

波卓霉素生物合成基因簇的异源表达及产量提高

周 威^{1,2} 张学文^{1,2} 庄以彬² 刘晓楠²
殷 华² 郁 彭¹ 刘 涛²

1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

摘要 波卓霉素是从波卓链霉菌(*Streptomyces bottropensis*)中分离得到的, 具有抗革兰氏阳性菌及支原体的生物活性, 尤其重要的是对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和抗万古霉素肠球菌有抑菌活性。试验通过构建基因组文库, PCR 筛选获得包含完整波卓霉素合成基因簇的柯斯质粒 4E11, 通过接合转移的方法把 4E11 转化至天蓝色链霉菌 M145 中, 对获得的异源表达株 M145/4E11 进行发酵, 通过提取纯化和 HPLC-MS 检测, 表明 M145/4E11 发酵液中产生了波卓霉素; 试验并通过 Red/ET 重组系统, 以红霉素启动子(ermE * P1)替换了波卓霉素生物合成簇抗性基因 *btmA* 和前提肽合成基因 *btmD* 的启动子, 成功实现异源表达株 M145/4E11 波卓霉素的产量提高。

关键词 波卓链霉菌; 波卓霉素; 基因组文库; 异源表达; 启动子替换

中图分类号 Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)01-0049-10

细菌耐药性的增强已成为世界性的难题, 开发具有新的作用机制的抗生素具有重要的现实意义。波卓霉素是 1957 年由 Waisvisz 等^[1]从波卓链霉菌 *Streptomyces bottropensis* 中分离得到的肽类抗生素, 其主要成分是波卓霉素 A2, 还含有少量的 B2 和 C2。波卓霉素由 8 个氨基酸残基组成, 是由四环肽和线性四肽缩合形成脒的独特结构, 其明显的特点是甲基化修饰, 如 8 位、21 位、28 位和 34 位的 C-甲基化以及 51 位的 O-甲基化。波卓霉素具有抗革兰氏阳性菌及支原体的功能, 尤其重要的是具有 *anti*-MRSA 和 *anti*-VRE 的活性^[1-2], 其作用机制是通过阻止氨酰基-tRNA 与 50S 核糖体 A 位点结合, 从而抑制细菌蛋白质的合成, 但不抑制肽键形成及转位, 这种作用机制不同于目前已知的抗生素, 与已知抗生素无交叉抗性, 是一个具有重要前景的候选抗生素药物^[3-4]。天蓝色链霉菌是链霉菌研究的模式菌, 其全基因组序列测定已于 2002 年完成, 与波卓链霉菌相比, 其具有遗传背景清晰、遗传操作简单等优点, 因此常用于外源基因簇的异源表达。另一

种模式链霉菌变铅青链霉菌 TK24 因对甲基化 DNA 无限制作用, 同样常被用作基因簇的异源表达宿主^[5]。笔者所在实验室在完成波卓链霉菌全基因组序列测定的基础上, 通过生物信息学分析并结合波卓霉素分子结构特点推测得到波卓霉素生物合成基因簇, 并通过构建基因组文库实现了波卓霉素生物合成基因簇在天蓝色链霉菌中表达, 为进一步对基因簇中各基因功能进行验证或通过遗传改造产生新结构新活性的波卓霉素类似物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1) 菌株和质粒。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) XL1-blue 和质粒 pJTU2554 用于基因组文库构建。质粒 pJ778^[6]、*E. coli* BW25113/pJ790^[6] 和 *E. coli* DH5 α /BT340^[6] 用于基因敲除, *E. coli* ET12567/pUZ8002^[6] 用于接合转移, 由上海交通大学陶美凤教授惠赠。天蓝色链霉菌 M145 和变铅青链霉菌 TK24 用于基因簇异源表达, 由中科院微生物研究

收稿日期: 2013-11-27

基金项目: 国家“973”项目(2012CB721100); 天津市科技支撑计划重点项目(11ZCKFSY07900)

周 威, 硕士研究生, 研究方向: 天然化合物合成生物学. E-mail: earl_wei@163.com

通信作者: 殷 华, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然化合物合成生物学. E-mail: yin_h@tib. cas. cn

所杨克迁研究员惠赠; *Streptomyces bottropensis* ATCC 25435 购自美国模式菌种保藏中心。

2) 试剂及培养基。限制性内切酶 *Sau3A I*、*Hpa I*、*BamH I* 和去磷酸化酶 FastAP™ Thermo-sensitive Alkaline Phosphatase 购自 Fermentas 公司。T4 连接酶购自 TaKaRa Biotechnology 公司。One Taq™ DNA 聚合酶和 Phusion 超保真 DNA 聚合酶购自 New England Biolabs 公司。

大肠杆菌所用培养基为 LB 培养基和 SOB 培养基^[7]。波卓霉素发酵的种子培养基: 可溶性淀粉 24 g/L、酵母提取物 5 g/L、碳酸钙 4 g/L、Peptone

3 g/L、Meat extract 3 g/L、葡萄糖 1 g/L、pH 值 7.0。波卓霉素发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L、磷酸氢二钾 0.5 g/L、酵母膏 10 g/L、Meat extract 3 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、可溶性淀粉 10 g/L、碳酸钙 2 g/L、NaCl 5 g/L、pH 值 7.0。接合转移用培养基 2×YT 和 MS^[7]。

3) PCR 引物。本研究应用的所用引物见表 1。单下划线部分与 pIJ778 基因阻断盒两侧的序列相匹配; 另引物 btmA-Ep2 双下划线部分为改造的红霉素启动子 ermE * P1 序列。常规试剂及抗生素使用浓度参考链霉菌遗传操作手册^[8]。

