

庆大霉素生物合成基因 *genD2* 的研究

阙新桥, 陈泽斌, 洪文荣*

(福州大学生物科学与工程学院, 福州 350108)

摘要 以绛红小单孢菌 G1008 基因组为模板, PCR 扩增 *genD2* 的上下游序列作为同源交换臂, 在温敏型穿梭质粒 pKC1139 的基础上, 构建同源重组质粒 pDB303; 通过接合转移, 将质粒 pDB303 导入绛红小单孢菌 G1008, 经影印筛选得到一株 *genD2* 框内缺失的工程菌 GD238。发酵并提取代谢产物, 质谱分析表明, 工程菌 GD238 只积累庆大霉素 A2 和 A2e, 证明 *genD2* 参与了庆大霉素加洛糖胺上 C-3"位氮甲基化, 可能是编码脱氢酶基因。

关键词 庆大霉素 A2; *genD2* 基因; 生物合成; 绛红小单孢菌

中图分类号 R914; TQ 465 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)02-0237-05

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20140219

Research on *genD2* in gentamicin biosynthesis gene cluster

QUE Xinqiao, CHEN Zebin, HONG Wenrong*

College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China

Abstract In order to verify the function of *genD2*, a recombinant plasmid pDB303 derived from pKC1139 was constructed for blocking-up *genD2*. pDB303 was introduced into *Micromonospora purpurea* G1008 by conjugation. A desired mutant strain GD238 was obtained by PCR analysis. Antibiotics were isolated from the fermentation broth of GD238, the parent strain G1008 as the control. The result of mass spectral analysis indicated that the mutant strain GD238 only produce gentamicinA2 and A2e instead of gentamicinC complex, and that *genD2* might be responsible for dehydrogenation at C-3" of garosamine.

Key words gentamicinA2; *genD2*; biosynthesis; *Micromonospora purpurea*

This study was supported by China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2012ZX09201101-008) and the National Natural Science Foundation of China (No. 31070093)

庆大霉素是由绛红小单孢菌和棘孢小单孢菌所产生的一类重要氨基糖苷类抗菌药物, 对革兰阳性和阴性菌都有很强的杀灭作用, 主要作用于细菌核糖体亚基的 16S rRNA, 抑制蛋白质的合成^[1-2]。然而, 由于其存在耳肾毒性, 加上耐药菌的出现, 使得庆大霉素在临床使用上受到限制; 想解决此类缺陷问题, 其有效的方法是对现有天然氨基糖苷类抗生素进行化学改造, 获得半合成的氨基糖苷类衍生物, 或筛选新型高效低毒的药物^[3]。如西索米星的衍生物 ACHN-490, 对临床上含有氨基糖苷类钝化酶的病原菌依然有抗菌活性^[4]。Nepal 等^[5]将大观霉素和卡那霉素生物合成基因有效地组合在

一起, 在委内瑞拉链霉菌 Y1003 中实现了异源表达, 获得了新氨基糖苷类抗生素氧卡那霉素 C。因此, 在生物合成机制明确的基础上, 进行组合生物合成是行之有效的途径, 阐明氨基糖苷类抗生素生物合成基因簇中各个基因的功能, 具有重要的生物学意义和现实意义。

氨基糖苷类抗生素生物合成基因的研究始于 20 世纪 80 年代, 1987 年链霉素的部分生物合成基因簇得到确认^[6]。随后, 以其抗性基因和 2DOI(2-脱氧蟹肌醇)合成酶基因为探针, 陆续构建了丁酰苷菌素、新霉素、卡那霉素等生物合成基因簇。2004 年, Unwin 等^[7]公布了棘孢小单孢

* 收稿日期 2013-12-29 * 通信作者 Tel: 13705046451 E-mail: hongwr56@163.com

基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (No. 2012ZX09201101-008); 国家自然科学基金资助项目 (No. 31070093)

菌中庆大霉素的生物合成基因簇 (Genbank: AJ524043), 对其中各个基因进行了基本的阐述; 2006 年, Piepersberg 等^[8] 公布了棘孢小单孢菌中更为完整的庆大霉素生物合成基因簇 (GenBank: AJ628149), 并预测了其中各个基因的功能。Kudo 等^[9] 借助生物信息学技术, 从理论上, 分析了庆大霉素生物合成过程, 推测基因 *genD2*, *genS2* 与加洛糖胺修饰有关, 即负责催化庆大霉素 A2 转变成庆大霉素 A。

