

## 庆大霉素生物合成基因 *genA* 的功能

林强 陈洲琴 胡育龙 洪文荣\*

(福州大学 生物科学与工程学院 福建 福州 350116)

**摘要:**【目的】在绛红色小单孢菌 G1008 (*Micromonospora purpurea* G1008)上构建 *genA* 基因缺失工程菌, 通过分析其次级代谢产物的变化, 推测 *genA* 基因功能。【方法】构建用于 *genA* 基因框内敲除的质粒 pAB103, 经接合转移导入绛红色小单孢菌 G1008, 安普抗性及 PCR 扩增筛选获得 *genA* 缺失工程菌 GA1048。【结果】与出发菌 G1008 相比, 工程菌 GA1048 不再合成庆大霉素 C 族组分, 主要积累中间代谢产物庆大霉素 A2。【结论】*genA* 基因失活导致庆大霉素生物合成代谢流中断, 暗示 *genA* 基因参与加洛糖胺 C-3"位的氮甲基化。

**关键词:** 绛红色小单孢菌, *genA*, 庆大霉素 A2

## Function of *genA* in gentamicin biosynthesis gene cluster

LIN Qiang CHEN Zhou-Qin HU Yu-Long HONG Wen-Rong\*

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

**Abstract:** [Objective] The *genA* inactive mutant was constructed on the basis of *Micromonospora purpurea* G1008, and then the function of *genA* was studied by analyzing the secondary metabolites. [Methods] Plasmid pAB103 used for the *genA* in-frame deletion was constructed and transformed into *Micromonospora purpurea* G1008 by conjugation. Apramycin resistance and PCR amplification were used to confirm *Micromonospora purpurea* GA1048. [Results] Gentamicin A2, instead of gentamicin C complex, was accumulated in *Micromonospora purpurea* GA1048, comparing with *Micromonospora purpurea* G1008. [Conclusion] The inactivation of *genA* led to the changes of gentamicin biosynthesis flow, and *genA* might be responsible for the methylation at C-3" of garosamine.

**Keywords:** *Micromonospora purpurea*, *genA*, Gentamicin A2

庆大霉素是一类广谱氨基糖苷类抗生素, 对大部分革兰氏阳性和阴性病原菌有较强的抑制和杀灭作用<sup>[1]</sup>。根据其化学结构的差异, 庆大霉素又可分为 A 族、B 族、C 族、X 族。其中 C 族由于具有良好抗菌活性, 已广泛应用于临床; A、B、X 族抗

菌活性相对较弱, 虽未得到较好利用, 但其潜在的抗原虫、抗病毒、抗肿瘤功能, 受到药物学家的广泛关注。

庆大霉素产生菌是绛红色小单孢菌和棘孢小单孢菌。其生物合成途径研究已经进行了几十年。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31070093); 国家“重大新药创制”科技重大专项项目 (No. 2012ZX09201101-008)

\*通讯作者: 信箱: hongwr56@163.com

收稿日期: 2014-05-27; 接受日期: 2014-09-18; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2014-09-18

但是由于小单孢菌细胞壁特殊,且缺乏相应的分子遗传学操作手段,在很长的时间里,庆大霉素的生物合成研究进展缓慢。随着分子生物学和生物信息学技术的快速发展,从理论上对庆大霉素生物合成进行研究成为了可能。2004年之后,不同菌株的庆大霉素生物合成基因簇陆续被公布(GenBank 登录号: AY524043, AJ628149, AJ575934, JQ975418),并预测了其中各个基因的功能。2009年, Kudo 等<sup>[2]</sup>借助生物信息学软件,结合相关实验报道,进一步从理论上阐述了庆大霉素生物合成过程及各个基因的关系。2012年, Hong 等<sup>[3]</sup>通过同源重组敲除 *gntK* 基因,阐明其为编码绛红糖胺 C6'位的甲基化酶基因。2013年, Kim 等<sup>[4]</sup>对 *gntK* 基因进行体外表征,进一步证实了这一结论。因此,利用基因工程手段,对庆大霉素生物合成基因进行研究是可行的。理论推测 *genA* 基因是一个关键的保守基因, GenA 是一个疏水性蛋白,其氨基酸序列存在甲基转移结构域,可能参与修饰庆大霉素的生物合成,但是尚未被生物学实验所证实。