表 1 PCR 引物

Table 1 Primers

名称 Primers name	序列 Primers sequence(5'-3')
8114S	CCGAACAGCTCCGCCCGGTC
8114A	TTACCTTTCGAGGACCGTATC
8128S	CTTACCAGCACCTTCAGCCA
8128A	CTCGATGTAG ACCCACCTT
btmA-Ep1	<u>ACCCACCCCGCCACCCCGCCGCGAGATCCCGCGCTCC</u> <u>ATTCCGGGGATCCGTCGACC</u>
btmA-Ep2	<u>AGCAGGGACAGGCCGTGGGAGATGAGGTAGAGCGGCAGCATATCTCTAGATCCGTTCCGCTAGATCCTAC</u> <u>CAACCGGCACGATTGTGCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
btmA-Ep1-T	GTCTACGACGGGGAGCGCGGCGA
btmA-Ep2-T	CACCCGAGTCTCCCGGGTC
btmD-Ep1	<u>ACCGCTCGACCGTAAGGAGGCACCCATCGCGCGGATCCGGGCCACCGCTCCCATGGAGGATTCCGGGGGA</u> <u>TCCGTCGACC</u>
btmD-Ep2	<u>TGAGGAAGTCTGCGGTATGCAGTCAATACGACTACGGGTCCCAT</u> <u>ATCTCTAGATCCGTTCCGCTAGATCCTACCAACCGGCACGATTGTGCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>
btmD-Ep1-T	GTCTACATCGAAGGCACGA
btmD-Ep2-T	CTTCGCGCATGCTCCCTCT

1.2 波卓链霉菌基因组测序分析、预测及 DNA 的提取

1) 测序分析及波卓霉素基因簇预测。基因组序列是采用双端高通量 Illumina 测序技术, 由北京华大基因公司完成^[9]。基因序列组装通过基因组短序列寡核苷酸分析软件 Short Oligonucleotide Alignment Program (SOAP) denovo 1.05 完成^[10]; 基因、rRNA 操纵子和 tRNAs 的预测分别使用了软件 Glimmer 3.0^[11]、RNAmmer^[12] 和 tRNAscan-SE^[13]。基因功能注释利用 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)^[14]、Swiss-Prot^[15]、Clusters of Orthologous Groups (COG)^[16] 和 non-redundant (NR) databases。

波卓霉素属于环肽类化合物, 其基本骨架由短肽组成, 并被一系列甲基化(包括 C-甲基化和 O-甲基化)和分子环化修饰。“逆生物合成”分析, 波卓霉素的生物合成需要甲基化酶、环化酶的修饰。获得波卓链霉菌基因组草谱后, 结合波卓霉素分子结构特点, 对 C-甲基转移酶、O-甲基转移酶和环化酶进行基因组扫描, 并由生物信息分析, 预测波卓霉素生物合成基因簇。

2) DNA 的提取。具体方法参考链霉菌遗传操作手册^[8]。基因组溶解在 pH 为 8.0 的 TE 缓冲液中。构建基因文库所使用的 DNA 终质量浓度 ≥ 600 ng/ μ L。

1.3 波卓链霉菌基因组文库的构建

1) 基因组 DNA 的处理。基因组 DNA 用限制

性内切酶 *Sau3A I* 部分酶切,固定酶的浓度不变,取不同的酶切处理时间(分别为 0、2、4、6、8、10 min),反应温度 37 °C,在反应结束后直接加入等体积的苯酚氯仿溶液使酶失活;然后 12 000 r/min 离心 5 min,并取上清 5 mL,用 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测不同酶切时间下基因组的酶切效果,选取最佳的酶切处理的基因组,乙醇沉淀,干燥后溶解;并 Fast Ap 去磷酸化处理,乙醇沉淀回收,溶于适量 TE,使 DNA 质量浓度 ≥ 500 ng/ μ L。

2) 质粒 pJTU2554 的提取及处理。以质粒 pJTU2554 做为建库载体(图 1),该质粒为 cosmid 与 pSET152 的衍生质粒,携带 *cos* 位点,接合转移起始位点(*oriT*)、在链霉菌中的整合位点(*attP*)和整合酶基因(*int*)。质粒的中量提取方法参考文献[7]。质粒溶解于适量双蒸水中,使终质量浓度 $\geq 1\ 000$ ng/ μ L。取提取的 pJTU2554 质粒 25 μ L,以 *Hpa I* 进行酶切,同时在酶切体系中加入去磷酸化酶 Fast Ap。酶切完全后,在反应体系中加入与酶反应体系相同体积的苯酚氯仿抽提,乙醇沉淀回收酶切后的片段。然后用 *BamH I* 对回收的 DNA 片段进行酶切,乙醇沉淀回收酶切片段,溶于水,使终质量浓度 $\geq 1\ 000$ ng/ μ L。

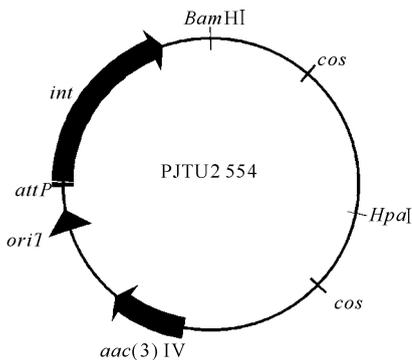


图 1 质粒 pJTU2554

Fig. 1 Plasmid pJTU2554

3) 连接与包装。具体方法参照 MaxPlax™ Lambda 噬菌体包装提取物操作说明。T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接处理质粒 pJTU2554 与基因组。取 1 μ L 载体 pJTU2554,酶切处理好的基因组分别取 4、6、8 μ L 3 种不同体积在 15 μ L 连接体系下进行连接。连接产物经 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,确定连接效果最好的体系用于噬菌体包装。从 -80 °C 冰箱中取出包装蛋白 50 μ L 置冰上,快速取 25 μ L 至另一 EP 管中,加入 9 μ L 连接产物,用枪吹

