

阿维菌素 B 产生菌寡霉素合成阻断株的构建

张晓琳 陈芝 赵金雷 宋渊 文莹 李季伦*

(中国农业大学生物学院微生物系, 北京 100094. * 联系人, E-mail: lijilun@cau.edu.cn)

摘要 以仅产阿维菌素(avermectin) B 和寡霉素(oligomycin)的阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*) CZ8-73 为出发菌株, 构建基因缺失载体 pXL05(pKC1139:: $\Delta olmA1 + \Delta olmA4$), 并将其转入 CZ8-73 中, 通过缺失质粒和染色体之间的同源双交换, 对染色体上长达 90 kb 的寡霉素 PKS 基因簇(*olmA*)进行了缺失突变. 将 4 株经 Southern 杂交验证正确的基因缺失突变株进行摇瓶发酵和 HPLC 检测, 发现 4 个突变株均不再产生寡霉素而仅产阿维菌素 B 组分, 阿维菌素的总产量和 B1 的产量与出发菌株相当, 说明寡霉素 PKS 基因簇的缺失并不影响阿维菌素的生物合成. 该缺失突变是在染色体上通过同源双交换完成的, 不会发生进一步的重组, 因此突变株性状稳定, 在工业生产上具有应用价值.

关键词 阿维链霉菌 寡霉素 阿维菌素 *olmA* 基因缺失

阿维菌素是由阿维链霉菌产生的一组具有相似结构的十六元大环内酯类抗生素, 有极强的杀体内外寄生虫活性, 是目前最为有效的杀虫剂之一, 被广泛应用于农业和畜牧业生产中^[1]. 阿维菌素的天然发酵产物共有 8 个组分: A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a, B2b, 其中 B1 组分的杀虫活性最高, 而毒性最小^[2]. 阿维链霉菌除了产生阿维菌素, 还产生另外一种二十六元环大环内酯化合物——寡霉素(图 1). 寡霉素是哺乳动物细胞氧化磷酸化的抑制剂, 毒性很高^[3].

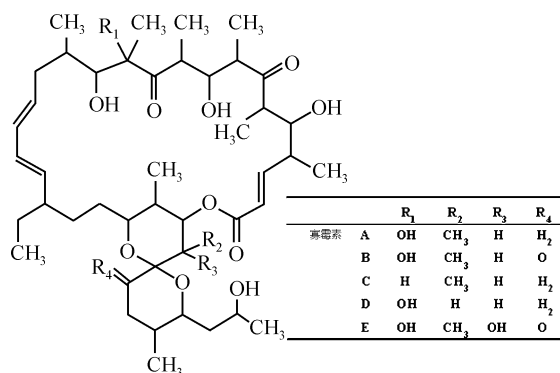


图 1 寡霉素的结构图

阿维链霉菌主要产生寡霉素 A 组分

目前, 有关阿维菌素合成的生化及遗传学基础的研究已取得了突破性的进展. 阿维菌素的生物合成途径已基本阐明^[4,5], 有关的基因簇已被克隆, 多数基因的功能已确定^[6~8]. Ikeda 等人^[9]又于最近完成了阿维链霉菌全基因组的测序, 该基因组大小为 9.02 Mb, 至少包含 7574 个可读框架. 在阿维链霉菌的线

状染色体上共有 30 个基因簇与次级代谢合成有关, 其中寡霉素的生物合成基因簇最大, 全长 104 kb, 共有 18 个可读框架(图 2)^[10]. 在该基因簇内部长约 90 kb 的片段含有 7 个大的可读框架 (*olmA1-olmA2-olmA3-olmA6-olmA7*)和(*olmA5-olmA4*), 它们共同编码多功能的聚酮合酶(polyketide synthase, PKS), 催化寡霉素聚酮体骨架的生物合成. 该聚酮合酶由 17 个模块(module)组成, 共有 79 个催化酶域(domain), 其中有一些酶域没有功能. 在基因簇两侧的一些基因可能与聚酮体的修饰有关^[10].

