

肉色吸水链霉菌 SH121 接合转移系统的建立

杨 卓 李佳丽 肖 乐 何 璟

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 利用单因素试验探索了热激处理、预萌发时间、供体宿主菌的类型、供受比及 MgCl_2 浓度对链霉菌 SH121 接合转移效率的影响, 结果显示: 在 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 热激 10 min , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 预萌发 1 h , 以大肠杆菌 DCDA/pUZ8002 为供体宿主菌, 在供受比为 $100:1$ 时, 使用添加 40 mmol/L MgCl_2 的培养基 M-ISP4, 接合转移效率最高可达到每受体 1.03×10^{-3} 个接合子。利用建立好的接合转移方法, 将整合型质粒 pSET152 和基因敲除质粒 pYZ09 成功地导入链霉菌 SH121, 证实该方法可用于后期链霉菌 SH121 活性天然产物的挖掘及其相关生物合成基因簇的研究工作。

关键词 肉色吸水链霉菌 SH-121; 接合转移; 遗传操作; 基因敲除

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)04-0049-07

吸水链霉菌 SH121 是华中农业大学周啟教授于 1985 年从湖北省房县郊区土壤中分离到的 1 株链霉菌, 它的发酵产物对青霉、绿霉引起的柑橘储藏病害有良好的防治效果^[1]。该菌能产生带成链孢子的气生菌丝并具有吸水现象, 吸水斑呈黑褐色或茶褐色, 由此命名为肉色吸水链霉菌 (*Streptomyces carneohygroscopicus*)。前期在研究吸水链霉菌 SH121 的抗菌谱时, 发现它对枯草芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性细菌有较强的抑制作用, 对大肠杆菌等革兰氏阴性菌没有抑菌活性, 能够明显抑制稻白叶枯病菌、稻纹枯病菌、棉花枯萎病菌、玉米小斑病菌等多种植物病原真菌的生长。对吸水链霉菌 SH121 进行全基因组扫描测序, 通过生物信息学分析发现其基因组中含有大量的聚酮合酶 (PKS) 和非核糖体多肽合成酶 (NRPS) 基因, 具有产生不同类型活性天然产物的潜力。

聚酮合酶是聚酮类化合物生物合成的核心酶, 主要合成大环内酯、多烯、聚醚、芳香族等类型聚酮化合物, 如红霉素^[2]、杀念菌素^[3]、阿维菌素^[4]等。非核糖体多肽合成酶负责催化合成非核糖体多肽类化合物, 包括博来霉素^[5]、环孢菌素^[6]、万古霉素^[7]等。聚酮类和非核糖体多肽类是天然产物中结构及

生物活性多样性最为丰富的两类化合物^[8-9], 引起了众多研究者的关注。为了对吸水链霉菌 SH121 基因组中潜在的天然产物生物合成基因簇进行研究, 我们首先尝试建立该菌的遗传操作系统, 将外源 DNA 导入链霉菌 SH121, 以便通过基因中断、敲除及超量表达等技术展开与基因功能分析相关的研究。

链霉菌常见的遗传操作方法有原生质体转化和接合转移 2 种。原生质体是通过溶菌酶将细胞壁降解, 在 PEG 的作用下将外源 DNA 导入原生质体获得相应的转化子。原生质体制备和再生的过程影响因素较多, 条件难以控制, 且外源 DNA 很容易被宿主菌的限制性内切酶降解^[10], 除了在模式菌株变铅青链霉菌和天蓝色链霉菌中的操作方法成熟以外, 较少应用于其他自然分离到的野生型链霉菌。而接合转移则较少受到宿主限制修饰系统的干扰, 从而提高外源 DNA 的转移效率, 是链霉菌中应用范围最广的遗传操作方法。目前最常用的是根据广宿主范围质粒的特性发展出来的大肠杆菌-链霉菌属间接合转移系统。由于链霉菌是一种高度分化的种属, 不同链霉菌之间遗传背景差异很大^[11], 适用于一种链霉菌的接合转移方法不一定适用于其他的链

收稿日期: 2015-06-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30970059, 31270136); 教育部留学回国人员科研启动基金项目 (2009-1590); 教育部新世纪人才支持计划项目 (NCET-08-0779)

杨 卓, 硕士研究生, 研究方向: 微生物天然产物的生物合成. E-mail: zhao2008@163.com

通信作者: 何 璟, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物的生物合成. E-mail: hejingj@mail.hzau.edu.cn

