

研究报告

## 亚硝基胍消除链霉菌 FR-008 的线性质粒

徐玉松 高土玲 于昊 邓子新 贺新义\*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200030)

**摘要:**【目的】利用亚硝基胍(NTG)消除链霉菌 FR-008 线性质粒以简化其基因组, 获得背景清晰的菌株, 作为抗生素异源生物合成的底盘细胞。【方法】NTG 溶液处理链霉菌 FR-008 孢子悬液, 从存活的诱变株中筛选砷敏感的突变株, 再通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)检测线性质粒是否被消除; 用生测实验定性检测各个线性质粒消除突变株杀念菌素合成的能力, 最后通过 HPLC 定量比较突变株和野生型产生杀念菌素的差异。【结果】从 103 个诱变株中筛选到 3 株砷敏感的突变株(10#, 59#, 115#)。PFGE 检测发现它们均丢失了大线性质粒 pSSFR1, 此外, 42# 突变株的小线性质粒 pSSFR2 被消除, 在此基础上, 第二轮 NTG 诱变获得了双质粒消除的突变株。大线性质粒 pSSFR1 消除率约为 3%, 小线性质粒 pSSFR2 消除率约为 1%。发酵结果显示: 10#、115# 突变株杀念菌素有效组分 III 产量分别提高了 40% 和 30%。【结论】首次发现 NTG 是一种有效消除链霉菌线性质粒的诱变剂, 2 株大线性质粒消除的突变株杀念菌素的产量得到提高。此方法可以用来消除特定链霉菌菌株中的巨型线性质粒以高效简化其基因组, 因而是一种有效的抗生素遗传育种的方法。

**关键词:** 链霉菌 FR-008, 质粒消除, 线性质粒, 亚硝基胍, 脉冲场凝胶电泳, 砷抗性, 基因组简化

## Curing linear plasmids by nitrosoguanidine in *Streptomyces* sp. FR-008

XU Yu-Song GAO Tu-Ling YU Hao DENG Zi-Xin HE Xin-Yi\*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

**Abstract:** [Objective] *Streptomyces* sp. FR-008 was treated with nitrosoguanidine (NTG) to screen mutant with reduced genome in size and without any effect on its growth rate. The resultant mutants were measured on their potentiality to be further developed into chassis cells for heterologous production of secondary metabolites. [Methods] Treatment of the spore suspension of *Streptomyces* sp. FR-008 by NTG was immediately followed by screening of mutants that are sensitive to arsenite, indicative of loss of large linear plasmid. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis of

**Foundation item:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB721004)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-62932943-2131; E-mail: xyhe@sjtu.edu.cn

Received: April 27, 2016; Accepted: September 07, 2016; Published online (www.cnki.net): October 09, 2016  
基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划) (No. 2012CB721004)

\*通讯作者: Tel: 86-21-62932943-2131; E-mail: xyhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-04-27; 接受日期: 2016-09-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-10-09

103 strains that survived NTG treatment was used to detect the presence or loss of linear plasmids. Bioassay and HPLC analysis were used to compare the yield of candicidin component III for four mutants with that of the wild type strain. **[Results]** From 103 strains, 4 independent mutants named 10#, 42#, 59# and 115# with one linear plasmid cured were obtained, and the second-round NTG mutagenesis cured both two linear plasmids in XYS1. Fermentation analysis revealed that the yield of candicidin component III in 10# and 115# increased by 40% and 30%, respectively. **[Conclusion]** It is the first report that NTG is an effective reagent to cure the stable linear plasmids in *Streptomyces*, two strains from which the large linear plasmid were cured with enhanced yields of candicidin were obtained. NTG treatment can be used to cure the linear plasmids in some *Streptomyces* to efficiently reduce its genome, and therefore an effective approach in genetic breeding of antibiotic producer.

**Keywords:** *Streptomyces* sp. FR-008, Plasmids curing, Linear plasmids, NTG, PFGE, Arsenic resistance, Reduced-genome

2010年美国生物学家Gibson等<sup>[1]</sup>在Science杂志发表了由化学合成的基因组控制的细胞的文章,对最小基因组的研究引起了广泛的关注。最小基因组(Minimal genome)是指在最适宜的条件下,仅仅拥有维持细胞生长繁殖所必需的最少数目的基因。在最小基因组中,敲除任何基因后细胞将无法生存。在研究最小基因组的探索过程中,主要有两种研究思路:一种是“自下而上”地从头合成基因组,例如Smith等<sup>[2]</sup>和Gibson等<sup>[3]</sup>小组成功报道人工设计和化学合成目前最小基因组;另一种是“自上而下”地逐步敲除冗余基因获取最小基因组,例如Kolisnychenko等<sup>[4]</sup>敲除了包括前噬菌体、转座子和未知功能基因片段,使基因组减小了8.1%。由于必需基因精确预测和基因组装的高难度,所以目前对于最小基因组的研究探索中以“自上而下”地逐步敲除冗余基因获取最小基因组为代表的基因组简化(Reduced-genome)是该领域研究的热点之一。

基因组简化是指基因组被适度删除,复杂程度相对减小,并削弱某些非必需基因的代谢影响,从而获得代谢途径相对简单,且对能量的利用效率明显提高的简化细胞。其作为理想的宿主细胞,在生物合成和生产微生物药物中得以广泛的应用。基因组简化的技术策略通常采用染色体大片段缺失。该操作技术主要包括两种:以Red同源重组和Cre/LoxP重组为代表的定点敲除和利用转座子<sup>[5]</sup>

