

文章编号: 1004-4353(2016)01-0023-06

# *sisI* 替换 *genP* 在绛红小单孢菌 G1008 中的功能表达

陈成立, 林艺辉, 林共德, 洪文荣\*  
(福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350116)

**摘要:** 将依纽小单孢菌 3',4'-双脱羟基基因 *sisI* 组合到绛红小单孢菌 G1008 中, 替代其中的同工异源酶基因 *genP*, 研究 *sisI* 基因异源表达的内在特征. 以温敏型质粒 pKC1139 作为克隆载体, 构建 *sisI* 替换 *genP* 的重组质粒 pIP303, 利用接合转移技术, 将穿梭质粒导入绛红小单孢菌 G1008 基因组, 影印筛选并通过 PCR(聚合酶链式反应)鉴定, 获得一株基因重组工程菌 GIP95. 借助 TLC(薄层色谱)、HPLC(高效液相色谱)和 MS(质谱)检测代谢产物组分及结构变化, 结果表明突变株 GIP95 的代谢流未被阻断, 仍能够合成庆大霉素 C 族组分. 由此得出结论, 外源基因依纽小单孢菌 3',4'-双脱羟基基因 *sisI* 参与了庆大霉素生物合成中绛红糖胺 3',4'-双脱羟基这一关键步骤, 在绛红小单孢菌 G1008 中实现异源表达.

**关键词:** 依纽小单孢菌; *sisI*; *genP*; 3',4'-双脱羟基基因; 绛红小单孢菌

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A

## Study of the funtional expression of gene *sisI* replacing the *genP* in *Micromonospora purpurea* G1008

CHEN Chengli, LIN Yihui, LIN Gongde, HONG Wenrong\*  
( College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China )

**Abstract:** To research the heterologous expression of the inherent characteristics, *sisI* from *Micromonospora inyoensis*, which was presumed to be 3',4'-double dehydroxylase gene, was assembled into *Micromonospora purpurea* G1008 and replaced the isoschizomer gene *genP*. Using the temperature-sensitive plasmid pKC1139 as cloning vector, the recombinant plasmid pIP303 for *sisI-genP* gene replacement was constructed and introduced into *Micromonospora purpurea* G1008 by conjugation. The combination mutant GIP95 was screened out by replica plating and PCR identification. Using TLC, HPLC and MS to analyze the components and structure changes of the metabolites. The results showed that the metabolic flow of the strain GIP95 was not blocked, which can still synthesize gentamicin C components. Gene *sisI* presumed to be 3',4'-double dehydroxylase gene from *Micromonospora inyoensis* was responsible for 3',4'-double dehydroxylation of the magenta sugar amine in the biosynthesis of gentamicin, completing the heterologous expression in *Micromonospora purpurea* G1008.

**Keywords:** *Micromonospora inyoensis*; *sisI*; *genP*; 3',4'-double dehydroxylase gene; *Micromonospora purpurea*

氨基糖苷类抗生素是一类重要的广谱抗感染药物,是临床应用中的重要的一线药物,它与  $\beta$ -内

酰胺类抗生素协同作用,更易于进入病原细胞发挥作用<sup>[1]</sup>. 随着耐药菌的出现,一些研究人员尝试

对天然氨基糖苷类抗生素进行修饰和改造,以提高药效和抗菌活性. Umezawa 等<sup>[2]</sup>利用铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)合成的磷酸转移酶(APH),获得 3′-脱羟卡那霉素 A(妥布霉素)和 3′,4′-双脱羟卡那霉素 B(地贝卡星). 邵雷等<sup>[3]</sup>将庆大霉素产生小单孢菌中的 *genP* 转至大肠杆菌 BL21(DE3)中进行异源表达,获得纯化的 *genP* 蛋白,并催化卡那霉素 B 合成 3′-磷酸卡那霉素 B.

