

拟诺卡氏菌线型质粒 pNPL1 的测序和分析

田新莉 钟莉 覃重军*

(中国科学院上海生命科学研究院 植物生理生态研究所合成生物学重点实验室 上海 200032)

摘要:【目的】检测和分析稀有放线菌中新线型质粒。【方法】从植物内生菌中分离链霉菌之外的放线菌菌株,检测、测序和分析线型质粒。【结果】从中草药植物紫花前胡的叶片中分离到一株内生放线菌 25L-1-1c,经过 16S rRNA 基因序列比对属于拟诺卡氏菌。从该菌株中检测到一个约 25 kb 的线型质粒 pNPL1。克隆和测序了 pNPL1 新的端粒,含有多个小的回文序列。测序获得全长为 24 621 bp 的线型质粒 pNPL1,预测编码 22 个基因,其中 2 个基因与链霉菌质粒的端粒复制基因同源,1 个基因与链霉菌质粒主要的接合转移基因相似,其余 19 个基因为未知功能。携带 pNPL1 端粒复制基因的质粒不能转化铅青链霉菌,暗示需要发展拟诺卡氏菌的遗传操作系统。【结论】这是首次在拟诺卡氏菌中发现和描述线型质粒。

关键词: 拟诺卡氏菌, 线型质粒, 测序, 分析

Sequencing of *Nocardiopsis* linear plasmid pNPL1

TIAN Xin-Li ZHONG Li QIN Zhong-Jun*

(Key Laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: [Objective] To detect and analyze linear plasmids from rare actinomycetes species. [Methods] Rare actinomycetes strains were isolated from plants, and linear plasmids were detected, sequenced and analyzed. [Results] An endophytic actinomycetes strain 25L-1-1c was isolated from Chinese herb *Peucedanum decursivum*. Its 16S rRNA gene sequence resembled *Nocardiopsis*. Strain 25L-1-1c harbored a linear plasmid pNPL1. The telomere of pNPL1 was cloned and sequenced, which was a novel sequence containing multiple palindromes. The complete nucleotide sequence of pNPL1 comprised 24 621 bp, encoding 22 genes, 2 of them resembling *Streptomyces* telomere replication genes, one major plasmid transfer gene, and others unknown functional genes. Plasmid containing the *Nocardiopsis* telomere replication genes could not propagate in *S. lividans*, indicating that development of *Nocardiopsis* genetic system is needed. [Conclusion] This is the first example of linear plasmid in *Nocardiopsis*.

Keywords: *Nocardiopsis*, Linear plasmid, Sequencing, Analysis

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31121001)

*通讯作者: Tel: 86-21-54924171/54924176; 邮箱: qin@sibs.ac.cn

收稿日期: 2013-09-02; 接受日期: 2013-10-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-29

放线菌(*Actinomycetes*)属于高 G+C 含量、产生菌丝体的革兰氏阳性细菌,迄今描述了至少 145 个属,包括链霉菌(*Streptomyces*)、红球菌(*Rhodococcus*)、分枝杆菌(*Mycobacterium*)、游动双孢菌(*Planobispora*)、节杆菌(*Arthrobacter*)、诺卡氏菌(*Nocardia*)、拟诺卡氏菌(*Nocardiopsis*)等^[1]。放线菌的不同种产生了约 8 700 种抗生素和药理活性物质,在医药、农业和畜牧业有重要的应用价值^[2]。

放线菌菌株常含有环型质粒,包括游离态复制的质粒和在染色体上整合的质粒^[3]。与其它细菌不同的是,放线菌含有线型质粒,大小在 12–1 800 kb 之间^[4–6]。线型质粒 DNA 的两个末端均有回文(倒转重复)序列,5'端共价结合了端粒蛋白^[7]。近年来在游动双孢菌、红球菌、节杆菌和分枝杆菌等放线菌中也发现了线型质粒^[8–11]。研究表明放线菌线型质粒,尤其是端粒具有新颖的 DNA 复制机制^[12–14]。