或者是T-DNA随机插入或切离引发的重组实现DNA片段的随机缺失。Komatsu等<sup>[6]</sup>利用Cre/LoxP重组系统对阿维链霉菌进行删减,获得基因组减少1.4 Mb的突变株。Murakami等<sup>[7]</sup>通过PCR介导染色体分裂技术,获得了染色体片段缺失531.5 kb的酿酒酵母突变株。Pósfai等<sup>[8]</sup>通过大片段基因敲除成功将*Escherichia coli* K-12基因组减少了15%。除了染色体大片段缺失外,染色体外的质粒消除也是基因组简化研究中的一个重要方向。对于质粒消除的方法并不统一,主要包括物理方法、化学方法和分子生物学方法。如Heery等<sup>[9]</sup>第一次报道了用高压电穿孔方法成功消除大肠杆菌DH1的内源质粒pUG2;Patrignani等<sup>[10]</sup>利用SDS结合高温成功消除5株乳杆菌属的内源质粒;Imre等<sup>[11]</sup>报道了基于转座子两步法消除肠炎沙门氏菌毒性质粒的方法。除列举之外还有如利用中药<sup>[12]</sup>、吡啶类<sup>[13]</sup>与EB<sup>[14]</sup>等诱变剂和冻融法<sup>[15]</sup>以及质粒不相容<sup>[16]</sup>等方法。

线性质粒普遍存在于链霉菌中<sup>[17]</sup>,一般比环形质粒大,有的可以高达1.8 Mb<sup>[18]</sup>,而现在已知的抗生素70%以上是由链霉菌产生的,所以质粒消除遗传育种在链霉菌中具有一定的应用潜力。但是,链霉菌线性质粒拷贝数低,非常稳定,常见的质粒消除方法对于环形质粒比较有效,据我们所知,以前还没有使用NTG消除链霉菌线性质粒用于遗传育种的报道。

本研究选用链霉菌 FR-008 不仅是因为 FR-008 具有简便的遗传操作, 而且其有生长迅速、发酵条件宽松、抗生素产量高等诸多优势<sup>[19-20]</sup>, 同时肖湘等<sup>[21]</sup>报道链霉菌 FR-008 具有两条明显的线性质粒 (pHZ227 和 pHZ228), Wang 等<sup>[22]</sup>将 FR-008 的砷抗性基因簇定位在大线性质粒 pHZ227 上。FR-008 基因组测序显示 pHZ227 大小为 142 kb (又名 pSSFR1, 登录号: CP009803.1), pHZ228 大小为 24 kb (又名 pSSFR2, 登录号: CP009804.1)。本研究首次使用 NTG 诱变来消除 FR-008 的线性质粒, 其丢失频率为 4%, 并获得了两个杀念菌素产量提高的突变株, 是一种有效的遗传育种方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株: 链霉菌 FR-008 (*Streptomyces* sp. FR-008)、清酒酵母 (*Saccharomyces sake*) 与变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 由上海交通大学分子微生物学实验室保存。

1.1.2 培养基<sup>[23]</sup>: 链霉菌 FR-008 和变铅青链霉菌固体培养基为 SFM, 链霉菌 FR-008 液体培养基为 TSBY, 清酒酵母固体培养基为 PDA, 清酒酵母液体培养基为 YEME。

1.1.3 试剂和仪器: 细胞悬浮液: 蔗糖 0.3 mol/L, EDTA (pH 8.0) 25 mmol/L, Tris (pH 8.0) 25 mmol/L。蛋白酶 K 缓冲液: EDTA 93.0 g, Tris 碱 0.605 g, 十二烷基肌氨酸钠 5.0 g, 蒸馏水定容至 500 mL (pH 9.5)。TBE 缓冲液: 浓贮存液 5×: Tris 碱 54.0 g, 硼酸 27.5 g, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 20 mL; 使用液 (0.5×): 0.045 mol/L Tris-硼酸, 0.002 mol/L EDTA。TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。Tris-Maleic acid (Tris-马来酸) 溶液: Tris-碱与马来酸的终浓度各为 0.25 mol/L (pH 8.0)。1.5% 低熔点琼脂糖 (Sigma 公司): 1.5 g 低熔点琼脂糖溶于 100 mL TE 缓冲液中。1% 琼脂糖 (Sigma 公司): 10 g 琼脂糖溶于 1 000 mL TBE 缓冲液中。NaAsO<sub>2</sub>、NTG, 购于上海试一化学试剂有

限公司。

脉冲场凝胶电泳仪 (CHEF-DR III system), 伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司; 生化培养箱 (SPX-250B-Z), 上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

### 1.2 实验方法

1.2.1 链霉菌 FR-008 孢子悬浮液制备: 链霉菌 FR-008 在 SFM 培养基于 30 °C 培养 4 d 后, 用无菌棉签轻轻地将孢子刮下悬浮在 TES 溶液中, 振荡混匀, 用孢子过滤器过滤, 收集滤液, 离心去上清并用无菌水将孢子悬浮。