绛红糖胺 3′,4′-双脱羟基酶作用于糖胺基团,脱去 3′和 4′位羟基后,成为某些氨基糖苷类药物合成的关键酶. 该酶修饰作用是临床应用半合成氨基糖苷类抗生素的主要修饰方式,经过这一步骤修饰后的氨基糖苷类抗生素具有更强的耐钝化酶活性<sup>[4]</sup>. 庆大霉素的生物合成亦是由绛红糖胺 3′,4′-双脱羟基的修饰过程来合成庆大霉素 C1 和 C2b. 根据生物信息学技术的推测,结合参与绛红糖胺 3′,4′-脱羟基酶功能基因的相关研究结果,表明基因 *sisI* 与 *genP* (*gtmJ*)是参与绛红糖胺 3′,4′-脱羟基的同工异源酶基因<sup>[5-6]</sup>.

本文利用组合生物合成技术,将依纽小单孢菌绛红糖胺 3′,4′-双脱羟基酶基因 *sisI* 导入到绛红小单孢菌中,置换基因 *genP*,以实现 *sisI* 基因功能的异源表达,为进一步研究外源基因的表达奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 *E. coli* Top10、大肠杆菌 *E. coli* ET12567 (pUZ8002)<sup>[7]</sup>、依纽小单孢菌 TS388 和绛红小单孢菌 G1008 均由本实验室保藏;克隆载体 pMD-19T 购自 Takara 公司,温敏型质粒 pKC1139(*aac*(3) *IV*)<sup>[8]</sup>,oriT)为本实验室提供.

1.1.2 培养基和抗生素 绛红小单孢菌 G1008 固体培养基、种子培养基、发酵培养基和孢子预萌发培养基均参见文献<sup>[9]</sup>. 绛红小单孢菌菌丝体生长培养基和细菌生长培养基分别为 YEME 培养基<sup>[10]</sup>和 LB 培养基.

抗生素及其浓度分别为:安普霉素 100 mg/L、氯霉素 25 mg/L、卡那霉素 50 mg/L、氨苄青霉素

100 mg/L、萘啶酸 25 mg/L.

1.1.3 主要试剂和仪器 Taq DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶和限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司;RNase A 酶、溶菌酶、Proteinase K 和 DNA 凝胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司;732 型阳离子树脂购自上海华震科技有限公司;其余化学试剂均为分析纯或色谱纯. 隔水式恒温培养箱 GNP-9080 型,上海精宏实验设备有限公司生产;台式恒温振荡器 THZ-D 型,太仓市实验设备厂生产;生物显微镜 B203,重庆奥特光学仪器厂生产.

1.2 方法

1.2.1 引物设计 以 GeneBank 公布的依纽小单孢菌生物合成基因簇(登记号:JF431003)为模板,设计扩增目的基因 *sisI* 的引物 PI1/PI2;以庆大霉素生物合成基因簇(登记号:JQ975418)为模板,设计 *genP* 的同源交换臂引物:PB1/PB2 用于扩增上游交换臂 PB1, PB3/PB4 用于扩增下游交换臂 PB2. 本文所用引物序列及限制酶见表 1.

表 1 研究 *sisI* 与 *genP* 所用的引物

交换臂	序 列	限制酶
PI1	5′-TCTAGA-TCACACCGAGATCTGCCACA-3′	<i>Xba</i> I
PI2	5′-TCTAGA-CTAGAATGGAACCAGGACGT-3′	<i>Xba</i> I
PB1	5′-GAATTC-AGTTCACCTGCCGCTGCC-3′	<i>EcoR</i> I
PB2	5′-TCTAGA-CTCGTCGTCTGCCACGGTGA-3′	<i>Xba</i> I
PB3	5′-TCTAGA-CATCTTCACCGCCCTGTGCG-3′	<i>Xba</i> I
PB4	5′-AAGCTT-CACCGCTCTGTCTGTGCTG-3′	<i>Hind</i> III
PI5	5′-ACAGAACTGACCCGGACCCT-3′	
PI6	5′-GTGGCAGACGACGAGTCTAG-3′	

1.2.2 DNA 操作技术 依纽小单孢菌与绛红小单孢菌基因组提取方法参照链霉菌遗传操作手册<sup>[10]</sup>. PCR、质粒 DNA 的小量提取、酶切、酶连以及大肠杆菌感受态细胞制备及转化等常规分子遗传学操作方法参照分子克隆实验手册<sup>[11]</sup>.

