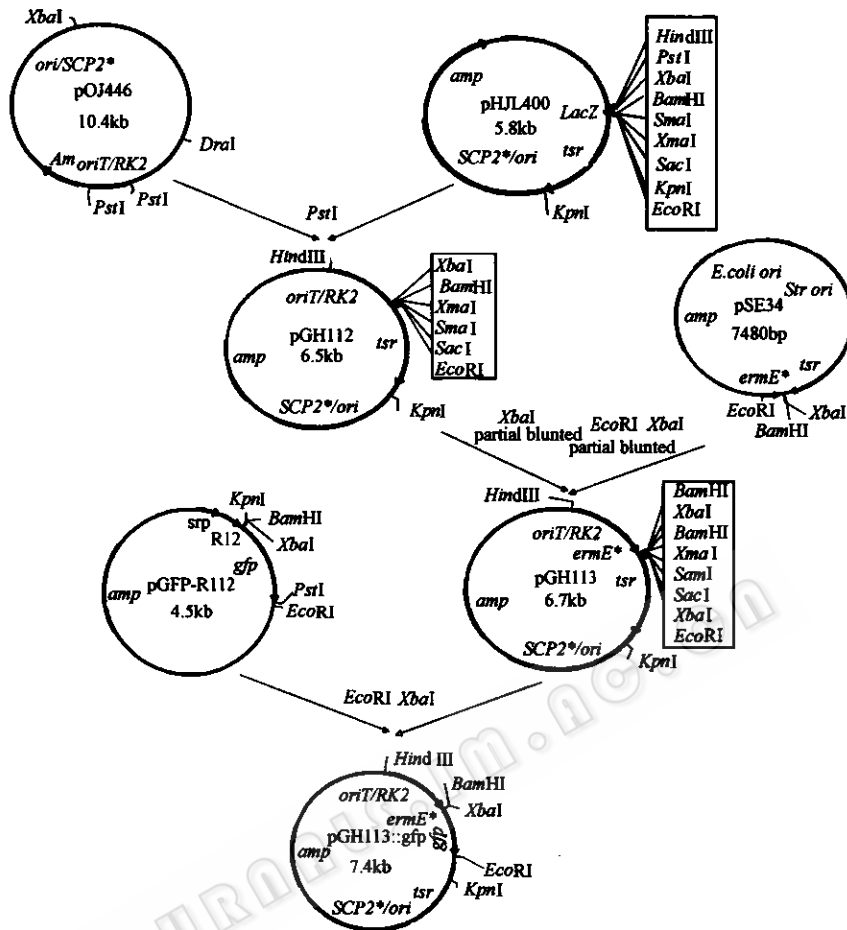


图1 质粒 pGH112、pGH113 和 pGH113::gfp 的构建

Fig.1 Construction of pGH112, pGH113 and pGH113::gfp

Restriction sites underlined are unique in the plasmids

表1 质粒 pGH112 接合转移频率

Table 1 Comparison of the conjugal transfer frequency of pGH112 and pKC1139

Donors	Recipients	Frequency	
		pGH112	pKC1139
<i>E. coli</i> ET12567(pUZ8002)	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	1.2×10^{-3}	4.52×10^{-3}
<i>E. coli</i> ET12567(pUZ8002)	<i>S. coelicolor</i> YU105	0 ~ 20 ^a	0 ~ 10 ^a
<i>E. coli</i> ET12567(pUZ8002)	<i>Sacc. erythraea</i>	b	0
<i>E. coli</i> ET12567(pUZ8002)	<i>S. lividans</i> TK54	6.5×10^{-3}	7.6×10^{-4}
<i>E. coli</i> ET12567(pUZ8002)	<i>S. avermitilis</i>	2.6×10^{-5}	9.0×10^{-6}
<i>E. coli</i> ET12567(pUZ8002)	<i>S. venezuelae</i> ISP5230	9.16×10^{-7}	0
<i>E. coli</i> ET12567(pUZ8002)	<i>S. toxytricini</i> NRRL15443	b	0

a: possible exconjugants per plate. b: exconjugants from conjugation were observed on plate, but conjugal transfer frequency was not determined.

2.4 用 *gfp* 对链霉菌接合转移表达载体的验证

为了检测所构建的接合表达载体 pGH113 能否具有表达基因的功能,用 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切 pGH113,电泳回收;用 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切 pGFP-

R112,电泳回收 0.72kb 含有 *gfp* 的片段;连接这两部分,得到 pGH113::gfp。把 pGH113::gfp 转化大肠杆菌 ET12567(pUZ8002),得到大肠杆菌/pGH113::gfp;以此为供体菌分别与天蓝链霉菌、除虫链霉菌

和变铅青链霉菌接合转移。接合子分别接到含有硫链丝菌素的 MS 平板培养,至少传代 3 次,挑取单菌落至含有硫链丝菌素的 YEME 液体培养基中培养 24 h,收集菌丝体,用超声波破碎细胞(宁波新芝生物公司, JW92-2D 超声细胞破碎仪;超声时功率为 60 W,超声时间为 5 s,间隔 15 s,连续超声破碎 5 次),离心收集上清进行 SDS-PAGE 电泳。同样条件下培养含空质粒的天蓝链霉菌、除虫链霉菌和变铅青链霉菌,同样收集上清作为对照与上面的粗提取物一起电泳。从电泳(图 4)中可以看出,含有绿色荧光

