

变铅青链霉菌高效异源表达宿主 SBT5 的构建

白亭丽¹ 俞燕飞¹ 徐 钟¹ 陶美凤^{1,2}

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 以变铅青链霉菌 TK24 为出发菌株, 依次敲除钙依赖抗生素(CDA)、放线紫红素(ACT)和十一烷基灵菌红素(RED)这 3 个内源抗生素的生物合成基因簇, 同时在钙依赖抗生素基因簇原位整合了来自棒状链霉菌的全局性调控基因 *afsRS_{da}*, 构建得到变铅青链霉菌菌株 SBT5。将来自天蓝色链霉菌的放线紫红素生物合成基因簇导入 SBT5 中, 接合子产生大量蓝色的放线紫红素, 而出发菌株 TK24 只产微量蓝色抗生素; SBT5 接合子的 ACT 产量也显著高于导入了额外 *act* 基因簇拷贝的出发菌株接合子。SBT5 菌株次级代谢背景清晰, 不产色素类抗生素和抗细菌抗生素, 可作为高效宿主用于次级代谢产物基因簇的异源表达和筛选。

关键词 变铅青链霉菌; 异源表达宿主; 次级代谢产物; 抗生素生物合成基因簇; 基因敲除; *afsRS_{da}*

中图分类号 Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)01-0001-06

天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)是链霉菌分化发育和遗传学研究的模式菌株, 可以产生色素类抗生素放线紫红素(ACT, 中性及偏碱性下呈蓝色)、十一烷基灵菌红素(RED, 中性及偏碱性下呈红色)以及抗细菌抗生素钙依赖抗生素(CDA), 天蓝色链霉菌也常被作为宿主菌用于次级代谢基因簇的异源表达^[1]。天蓝色链霉菌对甲基化 DNA 具有限制作用, 妨碍了它作为宿主的广泛应用。变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)是天蓝色链霉菌近缘种, 对甲基化 DNA 没有限制作用, 常被用作单基因或基因簇异源表达的宿主^[2]。野生型变铅青链霉菌 TK24 的基因组含有 ACT、RED 和 CDA 这 3 种抗生素的生物合成基因簇, 对外源基因簇的表达筛选可能会造成干扰; 这些基因簇只在特定条件下才会表达, 表明该菌株合成次级代谢产物的能力较低。根据变铅青链霉菌的这些特点, 本研究拟敲除这些内源基因簇, 同时加入一个全局性调控基因 *afsRS*, 用以激活次级代谢基因簇, 旨在构建适用于次级代谢产物基因簇异源表达和筛选的高效宿主菌。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为克隆宿

主^[3]; 大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 为大肠杆菌-链霉菌属间接接合转移供体菌^[4]。蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*)为钙依赖抗生素(CDA)生物活性测定的指示菌^[5]。变铅青链霉菌 TK24^[6]为野生型链霉菌, 出发菌株。天蓝色链霉菌 K7 为 M145 衍生菌株, 由徐钟构建(未发表), 在其 CDA 生物合成基因簇(*cda*)的下游有 Tn5 微型转座子(mini-Tn5-aac(3)IV)插入, 但 CDA 的合成不受影响, mini-Tn5-aac(3)IV 序列中含有阿泊拉霉素抗性基因 *aac(3)IV* 以及大肠杆菌质粒 pUC18 的复制子, 本研究利用 K7 菌株的这些特点克隆 *cda* 基因簇部分序列, 并用于构建 *cda* 基因置换质粒。

质粒 pSET152^[7]包含接合转移起始位点 *oriT_{RK2}*、阿泊拉霉素抗性基因 *aac(3)IV*、放线菌噬菌体 Φ C31 整合位点 *attP* 以及整合酶基因 *int*。pMM1 为 pSET152 衍生质粒, 含有放线紫红素生物合成基因簇, 由王业民构建(未发表)。pHL737 为放线紫红素生物合成基因簇敲除载体, 由徐钟构建(未发表); pHLY32 为十一烷基灵菌红素基因簇敲除载体, 由俞燕飞构建(未发表); pHLS51 携带来自棒状链霉菌的全局性调控基因 *afsRS_{da}*^[8]。

