

研究报告

麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌1748的质粒pSMY1及其特性的研究

龚利民 王以光

(中国医学科学院抗菌素研究所, 北京)

从大环内酯类抗生素麦迪霉素的产生菌生米卡链霉菌 1748(*Streptomyces mycarofaciens* 1748)中首次分离到质粒pSMY1 DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳和电镜观察, 测定pSMY1的分子量为 7.17×10^6 道尔顿。用限制性内切酶EcoRI、PstI、XhoI、Sall 和BamHI酶切该质粒DNA, 构成了pSMY1的限制性内切酶酶切图谱。EcoRI、PstI对该质粒均只有一个切点。

pSMY1能转化到变青链霉菌1326(*S. lividans* 1326)菌株中, 并能稳定地存在, 且具有形成麻点(pock)的特性。

关键词 质粒; 链霉菌; 抗生素; 麻点

自从1970年Okanishi等^[1]首次报道质粒可能参与抗生素生物合成以来, 有关质粒在抗生素产生菌中的存在及其功能的研究受到人们的重视^[2-7], 尤其是质粒作为运载体在遗传工程中起着重要作用的报道更引人关注^[8,9]。

我们从麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌1748中首次分离得到一种质粒DNA, 命名为pSMY1。对其进行了电镜观察和限制性内切酶酶切分析, 构成了具有14个酶切位点的pSMY1限制性内切酶酶切图谱。pSMY1成功地转化到变青链霉菌1326中, 且具有形成麻点特性。

材料和方法

(一) 菌株

1. 生米卡链霉菌1748 (*Streptomyces mycarofaciens* 1748)由本所提供。

2. 变青链霉菌1326 (*Streptomyces*

lividans 1326) 由D. A. Hopwood赠送。

(二) 培养基

1. 斜面孢子培养基组成(%) : KNO₃ 0.1, NaCl 0.05, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.05, FeSO₄ · 7H₂O 0.001, MgSO₄ · 7H₂O 0.05, 可溶性淀粉2, 琼脂1.5 pH7.0。

2. 改良的TSB组成(%): 蛋白胨(武汉) 2, 葡萄糖 0.25, NaCl 0.5, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.25, 自然pH。

3. 改良的YEME组成(%): 蔗糖10, 葡萄糖 1, 酵母膏(上海) 0.3, 精解蛋白胨0.5, 麦芽浸膏0.3, MgCl₂ · 6H₂O 0.1。

4. 改良的R₂M

(1) 蔗糖10.3%, 硫酸钾0.025%, 酵母膏0.4%, 蛋白胨(武汉) 0.4%, 葡萄

本文于1985年1月8日收到。

感谢Prof. D. A. Hopwood, John Innes Institute, England 赠送变青链霉菌1326。

本文承本所刘若莹副教授提供宝贵意见, 承刘琳同志制作电镜片; 病毒学研究所电镜室大力协作, 特此致谢。

糖 1%; (2) 三羟甲基氨基甲烷 (Tris 缓冲液) pH7.2(0.25M):100ml/1000ml; (3) KH_2PO_4 0.0025%; (4) NaOH 0.01% (5) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.295%; (6) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.012%; (7) 微量元素溶液 2ml/1000ml (ZnCl_2 0.004%, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%); (8) 琼脂 1.5%。

(三) 限制性内切酶及酶切反应条件

EcoRI、PstI、BamHI为美国BRL公司产品, SalI为美国Biolabs公司产品, XhoI为中国科学院生物物理所生化试剂厂产品。单酶酶切条件按照产品说明书所载。EcoRI-PstI、EcoRI-XhoI、PstI-XhoI双酶酶切用美国BRL公司提供的缓冲液(Core buffer), EcoRI-SalI、PstI-SalI、XhoI-SalI、BamHI-SalI双酶酶切用SalI酶切缓冲液。EcoRI-BamHI、PstI-BamHI、XhoI-BamHI双酶酶切用BamHI酶切缓冲液。置37℃恒温16h后在70℃保温10min,终止酶反应,终体积50 μ l。