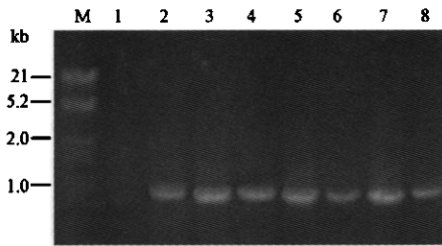


图 2 PCR 扩增硫链丝菌素抗性基因检测质粒 pGH112

Fig.2 PCR detection of thiostrepton-resistance gene (*tsr*) in different actinomycetes DNA samples.

M: DNA marker. Plasmid DNAs were extracted from *E. coli* and the following conjugant strains and used as template to amplify *tsr* fragment. 1: control using genomic DNA of *S. coelicolor*; 2: *E. coli*; 3: *S. coelicolor*; 4: *S. lividans*; 5: *S. avermitilis*; 6: *Sacc. erythraea*; 7: *S. venezuelae*; 8: *S. toxytricini*.

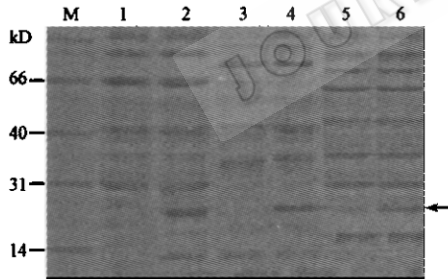


图 4 绿色荧光蛋白基因在链霉菌中的表达

Fig.4 Expression of *gfp* in Streptomyces. SDS-PAGE of cell-free extracts of Streptomyces expressing *gfp*.

M: Marker. 1: *S. coelicolor* /pGH113; 2: *S. coelicolor* A3(2)/pGH113:: *gfp*; 3: *S. lividans*/pGH113; 4: *S. lividans*/pGH113:: *gfp*; 5: *S. avermitilis*/pGH113; 6: *S. avermitilis*/pGH113:: *gfp*.

3 讨论

链霉菌是一类具有重要经济价值的革兰氏阳性菌,能够产生多种抗生素和生物活性物质。然而在链霉菌中引入外源基因的遗传操作比较困难,这主要是大多数链霉菌存在着限制修饰系统,一般难以转化或转化频率较低,而接合转移过程可能受宿主

蛋白基因质粒的培养物与对照相比,在约 27 kD 处多出一条蛋白带。用有 pGH113 和 pGH113:: *gfp* 的变铅青链霉菌分别在固体培养基上培养 72 h,取其气生菌丝体,在 BX51/BX52 系统反射荧光显微镜(油镜)下,观察了绿色荧光蛋白在变铅青链霉菌的表达情况。在蓝光下(激发波长: 488 nm, 发射波长: 507nm,放大倍数:100 倍),以变青铅链霉菌菌丝(pGH113)荧光为基底,含有 pGH113:: *gfp* 质粒的菌丝体经激发后发出明显荧光。

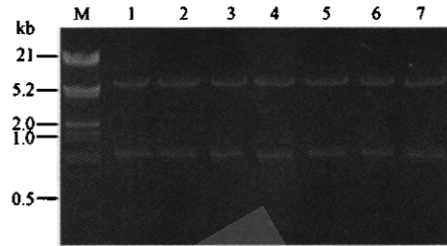


图 3 质粒 pGH112 *Kpn* I 酶切鉴定

Fig.3 *Kpn* I digest of pGH112

M: DNA marker. Plasmid DNAs were extracted from *E. coli* transformed with plasmid DNA of the following conjugant strains. 1: control, pGH112 primarily constructed in *E. coli*; 2: *S. coelicolor*/pGH112; 3: *S. lividans*/pGH112; 4: *S. avermitilis*/pGH112; 5: *Sacc. erythraea*/pGH112; 6: *S. venezuelae*/pGH112; 7: *S. toxytricini*/pGH112.

限制-修饰系统的影响较少^[3,7]。

本文成功地构建了一个能够在大肠杆菌与链霉菌之间进行高效接合转移的克隆载体 pGH112。pGH112 含有多个单克隆位点(图 1),可以作为克隆载体。pGH113 是由 pGH112 发展而来,它含有强的组成型 *ermE*^{*} 启动子,在其下游有多个单一的酶切位点,因此可以作为表达载体。*gfp* 基因克隆到 pGH113 中,通过接合转移至链霉菌中,进行了表达研究,初步证明 pGH113 可以作为表达载体。因此可以把这两个质粒发展为这些放线菌基因转移的工具载体。

