

# 大肠杆菌乙酰-CoA 羧化酶基因异源表达对变铅青链霉菌次级代谢的影响

郑华亮<sup>1</sup> 白亭丽<sup>1</sup> 陶美凤<sup>1,2</sup>

1. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070; 2. 上海交通大学微生物代谢国家重点实验室, 上海 200030

**摘要** 克隆组装了大肠杆菌的乙酰-CoA 羧化酶基因 *acc*, 以研究其异源表达对变铅青链霉菌中 2 种“沉默”抗生素放线紫红素和十一烷基菌红素合成的影响。大肠杆菌 ACC 由 4 个基因编码, 通过 PCR 扩增 4 个基因, 并通过重叠延伸 PCR 加上 *ermE* 启动子, 构建得到 4 个重组基因; 再将重组基因依次组装得到异源表达质粒 pHLZ11, 接合转移到变铅青链霉菌中进行异源表达。结果显示: 含有异源表达质粒的变铅青链霉菌接合转移子能合成放线紫红素而十一烷基菌红素产量提高。表明大肠杆菌 *acc* 基因异源表达能够激活变铅青链霉菌沉默抗生素的合成, 并提高已有抗生素产量。

**关键词** 变铅青链霉菌; 大肠杆菌; 乙酰-CoA 羧化酶; 放线紫红素; 十一烷基菌红素

**中图分类号** Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)04-0012-07

链霉菌 (*Streptomyces*) 产生的天然产物中, 许多生物活性较好的化合物属于聚酮类化合物。聚酮类化合物是以乙酸、丙酸或丁酸等短链脂肪酸为前体, 由聚酮合酶催化活性前体间缩合及随后的还原等步骤, 通过类似于脂肪酸合成的方式合成的。在细菌中, 短链脂肪酸需要活化形成丙二酰基辅酶 A (malonyl-CoA) 及其类似结构作为活性前体参与缩合反应。酰基辅酶 A 羧化酶是短链脂肪酸前体活化的关键酶, 它也是中心碳代谢重要酶类, 其基因表达水平和酶活性水平受到复杂的调控。酰基辅酶 A 羧化酶广泛存在。大肠杆菌乙酰-CoA 羧化酶复合物由生物素羧化酶 (BC)、生物素羧基载体蛋白 (BC-CP)、羧基转移酶  $\alpha$  亚基 (CT $\alpha$ ) 和  $\beta$  亚基 (CT $\beta$ ) 4 种蛋白亚基组成, 4 种亚基按一定计量关系形成酶复合物, 即 (BC)<sub>2</sub>(BCCP)<sub>4</sub>(CT $\alpha$ , CT $\beta$ )<sub>2</sub><sup>[1]</sup>, 这些亚基分别由 *accC*、*accB*、*accA* 和 *accD* 等 4 个基因编码<sup>[1-2]</sup>。在天蓝色链霉菌 (*S. coelicolor*) 中有 2 种类型的酰基-CoA 羧化酶: 乙酰-CoA 羧化酶 (ACC) 和丙酰-CoA 羧化酶 (PCC), ACC 优先催化乙酰-CoA 的羧化, 而 PCC 更偏好选择丙酰-CoA, 并且能有效地羧化丁酰-CoA<sup>[3-6]</sup>。在链霉菌中通过过量表达来自链霉菌的酰基-CoA 羧化酶基因可以提高活性前

体供应, 从而提高放线紫红素和淡黄霉素 (flaviolin) 的发酵效价<sup>[7-8]</sup>。

变铅青链霉菌 (*S. lividans*) 基因组含有放线紫红素 (ACT) 生物合成基因簇和十一烷基菌红素 (RED) 生物合成基因簇, 但在通常培养条件下不能合成 ACT 和 RED, 因而变铅青链霉菌常被用于研究激活“沉默”抗生素的宿主菌。ACT 和 RED 是 2 种色素类抗生素, 其中 ACT 在中性及碱性 pH 条件下呈蓝色, 酸性 pH 下呈红色; RED 在中性及碱性 pH 下呈红色, 酸性 pH 下呈黄色, 很容易通过颜色的有无及其深浅观察抗生素的合成。ACT 合成属于 II 型聚酮合酶途径, 需要丙二酰-CoA 为活性前体; RED 生源较复杂, 其生物合成起始类似于脂肪酸生物合成, 以丙二酰-CoA 为底物经 6 次克莱森缩合形成正十二烷酸中间体<sup>[9-11]</sup>。