吸轻轻混匀,然后 30 °C 温浴 90 min。取另外的 25 μ L 包装蛋白再加入此体系,30 °C 温浴 90 min;然后加入 500 μ L 的 PDB buffer(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L MgCl₂)及 25 μ L 的氯仿,颠倒均匀,瞬时离心,获得包装产物,4 °C 保存。

4) 转染。从菌种保存管中取少量 XL1-Blue 菌液,在含有四环素的 LB 平板上划线,37 °C 培养过夜。挑单克隆至 5 mL LB 中(含有 10 mmol/L MgSO₄,0.2% 麦芽糖),37 °C 培养过夜。将过夜培养物按 1 : 100 转接到 50 mL LB 中(含有 10 mmol/L MgSO₄,0.2% 麦芽糖),37 °C 振荡培养 3~6 h,至 *D*₆₀₀ 为 0.8~1.0。用 10 mmol/L MgSO₄ 重悬菌体,浓度至 *D*₆₀₀ 为 1.0。取 25 μ L 菌液进行预转染,与 25 μ L 的包装产物混合,室温 30 min。加入 200 μ L 的 LB,37 °C 温浴,每隔 15 min 轻轻摇匀 1 次,45 min 后离心,加入 50 μ L LB 重悬。将菌液涂布在含有安普霉素的 LB 平板上,37 °C 培养过夜。平板克隆计数,推算所有包装产物可长出的克隆数。随机挑取 15~20 个克隆,提取质粒,用 *BamH I* 酶切,计算文库平均插入片段大小。用公式 $N = \ln(1-p)/\ln(1-f/g)$ 计算达到 99% 的完备性,并覆盖整个基因组 2 遍所需的克隆数,其中 *N* 为总共的克隆数;*p* 为文库对基因组覆盖效率;*f* 为插入片段大小;*g* 为基因组的大小。按照同上的方法大量转染,挑取约 2 000 个克隆于 2 mL 的 96 孔培养板中(300 μ L LB/孔),37 °C 培养过夜,向 96 孔板中加入等体积的 30% 的甘油,混匀,保存于 -80 °C 的冰箱中。

5) PCR 方法筛选文库。PCR 方法筛选文库参照文献[17]进行,以所预测波卓霉素生物合成基因簇两端基因 8114 和 8128 为模板,设计 2 对 PCR 筛选引物 8114S/8114A 和 8128S/8128A。以波卓霉素基因组文库为模板,8114S/8114A 为引物进行菌落 PCR,PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 60 s,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 90 s,25 个循环,72 °C 延伸 10 min。获得的阳性克隆并为模板,8128A/8128S 为引物进行菌落 PCR。最终获得基因 8114 和基因 8128 同时存在的阳性克隆,提取质粒,通过基因测序确定插入载体 pJTU2554 的 DNA 片段大小及范围。

1.4 波卓霉素生物合成基因簇异源表达株的构建

将获得的包含预测波卓霉素生物合成基因簇的阳性克隆质粒 4E11 转化至 *E. coli* ET12567/

pUZ8002,通过接合转移^[7]分别转化至天蓝色链霉菌 M145 和变铅青链霉菌 TK24。挑取 3~5 个接合转移子转接到含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 安普霉素和萘啶酮酸的 MS 固体平板上,并通过库筛选引物 8114S/8114A,PCR 验证柯斯质粒 4E11 整合至链霉菌基因组,获得异源表达株。

1.5 异源表达株液体发酵及波卓霉素 HPLC-MS 检测

取适量孢子接种到种子培养基(50 mL/250 mL),28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养(200 r/min)24~36 h。按 5% 的接种量转接至液体发酵培养基(50 mL/250 mL),28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养(200 r/min)5~6 d。发酵液用乙酸乙酯萃取,萃取液旋转蒸发仪浓缩干燥,1 mL 甲醇溶解。波卓霉素的产生通过 HPLC-MS 检测。HPLC-MS 检测系统是安捷伦公司的 Agilent 1260 system;检测条件为:HPLC 流动相 A 为水(含 0.1% 甲酸),B 为甲醇;流速=1 mL/min,溶液配比为二元梯度,梯度洗脱条件:0~5 min 5% B,6~45 min 5% B 到 100% B;进样量 50 μL ;液相色谱柱为 Agela Innoval C18 柱;UV 检测波长为 201 nm;质谱检测 ESI 为正离子源,相对分子质量扫描范围 50~1 000。

1.6 红霉素启动子 ermE* P1 原位替换抗性基因 btmA 启动子序列

根据抗性基因 *btmA* 启动子序列,参照 PCR-targeting 系统^[5],设计引物 btmA-Ep1 和 btmA-Ep2(表 1),表中引物 btmA-Ep1 与 btmA-Ep2 斜体部分与抗性基因 *btmA* 启动子序列相匹配。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,10 个循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,15 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

利用 PCR-targeting 的方法对基因 *btmA* 启动子序列替换。以质粒 pIJ778 为模板, btmA-Ep1& btmA-Ep2 为引物,PCR 扩增链霉素抗性基因盒,纯化待用。将柯斯质粒 4E11 电转至 *E. coli* BW25113/pIJ790 中,得到 *E. coli* BW25113/pIJ790/4E11,添加终浓度为 10 mmol/L 阿拉伯糖诱导 λ /red 重组系统,并将该菌制成电转感受态细胞。将 PCR 纯化产物电转入 *E. coli* BW25113/pIJ790/4E11 中,涂布于含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 安普霉素 LB 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取单克隆提取质粒,得到带有启动子 ermE* P1 和链