由于寡霉素对哺乳动物有很强的毒性, 因此在工业生产中必须通过分离提纯把它从发酵液中除去. 在国内, 由于一些生产厂家只将发酵液用溶剂萃取后就直接浓缩制成乳剂销售, 并未除去其中的寡霉素, 曾经导致家畜中毒. 此外, 寡霉素的产生对生产工人的身体健康会造成一定的威胁. 我们以仅产阿维菌素 B 和寡霉素的突变株为出发菌株, 通过对整个寡霉素 PKS 基因(*olmA*)进行缺失, 从而阻断了寡霉素 PKS 的合成, 获得了不产寡霉素而仅产阿维菌素 B 的基因工程菌.

1 材料与方法

(i) 菌株和质粒. 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 以及质粒 pIJ2925 均由本室保存. 阿维链霉菌 CZ8-73 为本实验室构建的仅产阿维菌素 B 组份的突变株^[11]. pKC1139 为大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒^[12], 由中国科学院微生物研究所谭华荣教授惠赠(表 1).

(ii) 培养基. 大肠杆菌培养基为 LB^[13]. 阿维

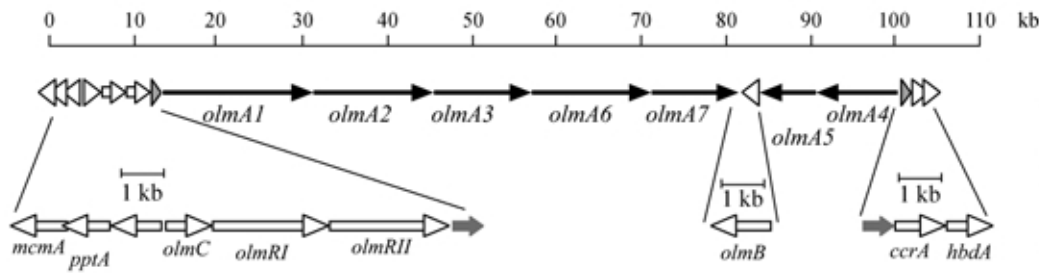


图 2 寡霉素生物合成基因簇结构(引自文献[10])

黑色实心箭头示寡霉素 PKS 基因; 空心箭头示可能与聚酮体修饰相关的基因; 带阴影的箭头示与寡霉素合成无关的基因. *olmA* 编码寡霉素 PKS; *olmR* 编码 luxR-家族转录调控蛋白; *olmC* 编码硫酸酯酶; *olmB* 编码细胞色素 P450; *mcmA* 编码甲基丙二酸单酰辅酶 A 变位酶; *pptA* 编码磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶; *ccrA* 编码丁烯酰基辅酶 A 还原酶; *hbdA* 编码 3-羟酰基辅酶 A 脱氢酶

表 1 菌株和质粒

菌株和质粒	基本描述	文献
大肠杆菌 DH5α	<i>supE44, lacU169(φ80, lacZΔM15), hsdR17, recA, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	[16]
阿维链霉菌 CZ8-73	工业菌株阿维链霉菌 76-9 的 <i>aveD</i> 缺失突变株, 仅产阿维菌素 B 组分	[11]
阿维链霉菌 Olm73-5, 73-12, 73-31, 73-51	阿维链霉菌 CZ8-73 的 <i>olmA</i> 缺失突变株, 不产寡霉素, 仅产阿维菌素 B	本研究
pMD18-T	2.69 kb, T 载体, <i>bla lacZα</i>	TaKaRa 公司
pIJ2925	2.69 kb, pUC18 衍生载体, <i>bla, lacZα</i>	[17]
pKC1139	6.50 kb, 大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒, <i>aac(3)IV, lacZα, oriTRK2</i>	[12]
pXL01	3.31 kb, pMD18-T::Δ <i>olmA1</i> (0.6 kb)	本研究
pXL02	3.33 kb, pMD18-T::Δ <i>olmA4</i> (0.6 kb)	本研究
pXL03	3.31 kb, pIJ2925::Δ <i>olmA1</i> (0.6 kb)	本研究
pXL04	3.95 kb, pMD18-T::Δ <i>olmA1</i> (0.6 kb) +Δ <i>olmA4</i> (0.6 kb)	本研究
pXL05	7.75 kb, pKC1139::Δ <i>olmA1</i> (0.6 kb) +Δ <i>olmA4</i> (0.6 kb)	本研究