霉菌^[12]。供体宿主菌的类型、热激、预萌发时间、培养基、供体与受体比例等都是影响接合转移效率的重要因素。笔者以链霉菌 SH121 为研究对象,对其接合转移条件进行摸索,以期建立一个高效的适用于基因超量表达和基因敲除的接合转移操作系统。

1 材料与方法

1.1 材料

1)菌种和质粒。受体菌 *Streptomyces carneohygroscopicus* SH-121 由华中农业大学周啟教授馈赠;供体菌大肠杆菌 *E. coli* S17-1(*dam*⁺)、*E. coli* DH5a/pUZ8002、*E. coli* ET12567/pUZ8002(*dam*⁻*dcm*⁻*Hsd*⁻)、*E. coli* DCDA/pUZ8002(*dam*⁻*dcm*⁻)和 *E. coli* DH10B/pUZ8002,质粒 pOJ260 和 pSET152 均由笔者所在实验室收藏。

2)培养基。大肠杆菌培养基为 LB 液体和固体培养基,链霉菌培养基 TSB、2CM、ISP4、YD、PDA、ISP3 和 MS 的配方参见文献[11]。

3)主要试剂。抗生素购自 Sigma 公司;普通 DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGEN 公司;限制性内切核酸酶和 T4 DNA 连接酶购自 Thermo Fisher 公司,DNA maker 购自东盛生物科技有限公司;KOD DNA 高保真酶购自 TOYOBO 公司;TSB 购自 B&D 公司;其余药品购自国药集团;所用引物为南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1)常用分子生物学方法。基本操作、大肠杆菌转化及质粒提取方法参见文献[13];链霉菌培养及总 DNA 提取方法见文献[14]。

2)生物活性测定。以 *Bacillus subtilis* 168、*Rice rhizoctonia*、*Alternaria alternata*、*Oomycetes* JL-S、*Saccharomyces cerevisiae* 及 *Escherichia coli* BL21、*Ralstonia dolaanacearum* 及 *Xanthomonas oryzae pathovar oryzicola* RH3 为指示菌。丝状真菌指示菌在 PDA 培养基上活化后用 1 mL 枪头打菌块至一个新的 PDA 培养基平板的中心,将链霉菌 SH121 的固体发酵培养基打菌块置于其四周,28℃培养至丝状真菌菌丝体覆盖整个平板,观察链霉菌菌块周围是否有抑菌圈;细菌指示菌的生物活性测定:将活化后的指示菌菌悬液与融化后降温至 50℃左右的 LB 固体培养基混合均匀后倒平板,再将链霉菌菌块放置于培养基表面,37℃恒温培养 1~2 d 后观察抑菌圈。

3)质粒 pYZ09 的构建。利用引物 SH121001orf81-for-u *Hind*Ⅲ: 5'-AAA AAG CTT CGC GGG CCG GCC ACA TCA TCC TCA-3'和 SH121001orf81-for-l *Eco*RⅠ: 5'-AAA GAA TTC GGG TAG CGG CGG TGC GTC CAG AG-3'扩增得到 *orf*81 基因上游 3.04 kb 的同源片段即为左臂,经 *Hind*Ⅲ和 *Eco*RⅠ双酶切处理后跑胶回收纯化。利用引物 SH121001orf83-back-u *Hind*Ⅲ: 5'-AAA AAG CTT CGG CGG CGT CCA GCG GGT AGT TCT-3'和 SH121001orf83-back-l *Xba*Ⅰ: 5'-AAA TCT AGA CGG CCC CGA CGA CTC CTT CTT C-3'扩增得到 *orf*83 基因下游 2.67 kb 的同源片段即为右臂,经 *Hind*Ⅲ和 *Xba*Ⅰ双酶切处理后跑胶回收纯化。用 *Xba*Ⅰ和 *Eco*RⅠ双酶切处理载体 pOJ260,然后与处理好的左臂和右臂进行三片段连接,转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞,构建得到质粒 pYZ09。