1.2.2 NTG 诱变链霉菌 FR-008 孢子悬浮液: 将孢子悬浮液分别加上 1 mL 不同浓度的 NTG 溶液 (0、1.6、2.0 g/L), 在 30 °C 恒温箱中反应 12 h 后, 用无菌水洗孢子 3 遍以终止 NTG 的诱变作用。将诱变后的孢子悬浮液稀释成不同的浓度梯度涂布于 SFM 平板上, 30 °C 恒温箱培养 3 d 后观察结果。计算致死率并将诱变后存活的诱变株保种于 20% 甘油的菌种管并置于 -20 °C。

1.2.3 砷抗性筛选丧失抗砷能力突变株: 链霉菌 FR-008 的大线性质粒 pSSFR1 含有砷抗性基因<sup>[22]</sup>, 所以本研究通过砷敏感筛选丧失抗砷能力的突变株。本研究直接将 250 μmol/L 亚砷酸钠溶液加到 20 mL SFM 培养基中, 混合均匀, 以不加砷盐的 SFM 培养基作对照, 其背面画格一一对应标记并接种诱变株, 30 °C 培养 1-2 d 后观察结果。

1.2.4 筛选线性质粒消除突变株: 突变株不抗砷并不能完全说明大线性质粒 pSSFR1 的消除, 也可能是抗砷基因发生了突变导致功能丧失。PFGE 可以直接观测质粒的消除情况, 找到突变株砷敏感的原因。PFGE 技术是基于不同长度的 DNA 长链大分子在电场中所经历的构型变化不同, 通过变换电场方向的变化及间隔时间, 从而达到分离大片段 DNA 的目的。操作过程如下<sup>[24]</sup>: (1) Plug 的制备: 将收集到的菌体用细胞悬浮液清洗 2 遍, 然后按下述比例混合: 菌体悬浮液 500 μL, 1.5% 低熔点琼脂糖 500 μL。迅速混匀并加入制胶模孔中, 置于 4 °C 冰箱中使菌体和琼脂糖凝固形成 Plug; (2) Plug 的

处理：将 Plug 转入溶菌酶溶液中(终浓度 2 g/L)，37 °C 水浴 8 h 后，去除溶菌酶溶液，用 TE 缓冲液清洗至少 3 遍，再用终浓度为 1% 的 SDS 50 °C 水浴 2 h，用 TE 缓冲液清洗至少 3 遍，再用蛋白酶 K 缓冲液清洗一遍后加入蛋白酶 K 溶液(终浓度为 1 g/L)，50 °C 水浴 16 h；(3) Plug 的电泳：将清洗后的 Plug 整齐置于电泳梳子上，固定制胶槽，缓慢倒入融化后的琼脂糖凝胶(浓度为 1%，用 0.5×TBE 配制)，待凝胶凝固后拔除梳子，将凝胶连同制胶板一同放入电泳槽进行脉冲场凝胶电泳。本研究数据设置如下：电压：6 V/cm；起始时间：1 s；最终时间：50 s；温度：14 °C；电泳时间：20 h；电场夹角：120°。

**1.2.5 链霉菌 FR-008 特异性引物设计：**为验证突变株来源于链霉菌 FR-008，设计了 3 条特异性引物。引物合成由上海杰李生物技术有限公司完成。primer1.F：5'-TCTTCTTCGTCACCGGACGAT-3'；primer1.R：5'-ATGTCGTTGAGGTCCCAGCCGT-3'；primer2.F：5'-AAATCTAGAGAGCCCGCATTACGCACTTTCG-3'；primer2.R：5'-AAAGGATCCTTCCAGTCCTCGCTGTCGGTGTGTT-3'；primer3.F：5'-AAAGAATTCTACCTCTGGTTCGTCCTCGCCTCCC-3'；primer3.R：5'-AAAAAGCTTCCGATGCTGCCGTCGTCGTTGAT-3'。

**1.2.6 线性质粒消除突变株生物活性测定：**FR-008 具有较好的抗真菌活性<sup>[25]</sup>，本研究选择清酒酵母(*Saccharomyces sake*)作为生测的指示菌。首先在 PDA 平板上划线分离清酒酵母单克隆，接种至 YEME (10.3%蔗糖)培养基中，30 °C、220 r/min 培养约 24 h，离心收集菌体，用 LB 培养基洗涤一次，融化 PDA 培养基并冷却至 50 °C 左右，每 20 mL 培养基中加入 20 μL 新鲜指示菌，立即混匀后倒入培养皿，待其凝固。从 FR-008 野生型和突变株的菌坪上(30 °C 培养 5–7 d)接种于 SFM 固体培养基平板上，用蓝枪头将培养物打成一圆形菌块。在含有指示菌平板的合适的位置上摆好待测的菌块，30 °C 培养 1–2 d 后观察抑菌圈的大小。

**1.2.7 HPLC 检测各线性质粒消除突变株的抗生素产量：**将各突变株及链霉菌 FR-008 野生型等量孢子接种到 40 mL TSBY 液体培养基的摇瓶(250 mL)中，30 °C、220 r/min 培养 2 d 制备种子发酵液。再将等量种子液接种到 40 mL YEME (10.3%蔗糖)液体培养基的摇瓶(250 mL)中，30 °C、220 r/min 培养 3–4 d 得到发酵液。各突变株取等湿重的菌体，加入甲醇溶液重复萃取 2 次，收集萃取液，并用 0.25 μm 有机相滤膜过滤后，用于 HPLC 分析。HPLC 使用的是安捷伦公司的 Agilent 1100 series LC/MSD trap system。色谱柱为 Agilent SB-C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm×250 mm)反向柱，流动相为 HPLC 级乙腈：5.5 mmol/L NH<sub>4</sub>AC (pH 4.5)=50:50 (体积比)，流速为 0.3 mL/min，检测波长为 380 nm，柱温为 25 °C。

