

文章编号: 1004-4353(2016)02-0130-06

西索米星生物合成基因 *sisI* 功能的研究

万云凤, 洪文荣*, 石贤爱

(福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350116)

摘要: 通过生物学试验,构建依纽小单孢菌 TS388(*Micromonospora inyoensis* TS388)中 *sisI* 基因缺失工程菌,再通过分析其次级代谢产物的变化,揭示西索米星生物合成基因簇上 *sisI* 基因的功能. 首先构建用于 *sisI* 基因框内敲除的穿梭载体 pKTI3,经接合转移导入依纽小单孢菌 TS388 中,通过影印筛选及 PCR 鉴定获得 *sisI* 功能缺失工程菌 TI1102($\Delta sisI$). 工程菌经发酵,提取代谢产物,再经 TLC 及 MS 分析,用以比较亲株与工程菌代谢产物结构的差异. 结果显示:工程菌 TI1102 代谢产物结构发生变化,不再合成西索米星,主要积累中间代谢产物 JI-20A,由此证明了 *sisI* 基因参与了 JI-20A 到西索米星的 3',4'-双脱羟基作用. 获得主产 JI-20A 的工程菌为该半合成药物提供了重要前导化合物.

关键词: *sisI* 基因; 依纽小单孢菌; 生物合成; 3',4'-双脱羟基

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A

The functional exploration of *sisI* in sisomicin biosynthesis gene cluster

WAN Yunfeng, HONG Wenrong*, SHI Xianai

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

Abstract: The *sisI* deletion mutant was constructed in *M. inyoensis* TS388 by the biological experiments and the function of *sisI* in sisomicin biosynthetic gene cluster was revealed by analyzing the changes of its secondary metabolites. First, the recombinant plasmid pKTI3 used for the *sisI* in-frame deletion was constructed and then was introduced into *M. inyoensis* TS388 by conjugation. The *sisI*-disruption mutant *M. inyoensis* TI1102 ($\Delta sisI$) was screened out by replica plating and PCR validation. Metabolites which was isolated from the fermentation broth of TI1102 was analyzed by TLC and MS to compare the differences of metabolite structure between the parent strain and engineering strain. The result indicated that the structure of metabolites of the mutant strain TI1102 is changes, and TI1102 mainly accumulates intermediate metabolite JI-20A instead of sisomicin. It was demonstrated that *sisI* might be responsible for double dehydroxylation at C-3' and C-4' of JI-20A to sisomicin. An engineered bacteria that mainly produces monocomponent JI-20A was obtained, which provides the important lead compounds for semi-synthetic drugs.

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

0 引言

氨基糖苷类抗生素具有抗菌谱广和杀菌完全的优点,与 β -内酰胺等抗生素联合使用,具有较

好的协同效果,因此作为一线药物而广泛应用于临床^[1-3]. 由依纽小单孢菌(*Micromonospora inyoensis*)产生的西索米星(Sisomicin,别称西索霉素、紫苏霉素等)及其衍生物奈替米星(netilmicin)

公司;其他化学试剂均为分析纯或色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 以西索米星生物合成基因簇(GenBank:JF431003)为模板,以 *sisI* 的上下游序列为同源交换臂,设计两对引物:P1/P2 和 P3/P4,分别用于扩增上游交换臂 IB1 和下游交换臂 IB2。根据同源重组原理,设计一对筛选与鉴定单双交换的引物 P5/P6。引物序列及其限制酶见表 1。

表 1 本研究所用引物

交换臂	序 列	限制酶
P1	AAGCTTTCCTGGTCCGCACCATGCAGC	<i>Hind</i> III
P2	TCTAGATGACGCGGTCCGGCCGGATC	<i>Xba</i> I
P3	TCTAGACATCTCCTCGCCGGTCGTCAG	<i>Xba</i> I
P4	GAATTCTCGTACGACGAAACTGCGCC	<i>EcoR</i> I
P5	GACAAGGTGCTGGAGGCGAT	
P6	ATGTTTCGACGTGGTGTCTGCC	

1.2.2 分子克隆 PCR、酶切、酶连、大肠杆菌感受态细胞制备及其转化,少量质粒 DNA 提取等方法参见文献[15-17];DNA 测序工作委托生工生物工程(上海)有限公司。

