

# 硫藤黄链霉菌基因组表达文库的构建及筛选

杨丽鸳 朱梦奕 何 璟

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为了探讨硫藤黄链霉菌中可能存在的次级代谢产物合成及调控机制,以链霉菌整合型质粒 pJ-TU2554 为载体,构建了硫藤黄链霉菌的基因组表达文库。以模式菌株变铅青链霉菌为异源表达宿主,通过生物活性筛选获得 9 株具有抑菌活性的异源表达突变菌株,同时通过 PCR 筛选获得多个含有聚酮合酶和非核糖体多肽合成酶基因的克隆子。TLC 及 HPLC-MS 分析发现 6 个携带有 aureothin 生物合成基因簇的 cosmid,通过异源表达在变铅青链霉菌中成功合成聚酮类抗生素 aureothin,证实文库异源表达及筛选的有效性。

**关键词** 硫藤黄链霉菌;天然产物;基因组文库;异源表达;文库筛选

**中图分类号** Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)05-0039-06

微生物在次级代谢过程中产生丰富的活性天然产物,一般对环境中其他微生物具有毒害作用,使得宿主获得自然界的竞争优势并实现群体间的自我保护<sup>[1]</sup>。微生物所产生的天然产物按照化学结构可以分为 $\beta$ -内酰胺类(青霉素<sup>[2]</sup>、头孢菌素等)、氨基糖苷类(卡那霉素、井冈霉素等)、四环素类(四环素、土霉素等)、氯霉素类(氯霉素、甲砒霉素等)、大环内酯类(红霉素、麦迪霉素等)、林可酰胺类(克林霉素、林可霉素等)、寡肽类(万古霉素、硫链丝菌素等)等<sup>[3]</sup>。这些不同类型的天然产物因具有较好的生物学活性而成为近几十年来研究的热点。放线菌尤其是链霉菌属是目前发现的活性天然产物含量最丰富的类群。随着研究的不断深入,越来越多的天然产物的生物合成基因被克隆及分析<sup>[4-5]</sup>,最大的基因簇已经超过 100 kb,其中关于聚酮类和非核糖体多肽类抗生素研究最为深入<sup>[6]</sup>。I 型聚酮合酶(PKS)和非核糖体多肽合成酶(NRPS)分子机制的揭示<sup>[7-8]</sup>使得特定模块的重组杂合成为可能,为通过组合生物学方法获得更多新型抗生素提供了理论基础,为克服近些年来日益严重的细菌耐药性带来了希望<sup>[9-10]</sup>。

硫藤黄链霉菌因能够产生大量的黄色色素,使得菌体在进入次级代谢阶段后变为特异性的亮黄色而被命名。目前在硫藤黄链霉菌的发酵产物中分离

得到的聚酮类抗生素 aureothin<sup>[11]</sup>和二硫吡咯酮类抗生素 thiolutin<sup>[12]</sup>,均为黄色物质且产量较高。聚酮类化合物 aureothin 含有比较稀有的苯硝基、甲基化吡喃酮以及甲烯四氢吡喃环结构,具有抗肿瘤、抗真菌以及杀虫等广泛的生物活性。而二硫吡咯酮类抗生素 thiolutin 对革兰氏阳性和阴性菌均具有抑菌作用,同时还能抑制上皮细胞的粘连及肿瘤细胞的生长。有数据显示,thiolutin 对淋巴细胞的增殖和血小板的凝集都具有抑制作用<sup>[13]</sup>。笔者所在实验室前期利用简并性引物在该链霉菌的基因组中扩增得到多个聚酮合酶(PKS)和非核糖体多肽合成酶(NRPS)基因,暗示着硫藤黄链霉菌具有产生多种活性天然产物的能力及丰富的次级代谢途径。由于硫藤黄链霉菌具有较强的限制修饰系统,外源 DNA 不能有效地导入,使得基因敲除、基因中断等遗传操作方法无法在野生型菌株中开展。因此,本研究采用构建基因组表达文库的方法,在遗传和代谢背景清晰的模式菌株内表达硫藤黄链霉菌的基因,通过文库筛选来研究基因的功能,旨在为发掘新的天然产物及其生物合成途径奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1) 菌种和质粒。硫藤黄链霉菌(*Streptomyces*