链霉菌高渗液体培养基采用改良 YEME(蔗糖浓度为 25%), 原生质体再生培养基为 RM14^[14], 阿维链霉菌固体产孢培养基为 YMS^[15]. 种子培养基(1 L)含 30 g 可溶性淀粉, 4 g 酵母膏, 2 g 大豆蛋白胨, 10 mg CoCl₂·6H₂O. 发酵培养基含可溶性淀粉, 酵母粉, K₂HPO₄·3H₂O, CaCO₃, MgSO₄·7H₂O, CoCl₂·6H₂O.

(iii) 酶、抗生素及化学试剂. 限制性内切酶为华美生物工程公司产品, T4 DNA 连接酶、Taq 聚合酶为大连 TaKaRa 公司产品, 溶菌酶为 Biozyme 公司产品. 氨基青霉素购自华美生物工程公司, 使用浓度为 100 μg/mL; 安普霉素(apramycin, Apr)在 LB 培养基中的使用浓度为 100 μg/mL, 在 YEME, YMS 和 RM14 培养基中的使用浓度分别为 5, 10 和 20 μg/mL. 阿维菌素 B1 的标准品和寡霉素标准品分别为齐鲁制药厂和 Serva 公司产品. 用于 DNA 探针标记的 DIG DNAs 标记检测试剂盒购自 Roche 公司.

(iv) DNA 的提取及操作. 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化及常规的 DNA 克隆操作按文献[13]进

行. 链霉菌总 DNA 和质粒的提取见文献[18]和[21]. 阿维链霉菌原生质体的制备及转化按文献[14]进行. PCR 扩增及 DNA 的连接均按产品说明书进行. DNA 的序列测定由大连 TaKaRa 公司完成. 地高辛标记 DNA 探针和 Southern 杂交按照产品说明书和文献[18]进行.

(v) 阿维菌素的摇瓶发酵. 按文献[19]进行.

(vi) 阿维菌素和寡霉素的 HPLC 分析. 参照文献[19]. 取 1.0 mL 发酵液, 加入 4.0 mL 甲醇, 充分振荡浸泡 30 min 后, 离心取上清液进行 HPLC 分析. 分析条件为: C₁₈ 反相柱, 柱长 250 mm, 柱内径 4.6 mm; 流动相为乙腈-甲醇-水(62 : 18 : 20); 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 224 nm.

2 结果

2.1 用于 *olmA* 基因缺失的重组质粒的构建

为了将整个寡霉素 PKS 基因簇(*olmA*)缺失, 分别设计 2 对引物, 引物 1(5'-CGTCAACACGGCAC-TCAC-3')和引物 2(5'-GAACTCGGTACGGTCCA-

GG-3')的扩增产物为 622 bp 的 *olmA1* 基因内部序列 ($\Delta olmA1$), 引物 3(5'-GCGAGATCTCCACGAAGGTG-3', 斜体部分引入了 *Bgl* II 酶切位点)和引物 4(5'-ATAGCGATCGTCGGGATGG-3'), 扩增产物为 634 bp 的 *olmA4* 基因内部序列 ($\Delta olmA4$). 以阿维链霉菌 CZ8-73 的总 DNA 为模板, 分别扩增出预期的 622 bp 和 634 bp 的 DNA 片段, 将它们分别连接于 pMD18-T 载体的多克隆位点上, 得质粒 pXL01 和 pXL02, 测序验证后, 用于构建 *olmA* 基因缺失载体 pXL05 (pKC1139 :: $\Delta olmA1 + \Delta olmA4$). 质粒 pXL05 的构建过程见图 3.

