

## 游动放线菌 8-22 中 *treY* 基因敲除对于降低阿卡波糖 C 组分的作用

余贞 李美红 李娜 郑玲辉 黄隽\*

(浙江海正药业股份有限公司 浙江 台州 318000)

**摘要:**【目的】在阿卡波糖发酵过程中, C 组分的存在严重影响阿卡波糖产品的质量, 研究拟通过基因改造降低阿卡波糖 C 组分。【方法】通过构建 *treY* 同框敲除质粒 pUAmT-YUD, 以接合转移方法将其转入阿卡波糖工业菌株 8-22, 经同源重组将 *treY* 基因内部编码 182 个氨基酸的序列敲除, 从而得到 *treY* 基因失活的突变株 Y810。【结果】发酵结果显示突变菌株中 C 组分较出发菌株下降了约 10 倍, 而阿卡波糖本身的效价未受影响。【结论】敲除 *treY* 基因可大幅降低阿卡波糖 C 组分的含量。研究的实施将大大简化阿卡波糖的纯化步骤, 提升产品品质, 降低生产成本, 从而提高工业化生产的市场竞争力。研究同时还对游动放线菌的接合转移条件进行了优化, 大大提高了转化效率。

**关键词:** 阿卡波糖 C 组分, *treY*, 接合转移, 基因敲除

### Effect of *treY* gene inactivation on reducing of acarbose component C in *Actinoplanes* 8-22

YU Zhen LI Mei-Hong LI Na ZHENG Ling-Hui HUANG Jun\*

(Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd., Taizhou, Zhejiang 318000, China)

**Abstract:** [Objective] In acarbose producing strain *Actinoplanes* sp., *treY*, an important gene in trehalose synthesis, encodes an enzyme that catalyzes acarbose to produce component C during the fermentation. However, component C impacts the quality of acarbose products terribly. In current study, we construct a genetically engineered strain with reduced component C. [Methods] An in-frame knock-out plasmid pUAmT-YUD is constructed and transformed into acarbose-producing strain *Actinoplanes* 8-22 to inactivate *treY* by homologous recombination. [Results] Fermentation tests showed that component C produced by the recombinant strain Y810 was reduced by about 10-fold comparing with the parent strain, while the titer of acarbose was not affected. [Conclusion] Knockout of *treY* leads to compound C decrease in acarbose fermentation. The application of this trial will simplify the purification steps, improve the acarbose quality and reduce the cost to some extent. In addition, conjugation conditions of *Actinoplanes* are optimized and the conjugation efficiency is improved notably.

**Keywords:** Acarbose component C, *treY* gene, Conjugation, Gene knock-out

\*通讯作者: ✉: huangj@hisunpharm.com

收稿日期: 2015-03-16; 接受日期: 2015-05-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-13

阿卡波糖 (Acarbose) 是游动放线菌 (*Actinoplanes* sp.) 产生的次级代谢产物, 是一种 C7N-氨基环醇类的假性四糖物质<sup>[1]</sup>, 可与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶发生竞争性抑制作用, 是目前 II 型糖尿病的首选治疗药物, 国内年销售额已近 20 亿元。

由于阿卡波糖结构复杂, 目前它的工业化生产均为微生物发酵法。尽管通过发酵工艺优化可以使阿卡波糖的产量得到大幅度的提高, 但是在阿卡波糖发酵过程中还会产生一系列的阿卡波糖类物质。其中最为突出的是杂质 C 组分, 它的结构(图 1)与阿卡波糖极为相似, 这给阿卡波糖的分离纯化造成了极大的困难<sup>[2]</sup>。欧洲药典对阿卡波糖杂质组分的含量控制有着严格的限制<sup>[3]</sup>, 因此, 去除杂质组分显得尤为重要。

