

刺糖多孢菌电转化条件研究*

张求学^{1,2} 兰 周² 汪 洋² 王昌禄^{1**} 宋 渊³ 张晓琳^{2**}

(1 天津科技大学食品工程与生物技术学院 天津 300457 2 国家粮食局科学研究院 北京 100037)

(3 中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘要 以经理化诱变选育的多杀菌素高产菌株刺糖多孢菌(*Saccharopolyspora spinosa*) CB11 为受体菌,将具有安普霉素(apramycin)抗性标记的整合型载体 pSET152 作为质粒供体,研究了制备刺糖多孢菌感受态细胞时菌体的生长阶段、质粒 DNA 浓度、电场强度等因素对电转化效率的影响,结果表明,在菌体培养 48h 至对数中期制备感受态,电场强度为 12kV/cm,最小 DNA 浓度为 0.1μg 时可获得最高的转化效率,转化子的安普霉素抗性基因的 PCR 扩增及抗性稳定性实验从分子水平及细胞水平验证了 pSET152 质粒能整合在刺糖多孢菌的基因组中并能稳定遗传,所有结果表明所建立的刺糖多孢菌电转化体系是行之有效的。

关键词 刺糖多孢菌 电转化 质粒 pSET152

中图分类号 Q78

刺糖多孢菌(*Saccharopolyspora spinosa*)最初是由礼来研究所的科研人员 1990 年从加勒比海地区采集的土壤中分离到的一株能产生杀虫活性物质的放线菌^[1]。该菌株经有氧发酵能产生一系列多杀菌素类物质,其中主要活性成分为多杀菌素 A (spinosyn A) 和多杀菌素 D (spinosyn D)^[2]。多杀菌素作为生物杀虫剂兼具化学农药的速效性和生物农药的安全性,由于其具有低毒、低残留、对非靶标生物安全、自然降解快等优点,从而多次获得美国“总统绿色化学品挑战奖 (Presidential Green Chemistry Challenge Award)”^[3]。

目前,刺糖多孢菌中多杀菌素生物合成基因簇已经被成功克隆和测序,研究人员通过阻断突变株互补实验,初步阐明了其生物合成和调控的分子机理^[4-5]。通过基因工程技术提高多杀菌素的产量和开发新型的多杀菌素衍生物成为未来的研究方向,因此建立简单、高效的刺糖多孢菌遗传转移体系就显得非常必要。由于刺糖多孢菌具有较强的限制性修饰系统,致使外源 DNA 很难导入。为了避开刺糖多孢菌的限制性修饰作用,Matsushima 等^[6]于 1994 年用经过刺糖多孢菌无细

胞提取物体外修饰的质粒转化刺糖多孢菌原生质体,成功地通过 PEG 介导的原生质体转化法将质粒转入到刺糖多孢菌中,同年又通过接合转移法,成功将质粒转入刺糖多孢菌^[7]中,但这两种方法操作相当复杂,本实验室经多次尝试,转化效率都较低。电转化法作为一种常规的外源 DNA 转移方法,具有操作简便、快速、转化效率高等优点。电转化法在放线菌基因操作中已有许多成功的应用,变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)^[8]、阿维链霉菌(*S. avermitilis*)^[9]、红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)^[10]、小小链霉菌(*S. parvulus*)^[11]、酒红链霉菌(*S. vinaceus*)^[11]、龟裂链霉菌(*S. rimosus*)^[12]等都有成功的报道。本研究尝试建立刺糖多孢菌的电转化方法,利用电转化将链霉菌整合型质粒 pSET152^[13]导入到刺糖多孢菌中,并在分子水平上对电转化子进行验证,同时检测质粒 pSET152 在电转化子中的遗传稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 电转化受体菌株刺糖多孢菌(*Saccharopolyspora spinosa*) CB11 为国家粮食局科学研究院发酵生物技术实验室经理化交替诱变选育获得的多杀

收稿日期:2011-01-20 修回日期:2011-03-02

* “十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD08B02-1)

** 通讯作者,电子信箱:zx1@chinagrains.org, clw123@tust.edu.cn

菌素高产菌株, -70℃ 保存。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ET12567 为去甲基化菌株。pSET152 质粒为大肠杆菌-链霉菌穿梭型整合质粒, 含有安普霉素抗性基因 *acc(3)IV*, pUC 18 复制子, 接合转移位点 (*oriT*) 及噬菌体 ΦC31 的整合酶基因 (*int*) 和整合位点 (*attP*)。

