

胡欣瑞, 贺卫军, 吕金, 等. 拟无枝酸菌宿主构建及次级代谢基因簇异源表达[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(3): 164-172.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.03.019

拟无枝酸菌宿主构建及次级代谢基因簇异源表达

胡欣瑞, 贺卫军, 吕金, 王业民, 陶美凤

上海交通大学微生物代谢国家重点实验室, 上海 200030

摘要 为将生长快、发酵时间短、遗传操作便捷的稀有放线菌拟无枝酸菌 TNS106 开发成异源表达宿主, 通过同源重组将内源的瑞斯托霉素生物合成关键基因 *rpsA* 替换为 Φ C31 和 Φ BT1 噬菌体细菌附着位点 *attB*, 清除代谢背景并引入整合位点, 得到菌株 HXR1; 将含有来自天蓝色链霉菌的放线紫红素基因簇或来自刺糖多孢菌的多杀菌素基因簇的质粒转到 HXR1 进行异源表达, 检测发酵产物。结果显示, HXR1 成功表达放线紫红素和多杀菌素; 与红色糖多孢菌宿主 LJ161 相比, 放线紫红素的产生提前 1 d, 产量提高 1.3 倍。拟无枝酸菌异源表达宿主 HXR1 可为从链霉菌和稀有放线菌中发现新的次级代谢产物提供有用的平台。

关键词 药物研发; 稀有放线菌; 拟无枝酸菌; 异源表达; 放线紫红素; 多杀菌素; 抗生素; 次级代谢产物
中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)03-0164-09

放线菌来源的天然产物具有多样的化学结构和丰富的生物活性, 在医疗和农业方面具有重要应用价值^[1-2]。其中许多重要抗生素由稀有放线菌产生, 如万古霉素、替考拉宁、红霉素和利福霉素^[3]。近些年, 由于常在链霉菌中重复筛选出已知天然产物, 新型活性化合物的获得效率大大降低, 稀有放线菌作为挖掘新型抗生素的潜在资源, 愈发受到关注^[3-5]。通过基因组学和生物信息学研究发现放线菌基因组中通常含有 20~40 个生物合成基因簇 (biosynthesis gene clusters, BGC)。然而在实验室培养条件下, 仅少数 BGC 产生对应的天然产物, 超过 90% 的 BGC 处于沉默状态, 这些 BGC 被称为隐性基因簇^[6-7]。由于大多数稀有放线菌生长缓慢、遗传操作困难, 将目标化合物的基因簇转到异源宿主中表达成为发现隐性天然产物的有效途径^[8]。这种方法主要取决于 2 个因素: 一是将完整的 BGC 克隆到合适的表达载体中的能力; 二是异源宿主表达外源 BGC 的兼容性。

目前, 链霉菌因其相对完备的遗传操作系统和强大的次级代谢能力被开发成最广泛使用的宿主, 如天蓝色链霉菌 M145、变铅青链霉菌 TK24、白色链霉菌 J1074 和阿维链霉菌 SUKA2 等^[8-10]。这些模式异源宿主具备一些共同的特征, 如: 生长速率快, 遗传操作简单, 遗传背景清晰, 对次级代谢产物的分析

背景低; 能识别并转录外源 DNA, 即能识别异源生物合成基因簇的所有表达调控元件, 以确保所需蛋白质的功能性表达; 能提供丰富的前体和辅因子, 满足不同类型化合物生物合成的需求; 其内源天然产物的表达与调控已有一定程度的了解, 便于对异源途径进行理性设计; 能表达必要的转录后修饰系统, 如磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶, 使天然产物生物合成相关蛋白活化^[11]。

在实际应用中, 针对特定的目标化合物, 常遇到在异源宿主中不表达或产量很低的情况, 一般还需要进行密码子优化、增加前体供应、使用强启动子、过表达正调控蛋白和敲除负调控蛋白等一系列操作对宿主菌株进行工程化改造, 实验周期较长^[12-13]。考虑到化合物来源、宿主的转录机制和代谢能力, 需要开发亲缘关系更近或兼容性更高的底盘菌株。2018 年, Zhang 等^[14]首次开发出海洋放线菌 *Salinispora tropica* CNB-440 作为异源宿主, 用于表达来自 *Salinispora pacifica* 的硫乳霉素生物合成基因簇, 与在超级宿主天蓝色链霉菌 M1152 中生产相比产量提高 3 倍。2019 年, Wang 等^[15]开发了 CRAGE 工具用于快速激活未驯化的细菌来源的生物合成基因簇, 发现当基因簇在与天然生产者亲缘关系近的菌株中

收稿日期: 2022-03-18

基金项目: 国家重点研发专项 (2018YFA0901900); 上海抗生素耐药研究联合创新中心项目 (19430750600)

胡欣瑞, E-mail: xinrui_hu96@163.com

通信作者: 陶美凤, E-mail: tao_meifeng@sjtu.edu.cn

表达时,产物多样性和产量比远缘菌株更大。这些研究均暗示着开发系统发育多样的底盘菌株可能会显著提高基因簇异源表达的成功率或产量。2020年,Lü等^[16]敲除红色糖多孢菌HOE107的内源基因簇,使其成功异源表达来自刺糖多孢菌的多杀菌素和来自天蓝色链霉菌的放线紫红素。稀有放线菌来源的异源表达宿主对于活性天然产物的基因组挖掘具有重要意义,但目前相关报道非常有限。