本研究克隆大肠杆菌乙酰-CoA 羧化酶复合物的 4 个基因, 通过重叠延伸 PCR 在基因上游分别加上红霉素抗性基因 *ermE* 的启动子, 并依次连接组装获得大肠杆菌乙酰-CoA 羧化酶的异源表达质粒 pHLZ11, 探讨大肠杆菌 *acc* 基因在变铅青链霉菌异源表达对沉默的放线紫红素和十一烷基菌红素合

收稿日期: 2012-06-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31170084)

郑华亮, 硕士研究生。研究方向: 链霉菌分子生物学。E-mail: hualiangzheng@163.com

通讯作者: 陶美凤, 博士, 研究员。研究方向: 抗生素生物合成及代谢调控。E-mail: tao\_meifeng@sjtu.edu.cn

成影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒及试剂

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为克隆宿主<sup>[12]</sup>, ET12567/pUZ8002 为大肠杆菌-链霉菌属间接合转移供体菌<sup>[13]</sup>。变铅青链霉菌 TK24 为野生型菌株<sup>[13]</sup>, SBT4( $\Delta$ CD A  $\Delta$ act) 为 TK24 衍生菌株, 由白亭丽构建(未发表)。质粒 pSET152 含阿泊拉霉素抗性基因(*aac*(3)IV)、RK2 接合转移起始区(*oriT*)以及放线菌噬菌体 $\Phi$ C31 的基因组整合功能区(*int*, *attP*)<sup>[14]</sup>。

限制性内切酶、碱性磷酸酶购自 Fermentas 公司, pMD18-T 载体、T4 DNA 连接酶 Solution I、DNA 聚合酶 *rTaq* 及相关试剂购自 TaKaRa 公司, 高保真 DNA 聚合酶 KOD plus 购自 TOYOBO 公司, 琼脂糖回收试剂盒购自 OMEGA 公司。氨苄青霉素、阿泊拉霉素、卡那霉素、氯霉素和三甲氧苄啶等抗生素均购自 Sigma 公司, 其余试剂均购自国药集团。

LB 培养基(胰蛋白胨 10 g, 酵母抽提物 5 g, NaCl 5 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 7.0)用于培养大肠杆菌<sup>[15]</sup>。2 $\times$ YT 培养基(胰蛋白胨 16 g, 酵母抽提物 10 g, NaCl 5 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, pH 7.0)<sup>[15]</sup>用于接合转移时链霉菌孢子的热激处理。MS 培养基(琼脂 20 g, 甘露醇 20 g, 黄豆粉 25 g, 加自来水至 1 000 mL, pH 7.2)用于链霉菌的

培养、产孢和接合转移<sup>[13]</sup>。

### 1.2 引物设计

根据 NCBI 数据库中大肠杆菌 K12 DH10B 的基因组序列(NC\_010473.1)设计引物, 用于扩增乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC) 4 个亚基的基因 *accA*、*accB*、*accC* 和 *accD*; 根据红霉素抗性基因 *ermE* (SACE\_0733)启动子序列设计引物, 用于扩增红霉素抗性基因 *ermE* 的启动子 *permE*。为便于在链霉菌表达 4 个 *acc* 亚基基因, 设计特殊引物, 以便通过重叠延伸 PCR 反应将 *permE* 分别连接到 *accA*、*accB*、*accC* 和 *accD* 基因的开放阅读框上游; 设计 4 条不同的 *permE* 下游引物(表 1), 其 5' 末端 20 nt 序列各不相同, 分别与 4 个基因上游序列互补; 4 条引物的 3' 末端 20 nt 序列相同, 均与 *permE* 序列互补; 用于扩增 4 个基因的上游引物分别与前述 4 条引物长度相同, 序列互补, 即 ACCA-F 与 *permE*-RA 序列互补, ACCB-F 与 *permE*-RB 互补, ACCC-F 与 *permE*-RC 互补, ACCD-F 与 *permE*-RD 互补。本研究所有引物序列见表 1。