(四) 质粒pSMY1 DNA的分离纯化

质粒 pSMY1 DNA 的提取按 Kado 等^[10]所报道的方法加以改进而进行。将生米卡链霉菌1748新鲜斜面孢子接种到改良的TSB中(250ml三角瓶装50ml培养基), 28℃振荡培养48h, 吸取菌液置离心管中, 离心(2500rpm, 室温)后弃去上清, 用15%蔗糖+TE(10.3%蔗糖, 10mMTris-HCl pH8.0, 1mMEDTA)洗涤一次, 加入1ml溶菌酶溶液(10mg/ml溶菌酶溶于15%蔗糖+TE), 使溶菌酶溶液与细胞充分混匀, 37℃保温30min, 再加入8ml碱性SDS溶液(3%SDS, 50mMTris pH12.6), 轻轻混匀直至溶液透明变粘, 65℃保温30min, 冷却至室温, 加入12ml酚:氯仿(1:

1), 充分混匀后离心(10,000rpm, 10min, 0℃), 吸取上清, 用乙醚抽提三次, 68℃使乙醚完全挥发, 加入1/10体积的3MNaAc(pH6.0)和2倍体积预冷过的无水乙醇, 置-20℃冰箱内过夜, 离心(4000rpm, 5min, 0℃)后, 迅速弃去上清, 将沉淀溶于适量TE液, 再次乙醇沉淀, 离心后弃上清, 于真空干燥器中减压抽干除去乙醇, 沉淀物溶于100 μ lTE液中, 低温保存备用。

(五) 琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用0.7—2.0%琼脂糖凝胶水平平板电泳, 电泳缓冲液为40mMTris—20mMNaAc—2mMEDTA·Na₂ pH8.0, 电压梯度4V/cm, 电泳毕将凝胶浸于0.5 μ g/ml溴化乙锭中染色20min以上, 在254nm紫外光下观察结果, 并加红色滤光片照相。聚丙烯酰胺凝胶浓度为8%, 电压梯度8V/cm, 电泳时间为10h。

(六) 电镜观察

基本按照徐有成等^[11]报道的方法进行。

(七) 原生质体的制备和转化

原生质体的制备和转化按Thompson等^[12]报道的方法进行。当培养基上长出菌落并出现麻点后, 以麻点中心部分分离孢子, 进一步检测质粒。

结 果

(一) 生米卡链霉菌质粒 pSMY1 DNA的分离及电泳观察

用碱变性方法得到的DNA, 经琼脂糖凝胶电泳发现存在质粒DNA电泳带, 而不见染色体DNA电泳带(图版I-1), 说明此法消除染色体效果很好。将质粒

DNA样品, 制片后用电子显微镜观察, 比较容易找到质粒 DNA分子(图1)。用已知分子量的质粒 pBR322 DNA分子作对照, 根据其相对长度 ($pBR322:pSMY1 = 1:2.529$), 测量分子量为 7.17×10^6 道尔顿。

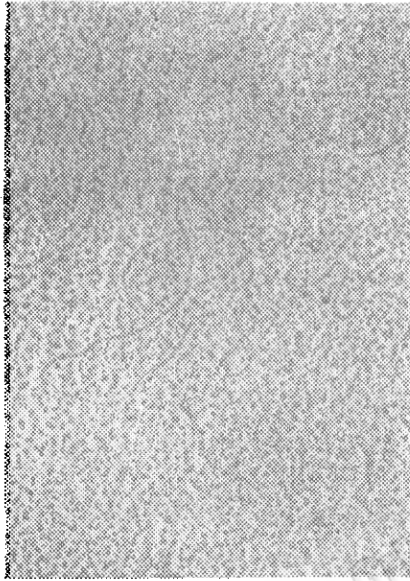


图1 质粒pSMY1DNA的电镜照片
Fig. 1 Electron microscope photograph of plasmid pSMY1 DNA

(二) 质粒 pSMY1 DNA的物理特性

用5种限制性内切酶分别对质粒pSMY1进行酶切, 从电泳图谱上出现的酶切DNA片段数, 可以推断EcoRI和PstI分别对pSMY1各有一个切点(图版I-2e,f), XhoI对pSMY1有二个切点(图版I-2g), SalI对pSMY1有五个切点(图版I-2i), BamHI对pSMY1也有五个切点(图版I-2j)。在相同的琼脂糖凝胶平板电泳条件下, 用λDNA的BglII酶切片段的迁移速度对其分子量的对数作图, 在所得到的线性范围内, 从标准曲线上求出其分子量(图版I-2a,b; 图2), 结果表明pSMY1DNA分子量为7.17Md, 此结果与电镜观察测量结果相一致。用λDNA的HindIII

