

利用同框敲除技术研究Ⅲ型聚酮合酶基因 *orf18* 的代谢产物

原海亮¹ 管仁艳² 何 璟¹

1. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070; 2. 华中农业大学理学院, 武汉 430070

摘要 为了阐明 *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 中Ⅲ型聚酮合酶基因 *orf18* 的功能, 利用同源双交换的方法对该基因进行同框敲除, 采用异位表达的方法进行了相应的回补实验。通过高效液相色谱及液相色谱-质谱联用分析发现基因 *orf18* 的敲除会明显降低发酵产物中苯甲酸盐的含量, 回补该基因能够在一定程度上恢复苯甲酸盐的产量, 表明 *orf18* 在原宿主中极有可能参与苯甲酸盐的生物合成。

关键词 链霉菌; Ⅲ型聚酮合酶; 同源双交换; 同框敲除; 基因回补; 苯甲酸盐

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)01-0074-07

链霉菌是一种产自土壤的革兰氏阳性细菌, 可产生大量具有生物活性的代谢产物, 包括抗生素、抗肿瘤制剂以及免疫抑制剂等^[1]。随着研究的不断深入, 越来越多活性代谢产物的生物合成基因被克隆及分析。根据对应的生物合成酶的特性, 可以将这些作用效果多样、结构纷繁复杂的化合物分为聚酮类、非核糖体多肽类、核糖体合成的寡肽类和氨基糖苷类这几个主要的类群。而聚酮类和非核糖体多肽类是其中最大的两类化合物。研究表明无论是在微生物还是在植物中, 聚酮合酶 (polyketide synthases, PKS) 都被认为是负责合成聚酮类化合物的关键酶^[2]。聚酮合酶根据其作用机制可分为三类: I 型 PKS 是一个巨大模块式的多功能多肽, 可合成大环内酯类、多烯类、聚醚类抗生素, 如红霉素、利福霉素等^[3], 在酵母及哺乳动物中也有发现^[4]; II 型 PKS 是一个大的多酶复合体, 各个功能结构域都由独立的基因编码, 并且可以重复利用, 主要负责合成芳香族化合物, 如四环素、柔红霉素等; III 型 PKS 又称为查尔酮合酶, 主要分布于植物界, 在少数细菌中也有发现, 负责合成许多天然聚酮化合物如苯甲酮、间苯三酚、查耳酮、色酮、吡喃酮等含有黄酮类骨架的化合物^[5], 使植物具有抵御外界胁迫的能力, 在抗氧化、抗诱变、抗病害等方面发挥着重要的作用。与 I 型和 II 型 PKS 不同, III 型 PKS 的结构相对简单, 由

两个亚基组成二聚体来完成整个聚酮链的复杂反应, 包括底物反应的起始、延伸单位的缩合、环化以及芳香化等^[6]。如何利用如此简单的结构完成复杂的反应过程, 成为了目前研究者们十分感兴趣的问题。

III 型 PKS 在早期一直被认为是植物次级代谢所特有的酶类^[7], 直到日本研究者在灰色链霉菌中发现了一个 RppA 类的 III 型 PKS^[8], 从此揭开了细菌中 III 型 PKS 的研究序幕。RppA 类聚酮合酶是目前研究较多的一类 III 型 PKS。在体外反应中, 它可以在不需要酰基载体蛋白的辅助作用下, 催化底物丙二酰辅酶 A 发生脱羧缩合反应, 形成 1, 3, 6, 8-四羟基萘 (THN)。但是在细胞内很少能够检测到 THN 的存在, 推测 THN 作为中间产物在细胞内会被其他酶类加工修饰, 如乙酰化、磷酸化、糖基化等, 从而形成多种多样的终产物。

随着测序技术的发展, 越来越多的 III 型 PKS 基因在细菌中被发现。笔者所在实验室在抗肿瘤药物 azinomycin B 的产生菌 *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 的全基因组测序分析中, 发现了一个 III 型 PKS 基因 *orf18* 编码 RppA 类的聚酮合酶^[9], 在异源表达宿主内可积累产物 THN, 但在野生型菌株内却没有检测到 THN 及其衍生物的存在。RT-PCR 结果证实 *orf18* 在原宿主中是可以正常转录表达的。那么它到底参与了哪种(些)化合物的生