1.2 引物及试剂

本研究应用的引物序列如表 1, 由上海生工生物技术有限公司合成。

收稿日期: 2013-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170084)

白亭丽, 硕士研究生, 研究方向: 链霉菌分子生物学。E-mail: baitingli@gmail.com

通信作者: 陶美凤, 博士, 研究员, 研究方向: 链霉菌分子生物学。E-mail: tao_meifeng@sjtu.edu.cn

表1 本研究所涉及引物及其用途

Table 1 Primers used in this study and its application

| 名称 Name | 序列 Sequence | 用途 Application |
|-------------|--------------------------|--|
| oriT-F | GGATCCGGTTTCATCAGCCATCCG | 扩增 <i>oriT</i> 片段 Amplification of <i>oriT</i> |
| oriT-R | AGATCTTGCCAAAGGGTCGTGTAG | |
| K7-BKF | TGCTGCTGCTCATCCACCATCG | |
| K7-BKR | CGTCATCCGGGTCGCGTTCA | |
| K7-LN-F | GAGCCTCCGTCACCCTCGTT | 筛选含 <i>cda</i> 序列的 pHLT2 Screening for pHLT2 which containing <i>cda</i> sequence |
| K7-LN-R | CCAGCTTCCTGTTCGCGTCA | |
| K7-Left-F | GCAGGTCGGTGAGCACGAAGGT | |
| K7-Left-R | TGGTGGATGAGCAGCAGCAGGAC | |
| sjhChek1F | CGACTGGCTGGACGTGCTGGAA | 筛选 <i>cda</i> 基因簇中断菌株 (PCR1) Screening for <i>cda</i> gene cluster replacement mutant (PCR1) |
| sjhChek1R | ACGACGACATGCGGGAGGTGCT | |
| tn-7-2047-F | GGGGATAACGCAGGAAAGAA | 筛选 <i>cda</i> 基因簇中断菌株 (PCR2) Screening for <i>cda</i> gene cluster replacement mutant (PCR2) |

限制性内切酶和碱性磷酸酶购自 Fermentas 公司;连接酶 Solution I、DNA 聚合酶 rTaq 等试剂购自 TaKaRa 公司;琼脂糖回收试剂盒购自 OME-GA 公司;高保真 DNA 聚合酶 KOD plus 购自 TOYOBO 公司;抗生素购自 Sigma 公司;其余试剂均购自国药集团和 Oxoid 公司。

1.3 培养基

LB 培养基用于培养大肠杆菌^[8]。2×YT 培养基^[9]用于接合转移时链霉菌孢子的热激处理。MS 培养基用于链霉菌的培养、产孢和接合转移^[10]。营养琼脂培养基用于生测涂布培养蕈状芽孢杆菌^[11]。SMMS 培养基用于链霉菌产素观察^[12]。NA 培养基用于链霉菌固体发酵产抗生素^[13]。

1.4 DNA 的抽提、转化及克隆

大肠杆菌质粒 DNA 和链霉菌总 DNA 抽提参照标准操作方法^[9-10]。质粒酶切和连接方法参照酶的使用说明书。DNA 片段的回收参照琼脂糖回收试剂盒的使用说明书。DNA 片段的 PCR 扩增参见文献[9]。大肠杆菌转化参照标准钙转方法^[9]。DNA 序列由上海美吉生物医药科技有限公司测定。