1.2.3 接合转移 大肠杆菌与依组小单孢菌接合转移方法参照文献[14]。

1.2.4 发酵及产物提取 发酵:将菌株使用稀释平板法分离出产孢丰富的单菌落转接于斜面培养基,37 ℃ 培养 8~10 d,待斜面孢子丰满。刮取适量孢子接种于种子培养基(装量为 50 mL/250 mL 三角瓶),36 ℃ 摇床培养 28~32 h(转速为 260 r/min),使其进入对数生长期时,按 10%接种量转接发酵培养基(装量为 150 mL/1 000 mL 三角瓶),36 ℃ 摇床发酵 120 h(转速为 250 r/min)。

代谢产物提取:将发酵液稀释后依次使用浓硫酸酸化、NaOH 回调,再用 732 树脂静态吸附 6~8 h。收集吸附饱和树脂,使用体积分数为 5% 的氨水进行解吸,收集洗脱液,并用浓硫酸调至 pH 值为 5.5~6.0。在搅拌下,缓慢向洗脱液中滴加入体积分数为 95% 的乙醇,进行结晶(3~4 h),之后经离心分离,真空干燥获得粗制品。

1.2.5 代谢产物分析 产物组分分析采用硅胶 GF254 薄层层析,展开剂为氯仿-甲醇-氨水

(1:1:1,体积比),混合均匀后,取下层作为展开剂。精确成分确定采用电喷雾电离质谱(ESI/MS)分析,该 Q-TOF-MS 扫描范围设定在正离子模式 m/z 100~800,干燥气体为 N₂,流量为 8 mL/min,温度为 350 ℃;雾化压力为 241.32 kPa,毛细管电压为 3 500 V,碎裂电压为 135 V,MS 数据分析使用安捷伦 MassHunter 进行(B.04.00)。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pKTI3 的构建

以 TS388 的染色体 DNA 为模板,用两对引物 P1/P2 和 P3/P4 依次扩增上游交换臂 IB1 (2 023 bp)和下游交换臂 IB2 (2 085 bp)。PCR 样品经电泳检测后回收目标条带并进行 TA 克隆,得到中间质粒 pIB01 (pMD-19T:IB1)和 pIB02 (pMD-19T:IB2)。

质粒 pIB01 用 *Hind* III/*Xba* I 双酶切,电泳回收 IB1 片段;质粒 pIB02 用 *Xba* I/*EcoR* I 双酶切,电泳回收 IB2 片段;温敏性质粒 pKC1139 用 *Hind* III/*EcoR* I 双酶切,并电泳回收长片段。将回收的 3 个片段进行酶连,转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,筛选阳性克隆子,获得同源重组质粒 pKTI3(图 2 A)。质粒 pKTI3 在理论上,用 *Pst* I 单酶切,可得到 5 584、4 073 bp 和 870 bp 3 条带;用 *EcoR* I/*Hind* III 双酶切,可得到 6 419 bp 和 4 108 bp 的线性片段。结果与理论预测相一致,由此初步证明穿梭质粒 pKTI3 构建正确(图 2 B)。

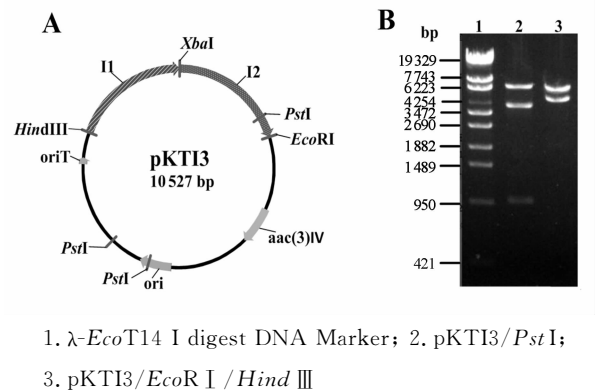


图 2 质粒 pKTI3 的物理图谱(A)及其酶切鉴定图(B)

2.2 *sisI* 基因缺失突变株的筛选与验证

2.2.1 单交换工程菌筛选 穿梭质粒 pKTI3 转

化大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002),得到含重组质粒的供体菌 *E.coli* ET12567 (pUZ8002,pKTI3),然后通过接合转移将其导入依组小单孢菌 TS388 中.在 37 ℃ 下培养 22 h 后用安普霉素和萘啶酸水溶液覆盖,继续培养 3~4 d,待接合子长出.挑取其中一株命名为依组小单孢菌 TI01,简称 TI01.根据同源重组模型(图 3 A),提取 TI01 基因组 DNA 作为模板进行 PCR.用引物 P5/P6 扩增到 2 033 bp 和 1 163 bp 片段,电泳图见图 3 B.结果与理论大小一致,由此初步确定 TI01 为单交换突变株.

