

玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中 3 个调控基因的检测

冀红柳^{1,2}, 胡亚亚¹, 沈凤英³, 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/国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北 保定 071001; 2. 邢台市园林局, 河北 邢台 054000; 3. 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 及其发酵液对多种重要植物病原菌均表现出很强的抑制作用, 在植物病害生物防治方面有很大的应用潜力。根据天蓝色链霉菌 A3(2) 调控基因 *tcrA*、*sarA* 和 *scrX* 序列设计引物, 扩增 Men-myco-93-63 基因组 DNA, 分别获得 705 bp、1 472 bp 和 473 bp 的片段, 经测序和比对, 上述片段与天蓝色链霉菌 A3(2) 的 *tcrA*、*sarA* 和 *scrX* 基因在核苷酸序列和氨基酸序列上同源性均为 99%, 因此, 推测玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 中很可能含有这些调控基因。Men-myco-93-63 中这 3 个调控基因的初步检测为玫瑰黄链霉菌功能基因的获得、菌株的遗传改良和代谢调控途径的研究提供了重要依据。

关键词: 玫瑰黄链霉菌; 调控基因; *tcrA* 基因; *sarA* 基因; *scrX* 基因

中图分类号: Q781 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)03-0083-04

Detection of *tcrA* and Other Regulator Genes from *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63

Ji Hong-liu^{1,2}, HU Ya-ya¹, SHEN Feng-ying³, LI Ya-ning^{1*}, LIU Da-qun^{1*}

(1. Biological Control Center of Plant Diseases and Pests of Hebei Province/National Agriculture Engineering Research Center in Northern Mountainous Areas, College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 2. Xingtai Bureau of Parks and Woods, Xingtai 054000, China; 3. North University of Hebei, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63 and its fermentation provide very well control effects on many important pathogenic fungi, and have shown a great deal of production and application potential in biological control of plant diseases. In this study, three fragments of 705 bp, 1 472 bp and 473 bp, corresponding with the *tcrA*, *sarA* and *scrX* gene of Men-myco-93-63, respectively, were amplified by the primers designed based on the corresponding gene sequences of *S. coelicolor* A3(2). After sequencing, Blastn and Blastx analyses, the nucleotide sequences and amino acid sequences of the three fragments from Men-myco-93-63 had 99% homology separately with the *tcrA*, *sarA* and *scrX* gene of *S. coelicolor* A3(2). So, *S. roseoflavus* Men-myco-93-63 might contain these regulator genes. The detection will provide an important basis for gain of functional genes, performance of genetic transformation and research of metabolic pathway of *S. roseoflavus*.

Key words: *Streptomyces roseoflavus*; regulator genes; *tcrA*; *sarA*; *scrX*

收稿日期: 2012-09-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171894); 国家高技术研究与发展计划(863)项目(2011AA10A205); 河北省自然科学基金项目(C2011204114)

作者简介: 冀红柳(1986-), 女, 河北邢台人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物病害生物防治。E-mail: uxspipi@163.com

* 通讯作者: 李亚宁(1974-), 女, 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: yanning22@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@hebau.edu.cn

链霉菌(*Streptomyces* spp.)是一种高 G+C 含量的革兰氏阳性丝状放线菌,是重要的天然抗生素产生菌。研究表明,其抗生素等次级代谢产物的产生与细胞复杂的分化密切相关,链霉菌中存在着原核生物中罕见的庞大而复杂的调控网络^[1],研究这些调控基因将有利于改良抗生素生产菌株及进行新型抗生素的研发,为改造链霉菌抗生素生物合成相关基因,提高菌株抗生素产量提供重要的理论依据。*tcrA* 基因是天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)中负调控色素类次级代谢产物生成的调控基因,编码一个由 761 个氨基酸组成的蛋白,蛋白 C 端含 TPR 结构域。该基因的阻断突变株表现出孢子颜色加深和色素产量增加的表型变化,形态分化上则没有显著变化^[2]。*sarA* 基因也是天蓝色链霉菌中的一个调控基因,编码 664 个氨基酸,其通过影响抗生素合成通路转录激活因子 ActII-ORF4 和 RedZ 的 mRNA 水平来正调控放线紫红素和十一烷基灵菌红素的合成^[3],对孢子发育有负调控作用。*scrX* 基因是天蓝色链霉菌中与形态分化和生理分化有关的一个调控基因,由 660 个碱基组成,在孢子形成中起正调控作用^[4]。