4)接合转移。将 5 mL 过夜培养的大肠杆菌供体菌转接到含有抗生素的 50 mL LB 培养基中,37℃摇床培养至 D_{600} 为 0.6~0.8,收集菌体,用等体积无抗的 LB 洗涤 2 次后悬浮于 0.1 倍体积的 LB 中备用。同时将新鲜的链霉菌孢子用 1 mL TSB 洗涤 2 次,悬浮于 1 mL TSB,50℃水浴热激后,37℃温育至孢子萌发,离心收集萌发后的孢子并重新悬浮于适量的 LB 中。按一定的体积比例将处理好的大肠杆菌和孢子混合,均匀涂布在合适的接合转移培养基平板上,30℃培养 16 h 后,用适当浓度的抗生素和萘啶酮酸覆盖,30℃继续培养 3~7 d 后可观察接合转移子,计算接合转移效率,文中数据均为 3 次平行实验的平均值。

2 结果与分析

2.1 产孢培养基的选择

作为接合转移的受体,链霉菌孢子的质量会直接决定接合转移是否能够成功。为了获得足量的新鲜孢子,我们将链霉菌 SH121 接种到多种链霉菌常用的产孢培养基中,30℃恒温培养 7 d,观察菌丝的生长及产孢状况(图 1)。该菌在培养 2~4 d 后开始长出白色的气生菌丝,培养 4~6 d 开始产黑褐色孢子,同时伴随有棕色色素产生。相比而言,链霉菌 SH121 在 PDA、ISP3、MS 及 YD 培养基上生长状况良好,在 2CM 上生长状况不佳。收集孢子稀释计数后,计算每种培养基上所产生的孢子数量,发现最佳产孢培养基为 YD,其次为 MS 和 ISP3(表 1)。

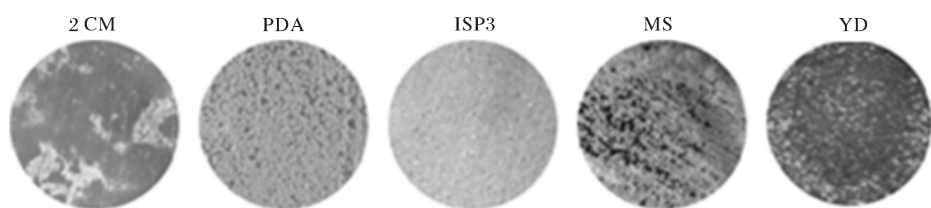


图 1 链霉菌 SH121 在不同培养基上生长到第 5 天的表型观察

Fig.1 Photos of *S. carneoerythroscopicus* SH121 cultured in different media on the 5th day

表 1 链霉菌 SH121 在不同培养基上的生长状况

Table 1 Morphological observation of *Streptomyces carneoerythroscopicus* SH121 cultivated in different media

培养基 Media	生长状况 Morphological	产孢状况 Sporulation
2CM	仅见基质菌丝 Only substrate mycelia	不产孢 No spores
PDA	生长较好，菌落小但密集 Grow well but colonies small and intensive	产孢，但产孢较少 Little spore
ISP3	菌落生长良好 Grow well	产孢，但产孢较少 Little spore
MS	菌落生长良好 Grow well	产生较多黑褐色孢子 Produce many drak brown spore
YD	菌落生长旺盛 Grow strong	产生大量黑褐色孢子 Product a lot of dark brown spore

因此,选择 YD 作为产孢培养基来获得大量的链霉菌 SH121 的孢子。

2.2 抗性背景测定

为了选择合适的抗性标记对接合子进行有效的筛选,我们对链霉菌 SH121 背景的抗性进行了测定。将等量的孢子均匀涂布到加有不同抗生素的

YD 平板上,30 ℃ 培养 2 周后,观察生长情况(表 2)。结果表明,链霉菌 SH121 对壮观霉素和卡那霉素具有较强的抗性,对氯霉素和链霉素具有微弱的背景抗性,对阿伯拉霉素和硫链丝菌素非常敏感。接合转移可选择带有阿伯拉霉素或硫链丝菌素抗性基因的质粒进行实验。

表 2 链霉菌 SH121 抗性背景测定

Table 2 The antibiotic resistance background of *S. carneoerythroscopicus* SH121

抗生素 Antibiotics	0 μg/mL	10 μg/mL	20 μg/mL	30 μg/mL	40 μg/mL
阿伯拉霉素 Apramycin	✓	×	×	×	×
硫链丝菌素 Thiostrepton	✓	×	×	×	×
氯霉素 Chloramphenicol	✓	✓	×	×	×
链霉素 Streptomycin	✓	✓	×	×	×
壮观霉素 Spectinomycin	✓	✓	✓	✓	✓
卡那霉素 Kanamycin	✓	✓	✓	✓	✓

注:“✓”代表有链霉菌生长,“×”代表没有生长。Note: “✓” means the strain can grow, “×” means the strain cannot grow.