1.5 大肠杆菌和链霉菌属间接合转移

大肠杆菌和链霉菌属间接合转移参照文献[10]进行,将待转穿梭质粒转化到大肠杆菌 ET12567/pUZ8002,挑单克隆转化子于 LB 中活化过夜;活化后按 1:100(V/V)的比例转接到新鲜 LB 中培养到 $D_{600\text{ nm}} = 0.4 \sim 0.6$,收集菌体,用新鲜 LB 洗涤 2 次,0.1 倍体积 LB 悬浮备用。同时将新鲜链霉菌孢子悬浮于 2×YT 培养基中,50 °C 水浴 10 min,自然冷却。1:1(V/V)混合大肠杆菌和孢子,涂布在 MS 无抗平板上,30 °C 培养 14~18 h,用抗生素和三甲氧苄啶覆盖筛选接合转移子。

1.6 cda 基因簇敲除质粒的构建

从天蓝色链霉菌 K7 菌株中克隆 *cda* 生物合成基因簇的部分序列,然后用来自 pHL851 的 *afsRS_{da}* 替换 *cda* 基因簇内部分片段,获得 *cda* 基因簇敲除质粒。具体构建过程如下:

1) *cda* 基因簇部分序列的克隆。抽提 K7 菌株的总 DNA, *Sau* 3AI 部分酶切,回收大约 20 kb 的片段,自连后转化大肠杆菌 DH5 α ,获得具有阿泊拉霉素抗性、含有完整的 mini-Tn5-aac(3)IV 微型转座子的克隆,最后从这些克隆中 PCR 筛选到含有较长 *cda* 基因簇序列的克隆,命名为 pHLT2。

2) *afsRS_{da}* DNA 片段的结构改造。用 PCR 方法从 pSET152 上扩增含 *oriT_{RK2}* 的 DNA 片段,用 *Bam*H I 和 *Bgl* II 双酶切 PCR 产物,插入到 pHL851 上 *afsRS_{da}* 下游的 *Bam*H I 位点,得到质粒 pHLT1。

3) *cda* 基因簇敲除质粒的构建。用 *Pst*I 和 *Eco*R I 双酶切 pHLT1,回收含有 *afsRS_{da}-oriT* 的 4 685 bp 片段,与 *Pst* I 和 *Eco*R I 双酶切 pHLT2 得到的约 14 kb 片段连接,得到 pHLT3,再用 *Kpn* I 酶切 pHLT3,自连以抹掉过长的一段基因组 DNA,得到 pHLT4,在该质粒中用全局性正调控基因 *afsRS_{da}* 替换掉了 7.1 kb 的 *cda* 基因簇部分 DNA 片段,可用作 *cda* 基因簇基因置换质粒。

1.7 抗生素基因簇敲除突变菌株的筛选

通过同源重组删除基因簇的部分序列来失活抗生素合成基因簇,为便于今后菌株的应用,不采用抗生素抗性基因来替换待中断的基因,因此,基因中断菌株没有抗生素抗性,筛选必须分为两步进行。首先,接合转移得到整合了中断载体的链霉菌,PCR 筛选并且验证单交换;其次,正确的单交菌株在抗性

MS 平板培养至产孢, 孢子稀释涂布到无抗的 MS 平板上培养, 用影印的方法将长好的菌落转印到抗生素平板上培养, 对照 2 个平板挑选无抗性的克隆, 然后抽提总 DNA, 通过 PCR 筛选双交换突变株。

1.8 抗生素生物活性测定

将待测链霉菌接种到 NA 培养基上, 30 °C 培养 7 d 进行固体发酵。指示菌芽孢杆菌于 LB 培养基中 37 °C、200 r/min 活化过夜, 然后转接培养至 $D_{600\text{ nm}} = 0.4 \sim 0.6$, 取 200 μL 培养物均匀涂布到营养琼脂平板上, 接着用打孔器取相同大小的链霉菌发酵菌块放置到上述营养琼脂平板上, 37 °C 培养 12~16 h 后观察抑菌圈。

