

糖基转移酶编码基因 *snogE* 中断对诺加霉素生物合成的影响

石焯雯^{1,2}, 李梦茜^{1,2}, 李航³, 李继安², 陈代杰², 邵雷^{2*}

(¹上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234; ²中国医药工业研究总院上海医药工业研究院
创新药物与制药工艺国家重点实验室, 上海 200040; ³雅本化学股份有限公司, 苏州 215433)

摘要 为了考察基因 *snogE* 中断对诺加霉素生物合成的影响, 比对多种糖基转移酶的氨基酸序列, 并克隆与已知蒽环类抗生素糖基转移酶序列同源性最高的 *snogE* 编码基因片段, 构建基因中断质粒 pSXW-2-62。利用接合转移的方法将其转入产诺加霉素的胡桃链霉菌中并发生同源重组, 得到重组菌株 mSXW-2-71, 验证突变株基因型与发酵产物。结果表明, 基因中断质粒以正确方式整合入基因组, 中断了 *snogE* 基因; 在突变株发酵产物中无法检测到诺加霉素产生。*snogE* 基因编码的糖基转移酶在诺加霉素的生物合成途径中是必需的。

关键词 诺加霉素; 糖基转移酶; 基因中断; 同源重组

中图分类号 Q815 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)05-0460-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130515

Effect of gene disruption of *snogE* encoding glycosyltransferase on nogalamycin biosynthesis

SHI Xuanwen^{1,2}, LI Mengxi^{1,2}, LI Hang³, LI Ji'an², CHEN Daijie², SHAO Lei^{2*}

¹College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234; ²State Key Laboratory of New Drug & Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040; ³ABA Chemicals Corporation, Suzhou 215433, China

Abstract This study investigated the influence of *snogE* disruption in biosynthesis pathway of nogalamycin. According to the sequence alignment of several glycosyltransferases, we cloned the fragment of *snogE* gene sharing the highest homology with the published anthracycline antibiotics glycosyltransferase sequence. The gene disruption plasmid pSXW-2-62 was constructed and transferred into *Streptomyces nogalater* ATCC27451 by conjugation. Finally, we got the recombinant strain mSXW-2-71 by homologous recombination. The genotype and fermentation product of mSXW-2-71 were identified. As a result, the gene disruption plasmid was integrated into the genome and interrupted *snogE* gene successfully. Nogalamycin could not be detected in fermentation broth. The *snogE* encoding glycosyltransferase is necessary in nogalamycin biosynthesis pathway.

Key words nogalamycin; glycosyltransferase; gene disruption; homologous recombination

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81172962); and China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2012ZX9301002003)

诺加霉素(nogalamycin)是于1965年发现的由黑胡桃链霉菌(*Streptomyces nogalater*) ATCC27451产生的重要蒽环类抗生素^[1-2], 其结构与临床抗肿瘤抗生素柔红霉素、表阿霉素、阿克拉霉素和阿霉素结构非常相似, 都是由一个高度相似的四环蒽醌

结构和相应的糖基配体构成。诺加霉素对多种肿瘤细胞具有强抑制活性^[3-5]。

涉及诺加霉素生物合成途径的部分基因簇已被报道^[6], 其中3个酶基因(*snogD*、*snogE*和*snogZ*分别编码SnogD、SnogE和SnogZ蛋白)与糖基转移

* 收稿日期 2013-03-26 * 通信作者 Tel:021-62479808-706 E-mail:shaolei00@gmail.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81172962); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 2012ZX9301002003)

酶的序列同源性较高,可能涉及到诺加霉素两个糖苷键的形成^[7]。而目前尚未见文献报道使用基因失活手段研究在诺加霉素产生菌的体系中究竟是哪两个酶催化了诺加霉素两个糖苷键的形成。本研究首先对比了诺加霉素、柔红霉素、阿克拉霉素等萜环类抗生素和万古霉素、雷莫拉宁等糖肽类抗生素的生物合成途径中涉及的糖基转移酶的同源性,找出与已知其他萜环类抗生素生物合成糖基转移酶同源性最接近的酶基因,并通过同源重组的方法中断目的基因,筛选得到基因失活突变株,考察基因失活对诺加霉素产生的影响。