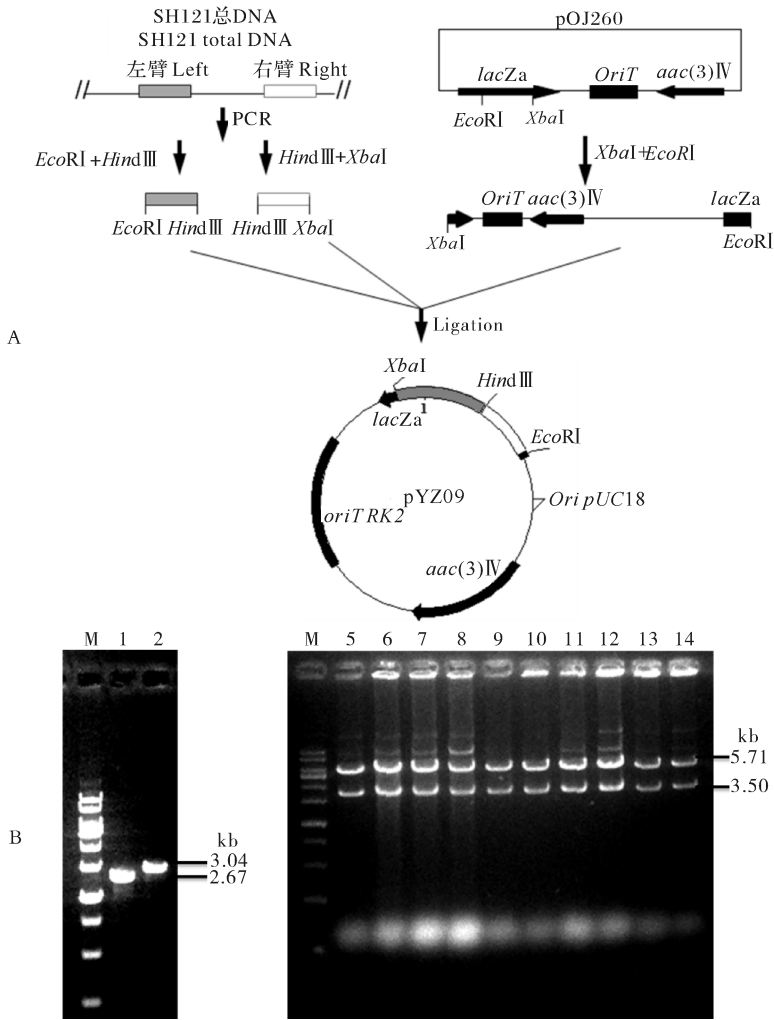
2.3 接合转移质粒的选择

依据抗性背景测定的结果,我们首先选择带有阿伯拉霉素抗性基因的 pSET152 作为接合转移的测试质粒。pSET152 为整合型链霉菌质粒,含有来源于链霉菌噬菌体 φC31 的整合酶 int 和整合位点 attP,能够与链霉菌染色体上 attB 位点发生位点特异性重组,从而整合到宿主染色体中,获得遗传稳定性^[15]。pSET152 可作为链霉菌基因表达的载体,常用于基因互补^[16]、异源表达^[17]等实验,转移效率较高,很容易获得接合子。而基因中断、基因敲除等遗传操作则通常使用携带有同源片段的自杀型质粒,通过同源片段与染色体之间的交换整合到宿主染色体上。这类质粒的整合依赖于同源重组,因此,比较难获得接合子。为了探索进行基因中断和基因敲除的可能性,我们以链霉菌 SH121 基因组中发现的一

个潜在天然产物生物合成基因簇为研究对象,选取该基因簇中的核心 PKS 基因 *orf82* 作为基因敲除的靶基因,通过 PCR 扩增得到其上下游同源 DNA 片段,克隆到大肠杆菌质粒 pOJ260 中,得到含有 3.04 kb 和 2.67 kb 2 个同源臂的基因敲除质粒 pYZ09(图 2),进行接合转移系统的验证。