本研究借助已有的小单孢菌接合转移体系,在阐明 *gntK* 基因功能的基础上,利用分子遗传学操作手段对 *genA* 基因进行框内失活研究。通过分析 *genA* 缺失工程菌的次级代谢产物是否发生变化,进而推测 *genA* 基因的功能位点,为阐明庆大霉素生物合成途径提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌株:** 克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司。*Escherichia coli* Top10、*Escherichia coli* ET12567/pUZ8002、温敏性质粒 pKC1139 为本实验室保存。出发菌 *Micromonospora purpurea* G1008 为实验室选育和保藏。

**1.1.2 培养基及抗生素:** 绛红色小单孢菌 G1008 固体培养基(MM)、种子培养基(SM)及发酵培养基(FM)参见文献[3]。LB 细菌培养基和接合转移使用的 MS 固体培养基参见文献[5]。本研究使用的抗生素及

其终浓度分别为: 氨苄青霉素 100 mg/L、安普霉素 50 mg/L、氯霉素 25 mg/L、卡那霉素 25 mg/L、萘啶酮酸 25 mg/L。

**1.1.3 主要试剂:** *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 溶菌酶、RNase A 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; 其他常规试剂见文献[5]。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计:** 根据已公布的庆大霉素生物合成基因簇序列(GenBank 登录号 JQ975418),通过生物学软件 Vector NTI 11.5 设计靶基因序列上下游同源交换臂引物 P1/P2 和 P3/P4,以及双交换鉴定引物 P5/P6 和 P7/P8。P1: 5'-GAATTC<sup>+</sup>CCCGTACCAA CAGCTCAAGG-3' (*EcoR* I); P2: 5'-AAGCTT<sup>+</sup>AAG ACCCGCAGGTCGATGTC-3' (*Hind* III); P3: 5'-AAGCTT<sup>+</sup>CTACGAGACGATGGCCAACCT-3' (*Hind* III); P4: 5'-TCTAGA<sup>+</sup>GGTCAGCAACGTGGAACG GAT-3' (*Xba* I); P5: 5'-CTGAGATCACCGGCGCTG GT-3'; P6: 5'-TGTGCGTCCAGGCGTAGTCG-3'; P7: 5'-ACATCCCGTCGGTCACCGTG-3'; P8: 5'-TCGCTGCTCACCGAGATCCC-3'。

**1.2.2 DNA 操作技术:** 质粒 DNA 的小剂量提取、酶切、酶连和电泳,大肠杆菌感受态的制备和转化等见文献[6-8]。重组质粒导入绛红色小单孢菌,采用接合转移法。绛红色小单孢菌染色体 DNA 的提取和接合转移操作参见文献[9]。

**1.2.3 发酵及产物提取:** 发酵前先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 °C 培养 10 d,挖块接种于种子培养基(装量为 50 mL/250 mL 三角瓶), 37 °C 摇床培养 36 h (转速为 250 r/min),培养进入对数生长期时,按 10%接种量转接于发酵培养基(装量为 150 mL/1 000 mL 三角瓶), 37 °C 摇床发酵 120 h (转速为 250 r/min)。提取代谢产物时,将发酵液稀释后分别酸化、碱化,用 732 树脂静态吸附 6-8 h。收集吸附饱和树脂,而后用 5%氨水进行碱洗,收集洗脱液。洗脱液经

薄膜浓缩到约 300 000 mg/L, 用浓硫酸调至 pH 5.5–6.0, 在搅拌下缓慢向浓缩液中滴入 95%以上乙醇进行结晶, 时间 3–4 h, 之后离心分离(转速为 10 000 r/min), 真空干燥获得成品。