2 结果与分析

2.1 *cda* 基因簇敲除

1) *cda* 基因簇敲除质粒 pHLT4 的构建。从天蓝色链霉菌 k7 菌株的总 DNA 中克隆得到 pHLT2, PCR 验证 mini-Tn5-aac(3)IV 一侧含有约 14 kb 的 *cda* 基因簇部分序列, 在此基础上构建 pHLT4(图 1)。pHLT4 与 pHLT2 相比: *cda* 基因簇 DNA 序列中从 *Pst*I 到 *Eco*RI 位点的 7.1 kb 部分片段被 *afsRS_{da}-oriT* 所取代; 且 pHLT4 中 *afsRS_{da}-oriT* 两侧可用于同源交换的染色体 DNA 片段分别为 4 544 和 2 312 bp, 可用于 *cda* 基因簇的基因置换。

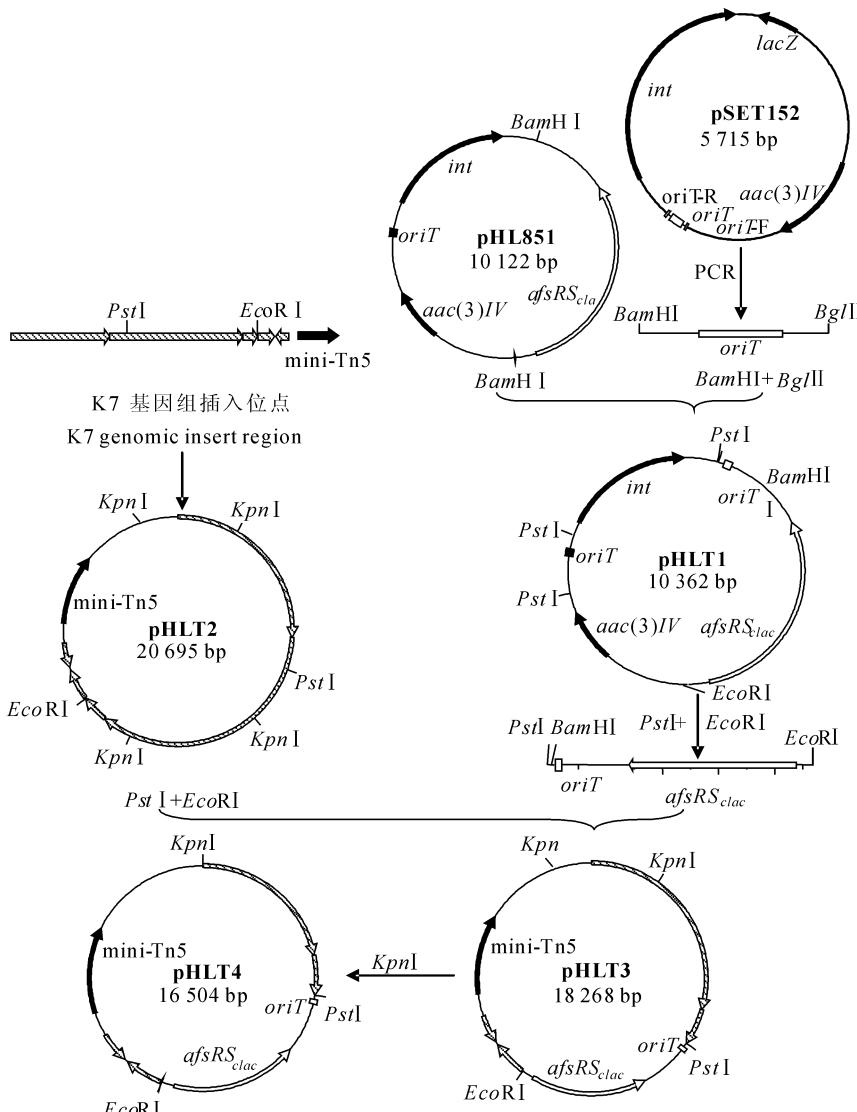
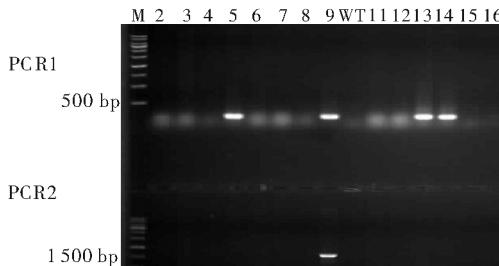