本研究借助成功建立起的小单孢菌接合转移体系^[10], 突破了小单孢菌壁厚难以进行基因组改造的难关, 在阐明 *gntK* 基因功能的基础上^[11], 利用微生物分子遗传学技术, 进一步研究 *genD2* 的功能。通过敲除 *genD2* 基因, 分析是否积累庆大霉素 A2, 推测基因 *genD2* 的功能, 以及获得产庆大霉素 A2 工程菌, 为开发庆大霉素 A2 等系列药物奠定基础, 为阐明庆大霉素代谢机制提供科学依据。

1 材 料

1.1 菌株与质粒

庆大霉素产生菌绛红小单孢菌 G1008, 大肠杆菌 *E. coli* top10 以及大肠杆菌 *E. coli* ET12567 (pUZ8002) 均为本实验室保藏。大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pKC1139 (*aac*(3)IV, *oriT*) 为本实验室保藏。克隆载体 pMD19-T 购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 培养基与抗生素

绛红小单孢菌 G1008 固体培养基, 种子培养基, 发酵培养基以及预萌发培养基均参照文献叙述^[10]。绛红小单孢菌 G1008 菌丝体生长培养基和大肠杆菌生长培养基分别为 YEME 培养基^[12] 和 LB 培养基。

本研究中使用的抗生素及其终浓度分别为: 庆大霉素 100 μg/mL、安普霉素 50 U/mL、氯霉素 25 μg/mL、卡那霉素 50 U/mL、萘啶酸 25 μg/mL。

1.3 主要试剂

限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 溶菌酶、RNase A 酶、Proteinase K 和 DNA 凝胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司; 其他化学试剂均为国产分析纯或色谱纯。

2 方 法

2.1 引物设计

以 GenBank 公布的庆大霉素生物合成基因簇 (登记号: AJ628149) 为模板, 根据 *genD2* 的上下游序列为同源交换臂设计两对引物: pD1/pD2, pD3/pD4 分别用于扩增上游交换臂 DB1 和下游交换臂 DB2。根据同源重组原理设计一对筛选与鉴定突变株引物: pD5/pD6。同源重组模型及 pD5/pD6 位置如图 3。以质粒 pKC1139 质粒为模板, 设计安普霉素抗性基因筛选引物: pD7/pD8。本文所用的引物序列及限制酶见表 1。

Table 1 Primers used in this work

Primer	Sequence	Restriction enzyme
pD1	5'-GAATTC GTGCCTGTCGGAGTCCAG-3'	<i>Eco</i> RI
pD2	5'-AAGCTT CTTGACCGTGTCTGCAGCC-3'	<i>Hind</i> Ⅲ
pD3	5'-AAGCTT TTCCGTTCTGAAGCGCAGCC-3'	<i>Hind</i> Ⅲ
pD4	5'-TCTAGA AACGGCTCGGTGAAGTCTGTG-3'	<i>Xba</i> I
pD5	5'-TTCGAGTTGGTGTCTCCGGTCTCG-3'	
pD6	5'-CCTGTGTCACGTATCCGCTGTT-3'	
pD7	5'-CATTCTTCGCATCCCGCCTCTG-3'	
pD8	5'-TCAGCGGTGGAGTGCAATGTCTCG-3'	

2.2 分子克隆

PCR、酶切、酶连、大肠杆菌感受态细胞制备及转化、小量质粒 DNA 提取等分子克隆方法参照分子《克隆实验手册》^[13]。绛红小单孢菌基因组提取参照《链霉菌遗传操作手册》^[12]。DNA 测序由金斯瑞公司完成。

2.3 接合转移

绛红小单孢菌与大肠杆菌间接合转移方法参考文献^[10]。

2.4 发酵、产物提取及组分分析

小单孢菌摇瓶发酵工艺参照 Kumar 等所述^[1], 代谢产物提取参照严凌斌等^[10]所述, 生物效价测定参照《中华人民共和国药典》(2010 版)^[14], 产物组分分析采用质谱技术。