2.2 *olmA* 基因的缺失

将在 *E. coli* DH5 α 中构建好的 pXL05 转化阿维链霉菌 CZ8-73 的原生质体, 在含有安普霉素的 RM14 再生平板上培养 10 d 后, 共得到 56 个转化子. 阿维链霉菌在 RM14 再生培养基上不产孢, 需挑取转化子在含安普霉素的 YMS 平板上培养以恢复产孢. 随机挑取 8 个转化子提取质粒, 经酶切验证与提自 *E. coli* DH5 α 的质粒 pXL05 完全相同.

分别收集 8 个转化子的孢子, 以每培养皿约 100 个孢子涂布于含有安普霉素的 YMS 平板上, 置于 28℃ 培养 72 h 后, 将平板移至 39℃ 高温培养 7 d, 以消除质粒 pXL05. pKC1139 为温敏型的大肠杆菌-链霉菌穿梭载体, 当温度高于 34℃ 时不能自我复制, 只有当重组质粒 pXL05 所携带的部分 *olmA1* 基因或 *olmA4* 基因与 CZ8-73 染色体上的同源区段发生同源重组, 并整合到染色体上的菌株才能在含有安普霉素的 YMS 培养基上生长. 将 39℃ 长出的抗安普霉素的单交换突变株在不添加抗生素的 YMS 平板上传代, 共转接 4 次后, 筛选安普霉素敏感的双交换重组体, 共得到 200 个 Apr^s 的菌株. 挑取其中的 5 株菌, 与 CZ8-73 一起在 YEME 中 28℃ 振荡培养 48 h, 均未能从中提取出产物, 说明重组质粒 pXL05 已被消除, 将这 5 株菌分别命名为 Olm73-5, 73-12, 73-25, 73-31 和 73-51.

为了使突变株能应用于工业生产中, 我们在染色体上的待缺失部位没有引入抗性标记, 这给缺失突变株的筛选带来一定难度. 单交换突变株 (缺失载体被整合到染色体上) 经无抗平板传代后筛选到的 Apr^s 的菌株可能是已发生了双交换的缺失突变株, 也可能是缺失载体又被从染色体上全部切除而发生

了回复突变的菌株, 因此还需进一步通过 Southern 杂交或 PCR 来加以验证.