2.4 热激条件的优化

热激处理能够降低受体菌中限制性内切酶和 DNA 酶的活性,同时促进孢子萌发,使得外源 DNA 能够顺利进入链霉菌细胞内。因此,热激处理温度和时间能够影响接合转移的效率。为了确定最适合链霉菌 SH-121 接合转移的热激条件,首先将质粒 pSET152 导入 *E. coli* S17-1 作为供体菌,在不同温度和时间下对受体孢子进行热激处理,结果发现 50 ℃ 热激 10 min 后的孢子的接合转移效率最高(图 3)。



A: 构建路线图; B: PCR 及酶切检测胶图。A: Strategy for construction of pYZ09; B: Agarose gel of PCR amplification of homologous fragments and restriction digestion of pYZ09 with *Xba* I and *Eco* R I. Lane 1 and 2 are PCR products of 2.67 and 3.04 kb homologous regions, respectively. Lane 5-14 are restriction digestion of pYZ09 respectively isolated from *E. coli* S17-1, DH10B/pUZ8002, DCDA/pUZ8002 and ET12567/pUZ8002.

图 2 基因敲除质粒 pYZ09 的构建

Fig.2 Construction of the plasmid pYZ09 for knockout of *orf82*

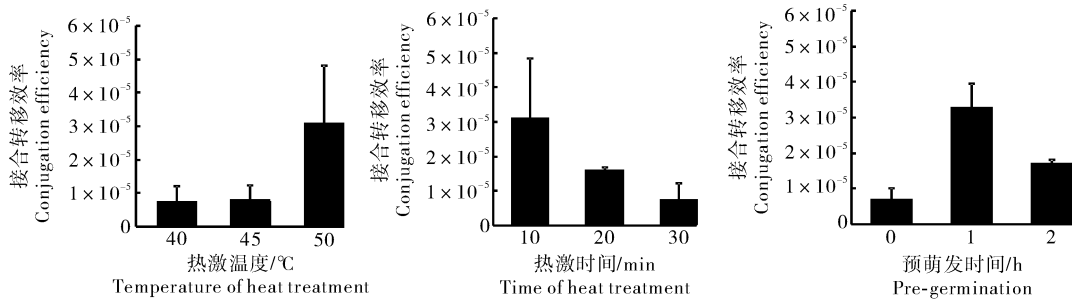


图 3 热激处理和预萌发时间对接合转移效率的影响

Fig.3 Influence of heat treatment and pre-germination time on conjugation frequency

预萌发处理有助于提高孢子的萌发效率,为接合转移过程提供更好的细胞条件。有的链霉菌需要较长时间的预萌发才能有较高的接合转移效率,而有的链霉菌则不需要预萌发的过程。为了确定最适合链霉菌 SH-121 接合转移的预萌发时间,我们检测了不同预萌发时间对接合转移的影响(图 3)。结果

发现在 37℃ 预萌发 1 h 的条件下,质粒的接合转移效率达到最高,为每受体 3.3×10^{-5} 个接合子。

2.5 供体宿主菌对接合转移效率的影响

为了测试链霉菌 SH121 的偏好性,选择甲基化丰富的 *E. coli* S17-1 和 DH10B/pUZ8002 以及不同程度甲基化缺陷的 *E. coli* DCDA/pUZ8002 (*dam*⁻ *dcm*⁻) 和 ET12567/pUZ8002 (*dam*⁻ *dcm*⁻ *hsd*⁻) 作为供体宿主菌。将质粒 pSET152 和 pYZ09 分别导入这些大肠杆菌细胞,获得相应的供体菌进行接合转移(图 4)。结果发现,pSET152 能够以 4 种大肠杆菌为供体宿主菌获得接合子,其中 *E. coli* DCDA/pUZ8002+pSET152 的接合转移效率最高,达到 2.06×10^{-4} ;只有以 *E. coli* DCDA/pUZ8002 为供体宿主菌时,pYZ09 才能成功地进入链霉菌 SH121,接合转移效率达到 1.96×10^{-5} 。