拟诺卡氏菌属于链孢囊亚目、拟诺卡氏菌科、拟诺卡氏菌属,常从盐碱环境中分离到,目前发表的菌种有 27 个^[15]。从拟诺卡氏菌中发现了一些新的抗生素,如抗白血病的 Griseusin D^[16]和抗结肠癌的 Lucentamycins A–D^[17]。本实验室前期工作从 87 种中草药植物中分离到 560 株内生放线菌(大多数为链霉菌)^[18],检测到许多环型和线型质粒。本文报道来自植物紫花前胡的拟诺卡氏菌线型质粒 pNPL1 的克隆、测序及功能分析。这是首次报道在拟诺卡氏菌中发现线型质粒。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和基本的遗传操作

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为克隆宿主,质粒 pSP72 为克隆端粒的载体。变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*) ZX7 为克隆宿主^[19],质粒 pQC156^[20]为克隆线型质粒 pNPL1 复制基因的载体。大肠杆菌的培养、转化和质粒提取等基本操作参照文献^[21]。放线菌的培养、DNA 的抽提、脉冲场凝胶电泳、原生质体的制备及转化等操作参照文献^[22]。

1.2 主要试剂和 DNA 试剂盒

生化试剂和 DNA 聚合酶,购于上海生工生物工程技术服务有限公司;硫链丝菌素,购于 Sigma 公司;限制性核酸内切酶和 T4 DNA 连接酶,购于 MBI 公司;DNA 凝胶回收试剂盒,购于上海华舜生物工程有限公司。

1.3 拟诺卡氏菌 25L-1-1c 菌株的分离和鉴定

分离植物内生放线菌的方法参照文献^[18]。从上海市植物园的草药园中采集药用植物,用 70%乙醇、0.87%次氯酸钠和 10%碳酸氢钠分别处理 5、20 和 10 min 以达到表面消毒的目的。用无菌水洗涤 3 次,再用无菌滤纸吸干水分。将植物剪成约 1 cm 的小段,放置于培养基表面,于 30 °C 培养。根据形态和培养特征初步鉴定放线菌^[1]。以基因组 DNA 为模板,利用 16S rRNA 基因保守区设计引物(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 5'-TCAGGCTACCTTGTACGACTT-3'),进行 PCR 扩增,条件为:95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 2 min,共 30 个循环。放线菌菌株的初步归属采用 16S rRNA 基因序列测定和比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。

1.4 线型质粒 pNPL1 的提取和 DNA 结构验证

菌株 25L-1-1c 接种于 Tryptone-Soya-Broth 液体培养基,于 30 °C 培养 2 d 后,离心收集菌丝体。拟诺卡氏菌线型质粒的提取方法参照蛋白酶 K/SDS 处理链霉菌线型质粒的文献^[13]。提取的线型质粒 DNA 溶于 TE 溶液,在等量的 DNA 中分别加入 1 U 大肠杆菌外切酶 III 和 λ 外切酶,37 °C 保温,然后进行凝胶电泳。

1.5 pNPL1 端粒的克隆和分析

线型质粒 DNA 电泳后,从凝胶中切割条带并用试剂盒回收、纯化 DNA。为了彻底去除线型 DNA 端粒上共价结合的末端蛋白,加入 NaOH 至终浓度 0.2 mol/L,于 37 °C 保温 1 h,加入 HCl 至终浓度 0.2 mol/L 和 Tris-HCl (pH 8.0)至终浓度 0.1 mol/L。加入终浓度为 2 \times SSC 溶液,于 65 °C 保温 5 h。加入等体积的异丙醇沉淀 DNA,用 70%