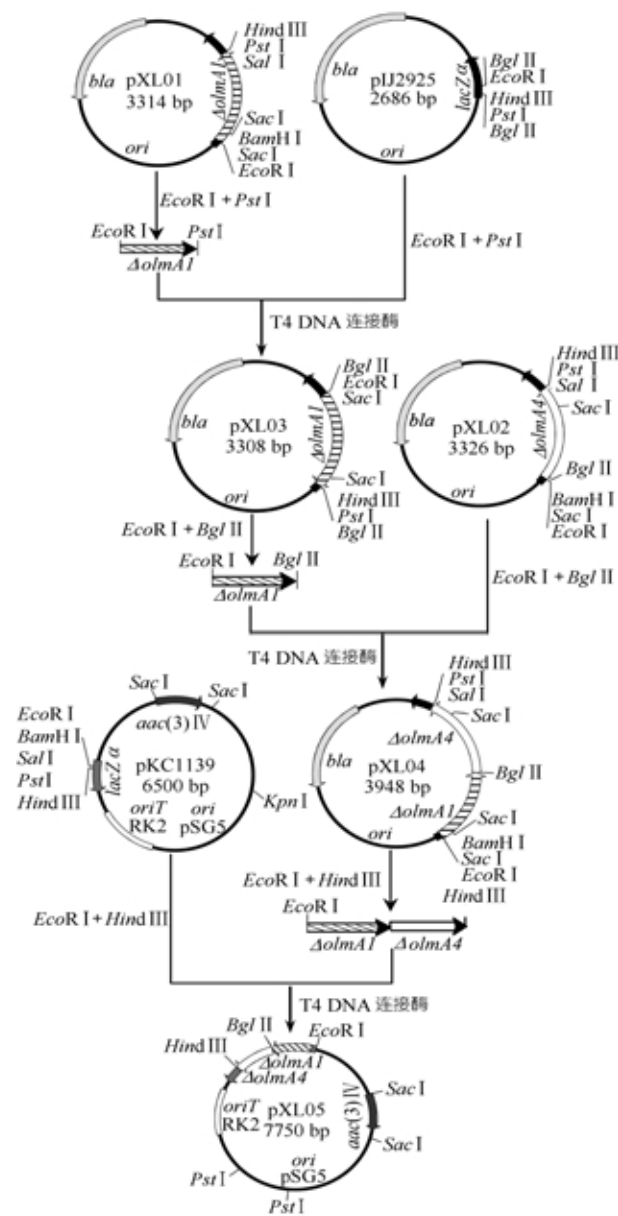


图3 用于 *olmA* 基因缺失的重组质粒 pXL05 的构建

2.3 缺失突变株总 DNA 的 Southern 杂交验证

提取 5 个 Apr^s 的突变株以及 CZ8-73 的总 DNA, 用 *Bam*HI 酶切后, 以 pXL05 中约 1.25 kb 的 *Eco*RI 和 *Hind*III 酶切片段 ($\Delta olmA1 + \Delta olmA4$) 为探针进行 Southern 杂交 (图 4). pXL05 所携带的部分 *olmA1* 基因和 *olmA4* 基因与染色体上的同源序列发生双交换后, 可将 *olmA* 基因簇上 $\Delta olmA1$ 和 $\Delta olmA4$ 片段中间的长

达 90 kb 的序列全部缺失掉, 在这段约 90 kb 的序列内有多条 *Bam*H I 酶切位点, 而在 1.25 kb 的 $\Delta olmA1 + \Delta olmA4$ 片段中没有该酶切位点, 因此出发菌株 CZ8-73 杂交后应出现 2 条杂交带, 而缺失突变株应仅出现 1 条杂交带. 从图 4 的结果来看, CZ8-73 的杂交信号中出现 2 条杂交带, 而 Olm73-5, 73-12, 73-31 和 73-51 仅有 1 条杂交带, 证明这 4 株菌均为正确的缺失突变株. 但 Olm73-25 的杂交带有 2 条, 与 CZ8-73 的杂交信号大小相同, 说明该菌株并未发生缺失突变.

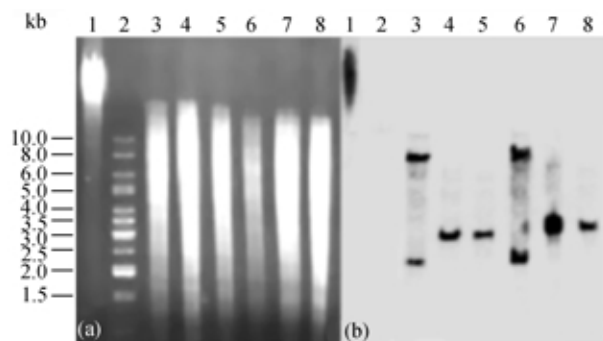


图 4 总 DNA *Bam*H I 酶切后的琼脂糖凝胶电泳(a)及 Southern 杂交(b)

1 示 *S. avermitilis* CZ8-73 的总 DNA; 2 示 1-kb Ladder Marker; 3 示 *S. avermitilis* CZ8-73 总 DNA 的 *Bam*H I 酶切片段; 4~8 示 *Apr*^r 的突变株总 DNA 的 *Bam*H I 酶切片段(依次为 Olm 73-5, 73-12, 73-25, 73-31, 73-51)