## 2 结果与分析

### 2.1 NTG 诱变链霉菌 FR-008 孢子悬浮液

采用不同浓度的 NTG 处理(NTG 溶液与孢子悬浮液共培养)，无菌水处理之后(终止 NTG 的诱变作用)十倍稀释法均匀平铺于 SFM 固体培养基，培养 3 d 得到以下结果(图 1)。

实验结果表明链霉菌 FR-008 孢子悬浮液对于 NTG 比较敏感，能够达到比较高的致死率而且随着 NTG 浓度的增加致死率上升。1.6 g/L 和 2 g/L 的 NTG 诱变处理后，致死率分别为 96.2%和 99.8%。本研究采用 2 g/L 的浓度用于线性质粒的消除。

### 2.2 砷抗性筛选的结果

收集经 2 g/L NTG 处理后的 103 个诱变株。由于链霉菌 FR-008 的大线性质粒 pSSFR1 上具有抗砷的基因，因此将 103 个诱变株 30 °C 培养在含有有砷(3 价)的 SFM 固体培养基上 3 d。观察是否能够生长。理论上在含有有砷(3 价)的 SFM 固体培养基上不能生长的诱变株有可能其大线性质粒 pSSFR1 发生消除。实验结果如图 2 所示。

将经 2 g/L NTG 处理后的 103 个诱变株依次接种含 250 μmol/L 亚砷酸钠溶液的 SFM 固体培养基上。从 103 个突变株中筛选到了 10#、59#、115#

3 个砷敏感的突变株, 暗示其对应的 pSSFR1 大线性质粒(142 kb, 砷抗性基因簇)可能被消除了。为消除实验偶然误差, 对砷敏感的突变株进行了复证, 图 2 左边是 SFM 培养基上均可以生长, 图 2 右边是 SFM 培养基上添加 250  $\mu\text{mol/L}$  亚砷酸钠溶液, 10#、59#、115#不能生长, 其中以对砷有抗性的 FR-008 和 *S. lividans* 作为阳性对照。

### 2.3 PFGE 检测的结果

为了检测这些砷敏感的突变株是否丢失了大线性质粒, 以及小线性质粒丢失的情况, 对这 103 个突变株进行了 PFGE 检测。结果见图 3。

PFGE 检测结果显示: 10#、59#和 115#经 NTG 诱变后丢失了 142 kb 的大线性质粒 pSSFR1, 但是该 3 株突变株中 24 kb 的线性质粒 pSSFR2 仍然保留。42#突变株丢失了 pSSFR2 但是保留了 pSSFR1。综合起来, 在致死率为 99.8%的情况下, NTG 消除线性质粒的效率约为 4%, 因而是一种有效的线性质粒消除剂。为了证实两个线性质粒是否可能同时被消除, NTG 继续处理 42#突变株, 获得了大小线性质粒均丢失的双突变株 XYS1 (图 4A)。我们使用了 3 套链霉菌 FR-008 特异性的 PCR 引物 (泳道 1、2 所用的引物扩增 2 871 bp, 泳道 3、4

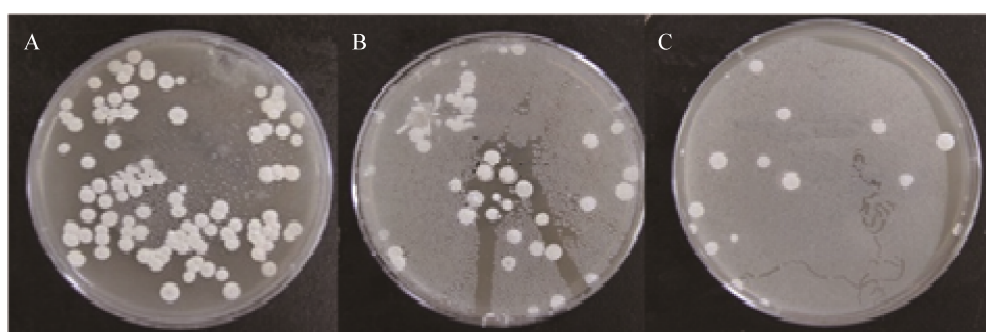


图 1 经不同浓度的 NTG 处理存活的诱变株

Figure 1 Survival rates for mutants treated with different concentration of NTG

注: A: 未经处理的 FR-008 孢子悬浮液, 稀释  $10^7$  倍存活 105 个孢子; B: 经 1.6 g/L NTG 处理后稀释  $10^6$  倍存活 40 个孢子; C: 经 2 g/L NTG 处理后稀释  $10^5$  存活 17 个孢子。

Note: A: 105 colonies of wild type strains grew ( $10^7$ -fold dilution); B: 40 colonies of mutants survived after 1.6 g/L NTG treatment ( $10^6$ -fold dilution); C: 17 colonies of mutants survived after 2 g/L NTG treatment ( $10^5$ -fold dilution).