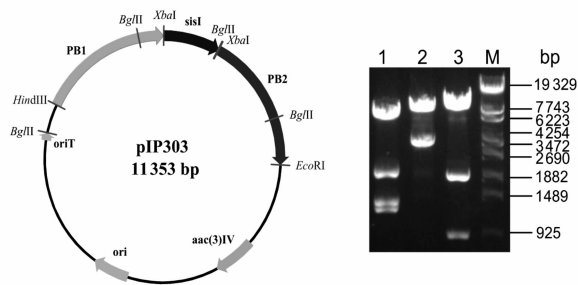
1.2.3 接合转移 大肠杆菌与绛红小单孢菌间的接合转移方法参照文献<sup>[9]</sup>.

1.2.4 代谢产物提取及组分分析 绛红小单孢菌发酵培养及其代谢产物的分离提取参照文献<sup>[9]</sup>;TLC 和 HPLC 参照《中华人民共和国药典》(2010 版)<sup>[12]</sup>;MS 分析采用安捷伦 6520 四级杆飞行时间串联质谱仪.

## 2 结果与分析

### 2.1 重组穿梭质粒 pIP303 的构建

采用方法 1.2.1 中的引物,PCR 扩增依组小单孢菌 TS388 中的目的基因 *sisI* (870 bp),同时扩增基因 *genP* 的上游同源交换臂 PB1 和下游同源交换臂 PB2. 将基因 *sisI*、同源交换臂 PB1 和 PB2 的 DNA 片段分别克隆到 pMD-19T 载体上,获得中间质粒 pTI101、pTB201 和 pTB302,经酶切验证质粒正确. 质粒 pTI101 经 *Xba* I 单酶切,回收 *sisI* 片段;质粒 pTB201 经 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切,回收 PB1 片段;质粒 pTB302 经 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切,回收 PB2 片段;此外,质粒 pKC1139 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切,回收 6 419 bp 大片段. 将上述酶切回收的 4 个片段以 T4DNA 连接酶进行混合酶连,克隆得到重组质粒 pIP303. 重组质粒中存在 4 个 *Bgl* II 酶切位点,将质粒切割为 6 680、2 084、1 357 bp 和 1 232 bp 4 个片段;重组质粒经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切,可切割为 7 851 bp 和 3 502 bp 2 个片段;重组质粒经 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切,切割为 8 443、2 034 bp 和 876 bp 3 个片段. 重组质粒 pIP303 经上述酶切验证,通过琼脂糖凝胶电泳检测表明电泳条带大小与理论分析一致(图 1). 进一步对重组质粒进行测序,证明该质粒正确.



A) 重组质粒 pIP303 图谱 B) 质粒 pIP303 酶切验证图

图 1 质粒 pIP303 的物理图谱和验证

### 2.2 基因 *sisI* 替换 *genP* 突变菌株的筛选与鉴定

参照方法 1.2.3 中的绛红小单孢菌接合转移技术,将同源重组质粒 pIP303 导入绛红小单孢菌 G1008 基因组中. 质粒 pIP303 携带链霉菌温敏型复制起始位点 psG5 ori,当温度高于 34 ℃ 时,其不能在绛红小单孢菌 G1008 中游离存在;因而需

在 37 ℃ 条件下,以及在安普霉素和萘啶酸 2 种抗生素筛选下,只有由质粒 pIP303 整合到 G1008 基因组中的单交换菌株才能在含相应抗生素的固体平板上生长. 选择其中长势较好,产孢能力较强的一株菌株,命名为绛红小单孢菌 GI12,将其转点至含有安普霉素 50 mg/L 和萘啶酸 25 mg/L 的固体平板上培养,同时清除可能夹杂的大肠杆菌和 G1008.