2.4 缺失突变株发酵产物的 HPLC 分析

将 4 个经 Southern 杂交验证正确的 *olmA* 缺失突变株与 *S. avermitilis* CZ8-73 一起进行摇瓶发酵和 HPLC 分析. 结果表明, CZ8-73 除产生阿维菌素 B1a, B1b, B2a, B2b, 还产生寡霉素 A (图 5(a)); 4 株缺失突变株不再产生寡霉素, 而仅产阿维菌素 B 的 4 个组份 (图 5(b)). CZ8-73 的阿维菌素总产量为 1572 $\mu\text{g/mL}$, 其中阿维菌素 B1 为 754 $\mu\text{g/mL}$, 寡霉素的产量为 35 $\mu\text{g/mL}$. 4 个基因缺失突变株 Olm73-5, 73-12, 73-31 和 73-51 的阿维菌素总产量分别为 1489, 1642, 1593 和 1607 $\mu\text{g/mL}$, 阿维菌素 B1 产量分别为 697, 819, 785 和 795 $\mu\text{g/mL}$, 与出发菌株 CZ8-73 大致相当. 以上结果说明寡霉素 PKS 基因的缺失并不影响阿维菌素的生物合成.

2.5 缺失突变株的稳定性考察

将 4 个缺失突变株分别在 YMS 平板上连续转接 5 次后, 其形态特征和培养特征与出发菌株相同, 生

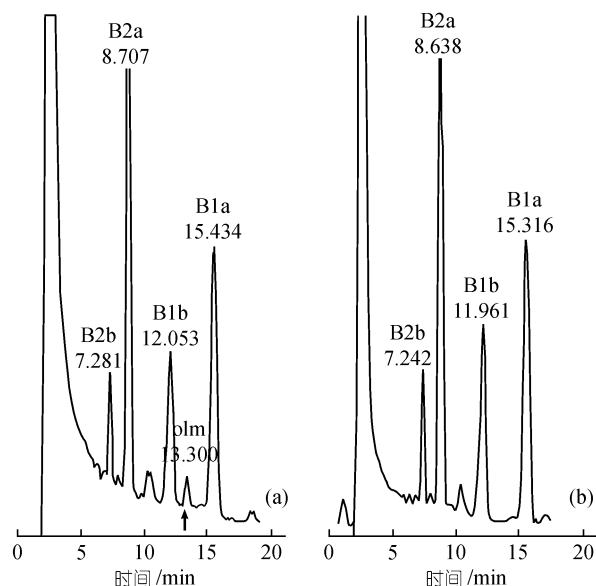


图 5 *S. avermitilis* CZ8-73 (a) 和 *olmA* 基因缺失突变株 Olm73-12 (b) 发酵产物的 HPLC 分析图谱
B1a, B1b, B2a 和 B2b 分别表示阿维菌素的 4 个 B 组分, $\rightarrow$ 及 olm 示寡霉素 A

长良好, 产孢丰富. HPLC 检测发酵产物, 均不再产生寡霉素, 阿维菌素的发酵单位也未发生变化, 说明缺失突变株在遗传上是稳定的.

3 讨论

野生型的阿维链霉菌不仅产生阿维菌素, 同时也产生寡霉素, 工业生产中用于产生阿维菌素的菌株一般都是由野生型菌株诱变得来, 因此也产生寡霉素. Ikeda 等人^[7,20]曾用 Tn4560 对阿维链霉菌野生型菌株进行转座诱变得到 2 株不产寡霉素的突变株, 并利用转座子上的遗传标记将转座子在染色体上插入的位点进行定位, 然后将插入了转座子的寡霉素合成基因片段克隆到温敏型质粒 pKU110 上, 构建重组质粒, 对仅产阿维菌素特定组份的工程菌株进行基因取代, 得到不产寡霉素而仅产阿维菌素特定组份的突变株. 该突变是通过同源重组在寡霉素的生物合成基因簇上插入了转座子 Tn4560 而造成插入失活, 使突变株不再合成寡霉素. 由于转座子的转座特征, 使获得的转座子插入突变体往往在遗传上不稳定, 还可能发生回复突变.