收稿日期: 2015-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970059, 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)

杨丽鸳, 硕士研究生。研究方向: 微生物天然产物的生物合成。E-mail: yly920818@126.com

通信作者: 何 璟, 博士, 教授。研究方向: 天然产物的生物合成。E-mail: hejingj@mail.hzau.edu.cn

*thioluteus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 168)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* strain RH3、丝状真菌 *Alternaria alternata*、*Rice rhizoctonia* 和 *Oomycetes* JL-S 由笔者所在实验室收藏;大肠杆菌 EPI300 购自 EPICENTRE 公司;质粒 pJTU2554 由笔者所在实验室收藏。

2)培养基。大肠杆菌培养基为 LA 固体和 LB 液体培养基,硫藤黄链霉菌液体培养基为 M10,变铅青链霉菌液体培养基为 YEME,产孢及发酵培养基为 YD<sup>[14]</sup>。

3)主要试剂。限制性内切酶购自 Fermentas 公司;T4 DNA 连接酶购自 TOYOBO 公司;DNA marker 及 rTaqDNA 聚合酶购自东盛生物科技有限公司;Copy Control Fosmid Library Production Kit 购自 EPICENTRE 公司;所用引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成;其余试剂均购自国药集团。

## 1.2 链霉菌基因组 DNA 的提取

将链霉菌孢子接种于 50 mL M10 培养基中,在 30 °C 摇床中 200 r/min 培养 72 h。菌丝体收集及基因组 DNA 抽提方法见文献[14]。

## 1.3 基因组文库的构建

将 50  $\mu$ L 抽提好的链霉菌总 DNA 加入 10  $\mu$ L 10 $\times$  *Sau*3AI Buffer、40  $\mu$ L 无菌水以及不同量的 *Sau*3AI,37 °C 酶切 30 min 后,加入 1/10 体积的 0.5 mol/L EDTA 终止反应,然后通过脉冲电泳分析部分酶切的效果。选取能够将总 DNA 酶切成 30~40 kb 大小片段的部分酶切条件进行大量酶切。通过脉冲电泳分离不同大小的酶切片段,将包含有 30~40 kb DNA 片段的凝胶切割下来,装入透析袋中并加入适量 1 $\times$  TAE Buffer 进行电洗脱回收。同时将 30  $\mu$ L 质粒 pJTU2554 的 DNA 加入 5  $\mu$ L 10 $\times$  *Bam*H I Buffer、10  $\mu$ L 无菌水以及 5  $\mu$ L *Bam*H I,37 °C 酶切 3 h 后,跑胶回收线性化的载体 DNA 条带,然后用 T4 DNA 连接酶连接载体和处理好的总 DNA。10  $\mu$ L 连接产物与 25  $\mu$ L  $\lambda$  噬菌体包装蛋白混匀后,30 °C 温浴 90 min 后,再加入 25  $\mu$ L  $\lambda$  噬菌体包装蛋白,30 °C 继续温浴 90 min。将 10  $\mu$ L 包装产物与 100  $\mu$ L 大肠杆菌 EPI 300 细胞混匀后,室温放置 20 min,然后涂平板检测克隆子的数量。脉冲电泳条件为:交变时间 1~50 s、电泳时间 19 h、电压 6 V/cm、脉冲场角度 120°、温度 14 °C。

## 1.4 原生质体转化

链霉菌原生质体制备及转化方法参照文献[14]进行。

## 1.5 文库的 PCR 筛选

根据 GenBank 中 aureothin 生物合成基因簇的序列设计特异性引物 2up: 5'-CGGTCCGGGT-GAATGGCTGAAATG-3' 和 2down: 5'-CCGGC-CCGAGGATGTTGAAGGATA-3'、