收稿日期: 2014-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270136); 教育部留学回国人员科研启动基金项目([2009] 1590); 教育部新世纪人才支持计划项目(NCET-08-0779)

原海亮, 硕士研究生, 研究方向: 微生物次级代谢调控基因工程. E-mail: yuanhailiang2010@163.com

通信作者: 何 璟, 博士, 教授, 研究方向: 微生物次级代谢调控. E-mail: hejingj@mail.hzau.edu.cn

物合成呢？本研究利用同源双交换的方法构建了 *orf18* 的基因敲除菌株及回补菌株，旨在通过分析表型及代谢产物的变化来鉴定 *orf18* 基因可能的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材 料

1) 菌株和质粒。大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 、大肠杆菌 (*E. coli*) S17-1、*Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158、质粒 pOJ260 和 pWS052 由笔者所在实验室保藏，pMD19-T 购于 TaKaRa 公司。

2) 培养基及抗生素。大肠杆菌培养采用 LB 培养基；链霉菌接合转移培养基为 Modified-ISP4；链霉菌液体培养基为 10.3% YEME 和 TSB；*S. sahachiroi* ATCC 33158 孢子培养基为 PS5；*S. sahachiroi* ATCC 33158 液体发酵培养基为 R2YE。LB 培养基中卡那霉素终质量浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，安

普拉霉素终质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，萘啶酮酸终质量浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，链霉菌培养中安普拉霉素终质量浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3) 试剂和酶类。本研究使用的限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均采购于 Thermo Fisher Scientific 公司，去磷酸化酶采购于 Promega 公司；PCR 相关试剂采购于东盛生物科技有限公司；胶回收试剂盒购买于爱思进生物科技有限公司；引物由金斯瑞生物科技有限公司合成。

4) 实验仪器。高效液相色谱仪 (HPLC) 为 Agilent 1260 LC；液质联用质谱仪 (LC-MS)：Agilent 1260 LC-Agilent 6540 UHD Accurae- Mass；其他常规实验仪器购买于 Eppendorf 公司。

1.2 引物设计

本研究根据 *orf18* 基因的序列和载体序列设计了不同用途的引物，所有的引物序列及作用如表 1 (下划线序列为酶切位点序列) 所示。

表 1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Function
orf18L- <i>Xba</i> I	AAATCTAGACAGCAGAGGCAGCGGCATCTCACC	扩增 <i>orf18</i> 基因左同源臂
orf18L- <i>Hind</i> III	AAAAAGCTTCAGCTCGGCGTCCAAAGACCCCA	Amplification of the left one of homologous arms
orf18R- <i>Xba</i> I	AAATCTAGAGAGGCGTGATGGGCTTCGGCAGAA	扩增 <i>orf18</i> 基因左同源臂
orf18R- <i>Eco</i> R I	AAAGAATTCTCGCAAGCCTCGGAAACTACG	Amplification of the left one of homologous arms
orf18-cl- <i>Xba</i> I	AAATCTAGAGGCGACTCCGGACAGCAGAAAC	扩增 <i>orf18</i> 基因，构建回补菌株
orf18-cl- <i>Eco</i> R I	AAAGAATTCTGAGGGAGAACAGGTGGTGGTC	Amplification of the <i>orf18</i> for the complementary strain
orf18-qc-R	ACGACCGGGCCAGGAACACTCAG	筛选 <i>orf18</i> 基因的双交换菌株
orf18-qc-F	GGCCGGTCAGGGACGACGCTCTTGG	Screening for double exchange strains
152BR	GGAAACAGCTATGACATGATTACGAA	筛选 <i>orf18</i> 基因的回补菌株
JTF	GGATGTGCTGCAAGGCGATTA	Screening for complementary strains

1.3 常规实验技术

链霉菌总 DNA 的抽提见参考文献 [10]；大肠杆菌转化以及质粒抽提见参考文献 [11]。

1.4 重组质粒 pYHL001 的构建

以 *S. sahachiroi* ATCC 33158 总 DNA 为模板，利用引物对 orf18L-*Xba*I/*Hind*III 扩增出 2.8 kb 大小的左同源臂，同时用引物对 orf18R-*Xba*I/*Eco*R I 扩增出 2.6 kb 大小的右同源臂。将 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接后进行测序分析，验证序列信息正确后，分别采用限制性内切酶 *Xba* I + *Hind*III 和 *Xba* I + *Eco*R I 对同源臂 orf18-L 和 orf18-R 进行双酶切处理，并与 *Hind*III + *Eco*R I 处理过的 pOJ260 载体进行三片段连接，转化大肠杆菌 DH5 α ，挑选安普拉霉素抗性菌落，酶切验证正确后命名为 pYHL001。

