

透明颤菌血红蛋白基因在淀粉酶产色链霉菌中的表达及对合成丰加霉素的影响

马正 刘金秀 申屠旭萍 边亚琳 俞晓平*

(中国计量学院 生命科学学院 浙江省生物计量与检验检疫技术重点实验室 浙江 杭州 310018)

摘要:【目的】丰加霉素(Toyocamycin)是核苷类抗生素家族的重要成员,其在农业植物病害防治领域具有巨大的应用价值。为改善丰加霉素生产菌淀粉酶产色链霉菌(*Streptomyces diastatochromogenes* 1628)发酵过程溶氧限制,旨在实现 *vgb* 在 *S. diastatochromogenes* 1628 中的表达以促进丰加霉素的生物合成。【方法】首先以 *gfp* 为报告基因检测红霉素抗性基因启动子 *Perm*^{*}在 *S. diastatochromogenes* 1628 中的转录活性,再利用 *PermE*^{*}实现 *vgb* 的异源表达。【结果】在荧光显微镜下,重组菌 1628-GFP 菌丝可发出稳定明亮的绿色荧光,表明启动子 *PermE*^{*}在菌株 1628 中可有效启动外源基因的表达;通过一氧化碳结合差光谱分析显示 VHB 具有生物学活性;摇瓶实验表明:与原始菌株相比,重组菌可促进丰加霉素产量的提高,在中度和高度限氧条件下促进效果尤为明显,提高幅度分别为 48.9%和 104.5%。PCR 和发酵效价检测显示重组菌具有良好的遗传稳定性。【结论】成功实现了 *vgb* 在 *S. diastatochromogenes* 1628 中的表达,有效提高了其丰加霉素的合成水平,为丰加霉素的工业化生产提供了基础条件。

关键词: 淀粉酶产色链霉菌, 丰加霉素, 绿色荧光蛋白, 透明颤菌血红蛋白, 红霉素抗性基因启动子

基金项目: 浙江省公益技术研究项目(No. 2010C32063); 浙江省科技创新团队项目(No. 2009R500273); 浙江省自然科学基金项目(No. LQ12C14004); 国家重点基础研究发展计划项目(No. 2011CB111602, 2012CB114100); 国家 863 计划项目(No. 2012AA021601)

*通讯作者: Tel: 86-571-86836006; 信箱: yxp@cjlu.edu.cn

收稿日期: 2012-09-20; 接受日期: 2012-11-12

Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene for toyocamycin biosynthesis in *Streptomyces diastatochromogenes*

MA Zheng LIU Jin-Xiu SHENTU Xu-Ping BIAN Ya-Lin YU Xiao-Ping*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)

Abstract: [Objective] Toyocamycin is an important nucleoside antibiotics with diverse bioactivities and potentials for biological control of plant diseases. We expressed the *vgb* gene encoding *Vitreoscilla* hemoglobin to alleviate the dissolved oxygen (DO) limitation and to improve the toyocamycin production in *Streptomyces diastatochromogenes* 1628. [Methods] we used *gfp* gene as the report gene to test the transcription activity of erythromycin resistance gene promoter *PerME** of integrative plasmid pIB139. Then, the promoter *PerME** was used to drive the gene *vgb* expression in *S. diastatochromogenes* 1628. [Results] Green fluorescent of recombinant strain 1628-GFP was detected by fluorescent microscopy. The promoter *PerME** was efficient for heterologous gene expression in *S. diastatochromogenes* 1628. The *vgb* gene was also expressed in engineered strain 1628-VHB by the CO-difference spectrum analysis. The engineered strain 1628-VHB improved toyocamycin production under all diverse DO condition. Specially, strain 1628-VHB increased 48.9% toyocamycin production under middle and 104.5% under high limitation DO condition, comparing with the control stain 1628. Meanwhile, strain 1628-VHB was genetically stable by the PCR and toyocamycin yield test from different generation strain. [Conclusion] Expression of *vgb* gene improved toyocamycin production of strain 1628.

Keywords: *Streptomyces diastatochromogenes*, Toyocamycin, Green fluorescent protein, *Vitreoscilla* hemoglobin, Erythromycin resistance gene promoter

淀粉酶产色链霉菌(*Streptomyces diastatochromogenes* 1628)是本研究小组在浙江天目山筛选得到的一株拮抗放线菌,其发酵液对多种植物病原真菌具有较强的抑制作用,经分离提取,确定其主要有效成分为丰加霉素(Toyocamycin)^[1]。丰加霉素是一种新型核苷类抗生素,分子式为C₁₂H₁₃N₅O₄,核糖 C₁连接类似鸟嘌呤的脱氮杂嘌呤环,核心结构为吡咯嘧啶核苷类似物(图 1)。作用机理主要是通过抑制微生物的转录而影响菌体的生长,其生物活性研究报道主要集中在临床

医学领域^[2]。近期有研究发现丰加霉素对多种植物疫病具有良好的防治效果,长期使用不会造成环境污染,而且对植物生长也具有一定的调节作用^[3-4]。前期田间试验表明,以丰加霉素为主要成分配制成的多种剂型可用于防治如烟草赤星病、稻瘟病、番茄叶霉病和黄瓜枯萎病等植物真菌病害,防治效果不仅较常规化学药剂略优,且安全性较高,同时兼具多种核苷类抗生素的优点^[5-8]。因此,丰加霉素在农业植物病害防治领域具有良好的应用潜力。