1.1.2 培养基 刺糖多孢菌 CB11 的固体培养基为 GYM^[14], 液体培养基为 TSB, 大肠杆菌培养基为 LB^[15]。

1.1.3 主要试剂和仪器 限制性内切核酸酶, *Taq* DNA 聚合酶, dNTPs, 1kb Marker, DL2000 Marker 均购自大连 TaKaRa 公司; 安普霉素购自美国 Sigma 公司, Multiporator 多功能细胞电穿孔仪, 5810R 台式高速冷冻离心机, Mastercycler e P 梯度型 PCR 仪均为德国 eppendorf 公司生产, 电泳仪为北京六一仪器厂生产。

1.2 DNA 基本操作

大肠杆菌中的质粒 DNA 提取参照碱裂解法^[15], 刺糖多孢菌总 DNA 提取采用链霉菌基因组的提取方法^[16]。DNA 的定量是将质粒 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 1kb Marker 为定量标准, 采用 Quantity One 系统对质粒进行定量, 并用 TE 稀释成不同浓度。安普霉素抗性基因的 PCR 引物为 AprF: 5'-CTTCGCATCCCGCCTCTGG-3'; AprR: CAATACGAATGGCGAAAAG, 均由 Invitrogen 公司合成。

1.3 感受态细胞的制备

实验方法参考《链霉菌遗传操作实验手册》^[16] 中的电转化感受态细胞制备方法并加以改进, 将 -70℃ 甘油管中保存的刺糖多孢菌 CB11 在 GYM 平板上活化后, 转接于 TSB 培养基中, 30℃, 180r/min 培养 36 ~ 60h。而后, 培养物在 4℃ 条件下 4 000r/min 离心 10min 收集菌体, 并用 10% 的蔗糖溶液和 15% 的甘油溶液分别洗涤 1 次后重悬于含 100μg/ml 溶菌酶的 15% 甘油中, 37℃ 温浴 40min, 离心后用 15% 甘油洗涤 1 次, 最后用 15% 的甘油稀释到 10⁸ 细胞/ml, 分装后置于 -70℃ 保存备用。

1.4 刺糖多孢菌电转化方案

取一管 40μl 的刺糖多孢菌感受态细胞, 加 1μl 质粒, 混匀后转入预冷的 1mm 电转化杯中, 设置阴性对照 (只加感受态细胞不加质粒), 在 Multiporator 多功能细胞电穿孔仪上 (默认脉冲时间为 5ms), 选择适当的电场强度电击, 并迅速加入 960μl 预冷的 TSB, 静置 10min 后在 30℃、180r/min 培养 3h, 将菌丝体用 TSB 按不同的比例稀释后取 100μl 涂布于 GYM 平板上, 20h 后用 1ml 含 50μg/ml 安普霉素的水溶液覆盖平板, 30℃ 培养

7d。出发菌株 CB11 在含安普霉素的 GYM 平板上不能生长, 因此在含安普霉素的 GYM 平板上长出的菌落可能为阳性转化子。统计转化子数, 计算电转化效率。

电转化效率(CFU/μgDNA) =
$$\frac{\text{转化子数} \times \text{稀释倍数}}{\text{DNA 量}(\mu\text{g})}$$

2 结 果

2.1 刺糖多孢菌 CB11 对抗生素的敏感性

为了确定可能用于刺糖多孢菌 CB11 进行遗传操作的抗生素选择标记, 分别检测了刺糖多孢菌在 GYM 平板上对安普霉素、四环素、卡那霉素、氯霉素和萘啶酮酸的抗性水平。结果如表 1 所示, 刺糖多孢菌 CB11 对安普霉素和四环素比较敏感, 在含终浓度为 1μg/ml 安普霉素或四环素的平板上生长就已经非常缓慢, 对卡那霉素敏感, 在含终浓度为 5.0μg/ml 卡那霉素的平板上生长受到抑制。而对氯霉素和萘啶酮酸则有一定的抗性。

表 1 刺糖多孢菌 CB11 对不同抗生素的敏感性
Table 1 Sensitivity of *Saccharopolyspora spinosa* CB11 to antibiotics

Antibiotics	Antibiotics concentration in GYM medium (μg/ml)					
	0.0	1.0	2.0	5.0	10.0	20.0
Apramycin	++	+	-	-	-	-
Tetracyclin	++	+	-	-	-	-
Kanamycin	++	+	+	+	-	-
Chloramphenicol	++	++	++	+	+	+
Nalidixicacid	++	++	++	++	++	++

++ :Normal growth; + :Slow growth;- :No growth.

