

文章编号: 1004-4353(2015)04-0313-05

庆大霉素生物合成基因 *genB4* 的研究

温淑平, 林强, 洪文荣*

(福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350116)

摘要: 以庆大霉素生物合成基因簇为模版, 构建了 *genB4* 基因阻断质粒 pGB403. 经接合转移导入绛红色小单孢菌 G1008, 得到一株 *genB4* 基因缺失工程菌 GB4408. 对菌株 GB4408 的发酵产物进行了 TLC、HPLC 和 MS 分析, 结果表明 GB4408 不再合成庆大霉素 C 族组分, 而是积累中间代谢产物 G418、西索霉素和威大霉素, 阻断了从西索霉素到庆大霉素 C1a 的转化以及从威大霉素到庆大霉素 C2 的转化, 这可能是 *genB4* 基因参与了庆大霉素绛红糖胺 C4' 和 C5' 的双脱氢作用. 据此推论, 在菌株 GbK($\Delta genK$) 基础上敲除了 *genB4* 基因, 并成功获得一株主产西索霉素的工程菌 GbKB4, 进一步验证了 *genB4* 的功能.

关键词: 绛红色小单孢菌; *genB4*; 西索霉素

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A

Research of *genB4* in gentamicin biosynthesis gene cluster

WEN Shuping, LIN Qiang, HONG Wenrong*

(College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China)

Abstract: A recombinant plasmid pGB403 was constructed with gentamicin biosynthesis gene cluster as the template to study the function of *genB4*. Then, the plasmid pGB403 was transformed into *Micromonospora purpurea* G1008 by conjugation. A disrupt *genB4* was obtained, i. e., *emqineering strain* (GB4408). Its ferment extract was analysed by TLC, HPLC and MS. The GB4408 mainly produced accumulated intermediate G418, sisomicin and verdamycin instead of gentamicin C compounds. The metabolic flux from sisomicin to gentamicin C1a and from verdamycin to getamicin C2 were blocked. This result indicated that *genB4* might be responsible for the dehydrogenation at C4'-C5' of purpurosamine. Based on the speculation, *genB4* was disrupted in the strain GbK($\Delta genK$), and the strain GbKB4 mainly produced sisomicin was successful constructed, which further verified the function of *genB4*.

Key words: *Micromonospora purpurea*; *genB4*; sisomicin

庆大霉素是由小单孢菌发酵液中分离得到的一组广谱抗生素, 包含庆大霉素 C1、C1a 和 C2 等组分. 在化学结构上, 庆大霉素由 2-脱氧链霉胺 (2-DOS)、绛红糖胺和加洛糖胺 3 部分组成. 研究^[1-3]发现, 庆大霉素的生物合成是从 X2 开始, 分为 2 条路线(图 1): 一条经 JI-20A、西索霉素合成庆大霉素 C1a; 另一条经 G418、JI-20B、威大霉素合成庆大霉素 C2, 并最终合成庆大霉素 C1.

2 条合成路线的酶促反应只对绛红糖胺进行修饰. 近年来, 不同菌株的庆大霉素生物合成基因簇陆续被公布出来. F. Kudo 等^[1]通过与妥布霉素、卡那霉素生物合成基因簇比较, 推测 *genB4* 为 B 型的氨基转移酶基因. Guo J. H. 等^[4]通过基因失活研究, 推测基因 *genB4* 与绛红糖胺 C3', 4'-双脱羟基有关. 本实验组^[5]也对 *genB4* 基因进行了失活, 结果产生了带有新化合物的复杂组分的产物,

但是否由 *genB4* 单基因失活而导致这一结果仍有待进一步验证;因此,有必要重新对 *genB4* 基因进行敲除.

本文通过基因框内敲除方法,重新设计引物,构建同源重组质粒,阻断绛红小单孢菌 G1008 中 *genB4*(1 338 bp)的表达,并借助分析代谢物的变化,进一步研究 *genB4* 基因在庆大霉素生物合成过程中所起到的作用.

