

文章编号 :1003-8701(2012)02-0030-04

# 链霉菌 769 接合转移体系的建立

杜茜<sup>1</sup>,张红丹<sup>1,2</sup>,张正坤<sup>1</sup>,陈光<sup>2\*</sup>,李启云<sup>1\*</sup>

(1.吉林省农业科学院,长春 130033 2.吉林农业大学,长春 130118)

**摘要:**本研究确定了质粒 pSET152 从大肠杆菌( *Escherichia coli*)ET12567 (pUZ8002)转移到链霉菌 769 中的接合转移的条件。在 MS 培养基上得到了最高的接合转移效率,孢子在 50℃ 下热激 10 min,供体菌和受体菌的比例为 1:10,16~18 h 后进行抗生素覆盖的情况下结合转移效率为  $1.03 \times 10^{-6} \sim 1.23 \times 10^{-5}$ 。经过连续 5 代的选择压力和 PCR 验证,表明质粒 pSET152 已经整合到受体菌株的染色体中。本研究首次建立了链霉菌 769 接合转移系统。

**关键词:**链霉菌 769;接合转移

中图分类号:Q784

文献标识码:A

## Construction of Conjugal Transfer System of *Streptomyces ahygroscopicus gongzhulingensis*

DU Qian<sup>1</sup>, ZHANG Hong-dan<sup>1,2</sup>, ZHANG Zheng-kun<sup>1</sup>, CHEN Guang<sup>2\*</sup>, LI Qi-yun<sup>1\*</sup>

(1. *Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033* 2. *Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China*)

**Abstract:** In this study, conditions for the conjugal transfer of pSET152 from *E. coli* ET12567 (pUZ8002) to *Streptomyces ahygroscopicus gongzhulingensis* were established. The highest frequency was obtained on MS medium. The frequency of conjugant formation was  $1.03 \times 10^{-6} \sim 1.23 \times 10^{-5}$  depending on heat treatment of the spores at 50 °C for 10 min, donor and recipient cells mixed in a 1:10 ratio, incubated 16 to 18 hours and then covered with antibiotics. After five generations selection under stress conditions, it was demonstrated by PCR experiments that plasmid pSET152 has integrated into chromosomes of the recipient strains. And this is the first report on the transfer system of *S. gongzhulingensis*.

**Keywords:** *Streptomyces ahygroscopicus gongzhulingensis*; Conjugal transfer

链霉菌是一类具有重要经济价值的革兰氏阳性细菌,能产生多种抗生素和生物活性物质。随着社会的发展,农用抗生素的研发成为农药发展的热点。在应用过程中发现公主岭霉素对禾谷类黑穗病、水稻恶苗病、谷子白发病有很好的防治作用<sup>[1]</sup>,后续的研究表明其发酵液对 15 属 21 种植物病原菌具有明显拮抗作用<sup>[2]</sup>,其产生菌由中科院阮

继生研究员定名为不吸水链霉菌公主岭新变种 (*Streptomyces ahygroscopicus gongzhulingensis* Ruan et zhang1974)(链霉菌 769)。在未来的工作中,提高链霉菌 769 的发酵效价,降低生产成本和扩大防治对象以兼治多种病害,充分发挥公主岭霉素的作用,具有重要的研究价值和应用前景。

随着链霉菌基因工程技术的发展,克隆次级代谢产物生物合成基因、有目的地定向改造基因、提高基因的表达水平以改造菌种的生产能力、基因重组产生新化合物成为可能<sup>[3]</sup>。在对一个链霉菌进行基因改造时,首要的问题就是建立所研究菌株的基因转移系统,这是实现对其基因功能分析、生物合成基因簇定位、基因改造等一系列工作的基础<sup>[4]</sup>。本研究首次探索了链霉菌 769 的接合转

收稿日期:2011-11-04

基金项目:吉林省农科院植保所青年基金项目(zbs2010-01)