霉素抗性基因盒的柯斯质粒。将该质粒电转入 *E. coli* DH5 α /BT340 中,涂布在含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 平板上 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d。挑取单克隆划线培养于无抗 LB 平板上,42 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜诱导 FLP 重组蛋白表达,挑取 20~30 个单克隆分别对应转接到带有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素 LB 平板和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 安普霉素 LB 平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,得到 Streptomycin^S Apramycin^R 菌株,提取质粒 PCR 验证,PCR 验证引物 btmA-Ep1-T& btmA-Ep2-T。

1.7 红霉素启动子 ermE* P1 原位替换前体肽合成基因 btmD 启动子序列

在红霉素启动子 ermE* P1 替换抗性基因 *btmA* 启动子序列完成后,得到柯斯质粒 4E11/*btmA*/ermE* P1。利用 PCR-targeting 的方法对柯斯质粒 4E11/*btmA*/ermE* P1 上前提肽合成基因 *btmD* 启动子序列原位替换。设计引物 btmD-Ep1 和 btmD-Ep2,引物 btmD-Ep1 与 btmD-Ep2 斜体部分与前体肽合成基因 *btmD* 启动子序列相匹配。结构基因 *btmD* 启动子序列原位替换具体方法参照本文“1.6”。

1.8 菌株 M145/4E11/*btmA*/*btmD*/ermE* P1 发酵产物 HPLC-MS 检测

红霉素启动子 ermE* P1 原位替换抗性基因 *btmA* 和前体肽合成基因 *btmD* 启动子序列完成后,得到柯斯质粒 4E11/*btmA*/*btmD*/ermE* P1。将该质粒电转入 *E. coli* ET12567/pUZ8002 中,并通过接合转移转化至天蓝色链霉菌 M145 中,得到菌株 M145/4E11/*btmA*/*btmD*/ermE* P1。对菌株 M145/4E11/*btmA*/*btmD*/ermE* P1 进行发酵,并以菌株 M145/4E11 做为对照,HPLC-MS 检测波卓霉素产物。发酵及检测方法参照本文“1.5”。

2 结果与分析

2.1 基因组测序及结果

通过对 *Streptomyces bottropensis* ATCC 25435 基因组的测序,获得基因组总数据多达 1 199 Mb(G+C,71.53%),基因组被覆盖 138 次。最终获得 *Streptomyces bottropensis* ATCC 25435 基因组序列草谱,大小 8 914 727 bp,分布于 43 个 scaffold 上。所有的基因组存在于 1 条染色体上,该染色体包括 4 个 rRNA 操纵子,70 个 tRNA 基因和 8 253 个蛋白编码基因(CDSs)。对 *Streptomyces*

bottropensis ATCC 25435 基因组分析发现其中部分基因参与次级代谢物的形成,由 antiSMASH 鉴定该基因组,含有 21 个次级代谢物生物合成基因簇(4 个铁载体,5 个萜烯类化合物,1 个羊毛硫抗生素,1 个细菌素,2 个 I 型聚酮化合物,2 个 II 型聚酮化合物,3 个 NRPS 化合物和 3 个 NRPS-PKS 杂化合物)。Streptomyces bottropensis ATCC 25435 基因组序列已被 GenBank 收录,收录号为 AOCF00000000^[18]。

2.2 波卓霉素生物合成基因簇预测

波卓霉素基因簇在 scaffold 9 上,约 13 个基因参与波卓霉素的合成(图 2A),各基因的功能注释如表 2 所示,在该基因簇上有 3 个不同的 SAM 自由基酶基因,1 个前体肽基因,2 个环化脱水酶基因(YcaO-like family),1 个 O-甲基转移酶基因,1 个多耐药抗性载体基因,1 个酰胺水解酶基,1 个 α/β 水解酶基因,1 个亮氨酸-氨基肽酶基因,1 个细胞色素 P450 酶基因和 1 个转录调节基因。试验所预测波卓霉素生物合成基因簇,与 Huo 等^[19]所报道菌株 Streptomyces sp. BC16019 的波卓霉素生物合成基因簇各氨基酸序列的一致性存在一定差异。