3up: 5'-CGTGGCGGAGGCTGGGTTGTTTC-3' 和 3down: 5'-AGCGCTGTGCCCTGGTGTCTGTC-3'、KS2for1: 5'-GCACCGGCGCCGATACCAA-3' 和 KS2rev1: 5'-TGCGCCTCCACCACGTCCACCTC-3'、KS145for1: 5'-GTCGCCTCCGGACGCATCTCCTA-3' 和 KS145rev1: 5'-CGCCTCGACCACATCCACAT-CAGC-3',通过 PCR 扩增来筛选文库。首先筛选 plate 库,然后筛选 row 库,再筛选单克隆,最后获得阳性克隆子。PCR 扩增条件为 94 °C 3 min;;94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 1 min,34 个循环;72 °C 10 min。

## 1.6 发酵及 HPLC-MS 分析

将链霉菌孢子接种到 M10 或 YD 培养基上,30 °C 培养 7 d 后,将固体培养基切碎,加入适量的乙酸乙酯萃取 3~4 h 后过滤。滤液用旋转蒸发仪进行浓缩,最后溶于甲醇,使用 0.45  $\mu$ m 有机膜过滤除去不溶物后直接用于 HPLC 和 LC-MS 检测。HPLC 条件为流速 0.5 mL/min;0 min 时, $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 30 : 70$ ;15 min 时, $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 75 : 25$ ;45 min 时, $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 75 : 25$ ;50 min 时, $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 30 : 70$ ;检测波长 345 nm。质谱数据由 Thermo Scientific LTQ FLEET 仪器系统和 Agilent 1100 HPLC 仪器系统获得。使用的条件如下:毛细管电压 45 V,毛细管温度 275 °C,喷雾电压 3.5 kV,相对分子质量范围 100~2 000。

## 2 结果与分析

### 2.1 硫藤黄链霉菌发酵产物的分析

为了确定所获得的菌株与前期研究结果<sup>[15-16]</sup>相符,首先进行菌株的发酵培养,然后通过生物活性测定、HPLC 及 LC-MS 对其代谢产物进行鉴定。生物活性测定结果显示该菌对枯草芽孢杆菌 168 等革兰氏阳性菌、酿酒酵母及多种丝状真菌等都有较强的抑制作用。发酵产物的 HPLC 分析结果如图 1 所示,在 300 nm 波长下可以同时观察到 2 种化合物 aureothin 和 thiolutin 的特征吸收峰。通过 LC-

MS分析进一步确定了这2种化合物的保留时间, 16.3 min处为 thiolutin 的吸收峰,  $[M+H]^+ = 229^{[15]}$ ; 37~39 min处的3个连续的吸收峰为 aureothin, 核质比相同, 均为  $[M+H]^+ = 398^{[16]}$ 。aureothin

为线性多烯类聚酮化合物, 出现3个连续的吸收峰可能与其存在多个空间结构异构体有关。上述结果证实本研究所获得的菌株为硫藤黄链霉菌。

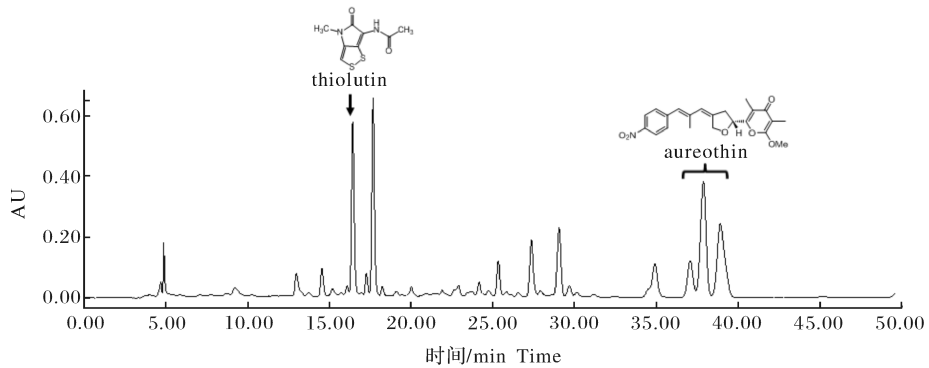


图1 硫藤黄链霉菌发酵产物的 HPLC 分析 (UV, 300 nm)