作者简介:杜茜(1979-),女,助理研究员,硕士,从事微生物农药及微生物分子生物学研究。

通讯作者:陈光,女,教授,E-mail:chg61@163.com

李启云,男,研究员,博士,E-mail:qyli@cjaas.com

移体系,为进一步研究该生防菌的功能基因和其他分子操作提供必不可少的平台,为研究该生防菌抗生素合成代谢途径、调控机理、遗传改良等奠定重要的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌株、质粒

ET12567(pUZ8002)为接合转移去甲基化供体<sup>[3]</sup>,由中国科学院微生物所杨克迁研究员惠赠;链霉菌 769、质粒 pSET152 均由本实验室保存。

#### 1.1.2 培养基和抗生素

大肠杆菌培养基为 LB;接合转移则分别选用 TSB、高氏一号和 MS 培养基;链霉菌 769 固体产孢培养基为高氏一号,菌丝培养基为 YEME 液体培养基。LB 中安普霉素、氯霉素、卡那霉素使用量均为 50 $\mu$ g/mL,接合转移培养基中安普霉素使用量为 50 $\mu$ g/mL,萘啶酮酸为 40 $\mu$ g/mL。其他培养基参见[2]。

#### 1.1.3 安普抗生素引物

aac-F :5'-GTGCAATACGAATGGCGAAAAGCC-3'

aac-R :5'-TCAGCCAATCGACTGGCGAG-3'

均由上海生工合成。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 供体菌的制备

质粒 pSET152 2 $\mu$ L 加入到 40 $\mu$ L ET12567 (PUZ8002)感受态细胞中混匀,置于预冷的电击杯中将电击杯放入电击仪中,设置电压 1.8KV 电脉冲长度约为 1.5~1.8 毫秒快速加入冰冷的 1 mL SOC 液体培养基,吸取液体,37 $^{\circ}$ C 摇床培养 1 h,涂布含卡那霉素 25 $\mu$ g/mL、氯霉素 25 $\mu$ g/mL、安普霉素 50 $\mu$ g/mL 的 LB 固体培养基平板,37 $^{\circ}$ C 培养。

#### 1.2.2 受体菌的准备

将链霉菌 769 涂布在固体培养基上,28 $^{\circ}$ C 恒温培养,待孢子成熟后(培养 10 d 左右),制备单孢子悬浮液。

#### 1.2.3 DNA 操作

大肠杆菌质粒提取参照文献[5],链霉菌 DNA 提取参照文献[6]。

#### 1.2.4 链霉菌 769 对抗生素的敏感性检测

参见文献[7]进行操作。

#### 1.2.5 大肠杆菌与链霉菌 769 属间接接合转移体系

##### 1.2.5.1 接合转移培养基的选择

参照[8]。

##### 1.2.5.2 供体、受体比例对接合转移效率的影响

供体大肠杆菌细胞量保持 10<sup>8</sup> 不变,链霉菌 769 孢子量以 1:1,1:10,1:100,1:1 000 及 1:10 000 的比例递增。以形成肉眼可分辨的转化子为准。

##### 1.2.5.3 热激时间的确定

在最适宜的供受体比例下,50 $^{\circ}$ C 分别热激 5 min、10 min、15 min、20 min 及 25 min,以形成肉眼可分辨的转化子为准。

##### 1.2.5.4 接合转移的操作<sup>[9]</sup>及接合转移频率的计算<sup>[10]</sup>

用接种环刮下培养好的新鲜孢子至装有 500 $\mu$ L YEME 培养基 eppendorf 管中,振荡混匀(悬液中孢子数约为 10<sup>8</sup>/mL)。50 $^{\circ}$ C 水浴,热激 10 min,取 10 $\mu$ L 按 10<sup>3</sup> 倍数稀释涂板,培养,计数长出的菌落数,然后换算成孢子悬液中孢子数 /mL(A);同时热激后取一定体积的孢子悬液,与含有接合转移质粒的大肠杆菌(浓度约为 10<sup>8</sup>/mL)混匀后涂板培养,加含有萘啶酮酸的抗生素溶液筛选,计数长出的链霉菌菌落数,然后换算成接合转移的菌落数 /mL(B)。