1 材料

1.1 菌种与质粒

诺加霉素产生菌 *Streptomyces nogalater* ATCC27451,接合转移用大肠杆菌 *E. coli* ET12567 (pUZ8002)^[8],克隆质粒 pSP72、温敏型质粒 pKC1139^[9]均由本实验室保存。

1.2 培养基

大肠杆菌培养用 LB 培养基;黑胡桃链霉菌菌丝培养用 TSB 培养基(美国 Sigma 公司):高氏一号培养基(黑胡桃链霉菌固体培养用)和 MS 培养基配方(接合转移用)见文献[10],蒸馏水定容至 1 L,调 pH 至 7.0;诺加霉素种子培养基与发酵培养基配方参见文献[11]。

1.3 试剂

限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶和 Primer star 高保真 DNA 聚合酶等分子生物学试剂[宝生物工程(大连)有限公司];抗生素(安普霉素、卡那霉素、氯霉素、萘啶酮酸)及其他生化试剂(上海鼎国生物公司);化学试剂均为国产分析纯。诺加霉素标准品由本实验室保存。PCR 引物合成和质粒测序由 Invitrogen 公司完成。

2 方法

2.1 糖基转移酶氨基酸序列的比对分析

使用在线软件 Biology workbench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu/>) 比对诺加霉素生物合成基因编码酶氨基酸序列(SnogD、SnogE、SnogZ),柔红霉素糖基转移酶基因编码酶序列(DnrH、DnrS),阿克拉霉素糖基转移酶基因编码酶序列(AknS),万古霉素糖基转移酶基因编码酶序列(GtFE、GtFZ),和雷莫拉宁糖基转移酶编码酶序列(ORF29)。比较

SnogD、SnogE、SnogZ 与已知萜环类抗生素生物合成糖基转移酶同源性。

2.2 *snogE* 基因同源重组片段的扩增

根据 NCBI 相关数据(GenBank AF187532),在 *snogE* 基因内部设计同源重组片段扩增引物。上游引物 P1:5'-AAA AAGCTT GCTCG ACGAT GCGGA AGT -3'(含 *Hind* III 酶切位点);下游引物 P2:5'-AAA GAATTC CCTCA AAGGG CACAA CACG -3'(含 *Eco*R I 酶切位点)。提取 *S. nogalater* ATCC27451 的基因组 DNA 作为 PCR 反应的模板,以引物 P1/P2 和 Primer star DNA 高保真聚合酶扩增同源重组片段。PCR 反应程序:94 °C 预变性 5 min,98 °C 变性 10 s,60 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 90 s,30 个循环。PCR 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.3 *snogE* 基因同源重组中断质粒的构建

将 PCR 产物切胶回收后,使用 *Hind* III/*Eco*R I 双酶切,并连入同样双酶切的 pSP72 质粒片段,得到含 *snogE* 同源重组片段的重组质粒 pSXW-2-56,并将该质粒送公司测序。使用 *Hind* III/*Eco*R I 将 *snogE* 同源重组片段自质粒 pSXW-2-56 切出,连入同样双酶切的 pKC1139 质粒片段,构建得到基因中断质粒 pSXW-2-62,构建过程见图 1。使用 *Hind* III/*Eco*R I 酶切验证质粒 pSXW-2-62。