游动放线菌中阿卡波糖的生物合成基因簇及合成机制已经阐明<sup>[4-6]</sup>, 阿卡波糖产生菌游动放线菌

SE50/110<sup>[7]</sup>及淡青链霉菌 GLA.O<sup>[8]</sup>的全基因组序列也先后公布, 但 C 组分的合成机制仍未明确。有文献报道<sup>[9]</sup>, 推测产生阿卡波糖 C 组分有两条途径(图 1): 一是阿卡波糖经过 *treY* 基因编码的麦芽寡糖基海藻糖合酶催化反应直接得到 C 组分; 二是由 *treS* 基因编码的海藻糖合成酶合成海藻糖, 再进入合成途径得到 C 组分。分别纯化 TreY 和 TreS 两个酶, 以阿卡波糖作底物进行生物转化试验, 结果表明 TreY 可以将阿卡波糖异构化而产生 C 组分, 而 TreS 却不能, 证实了 *treY* 基因在阿卡波糖发酵后期的催化作用。本研究以阿卡波糖工业菌株游动放线菌 8-22 为出发菌株, 利用同源重组在不改变读码框的基础上敲除 *treY* 基因内部 546 bp 的基因片段, 尝试通过失活 *treY* 基因来降低杂质 C 组分。由于同源重组涉及到接合转移方法, 本研究同时优化了游动放线菌的接合转移条件。

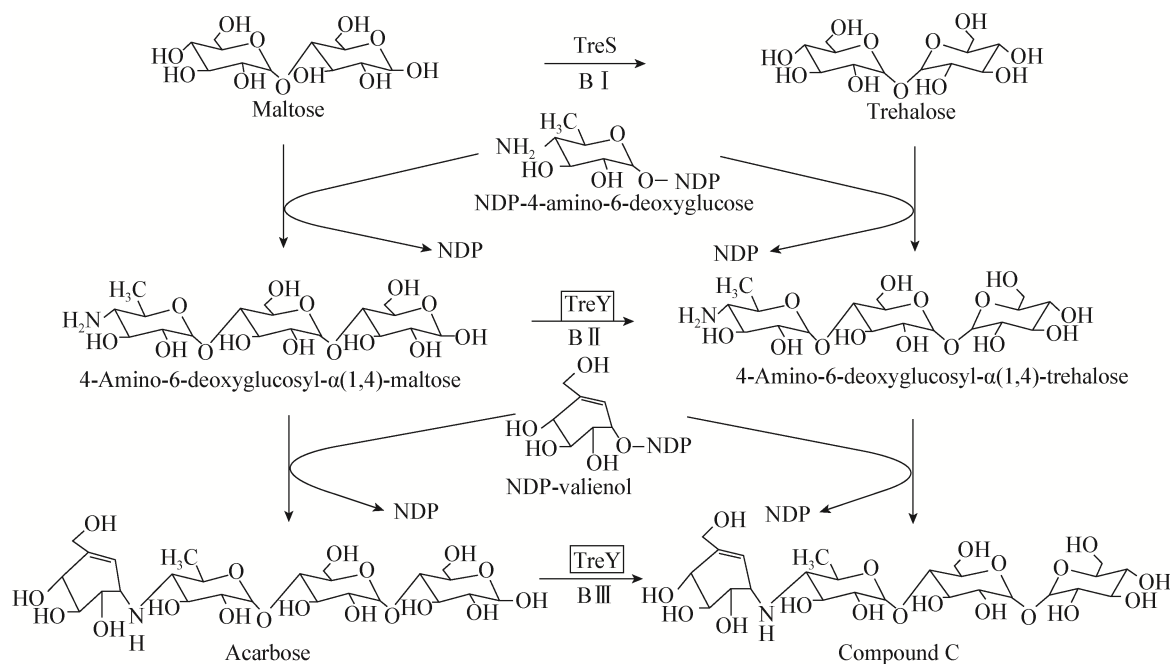


图 1 游动放线菌中阿卡波糖杂质 C 组分的形成途径<sup>[9]</sup>

Figure 1 Putative pathways leading to the biosynthesis of component C in *Actinoplanes* sp. SN 223/229 by trehalose synthetic enzymes<sup>[9]</sup>