**1.2.4 代谢产物分析:**产物组分分析采用硅胶 GF<sub>254</sub> 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, 下相展开。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(N<sub>2</sub>)流量为 8 L/min, 干燥气体的温度设定在 350 °C, 雾化压力为 35 psig, 毛细管电压为 3 500 V, 碎裂电压为 135 V, 质谱数据分析使用安捷伦 MassHunter 执行 (B.04.00)。

## 2 结果与分析

### 2.1 穿梭质粒 pAB103 的构建

以绛红小单孢菌 G1008 的基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得同源交换臂 B1 (1 771 bp) 和 B2 (1 945 bp)。将扩增的两条交换臂分别克隆到 pMD19-T 载体, 得到阳性克隆子, 提取质粒, 分别命名为质粒 pAB101 和质粒 pAB102。

质粒 pAB101 用 (*EcoR* I/*Hind* III) 双酶切, 电泳回收 B1 片段; 质粒 pAB102 用(*Hind* III/*Xba* I)双酶切, 电泳回收 B2 片段; 温敏性质粒 pKC1139 用

(*EcoR* I/*Xba* I)双酶切, 并电泳检测分离, 回收长片段。将回收的 3 个片段经酶连, 转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 筛选阳性克隆子, 获得穿梭质粒 pAB103 (图 1A)。理论上穿梭质粒, 用(*EcoR* I/*Xba* I)双酶切可以得到 3 728 和 6 446 bp 的线性片段, 结果与理论预测相一致, 初步证明穿梭质粒 pAB103 构建正确(图 1B)。

### 2.2 穿梭质粒 pAB103 导入绛红小单孢菌 G1008

将穿梭质粒 pAB103 转入 *E. coli* ET12567(pUZ8002)感受态中, 得到供体菌 *E. coli* ET12567(pUZ8002, pAB103)。然后, 通过接合转移方法, 将供体菌中的穿梭质粒 pAB103 导入绛红小单孢菌 G1008。供体菌与受体菌细胞数量比按大约 1:1 混合。37 °C 培养 20 h 后, 用 1 mL 的安普霉素和萘啶酸(终浓度分别为 50 mg/L 和 25 mg/L)水溶液覆盖, 37 °C 继续培养 7 d 长出接合子。由于质粒 pAB103 是温度敏感型质粒, 培养温度高于 34 °C 质粒就不能在绛红色小单孢菌中进行复制, 只有该质粒整合到 G1008 基因组中才能表达安普霉素抗性, 因此长出来的接合子是单交换菌株。随机挑取其中一株命名为绛红小单孢菌 GA1。

为进一步验证单交换菌株的正确性, 根据同源重组原理(图 2), 以 GA1 基因组 DNA 为模板, 分

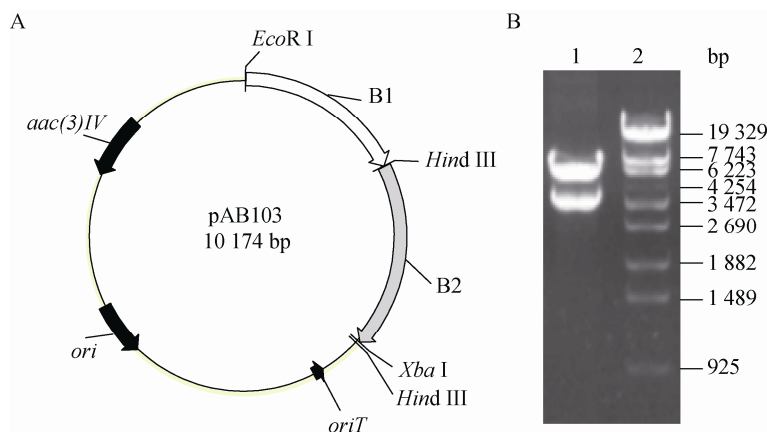


图 1 穿梭质粒 pAB103 酶切鉴定图

Figure 1 Verification of the shuttle plasmid pAB103 by endonuclease digestion

Note: 1: pAB103 (*EcoR* I/*Xba* I); 2: Marker ( $\lambda$ -*Eco*T14).

