

链丝菌素生物合成基因簇的克隆及其异源表达

陈萌¹ 徐敏¹ 王业民¹ 白亭丽² 毕德玺¹ 邓子新¹ 陶美凤¹

1. 上海交通大学生命科学技术学院/微生物代谢国家重点实验室, 上海 200030;

2. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 通过基因组粘粒文库的高通量接合转移、异源表达和生物活性测定, 结合 DNA 序列测定, 从刺孢吸水链霉菌 AA97026 中筛选具有广谱抗菌活性的小分子化合物及其生物合成基因簇, 获得 1 个对革兰氏阳性细菌和红酵母均有抑制活性的阳性克隆 1H5, 其部分 DNA 序列与链丝菌素生物合成基因相似。含 1H5 的异源链霉菌宿主的发酵液均能检测到链丝菌素的不同组份, 表明 1H5 含有完整的链丝菌素生物合成基因簇。

关键词 链霉菌; 链丝菌素; 基因组粘粒文库; 高通量接合转移; 异源表达

中图分类号 Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)02-0041-07

链丝菌素(streptothricins, 简称 ST), 又名诺尔丝菌素(nourseothricins), 是 1942 年首次从淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*)发酵液中分离得到的碱性水溶性抗生素^[1], 之后在多种链霉菌如诺尔丝链霉菌(*S. noursei*)和娄彻氏链霉菌(*S. rochei*)也分离到类似化合物^[2-3]。链丝菌素抑制细菌蛋白质合成并抑制真核细胞生长, 对革兰氏阳性细菌、阴性细菌和丝状真菌等具有抗生作用, 链丝菌素在国内作为农用抗生素使用, 商品名为“中生菌素”, 用于防治由细菌或真菌引起的多种农作物病害。

链丝菌素化学结构为核苷寡肽类, 是由氨甲酰化的古洛糖胺(*D*-gulosamine)分别与 1 个特殊氨基酸链里定内酰胺(streptolidine lactam)以及 1 个聚 *L*- β -赖氨酸寡肽(聚合度为 1~7)相连而成^[4]。乙酰化修饰分子侧链赖氨酸残基的 β -氨基, 可使链丝菌素失活^[5]; 链里定内酰胺的开环反应则使 ST-D 衍生物改变抗菌谱, 只保留抗细菌活性, 而 ST-F 的开环衍生物则完全丧失抗菌活性^[6]。近年, 从新的链霉菌中也陆续分离到一些结构与活性均不同的链丝菌素衍生物^[7-9]。

1987 年, Horinouchi 等^[5]从淡紫灰链霉菌中克隆了链丝菌素乙酰转移酶(STAT)基因, STAT 能够将乙酰辅酶 A 上的乙酰基转移到 β -赖氨酸上, 从

而导致链丝菌素失活, 因此该基因与链丝菌素的抗性有关。随后, 利用链丝菌素抗性基因作为探针, Fernández-Moreno 等^[3]从娄彻氏链霉菌 F20 中克隆了 1 个 7.2 kb 的 DNA 片段, 其中包括 5 个 ORF, 推测 ORF 1(*sttA*)编码 1 个非核糖体肽合成酶(NRPS), ORF 2(*sttB*)与大环内酯类化合物的抗性相关, ORF 3(*sttC*)编码 1 个水解酶, ORF 4(*sttD*)与已知蛋白不具有同源性, ORF 5(*sttR*)编码 STAT, 通过基因敲除实验证实该片段为链丝菌素生物合成基因簇的一部分。接着, Grammel 等^[10]从诺尔丝链霉菌中克隆了 2 个与链丝菌素生物合成相关的基因 *npsA* 与 *npsB*, 其中 *NpsA* 是一个独立的腺苷酰化结构域, 负责 β -赖氨酸的活化, *NpsB* 则含有一个 PCP 和 E 结构域, 能够与活化了的 β -赖氨酸结合。2012 年, Maruyama 等^[11]利用链丝菌素抗性基因作为探针从娄彻氏链霉菌 NBRC12908 和淡紫灰链霉菌 NBRC12789 中分别克隆了长度约为 34 kb 的链丝菌素生物合成基因簇, 通过同源性比对, 发现娄彻氏链霉菌的链丝菌素基因簇中 ORF 19 是 1 个新的 NRPS, 敲除实验结果表明它与链丝菌素中 β -赖氨酸的聚合程度有关, 在 ORF 19 缺失的菌株中只能检测到含有 1 个 β -赖氨酸残基的链丝菌素。上述基因簇的克隆及部分基因功能的阐释促进