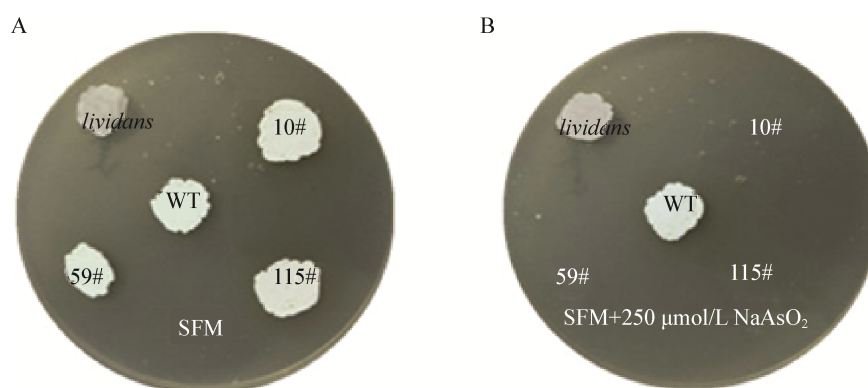


图 2 砷抗性筛选亚砷酸钠敏感突变株及复证

Figure 2 Screening of arsenite sensitive mutants and validation

注: A: 突变株及对照菌株在不含砷的 SFM 固体培养基上培养; B: 突变株及对照菌株在含 250  $\mu\text{mol/L}$  亚砷酸钠的 SFM 固体培养基上培养。lividans 代表变铅青链霉菌(抗砷); WT 代表野生型链霉菌 FR-008(抗砷)。

Note: A: Mutants and control strains on SFM; B: Strains grown on SFM supplied with 250  $\mu\text{mol/L}$  arsenite. lividans: *Streptomyces lividans* (arsenite resistance); WT: *Streptomyces* sp. FR-008 wild type (arsenite resistance).

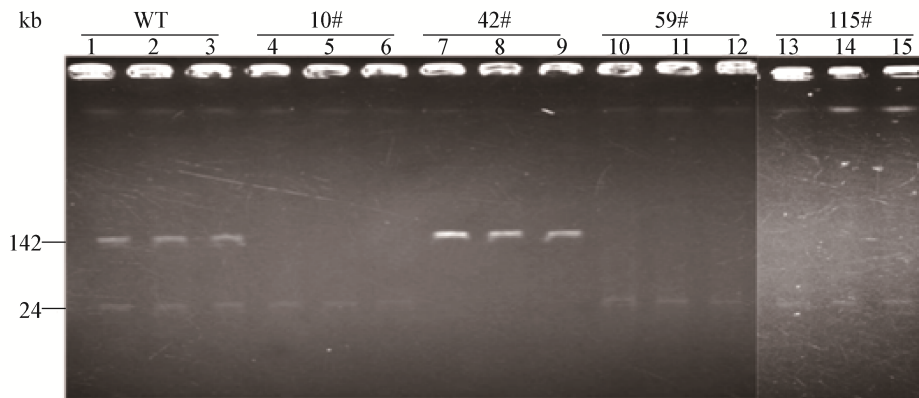


图3 PFGE 检测各突变株线性质粒丢失情况

Figure 3 Detection of the presence or loss of linear plasmids in the mutants by PFGE

注：野生型和各个突变株都选取了3个独立的克隆来进行PFGE检测。大线性质粒142 kb，小线性质粒24 kb。脉冲场凝胶电泳的条件为：转换时间为1-50 s；电压：6 V/cm；电泳时间：20 h；凝胶浓度为1%；缓冲液为0.5×TBE。

Note: Three independent colonies for each strain were selected to detect the linear plasmids. Total DNA in the plug were separated on a 1% agarose gel with a 1-50 s pulse for 20 h at 6 V/cm in 0.5×TBE buffer.

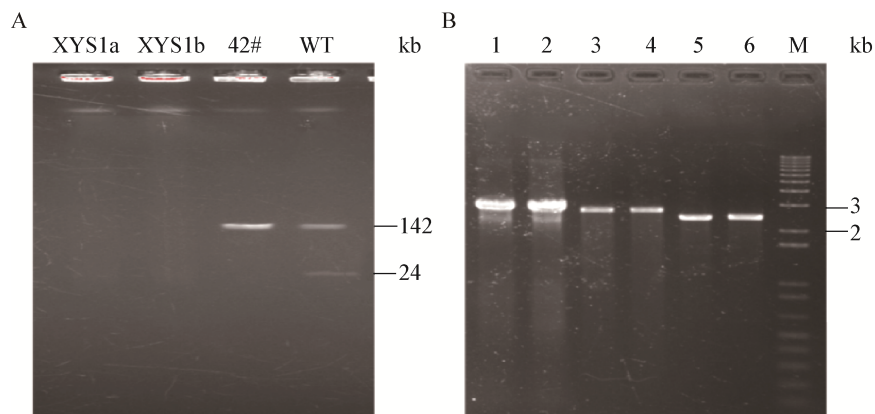


图4 NTG 诱变同时消除两条线性质粒及验证

Figure 4 Conformation of XYS1 derived from *Streptomyces* sp. FR-008

注：A：PFGE 检测 WT、42#、XYS1 的线性质粒，XYS1a 和 XYS1b 是 42# 突变株经过第二轮 NTG 诱变后获得对亚砷酸钠敏感的两个克隆；B：PCR 验证 XYS1 是 *Streptomyces* sp. FR-008 的衍生菌株，而非污染其它细菌。M 为 1 kb DNA 分子量标记；1、3、5 为 FR-008 的基因组 DNA 为模板；2、4、6 为 XYS1 的基因组 DNA 为模板；1、2 使用 Primer1\_F&R；3、4 使用 Primer2\_F&R；5、6 使用 Primer3\_F&R。