实验中发现,在含有 pGH112 和 pKC1139 的大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)与天蓝链霉菌 YU105 进行接合转移时,两种质粒均难进入 YU105。YU105 是将天蓝链霉菌中合成放线紫红素的基因簇与 *whiE* 基因簇相应地用 *ermE*^{*} 启动子和潮霉素抗性基因通过双交换置换后的突变株,而 *whiE* 基因簇与天蓝链霉菌形态分化相关^[11],可能说明接合转移的发生与细菌的形态分化相关。与 pGH112 类似的质粒有 pKC1218,其接合转移的宿主范围没有报道。

pGH112 与 pKC1218 的差异为后者筛选标记是安普霉素抗性^[7]。pRM5(SCP2^{*})在表达聚酮合酶基因簇中非常成功,其含有 *ermE*^{*},但不是接合转移质粒^[12]。pGH112 的复制位点来自具有很广泛宿主范围的质粒 SCP2^{*}。其在 pHJL400 中的片段使得质粒拷贝数增加到 10(只包含 SCP2^{*} 复制起始位点周围约 1.4kb)^[9]。SCP2^{*} 是 SCP2 的高致育突变体,拷贝数为 1~2,在载体的构建方面得到了广泛的应用,较 SCP2 更广泛^[13]。本文构建的质粒集中了 pKC1218 和 pRM5 的优点,经过进一步修饰,可能发展成为链霉菌遗传操作有效工具之一。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Trieu-Cuot P, Carlier P, Martin P *et al.* Plasmid transfer by conjugation from *E. coli* to gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 1987, **48**: 289-294
- [2] Bierman M, Logan R, Brien K *et al.* Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *E. coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, **16**: 43-49
- [3] Deng ZX(邓子新), Zhou XF(周秀芬). Intergeneric plasmid conjugal transfer between *E. coli* and *Streptomyces*. *Hereditas* (遗传), 1994, **16**: 7-10
- [4] Heinmann J A, Sprague G F. Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature*, 1989, **340**: 205-209.
- [5] Li WQ(李维泉), Shen MJ(沈美娟), Jiao RS(焦瑞身) *et al.* Conjugal actinomycetes of plasmid RSF101 from *E. coli* to the rare actinomycetes of *Nocardia asteroides* and *Streptovercillum caespitosus*. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 1999, **39**: 376-380
- [6] Donald G, Guiney, Emanuel Jakobson. Location and nucleotide sequence of the transfer origin of the broad host range plasmid RK2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**: 3595-3598
- [7] Kieser T, Mervyn J, Bibb M J *et al.* *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 2000
- [8] Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002
- [9] Larson J, Hershberger C. The minimal replicon of a *Streptomyces* plasmid produces an ultrahigh level of plasmid DNA. *Plasmid*, 1986, **15**: 199-209
- [10] Janssen G R, Bibb M J. Tandem promoters, *tsrp1* and *tsrp2*, direct transcription of the thiostrepton resistance gene (*tsr*) of *Streptomyces azureus*: transcriptional initiation from *tsrp2* occurs after deletion of the -35 region. *Mol Gen Genet*, 1990, **221**: 339-346
- [11] Mutational analysis and reconstituted expression of the biosynthetic genes involved in the formation of 3 amino 5 hydroxybenzoic acid, the starter unit of rifamycin biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* S699. *J Biol Chem*, 2001 **276**: 12546-12555
- [12] Ichinose K, Surti C, Taguchi T *et al.* Proof that the ACTVI genetic region of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is involved in stereospecific pyran ring formation in the biosynthesis of actinorhodin. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, **9**: 395-400
- [13] Lydiate D, Malpartida F, Hopwood D A. The *Streptomyces* plasmid SCP2^{*}: its functional analysis and development into useful cloning vectors. *Gene*, 1985, **35**: 223-235

Construction of Efficient Conjugal Plasmids Between *Escherichia coli* and *Streptomyces*

MO Hong-Bo¹ BAI Lin-Quan² WANG Sheng-Lan¹ YANG Ke-Qian^{1*}

¹(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080, China)

²(Bio X-centre, Shanghai Jiaotong university, Shanghai, 200030, China)

Abstract Conjugal plasmid pGH112 has been developed based on the replicons of *Streptomyces coelicolor* plasmid SCP2^{*} and *E. coli* ColE. The plasmid contains ampicillin resistance gene (*amp*) for selection in *E. coli* and thiostrepton resistance gene (*tsr*) for selection in *Streptomyces*, and a 0.76 kb *oriT* fragment of (IncP) RK2. Conjugal transfer of pGH112 was performed from *E. coli* to *S. coelicolor* A3(2), *S. avermitilis*, *S. lividans* TK54, *S. toxytricini* NNRL15443, *S. venezuelae* ISP5230 and *Sacc. erythraea* by conjugation, results show that the plasmid was able to transfer efficiently from *E. coli* to *Streptomyces*, was stably inherited in the recipients. pGH113 was constructed from pGH112 by combining the constitutive *ermE*^{*} promoter with green fluorescent protein gene (*gfp*).

Key words conjugation, exconjugant, conjugal plasmid, *Streptomyces*

Received: 02-17-2004

* Corresponding author. Tel: 86-10-62653230; Fax: 86-10-62652318; E-mail: yangkq@sun.im.ac.cn