



生防菌密旋链霉菌Act12中SPA7074缺失突变株的构建及其次级代谢产物鉴定

段雪梅¹, 赵飞扬¹, 颜霞¹, 薛泉宏², 李晓霞¹, 文冰洁¹, 贾良辉^{1*}, 颜华^{1*}

西北农林科技大学, ¹ 生命科学学院, ² 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100

摘要: 【目的】通过基因工程手段构建生防菌Act12转录调控因子SPA7074缺失突变株, 并挖掘其中活性次级代谢产物资源和探讨其活性机理。【方法】利用同源重组方法敲除Act12基因组中可能的TetR家族转录调控因子编码基因*spa7074* (accession number: KU955325), 平板实验检测缺失突变株发酵液抑菌活性的变化, 并通过HPLC比较代谢图谱, 然后通过质谱及核磁共振对差异峰对应化合物进行结构鉴定。【结果】SPA7074缺失突变株对几种病原真菌的拮抗活性显著增强, 比较代谢图谱表明出现数个差异峰, 将最显著差异峰所对应化合物进行分离纯化鉴定, 结果为寡霉素D。【结论】本研究通过基因工程手段敲除生防菌株Act12中的负转录调控转录因子, 使得突变菌株抑菌活性显著增强, 并获得了产量达野生型菌株7倍的寡霉素D高产菌株 $\Delta spa7074$ 。

关键词: 生防菌, 密旋链霉菌Act12, TetR家族, 基因中断, 寡霉素D

链霉菌是一类高G+C含量的革兰氏阳性细菌, 产生的抗生素种类繁多, 结构丰富多样, 生理活性广泛, 占目前已市场化的天然产物来源抗生素的三分之二^[1]。这些活性物质的产生通常受到复杂而庞大的调控网络的控制, 所以, 尽管链霉菌的基因组中蕴藏着非常丰富的次级代谢产物生物合成基因簇, 但许多次级代谢基因簇是沉默的, 或者表达水平非常低, 达不到普通提取分离的检测限, 所以一般从中仅能分离到数目有限的

化合物^[2]。一般来说, 链霉菌次级代谢受到全局或途径特异调控蛋白的调控^[3-4]。全局调控蛋白主要有双组分调控系统以及其它一些应答因子, 途径特异性调控蛋白则主要包括链霉菌抗生素调控蛋白(*Streptomyces antibiotic regulatory protein*, SARP)家族和四环素抑制因子(*tetracycline repressor*, TetR)家族等。前者多对抗生素生物合成途径性正调控作用^[5], 而TetR家族转录因子既可以作用于全局调控因子, 也可对抗生素的生物合成进行

基金项目: 陕西省农业科技创新与攻关(2015NY066); 上海交通大学微生物代谢国家重点实验室开放基金(MMLKF14-09); 中央高校基本科研业务费(Z109021426, Z109021432); 高校博士点基金(20120204120034, 20120204120042)

*通信作者。E-mail: 贾良辉, jialianguhui@nwsuaf.edu.cn; 颜华, yanh99@gmail.com

收稿日期: 2016-03-31; 修回日期: 2016-05-13; 网络出版日期: 2016-06-15

途径特异性调控。虽然近年来有少数研究报道了其作为正调控因子的例子^[6-7]或者同时具有阻遏/激活的双重作用^[8],但绝大多数已经报道的TetR家族转录因子均具有转录阻遏的作用。

西北农林科技大学微生物资源研究室在生防菌筛选过程中获得1株多效放线菌Act12,该菌株对草莓疫霉(*Phytophthora fragariae*)等病原菌具有明显抑制作用^[9],对草莓^[9]、甜瓜^[10]等园艺作物表现出良好的促生作用。Act12与腐植酸钾配施处理后能明显促进丹参生长,提高丹参产量及抗病虫能力,调节丹参根域微生态平衡^[11]。我们对这株多功能链霉菌进行了全基因组测序并用生物合成基因簇分析工具antiSMASH 3.0^[12]分析表明在Act12中有38个可能的次级代谢产物基因簇,但其发酵液液相色谱分析则表明在实验室条件下仅可产生种类非常有限的次级代谢产物,且产量很低,需要大量发酵才足以进行分离鉴定,说明生防菌Act12中绝大多数基因簇在实验室条件下是不表达或者表达量很低。通过序列对比分析,我们找到一个可能的TetR家族负调控因子编码基因spa7074,本实验以其为对象,通过同源重组构建其缺失突变株,并研究该缺失突变株抑菌活性及次级代谢产物合成的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒:本研究用到的菌株:密旋链霉菌(*Streptomyces pactum*) Act12,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α ,大肠杆菌(*Escherichia coli*) S17-1,核桃溃疡病菌(*Dothiorella gregaria* Sacc),苹果腐烂病菌(*Valsa mali*),油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*),小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC 11562)(皆由本实验室保存)。质粒: pMD18-T simple vector,含Amp抗性基因(购于TaKaRa公司),