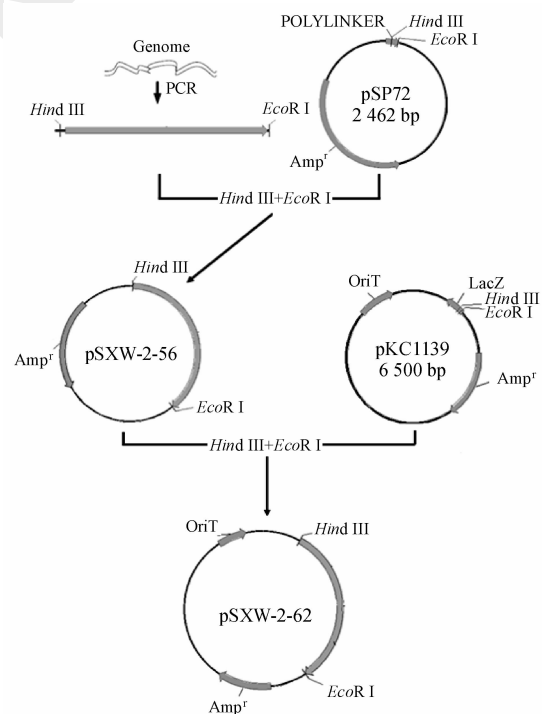


Figure 1 Construction of the plasmid pSXW-2-62 for *snogE* gene inactivation

2.4 *snogE* 基因中断突变株的获得及验证

将基因中断质粒 pSXW-2-62 转化入 *E. coli* ET12567 (pUZ8002), 得到的转化子 *E. coli* ET12567 (pUZ8002/pSXW-2-62) 作为接合转移供体菌。将黑胡桃链霉菌 *S. nogalater* ATCC27451 作为受体菌, 按文献方法做接合转移实验^[12-13]。5 d 后从 MS 培养平板上挑取阳性接合子, 接种 TSB 液体培养基 (含安普霉素 50 μg/mL)。28 °C 振荡培养 2 d 后, 取菌液 5 μL 混匀涂布于高氏一号培养基平板 (含安普霉素 50 μg/mL), 置于 37 °C 恒温培养, 使其发生同源重组单交换。4 d 后挑取生长良好的阳性单交换接合子, 接种 TSB 液体培养基 (含安普霉素 50 μg/mL) 培养, 作为初步筛选的 *snogE* 基因中断突变株。提取上述基因中断突变株的总 DNA 作为模板, 分别使用 P3 (5'-TGCGG CACCC CGTAC A-3')/P4 (RV-M 通用引物); P5 (5'-CGGCA GCGAC ATCCT C-3')/P6 (M13-47 通用引物) 扩增同源重组整合片段, 验证突变株基因型。PCR 扩增条件: *Taq* DNA 聚合酶, 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 45 s, 62 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 70 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

2.5 *snogE* 基因中断突变株的发酵培养和产物检测

将产诺加霉素链霉菌野生型与突变株分别接种于种子培养基 (突变株培养基含安普霉素 50 μg/mL, 下同) 100 mL 中, 28 °C, 250 r/min 振荡培养 2 d。将种子培养液 10% 接种于发酵培养基 100 mL 中, 28 °C, 250 r/min 振荡培养 5 d。使用饱和草酸调发酵液至 pH 5.0, 静置 1 h。取发酵液 4 mL, 加入等体积甲醇, 混匀浸泡 6 h 以上, 12 000 r/min 离心后, 取上清液用于 HPLC 检测^[13]。HPLC 条件: Waters 1525-2998-2707 高压液相分析系统, 色谱柱为 Hypersil 300A C₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为含 0.01% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液; 流动相 B 为含 0.01% TFA 的乙腈溶液。检测条件为: 0% ~ 25% B, 5 min; 25% ~ 45% B, 13 min; 45% ~ 90% B, 2 min; 90% ~ 25% B, 5 min; 25% B, 5 min。流速为 0.8 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温: 40 °C。

