

文章编号: 1001-8689(2021)02-0128-06

费氏链霉菌遗传操作体系的优化与应用

孙俊峰 王珊 刘鹏飞 薛正莲* 王洲 刘艳

(安徽工程大学生物与化学工程学院, 微生物发酵安徽省工程技术研究中心, 芜湖 241000)

摘要: 目的 建立并优化费氏链霉菌的遗传操作体系, 并通过分子改造得到新霉素效价提高的重组菌株, 为后续获得新霉素高产菌株奠定理论基础。方法 选择费氏链霉菌最适产孢培养基和抗性筛选标记, 对接合转移体系的关键影响因素进行优化, 获得过表达neoC基因的重组菌株, 以进一步研究neoC基因对新霉素效价的影响。结果 费氏链霉菌接合转移最适培养基为A75培养基, 孢子最适处理条件为50℃热激10min, 37℃预培养4h, 最适供受比为10:1, 安普霉素最适添加时间为15h, 优化后接合转移频率提高了7.69倍, 并得到了一株新霉素效价提高了22.29%的neoC基因过表达菌株SF-neoC。结论 成功建立并优化了费氏链霉菌的遗传操作体系, 为后续基于费氏链霉菌分子改造的其它应用提供依据。

关键词: 费氏链霉菌; 接合转移; 遗传操作; 新霉素

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Optimization and application of genetic manipulation system of *Streptomyces fradiae*

Sun Jun-feng, Wang Shan, Liu Peng-fei, Xue Zheng-lian, Wang Zhou and Liu Yan

(Institute of Biologic & Chemical Engineering of Anhui Polytechnic University, Microorganism Fermentation Engineering and Technology Research Center of Anhui Province, Wuhu 241000)

Abstract Objective To establish and optimize a genetic manipulation system suitable for *Streptomyces fradiae*, and to obtain a recombinant strain with increased neomycin titer through molecular modification. This study lays a theoretical foundation for the subsequent acquisition of high-yield strains of neomycin. **Methods** The optimal spore production medium and resistance selection markers of *Streptomyces fradiae* were selected, the key influencing factors of the conjugation system were optimized, and a recombinant strain over-expressing the neoC gene was obtained to further study the effect of the neoC gene on the neomycin titer. **Results** The optimal medium for *Streptomyces fradiae* conjugation was the A75 medium. The optimal spore treatment conditions were heat-shocked at 50℃ for 10min and precultured at 37℃ for 4h. The optimal ratio was 10:1. The optimal addition time of apramycin was 30℃ for 15h. After optimization, the conjugation frequency increased by 7.69 times. At the same time, we obtained a neoC gene over-expressing strain SF-neoC with 22.29% increase in neomycin titer. **Conclusion** The genetic operation system of *Streptomyces fradiae* was successfully established and optimized, providing a basis for other applications based on the subsequent molecular transformation of *Streptomyces fradiae*.

Key words *Streptomyces fradiae*; Conjugation; Genetic manipulation; Neomycin

收稿日期: 2020-02-10

作者简介: 孙俊峰, 男, 生于1994年, 在读硕士研究生, 主要研究方向为微生物资源开发与利用, E-mail: 1607452025@qq.com

*通讯作者, E-mail: xuezhen0851@sina.com

新霉素(neomycin, Nm)是1949年于费氏链霉菌产物中纯化得到的一种氨基糖苷类抗生素^[1-2]。其主要作用方式为与细菌核糖体16S rRNA结合，通过诱导密码子误读和干扰起始和易位来抑制蛋白质合成，从而导致细菌死亡。由于其有较高的抗菌活性和动物饲料添加剂的可用性，被广泛用于临床和畜牧业^[3-5]。有研究表明新霉素及其类似物具有抗HIV功能^[6]。文献研究显示，新霉素具有体外抗血管生成活性，已被认为是待开发的潜在抗癌药物^[7-8]，新霉素还具有抑制整个植物界茉莉酸酯介导的植物发育过程和防御反应^[9]。因此提升新霉素的生产能力具有重要现实意义。

费氏链霉菌是Nm的工业生产菌。在前期研究中，主要通过亚硝基胍、等离子技术或UV光处理等方法获得高产突变菌株^[10-11]。而随着对费氏链霉菌基因组中新霉素生物合成基因簇的不断研究，新霉素生物合成的代谢途径已经逐渐清晰^[12-14]。近年来，人们已经开始通过分子遗传改造来提高费氏链霉菌生产新霉素的能力^[15-16]。