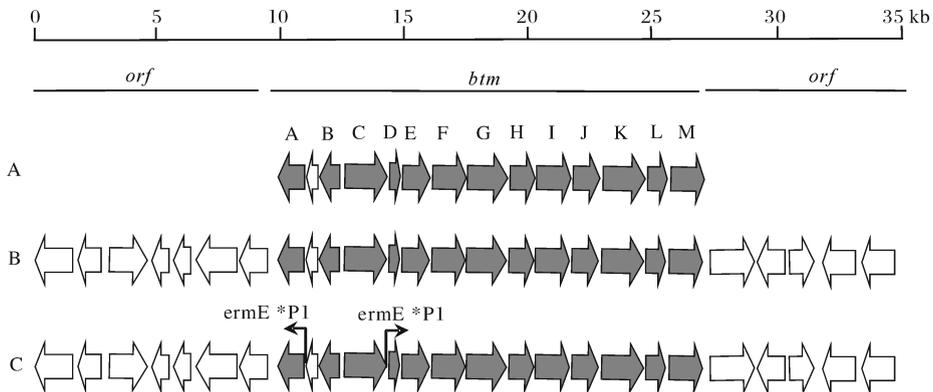
2.3 波卓链霉菌基因组文库的构建及筛选

λ 噬菌体包装片段长度有一定选择范围,一般片段长度约 30~50 kb,在对波卓链霉菌基因组用 Sau3A I 部分酶切时,处理时间非常关键。本研究

选取了 6 个不同的酶切时间,经 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果(图 3),选取了酶切处理时间为 4 min 的基因组做为基因组文库的构建。基因组去磷酸化处理后与载体连接,经过电泳分析,基因组 8 μL 的连接结果显示载体的短臂全部消失,长臂也几乎完全消失(图 3),说明该体系连接效果最好,可用于噬菌体包装。包装、转染,得到波卓链霉菌 cosmid 基因组文库。随机挑取 20 个黏粒,酶切胶胶分离,根据酶切片段估算平均插入片段长度 38 kb,其中最大插入片段 43 kb。计算达到 99% 的完备性并覆盖整个基因组 1 遍所需的克隆数为 1 067,共需挑去 2 135 个克隆保存。以引物 8114S/8114A 和 8128S/8128A 为 PCR 筛选引物,对 1 500 个文库克隆进行菌落 PCR 筛选,共得到 5 个阳性克隆,提取质粒,基因测序得到该 5 个载体所携带基因片段大小及范围。其中柯斯质粒 4E11(图 2B)携带完整的波卓霉素生物合成基因簇,用于波卓霉素生物合成在模式链霉菌天蓝链霉菌 M145 和变铅青链霉菌 TK24 中异源表达。

2.4 波卓霉素生物合成基因簇异源表达株 M145/4E11 和 TK24/4E11 发酵产生波卓霉素

柯斯质粒 4E11 经接合转移转化至模式链霉菌天蓝链霉菌 M145 和变铅青链霉菌 TK24 中,异源表达株验证;选取 2 个接合子进行传代培养,并用波卓霉素生物合成筛选引物 8114S&8114A 进行 PCR 验证,验证结果见图 4,表明柯斯质粒 4E11 已



A:波卓霉素生物合成基因簇 Bottromycin gene cluster; B:柯斯质粒 4E11 所携带外源基因片段,包含完整波卓霉素生物合成基因簇 Cosmid 4E11 with complete gene cluster; C:柯斯质粒 4E11 突变载体 4E11/*btmA*/*btmD*/*ermE**P1,抗性基因 *btmA* 启动子序列和结构基因 *btmD* 启动子序列用红霉素启动子 *ermE**P1 原位替换 The promoters of *btmA* and *btmD* were replaced with *ermE**P1 in 4E11.

图 2 波卓霉素生物合成基因簇

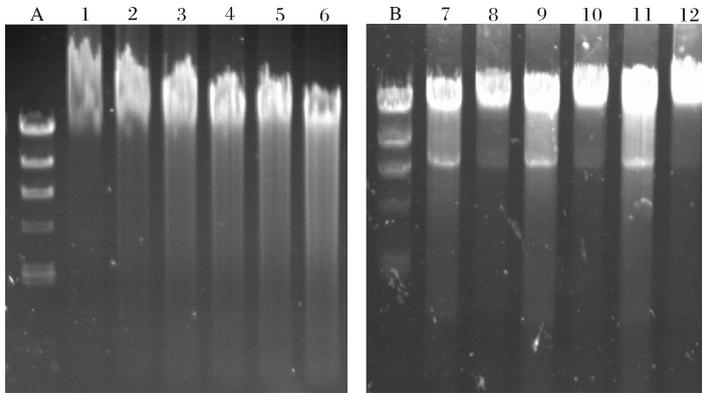
Fig. 2 The biosynthetic gene cluster of bottromycin

表 2 波卓霉素生物合成基因簇各种基因

Table 2 Biosynthetic genes of bottromycin

基因 Gene	氨基酸数量 Number of amino acid	基因功能注释 Putative function of gene	序列一致性/% ¹⁾ Identity
<i>btmA</i>	429	耐多药载体基因 Multidrug transporter	89
<i>btmB</i>	280	氧甲基转移酶基因 O-Methyl transferase	91
<i>btmC</i>	631	SAM 自由基酶基因 Radical SAM	92
<i>btmD</i>	45	前提肽合成基因 Precursor peptide	100
<i>btmE</i>	411	环化脱水酶基因 YcaO-like family cyclodehydratase	83
<i>btmF</i>	389	环化脱水酶基因 YcaO-like family cyclodehydratase	90
<i>btmG</i>	671	SAM 自由基酶基因 Radical SAM	91
<i>btmH</i>	296	α/β 水解酶基因 Putative α/β hydrolase	88
<i>btmI</i>	479	酰胺水解酶基因 Putative amidohydrolase	88
<i>btmJ</i>	379	细胞色素 P450 酶基因 Cytochrome P450 enzyme	92
<i>btmK</i>	678	SAM 自由基酶基因 Radical SAM	91
<i>btmL</i>	185	转录调节基因 Transcriptional regulator	94
<i>btmM</i>	505	亮氨酸-氨基肽酶基因 Leucyl-aminopeptidase	85

1) 与菌株 *Streptomyces* sp. BC16019 波卓霉素生物合成基因氨基酸序列比对 The identity with according gene in *Streptomyces* sp. BC16019.



