



# 一株产灵菌红素黏质沙雷氏菌的分离鉴定及其基因组分析

张雨欣<sup>1</sup>, 王美燕<sup>1</sup>, 李殿怡<sup>1</sup>, 司军<sup>3</sup>, 卞小莹<sup>4</sup>, 牛国清<sup>1\*</sup>, 刘蓉<sup>1,2\*</sup>

1 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400715

2 重庆中烟工业有限责任公司, 烟草资源科学利用重庆重点实验室, 重庆 400060

3 西南大学 园艺园林学院, 长江上游农业生物安全与绿色生产教育部重点实验室, 重庆 400715

4 山东大学, 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237

张雨欣, 王美燕, 李殿怡, 司军, 卞小莹, 牛国清, 刘蓉. 一株产灵菌红素黏质沙雷氏菌的分离鉴定及其基因组分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4290-4307.

ZHANG Yuxin, WANG Meiyan, LI Dianyi, SI Jun, BIAN Xiaoying, NIU Guoqing, LIU Rong. Isolation, identification, and genomic analysis of a prodigiosin-producing strain of *Serratia marcescens*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4290-4307.

**摘要:** 【目的】对甘蓝根际微生物进行分离, 从中选择具有优良性状的菌株, 对其次级代谢产物合成能力进行评估, 为甘蓝根际微生物资源的发掘利用奠定基础。【方法】采集重庆市武隆区仙女山镇仙女山村甘蓝根, 分离培养根际微生物菌株, 从中选择一株黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*), 利用 PacBio RS II 平台和 Illumina HiSeq 平台完成全基因组测序, 通过 antiSMASH 分析评估其合成次级代谢产物的潜力, 采用 Red/ET 重组工程技术克隆目的基因簇并进行异源表达。【结果】从甘蓝根际分离鉴定到一株产灵菌红素的黏质沙雷氏菌, 对其进行基因组测序及分析发现, 基因组含有 11 个次级代谢产物生物合成基因簇, 其中 9 个基因簇与已知化合物编码基因簇相似性较低, 说明该菌具有产生多种新型次级代谢产物的潜力; HPLC 分析和高分辨质谱检测鉴定了灵菌红素; 克隆了灵菌红素生物合成基因簇, 并在大肠杆菌中实现了异源表达; 选择 4 种大肠杆菌常用启动子驱动灵菌红素基因簇的表达, 发现 *rpoS* 启动子具有较好的效果。【结论】本研究从甘蓝根际分离得到一株产灵菌红素的黏质沙雷氏菌, 完成了全基因组测序和分析, 从中克隆得到灵菌红素生物合成基因簇, 并成功在大肠杆菌中异源表达。

**关键词:** 甘蓝; 黏质沙雷氏菌; 灵菌红素; 基因组分析; 生物合成基因簇; 异源表达

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0907700)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0907700).

\*Corresponding authors. E-mail: NIU Guoqing, niu062376@swu.edu.cn; LIU Rong, LiuR20190724@163.com

Received: 2024-05-15; Accepted: 2024-07-03; Published online: 2024-07-06

# Isolation, identification, and genomic analysis of a prodigiosin-producing strain of *Serratia marcescens*

ZHANG Yuxin<sup>1</sup>, WANG Meiyan<sup>1</sup>, LI Dianyi<sup>1</sup>, SI Jun<sup>3</sup>, BIAN Xiaoying<sup>4</sup>, NIU Guoqing<sup>1\*</sup>, LIU Rong<sup>1,2\*</sup>

1 College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Chongqing Key Laboratory of Scientific Utilization of Tobacco Resources, China Tobacco Chongqing Industrial Co., Ltd., Chongqing 400060, China

3 Key Laboratory of Agricultural Biosafety and Green Production of Upper Yangtze River, Ministry of Education, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

4 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China

**Abstract: [Objective]** To select the elite strains among the microorganisms isolated from the rhizosphere of *Brassica oleracea* var. *capitata* and evaluate the secondary metabolism potential of the strains, laying a solid foundation for mining the microbial resources in the rhizosphere of this plant. **[Methods]** The roots of *B. oleracea* var. *capitata* were collected from Xiannüshan Town in Wulong District of Chongqing. The conventional methods were then used to isolate microbial strains, and one strain of *Serratia marcescens* was selected for genome sequencing (PacBio RS II and Illumina HiSeq) and bioinformatic analysis. The antiSMASH was used for the detection and comparison of biosynthetic gene clusters (BGCs) encoding secondary metabolites. Red/ET recombination was employed to capture the BGC for prodigiosin. **[Results]** One prodigiosin-producing strain of *S. marcescens* was isolated from the rhizosphere of *B. oleracea* var. *capitata*. The genome of this strain contained 11 putative BGCs (1–11) for secondary metabolites, of which 9 BGCs displayed low similarities to the BGCs encoding known compounds. This result suggested that the strain had great potential of producing novel secondary metabolites. Prodigiosin was identified by HPLC and high-resolution mass spectrometry (HRMS). Heterologous expression of BGC4 resulted in the production of prodigiosin in *Escherichia coli*. Four common promoters were used to drive the expression of BGC in *E. coli*, and the highest prodigiosin production was observed with the *rpoS* promoter. **[Conclusion]** A prodigiosin-producing strain of *S. marcescens* was isolated from the rhizosphere of *B. oleracea* var. *capitata*. The BGC for prodigiosin was captured from the chromosome of this strain and expressed successfully in the surrogate host *E. coli* BAP1.

**Keywords:** *Brassica oleracea* var. *capitata*; *Serratia marcescens*; prodigiosin; genomic analysis; biosynthetic gene cluster; heterologous expression

结球甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*), 简称甘蓝, 是一种重要的十字花科蔬菜, 因其叶

球中含有丰富的营养物质而在世界各地普遍种植。据统计, 甘蓝在重庆市武隆区、涪陵区和奉

节县等高山地区(海拔 800–1 800 m)栽培面积达 6 500 hm<sup>2</sup><sup>[1]</sup>, 这些区域具有昼夜温差大、土层深厚疏松且富含有机质等独特地理要素, 不仅有利于甘蓝种植, 而且还塑造了高山地区特有的微生物群落。植物根际微生物在植物生长、营养吸收、胁迫耐受和病原抵御等方面都具有一定的作用, 比如枯草芽孢杆菌和荧光假单胞菌促进红甘蓝对微量元素的吸收<sup>[2]</sup>, 分离自不同作物的沙雷氏菌可以有效地抑制根腐病和黄萎病等植物病害<sup>[3–4]</sup>。此外, 根际微生物也是活性次级代谢物的重要来源, 例如绝大多数从根际分离的微生物产生的非那嗪类化合物对真菌病原体有较好抑制效果<sup>[5]</sup>; 分离自水稻根际的铜绿假单胞菌 BRp3 产生 2 种新的次级代谢产物, 对引发叶枯病的病原菌有拮抗作用<sup>[6]</sup>; 从沙漠植物根际分离的微生物产生的不同结构次级代谢物, 对癌细胞均有较强毒性<sup>[7]</sup>。

灵菌红素(prodigiosin)是一类含有三吡咯环骨架结构的天然色素, 具有抗菌、抗疟疾、抗癌和免疫抑制等生物活性<sup>[8–9]</sup>。值得一提的是, 灵菌红素对人的肝癌及结肠癌细胞等具有靶向性, 而对正常细胞毒性低, 是一种具有广泛应用前景的抗癌药物<sup>[10]</sup>。同时, 灵菌红素能抑制藻类生长, 可用于治理海洋赤潮及淡水水华等环境问题<sup>[11]</sup>。此外, 灵菌红素作为生态染料具有良好着色度和上染率<sup>[12–13]</sup>, 在纺织业也具有广阔的应用前景。

微生物是灵菌红素的主要来源, 其产生菌包括沙雷氏菌属(*Serratia*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和河氏菌属(*Hahella*)等<sup>[14]</sup>。黏质沙雷氏菌是灵菌红素的主要产生菌, 该菌是一种革兰氏阴性细菌, 在自然界中广泛分布, 水和土壤都是该菌的天然生境。黏质沙雷氏菌在临床上被列为人兽共患的机会致病菌<sup>[15]</sup>, 会侵染受损或低免疫功能机体, 导致肺炎、尿路