另外, 为便于将连接有 *permE* 的重组基因进一步通过酶切-酶连方式按一定顺序重组在一起, 在 *permE* 上游引物的 5' 末端引入 *Bam*H I 酶切位点, 在 *accA*、*accB*、*accC* 和 *accD* 基因的下游引物的 5' 末端引入 *Bgl* II 酶切位点(表 1 中用下划线表示), *Bam*H I 和 *Bgl* II 为同尾酶。

表 1 用于扩增红霉素抗性基因 *ermE* 启动子及 4 个乙酰辅酶 A 羧化酶基因的引物

Table 1 Primers for amplification of the promoter of the erythromycin resistance gene *ermE* and 4 *acc* genes

引物名称 Name of primers	引物序列(从 5' 到 3') <sup>1)</sup> Sequence of primers (from 5' to 3')
<i>permE</i> -F	<u>GGATCC</u> GATGCTGTTGTGG
<i>permE</i> -RA	TCAAGGAAATTCAGACTCATATGTCCGCTCCCTTCTCCG
<i>permE</i> -RB	TTAATCTTACGAATATCCATATGTCCGCTCCCTTCTCCG
<i>permE</i> -RC	CAATAACAATTTTATCCAGCATATGTCCGCTCCCTTCTCCG
<i>permE</i> -RD	TAATTCGTTCAATCCAGCTCATATGTCCGCTCCCTTCTCCG
ACCA-F	CGGAAGAAGGGAGCGGACATATG <u>AGTCTGA</u> ATTTCTTGA
ACCA-R	<u>AGATCTTCTTACGCGTA</u> ACCGTAGCTCATCAG
ACCB-F	CGGAAGAAGGGAGCGGACATATGGATATTCGTAAGATTAA
ACCB-R	<u>AGATCTTCTTACTCGATGACG</u> ACCAGCGG
ACCC-F	CGGAAGAAGGGAGCGGACATATGCTGGATAAAAATTGTTATTG
ACCC-R	<u>AGATCTTCTTATTTTCTG</u> AAGACCGAGT
ACCD-F	CGGAAGAAGGGAGCGGACATATGAGCTGGATTGAACGAATTA
ACCD-R	<u>AGATCTTCTCAGGCCTCAGG</u> TTCTTGAT

1) 引入的 *Bam*H I 和 *Bgl* II 位点用下划线表示 *Bam*H I and *Bgl* II sites were noted with underlines.

### 1.3 DNA 扩增及重叠延伸 PCR

增 *ermE* 启动子片段, 以大肠杆菌 DH5 $\alpha$  的总 DNA

以质粒 DNA(来自笔者所在实验室)为模板扩

为模板扩增 *acc* 的 4 个亚基基因 *accA*、*accB*、*accC*

和 *accD*; 通过重叠延伸 PCR 反应将 *ermE* 启动子序列与 *accA*、*accB*、*accC* 和 *accD* 基因拼接起来。PCR 及重叠延伸 PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s; 60 °C 30 s; 68 °C 90 s, 68 °C 10 min; 30 个循环。PCR 扩增后的产物, 分别加上 1  $\mu$ L DNA 聚合酶 *rTaq* 进行加 A 反应, 72 °C 30 min。

#### 1.4 PCR 产物的回收、连接、转化和验证

将 PCR 扩增的目的片段通过 OMEGA 胶回收试剂盒进行回收纯化。纯化 DNA 片段与 pMD18-T 酶连: T4 DNA 连接酶 Solution I 5  $\mu$ L, pMD18-T 0.5  $\mu$ L, 外源片段 4.5  $\mu$ L, 16 °C 1 h。连接反应混合物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  化学感受态细胞, 通过 Amp 抗性和 IPTG/X-gal 蓝白斑筛选重组子, 感受态细胞制备 (CaCl<sub>2</sub> 法) 及转化参照文献 [15] 的方法进行。挑取白色菌斑扩大培养, 提取质粒 DNA, 用 *Bam*H I 和 *Bgl* II 酶切验证, 并测序验证序列。

#### 1.5 *acc* 表达质粒的构建

将测序正确的重组克隆用 *Bam*H I 和 *Bgl* II 酶切, 分别跑胶分离、纯化回收目的片段。用 *Bam*H I 酶切质粒 DNA, 跑胶分离纯化, 再用碱性磷酸酶进行去磷酸化处理。去磷酸化反应体系: 酶切并纯化的 pSET152 线性化质粒 DNA 5  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 12  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 2  $\mu$ L, 碱性磷酸酶 1  $\mu$ L, 37 °C, 10 min; 70 °C, 5 min, 使碱性磷酸酶失活。将 4 个目的基因片段依次连接到 pSET152 及其衍生质粒的 *Bam*H I 位点, 最后获得含有 4 个编码 *acc* 亚基的