温敏型穿梭质粒pKC1139,含有Apr抗性基因(本实验室保存)。

1.1.2 培养基和抗生素:常用培养基的配置参照微生物学实验手册^[13]。大肠杆菌培养基为LB,培养温度为37 °C;链霉菌种子培养基为TSB,发酵培养基为SPY(胰蛋白胨0.2%,酵母提取物0.4%,淀粉1%,氯化钠0.8%,pH 7.2),固体培养基为高氏一号,培养温度为28 °C;真菌培养基为PDA,培养温度为28 °C。LB培养基中氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)和卡那霉素(Kanamycin, Kan)使用终浓度均为50 μ g/mL。高氏一号培养基中卡那霉素和安普霉素(Apramycin, Apr)使用终浓度为10 μ g/mL,萘啶酮酸(Nalidixic acid, Nd)终浓度为25 μ g/mL。

1.1.3 工具酶和生化试剂:Taq DNA聚合酶,限制性内切酶,T4 DNA连接酶和DNA Marker购于TaKaRa公司,DNA回收试剂盒,质粒小提试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司。PCR引物的合成及测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 DNA操作

常规的分子生物学操作参照分子克隆指南^[14],链霉菌基因组的提取参照链霉菌操作手册^[15]。

1.3 基因敲除质粒pKT7074的构建

提取Act12基因组DNA,以基因组DNA为模板,首先利用引物u-F(5'-CACGCAGGTTTCGAA TTCTGC-3',EcoR I)和u-R(5'GCTGGTCTAGAGATCGGCGAA-3',BamH I)PCR扩增获得spa7074基因的上游同源臂片段u,再利用引物d-F(5'-GTTGTCGACGGCGTGCTCCA-3',Sal I)和d-R(5'-TGATGACCCACTGAAGCTTGGTC-3',Hind III)PCR扩增spa7074基因的下游同源臂d。从含有Kana抗性基因的质粒上扩增kan基因并构建载体pMD18T-kan载体。然后将u,d依次连接到pMD18T-kan中得到重组质粒pMD18T-kan-u-d。测序正确后,将pMD18T-kan-u-d用Hind III和

EcoR I 双酶切, 回收相应片段kan-u-d并与经过 *Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切的载体pKC1139连接得到用于敲除*spa7074*基因的重组质粒pKT7074 (图1)。

1.4 敲除突变株的构建与筛选

将重组质粒pKT7074转入*E. coli* S17-1感受态细胞, 然后接合转移入链霉菌Act12中, 涂布于高氏一号平板。28 °C培养18 h后覆盖卡那霉素(抑制非接合子生长)和萘啶酮酸(抑制大肠杆菌生长)溶液, 5–7 d后挑取接合子划线于卡那霉素和萘啶酮酸的高氏一号平板28 °C扩大培养5 d, 刮取孢子涂布于高氏一号平板于40 °C培养, 由于pKC1139的温敏型复制子在高于37 °C时不能复制, 迫于选择压力重组质粒pKT7074依靠同源臂与宿主染色体发生同源重组整合到染色体上, 从而获得单交换菌株和双交换菌株。挑取单克隆划线于含卡那霉素的高氏一号平板上扩大培养。刮取孢子划线于安普霉素抗性平板上筛选安普霉素敏感的双交换菌株提取染色体进行PCR验证。

1.5 菌株发酵与代谢产物分析

收集Act12及突变株*spa7074*的新鲜孢子接种于50 mL的TSB种子培养基, 28 °C振荡培养48 h; 按1 : 10的比例转种于200 mL的SPY发酵培养基,

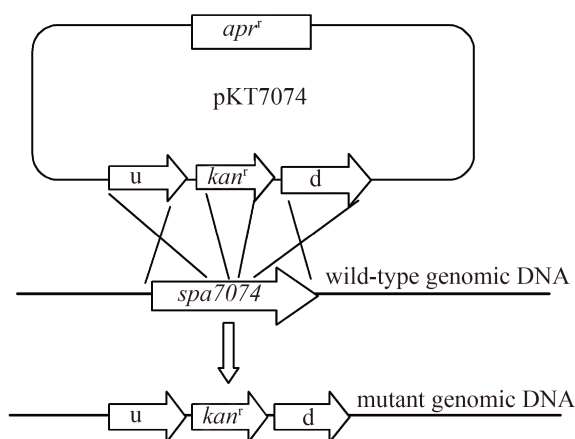


图 1. pKT7074与链霉菌染色体同源区域发生双交换的示意图

Figure 1. Schematic diagram of gene replacement between plasmid pKT7074 and chromosomes.