感染和菌血症等<sup>[16–18]</sup>, 并且对多种常用抗菌药具有一定的耐药性。

灵菌红素通常由 *pigA–N* 共 14 个基因编码的蛋白合成, 这些基因组成一个转录单元, 并由 *pigA* 启动子驱动它们的转录。灵菌红素生物合成途径包括 2-甲基-3-戊基吡咯(2-methyl-3-n-amylypyrrole, MAP)和 4-甲氧基-2,2'-二吡咯-5-羧甲基乙醛(4-methoxy-2,2'-bipyrrole-5-carbaldehyde, MBC)两个分支途径(图 1)。MAP 以 2-辛烯醛(2-octenal)和丙酮酸(pyruvate)为底物, 而 MBC 以脯氨酸(proline)和丙二酰辅酶 A(malonyl-CoA)为底物, 两个分支途径最后经缩合酶 PigC 作用生成灵菌红素<sup>[19]</sup>。此外, 黏质沙雷氏菌的灵菌红素合成受多种因子的调控<sup>[20]</sup>, 如 LuxI/LuxR 和 LuxS 群体感应系统<sup>[21]</sup>, RssA/RssB 双组分调控系统<sup>[22]</sup>, PsrA、OmpR 和 RcsB 转录调控因子等<sup>[23–24]</sup>。

本研究从甘蓝根际分离得到一株黏质沙雷氏菌, 全基因组测序和生物信息学分析发现该菌含有一个灵菌红素生物合成基因簇, 利用 Red/ET 重组工程技术克隆了完整的灵菌红素基因簇, 并在大肠杆菌中进行异源表达。本研究不仅有助于灵菌红素的工程改造, 而且为黏质沙雷氏菌的基因组挖掘奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

用于菌株分离的样品采集于重庆市武隆区仙女山镇仙女山村, 田间随机采取甘蓝根, 装入无菌样品袋中, 取回后保存于冰箱备用。

#### 1.1.2 培养基

为了分离甘蓝根际微生物, 选择了 10 种常用微生物培养基<sup>[25]</sup>。本研究所用沙雷氏菌培养基包括 LB (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0,

NaCl 10.0, 琼脂 15.0; TSB (g/L): TSB 30.0, 琼脂 15.0; LBG (g/L): LB 培养基中加入甘油 20.0; GTY (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 甘油 20.0, 琼脂 15.0; GYB (g/L): 胰蛋白胨 5.0, 酵母提取物 0.5, 葡萄糖 10.0, 牛肉膏 3.0, 琼脂 15.0; TB (g/L): 胰蛋白胨 12.0, 酵母提取物 24.0,  $K_2HPO_4$  12.5,  $KH_2PO_4$  2.3, 琼脂 15.0。以上培养基均调节 pH 值至 7.0。

### 1.1.3 菌株

本研究所用菌株见表 1。

### 1.1.4 质粒

本研究所用质粒见表 2。

### 1.1.5 引物

本研究所用引物由生工生物工程(上海)股

份有限公司合成, 引物序列见表 3。

### 1.1.6 主要试剂和仪器

色谱级甲醇, 北京迪科马科技有限公司; 氯霉素、卡那霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; KOD Plus Neo, TOYOBO 公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶, TaKaRa 公司; T4 DNA 聚合酶, 纽英伦生物技术(北京)有限公司。

电穿孔系统、PCR 仪, Bio-Rad 公司; 恒温培养箱, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 光学显微镜, 南京江南永新光学有限公司; 高效液相色谱仪, 岛津公司; 高效液相色谱-高分辨质谱联用系统, 安捷伦科技(中国)有限公司。

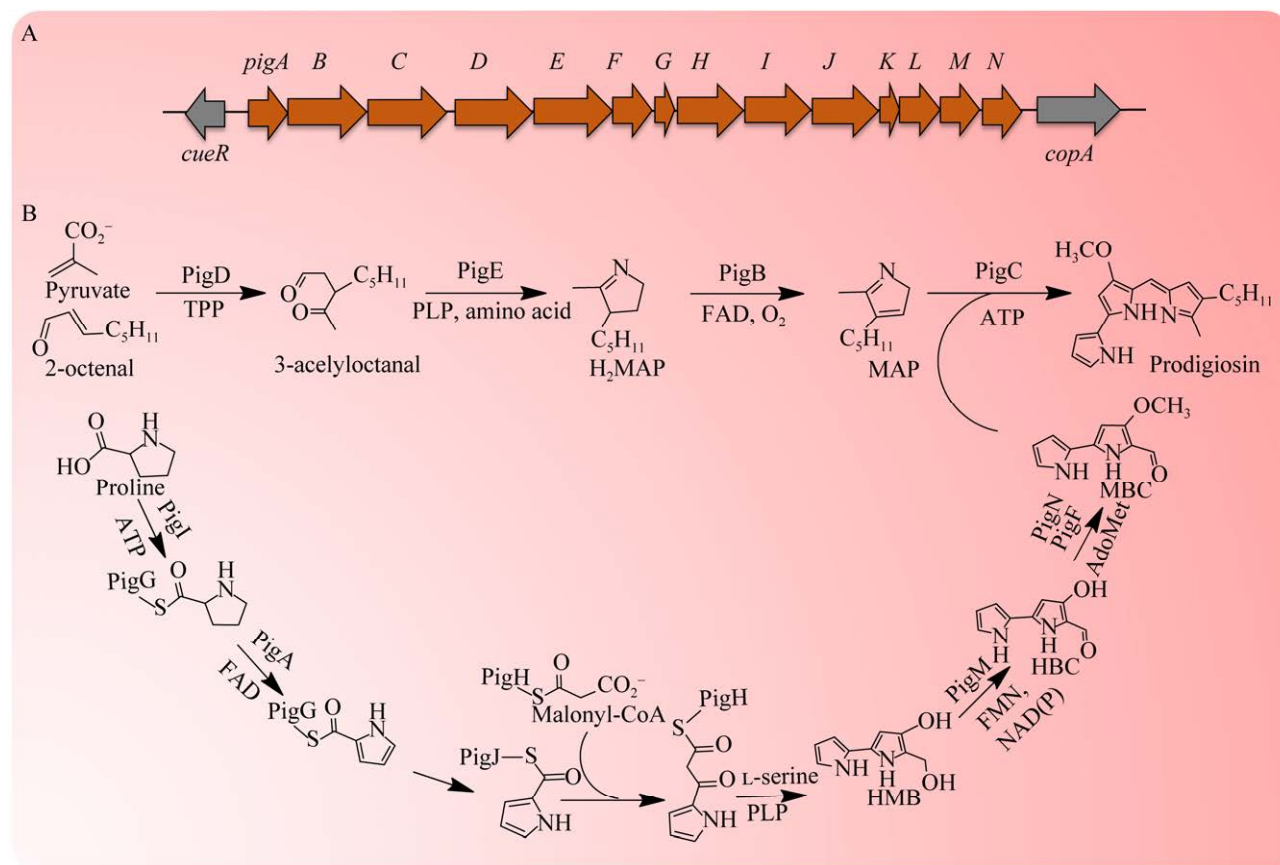


图 1 灵菌红素生物合成基因簇(A)及其合成途径(B)

Figure 1 The prodigiosin biosynthetic gene cluster (A) and biosynthetic pathway of prodigiosin (B).