与电转化等方法相比，接合转移更易于操作，已成为是链霉菌常用的基因转移方法^[17-19]。目前费氏链霉菌的接合转移方法尚不成熟，只有少量文献有所报道^[16]。本文通过对费氏链霉菌接合转移关键因素的研究，建立并优化了费氏链霉菌的接合转移体系，得到了新霉素效价提高的基因过表达菌株，为后续进一步改造费氏链霉菌以提高其新霉素效价提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株和质粒大肠埃希菌*E.coli* ET12567(pUZ8002)和质粒pSET152购自楚灵生物工程有限公司。费氏链霉菌SF(*Streptomyces fradiae*, SF)由本实验室诱变育种所得。

培养基费氏链霉菌固体培养基为TSB固体、AS-1、RG、YMS、MS、2CMY、YD、2×YT，液体生长培养基为YEME，配方参见文献[20-21]。发酵培养基主要成分参见文献[22]。

主要试剂和仪器本实验相关抗生素、萘啶酮酸(NA)及细菌基因组小量提取试剂盒、蛋白质提取试剂盒、DNA纯化试剂盒等均购自上海生工生物公司；内切酶、连接酶购自TaKaRa；其他常用试剂购自国药公司。基因扩增仪、核酸电泳仪与蛋白电泳仪均购自伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 相关基本操作

费氏链霉菌的培养、相关分子操作等参见文献[20]。

1.2.2 重组质粒pSET152-neoC构建与转化

以费氏链霉菌基因组为模板，采用特异性引物neoC-F: 5'-ATAGCGGCCGCATGCAGACCAC-3'和neoC-R: 5'-GCGGATATCTTACGGCACGGGG-3'(下划线分别为NotI、EcoRV酶切位点)，PCR扩增长度1293bp的neoC基因。将扩增得到的neoC基因与pSET152质粒进行双酶切，再通过T4连接酶连接，得到重组质粒pSET152-neoC。将其导入*E. coli* ET12567(pUZ8002)感受态中，利用Am抗性平板筛选，并用特异性引物PCR验证。PCR检测引物序列为：M13-F: 5'-AGGGTTTCCCAGTCACG-3'; M13-R: 5'-GGCTTACACTTATGCTTCC-3'。

1.2.3 *E. coli* ET12567(pUZ8002, pSET152-neoC)与费氏链霉菌的接合转移

接合转移基本操作及其频率算法参见文献[20]。

1.2.4 接合子的PCR验证

分别将原始菌与接合子的菌丝体接种到含有Am的液体培养基中培养至对数生长期后期，提取全基因组，设计安普霉素抗性基因apmR的特异性引物进行PCR验证，引物参见文献[18]。

1.2.5 接合子的SDS-PAGE验证

分别将原始菌与接合子的菌丝体接种到含有Am的液体培养基中培养至对数生长期后期，提取总蛋白，进行SDS-PAGE验证。

1.2.6 neoC基因过表达菌株新霉素效价检测

将适量费氏链霉菌菌丝体与接合子菌丝体分别接种到发酵培养基中，35℃、260r/min培养7d后，取发酵液上清检测新霉素效价，检测方法参见文献[22]。

2 结果与分析

2.1 供体菌构建

*neoC*基因的功能为编码合成2DOI合酶，对新霉素的生物合成具有重要作用^[14]。为进行后续接合转移研究，构建重组质粒pSET152-neoC，其图谱见图1。重组质粒的PCR验证结果如图2所示。再将得到的重组质粒pSET152-neoC导入*E. coli* ET12567(pUZ8002)中，得到供体菌*E. coli* ET12567(pUZ8002, pSET152-neoC)。

2.2 受体菌产孢培养基选择

以链霉菌孢子为接合转移的受体，孢子数量对接合转移频率有重要影响^[20]。将费氏链霉菌孢子液分别涂布于8种常用的链霉菌固体培养基上，于30℃进行培养。结果(表1)显示，该菌在RG培养基上生长最快、产孢最快，生长4d即可产大量孢子；在2CMY、AS-1培养基中上生长较快，但产孢较慢；