收稿日期: 2015-03-07

基金项目: 国家“973”计划项目(2009CB118905); 国家自然科学基金项目(FC31170084)

陈萌, 硕士研究生, 研究方向: 微生物次级代谢。E-mail: chenmeng88520@126.com

通信作者: 陶美凤, 研究员, 研究方向: 链霉菌次级代谢及其调控。E-mail: tao_meifeng@sjtu.edu.cn

了人们对链丝菌素生物合成机制的理解。本研究通过基因组挖掘从 1 株刺孢吸水链霉菌中克隆到 1 个链丝菌素基因簇,为链丝菌素类化合物的结构优化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

阿泊拉霉素及卡那霉素购于 Amresco 公司,限制性内切酶、T4DNA 连接酶及去磷酸化酶购于 TaKaRa 公司,胶回收试剂盒购于 Omega 公司,包装蛋白购于 Epicenter 公司,链丝菌素标准品购于 Enzo 公司。

1.2 菌株、质粒和培养条件

1) 菌株与质粒。刺孢吸水链霉菌(*Streptomyces hygrospinosus*) AA97026 (以下简称链霉菌 Shs47)由武汉大学提供。变铅青链霉菌(*S. lividans*) SBT5^[12]、毒三素链霉菌(*S. toxytricini*) SBT11(白亭丽等,未发表)以及天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*) M1152 和 M1154^[13]为异源表达宿主。基因组粘粒文库宿主为大肠杆菌 XL1-Blue MR/pUZ8002^[14],载体为 pJTU2554^[15]。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、耻垢分支杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)、蕈状芽胞杆菌(*Bacillus mycoides*)以及红酵母(*Rhodotorula* sp.)为抗生素活性生测指示菌。

2) 培养基。MS 培养基^[16],用于链霉菌产孢与接合转移;R3 培养基^[13],用于链丝菌素的摇瓶发酵;TSBY 培养基^[16],用于链丝菌素发酵的种子培养;R3 固体培养基^[13],用于链丝菌素的固体发酵;LB^[17],用于金黄色葡萄球菌、蕈状芽胞杆菌和大肠杆菌的培养;LB+1%甘油+0.1%吐温 80^[18],用于耻垢分支杆菌的培养;沙博诺培养基^[19],用于红酵母的培养。

1.3 刺孢吸水链霉菌 Shs47 基因组文库的构建

刺孢吸水链霉菌 Shs47 基因组粘粒文库的构建参考 Chen 等^[14]的方法。提取链霉菌 Shs47 的基因组 DNA,用限制性内切酶 *Sau* 3AI 将基因组部分酶切,回收 40 kb 左右的片段,去磷酸化处理;同时将粘粒载体 pJTU2554 用 *Hpa* I 酶切,去磷酸化处理,再用 *Bam*HI 酶切;将处理好的外源片段与载体用 T4DNA 连接酶连接,用 λ 噬菌体包装蛋白包

装,转染 XL1-Blue MR/pUZ8002,将菌液涂于含有阿泊拉霉素及卡那霉素的 LA 平板上,37 °C 培养过夜;挑取长出的克隆子置于 96 孔板培养、保藏。

