

## 研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-032

## 基于紫外诱变与生物合成基因簇倍增的多氧霉素高产菌株构建

刘如欣<sup>1</sup>, 杜磊<sup>1,2</sup>, 徐晓庆<sup>3</sup>, 丁金鹏<sup>3</sup>, 张伟<sup>1</sup>, 李盛英<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 山东大学微生物技术研究院, 山东 青岛 266237; <sup>2</sup> 山东省合成生物学重点实验室, 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266101; <sup>3</sup> 乳山韩威生物科技有限公司, 山东 乳山 264502)

**摘要:** 多氧霉素是一种抑制几丁质生物合成的广谱抗真菌类抗生素, 对多种真菌引起的农作物病害具有显著的防治效果, 且对人和动植物无害, 是一种绿色安全的生物农药, 目前仍然是全球应用最广泛的抗真菌农药之一。多氧霉素的主要作用机制在于竞争性抑制真菌细胞壁合成中几丁质合成酶的活性, 因此对农作物真菌病害具有显著的防治效果。现代农业的发展对于绿色生物农药的需求日益增长, 本研究的目的是构建多氧霉素关键活性成分——多氧霉素B的高产菌株。从一株自土壤环境中分离得到的金色链霉菌 (*Streptomyces ansochromogenes*) 出发, 首先通过紫外诱变初步筛选多氧霉素B的高产突变菌株; 然后利用 ExoCET 直接克隆技术对多氧霉素基因簇 *pol* 进行克隆, 并在基因簇第 1 个基因上游分别添加原始启动子和 *kasOp\** 强启动子, 通过整合酶 *phiC31* 将基因簇整合到突变株染色体上构建 *pol* 倍增菌株, HPLC-MS 检测比较多氧霉素B的产量。通过紫外诱变育种和筛选获得了链霉菌突变株 Pol-12 菌株, 其产量较野生型菌株提高了 1.2 倍。为进一步提高多氧霉素产量, 利用 ExoCET 直接克隆技术将 *pol* 克隆至 p15A 载体, 并通过接合转移转化 Pol-12 菌株获得 *pol* 倍增菌株 *S. ansochromogenes* Pol-12::P<sub>ori</sub>-*pol* (M1) 和 *S. ansochromogenes* Pol-12::P<sub>kasOp\*</sub>-*pol* (M2)。与受体菌 Pol-12 相比, 菌株 M1 和 M2 多氧霉素B的产量分别提高了 22 倍和 33 倍。因此得出结论: 紫外随机诱变育种联合基因工程定向育种可有效应用于多氧霉素高产菌株的构建, 增加基因簇的拷贝数以及强启动子插入有效提高了多氧霉素B的产量。

**关键词:** 多氧霉素; 链霉菌; 紫外诱变; ExoCET 直接克隆; 基因工程育种

**中图分类号:** Q 939.9 **文献标志码:** A

## Construction of high polyoxin-producing strains by ultraviolet mutagenesis and duplication of a biosynthetic gene cluster

LIU Ruxin<sup>1</sup>, DU Lei<sup>1,2</sup>, XU Xiaoqing<sup>3</sup>, DING Jinpeng<sup>3</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, LI Shengying<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Microbial Technology Institute, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China; <sup>2</sup> Shandong Provincial Key Laboratory of Synthetic Biology, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China; <sup>3</sup> Rushan Hanwei Biochechnology Co., Ltd., Rushan 264502, Shandong, China)

**Abstract:** Modern agriculture urgently demands for green biological pesticides. Polyoxins are a class of nucleoside

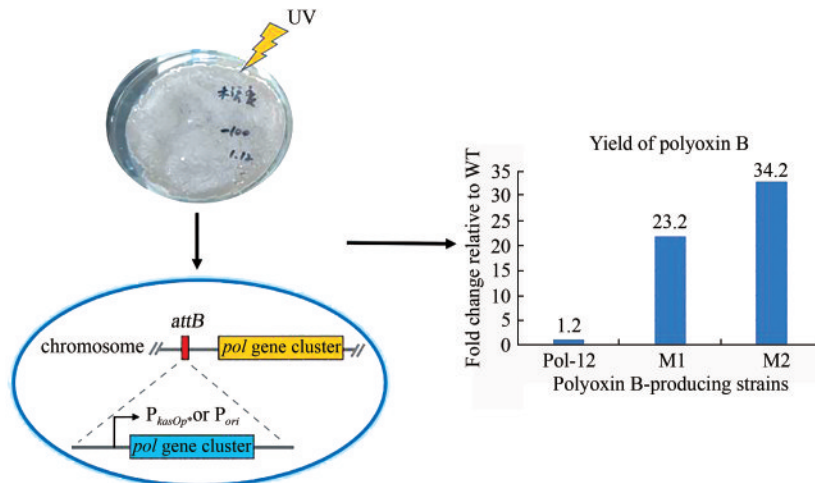
收稿日期: 2020-03-22 修回日期: 2020-04-08

基金项目: 国家自然科学基金 (32025001, 31800041)

引用本文: 刘如欣, 杜磊, 徐晓庆, 丁金鹏, 张伟, 李盛英. 基于紫外诱变与生物合成基因簇倍增的多氧霉素高产菌株构建[J]. 合成生物学, 2020, 1(5): 609-620

Citation: LIU Ruxin, DU Lei, XU Xiaoqing, DING Jinpeng, ZHANG Wei, LI Shengying. Construction of high polyoxin-producing strains by ultraviolet mutagenesis and duplication of a biosynthetic gene cluster[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(5): 609-620

antibiotics with a broad spectrum of biological activities. Polyoxins show remarkable potency towards diverse crop diseases due to their competitive inhibition of the chitin synthetase's activity during the building of fungal cell wall and insect crust. This study aimed to construct a high polyoxin B-producing strain, which is one of the most bioactive ingredients in polyoxin derivatives. First, a high polyoxin B-producing mutant strain Pol-12, showing a 1.2-fold higher yield of polyoxin B than the wild-type strain, was obtained from the random mutants generated by ultraviolet mutagenesis of the starting strain *Streptomyces ansochromogenes* that was isolated from soil and stored by this laboratory. Second, the polyoxin biosynthetic gene cluster *pol* was directly cloned into p15A vector by ExoCET direct cloning method; and the original promoter and the *kasOp*\* strong promoter were respectively added upstream of the first gene of *pol*. Third, the resulting shuttle vectors were used to transform the Pol-12 strain by interspecies conjugation and the gene cluster *pol* was integrated into the chromosome by integrase *phiC31*, leading to the *pol*-duplicated strains *S. ansochromogenes* Pol-12::P<sub>ori</sub>-*pol* (M1) and *S. ansochromogenes* Pol-12::P<sub>kasOp</sub>\*-*pol* (M2). Compared with Pol-12, the yield of polyoxin B was increased by 22 and 33 times in M1 and M2, respectively. These results indicate that UV mutagenesis together with genetic engineering breeding can be applied in construction of high polyoxin-producing strains. Increase of the copy number of biosynthetic gene cluster and strong promoter insertion are effective for titer-improvement of polyoxin B.