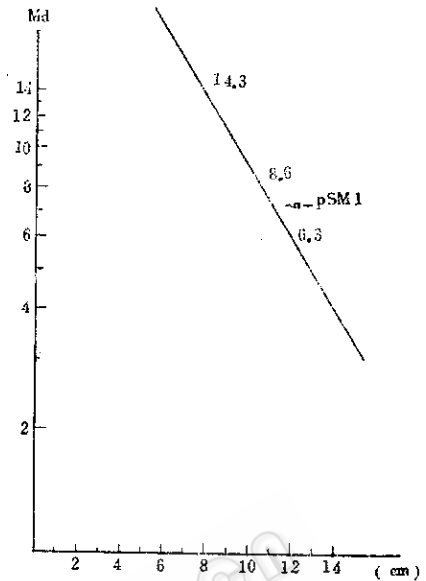


图2 DNA片段泳动距离和分子量关系

Fig. 2 The relationship between the distance of DNA fragment migration and their molecular weights

酶切片段作为分子量对照便可测出pSMY1DNA的酶切片段分子量。pSMY1被XhoI切成分子量分别为5.82Md和1.35Md二条片段; 被SalI切成分子量分别为2.54Md、1.86Md、1.36Md、1.06Md和0.35Md五条片段; 被BamHI切成分子量分别为3.59Md、1.76Md、0.77Md、0.59Md和0.46Md五条片段(见表1)

表1 质粒pSMY1DNA经不同限制性内切酶酶切所得片段数目及其分子量

Table 1 Number and molecular weight of plasmid pSMY1 DNA fragments after endonuclease digestion

限制性内切酶 Restriction endonuclease	片段数目 Number of fragments	分子量 Molecular weight (Md)
EcoRI	1	7.17
PstI	1	7.17
XhoI	2	5.82 1.35
SalI	5	2.54 1.86 1.36 1.06 0.35
BamHI	5	3.59 1.76 0.77 0.59 0.46

(三) 限制性内切酶对质粒 pSMY1-DNA切点的酶切图谱

根据单酶切实验结果, 为了找出各酶

在pSMY1上的酶切位点之间的位置关系, 我们进一步对该质粒DNA进行了双酶切实验, 结果如表2。

表2 质粒pSMY1DNA经不同限制性内切酶双酶切所得的片段数及其分子量

Table 2 Number and molecular weight of plasmid pSMY1DNA fragments after double endonuclease digestion

限制性内切酶 Restriction endonuclease	片段数 Number of fragments	分子量 Molecular weight(Md)												
PstI-EcoRI	2	4.29	2.88											
PstI-XhoI	3	5.10	1.35	0.72										
PstI-SalI	6	2.54	1.36	1.06	1.02	0.84	0.35							
PstI-BamHI	6	3.09	1.76	0.77	0.59	0.50	0.46							
EcoRI-XhoI	3	5.01	1.35	0.81										
EcoRI-SalI	6	2.54	1.86	1.36	0.91	0.35	0.15							
EcoRI-BamHI	6	3.38	1.76	0.77	0.59	0.46	0.21							
XhoI-SalI	7	2.54	1.56	1.06	0.70	0.66	0.35	0.30						
XhoI-BamHI	7	1.76	1.35	1.22	1.02	0.77	0.59	0.46						
SalI-BamHI	10	1.76	1.52	1.36	0.66	0.59	0.36	0.35	0.34	0.12	0.11			