根据同源重组模型(图 2),提取单交换菌株 GI12 基因组为模板,利用引物 PI1/PI2 扩增得到外插入基因 *sisI* 的 876 bp 片段,该引物不能扩增 *genP* 基因,如电泳图 3 所示. PCR 产物经电泳检测与理论一致,证实 GI12 为单交换菌株.

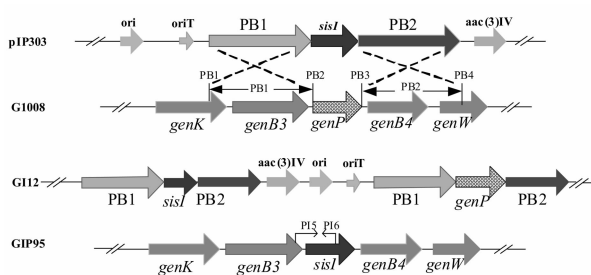
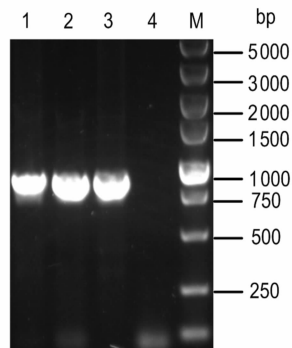


图 2 重组质粒 pIP303 与 G1008 基因组 DNA 同源重组示意图

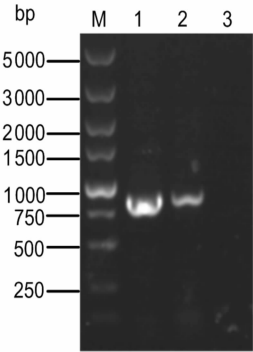


1. TS388 (PI1/PI2); 2. GI12/(PI1/PI2); 3. GI12 (PI1/PI2); 4. G1008(PI1/PI2); M. DL5000 marker

图 3 单交换菌株的 PCR 鉴定

单交换菌株具有遗传不稳定性,在松弛培养条件下,易发生 2 次同源重组,因此,可筛选出发生基因替换的目的突变株. 单交换菌株 GI12 经松弛培养至第 4 代后,开始分离单菌落直至第 8 代. 利用影印平板法筛选双交换菌株,将单菌落分别影印至含有安普霉素抗性和无抗平板上,最后获得 18 株安普霉素敏感菌株,这些菌株可能是目的突变菌株,也可能是回复突变菌株. 采用孢子

PCR 进行初步验证,其中 1 株可能为目的突变株.对该菌株进行斜面培养,提取其基因组 DNA,采用双交换验证引物 PI5/PI6 进行 PCR 扩增,电泳检测结果表明其与理论分析一致,如图 4 所示.进一步进行 DNA 测序,测序结果表明与 *sisI* 基因一致,证实基因 *sisI* 已成功替换 *genP*,由此表明获得基因组合突变菌株,将其命名为 GIP95.



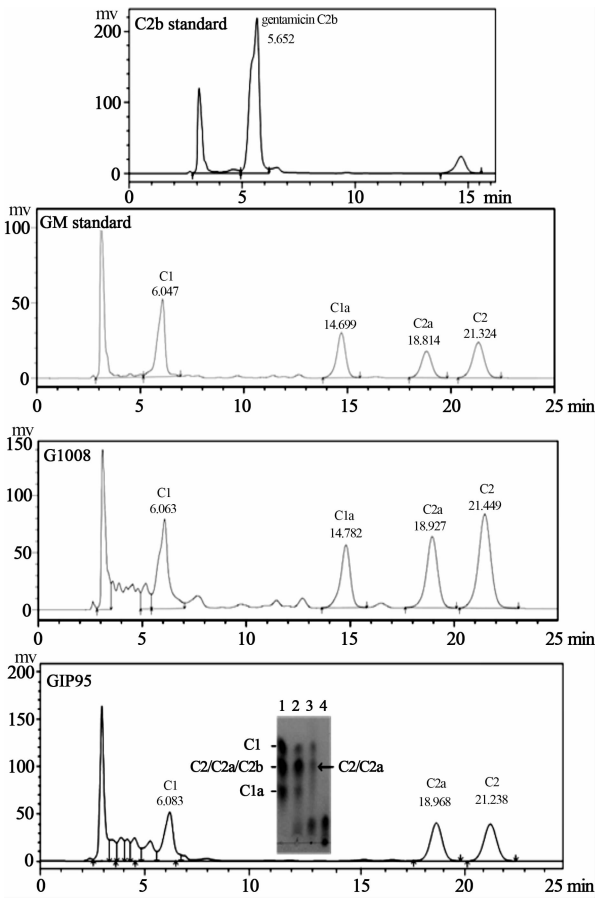
M. DL5000; 1. GIP95/(PI5/PI6); 2. GIP95/(PI5/PI6); 3. G1008/(PI5/PI6)