1.5 重组质粒 pYHL002 的构建

以 *S. sahachiroi* ATCC 33158 总 DNA 为模板，采用引物对 orf18-cl- *Xba* I / *Eco*R I 扩增出 1 306 bp 的 *orf18* 基因片段。PCR 产物与 pMD19-T 载体连接后进行测序分析，验证序列信息正确后，利用 *Xba* I + *Eco*R I 对 PCR 产物进行双酶切处理，与相同酶处理过的载体 pWS052 进行连接，转化大肠杆菌 DH5 α ，挑选安普拉霉素抗性菌落，酶切验证正确后命名为 pYHL002。

1.6 链霉菌 *S. sahachiroi* ATCC 33158 的接合转移

将验证正确的重组载体转化大肠杆菌 S17-1，选择正确的克隆子于 5 mL 的 LB (含有安普拉霉素) 中，37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。按 1 : 100 的体积比将过夜培养物转接于 50 mL 新鲜 LB (含有安普拉霉素)

中,于 37 ℃ 继续培养至 $D_{600}=0.4\sim 0.6$ 。吸取 2 mL 的培养物,离心收集菌体,用等体积的 LB 将大肠杆菌细胞洗 2 次后,重新悬浮于 100 μL 的 LB 中。用 1 mL 的 TSB 将接合转移所需的 *S. sahachiroi* 孢子(孢子量约为 10^8 个)清洗 3 次,并用 500 μL TSB 重悬,50 ℃ 热激 10 min 后,37 ℃ 温育 2~5 h。温育后用 1 mL 的 LB 清洗 3 次,用 100 μL 的 LB 重悬孢子。取 100 μL 含有重组质粒的 S17-1 菌株和 100 μL 孢子混合均匀,将其混合物涂 Modified ISP-4 平板上,30 ℃ 培养 16~20 h 后,采用安普拉霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和萘啶酮酸(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对接合转移平板进行覆盖,待多余水分挥发后,30 ℃ 继续培养。3~5 d 即可挑取潜在的接合子于加有安普拉霉素的 PS5 选择平板上,划单菌落分离,重复 3 次。挑取选择平板上的接合子接种到 YEME 中,抽总 DNA 进行 PCR 验证。

1.7 菌株发酵及产物萃取

将野生型菌株、双交换菌株 YHL001 和回补菌株 YHL002 接种到 200 mL R2YE 培养基中,28 ℃、180 r/min,发酵 5 d。离心收集发酵液,用等体积的乙酸乙酯进行萃取,萃取液经减压蒸干后,溶于 1 mL 甲醇。

1.8 检测条件

1)HPLC 检测条件。波长为 254 nm,流动相为水和乙腈,洗脱条件如下:0~30 min 乙腈由 5%~40%,30~40 min 乙腈由 40%~90%,40~43 min 乙腈由 90%~95%,43~50 min 乙腈由 95%~5% 梯度洗脱,流速为 0.5 mL/min。

2)LC-MS 检测条件。在阴离子模式下,LC 检测波长为 254 nm,流动相为水(含有 0.1% 甲酸)和乙腈,洗脱条件如下:0~15 min 乙腈 5%~60%,15~17 min 乙腈 60%~95%,17~20 min 乙腈保持 95%,流速为 0.3 mL/min。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