EcoRI-XhoI双酶切pSMY1后得到三条片段(图版I-4b), 与XhoI单酶切pSMY1结果相比较, 表明EcoRI位点在XhoI酶切pSMY1的A片段内, 将A片段切为5.01Md和0.81Md二条片段; PstI-XhoI双酶切pSMY1的结果与XhoI单酶切pSMY1的结果相比, 表明PstI位点在XhoI单酶切pSMY1的A片段内, 将A片段切为5.10Md和0.72Md(图版I-4a); PstI-BamHI双酶切pSMY1与BamHI单酶切pSMY1的结果相比较(图版I-4e,f), 表明PstI位点在BamHI酶切pSMY1的A片段内, 将A片段切为3.09Md和0.50Md二个片段; XhoI-BamHI双酶切pSMY1与XhoI BamHI分别单酶切pSMY1的结果相比较, 表明XhoI酶切pSMY1的B片段内没有BamHI的切点, 而BamHI酶切pSMY1的B、C、D、E片段中也没有XhoI的切点, XhoI的二个切点都在BamHI单酶切pSMY1的A片段内, 将A片段切成1.35Md、1.22Md和1.02

Md(图版I-4d); EcoRI-PstI双酶切pSMY1后得到4.29Md和2.88Md二条片段, 表明两种酶酶切位点相距较远(图版I-5a) EcoRI-BamHI双酶切pSMY1的结果与BamHI单酶切pSMY1的结果相比, 表明EcoRI的位点在BamHI单酶切pSMY1的A片段内, 将A片段切为3.38Md和0.21Md(图版I-5c); SalI-BamHI双酶切pSMY1后在琼脂糖凝胶电泳图谱上可清晰地观察到五个分子量较大的片段(图版I-6c), 其余五个片段由于分子量较小, 用琼脂糖凝胶电泳难以判断, 故用8%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可观察到分子量较小的五个片段(图版I-6a)。比较SalI和BamHI单酶切pSMY1的结果, 可以看出SalI单酶切pSMY1的C、E片段中没有BamHI的酶切位点; XhoI-SalI双酶切pSMY1与XhoI、SalI分别单酶切pSMY1的结果相比, 表明SalI酶切pSMY1的A、D、E片段内没有XhoI的切点, XhoI对

pSMY1的二个切点，一个在SalI酶切 pSMY1的B片段内，将B片段切为1.56Md 和 0.30Md，另一个在SalI酶切pSMY1的C片段内，将C片段切为0.70Md 和 0.66Md(图版 I -6d)；PstI-SalI双酶切pSMY1的结果与SalI单酶切 pSMY1的结果相比，说明Pst I 位点在SalI 酶切 pSMY1的B 片段内。将B片段切成1.02Md 和0.84 Md (图版 I -6e)；EcoRI-SalI双酶切pSMY1后在琼脂糖凝胶电泳中可清晰地观察到五条片段，第六条片段分子比较小，用琼脂糖凝胶电泳无法判断，用 8 %聚丙烯酰胺凝胶电泳可见第六条片段(图版 I -6f,i)与SalI单酶切pSMY1结果相比，表明EcoRI位点在SalI 单酶切 pSMY1的 D 片段内，将D片段切为0.91Md和0.15 Md 二条片段。根据这些结果我们可以画出表明EcoRI、PstI、XhoI、SalI和BamHI 对质粒 pSMY1DNA分子14个酶切位点相对位置的限制性内切酶酶切图谱(图 3)

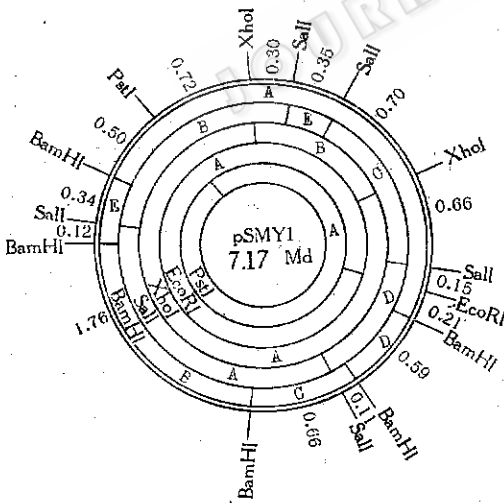


图 3 质粒pSMY1 DNA的酶切图
Fig. 3 Restriction map of plasmid pSMY1 DNA

(四) 质粒pSMY1 DNA对变青链霉菌1326的转化及其麻点形成

以质粒 pSMY1 为转化实验的供体

DNA，以不含质粒的变青链霉菌 1326 为受体菌，进行原生质体转化实验。用 2μg-pSMY1DNA转化 1.1×10^7 个变青链霉菌 1326的原生质体，得到 9.3×10^8 个菌落，于再生平板上观察到麻点形成，再生第四天后麻点较明显。大约 8×10^6 个菌落形成麻