接合率 = B/A

#### 1.2.6 转化子中质粒的检测和分析

转化子传代培养稳定后挑取单菌落接种到 YEME 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、200rpm 振荡培养 72 h 后收集菌丝体,提取质粒,对转化子中提取的质粒和 ET12567(puz8002、pSET152)内的质粒通过电泳验证两个质粒的一致性。

## 2 结果与分析

### 2.1 用于抗生素筛选的培养基的选择

抗生素的筛选过程是在固体培养基上考察一定浓度的抗生素对链霉菌 769 的抑制作用,使用的培养基既要保持菌种的正常生长,有较短的生长时间,又不能有过大的生长势,因此,固体培养基的选择很重要。选取常用培养基 769-1、769-2、高氏一号、PDA 及查氏培养基等 5 种培养基,综合考虑各方面的因素,用于遗传转化的选择剂的筛选。接种 3 d 后,查氏和高氏一号培养基上均未见菌体生长,7 d 后高氏一号培养基上有菌体生长,查氏培养基上仍未见有菌体生长,生长 12 d 后查氏培养基上依稀见有菌体生长。菌体生长过快或过慢,均不利于遗传选择,综上,选定高氏一号培养基作为遗传转化选择的培养基。

### 2.2 链霉菌 769 对抗生素的敏感性

为了确定用于链霉菌 769 进行遗传操作的选

择标记,检测了该菌种对利福平、硫酸新霉素、安普霉素等 13 种抗生素的抗性水平,结果显示链霉菌 769 对红霉素、利福平、硫酸新霉素、卡那霉素、链霉素、安普霉素较为敏感,浓度为  $50\mu\text{g/mL}$  的抗性平板可完全抑制该菌的生长,这表明红霉素、利福平、硫酸新霉素、卡那霉素、链霉素、安普霉素均可以作为链霉菌 769 进行遗传操作的选择标记。参考其它链霉菌遗传筛选标记,本研究选定安普霉素作为转化子的选择标记进行下一步研究。结果显示,链霉菌 769 对安普霉素极其敏感, $2.5\mu\text{g/mL}$  的抗性平板即可完全抑制链霉菌 769 的野生型菌株的生长(表 1),在转化子的筛选中,选用  $10\sim 20\mu\text{g/mL}$  作为转化子筛选的浓度。

表 1 链霉菌 769 对不同浓度安普霉素的敏感性

	100	50	25	10	5	2.5	1	0.5
安普霉素	-	-	-	-	-	-	+/-	+

注:抗生素浓度单位  $\mu\text{g/mL}$

+ :正常生长 +/- :生长缓慢 - :不长。

## 2.3 链霉菌 769 接合转移系统的建立

### 2.3.1 接合转移培养基的选择

以链霉菌 769 的孢子为受体,选用 TSB、高氏一号和 MS 培养基进行接合转移。结果表明,孢子在高氏一号培养基上不生长,在 TSB 培养基上只长出零星的结合子,而在 MS 培养基上有较多的结合子,因此 MS 培养基作为链霉菌 769 接合转移的首选培养基。

### 2.3.2 供体菌和受体菌的比例

当用链霉菌 769 的孢子进行接合转移试验时,对供体和受体的比例进行优化时供体菌的浓度保持  $10^8$  不变(表 3),供受体浓度比例为 1:1 时,对照培养基上也有大量的菌体生长,造成结合子的假阳性比例升高,而在 1:100、1:1000、1:10000 的比例下,均未见结合子生长,选定 1:10 作为最佳的供受体比例。

表 2 供体菌和受体菌的最佳共培养比例

供体浓度	浓度比例	转化子个数	接合转移频率
$1.0\times 10^8$	1:1	46	$0.46\times 10^6$
	1:10	50	$0.5\times 10^6$
	1:100	0	0
	1:1000	0	0
	1:10000	0	0