整合型表达质粒 pHLZ11。

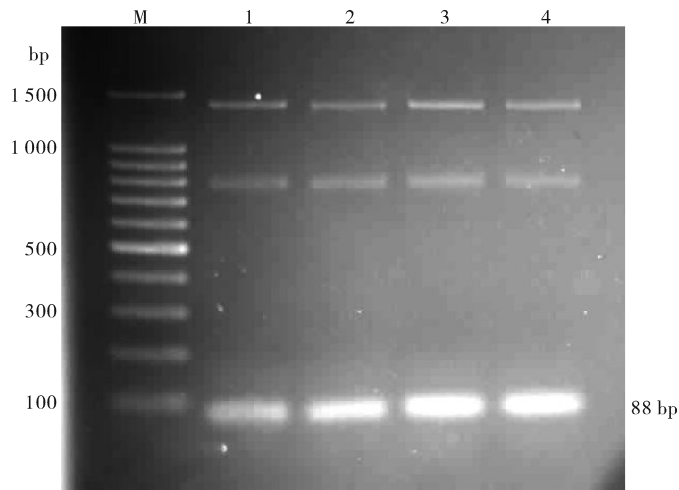
#### 1.6 接合转移

链霉菌与大肠杆菌属间接接合转移参见文献 [13]。将 pHLZ11 转化进入大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 感受态细胞, 涂布在含有卡那霉素 (50  $\mu$ g/mL)、氯霉素 (25  $\mu$ g/mL) 和阿泊拉霉素 (50  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板上, 37 °C 培养 20 h。转化子 ET12567/pUZ8002/pHLZ11 为接合转移供体菌, 变铅青链霉菌 TK24 及 SBT4 为受体菌。接合转移后涂布 MS 平板, 30 °C 培养 14 h 后用阿泊拉霉素 (50  $\mu$ g/mL, 终质量浓度) 和三甲氧苄啶 (50  $\mu$ g/mL, 终质量浓度) 进行覆盖, 继续培养直至接合转移子长出。

## 2 结果与分析

### 2.1 *acc* 基因的克隆及其组装

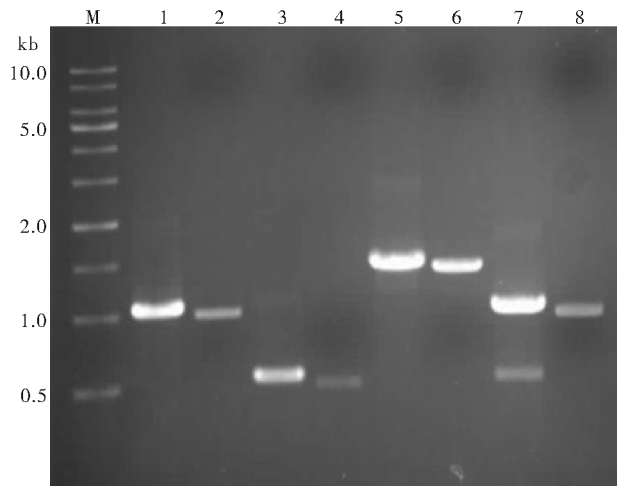
采用重叠延伸 PCR 的方法, 将 *permE* 分别重组到 4 个 *acc* 基因上游。首先扩增 *ermE* 启动子, 以 *permE*-F 为共同的上游引物, *permE*-RA、*permE*-RB、*permE*-RC 和 *permE*-RD 分别为下游引物扩增 *permE*, 获得大小约为 88 bp 的片段, 分别命名为 *permEa*、*permEb*、*permEc* 和 *permEd*。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1), 跑胶分离回收, 作为重叠延伸的模板。以引物 (表 1) 分别 PCR 扩增 *accA*、*accB*、*accC* 和 *accD*, 并跑胶检测 (图 2)、分离回收, 作为重叠延伸的模板。



M: 100 bp marker; 1: *permEa* PCR 产物 PCR product of *permEa*; 2: *permEb* PCR 产物 PCR product of *permEb*; 3: *permEc* PCR 产物 PCR product of *permEc*; 4: *permEd* PCR 产物 PCR product of *permEd*.