图 4 pSMY1转化到变青链霉菌1326中所形成的麻点
Fig.4 Pocks formed by transformation of pSMY1 into *S.lividans* 1326

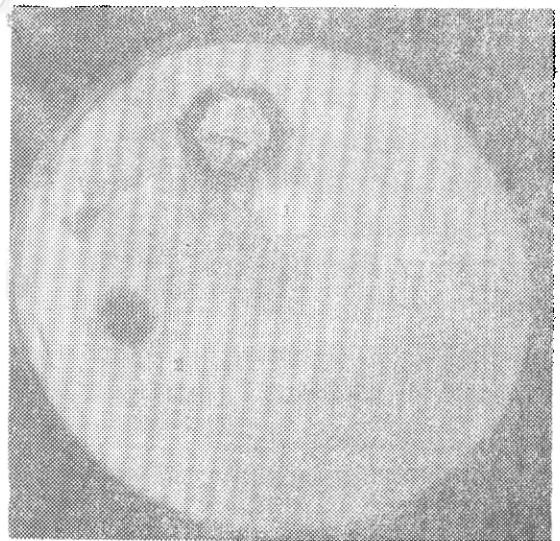


图 5 含有pSMY1 的菌株生米卡链霉菌 1748(1)和转化子(2)在不含质粒的菌株变青链霉菌1326菌苔上所形成的麻点

Fig.5 Pocks formed by pSMY1-carrying strain *s.mycarofaciens* 1748 and transformant on the lawn of plasmid non carrying strain *s.lividans* 1326

点。计算其原生质体再生率为84.5%，转化效率为 $4 \times 10^5/\mu\text{gDNA}$ ，转化频率为8.6%。从麻点区域中心分离转化子，并从转化子中提取到质粒 pSMY₁DNA (图版 I-3)。将形成麻点的转化子菌落传代后影印到不含质粒的变青链霉菌1326菌苔上，可观察到清晰的麻点(图4)，说明 pSMY₁在转化子中能稳定地存在。将转化子和生米卡链霉菌1748孢子涂布在不含质粒的变青链霉菌1326菌苔上，也可观察到麻点的形成(图5)，说明 pSMY₁既能成功地转化又具有接合转移特性。

讨 论

综上所述，我们采用碱变性法从大环内酯类抗生素麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌 1748 中分离得到质粒 pSMY₁DNA，用限制性内切酶 EcoRI、PstI、XhoI、SalI和BamHI 对该质粒进行了限制性内切酶酶切分析，结果表明 pSMY₁的分子量为7.17Md，与电镜观察结果基本一致。根据

酶切实验结果，构成了具有14个酶切位点相对位置的限制性内切酶酶切图。

麦迪霉素产生菌——生米卡链霉菌 1748是我所在1974年从国内土壤筛选得到的菌株^[13]，现已用于生产。该菌株中所分离得到的质粒分子量小(7.17Md)，分离方法简单，易于制备，具有EcoRI、Pst-I 单个酶切点。该质粒能够进行转移和转化，且具有麻点形成特点，这对于将该质粒建造成新的放线菌质粒载体是很有利的。目前有一些关于链霉菌质粒载体的建造和利用方面的报道，所用材料多半是不产生抗生素的菌种，从产生抗生素的菌种中提取质粒并建造成合适的分子载体的报道不多。因此，建造新的链霉菌质粒载体，使之成为更理想的运载体工具是当前链霉菌基因工程研究的一个重要方面。如能将产生抗生素的基因片段，通过质粒 pSMY₁作为分子载体进行克隆，对提高抗生素产量或产生新抗生素将是极有意义的。关于质粒pSMY₁DNA与麦迪霉素产生的关系正在探讨。