稀有放线菌拟无枝酸菌(*Amycolatopsis* sp.) TNS106是一株糖肽抗生素瑞斯托霉素(ristomycin)的产生菌,前期研究发现其发酵2~3 d即可达到产素高峰,发酵周期较短^[17]。本研究旨在开发 TNS106 作为底盘宿主,用于表达异源生物合成基因簇,以补充目前以链霉菌为主的宿主库。为了构建具有干净的次级代谢背景的可整合宿主,用噬菌体 Φ C31 和

Φ BT1 细菌附着位点 *attB* 替换瑞斯托霉素生物合成的非核糖体肽合成酶基因 *rpsA*,并在突变株中异源表达来自链霉菌的放线紫红素和来自糖多孢菌属的多杀菌素,旨在探究该菌株表达不同来源基因簇的适配性。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与引物

大肠杆菌 DH10B、ET12567、ET12567/pUB307、拟无枝酸菌 TNS106、白色链霉菌 J1074、变铅青链霉菌 TK24、天蓝色链霉菌 M145、红色糖多孢菌 LJ161/pJTU2554 和 LJ161/pMM1 菌株均由上海交通大学微生物代谢国家重点实验室保藏。本研究所用质粒见表1,所用引物由北京擎科生物科技有限公司合成(表2)。

表1 本研究所使用的质粒
Table 1 Plasmids used in this study

质粒 Plasmids	特征描述 Description	来源 Source
pYH7	<i>ori</i> (ColE1), <i>rep</i> (pIJ101), <i>oriT</i> (RK2), <i>aac(3)IV</i> , <i>bla</i> , <i>tsr</i>	[18]
pXH8	pYH7 中引入 <i>rpsA</i> 基因上下游同源臂 (2 kb) pYH7 with the upstream and downstream homologous arms (2 kb) of gene <i>rpsA</i>	本研究 This study
pJTU2554	整合型黏粒载体, <i>attP-int^{ΦC31}</i> , <i>aac(3)IV</i> Integrative cosmid vector, <i>attP-int^{ΦC31}</i> , <i>aac(3)IV</i>	[19]
pMM1	整合型质粒, 含有源自天蓝色链霉菌的放线紫红素基因簇, <i>attP-int^{ΦC31}</i> , <i>aac(3)IV</i> Integrative plasmid containing the intact actinorhodin BGC from <i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>attP-int^{ΦC31}</i> , <i>aac(3)IV</i>	[20]
pHL921	细菌人工染色体载体, <i>attP-int^{ΦC31}</i> , <i>aac(3)IV</i> Bacterial artificial chromosome vector, <i>attP-int^{ΦC31}</i> , <i>aac(3)IV</i>	[21]
pSPI3H2	BAC 克隆, 含有刺糖多孢菌来源的多杀菌素基因簇, <i>attP-int^{ΦC31}</i> , <i>aac(3)IV</i> BAC clone containing the intact spinosad BGC from <i>Saccharopolyspora spinosa</i> NRRL18395, <i>attP-int^{ΦC31}</i> , <i>aac(3)IV</i>	[16]
pHLJ811	含有4个鼠李糖和福乐糖胺生物合成基因 <i>gtt</i> , <i>epi</i> , <i>gdh</i> 和 <i>kre</i> Plasmid containing four genes (<i>gtt</i> , <i>epi</i> , <i>gdh</i> , and <i>kre</i>) for forosamine and rhamnose biosynthesis	[16]
pJWJ3H2	pSPI3H2 中引入 <i>bla-gtt-epi-gdh-kre</i> 基因盒 pSPI3H2 with a <i>bla-gtt-epi-gdh-kre</i> cassette	本研究 This study

1.2 培养基

研究中用到的培养基有 LB 和 LA (大肠杆菌培养基)、MS (放线菌固体培养基)、TSBY 液体培养基、SAM 液体培养基^[22]、R5 固体培养基^[23]、GMC 液体培养基、CTF4 液体培养基。TSBY、SAM、R5 和 CTF4 培养基于 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min, 其余培养基于 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

1.3 拟无枝酸菌 TNS106 生长曲线的测定

将拟无枝酸菌 TNS106 单菌落接种至含有 50 mL TSBY 培养基的三凹摇菌瓶中, 30 °C、220 r/min 培养 48 h; 将 5 mL 种子液接种至含有 50 mL SAM 培

培养基的三凹摇菌瓶中, 30 °C、220 r/min 培养 7 d; 期间每隔 24 h 取 1 mL 发酵液置于预先称质量的 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 小心弃去上清, 将收集的菌体置于烘箱干燥至恒定质量, 再次称质量后计算与空离心管的差值, 即为生物量; 记录 1~7 d 生物量变化, 绘制生长曲线。

1.4 质粒的构建

1) pXH8 的构建。设计引物使得同源重组臂片段之间以及扩增产物与线性化载体之间各有 36 bp 的末端重叠序列, 并分别凝胶回收同源重组臂片段和线性化载体。DNA 无缝克隆采用诺唯赞公司的

表2 本研究所使用的引物
Table 2 Primers used in this study

引物 Primers	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
pXH8_F	TGCCTGTTTCAGGACGATCTC
pXH8_R	GACCAGATCCTCGTGATCGA
rpsA-Up_F	<u>AGGGCACGCCCTGGCACCCCAGGTTTTT</u> GACGAAAGTGATCCAGATGATCCAGCCGTCATCCTCCGTAGACCAC
rpsA-Up_R	<u>GTCGAGAACGACGACGTCCCCACGCCGGCTCGCGAT</u> CACTCGTGACATCGACACG
rpsA-Down_F	<u>GCGCGTCCACCGGGACTGATCAAGGCGAATACTTCA</u> CACCAAGACCTCGTACAACG
rpsA-Down_R	<u>CTTTCGTCAAAAACCTGGGGTGCCAGGGCGTGCCCTT</u> TGGGCTCCCCGGGCGCGACACTTCGACGACAACTTCT
rpsA_F	TTCAGGACGATCTCCAGG
rpsA_R	CATGTCCGGTGGGGAGAAG

注:加粗表示噬菌体细菌附着位点 $attB^{\Phi C31}$ 和 $attB^{\Phi BT1}$, 下划线表示 36 bp 同源臂序列。Note: Bacterial attachment site $attB^{\Phi C31}$ and $attB^{\Phi BT1}$ are bold, and the 36-bp homologous arm sequences are underlined.