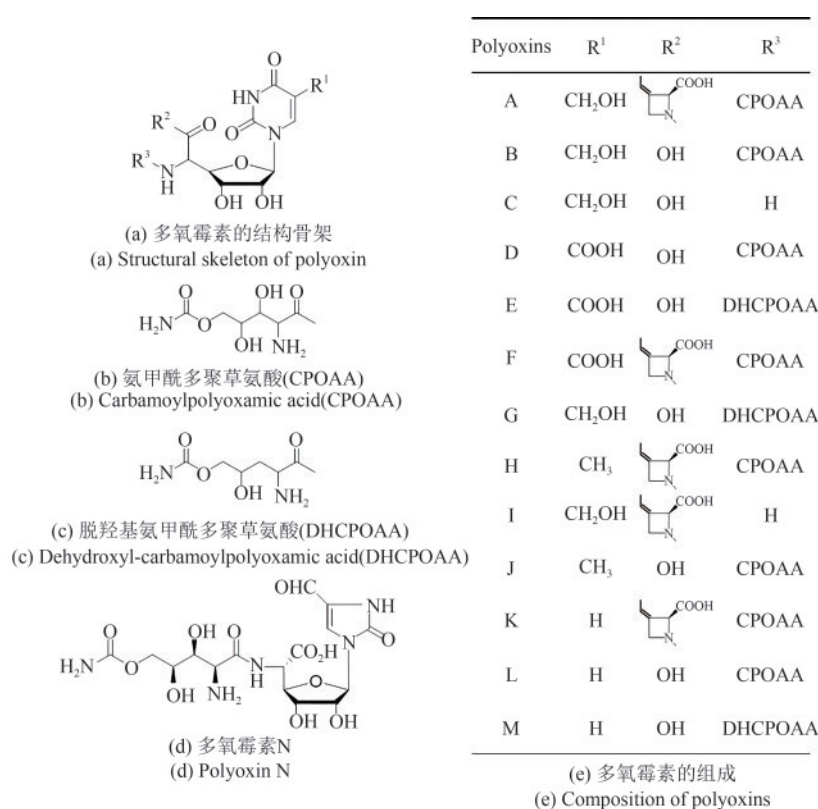


**Keywords:** polyoxins; *Streptomyces*; UV mutagenesis; ExoCET direct cloning; genetic engineering breeding

1965年 Suzuki 等<sup>[1]</sup>首次从分离自日本熊本县阿苏地区土壤的可可链霉菌阿苏变种 (*Streptomyces cacaoi* var. *asoeinsis*) 的发酵液中检测到一种具有较强抗真菌活性的肽基核苷类抗生素, 由于该抗生素的结构中含有多个氧原子, 将其命名为多氧霉素。1967年我国中国科学院微生物所在安徽省合肥市的菜园土壤中分离到另一株多氧霉素的产生菌金色链霉菌 (*S. aureochromogenes*)<sup>[2]</sup>。多氧霉素对多种真菌引起的农作物病害如黑斑病、灰霉病等具有很好的防治效果, 且对动植物没有毒性, 在环境中可降解, 是一种理想的绿色农药。经过数十年的应

用, 目前多氧霉素仍然是在全球应用最为广泛的农用抗生素之一。

多氧霉素的化学结构与几丁质合成酶 (chitin synthase) 的底物尿苷二磷酸酯-*N*-乙酰氨基葡萄糖 (UDP-GlcNAc) 相似, 因而能够竞争性抑制真菌细胞壁中几丁质的合成, 导致细胞因渗透压差异而裂解<sup>[3-4]</sup>。Isono 等<sup>[3, 5-7]</sup>将可可链霉菌阿苏变种的发酵液进行多步分离纯化和结构鉴定, 发现多氧霉素由多氧霉素 A~M 13 个组分组成 (图 1), 其中 A 和 B 为主要组分, B 组分的抗真菌效果尤为显著。之后 Uramoto 等<sup>[8]</sup>又从 *S. piomogenus* 分离

图1 多氧霉素的结构与组成<sup>[6]</sup>Fig. 1 Composition and structures of polyoxins<sup>[6]</sup>

得到新组分多氧霉素N，与其他多氧霉素不同，多氧霉素N是一种杂合抗生素，它由多氧霉素的肽基和尼可霉素的核苷骨架组合而成（图1）。

多氧霉素的化学结构主要由核苷骨架（nucleoside skeleton）、氨甲酰多聚草氨酸（carbamoylpolyoxamic acid, CPOAA）和聚脲酸（polyoximic acid, POIA）三部分组成<sup>[9]</sup>，其中核苷骨架以尿苷和磷酸烯醇式丙酮酸为前体<sup>[10]</sup>，氨甲酰多聚草氨酸的合成前体为异亮氨酸<sup>[11-12]</sup>，聚脲酸合成前体为谷氨酸。2009年Chen等<sup>[13]</sup>首次从*S. cacaoi*基因组文库中克隆到多氧霉素的完整生物合成基因簇，并成功在*S. lividans* TK24中进行异源表达，实现了多氧霉素H组分的产生。多氧霉素基因簇含有20个基因：*polB*、*polA*、*polD*、*polH*、*polI*、*polJ*和*polK*七个基因负责核苷骨架的合成<sup>[10]</sup>，肽基CPOAA由*polL*、*polM*、*polN*、*polO*和*polP*五个基因负责组装<sup>[14]</sup>，*polC*、*polE*和*polF*则负责另一个肽基POIA的合成<sup>[13]</sup>，最后由*polG*基因编码的PolG蛋白负责将两个肽基组装到核苷

骨架上，*polQ1*与*polQ2*编码转运蛋白，*polR*<sup>[15]</sup>和*polY*<sup>[16]</sup>为正调控基因。

物理或化学诱变育种是传统的抗生素菌种选育方法，具有速度快、方法简便等优点，缺点在于缺乏定向性，必须与大规模筛选相配合才能获得较好的效果。近年来，随着分子育种及合成生物学的快速发展，出现了一些新的策略，如增加目标产物合成基因簇的拷贝数、提高前体供应、阻断竞争通路、重整目标产物基因簇等<sup>[17]</sup>。其中，增加基因簇的拷贝数可显著提高目标化合物的产量：Yanai等<sup>[18]</sup>通过在卡那霉素链霉菌中将卡那霉素基因簇的拷贝数增加2，使卡那霉素的产量翻番。该课题组<sup>[19-20]</sup>随后又发现了由ZouA和RsA/RsB介导的基因倍增系统，并利用该系统使放线紫红素的产量提高了20多倍。芦银华等<sup>[21]</sup>利用其建立的多重整合酶-多重*attB*位点的方法将5-氧代米尔贝霉素的基因簇增加了3个拷贝，使其产量提高了近2倍。ExoCET直接克隆技术将核酸外切酶介导的体外同源重组和RecET介导的细胞内同源重

组有效结合,可以快速、高效地对大片段DNA(如次级代谢产物基因簇)进行直接克隆,可有效用于基因簇倍增<sup>[22-25]</sup>。例如: Ongley等<sup>[26]</sup>利用直接克隆技术成功从不可培养的海洋藻青菌中克隆了lyngbyatoxin的生物合成基因簇,并在大肠杆菌中实现了异源表达,其产量为25.6 mg/L,其前体化合物indolactamV的产量达到了150 mg/L; Bian等<sup>[27]</sup>利用直接克隆技术成功从伯克菌DSM7029中克隆了一种蛋白酶抑制剂——glidobactin的生物合成基因簇,并通过在大肠杆菌中进行异源表达将其产量提高了10倍。