图 1 *ermE* 启动子的 4 个 PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of 4 PCR products of the *ermE* promoter



M: 1 kb DNA ladder; 1: *accA* 与 *permEa* 的重叠延伸 PCR 产物 Overlapping extension PCR product of *accA* and *permEa*; 2: *accA* PCR 产物 PCR product of *accA*; 3: *accB* 与 *permEb* 的重叠延伸 PCR 产物 Overlapping extension PCR product of *accA* and *permEb*; 4: *accB* PCR 产物 PCR product of *accB*; 5: *accC* 与 *permEc* 的重叠延伸 PCR 产物 Overlapping extension PCR product of *accC* and *permEc*; 6: *accC* PCR 产物 PCR product of *accC*; 7: *accD* 与 *permEd* 的重叠延伸 PCR 产物 Overlapping extension PCR product of *accD* and *permEd*; 8: *accD* PCR 产物 PCR product of *accD*.

图2 *acc* 基因及重组 *acc* 基因的 PCR 扩增产物分析

Fig. 2 Electrophoresis analysis of the PCR products of 4 *acc* and recombinant *acc* genes

1) 重叠延伸构建重组 *acc* 基因。分别以 PCR 获得的 4 种 *permE* 片段以及对应的 *acc* 基因扩增产物作为模板, 以 *permE-F* 作为共同的上游引物, 以 ACCA-R、ACCB-R、ACCC-R 和 ACCD-R 分别作为下游引物进行 4 组重叠延伸 PCR 反应, 获得含有 *ermE* 启动子的 4 个重组 *acc* 基因, 分别命名为 *permE-accA*、*permE-accB*、*permE-accC* 和 *permE-accD* (图 2-2, 4, 6, 8)。

2) 重组 *acc* 基因的克隆和组装。将扩增的重组基因产物 *permE-accA*、*permE-accB*、*permE-accC* 和 *permE-accD* 分别跑胶回收, 与 pMD18-T 载体进行酶连, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 对重组质粒酶切、测序验证, 获得正确的重组克隆, 分别命名为 pHLZ4、pHLZ5、pHLZ6 和 pHLZ7。将这 4 个质粒用 *Bam*HI 和 *Bgl*II 酶切, 纯化相应的 4 条重组 *acc* 片段, 将 *permE-accA* 克隆到 pSET152 的 *Bam*HI 位点得到 pHLZ8, 再将 *permE-accB* 克隆到 pHLZ8 的 *Bam*HI 位点得到 pHLZ9, 再将 *permE-accC* 克隆到 pHLZ9 的 *Bam*HI 位点得到 pHLZ10, 最后将 *permE-accD* 克隆到 pHLZ10 的 *Bam*HI 位点得到 pHLZ11。在 pHLZ11 中, *accA*、*accB*、*accC* 和 *accD* 基因依序排列, 且每个基因上游均含有 *permE* (图 3)。

## 2.2 *acc* 基因在链霉菌中表达

将 pHLZ11 和 pSET152 分别转化进入大肠杆菌 ET12567/pUZ8002, 再通过接合转移进入变铅青链霉菌野生型菌株 TK24 和 ACT 基因簇中断菌株 SBT4 中, 观察 *acc* 异源表达对 2 种沉默的色素类抗生素 (ACT 和 RED) 生物合成的影响。pSET152 作为空载体对照。采用 ACT 基因簇中断的 SBT4 是为了避免紫红色的 ACT 干扰, 可更好地观察红色抗生素 RED 的合成。

在变铅青链霉菌 TK24 为受体的接合转移板上, pHLZ11 的接合子产生深蓝色的 ACT, 而空载体 pSET152 的接合子则没有 ACT 的产生; 将接合子转接到新鲜 MS 平板培养, 仍可观察到 TK24::pHLZ11 大量合成放线紫红素 (图 4)。另外, TK24::pHLZ11 生长明显变弱, 只产少量白色气丝; 而空载体的接合子 TK24::pSET152 产大量气丝, 最终产生丰富的孢子。

在 SBT4 为受体的接合子中, SBT4::pHLZ11 的十一烷基灵红菌素 (红色) 产量明显提高 (图 5), 而空载体 pSET152 的接合子以及宿主对照几乎不产红色素。