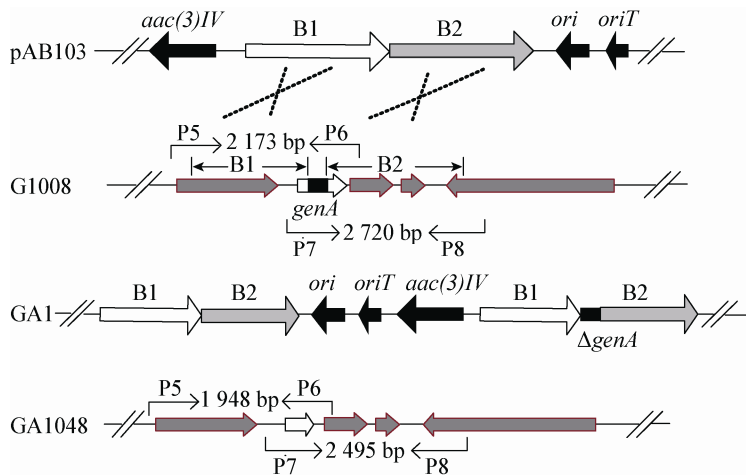


图 2 质粒 pAB103 与染色体 DNA 同源重组示意图  
Figure 2 Homologous recombination between the plasmid pAB103 and chromosome DNA

别用引物 P5/P6 和 P7/P8 进行 PCR，引物 P5/P6 扩增得到 1 948 bp 片段，与亲株相比片段减小 225 bp，引物 P7/P8 扩增得到 2 720 bp 片段，与亲株条带大小一致，电泳检测结果见图 3，初步推断质粒 pAB103 已经整合到绛红小单孢菌 G1008 的基因组上，并且是同源交换臂 B1 上发生一次重组。

由于单交换菌株 GA1 基因组上存在重复序列，不稳定，容易发生二次重组，产生回复突变菌株或是 *genA* 框内缺失工程菌。因此，进一步筛选

双交换工程菌时，将 GA1 在斜面培养基上松弛培养 3 代，然后分离单菌落，将单菌落影印至添加安普霉素的抗性平板和不添加抗生素的普通平板上，培养后，取其中一株在抗性板上不长的安普霉素敏感菌株，提取其基因组 DNA，再分别用引物 P5/P6 和 P7/P8 进行 PCR 验证，引物 P5/P6 扩增得到 1 948 bp 片段，引物 P7/P8 扩增得到 2 495 bp 片段，与亲株相比片段均减小 225 bp，初步确定该菌株是目标突变菌，命名为 GA1048，电泳检测见图 3，经测序比对，证明 GA1048 确实为基因 *genA* 框内缺失工程菌。

2.3 GA1048 工程菌生长状态考察

工程菌 GA1048 经斜面培养基连续培养 3 代，与出发菌株 G1008 相比，其菌落形态、菌丝体生长、生长周期没有明显改变(图 4)，说明 *genA* 的敲除对菌株的表型没有明显的影响，遗传性状稳定。

2.4 GA1048 工程菌代谢产物分析

绛红小单孢菌 G1008 和 GA1048 工程菌同时按照 1.2.3 中的方法进行摇瓶发酵，提取代谢产物，并进行质谱分析(图 5)。

结果表明，工程菌 GA1048 与出发菌 G1008 的代谢产物有明显差异。工程菌 GA1048 的主要离子峰为 456[M+H]<sup>+</sup>，与庆大霉素 A2 同质，不再产生庆大霉素 C1、庆大霉素 C1a、庆大霉素 C2、C2a 和 C2b。此外，工程菌 GA1048 的次要离子峰为

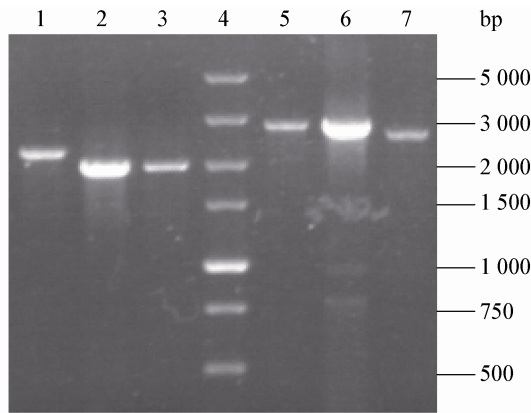


图 3 PCR 鉴定重组突变菌  
Figure 3 The PCR verification of the recombinant mutant  
Note: 1: G1008 (P5/P6); 2: GA1 (P5/P6); 3: GA1048 (P5/P6); 4: DL5000 bp marker; 5: G1008 (P7/P8); 6: GA1 (P7/P8); 7: GA1048 (P7/P8).