1.4 基因组粘粒文库的高通量接合转移、异源表达和活性筛选

粘粒文库的高通量接合转移参考 Chen 等^[14]的方法进行。用 48 孔复制器将链霉菌 Shs47 文库接种到涂有合适浓度 SBT5 孢子的 MS 平板上,30 °C 培养 14~16 h 后用阿泊拉霉素以及三甲氧苄氨嘧啶覆盖;继续培养 3~7 d,即可观察到接合转移子。接合转移子产孢后,用 48 孔复制器转接到新的含有阿泊拉霉素以及三甲氧苄氨嘧啶的 MS 平板培养;待产孢后,用 48 孔复制器转接到 R3 固体培养基,30 °C 培养发酵 7 d,将新鲜培养的生测指示菌掺入到 0.5%琼脂的 LA 或者沙博诺培养基中,覆盖到发酵平板上,37 或 30 °C 继续培养 1~2 d,观察抑菌圈情况。挑出产抑菌圈克隆相对应的大肠杆菌粘粒阳性克隆,重新接合转移到链霉菌异源表达宿主,发酵验证其产抗生素活性。

1.5 粘粒阳性克隆的测序及分析

将验证正确的粘粒阳性克隆进行测序,利用 FramePlot 4.0 进行 ORF 的预测,同时利用 NCBI 数据库进行 DNA 以及氨基酸序列的同源比对。

1.6 链丝菌素的发酵与分离提纯

从充分产孢的平板上打取菌块,接种到 TSBY 培养基中,摇种子培养 2 d,再以 1/10 的接种量接种到液体培养基 R3 中,30 °C 摇瓶培养 5 d。将发酵液离心,取上清液,用 20 μ m 孔径的滤膜过滤,取 10 μ L 进行 LC-MS 检测。

1.7 链丝菌素组份的检测

用 LC-ESI-MS-MS 检测发酵产物,根据准分子离子的质荷比值以及二级质谱特征确定链丝菌素的不同组份^[11]。针对已知链丝菌素 7 种组份(ST-XABCDEFGF)的理论相对分子质量,抽提 LC-MS 总离子流中具有既定分子质量的准分子离子,参考标准品中链丝菌素组份的保留时间,检测链丝菌素的不同组份;再根据特征二级质谱,确定链丝菌素组份。LC-MS 条件:色谱柱,Kromasil 5 μ m 100A C18 250 mm $\times$ 4.6 mm。洗脱条件,流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.05%(V/V)的七氟丁酸与 0.05%(V/V)的甲酸的水溶液。0~3 min:10%~25%的

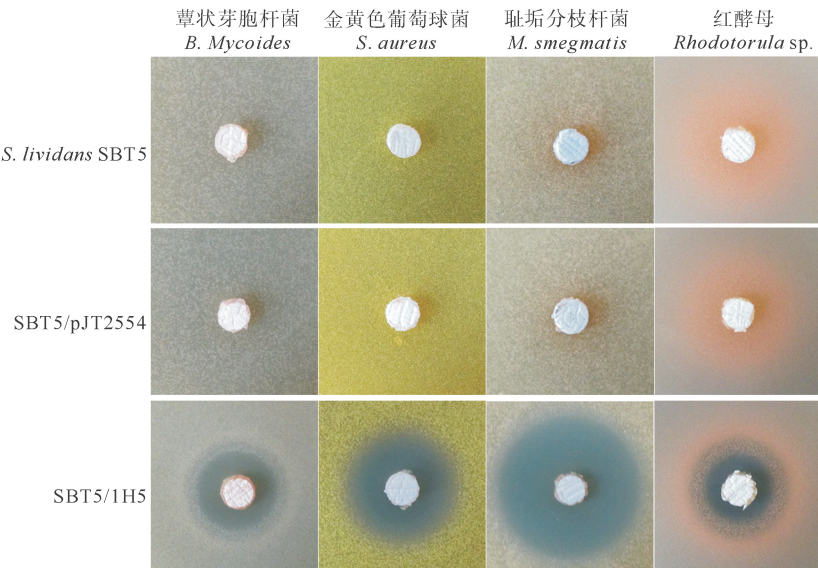
A 相(V/V),3~12 min;30%的 A 相(V/V),12~18 min;100%的 A 相(V/V),18~25 min;10%的 A 相(V/V)^[11]。