ClonExpress® Ultra One Step Cloning Kit, 配制 10 μ L 反应体系:线性化载体, 200 ng; 上游同源重组臂片段, 40 ng; 下游同源重组臂片段, 40 ng; $2 \times$ ClonExpress Mix, 5 μ L; 补加 ddH₂O 至 20 μ L。将体系置于 50 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 脱盐后电转化, 对单克隆进行验证。

2)pJWJ3H2的构建。以 pHLJ811 为模板扩增鼠李糖和福乐糖胺合成基因, 以 pYH7 为模板扩增氨基青霉素抗性基因, 然后利用重叠延伸 PCR 获得 *bla-gtt-epi-gdh-kre* 基因盒。通过 PCR-targeting 技术^[24]将基因盒敲入 pSPI3H2, 获得 pJWJ3H2。

1.5 三亲本接合转移

将含有待转移质粒的供体菌株 ET12567 和含有三亲本接合转移辅助质粒的菌株 ET12567/pUB307 分别接种至含有相应抗生素的 5 mL LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6; 取 5 mL 培养 24 h 的新鲜 TNS106 菌丝体和上述大肠杆菌混合, 4 $^{\circ}$ C 4 000 r/min 离心 3 min, 收集菌体; 用无菌水洗涤 2 次, 每次 4 $^{\circ}$ C 4 000 r/min 离心 3 min; 将洗好的菌体用 1 mL 无菌水重悬并充分混匀, 均匀涂布在 2 块含有 20 mmol/L MgCl₂ 的 MS 平板, 每块平板 500 μ L 菌液, 并于超净台干燥 45~60 min, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 8~10 h; 将抗生素溶液稀释到工作浓度(按平板中培养基的体积计算)后均匀覆盖在培养基表面, 在超净台上干燥后于 30 $^{\circ}$ C 继续静置培养 3~5 d, 观察长出的接合转移子。

1.6 瑞斯托霉素的发酵与检测

将 TNS106 野生型和基因置换菌株 HXR1 在 MS 培养基上培养活化, 挑取单菌落分别接种至含有 50 mL TSBY 培养基的 250 mL 三凹摇菌瓶中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 48 h; 将 5 mL 种子液接种至含有 50 mL SAM 培养基的三凹摇菌瓶中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min

培养 2 d; 取 1 mL 发酵液 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清用 0.22 μ m 滤膜过滤, 对滤液进行 HPLC 分析。流动相为水(A相)和甲醇(B相), 两相均含 0.05% 甲酸。色谱柱为 ZORBAX SB-C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流速为 0.6 mL/min, 检测波长为 220 nm, 洗脱条件: 0~23 min, 5%~25% B 相; 23~30 min, 25%~100% B 相; 30~35 min, 100% B 相; 35.1~45 min, 5% B 相。

1.7 放线紫红素的发酵与检测

将含 pMM1 的拟无枝酸菌和含载体对照的菌株在 MS 培养基上活化, 挑取单菌落分别接种至 R5⁻平板固体发酵, 30 $^{\circ}$ C 培养 8 d; 期间每隔 24 h 用 1 mL 蓝枪头末端取同等大小菌块置于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 1 mol/L KOH 溶液, 浸提 1 h; 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清测量 OD₆₄₀, 并扣除未接种培养基浸提液的光密度。

1.8 多杀菌素的发酵与检测

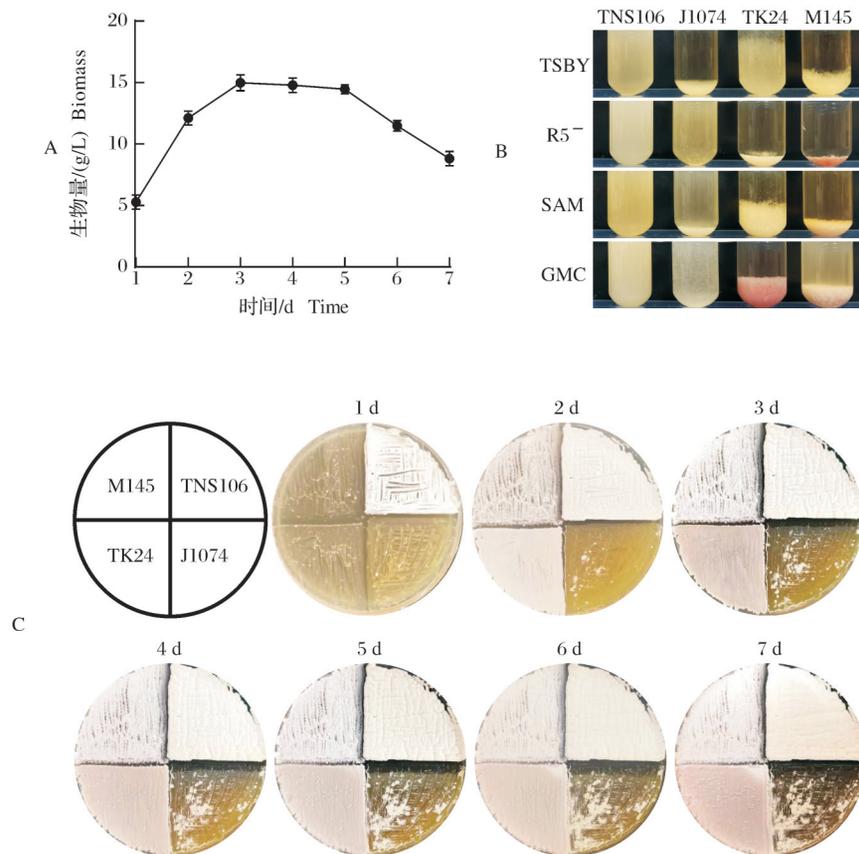
将含 pJWJ3H2 的拟无枝酸菌和对照菌株在 MS 培养基上活化, 挑取单菌落分别接种至含有 50 mL TSBY 培养基的 250 mL 三凹摇菌瓶中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 48 h; 将 5 mL 种子液接种至含有 50 mL CTF4 培养基的三凹摇菌瓶中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 避光发酵 10 d; 取 1 mL 发酵液加入等体积甲醇, 超声处理 30 min, 避光静置 12 h; 12 000 r/min 离心 5 min, 将上清用 0.22 μ m 滤膜过滤, 对滤液进行 HPLC 分析。流动相为体积比为 47.5: 47.5: 5.0 的甲醇/乙腈/0.05% 乙酸钠溶液(A相)和乙腈(B相)。色谱柱为 ZORBAX SB-C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 250 nm, 洗脱条件: 0~15 min, 0% B 相; 15.1~20 min, 100% B 相; 20.1~30 min, 0% B 相。