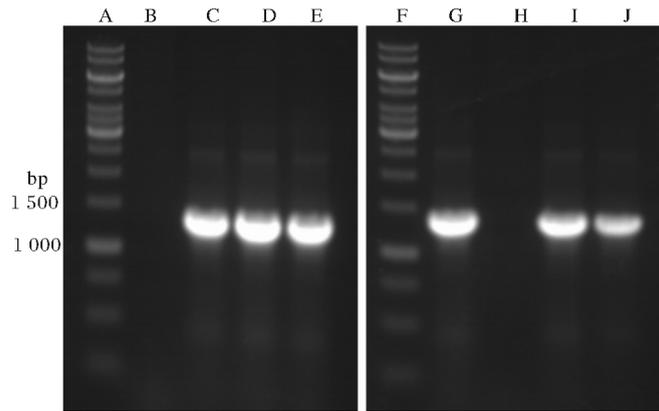
A, B: DNA λ /HindIII 标准(对照)DNA λ /HindIII marker; 1~6: 基因组 DNA 酶切处理时间分别为 0、2、4、6、8、10 min The enzyme processing time was 0, 2, 4, 6, 8, 10 min, respectively; 7, 9, 11: 对照, 反应体系中的酶已 85 °C 失活 Controls, the ligase enzyme had been inactivated at 85 °C; 8, 10, 12: 连接体系基因组 DNA 的量分别为 4、6、8 μ L The amount of genome DNA in the ligase system was 4, 6, 8 μ L.

图 3 基因组酶切及 3 种基因组与载体连接体系的凝胶电泳分析

Fig. 3 Gel electrophoresis of digested genome DNA and three ligation systems

成功转入天蓝色链霉菌 M145 和变铅青链霉菌 TK24, 获得含有整合目的质粒的菌株 M145/4E11 和 TK24/4E11。对菌株 M145/4E11 发酵液进行检测, HPLC-MS 分析结果如图 5。在 30.9 min 处可检测到分子质量大小为 823.5 ku 的化合物, 该质谱

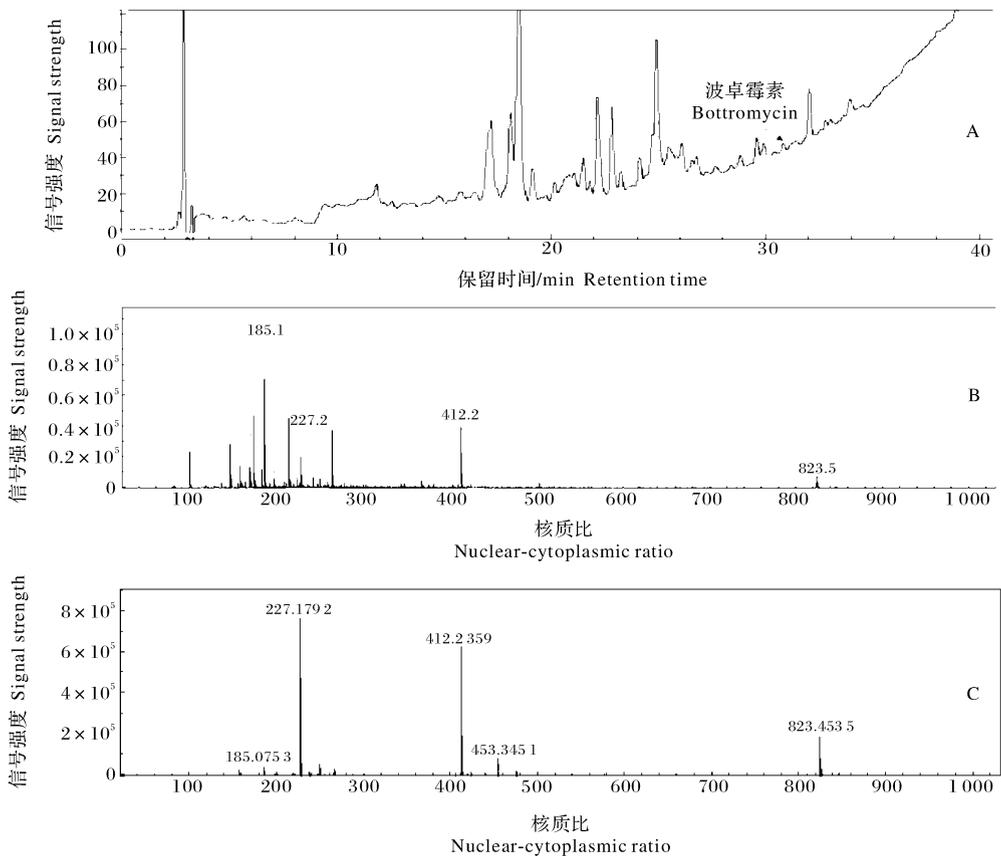
结果与波卓霉素 A2 标品质谱结果完全相同, 表明菌株 M145/4E11 发酵产生波卓霉素 A2。菌株 TK24/4E11 发酵液 HPLC-MS 检测, 没有发现波卓霉素, 表明波卓霉素没有在变铅青链霉菌 TK24 中合成。



A, F: 1 kb 标准(对照) 1 kb DNA marker; C, G: 柯斯质粒 4E11 为模板, PCR 产物 PCR products and the template was cosmid 4E11; B, H: M145 和 TK24 为模板, PCR 产物 PCR products and the template was M145 and TK24 respectively; D, E, I, J: 随机挑取的接合子为模板, PCR 产物 PCR products and templates were transconjugants which were picked randomly.

图 4 接合子 PCR 验证

Fig. 4 The PCR verification of transconjugants



A: 菌株 M145/4E11 发酵液 HPLC 图谱 HPLC chromatograms of strain M145/4E11 fermentation broth; B: 保留时间为 30.9 min 处菌株 M145/4E11 发酵液的 MS 图谱 Mass spectrum of strain M145/4E11 fermentation broth when retention time was 30.9 min; C: 波卓霉素 A2 MS 图谱 Mass spectrum of botromycin A2.