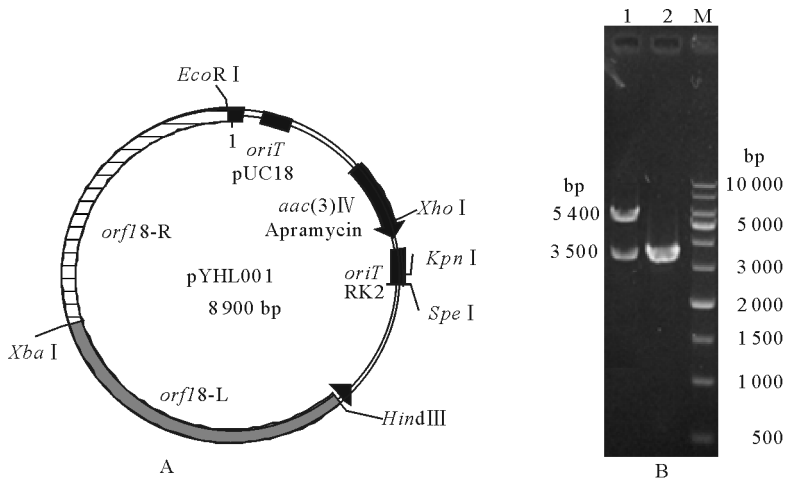
1)质粒 pYHL001 的构建。通过 PCR 的方法将基因 *orf18* 上下游的 DNA 片段扩增出来,分别作为 2 个同源臂。左同源臂 *orf18-L* 止于基因 *orf18* 读码框的第 81 位碱基处,右同源臂 *orf18-R* 始于 *orf18* 读码框的倒数第 9 位碱基位置。拟通过同源双交换敲除的区域为这 2 个同源片段之间的间

隔区域,大小为 1 074 bp。可将基因 *orf18* 的编码产物从 387 个氨基酸缩短为 29 个氨基酸,而不破坏其读码框架,避免了极性效应。载体选用大肠杆菌载体 pOJ260,含有可在链霉菌中进行筛选的安普拉霉素抗性基因,没有链霉菌复制子,进入链霉菌细胞后只能通过同源重组插入到染色体中,才能保存下来表现出安普拉霉素抗性。将测序验证正确的左同源臂 *orf18-L* 和右同源臂 *orf18-R* 克隆到载体 pOJ260 中,最终获得双交换质粒 pYHL001(图 1A),经过 *Hind* III 和 *Eco* R I 双酶切验证其构建正确(图 1B)。

2)质粒 pYHL002 的构建。为了证实 *orf18* 基因的敲除没有引起极性效应,构建了回补 *orf18* 所需的重组质粒。通过 PCR 扩增出基因 *orf18* 完整的 ORF 及其上游的核糖体结合位点(RBS),大小为 1 306 bp,克隆到链霉菌载体 pWS052 的红霉素抗性基因的强启动子 P_{ermE^*} 的下游,得到回补质粒 pYHL002(图 2A)。链霉菌载体 pWS052 含有来源于链霉菌噬菌体 ϕC31 的整合酶基因 *att* 和整合位点 *attP*,进入链霉菌后可与染色体上的 *attB* 位点发生位点特异性重组而整合到染色体上,表现出安普拉霉素抗性。最后采用 *Xba* I 和 *Eco* R I 对重组质粒进行双酶切验证,结果显示其构建正确(图 2B)。

2.2 双交换突变菌株 YHL001 的构建

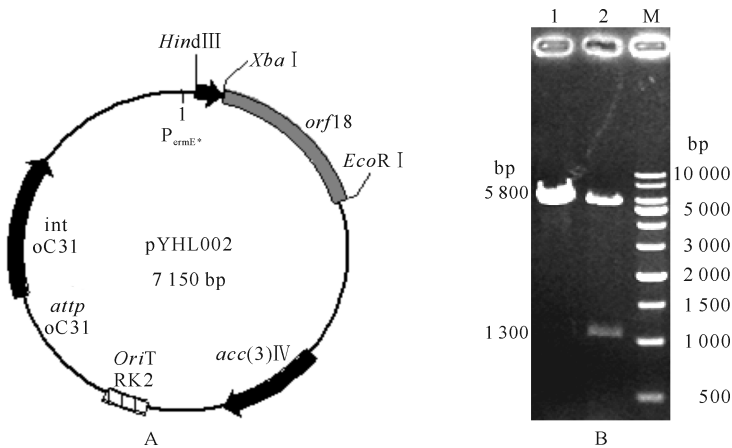
将双交换质粒 pYHL001 通过接合转移的方法导入 *S. sahachiroi* ATCC 33158 中,获得具有安普拉霉素抗性的接合子,即为发生了第 1 次重组的单交换突变菌株。然后将单交换菌株接种到不含有抗生素的 PS5 平板上进行松弛培养 3 代后,收集孢子,通过稀释影印筛选得到了 11 株对安普拉霉素敏感的菌株。敏感菌株既有可能是在同一个同源臂上发生第 2 次重组得到的野生型菌株,也有可能是在另外一个同源臂上进行第 2 次重组得到的双交换突变株(图 3A)。为了挑选出正确的菌株,我们抽提了敏感菌株的总 DNA,使用分别位于 2 个同源臂上的引物对 *orf18-qc-R/F* 进行 PCR 检测(图 3A),野生型菌株的扩增产物为 1 636 bp,双交换菌株因为有 DNA 片段的缺失,扩增产物为 562 bp,2 种 PCR 产物大小正好相差 1 074 bp,与缺失区域大小相符(图 3B)。敏感菌株中有 5 株为基因 *orf18* 的双交换同框敲除突变菌株 YHL001。