### 2.3.3 不同热激时间下的转化效率

不同的热激时间可以影响到接合转移的转化效率,分别在  $50^\circ\text{C}$  的热激温度下热激 5 min、10

min、15 min、20 min、25 min,结果显示(表 3),在 5 min 和 10 min 的条件下均可以长出较多的转化子,但是热激 5 min 时的对照上亦长出较多的菌落,随着热激时间的延长,转化子的个数明显减少,甚至没有转化子,由此可见,热激的时间不宜过长,否则会有大量的孢子死亡,热激 10 min 是最佳的热激时间。

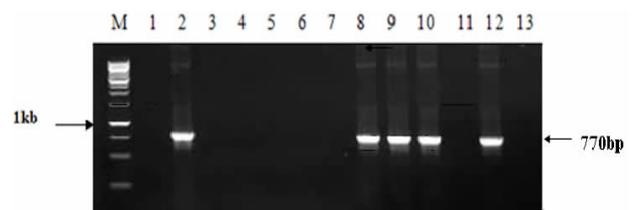
表 3 热激时间对接合转移频率的影响

热激温度	热激时间(min)	转化子个数	接合转移频率
$50^\circ\text{C}$	5	6	$0.6\times 10^6$
	10	7	$0.7\times 10^6$
	15	3	$0.3\times 10^6$
	20	1	$0.1\times 10^6$
	25	2	$0.2\times 10^6$

## 2.4 链霉菌 769 转化子的检测和分析

pSET152 属于基因整合性质粒,转入到链霉菌中后,不能单独存在于细胞质中,而是整合到菌株的基因组上<sup>[11]</sup>。将转化子在选择压力下连续传代 5 代后,随机挑取转化子在 YEME 培养液中扩繁。选择 pSET152 质粒中存在的安普霉素 *aac(3)*

抗性基因的引物,分别以 pSET152 质粒和接合转移转化子的基因组,以及野生型链霉菌 769 基因组为模板进行扩增(图 1),2、8、9、10 四株转化子可扩增出 770 bp 左右的片段,表明质粒 pSET152 已经整合到受体菌株的染色体中。但在不同的转化子中,在无选择压力的情况下有质粒丢失的现象。



注:M:B032-1(鼎国);1-10:不同转化子单菌落基因组 DNA 为模板扩增 *acc(3)* 基因;11:769 野生型基因组 DNA 为模板扩增 *acc(3)* 基因;12:质粒 pSET152 为模板扩增 *acc(3)* 基因;13:清水对照。

图 1 接合转移转化子中 *aac(3)IV* 基因的 PCR 验证

## 3 讨论

接合转移作为一种基因转移手段已在多种链霉菌中成功应用,它不仅可以避免胞外核酸酶,使 DNA 免遭核酸酶的降解,在某种程度上克服宿主对外源 DNA 的限制性障碍,而且操作程序相对简单<sup>[4]</sup>,是目前链霉菌遗传转化中广泛使用的一种