乙醇洗涤 2 次,干燥后溶于 TE 溶液。纯化的线型质粒 DNA 用 *Nhe* I 酶切,含有 1 个端粒的酶切片段克隆到质粒 pSP72 上的 *Xba* I/*Eco*R V 位点(*Xba* I 的粘性末端与 *Nhe* I 相同, *Eco*R V 切割产物为平末端)。利用 pSP72 上的 T7 引物测定克隆到 *Eco*R V 位点的插入片段 DNA 序列。测序在上海博尚生物技术有限公司完成。端粒 DNA 的二级结构分析采用软件“DNA mfold”(http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form)。

1.6 pNPL1 的测序和分析

利用脉冲场凝胶电泳分离、回收和纯化约 10 μ g 的质粒 DNA^[22],进行鸟枪克隆,利用基因组测序 FLX 454 系统(Roche)在人类基因组南方中心(上海)完成测序。结合前面获得的端粒序列,拼接成完整的线型质粒 pNPL1 序列。放线菌 DNA 的开放阅读框(Open reading frame, ORF)分析软件为 Frameplot 4.0 beta (http://nocardia.nih.go.jp/fp4/)。pNPL1 全序列已经提交 GenBank 数据库,编号为 HM102370。

2 结果与讨论

2.1 线型质粒 pNPL1 的末端结构的验证

从中草药植物紫花前胡的叶片中分离到一株内生放线菌 25L-1-1c,该菌株与阿尔巴拟诺卡氏(*Nocardiosis alba*)的 16S rRNA 基因序列(GenBank 编号为 X97883)完全相同。在 LB (Luria-Bertani)培养基上生长良好,大量产生白色孢子;在 MS (Mannitol soya flour)培养基上生长,但是几乎不产生孢子。采用链霉菌中提取线型质粒的方法,从菌株 25L-1-1c 中检测到一个约 25 kb 的线型质粒 pNPL1。由于蛋白酶 K/SDS 处理链霉菌线型质粒 DNA 常常不能将其端粒 5'末端共价结合的蛋白完全切除,因此,线型质粒 DNA 表现出对 5'→3'的 λ 外切酶抗性,而其 3'末端由于没有被蛋白保护而表现出对 3'→5'的大肠杆菌外切酶 III 敏感^[13]。我们在等量的 pNPL1 DNA 溶液中分别加入大肠杆菌外切酶(*Exo*) III 和 λ 外切酶。凝胶电泳

的结果(图 1)显示,在溶于 TE 溶液的 pNPL1 中检测到约 25 kb 的质粒 DNA 带和染色体 DNA 片段带,用外切酶 III 处理 45 min 或 4 h 均可以完全消化质粒和染色体 DNA,而用 λ 外切酶处理 1 h 或 4 h 后只有染色体 DNA 片段带消失,质粒 DNA 带则清晰可见。该实验结果提示,质粒 pNPL1 与链霉菌线型质粒的 DNA 结构相同,即 3'末端为开放结构,而 5'末端被蛋白保护。

2.2 pNPL1 端粒的克隆和二级结构的分析

用多种限制性内切酶(包括 *Eco*R I、*Nhe* I 和 *Xho* I 等)分别消化线型质粒 pNPL1 DNA,凝胶电泳显示有 3 条 *Eco*R I 片段(~16、5.5 和 2.7 kb)、2 条 *Nhe* I 片段(~20 和 4.2 kb)和 2 条 *Xho* I 片段(约 14 和 10 kb)(图片未列出)。pNPL1 DNA 经 NaOH 处理去除末端蛋白后,用 *Nhe* I 消化,从凝胶中回收 4.2 kb 的片段克隆到质粒 pSP72 上。克隆到的端粒序列预测含有多个回文序列,可以多次“折叠”(图 2)。但是, pNPL1 与链霉菌保守的端粒序列没