2.2 刺糖多孢菌不同生长时期对电转化效率的影响

细菌细胞在一定的生长阶段, 经过特定处理能够摄取外源 DNA 的生理状态称为感受态。为确定刺糖多孢菌制备感受态细胞的最佳生长时期, 分别在刺糖多孢菌培养 36h、42h、48h、54h 和 60h 后, 制备感受态细胞, 将不同生长时期培养物制备的感受态细胞与 50ng 的质粒 DNA 在 12kV/cm 的电场强度下进行电转化。实验结果表明: 48h 培养物制备的感受态细胞电转化效率最高, 能达到 5.4 × 10² CFU/μgDNA (图 1)。

2.3 电场强度对电转化效率的影响

采用培养 48h 的刺糖多孢菌制备感受态细胞与 50ng 质粒 DNA, 分别测定了在 10kV/cm、12kV/cm、14kV/cm、16kV/cm、18kV/cm 5 种不同电场强度下的转化效率。结果见图 2, 在 12kV/cm 的电场强度下的电转化效率最高可达 2.6 × 10³ CFU/μg DNA。当电场

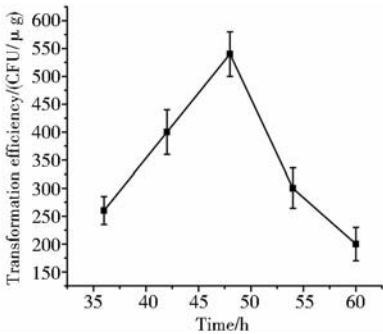


图 1 不同生长时期 *S. spinosa* CB11 的电转化效率

Fig.1 Effect of culture age on electrotransformation efficiency of *S. spinosa* CB11

强度超过 12kV/cm 时电转化效率随着电场强度增大而逐渐降低。

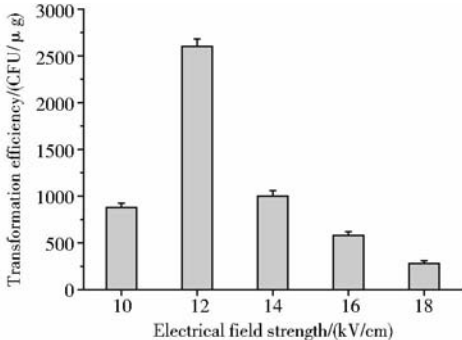


图 2 不同电场强度下的转化效率

Fig.2 Electrotransformation efficiencies of *S. spinosa* with different electric field strength

2.4 DNA 浓度对电转化效率的影响

采用上述优化的实验条件,刺糖多孢菌经培养 48h 后制备感受态细胞,分别加入不同量的质粒 DNA,在 12kV/cm 的电场强度下进行电转化。结果见图 3,DNA 量在 0.01 ~ 1μg,转化效率随 DNA 量的增加而迅速增加,当 DNA 量达到 0.1μg 时,转化效率增加趋势趋于平缓。

2.5 刺糖多孢菌电转化子的检测和分析

pSET152 为基因组整合型质粒,在刺糖多孢菌中不能单独复制,只能整合到菌株的基因组上,通过基因组一起复制。因此选择刺糖多孢菌基因组中不存在而 pSET152 质粒上含有的安普霉素抗性基因 *acc(3)IV* 作为标记,分别以 pSET152 质粒、pSET152 电转化子的基因组 DNA、出发菌株 CB11 的基因组 DNA 为模板,Ap^rF 和 Ap^rR 为引物进行 PCR 扩增。结果发现前两者中均能扩增出 750bp 的特异性片段而出发菌株 CB11 的基