2 结果与分析

2.1 拟无枝酸菌 TNS106 生长特性的评估

首先确定其生长曲线(图1A),TNS106在SAM培养基中,1~3 d生长较快,生物量积累迅速,为对数生长期;3~5 d达到稳定期,之后进入衰亡期。在TSBY、R5⁻、SAM和GMC 4种液体培养基中观察,拟无枝酸菌 TNS106都呈现出菌丝体均匀分散的特征,而其他3种常见的链霉菌宿主白色链霉菌J1074、变铅青链霉菌TK24和天蓝色链霉菌M145均出现非常明显的颗粒和团块,且更易沉降(图1B)。菌丝体

均匀分散的特征有利于菌体对氧气和营养物质的利用,对于大规模发酵过程具有重要的应用价值。其次,TNS106在MS平板上培养1 d即可观察到非常明显的白色气生菌丝体,培养至后期菌丝体更加浓密,而其他3种链霉菌宿主生长相对缓慢,菌丝体也较为稀疏和粗糙(图1C)。此外,由于拟无枝酸菌 TNS106产孢少,采用菌丝体代替孢子进行接合转移,省去传统方法中收集孢子、孢子热激和预培养的步骤,遗传操作更加简化。综上,TNS106生长特性优良、遗传操作便捷,具有开发成底盘宿主的优势。



A: TNS106在SAM培养基中的生长曲线;B: TNS106和3种常见链霉菌宿主在各种液体培养基中的分散生长特性;C: TNS106和3种常见链霉菌宿主在MS固体培养基上的生长状况。数据来源于3次生物学重复。A: Growth curve of TNS106 in SAM medium; B: Dispersed growth characteristic of TNS106 and three *Streptomyces* hosts in various liquid media; C: Surface growth phenotype of TNS106 and three *Streptomyces* hosts on MS agar medium. Data are from three biological replicates.

图1 拟无枝酸菌 TNS106 的生长特性

Fig.1 Growth characteristics of *Amycolatopsis* sp. TNS106

2.2 *rpsA* 基因置换质粒 pXH8 的构建

为了对拟无枝酸菌 TNS106 中瑞斯托霉素生物合成基因簇内非核糖体肽合成酶基因 *rpsA* 进行基因置换以清除背景代谢物瑞斯托霉素,构建了 *rpsA* 基因置换质粒。以拟无枝酸菌 TNS106 的基因组 DNA 为反应模板,利用引物 *rpsA*-Up_F/R 和 *rpsA*-