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Genotype/Description	Reference/Source
<i>Serratia marcescens</i> BoR121	Wild-type, prodigiosin producer	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F <sup>-</sup> , φ80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Thermo Fisher Scientific
JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ(lac-proAB), [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> ΔM15]	Thermo Fisher Scientific
BL21(DE3)	<i>fhuA2</i> , <i>ompT</i> , <i>gal</i> (λ <i>DE3</i> ), [ <i>dcm</i> ] Δ <i>hsdS</i> , λ <i>DE3</i> =λ <i>sBamH</i> Io Δ <i>EcoR</i> I-B <i>int</i> -( <i>lacI</i> - <i>PlacUV5-T7 gene1</i> ) <i>i21</i> Δ <i>nin5</i>	New England Biolabs
BAP1	BL21(DE3), Δ <i>prpRBCD</i> -T7prom- <i>sfp</i> , T7prom- <i>prpE</i>	Kerafast
BW25113/pIJ790	K-12 derivative, Δ <i>araBAD</i> , Δ <i>rhaBAD</i> /pIJ790	[26]
GB05-dir	Red/ET mediated linear-linear recombineering	[27-28]
DH5α- <i>pig</i>	<i>E. coli</i> DH5α containing p15A:: <i>pig</i>	This work
JM109- <i>pig</i>	<i>E. coli</i> JM109 containing p15A:: <i>pig</i>	This work
BL21- <i>pig</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) containing p15A:: <i>pig</i>	This work
BAP1- <i>pig</i>	<i>E. coli</i> BAP1 containing p15A:: <i>pig</i>	This work
BAP1-T7- <i>pig</i>	<i>E. coli</i> BAP1 containing pET28a::T7 <i>pig</i>	This work
BAP1- <i>rpoD-pig</i>	<i>E. coli</i> BAP1 containing pET28a::P <sub><i>rpoD</i></sub> <i>pig</i>	This work
BAP1- <i>rpoS-pig</i>	<i>E. coli</i> BAP1 containing pET28a::P <sub><i>rpoS</i></sub> <i>pig</i>	This work
BAP1- <i>oxb20-pig</i>	<i>E. coli</i> BAP1 containing pET28a::P <sub><i>oxb20</i></sub> <i>pig</i>	This work

表 2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant characteristics	Reference/Source
p15A-cm-TetR-TetO	ori (p15A), Cm <sup>R</sup>	[27]
pET28a	ori (pBR322), T7, His6-tag, Kan <sup>R</sup>	Novagen
p15A:: <i>pig</i>	A derivative of p15A containing the prodigiosin biosynthetic gene cluster, Cm <sup>R</sup>	This work
pET28a::T7 <i>pig</i> UpDn	pET28a containing T7 promoter, 500 bp of <i>pigA1</i> and 530 bp of <i>copA</i>	This work
pET28a::P <sub><i>rpoD</i></sub> <i>pig</i> UpDn	pET28a containing P <sub><i>rpoD</i></sub> , 500 bp of <i>pigA3</i> and 530 bp of <i>copA</i>	This work
pET28a::P <sub><i>oxb20</i></sub> <i>pig</i> UpDn	pET28a containing P <sub><i>oxb20</i></sub> , 500 bp of <i>pigA3</i> and 530 bp of <i>copA</i>	This work
pET28a::P <sub><i>rpoS</i></sub> <i>pig</i> UpDn	pET28a containing P <sub><i>rpoS</i></sub> , 500 bp of <i>pigA2</i> and 530 bp of <i>copA</i>	This work
pET28a::T7 <i>pig</i>	A derivative of pET28a containing the prodigiosin biosynthetic gene cluster driven by T7 promoter	This work
pET28a::P <sub><i>oxb20</i></sub> <i>pig</i>	A derivative of pET28a containing the prodigiosin biosynthetic gene cluster driven by <i>oxb20</i> promoter	This work
pET28a::P <sub><i>rpoD</i></sub> <i>pig</i>	A derivative of pET28a containing the prodigiosin biosynthetic gene cluster driven by <i>rpoD</i> promoter	This work
pET28a::P <sub><i>rpoS</i></sub> <i>pig</i>	A derivative of pET28a containing the prodigiosin biosynthetic gene cluster driven by <i>rpoS</i> promoter	This work

表 3 本研究所用引物

Table 3 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Purpose
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	PCR amplification of 16S rRNA gene
1492R	GGTTACCTTGTTACGCTT	PCR amplification of 16S rRNA gene
pig-HA-p15A-1-F	gccgggagcgctggctccatctggtggcagcatccaAGATCCGAAAACCCCAAGTT	p15A vector fragment
pig-HA-p15A-1-R	atgggaataaaagtaagcatgcaaacctctgtcagacaAGATCCTTTCTCCTCTTTAG	carrying the 80 bp target
pig-HA-p15A-2-F	tcgccaaaagttaacgttatccggcgtggacatcactctGCCGGGCGAGCGTCGGCT	gene cluster homology
pig-HA-p15A-2-R	tgacgccggcgaaacaccacaatcagcgcgacgatcacgATGGGAATAAAAGTAAGC	arm
oxb20-F	AATTAGATCTCTATTTACAAGAGGGGGGCG	PCR 706 bp of <i>oxb20</i>
oxb20-R	GCCGGGTAATACCGGATAGT	PCR 706 bp of <i>oxb20</i>
rpoD-F	AATTAGATCTACGCACGACCATGCGTATAC	PCR 600 bp of <i>rpoD</i>
rpoD-R	tgataagttaaaatccatAAGACGGTATCCACACTTAT	PCR 600 bp of <i>rpoD</i>
rpoS-F	AATTAGATCTCTTTAGTGAAGGGTGAGCTGGC	PCR 1 367 bp of <i>rpoS</i>
rpoS-R	AAGGTGGCTCCTACCCGTGA	PCR 1 367 bp of <i>rpoS</i>
pig Up-F1	AATTCATGGATGGATTTTAACTTATCAAGTGGGC	PCR 500 bp of <i>pigA1</i>
pig Up-F2	ATGGATTTTAACTTATCAAGTGGGC	PCR 500 bp of <i>pigA2</i>
pig Up-F3	tatccggtattaccggcATGGATTTTAACTTATCAAGTGGG	PCR 500 bp of <i>pigA3</i>
pig Up-R	TTAAGCTAGCATGTCGGCAATCGGCGCGTT	PCR 500 bp of <i>pigA1-A3</i>
pig Dn-F	AATTGCTAGCCCCCAACGCGGCAGCGCGGTT	PCR 530 bp of <i>copA</i>
pig Dn-R	AATTGAATTCGGATCCCTTTGCGTTGTCGATCTCG	PCR 530 bp of <i>copA</i>

Underlined sequences for restriction enzyme recognition sites, and lowercase letters for overlapping between DNA sequences.

## 1.2 菌株分离和鉴定

取出保存的甘蓝根, 用灭菌的去离子水冲洗表面泥土, 将根分段剪碎, 随后取 20 g 根和 100 mL 无菌水放入破壁机中破碎至糊状, 经 4 层无菌纱布过滤后的滤液用生理盐水进行逐级稀释。取各梯度稀释液 100  $\mu$ L 分别涂布于分离培养基, 置于 28  $^{\circ}$ C 培养<sup>[25]</sup>。利用通用引物 27F/1492R 对细菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 所得产物经琼脂糖凝胶电泳检测并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。用 BioEdit 拼接测序所得基因序列后在 NCBI 中进行比对。

## 1.3 黏质沙雷氏菌的培养

挑取黏质沙雷氏菌单菌落, 接种至 LB 液体培养基中, 28  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 2 h。待其  $OD_{600}$  约为 0.5 时, 接种环取菌液在 LB、LBG、TB、TSB、GTY 和 GYB 共 6 种固体培养基上划线, 置于 28  $^{\circ}$ C 培养箱培养 2 d 后观察菌落形态。同时, 菌液以 2% 的接种量接至 30 mL 上述 6 种液

体培养基中, 28  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 6 h 后显微镜观察细菌形态。

## 1.4 黏质沙雷氏菌的系统发育树构建

利用 NCBI 对黏质沙雷氏菌的 16S rRNA 基因序列进行比对, 选取沙雷氏菌属中具有较高相似性的序列, 通过 MEGA 6.0 构建系统发育树。

## 1.5 基因组测序和生物信息学分析

黏质沙雷氏菌的基因组测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成, 依托美吉云平台 ([www.i-sanger.com](http://www.i-sanger.com)) 完成基因组的特征分析。利用 antiSMASH 7.0 (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) 对该菌株的次级代谢产物生物合成基因簇进行分析。