试验结果说明, 来自大肠杆菌的乙酰-CoA 羧化酶基因能够在链霉菌中表达, 其表达能够激活沉默抗生素的合成。

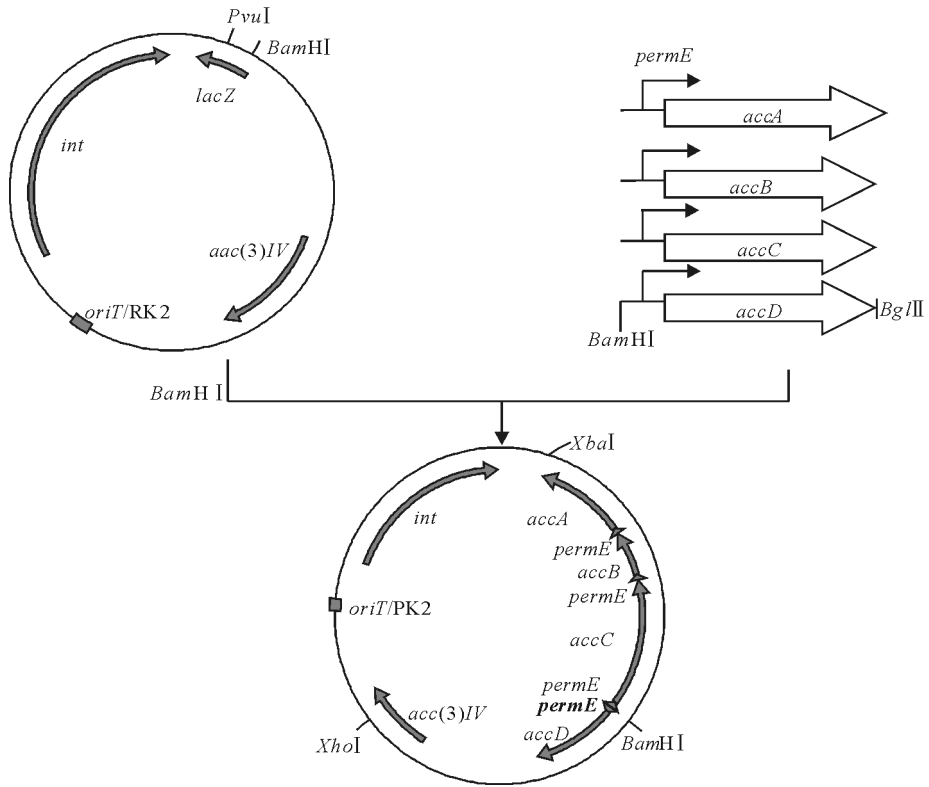


图 3 *acc* 表达质粒 pHLZ11 的构建

Fig. 3 Construction of the *acc* expression plasmid pHLZ11

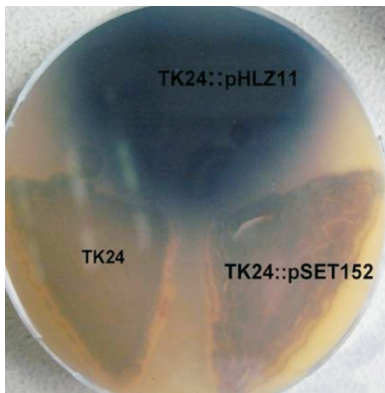


图 4 pHLZ11 激活变铅青链霉菌 TK24 中沉默的放线紫红素的合成

Fig. 4 Activation of the silent actinorhodin production in *S. lividans* TK24 by pHLZ11

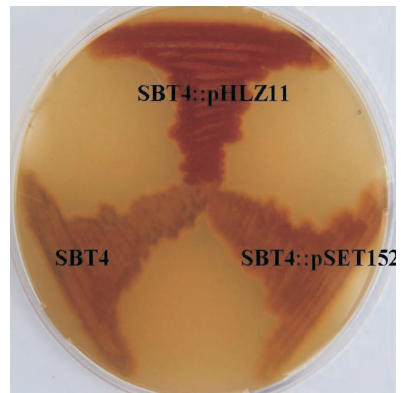


图 5 大肠杆菌 *acc* 促进变铅青链霉菌 SBT4 中十一烷基菌红素的合成

Fig. 5 Promotion of the undecylprodigiosin production in *S. lividans* SBT4 by *E. coli acc*