2.5 绛红小单孢菌生长代谢测定方法

湿菌浓度测定, 取发酵液体积 V_1 10 mL, 4 000 r/min 离心 10 min, 得到上清液体积 V_2 ; 湿菌浓度为 (发酵液体积 V_1 - 上清液体积 V_2) / 发酵液体积, 即菌丝体沉淀占总体积的百分比。总糖采用工业化常规分析方法^[15]。

3 结 果

3.1 重组质粒 pDB303 的构建

首先以绛红小单孢菌 G1008 基因组为模板,采用 pD1/pD2 扩增上游同源交换臂 DB1,理论长度为 2 021 bp;pD3/pD4 扩增下游同源交换臂 DB2,理论长度为 2 025 bp,分别克隆至 pMD-19T 上得到中间质粒 pDB301 和 pDB302,经酶切验证正确。质粒 pDB301 经 *Hind* III/*Eco*R I 双酶切,回收 DB1 片段;质粒 pDB302 经 *Hind* III/*Xba* I 双酶切,回收 DB2 片段;pKC1139 经(*Eco*R I/*Xba* I)双酶切,回收 6 477 bp 片段;载体片段和上下游交换臂 3 个片段一起酶连转化得到同源重组质粒 pDB303。根据质粒图谱(图 1),用 *Hind* III 单酶切重组质粒 pDB303,可得到 8 483 bp 和 2 052 bp 两个片段;经(*Eco*R I/*Xba* I)双酶切则可以得到 6 477 bp 和 4 058 bp 两个片段,其酶切验证电泳如图 2 所示,结果与理论预测相符,并经测序证明得到目的质粒正确,可用于后续的接合转移。

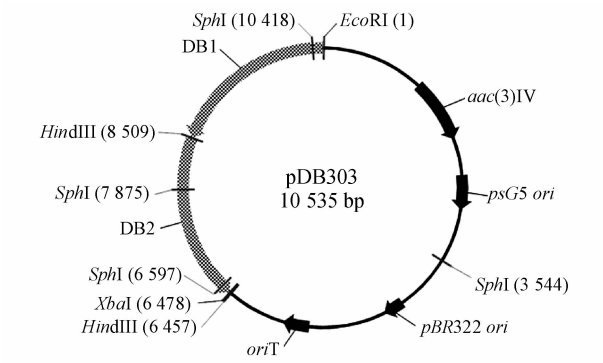


Figure 1 Physical map of plasmid pDB303

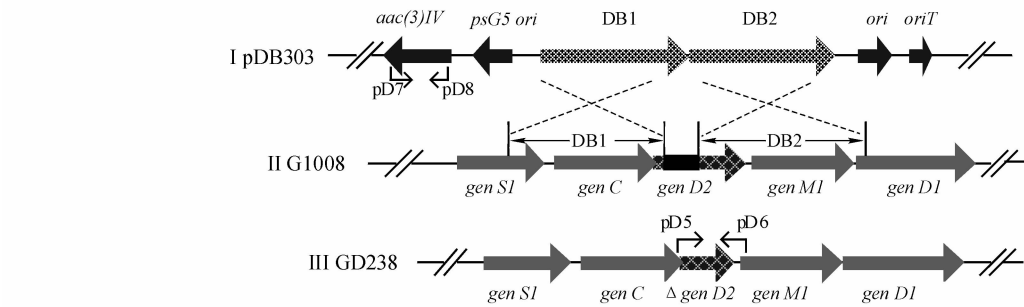


Figure 3 Sketch map of homologous recombination

为进一步验证单交换菌株的正确性,根据同源重组原理(图 3),设计目的突变菌筛选引物 pD5/pD6 和安普霉素抗性基因引物 pD7/pD8。以 GD1

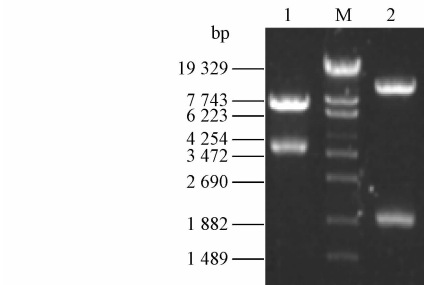


Figure 2 Restriction analysis of pDB303
M:λ-EcoT14 I digest DNA Marker;1:pDB303/(*Eco*R I/*Xba* I);2:pDB303/*Hind* III