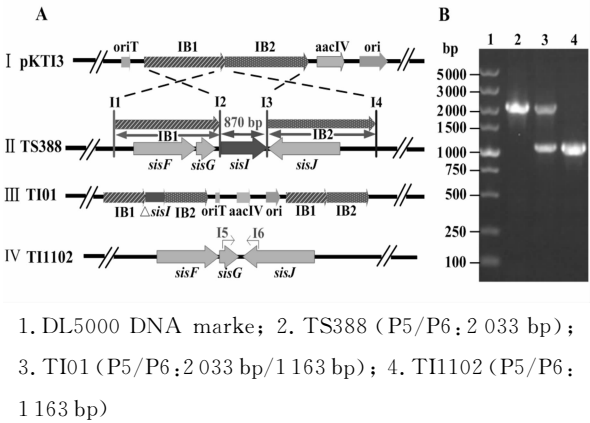


图 3 pKTI3 质粒与 TS388 染色体 DNA 同源重组示意图 (A)及其突变株 PCR 鉴定电泳图(B)

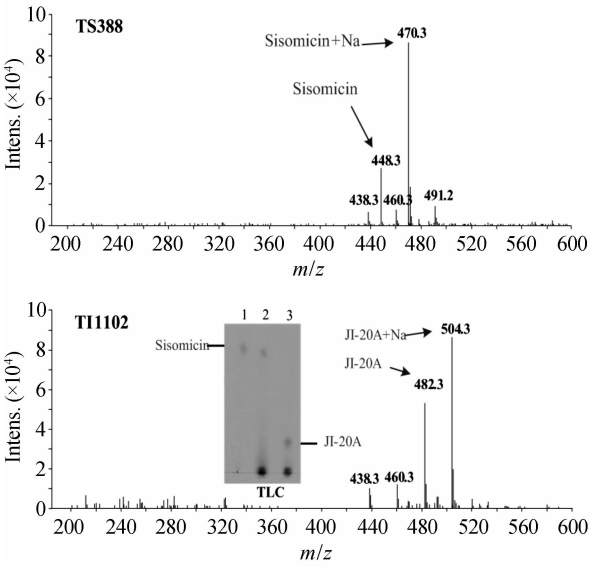
2.2.2 双交换菌株筛选 将 TI01 工程菌转接在斜面培养基上松弛培养 7 代,然后分离单菌落.将单菌落影印至含安普霉素的抗性平板和不含抗生素的普通平板上,培养 4 d 后,取其中 1 株安普霉素敏感菌株,提取其基因组 DNA,用引物 P5/P6 进行 PCR 验证,扩增到 1 163 bp 片段.与亲株相比片段缺失了 870 bp,由此初步确定该菌株是目的基因缺失突变菌,命名为依组小单孢菌 TI1102(简称 TI1102),电泳检测结果见图 3 B.经测序比对分析,证实 TI1102 为基因 *sisI* 框内缺失工程菌.

2.3 工程菌 TI1102 代谢产物提取及分析

基因 *sisI* 缺失工程菌 TI1102 经斜面培养 3 代,与亲株 TS388 相比,其菌落形态、生长速度和生长周期均没有明显变化,说明其遗传性状稳定.将 TS388 和 TI1102 同时按照 1.2.4 中的方法进行摇瓶发酵,提取代谢产物,并按照 1.2.5 中的方

法进行 TLC 及 MS 分析,结果见图 4.

TLC 及 MS 分析结果表明,工程菌 TI1102 与出发菌株 TS388 相比,代谢产物组分发生了明显变化.TLC 分析结果显示,工程菌 TI1102 代谢产物中没有检测到西索米星存在,也许是含量极少不足以在硅胶板上呈现.MS 分析结果表明,在出发菌株 TS388 代谢产物中检测到的离子峰主要是西索米星($m/z=448.3, [M+H]^+$)以及西索霉素的加钠峰($m/z=470.3, [M+Na]^+$);而工程菌 TI1102 代谢产物中没有检测到西索米星的离子峰,其主要离子峰为 $m/z=481.3, [M+H]^+$ 和 $m/z=504.3, [M+Na]^+$,分别是 JI-20A 及其加钠的离子峰.这进一步说明 *sisI* 基因的缺失阻断了西索米星的合成,使合成代谢终止于 JI-20A.由此证明 *sisI* 基因负责参与催化绛红糖胺 3',4'-双脱羟基反应.