## 1.6 菌株发酵产物分析鉴定

黏质沙雷氏菌接种至 LB、LBG、TB、TSB、GTY 和 GYB 共 6 种培养基, 大肠杆菌重组菌株接种至 LBG 培养基。28  $^{\circ}$ C 培养 2 d 后, 收集板上菌落, 用酸性甲醇(按 4% 体积比加入 1 mol/L

HCl)破胞萃取, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上机测试。HPLC 和 HPLC-HRMS 的流动相 A 为含 0.1%甲酸的去离子水, 流动相 B 为甲醇, 检测波长为 535 nm。HPLC 洗脱程序: 0–2 min, 50%–100%甲醇; 2–5 min, 100%甲醇; 5–7 min, 100%–50%甲醇; 7–20 min, 50%甲醇, 流速 1.0 mL/min; HPLC-HRMS 洗脱程序: 0–3 min, 70%甲醇; 3–8 min, 70%–100%甲醇; 8–13 min, 100%甲醇; 13–15 min, 70%甲醇, 流速 0.3 mL/min。

### 1.7 灵菌红素基因簇的克隆及异源表达

黏质沙雷氏菌接种至 50 mL LB 培养基中, 恒温摇床中 28  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下培养 2 d, 收集菌体并提取基因组。利用 *Nde* I 酶切, 获得包含完整基因簇的 DNA 片段。利用引物对 pig-HA-p15A-1-F/R 和 pig-HA-p15A-2-F/R, 以质粒 p15A-cm-TetR-TetO 为模板, 依次进行 PCR 扩增, 最终获得带有 80 bp 同源臂的约 2.7 kb DNA 片段。将其与上述基因组酶切回收后的 DNA 片段混合, 电转化至大肠杆菌 GB05-dir 中<sup>[27]</sup>。采用酶切验证确定获得含目标基因簇的重组质粒, 并将其命名为 p15A::pig。将 p15A::pig 分别转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、JM109、BL21(DE3)和 BAP1 中进行异源表达。

### 1.8 灵菌红素基因簇的启动子改造

pET28a 质粒分别经 *Nco* I/*Bam* H I 和 *Bgl* II/*Bam* H I 酶切制备两种线性化载体。以 BW25113 基因组为模板, 用引物对 *oxb20*-F/R 扩增 *oxb20* 启动子片段; 以大肠杆菌 K-12 基因组为模板, 分别用引物对 *rpoD*-F/R 和 *rpoS*-F/R 制备 *rpoD* 和 *rpoS* 启动子片段。以黏质沙雷氏菌 BoR121 基因组为模板, 分别采用引物对 pig Up-F1/R、pig Up-F2/R、pig Up-F3/R 进行扩增, 得到 3 个 500 bp 的 *pigA1*、*pigA2* 和 *pigA3* 片段作为上游同源臂, 用引物对 pig Dn-F/R 扩增得到 530 bp 的 *copA* 下游同源臂片段。*oxb20*、*rpoD*

分别与 *pigA3* 连接获得 *oxb20-pigA3* 和 *rpoD-pigA3* 片段。然后, 将 *pigA1*、*oxb20-pigA3* 和 *rpoD-pigA3* 分别与下游 *copA* 片段酶切连接至 pET28a 线性化载体, 得到重组质粒 pET28a::T7 pigUpDn、pET28a::P<sub>*oxb20*</sub> pigUpDn 和 pET28a::P<sub>*rpoD*</sub> pigUpDn。*rpoS* 与 *pigA2* 片段磷酸化连接至 pET28a::P<sub>*rpoD*</sub> pigUpDn (*Bgl* II+*Nhe* I 酶切)质粒相应位置, 得到重组质粒 pET28a::P<sub>*rpoS*</sub> pigUpDn。将上述构建的 4 个重组质粒经 *Nhe* I 线性化, 利用 PCR-targeting 技术将灵菌红素基因簇插入到该线性化载体上, 得到重组质粒 pET28a::T7 pig、pET28a::P<sub>*oxb20*</sub> pig、pET28a::P<sub>*rpoD*</sub> pig 和 pET28a::P<sub>*rpoS*</sub> pig, 之后转入大肠杆菌 BAP1。

## 2 结果与分析

### 2.1 黏质沙雷氏菌的分离和鉴定

随机采集了重庆市武隆区仙女山镇仙女山村的甘蓝根, 使用传统细菌培养方法对甘蓝根际微生物进行分离和纯培养, 在 LB 平板上观察到一株呈橙色的菌株。使用通用引物 27F/1492R 对该菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 将所得 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 比对分析, 利用 MEGA 6.0 构建系统发育树, 发现该菌株与黏质沙雷氏菌 ATCC 274 的亲缘关系最近(图 2), 其相似性为 99.67%, 因此将其命名为黏质沙雷氏菌 BoR121。为了进一步观察其菌落形态, 将该菌分别接种在 6 种不同的固体培养基上(LB、LBG、TSB、GTy、GYB 和 TB), 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 2 d 后菌落表面光滑、湿润、黏稠, 呈圆形凸起, 该菌在 6 种培养基上呈现不同的颜色(图 3A)。此外, 我们将该菌株分别接种至上述对应的液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 6 h 后进行显微观察, 发现该菌在 6 种液体培养基中均呈短杆状(图 3B)。以上结果表明, 黏质沙雷氏菌 BoR121 是一株短杆状细菌, 具有产生有颜色化合物的能力。



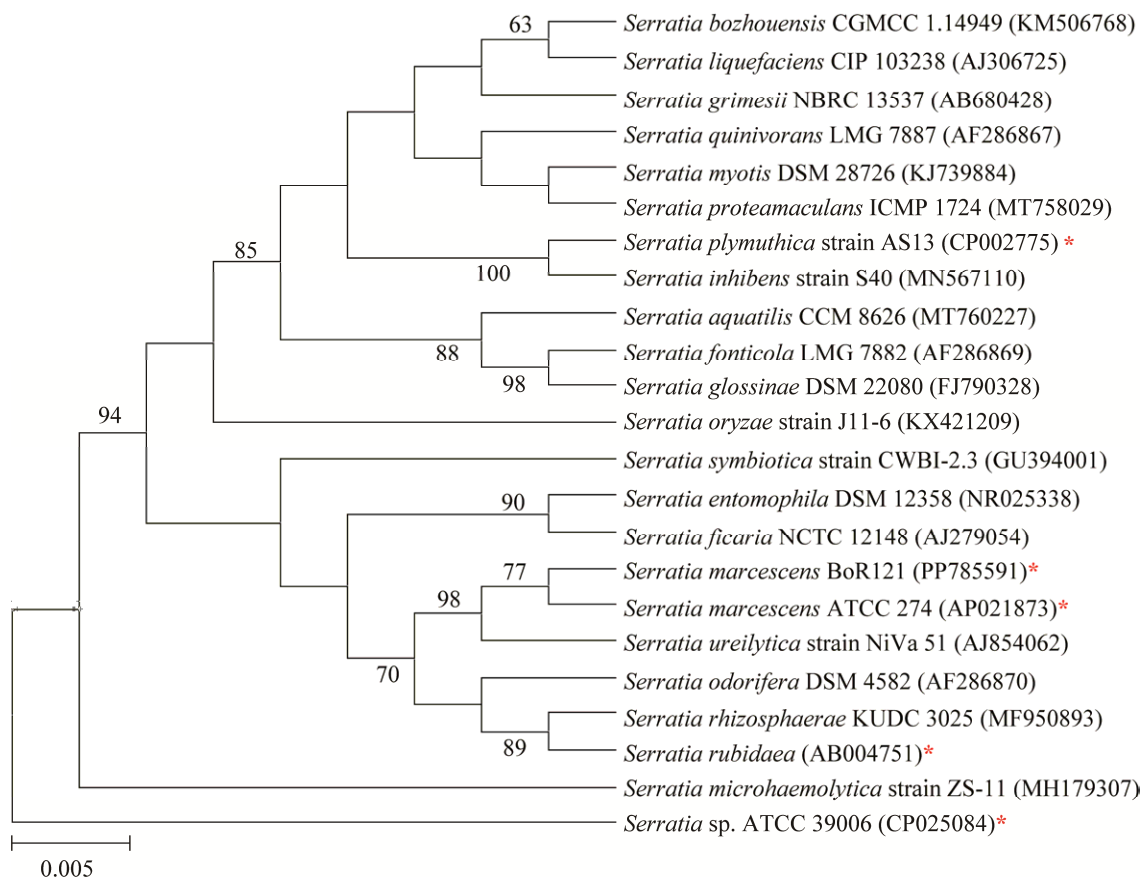


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree showing the relationships between *Serratia marcescens* BoR121 and closely related species. Prodigiosin-producing strains were marked using a red star, and numbers in parentheses represent accession numbers of 16S rRNA gene sequences in GenBank. Numbers at the branch points indicated the bootstrap value; Scale bar indicates the estimated number of base changes per nucleotide sequence position.