28 °C振荡培养6 d后, 将发酵物按1 : 1的比例用乙酸乙酯萃取2次, 将上层有机相蒸干, 萃取物溶于1 mL甲醇用于后续的检测。萃取物的甲醇溶液用0.22 μm滤膜过滤后做HPLC检测。HPLC条件: C₁₈反向柱; 流动相A: 10%甲醇, B: 甲醇, 梯度洗脱(0–5 min, A; 5–35 min, 10%–100% B; 35–45 min, B; 45–50 min, 100%–10% B); 流速1 mL/min; 进样量5 μL; 检测波长210 nm。

1.6 发酵产物抑菌活性的测定

萃取物采用滤纸片法, 以核桃溃疡病菌, 苹果腐烂病菌和枯草芽孢杆菌为供试菌株进行抑菌试验。真菌的抑菌实验: 将真菌平板活化后打成菌饼置于PDA平板中央, 在距离中央相等的位置放2张圆形滤纸片, 每个滤纸片分别滴加10 μL的野生型和突变株发酵液萃取物。于28 °C培养5 d, 观察两者抑菌圈大小。枯草芽孢杆菌抑菌实验: 将生长至对数期的枯草芽孢杆菌与LB培养基混合倒平板, 待平板凝固后将已灭菌的滤纸片放在培养基表面, 滤纸片上分别滴加10 μL的野生型和突变株发酵液萃取物, 37 °C培养过夜, 观察抑菌活性差异。

1.7 化合物M的分离纯化及鉴定

采用SPY培养基发酵10 L突变株*spa7074* (28 °C、7 d), 发酵产物经乙酸乙酯萃取后, 萃取物过C₁₈填料柱(SiliaSphere PC C₁₈, 50 μm 120 Å)分段收集并进行HPLC分析确认目标化合物M所在区段; 将前述粗提物通过Waters 1512EF高效液相色谱仪以及半制备柱(YMC-Pack ODS-A 250×10 mm I.D.S-5 μm, 12 nm)制备得到纯净的化合物M, 化合物M通过高分辨率质谱及核磁共振进行结构鉴定。

2 结果和分析

2.1 *spa7074*基因的生物信息分析以及*spa7074*基因中断突变株的获得

将*spa7074*基因的蛋白序列在NCBI中进行

BLAST比对表明其相似性基因均为TetR家族基因。保守结构域分析表明,其含有TetR N端保守结构域。将筛选得到的*spa7074*基因缺失突变株,提取总DNA进行PCR验证。所用到的引物分别为u-F, d-R。其中,以Act12染色体为模板,PCR产物的理论大小为1.2 kb,而基因缺失突变株由于中间插入了*kan*基因(1 kb),PCR产物的理论大小2.2 kb。PCR结果表明筛选获得了*spa7074*基因缺失突变株 $\Delta spa7074$ (图2)。

2.2 突变株 $\Delta spa7074$ 的代谢产物分析

野生型菌株Act12及基因中断突变株 $\Delta spa7074$ 的发酵液HPLC分析结果见图3。结果表明:在保留时间35 min的位置,突变株 $\Delta spa7074$ 的吸收峰显著增强,对应的化合物命名为M,通过积分面积求得M的产量提高了7倍。在保留时间34 min, 35.5 min的位置有新的吸收峰出现,证明产生了新的化合物,但化合物的含量较低。

2.3 发酵液抑菌活性的检测

采用滤纸片法对Act12和 $\Delta spa7074$ 发酵液的抑菌活性做检测。结果表明, $\Delta spa7074$ 较Act12对苹果腐烂病菌,核桃溃疡病菌拮抗活性明显增强;

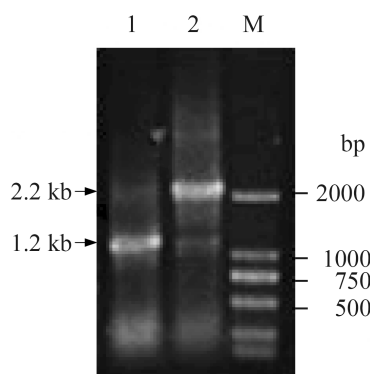


图2. *spa7074*基因缺失菌株PCR鉴定琼脂糖凝胶电泳图
Figure 2. Agarose gel electrophoresis of *spa7074*-disrupted strain by PCR. Lane 1: genomic DNA from wild-type Act12 as PCR template; Lane 2: genomic DNA from $\Delta spa7074$ as PCR template; M: DNA ladder.