Fig.1 HPLC analysis of extracts from *Streptomyces thioluteus* (UV, 300 nm)

## 2.2 基因组文库的构建

由于无法建立硫藤黄链霉菌的遗传操作系统, 笔者选择构建基因组表达文库, 希望通过异源表达对其基因组中可能存在的活性天然产物生物合成基因簇进行研究。文库载体 pJTU2554<sup>[17]</sup> 含有3个 *cos* 位点, 包含来自于链霉菌噬菌体  $\phi$ C31 的整合酶基因 *int* 和整合位点 *intP*, 进入链霉菌宿主细胞后可以通过位点特异性整合插入到宿主染色体的 *attB* 位点中, 形成稳定的遗传。提取硫藤黄链霉菌的基因组 DNA, 使用限制性内切酶 *Sau3AI* 对基因组 DNA 进行部分酶切, 回收大小为 30~40 kb 的片段, 与 *Bam*HI 处理过的载体 pJTU2554 连接, 经  $\lambda$  噬菌体包装蛋白包装后, 侵染大肠杆菌 EPI300, 获得 28 个转染平板, 每板约含有 300 个克隆, 整个文库共计约 8 400 个克隆。根据文献<sup>[18]</sup>中的公式  $N = \ln(1-p)/\ln(1-f)$  (式中,  $N$  为文库克隆数;  $p$  为目的基因在文库中出现的概率;  $f$  为插入片段与基因组总长的比值) 计算, 发现 2 100 个克隆就足以覆盖链霉菌基因组的 99.99%。挑取其中 7 个平板中的 2 112 个克隆接种到 22 个 96 孔板中进行文库的保藏。将另外 21 个平板中的菌落分别混合收集起来, 分成 21 个亚库保存于菌种管中, 同时从菌种管中取出一半菌体细胞, 抽提相应的质粒 DNA。

## 2.3 文库的异源表达筛选

通过原生质体转化的方法, 将 21 个亚库的质粒 DNA 分别导入模式菌株变铅青链霉菌 ZX1<sup>[19]</sup> 中进

行异源表达。每个亚库随机挑选 100 个转化子, 共获得 2 100 个转化子。将这些转化子分别接种到 YD 培养基上, 30 °C 培养 7 d 后, 以枯草芽孢杆菌 168、植物细菌性条斑病病原菌 RH3 (*Xanthomonas oryzae* pv *oryzicola* strain RH3)、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为指示菌进行生物活性测定, 共筛选得到 9 株有抑菌活性的异源表达菌株 (表 1)。其中 6 株可以产生蓝色色素, 2 株可以同时抑制 4 种生测指示菌。

## 2.4 文库的 PCR 筛选

虽然通过生物活性测定及表型观察的方法, 从文库中筛选得到了一些具有生物活性的异源表达菌株, 但是在这些异源表达菌株的代谢产物中并没有检测到 aureothin 或 thiolutin 这 2 种抗生素的产生。硫藤黄链霉菌中目前已经报道的只有 aureothin 生物合成基因簇 (*aur*) 的序列<sup>[11]</sup>, 而笔者所在课题组利用简并性引物从该链霉菌基因组中扩增得到多个聚酮合酶和非核糖体多肽合成酶基因, 如 *ks2*、*ks145* 和 *nrps1*。经过序列比对发现它们绝大多数不属于 *aur* 基因簇, 推测可能参与其他聚酮或非核糖体多肽类化合物的合成。为了更有效地筛选并克隆到活性天然产物的合成基因簇, 笔者同时还采用了 PCR 的方法, 定向筛选包含有某个 PKS 或 NRPS 基因簇的克隆子, 然后通过异源表达展开相应的功能研究。

利用引物 KS2for1 和 KS2rev1 筛选得到包含

表 1 异源表达文库的活性筛选结果

Table 1 Screening of the *S. thioluteus* genomic library by heterologous expression