TLC: 1. Sisomicin standard; 2. Products from *M.inyoensis* TS388; 3. Products from TI1102

图 4 亲株 TS388 和突变株 TI1102 发酵代谢产物 MS 和 TLC 分析

3 讨论

通过对基因 *sisI* 特异性灭活,阻断其在依组小单孢菌 TS388 中的表达,得到工程菌 TI1102.MS 分析结果表明,工程菌 TI1102 不再合成西索米星,主要积累 JI-20A.这说明 *sisI* 基因的失活阻断了西索米星的生物合成代谢流,基本探明了

sisI 基因参与 3',4'-双脱羟基修饰作用,其催化途径如图 5 所示.获得 JI-20A 工程菌,不仅为定向改造特定抗生素提供了理论依据,还为该类药物开发研究提供了重要的前导化合物.

下面分析基因 *sisI* 的功能结构域.采用 VectorNTI11.5 软件将依纽小单孢菌 *sisI* 基因及绛红小单孢菌 *genP* 基因(GenBank:JQ975418)的 DNA 序列转译成氨基酸序列.通过 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>)进行同源建模和在线软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析,结果显示 *sisI* 及 *genP* 均含有组成氨基糖苷磷酸转移酶(APH)的结构域.APH 的结构及活性中心(黄色球体和紫色球体区域)如图 6 所示.APH 能以 ATP 为底物使氨基糖上的特定羟基磷酸化,进而脱去羟基,由此推测 *sisI* 与催化庆大霉素 3',4'-双脱羟基的 *genP* 为同工酶,负责催化 JI-20A 进行 3',4'-双脱羟基,生成西索米星.

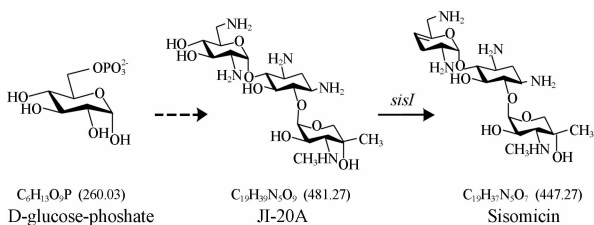


图 5 西索霉素生物合成过程中 *sisI* 基因的催化途径

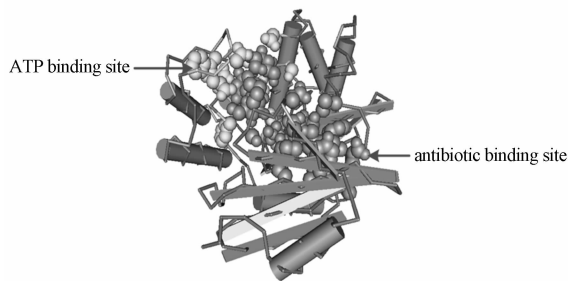


图 6 APH 的结构及活性中心

在庆大霉素生物合成过程中有 2 个非常相似的步骤:氨基化产物 JI-20A 和 JI-20B 分别经磷酸化酶 *genP* 催化,脱去 D-葡萄糖胺 3'和 4'位羟基,最终生成庆大霉素 C_{1a} 和 C_2 .西索米星与庆大霉素 C_{1a} ,在结构上仅仅是 4',5'位之间双键的区别,且二者生物合成基因簇有很高的同源性.其

中,基因 *sisI* 与 *genP* 序列同源性高达 81.8%.

在氨基糖苷类生物合成过程中,3',4'-双脱羟基酶是合成某些特定抗生素的关键酶,脱去 3'位和 4'位羟基后的氨基糖苷类抗生素具有很强的耐钝化酶活性.如卡那霉素 B 脱去 3',4'位羟基后形成地贝卡星,其对耐药性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌及产生 3'-磷酸转移酶的致病菌都高度有效,而毒副作用比庆大霉素和卡那霉素小,因此一直倍受青睐.目前,其工业生产主要是从卡那链霉菌发酵液中分离提取卡那霉素 B,再通过半合成方式合成地贝卡星,工艺较为复杂,难以大规模生产,严重制约了地贝卡星的开发利用.若能 3',4'-双脱羟基酶应用于地贝卡星或其他去羟基衍生物的合成中,将会带来极高的工业应用价值.