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌种和质粒:** 阿卡波糖工业菌株游动放线菌 (*Actinoplanes* sp.) 8-22 为海正菌种保藏室保存。大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$ 、ET12567 (pUZ8002) 由本实验室保存。pUAmT14<sup>[10]</sup> 为大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒, 含 pUC19 复制子、阿泊拉霉素抗性基因 [*aac(3)IV*]、oriT 及 *lacZ*( $\alpha$ ); 质粒 pSET152 为链霉菌整合型质粒。

**1.1.2 试剂:** 核酸内切酶、DNA 分子量标准、*rTaq* DNA 聚合酶、PrimeSTAR DNA 高保真聚合酶、DNA 连接试剂盒等均购于 TaKaRa 公司; DNA 胶回收试剂盒购于上海华舜生物公司; 引物由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。

**1.1.3 抗生素和培养基:** 大肠杆菌培养基为 LB<sup>[11]</sup>; 游动放线菌 8-22 固体产孢培养基和接合转移培养基均为 MS<sup>[12]</sup>; 液体培养基为 TSB (Tryptic soy broth, BD 公司)。游动放线菌种子培养基和发酵培养基参见文献[13]。LB 中使用的氨苄青霉素 (Ampicillin, Ap) 和阿泊拉霉素 (Apramycin, Am) 终浓度分别为 100 mg/L 和 25 mg/L; MS 培养基中使用的阿泊拉霉素终浓度为 50 mg/L、萘啶酮酸 (Nalidixic acid, Nal) 的终浓度为 25 mg/L。

### 1.2 DNA 提取和转化

放线菌基因组 DNA 提取参照文献[12]进行。大肠杆菌质粒提取和转化参照文献[11]进行。

### 1.3 *treY* 基因敲除质粒的构建

根据 GenBank 公布的游动放线菌中海藻糖合成基因簇 (EF364111) 设计同源双交换两臂引物。用于扩增 *treY* 基因上游及 5' 部分片段的引物: *treU1*: 5'-atcgaattcCGTAAGGGGATAAATTAGCGCC-3' (下划线部分为 *EcoR* I 位点); *treU2*: 5'-atcggatccTATCTTCTCGATCACCAGCCAGG-3' (下划线部分为 *BamH* I 位点)。用于扩增 *treY* 基因下游及 3' 部分片段的引物: *treD1*: 5'-atcggatccACCGACGAGTTCCACGAGTGCT-3' (下划线部分为 *BamH* I

位点); *treD2*: 5'-atcaagcttGACCGCAGTCGCGGAGTTGTCA T-3' (下划线部分为 *Hind* III 位点)。以阿卡波糖工业菌 8-22 总 DNA 作为模板, 按说明书方法以 PrimeSTAR DNA 高保真聚合酶进行 PCR 反应。

将引物 *treU1*/*treU2* 扩增得到的 3 057 bp 片段 (YU) 克隆到 pUAmT14 的 *EcoR* I-*BamH* I 位点, 得到含 YU 的重组质粒 pUAmT-YU。将引物 *treD1*/*treD2* 扩增得到 2 885 bp 的片段 (YD) 克隆到 pUAmT-YU 的 *BamH* I-*Hind* III 位点, 得到同时含 YU 和 YD 片段的重组质粒 pUAmT-YUD (图 2), 即 *treY* 基因中断质粒。测序结果表明 pUAmT-YUD 的序列与预期的相吻合。

### 1.4 游动放线菌属间接接转移

以 Kieser 等<sup>[14]</sup>的方法为基础, 保持其它条件不变的情况下, 对游动放线菌菌丝的热激温度和时间进行了优化: 从平板上刮取游动放线菌 8-22 的菌丝到 30 mL TSB 培养基中, 28 °C 培养 24-40 h, 至菌液变成黑色; 取 3 mL 菌液转接到 30 mL TSB 培养基中, 28 °C 培养约 6 h。取 500  $\mu$ L 菌液, 离心去上清后, 以 500  $\mu$ L 2 $\times$ YT 培养基重新悬浮, 分别在不同的温度下热激, 取不同时间点进行试验, 室温冷却后用于接合转移。