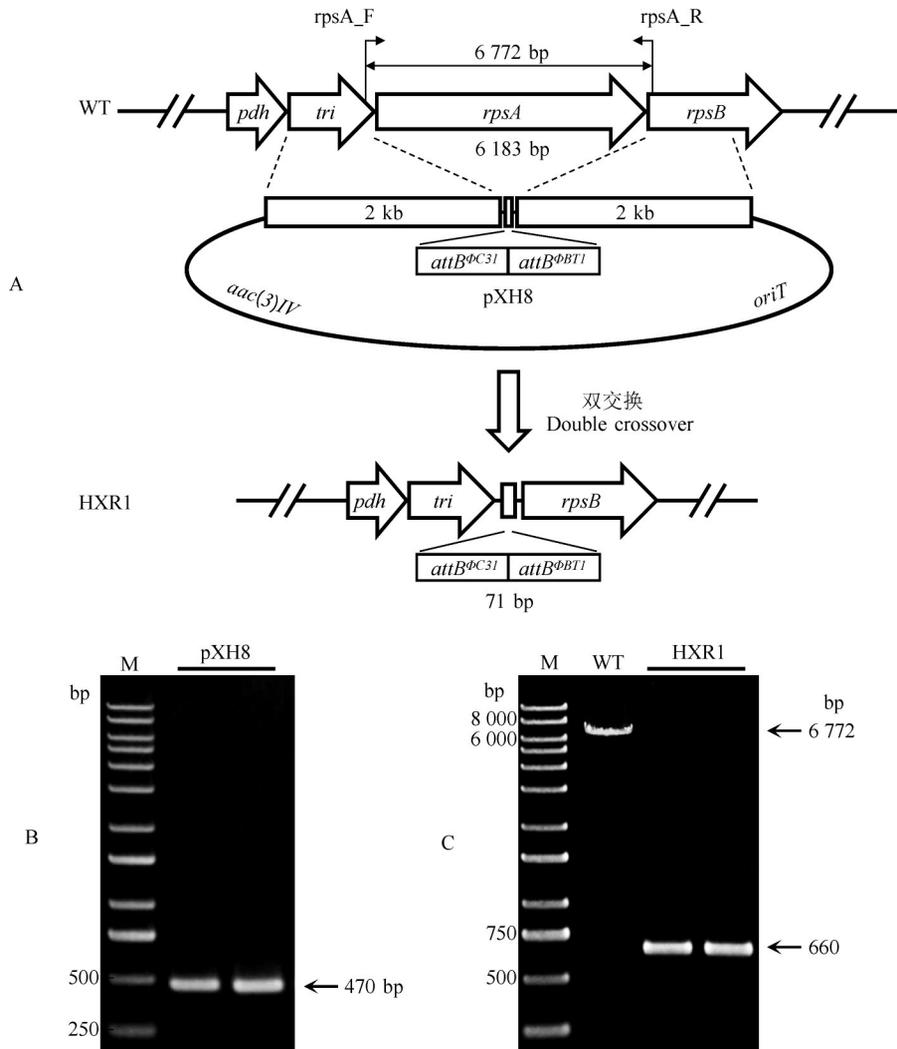
Down_F/R 分别扩增获得 *rpsA* 上下游各 2 kb 的同源重组臂片段。用于扩增同源臂的引物中还添加了 *attB*^{ΦC31} 和 *attB*^{ΦBT1} 的序列。同时,将质粒 pYH7 用限制性内切酶 *Nde*I 和 *Eco*RV 酶切制备线性化载体。用一步克隆试剂盒将同源重组臂片段与线性化载体进行重组。最后,将完成重组反应后的体系脱盐,电

转化至大肠杆菌DH10B中,在含有阿泊拉霉素的抗性平板上培养获得单克隆。用引物pXH8_F/R对单克隆进行PCR验证(图2B),并测序得到正确的*rpsA*基因置换质粒pXH8,其中2个同源臂之间含有 $attB^{\Phi C31}$ 和 $attB^{\Phi BT1}$,因此,在敲除*rpsA*基因的同时将引入细菌附着位点,利于后续BAC质粒和其他功能质粒的高效整合。

2.3 *rpsA*基因置换菌株HXR1的构建及其发酵产物分析

通过三亲本接合转移将*rpsA*基因置换质粒pXH8转入TNS106中,挑取接合子至含有阿泊拉霉素的MS抗性平板,筛选获得同源单交换菌株。将单

交换菌株接种至不含抗生素的TSBY液体培养基中松弛培养2 d,转接到TSBY再松弛培养2 d。然后,取适量菌液划线至不含抗生素的MS平板上,培养获得单菌落。将单菌落一一对应地分别接种至含有或不含阿泊拉霉素的MS平板上培养,筛选获得阿泊拉霉素敏感菌株,即为双交换菌株(图2A)。最后,提取双交换菌株基因组DNA作为模板,以TNS106基因组DNA为对照,*rpsA*_F/R为引物进行PCR验证。理论上,TNS106野生型的扩增产物大小应为6 772 bp,缺失*rpsA*基因并引入2个 $attB$ 位点后的扩增产物大小应为660 bp。PCR验证结果与预期完全一致(图2C),表明成功获得*rpsA*基因置换菌株,命名为



A:通过同源重组替换TNS106中*rpsA*的示意图。B:用于基因置换的质粒pXH8的PCR验证。C:突变株HXR1的PCR验证。基因组DNA模板分别来自TNS106(WT)和突变株(HXR1)。A:Schematic diagram of the replacement of *rpsA* by homologous recombination in *Amycolatopsis* sp. TNS106. B: PCR verification of the gene replacement plasmid pXH8. C: PCR verification of the mutant HXR1. Genomic DNA from wild-type *Amycolatopsis* sp. TNS106 (WT) or the mutant strain (HXR1) was used as template.

图2 *rpsA*基因置换突变株HXR1的构建

Fig.2 Construction of the *rpsA* gene replacement mutant HXR1

HXR1。随后,将HXR1和野生型菌株分别接种至SAM液体培养基中发酵2 d,并对发酵液进行HPLC分析。如图3所示,HXR1的发酵液中不再积累瑞斯托霉素,具有更加干净的代谢产物分析背景。