3.2 *genD2* 阻断突变株的筛选与验证

同源重组质粒 pDB303 转化至大肠杆菌 ET12567(pUZ8002),得到接合转移供体菌 ET12567(pUZ8002,pDB303)。然后,采用接合转移的方法,将供体菌中的同源重组质粒 pDB303 导入到绛红小单孢菌 G1008 中。供体菌与受体菌按数量比 $1 \times 10^8:1 \times 10^8$ 混合,在固体培养基上 37 ℃ 条件下培养 20 h,覆盖终浓度为 50 U/mL 的安普霉素和 25 μg/mL 的萘啶酸,继续培养 6 d,待接合子长出。由于质粒 pDB303 携带的链霉菌复制起始位点为温敏型 *psG5 ori*,只有在温度低于 34 ℃ 时才能在绛红小单孢菌 G1008 中自主复制,因此在 37 ℃ 条件下,只有质粒 pDB303 整合到 G1008 中才能表达其抗性基因,所以在安普霉素和萘啶酸两种抗生素选择下,在固体平板上长出的接合子即为单交换菌株,挑取其中一株,命名为绛红小单孢菌 GD1。

带;而 pD7/pD8 将扩增到长为 770 bp 的安普霉素抗性基因片段,电泳检测结果如图 4 所示,与理论相符,证明质粒 pDB303 已经整合至绛红小单孢菌 G1008 的基因组上。

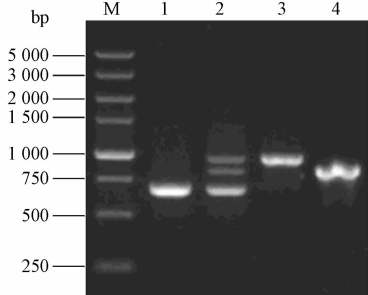


Figure 4 PCR verification of mutant strains
M: DL5000 marker; 1: GD238/(pD5/pD6); 2: GD1/(pD5/pD6); 3: G1008/(pD5/pD6); 4: GD1/(pD7/pD8)

单交换菌株由于其基因组上存在重复序列,不稳定,容易发生第 2 次重组,产生回复突变或者是 *genD2* 框内缺失菌株(即目标突变菌)。因此, GD1 在种子培养基中松弛培养 3 代后,开始对每一代进行分离单菌落,直至 20 代。单菌落影印至添加安普霉素的抗性平板和不添加抗生素的普通平板上,培养后筛选得到 6 株在抗性板上不长的安普霉素敏感菌株,这些菌株可能是 *genD2* 缺失菌株或者是回复突变菌株,为得到 *genD2* 缺失突变菌,因此提取这 6 株菌的基因组,进一步 PCR 验证筛选,筛选到一株目的突变菌,命名为 GD238,以其基因组为模板,引物 pD5/pD6 进行 PCR 扩增得到了 600 bp 左右的片段,电泳验证如图 4,经测序和相似度比对,结果证明了 GD238 为基因 *genD2* 框内缺失菌株。

3.3 工程菌生长状态考察

工程菌 GD238 经斜面培养基连续培养 5 代,与出发菌株 G1008 相比,其菌落形态、菌丝体生长、生长周期没有明显的改变,说明 *genD2* 的敲除对菌株的表型没有明显的影响,遗传性状稳定。

按照“2.5”项下方法,将工程菌 GD238 和亲株 G1008 分别接种发酵 1 L,每 12 小时各取 1 次,测定湿菌浓度和总糖,直到发酵完成,约 120 h,其中 0 h 为空白对照。绘制菌株生长曲线和总糖消耗曲线,结果如图 5 所示。工程菌 GD238 与亲株 G1008 的生长趋势相近,前 36 h 为调整期,36 至 60 h 为快速生长期,60 至 108 h 为稳定期,之后开始衰退。因此,基因 *genD2* 的缺失对菌株生长代谢没有明显的影响。