我国于20世纪70年代开始进行有关多氧霉素菌种选育和生产工艺的研究,但是其生产水平仍然较低、成本较高,目前主要依赖于从日本进口的含多氧霉素的农药品种宝丽安<sup>[2]</sup>。本文作者为了提高多氧霉素B的产量,从一株由本实验室自土壤环境中分离得到的多氧霉素产生菌——金色链霉菌出发,将传统的紫外诱变育种与基因工程育种相结合,首先通过紫外诱变育种初步筛选多氧霉素B高产菌株,然后通过

ExoCET直接克隆技术将多氧霉素生物合成基因簇*pol*克隆到p15A载体上,并利用Red/ET重组工程技术对得到的重组质粒进行修饰,进而构建*pol*倍增菌株,成功提高了工程菌多氧霉素B的产量,期待为我国多氧霉素的工业发酵生产提供候选菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种、质粒和引物

本研究所用的菌株和质粒见表1。寡核苷酸引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,本研究所用的寡核苷酸序列见表2。

#### 1.1.2 培养基

LB培养基(100 mL): 蛋白胨1 g, 酵母粉0.5 g, 氯化钠0.1 g。

MS培养基(100 mL): 大豆粉2 g, 甘露醇2 g, 琼脂2 g。

表1 本研究所用的菌株和质粒

Tab. 1 Strains and plasmids used in this study

Type	Characteristics	Source
<b>Strains</b>		
<i>S. ansochromogenes</i>	Wild type strain	This laboratory
<i>S. ansochromogenes</i> Pol-12	High polyoxin B-producing strain prepared by ultraviolet mutagenesis	This study
<i>S. ansochromogenes</i> Pol-12::P <sub>ori</sub> -pol	High polyoxin B-producing strain upon integration of <i>pol</i> into the <i>S. ansochromogenes</i> Pol-12 chromosome	This study
<i>S. ansochromogenes</i> Pol-12::P <sub>kasOp*</sub> -pol	High polyoxin B-producing strain upon integration of <i>pol</i> into the <i>S. ansochromogenes</i> Pol-12 chromosome, and the strong promoter <i>kasOp*</i> is inserted upstream of the first gene of <i>pol</i>	This study
<i>E. coli</i> GB2005	<i>E. coli</i> DH10B, <i>fhuA</i> ::IS2, <i>ArecET</i> , <i>AybcC</i> ; endogenous <i>recET</i> and DLP12 phage <i>ybcC</i> genes are deleted, and <i>fhuA</i> is mutated to make it resistant to T1 phage	Gifted from Professor Zhang Youming at Shandong University
<i>E. coli</i> GB05-dir	<i>E. coli</i> GB2005, P <sub>BAD</sub> -ETγA; <i>recE</i> , <i>recT</i> , <i>redγ</i> and <i>recA</i> regulated by the arabinose-induced promoter are integrated at the <i>ybcC</i> site on chromosome	
<i>E. coli</i> GB08-red	<i>E. coli</i> GB2005, P <sub>BAD</sub> -αβγA, <i>AlacZ</i> ; <i>redα</i> , <i>redβ</i> , <i>redγ</i> , and <i>recA</i> regulated by the arabinose-induced promoter are integrated at the <i>ybcC</i> site on chromosome, and <i>lacZ</i> is knocked out	
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Donor strain for conjugation, methylated defective strain, pUZ8002 plasmid contains the <i>tra</i> gene, which encodes the transfer protein Tra, and contains chloramphenicol and kanamycin resistance genes	This laboratory
<b>Plasmids</b>		
pSC101-BAD-ETgA	The plasmid contains ETgA operon regulated by the arabinose-induced promoter and tetracycline resistance gene; the pSC101 origin is temperature-sensitive (replicates at 30 °C and stops at 37 °C)	Gifted from Professor Zhang Youming at Shandong University
p15A-cm-tetR-tetO-hyg-ccdB	The plasmid contains <i>ccdB</i> , chloramphenicol, hygromycin and tetracycline resistance genes with a p15A origin	
pR6K-oriT-phiC31	The plasmid contains <i>oriT</i> , integrase <i>phiC31</i> and apramycin resistance genes with a pR6k origin	

表2 本研究所用的寡核苷酸序列

Tab. 2 Nucleotide sequences used in this study

Oligos	Sequence
p15Acm-PO-1	ctccgtcatgtctaccactctccgccgccccgcagccgaagccgacAGATCCGAAAACCCCAAGTTACG
p15Acm-PO-2	tcaccacggcgccggtgaatggctggaggacacgtcgagagcaatcgAGATCCTTTCTCTCTTTAGATC
p15A-seq-5	GGAAGCGGAATATATCCCTA
tetR-seq-3	GACCTCATTAAGCAGCTCTA
oripromoter-1	CTCCGTCATGTCCTACCCACTCT
oripromoter-2	CCGGTCCC GCCGACCCGCCACT
p15Aapra-PO-1	ccccaccccatgccccgacgacgccgagccgcccgtcgtcAGATCCGAAAACCCCAAGTTACG
p15Aapra-PO-2	aggcgtgctggcgtggagtgccggcgccgggacccgagatctttcTCCTCTTTAGATC
p15Aapra-PO-3	CCCCACCCCATGGCCCCGACGA
p15Aapra-kasOp*-PO-2	<u>gtattctctgcccagactttACAACACCCGCACAGCATGTTGTCAAAGCAGAGACCGTTCGAATGTGAACAAGATCCTTT</u> CTCCTCTTTAGATC
p15Aapra-kasOp*-PO-4	<u>ccgacgcccgcgctccggtgagcggccgcccgggaactccgcatAACTCCCCCAGTCTGCACGCTGTCGTATTCTCCTGGCCA</u> <u>CGACTTT</u>
attP-up	AAGCTCTAGCGATTCCAGAC
attP-dn	TTCGTTCAAGGATGCGTTCGAA
attB-up	CCATCATCTTGTCTTGCCG
attB-dn	CTTCCGTCGTTACGGGTAGCA

注：小写部分为同源臂序列；下划线部分为 *kasOp\** 启动子序列。

孢子斜面培养基（100 mL）：可溶性淀粉 2 g， $\text{KNO}_3$  0.1 g， $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g， $\text{NaCl}$  0.05 g， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001 g，琼脂 2 g，pH 7.0。

种子培养基（100 mL）：酵母提取物 1.0 g，胰蛋白胨 1.6 g， $\text{KNO}_3$  0.1 g， $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g， $\text{NaCl}$  0.05 g， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001 g，pH 7.0。

发酵培养基（100 mL）：淀粉 5 g，豆粕粉 2.5 g，酵母提取物 0.5 g，甘露醇 0.5 g， $\text{NaCl}$  0.5 g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.05 g， $\text{CaCO}_3$  0.2 g，pH 7.1。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

试剂：限制性 DNA 内切酶购自莫纳生物技术有限公司和 New England BioLabs 公司；T4 DNA 聚合酶购自 New England BioLabs 公司；PrimeSTAR Max DNA 聚合酶、DNA Marker 购自 Takara 公司；RNase A 购自 Omega Bio-Tek 公司；蛋白胨、酵母粉等购自 Oxoid 公司；琼脂粉、琼脂糖、50 × TAE 电泳缓冲液、10 × TBE 电泳缓冲液购自 Solarbio 公司；Buffer P1、P2、P3、DNA 纯化回收试剂盒等购自天根生化科技（北京）有限公司。