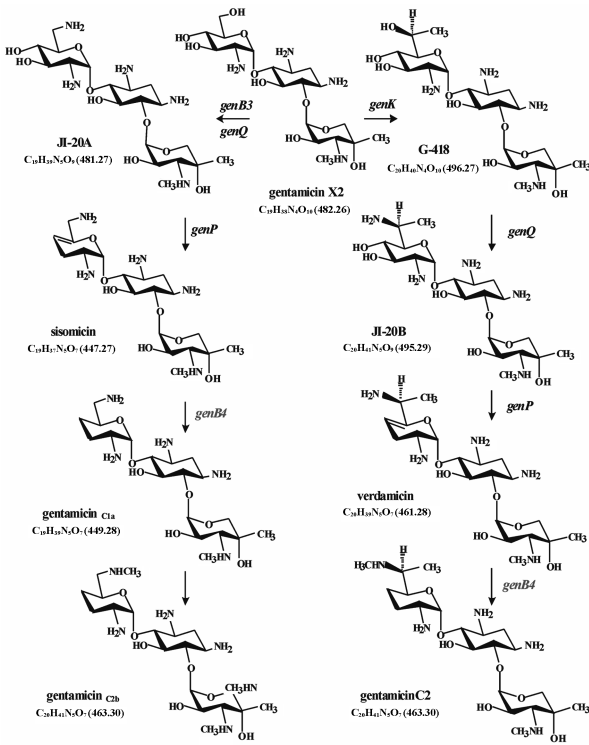


图 1 庆大霉素生物合成途径

1 材料与方法

1.1 材料

1) 质粒与菌株. 克隆载体使用 pMD19-T(日本 TaKaRa),用温敏型自杀质粒 pKC1139^[6]作为大肠杆菌—链霉菌属间穿梭载体. 用 *E. coli* Top10

作为质粒克隆宿主菌,用短小芽孢杆菌[CMCC (B) 63202]作为抗生素微生物检定菌,用 *E. coli* ET12567(pUZ8002)^[7]作为大肠杆菌—链霉菌属间接转移供体菌,用绛红色小单孢菌 G1008 和 GbK(Δ *genK*)作为接合转移受体菌.

2) 培养基与抗生素. 绛红色小单孢菌斜面培养基、种子培养基、发酵培养基以及孢子预萌发培养基参照文献[8]. 抗生素微生物检定培养基 I 参照 2010 版《中华人民共和国药典》,大肠杆菌培养使用 LB 培养基,各培养基根据需要添加相应的抗生素. 本研究使用的抗生素作用浓度分别为:氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$,安普霉素 50 $\mu\text{g/mL}$,氯霉素 25 $\mu\text{g/mL}$,卡那霉素 25 $\mu\text{g/mL}$,萘啶酮酸 25 $\mu\text{g/mL}$.

3) 工具酶与试剂. 限制性核酸内切酶、T4 DNA Ligase、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker 和 Proteinase K(日本 TaKaRa 公司);DNA 凝胶回收试剂盒、RNase A 酶和溶菌酶(上海生工生物工程股份有限公司);其他常规试剂见参考文献[9].

1.2 方法

1) 引物设计. 以基因库(Genebank)公布的庆大霉素生物合成基因簇(登录号:JQ975418)为模板,利用生物信息学软件 Vector NTI11.5 设计两对引物扩增 *genB4* 基因上下游序列作为同源交换臂:引物 P1/P2 用于扩增上游交换臂 B41,引物 P3/P4 用于扩增下游交换臂 B42. 设计引物 P5/P6 用于 *genB4* 基因阻断突变株的验证. 所有引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物位置与扩增片段长度如图 3 所示,引物序列及其限制性酶切位点见表 1.

2) DNA 分子操作. PCR、质粒 DNA 抽提、大肠杆菌感受态细胞的制备、酶切、酶连和转化等常

表 1 研究 *genB4* 所用引物

Primers		Sequence	Restriction enzyme
P1	5'-	GAATTC CGAACACCATGCATCAGCAG-3'	<i>EcoR</i> I
P2	5'-	AAGCTT GTTGATGTTTCGACGTGGTGC-3'	<i>Hind</i> III
P3	5'-	AAGCTT AACGTCGTACCGTAGTCCCG-3'	<i>Hind</i> III
P4	5'-	TCTAGA GGTCGGTTTCGGGTACAACG-3'	<i>Xba</i> I
P5	5'-TTCCGCCCGGATCAGTTCTG-3'		
P6	5'-ATGACGGACCTGTCGGCAA-3'		

规分子克隆操作参照文献[10]. 绛红色小单孢菌基因组 DNA 的提取和接合转移参照文献[11].

