DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2010.03.006
河南农业科学

玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 *nsdA*$_{mgh}$ 基因的验证

沈凤英[1,2]，吴伟刚[2]，冀红柳[1]，李亚宁[1*]，刘大群[1*]
（1.河北农业大学 植物保护学院，河北省植物病虫害生物防治工程技术研究中心，河北 保定 071001；
2.河北北方学院，河北 张家口 075000）

摘要：玫瑰黄链霉菌（*Streptomyces roseoflavus*）Men-myco-93-63 是分离自马铃薯疮痂病自然衰退土壤中的一株拮抗菌。该菌株及其发酵液对棉花黄萎病菌（*Verticillium dahliae*）等多种重要的植物病原真菌都具有较强的抑制作用。*nsdA*（negative regulator of *Streptomyces* differentiation）基因是从天蓝色链霉菌中发现的与抗生素合成相关的负调控基因。根据天蓝色链霉菌 A3(2)的序列设计引物，PCR 扩增出 Men-myco-93-63*nsdA*$_{mgh}$ 基因，经斑点杂交法验证，*nsdA*$_{mgh}$ 确实在该生防菌中存在。该基因的发现有助于进一步了解该生防菌产生抗生素调节的分子机制，也为抗生素高产菌株的获得提供了新的靶标。

关键词：玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63；*nsdA* 基因；斑点杂交；核酸探针
中图分类号：S476　　文献标识码：A　　文章编号：1004-3268(2010)03-0059-04

The Validation of *nsdA*$_{mgh}$ Gene in *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63

SHEN Feng-ying[1,2], WU Wei-gang[2], JI Hong-liu[1], LI Ya-ning[1*], LIU Da-qun[1*]
(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei; Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China; 2. North University of Hebei, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: *S. roseoflavus* Men-myco-93-63 is an antagonistic strain isolated from potato scab disease induced naturally decaying soil. The strain and its fermentation fluid can effectively inhibit many pathogenic plant fungi, such as *V. dahliae*, thereby control the corresponding plant diseases. *nsdA* (negative regulator of *Streptomyces* differentiation) is a globally negative regulator gene first found in *S. coelicolor*. *nsdA*$_{mgh}$ gene of Men-myco-93-63 amplified by PCR using the primer sequences designed for *S. coelicolor* A3(2) was verified by dot-blot hybridization in this study. The detection of *nsdA*$_{mgh}$ gene will contribute to the understanding of antibiotic regulation mechanism and provide a new way to obtain high-yield antibiotic producing strain of *S. roseoflavus* Men-myco-93-63.

Key words: *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63; *nsdA* gene; Dot-blot hybridization; Nucleicacid probe

收稿日期：2009-11-16
基金项目：国家自然科学基金项目（30800734）；国家高技术研究与发展计划（863）（2006AA10A211）；河北省自然科学基金项目（C200900598）
作者简介：沈凤英（1981-），女，河北衡水人，助教，硕士，主要从事植物病害生物防治研究。
*通讯作者：李亚宁（1974-），女，河北石家庄人，副教授，博士，主要从事植物病害生物防治和分子植物病理学研究。
E-mail：yaning22@yahoo.com.cn
刘大群（1958-），男，河北石家庄人，教授，博士，主要从事植物病害生物防治和分子植物病理学研究。
E-mail：ldq@mail.hebau.edu.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 是从马铃薯疮痂病自然衰退土壤中分离得到的 1 株生防链霉菌[1,2]，室内和田间试验表明，该菌株及其发酵液对棉花黄萎病菌、瓜类白粉病菌、番茄灰霉病菌等多种重要的植物病原菌具有很强的抑制作用，具有良好的生防应用潜力[3-6]。

nsdA（negative regulator of *Streptomyces* differentiation）是普遍存在于大多数链霉菌中的全局性负调控基因[7]，对链霉菌抗生素的合成和产孢形态分化具有负调控作用。已发现该基因在天蓝色链霉菌中调控着放线紫红（Act）、十一烷基灵菌红素（Red）、钙依赖抗生素（CDA）和次甲霉素（Mmy）等抗生素的合成，阻断 *nsdA* 基因后，这些抗生素的产量明显提高，孢子产量也明显提高[8]。在变铅青链霉菌 ZX64 中，*nsdA* 基因的中断可激活沉默的放线紫红素生物合成基因簇的表达[9]。在阿维链霉菌 NRRL8165 中阻断该基因后，阻断菌株产阿维菌素的效价提高了 3～5 倍[10]。肉桂地链霉菌 *nsdA* 中断菌株 BIB309 与出发菌株相比莫能菌素产量提高了 2.7 倍[11]。但目前尚未有玫瑰黄链霉菌中 *nsdA* 基因的报道。我们已根据天蓝色链霉菌 A3(2)的序列设计引物，PCR 扩增、克隆得到了玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 的 *nsd* 基因，即 $nsdA_{mgh}$，它与变铅青链霉菌和天蓝色链霉菌 A3(2)中的 *nsdA* 基因的核苷酸序列同源性达到 100%，与氨基酸序列同源性达到 99%[12]。为了验证 $nsdA_{mgh}$ 基因在玫瑰黄链霉菌中的存在情况及 PCR 扩增克隆结果的准确性，本研究采用斑点杂交法对 Men-myco-93-63 中的 $nsdA_{mgh}$ 基因进行了验证。