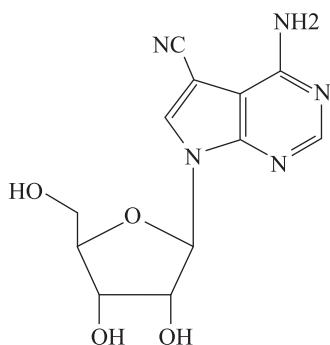


图1 丰加霉素化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of toyocamycin

相对于化学合成法,生物法合成丰加霉素以可再生资源为原料,具有反应条件温和、污染少以及成本低廉等优点,然而,丰加霉素属于次级代谢产物,在发酵过程中菌丝结构稠密,发酵液粘稠导致溶氧水平受到限制,这已成为丰加霉素合成水平较低,生产能耗较大,难以规模化生产的瓶颈因素。

透明颤菌血红蛋白(*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb)来源于专性好氧的革兰氏阴性菌透明颤菌(*Vitreoscilla stercoraria*), VHb在贫氧的条件下能被大量诱导合成,由于具有结合和传递氧的特性, VHb已成为应用广泛的一种血红蛋白^[9-10]。目前 VHb已在林可链霉菌、委内瑞拉链霉菌等多个链霉菌宿主中实现了异源表达,其能明显改善宿主在限氧条件下的生长,促进次级代谢产物的合成^[11-13]。本研究首先以绿色荧光蛋白基因 *gfp* 为报告基因,确定了红霉素抗性启动子 *PerME*^{*}在菌株 *S. diastatochromogenes* 1628 中启动外源基因表达的有效性,并利用启动子 *PerME*^{*}实现了 VHb在 *S. diastatochromogenes* 1628 中的异源表达,考察了 VHb 表达对丰加霉素生物合成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物: 本研究所用菌株、质粒和引物见表1。PCR引物由上海桑尼生物科技

有限公司合成。

1.1.2 主要试剂、工具酶、抗生素及使用浓度: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Ex Taq DNA 聚合酶等购自上海大连宝生物工程有限公司;质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司;胰蛋白胨与酵母提取物购自 OXIOD 公司;TSB 购自 Difco 公司;其他试剂购自杭州常青化工有限公司,药品为分析纯或色谱纯。抗生素购自 Sigma 公司,氨苄青霉素(Ampicillin, Amp) 100 mg/L,氯霉素(Chloramphenicol, Cm) 25 mg/L,卡那霉素(Kanamycin, Kan) 50 mg/L,安普霉素(Apramycin, Apr) 50 mg/L,萘啶酮酸(Nalidixic acid) 30 mg/L。

1.1.3 培养基: *E. coli* JM109 用 LB 培养基培养;*S. diastatochromogenes* 1628 野生菌株和工程菌斜面培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基 PDA;种子培养基为 CP 培养基;发酵培养基为改良的 A2 培养基。接合转移采用 MS 培养基。A2 培养基参考文献[14],其余培养基配方参考文献[15]。

1.2 菌株的培养

含有重组质粒的 *E. coli* JM109 在含有相应抗生素的 LB 固体或液体培养基中培养。

斜面培养:孢子悬液划线后 28 °C 培养,3 d 后放入 4 °C 冰箱保存。

种子培养条件:将野生菌 *S. diastatochromogenes* 1628 和重组菌 1628-VHB 的孢子悬液分别接入装有 50 mL CP 培养基的 250 mL 摇瓶中,28 °C、180 r/min 培养 48 h。

发酵培养:以6%的接种量将种子培养液接种于装有 50、75 和 100 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中,28 °C 培养 4 d。

1.3 常规分子生物学实验操作

大肠杆菌感受态的制备、质粒的提取、酶切、连接、转化等分子生物实验操作参考文献[16]。链霉菌 DNA 染色体的提取参考文献[17]。

表 1 本实验使用的菌株、质粒和引物
Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

项目 Item	描述 Description	来源 Source
菌株 Strain		
<i>S. diastatochromogenes</i> 1628	Wild strain, a toyocamycin producer	Our lab ^[1]
1628-GFP	The strain harboring gene <i>gfp</i>	This work
1628-VHB	The strain harboring gene <i>vgb</i>	This work
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lac-proAB)$, host for gene cloning	Invitrogen
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002)	<i>recF dam⁻ dcm⁻ cml^r str^r km^r</i> , donor strain for conjugation	Jiangnan University
质粒 Plasmid		
pMD18-T vector	Cloning vector, Amp ^r	TaKaRa
pYG013	A plasmid harboring <i>vgb</i> gene, Kan ^r	Jiangnan University
pCAMBIA1302	A plasmid harboring <i>gfp</i> gene, Kan ^r	Jiangnan University
pIB139	Derivative of integrative plasmid pSET152, harboring a <i>PermE</i> [*] promoter, Apr ^r , <i>OrtRK2</i> , ϕ C31 <i>int/attP</i>	Jiangnan University
pIB139- <i>gfp</i>	<i>gfp</i> gene under the control of promoter <i>PermE</i> [*] in plasmid pIB139	This work
pIB139- <i>vgb</i>	<i>vgb</i> gene under the control of promoter <i>PermE</i> [*] in plasmid pIB139	This work
引物 Primers		
PgfpF (<i>Xba</i> I restriction site)	5'-ACGTCCTAGAAATGGTAGATCTGACTAG-3'	This work
PgfpR (<i>Not</i> I restriction site)	5'-ACGGCGGCCCGCCCCGATCTAGTAAC-3'	This work
PvgbF (<i>Nde</i> I restriction site)	5'-ACGCATATGATGTTGGATCAACAGAC-3'	This work
PvgbR (<i>Not</i> I restriction site)	5'-ACGGCGGCCCGCTTATTCAACAGCTTG-3'	This work
PaprF	5'-ACGGTGC AATACGAATGGCG-3'	This work
PaprR	5'-ACGTCAGCCAATCGACTGG-3'	This work