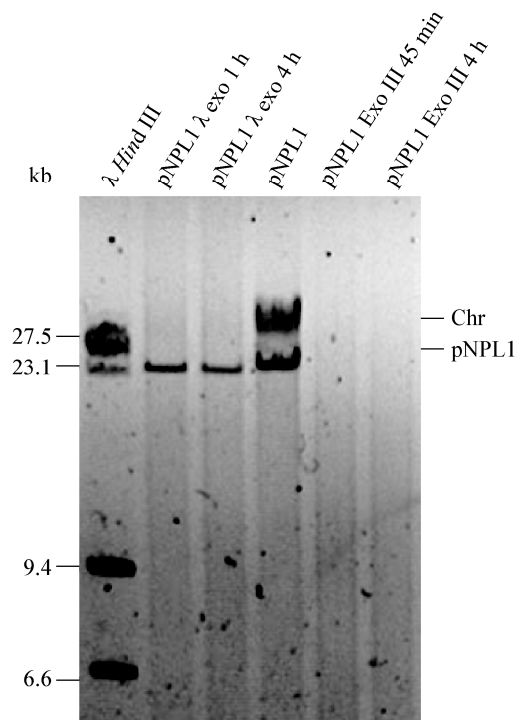


图 1 验证线型质粒 DNA 的结构

Figure 1 Determination of structure of linear plasmid pNPL1

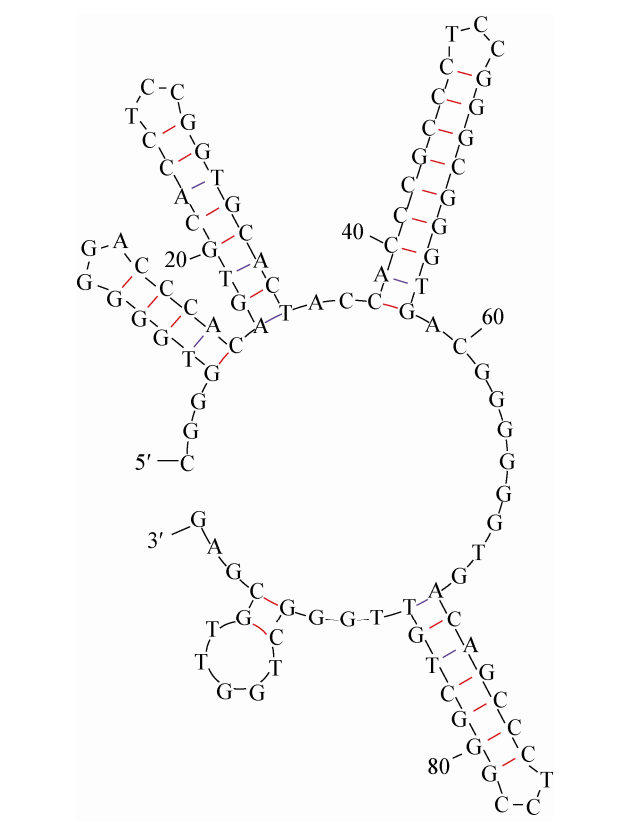


图 2 pNPL1 末端 100 核苷酸 DNA 的二级结构

Figure 2 Secondary structure of terminal 100 nt of pNPL1

有相似性,链霉菌端粒最末端的回文序列可以“折返”与中间的序列互补配对^[23],而 pNPL1 端粒的最末端不能“折返”。因此,这是一类新型的端粒。

2.3 线型质粒 pNPL1 全序列的获得和 ORF 的分析

利用脉冲场凝胶电泳获得了大量的 pNPL1 DNA,进行了鸟枪克隆和测序,加上前面测序的端粒序列,拼接了全长为 24 621 bp 的线型质粒 pNPL1 序列。pNPL1 的 G+C 含量为 67.3%,低于链霉菌的线型质粒(如 pSCL 为 72%^[5])。全长的 pNPL1 序列预测编码 22 个基因(表 1),只有 3 个基因(即 pNPL1.7c、pNPL1.13 和 pNPL1.14)与 GenBank 数据库里已知功能的链霉菌基因比对有相似性,包括 2 个端粒复制的基因(即 *tap* 和 *tpg*)和 1 个质粒主要的接合转移基因 *tra*,其余的 19 个基因与功能未知的基因有相似性或找不到有相似性的基因。pNPL1 的 5 个基因与链霉菌质粒(即线型质粒 pRL2 和 SCP1 以及环型质粒 pFP1)的已知或未知功能的基因相似,暗示该线型质粒与链霉菌质粒的亲缘关系可能比较接近。