### 3 讨论

链霉菌基因组测序发现,每个基因组均含有十几到三十多个不同的次级代谢生物合成基因簇,除少数基因簇(约占 10%)编码已知化合物外,80%~90%的基因簇编码未知的次级代谢途径合成的化合

物<sup>[16]</sup>,这些途径产生的化合物在传统的实验室筛选条件下是“沉默”的,相应的天然产物或者完全不成、或者由于产量太低而没有被分离鉴定得到。链霉菌超强的次级代谢合成潜力暗示,如果开发出一些相对简单的方法激活这些“沉默”的次级代谢途径,将为新化合物的筛选鉴定提供巨大的空间,自

2002年天蓝色链霉菌基因组测序论文<sup>[17]</sup>发表至今,已有多种方法对链霉菌开展基因组挖掘(genome mining),包括尝试多种培养条件的OSMAC法、同位素示踪、基因敲除、异源表达和调控基因改造等方法,获得了许多新的化合物<sup>[18-21]</sup>。

野生型变铅青链霉菌中含有ACT和RED生物合成基因簇,但在普通培养基如MS上培养时这2种抗生素并不能有效合成,有文献报道通过增加正调控基因拷贝数或敲除一些负调控基因可以激活沉默抗生素的合成<sup>[22-24]</sup>。本研究在变铅青链霉菌引入大肠杆菌*acc*基因,激活了ACT的表达并提高了RED的产量,推测这2种抗生素生物合成产量的改变是由于链霉菌体内丙二酰-CoA的增加所导致,说明对中心代谢途径的修饰能够激活沉默次级代谢途径。

另外,在本试验中将大肠杆菌*acc*基因导入到变铅青链霉菌后,在接合转移平板以及转接一代的平板上均能够产生大量ACT和RED,但是接合子菌落变小,气生菌丝的生长受到影响,且不产生孢子;将接合子多次传代后,后全部代恢复到不产色素抗生素状态,同时,气生菌丝和产孢也恢复到正常的出发菌株状态。一种可能的原因是,过量抗生素的合成导致宿主负荷过重,传代后死亡,只有少数不产抗生素的自发突变个体可以存活;另一个可能的原因是导入大肠杆菌*acc*基因后,导致乙酰辅酶A羧化酶活性额外增加、丙二酰-CoA浓度升高,一方面使ACT和RED产量增高,同时链霉菌细胞通过未知的负反馈机制抑制乙酰辅酶A羧化酶的活性,并抑制宿主自身*acc*基因的进一步表达;有意思的是,这种反馈机制作用需要较长时间才达到效果。另外在本研究中大肠杆菌与链霉菌属于不同的种,两者的进化不同,在基因的排布及各基因的协调方面不尽相同,导入不同种属的基因可能引起菌株本身生理和生长的改变。本研究中采用了组成型强启动子*permE*表达*acc*,如果采用诱导性启动子,或许可以减轻宿主负荷,使抗生素高产性状能够稳定传代。