图 4 突变株 PCR 产物电泳检测结果

工程菌 GIP95 经斜面培养 3 代,相对于出发菌 G1008,其形态特征未出现显著变化,其生长状态和产孢能力良好,可见其遗传性状稳定.对菌株 GIP95 进行摇瓶发酵,同时以亲株 G1008 作为平行对照.

2.3 绛红小单孢菌 GIP95 的代谢产物分析

将预处理的发酵液经 732 氨型树脂吸附,用体积分数为 5% 的氨水洗脱后浓缩至少量,再用乙醇浸提,得到粗制样品.利用 TLC、HPLC 和 MS 检测,通过对 GIP95 的代谢产物与亲株 G1008 进行比较,分析基因 *sisI* 置换 *genP* 对庆大霉素代谢流的影响. TLC 和 HPLC 检测结果如图 5 所示:G1008 主要产 C1、C1a、C2a 和 C2,而 GIP95 代谢产物有 C1、C2 和 C2a.由此可初步断定 GIP95 实现了 *sisI* 在绛红小单孢菌 G1008 中的基因功能表达.通过 MS 进一步检测显示, G1008 代谢物质谱图有 3 个主峰,分子量分别为 450. 3 (C1a)、464. 3 (C2、C2a、C2b) 和 478. 3 (C1),而 GIP95 代谢产物的质谱图主峰为 464. 3 (C2、C2a)、478. 3 (C1),500. 3 为 C1 的加钠峰,322. 2 的峰为碎片峰,249. 1 的峰为双电荷峰,239. 6 的峰为碎片峰(图 6).



TLC: 1. 庆大霉素标准品; 2. G1008; 3. GIP95; 4. *genP* 缺失工程菌

图 5 庆大霉素 C2b 标品、庆大霉素标准品、G1008 和工程菌 GIP95 代谢产物 HPLC 和 TLC 分析

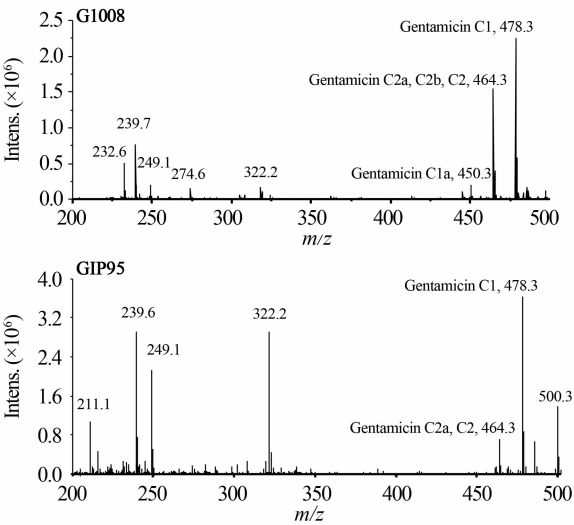


图 6 G1008 和 GIP95 次级代谢产物 MS 分析图

结合 TLC、HPLC 与 MS 分析,出发菌株 G1008 的主要代谢产物是庆大霉素 C1、C1a、C2a 和 C2,其中 C1a 的组分相对偏低.人为操作实现

基因替换可能会对菌株的代谢流造成一定程度的影响,致使无 C1a(450. 3)的产物检出,左支路受阻,而主要生产右支路的产物庆大霉素 C1、C2a 和 C2. 这可能是由于同工异源酶通过基因置换后,在有差异的化学环境中,其功能不能完全相同地发挥作用,因此外源基因功能的表达受到一定的限制,使得工程菌 GIP95 代谢流向表达生成庆大霉素 C1 右支路倾斜. 综上,基因 *sisI* 置换 *genP* 获得的基因组合突变株 GIP95,其代谢合成途径未被阻断,依然能够合成庆大霉素 C 族组分.