参 考 文 献

- [1] Okanishi, M. et al., *J. Antibiotics*, 23(1):45, 1970.
- [2] 薛禹谷等: 微生物学报, 18(3):195, 1978.
- [3] 王嶽五等: 遗传学报, 7(4):123, 1980.
- [4] 郑幼霞等: 遗传学报, 7(2):111, 1980.
- [5] 王以光: 微生物学报, 24(4):357, 1984.
- [6] Hopwood, D. A., *Annu. Rev. Microbiol.*, 32:373, 1978.
- [7] Wang Y-G, et al., *J. Antibiotics*, 35:335, 1982.
- [8] Hopwood, D. A. et al.: *Trends in Biotechnology*, 1(2):42, 1983.
- [9] Kieser, T. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 185:223, 1982.
- [10] Kado, C. I. et al.: *J. Bacteriol.*, 145(3):1365, 1981.
- [11] 徐有成等: 生物化学与生物物理进展, 1975年第2期, p.9.
- [12] Thompson, C. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 151:668, 1982.
- [13] 中国医学科学院药物研究所抗菌素研究室等: 微生物学报16(4):311, 1977.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLASMID pSMY1 FROM MIDECAMYCIN-PRODUCING STRAIN *STREPTO- MYCES MYCAROFACIENS* 1748

Gong Limin Wang Yiguang

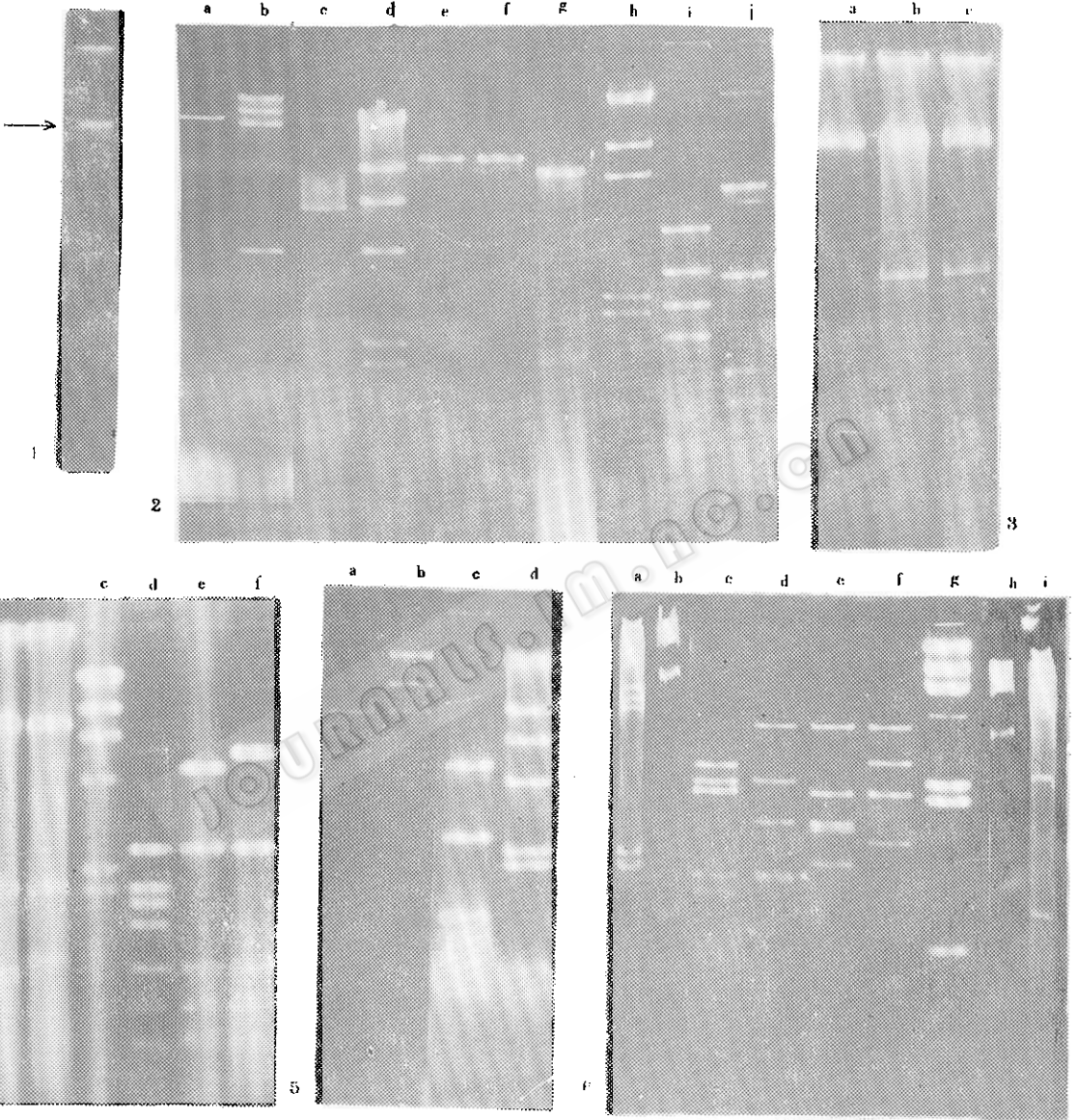
(*Institute of Antibiotics, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