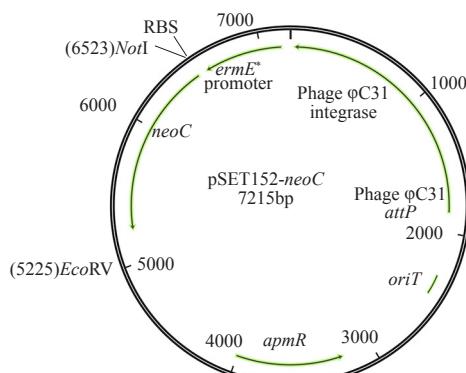


图1 重组质粒pSET152-neoC图谱
Fig. 1 Map of plasmid pSET152-neoC

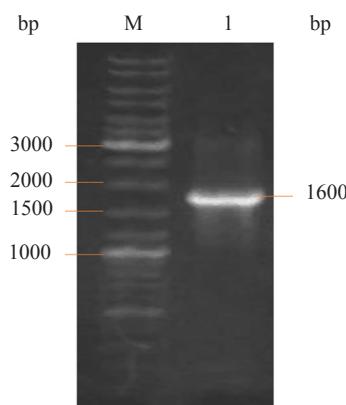


图2 重组质粒pSET152-neoC PCR验证
Fig. 2 Recombinant plasmid pSET152-neoC PCR validation

表1 费氏链霉菌产孢情况

Tab. 1 Spore production of *Streptomyces fradiae*

固体培养基种类	培养时间/d						
	1	2	3	4	5	6	7
MS	-	+/-	+/-	+	+	++	++
2CMY	+/-	+/-	+	++	++	+++	+++
YMS	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
YD	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
TSB	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
AS-1	+/-	+/-	+	++	++	+++	+++
RG	+/-	+	++	+++	+++	+++	+++
2×YT	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

注：- 未长菌丝，+/- 未产孢子，+ 少量孢子，++ 较多孢子，+++ 大量孢子

在MS培养基上生长较慢，产孢慢且产孢量也较少；而在YMS、YD、2×YT、TSB培养基上只生长菌丝，不产孢子。综上，实验选择RG培养基为费氏链霉菌产孢培养基。

2.3 接合子抗性筛选标记选择

本研究检测了费氏链霉菌对6种常用抗生素的敏感性。结果(表2)表明，Nm对该菌生长无抑制作用；Amp、Km仅在浓度达到100μg/mL时有一定的抑制作用，但只能使该菌生长缓慢，不能完全抑制；Str在工作浓度为25~100μg/mL时也只有微弱的抑制作用；Am、Cm均能有效抑制该菌生长，但Cm只有在较

高工作浓度(超过50μg/mL)时才能有完全抑制该菌生长，而Am在工作浓度为10μg/mL时即可达到完全抑制。本研究以Am为抗性筛选标记。

2.4 大肠埃希菌-费氏链霉菌接合转移条件的单因素优化

2.4.1 费氏链霉菌接合转移培养基

接合转移培养基需要同时满足供体和受体的生长需求。本研究中供体为 *E. coli* ET12567(pUZ8002, pSET152-neoC)，受体为费氏链霉菌孢子，依照前期研究，选择了MS、2CMY、RG、AS-1 4种固体培养基进行实验。结果(图3)显示，在AS-1培养基上，接合转移频率最高，可能是AS-1中Mg²⁺的影响^[18]。

根据文献报道，Ca²⁺浓度对接合转移频率也具有重要影响^[23]。本研究比较了MgCl₂、CaCl₂和MgSO₄对接合转移频率的影响。结果(图4)表明，MgCl₂对费氏链霉菌接合转移频率影响较大，且当AS-1培养基中添加75mmol/L MgCl₂时，接合转移频率最高，将该培养基命名为A75。

2.4.2 费氏链霉菌孢子预萌发条件

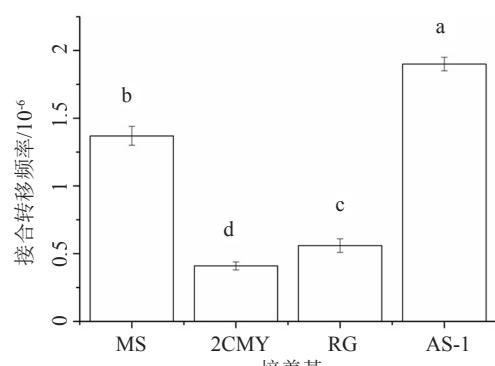
适当的热激处理可以促进孢子的萌发。本研究选取40、45、50、55和60℃ 5个温度，并选择5、10、15和20min 4个时间梯度进行实验。结果(图5)