2 结果与分析

2.1 链霉菌 Shs47 基因组粘粒文库抗生素活性克隆的筛选

将链霉菌 Shs47 基因组粘粒文库以高通量接合转移的方法导入链霉菌 SBT5,在固体培养基上发

酵,生物活性检测筛选到 1 个对蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)和红酵母(*Rhodotorula* sp.)均有抑制活性的粘粒克隆 1H5。单独将 1H5 再转到链霉菌 SBT5,发酵验证抑菌活性,结果如图 1 所示,含 1H5 的接合转移子对 4 种指示菌均具有明显抑菌活性。说明这种活性物质具有广谱的抗菌作用,不同指示菌对于物质敏感性程度的不同使得抑制圈大小有所差异。



pJTU2554 是粘粒文库的载体,*S. lividans* SBT5 是异源表达宿主。pJTU2554 was the vector of the cosmid library,*S. lividans* SBT5 was used as the heterologous expression host.

图 1 阳性克隆 1H5 的生物活性检测

Fig. 1 Bioassay of the positive clone 1H5

2.2 粘粒 1H5 包含完整的链丝菌素生物合成基因簇

对粘粒 1H5 进行 DNA 序列测定,发现 1H5 包含 1 个小分子化合物生物合成基因簇,与娄彻氏链霉菌 NBRC 12908 中的链丝菌素生物合成基因簇(序列号: AB684619. 1)序列相似性达到 99%(表 1),基因排列顺序也高度相似(图 2),只是 1H5 序列比 AB644619. 1 在左边多 8 个 ORF(-1~

-8),其中 ORF -1 与 ORF 23 和 ORF 24 一样,都编码转座酶。1H5 上的基因簇与淡紫灰链霉菌 NBRC12789 的链丝菌素基因簇(序列号: AB684620. 1)ORF 的相似性也达 70%~92%(表 1)。根据以上序列分析,推测 1H5 编码基因簇表达出的抗菌物质可能为链丝菌素或其衍生物。

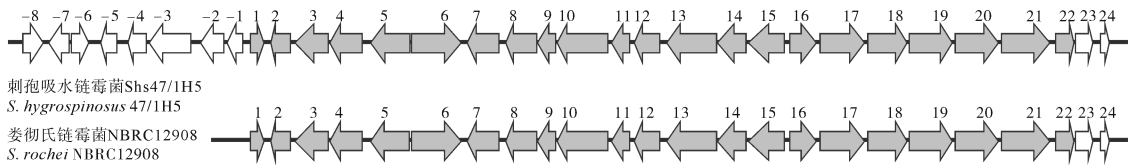


图 2 粘粒 1H5 与娄彻氏链霉菌 NBRC 12908 的链丝菌素基因簇结构

Fig. 2 Organization of the streptothricin gene clusters from 1H5 and *S. rochei* NBRC12908

表 1 粘粒 1H5 与已知链丝菌素生物合成基因的比较

Table 1 Comparison of the biosynthetic genes from cosmid 1H5 and two known streptothricin gene clusters