M: 1 kb marker; 1: pYHL001/*Hind* III + *EcoR* I, 预期出现 2 条带, 其中载体带大小约为 3.5 kb, 插入片段带大小为两同源臂之和 5.4 kb; 2: pOJ260/*Hind* III + *EcoR* I, 预期出现 1 条载体带, 大小为 3.5 kb。Two bands were found in the sample of pYHL001 DNA digested with *Hind* III and *EcoR* I (line 1). One is the vector band (about 3.5 kb); the other is the insert band (about 5.4 kb) containing two homology arms. Only one band (about 3.5 kb) was found in the sample of the vector pOJ260 digested with *Hind* III and *EcoR* I (line 2).

图 1 质粒 pYHL001 图谱 (A) 和双酶切验证结果 (B)

Fig.1 The restriction map of pYHL001(A) and agarose gel of pYHL001 DNA digested by restriction enzymes (B)



M: 1 kb marker; 1: pWS052/*Xba* I + *EcoR* I, 预期出现 1 条载体带, 大小为 5.8 kb; 2: pYHL002/*Xba* I + *EcoR* I, 预期出现 2 条带, 其中载体带大小约为 5.8 kb, 插入片段带大小为 1.3 kb。Two bands were found in the sample of pYHL002 DNA digested with *Xba* I and *EcoR* I (line 2). One is the vector band (about 5.8 kb); the other is the insert band (about 1.3 kb). Only one band (about 5.8 kb) was found in the sample of the vector pWS052 digested with *Xba* I and *EcoR* I (line 1).

图 2 质粒 pYHL002 图谱 (A) 和双酶切验证结果 (B)

Fig.2 The restriction map of pYHL002(A) and agarose gel of pYHL002 DNA digested by restriction enzymes (B)

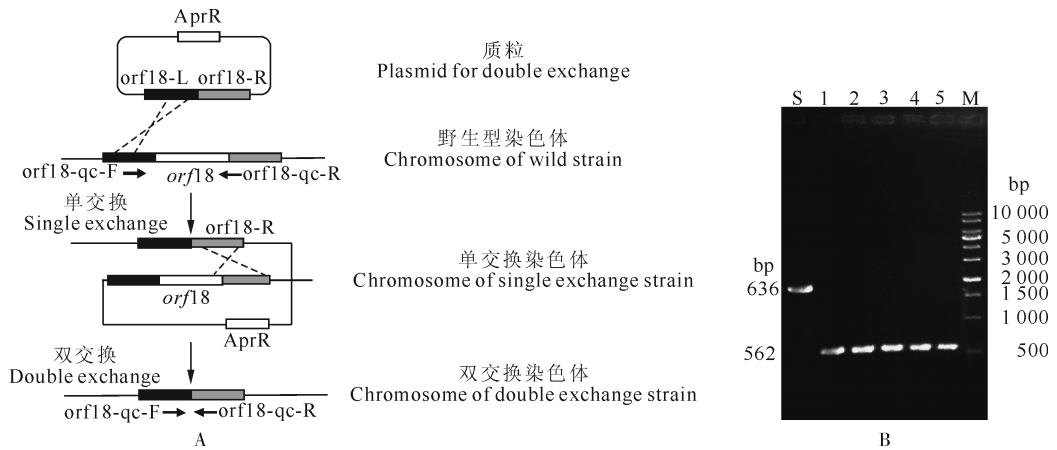
2.3 回补突变菌株 YHL002 的构建

将回补质粒 pYHL002 经过接合转移的方法导入到双交换突变菌株 YHL001 中, 获得具有安普拉霉素抗性的接合子, 抽提接合子的总 DNA, 使用引物对 152BR/JTF 进行 PCR 检测。引物 152BR 和 JTF 分别位于载体 pYHL002 上 *orf18* 基因的两端, 空载体 pWS052 的 PCR 产物为 480 bp, 而回补