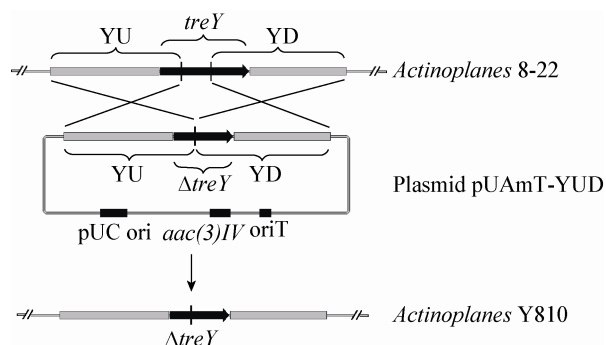


图 2 质粒 pUAmT-YUD 与游动放线菌 8-22 染色体之间的同源双交换

Figure 2 Homogenous double-crossover between plasmid pUAmT-YUD and *Actinoplanes* 8-22

## 1.5 色谱条件

色谱柱 Hypersil NH<sub>2</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0):乙腈(65:35, 体积比); 检测波长 210 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温 37 °C。阿卡波糖 C 组分的测定方法参照文献[9]。

## 2 结果与分析

### 2.1 游动放线菌菌丝热激的温度和时间对接合转移效率的影响

重组质粒 pUAmT-YUD 转化到大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002)后, 与经过不同条件处理的游动放线菌 8-22 菌丝体进行接合转移。结果(图 3)表明: 在热激温度为 30、42 和 50 °C 下, 热激时间从 0–30 min, 几乎都不能得到转化子; 而在 37 °C 下, 质粒 pUAmT-YUD 能以较高的效率转化到宿主菌, 尤其是热激时间为 20 min, 一个平板上的接合转移转化子更是达到 120 个以上。

### 2.2 *treY* 基因缺失突变株的构建及验证

质粒 pUAmT-YUD 转化到大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002)后, 通过接合转移转化到游动放线菌 8-22 内, 得到的接合转移子经含萘啶酮酸和阿泊拉霉素抗性的培养基上划线纯化后, 再在不含抗生素的 MS 培养基上进行松弛传代培养, 筛选只在无抗生素平板生长而在阿泊拉霉素抗性平板上不生长的菌落, 即对阿泊拉霉素敏感(Am<sup>S</sup>)的菌落。

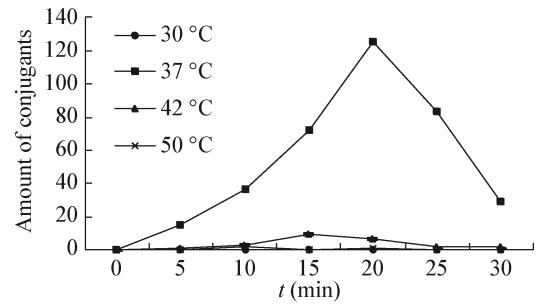


图 3 热激温度和时间对接合转移效率的影响

Figure 3 Conjugation efficiency under different temperature and time

从 366 个接合子中筛选得到 8 株 Am<sup>S</sup> 菌株, 这些菌株可能发生了双交换, 也有可能是回复突变株。在 *treY* 基因上下游设计验证引物, 上游引物 treY1: 5'-TTCTACGACATCGACTGGGAGC-3'; 下游引物 treY2: 5'-GTAGATCCGGTTCGACCATCTC-3'。从出发菌株 8-22 可以扩增出 1 347 bp 的条带; 而当中断质粒 pUAmT-YUD 进入到 8-22 并发生双交换后, *treY* 基因将缺失 546 bp。因此验证引物 treY1/Y2 扩增出 801 bp 条带(比出发菌株减少约 546 bp)的为双交换, 而扩增出 1 347 bp 条带的则为回复突变。上述筛选到的 8 株菌分别以总 DNA 为模板, treY1/Y2 为引物, 进行 PCR 扩增验证。结果显示有 4 株菌发生了双交换, 其余为回复突变。图 4 所示双交换菌株 DNA 以及各种对照 DNA 的 PCR 检验结果。