1 材料和方法

1.1 菌株

玫瑰黄链霉菌（*S. roseof lavus*）Men-myco-93-63，质粒 pKC1139、pSRNA1500 由河北农业大学生防实验室保存。天蓝色链霉菌（*S. coelicolor*）M145 由中国科学院微生物所谭华荣教授惠赠。

1.2 载体、限制性内切酶和试剂

酶类均购于 TaKaRa 公司；DNA 分子量标准物购于北京泽星公司；DNA 回收试剂盒购于 TaKaRa 公司；DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit Ⅰ 购于 Roche 公司；NC 膜购于上海生工生物工程技术服务有限公司；其他常规试剂参见文献[13，14]。

1.3 培养基和抗生素

大肠杆菌培养基为 LA、LB[14]；安普霉素（Ampicillin，Amp），储存质量浓度 50g/L，使用终质量浓度 50mg/L。

1.4 $nsdA_{mgh}$ 基因 PCR 扩增

1.4.1 PCR 扩增所用的引物[15] *nsdA* WZ-R：5′-GTGAGTGGCAACGGCGGAAGC-3′，*nsdA* WZ-L：5′-TCAGACCGCTTCGGCGGTCTCC-3′均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4.2 PCR 扩增程序 以 *nsdA* WZ-R 和 *nsdA* WZ-L 为引物，反应条件：96℃预变性 5min；95℃1min，62℃1min，72℃2min，30 个循环；72℃延伸 5min。PCR 反应中所用的酶均为 LA *Taq* 酶，buffer 为 2×GCⅠ。

1.5 核酸杂交

1.5.1 引物的设计与合成 PCR 反应中用来制备探针的引物与 PCR 扩增所用的引物相同。

1.5.2 探针制备 参照 Roche 公司试剂盒所示方法，将酶切片段用 Digoxigenin-dUTP 标记。

用含有 $nsdA_{mgh}$ 基因片段[12]的质粒 pSRNA1500 合成探针，$nsdA_{mgh}$ 基因在 GenBank 登录号 FJ899042，大小为 1503bp，质粒 pSRNA1500 经 *Hin*dⅢ和 *Xba*Ⅰ双酶切和琼脂糖电泳后，回收特异性克隆片段，经 1%琼脂糖电泳分析初步确定回收产物的含量。然后按探针标记试剂盒标明的方法标记探针，标记好的探针经梯度稀释后，取 1μL 稀释溶液准备在杂交膜上点样，标记探针置－20℃保存。

1.5.3 Dot-blot 杂交点样[15] 用毛细管或微量移液器将 DNA 样品点在未经任何处理的尼龙膜上，或将尼龙膜贴在大肠杆菌菌落长成约 1～2mm 直径的 LB 平板上，并轻轻将尼龙膜揭起，将三叠滤纸分别放入装有碱变性液（0.5mol/L NaOH，1.5mol/L NaCl，0.1% SDS），中和液（1.0mol/L Tris-HCl，pH 7.5；1.5mol/L NaCl）和 2×SSC 的平皿中；将尼龙膜 DNA 面或菌落面向上平放在吸足碱变性液的滤纸上，变性 15min（变性过程可在 37℃水浴中进行，以免碱变性液中的 SDS 析出。注意不要让碱变性液以及下步的中和液、2×SSC 溶液流到尼龙膜的菌落面上，否则会引起 DNA 扩散）；转移尼龙膜到中和液滤纸上中和 5min，转移尼龙膜到 2×SSC 滤纸上作用 15min，直接拿湿的尼龙膜紫外照射固定 DNA。