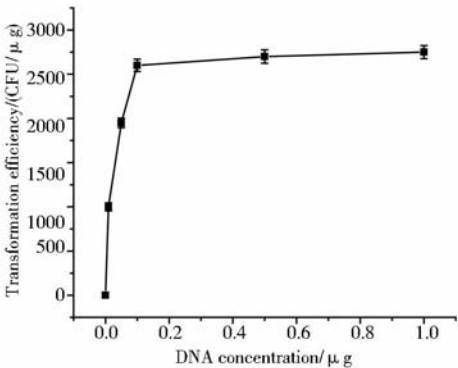


图 3 质粒浓度对电转化效率的影响

Fig.3 Effect of plasmid concentration on electrotransformation efficiency

因组扩增不出该片段。将该片段回收后,与 pMD18-T 载体相连,经测序验证与安普霉素抗性基因序列一致。由此证实了质粒 pSET152 已经成功地转入到刺糖多孢菌 CB11 中(图 4)。

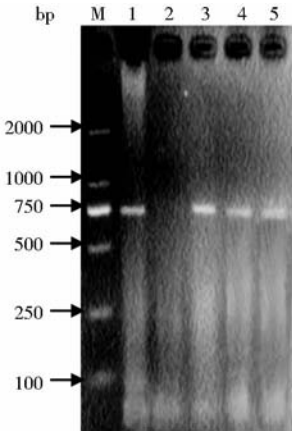


图 4 pSET152 电转化子的 PCR 验证

Fig.4 Verification of transformant by PCR amplification for internal *acc(3)IV* fragment

M:DL2000 marker;1:PCR product of pSET152;2:PCR product of CB11;3~5:PCR product of transformants

2.6 刺糖多孢菌转化子的稳定性

为检测质粒 pSET152 在电转化子中的遗传稳定性,将转化子在不含安普霉素的 GYM 平板上连续转接 4 次,随机挑取 100 个单菌落转接到含有安普霉素的 GYM 平板上,没有发现抗性消失的菌落。随机选取 8 个菌落,经 PCR 扩增和测序验证,结果与电转化子验证一致。表明 pSET152 质粒能在刺糖多孢菌 CB11 中稳定遗传。

3 讨论

刺糖多孢菌 CB11 是本实验室通过常规的理化诱变育种和抗性筛选得到的一株多杀菌素高产菌株。为了从分子水平进一步研究多杀菌素生物合成并提高多杀菌素的发酵产量,需要建立刺糖多孢菌的遗传操作体系。本实验室曾多次尝试用常规的原生质体转化和接合转移的方法将自主复制型质粒和整合型质粒导入到刺糖多孢菌中,但转化效率都较低。基于以上原因,本研究考察了不同的菌体生长时期、不同电场强度及 DNA 含量对刺糖多孢菌电转化效率的影响,首次成功建立了刺糖多孢菌电转化体系。

根据本实验室的研究经验,*S. spinosa* CB11 经培养 36~60h 时处于对数生长期。研究表明,菌体生长时期是影响电转化效率的关键因素。当菌体生长 48h 达到对数中期时,转化效率最高,这可能是因为处于对数生长中期的刺糖多孢菌生长旺盛,细胞壁较薄、外源 DNA 较易进入、电转化之后细胞恢复能力较强。

刺糖多孢菌作为一种革兰氏阳性菌,其细胞壁较厚,经过溶菌酶处理后,部分细胞壁被溶解,细胞膜裸露于外界环境中,在瞬间高电压下其通透性增加,同时摄取外源 DNA 的能力增强,在一定电场强度范围内,转化率随着电场强度增大而升高,但当电场强度超过一个峰值以后,继续提高电场强度,转化效率会降低。这是因为电转化过程中受体细胞要受到一定程度的损害,当电场强度过大时,受体损害较大,死亡率增加。

在一定的质粒 DNA 浓度范围内,电转化效率随质粒 DNA 浓度增大近似线性升高,而后趋于平缓。这可能是因为一定浓度的感受态细胞,在电转化过程中摄取外源 DNA 的能力是有限的。在相同质粒 DNA 浓度情况下,增大感受态细胞浓度或许能提高转化效率。

国内外关于刺糖多孢菌遗传转化体系的建立鲜有报道,这是因为刺糖多孢菌具有非常特别的限制修饰系统,对外源 DNA 表现出很强的限制性。为避开限制修饰系统,本实验采用的质粒是提取自去甲基化的大肠杆菌 ET12567,去甲基化的质粒或许是本实验成功的原因之一。为验证所建立电转化方法的可行性和有效性,我们将重组质粒(pSET152::*metK*)电转化刺糖多孢菌,*metK* 基因主要负责合成硫腺苷甲硫氨酸,该基因的过量表达会导致硫腺苷甲硫氨酸的大量合成从而影响到次级代谢产物的产生,*metK* 基因的 PCR 扩增和硫腺苷甲硫氨酸的 HPLC 检测结果都与预期结果相符(数据