玫瑰黄链霉菌(*S. roseoflavus*) Men-myc-93-63 是从马铃薯疮痂病自然衰退土壤中分离到的一株对棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)表现强烈抑制作用的拮抗链霉菌^[5]。在室内及大田试验中, Men-myc-93-63 及其发酵液对不同致病力的棉花黄萎病菌、瓜类白粉病菌(*Sphaerotheca fuliginea* Poll)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers.)、马铃薯疮痂病菌(*S. scabies*)等多种重要植物病原菌均表现强烈的抑制作用^[6-9],在植物病害生物防治方面表现出良好的生产和应用潜力。刘力强等^[10]克隆了 Men-myc-93-63 的几丁质酶基因,并且实现了其在大肠杆菌中的异源表达。沈凤英等^[11]克隆了 Men-myc-93-63 的 *nsdA_{mgh}* 负调控基因,并成功将其阻断,发现阻断突变株对棉花黄萎病菌的抑制能力比出发菌株提高了 1 倍^[12]。但目前尚无关于玫瑰黄链霉菌中 *tcrA*、*scrX* 和 *sarA* 基因的研究和报道,本试验根据天蓝色链霉菌 A3(2) 中 *tcrA*、*sarA* 和 *scrX* 基因序列设计引物对玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 基因组进行 PCR 扩增,检测该生防菌中 *tcrA*、*sarA* 和 *scrX* 调控基因的表达情况,为玫瑰黄链霉菌功能基因的获得、菌株的

遗传改良和代谢调控途径的研究提供重要依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

玫瑰黄链霉菌(*S. roseoflavus*) Men-myc-93-63 由河北农业大学生物防治实验室保存。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 主要生化试剂

pMD19-T 载体、LA *Taq* 酶、2×GC buffer I、DNA 回收试剂盒均购于 TaKaRa 公司;DNA 分子量标准物购于北京泽星生物技术有限公司;大肠杆菌培养基为 LB;氨苄青霉素(Amp)使用终质量浓度 100 μg/mL;X-Gal(20 mg/mL),二甲基甲酰胺溶液配制后-20℃储存;IPTG(40 mg/mL),ddH₂O 配制滤菌后-20℃储存。

1.3 链霉菌 DNA 的提取

采用 SDS 法提取天蓝色链霉菌 M145 和玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 的基因组 DNA^[13]。

1.4 引物设计和 PCR 扩增

根据天蓝色链霉菌 A3(2) 中 *tcrA*、*sarA* 和 *scrX* 基因序列,利用 Primer 3.0 分别设计相应的特异引物 *tcrF* 和 *tcrR*、*sarF* 和 *sarR*、*scrF* 和 *scrR* (表 1),由上海生工生物工程有限公司合成。利用上述引物分别扩增天蓝色链霉菌 M145 和玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 的基因组 DNA,PCR 体系为 25 μL,反应成分如下:2×GC Buffer I 2.5 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,每条引物(10 μmol/L) 0.5 μL,模板 DNA 50 ng,1.25 U TaKaRa LA *Taq* 酶。PCR 反应程序见表 2。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带回收、转化、测序。测序工作交由上海生工生物工程有限公司完成。

表 1 用于 PCR 扩增调控基因的引物序列

引物名称	序列(5'-3')
<i>tcrF</i>	ACCGAAGTCTGCGAACCCTG
<i>tcrR</i>	CGTGTGCCCCCTCTCCACTA
<i>sarF</i>	TCATCGGCTCACCGTTCCTG
<i>sarR</i>	CGGCTTCTCGGGACGTATGC
<i>scrF</i>	CTGCGGGTCTCTCAAAGTGCT
<i>scrR</i>	GCCGTGGGTGAGGGTGTAGC

表 2 调控基因的 PCR 扩增程序

基因名称	反应程序
<i>tcrA</i>	94℃ 5 min;35 个循环(94℃ 1 min,63℃ 1 min,72℃ 1 min);72℃ 10 min;4℃ 保存
<i>sarA</i>	94℃ 5 min;35 个循环(94℃ 1 min,64.5℃ 1 min,72℃ 2 min);72℃ 10 min;4℃ 保存
<i>scrX</i>	94℃ 5 min;35 个循环(94℃ 1 min,63.5℃ 1 min,72℃ 1 min);72℃ 10 min;4℃ 保存