表2 费氏链霉菌对6种常用抗生素敏感性的研究

Tab. 2 Study on the sensitivity of *Streptomyces fradiae* to six commonly used antibiotics

抗生素种类	抗生素工作浓度/(μg/mL)			
	10	25	50	100
新霉素(Nm)	+	+	+	+
氯霉素(Cm)	+/-	+/-	-	-
卡那霉素(Km)	+	+	+	+/-
链霉素(Str)	+	+/-	+/-	+/-
安普霉素(Am)	-	-	-	-
氨苄西林(Amp)	+	+	+	+/-

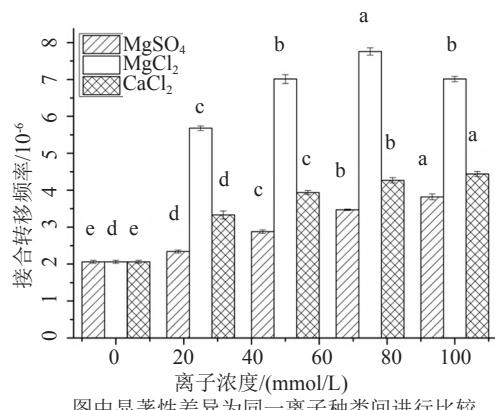
注：- 未生长，+/- 缓慢生长，+ 正常生长



注：用t检验法进行分析，图中标有不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)，标有相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)，下同。

图3 培养基对接合转移频率的影响

Fig. 3 Effect of medium on conjugation frequency



图中显著性差异为同一离子种类间进行比较

图4 离子种类及浓度对接合转移频率的影响

Fig. 4 Effect of ion species and concentration on conjugation frequency

显示，当温度较低或较高，热激处理对接合转移频率影响较小，甚至会产生抑制现象，而温度在45~55℃，处理10min效果最好，且在温度为50℃时，接合转移频率最高。

对受体的预培养处理会影响受体的萌发频率，从而促进接合转移的产生。本研究以孢子预萌发时间为1、2、3、4和5h 5个时间梯度进行接合转移实验。结果(图6)显示，孢子预培养4h时，接合转移频率最高，推测可能是此时的菌丝萌发状态良好，有利于接合转移^[18]。

2.4.3 接合转移体系中供受比

不同链霉菌接合转移过程中的最适供受比也不同。本实验通过控制供体和受体孢子的浓度，比较了5种不同的供受比对接合转移频率的影响。结果(图7)显示，供受比为10:1时，接合转移频率最高。