Note: A: PFGE detection of linear plasmids in Wild Type, Mutant 42# and XYS1 that is mutant 42#-derived mutant sensitive to arsenite; B: XYS1 is confirmed to be a *Streptomyces* sp. FR-008 derived strain by PCR. M: 1 kb DNA marker; 1, 3, 5: PCR product using total DNA of FR-008 wild type as template; 2, 4, 6: PCR product using total DNA of XYS1 as template. 1, 2: Primer1\_F&R; 3, 4: Primer2\_F&R; 5, 6: Primer3\_F&R.

所用的引物扩增 2 654 bp，泳道 5、6 所用的引物扩增 2 368 bp)，证明 XYS1 的确是衍生于 42# 的突变株(图 4B)。

#### 2.4 生物活性定性比较突变株产杀念菌素的能力 链霉菌 FR-008 能够产生杀念菌素，该类化合

物(杀念菌素具有多个组分，有效组分是 Candicidin III)具有抗真菌活性，通常利用酵母来检测其产抗生素的能力。本研究要比较各质粒消除突变株同野生型的差异，因此采用酿酒酵母作为生测菌来比较各个菌株的产素能力。

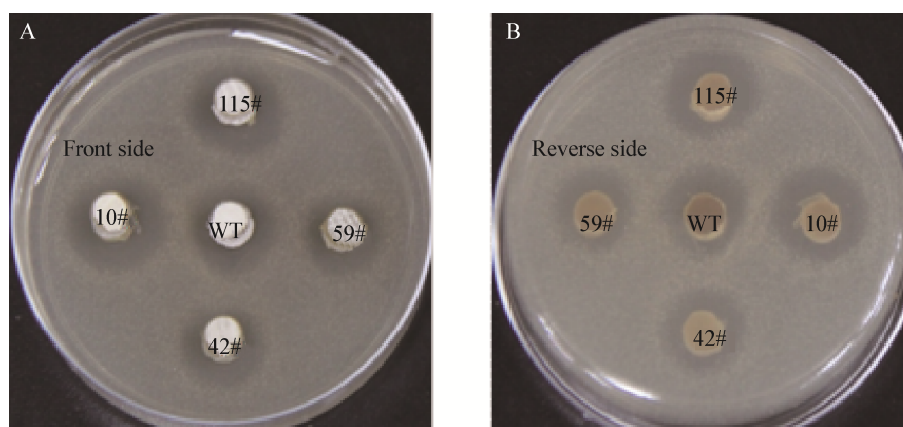


图 5 生测实验比较各菌株产杀念菌素的能力

Figure 5 Bioassay to compare candidicin yield of four mutant strains and the wild type

注: 在 SFM 上生长了 5 d 链霉菌打菌块, 并转移到预混有指示菌清酒酵母的 PDA 平板上。抑菌圈大小指示了各菌株产生杀念菌素的能力。

Note: The plugs was taken out from SFM agar where *Streptomyces* strains have grown for 5 days, and transferred to the PDA agar that is premixed with the indicator *Saccharomyces sake*. The size of clear halo indicate the candidicin productivity for each strain.

图 5 结果表明各线性质粒消除突变株仍然能够合成抗真菌的杀念菌素, 对指示菌清酒酵母具有一定的抑菌效果。其中, 10#和 115#突变株相比较野生型其抑菌圈较大, 暗示产生杀念菌素的能力比野生型强。而 42#和 59#与野生型相比, 其抑菌圈似乎要小些。

## 2.5 HPLC 定量检测突变株杀念菌素的产量

测定了这些突变株及野生型液体发酵(TSBY培养基)产杀念菌素的产量, 利用 HPLC 检测了这些突变株发酵产物中的杀念菌素有效组分 III 的产量。结果以相对值(野生型为标准值 1)显示如下(图 6)。

图 6 数据表明和链霉菌 FR-008 野生型一样, 各个被消除线性质粒的突变株依然能够产生杀念菌素, 但对产量影响却不尽相同。总体结果与生测一致: 两株消除了 pSSFR1 线性大质粒的 10#和 115#突变株相比较链霉菌 FR-008 野生型, 杀念菌素有效组分 III 的产量分别提高了 40%和 30%。然而 42#和 59#相比较链霉菌 FR-008 野生型, 抗生素的产量反而下降了。

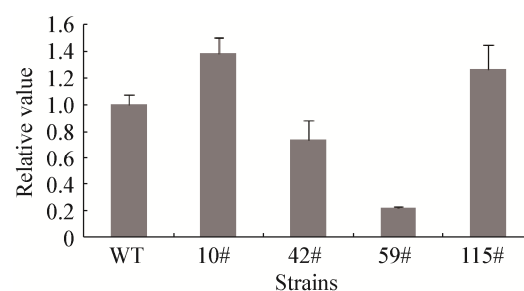


图 6 HPLC 比较各菌株杀念菌素有效组分 III 的产量

Figure 6 The yield of candidicin component III for each strain was analyzed by HPLC

注: 野生型菌株杀念菌素组分 III 的产量在柱状图中标示为 1, 另外 4 个柱状图的高度分别代表菌株 10#、42#、59#和 115# 相对于野生型产杀念菌素组分 III 的倍数。

Note: The yield of candidicin component III for wild type strain is represented by 1 whereas in other four mutants it is represented by the fold to that of WT.