仪器：赛百奥紫外诱变箱；Bruker 液相色谱高分辨质谱联用仪；莱玻特瑞恒温恒湿培养箱；Bio-Rad 电转化仪；Thermofisher Nanodrop 微量紫外分光光度计；Tanon 凝胶成像系统等。

## 1.2 紫外诱变初步筛选多氧霉素高产菌株

### 1.2.1 紫外诱变

将链霉菌孢子悬液稀释至  $10^7 \text{ mL}^{-1}$ ，取 3 mL 混匀的单孢子悬液置于无菌平板上，分别以不同时间（5 s、10 s、20 s、40 s、60 s）的紫外照射时间为紫外线处理剂量，放置于已预热 20 min 的紫外诱变箱（波长 253.5 nm，强度 30 W，距离 30 cm）中进行诱变。紫外线诱变处理后，为防止可见光下回复突变，用黑纸包裹平板，避光静置 2 h。取出后在红光下进行梯度稀释（ $10^{-1} \sim 10^{-5}$ ），再分别以从低到高浓度的顺序涂布于斜面培养基平板中，28 °C 暗处培养 4~7 d。同时，未经紫外处理的孢子进行平行实验，作为对照。

致死率的计算方法：

$$\text{致死率} = \frac{\text{对照菌落总数} - \text{诱变处理后菌落总数}}{\text{对照菌落总数}} \times 100\%$$

通过计算紫外诱变致死率，确定最佳的紫外诱变参数。挑取 100 株突变后的单菌落，传代一次制备孢子悬液备用。

### 1.2.2 多氧霉素突变株的发酵和产量检测

接种不同突变株的孢子于孢子斜面培养基，于 29 °C 培养 7 d，可见明显黑色孢子生成。接种  $0.5 \text{ cm}^2$  到 25 mL 种子培养基（250 mL 三角烧瓶），250 r/min，29 °C，培养 1 d，可见形成大量细颗粒

的菌丝体。按 10% 接种量接种发酵培养基 (25 mL/250 mL), 250 r/min, 29 °C, 培养 6 d, 到衰亡期停止发酵, 培养过程严格控制温度不高于 30 °C。收集发酵液, 离心去除菌体, 吸取 1 mL 上清, 加入 200  $\mu$ L 甲醇, 振荡 1 min, 最高转速离心 10 min, 吸取上清进行 HPLC 检测。

HPLC 检测条件: 色谱柱为 YMC-Triart C<sub>18</sub>, 4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m; 流动相, A 相为水+0.1% 甲酸, B 相为乙腈+0.1% 甲酸; 洗脱程序为 0~10 min 100% A, 10~15 min 93% A, 15.5~23 min 0% A, 23~23.5 min 100% A, 23.5~28 min 100% A; 流速 1 mL/min; 检测波长 262 nm; 进样体积 20  $\mu$ L。

标准品制备: 用 50% 多氧霉素 B 粉末作为标准品, 称取 2 mg, 加 800  $\mu$ L 水溶解, 加 200  $\mu$ L 甲醇, 充分振荡, 最高转速离心 10 min, 吸取上清进行 HPLC 检测。

### 1.3 多氧霉素基因簇的直接克隆

#### 1.3.1 *S. ansochromogenes* Pol-12 基因组的提取

将 50 mL 培养 2 d 的链霉菌菌液 8300 g 离心 5 min, 弃上清。用 30 mL 无菌 ddH<sub>2</sub>O 重悬菌体, 涡旋混匀 8300 g 离心 5 min, 弃上清。用 8 mL SET 溶液重悬细胞, 涡旋混匀。加入 10 mg 溶菌酶, 颠倒混匀, 37 °C 水浴 1 h, 间断颠倒。加入 500  $\mu$ L 20mg/mL 的 Proteinase K, 颠倒混匀, 加入 1 mL 10% SDS, 颠倒混匀。50 °C 水浴 2 h, 中间间断颠倒, 直至溶液澄清。加入 3.5 mL 5 mol/L NaCl, 颠倒混匀。加入 15 mL 苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1), 颠倒混匀, 至呈乳浊状。8300 g 离心 30 min。用去尖枪头取上清 500  $\mu$ L 分装至 2 mL EP 管。加入 35  $\mu$ L 3 mol/L NaAc 和 1.2 mL 无水乙醇, 颠倒混匀。准备新的 2 mL EP 管, 加入 1.5 mL 70% 乙醇, 用黄枪头将絮状 DNA 转移至 EP 管中, 9400 g 离心 1 min。弃上清, 倒置于吸水纸上, 常温干燥 30 min。用 500  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 溶解 DNA。

#### 1.3.2 *S. ansochromogenes* Pol-12 基因组酶切产物制备

选择合适的限制性内切酶 *Bsr*DI, 酶切基因组, 释放基因簇片段。取浓度为 200 ng/ $\mu$ L 的基因

组 DNA 250  $\mu$ L, 加入 40  $\mu$ L 10  $\times$  Cutsmart、15  $\mu$ L 限制性内切酶 *Bsr*DI、2  $\mu$ L RNase A, 用双蒸水补至 400  $\mu$ L, 37 °C 反应 4 h。取 10  $\mu$ L 酶切产物跑琼脂糖凝胶电泳进行检测。检测之后用对苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 抽提酶切产物除去蛋白, 然后进行酒精沉淀。

#### 1.3.3 直接克隆载体的制备

以 p15Acm-PO-1 和 p15Acm-PO-2 为 PCR 引物, 以质粒 p15A-cm-tetR-tetO-hyg-ccdB 为 PCR 模板, 进行 PCR 扩增。通过琼脂糖凝胶电泳检测大小为 2720 bp 的 PCR 产物 p15A-cm-PO PCR, 切胶回收目的片段。

#### 1.3.4 多氧霉素基因簇的直接克隆

直接克隆载体和酶切基因组产物在体外用 T4 DNA Polymerase 退火: 取 200 ng p15A-cm-PO PCR, 加入 2  $\mu$ g 基因组酶切产物、0.2  $\mu$ L 10  $\times$  NEB Buffer 2.1、0.13  $\mu$ L T4 DNA Polymerase、12.87  $\mu$ L 双蒸水, PCR 仪中 25 °C 1 h, 75 °C 20 min, 50 °C 30 min, 1 个循环, 4 °C 保温。反应完成之后将产物室温除盐 30 min。将上述除盐后的产物电转化到经 L-Ara 诱导的感受态细胞 *E. coli* GB05dir (含有 pSC101-BAD-ETgA) 中。从转化平板上挑取单菌落, 少量提取质粒, 进行酶切分析。

### 1.4 多氧霉素基因簇倍增菌株的构建

#### 1.4.1 质粒 p15A-apra-oriT-phiC31 的构建

制备质粒 p15A-cm-tetR-tetO-hyg-ccdB 和 pR6K-oriT-phiC31, 用限制性内切酶 *Ase* I 酶切 pR6K-oriT-phiC31, 得到带有同源臂的酶切片段 apra-oriT-phiC31。将酶切产物用 Omega Bio-tek DNA 纯化试剂盒进行纯化。将 200 ng 酶切产物 apra-oriT-phiC31 和 200 ng p15A-cm-tetR-tetO-hyg-ccdB 共同电转化入经 L-Ara 诱导的 GBred-gyrA462 中。挑取单菌落, 少量提取质粒, 用限制性内切酶 *Ase* I 进行酶切鉴定。

