

稀有放线菌小单孢菌与大肠杆菌 接合转移体系的构建

陈鑫¹ 杨振飞¹ 朱芮¹ 肖延辉¹ 郭利² 王晓丽² 李晓华¹

1.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;

2.湖北省襄阳市烟草专卖局,襄阳 441003

摘要 为将外源基因导入小单孢菌,建立小单孢菌(*Micromonospora*)与大肠杆菌两亲接合转移方法,将包含小单孢菌内源质粒 pJTU112 复制区的 4.7 kb 片段插入质粒 pOJ260 的 *Bam*HI 酶切位点,构建了能在大肠杆菌和小单孢菌中复制的穿梭载体 pSCU207,将质粒 pSCU207 转化大肠杆菌 ET12567/pUZ8002,再与小单孢菌 LXH20 进行两亲接合转移,挑取接合转移子,并进行验证。结果表明:质粒 pSCU207 通过大肠杆菌与小单孢菌新鲜菌丝之间接合转移导入小单孢菌中,并可稳定遗传;大肠杆菌与小单孢菌新鲜菌丝之间的最佳接合转移体积是 40 μ L 和 400 μ L。

关键词 小单孢菌;接合转移;质粒 pSCU207;抗生素的敏感性;质粒稳定性

中图分类号 Q 933 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)04-0080-04

稀有放线菌小单孢菌(*Micromonospora*)是具有菌丝和孢子分化的革兰氏阳性细菌,其基因组GC含量为70%以上,也是几丁质酶、纤维素酶的产生菌,在其复杂的形态分化过程中能产生多种重要抗生素,如:紫苏霉素、扁枝衣霉素、福堤霉素^[1-2],从小单孢菌中寻找结构新颖、有生物活性的化合物潜力很大^[3-4],因此,从分子水平研究小单孢菌具有重要意义,但是,与小单孢菌遗传操作方法有关的文献较少。

小单孢菌 40027 菌株^[5]是新型氨基糖苷类抗生素——福堤霉素 A 的产生菌^[6],福堤霉素 A 对多种氨基糖苷类抗生素耐药菌株有效,具有广谱抗菌活性。质粒 pJTU112 是小单孢菌 40027 菌株的内

源质粒,从小单孢菌 40027 菌株中消除内源质粒 pJTU112,得到小单孢菌 LXH20 菌株。我们前期研究中试图将链霉菌原生质体转化等技术用于小单孢菌 40027 菌株,但都没有成功。本研究将链霉菌接合转移方法引入小单孢菌中,试图将质粒 pSCU207 通过接合转移方法导入小单孢菌 LXH20 菌株,并检测质粒 pSCU207 在小单孢菌 LXH20 菌株中的稳定性。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 Strain or plasmid	特征 Characteristics	来源 Source
<i>Micromonospora</i> sp. 40027	野生型 Wild type	[5]
<i>Micromonospora</i> sp. LXH20	40027 cured of both free and integrated pJTU112	[5]
<i>E.coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>dam dcm hsdS</i> Cml ^R Str ^R Tet ^R Km ^R	[7]
pJTU112	A plasmid in <i>Micromonospora</i> sp. 40027	[5]
pOJ260	<i>rep^{pucc} oriT bla acc(3) IV</i>	[8]
pSCU207	A 4.7 kb <i>Bgl</i> II fragment of pSCU206 inserted into <i>Bam</i> HI site of pOJ260	本研究 This study

收稿日期: 2014-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070087, 30570046);湖北省自然科学基金重点项目(2011CDA079);湖北省烟草公司面上项目(0710XYCY2012-01);国家大学生创新创业训练项目(GCX13104);“十二五”中南民族大学国家级民族药理学实验教学中心建设项目

陈鑫, 硕士研究生, 研究方向: 放线菌分子生物学. E-mail: chenxinzn@163.com

通信作者: 李晓华, 博士, 教授, 研究方向: 微生物学. E-mail: lixiaohua@mail.scuec.edu.cn

1.2 试 剂

硫链丝菌素和阿泊拉霉素购自美国 Sigma 公司；氯霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、Lambda/*Hind*Ⅲ、限制性内切酶、DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒等购自大连宝生物工程有限公司；其他常用试剂均购于上海国药集团。