## 3 讨论

链霉菌 FR-008 隶属于白色链霉菌亚种, 它可以产生多烯类抗真菌抗生素杀念菌素, 加上 FR-008 菌株野生型生长迅速、产孢快、接合转移效率高, 因而有潜力发展成为一个异源表达宿主。质粒消除作为一种有效的微生物遗传育种手段, 已经有许多早期的应用报道<sup>[26-27]</sup>, 一般是加热和 SDS

多轮处理,但是一般应用于环形质粒的消除,比较繁琐。链霉菌中的线性质粒比较大,和环形质粒不同的是:它的拷贝数低,较为稳定而不易消除,大小通常都在 20 kb-1.8 Mb 之间。由于质粒上通常携带非必需基因,因而大线性质粒的消除在基因组简化方面具有较好的应用潜力。NTG 作为诱变剂,主要引起碱基的转换,至今尚未有研究者用它来消除链霉菌的线性质粒。FR-008 包含两个线性质粒 pSSFR1 和 pSSFR2,前者包括了抗砷基因簇,这为利用 NTG 诱变消除质粒的检测提供了很好的条件,只需测试砷的敏感性,就能轻易筛到砷敏感的菌株(可能的大线性质粒消除突变株)。

本研究中当 NTG 致死率达到 99.8%以上时,线性质粒消除率约为 4%,远高于链霉菌自然突变的频率。对于线性质粒之所以能够被 NTG 消除,猜测可能是因为和它的质粒结构有关系,链霉菌线性质粒的末端通常有端粒结构<sup>[28]</sup>, NTG 处理可能影响了端粒的功能而使复制过程受阻,从而被消除。结合抗砷筛选和 PFGE 证实 FR-008 野生型两个线性质粒的存在,同时表明抗砷基因确实是位于大线性质粒 pSSFR1 上。这种研究模式可以推广,即为选择质粒上不同于染色体某个特性作为质粒消除与否的证据。可以人为将某个抗性基因克隆到质粒上作为一种标记,运用于质粒功能的研究。根据质粒消除的结果,不管是 pSSFR1 还是 pSSFR2,两者均不含有宿主生长代谢所必需的基因。而 Ye 等<sup>[29]</sup>发现不能将极端嗜盐古生菌质粒 pHH205 消除。同时 Nindita 等<sup>[30]</sup>发现可以分别单独消除 *Streptomyces rochei* 中 pSLA2-L (211 kb)和 pSLA2-M (113 kb),但同时消除两者会使线性染色体环化。说明不同种属的菌株质粒上携带基因组不同的信息。质粒与染色体既可以“共生”也可以“寄生”。这可能是由于进化过程不同而造成的差异。

根据生测和 HPLC 的结果,获得了 2 株相对链霉菌 FR-008 野生型更高产量抗生素的优势突变株。链霉菌 FR-008 大线性质粒除了砷抗性基因簇、质粒转移复制相关蛋白、CRISPR 相关蛋白之外,

编码了两个可能的调节蛋白,一个注释为 LuxR 家族的调节蛋白(基因编号:SFR\_7012, 218 个氨基酸残基),另外一个可能的调节蛋白(377 个氨基酸残基)。然而杀念菌素合成基因簇中 4 个 LuxR 家族调节蛋白<sup>[31-32]</sup>FscRI、FscRII、FscRIII 和 FscRIV 多属于正调节。同时 59#菌株的有效组分 III 的产量相对于野生型下降。因此推测:大线性质粒消除突变株中杀念菌素有效组分 III 的提高可能和质粒上编码的基因没有关系,猜测是因为 NTG 作用质粒外其他部分引起的突变造成的。当然这些假设还需实验证实。对于被消除线性质粒的突变株,其基因组大小相应减少一部分,是否会增强某个部分的代谢通路,该突变株是否可以作为生产某一代谢通路产物的生产菌株,并在此突变株的基础上改造,使其更有利于某一代谢通路产物的积累。

## 参考文献

- [1] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome[J]. *Science*, 2010, 329(5987): 52-56
- [2] Smith HO, Hutchison CA, III, Pfannkoch C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly:  $\phi$ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(26): 15440-15445
- [3] Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome[J]. *Science*, 2008, 319(5867): 1215-1220
- [4] Kolisnychenko V, Plunkett G, III, Herring CD, et al. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome[J]. *Genome Research*, 2002, 12(4): 640-647
- [5] Hutchison CA, III, Peterson SN, Gill SR, et al. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome[J]. *Science*, 1999, 286(5447): 2165-2169
- [6] Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, et al. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(6): 2646-2651
- [7] Murakami K, Tao E, Ito Y, et al. Large scale deletions in the *Saccharomyces cerevisiae* genome create strains with altered regulation of carbon metabolism[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(3): 589-597
- [8] Pósfai G, Plunkett G, III, Fehér T, et al. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2006, 312(5776): 1044-1046
- [9] Heery DM, Powell R, Gannon F, et al. Curing of a plasmid from *E. coli* using high-voltage electroporation[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(23): 10131
- [10] Patrignani F, Lanciotti R, Mathara JM, et al. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107(1): 1-11