1.4 PCR 扩增

采用 50 μL 反应体系，反应条件：94 ℃ 5 min; 94 ℃ 45 s, 52 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min，共 35 个循环; 72 ℃ 10 min。

1.5 重组菌 *S. diastatochromogenes* 1628-GFP 及 1628-VHB 的构建

分别以质粒 pCAMBIA1302 和 pYG013 为模板，扩增得到绿色荧光蛋白基因 *gfp* 和透明颤菌血红蛋白基因*vgb*，将其分别连入pMD18-T vector，得到质粒 T-*gfp* 和 T-*vgb*。其次，将酶切获得的 *gfp* 和 *vgb* 分别连入载体 pIB139 启动子 *PermE*^{*}下游，得到重组载体 pIB139-*gfp* 和 pIB139-*vgb*。采用氯

化钙转化法将重组质粒 pIB139-*gfp* 和 pIB139-*vgb* 分别转入 *E. coli* ET12567(pUZ8002)中，经 Cm、Kan 和 Apr 三种抗性筛选得到用于接合转移的供体菌 *E. coli* ET12567(pUZ8002, pIB139-*gfp*)和 *E. coli* ET12567(pUZ8002, pIB139-*vgb*)。大肠杆菌-链霉菌属间接合转移遗传操作参照文献[18]。将受体菌 1628 划线新鲜的 MS 平板，将新鲜的孢子悬浮于 5 mL 0.05 mol/L、pH 8.0 的 TES 缓冲液中，在 50 ℃ 水浴热激 10 min，冷却至室温后加入等体积的 2×孢子预萌发培养基，37 ℃ 孵育 3 h，离心收集孢子并重新悬浮于适量 TES 中，同时，用 LB 培养基将过夜培养含有重组质

粒的供体菌 *E. coli* ET12567 洗涤 2 次去除抗生素, 再重新悬浮于适量 TES。供体-受体菌(*E. coli*-*S. diastatochromogenes*)按 $10^8:10^8$ 细胞量混合加入无菌离心管中, 放置 2 min, 然后将 200 μ L 混合物涂布 MS 平板, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养, 18 h 后用含 Apr 和萘啶酮酸的 1 mL 无菌水覆盖, 吹干后继续培养 2–3 d。挑取单克隆转接至新鲜的 MS 平板(50 mg/L Apr+30 mg/L 萘啶酮酸), 观察接合子。染色体上整合有 *gfp* 和 *vgb* 基因的 1628 重组菌分别命名为 1628-GFP 和 1628-VHB。

1.6 绿色荧光蛋白的检测

将野生菌 *S. diastatochromogenes* 1628 和重组菌 1628-GFP 孢子悬液分别接种于 CP 培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜, 然后再以 1:50 的接种量分别接种于装有 50 mL 新鲜 CP 培养基中, 培养至对数生长中期, 细胞干重(DCW)约为 0.3 g/L, 6 000 r/min 离心收集菌丝体, 用 PBS 缓冲液洗涤菌丝体 2 次后, 重悬于 30 mL PBS 中。取 5–10 μ L 菌液涂片, 在 Olympus BX50 荧光显微镜下观察, 同时用 SONY 3CCD 的 Color Video Camera 拍照。以野生菌作为对照, 选择激发滤光片为 485 nm, 发射滤光片为 520 nm^[19]。

1.7 VHB 在重组菌 *S. diastatochromogenes* 1628-VHB 中生物活性的测定

参考文献[20], 略作修改。采用一氧化碳(CO)差光谱法分析 VHB 的生物学活性。收集 50 mL 对数生长中期的菌丝体, 用预冷的无菌水洗涤菌丝体 2 次, 4 $^{\circ}$ C 离心, 重悬菌丝体于 20 mL 的冰冷的无菌水中。冰水化合物上超声波破碎菌体 30 min, 功率 100 W, 超声 10 s, 间隔 20 s, 重复 3 次。4 $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心去除沉淀, 取上清加入连二亚硫酸钠至终浓度 2 g/L, 避光振荡混匀 10 min。等分为 2 份, 一份作为参照直接加入比

色皿放入参比池, 另一份通入 CO 3 min, 每秒钟 3–5 个泡, 暗室放置 5 min 后加入比色皿放入检测池, 400–500 nm 光谱扫描。

1.8 丰加霉素 HPLC 分析

参照文献[1], 丰加霉素浓度的测定采用高效液相色谱法检测: Varian 高效液相色谱仪; SHIMADZU C₁₈ 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 光电二极管检测器; 甲醇为流动相 A, 水为流动相 B, 梯度洗脱; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 279 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C。

1.9 生物量的测定

生物量的测定采用细胞干重法: 5 mL 发酵液 6 000 r/min 离心 10 min, 108 $^{\circ}$ C 烘干至恒重。

1.10 重组菌遗传稳定性的检测

转化子通过 MS 选择平板(50 mg/L Apr^r)筛选, 将能在 MS 选择平板上长出的转化子再次在 MS 选择平板上划线分离, 生长良好的转化子即认为是阳性转化子; 将得到的阳性转化子在没有选择压力的平板上连续传代培养, 每十代用选择平板筛选一次, 删除不能生长的菌种, 经过 30 次传代培养, 从中随机挑选 4 个单菌落, PCR 扩增检测 *vgb* 基因。以第一代工程菌的丰加霉素含量为 100%对照计算传代后的生产效价^[19,21]。