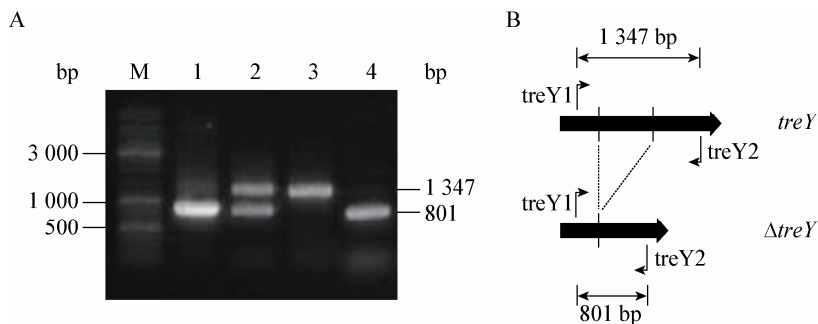


图 4 *treY* 基因突变株的 PCR 验证

Figure 4 PCR test of *treY* gene mutant strain

注: M: 标准分子量 DNA; 1: 质粒 pUAmT-YUD; 2: 单交换菌株的基因组 DNA; 3: 出发菌株 8-22 的基因组 DNA; 4: *treY* 失活突变株 Y810 的基因组 DNA。

Note: M: DNA marker; 1: Template from plasmid pUAmT-YUD; 2: Template from single-crossover strain genomic DNA; 3: Template from parent strain 8-22 genomic DNA; 4: Template from recombinant strain Y810 genomic DNA.

### 2.3 *treY* 基因缺失突变株的发酵验证

将得到的 4 株 *treY* 基因缺失突变株与出发菌株 8-22 按照文献[13]方法进行摇瓶发酵。取发酵液各 5 mL 过滤, 取上清 1 mL 到 4 mL 无水甲醇中浸泡过夜, 然后取滤液进行 HPLC 检测分析。结果显示 4 株突变株中 C 组分均下降明显。取其中发酵单位最高的 Y810 进行复筛, 结果与初筛基本一致。如图 5 所示, 与出发菌株 8-22 相比, *treY* 基因缺失突变后, Y810 发酵产物中的 C 组分从 0.514% (图 5A) 降到 0.056% (图 5B), 而发酵单位则与出发菌基本无差别。

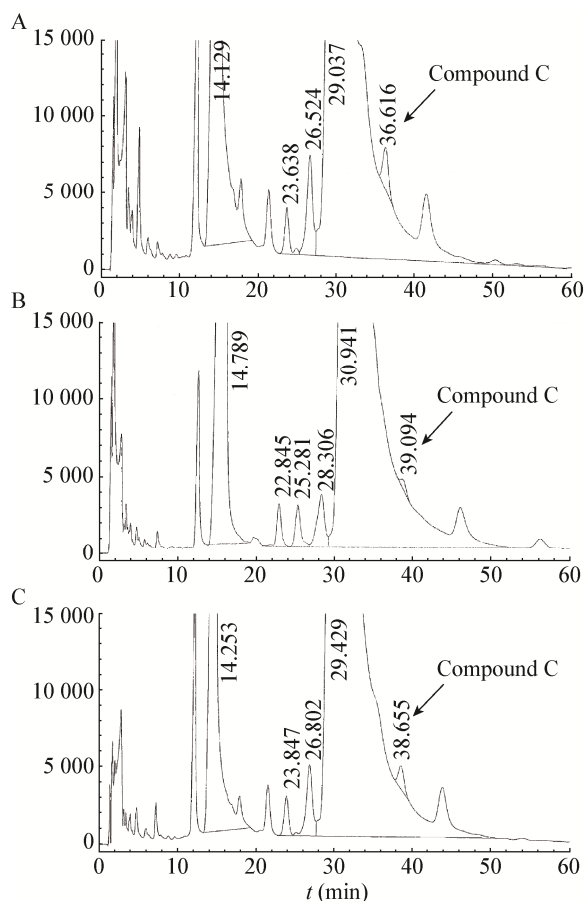


图 5 阿卡波糖发酵产物的 HPLC 分析

Figure 5 HPLC analysis of acarbose fermentation products

注: A: 出发菌株 8-22; B: *treY* 失活突变株 Y810; C: Y810 *treY* 基因回补菌株。

Note: A: HPLC of fermentation products from parental strain 8-22; B: HPLC of fermentation products from *treY* gene mutant strain Y810; C: HPLC of fermentation products from *treY* gene covering strain.