3 结论与讨论

本研究通过组合生物合成技术实现小单孢菌

属之间的关键基因 3',4'-双脱羟基基因 *sisI* 替换 *genP*,并探究了同工异源酶异源表达的内在特征. 研究表明,经过基因组合后,庆大霉素生物合成途径未被阻断,说明依纽小单孢菌基因 *sisI* 替换绛红小单孢菌基因 *genP* 后,实现了 *sisI* 基因在绛红小单孢菌中绛红糖胺 3',4'-双脱羟基的异源表达,发挥其应有的功能. 人为操作使合成代谢流受到影响,使得左支路受阻而更加倾向于合成庆大霉素 C1(右支路),如图 7 所示,其原因可能是由于外源基因在不同的种之间有其倾向性,且同工异源酶在有差异的化学环境中,其功能可能不能完全相同地发挥,因而其基因功能的表达受到一定的限制.

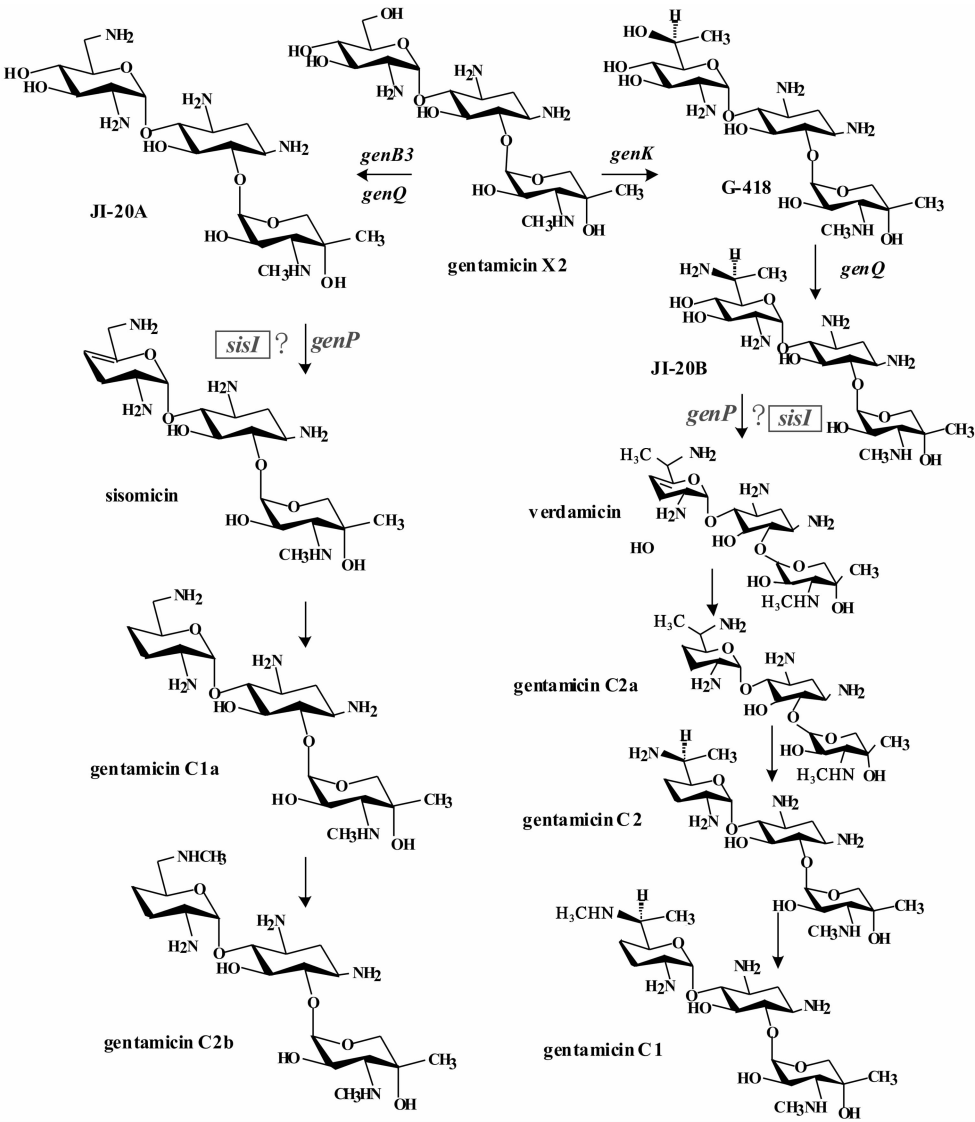


图 7 *sisI* 在庆大霉素生物合成代谢流中的作用

氨基糖苷类抗生素的耐药机制主要是通过耐药菌的灭活酶修饰抗生素来达成,其中羟基是灭活酶主要作用的修饰位点<sup>[13-14]</sup>,而绛红糖胺 C3',C4'-双脱氧修饰能使庆大霉素对多种氨基糖苷类抗生素修饰酶有抵抗性。此外,卡那霉素 B 经过脱去绛红糖胺 3',4'-羟基,能合成疗效更佳、前景更好的抗耐药菌药物地贝卡星<sup>[15]</sup>,这无疑具有重要的工业化意义。本文研究小单孢菌 3',4'-双脱羟基基因 *sisI* 替换 *genP*,并在绛红小单孢菌 G1008 中实现异源表达,为后续通过外源基因功能的异源表达定向合成地贝卡星奠定良好的理论与实践基础。

## 参考文献:

- [1] Mahmud T. Progress in aminocyclitol biosynthesis [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2009,13 (2):161-170.
- [2] Umezawa H, Ueda M, Maeda K, et al. Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin [J]. The Journal of Antibiotics, 1957,10(5):181-188.
- [3] Shao L, Chen J, Wang C, et al. Characterization of a key aminoglycoside phosphotransferase in gentamicin biosynthesis [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013,23(5):1438-1441.
- [4] Martin M F, Liras P. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and secondary metabolites [J]. Annu Rev Microbiol, 1989,43(8):173-206.