2 结果与分析

2.1 pIB139-*gfp* 的构建

pIB139-*gfp* 构建过程如图 2 所示, 酶切载体 T-*gfp* 回收 *gfp* 片段(图 3), 并在 *Xba* I 和 *Not* I 位点插入质粒 pIB139, 得到重组质粒 pIB139-*gfp*。利用 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切验证结果见图 4, 释放出 5.9 kb 和 1.1 kb 大小的片段, 分别与载体 pIB139 和 *gfp* 片段大小相一致, 表明重组质粒构建成功。质粒 pIB139-*gfp* 经接合转移法转入 *S. diastatochromogenes* 1628。

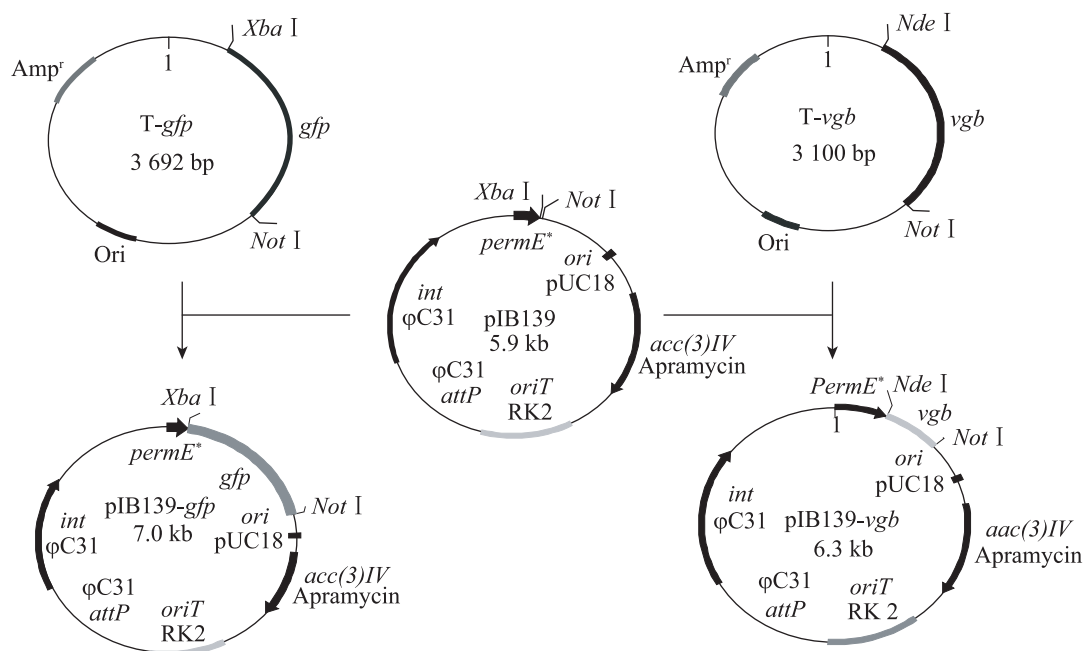


图2 重组质粒 pIB139-*gfp* 和 pIB139-*vgb* 的构建

Fig. 2 Construction of recombinant plasmids pIB139-*gfp* and pIB139-*vgb*

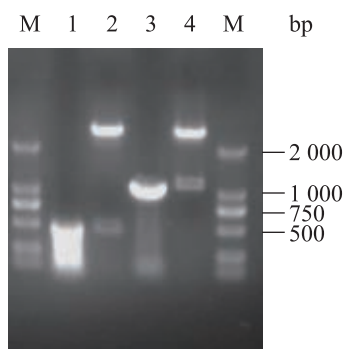


图3 基因 *gfp* 和 *vgb* 的扩增

Fig. 3 Amplification of gene *gfp* and *vgb*

注: 1: *vgb* 基因; 2: *Nde* I+*Not* I 双酶切 pMD18-T-*vgb*; 3: *gfp* 基因; 4: *Xba* I+*Not* I 双酶切 pMD18-T-*gfp*; M: DNA 分子量标准。

Note: 1: PCR product of gene *vgb*; 2: pMD18-T-*vgb*/*Nde* I+*Not* I; 3: PCR product of gene *gfp*; 4: pMD18-T-*gfp*/*Xba* I+*Not* I; M: DL2000 marker.

2.2 重组菌 1628-GFP 的构建及 PCR 验证

质粒 pIB139 是从链霉菌整合型质粒 pSET152 衍生而来, 是在 pSET152 多克隆位点插

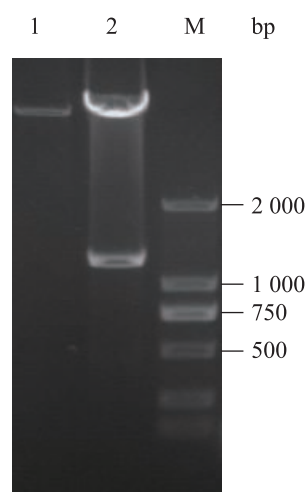


图4 质粒 pIB139-*gfp* 的酶切验证

Fig. 4 Analysis of plasmid pIB139-*gfp* by *Xba* I and *Not* I digestion

注: 1: *Xba* I+*Not* I 双酶切 pIB139; 2: *Xba* I+*Not* I 双酶切 pIB139-*gfp*; M: DNA 分子量标准。

Note: 1: Plasmid pIB139/*Xba* I+*Not* I; 2: Plasmid pIB139-*gfp*/*Xba* I+*Not* I; M: DL2000 marker.