#### 1.4.2 p15A-apra-P<sub>ori</sub>-pol 的构建

以链霉菌 *S. ansochromogenes* Pol-12 基因组 DNA 为模板、ori-promoter-1/2 为引物, 进行 PCR 扩增, 得到原始启动子的 PCR 产物 ori-promoter

PCR; 以 p15A-apra-oriT-phiC31 为模板、p15Aapra-PO-1/2 为引物, 进行 PCR 扩增, 得到 PCR 产物 p15Aapra-PO PCR-1。以 ori-promoter PCR 和 p15Aapra-PO PCR-1 为模板, 以 p15Aapra-PO-3 和 oripromoter-1 进行融合 PCR 扩增, 得到 p15A-apra-P<sub>ori</sub> PCR。制备质粒 p15A-cm-pol, 将 500 ng p15A-apra-P<sub>ori</sub> PCR 和 500 ng p15A-cm-pol 共同电转化入经 L-Ara 诱导的 GBred 的感受态细胞中, 挑取单菌落, 小量提取重组质粒, 用限制性内切酶 BamHI 进行酶切鉴定, 将酶切鉴定正确的质粒 p15A-apra-P<sub>ori</sub>-pol 送生工生物工程(上海)股份有限公司对同源臂部分进行测序确认。

#### 1.4.3 p15A-apra-P<sub>kasOp\*</sub>-pol 的构建

以 p15A-apra-oriT-phiC31 为模板, 以 p15Aapra-PO-1 和 p15Aapra-kasOp\*-PO-2 为引物, 进行 PCR 扩增, 得到 PCR 产物 p15A-apra-P<sub>kasOp\*</sub> PCR。将 500 ng p15A-apra-P<sub>kasOp\*</sub> PCR 和 500 ng p15A-cm-pol 共同电转化入经 L-Ara 诱导的 GB05red 的感受态细胞中, 用限制性内切酶 BamHI 对得到的重组子进行酶切鉴定, 将酶切鉴定正确的质粒 p15A-apra-P<sub>kasOp\*</sub>-pol 送去生工生物工程(上海)股份有限公司对同源臂部分进行测序。

#### 1.4.4 pol 在链霉菌 *S. ansochromogenes* Pol-12 中的整合和表达

将质粒 p15A-apra-P<sub>ori</sub>-pol 和 p15A-apra-P<sub>kasOp\*</sub>-pol 分别电转化入 *E. coli* ET12567/pUZ8002 中。链霉菌和大肠杆菌的接合转移参照文献 [28]。多氧霉素的发酵和产量检测方法同 1.2.2。

## 2 结果和分析

### 2.1 紫外诱变筛选多氧霉素高产菌株

通过 1.2 的公式计算紫外诱变致死率, 确定最佳的紫外诱变参数为 5~10 s (致死率 90%~95%)。经紫外诱变和 100 株随机挑选的突变菌株的多氧霉素 B 产量比较, 得到突变株 *S. ansochromogenes* Pol-12, 其摇瓶发酵 6 d 的产量较野生型菌株提高了 1.2 倍。

### 2.2 多氧霉素基因簇的直接克隆

#### 2.2.1 基因组提取及酶切

按 1.3.1 的方法制备基因组, 并用限制性内切酶 BsrDI 对基因组 DNA 进行酶切, 释放多氧霉素基因簇, 通过琼脂糖凝胶电泳对基因组的酶切产物进行检测。如图 2 所示, 未酶切的基因组 DNA 为单一的条带, 而 BsrDI 酶切后的基因组 DNA 条带较多, 并且亮度从上到下呈梯度式下降, 说明得到的酶切产物 DNA 质量较好。

#### 2.2.2 多氧霉素基因簇直接克隆载体的制备

PCR 扩增的模板为 p15A-cm-tetR-tetO-hyg-ccdB, 模板上带有 ccdB 反向筛选基因, 可以消除筛选中由模板带来的背景菌落。PCR 产物的大小与预期条带 (2720 bp) 的大小一致, 切胶回收 PCR 产物 (图 3)。

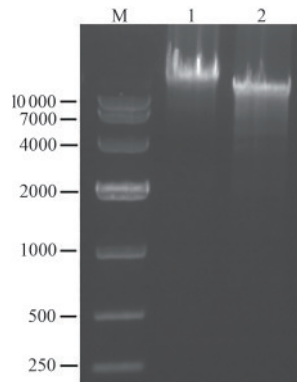
#### 2.2.3 多氧霉素基因簇的直接克隆

将直接克隆载体和基因组酶切产物的 T4 DNA Polymerase 退火产物转化至表达了 RecET 的大肠杆菌感受态细胞中, 复苏涂板后 37 °C 过夜培养, 挑取 8 个转化子, 进行酶切鉴定 (图 4), 所有酶切条带大小均符合预期, 然后对酶切条带正确的质粒的同源臂部分进行测序, 同源臂序列测序正确, 表明得到了含有 pol 的重组质粒 p15A-cm-pol。

### 2.3 多氧霉素基因簇倍增菌株的构建

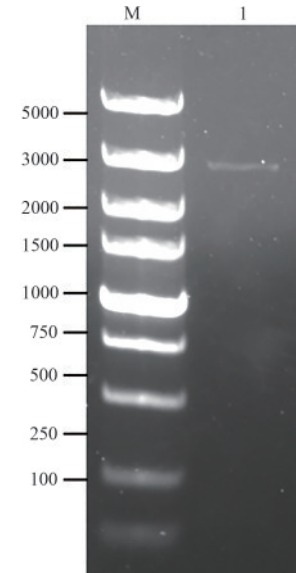
#### 2.3.1 质粒 p15A-apra-oriT-phiC31 的构建

来源于噬菌体的 Red/ET 重组酶可以在大肠杆菌中介导一个线性 DNA 分子和一个环状 DNA 分子发生重组, 简称线环重组 (linear-circular homologous recombination, LCHR)。为了方便下一步接合转移和位点特异性元件的插入, 将含有筛选标记阿泊拉霉素抗性基因 apra、转移起始位点 oriT、整合酶基因 phiC31 的片段 apra-oriT-phiC31 通过 Red/ET 重组酶介导的线环重组替换掉 p15A-cm-tetR-tetO-hyg-ccdB 上的氯霉素抗性基因 cm (图 5), 获得质粒 p15A-apra-oriT-phiC31。通过酶切鉴定分析 6 个转化子的酶切条带均与预测条带相符, 从中选取 3 个转化子进行同源臂部分测序, 得到了 1 个同源臂序列正确的重组质粒 p15A-apra-oriT-phiC31。