1.3 培养基

大肠杆菌 (*E.coli*) 液体培养使用 LB 培养基；小单孢菌 LXH20 菌株固体培养使用贝奈特培养基^[5]，小单孢菌 LXH20 菌株液体培养使用菌丝体培养基^[5]，小单孢菌 LXH20 菌株对抗生素敏感性实验使用 MM 培养基^[5]。

1.4 抗生素敏感性检测

将已灭菌的 MM 培养基融化，温度降至 45 ℃，加入适当质量浓度的抗生素，倒平板，将小单孢菌 LXH20 菌株的孢子悬液涂布平板，30 ℃ 培养 5 d，变铅青链霉菌 TK24 和大肠杆菌 DH5α 作为对照，根据小单孢菌 LXH20 菌株生长状态评定小单孢菌株对抗生素的敏感性。

1.5 DNA 操作

大肠杆菌培养、转化、质粒提取的操作见文

献[9]，小单孢菌培养和质粒提取参照文献[10]。

1.6 大肠杆菌与小单孢菌属间接转移实验

重组质粒通过两亲接合转移法^[5,10]从大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 导入到小单孢菌菌株 LXH20 的新鲜菌丝体中，30 ℃ 恒温培养数天后，观察接合转移子的数量。

2 结果与分析

2.1 小单孢菌 LXH20 菌株对不同抗生素抗性水平的检测

为确定抗生素抗性基因能否用于小单孢菌 LXH20 菌株进行遗传操作的选择标记，检测了小单孢菌 LXH20 菌株对几种抗生素(阿泊拉霉素、链霉素、硫链丝菌素、庆大霉素、卡那霉素等)的抗性水平，结果(表 2)显示：小单孢菌 LXH20 菌株在含有 0.5 μg/mL 硫链丝菌素的培养基上不能生长，表明小单孢菌 LXH20 菌株对硫链丝菌素非常敏感；小单孢菌 LXH20 菌株在含有 2.5 μg/mL 阿泊拉霉素和链霉素的培养基上不能生长，表明小单孢菌 LXH20 菌株对阿泊拉霉素和链霉素比较敏感；小单孢菌 LXH20 菌株在质量浓度为 50.0 μg/mL 的卡

表 2 小单孢菌 LXH20 菌株对不同抗生素的抗性水平检测¹⁾

Table 2 The resistance to different antibiotics for *Micromonospora* sp. LXH20

抗生素 Antibiotics	MM 培养基中抗生素质量浓度/(μg/mL) Antibiotics concentration in MM medium						
	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0	25.0	50.0
硫链丝菌素 Thiostrepton	—	—	—	—	—	—	—
阿泊拉霉素 Apramycin	+	+/-	—	—	—	—	—
链霉素 Streptomycin	+	+/-	—	—	—	—	—
卡那霉素 Kanamycin	++	++	++	++	++	++	++
潮霉素 Hygromycin	++	++	++	++	++	++	++
庆大霉素 Gentamycin	++	++	++	++	++	++	++

1) ++: 正常生长 Normal growth; +: 缓慢生长 Slow growth; +/-: 轻微生长 Light growth; -: 不能生长 No growth.

那霉素、潮霉素和庆大霉素培养基上可以正常生长，表明小单孢菌 LXH20 菌株对卡那霉素、潮霉素和庆大霉素都有抗性。

2.2 小单孢菌与大肠杆菌之间两亲接合转移

将包含小单孢菌内源质粒 pJTU112 复制区的 4.7 kb 片段插入质粒 pOJ260 的 *Bam*HI 酶切位点，构建了重组质粒 pSCU207。重组质粒 pSCU207 含有阿泊拉霉素的抗性基因(*acc* (3) IV)、接合转移功能区 *ori*T 和分别在小单孢菌和大肠杆菌进行复制的功能区。分别用消除质粒的小单孢菌 LXH20 菌株的新鲜菌丝体和萌发孢子作为受体菌与含有质粒 pSCU207 的大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 菌株进行两亲接合转移实验，结果表明：在小单孢菌

LXH20 菌株萌发孢子作为受体菌与含有质粒 pSCU207 的大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 菌株进行的两亲接合转移的实验中，没有获得阿泊拉霉素的抗性菌落；在小单孢菌 LXH20 菌株新鲜菌丝体作为受体菌与含有质粒 pSCU207 的大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 菌株进行的两亲接合转移的实验中，得到了阿泊拉霉素的抗性菌落。