入启动子 *PermE**, 以用于基因在链霉菌中高效表达。载体 pIB139 大小为 5.9 kb, 没有链霉菌质

粒的复制子,但具有用于接合转移的 *oriT* 功能区域,链霉菌筛选标记-安普抗性基因(*apr*),整合酶基因,链霉菌温和噬菌体 ϕ C31 的 *attP* 位点(能识别链霉菌基因组上的特定位点 *attB*)。因此, pIB139 利用接合转移法导入链霉菌后,可通过特异性重组整合在链霉菌染色体的 *attB* 位点上,随着宿主染色体的复制而复制并赋予安普抗性。重组菌 1628-GFP 的 PCR 验证结果见图 5。随机挑取 4 个重组菌 1628-GFP,提取基因组染色体,用引物 *Papr-F* 和 *Papr-R* PCR 扩增出大小为 0.8 kb *apr* 片段,用引物 *Pgfp-F* 和 *Pgfp-R* PCR 扩增出大小为 1.1 kb 的 *gfp* 片段,原始菌株 1628 为对照,均不能扩增得到 *apr* 和 *gfp* 特异性条带。结果说明, *apr* 和 *gfp* 均已成功整合到 1628 染色体上,重组菌 1628-GFP 构建成功。

2.3 重组菌 1628-GFP 的荧光检测

将原始对照菌株 *S. diastatochromogenes* 1628 和重组菌 1628-GFP 分别培养至对数生长期后收

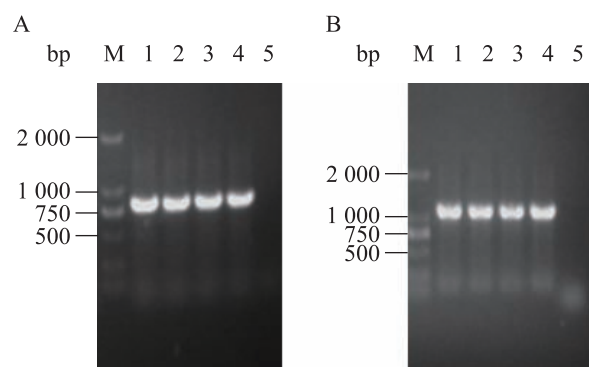


图 5 重组菌 1628-GFP 的 PCR 验证

Fig. 5 Confirmation of recombinant strain 1628-GFP by PCR amplification

注: A: 1-4: 以重组菌 1628-GFP 为模板 PCR 扩增 *apr* 基因; 5: 以对照菌株 1628 为模板 PCR 扩增 *apr* 基因。B: 1-4: 以重组菌 1628-GFP 为模板 PCR 扩增 *gfp* 基因; 5: 以对照菌株 1628 为模板 PCR 扩增 *gfp* 基因; M: DNA 分子量标准。

Note: A: 1-4: PCR product of *apr* gene from recombinant strain 1628-GFP; 5: PCR product of *apr* gene from control strain 1628. B: 1-4: PCR product of *gfp* gene from recombinant strain 1628-GFP; 5: PCR product of *gfp* gene from control strain 1628; M: DL2000 marker.

集菌丝体用荧光显微镜观察。结果显示重组菌 1628-GFP 菌丝能发出稳定明亮的绿色荧光(图 6),而对照无荧光,说明在 *S. diastatochromogenes* 1628 中红霉素抗性基因启动子 *PermE*^{*} 能有效启动外源基因 *gfp* 的表达。

2.4 重组菌 1628-VHB 的构建

如图 1 所示,酶切载体 T-*vgb* 回收 *vgb* 片段(图 2),在 *Nde* I 和 *Not* I 位点插入质粒 pIB139,得到重组质粒 pIB139-*vgb*。利用 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切验证(图 2),释放出 5.9 kb 和 0.4 kb 大小的片段,分别与载体 pIB139 和 *vgb* 大小相一致(图 7),结果表明重组质粒 pIB139-*vgb* 构建成功。pIB139-*vgb* 经接合转移法转入 *S. diastatochromogenes* 1628。重组菌 1628-VHB 的 PCR 验证结果见图 8。随机挑取 4 个重组菌 1628-VHB,分别用引物 *Papr-F*/*Papr-R* 和 *Pvgb-F*/*Pvgb-R*,均能 PCR 扩增出大小为 0.8 kb *apr* 片段和 0.4 kb *vgb*,而原始菌株 1628 均无法扩增出 *apr* 和 *vgb*。结果说明, *apr* 及 *vgb* 均已成功整合到菌株 1628 染色体上,重组菌 1628-VHB 构建成功。

2.5 重组菌 1628-VHB 的 VHB 生物学活性检测

将重组菌 1628-VHB 和对照菌 1628 的细胞破碎粗提液进行 CO 差光谱分析。结果显示,重组菌细胞同 CO 结合后在 420 nm 处产生了一个明显的

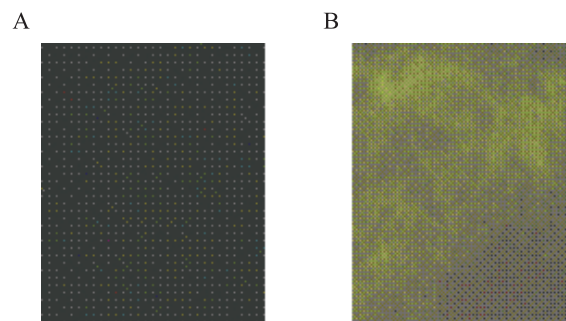


图 6 重组菌 1628-GFP 的绿色荧光检测

Fig. 6 Detection of green fluorescent in recombinant strain 1628-GFP

注: A: 对照菌株 1628; B: 重组菌 1628-GFP。

Note: A: Control strain 1628; B: Recombinant strain 1628-GFP.