1.5.4 Dot-blot 预杂交 将尼龙膜装入杂交筒中，按比例即每 100cm² 加入 20mL 预杂交液，55℃预杂交至少 1h。

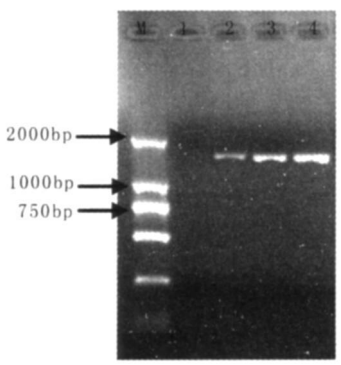
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5.5 Dot-blot 杂交及显色(试剂用量以 100 cm^2 膜计) 倒掉预杂交液,加入至少 20mL 杂交液(杂交液在用前放入 100℃沸水浴变性 10min),换杂交液时注意不能让膜干燥,于杂交箱中 55℃至少杂交 16h;回收杂交液;室温下用 2×SSC,0.1%(*m*/*V*)SDS 洗膜 2×5min,用预热到 65~68℃ 0.5×SSC,0.1% SDS 洗膜 2×15min;严格洗膜后,用 Washing buffer 轻轻洗膜 1~5min;在 10mL blocking solution 中孵育 30min 摇动;在 20mL Antibody solution 中孵育 30min 摇动;用 100mL Washing buffer 洗膜 2× 15min 摇动;用 20mL detection buffer 3 平衡 2~5min 摇动;将膜放入可热封的塑料袋中,加入 10mL 新配置的显色溶液,封口,放在暗处静置显色,至所需的杂交带显现清楚,加 100mL TE 缓冲液洗膜终止反应。尼龙膜干燥保存。

2 结果与分析

2.1 *nsdA*$_{mgh}$ 基因的 PCR 扩增

根据已报道的天蓝色链霉菌 A3(2)中 *nsdA* 序列,在该基因的外部设计 1 对 PCR 扩增引物 *nsdA*WZ-R和 *nsdA*WZ-L 来扩增 *nsdA*$_{mgh}$ 基因全长序列。PCR 产物在紫外透射仪下观察电泳结果,结果显示,与 DNA 分子量标准相比,在约 1.5kb 处可见一条特异性条带,与模式菌株天蓝色链霉菌 M145 中预期片段的大小一致(图 1)

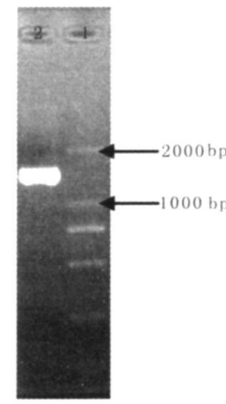


M. DL2000 Marker; 1. pKC1139 质粒为模板;
2. Men-myco-93-63 基因组为模板;
3. M145 基因组为模板;
4. pSRNA1500 质粒为模板

图 **1** ***nsdA*$_{mgh}$ 基因的扩增结果**

2.2 探针的制备

重组质粒 pSRNA1500 中含有 1.5kb 的介于 *Hin*d Ⅲ和 *Xba* Ⅰ 之间的 DNA 片段,该 DNA 片段含有完整的 *nsdA* 基因。利用 *Hin*d Ⅲ和 *Xba* Ⅰ 双酶切 pSRNA1500,用 DEAE 回收 1.5kb 的 *nsdA* 基因片段(图 2),并用非放射性地高辛标记作为基因克隆的探针。

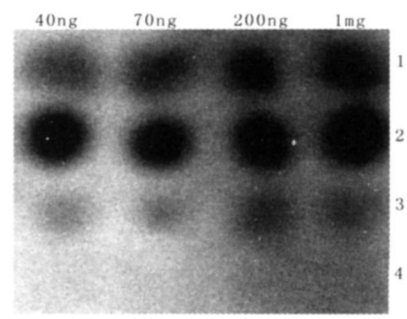


1. Marker DL2000; 2. Men-myco-93-63 中的 1.5kb DNA 片段

图 **2** 用作探针的 **DNA** 片段的琼脂糖凝胶电泳

2.3 *nsdA*$_{mgh}$ 基因的 Dot-blot 验证

将 Men-myco-93-63 接种至 TSB 培养基中,28℃,250r/min 培养 48h 后提取染色体 DNA 分不同质量浓度点 NC 膜(图 3、行 1,3)。以pSRNA1500质粒上 1.5kb 的 *Hin*d Ⅲ-*Xba* Ⅰ DNA 片段为阳性对照(图 3、行 2),pKC1139 质粒不含 1.5kb 的 *Hin*d Ⅲ-*Xba* Ⅰ DNA 片段为阴性对照(图 3、行 4),以pSRNA1500质粒上 1.5kb 的 *Hin*d Ⅲ-*Xba* Ⅰ DNA 片段为探针,进行 Dot-blot 杂交。理论上,pSRNA1500 质粒上 1.5kb 的 *Hin*d Ⅲ-*Xba* Ⅰ DNA 片段作为探针的片段应给出阳性杂交信号,而 pKC1139 质粒因为不含 1.5kb 的 *Hin*d Ⅲ-*Xba* Ⅰ DNA 片段,故应该没有杂交信号。Men-myco-93-63 中若存在 1.5kb 的 *nsdA* 基因 DNA 片段则应有斑点杂交信号。Dot-blot 杂交结果显示(图 3),杂交信号与预期值一致,说明玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中确实存在 *nsdA*$_{mgh}$ 基因,也从分子水平上验证了该基因 PCR 扩增克隆结果的正确性。