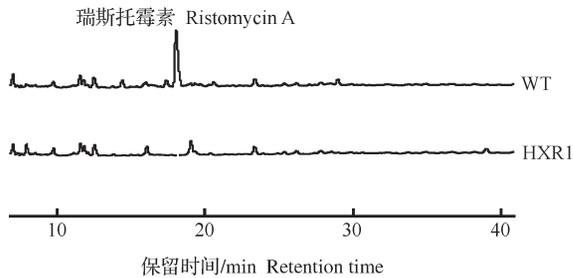
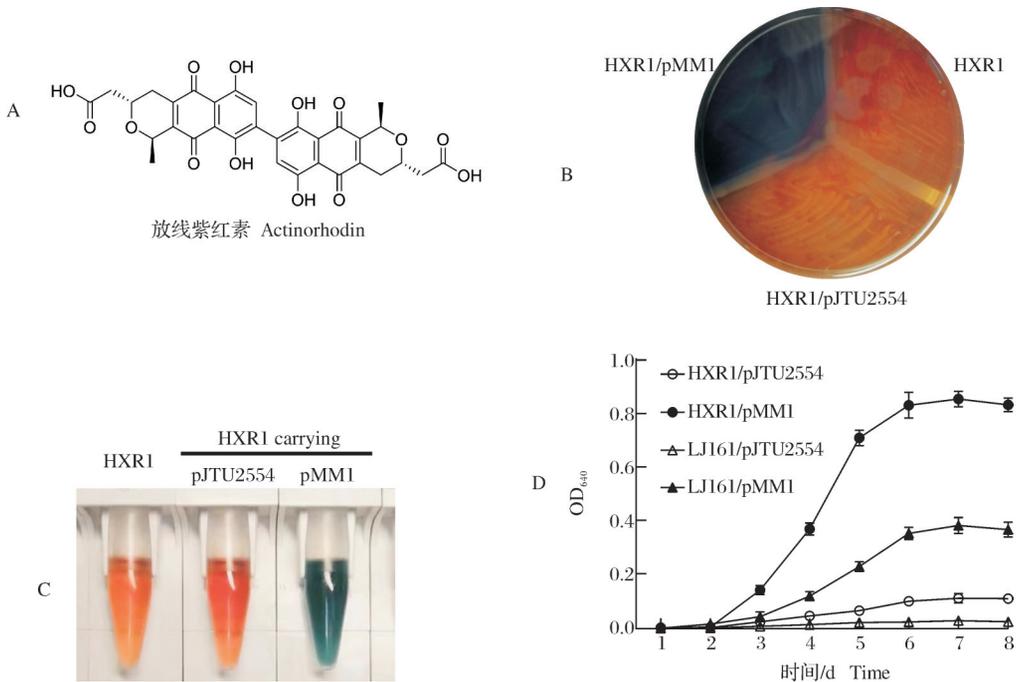


图3 基因置换菌株HXR1和野生型发酵液液的HPLC分析
Fig.3 HPLC profile analysis of ristomycin A in WT and HXR1

2.4 以HXR1为宿主异源表达放线紫红素

放线紫红素(actinorhodin)是天蓝色链霉菌产生

的聚酮类色素抗生素(图4A),在碱性环境中呈现蓝色,由II型聚酮合酶利用乙酰辅酶A和丙二酰辅酶A催化合成。为评估HXR1表达异源基因簇的能力,将包含完整放线紫红素生物合成基因簇的质粒pMM1通过位点特异性重组整合至其染色体上,抗性筛选获得突变株HXR1/pMM1。在R⁵⁻培养基上培养3 d时,HXR1/pMM1可以明显观察到蓝色色素的产生(图4B)。为了与之前报道的稀有放线菌宿主红色糖多孢菌LJ161定量比较放线紫红素的产生情况,将HXR1/pMM1和LJ161/pMM1发酵产物分别用1 mol/L KOH溶液浸提(图4C),并测定在640 nm处的光密度。结果显示,HXR1/pMM1在发酵第2天开始产生放线紫红素,第3~6天迅速积累,在第4天可以达到LJ161/pMM1发酵的最大产量。与LJ161/pMM1相比,HXR1/pMM1中放线紫红素提前1 d产生,产量提高了1.3倍(图4D)。



A:放线紫红素的化学结构。B:异源表达菌株在R⁵⁻培养基上发酵72 h后蓝色色素产生情况。C:发酵产物用1 mol/L KOH溶液浸提。宿主本身有少量红色色素产生。D:放线紫红素在HXR1和红色糖多孢菌LJ161中异源表达的产量比较。数据来源于3次生物学重复。

A:Chemical structure of actinorhodin.B:Heterologous production of the blue pigment actinorhodin on R⁵⁻ agar medium.The top of the culture plate after 72 h fermentation is shown.C:Crude extract of the culture by 1 mol/L KOH.The host itself produces a small amount of red pigment.D:Quantification of actinorhodin production by HXR1 and *Saccharopolyspora erythraea* LJ161 carrying pMM1 on R⁵⁻ medium.The optical density (OD) was determined at 640 nm.Data are from three biological replicates.

图4 以HXR1为宿主异源表达放线紫红素

Fig.4 Heterologous expression of actinorhodin by HXR1 carrying the *S. coelicolor* actinorhodin BGC on pMM1