3)工程菌发酵及产物提取分析. 绛红色小单孢菌发酵及产物提取方法参照文献[8],生物效价测定参照 2010 版《中华人民共和国药典》. 提取的产品采用硅胶 GF254 薄层层析(TLC)和 HPLC 进行初步检测, TLC 展开剂为氯仿-甲醇-氨水(1:1:1,体积比),混合均匀后静置 5 min,展开; HPLC 参照 2010 版《中华人民共和国药典》,组分的精确测定采用质谱法.

2 结果与讨论

2.1 重组质粒 pGB403 的构建

提取绛红色小单孢菌 G1008 基因组 DNA, 并以其为模板,PCR 扩增 *genB4* 上下游交换臂 B41 和 B42. 将这两条交换臂分别克隆至 pMD19-T 载体,得到中间质粒 pGB401 和 pGB402. 质粒 pGB401 用 *Hind* III 和 *Eco* R I 酶切,回收 1 963 bp 片段;质粒 pGB402 用 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切,回收 2 019 bp 片段;pKC1139 用 *Xba* I 和 *Eco* R I 酶切,回收 6 446 bp 片段. 将以上 3 个片段酶连,酶连样转化 Top10 感受态细胞,筛选阳性克隆子,最终获得重组质粒 pGB403. 用 *Eco* R I 和 *Xba* I 对 pGB403 进行酶切,酶切样经电泳检测(图 2)有两条带与理论值(6 446 bp 和 3 994 bp)相符,最后通过测序验证,证明质粒 pGB403 为正确质粒.

2.2 GB4408 菌株的构建

将重组质粒 pGB403 转化 *E. coli* ET 12567

(pUZ8002)得到接合转移供体菌 *E. coli* ET12567 (pGB403/pUZ8002),绛红色小单孢菌 G1008 的孢子作为接合转移受体菌. 按照接合转移方法,将孢子悬液与供体菌混合,稀释涂布于平板培养基,于 37 ℃ 培养约 20 h 后,再用含安普霉素和萘啶酸的水溶液覆盖,继续培养直至在平板上长出接合子.

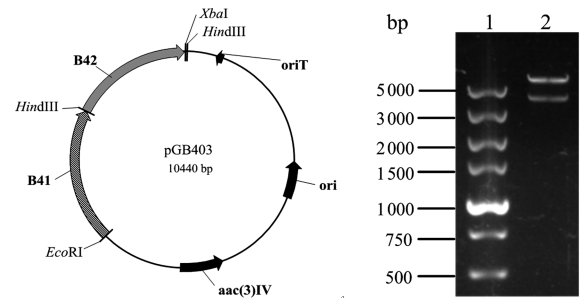
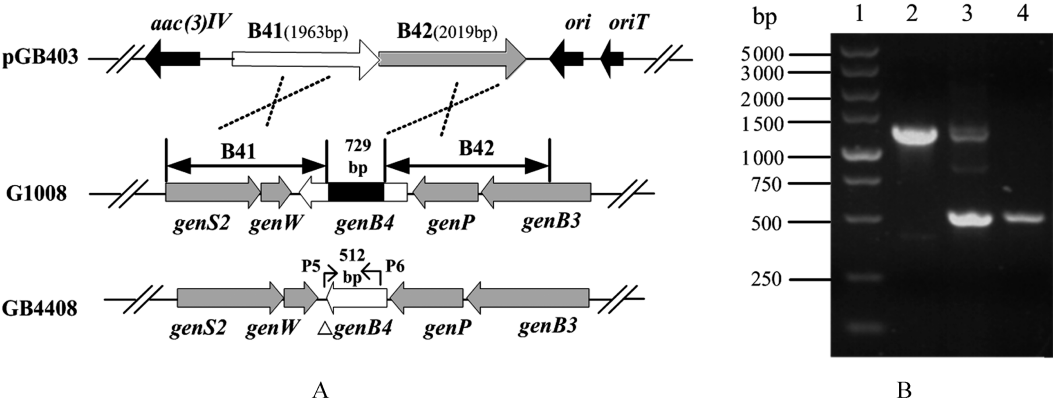


图 2 质粒 pGB403 酶切电泳检测图(1:PGB403, *Xba* I /*Eco* I ; 2:DL 5 000 Marker)

选取一株长势较好的接合子,提取基因组 DNA,用 P5/P6 引物进行 PCR 扩增验证. 如果得到两条片段,分别为 1 241 bp 和 512 bp,那么说明其为单交换工程菌. PCR 产物电泳结果与预期相符(图 3B),这表明重组质粒 pGB403 已成功整合到绛红色小单孢菌 G1008,即单交换突变株菌,将其命名为小单孢菌 GB41.