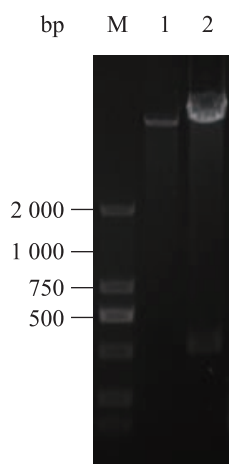


图7 质粒 pIB139-*vgb* 的酶切验证

Fig. 7 Analysis of plasmid pIB139-*vgb* by *Nde* I and *Not* I digestion

注: 1: *Nde* I+*Not* I 双酶切 pIB139; 2: *Nde* I+*Not* I 双酶切 pIB139-*vgb*; M: DNA 分子量标准。

Note: 1: Plasmid pIB139/*Nde* I+*Not* I; 2: Plasmid pIB139-*vgb*/*Nde* I+*Not* I; M: DL2000 marker.

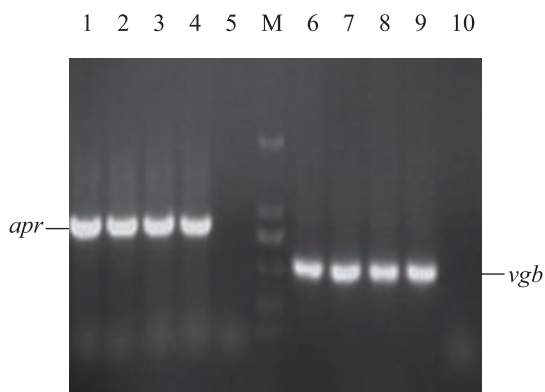


图8 重组菌 1628-VHB 的 PCR 验证

Fig. 8 Confirmation of recombinant strain 1628-VHB by PCR amplification

注: 1-4: 以重组菌 1628-VHB 为模板 PCR 扩增 *apr* 基因; 5: 以对照菌株 1628 为模板 PCR 扩增 *apr* 基因; 6-9: 以重组菌 1628-VHB 为模板 PCR 扩增 *vgb* 基因; 10: 以对照菌株 1628 为模板 PCR 扩增 *vgb* 基因; M: DNA 分子量标准。

Note: 1-4: PCR product of *apr* gene from recombinant strain 1628-VHB; 5: PCR product of *apr* gene from control strain 1628; 6-9: PCR product of *vgb* gene from recombinant strain 1628-VHB; 10: PCR product of *vgb* gene from control strain 1628; M: DL2000 marker.

吸收峰, 而对照菌没有此光谱特性(图9)。此结果说明重组菌中的 VHB 成功表达, 具有生物学活性, 能吸收 CO 形成 CO 结合性的血红蛋白。

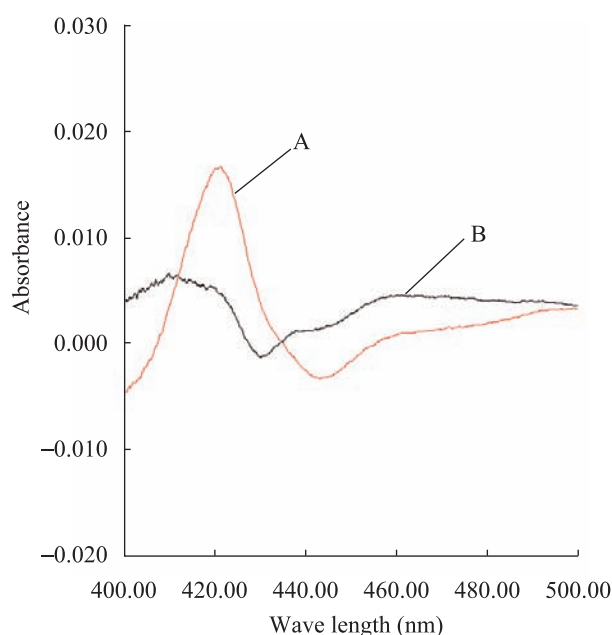


图9 重组菌细胞粗提物的 CO 差光谱分析

Fig. 9 CO binding difference spectrum of cell extracts from 1628-VHB

注: A: 重组菌 1628-VHB; B: 对照菌株 1628。

Note: A: Recombinant strain 1628-VHB; B: Control strain 1628.

2.6 不同溶氧条件下, 重组菌 1628-VHB 丰加霉素合成水平分析

以不同的培养基装液量与摇床转速模拟不同的溶氧条件, 考察 VHB 的表达对 1628 生物合成丰加霉素的影响(表2)。结果表明, 溶氧水平对 1628 生物合成丰加霉素有明显的影响。与正常的溶氧条件相比, 通过改变培养基的装液量和降低摇床转速降低溶氧水平均不利于原始菌株 1628 和重组菌 1628-VHB 生物合成丰加霉素。在正常的溶氧条件下, 重组菌株 1628-VHB 的丰加霉素产量较原始菌株提高21.2%; 与正常的溶氧状态相比, 中度限氧条件下原始菌的丰加霉素产量下降 38%, 而重组菌的丰加霉素合成量下降 23.9%, 产量明显高于原始菌株($P < 0.01$)。在高度限氧的环境下, 两株菌丰加霉素合成能力明显下降, 但重组菌与原始菌相比丰加霉素产量提高 104.5%。以上结果说明越是在低溶氧的条件下, VHB 的表达越有利于产物丰加霉素的积累。

表 2 不同溶氧状况下 VHb 表达对 1628 丰加霉素生物合成的影响
Table 2 Effects of VHb expression on the toyocamycin biosynthesis of strain 1628 under the diverse dissolved oxygen conditions