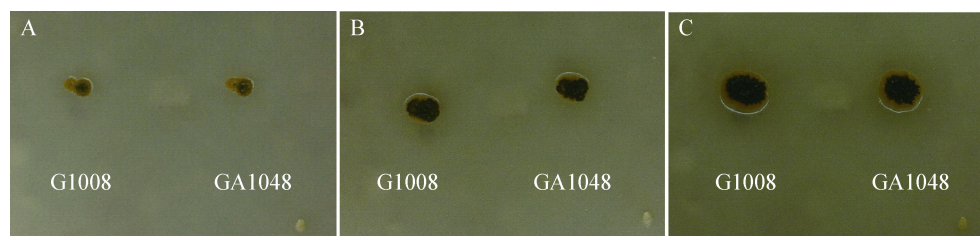


图4 G1008 和 GA1048 生长状态

Figure 4 The growth state of the G1008 and GA1048

注: A: 第4天; B: 第6天; C: 第8天。

Note: A: The fourth day; B: The sixth day; C: The eighth day.

470[M+H]<sup>+</sup>, 根据 Kim 等<sup>[10]</sup>推测, 该组分为庆大霉素 A2 的衍生物庆大霉素 A2e (图 5)。

## 2.5 *genA* 基因回补实验

以绛红小单孢菌 G1008 的基因组 DNA 为模板, 通过 P1/P4 引物 PCR 扩增获得 3 941 bp 片段, 将其克隆到 pMD19-T 载体, 得到阳性克隆子, 提取其质粒, 并命名为质粒 pAB104。质粒 pAB104 和质粒 pKC1139 分别用(*Eco*R I/*Xba* I)双酶切, 并电泳回收大片段。回收的两个片段经酶连, 转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 筛选阳性克隆子, 获得 *genA* 基

因回补质粒 pAB105, 并将其转入 *E. coli* ET12567(pUZ8002)。

然后, 通过接合转移方法, 将供体菌中的回补质粒 pAB105 导入到绛红小单孢菌 GA1048。筛选获得一株 pAB105 质粒整合到 GA1048 染色体上的重组菌株, 命名为绛红小单孢菌 GH1。该重组菌株存在同源片段, 不稳定, 容易发生二次重组。通过影印点板, 再经安普抗性和 PCR 扩增筛选获得工程菌 GH110。GH110 工程菌同样按照 1.2.3 中的方法进行摇瓶发酵, 提取代谢产物, 并进行 TLC 分析(图 6)。