菌株插入了 *orf18* 基因, 其 PCR 产物为 1 780 bp, 双交换突变菌株因不含有引物的结合位点而无扩增产物。经过 PCR 检测发现 4 株接合子均为正确的回补突变菌株 YHL002(图 4)。

2.4 突变菌株发酵产物的检测分析

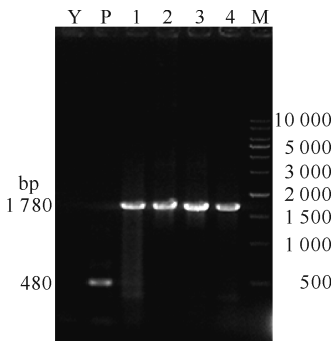
将野生型菌株、双交换菌株 YHL001 和回补菌株 YHL002 接种到 200 mL R2YE 培养基中, 28 ℃、



在 B 图中野生型菌株的 PCR 产物为 1 636 bp(line S), 双交换突变菌株 YHL001 的 PCR 产物为 562 bp(line 1-5)。The 1 636 bp PCR product was found using total DNA of the wild type strain as template (line S), while the 562 bp PCR product was found using total DNA of the in-frame deletion mutant strain YHL001 as template (line 1-5). Line M is the 1 kb ladder marker.

图 3 利用同源双交换敲除 *orf18* 基因的示意图(A)及双交换突变菌株 YHL001 的 PCR 验证(B)

Fig.3 The strategy for in-frame deletion of *orf18* by double crossover (A) and agarose gel of PCR confirmation of the in-frame deletion mutant strain YHL001 (B)



双交换突变菌株 YHL001 没有扩增得到 PCR 产物(Y 为阴性对照); 载体 pWS052 的 PCR 产物为 480 bp(line P); 回补突变菌株 YHL002 的 PCR 产物为 1 780 bp(line 1-4); M: 1 kb marker. No PCR product was found using template DNA of the in-frame deletion mutant strain YHL001 as the negative control (line Y). The 480 bp PCR product was found using template DNA of the vector pWS052 (line P), while the 1 780 bp PCR product was found using total DNA of the complementation mutant strain YHL002 as template (line 1-4).