- [11] Imre A, Olasz F, Kiss J, et al. A novel transposon-based method for elimination of large bacterial plasmids[J]. *Plasmid*, 2006, 55(3): 235-241
- [12] Chen Q, Xie KP, Yun BY, et al. Inhibition and plasmid elimination effect of cortex *Phellodendron chinensis* and other Chinese herbal medicines on MRSA[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 33(3): 54-57 (in Chinese)  
陈晴, 谢鲲鹏, 云宝仪, 等. 黄柏等中草药对 MRSA 的抑菌作用及其对质粒的消除作用[J]. *微生物学杂志*, 2013, 33(3): 54-57
- [13] Brzychczy-Wloch M, Borszewska-Kornacka M, Gulczynska E, et al. Prevalence of antibiotic resistance in multi-drug resistant coagulase-negative staphylococci isolated from invasive infection in very low birth weight neonates in two Polish NICUs[J]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2013, 12: 41
- [14] Yeldho D, Rebello S, Jisha MS. Plasmid-mediated biodegradation of the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate, by *Pseudomonas aeruginosa* S7[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2011, 86(1): 110-113
- [15] Zhong YJ, Wu XY, Liu HJ, et al. Plasmid elimination method and conditions of *Burkholderia cepacia* T1828[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(6): 847-852 (in Chinese)  
钟义军, 吴晓玉, 刘好桔, 等. 洋葱伯克霍尔德菌 T1828 质粒消除方法及条件[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(6): 847-852
- [16] Wang DS, Gao ZQ, Wang HG, et al. Curing both virulent mega-plasmids from *Bacillus anthracis* wild-type strain A16 simultaneously using plasmid incompatibility[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(10): 1614-1620
- [17] Kinashi H, Shimaji M, Sakai A. Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes[J]. *Nature*, 1987, 328(6129): 454-456
- [18] Ou HY. Bioinformatics tools and databases focused on genomic islands and secondary metabolite biosynthesis of *Streptomyces*[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(10): 1909-1919 (in Chinese)  
欧竑宇. 链霉菌基因组岛和次生代谢物合成相关的生物信息学工具及数据库[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(10): 1909-1919
- [19] Chen S, Huang X, Zhou XF, et al. Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex[J]. *Chemistry & Biology*, 2003, 10(11): 1065-1076
- [20] Hu ZH, Bao K, Zhou XF, et al. Repeated polyketide synthase modules involved in the biosynthesis of a heptaene macrolide by *Streptomyces* sp. FR-008[J]. *Molecular Microbiology*, 1994, 14(1): 163-172
- [21] Xiao X, Zhou XF, Deng ZX. Linear plasmid—a new research highlight in fundamental biology for *Streptomyces*[J]. *World Notes on Antibiotics*, 1999, 20(2): 49-53 (in Chinese)  
肖湘, 周秀芬, 邓子新. 线性质粒——链霉菌基础生物学研究的一个新热点[J]. *国外医药: 抗生素分册*, 1999, 20(2): 49-53
- [22] Wang LR, Chen S, Xiao X, et al. arsRBOCT arsenic resistance system encoded by linear plasmid pHZ227 in *Streptomyces* sp. strain FR-008[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3738-3742
- [23] Kieser T, Bibb M J, Chater K F, et al. *Practical Streptomyces Genetics*[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000
- [24] Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis[J]. *Cell*, 1984, 37(1): 67-75
- [25] Zhou Y, Li J, Zhu J, et al. Incomplete  $\beta$ -ketone processing as a mechanism for polyene structural variation in the FR-008/candicidin complex[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(6): 629-638
- [26] Feng J, Zhang W, Song CJ. Progress in endogenous plasmid curing of bacteria—a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(11): 1142-1148 (in Chinese)  
冯俊, 张伟, 宋存江. 细菌内源质粒消除研究进展[J]. *微生物学报*, 2013, 53(11): 1142-1148
- [27] Hu GY. Interaction among indigenous plasmids of *Mesorhizobium huakuii* strains and its effect on symbiotic nitrogen fixation[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2006 (in Chinese)  
胡国元. 华癸中生根瘤菌内源质粒间的相互作用及其对共生固氮的影响[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2006
- [28] Bao K, Cohen SN. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*[J]. *Genes & Development* 2001, 15(12): 1518-1527
- [29] Ye XC, Ou JH, Ni LN, et al. Characterization of a novel plasmid from extremely halophilic Archaea: nucleotide sequence and function analysis[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 221(1): 53-57
- [30] Nindita Y, Cao ZS, Yang YJ, et al. The *tap-tpg* gene pair on the linear plasmid functions to maintain a linear topology of the chromosome in *Streptomyces rochei*[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 95(5): 846-858
- [31] Zhang PP, Zhao ZL, Li H, et al. Production of the antibiotic FR-008/candicidin in *Streptomyces* sp. FR-008 is co-regulated by two regulators, FscRI and FscRIV, from different transcription factor families[J]. *Microbiology*, 2015, 161(3): 539-552
- [32] Mo SJ, Yoon YJ. Interspecies complementation of the LuxR family pathway-specific regulator involved in macrolide biosynthesis[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(1): 66-71