亚库 Sub-library	编号 No.	色素 Pigment	抑菌谱 Inhibition spectrum
1	1-1	浅蓝色 Light blue	<i>B. substilis</i> 168
2	2-1	无 None	<i>B. substilis</i> 168
9	9-1	浅蓝色 Light blue	<i>B. substilis</i> 168
9	9-2	蓝色 Blue	<i>B. substilis</i> 168
9	9-3	蓝色 Blue	<i>B. substilis</i> 168
9	9-4	蓝色 Blue	<i>B. substilis</i> 168
11	11-2	浅蓝色 Light blue	<i>B. substilis</i> 168
13	13-2	无 None	<i>B. substilis</i> 168, <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> strain RH3, <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
19	19-2	无 None	<i>B. substilis</i> 168, <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> strain RH3, <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

有 PKS 基因—*ks2* 的阳性克隆子 1C2、4F2、6G1、9E5、11B12、15B11、22B10 和 23H4；利用引物 KS145for1 和 KS145rev1 筛选得到包含有 PKS 基因—*ks145* 的阳性克隆子 5A2、7C4、8G5、12D4、14H1、16F12、20A3 和 21A2（图 2）；利用引物

NRPSfor1 和 NRPSrev1 筛选得到包含有 NRPS 基因—*nrps1* 的阳性克隆子 3G11、6G2、6G7、6G11、10D8、12F11、15A5、15E1、16C1 和 19C11。从筛选得到的阳性克隆可以看出，这 3 个基因分别位于不同的基因簇内，其阳性克隆之间没有重复。

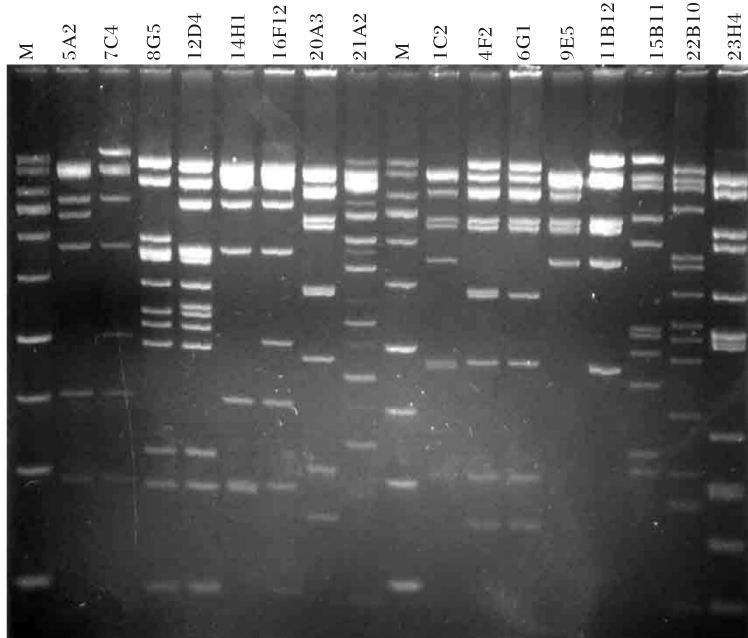


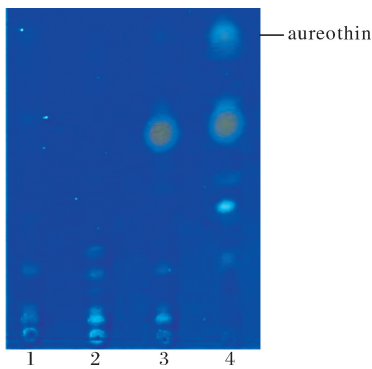
图 2 阳性克隆子的酶切胶图

Fig.2 Agarose gel of restriction digestion of the positive clones with *Bam*HI ( M: 1 kb ladder)

为了验证 PCR 筛选策略的可行性，在已经公布的 *aur* 基因簇两侧分别设计了 1 对引物，通过 PCR 的方法在基因组文库中寻找能够同时用特异性引物对 2up/2down 和 3up/3down 扩增得到阳性的克隆子，即包含完整的 *aur* 基因簇。最终获得 6 个阳性克隆，分别为 2E10、5A4、5A5、12F2、12F10 和 21E4。通过 PCR 及酶切分析进一步对阳性克隆子进行验证。