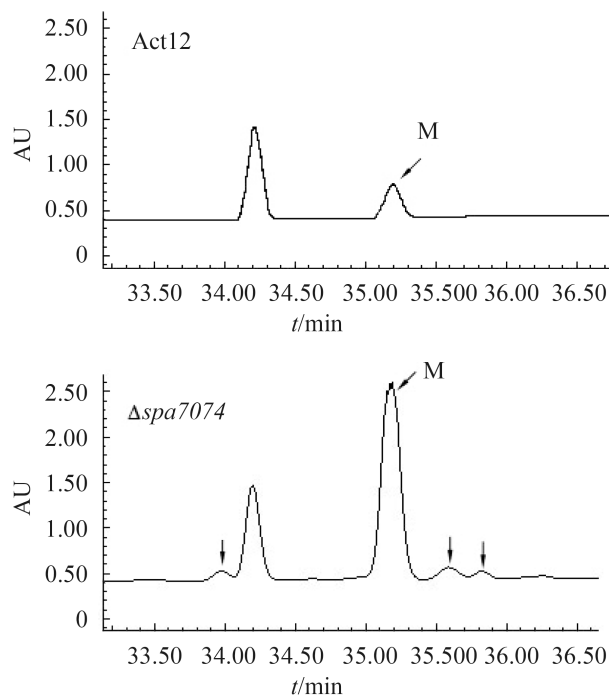


图3. Act12及 $\Delta spa7074$ 发酵产物HPLC图谱(检测波长210 nm)

Figure 3. HPLC chromatograms of the fermentation broth from Act12 and $\Delta spa7074$ (detected at 210 nm).

同时 $\Delta spa7074$ 对枯草芽孢杆菌有一定的抑制活性,野生型Act12则没有(图4)。

2.4 化合物M的分离纯化及鉴定

鉴于化合物M在突变株中产量显著增加,我们将突变株 $\Delta spa7074$ 进行了发酵,并在发酵液中分离纯化获得了化合物M的纯品,将这些样品用于质谱和核磁共振分析。高质量质谱的数据显示化合物M的相对分子质量 $[M+H]^+$ 为777.5150,推测其分子式为 $C_{44}H_{72}O_{11}$ (图5)。核磁共振波谱(图6-A、B)数据如下: 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz), ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ 0.03, 5.37, 8.38, 9.40, 11.32, 12.14, 14.10, 14.55, 17.85, 21.09, 24.77, 26.28, 28.55, 29.85, 30.61, 30.90, 31.33, 33.58, 35.40, 35.55, 38.49, 40.16, 42.05, 42.58, 45.84, 45.90, 46.57, 50.81, 64.67, 67.46, 69.85, 70.85, 72.32, 72.71, 73.06, 76.82, 77.08, 77.33, 83.08,

97.38, 122.70, 129.54, 130.41, 132.45, 137.77, 148.61, 164.91, 220.10, 220.33。通过数据库查找和文献[9]对比, 发现该化合物与寡霉素D的核磁共振数据