2.3 不同比例的供体菌和受体菌对接合转移效率的影响

供体菌含有质粒 pSCU207 的大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 菌株和受体菌小单孢菌 LXH20 菌株在同一个平板上生长时，两者之间存在不可避免的相互竞争。由于小单孢菌的生长速度比大肠杆

菌的生长速度缓慢,过量的大肠杆菌会使小单孢菌的生长受到抑制,导致接合转移率降低。为了确定接合转移过程中受体菌和供体菌接种最佳比例,按不同比例的大肠杆菌和小单孢菌菌丝体进行混合涂布平板,结果如表 3 所示:40.0 μL 的供体菌——大肠杆菌与 400.0 μL 的受体菌——小单孢菌进行混合,接合转移效率最高,接合转移子的数量为 259.6 cfu。

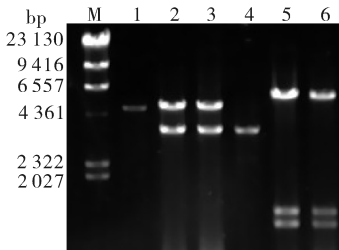
表 3 不同比例的供体菌和受体菌对接合转移效率的影响

Table 3 Effects of different proportion between donor and receptor on conjugal transfer

体积/ μL Volume		接合转移子数量/cfu Transconjugants
供体菌(大肠杆菌) ET12567/pUZ8002/ pSCU207) Donor (<i>E. coli</i> ET12567 carrying pUZ8002/ pSCU207)	受体菌(小单孢菌 LXH20 菌株) Receptor (<i>Micromonospora</i> sp. LXH20)	
10.0	400.0	51.2 \pm 3.4
20.0	400.0	65.3 \pm 5.4
30.0	400.0	113.5 \pm 13.2
40.0	400.0	259.6 \pm 23.3
50.0	400.0	102.5 \pm 14.2
60.0	400.0	60.4 \pm 6.2

2.4 小单孢菌接合转移子的验证

随机挑取几个接合转移子,提取质粒 DNA,对其进行酶切验证,酶切结果如图 1 所示,来自小单孢菌接合转移子中的质粒 DNA 和来自大肠杆菌中的质粒 DNA 大小一致,都包含小单孢菌内源质粒 pJTU112 复制区的 4.7 kb 片段和 3.5 kb 质粒 pOJ260。



M: λ DNA/*Hind*III 分子质量标准(对照) λ DNA/*Hind*III marker; 1:4.72 kb *Sac*I-*Kpn*I DNA 片段 4.72 kb *Sac*I-*Kpn*I DNA fragment; 2:来源于大肠杆菌的质粒 pSCU207 进行 *Hind*III 酶切 pSCU207/*Hind*III from *E. coli*; 3:来源于接合转移子的质粒 pSCU207 进行 *Hind*III 酶切 pSCU207/*Hind*III from transconjugants; 4:质粒 pOJ260 *Bam*HI 酶切 pOJ260/*Bam*HI; 5:来源于大肠杆菌的质粒 pSCU207 进行 *Bam*HI 酶切 pSCU207/*Bam*HI from *E. coli*; 6:来源于接合转移子的质粒 pSCU207 进行 *Bam*HI 酶切 pSCU207/*Bam*HI from transconjugants.

图 1 接合转移子中质粒 pSCU207 酶切验证电泳分析

Fig.1 Verification for plasmid pSCU207 from transconjugants

2.5 质粒 pSCU207 在小单孢菌接合转移子中的稳定性

为了检测质粒 pSCU207 在小单孢菌 LXH20 菌株中的稳定性,将小单孢菌接合转移子 (*Micromonospora* sp. LXH20/ pSCU207) 接种到无抗生素的贝乃特培养基平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至产孢,再转接到无抗生素的贝乃特培养基平板上,连续转接 5 次,随机挑取 200 个单菌落,分别转接到添加有阿泊拉霉素和无抗生素的贝乃特培养基平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养,200 个单菌落在添加有阿泊拉霉素和无抗生素的贝乃特培养基平板上都能生长,没有发现阿泊拉霉素抗性消失的菌落。结果表明,质粒 pSCU207 在小单孢菌 LXH20 菌株中可稳定存在。

3 讨论

笔者所在课题组试图将多种链霉菌自主复制型质粒和整合型质粒通过原生质体转化方法导入小单孢菌,但均未成功。仅有将质粒 pSET152 通过电转化小单孢菌新鲜菌丝体导入小单孢菌的报道^[11]。