溶氧状态 Conditions	三角烧瓶体积/装液量/摇床转速 Volume of rotary flask (mL)/liquid volume (mL)/stirrer speed (r/min)	丰加霉素产量 Toyocamycin production (mg/L)		提高幅度 Rate of increase (%)
		Strain 1628	Strain 1628-VHB	
普通溶氧 Normal DO	250/50/200	134.97±0.6	163.52±0.8	21.2
中度限氧 Middle limitation DO	250/75/180	83.67±0.2	124.56±0.4	48.9
高度限氧 High limitation DO	250/100/150	32.15±0.1	65.76±0.2	104.5

2.7 重组菌 1628-VHB 的遗传稳定性分析

在无抗性压力条件下，重组菌连续传代 10 次，99%以上的单菌落仍保持安普霉素抗性。说明重组菌在传代过程中并没有发生整合外源基因丢失的情况。另外 *vgb* 的 PCR 检测及发酵结果显示，丰加霉素合成相对效价稳定在 95%以上，各代之间丰加霉素产量没有显著差异。以上结果说明重组菌 1628-VHB 具有良好的遗传稳定性。

3 讨论

核苷类抗生素是微生物合成的次级代谢产物，由核苷或核苷酸经过一系列后修饰而成，具有抗真菌、抗细菌等广谱的生物活性和良好的应用潜力^[22-23]。利用生物法合成广谱高效生物活性的该类抗生素已引起了国内外研究学者的高度重视和极大兴趣。丰加霉素是核苷类抗生素家族的重要成员，在农业领域已显示出较大的应用潜力。菌株 *S. diastatochromogenes* 1628 是本研究室前期筛选的一株丰加霉素生产菌株，但其产量较低，实现工业化生产仍有很大差距。为提高产量，在前期的工作中采取传统育种及发酵条件优化等措施，但效果均不理想。已有研究表明：溶氧水平的限制是链霉菌难以实现大规模生产次级代谢产物的关键因素。针对链霉菌这一共性问题，分子生物学技术已显示出明显的优越性，将透明颤菌血红蛋白 VHb 在链霉菌中的异源表达已成为促进菌体生长和代谢产物合成的有效手段。因

此，本研究旨在将编码 VHb 的 *vgb* 导入菌株 *S. diastatochromogenes* 1628 中，实现异源表达，以促进丰加霉素的合成。

在链霉菌中，基因的异源表达成功与否主要依赖于启动子的转录活性。在此方面，已有研究表明 *PermE*^{*}是可在链霉菌中实现基因组成型表达且转录活性较强的启动子^[24-25]，由于 *S. diastatochromogenes* 1628 属于野生菌株，遗传背景不清楚，因此 *PermE*^{*}能否有效启动外源基因的表达是本研究的根本前提。本研究首先将报告基因 *gfp* 置于链霉菌整合型载体 pIB139 下游，通过大肠杆菌-链霉菌属间接合转移法，将 *gfp* 整合到 1628 染色体上，重组菌 1628-GFP 菌丝在荧光显微镜下可检测到稳定明亮的绿色荧光，说明在 1628 菌株中启动子 *PermE*^{*}具有良好的转录活性，这为 VHb 在 1628 的表达奠定了基础。随后构建了重组菌 1628-VHB，通过 CO 差光谱分析法，检测到 VHb 在重组菌中具有生物活性。最后通过改变不同的装液量和摇床转速，考察了在不同的溶氧条件下 VHb 的表达对菌株 1628 生物合成丰加霉素的影响。研究发现，无论在何种溶氧条件下，与原始菌株相比，VHb 的表达均有利于产物丰加霉素的合成，且限氧水平越苛刻，VHb 异源表达对产物合成的促进作用越明显。此结果与杨洪涛等将 *vgb* 在林可霉素链霉菌中表达的实验结果相类似^[26]。

本研究构建获得的重组菌 1628-VHB 具备以

下优点: (1) *vgb* 采用的是已被成功应用的组成型启动子 *PermE**, 不需要诱导即可表达, 降低了添加诱导物的成本。(2) *VHb* 的表达能促进次级代谢产物丰加霉素的合成, 尤其是在中度限氧和高度限氧的条件下, 促进效果更为明显。(3) 重组菌经多次传代后, 丰加霉素的的生产性能无明显变化, 说明重组菌具有良好的遗传稳定性。以上特点为今后重组菌在低溶氧条件下规模化生产创造了条件。

致谢: 感谢江南大学张东旭副教授为本研究工作提供工具载体 pIB139 与菌株 *E. coli* ET12567 (pUZ8002), 感谢江南大学许正宏教授和饶志明教授分别为本研究工作提供载体 pYG013 和 pCAMBIA1302。