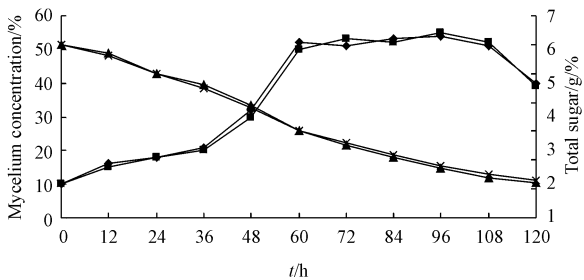


Figure 5 Growth and metabolism curve of engineering bacteria GD238 and parent strain G1008
Total sugar: —▲—GD238; —×—G1008;
Mycelium concentration: —□—GD238; —●—G1008

3.4 GD238 工程菌代谢产物提取和组分分析

绛红小单孢菌 G1008 和 GD238 工程菌同时按照“2.4”项的方法进行摇瓶发酵,代谢产物提取,得到代谢产物浓缩液,并进行质谱分析,结果如图 6。

质谱分析结果显示,亲株 G1008 主要存在 3 个离子峰,*m/z* 450 对应 C1a,*m/z* 464 对应 C2a、C2b 和 C2,478 *m/z* 对应 C1。工程菌则主要存在 *m/z* 456 和 *m/z* 470 两个离子峰,456 为庆大霉素 A2 的相对分子质量,而 470 为 Kim 等^[16]推测的庆大霉素 A2 的衍生物 A2e。以上结果表明 *genD2* 的缺失阻断了绛红小单孢菌中庆大霉素的生物合成代谢流,工程菌 GD238 不再产生庆大霉素复合物,只积累了庆大霉素 A2 和 A2e。

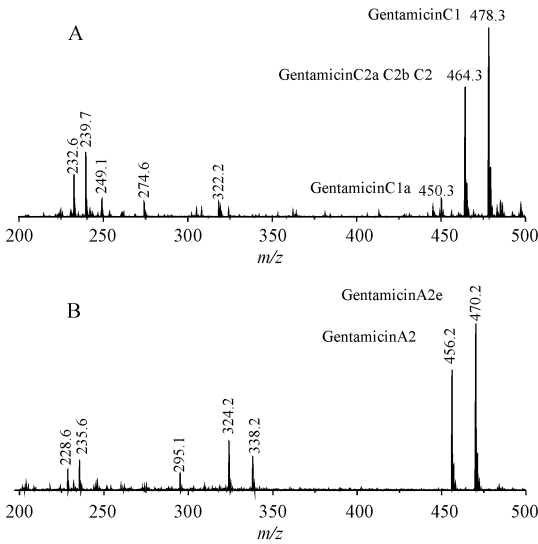


Figure 6 MS analysis of metabolites from *M. purpurea* G1008 (A) and GD238 (B)

4 讨论

通过阻断绛红小单孢菌 G1008 中 *genD2*,得到

工程菌 GD238,通过质谱技术分析其代谢产物主要积累庆大霉素 A2 和 A2e,证明了 *genD2* 参与加洛糖胺 C-3"位的修饰作用;本实验组在 *gntK* 失活的绛红小单孢菌 GK1101 基础上,阻断了 *genS2* 的表达,结果代谢产物只积累了庆大霉素 A2 (待发表)。从这些结果分析推测,A2e 的存在进一步证明了 Kim 等^[16]对甲基转移酶 GntK 专一性不高的解释。利用 swiss-mode 进行结构域分析,GenD2 在 C 端和 N 端都含有氧化还原功能域,与 NADH 依赖的脱氢酶同属一个蛋白质家族;而 GenS2 存在氨基转移结构域;Kim 等分析 GntE 序列上存在甲基转移酶相关的钴胺素结合结构域和极性 S-腺苷蛋氨酸结构域,并通过灭活 *gntE* (*genD1*) 基因,得到了产庆大霉素 A2 和 A2e 的突变菌。因此,说明脱氢酶 GenD2、转氨酶 GenS2 及甲基转移酶 GenD1 可能共同负责加洛糖胺 C-3"位的氨甲基化修饰作用,生成庆大霉素 A。