表 1 预测质粒 pNPL1 的基因编码区				
Table 1 Predicted opening reading frames (ORFs) of plasmid pNPL1				
基因读框 ORFs	位置 Position (bp)	大小 Size (aa)	期望值 E. value	功能(菌株) Functions (organisms)
pNPL1.1c	1 381-1 157	75	1×10 ⁻³⁸	Unknown
pNPL1.2c	2 233-1 469	225		Unknown
pNPL1.3c	2 873-2 157	239		Unknown
pNPL1.4c	3 610-2 894	239		Unknown
pNPL1.5c	4 620-3 637	328		Unknown
pNPL1.6c	5 175-4 747	143	5×10 ⁻¹⁴	Unknown
pNPL1.7c	7 489-5 294	732		Tra protein of plasmid pRL2.11 (<i>Streptomyces</i>)
pNPL1.8c	7 954-7 598	119		Unknown
pNPL1.9c	8 259-7 981	93		Unknown
pNPL1.10c	8 801-8 283	173		Unknown
pNPL1.11c	10 660-8 801	620	3×10 ⁻⁵	Hypothetical protein SCP1.140 (<i>Streptomyces</i>)
pNPL1.12c	11 087-10 656	144		Unknown
pNPL1.13	11 366-15 094	1 243		Telomere-associated protein pRL2.4c (<i>Streptomyces</i>)
pNPL1.14	15 101-15 787	229		Telomere terminal protein pRL2.3c (<i>Streptomyces</i>)
pNPL1.15	16 539-16 994	152		Unknown
pNPL1.16	16 975-17 652	226	3×10 ⁻⁷⁸	Unknown
pNPL1.17	17 719-18 195	159		Unknown
pNPL1.18	18 287-18 883	199		Hypothetical protein Sros_9420 (<i>Streptosporangium</i>)
pNPL1.19	18 943-19 317	125		Hypothetical protein pFP1.39 (<i>Streptomyces</i>)
pNPL1.20	19 348-20 031	228		Unknown
pNPL1.21c	22 292-20 091	734	3×10 ⁻⁷⁸	Hypothetical protein NdasDRAFT_0783 (<i>Nocardiopsis</i>)
pNPL1.22	22 640-23 806	389		Unknown

2.4 线型质粒 pNPL1 复制基因的结构分析和在链霉菌中克隆的尝试

目前在链霉菌中鉴定了 2 个保守的端粒复制基因 *tpg* 和 *tap*, 分别编码末端蛋白(Tpg)和端粒相关蛋白(Tap)^[7,14]。链霉菌端粒复制基因 *tpg* 和 *tap* 常连锁在一起共同转录, 所编码的蛋白 Tpg 和 Tap 之间有相互作用^[14]。*pNPL1.13* 和 *pNPL1.14* 基因分别编码链霉菌 Tap 和 Tpg 类似的蛋白, 其组成结构与链霉菌线型质粒 pRL2^[24]和游动双孢菌线型质粒 pPR2^[25]相似(图 3)。但是 *pNPL1.13* 基因中间有一段功能未知的序列(555–915 aa), 含有高达 16 个重复序列(Iteron)(图 4)。一般 Theta 型质粒复制的起始区含有多个重复序列, 可以被复制蛋白结合, 以解开双链 DNA 开始复制^[26]。