由于单交换菌株具有同源性极高的片段,不稳定,容易发生 2 次同源重组,获得 *genB4* 基因缺失双交换菌株或回复突变菌株,质粒 pGB403 与 G1008 同源重组示意图如图 3A 所示.



1:DL 5 000 Marker; 2:G1008(P5/P6); 3:GB41(P5/P6); 4:GB4408(P5/P6)

图 3 GB4408 基因组 DNA PCR 产物电泳图

将单交换菌株 GB41 于 37 ℃、不含抗生素的斜面上松弛培养 3 代,然后分离单菌落,通过单菌落影印点板方法进行筛选.经筛选,从 408 株菌株中获得 2 株在抗性平板上不生长,而在无药平板上正常生长的单菌落.为验证其是否为目的工程菌,选取其中一株长势良好的菌株,提取其基因组 DNA,然后利用双交换鉴定引物 P5/P6 进行 PCR 验证.如果电泳只检测到 512 bp 的片段,而未检测到 1 241 bp 的片段,那么该菌株即为双交换工程菌.电泳检测结果表明所挑选的菌株为双交换工程菌,将其命名为 GB4408,如图 3 所示.将 PCR 产物测序后,其结果进一步说明 GB4408 工程菌缺失了 *genB4* 基因 729 bp.

2.3 GB4408 菌株的代谢产物分析

GB4408 的发酵液经树脂吸附、乙醇沉淀等处理之后,获得粗制样品.将样品进行 TLC 分析,结果如图 4.图中主要有 3 个斑点,与标准品相比,未合成庆大霉素 C1、C1a、C2 等庆大霉素 C 族组分,转而合成其他庆大霉素中间体.

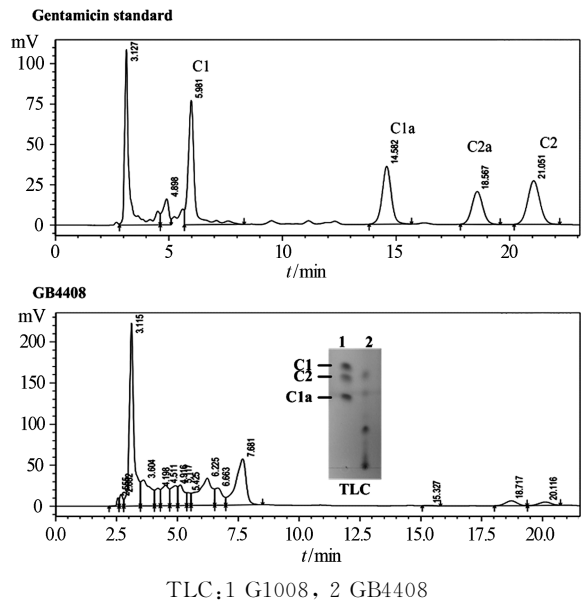


图 4 GB4408 菌株代谢产物的 TLC 和 HPLC 分析

按照《中华人民共和国药典》^[12],对 GB4408 代谢产物进行 HPLC 分析,检测结果见图 4.庆大霉素标准品各组分的保留时间分别为:C1(5.98 min),C1a(14.58 min),C2a(18.57 min),C2(21.05 min).GB4408 的粗制样品中的 3 个主峰,保留时间分别为 7.68、18.72、20.12 min,这与庆大霉素标准

品的保留时间无一相符.由此进一步表明 GB4408 的代谢产物没有庆大霉素 C 族组分.

为精确确定 GB4408 代谢产物的组分,采用 MS 分析,结果如图 5 所示.图中主要离子峰有 4 个,分别为 448.3(西索霉素)、462.3(威大霉素)、476.3(威大霉素 C6' 位甲基化产物)、497.3(G418).231.6 和 249.1 分别为威大霉素和 G418 的双电荷峰,322.2 为碎片峰.这说明工程菌 GB4408 不再合成庆大霉素 C 族组分,而是积累中间代谢产物 G418、西索霉素和威大霉素,阻断了西索霉素到庆大霉素 C1a 和威大霉素到庆大霉素 C2 的转化,据此推测 *genB4* 参与庆大霉素绛红糖胺 C4' 和 C5' 的双脱氢作用.