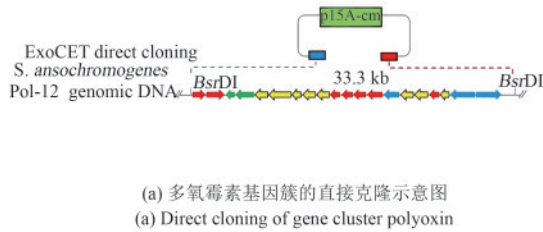


**图2** 链霉菌 *S. ansochromogenes* Pol-12 的基因组及其限制性内切酶 *BsrDI* 酶切产物  
M—Takara DL10 000 DNA Marker; 1—*S. ansochromogenes* Pol-12 的基因组 DNA; 2—*S. ansochromogenes* Pol-12 基因组 DNA 的 *BsrDI* 酶切产物

**Fig. 2** Genomic DNA of *S. ansochromogenes* Pol-12 and its digestion product by *BsrDI*



**图3** 直接克隆载体的 PCR 扩增产物  
**Fig. 3** PCR amplification product of direct cloning vector



**图4** 多氧霉素基因簇的直接克隆

**Fig. 4** Direct cloning of *pol* gene cluster

### 2.3.2 原始启动子、*kasOp\**启动子以及接合转移和位点特异性整合元件的插入

由于直接克隆得到的重组质粒 p15A-cm-*pol* 未包含启动子部分, 为比较原始启动子和强启动子 *kasOp\** 对多氧霉素产量的影响, 分别将原始启动子和 *kasOp\** 启动子插入基因簇第 1 个基因上游, 通过线环重组构建重组质粒 p15A-apra- $P_{ori}$ -*pol* 和 p15A-apra- $P_{kasOp^*}$ -*pol* (图 6), 分别挑取了 7 个和 15 个转化子, 通过酶切鉴定分析表明分别得到了 1 个和 2 个与预测条带相符的转化子, 并对酶切鉴定正确的转化子的同源臂部分进行测序, 同源臂序列均正确。

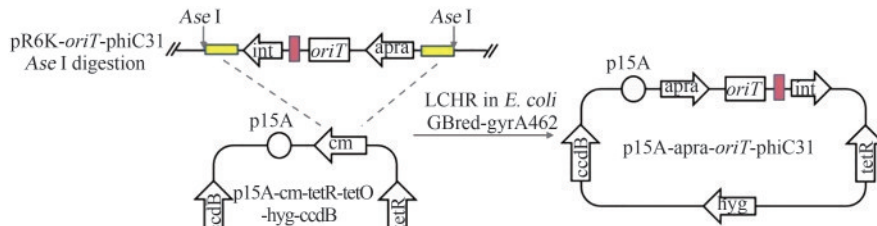
### 2.3.3 多氧霉素基因簇在链霉菌 *S. ansochromogenes* Pol-12 中的整合

通过 *phiC31* 介导的位点特异性重组将构建的包含多氧霉素基因簇 *pol* 的质粒整合到 *S. ansochromogenes* Pol-12 基因组上, 构建多氧霉素

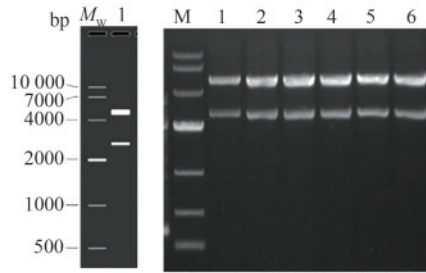
基因簇倍增菌株。从 MS 筛选平板上挑取接合转移转化子进行菌落 PCR 验证 (图 7)。

## 2.4 多氧霉素基因簇倍增菌株的产量检测

按照 1.2.2 节进行菌株发酵和产量检测, 多氧霉素基因簇倍增菌株发酵液进行 HPLC-MS 分析, 根据多氧霉素 B 的分子量, 从基峰图中提取分子量 508, 得到如图 8 所示的结果, 并对样品中多氧霉素 B 组分的色谱峰进行积分计算峰面积, 发现与 *S. ansochromogenes* Pol-12 相比, 插入了原始启动子调控下的 *pol* 倍增菌株 M1 (*S. ansochromogenes* Pol-12: : $P_{ori}$ -*pol*) 多氧霉素 B 的产量提高了 22 倍, 而插入了 *kasOp\** 强启动子调控下的 *pol* 倍增菌株 M2 (*S. ansochromogenes* Pol-12: : $P_{kasOp^*}$ -*pol*) 多氧霉素 B 的产量提高了 33 倍。



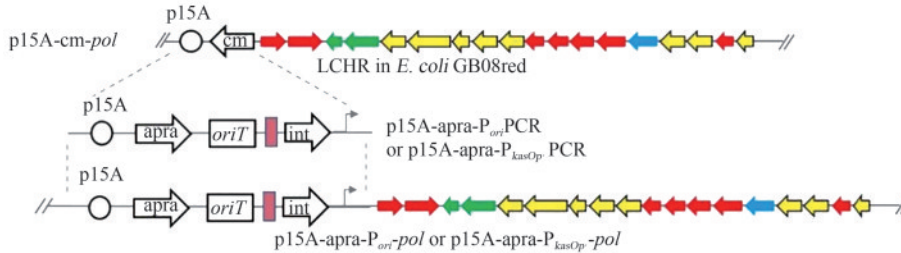
(a) 质粒p15A-apra-oriT-phiC31的构建流程  
(a) Construction of p15A-apra-oriT-phiC31



(b) p15A-apra-oriT-phiC31的Ase I酶切鉴定  
M—takara DL10 000 DNA Marker;  
1~6—线环重组得到的重组子  
(b) Restriction analysis of p15A-apra-oriT-phiC31 by Ase I.  
M—takara DL10 000 DNA Marker; 1~6—recombinant plasmids

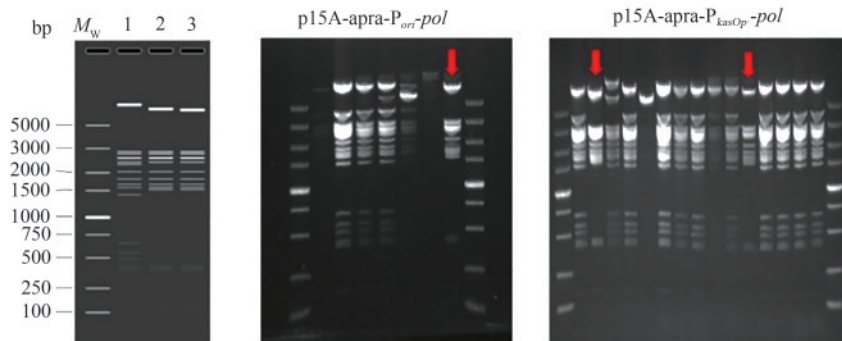
图5 质粒p15A-apra-oriT-phiC31的构建与鉴定

Fig. 5 Construction of p15A-apra-oriT-phiC31 and its verification



(a) 原始启动子、kasOp\*启动子以及接合转移和位点特异性整合元件插入的流程图

(a) Insertion of the original promoter, kasOp\* promoter, and the elements for conjunction and site-specific integration



(b) 重组质粒的BamHI酶切鉴定，红色箭头代表酶切条带正确的重组质粒

(b) Restriction analysis of recombinant plasmids by BamHI. Red arrows indicate right recombinant plasmids

图6 原始启动子、kasOp\*启动子以及接合转移和位点特异性整合元件的插入与鉴定

Fig. 6 Insertion of original promoter, kasOp\* promoter, and elements for conjunction and site-specific integration as well as their verification