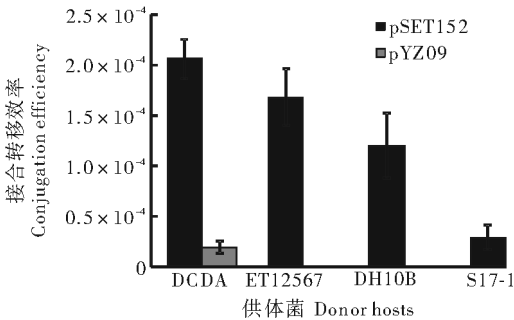


图 4 供体宿主菌对接合转移效率的影响
Fig.4 Effects of donor hosts on conjugation efficiency

2.6 供受比对接合转移效率的影响

供受比是指接合转移过程中供体大肠杆菌和链霉菌孢子混合时的细胞数量之比。理论情况下最佳供受比为 1:1,即 1 个大肠杆菌供体细胞与 1 个链霉菌受体孢子通过直接接触可以发生接合转移。但实际操作过程中发现使用较多的供体细胞可以提高接合转移的效率。将链霉菌 SH-121 在接合转移过程中的供受比提高至 100:1 时,其接合转移效率是 1:1 时的近 20 倍,而当供受比提高至 400:1 时,其效率仅为 100:1 时的 80% 左右(图 5)。表明:当供受比为 100:1 时接合转移的效率最高,如果使用超过这个比例的供体菌反而会使效率有所下降。这可能是因为系统中存在过多的供体大肠杆菌会竞争抑制受体菌的生长,从而阻碍接合转移的发生。

2.7 Mg²⁺ 对接合转移的影响

Mg²⁺ 与膜结构及功能的完整性有关,是酶活性中心的组成,有研究表明在培养基中加入一定量的 Mg²⁺ 能够提高接合转移的效率^[18]。我们在常用接

合转移培养基 M-ISP4 中添加不同浓度的 MgCl₂ (图 6),发现在未添加 MgCl₂ 的培养基上,无接合转移子产生;随着 MgCl₂ 浓度的增加,接合转移效率逐渐升高;MgCl₂ 浓度为 40 mmol/L 时接合转移效率最高,达到 1.03×10^{-3} (pSET152) 和 2.28×10^{-4} (pYZ09)。结果表明:Mg²⁺ 的存在可较大幅度地提高接合转移的效率,接合转移培养基中 Mg²⁺ 浓度有一个最佳的范围,超过这个范围都会使得接合转移效率降低。

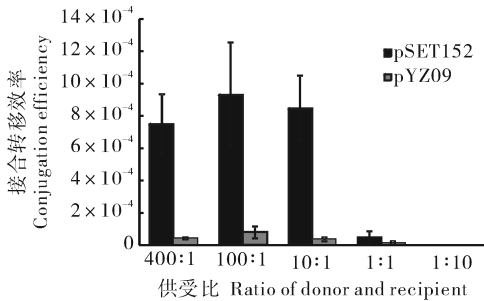


图 5 供受比对接合转移效率的影响
Fig.5 Effects of ratio of donor and recipient on conjugation efficiency

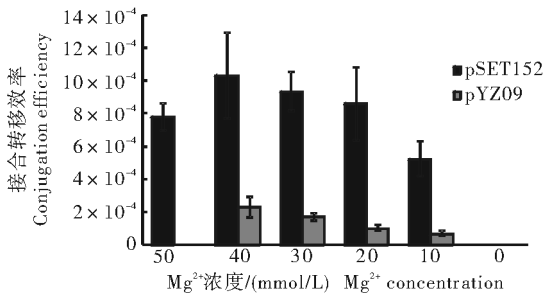
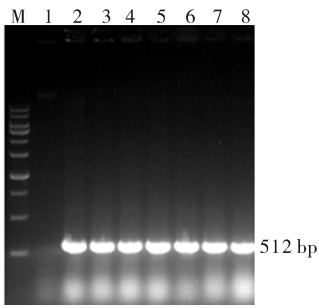


图 6 MgCl₂ 浓度对接合转移效率的影响
Fig.6 Influence of MgCl₂ concentration on conjugation frequency

2.8 接合转移子的验证

通过优化后的方法,不同类型的质粒 pSET152 和 pYZ09 均能以较高的频率导入链霉菌 SH121。这 3 种质粒都需整合到链霉菌宿主染色体上才能获得稳定的接合子。为了验证接合子的正确性,我们随机挑取了相应的接合子,抽提接合子的总 DNA,使用特异性引物扩增 512 bp 的阿伯拉霉素抗性基因片段,从而证实质粒 pSET152 和 pYZ09 通过接合转移成功进入链霉菌 SH121。验证结果如图 7,从接合子总 DNA 中扩增出来的 PCR 片段大小符合预期,而出发受体菌株的总 DNA 中没有扩增条带,从而证实接合子是正确的。



M:1 kb ladder; 1.野生型菌株; 2-4: pYZ09 的接合转移子; 5-8: pSET152的接合转移子 Lane 1: The wild type strain; Lane 2-4: pYZ09 of exconjugants; Lane 5-8: pSET152 of exconjugants.