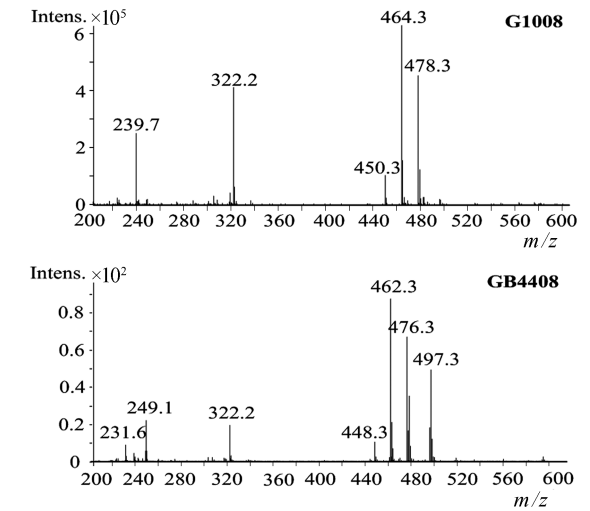
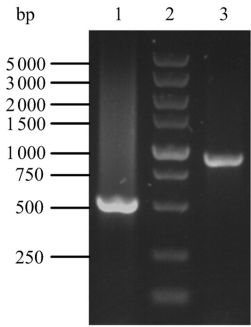


图 5 GB4408 菌株代谢产物的 MS 分析

2.4 GbKB4 工程菌的构建

绛红小单孢菌 GbK 菌高产庆大霉素 C1a,且 *genK* 基因失活,阻断了从庆大霉素 X2 至 G418 的转化.根据对 *genB4* 基因功能的推测,若在菌株 GbK 上继续敲除 *genB4* 基因,则有望获得西索霉素的工程菌.

利用上述方法,将供体菌 ET12567/(pGB403/pUZ8002)与 GbK($\Delta genK$)的孢子进行接合转移,7 d 后长出 2 株接合子,挑取长势良好的一株(命名为 GbKB4-1).将其转接至小单孢菌种子培养基,松弛培养 4 代后开始分离单菌落,并影印到含 50 μ /mL 安普霉素和不含抗生素的平板上,筛选后获得工程菌 GbKB4,提取其基因组 DNA,用引物 P5/P6 进行 PCR 验证,电泳检测见图 6.



1: GB4408(P5/P6); 2: DL 5 000 Marker; 3: GbK(P5/P6)

图 6 GbKB4 基因组 DNA PCR 产物电泳图

2.5 工程菌 GbKB4 发酵及代谢产物分析

按照同样的方法,对工程菌 GbKB4 进行发酵及代谢产物的提取,组分分析采用 HPLC,见图 7.以西索霉素标准品作对照,按照庆大霉素的流动相来分析,西索霉素标准品出峰的保留时间为 18.64 min. GbKB4 粗制样品有 2 个主峰,保留时间分别为 6.21 min 和 18.63 min. 其中后者与标准品的出峰时间大致相符,由此初步确认其为西索霉素.

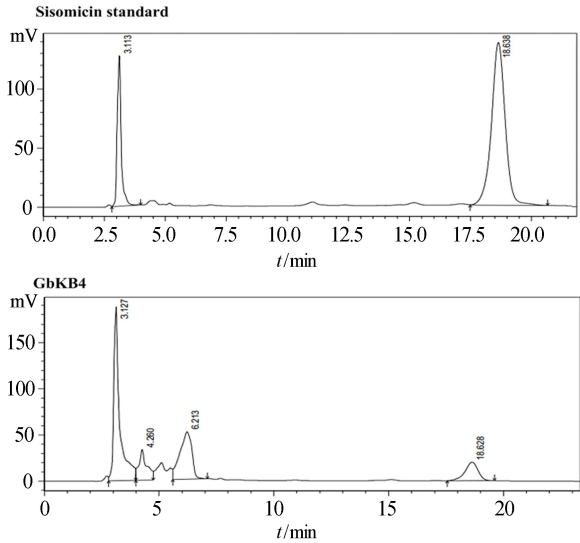


图 7 GbKB4 菌株代谢产物的 HPLC 分析

精确组分分析采用质谱检测,如图 8 所示. GbKB4 工程菌离子峰 448[M+H]⁺、470[M+Na]⁺、486[M+K]⁺,它们与西索霉素分子量同质. 离子峰 483[M+H]⁺,它与中间代谢产物庆大霉素 X2 同质. 242[M+H]⁺为庆大霉素 X2 双电荷峰,其他峰为碎片峰或杂质峰. 这表明 GbKB4 菌株中敲除 *genB4* 基因,阻断了西索霉

素转化庆大霉素 C1a,由此获得了一株主产西索霉素工程菌,同时也验证了 *genB4* 基因的功能.