一致, 因此鉴定该化合物为寡霉素D(图6-C)。

2.5 寡霉素D抑菌活性的测定

为了探究寡霉素D在Act12及 $\Delta spa7074$ 的抑菌

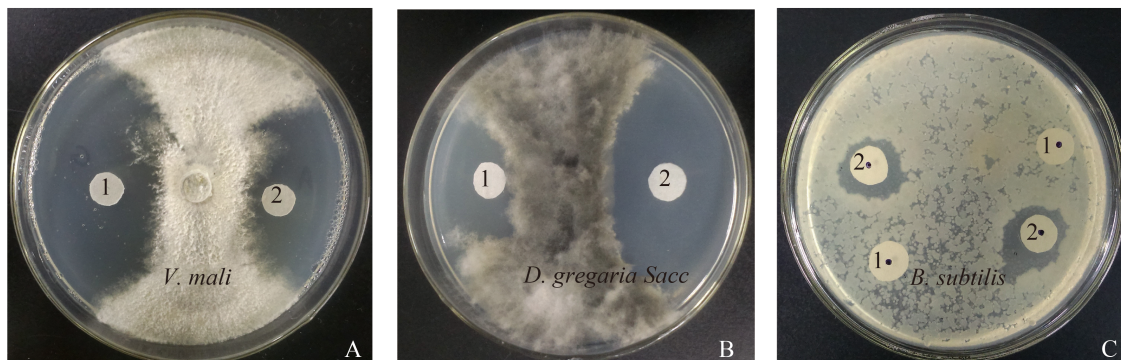


图 4. Act12和 $\Delta spa7074$ 的抑菌活性测定

Figure 4. Antimicrobial activity determination of Act12 and $\Delta spa7074$. A: *Valsa mali*, 1: wild-type strain Act12, 2: $\Delta spa7074$; B: *Dothiorella gregaria* Sacc, 1: wild-type strain Act12, 2: $\Delta spa7074$; C: *Bacillus subtilis* ATCC 11562, 1: wild-type strain Act12, 2: $\Delta spa7074$.

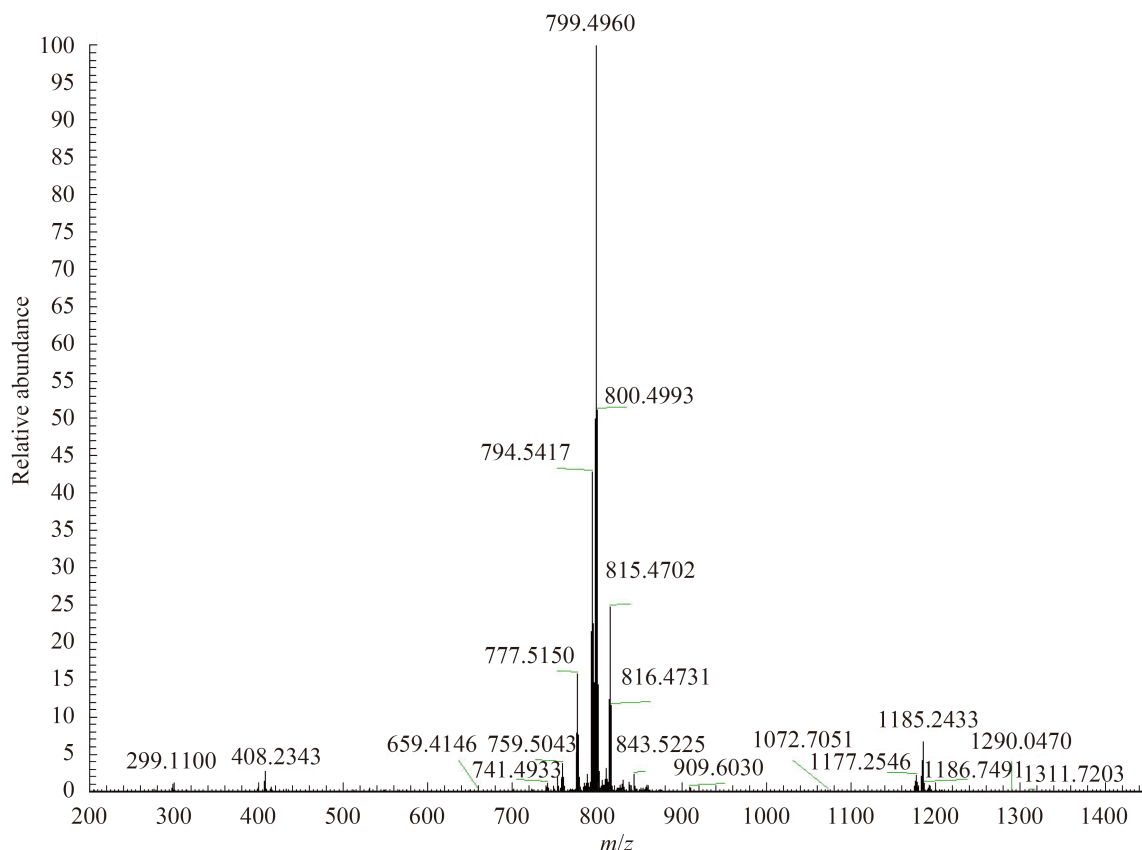


图 5. 化合物M的高分辨质谱分析

Figure 5. High resolution mass spectrum of compound M.