3 结果

3.1 糖基转移酶氨基酸序列的比对

根据 SnogD, SnogE, SnogZ, DnrH, DnrS, AknS, GtfD, GtfE 和 ORF29 的氨基酸序列比对结果构建

有源进化关系树 (图 2)。从进化关系树图可知, 在诺加霉素生物合成基因簇的编码酶中, SnogE 氨基酸序列与其他萜环类的抗生素生物合成途径中的糖基转移酶氨基酸序列同源性最高。而 SnogD 与 SnogZ 则同源性相对较低, GtfD, GtfE 和 ORF29 序列与萜环类抗生素糖基转移酶同源性差别较大。这种氨基酸序列间的差异可能造成糖基转移酶对于底物选择的特异性。本研究首先基因中断同源性最高的 *snogE* 编码基因, 以考察该基因失活对于诺加霉素产生的影响。

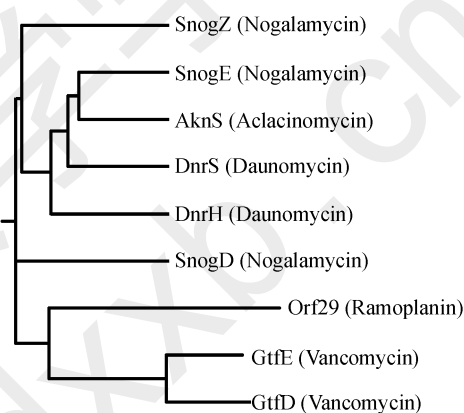


Figure 2 Phylogenetic relationships among SnogE and related enzymes

3.2 *snogE* 基因同源重组片段的克隆及基因中断质粒的构建

以 *S. nogalater* ATCC 27451 的基因组 DNA 为模板, 以 P1/P2 为引物 PCR 扩增, 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带相对分子质量约为 650 bp (图 3, A)。将该片段酶切后连入 pSP72 克隆载体, 得到重组质粒 pSXW-2-56。测序结果表明 pSXW-2-56 所含 *snogE* 基因同源重组片段与预期一致 (GenBank AF187532), 未发生突变。将该片段自 pSXW-2-62 切出, 连入 pKC1139 穿梭质粒, 得到基因中断质粒 pSXW-2-62。使用 *Hind* III/*Eco*R I 双酶切验证该基因中断质粒, 电泳结果显示, 两条酶切产物条带大小约为 6.5 kb 和 0.65 kb, 结果符合预期 (图 3, B)。

3.3 *snogE* 基因中断突变株获得及基因型验证

使用接合转移的方法, 将基因中断质粒 pSXW-2-62 转入 *S. nogalater* ATCC27451, 并使其发生同源重组, 筛选得到 *snogE* 基因中断的阳性突变株 mSXW-2-71。抽提该突变株总 DNA 为模板, 分别用验证引物 P3/P4 和 P5/P6 扩增同源重组整合

片段的两端,验证突变株基因型。PCR 扩增产物条带大小符合预期(图 4-A)。经测序后,结果表明 PCR 产物含有预期的 *snogE* 基因序列和 pKC1139 质粒序列,而以野生型基因组 DNA 为模板的对照组没有扩增到任何片段。这表明质粒 pSXW-2-62 以正确方式插入 *snogE* 基因内部,将其中断(图 4-B)。

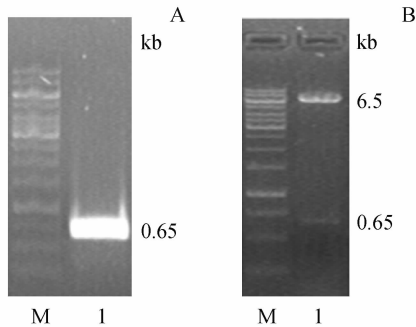


Figure 3 A: Electrophoresis analysis of PCR product (1) and DNA maker (M); B: Enzyme digest assay for pSXW-2-62 verification (1: Digested by *Hind* III and *Eco*R I; M: DNA maker)