图 7 接合转移子的 PCR 验证

Fig.7 PCR confirmation of exconjugants

3 讨论

当前由于抗生素的滥用而导致很大一部分细菌产生了耐药性,包括让人望而生畏的超级细菌,新型抗生素的需求显得日益迫切。据统计,自然界中 66%的抗生素来自放线菌科,而链霉菌属所产生的抗生素又占其中的 80%。很多由链霉菌所产生的抗生素已经在医学和农业领域得到了广泛的使用。对于抗生素生物合成基因簇的研究通常包括基因中断、基因敲除以及异源表达和超量表达等基因操作^[19-21],所以一个高效率的遗传操作系统对抗生素生物合成基因簇中目标基因的研究是非常重要的。此外,由于链霉菌是一个高度分化的种属,不同的链霉菌有不同的限制修饰系统,其遗传操作系统也不尽相同,需要根据自身菌株的特点,建立适用于链霉菌自身的遗传操作系统。本研究使用接合转移的方法来建立链霉菌 SH121 的遗传操作系统。不同的载体由于带有不同的元件而在基因操作中行使不同的功能,本研究为了能够更全面地建立天然产物生物合成基因簇的基因操作方法,选用了 2 种不同类型的载体(整合型载体 pSET152 和自杀型载体 pOJ260)来构建接合转移质粒,可以分别应用于基因的表达和敲除。

在本研究中,我们首先以整合型载体 pSET152 为接合转移质粒,大肠杆菌 S17-1 为供体宿主菌,对热激和萌发条件进行了初步的摸索,结果发现外源 DNA 可以通过接合转移进入链霉菌 SH121,但是效率很低,远远不能满足基因敲除和基因置换等实验的要求。为此,又对供体宿主菌、供受比、接合转移培养基中 Mg^{2+} 浓度等条件进行了优化,成功建立起高效的接合转移方法。使得质粒 pSET152 的

接合转移效率与原来相比提高了 3 个数量级,达到 1.32×10^{-3} ,基本能够满足后续基因功能研究的需要。在研究过程中我们关注各种细微条件因素对接合转移效率的影响。从最开始产孢培养基选择、抗性背景的测定到接合质粒的选取,这些虽然属于接合转移实验操作的前期工作,但是都能够直接影响接合转移的效率,甚至决定接合转移的成败。本研究发现供体菌的选择对接合转移系统的建立至关重要,如果选择的供体菌不适合宿主菌的遗传操作系统则很难获得接合转移子。实验表明链霉菌 SH121 对无甲基化修饰的供体菌 DCDA 提供的外源 DNA 更容易接受,而对甲基化修饰丰富的供体菌 S17-1 只有很少的结合子产生。说明链霉菌 SH121 有非常严格的限制修饰系统,很容易降解甲基化修饰丰富的外源 DNA。建立高效的链霉菌 SH121 的接合转移系统,使得各种遗传操作方法可以在该菌中顺利实施,为链霉菌 SH121 中活性天然产物的挖掘奠定基础。

参 考 文 献

[1] 林开春,史贤明,袁德军. 微生物与农业[M].北京:科学出版社,2004: 198-202.

[2] WEBER J M,WIERMAN C,HUTCHINSON C R. Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus* [J]. Journal of bacteriology,1985,164(1):425-433.

[3] HAEDER S,WIRTH R,HERZ H,et al. Candidicin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*[J]. PNAS, 2009,106(12):4742-4746.

[4] IKEDA H,NONOMIYA T,USAMI M,et al. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*[J]. PNAS, 1999,96(17):9509-9514.

[5] DU L,SANCHEZ C,CHEN M,et al. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase[J]. Chemistry & biology,2000,7(8):623-642.

[6] GAO X,HAYNES S W,AMES B D,et al. Cyclization of fungal nonribosomal peptides by a terminal condensation-like domain[J]. Nature chemical biology,2012,8(10):823-830.