- [5] 张国华,洪文荣,饶以群,等.小单孢菌 3',4'-双脱羟基酶基因功能的研究 [J]. 中国药科大学学报,2011,42(1):88-91.
- [6] 于洪伟,倪现朴,夏焕章.庆大霉素生物合成基因 *gt-mJ* 的功能研究 [J]. 中国科技论文在线,2013:1-8.
- [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] 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.
- [9] Hong W R, Yan L B. Identification of *gntK*, a gene required for the methylation of purpurosamine C-6' in gentamicin biosynthesis [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2012,58 (5):349-356.
- [10] Kieser T, Bibb M J, Mark J, et al. Practical *Streptomyces* Genetics [M]. Norwich, England: The John Innes Foundation, 2000:162-170.
- [11] Sambrook J F, Russell D W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual [M]. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001:27-99.
- [12] Kumar C G, Himabindu M, Jetty A. Microbial biosynthesis and applications of gentamicin: a critical appraisal [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2008,28(3):173-212.
- [13] Wright G D. Aminoglycoside-modifying enzymes [J]. Current Opinion in Microbiology, 1999,2 (5):499-503.
- [14] Shakya T. Mechanisms of aminoglycoside antibiotic resistance [J]. Aminoglycoside Antibiotics, 2007:119-140.
- [15] Geiger J H, Jin X. The structure and mechanism of myo-inositol-phosphate synthase [J]. Subcell Biochem, 2006,39(1):157-180.