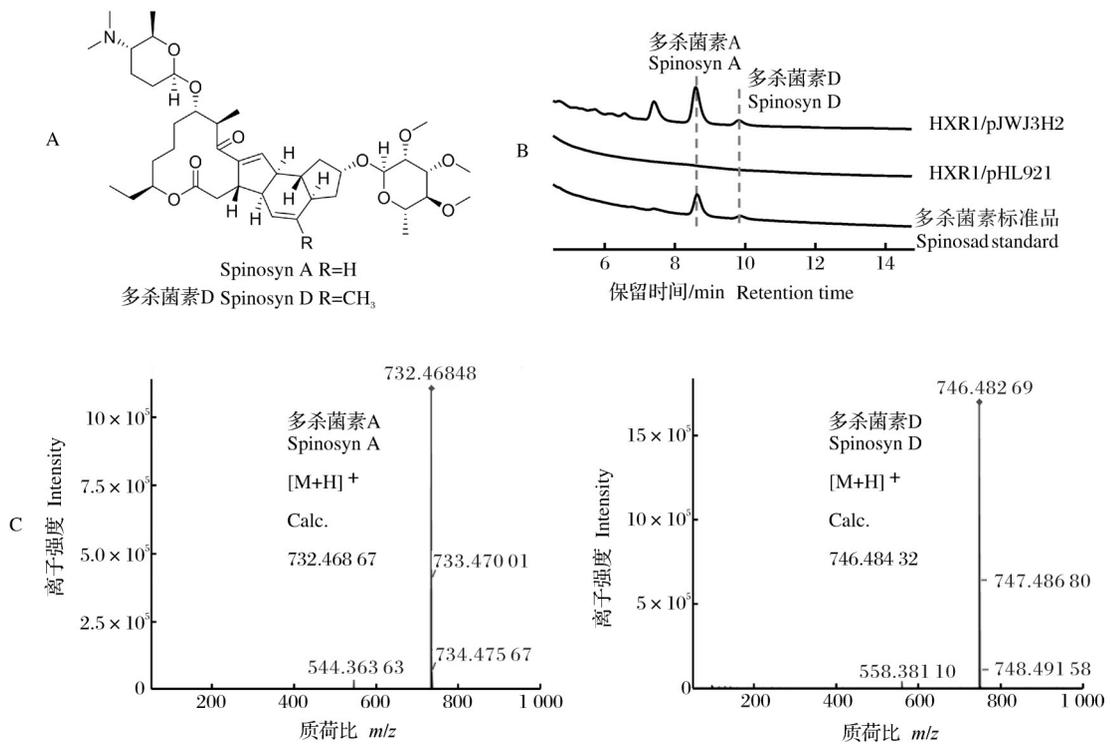
2.5 以HXR1为宿主异源表达多杀菌素

通过异源表达多杀菌素来验证HXR1与稀有放线菌来源的基因簇的适配性。多杀菌素(spinosad)

是多杀菌素A和多杀菌素D的混合物(图5A),常作为一种高效绿色杀虫剂,由I型聚酮合酶负责合成。多杀菌素原始产生菌为刺糖多孢菌,与拟无枝酸菌

同为拟诺卡氏菌科,但不同属。BAC质粒pJWJ3H2含有完整多杀菌素生物合成基因簇和多杀菌素生产所必需的4个鼠李糖生物合成基因。通过三亲本接合转移将pJWJ3H2转入HXR1中获得HXR1/pJWJ3H2。接着,将HXR1/pJWJ3H2和整合了空载体的对照菌株HXR1/pHL921分别接种至CTF4液体培养基中发酵10 d,并对发酵液进行HPLC分析。如图5B所示,与对照相比,HXR1/pJWJ3H2在8.592

min和9.819 min出现的2个差异峰与多杀菌素标准品的保留时间一致,推测其分别为多杀菌素A和多杀菌素D。高分辨质谱分析(UHPLC/Q-TOF-MS)结果表明,样品中2个目标化合物的相对分子质量分别与多杀菌素A和多杀菌素D的相对分子质量一致(图5C)。综上,HXR1/pJWJ3H2成功异源表达多杀菌素生物合成基因簇,产生多杀菌素A和多杀菌素D。



A:多杀菌素化学结构。B:异源表达菌株发酵液HPLC检测。C:发酵产物高分辨质谱分析。数据来源于3次生物学重复。A:Chemical structure of spinosad.B:HPLC profile analysis of spinosad standard and extraction from fermentation broth of HXR1/pJWJ3H2 cultured in CTF4 medium for 10 days.C:UHPLC/Q-TOF-MS analysis (positive ion model) of sample collected from the extract of HXR1/pJWJ3H2 fermentation.Data are from three biological replicates.

图5 以HXR1为宿主异源表达多杀菌素

Fig.5 Heterologous expression of spinosad by HXR1

3 讨论

异源表达已经成为“隐性”基因簇对应代谢产物的发掘和天然产物生物合成规律研究的常规方法。稀有放线菌蕴含丰富的“隐性”基因簇,采用亲缘关系更近的非链霉菌来源的宿主对于激活这些基因簇更为有利。然而,目前广泛使用的放线菌底盘主要是链霉菌,稀有放线菌由于生长缓慢和遗传改造困难,鲜有被开发成异源表达宿主的报道。

本研究基于快速生长、特性优良的稀有放线菌

拟无枝酸菌TNS106,通过同源重组的方法,将其主产物瑞斯托霉素生物合成的必需基因*rpsA*替换为*attB*位点,获得一个代谢背景干净的底盘菌株HXR1。HXR1能成功表达链霉菌来源的放线紫红素和稀有放线菌来源的多杀菌素,表明该宿主对不同来源的BGC具有一定普适性。而且与红色糖多孢菌相比,拟无枝酸菌HXR1的放线紫红素产生更早、产量更高,具有一定优势。异源表达宿主菌株HXR1对于未来链霉菌和稀有放线菌中天然产物的发现和工程化应用具有重要意义。