参考文献:

- [1] Mahmud T. Progress in aminocyclitol biosynthesis [J]. Curr Opin Chem Biol, 2009,13(2):161-170.
- [2] Livermore D M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare[J]. Clin Infect Dis, 2002,34(5):634-640.
- [3] Zembower T R, Noskin G A, Postelnick M J, et al. The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance[J]. Int J Antimicrob Agents, 1998,10(2):95-105.
- [4] Endimiani A, Hujer K M, Hujer A M, et al. ACHN-490, a neoglycoside with potent in vitro activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009,53(10):4504-4507.
- [5] 洪文荣,许向前,朱春宝,等.依纽小单孢菌 2-脱氧蟹肌醇合成酶基因的克隆与表达[J].复旦学报(自然科学版),2006,45(3):283-287.
- [6] Testa R T, Tilley B C. Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis. I. Sisomicin[J]. J Antibiot, 1975,28(8):573-579.
- [7] Goldberg S L, Romero J G, Deo Y M. Cloning and characterization of the sisomicin-resistance gene from *Micromonospora inyoensis* [J]. J Antibiot, 1990,43(8):992-999.
- [8] 洪文荣,陈代杰,刘靖,等.依纽小单孢菌抗性基因 *sisR* 的克隆研究[J].生物工程学报,2005,21(1):149-153.
- [9] Hong W R, Ge M, Zeng Z H, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the sisomicin biosyn-

thetic gene cluster from *Micromonospora inyoensis* [J]. *Biotechnol Lett*, 2009,31(3):449-455.

[10] GenBank Database. *Micromonospora inyonensis* hypothetical protein gene, complete cds [DB/OL]. [2016-01-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/327197283>.

[11] 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.

[12] 邵雷,陈俊生,陈代杰,等. 西索米星的生物合成途径和其中 3',4'位双脱羟基转化机制的研究[C]//2008 年中国微生物学会学术年会论文摘要集. 中国微生物学会,2008.

[13] Park J W, Joonghong J S, Parajuli N, et al. Genetic dissection of the biosynthetic route to gentamicin A2 by heterologous expression of its minimal gene set[J]. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 2008, 105(24):8399-8404.

[14] 张国华,洪文荣,沈剑锋,等. 依纽小单孢菌接合转移体系的构建[J]. 生物技术通报,2011(11):216-220.

[15] 朱碧银,洪文荣,严绍德,等. 黑暗链霉菌 DNA 同源重组系统的构建[J]. 生物技术通报,2011,17(4):162-166.

[16] Hong W R, Yan S D. Engineering *Streptomyces tenebrarius* to synthesize single component of carbamoyl tobramycin [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2012,55(1):33-39.

[17] 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.

.....

(上接第 102 页)

参考文献:

[1] Sun Chenlan. Models and Research Methods Of Mathematical Ecology [M]. Beijing: Science Press, 1988:199-231.

[2] 陈兰荪,陈健. 非线性生物动力系统[M]. 北京:科学出版社,1993:215-226.

[3] Jiang Guirong. Complex dynamics of a Holling type II prey-predator system with state feedback control [J]. *Chaos, Solutions and Fractals*, 2007,31(2):448-461.

[4] 宋新宇,郭红建,师向云. 脉冲微分方程理论及其应用[M]. 北京:科学出版社,2011:208-209.

[5] Zhang Yujuan, Liu Bing, Chen Lansun. Extinction and permanence of a two-prey one-predator system with impulsive effect[J]. *IMA Journal of Mathematical Medicine and Biology*, 2003, 20(4):309-325.

[6] 黄明湛,宋新宇. 具有状态反馈脉冲控制的种群互惠动力系统的研究[J]. 系统科学与数学,2012,32(3):265-276.

[7] Zhao Jingdong, Guo Xin. Average conditions for competitive system in a nonautonomous two dimensional Lotka-Volterra system[J]. *Mathematical and Computer Modeling*, 2013,57(5):1131-1138.

[8] Luo Albert C J. Discrete and Switching Dynamical System [M]. Beijing: Higher Education Press, 2012:167-204.