为了鉴定可能的复制区, 参照鉴定链霉菌线型质粒 pRL2 的复制基因的方法^[24], 将 2 个 pNPL1 端粒片段和~16 kb 的 *EcoR* I 片段(含有完整的 *pNPL1.13*、*pNPL1.14* 基因及完整的 16 个重复序列)克隆到带有链霉菌选择标记 *tsr* 的质粒 pQC156 上, 导入变铅青链霉菌 ZX7 中, 不能获得硫链丝菌素抗性的克隆子。该结果暗示, 拟诺卡氏菌线型质粒 pNPL1 也许不能在链霉菌中复制。需要先发展拟诺卡氏菌的遗传操作系统, 才能进一步鉴定 pNPL1 复制相关的基因。

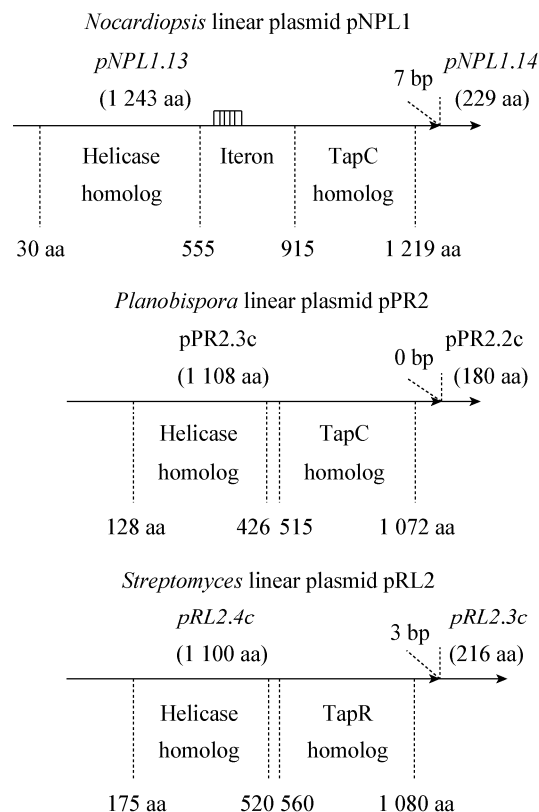


图3 pNPL1质粒的*pNPL1.13/pNPL1.14*基因编码的蛋白与链霉菌和游动双孢菌线型质粒端粒复制蛋白 Tap/Tpg 的比较

Figure 3 Comparison between *pNPL1.13/pNPL1.14* of plasmid pNPL1 and Tap/Tpg of *Streptomyces* and *Planobispora* linear plasmids