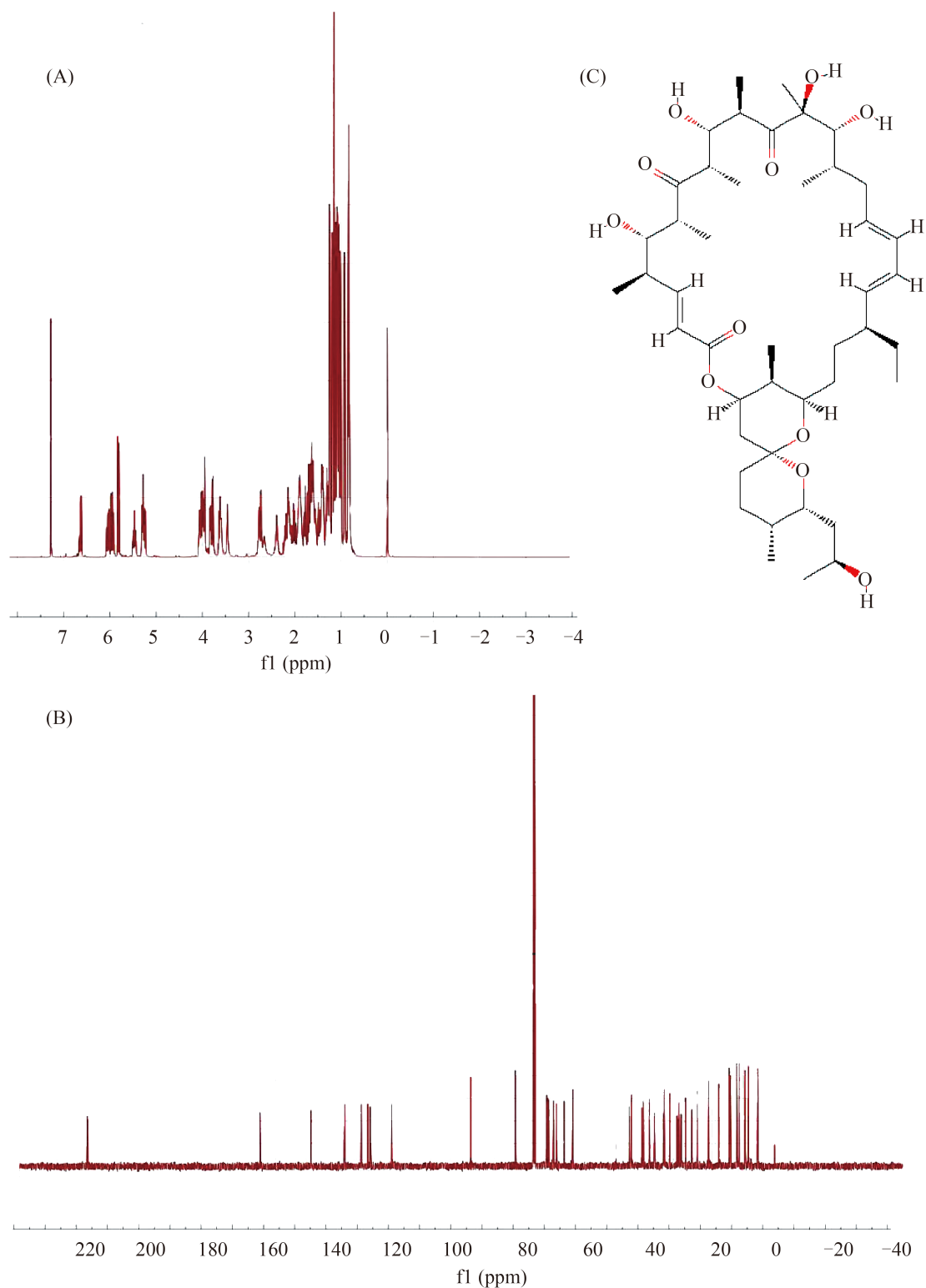


图 6. 化合物M的 ^1H 谱, ^{13}C 谱及预测结构

Figure 6. NMR spectrum of compound M and its structure. A: ^1H -NMR spectrum of compound; B: ^{13}C -NMR spectrum of compound M; C: structure of compound.

活性实验中起的作用, 进行寡霉素D的抑菌活性实验。纯化好的寡霉素D溶于甲醇中, 至终浓度为10 mg/mL, 滤纸片法测定寡霉素D的抑菌活性。将灭菌后的滤纸片放置于PDA平板中间, 滴

加10 μ L的寡霉素溶液。距离中间相等的位置放置4个病原菌菌饼, 28 $^{\circ}$ C培养5 d, 观察抑菌活性。实验结果表明寡霉素D对4种测定的病原真菌均具有较强的抑制作用, 对细菌未见抑制作用(图7)。