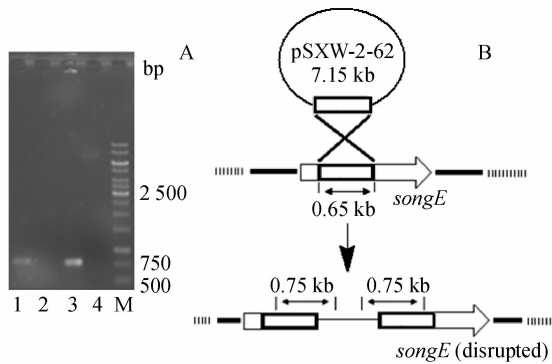


Figure 4 A: PCR assay of *snogE* gene inactivated mutant (1, 3: Total DNA of mSXW-2-71 strain as PCR template; 2, 4: Total DNA of wide type strain as PCR template; 1, 2: using the P3/P4 as primers; 3, 4: using the P5/P6 as primers; M: Maker 1 kb ladder); B: Illustration of single crossover Homologous recombination between plasmid pSXW-2-62 and genome ATCC27451

3.4 *snogE* 基因中断突变株的发酵与产物分析

将产诺加霉素链霉菌野生型与突变株 mSXW-2-71 平行发酵后, HPLC 检测发酵产物。检测结果(图 5)表明, 与野生型菌株相比, *snogE* 基因中断的突变株 mSXW-2-71 发酵产物中检测不到诺加霉素的产生。

4 讨论

抗生素结构中的糖基基因与其活性和不良反应密切相关, 利用基因工程的方法改造抗生素糖基

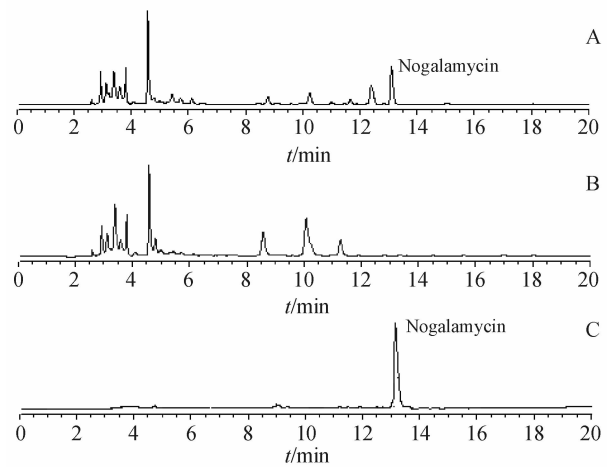


Figure 5 HPLC analysis of fermentation broth for nogalamycin A: Fermentation broth of ATCC27451; B: Fermentation broth of mSXW-2-71; C: Nogalamycin standard

结构是目前抗生素结构改造研究的热点^[14]。本课题组前期利用基因工程的方法, 将发酵单位约为 260 mg/L 的柔红霉素产生菌改造成发酵单位约为 90 mg/L 的表柔红霉素产生菌, 这些结果表明萹环类抗生素生物合成途径中的糖基转移酶可能具有一定的底物宽泛性^[15]。诺加霉素结构中含有两个碳氧糖苷键, 本研究希望在已克隆的诺加霉素生物合成基因中, 寻找并验证负责两次糖基转移过程的催化酶基因, 并在这项研究的过程中, 建立起分子改造诺加霉素产生菌的试验方法。研究表明, *snogE* 基因中断突变株的发酵产物中没有检测到诺加霉素的产生, 也没有发现缺少糖基的诺加霉素中间体。由此认为, *snogE* 基因编码的糖基转移酶是诺加霉素生物合成所必需的两个糖基转移酶之一。而 *snogE* 基因中断突变株 mSXW-2-71 的发酵中没有产生缺少糖基诺加霉素中间体的原因, 可能由于质粒插入中断造成的极性效应对其他基因表达造成了影响。本研究工作为利用基因工程手段改造诺加霉素糖基结构打下基础。