1.5 PCR 扩增片段序列的 BLAST 分析

将获得的 PCR 扩增片段测序后,在 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)上进行序列分析和比对。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的检测

将提取的天蓝色链霉菌 M145 和玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 基因组 DNA 在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行电泳,检测结果表明 DNA 条带清晰(图 1),说明提取的 DNA 无明显降解,可用于 PCR 扩增。

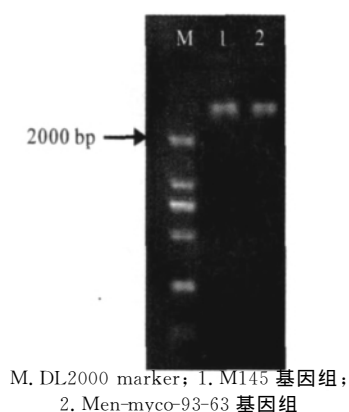


图1 链霉菌 DNA 电泳检测结果

2.2 *trcA* 基因的 PCR 扩增和序列分析

利用引物 *trcF* 和 *trcR* 分别扩增玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 和天蓝色链霉菌 M145 的基因组 DNA,对目的条带(图 2)回收、克隆、测序后,得到 705 bp 的核苷酸序列。Blastn 和 Blastp 比对后发现,从 Men-myc-93-63 中扩增出的基因片段与天蓝色链霉菌 M145 的 *trcA* 基因在核苷酸序列和氨基酸序列上同源性都为 99%,表明玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 中很可能存在 *trcA* 基因。

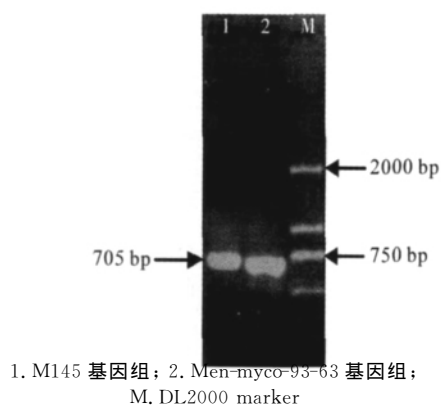


图2 *trcA* 基因扩增结果

2.3 *sarA* 基因的 PCR 扩增和序列分析

利用引物 *sarF* 和 *sarR* 扩增玫瑰黄链霉菌

Men-myc-93-63 和天蓝色链霉菌 M145 的基因组 DNA,对目的条带(图 3)回收、克隆、测序后,得到 1 472 bp 的核苷酸序列。Blastn 和 Blastp 比对后发现,从 Men-myc-93-63 中扩增出的基因片段与天蓝色链霉菌 M145 的 *sarA* 基因在核苷酸序列和氨基酸序列上同源性都为 99%,表明玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 中很可能存在 *sarA* 基因。

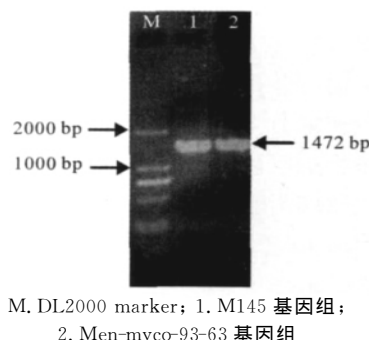


图3 *sarA* 基因扩增结果

2.4 *scrX* 基因的 PCR 扩增和序列分析

利用引物 *scrF* 和 *scrR* 扩增玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 和天蓝色链霉菌 M145 的基因组 DNA,对目的条带(图 4)回收、克隆、测序后,得到 473 bp 的核苷酸序列。Blastn 和 Blastp 比对后发现,从 Men-myc-93-63 中扩增出的基因片段与天蓝色链霉菌 M145 的 *scrX* 基因在核苷酸序列和氨基酸序列上同源性都为 99%,表明玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 中很可能存在 *scrX* 基因。