## 参 考 文 献

- [1] CRONAN J E, WALDROP G L. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases[J]. *Prog Lipid Res*, 2002, 41(5): 407-435.
- [2] GUCHHAIT R B, POLAKIS S E, DIMROTH P, et al. Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli* purification and properties of the biotin carboxylase, carboxyltransferase, and carboxyl carrier protein components[J]. *J Biol Chem*, 1974, 249(20): 6633-6645.
- [3] RODRIGUEZ E, GRAMAJO H. Genetic and biochemical characterization of the  $\alpha$  and  $\beta$  components of propionyl-CoA carboxylase complex of *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *Microbiology*, 1999, 145(11): 3109-3119.
- [4] RODRIGUEZ E, BANCHIO C, DIACOVICH L, et al. Role of an essential acyl coenzyme A carboxylases in the primary and secondary metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(9): 4166-4176.
- [5] GAGO G, KURTH D, DIACOVICH L, et al. Biochemical and structural characterization of an essential acyl coenzyme A carboxylase from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(2): 477-486.
- [6] DIACOVICH L, PEIRU S, KURTH D, et al. Kinetic and structural analysis of a new group of acyl-CoA carboxylases found in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(34): 31228-31236.
- [7] RYU Y G, BUTLER M J, CHATER K F, et al. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(11): 7132-7139.
- [8] MAHARJAN S, PARK J W, YOON Y J, et al. Metabolic engineering of *Streptomyces venezuelae* for malonyl-CoA biosynthesis to enhance heterologous production of polyketides [J]. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(2): 277-282.
- [9] CERDENO A M, BIBB M J, CHALLIS G L. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes [J]. *Chem Biol*, 2001, 8(8): 817-829.
- [10] MO S, SYDOR P K, CORRE C, et al. Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 2-undecylpyrrole, a key intermediate in undecylprodiginine and streptorubin B biosynthesis [J]. *Chem Biol*, 2008, 15(1): 137-148.
- [11] SINGH R, MO S, FLOROVA G, et al. *Streptomyces coelicolor* RedP and FabH enzymes, initiating undecylprodiginine and fatty acid biosynthesis, exhibit distinct acyl-CoA and malonyl-acyl carrier protein substrate specificities [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 328(1): 32-38.
- [12] HANAHAN D. Studies on the transformation of *E. coli* with plasmids [J]. *J Mol Biol*, 1983, 166(4): 557-580.
- [13] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. *Practical Streptomyces genetics* [M]. 2nd ed. UK: The John Innes Foundation, Norwich, 2000.
- [14] 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.
- [15] SAMBROOK J, RUSSELL D. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 3rd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [16] CHALLIS G L. Mining microbial genomes for new natural

- products and biosynthetic pathways[J]. *Microbiology*, 2008, 154(6):1555-1569.
- [17] BENTLEY S D, CHATER K F, CERDEÑO-TÁRRAGA A M, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Nature*, 2002, 417 (6885): 141-147.
- [18] WANG J, SOISSION S M, YOUNG K, et al. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties[J]. *Nature*, 2006, 441(7091):358-361.
- [19] LAURETI L, SONG L, HUANG L, et al. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2011, 108(15):6258-6263.
- [20] LAUTRU S, DEETH R J, BAILEY L M, et al. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining[J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(5):265-269.
- [21] 郭航, 白亭丽, 陶美凤. 刺糖多孢菌鼠李糖和福乐糖胺合成基因的克隆和组装[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(3):298-302.
- [22] HORINOUCI S, HARA O, BEPPU T. Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthesis of A-factor, actinorhodin, and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*[J]. *J Bacteriol*, 1983, 155(3):1238-1248.
- [23] TAKANO E, GRAMAJO H C, STRAUCH E, et al. Transcriptional regulation of the redD transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Mol Microbiol*, 1992, 6(19):2797-2804.
- [24] GRAMAJO H C, TAKANO E, BIBB M J. Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated[J]. *Mol Microbiol*, 1993, 7(6):837-845.

## Effect of heterologous expression of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase genes on the secondary metabolism of *Streptomyces lividans*

ZHENG Hua-liang<sup>1</sup> BAI Ting-li<sup>1</sup> TAO Mei-feng<sup>1,2</sup>

1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China

**Abstract** The *Streptomyces lividans* genome carries two gene clusters encoding the biosynthetic pathways of actinorhodin and undecylprodigiosin. However neither antibiotic is produced in *S. lividans* under the conditions of common laboratory growth. Malonyl-CoA as precursor was needed in the biosynthesis of both compounds catalyzed by the committed enzyme acetyl-CoA carboxylase (ACC). This study was aimed to clone the *acc* genes from *Escherichia coli* and introduce them into *S. lividans* to investigate their effect on the production of actinorhodin and undecylprodigiosin. The *E. coli* ACC subunits are encoded by 4 *acc* genes. These *acc* genes were cloned with adding *ermE* promoter to each through overlapping extension PCR to gain 4 recombined genes. The recombinant genes were then cloned into pSET152 successively to gain a heterologous expression plasmid. The constructed plasmid was transferred into *S. lividans* by conjugation, and the antibiotic production in exconjugants was examined. The exconjugants could not only produce actinorhodin but also showed a prominent increase in the production of undecylprodigiosin. *acc* from *E. coli* can improve the production of pre-existing antibiotics and activate the expression of silent gene clusters as well in *S. lividans*.

**Key words** *Streptomyces lividans*; *E. coli*; acetyl-CoA carboxylase; actinorhodin; undecylprodigiosin