A plasmid pSMY1 from midecamycin-producing strain *Streptomyces mycarofaciens* 1748 was isolated. The molecular weight of this plasmid was estimated to be 7.17Md by agarose gel electrophoresis and electron microscopy. A restriction map was constructed with restriction endonuclease EcoRI, PstI, XhoI, SaII, and BamHI, both EcoRI and PstI give single site of restriction on this plasmid DNA. pSMY1 was introduced into *S. lividans* 1326 by transformation and the pock-forming ability of pSMY1 was confirmed by the transformed *S. lividans* 1326.

Key words

Plasmid; *streptomyces*; antibiotics; pock

龚利民等：麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌1748的质粒pSMY1及其特性的研究
 Gong Limin et al.: Isolation and characterization of plasmid pSMY1 from
 midcamycin-producing strain *Streptomyces mycarofaciens*
 1748



图版说明

1. 质粒pSMY1 DNA的电泳图 2. 质粒pSMY1DNA经EcoRI、PstI、XhoI、SalI和BamHI分别酶切后的电泳图 3. 变音链霉菌1326转化子的质粒DNA电泳图 4. 质粒pSMY1 DNA经PstI-XhoI、EcoRI-XhoI、XhoI-BamHI和PstI-BamHI双酶切后的电泳图 5. 质粒pSMY1 DNA经EcoRI-PstI、EcoRI-BamHI双酶切后的电泳图 6. 质粒pSMY1DNA经SalI-BamHI、XhoI-SalI、EcoRI-SalI和PstI-SalI双酶切后的电泳图

1. Electrophoretic pattern of plasmid pSMY1 DNA 2. Electrophoretic pattern of plasmid pSMY1 DNA after: digestion with EcoRI, PstI, XhoI, SalI and BamHI, respectively. a. pSMY1/EcoRI; b. λ /BglII; c. pSM. Y1; d. λ /Hind III; e. pSMY1/EcoRI; f. pSMY1/PstI; g. pSMY1/XhoI; h. λ /Hind III; i. pSMY1/SalI; j. pS-

(下转30页)

MY1/BamHI 3. Electrophoretic pattern of plasmid DNA from transformant of *S. lividans* 1326 a. DNA from *S. lividans* 1326; b. DNA from transformant; c. DNA from *S. mycarofaciens* 1748 4. Electrophoretic pattern of plasmid pSMY1 DNA after double digestion with PstI-XhoI, EcoRI-XhoI, XhoI-BamHI and PstI-BamHI, respectively. a. pSMY1/PstI-XhoI; b. pSMY1/EcoRI-XhoI; c. λ /HindIII; d. pSMY1/XhoI-BamHI; e. pSMY1/PstI-BamHI; f. pSMY1/BamHI 5. Electrophoretic pattern of plasmid pSMY1 DNA after double digestion with EcoRI-PstI and EcoRI-BamHI, respectively. a. pSMY1/EcoRI-PstI; b. λ /HindIII; c. pSMY1/EcoRI-BamHI; d. λ /HindIII 6. Electrophoretic pattern of plasmid pSMY1 DNA after double digestion with SalI-BamHI XhoI-SalI, EcoRI-SalI and PstI-SalI respectively. c, d, e, f, g: agarose gel electrophoresis; c. pSMY1/SalI-BamHI; d. pSMY1/XhoI-SalI; e. pSMY1/PstI-SalI; f. pSMY1/EcoRI-SalI; g. λ /HindIII. a, i, b, h: polyacrylamide gel electrophoresis. a. pSMY1/SalI-BamHI, i. pSMY1/EcoRI-SalI, b, h. λ /HindIII.