2.4.4 接合转移过程中抗生素水溶液的添加时间

不同的链霉菌在接合转移培养基上生长速度不同，最适的抗生素添加时间也存在差异。分别于接

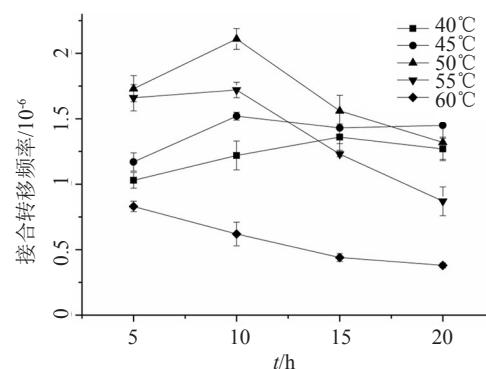


图5 热激条件对接合转移频率的影响

Fig. 5 Effect of heat shock conditions on conjugation frequency

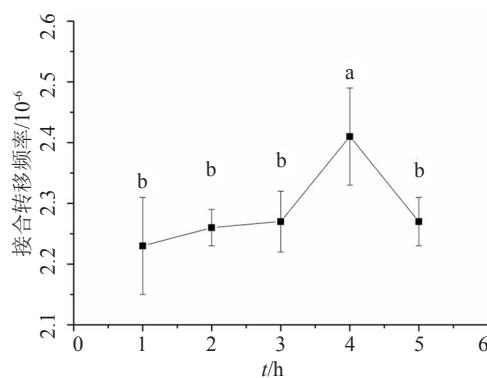


图6 孢子预培养时间对接合转移频率的影响

Fig. 6 Effect of spore pre-culture time on conjugation frequency

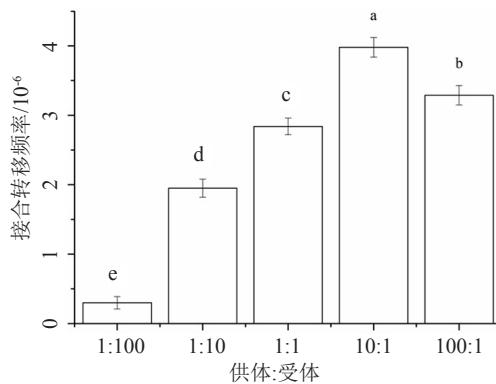


图7 供受体比例对接合转移频率的影响

Fig. 7 Effect of ratio of donor to recipient on conjugation frequency

合转移后10、12、14、16和18h添加Am，结果(图8)显示，Am添加时间为14h时，接合转移频率最高。

2.5 大肠埃希菌-费氏链霉菌接合转移条件的多因素优化

通过对单因素条件的研究，设计正交因素水平表(表3)。结果数据(表4)分析可得，供受比对接合转移频率影响最大，Am添加时间影响最小。接合转移理论最佳条件为A₂B₂C₃，实际最佳条件为A₂B₂C₂。经过验证，理论最佳条件时接合转移频率

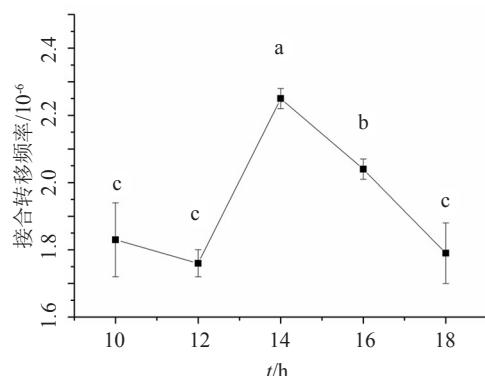


图8 安普霉素添加时间对接合转移频率的影响

Fig. 8 Effect of apramycin addition time on conjugation frequency

表3 正交因素水平表
Tab. 3 Orthogonal factor level table

水平	A: MgCl ₂ 浓度/mmol/L	B: 供受比	C: Am添加时间/h
1	65	5:1	13
2	75	10:1	14
3	85	15:1	15

表4 正交实验结果与数据分析
Tab. 4 Results and data analysis of orthogonal test

实验序号	A	B	C	接合转移频率/10 ⁻⁶
1	1	1	2	7.25
2	1	2	3	10.59
3	1	3	1	8.43
4	2	1	3	11.26
5	2	2	2	14.32
6	2	3	1	8.78
7	3	1	2	9.66
8	3	2	1	10.46
9	3	3	3	9.98
k1	8.757	9.390	9.223	
k2	11.453	11.790	10.117	
k3	10.033	9.063	10.610	
R	2.697	2.727	1.387	

注: 接合转移频率为3次数据的平均值

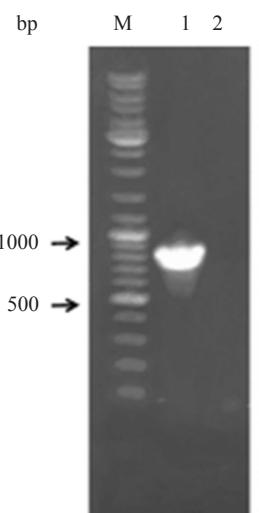
为 14.62×10^{-6} , 较未优化前提高了7.69倍。

2.6 接合子的PCR验证

通过提取接合转移平板上长出的接合子以及原始菌株SF的全基因组并进行PCR比较验证, 因为费氏链霉菌基因组中不含安普霉素抗性基因 $apmR$, 同时pSET152质粒不含链霉菌复制起始位点, 若没有整合到染色体上将会很快丢失, 使接合子丧失安普霉素抗性^[24]。结果(图9)显示, 原始菌株无条带, 而接合子在750bp处有明显条带, 表示pSET152-neoC质粒已整合到原始菌株SF染色体上, 初步表明本研究得到一株neoC基因过表达重组菌株SF-neoC。