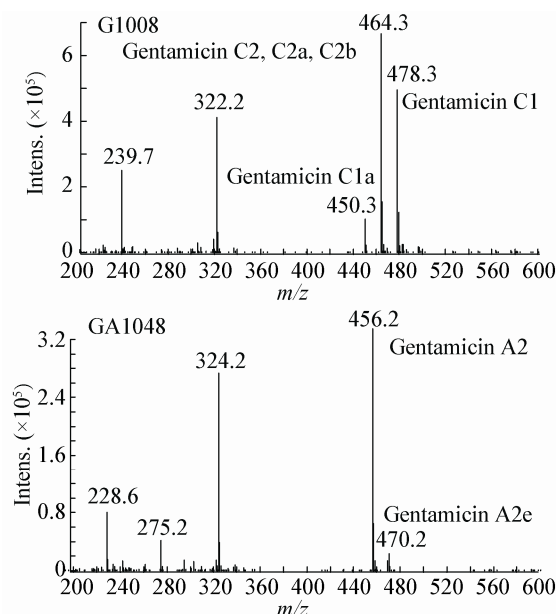


图5 G1008 和 GA1048 次级代谢产物质谱分析图

Figure 5 MS analysis of metabolites from the G1008 and GA1048

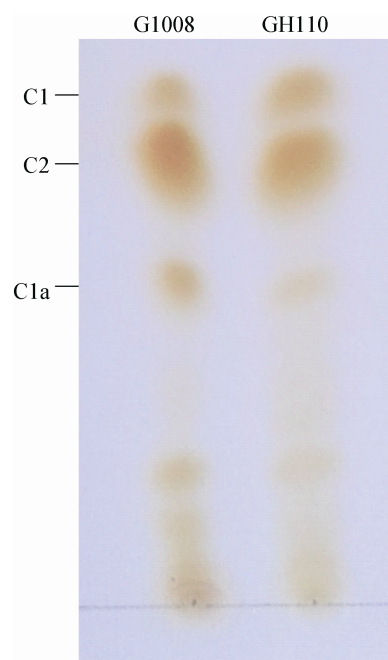


图6 G1008 和 GH110 次级代谢产物薄层层析图

Figure 6 TLC analysis of metabolites from the G1008 and GH110



结果表明,工程菌 GH110 重新获得产庆大霉素 C 族组分的能力,与绛红小单孢菌 G1008 相比没有明显差异。

### 3 讨论

庆大霉素 A2 是庆大霉素生物合成过程中的第一个拟三糖中间体,随后经生物化学修饰成为庆大霉素 A,再进一步形成庆大霉素 X2 (图 7)。从庆大霉素 A2 到庆大霉素 A 这一转化,可能涉及 3 个反应,分别是 C3"位的脱氢作用以及氨化和氨甲基化。通过基因 *genA* 框内缺失,阻断了其在绛红小单孢菌 G1008 中的表达,得到工程菌 GA1048,代谢产物发生显著变化。质谱分析表明,工程菌代谢产物主要积累庆大霉素 A2 和 A2e,证明了 *genA* 参与加洛糖胺 C-3"位的修饰作用。此外,在绛红小单孢菌 G1008 上缺失 *genA* 基因积累庆大霉素 A2 和 A2e,这一结果进一步证明了 Kim 等<sup>[10]</sup>对甲基转移酶 GntK 专一性不高的推测。

本研究通过 Swiss-model 等生物信息学软件分

析,推测基因 *genS2* 和 *genD2* 参与从庆大霉素 A2 到庆大霉素 A 这一转化。*GenS2* 存在氨基转移结构域,是一个氨基转移酶,而 *GenD2* 与 NADH 依赖的脱氢酶同属一个蛋白家族,是一个脱氢酶。在理论预测的基础上,本实验组对这两个基因进行失活研究,结果代谢产物也是积累在庆大霉素 A2。实验结果与理论预测相符,证明了基因 *genD2*<sup>[11]</sup>和基因 *genS2*<sup>[12]</sup>分别参与加洛糖胺 C-3"位的脱氢作用和氨化反应。此外,通过 Vector NTI 11.5 软件,将基因 *genA* 的 ORF 翻译成氨基酸序列,并在 NCBI 上进行保守结构域分析,结果表明 *GenA* 与转录调节蛋白 ExsB 以及核苷生物合成蛋白 QueC 具有较高的同源性。同时,在 *GenA* 的前 60 个氨基酸存在多功能结构域,该结构域与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸合成酶、天冬酰胺合成酶以及琥珀酸精氨酸合成酶密切相关,也与 tRNA 甲基转移酶结构域有关,参与某些 tRNA 的甲基化修饰。因此,可以推测 *GenA* 是一个调节蛋白,或者是一个甲基化酶,参与加洛糖胺 C-3"位的氨甲基化。