我们通过对长达 90 kb 的寡霉素 PKS 基因簇 (*olmA*) 进行缺失, 完全阻断了寡霉素聚酮体骨架的合

成,使缺失突变株不再产生寡霉素.缺失突变是在染色体上通过同源双交换完成的,不会发生进一步的重组,因此突变株在遗传上是稳定的.此外,在构建缺失突变株时未引入抗生素的抗性基因,这有利于突变株在工业生产中应用.

本研究所构建的基因工程菌不产寡霉素仅产活性较高的阿维菌素 B 组份,这一方面避免了繁琐的阿维菌素和寡霉素以及阿维菌素 B 组份和 A 组份的分离步骤,简化了提取工艺,提高了产品质量;另一方面在降低生产成本的同时也维护了生产工人的身体健康.因此,可对该工程菌进行发酵条件和培养基优化,进一步提高阿维菌素 B 的产量,以用于工业生产.

致谢 感谢谭华荣教授惠赠质粒 pKC1139. 本工作为国家高技术研究发展计划(批准号:2001AA214071)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Burg R W, Miller B M, Baker E E, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organisms and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979, 15: 361~367
- 2 Egerton J R, Ostlind D A, Blair L S, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Efficacy of the B1a component. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979, 15: 372~378
- 3 Pinna L A, Lorini M, Moret V, et al. Effect of oligomycin and succinate on mitochondrial metabolism of adenine nucleotides. *Biochim Biophys Acta*, 1967, 143:18~25
- 4 Ikeda H, Omura S. Genetic aspects of the selective production of useful components in the avermectin producer *Streptomyces avermitilis*. *Actinomycetol*, 1993, 7: 133~144
- 5 Ikeda H, Omura S. Avermectin biosynthesis. *Chem Rev*, 1997, 97: 2591~2609
- 6 MacNeil T, Gewain K M, MacNeil D J. Deletion analysis of the avermectin biosynthetic genes of *Streptomyces avermitilis* by gene cluster displacement. *J Bacteriol*, 1993, 175: 2552~2563
- 7 Ikeda H, Takada Y, Pang C -H, et al. Transposon mutagenesis by Tn4560 and applications with avermectin-producing *Streptomyces avermitilis*. *J Bacteriol*, 1993, 175: 2077~2082
- 8 Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, et al. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9509~9514
- 9 Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnol*, 2003, 21: 526~531
- 10 Omura S, Ikeda H, Ishikawa J. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 12215~12220
- 11 陈芝, 文莹, 宋渊, 等. 阿维链霉菌中 *aveD* 基因缺失对阿维菌素合成的影响. *微生物学报*, 2002, 42(5): 534~538
- 12 Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, 116: 43~49
- 13 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 14 MacNeil D J, Klappko L M. Transformation of *Streptomyces avermitilis* by plasmid DNA. *J Ind Microbiol*, 1987, 2: 209~218
- 15 Ikeda H, Kotaki H, Tanaka H, et al. Involvement of glucose catabolism in avermectin production by *Streptomyces avermitilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988, 32(2): 282~284
- 16 Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 1983, 166: 557
- 17 Janssen G R, Bibb M J. Derivatives of pUC18 that have *Bgl* II sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies. *Gene*, 1993, 124:133
- 18 Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F, et al. *Genetic manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*. Norwich: John Innes Foundation, 1985
- 19 宋渊, 曹贵明, 陈芝, 等. 阿维菌素高产菌株的选育及阿维菌素 B1 的鉴定. *生物工程学报*, 2000, 16 (1): 31~35
- 20 Ikeda H, Pang C H, Endo H, et al. Construction of a single component producer from the wild type avermectin producer *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot*, 1995, 48(6): 532~534
- 21 Kieser T. Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 1984, 12: 19~36

(2003-09-19 收稿, 2003-11-28 收修改稿)