2.7 接合子的SDS-PAGE验证

通过统一接合转移平板上长出的接合子以及原始菌株SF的总蛋白量并进行SDS-PAGE比较验证,



M: marker; 1: 接合子SF-neoC验证; 2: 原始菌株SF对照

图9 原始菌株SF与接合子SF-neoC的PCR验证

Fig. 9 PCR verification of original strain SF and exconjugant SF-neoC

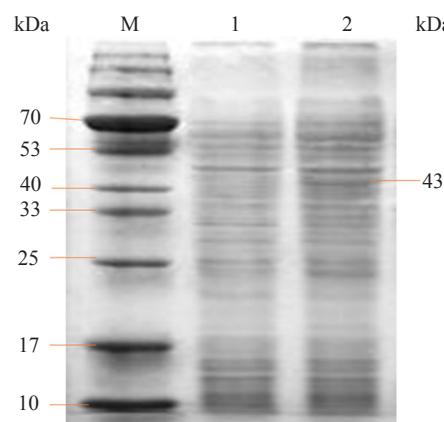
结果(图10)显示, 接合子在43kDa处的neoC基因表达的目的蛋白条带明显增强, 进一步表明重组菌株SF-neoC中的neoC基因的表达得到增强。

2.8 neoC基因过表达菌株新霉素效价检测

通过比较原始菌株SF与neoC基因过表达菌株SF-neoC发酵7d得到的发酵液新霉素效价, 结果(图11)显示, neoC基因过表达菌株SF-neoC的新霉素效价达到13775U/mL, 较原始菌株SF的效价提高了22.29%。

3 结论与展望

本文通过对费氏链霉菌接合转移体系中的关键因素进行优化, 使接合转移频率提高了7.69倍, 得到了以下结论: 费氏链霉菌最适产孢培养基为RG培养基, 抗性筛选标记为Am, 接合转移时, 最适培养基为A75, 最适受体处理条件为50℃孵育10min,



M: 蛋白分子标记; 1: 原始菌株SF总蛋白; 2: 接合子SF-neoC总蛋白

图10 原始菌株SF与接合子SF-neoC的SDS-PAGE验证

Fig. 10 SDS-PAGE verification of original strain SF and exconjugant SF-neoC

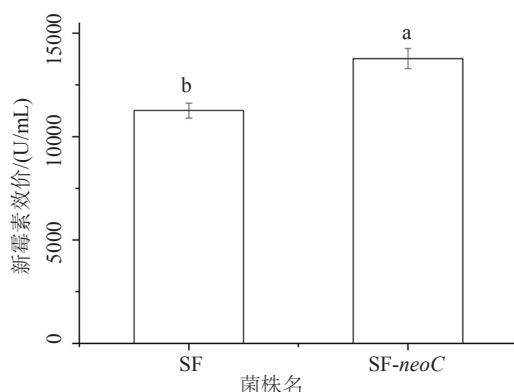


图11 原始菌株SF与接合子SF-neoC的新霉素效价检测
Fig. 11 Detection of neomycin titer of original strain SF and exconjugant SF-neoC

37℃预培养4h，最适供受体比例为10:1，Am最适添加时间为15h，得到了一株neoC基因过表达菌株SF-neoC，其新霉素效价较原始菌株SF提高了22.29%。

费氏链霉菌不仅是新霉素的主要生产菌株，也可以生物合成泰乐霉素等其他抗生素，本研究通过建立适宜的遗传操作体系，后续正在进过表达抗生素生物合成过程中的关键基因或添加强启动子元件等以得到优质高产的抗生素生产菌株，以及敲除或阻断某些关键基因以调控生物合成得到新品种抗生素产物。