接合转移是一种跨属的基因转移方法,在链霉菌基因操作中具有广泛应用^[12]。本研究将含有质粒 pSCU207 的大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 菌株分别与消除质粒的小单孢菌 LXH20 菌株的萌发孢子和新鲜菌丝体进行接合转移,以小单孢菌 LXH20 菌株萌发孢子为受体菌的接合转移未得到接合转移子;以小单孢菌 LXH20 菌株新鲜菌丝体为受体菌的接合转移获得了接合转移子。

将链霉菌自主复制型质粒 (pIJ702、pHZ1358 等) 与小单孢菌进行接合转移未得到接合转移子,而包含小单孢菌内源质粒 pJTU112 复制区的质粒 pSCU207 可以通过接合转移导入小单孢菌,暗示链霉菌自主复制型质粒 pIJ702、pHZ1358 等可以在链霉菌中进行自主复制的复制子不能在小单孢菌复制。

参 考 文 献

- [1] MTHMUD T. Progress in aminocyclitol biosynthesis[J]. Curr Opin Chem Biol, 2009, 13(2):161-170.
- [2] SAKAI A, MITSUMORI A, FURUKAWA M, et al. Production of a hybrid 16-membered macrolide antibiotic by genetic engineering of *Micromonospora* sp. TPMA0041[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(11):1693-1701.

- [3] ELFI K, TELL T, DIETER C. Design of a new warhead for the natural enediyne dynemicin A, an increase of biological activity [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(9): 2661-2670.
- [4] 耿旭梅, 陈鑫, 杨晓潼, 等. 小单孢菌 40027 菌株质粒 pJTU112 复制区的克隆与序列特性[J]. *微生物学报*, 2013, 53(6): 623-627.
- [5] LI X H, ZHOU X F, DENG Z X. Vector systems allowing efficient autonomous or integrative gene cloning in *Micromonospora* sp. Strain 40027[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3144-3151.
- [6] 程元荣, 郑卫. 小单孢菌及其产生的次级生物活性代谢产物[J]. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(6): 321-327.
- [7] MACNEIL D J, GEWAIN K M, RUBY C L, et al. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector[J]. *Gene*, 1992, 111(1): 61-68.
- [8] BIERMAN M, LOGAN R, O'BRIEN K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.[J]. *Gene*, 1992, 116(1): 43-49.
- [9] SAMBROOK J, RUSSELL D. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. *Practical Streptomyces genetics*[M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [11] 李晓华, 龙慈凡, 周秀芬, 等. 链霉菌质粒 pSET152 电转化稀有放线菌小单孢菌的研究[J]. *微生物学报*, 2007, 47(4): 718-720.
- [12] JORGENSEN H, DEGNE S K F, DIKIY A, et al. Insights into the evolution of macrolactam biosynthesis through cloning and comparative analysis of the biosynthetic gene cluster for a novel macrocyclic lactam[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(1): 283-293.

Constructing the conjugation transferring system between rare actinomycetes *Micromonospora* and *Escherichia coli*

CHEN Xin¹ YANG Zhen-fei¹ ZHU Rui¹ XIAO Yan-hui¹
GUO Li² WANG Xiao-li² LI Xiao-hua¹

1. Key Laboratory for Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission/
College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China;
2. Xiangyang Tobacco Monopoly Administrations, Xiangyang 441003, China

Abstract To construct the conjugation transferring system between rare actinomycetes *Micromonospora* and *E. coli* which can transfer foreign genes into *Micromonospora*, a 4.7 kb fragment containing the replication region of plasmid pJTU112 was cloned into the *Bam* H I site of vector pOJ260 which can be replicated in both *E. coli* and *Micromonospora*. The plasmid pSCU207 was introduced into *E. coli* ET12567 carrying pUZ8002 and subsequently transferred by conjugation into *Micromonospora* sp. LXH20 with selection of apramycin-resistant colonies, exconjugants were obtained. The plasmid pSCU207 was introduced by conjugation into *Micromonospora* sp. LXH20 and stably maintained in *Micromonospora* sp. LXH20. The optimal conjugation volume of *E. coli* ET12567 carrying pSCU207 and *Micromonospora* fresh mycelium was 40 μ L and 400 μ L, respectively.

Key words *Micromonospora*; conjugation; plasmid pSCU207; sensitivity to antibiotics; stability of plasmid

(责任编辑:张志钰)