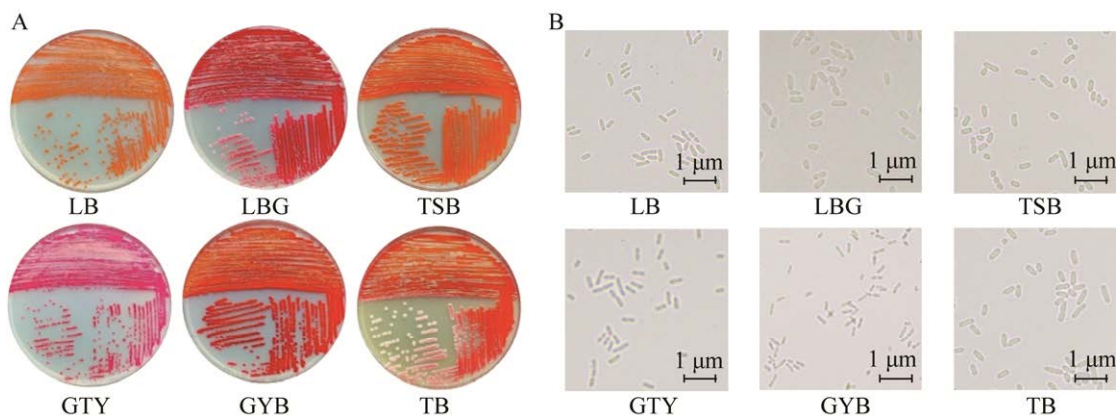


图 3 黏质沙雷氏菌 BoR121 在不同固体培养基上的生长情况(A)和对应液体培养基中显微形态观察(B)

Figure 3 Growth of *Serratia marcescens* BoR121 on different agar media (A) and morphological characteristics in different liquid media (B).



## 2.2 基因组测序及分析

为了深入了解黏质沙雷氏菌 BoR121 的生物学特性, 对其基因组进行了测序。Illumina HiSeq 二代测序质控数据显示, 原始 reads 读长 150 bp, 质控后得到高质量 reads 用来进行基因组组装, Circos 基因组如图 4 所示。PacBio 三代测序结果显示, 总 reads 的数量为 136 179, 平均 reads 读长 8 025.33 bp, 总碱基长 1 092 881 030 bp。完整基因组信息表明, 该菌株为黏质沙雷氏菌, 其基因组为一条环状染色体, 全长 5 228 182 bp, G+C 含量为 59.51%。预测有 4 996 个编码基因, 平均长度 913.94 bp, 总长度为 4 566 027 bp, 占基因组总长度的 87.33%。基因组包括 22 种 tRNA 基因共 92 个; 22 个 rRNA 基因中, 16S rRNA 基因和 23S rRNA 基因各 7 个(表 4)。将预测得

到的基因集与各种功能数据库进行比对, 分析发现 KEGG 数据库中共注释到 3 098 个基因, 占编码基因数目的 62.01%, 根据其功能分为 6 大类, 分别是胞内生命过程(cellular processes)、环境信息处理(environmental information processing)、遗传信息处理(genetic information processing)、人类疾病(human diseases)、代谢(metabolism)和有机体生命系统(organismal systems), 其中代谢类相关基因有 1 506 个(图 5)。COG 数据库中共注释到 4 502 个基因, 占编码基因数目的 90.11%, 共有 21 种类型, 除了未知功能基因外, 氨基酸转运和代谢类(amino acid transport and metabolism)以及转录类(transcription)基因数目最多, 分别为 427 个和 414 个(图 6)。GO 数据库中共注释到 3 136 个基因, 占编码基因的

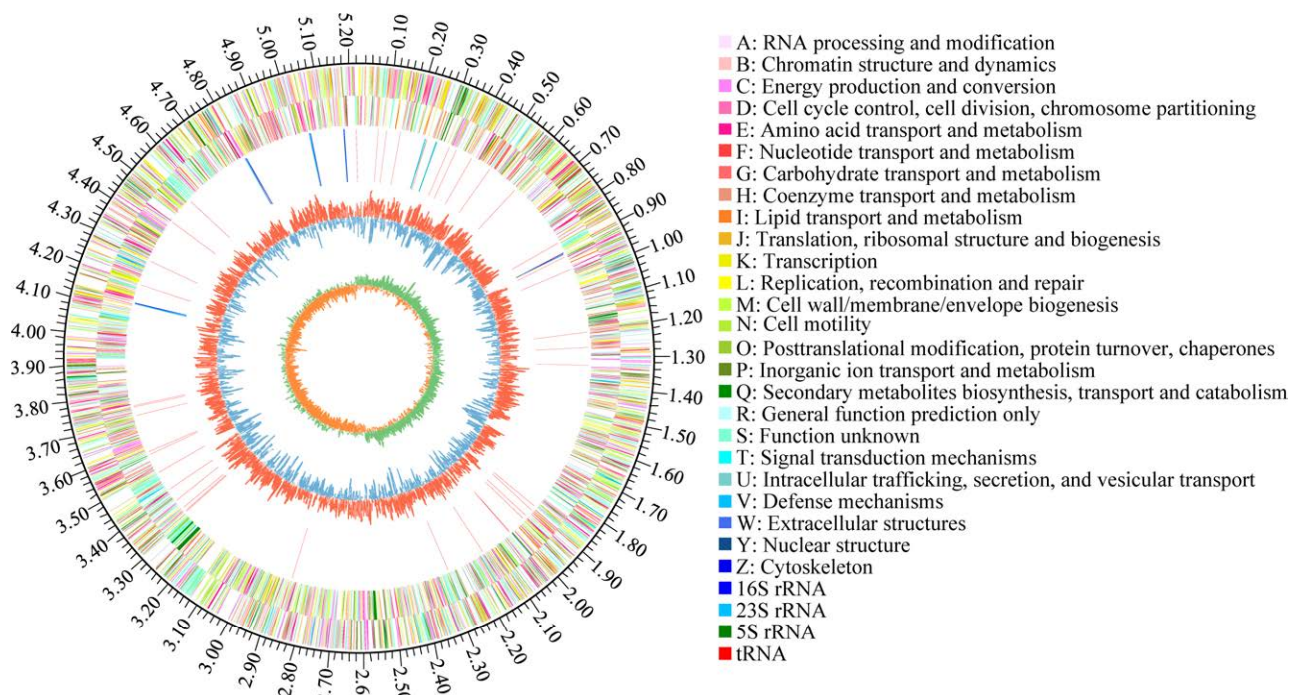


图 4 黏质沙雷氏菌 BoR121 的基因组圈图

Figure 4 Circular genome map of *Serratia marcescens* BoR121. From inside circle to outside, the following tracks are shown: G+C-skew, G+C content, rRNA and tRNA, predicted protein coding genes on forward and reverse strand, and genome size.