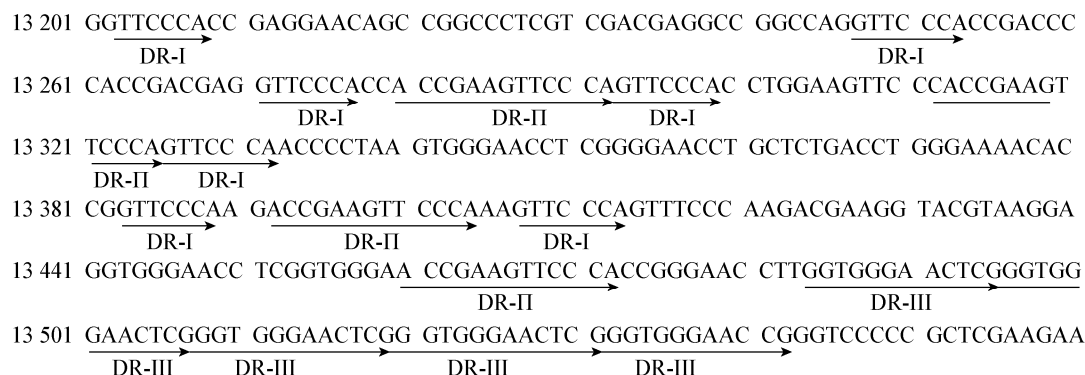


图4 *pNPL1.13* 基因中间的重复序列

Figure 4 Direct repeats within the *pNPL1.13* gene

参 考 文 献

- [1] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 14-84.
- [2] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites[J]. Journal of Antibiotics (Tokyo), 2005, 58: 1-26.
- [3] Hopwood DA, Kieser T. Conjugative plasmids of *Streptomyces*[A]// Bacterial Conjugation[M]. New York: Plenum Press, 1993: 293-311.
- [4] Hayakawa T, Yanaka T, Sakaguchi K, et al. A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* sp. producing lankacidin group antibiotics[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1979, 25: 255-260.
- [5] Wu X, Roy KL. Complete nucleotide sequence of a linear plasmid from *Streptomyces clavuligerus* and characterization of its RNA transcripts[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175: 37-52.
- [6] Kinashi H, Shimaji M, Sakai A. Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes[J]. Nature, 1987, 328: 454-456.
- [7] 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.
- [8] Kalkus J, Dorrie C, Fischer D, et al. The giant linear plasmid pHG207 from *Rhodococcus* sp. encoding hydrogen autotrophy: characterization of the plasmid and its termini[J]. Journal of General Microbiology, 1993, 139(9): 2055-2065.
- [9] Picardeau M, Vincent V. Characterization of large linear plasmids in mycobacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179: 2753-2756.
- [10] Polo S, Guerini O, Sosio M, et al. Identification of two linear plasmids in the actinomycete *Planobispora rosea*[J]. Microbiology, 1998, 144 (Pt 10): 2819-2825.
- [11] Parschat K, Overhage J, Strittmatter AW, et al. Complete nucleotide sequence of the 113-kilobase linear catabolic plasmid pAL1 of *Arthrobacter nitroguajacolicus* Rü61a and transcriptional analysis of genes involved in quinaldine degradation[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(10): 3855-3867.
- [12] Chang PC, Cohen SN. Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid[J]. Science, 1994, 265: 952-954.
- [13] Qin Z, Cohen SN. Replication at the telomeres of *Streptomyces* linear plasmid pSLA2[J]. Molecular Microbiology, 1998, 28(5): 893-903.
- [14] Bao K, Cohen SN. Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication[J]. Genes & Development, 2003, 17(16): 774-785.
- [15] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学——原理、方法及实践[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 390-394.
- [16] Li YQ, Li MG, Li W, et al. Griseusin D, a new pyranonaphthoquinone derivative from an alkaphilic *Nocardiosis* sp.[J]. Journal of Antibiotics (Tokyo), 2007, 60: 757-761.
- [17] Cho JY, Williams PG, Kwon HC, et al. Lucentamycins A-D, cytotoxic peptides from the marine-derived actinomycete *Nocardiosis lucentensis*[J]. Journal of Natural Products, 2007, 70(8): 1321-1328.
- [18] 田新莉, 钟莉, 成秋香, 等. 从87种中草药植物中分离内生放线菌及其规律的初探[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(9): 659-662.
- [19] Zhou X, Deng Z, Firmin JL, et al. Site-specific degradation of *Streptomyces lividans* DNA during electrophoresis in buffers contaminated with ferrous iron[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16: 4341-4352.
- [20] Qin Z, Shen M, Cohen SN. Identification and characterization of a pSLA2 plasmids locus required for linear DNA replication and circular plasmids stable inheritance in *Streptomyces lividans*[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(22): 6575-6582.
- [21] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [22] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [23] Huang C, Lin Y, Yang Y, et al. The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures[J]. Molecular Microbiology, 1998, 28(5): 905-926.
- [24] Zhang R, Xia H, Guo P, et al. Variation in the replication loci of *Streptomyces* linear plasmids[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 290(2): 209-216.
- [25] 杨勇, 覃重军. 游动双孢菌线型质粒 pPR2的全序列测定及分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(10): 1295-1300.
- [26] del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, et al. Replication and control of circular bacterial plasmids[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62: 434-464.