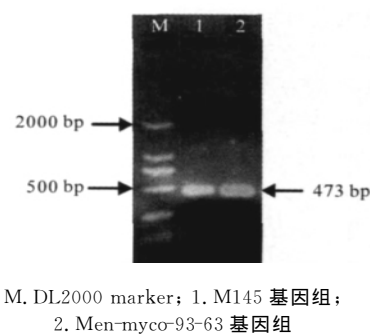


图4 *scrX* 基因扩增结果

3 结论与讨论

链霉菌能产生多种次级代谢物,并且其经历复杂的形态分化,有很多基因已被确认在形态分化中充当重要的角色。至今在模式链霉菌(天蓝色链霉菌、变铅青链霉菌)中发现了十几个与抗生素合成相关的调控基因^[14],包括天蓝色链霉菌 A3(2) 中的 *nsdA*、*nsdB*、*rrdA*、*trcA*、*sarA*、*scrX*、*afsR* 等调控基因,它们均不同程度地影响和调控着菌株次级代谢

产物的合成。其中, *tcra* 基因编码蛋白与 *afsR* 编码蛋白的氨基酸序列在结构域组织方式上十分相似, 都具有 ATPase 结构域和 TPR 结构域^[2]; *sarA* 编码的蛋白高度保守, 只在链霉菌中有发现; *scrX* 基因含有 3 个链霉菌中的稀有密码子——AAA、AAA 和 ATA^[4], 编码的蛋白产物与多种原核生物中参与碳源和氮源分支代谢途径的转录调控蛋白有较高的同源性^[15-16]。因此, 以这些调控基因为靶点开展工业菌种的基因改造, 可以作为抗生素高产菌株分子育种的一条行之有效的途径。

玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 及其发酵液对多种重要植物病原菌均表现出较好的防治效果, 具有良好的生防应用潜力。本试验根据模式菌株天蓝色链霉菌中的 *tcra*、*sarA* 和 *scrX* 基因序列设计引物, 均在 Men-myc-93-63 中扩增出了预期片段, 表明玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 中很可能存在这些调控基因, 这一发现为菌株的遗传改良和抗生素代谢途径的研究提供了重要依据。但要明确这些基因在生防菌代谢途径中起的具体作用, 还需要克隆基因的全长序列, 并通过基因阻断和遗传转化等试验进一步验证其功能。

参考文献:

- [1] 雷健, 赫卫清, 王以光. 链霉菌形态分化和次级代谢调控机制的研究进展[J]. 药物生物技术, 2007, 14(3): 225-229.
- [2] 柳金满, 杨克迁. 天蓝色链霉菌调控基因 *tcra* 功能的初步研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 33-37.
- [3] 欧西军. 天蓝色链霉菌 *cvaA*、*sarA* 及 *rrdA* 基因功能的初步研究[D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [4] 杨海花, 田宇清, 贾君永, 等. 天蓝色链霉菌分化调控基因 *scrX* 的功能研究[J]. 中国科学(C 辑), 2000, 30(2): 153-162.
- [5] Liu D Q, Xiao K. Isolation methods and soil sources selecting *Streptomyces* spp. suppressive to *S. scabies* and other plant pathogens[J]. Advances in Biological Control of Plant Diseases, 1992; 197-205.
- [6] Liu D Q, Anderson N A, Kinkel L L. Selection and characterization of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogens[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1996, 42(5): 487-502.
- [7] 刘大群, 杨文香, 祁碧菽, 等. 拮抗链霉菌 Men-myc-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.
- [8] 张汀, 赤国彤, 杨文香, 等. Men-myc-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, 2003; 420-423.
- [9] Yang W X, Zhang T, Liu D Q. Biological control cucumber powdery mildew using culture filtrate of an antagonistic *Streptomyces* in green house[C]// The 2nd international work shop on white agriculture, 2004; 18-21.
- [10] 刘力强, 张维宏, 李亚宁, 等. 玫瑰黄链霉菌几丁质酶基因的克隆及拼接表达[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 129-132.
- [11] 沈凤英, 刘力强, 吴伟刚, 等. 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 负调控基因 *nsdA_{mgh}* 的克隆及序列分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(5): 77-80.
- [12] 沈凤英. 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 接合转移体系及 *nsdA* 基因的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
- [13] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
- [14] 张艳娟, 洪斌. 链霉菌次级代谢调控机制进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(12): 39-42.
- [15] Bolotin A, Birc S. Nucleotide sequence of the putative regulatory gene and major promoter region of the *Streptomyces griseus* glycerol operon[J]. Gene, 1990, 87: 151-152.
- [16] Michael R B, Wouter A D, Peter A W. A3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid catabolic pathway in *Rhodococcus globularis* PWD1: Cloning and characterization of the hpp operon[J]. J Bacteriol, 1997, 179(19): 6145-6153.