参考文献

- [1] Paul F, Wiley Ronald B, Kelly E, et al. Structure of nogalamycin [J]. *J Am Chem Soc*, 1977, **99**(2): 542 - 549.
- [2] Bhuyan BK, Dietz A. Fermentation, taxonomic, and biological studies on nogalamycin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1965, **5**: 836 - 844.
- [3] Li LH, Kuentzel SL, Murch LL, et al. Comparative biological and biochemical effects of nogalamycin and its analogs on L1210 leu-

- kemia[J]. *Cancer Res*, 1979, **39**(12): 4 816 - 4 822.
- [4] Gao YG, Liaw YC, Robinson H, *et al.* Binding of the antitumour drug nogalamycin and its derivatives to DNA; structural comparison[J]. *Biol Chem*, 1990, **29**(45): 10 307 - 10 316.
- [5] Wiley PF, Johnson JL, Houser DJ. Nogalamycin analogs having improved antitumor activity [J]. *J Antibiot*, 1977, **30**(7): 628 - 629.
- [6] Ylihonko K, Tuikkanen J, Jussila S, *et al.* A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*: sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway[J]. *Mol Gen Genet*, 1996, **251**(2): 113 - 120.
- [7] Siitonen V, Claesson M, Patrikainen P, *et al.* Identification of late-stage glycosylation steps in the biosynthetic pathway of the anthracycline nogalamycin [J]. *ChemBioChem*, 2012, **13**(1): 120 - 128.
- [8] Flett F, Mersinias V, Smith CP. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **155**(2): 223 - 229.
- [9] Bierman M, Logan R, O'Brien K, *et al.* Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces spp* [J]. *Gene*, 1992, **116**(1): 43 - 49.
- [10] Chen YJ, Huang J, Li WP, *et al.* Construction of a high epidaunorubicin-producing strain by gene recombination [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2010, **41**(3): 283 - 288.
- [11] Liu W, Shi XW, Li MX, *et al.* The studies of the flask fermentation condition of *Streptomyces nogalater* producing nogalamycin [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2013, **20**(1): 39 - 43.
- [12] Klymyshin DO, Hromyko OM, Fedorenko VO. Using intergenetic conjugation *Escherichia coli*-*Streptomyces* for transfer of recombinant DNA into *S. nogalater* IMET 43360 strain [J]. *Tsitol Genet*, 2007, **41**(5): 3 - 8.
- [13] Hopood D, Bibb M, Chater K. *Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual* [M]. Norwich: John Innes Foundation, 1985: 125 - 158.
- [14] Cao MC, Zhang BC. Glycosyl synthesis and biofunction of macrolide antibiotics [J]. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2007, **32**(3): 140 - 145.
- [15] Shao L, Huang J, Jing L, *et al.* Overexpression of aveBIV leading to the improvement of 4'-epidaunorubicin production in *Streptomyces coeruleorubidus* strain SIPI-A0707 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **87**(3): 1 057 - 1 064.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2014 年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由国家教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药物生物技术、药理学、药代动力学等学科的原创研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录,被国内权威数据库:《中文核心期刊要目总览》、中国科技论文统计源数据库、中国科学引文数据库等列为药学类核心期刊,屡获国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2008年,《中国药科大学学报》被评为中国精品科技期刊,2006、2008、2010年连续3次被教育部评为中国高校精品科技期刊。据中国知网,中国学术期刊(光盘版)电子杂志社《中国学术期刊影响因子年报(2010版)》公布的最新数据,《中国药科大学学报》复合影响因子为1.171,位居中国药学历学学术期刊第4位。学术影响力极高,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,96页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R	ISSN:1000-5048
国内邮发代号:28-115	定价:30元/期,全年180元
地址:南京童家巷24号	邮政编码:210009
电话:025-83271566/562	传真:025-83271279
E-mail:xuebao@cpu.edu.cn	http://www.zgykdxxb.cn