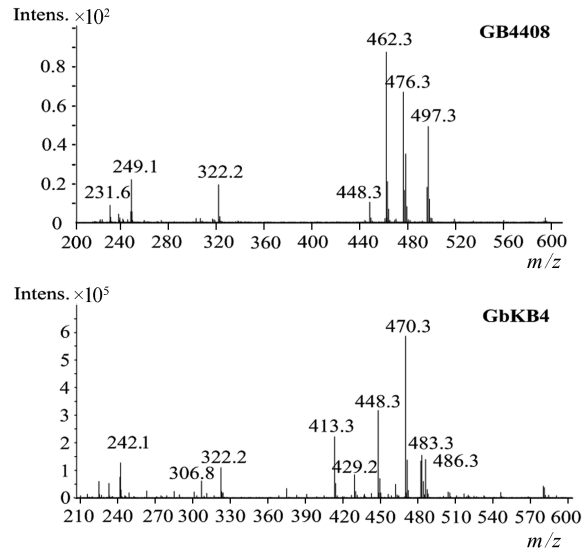


图 8 GbKB4 菌株代谢产物的 MS 分析

3 结论

本文在绛红色小单孢菌 G1008 中,对庆大霉素生物合成基因 *genB4* 进行框内敲除,获得工程菌 GB4408. 对其代谢产物分析,发现其不再合成庆大霉素 C 组分,而是积累中间代谢产物 G418、西索霉素和威大霉素. *genB4* 基因的失活,阻断了从西索霉素到庆大霉素 C1a 的转化以及从威大霉素到庆大霉素 C2 的转化,推测 *genB4* 基因参与了庆大霉素绛红糖胺 C4'和 C5'的双脱氢作用. 由此推测,在 *genK* 基因阻断工程菌 GbK 的基础上敲除 *genB4* 基因后获得 *genK* 和 *genB4* 双基因失活的工程菌 GbKB4. 将 GbKB4 发酵后,提取其代谢产物,经 HPLC 和 MS 分析结果表明,工程菌 GbKB4 主要积累中间体西索霉素和庆大霉素 X2. 与工程菌 GB4408 相比,工程菌 GbKB4 不再合成 G418 和威大霉素,因此本文成功地构建了一株主产西索霉素的工程菌,同时也进一步验证了 *genB4* 基因的功能.

参考文献:

[1] Kudo F, Eguchi. Biosynthetic genes for aminoglycoside Antibiotics[J]. The Journal of Antibiotics, 2009,62:471-481.

- [2] Unwin J, Standage S, Alexander D, et al. Gene cluster in *Micromonospora echinospora* ATCC 15835 for the biosynthesis of the gentamicin C Complex[J]. The Journal of Antibiotics, 2004,57(7):436-445.
- [3] Aboshanab K. Genetic studies on the biosynthesis of the major aminoglycoside antibiotics. Dissertation[D]. Wuppertal: Bergische Wuppertal University, 2005.
- [4] Guo J H, Huang F L, Huang C, et al. Specificity and promiscuity at the branch point in gentamicin biosynthesis [J]. Chemistry & Biology, 2014,21:608-618.
- [5] 洪文荣,张熠,张书祖,等.庆大霉素生物合成基因研究进展[C]//十二届全国抗生素学术会议论文集.四川:中国抗生素杂志社,2013:452-466.
- [6] 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.
- [7] Paranthaman S, Dharmalingam K. Intergeneric conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. strain C5: chromosomal integration and expression of recombinant plasmids carrying the *chiC* gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003,69(1):84-91.
- [8] Hong W R, Yan L B. Identification of *gntK*, a gene required for the methylation of purpurosamine C-6' in gentamicin biosynthesis[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2012,58(5):349-356.
- [9] Tobias K, Bibb M, Mark J B, et al. Practical Streptomyces Genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [10] Bierman M, Logan R, Obrien 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.
- [11] 严凌斌,洪文荣,方志锴,等.绛红色小单孢菌 G1008 接合转移体系的构建[J].中国抗生素杂志,2011,36(12):899-904.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].2部.北京:中国医药科技出版社,2010:976-977.