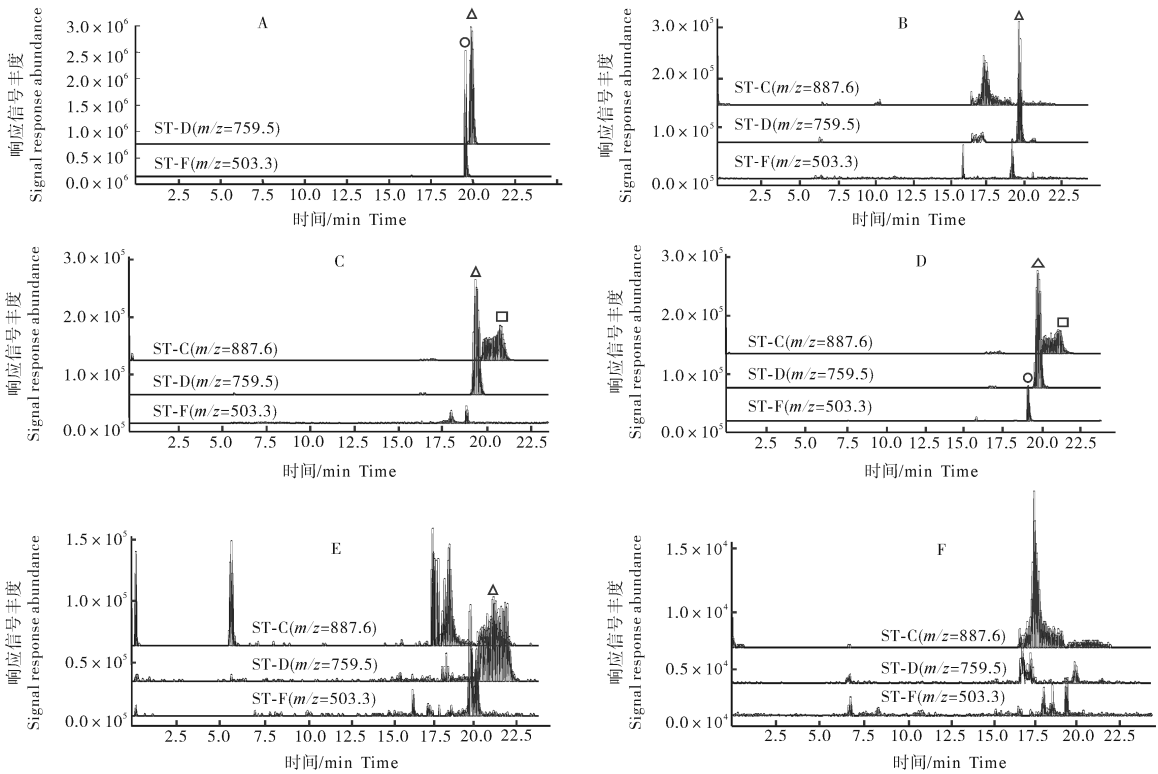
ORF 开放读码框	预测功能 Predicted function	蛋白 大小/aa Length	与萎彻氏链霉菌链丝菌素基因簇 AB684619.1 的同源性 Homology with AB684619.1 (from <i>S. rochei</i> NBRC 12908)			与淡紫灰链霉菌链丝菌素基因簇 AB684620.1 的同源性 Homology with AB684620.1 (from <i>S. lavendulae</i> NBRC12789)		
			ORF	大小/aa Length	同源性/% Identities	ORF	大小/aa Length	同源性/% Identities
1	Acetyltransferase (STAT) 酰基转移酶	189	1	189	100	E	186	70
2	假设蛋白 Hypothetical protein	259	2	259	100	F	248	79
3	水解酶 Hydrolase	276	3	276	99	G	280	70
4	大环内脂磷酸转移酶 Macrolide phosphotransferase	368	4	368	99	H	319	73
5	非核糖体肽合成酶 NRPS	505	5	505	99	I	505	74
6	肽酶 Peptidase	641	6	582	98	J	573	76
7	糖基转移酶 Glycosyl transferase	359	7	359	100	K	359	92
8	甲氨酰基磷酸转移酶 Carbamoyl-phosphate synthetase	410	8	410	100	L	410	81
9	假设蛋白 Hypothetical protein	234	9	234	99	M	234	91
10	氧化还原酶 Oxidoreductase	676	10	676	99	N	675	80
11	酰基转移酶 Acyltransferase	247	11	247	99	O	249	80
12	L-精氨酸-β-羟化酶 L-Arginine-β-hydroxylase	344	12	344	00	P	344	88
13	非核糖体肽合成酶 NRPS	662	13	662	99	Q	616	75
14	转氨酶 Aminotransferase	386	14	386	100	R	386	84
15	L-赖氨酸-2,3-转氨酶 L-Lysine-2,3-aminotransferase	474	15	474	100	S	476	88
16	调控蛋白 Regulatory protein	325	16	325	99	T	215	70
17	甲氨酰基转移酶 Carbamoyl transferase	576	17	576	99	U	577	88
18	非核糖体肽合成酶 NRPS	607	18	607	99	V	612	76
19	非核糖体肽合成酶 NRPS	559	19	559	99	没有同源性 No homology		
20	ABC 转移酶 ABC transporter	566	20	564	96	W	563	76
21	ABC 转移酶 ABC transporter	644	21	644	99	X	634	81
22	酪氨酸/丝氨酸磷酸酶 Tyr/Ser phosphatase	242	22	242	99	没有同源性 No homology		