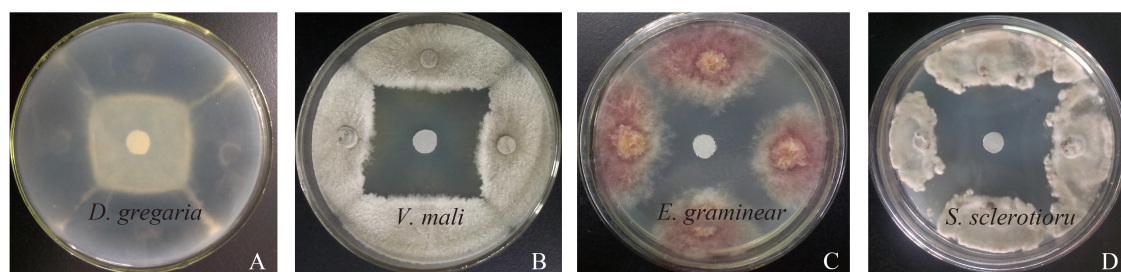


图 7. 寡霉素D的抑菌活性测定

Figure 7. Antimicrobial activity test of oligomycin D. A: *Dothiorella gregaria* Sacc, B: *Valsa mali*; C: *Fusarium graminearum*; D: *Sclerotinia sclerotiorum*.

3 讨论

生防菌株的广泛使用, 既可以减少化学农药使用带来的环境污染, 提高农产品的价值, 又可以改善土壤微生态环境, 压低有害生物的种群数量, 利于农作物的可持续生产。生防菌Act12属于分离自青藏高原土壤, 并已在农业生产中施用, 但其活性机理未明。本实验通过同源重组构建可能的负调控因子SPA7074缺失突变株, 使得突变株中一些次级代谢产物合成量增加, 尤其是寡霉素D产量显著增加, 可达到野生菌株的7倍之多, 且突变株对病原菌拮抗活性显著增强。

寡霉素是二十六元大环内酯类抗生素, 其生物学活性多种多样, 包括抗真菌活性、抗肿瘤活性、呼吸抑制作用及杀虫活性等。虽然它们在临床上尚未被应用, 但作为ATP合酶抑制剂, 寡霉素具有重要的科学意义, 已被广泛应用于科学研究当中。它们早已作为化学试剂被销售, 价格昂贵, 具有一定的经济价值^[16-18]。本研究通过敲除转录负调控因子, 使得寡霉素D产量提高到了野生型的7倍, 获得了寡霉素高产菌株, 在后续实验

中我们还可对该突变菌株进行发酵条件和培养基优化, 进一步提高寡霉素的产量。

另外, 对突变菌株的代谢产物进行了HPLC检测结果可以看出除了寡霉素的产量提高了以外, 还有一些化合物得到少量的表达, 但是由于表达量有限, 我们目前还没有将其分离鉴定。从抑菌实验的结果也可以看出, 突变株不仅抑制真菌的活性较野生型有了显著提高, 而且对枯草芽孢杆菌也产生了拮抗作用, 而野生型对枯草芽孢杆菌没有拮抗作用, 说明突变株中除了寡霉素D的产量得以大量提高外, 可能还有其他的化合物得以表达, 后续我们将对其展开进一步研究。

本实验通过构建TetR家族调控因子SPA7074缺失突变株并进行次级代谢产物分析, 对生防菌Act12的次级代谢产物及抑菌机理有了一定的了解, 并获得寡霉素高产以及抑菌活性更好的生防菌株个体, 但其田间施用效果尚待验证。而SPA7074调控寡霉素代谢的分子机制也尚不清楚, 这些我们将在以后的实验中进行详细的研究。