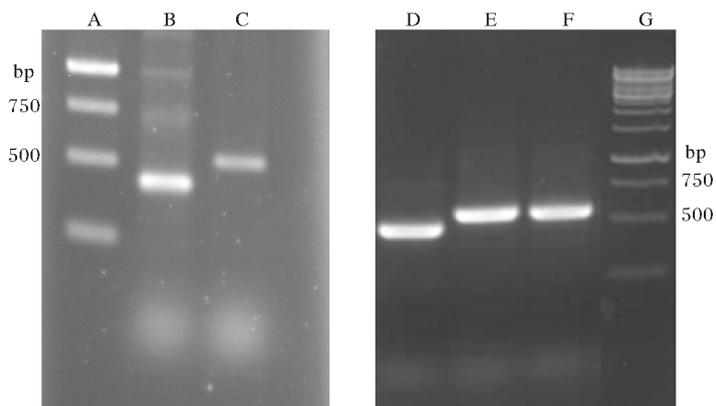
图 5 波卓霉素基因簇异源表达株产生波卓霉素的 HPLC-MS 检测

Fig. 5 HPLC-MS analysis of botromycin produced by M145/4E11

2.5 启动子替换突变株 M145/4E11/*btmA*/*btmD*/*ermE** P1 发酵

通过 Red/ET 重组系统实现了抗性基因 *btmA* 启动子序列和前提肽合成基因 *btmD* 启动子序列用红霉素启动子 *ermE** P1 原位替换,得到柯斯质粒 4E11/*btmA*/*btmD*/*ermE** P1(图 2C),PCR 验证结

果如图 6。通过接合转移将柯斯质粒 4E11/*btmA*/*btmD*/*ermE** P1 转化至天蓝色链霉菌 M145,得到启动子替换突变株 M145/4E11/*btmA*/*btmD*/*ermE** P1,对该菌株进行发酵及 HPLC-MS 检测,波卓霉素产量提高约 2 倍(图 7)。



A,G:DNA 标准 DNA marker; B,D:质粒 4E11 为模板,PCR 产物,条带大小分别约为 0.48、0.49 kb PCR products and the template was cosmid 4E11, the size of DNA bands was 0.48 kb and 0.49 kb, respectively; C:前提肽合成基因 *btmD* 启动子序列用红霉素启动子 *ermE** P1 替换后得到的克隆为模板,PCR 产物,条带大小约 0.59 kb PCR products and the template was 4E11 which promoter of *btmD* was replaced with *ermE** P1, the size of DNA band was 0.59 kb; E,F:抗性基因 *btmA* 启动子序列用红霉素启动子 *ermE** P1 替换后得到的克隆为模板,PCR 产物,条带大小约 0.60 kb PCR product and 4E11 template which promoter of *btmA* was replaced with *ermE** P1, the size of DNA band was 0.60 kb.

图 6 启动子替换 PCR 验证

Fig. 6 PCR verification of replaced promoter

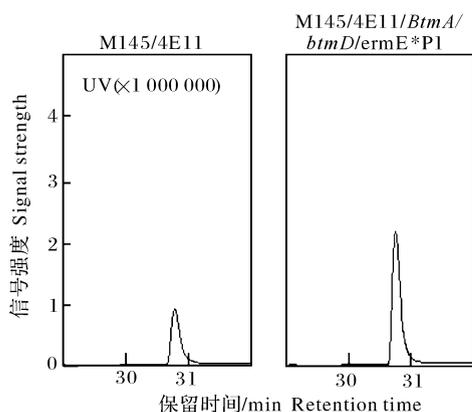


图 7 突变株 M145/4E11/*btmA*/*btmD*/*ermE** P1 HPLC 检测

Fig. 7 The mutant M145/4E11/*btmA*/*btmD*/*ermE** P1 detected by HPLC

3 讨论

70%以上的抗生素或抗肿瘤药物来源于天然产物或与天然产物相关。由于研发费用高,国际上

大制药公司纷纷关闭天然产物研发部门,但天然产物仍是新药发现最重要的来源。传统的天然产物发现是依赖于生物活性筛选为指导的分离纯化过程来获得先导化合物,然后再经过化学合成和化学修饰把它发展成药。从自然资源获得的物质量少,给天然产物发展成药物带来了很大的困难,同时天然产物的化学全合成和化学修饰对于多官能团、结构复杂分子在大规模制备方面存在诸多障碍,因步骤繁多、产率低、成本高昂从而在一定程度上限制了其实用价值。近年来,合成生物学及组合生物合成等技术的发展成为提高天然产物产量及产生新化合物的重要手段。

波卓霉素具有独特的结构及作用机制,其生物合成过程如后修饰步骤(O-甲基化、C-甲基化和分子环化等)仍不清楚。野生菌株 *Streptomyces bototropensis* ATCC 25435 的产量低,同时遗传操作非常困难,限制了对以上问题的研究,其中克服上述问题的办法之一是在模式菌株中异源表达。链霉菌模