表 4 黏质沙雷氏菌 *BoR121* 的基因组特征  
Table 4 Genomic characteristics of *Serratia marcescens* BoR121

Feature	Chromosome characteristics
Chromosome size (bp)	5 228 182
G+C content (%)	59.51
Predicted genes	4 996
rRNA operons	22
tRNA genes	92
sRNA genes	112
Genes assigned to COG	4 502
Genes assigned to GO	3 136
Genes assigned to KEGG	3 098
CRISPR repeat regions	4
Prophages	3
Simple tandem repeats	26
Interspersed repeats	72
Genomic islands	8
Carbohydrate-active enzymes	138
Transposable element	9
Antibiotic resistance genes	322
Virulence factors	656
Secondary metabolite gene clusters	11

62.77%，根据功能的不同，这些基因被分为生物过程(biological process)，细胞成分(cellular component)和分子功能(molecular function)三大类(图 7)。

为了评估黏质沙雷氏菌 *BoR121* 合成次级代谢产物的能力，本研究通过 antiSMASH 分析其基因组序列，发现 11 个次级代谢产物生物合成基因簇，依次命名为基因簇 1–11 (表 5)，其中 3 个属于非核糖体肽合成酶类(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)、2 个非核糖体肽合成酶-聚酮合酶杂合类(non-ribosomal peptide synthetase-polyketide synthetase, NRPS-PKS)、2 个硫肽类(thiopeptide)、2 个内酯类(lactone)和 2 个其他类型。其中，基因簇 4 与黏质沙雷氏菌 ATCC 274 的灵菌红素基因簇有 100%的相似性，与沙雷氏菌 ATCC 39006 的灵菌红素基因簇有 82%的相似

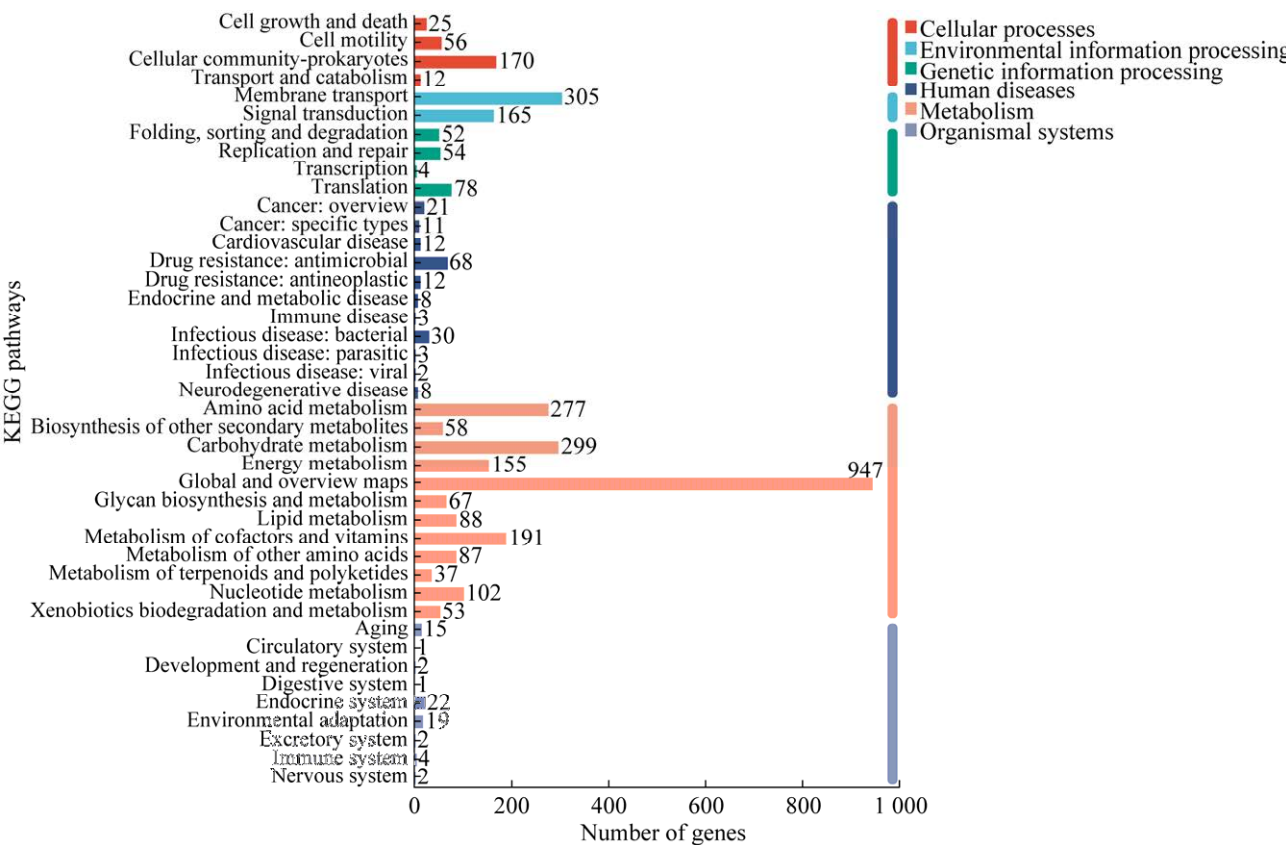


图 5 黏质沙雷氏菌 *BoR121* 基因组 KEGG 数据库注释结果  
Figure 5 The annotation result of *Serratia marcescens* BoR121 genome against KEGG database.

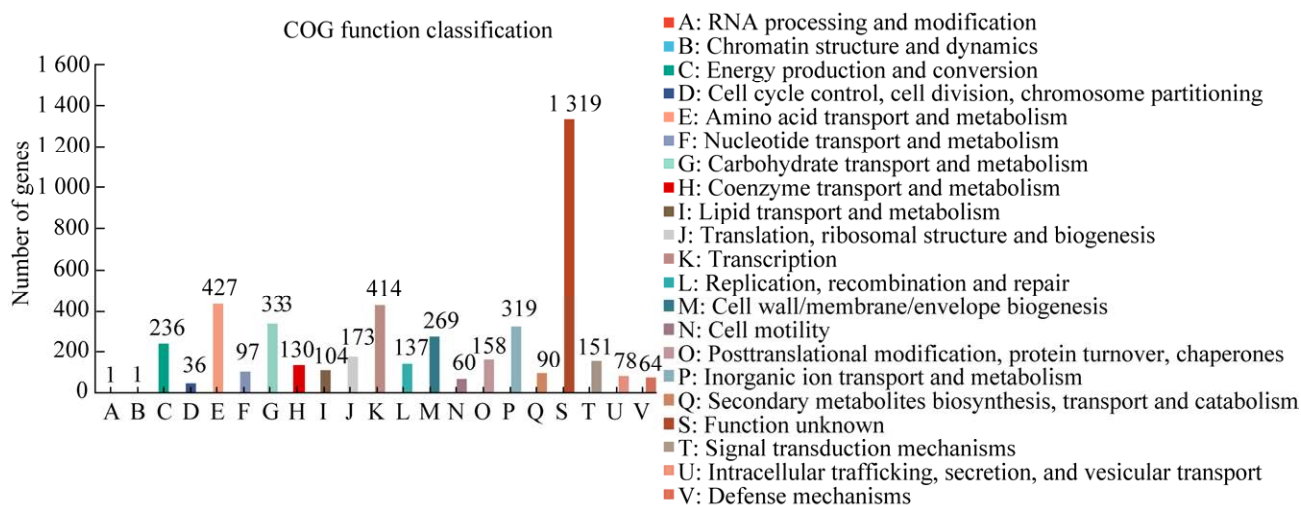


图 6 黏质沙雷氏菌 BoR121 基因组 COG 数据库注释结果

Figure 6 The annotation result of *Serratia marcescens* BoR121 genome against COG database.