## 2.5 异源表达产物的检测

将包含有完整 *aur* 基因簇的 6 个阳性克隆子通过原生质体转化分别导入异源表达宿主变铅青链霉菌 ZX1 中，获得相应的 6 个异源表达突变菌株。将异源表达菌株和原宿主菌的孢子接种到 YD 培养基中，30 °C 发酵 7 d。利用薄层层析 (TLC) 分析，在 366 nm 的紫外灯下可以明显看到在异源表达菌株的粗提取物中，有 1 个化合物的带表现出 aureothin 特



1: *S. lividans* ZX1; 2: *S. lividans* ZX1 : : pJTU2554;  
3: *S. lividans* ZX1 : : 12F10; 4: *S. thioluteus* .

图3 异源表达菌株的 TLC 分析

Fig.3 TLC analysis of extracts of the heterologous expression strains

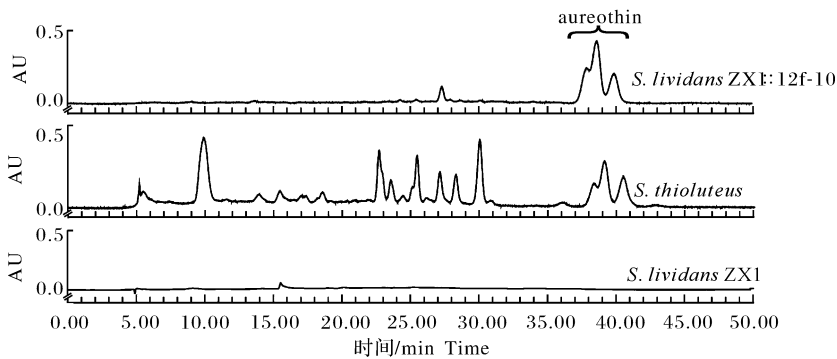


图4 异源表达菌株的 HPLC 分析(UV,320 nm)

Fig.4 HPLC analysis of extracts of heterologous expression strains

的突变菌株,从而证实本研究中异源表达文库的筛选是有效的。

本研究使用了不同的文库筛选方法。传统的生物活性筛选工作量较大且灵敏度低,很容易因筛选模型不合适或产量低而造成漏筛。如本研究在第1次生物活性筛选中就没有得到 aureothin 的异源表达菌株。生物活性测定的方法比较简单直观,但是用它进行文库筛选时显得盲目,因此,后期笔者又采用 PCR 的方法针对基因组中可能存在的 PKS 和 NRPS 基因簇进行了特异性的筛选,成功异源表达出 aureothin。PCR 筛选方法的目标明确,要求已知目标基因的序列。随着测序技术的飞速发展,很多基因甚至基因组的测序工作变得越来越简单,费用也在不断降低,目前 NCBI Genomes 数据库中细菌基因组就有 5 451 个,其中链霉菌基因组有 177 个。基因组学的兴起和迅速发展,增加了采用 PCR 方法筛选文库的可行性,使得该方法被科学研究者广泛用于基因或基因簇的克隆工作。通过 PCR 筛选,本

异性的橙红色荧光(图3)。进一步的 HPLC 分析证实 6 个异源表达菌株均可以产生 aureothin,而作为对照的原宿主菌中没有检测到该化合物(图4)。

### 3 讨论

本研究首先通过生物活性测定及 HPLC-MS 分析对野生型硫藤黄链霉菌的发酵产物进行了鉴定,证实该菌株具有较强的生物活性,能够产生聚酮类抗生素 aureothin 和二硫吡咯酮类抗生素 thiolutin。通过构建硫藤黄链霉菌的基因组表达文库,利用生物活性测定的方法获得 9 株能够产生活性物质的异源表达菌株。同时利用 PCR 筛选的方法获得更多含有聚酮合酶和非核糖体多肽合成酶基因的阳性克隆,并通过异源表达成功获得能够合成 aureothin