2.3 粘粒 1H5 在不同链霉菌宿主中均产生链丝菌素

将 1H5 分别重新接合转移到不产生链丝菌素类化合物的 4 株链霉菌(毒三素链霉菌 SBT11、天蓝色链霉菌 M1152 和 M1154 以及变铅青链霉菌 SBT5)中,分别发酵其接合转移子和野生型菌株

Shs47,检测发酵物的抑菌活性,含 1H5 的链霉菌都有明显的抑菌圈,SBT5/1H5 以及 Shs47 的抑菌圈直径略小,而空载体宿主发酵产物没有抑菌圈(数据未显示)。在此基础上,通过 LC-ESI-MS-MS 检测链丝菌素的不同组份(图 3)发现,在毒三素链霉菌 SBT11/1H5 中能够检测到 ST-D(图 3B,三角形标注峰);在天蓝色链霉菌 M1152/1H5 中能检测到 ST-D 和 ST-C(图 3C,三角形和正方形标注峰);而在天蓝色链霉菌 M1154/1H5 中则检测到 ST-F、

ST-D 以及 ST-C 三种组份(图 3D,分别为圆形、三角形和正方形标注峰);在变铅青链霉菌 SBT5/1H5 中检测到 ST-D 组份(图 3E,三角形标注峰),同时也观察到 ST-C 和 ST-F 的准分子离子抽提峰,但没有检测到相应的特征二级质谱信号,可能是 SBT5/1H5 中化合物产量低所导致。在野生型菌株 Shs47 的发酵液中,能够观察到与 ST-D 和 ST-F 相应的准分子离子抽提峰,其保留时间与标准品相应峰相同,但二级质谱没有检测到特征信号(图 3F)。



A:链丝菌素标准品; B:毒三素链霉菌 SBT11/1H5; C:天蓝色链霉菌 M1152/1H5; D:天蓝色链霉菌 M1154/1H5; E:变铅青链霉菌 SBT5/1H5; F:刺胞吸水链霉菌 Shs47。显示抽提的链丝菌素准分子离子峰图谱。圆形(○)、三角形(△)或正方形(□)标注峰分别是在 MS-MS 二级质谱中具有明显的特征分子碎片信号的 ST-F($m/z=503.3$)、ST-D($m/z=759.5$)或 ST-C($m/z=887.6$)组份。A:Streptothricins standard (a mixture of ST-D and ST-F); B;*S. toxytricini* SBT11/1H5; C: *S. coelicolor* M1152/1H5; D: *S. coelicolor* M1154/1H5; E;*S. lividans* SBT5/1H5; F: *S. hygrospinosus* Shs47. Only spectra of extracted specific molecular ions are shown. Labeled peaks, i.e. open circle (○), open triangle (△) or open square (□), are peaks with specific MS-MS signals corresponding to molecular fragments of streptothricin components ST-F($m/z=503.3$), ST-D($m/z=759.5$) or ST-C($m/z=887.6$), respectively.