### 2.4 *treY* 基因回补试验

设计上游引物 *treYF*: 5'-ACTTCGGCCGGGCG GTCGCGCT-3'; 下游引物 *treYR*: 5'-TCCAGGCGC AGCTTGGGCGACT-3'。从 8-22 基因组 DNA 扩增得到包含完整的 *treY* 基因的片段, 克隆到 pSET152 的 *EcoR* V 位点, 得到整合型重组质粒 pSET-*treY*。将 pSET-*treY* 转化到 *treY* 缺失突变株 Y810, 随机挑取 3 个转化子进行发酵, 检验其 C 组分的含量。HPLC 结果(图 5C)表明, 阿卡波糖的发酵单位基本没有受到影响, 而其 C 组分含量为 0.328%, 介于原始菌株 8-22 与 *treY* 缺失菌株 Y810 之间, 说明其 *treY* 基因的功能得到恢复。

## 3 讨论

高品质的阿卡波糖产品中杂质 C 组分的含量要求控制在 0.1% 以下, 杂质含量不达标的产品不能进入销售渠道。然而现有的由游动放线菌发酵工程生产的阿卡波糖中, C 组分含量普遍在 2.5% 以上。由于 C 组分很难分离, 经过提取后的阿卡波糖成品中的 C 组分比例基本上与发酵产物中的 C 组分没有差别。因此, 近年来人们在提高阿卡波糖的产率的同时也在积极寻找措施来减少阿卡波糖向 C 组分的转化。目前常用的方法主要集中在控制发酵工艺, 例如控制发酵液渗透压<sup>[15-16]</sup>, 加入阿卡波糖的结构类似物如有效霉素 (Valienamine)<sup>[17]</sup>、有效霉素 A (Validamycin A)<sup>[18]</sup>, 以及缩短发酵周期等。通常这些方法会在一定程度上限制菌种生产阿卡波糖能力的发挥, 或是增加了发酵工艺的复杂程度, 提高生产成本; 即使通过控制渗透压能在一定程度上降低 C 组分, 但其效果也很有限<sup>[16]</sup>。本研究通过基因上阻断发酵后期从阿卡波糖向 C 组分的转化, 从而降低 C 组分的含量。然而从发酵结果来看, 敲除 *treY* 基因后得到的突变株中并没有完全去除 C 组分杂质 (图 5), 这可能与 C 组分的另一条形成途径——通过海藻糖合成的途径有关(图 1)。一方面, 游动放线菌本身能合成少量的用于细胞功能的海藻糖; 另一方面, 海藻糖作为细胞的重要组分部分, 在细胞内广泛存在<sup>[19]</sup>, 也有可能渗入到培养基的成分中。这

些海藻糖渗入到阿卡波糖的合成途径,最终产生极微量的 C 组分。尽管如此,相较于传统的发酵工艺控制,基因工程菌的工艺更加简便,而且现有的发酵工艺可以进行调整,更大程度发挥菌种的生产潜能。本研究不仅简化了提取的工艺,提升了阿卡波糖产品品质,同时也为进一步提高发酵单位打下了基础,因此具有巨大的应用价值。

本研究采用敲除 *treY* 基因中约 546 bp 序列而不插入异源基因,既不动动剩余 *treY* 编码的片段,也不影响下游基因的表达,而且这种同框敲除也有利于保持高产菌株的优良特性。另一方面,由于是通过同源双交换实现的基因缺失,得到的 *treY* 基因缺失突变菌株遗传稳定性好且不含任何抗性标记,有利于后续基因工程进一步改造和优化。而 *treY* 基因回补实验中 C 组分含量的回升则进一步证实了 *treY* 基因在阿卡波糖发酵后期对于 C 组分形成的关键作用。