参 考 文 献

- [1] Waksman S A , Lechevalier H A. Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms[J]. *Science*, 1949, 109(2830): 305-307.
- [2] Choi J S, Dong W K, Dong S K, et al. Novel neomycin sulfate-loaded hydrogel dressing with enhanced physical dressing properties and wound-curing effect[J]. *Drug Delivery*, 2015: 1-7.
- [3] Merlusca I P, Ibanescu C, Tuchilus C, et al. Characterization of neomycin-loaded xanthan-chitosan hydrogels for topical applications[J]. *Cellulose Chem Technol*, 2019, 53(7-8): 709-719.
- [4] Childsdisney J L, Disney M D. Small molecule targeting of a Micro RNA associated with hepatocellular carcinoma main cellulo[J]. *Acs Chemical Biol*, 2016, 11(2): 375-380.
- [5] Acevedo M A W, Erickson A K, Pfeiffer J K. The antibiotic neomycin enhances coxsackievirus plaque formation[J]. *Msphere*, 2019, 4(1).
- [6] 顾觉奋, 陈丽萍. 新霉素A、B及其衍生物抗HIV作用的研究[J]. 国外医药(抗生素分册), 2008, 29(4): 154-159.
- [7] Vo D D, Becquart C, Anh T T P, Tran T P A, et al. Building of neomycin-nucleobase-amino acid conjugates for the inhibition of oncogenic miRNAs biogenesis[J]. *Org Biomol Chem*, 2018, 16: 6262-6274.
- [8] NaharS, Ranjan N, Ray A, et al. Potent inhibition of miR-27a by neomycin-bisbenzimidazole conjugates[J]. *Chem Sci*, 2015, 6(10): 5837-5846.
- [9] Vadassery J , Ballhorn D J , Fleming S R , et al. Neomycin: An effective inhibitor of jasmonate-induced reactions in plants[J]. *J Plant Growth Regul*, 2019, 38(2): 713-722.
- [10] 马林, 达娃, 刘运, 等. 费氏链霉菌中子辐射诱变菌株对硫酸新霉素的生物转化[J]. 微生物学通报, 2010, 37(9): 1347-1355.
- [11] 陈宏, 张祝兰, 孙菲, 等. 链霉素抗性突变理性筛选硫酸新霉素高产菌株[J]. 生物技术通报, 2014(12): 173-176.
- [12] Kudo F, Hoshi S, Kawashima T, et al. Characterization of a radical S-adenosyl-L-methionine epimerase, NeoN, in the last step of neomycin B biosynthesis[J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(39): 13909-13915.
- [13] Dow G T, Thoden J B, Holden H M. The three-dimensional structure of NeoB: An aminotransferase involved in the biosynthesis of neomycin[J]. *Prot Scie*, 2018, 27(5): 945-956.
- [14] Kudo F, Eguchi T. Aminoglycoside antibiotics: New insights into the biosynthetic machinery of old drugs[J]. *Chem Record*, 2016, 16(1): 4-18.
- [15] Meng X, Wang W, Xie Z, et al. Neomycin biosynthesis is regulated positively by AfsA-g and NeoR in *Streptomyces fradiae* CGMCC 4. 7387[J]. *Scie China(Life Sci)*, 2017, 60(9): 980-991.
- [16] Zheng J, Li Y, Guan H, et al. Enhancement of neomycin production by engineering the entire biosynthetic gene cluster and feeding key precursors in *Streptomyces fradiae* CGMCC 4. 576[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(5): 2263-2275.
- [17] 韩秀林, 吴姣姣, 朱园园, 等. 新磷氮霉素A生产菌 *Streptomyces auratus* AGR0001的遗传操作研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(7): 524-530.
- [18] 王露, 朱世扬, 赵春田, 等. 加纳链霉菌接合转移体系的建立与优化[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(11): 1965-1971.
- [19] Rocha D, Ruiz-VillafánB, Manzo M , et al. Development of an efficient conjugal DNA transfer system between *Escherichia coli* and a non-sporulating *Streptomyces* strain[J]. *J Microbiol Meth*, 2018, 144: 60-66.
- [20] Kieser T, Bibb M J, Buttner M, et al. Practical *Streptomyces* genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [21] Baltz R H. Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration[J]. *J Gen Microbiol*, 1978, 107(1): 93-102.
- [22] 余飞,孙俊峰,刘鹏飞,等.弗氏链霉菌产硫酸新霉素高通量选育模型的建立及优化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(08): 162-167.
- [23] Wang X K, Jin J L . Crucial factor for increasing the conjugation frequency in, *Streptomyces netropsis*, SD-07 and other strains[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 357(1): 99-103.
- [24] 马次郎, 陈奕公, 刘晓明, 等. 双拷贝 *tylD*、*tylF* 和 *tylJ* 弗氏链霉菌工程菌株构建及其发酵性能研究[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(8): 915-919.