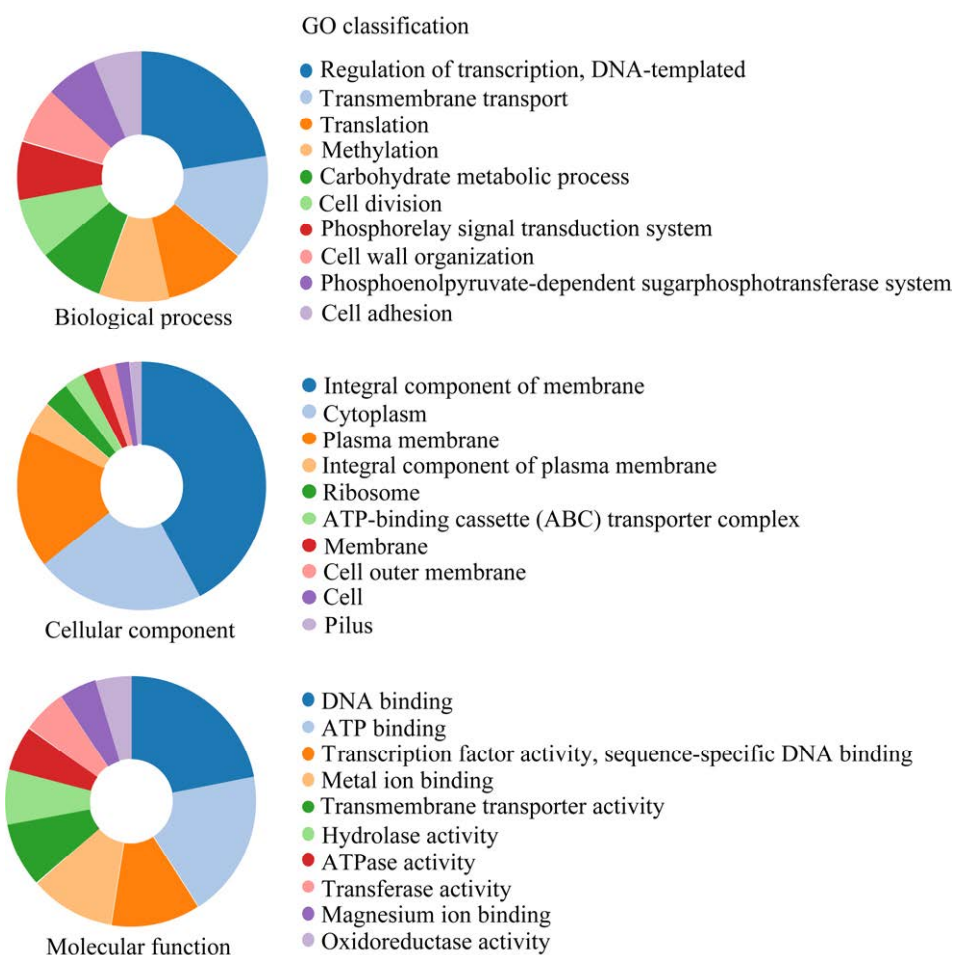


图 7 黏质沙雷氏菌 BoR121 基因组 GO 数据库注释结果

Figure 7 The annotation result of *Serratia marcescens* BoR121 genome against GO database.



表 5 黏质沙雷氏菌 BoR121 基因组的 antiSMASH 分析

Table 5 antiSMASH analysis of the genome sequences of *Serratia marcescens* BoR121

Cluster	Type	From	To	Most similar known biosynthetic gene cluster
1	Hserlactone	23 358	44 032	Unknown
2	NRPS	278 246	342 472	Unknown
3	Betalactone	747 506	773 174	Unknown
4	NRPS-PKS	1 174 609	1 195 556	Prodigiosin
5	Thiopeptide	1 797 266	1 823 709	Unknown
6	Other	2 183 729	2 205 826	Yersinopine
7	Other	2 467 098	2 487 376	Unknown
8	NRPS-PKS	2 514 439	2 584 366	Unknown
9	NRPS	3 218 021	3 294 757	Unknown
10	Thiopeptide	3 840 325	3 887 793	Unknown
11	NRPS	4 687 524	4 731 463	Unknown

性<sup>[29]</sup>, 基因簇 6 与来自 *Yersinia pestis* CO92 的 Yersinopine 基因簇有 100% 的相似性<sup>[30]</sup>, 其他 9 个基因簇与已报道化合物编码基因簇相似性较低, 说明该菌具有产生多种新结构、新功能化合物的潜力。

### 2.3 灵菌红素的鉴定

结合黏质沙雷氏菌 BoR121 的形态观察及基因组序列分析, 确认该菌具有合成灵菌红素的能力。从平板上刮取菌落, 使用酸性甲醇破胞萃取, 将所得萃取液进行 HPLC 分析, 结果显示, 6 种培养基上收集的样品均在 535 nm 吸收波长处观察到明显的单一峰, 该峰的保留时间为 8.4 min,

与灵菌红素标准样品一致(图 8A)。HRMS 测定其分子量为 324.235 6  $[M+H]^+$ , 与灵菌红素理论分子量(324.199 8  $[M+H]^+$ )相符, 确定该化合物为灵菌红素(图 8B)。

### 2.4 灵菌红素基因簇的克隆

黏质沙雷氏菌 BoR121 基因组中含有灵菌红素合成基因簇(基因簇 4), 该基因簇由 14 个基因组成一个转录单元, 其基因编码产物对应 PigA-N 的同源蛋白(表 6)。选择其他沙雷氏菌(*S. marcescens* ATCC 274、*S. plymuthica* strain AS13 和 *Serratia* sp. ATCC 39006)和河氏菌(*H. chejuensis* KCTC 2396)中灵菌红素基因簇进

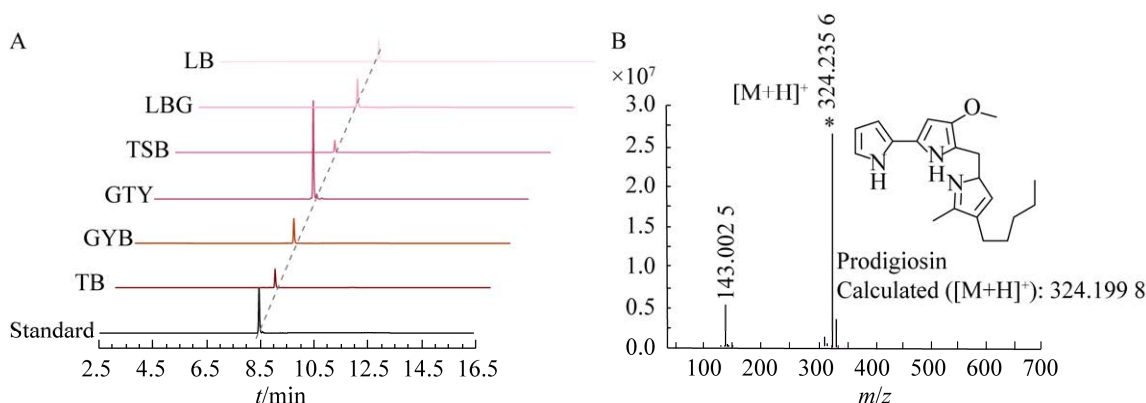


图 8 黏质沙雷氏菌 BoR121 发酵产物的 HPLC 分析(A)及 HRMS 分析(B)

Figure 8 HPLC analysis of *Serratia marcescens* BoR121 in different media (A) and the result of HRMS analysis of the compound found by HPLC (B).