图 3 粘粒 1H5 在不同链霉菌宿主表达链丝菌素的 LC-ESI-MS-MS 检测图谱
Fig. 3 LC-ESI-MS-MS analysis of the streptothricins produced by different *Streptomyces* strains

3 讨 论

刺胞吸水链霉菌 Shs47 是 1 株从神农架原始森林土壤中分离的链霉菌,初期研究发现其发酵液具有广谱抑菌活性。通过克隆测序,我们从该菌获得

了 1 个抗生素生物合成基因簇,并通过异源表达验证了该基因簇负责链丝菌素的生物合成。与已发表的 2 个链丝菌素生物合成基因簇^[11]相比,1H5 所包含的基因簇与娄彻氏链霉菌的链丝菌素基因簇相似度达到 99%,与淡紫灰链霉菌的基因簇间也具有较

高相似性。链丝菌素是链霉菌中最为频繁出现的抗生素,在抗菌药筛选实践中它的出现频率约为 10%^[20];有趣的是,本研究中 Shs47 基因簇两侧的基因(ORF-1、ORF23 和 ORF24)都编码转座酶,暗示整个基因簇因而可能在不同生物间移动,从而导致其广泛分布在不同链霉菌中。

多聚赖氨酸链的合成与连接是链丝菌素生物合成中非常关键的一步。通过研究娄彻氏链霉菌中的链丝菌素生物合成,Maruyama 等^[11]推测多聚赖氨酸的合成过程如下: β -赖氨酸被独立腺苷酰化结构域蛋白 ORF5 活化生成 L - β -赖氨酸-O-AMP,再转移到另一个 NRPS(ORF18)上;同时腺苷酰化结构域蛋白 ORF19 活化另一个 L - β -赖氨酸,并催化其连接到与 ORF18 相连的赖氨酸之后,延伸形成寡聚赖氨酸链;最后 ORF18 催化寡聚赖氨酸链与链里定中间体相连,释放出链丝菌素产物。

本研究通过用几株不同的链霉菌作为异源表达宿主对链丝菌素基因簇进行表达,发现在不同异源表达宿主中,同一个基因簇表达出了不同的链丝菌素产物,这些产物的主要差别在于 β -赖氨酸聚合程度的不同。这一现象为研究链丝菌素中 L - β -赖氨酸的聚合机制提供了新的思路,即异源表达宿主中可能存在调控因子,能够影响寡聚赖氨酸的合成。