## 基因转移方法。

链霉菌是一个高度分化的菌属,不同菌种之间有很大的差异,适用于一种链霉菌的转化方法不一定适用于其它链霉菌,即使同一种链霉菌的不同菌株由于遗传背景的不同,转化效率也差别很大,而且不是每一种链霉菌都能够进行转化,因此需要根据目的菌株的情况,探索适合的转化方法<sup>[3]</sup>。由于不同种属链霉菌遗传背景的差异,其生长对碳氮源的需求量也存在差异,表现为对不同培养基的适应性。在结合转移体系中,链霉菌 769 的最适固体培养基为 MS,而肉桂地链霉菌为 R6<sup>[12]</sup>、班贝链霉菌为 SMK<sup>[13]</sup>、委内瑞拉链霉菌秦岭变种为高氏一号<sup>[14]</sup>。链霉菌 769 孢子 50℃ 热激 10 min 时有最高的接合转移效率,而雷帕斯霉素产生菌 NRRL5491 的热激时间为 20 min<sup>[15]</sup>,委内瑞拉链霉菌秦岭变种为 45℃ 处理 20 min<sup>[14]</sup>,而链霉菌 Men- myco- 93- 63 则需要在 50℃ 热激 10 min 的基础上 37℃ 温育 2.5 h<sup>[3]</sup>后有较好的接合转移效率,不同菌种间有所不同。连续 5 代压力培养后,链霉菌 769 转化子的稳定性为 40%,与海洋链霉菌 M095 的 80% 相比稳定性较低<sup>[16]</sup>,推测由于链霉菌 769 中线性质粒的存在而导致质粒间的不相容引起 pSET52 质粒丢失。本研究采用最优化条件时链霉菌 769 接合转移效率为  $0.3 \times 10^{-5}$ ,高于肉桂地链霉菌  $1.45 \times 10^{-6}$ 、链霉菌 NRRL5491  $2 \times 10^{-6}$  和班贝链霉菌  $2.82 \times 10^{-6}$ ,虽然低于海洋链霉菌 M095 的接合转移效率  $1.99 \times 10^{-4}$ ,但该转化效率足够用于基因置换等遗传操作,该菌种接合转移体系的建立及优化是调控基因和次级代谢产物合成基因功能验证的必要前提,同时为实现基因工程菌株的构建奠定了重要基础。

## 参考文献:

[1] 胡吉成. 公主岭霉素的研究[A]. 岳德荣,主编. 胡吉成文集

- [C]. 长春:吉林科学技术出版社,2006,377-478.
- [2] 张红丹,杜 茜,张正坤,等. 放线菌 769 抑菌谱及液体培养生长曲线的测定[J]. 中国植保导刊,2010,30(7):5-9.
- [3] 沈凤英,李亚宁,刘力强,等. 生防链霉菌 Men- myco- 93- 63 遗传转化体系的建立和优化 [J]. 中国农学通报,2009,25(13):197-201.
- [4] 吴 胜,夏焕章. 链霉菌基因转移的方法[J]. 生物工程进展,2002,22(3):91-94,83.
- [5] Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [C]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [6] Pwood DA, Bihb MJ, Chater KF. 链霉菌遗传操作实验手册 [C]. 邓子新,唐纪良,译. 长沙:湖南科学技术出版社,1988.
- [7] 张 亮. 除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)的基因工程改造[D]. 中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所 硕士学位论文,2005.
- [8] 陈双雅. 质粒在大肠杆菌和吸水链霉菌井冈 5008 之间的属间接合转移 [J]. 漳州师范学院学报(自然科学版),1999,12(1):54-58.
- [9] 邓子新,周秀芬. 质粒在大肠杆菌和链霉菌 FR-008 之间的属间接合转移[J]. 遗传,1994,16(6):7-10.
- [10] 莫宏波,白林泉. 大肠杆菌-链霉菌高效接合载体的构建及其应用[J]. 生物工程报,2004,20(5):662-666.
- [11] 李晓华,龙慈凡,周秀芬,等. 链霉菌质粒 pSET152 电转化稀有放线菌小单孢菌的研究 [J]. 微生物学报,2007,47(4):718-720.
- [12] 陈 芬,熊 伟,闵 勇,等. 肉桂地链霉菌接合转移体系的构建及 nsdA 基因中断对其次级代谢的影响[J]. 农业生物技术学报,2007,15(6):1042-1047.
- [13] 凌华云,闵 勇,熊 伟,等. 班贝链霉菌接合转移系统的构建及透明颤菌血红蛋白基因的表达对其次级代谢的影响[J]. 微生物学通报,2006,33(5):59-64.
- [14] 高 峰,王 斌,陈太春,等. 委内瑞拉链霉菌秦岭变种属间接合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.
- [15] 杨 旻,陶美凤. 雷帕霉素产生菌吸水链霉菌 NRRL5491 接合转移体系的建立 [J]. 华中农业大学学报,2007,26(5):637-641.
- [16] 侯艳华,王淑军,李富超,等. 海洋链霉菌分离株 M095 遗传转化体系的建立[J]. 海洋科学,2006,30(11):12-16.