未报道),进一步验证该电转化方法是可行的;该电转化方法的建立为有目的定向改造基因,提高基因的表达水平为改造刺糖多孢菌的生产能力奠定了重要基础。

参考文献

- [1] Mertz F P, Yao R C. *Saccharopolyspora spinosa* Sp-Nov isolated from soil collected in a sugar mill rum still, international. Journal of Systematic Bacteriology, 1990, 40(1):34-39.
- [2] Kirst H, Michel K, Mynderase J, et al. Discovery, isolation, and structure elucidation of a family of structurally unique, fermentation-derived tetracyclic macrolides. In: Don R B, Joseph G, James J. Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III. Washington: ACS Publications, 1992.
- [3] Racke Kenneth D, A Reduced Risk Insecticide for Organic Agriculture: Spinosad Case Study, In: Allas S F, Racke K D. Crop Protection Products for Organic Agriculture. Washington: ACS Publications, 2006, 92-108.
- [4] Waldron C, Matsushima P, Rostek P R, et al. Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. Chemistry & Biology, 2001, 8(5): 487-499.
- [5] Waldron C, Madduri K, Crawford K, et al. A cluster of genes for the biosynthesis of spinosyns, novel macrolide insect control agents produced by *Saccharopolyspora spinosa*. Antonie van Leeuwenhoek, 2000, 78(3-4):385-390.
- [6] Matsushima P, Baltz R H. Transformation of *Saccharopolyspora spinosa* protoplasts with plasmid DNA modified in-Vitro to Avoid Host Restriction. Microbiology-Uk, 1994, 140:139-143.
- [7] Matsushima P, Broughton M C, Turner J R, et al. Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*. Effects of Chromosomal Insertions on Macrolide A83543 Production, Gene, 1994, 146(1):39-45.
- [8] MacNeil D J. Introduction of plasmid DNA into *Streptomyces lividans* by electroporation. Fems Microbiology Letters, 1987, 42(2-3):239-244.
- [9] Gong W, Jiang W, Yang Y, et al. Improvement of transformation and electroduction in avermectin high-producer. Streptomyces Avermitilis, Folia Microbiol (Praha), 2004, 49(4):399-405.
- [10] Fitzgerald N B, English R S, Lampel J S, et al. Sonication-dependent electroporation of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea*. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(4):1580-1583.
- [11] Mazy-Servais C, Baczowski D, Dusart J. Electroporation of intact cells of *Streptomyces parvulus* and *Streptomyces vinaceus*. Fems Microbiology Letters, 1997, 151(2):135-138.

[12]

Pigac J, Schrempf H. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other streptomycetes by electroporation. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(1):352-356.

[13]

Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces spp.* Gene, 1992, 116(1):43-49.

[14]

Shima J, Hesketh A, Okamoto S, et al. Induction of actinorhodin production by rpsL (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3 (2). J Bacteriol, 1996, 178 (24): 7276-7284.

[15]

Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

[16]

Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. Practical streptomyces genetics, norwich: John Innes Foundation, 2000.

Study on the Conditions of Electrotransformation in *Saccharopolyspora spinosa*

ZHANG Qiu-xue^{1,2} LAN Zhou² WANG Yang² WANG Chang-lu¹ SONG Yuan³ ZHANG Xiao-lin²

(1College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(2Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037, China)

(3College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract *Saccharopolyspora spinosa* CB11was used as the recipient strain . Optimal conditions including growth stage of the strain , electroshock voltage ,DNA concentration were investigated for the electrotransformation of CB11 with *Escherichia coli*-Streptomyces shuttle vector pSET152. It was showed that the highest electroporation efficiency was yielded under the cluture age of 48h, electric field strength of 12kV/cm and minimum DNA concentration needed 0.1μg . Plasmid stability experiment and PCR of *acc(3)IV* gene showed that pSET152 was successfully electroporated into and could stably exist in the *Saccharopolyspora spinosa* CB11. This protocol would be useful for genetic studies of *S. spinosa*.

Key words *Saccharopolyspora spinosa* Electroporation Plasmid pSET152