天然链丝菌素具有广谱的抑菌活性,对真核细胞的抑制活性妨碍了它的临床应用。组合生物合成方法已经证明是复杂天然产物结构优化的有效手段,其成功应用的前提是获得化合物的生物合成基因簇,在了解其合成途径基础上对有关基因进行遗传改造,从而获得结构变化的衍生物。本研究获得的链丝菌素基因簇以及对其异源表达的研究可为链丝菌素结构改造及其生物合成调控研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] WAKSMAN S A, WOODRUFF H B. Streptothricin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent, particularly active against gram-negative bacteria[J]. PSEBM, 1942, 49: 207-210.
- [2] BOCKER H, BERGTER F. Nourseothricin--properties, biosynthesis, production[J]. Arch Exp Veterinarmed, 1986, 40(5): 646-657.
- [3] FERNANDEZ-MORENO M A, VALLIN C, MALPARTIDA F. Streptothricin biosynthesis is catalyzed by enzymes related to nonribosomal peptide bond formation[J]. J Bacteriol, 1997, 179(22): 6929-6936.
- [4] KHOKHLOV A S, SHUTOVA K I. Chemical structure of streptothricins[J]. J Antibiot, 1972, 25(9): 501-508.
- [5] HORINOUCI S, FURUYA K, NISHIYAMA M, et al. Nucleotide sequence of the streptothricin acetyltransferase gene from *Streptomyces lavendulae* and its expression in heterologous hosts[J]. J Bacteriol, 1987, 169(5): 1929-1937.
- [6] HAMANO Y, MATSUURA N, KITAMURA M. A novel enzyme conferring streptothricin resistance alters the toxicity of streptothricin D from broad-spectrum to bacteria-specific[J]. J Biol Chem, 2006, 281(28): 16842-16848.
- [7] JI Z Q, WANG M G, ZHANG J W, et al. Two new members of streptothricin class antibiotics from *Streptomyces qinlingensis* sp. nov[J]. J Antibiot (Tokyo), 2007, 60(12): 739-744.
- [8] GAN M L, ZHENG X D, GAN L S, et al. Streptothricin derivatives from *Streptomyces* sp. I08A 1776[J]. J Nat Prod, 2011, 74: 1142-1147.
- [9] 甘茂罗, 郑旭东, 关艳, 等. 链霉菌 I08A1776 产生的水溶性链丝菌素[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(8): 599-606.
- [10] GRAMMEL N, PANKEVYCH K, DEMYDCHUK J, et al. A β -lysine adenylation enzyme and a β -lysine binding protein involved in poly β -lysine chain assembly in nourseothricin synthesis in *Streptomyces noursei*[J]. Eur J Biochem, 2002, 269: 347-357.
- [11] MARUYAMA C, TOYODA J, KATO Y, et al. A stand-alone adenylation domain forms amide bonds in streptothricin biosynthesis[J]. Nat Chem Biol, 2012, 8: 791-797.
- [12] 白亭丽, 俞燕飞, 徐钟, 等. 高效异源表达变铅青链霉菌宿主的构建[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(1): 1-6.
- [13] GOMEZ-ESCRIBANO J P, BIBB M J. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters[J]. Microb Biotechnol, 2011, 4(2): 207-215.
- [14] CHEN L, WANG Y M, GUO H, et al. High-throughput screening for *Streptomyces* antibiotic biosynthesis activators[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(12): 4526-4528.
- [15] LI L, XU Z N, XU X Y, et al. The mildiomycin biosynthesis: initial steps for sequential generation of 5-hydroxymethylcytidine 5'-monophosphate and 5-hydroxymethylcytosine in streptoverticillium rimofaciens ZJU5119 [J]. ChemBioChem, 2008, 9: 1286-1294.
- [16] KIESER T, BIBB M J, CHATER K F, et al. Practical *Streptomyces* genetics[M]. 2nd ed. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [17] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [18] GUERRA-LOPEZ D, DANIELS L, RAWAT M. *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 *fbtC* and MSMEG_2392 are involved in triphenylmethane dye decolorization and coenzyme F420 bio-

synthesis[J]. Microbiology, 2007, 153: 2724-2732.

[19] BOSSCHE H. Biochemical effects of miconazole on fungi I. Effects on the uptake and/or utilization of purines, pyrimidines, nucleosides, amino acids and glucose by *Candida albicans*[J]. Biochem Pharmacol, 1974, 23(4): 887-899.

[20] BALTZ R H. Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? [J]. SIM News, 2005, 55: 186-196.

Cloning and heterologous expression of a streptothricin biosynthetic gene cluster

CHEN Meng¹ XU Min¹ WANG Yemin¹ BAI Tingli²
BI Dexi¹ DENG Zixin¹ TAO Meifeng¹

1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism/College of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China;
2. State Key Laboratory of Agricultural Micobiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract To obtain small molecular antibacterial compound and its biosynthetic gene cluster, a genomic cosmid library was screened by high-throughput conjugation, heterologous expression, bioassay, and combined with DNA sequencing. A positive clone 1H5 expressing growth-inhibition activities against gram positive bacteria and *Rhodotorula* was obtained from the genomic library of *Streptomyces hygrospinosus*. The cosmid 1H5 harbored a cluster of genes highly similar to previously reported streptothricin biosynthetic gene clusters in terms of sequence and gene organization. Streptothricins were detected in the fermentation broth of *Streptomyces* expression hosts carrying 1H5, indicating that this clone contained an entire gene cluster for streptothricin biosynthesis. The cloning and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster pave the way for further study of the biosynthesis, regulation and structural modification of streptothricin.

Keywords *Streptomyces*; streptothricins; genomic cosmid library; high-throughput conjugation; heterologous expression;

(责任编辑: 张志钰)