另外,游动放线菌的接合转移转化效率较低,这也阻碍了其分子遗传操作方面的进展,本文通过对接合转移过程中热激温度和时间初步摸索,大大提高了转化效率,有利于后续的基因改造。

## 参 考 文 献

- [1] Mahmud T. The C7N aminocyclitol family of natural products[J]. Natural Products Report, 2003, 20(1): 137-166
- [2] Peng WF, Cheng X, Li KT. Research progress in microbial production of acarbose[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2014, 39(1): 1-5 (in Chinese)  
彭卫福, 程新, 李昆太. 微生物发酵产阿卡波糖的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(1): 1-5
- [3] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia 6.0[S]. 2008: 1089-1091
- [4] Wehmeier UF. The biosynthesis and metabolism of acarbose in *Actinoplanes* SE50/110: a progress report[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2003, 21: 279-285
- [5] Wehmeier UF, Piepersberg W. Biotechnology and molecular biology of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 63(6): 613-625
- [6] Rockser Y, Wehmeier UF. The *gac*-gene cluster for the production of acarbose from *Streptomyces glaucescens* GLA.O: identification, isolation and characterization[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(1/2): 114-123
- [7] Schwientek P, Szczepanowski R, Rückert C, et al. The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 112
- [8] Ortseifen V, Winkler A, Albersmeier A, et al. Complete genome sequence of the actinobacterium *Streptomyces glaucescens* GLA.O (DSM 40922) consisting of a linear chromosome and one linear plasmid[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 194: 81-83
- [9] Lee JS, Hai T, Pape H, et al. Three trehalose synthetic pathways in the acarbose-producing *Actinoplanes* sp. SN223/29 and evidence for the *TreY* role in biosynthesis of component C[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(5): 767-778
- [10] Li MH, Li N, Wang HB, et al. Gene disruption of *aveD* enhanced the yield of avermectin B in industrial strain[J]. World Notes on Antibiotics, 2014, 35(5): 216-218 (in Chinese)  
李美红, 李娜, 王海彬, 等. *aveD* 基因失活提高阿维菌素工业菌株 B 组分产量[J]. 国外医药抗生素分册, 2014, 35(5): 216-218
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [12] Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, et al. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: a Laboratory Manual[M]. Norwich, England: The John Innes Foundation, 1985: 125-158
- [13] Zhu HY, Tao MZ, Xing HY, et al. Mutation breeding of acarbose producing strain[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2005, 36(1): 17-21 (in Chinese)  
朱皖宜, 陶美珍, 邢红燕, 等. 阿卡波糖产生菌的诱变育种[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(1): 17-21
- [14] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical *Streptomyces* Genetic[M]. Norwich, England: The John Innes Foundation, 2000: 249-250
- [15] Beunink J, Schedel M, Steiner U. Osmotically controlled fermentation process for the preparation of acarbose, US: 6130072[P]. 2000-10-10. www. freepatentsonline.com/6130072.pdf
- [16] Chenq X, Peng WF, Huang L, et al. A novel osmolality-shift fermentation strategy for improving acarbose production and concurrently reducing byproduct component C formation by *Actinoplanes* sp. A56[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(12): 1817-1821
- [17] Choi BT, Shin CS. Reduced formation of byproduct component C in acarbose fermentation by *Actinoplanes* sp. CKD485-16[J]. Biotechnology Progress, 2003, 19(6): 1677-1682
- [18] Qin JW, Xue YP, Zheng YG. Effect of aminocyclitol compounds validamycin on fermentation of acarbose[J]. CIESC Journal, 2012, 63(8): 2531-2537 (in Chinese)  
秦俊伟, 薛亚平, 郑裕国. 氨基环醇类化合物有效霉素对阿卡波糖发酵过程的影响[J]. 化工学报, 2012, 63(8): 2531-2537
- [19] Zhu YM, Zhang J, Xing LJ, et al. Progress on molecular biology of trehalose synthase — a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(1): 6-12 (in Chinese)  
朱玥明, 张峻, 邢来君, 等. 海藻糖合酶的分子生物学研究进展[J]. 微生物学报, 2009, 49(1): 6-12