1,3. Men-myco-93-63 基因组 DNA;
2. *Hin*d Ⅲ-*Xba* Ⅰ 双酶切 pSRN1500 质粒回收片段大小为 1.5kb 的 *nsdA*$_{mgh}$ 基因片段;
4. pKC1139 质粒 DNA

图 **3** ***nsdA*$_{mgh}$ 在 Men-myco-93-63 中 Dot-blot 验证**

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

nsdA 基因是一个存在于链霉菌中的重要的负调节基因[10]。研究发现,该基因对天蓝色链霉菌的产孢和产素都有负调控作用,并相继在小单胞菌 40027、变铅链霉菌、肉桂地链霉菌、阿维链霉菌、白色链霉菌、庆丰链霉菌等多种链霉菌中被发现。前期根据模式菌株天蓝色链霉菌中的 *nsdA* 基因的内部和外部设计引物,均在玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中扩增出了预期片段[12],因此,推测该菌株中存在与天蓝色链霉菌、阿维链霉菌中类似的 *nsdA* 负调控基因。

斑点杂交技术是 1983 年由 Leary 等发展起来的一项简便、灵敏的检测技术[16],目前已越来越多地应用于实际研究中。为了验证玫瑰黄链霉菌中存在 *nsdA* 负调控基因,以及对该基因 PCR 扩增、克隆结果的正确性,本研究通过斑点杂交法进行了玫瑰黄链霉菌中 $nsdA_{mgh}$ 基因的验证。该负调控基因在 Men-myco-93-63 中的发现将有助于对该生防菌次生代谢中产生抗生素的调节机制的研究,也为通过基因中断获得高产抗生素的工程菌株奠定了重要基础。

参考文献:

[1] Liu D Q. Biological control of *Streptomyces scabies* and other plant pathogens[D]. Thesis, The University of Minnesota, USA, 1992.

[2] Liu D Q, Xiao K. Isolation methods and soil sources selecting *Streptomyces* spp. suppressive to *S. scabies* and other plant pathogens[C] //Advances in biological control of plant diseases. Beijing: China Agricultural University Press, 1992: 197-205.

[3] Liu D Q, Ersonna, Kinkelll. Selection an characterization of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogens[J]. Microbiol, 1996, 42: 487-502.

[4] 刘大群,杨文香,祁碧菽,等. 拮抗链霉菌 Men-myco-93-63 及其发酵液对棉花黄萎病菌生长的影响[J]. 河北农业大学学报, 1999, 22(4): 79-82.

[5] 张汀,赤国彤,杨文香,等. Men-myco-93-63 发酵液不同剂型防治茄子黄萎病的田间小区药效研究[C] //第二届全国绿色环保农药新技术、新产品交流会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2003: 420-423.

[6] Yang W X, Zhang T, Liu D Q. Biological control cucumber powdery mildew using culture filt rate of antagonistic *Streptomyces* in green house[C] //The 2nd International work shop on white agriculture. Beijing: China Agricultural University Press, 2004: 18-21.

[7] 余贞,王茜,邓子新. 负调节基因 *nsdA* 在链霉菌中同源性及激活沉默抗生素合成基因簇的研究[J]. 生物工程学报, 2006, 22(5): 757-762.

[8] Takano E, Tao M, Long F, *et al*. A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*[J]. Molecular Microbiology, 2006, 50: 475-486.

[9] Li W, Ying X, Guo Y, *et al*. Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188: 8368-8375.

[10] 王茜. 链霉菌分化负调节基因 *nsdA* 在抗生素高产育种上的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.

[11] 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.

[12] 沈凤英,李亚宁,刘力强,等. 玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 负调控基因 *nsdA* 的克隆及序列分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(4): 1-4.

[13] Tobias K, Bibb M J, Mark J B, *et al*. Practical *Streptomyces* genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.

[14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[15] 孟娟,古勤生,林石明,等. 地高辛标记探针检测 5 种葫芦科作物病毒的斑点杂交方法[J]. 中国农业科学, 2007, 40(12): 2741-2746.

[16] Leary J J, Brigati D J, Ward D C. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80(13): 4045-4049.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net