参考文献 References

- [1] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 [J]. *Journal of natural products*, 2020, 83(3): 770-803.
- [2] JOSE P A, MAHARSHI A, JHA B. Actinobacteria in natural products research: progress and prospects [J/OL]. *Microbiological research*, 2021, 246: 126708 [2022-03-18]. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126708>.
- [3] TIWARI K, GUPTA R K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics [J]. *Critical reviews in biotechnology*, 2012, 32(2): 108-132.
- [4] BALTZ R H. *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters [J]. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2010, 37(8): 759-772.
- [5] AMIN D H, ABDALLAH N A, ABOLMAATY A, et al. Microbiological and molecular insights on rare *Actinobacteria* harboring bioactive prospective [J/OL]. *Bulletin of the national research centre*, 2020, 44(1): 5 [2022-03-18]. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0266-8>.
- [6] BALTZ R H. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes [J]. *Current opinion in pharmacology*, 2008, 8(5): 557-563.
- [7] NETT M, IKEDA H, MOORE B S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes [J]. *Natural product reports*, 2009, 26(11): 1362-1384.
- [8] KANG H S, KIM E S. Recent advances in heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* hosts [J]. *Current opinion in biotechnology*, 2021, 69: 118-127.
- [9] LIU R, DENG Z X, LIU T G. *Streptomyces* species: ideal chassis for natural product discovery and overproduction [J]. *Metabolic engineering*, 2018, 50: 74-84.
- [10] 肖丽萍, 邓子新, 刘天罡. 链霉菌底盘细胞的开发现状及其应用 [J]. *微生物学报*, 2016, 56(3): 441-453, 330. XIAO L P, DENG Z X, LIU T G. Progress in developing and applying *Streptomyces* chassis: a review [J]. *Acta microbiologica sinica*, 2016, 56(3): 441-453, 330 (in Chinese with English abstract).
- [11] XU M, WRIGHT G D. Heterologous expression-facilitated natural products' discovery in actinomycetes [J]. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2019, 46(3/4): 415-431.
- [12] BEKIESCH P, BASITTA P, APEL A K. Challenges in the heterologous production of antibiotics in *Streptomyces* [J]. *Archiv der pharmazie*, 2016, 349(8): 594-601.
- [13] PALAZZOTTO E, TONG Y J, LEE S Y, et al. Synthetic biology and metabolic engineering of actinomycetes for natural product discovery [J/OL]. *Biotechnology advances*, 2019, 37(6): 107366 [2022-03-18]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.005>.
- [14] ZHANG J J, MOORE B S, TANG X. Engineering *Salinispora tropica* for heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2018, 102(19): 8437-8446.
- [15] WANG G Y, ZHAO Z Y, KE J, et al. CRAGE enables rapid activation of biosynthetic gene clusters in undomesticated bacteria [J]. *Nature microbiology*, 2019, 4(12): 2498-2510.
- [16] LÜ J, LONG Q S, ZHAO Z L, et al. Engineering the erythromycin-producing strain *Saccharopolyspora erythraea* HOE107 for the heterologous production of polyketide antibiotics [J/OL]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 593217 [2022-03-18]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593217>.
- [17] LIU K, HU X R, ZHAO L X, et al. Enhancing ristomycin A production by overexpression of ParB-like StrR family regulators controlling the biosynthesis genes [J/OL]. *Applied and environmental microbiology*, 2021, 87(19): e01066-21 [2022-03-18]. <https://doi.org/10.1128/AEM.01066-21>.
- [18] SUN Y H, HONG H, SARNBOSKY M, et al. Organization of the biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM 4137 for the novel neuroprotectant polyketide meridamycin [J]. *Microbiology*, 2006, 152: 3507-3515.
- [19] 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(8): 1286-1294.
- [20] ZHOU H, WANG Y M, YU Y F, et al. A non-restricting and non-methylating *Escherichia coli* strain for DNA cloning and high-throughput conjugation to *Streptomyces coelicolor* [J]. *Current microbiology*, 2012, 64(2): 185-190.
- [21] XU M, WANG Y M, ZHAO Z L, et al. Functional genome mining for metabolites encoded by large gene clusters through heterologous expression of a whole-genome bacterial artificial chromosome library in *Streptomyces* spp. [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2016, 82(19): 5795-5805.
- [22] NEU J M, WRIGHT G D. Inhibition of sporulation, glycopeptide antibiotic production and resistance in *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009 by protein kinase inhibitors [J]. *FEMS microbiology letters*, 2001, 199(1): 15-20.
- [23] HUANG J, LIH C J, PAN K H, et al. Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays [J]. *Genes & development*, 2001, 15(23): 3183-3192.
- [24] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products [J]. *PNAS*, 2000, 97(12): 6640-6645.

Construction of an *Amycolatopsis* sp.TNS106 derived host and heterologous expression of secondary metabolic gene clusters

HU Xinrui, HE Weijun, LÜ Jin, WANG Yemin, TAO Meifeng

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract Heterologous expression is an efficient approach to activate silent gene clusters of bioactive natural products. The rare actinomycetes strain *Amycolatopsis* sp.TNS106 is a producer of ristomycin A, which exhibits fast growth, short fermentation time and convenient genetic manipulation system. In order to develop this strain into a heterologous expression host for biosynthetic gene clusters (BGCs), the non-ribosomal peptide synthetase gene (*rpsA*) essential for the ristomycin A biosynthesis was replaced with a cassette containing the bacterial attachment sites $attB^{\Phi C31}$ and $attB^{\Phi BT1}$ via homologous recombination to construct a host with a clean background of secondary metabolism and two integrative sites. To test the obtained strain HXR1, integrative plasmids containing actinorhodin BGC from *Streptomyces coelicolor* or spinosad BGC from *Saccharopolyspora spinosa* were conjugated into HXR1. The results of fermentation and product analyses showed that actinorhodin and spinosad were successfully produced in HXR1. Compared with the *Sac. erythraea*-derived host LJ161 belonging to the non-*Streptomyces* actinomycete host, the actinorhodin production from HXR1 was approximately 1 day earlier and 1.3-fold higher. The *Amycolatopsis* sp. TNS106-derived host HXR1 will provide a useful platform for accelerating the discovery of novel secondary metabolites from *Streptomyces* and rare actinomycetes.

Keywords drug discovery; rare actinomycetes; *Amycolatopsis* sp.; heterologous expression; actinorhodin; spinosad; antibiotic; secondary metabolites

(责任编辑:张志钰)