图 4 回补突变菌株 YHL002 的 PCR 验证

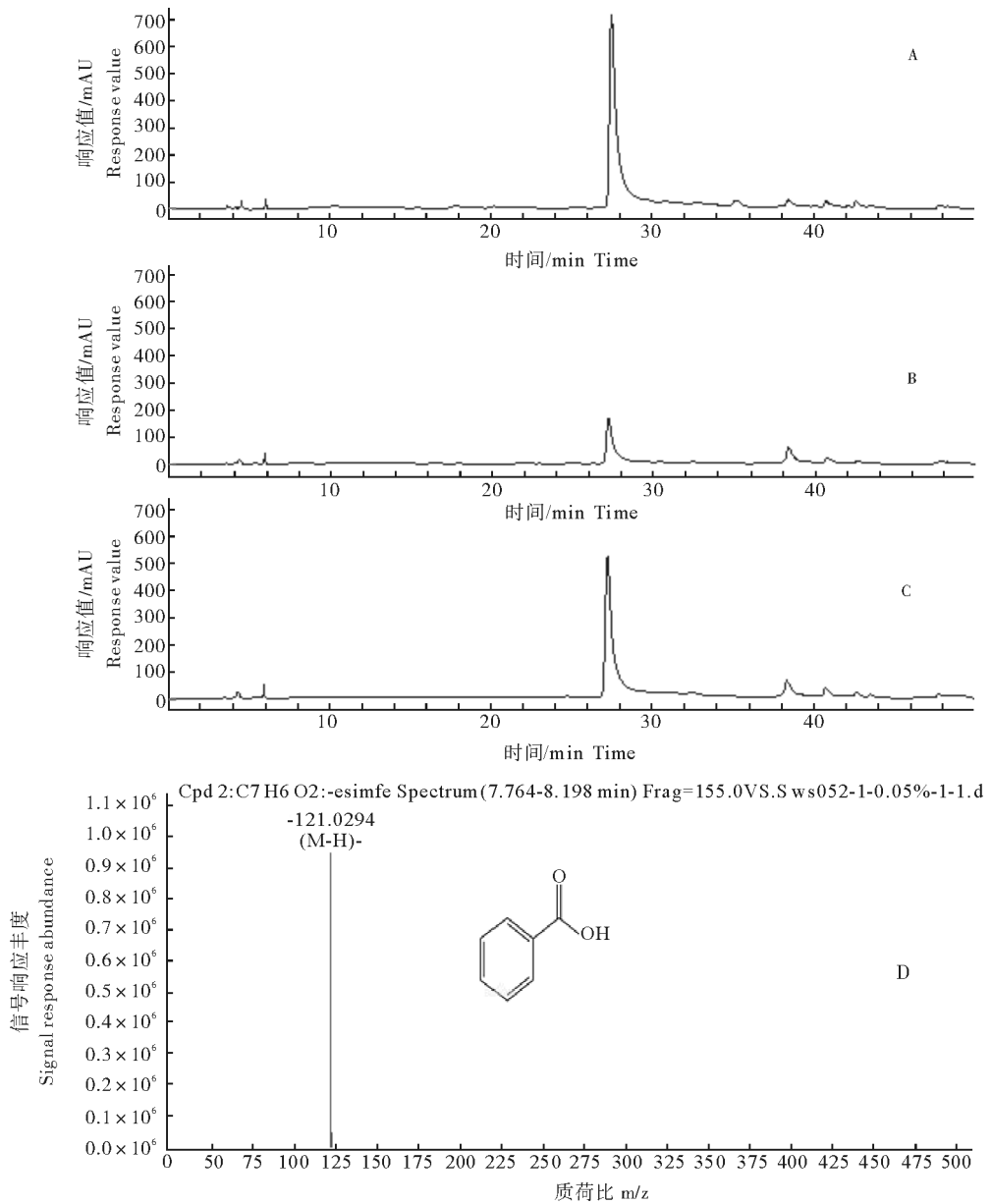
Fig.4 Agarose gel of PCR confirmation of the complementation mutant strain YHL002

180 r/min, 发酵 5 d。离心收集发酵液, 用等体积的乙酸乙酯进行萃取, 萃取液经减压蒸干后, 溶于 1 mL 甲醇。HPLC 分析发现, 相对于野生型菌株, 双交换菌株 YHL001 在保留时间为 28 min 时的吸收峰显著降低(图 5A、B), 而在回补菌株 YHL002 中又发生明显的回复(图 5C)。利用 LC-MS 对该吸

收峰进行进一步的分析, 在阴离子模式下检测结果显示该化合物的 $[M-H]^-$ 为 121.029 4, 与数据库比对, 推测其可能化学结构为苯甲酸物质(图 5D)。利用苯甲酸盐为标准品进行相应的 HPLC 和 LC-MS 分析, 证实该物质为苯甲酸。综上, 基因 *orf18* 能够明显影响原宿主中苯甲酸物质的合成。基因 *orf18* 敲除后苯甲酸盐的含量明显降低, 回补基因 *orf18* 能够在一定程度上恢复苯甲酸盐的产量, 暗示着 *orf18* 极有可能参与原宿主中苯甲酸的合成。

3 讨论

目前在许多链霉菌基因组中都找到了 III 型 PKS 基因, 但是能够发现其对应的代谢产物还很少。在灰色链霉菌和红色糖多孢菌中发现 III 型 PKS 基因可能参与孢子色素的合成^[12], 在针孢链霉菌 *S. aculeolatus* 中 III 型 PKS 参与了抗生素 napyradiomycin 的合成^[13]。前期研究^[9, 14]中, 我们通过异源表达实验证实 *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 基因组中发现的 RppA 类 III 型 PKS 基因 *orf18* 是可以合成代谢中间产物 THN 的, 同时 RT-PCR 证明其原宿主菌中应该是具有生物学功能的, 但野生型菌株中未能检测到其代谢中间产物 THN, 为了寻找 *orf18* 所参与的代谢途径及其对应产物, 本研究成功构建了基因 *orf18* 的双交换



A、B 和 C 分别为野生型菌株、双交换突变菌株 YHL001 和回补突变菌株 YHL002 发酵产物的 HPLC 分析结果；D 为差异吸收峰的 LC-MS 分析结果。A、B 和 C are results of HPLC analyses of WT, YHL001 and YHL002, respectively. D is the result of LC-MS analysis of the absorption peak at 28 min under negative mode.