参 考 文 献

- [1] 于冰, 申屠旭萍, 俞晓平. 丰加霉素对黄瓜立枯丝核菌的拮抗作用[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(3): 373-377.
- [2] Kurihara Y, Egawa K, Kunimoto S, et al. Induction of p16/INK4a gene expression and cellular senescence by toyocamycin[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(10): 1272-1276.
- [3] 曾会才, 戴好富, 商瑞, 等. 丰加霉素在制备植物疫病防治药物上的应用: 中国, ZL200810189738.1[P]. 2008.
- [4] Hayashi K, Kamio S, Oono Y, et al. Toyocamycin specifically inhibits auxin signaling mediated by SCFTIR1 pathway[J]. Phytochemistry, 2009, 70(2): 190-197.
- [5] 俞晓平, 申屠旭萍, 董胜张, 等. 丰加霉素在防治黄瓜枯萎病中的应用: 中国, 201010127349.3[P]. 2010.
- [6] 申屠旭萍, 俞晓平, 于冰, 等. 丰加霉素在防治黄瓜立枯病中的应用: 中国, 201010527650.3[P]. 2010.
- [7] 俞晓平, 申屠旭萍, 董胜张, 等. 丰加霉素在防治番茄灰霉病中的应用: 中国, 201010127363.3[P]. 2010.
- [8] 申屠旭萍, 俞晓平, 董胜张, 等. 丰加霉素在防治番茄早疫病中的应用: 中国, 201010127378.X[P]. 2010.
- [9] Wei XX, Chen GQ. Applications of the *VHb* gene *vgb* for improved microbial fermentation processes[J]. Methods in Enzymology, 2008, 436(436): 273-287.
- [10] Zhang L, Li Y, Wang Z, et al. Recent developments and future prospects of *Vitreoscilla* hemoglobin application in metabolic engineering[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(2): 123-136.
- [11] 文莹, 李季伦. 透明颤菌血红蛋白基因在阿维链霉菌中的表达[J]. 微生物学报, 2000, 40(1): 50-56.
- [12] 孟春, 叶勤, 邱荔, 等. 透明颤菌血红蛋白基因表达对金色链霉菌生长代谢的影响[J]. 微生物学报, 2002, 42(4): 418-424.
- [13] 高峰, 王斌, 陈太春, 等. 委内瑞拉链霉菌秦岭变种属间接转移系统的构建及透明颤菌血红蛋白的表达[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 406-410.
- [14] 陈伊, 李舟, 魏玉珍, 等. 根际放线菌 I06-03431 产生的核苷类抗生素3431的研究[J]. 生物学报, 2009, 26(4): 17-20.
- [15] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical Streptomyces Genetics[M]. Norwich, United Kingdom: John Innes Foundation, 2000.
- [16] Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [17] Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF. 链霉菌遗传操作实验手册[M]. 邓子新, 唐纪良, 译. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1988.
- [18] Bierman M, Logan R, O'brien 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.
- [19] 丁春生, 饶志明, 诸葛斌, 等. 利用荧光蛋白研究产甘油假丝酵母胞浆3-磷酸甘油脱氢酶基因 *CgGPD* 启动子[J]. 微生物学报, 2008, 48(8): 1013-1018.
- [20] 许虹. 钝齿棒杆菌产 L-精氨酸供氧策略优化的初

步研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2008.

[21] 罗玉双, 寇笑笑, 丁学知, 等. 透明颤菌血红蛋白基因在刺糖多孢菌中整合表达促进多杀菌素的生物合成[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(2): 155-164.

[22] Rachakonda S, Cartee L. Challenges in antimicrobial drug discovery and the potential of nucleoside antibiotics[J]. Current Medicinal Chemistry, 2004, 11(6): 775-793.

[23] 陈文青, 邓子新. 核苷类抗生素代谢工程研究现状与展望[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(3): 129-141.

[24] 杨永红, 赫卫清, 李瑞芬, 等. 利用强启动子 *PermeE**提高4“-异戊酰基转移酶基因在变铅青链霉菌 TK24中对螺旋霉素的4“-异戊酰化水平[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(11): 826-830.

[25] Wang T, Bai L, Zhu D, et al. Enhancing macrolide production in *Streptomyces* by coexpressing three heterologous genes[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 50(1): 5-9.

[26] 杨洪涛, 刘瑞华, 何建勇, 等. 透明颤菌血红蛋白基因的克隆及其在林可链霉菌中的表达[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(8): 657-662.



2013 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	第二届全国植物寄生线虫微生物防治学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	1 月	100	云南昆明	张克勤 kqzhang1@yahoo.com.cn
2	国际休克与脓毒症高峰论坛	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	3 月 1-3 日	700	广东广州	张庆红 010-66867398
3	第一届中-欧放线菌生物学研讨会	中国微生物学会	4 月 9-10 日	200	北京	史明欣 15210746182
4	第四届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	5 月 29-31 日	150	贵州	吕相征 lvxz@cnis.gov.cn
5	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会第二次学术会议	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	4 月或 5 月	150	湖南张家界	贾晓娟 010-64807503
6	the 11 th international symposium on <i>Yersinia</i>	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6 月 24-28 日	200	苏州	沈晔 meetings@csh-asia.org
7	首届全国固体有机废弃生物转化及资源化利用研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7 月	200	湖北武汉	张吉斌 zhangjb@mail.hzau.edu.cn
8	第十四届微生物学教学和科研成果产业化研讨会	中国微生物学会普通、农业微生物学专业委员会	7 月	200	江苏南京	袁生 025-85891067
9	第十六次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	8 月	500	甘肃兰州	蒋建东 025-84395326
10	海洋微生物资源开发利用高端研讨会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8 月	50	厦门	王梁华 021-65493936
11	国际粘细菌大会 (Myxo2013)	中国微生物学会普通微生物学专业委员会	8 月 7-10 日	100 人	北京	李越中 0531-88564288
12	2013 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10 月	600	云南昆明	王旭 010-64807200
13	第四届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	10 月 12-15 日	300-500	甘肃敦煌	张丹 1875881066
14	全国酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	10 月	150-200	广西南宁	欧阳浩森 010-64807420
15	病原基因组学、进化与溯源	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	11 月中旬	150	重庆	郭刚 guogang7001@163.com
16	第五届微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研究会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	11 月	400 人	广东广州	阮志勇 cmr@caas.ac.cn
17	第八届全国芽孢杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	100	待定	孙明 027-87283455
18	第十届全国病毒学学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	待定	150	待定	梁华 010-58900979