图 1 *cda* 生物合成基因簇基因置换质粒 pHLT4 的构建流程

Fig. 1 Construction of pHLT4, the *cda* gene cluster gene replacement plasmid

2) *cda* 基因簇敲除菌株的构建。将 pHLT4 接合转移到变铅青链霉菌 TK24 中,筛选阿泊拉霉素抗性(Apr^R)的接合转移子,用 *oriT_{KK2}* 特异性引物进行 PCR 验证菌株基因型为单交换菌株。从 Apr^R 的单交换菌株后代中通过影印筛选得到阿泊拉霉素敏感(Apr^S)菌株,设计 2 个 PCR 反应从 Apr^S 菌株中筛选、验证双交换菌株,双交换只有 PCR1 可以有阳性条带产生,野生型没有阳性条带,而单交换则 2 个 PCR 反应都有阳性条带(图 2)。图 2 中 5、13 和 14 号为正确的双交换菌株,命名为 SBT2。与 TK24 出发菌株相比,SBT2 明显产生更多的蓝色色素(图 3)。



M: 1 kb 标准(对照) 1 kb marker; WT: 野生型 *S. lividans* *S. lividans* wide type; 2~16: 来源于 pHLT4 接合转移子的衍生菌株 Strains derived from an Apr^R pHLT4 exconjugant.

图 2 *cda* 基因簇置换菌株的 PCR 筛选与鉴定

Fig. 2 PCR screening and confirmation of the *cda* gene cluster replacement strains

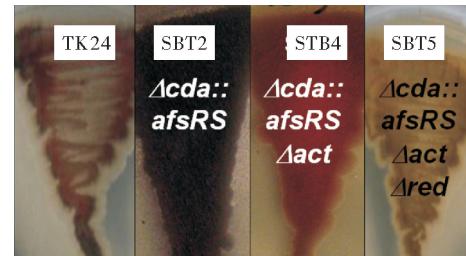
2.2 放线紫红素和十一烷基灵菌红素基因簇的基本敲除

将放线紫红素基因簇 *act* 敲除载体 pHL737 转入大肠杆菌 ET12567/pUZ8002,接合转移到 SBT2 中,得到 Apr^R接合转移子,再用 PCR 方法筛选验证单交换菌株。通过影印筛选,从 Apr^R 后代得到 Apr^S菌株,其中正确的双交换菌株不再产生蓝色的放线紫红素,菌株命名为 SBT4;同时观察到 SBT4 大量合成红色的十一烷基灵菌红素(图 3)。

将十一烷基灵菌红素基因簇 *red* 敲除载体 pHLY32 接合转移到 SBT4 中,得到 Apr^R接合转移子,先进行单交换菌株筛选,再筛选双交换菌株,得到既不产蓝色 ACT 也不产红色 RED(图 3)、且不产钙依赖性抗生素 CDA 的菌株(图 4),命名为 SBT5。

2.3 放线紫红素在 SBT5 中的表达

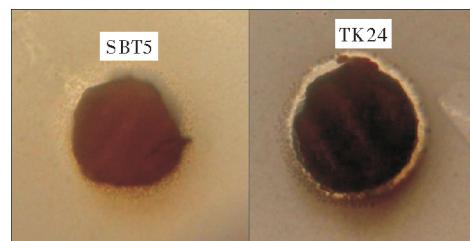
质粒 pMM1 上含有来自天蓝色链霉菌的放线紫红素生物合成基因簇,将 pMM1 引入 SBT5 和出发菌株 TK24 中,以空载体 pSET152 作为对照,2 个菌株均具有较高接合转移效率(数据未给出)。观察比较 2 个菌株表达次级代谢基因簇能力(图 5)。结果显示野生型菌株加入空载体 (TK24 :: pSET152, 含有 ACT 和 RED 两个色素类抗生素基因簇) 呈淡红色;用 pMM1 引入额外拷贝 *act* 基因簇后,含有 2 个 *act* 基因簇拷贝的菌株 TK24 :: pMM1 产蓝色色素有所提高,而含 pMM1 的 SBT5 菌株大量产生放线紫红素,根据深蓝色判断其产量远远高于含有 1 个或 2 个拷贝 *act* 基因簇的野生型菌株。超量表达 ACT 的 SBT5 接合转移子经过多次传代仍保持较高产量。