图 5 突变菌株发酵产物的 HPLC 和 LC-MS 分析

Fig.5 HPLC and LC-MS analyses of the fermentation products of different mutation strains

突变菌株以及回补菌株。利用 HPLC 和 LC-MS 分析发现基因 *orf18* 能够明显影响原宿主中苯甲酸物质的合成,推测其参与了苯甲酸类物质的合成及代谢,这在一定程度解释了为何无法检测到 THN 物质,为探究 *orf18* 基因在野生型菌株中的功能奠定了基础。当然本研究也发现在基因 *orf18* 的敲

除菌株中,苯甲酸的含量只是下降而非消失,表明在原宿主内基因 *orf18* 并不是唯一一个能够合成苯甲酸的基因,在 *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 所包含的一个线性质粒上,我们也发现了另外一个 III 型 PKS 基因。它是否也参与了苯甲酸盐的合成,又能否互补 *orf18* 的功能,还有待于进一

步的研究去解析。

参 考 文 献

- [1] CHALLIS G L, HOPWOOD D A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(S2): 14555-14561.
- [2] GOPAL PRASED GHIMIRE T-J O, KWANGKYOUNG L, JAE K S. Identification of a cryptic type III polyketide synthase (1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene synthase) from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 [J]. Molecules and Cells, 2008, 26: 362-367.
- [3] 姚琳, 郭东林. PKS-NRPS 数据库的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(16): 280-283.
- [4] FUNA N, OHNISHI Y, EBIZUKA Y, et al. Properties and substrate specificity of RppA, a chalcone synthase-related polyketide synthase in *Streptomyces griseus* [J]. J Biol Chem, 2002, 277(7): 4628-4635.
- [5] AUSTIN M B, NOEL J P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases [J]. Natural Product Reports, 2003, 20(1): 79-110.
- [6] LI J, LUO Y, LEE J K, et al. Cloning and characterization of a type III polyketide synthase from *Aspergillus niger* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(20): 6085-6089.
- [7] GROSS F, LUNIAK N, PERLOVA O, et al. Bacterial type III polyketide synthases: phylogenetic analysis and potential for the production of novel secondary metabolites by heterologous expression in pseudomonads [J]. Arch Microbiol, 2006, 185(1): 28-38.
- [8] FUNA N O Y, EBLZUKA Y, HORINOUCI S. Alteration of reation and substrate specificity of a bacterial type III polyketide synthase by site-directed mutagenesis [J]. J Bio Chem, 2002, 367: 781-789.
- [9] 强慧玲, 原海亮, 何璟. *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 中一个 III 型聚酮合酶基因的克隆及功能分析 [J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(6): 13-20.
- [10] TOBIAS K B M, MARK J B. Practical *Streptomyces* genetics [M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [11] SAMBROOK J F E, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [12] CORTES J V J, VELASCO J, FOSER G, et al. Identification and cloning of a type III polyketide synthase required for diffusible pigment biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. Mol Microbiol, 2002, 44(5): 1213-1224.
- [13] WITER J M, MOFFITT M C, ZAZOPOULOS E, et al. Molecular basis for chloronium-mediated metoterpene cyclization [J]. J Biol Chem, 2007, 282(22): 16362-16368.
- [14] 李娜, 黄胜, 何璟. 链霉菌 GEMSM4(6) 中聚酮合酶和非核糖体多肽合成酶基因的筛选及克隆 [J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(4): 73-79.

Studying the metabolites catalyzed by the type III polyketide synthase gene *orf18* through in-frame deletion

YUAN Hailiang¹ GUAN Renyan² HE Jing¹

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

2. College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract To verify the function of *orf18*, a type III polyketide synthase gene isolated from *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 was used to construct the knockout mutant strain by in-frame deletion of *orf18* and the complementation mutant strain by ectopic expression of *orf18* in the knockout strain. The results of HPLC and LC-MS analyses showed that knockout of *orf18* significantly reduced the benzoic acid production. Complementation of *orf18* recovered the yield of benzoic acid. It is indicated that *orf18* is involved in the biosynthesis of benzoic acid in the original host strain.

Keywords *Streptomyces sahachiroi*; type III polyketide synthase; homologous double-crossover; in-frame deletion; gene complementation; benzoate