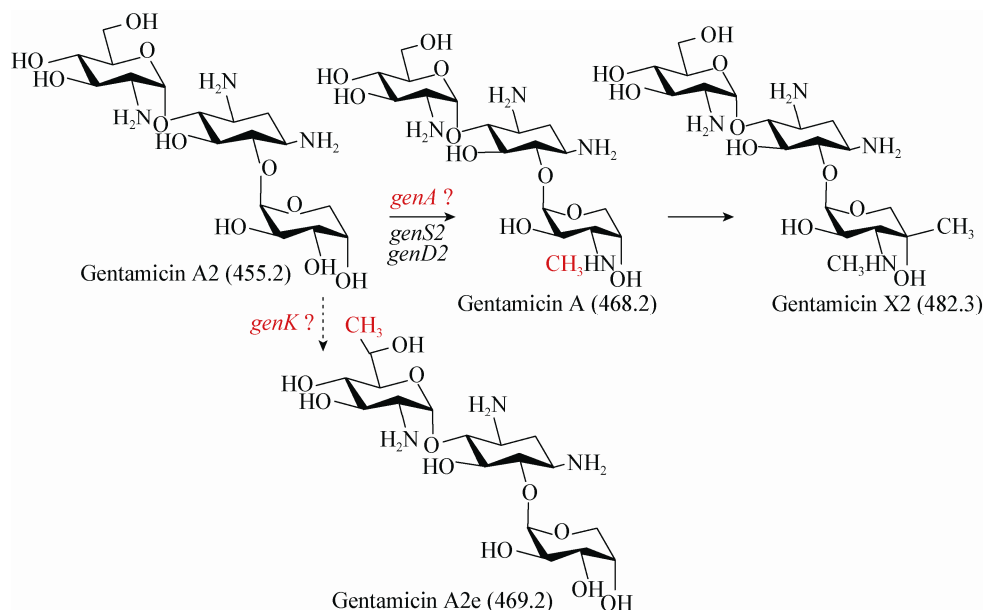


图 7 基因 *genA* 催化庆大霉素生物合成途径位点

Figure 7 The functional sites of the *genA* in gentamicin biosynthetic pathway

## 参 考 文 献

- [1] Kumar CG, Himabindu M, Jetty A. Microbial biosynthesis and applications of gentamicin: a critical appraisal[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2008, 28(3): 173-212
- [2] Kudo F, Eguchi T. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics[J]. The Journal of Antibiotics, 2009, 62: 471-481
- [3] Hong WR, Yan LB. 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
- [4] Kim HJ, McCarty RM, Ogasawara Y, et al. GenK-catalyzed C-6' methylation in the biosynthesis of gentamicin: isolation and characterization of a cobalamin-dependent radical SAM enzyme[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(22): 8093-8096
- [5] Tobias K, Bibb M, Mark JB, et al. Practical Streptomyces Genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000
- [6] Zhu BY, Hong WR, Yan SD, et al. Construction of DNA homologous recombination system in *Streptomyces tenebrarius*[J]. Biotechnology Bulletin, 2011, 4: 162-166 (in Chinese)  
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, 4: 162-166
- [7] Hong WR, Yan SD. Engineering *Streptomyces tenebrarius* to synthesize single component of carbamoyl tobramycin[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(1): 33-39
- [8] 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
- [9] Yan LB, Hong WR, Fang ZK, et al. Construction of the conjugal transfer system for *Micromonospora purpurea* G1008[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2011, 12, 36(12): 899-904 (in Chinese)  
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
- [10] Kim JY, Suh JW, Kang SH, et al. Gene inactivation study of *gntE* reveals its role in the first step of pseudotrisaccharide modifications in gentamicin biosynthesis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 372(4): 730-734
- [11] Que XQ, Chen ZB, Hong WR. Research on *genD2* in gentamicin biosynthesis gene cluster[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2014, 45(2): 237-241 (in Chinese)  
阙新桥, 陈泽斌, 洪文荣. 庆大霉素生物合成基因 *genD2* 的研究[J]. 中国药科大学学报, 2014, 45(2): 237-241
- [12] Zhang SZ. Study on the aminotransferase gene of gentamicin biosynthesis[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fuzhou University, 2013 (in Chinese)  
张书祖. 庆大霉素生物合成氨基转移酶基因的研究[D]. 福州: 福州大学硕士学位论文, 2013

## 编辑部公告

## 《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。