在 NA 培养基上培养 TK24 及其突变株 SBT2、SBT4 和 SBT5, 30 °C 4 d(平板背面)。TK24 和其 mutant SBT2, SBT4 和 SBT5 were cultured on NA agar plates for 4 d, 30 °C.

图 3 TK24 及其抗生素基因簇敲除菌株产色素的表型观察

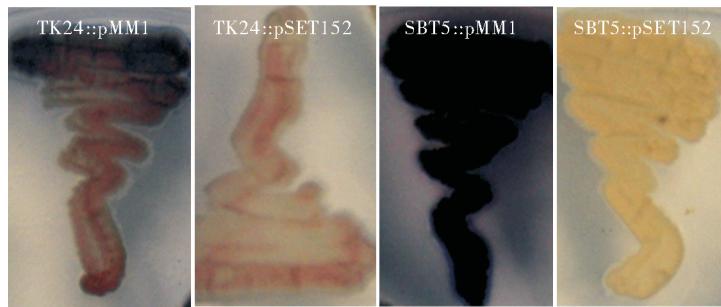
Fig. 3 Pigments production by TK24 and its gene clusters replacement mutants



链霉菌在 NA 培养基上发酵,发酵平板上的琼脂块用于生物测定。TK24 产生抑菌圈,SBT5 不产生。*Streptomyces* strains were fermented on NA agar, then the agar plugs from fermentation agar were used for the bioassay. TK24 produced a zone of inhibition, while SBT5 did not.

图 4 TK24 和 SBT5 合成钙依赖抗生素的生物测定

Fig. 4 Bioassay of CDA production by TK24 and SBT5



在 SMMS 培养基上接种链霉菌, 30 ℃ 培养 4 d; SBT5::pMM1 产生深蓝色的放线紫红素。*Streptomyces* strains were fermented on SMMS agar, 30 ℃, 4 d. SBT5::pMM1 produced dark blue actinorhodin.

图 5 SBT5 过量表达放线紫红素

Fig. 5 Overproduction of actinorhodin in SBT5

3 讨 论

基因组和宏基因组测序表明, 自然界中的可培养或未培养微生物基因组中蕴含着丰富的次级代谢途径资源, 是天然产物筛选的宝库。然而, 由于大部分基因簇常处于沉默状态, 采用传统方法很难继续从微生物中有效地分离到新的化合物。如何激活这些沉默或隐藏的基因簇以获得相应的化合物, 是新药先导化合物发掘领域亟待解决的瓶颈问题^[14-15], 开发高效的异源表达方法无疑是其中重要的备选方案。

变铅青链霉菌遗传背景清晰、遗传操作简单高效, 是异源表达筛选技术的首选宿主菌, 缺点是其含有内源色素和抗生素基因簇, 且天然次级代谢能力不强。本研究针对这些特点, 改造变铅青链霉菌, 敲除了 ACT、RED、CDA 等 3 个内源抗生素的基因簇, 同时为了激活或者高表达异源基因簇, 还加入了一个多效性正调控基因 *afsRS_{da}*。来源于棒状链霉菌的 *afsRS_{da}* 能够激活沉默的放线紫红素、钙依赖性抗生素和全霉素的生物合成, 并大幅度提高棒酸的产量^[8]。在本研究中也发现, 在 *cda* 基因簇原位加上 *afsRS_{da}* 后, 菌株 SBT2 大量合成放线紫红素; 在进一步敲除 *act* 基因簇后, 由于没有蓝色色素干扰, 在菌株 SBT4 中又观察到十一烷基灵菌红素 RED 大量合成。这些结果表明, 新引入的 *afsRS_{da}* 可以促进不同类型抗生素的大量合成。无疑, 高效表达宿主 SBT5 菌株的成功构建和应用将为我们大量快速发掘新的天然产物提供很好的工具。