[7] BISCHOFF D,BISTER B,BERTAZZO M,et al. The biosynthesis of vancomycin-type glycopeptide antibiotics-a model for oxidative side-chain cross-linking by oxygenases coupled to the action of peptide synthetases[J]. Chem Bio Chem,2005,6(2): 267-272.

[8] WALSH C T,O'CONNOR S E,SCHNEIDER T L. Polyketide-nonribosomal peptide epothilone antitumor agents: the EpoA,B,C

subunits[J]. Journal of industrial microbiology and biotechnology, 2003,30(8):448-455.

[9] 李娜,黄胜,何璟.链霉菌 GEMSM4(6)中聚酮合酶和非核糖体多肽合成酶基因的筛选及克隆[J].华中农业大学学报,2015,34(4):73-79.

[10] STEIN D C,GREGOIRE S,PIEKAROWICZ A. Restriction of plasmid DNA during transformation but not conjugation in *Neisseria gonorrhoeae* [J]. Infection and immunity,1988,56(1):112-116.

[11] FLETT F,MERSINIAS V,SMITH C P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes[J]. FEMS microbiology letters,1997,155(2):223-229.

[12] CHATER K F. Genetics of differentiation in *Streptomyces* [J]. Annual reviews in microbiology,1993,47(1):685-711.

[13] GREEN M R,SAMBROOK J. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 4th ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2012.

[14] KIESER T. Practical streptomyces genetics[M]. Norwich, UK:John Innes Foundation,2000.

[15] LUZHETSKYY A,FEDORYSHYN M,HOFFMEISTER D,et al. A gene cloning system for *Streptomyces cyanogenus* S136 [J]. Visn Lviv Univ Ser Biol,2002,29:62-69.

[16] ANZAI Y,IZAKA Y,LI W,et al. Production of rosamicin derivatives in *Micromonospora rosaria* by introduction of d-mycinnose biosynthetic gene with ΦC31-derived integration vector pSET152[J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology,2009,36(8):1013-1021.

[17] WANG Y,WANG Y,CHU J,et al. Improved production of erythromycin A by expression of a heterologous gene encoding S-adenosylmethionine synthetase[J]. Applied microbiology and biotechnology,2007,75(4):837-842.

[18] 余姣姣,陶美凤. 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[J]. 微生物学报,2010(11):1556-1561.

[19] 白亭丽,俞燕飞,徐钟,等. 变铅青链霉菌高效异源表达宿主 SBT5 的构建[J].华中农业大学学报,2014,33(1):1-6.

[20] 周威,张学文,庄以彬,等. 波卓霉素生物合成基因簇的异源表达及产量提高[J].华中农业大学学报,2015,34(1):49-58.

[21] 张怡,鲁洲,黄胜,等.链霉菌 SH-62 中肠菌素生物合成基因簇的克隆及异源表达[J].华中农业大学学报,2015,34(6):55-60.

Establishing intergeneric conjugation system in *Streptomyces carneohygroscopicus* SH121

YANG Zhuo LI Jiali XIAO Le HE Jing

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

Abstract *Streptomyces carneohygroscopicus* SH-121 isolated during selecting biocontrol agent of citrus diseases exhibits strong inhibition towards Gram positive bacteria and many pathogenic fungi in plant. Establishment of a highly efficient genetic manipulation system is critically required for functional analysing genes and genetic engineering in *Streptomyces*. In this study, the effects of heat treatment, pre-germination time, donor hosts, ratio of donor and recipient and MgCl₂ concentration in medium on conjugation efficiency were studied by single factor experiments. Under heat treatment at 50 °C for 10 min, pre-germination at 37 °C for 1 h, using *Escherichia coli* DCDA/pUZ8002 as donor host, with the ratio of donor to recipient being 100 to 1, supplementing M-ISP4 medium with 40 mmol/L MgCl₂, a highly efficient intergeneric conjugation method for SH-121 was developed with highest efficiency of 1.03×10^{-3} conjugants/ recipient. The integrative plasmid pSET152 and the plasmid pYZ09 for gene knockout was successfully transferred into SH-121 with the method newly established. It is indicated that this genetic manipulation system could be used to discover bioactive natural products and study their biosynthetic gene clusters in SH-121.

Keywords *Streptomyces carneohygroscopicus* SH-121; intergeneric conjugation; genetic manipulation; gene knockout

(责任编辑:张志钰)