感谢英国John Innes Centre的Mervyn Bibb教授提供质粒(pKC1139, pSET152)。

参考文献

- [1] Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitz E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, 417(6885): 141–147.
- [2] Han XW, Shen YM. TetR family proteins in regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microbiology China*, 2013, 40(10): 1831–1846. (in Chinese)
韩晓伟, 沈月毛. TetR家族调控链霉菌次级代谢的机制. *微生物学通报*, 2013, 40(10): 1831–1846.
- [3] Martin JF, Liras P. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(3): 263–273.
- [4] Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu GQ, Tan HR. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 112–143.
- [5] Zhang B, Yang D, Yan YJ, Pan GH, Xiang WS, Shen B. Overproduction of lactimidomycin by cross-overexpression of genes encoding *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(5): 2267–2277.
- [6] Hu B, Lidstrom M. Ccr R, a TetR family transcriptional regulator, activates the transcription of a gene of the ethylmalonyl coenzyme A pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(11): 2802–2828.
- [7] Kloosterman TG, Van Der Kooi-Pol MM, Bijlsma JJE, Kuipers OP. The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against Zn^{2+} stress by activation of the Zn^{2+} -resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 2007, 65(4): 1049–1063.
- [8] Chatteraj P, Mohapatra SS, Rao JLUM, Biswas I. Regulation of transcription by SMU.1349, a TetR family regulator, in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(23): 6605–6613.
- [9] Xu YJ, Xue QH, Xing SL, Zhou YQ, Zhang XL, Guo ZY, Yang B, Lin CF, Sun JZ. The growth promoting effect and induced endurance of three actinomycetes strains to strawberry. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2008, 17(1): 129–136. (in Chinese)
许英俊, 薛泉宏, 邢胜利, 周永强, 张晓鹿, 郭志英, 杨斌, 林超峰, 孙敬祖. 3株放线菌对草莓的促生作用及对 PPO 活性的影响. *西北农业学报*, 2008, 17(1): 129–136.
- [10] Zhao J, Du JZ, Xue QH, Duan CM, Wang LN, Shen GH, Chen Q, Xue L. The growth-promoting effect and resistance induction of 3 antagonistic actinomycetes on *Cucumis melo* L. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 38(2): 109–116. (in Chinese)
赵娟, 杜军志, 薛泉宏, 段春梅, 王玲娜, 申光辉, 陈秦, 薛磊. 3株放线菌对甜瓜幼苗的促生与抗性诱导作用. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2010, 38(2): 109–116.
- [11] Duan JL, Xue QH, Shu ZM, Wang DS, He F. Effects of combined application of actinomycetes Act12 bio-control agents and potassium humate on growth and microbial flora in rooting zone of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(6): 1807–1819. (in Chinese)
段佳丽, 薛泉宏, 舒志明, 王东胜, 何斐. 放线菌Act12与腐植酸钾配施对丹参生长及其根域微生态的影响. *生态学报*, 2015, 35(6): 1807–1819.
- [12] Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Brucoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH. AntiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43: W237–243.
- [13] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [14] Sambrook J, Russell D. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical *Streptomyces* genetics. 2nd ed. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [16] White JD, Hanselmann R, Jackson RW, Porter WJ, Ohba Y, Tiller T, Wang S. Total synthesis of rutamycin B, a macrolide antibiotic from *Streptomyces aureofaciens*. *The Journal of Organic Chemistry*, 2001, 66(15): 5217–5231.

- [17] Smith RM, Peterson WH, McCoy E. Oligomycin, a new antifungal antibiotic. *Antibiotics & Chemotherapy*, 1954, 4(9): 962–970. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2012, 37(9): 662–665, 670. (in Chinese)
林秀萍, 刘永宏, 李季伦. 寡霉素的研究进展. 中国抗生素杂志, 2012, 37(9): 662–665, 670.
- [18] Lin XP, Liu YH, Li JL. Advances in studies on oligomycins.

Construction of SPA7074-deficient mutant of biocontrol strain *Streptomyces pactum* Act12 and characterization of its secondary metabolites

Xuemei Duan¹, Feiyang Zhao¹, Xia Yan¹, Quanhong Xue², Xiaoxia Li¹, Bingjie Wen¹, Lianghui Jia^{1*}, Hua Yan^{1*}

¹ College of Life Sciences, ² College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China

Abstract: [Objective] To disrupt *spa7074*, which encodes a member of the TetR family transcriptional factors, in biocontrol strain Act12 and characterize the secondary metabolites in the mutant strain. [Methods] We disrupted the gene *spa7074* by homologous recombination. The secondary metabolites of the mutant strain $\Delta spa7074$ and Act12 were detected by HPLC. The structure was analyzed by MS and NMR. [Results] Compared to the wild-type strain, the production of some unknown compounds in the mutant strain $\Delta spa7074$ increased obviously. We purified one of the compounds and identified as oligomycin D by MS and NMR analysis. [Conclusion] An oligomycin D-producing strain $\Delta spa7074$ was derived via genetic engineering.

Keywords: biocontrol strain, *Streptomyces pactum* Act12, TetR family, gene disruption, oligomycin D

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Science Technology Research and Development Program of Shaanxi Province (2015NY066), by the State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University (MMLKF14-09), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Z109021426, Z109021432) and by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20120204120034, 20120204120042)

*Corresponding author. E-mail: Lianghui Jia, jjialianghui@nwsuaf.edu.cn; Hua Yan, yanh99@gmail.com

Received: 31 March 2016; Revised: 13 May 2016; Published online: 15 June 2016