研究获得了多个包含有 PKS 和 NRPS 基因簇的阳性克隆,这些基因簇是否参与活性天然产物的合成还有待于进一步的异源表达实验加以验证。

### 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]. PNAS, 2003, 100: 14555-14561.
- [2] MCEVOY G K, SNOW E K. AHFS drug information [M]. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 2007.
- [3] HERTWECK C. The biosynthetic logic of polyketide diversity [J]. Angewandte chemie international edition, 2009, 48(26): 4688-4716.
- [4] 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.
- [5] 张怡, 鲁洲, 黄胜, 等. 链霉菌 SH-62 中肠菌素生物合成基因簇的克隆及异源表达[J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(6): 55-60.
- [6] WALSH C T, OCONNOR S E, SCHNEIDER T L. Polyketide-

- nonribosomal peptide epothilone antitumor agents: the EpoA, B, C subunits[J]. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 2003, 30: 448-455.
- [7] HOPWOOD D A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases[J]. *Chemical reviews*, 1997, 97: 2465-2498.
- [8] WALSH C T. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility[J]. *Science*, 2004, 303: 1805-1810.
- [9] KAO C M, KATZ L, KHOSLA C. Engineered biosynthesis of a complete macrolactone in a heterologous host[J]. *Science*, 1994, 265: 509-512.
- [10] FISCHBACH M A, WALSH C T. Biochemistry: directing biosynthesis[J]. *Science*, 2006, 314: 603-605.
- [11] HE J, HERTWECK C. Iteration as programmed event during polyketide assembly; molecular analysis of the aureothin biosynthesis gene cluster[J]. *Chemistry & biology*, 2003, 10: 1225-1232.
- [12] DE LA FUENTE A, LORENZANA L M, MART N J F, et al. Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin; possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways[J]. *Journal of bacteriology*, 2002, 184: 6559-6565.
- [13] JIA Y, WU S L, ISENBERG J S, et al. Thiolutin inhibits endothelial cell adhesion by perturbing Hsp27 interactions with components of the actin and intermediate filament cytoskeleton [J]. *Cell stress and chaperones*, 2010, 15: 165-181.
- [14] KIESER T, BIBB M, BUTTNER M, et al. *Practical Streptomyces genetics*[M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [15] HUANG S, ZHAO Y, QIN Z, et al. Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus* [J]. *Process biochemistry*, 2011, 46: 811-816.
- [16] HE J, HERTWECK C. Functional analysis of the aureothin iterative type I polyketide synthase[J]. *Chembiochem*, 2005, 6: 908-912.
- [17] 黄胜, 李娜, 周俊, 等. 适用于链霉菌大片段基因组 DNA 克隆和异源表达的细菌人工染色体 (BAC) 载体的构建及应用[J]. *微生物学报*, 2012, 52(1): 30-37.
- [18] GREEN M R, SAMBROOK J. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [19] 白亭丽, 俞燕飞, 徐钟, 等. 变铅青链霉菌高效异源表达宿主 SBT5 的构建[J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(1): 1-6.

## Constructing and screening a genomic expression library of *Streptomyces thioluteus*

YANG Liyuan ZHU Mengyi HE Jing

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

**Abstract** Genome sequencing and bioinformatics analyses indicated that *Streptomyces thioluteus* has great potential to produce a variety of bioactive natural products and possesses complex regulatory mechanisms of secondary metabolites. In order to investigate the biosynthetic pathways of putative secondary metabolites and regulation mechanisms in this strain, a genomic expression library of *S. thioluteus* was constructed by using an integrative *Streptomyces* plasmid pJTU2554 as the vector. Nine heterologous expression mutant strains with antibacterial activities were obtained by bioassay screening of the expression library in the heterologous host of *Streptomyces lividans* ZX1. Positive clones carrying the putative polyketide synthase (PKS) and nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes were screened from the library by PCR. Results of TLC and HPLC-MS analyses showed that heterologous expression of 6 positive cosmids containing the aureothin biosynthetic gene cluster in *S. lividans* ZX1 resulted in the production of the polyketide antibiotic, aureothin. It is indicated that heterologous expression and screening of the library was successful in *S. thioluteus*.

**Keywords** *Streptomyces thioluteus*; natural products; genomic library; heterologous expression; library screening

(责任编辑:张志钰)