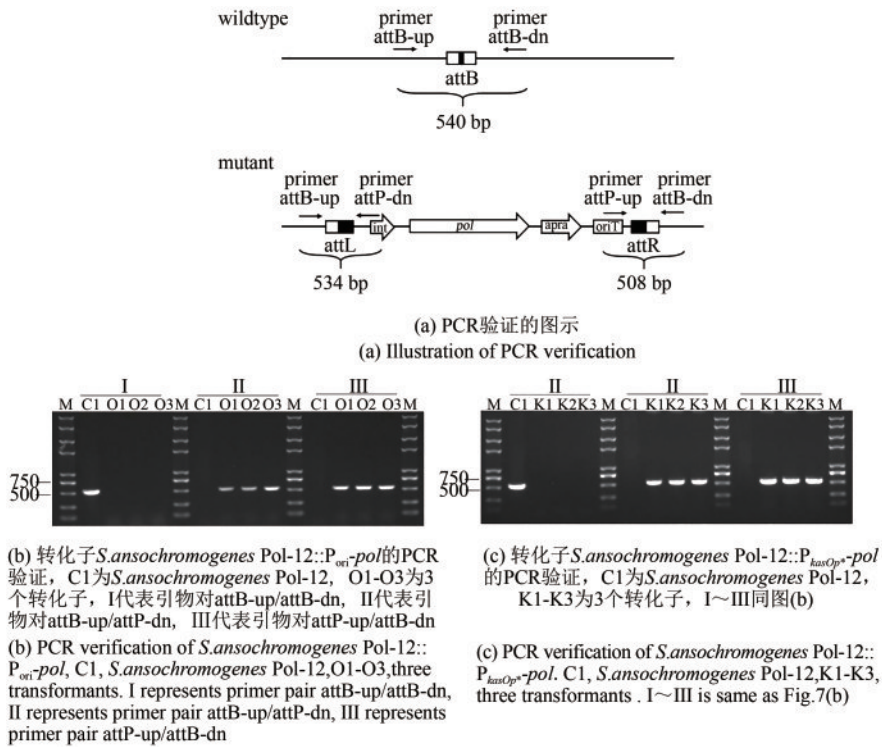
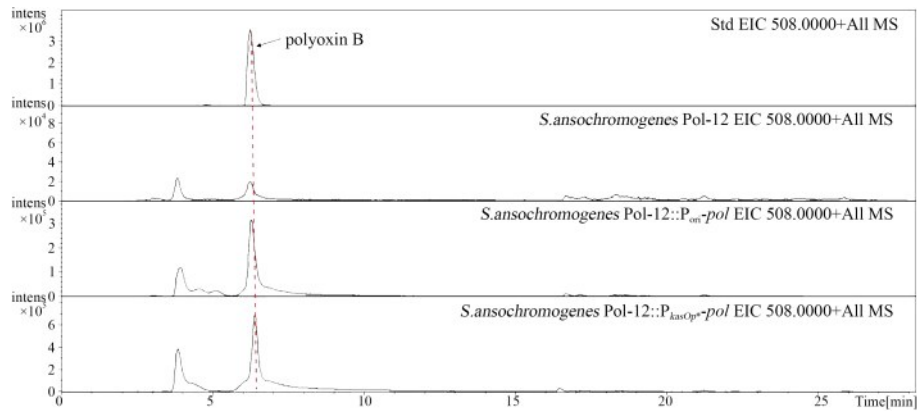


图7 多氧霉素基因簇整合入 *S.ansochromogenes* Pol-12 基因组的PCR验证

Fig. 7 PCR verification of *pol* gene cluster integrated into *attB* site in *S.ansochromogenes* Pol-12



Sample	Peak area	Fold change relative to Pol-12
std	53858472	—
<i>S.ansochromogenes</i> Pol-12	398670	—
<i>S.ansochromogenes</i> Pol-12::P <sub>ori</sub> - <i>pol</i>	8855203	22↑
<i>S.ansochromogenes</i> Pol-12::P <sub>kasOp</sub> - <i>pol</i>	13141840	33↑

(b) 突变株与野生株发酵产物中polyoxin B的峰面积比较  
(b) Peak area comparison of polyoxin B from mutants and wild type

图8 倍增菌株中多氧霉素B的产量检测

Fig. 8 Yield assay of polyoxin B from the *pol* duplicated strains

### 3 结 论

虽然多氧霉素已经实现商业化生产,但是我国多氧霉素B的产业化水平较低、生产成本高,因此有必要开展有关多氧霉素B高产菌株构建的研究。

本文将传统的紫外诱变育种和基因工程育种相结合,期望提高多氧霉素尤其是B组分的产量。首先通过紫外诱变初步筛选到了突变株 *S. ansochromogenes* Pol-12, 然后通过 ExoCET 直接克隆技术成功将多氧霉素生物合成基因簇 *pol* 克隆至 p15A 载体上, 通过 Red/ET 重组工程技术将启动子、接合转移元件以及位点特异性整合元件插入含有基因簇的重组质粒上, 最后通过 *phiC31* 介导的位点特异性整合技术成功地将多氧霉素生物合成基因簇插入到链霉菌染色体上的 *attB* 位点, 获得了 *pol* 倍增菌株 M1 和 M2 (*S. ansochromogenes* Pol-12::P<sub>ori</sub>-*pol*, *S. ansochromogenes* Pol-12::P<sub>kasOp\*</sub>-*pol*), 其多氧霉素 B 的产量相对 Pol-12 菌株分别提高了 22 倍和 33 倍, 说明增加基因簇的拷贝数和运用强启动子驱动生物合成基因表达可有效提高多氧霉素的产量, 本研究将为我国多氧霉素产业化水平的提升提供有益基础。

组合生物合成是一种通过对不同次级代谢产物基因簇进行遗传改造, 从而获得新颖次级代谢产物或其衍生物的有效方法, Li 等<sup>[29-30]</sup> 通过该方法将负责多氧霉素二肽生物合成的基因导入产生尼可霉素核苷骨架的突变菌中, 得到了两种比多氧霉素 B 具有更高抗菌活性且比尼可霉素更稳定的杂合抗生素 polynik A 和 polyoxin N 以及新的多氧霉素衍生物 polyoxin O 和 polyoxin P; 此外有文章报道将尼可霉素的相关合成基因转到多氧霉素的产生菌中进行异源表达, 分离获得了 6 种新颖的杂合抗生素 nikkoxin B~G<sup>[31-32]</sup>, 为研发抗菌活性更好的新型药物提供了一种高效的策略。未来可以利用更多代谢工程和合成生物学手段在高产菌株中对多氧霉素生物合成途径进行改造, 精确调控多氧霉素 B 或其他新活性组分的定向合成, 进一步特异性提高目标产物的产量和纯度。