式菌株天蓝色链霉菌遗传背景清晰, 遗传操作技术成熟, 对异源基因的表达没有明显的限制修饰, 生长较快, 被广泛用作链霉菌来源天然产物的表达宿主。通过实现波卓霉素生物合成基因簇在天蓝色链霉菌中异源表达, 利用合成生物学技术提高产量, 进而通过基因敲除阻断其生物合成途径, 获得关键中间体, 研究其关键酶学机制, 阐明波卓霉素生物合成机制, 为进一步的遗传改造产生活性更好的波卓霉素类似物奠定基础。Huo 等^[19]已经预测菌株 *Streptomyces* sp. BC16019 波卓霉素生物合成基因簇, 并在模式菌中成功实现异源表达, 但产量比较低, 不利于后续对波卓霉素生物合成的研究。本研究对菌株 *Streptomyces bottropensis* ATCC 25435 全基因组测序, 由基因序列分析确定了波卓霉素生物合成基因簇, 与所报道的波卓霉素基因簇基因序列比对, 氨基酸序列具有差异。本研究首次完成了菌株 *Streptomyces bottropensis* ATCC 25435 波卓霉素生物合成基因簇在天蓝色链霉菌 M145 中异源表达, 结果表明, 波卓霉素的异源表达量同样很低, 可能由多种原因造成, 如与波卓霉素生物基因簇启动子强度、调节基因功能、前体供给及生物合成途径竞争等。提高抗生素结构基因和抗性基因(如编码转运蛋白的基因)的表达量可以提高其产量。波卓霉素生物合成基因簇上, 基因 *btmD* 是编码波卓霉素前提肽的结构基因, 基因 *btmA* 是负责胞内产生的波卓霉素外排到胞外的功能基因。试验用组成型链霉菌强启动子红霉素启动子(*ermE* * P1)原位替换抗性基因 *btmA* 和前提肽合成基因 *btmD* 的启动子序列, 通过增强天蓝色链霉菌对波卓霉素的抗性, 并增加波卓霉素前提肽的合成, 使波卓霉素在天蓝色链霉菌中的异源表达量提高了约 2 倍。需要指出的是, 我们的新菌株没有进行培养基及发酵条件优化, 通过改变培养条件波卓霉素的产量还有进一步提高的空间。今后将进一步研究波卓霉素生物合成调控机制, 通过精确调控基因的表达、密码子优化、更换宿主并优化发酵条件等进一步提高波卓霉素的异源表达量。

参 考 文 献

- [1] WAISVISZ J M, HOEVEN M G, HOLSCHER J F, et al. Bottromycin. II. Preliminary degradation studies[J]. Journal of the American Chemical Society, 1957, 79(16): 4522-4524.
- [2] NAKAMURA S, YAJIMA T, LIN Y, et al. Isolation and characterization of bottromycins A2, B2, C2[J]. The Journal of Antibiotics, 1967, 20(1): 1-5.
- [3] OTAKA T, KAJI A. Mode of action of bottromycin A2: release of aminoacyl- or peptidyl-tRNA from ribosomes[J]. Biol Chem, 1976, 251(8): 2299-2306.
- [4] OTAKA T, KAJI A. Mode of action of bottromycin A2: effect on peptide bond formation[J]. FEBS Lett, 1981, 123(2): 173-176.
- [5] 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.
- [6] GUST B, KIESER T, CHATER K. PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2002.
- [7] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [8] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. Practical *Streptomyces* genetics [M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [9] BENTLEY D R, BALASUBRAMANIAN S, SWERDLOW H P, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry[J]. Nature, 2008, 456(7218): 53-59.
- [10] LI R, ZHU H, RUAN J, et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing[J]. Genome research, 2010, 20(2): 265-272.
- [11] DELCHER A L, BRATKE K A, POWERS E C, et al. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer [J]. Bioinformatics (Oxford, England), 2007, 23(6): 673-679.
- [12] LAGESE N, HALLIN P, RODLAND E A, et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(9): 3100-3108.
- [13] SCHATTNER P, BROOKS A N, LOWE T M. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33: W686-W689.
- [14] KANEHISA M, GOTO S, FURUMICHI M, et al. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38: D355-D360.
- [15] BAIROCH A, APWEILER R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 200 [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 45-48.
- [16] TATUSOV R L, GALPERIN M Y, NATALE D A, et al. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 33-36.
- [17] 田云龙, 朱昌雄, 蒋细良, 等. PCR 方法筛选淡紫灰链霉菌海南变种基因组粘粒文库[J]. 生物技术通报, 2009(11): 117-120.
- [18] ZHANG H, ZHOU W, ZHUANG Y, et al. Draft genome sequence of *Streptomyces bottropensis* ATCC 25435, a bottromycin-producing actinomycete [J]. Genome Announcements,

2013,1(2):e0001913.

ogy to study and engineer ribosomal bottromycin biosynthesis

[19] HUO L,RACHID S,STADLER M,et al. Synthetic biotechnol-

[J]. Chem Biol,2012,19(10):1278-1287.

Heterologous expression of bottromycin biosynthetic gene cluster and increase of yield

ZHOU Wei^{1,2} ZHANG Xue-wen^{1,2} ZHUANG Yi-bin²
LIU Xiao-nan² YIN Hua² YU Peng¹ LIU Tao²

1. *Tianjin University of Science and Technology, College of Biotechnology, Tianjin 300457, China;*
2. *Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China*

Abstract Bottromycin with the biological activity against Gram-positive bacteria and mycoplasma was isolated from *Streptomyces bottropensis*. It exhibited activities against methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Vancomycin-Resistant Enterococcus* (VRE). Cosmid 4E11 carrying the whole biosynthetic gene cluster of bottromycin was obtained by constructing genomic library and PCR screening, and then transformed into *Streptomyces coelicolor* M145 by intergeneric conjugation. The recombinant strain M145/4E11 was obtained. The results of fermentation showed that the M145/4E11 could produce bottromycin. Based on the Red/ET recombination system and technology, the native promoters of *btmA* and *btmD* were replaced by erythromycin promoter (ermE * P1) in M145/4E11, and bottromycin yield of the mutant was increased successfully.

Key words *Streptomyces bottropensis*; bottromycin; genomic library; heterologous expression; promoter replacement

(责任编辑:陆文昌)