依据推测的庆大霉素生物合成途径,巴龙霉素 C-6 位上经糖基转移酶 GenM2 催化,连接一个木糖生成庆大霉素 A2,再经过 C-3"位的脱氢、转胺及甲基转移生成庆大霉素 A。然而分别阻断了 *genD2*、*genS2*、*genD1* 的绛红小单孢菌突变菌,其代谢产物都积累庆大霉素 A2,并未产生其他的中间产物。在卡那霉素的生物合成过程中,*genD2*-*genS2* 的同源基因 *kanD2*-*kanS2* 主要负责催化 UDP-葡萄糖转化成 UDP-葡萄糖胺^[17-18],因此,可以作出这样的假设,在庆大霉素生物合成过程,*genD2*-*genS2*-*genD1* 先催化 D-木糖甲氨基化,再经糖基转移酶连接到巴龙霉素,而不直接催化庆大霉素 A2 转变成庆大霉素 A;同时,木糖也可以经糖基转移酶直接连接到巴龙霉素,形成庆大霉素 A,但效率低于前者。

本研究证明了 *genD2* 参与庆大霉素 C-3"位的修饰作用,可能为编码脱氢酶基因,同时构建了产庆大霉素 A2 和 A2e 的工程菌 GD238,后续可以考虑在 GD238 的基础上,阻断甲基转移酶基因 *gntK*,有望获得单组份庆大霉素 A2 突变菌。

参考文献

- [1] Kumar C, Himabindu M, Jetty A. Microbial biosynthesis and applications of gentamicin: a critical appraisal [J]. *Crit Rev Biotech*, 2008, **28**(3): 173 - 212.
- [2] Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD. Structural origins of gentamicin antibiotic action [J]. *EMBO J*, 1998, **17** (22): 6 437 - 6 448.
- [3] Dozzo P, Moser HE. New aminoglycoside antibiotics [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2010, **20**(10): 1 321 - 1 341.
- [4] Endimiani A, Hujer KM, Hujer A M, et al. ACHN-490, a neoglycoside with potent *in vitro* activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, **53**(10): 4 504 - 4 507.
- [5] Nepal KK, Yoo JC, Sohng JK. Biosynthetic approach for the production of new aminoglycoside derivative [J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, **110**(1): 109 - 112.
- [6] Distler J, Braun C, Ebert A, et al. Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: analysis of a central region including the major resistance gene [J]. *Mol Gen Genet*, 1987, **208**(1/2): 204 - 210.
- [7] Unwin J, Standage S, Alexander D, et al. Gene cluster in *Micromonospora echinospora* ATCC15835 for the biosynthesis of the gentamicin C complex [J]. *J. Antibiot*, 2004, **57**(7): 436 - 445.
- [8] GenBank Database. *micromonospora echinospora* genomic region of the gentamicin biosynthesis gene cluster, strain DSM 43036 [EB/OL]. (2004-11-15), [2013-12-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/85813995>.
- [9] Kudo F, Eguchi T. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics [J]. *J Antibiot*, 2009, **62**(9): 471 - 481.
- [10] Yan LB, Hong WR, Fang Z, et al. Construction of the conjugal transfer system for *Micromonospora purpurea* G1008 [J]. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2011, **12**, **36**(12): 899 - 904.
- [11] Hong W, Yan L. Identification of *gntK*, a gene required for the methylation of purpurosamine C-6' in gentamicin biosynthesis [J]. *J Genappl Microbiol*, 2011, **58**(5): 349 - 356.
- [12] Kieser T, Bibb MJ, Mark J, et al. *Practical Streptomyces Genetics* [M]. Norwich, England: The John Innes Foundation, 2000: 162 - 170.
- [13] Sambrook JF, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 27 - 99.
- [14] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia: part 2* (中华人民共和国药典: 二部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 附录 93 - 98.
- [15] Chen J, Xu L. *Industrial analysis of antibiotics* (抗生素工业分析) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 1997: 108 - 111.
- [16] Kim JY, Suh JW, Kang SH, et al. Gene inactivation study of *gntE* reveals its role in the first step of pseudotrisaccharide modifications in gentamicin biosynthesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **372**(4): 730 - 734.
- [17] Park JW, Park SR, Nepal KK, et al. Discovery of parallel pathways of kanamycin biosynthesis allows antibiotic manipulation [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, **7**(11): 843 - 852.
- [18] Park SR, Park JW, Ban YH, et al. 2-Deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics: recent advances in the characterization and manipulation of their biosynthetic pathways [J]. *Nat Prod Rep*, 2013, **30**(1): 11 - 20.