参 考 文 献

[1] KIESER H M, KIESER T, HOPWOOD D A. A combined ge-

netic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome[J]. J Bacteriol, 1992, 174: 5496-5507.

- [2] 郑华亮, 白亭丽, 陶美凤. 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[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(4): 12-18.
- [3] HANAHAN D. Studies on the transformation of *E. coli* with plasmids[J]. J Mol Biol, 1983, 166(4): 557-580.
- [4] FLETT F, MERSINIAS V, SMITH C P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting *Streptomyces*[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 155: 223-229.
- [5] KEMPTER C, KAISER D, HAAG S, et al. CDA: calcium-dependent peptide antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3 (2) containing unusual residues[J]. Angewandte Chemie International English Edition, 1997, 36: 498-501.
- [6] HOPWOOD D A, HINTERMANN G, KIESER T, et al. Integrated DNA sequences in three streptomycetes form related autonomous plasmids after transfer to *Streptomyces lividans* [J]. Plasmid, 1984, 11: 1-16.
- [7] 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.
- [8] CHEN L, WANG Y, GUO H, et al. High-throughput screening for *Streptomyces* antibiotic biosynthesis activators[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(12): 4526-4528.
- [9] SAMBROOK J, RUSSELL D. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3th ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
- [10] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. Practical *Streptomyces* genetics[M]. 2nd ed. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [11] FARINET C M. System, knowledge repository and computer-readable medium for identifying a secondary metabolite from a microorganism: USA, US2008/0010025 A1[P]. 2008-01-01.
- [12] BENTLEY S D, CHATER K F, CERDENO-TARRAGA A M, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete

- Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Nature, 2002, 417(6885): 141-147.
- [13] WINTER J M, BEHNKEN S, HERTWECK C. Genomics-inspired discovery of natural products[J]. Curr Opin Chem Biol, 2010, 15(1):22-31.
- [14] HERTWECK C. Hidden biosynthetic treasures brought to light [J]. Nat Chem Biol, 2009, 5(7):450-452.
- [15] SCHWARZER D, FINKING R, MARAHIEL M A. Nonribosomal peptides: from genes to products[J]. Nat Prod Rep, 2003, 20:275-287.

Construction of *Streptomyces lividans* SBT5 as an efficient heterologous expression host

BAI Ting-li¹ YU Yan-fei¹ XU Zhong¹ TAO Mei-feng^{1,2}

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 Three gene clusters controlling the biosynthesis of the antibiotics actinorhodin (ACT), undecylprodigiosin (RED) and calcium-dependent antibiotic (CDA) were sequentially knocked out by gene replacements from the chromosome of *Streptomyces lividans* TK24 to derive SBT5. In SBT5, the global regulatory genes *afsRS_{da}* from *Streptomyces clavuligerus* was integrated in the place of the *cda* gene cluster. The *act* gene cluster from *Streptomyces coelicolor* was introduced into SBT5 to test its capability of expressing secondary gene cluster. The resulting SBT5 exconjugants overproduced ACT comparing with wild-type strains harboring double copies of the *act* gene cluster. SBT5 is an efficient host with a clean secondary metabolism background suitable for heterologously expressing and screening secondary metabolic gene clusters.

Key words *Streptomyces lividans*; heterologous expression host; secondary metabolites; antibiotic biosynthetic gene clusters; gene knockout; *afsRS_{da}*

(责任编辑:张志钰)