致谢: 本工作得到山东省泰山产业领军人才项目 LJNY2015011 的支持。感谢山东大学张友明教授实

验室赠予的大肠杆菌工程菌株及质粒; 感谢中国科学院微生物研究所王为善研究员赠予的 *kasOp\** 启动子元件。

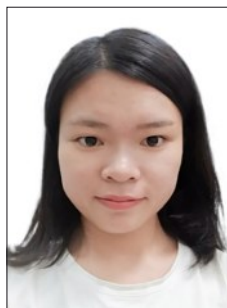
### 参 考 文 献

- [1] SUZUKI S, ISONO K, NAGATSU J, et al. A new antibiotic, polyoxin A [J]. *The Journal of Antibiotics*, 1965, 18: 131.
- [2] 沈寅初. 国内外农用抗生素研究和概况[J]. *中国抗生素杂志*, 1981, 6(2): 57-64.  
SHEN Yinchu. Research and development of agricultural antibiotics at home and abroad [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 1981, 6(2): 57-64.
- [3] ISONO K, NAGATSU J, KAWASHIMA Y, et al. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics (I): Isolation and characterization of polyoxins A and B [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1965, 29(9): 848-854.
- [4] ENDO A, MISATO T. Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine: chitin N-acetylglucosaminyltransferase in *Neurospora crassa* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1969, 37(4): 718-722.
- [5] ISONO K, NAGATSU J, KOBINATA K, et al. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics (V): Isolation and characterization of Polyoxins C, D, E, F, G, H and I [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1967, 31(2): 190-199.
- [6] ISONO K, ASAHU K, SUZUKI S. Polyoxins, antifungal antibiotics (XIII): Structure of polyoxins [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1969, 91(26): 7490-7505.
- [7] ISONO K, SUZUKI S. The polyoxins: pyrimidine nucleoside peptide antibiotics inhibiting fungal cell wall biosynthesis [J]. *Heterocycles*, 1979, 13(1): 333-351.
- [8] URAMOTO M, UZAWA J, SUZUKI S, et al. Isolation and structure of polyoxin N [J]. *Nucleic Acids Research*, 1978, 5 (s2): s327-s332.
- [9] ISONO K. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis [J]. *The Journal of Antibiotics*, 1988, 41(12): 1711-1739.
- [10] ISONO K, SATO T, HIRASAWA K, et al. Biosynthesis of the nucleoside skeleton of polyoxins [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1978, 100(12): 3937-3939.
- [11] ISONO K, FUNAYAMA S, SUHADOLNIK R J. Biosynthesis of the polyoxins, nucleoside peptide antibiotics. new metabolic role for L-isoleucine as a precursor for 3-ethylidene-L-azetidine-2-carboxylic acid (polyoximic acid) [J]. *Biochemistry*, 1975, 14(13): 2992-2996.
- [12] FUNAYAMA S, ISONO K. Biosynthesis of the polyoxins, nucleoside peptide antibiotics: biosynthetic pathway for 5-O-carbamoyl-2-amino-2-deoxy-L-xylonic acid (carbamoylpolyoxamic acid) [J]. *Biochemistry*, 1977, 16(14): 3121-3127.
- [13] CHEN Wenqing, HUANG Tingting, HE Xinyi, et al. Character-

- ization of the polyoxin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cacaoi* and engineered production of polyoxin H [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(16): 10627-10638.
- [14] CHEN Wenqing, DAI Daofeng, WANG Changchun, et al. Genetic dissection of the polyoxin building block-carbamoylpolyoxamic acid biosynthesis revealing the "pathway redundancy" in metabolic networks [J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12(1): 121.
- [15] LI Rui, XIE Zhoujie, TIAN Yuqing, et al. *polR*, a pathway-specific transcriptional regulatory gene, positively controls polyoxin biosynthesis in *Streptomyces cacaoi* subsp. *asoensis* [J]. *Microbiology*, 2009, 155(6): 1819-1831.
- [16] LI Rui, LIU Gang, XIE Zhoujie, et al. PolY, a transcriptional regulator with ATPase activity, directly activates transcription of *polR* in polyoxin biosynthesis in *Streptomyces cacaoi* [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(2): 349-364.
- [17] 中国科学院生命科学与生物技术局编著. 2012 工业生物技术发展报告[M]. 6 版. 北京: 科学出版社, 2012: 117-128. Bureau of Life Science and Biotechnology, Chinese Academy of Sciences. 2012 Report on the development of industrial biotechnology [M]. 6th ed. Beijing: Science Press, 2012: 117-128.
- [18] YANAI K, MURAKAMI T, BIBB M. Amplification of the entire kanamycin biosynthetic gene cluster during empirical strain improvement of *Streptomyces kanamyceticus* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(25): 9661-9666.
- [19] MURAKAMI T, SUMIDA N, BIBB M, et al. ZouA, a putative relaxase, is essential for DNA amplification in *Streptomyces kanamyceticus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 193(8): 1815-1822.
- [20] MURAKAMI T, BURIAN J, YANAI K, et al. A system for the targeted amplification of bacterial gene clusters multiplies antibiotic yield in *Streptomyces coelicolor* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38): 16020-16025.
- [21] LI Lei, WEI Keke, LIU Xiaocao, et al. aMSGE: advanced multiplex site-specific genome engineering with orthogonal modular recombinases in actinomycetes [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 52(2019): 153-167
- [22] ZHANG Youming, BUCHHOLZ F, MUYRERS J P P, et al. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli* [J]. *Nature Genetics*, 1998, 20(2): 123.
- [23] ZHANG Youming, MUYRERS J P P, TESTA G, et al. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli* [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(12): 1314.
- [24] FU Jun, BIAN Xiaoying, HU Shengbaio, et al. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting [J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 440.
- [25] WANG Hailong, LI Zhen, JIA Ruonan, et al. ExoCET: exonuclease in vitro assembly combined with RecET recombination for highly efficient direct DNA cloning from complex genomes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 46(5): e28-e28.
- [26] ONGLEY S E, BIAN Xiaoying, ZHANG Youming, et al. High-titer heterologous production in *E. coli* of lnygbyatoxin, a protein kinase C activator from an uncultured marine cyanobacterium [J]. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(9): 1888-1893.
- [27] BIAN Xiaoying, HUANG Fan, WANG Hailong, et al. Heterologous production of glidobactins/luminmycins in *Escherichia coli* nissle containing the glidobactin biosynthetic gene cluster from *Burkholderia* DSM7029 [J]. *ChemBioChem*, 2014, 15(15): 2221-2224.
- [28] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. *Practical streptomyces genetics* [M]. 2nd ed. Norwich: John Innes Foundation, 2000: 169-170.
- [29] LI Jine, LI Lei, TIAN Yuqing, et al. Hybrid antibiotics with the nikkomycin nucleoside and polyoxin peptidyl moieties [J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(3): 336-344.
- [30] LI Jine, LI Lei, FENG Chi, et al. Novel polyoxins generated by heterologously expressing polyoxin biosynthetic gene cluster in the sanN inactivated mutant of *Streptomyces ansiochromogenes* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11(1): 135.
- [31] ZHAI Lipeng, LIN Shuangjun, QU Dongjing, et al. Engineering of an industrial polyoxin producer for the rational production of hybrid peptidyl nucleoside antibiotics [J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(4): 388-393.
- [32] QI Jianzhao, LIU Jin, WAN Dan, et al. Metabolic engineering of an industrial polyoxin producer for the targeted overproduction of designer nucleoside antibiotics [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(9): 1865-1871.



通讯作者: 李盛英(1978—),男,博士,教授。研究方向为合成生物学,微生物学及生物化学。  
E-mail: lishengying@sdu.edu.cn



第一作者: 刘如欣(1994—),女,博士研究生。研究方向为合成生物学。  
E-mail: lrx@mail.sdu.edu.cn