行比较分析,发现该基因簇的排布方式与 *S. marcescens* ATCC 274 一致(图 9)。为进一步确认该基因簇负责灵菌红素的生物合成,通过 Red/ET 重组工程技术直接从该菌染色体上钓取了大小约为 26.3 kb 的 DNA 片段,其中包含了

大小为 20.9 kb 的灵菌红素基因簇,得到重组质粒 p15A::pig (图 10A)。该质粒分别经 *EcoR* I 和 *Sac* I 酶切后,琼脂糖凝胶电泳检测发现酶切条带与预期相符(图 10B)。结果表明,本研究成功克隆得到了灵菌红素基因簇。

表 6 黏质沙雷氏菌 BoR121 灵菌红素生物合成基因的功能分析

Table 6 Functional analysis of genes within the prodigiosin biosynthetic gene cluster of *Serratia marcescens* BoR121

ORF	Number of amino acids	Proposed function	Protein homology	Amino acid identity (%)
<i>pigA</i>	385	L-prolyl-PCP dehydrogenase	<i>Serratia marcescens</i> acyl-CoA dehydrogenase family protein (MDV2100735.1)	383/385 (99)
<i>pigB</i>	670	Oxidoreductase	<i>Serratia marcescens</i> FAD-dependent oxidoreductase (HEJ0404376.1)	667/670 (99)
<i>pigC</i>	888	Prodigiosin synthesizing transferase	<i>Serratia marcescens</i> phosphoenolpyruvate synthase (MDR2288025.1)	884/888 (99)
<i>pigD</i>	867	Thiamine diphosphate dependent-3-acetyloctanal synthase	<i>Serratia marcescens</i> biosynthesis protein PigD (WP_197787955.1)	864/867 (99)
<i>pigE</i>	853	Aminotransferase	<i>Serratia</i> sp. JKS296 minotransferase class III-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme (WP_097102633.1)	851/853 (99)
<i>pigF</i>	338	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyl transferase	<i>Serratia marcescens</i> methyltransferase domain-containing protein (MBH2772015.1)	336/338 (99)
<i>pigG</i>	87	Acyl carrier protein	<i>Serratia marcescens</i> acyl carrier protein (WP_176063587.1)	86/87 (99)
<i>pigH</i>	648	4-hydroxy-2,2'-bipyrrole-5-methanol synthase	<i>Serratia</i> sp. JKS296 aminotransferase class I/II-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme (WP_097102635.1)	643/648 (99)
<i>pigI</i>	491	L-proline-[L-prolyl-carrier protein] ligase	<i>Serratia marcescens</i> D-alanine-poly(phosphoribitol) ligase (AWO78120.1)	489/491 (99)
<i>pigJ</i>	762	Beta-ketoacyl synthase	<i>Serratia marcescens</i> polyketide synthase (WP_261420020.1)	758/762 (99)
<i>pigK</i>	104	Sterol 3-beta-glucosyltransferase	<i>Serratia marcescens</i> RedY (WP_164052918.1)	103/104 (99)
<i>pigL</i>	215	4'-phosphopantetheinyl transferase Sfp	<i>Serratia marcescens</i> 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily protein (WP_306376640.1)	212/215 (99)
<i>pigM</i>	352	Probable NAD(P)H nitroreductase	<i>Serratia marcescens</i> prodigiosin biosynthesis protein PigM (WP_229597835.1)	350/352 (99)
<i>pigN</i>	242	Delta (14)-sterol reductase	<i>Serratia marcescens</i> putative oxidoreductase (QWV59760.1)	240/242 (99)

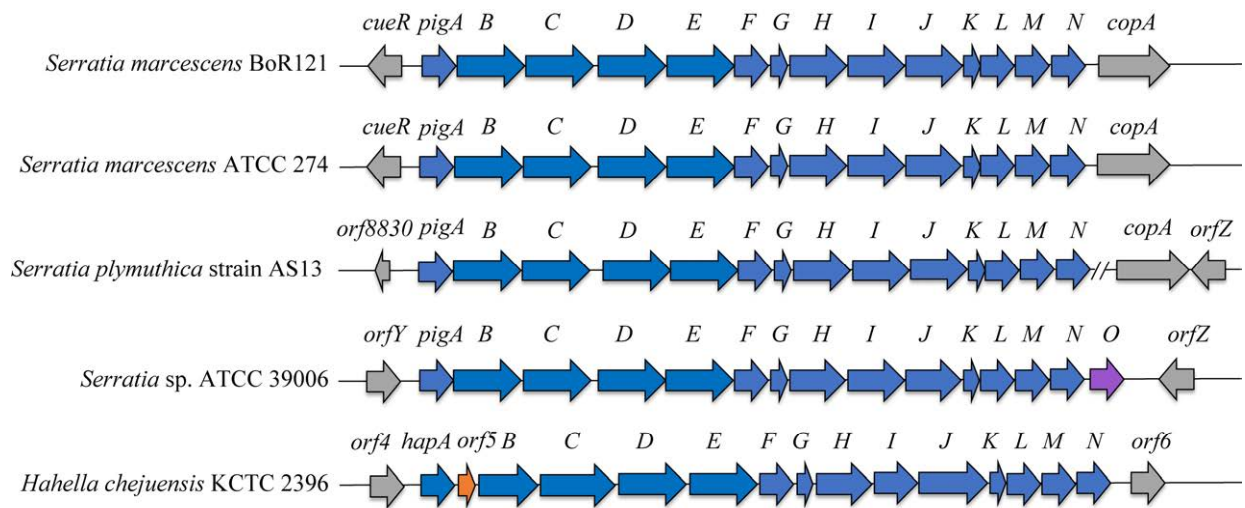


图 9 黏质沙雷氏菌 BoR121 中合成灵菌红素的相似基因簇比较分析

Figure 9 Comparison of prodigiosin biosynthetic genes of *Serratia marcescens* BoR121 with homologues from three additional strains of *Serratia* and *Hahella chejuensis* KCTC 2396.

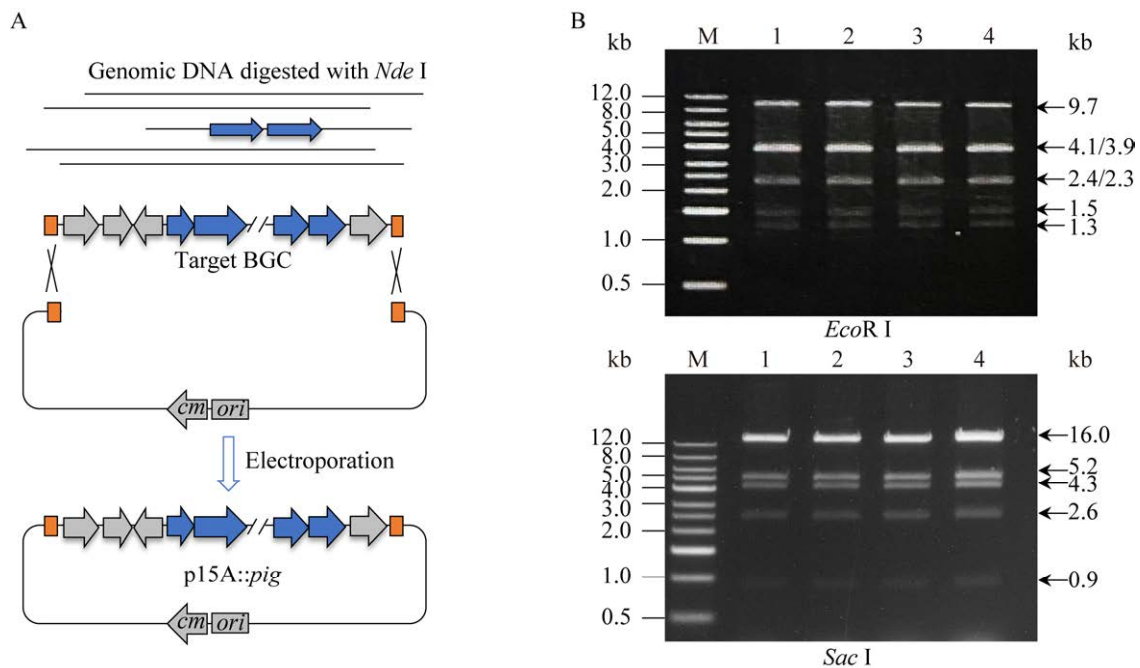


图 10 灵菌红素合成基因簇克隆示意图(A)及酶切验证(B)

Figure 10 A simplified schematic diagram for the construction of p15A::pig containing the prodigiosin gene cluster (A) and confirmation of the recombinant plasmids by restriction digestion (B). M: DNA marker; Lane 1–4: Restriction analysis of four independent plasmids showing correct band patterns.

## 2.5 灵菌红素基因簇的异源表达

将重组质粒 p15A::pig 分别导入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、JM109、BL21(DE3)和 BAP1 中, 得到相应的重组菌株 DH5 $\alpha$ -pig、JM109-pig、BL21-pig

和 BAP1-pig。将这些重组菌株分别接种到 LBG 平板上, 表型观察发现仅 BAP1-pig 呈现明显的红色(图 11A), 表明灵菌红素基因簇在大肠杆菌 BAP1 中成功异源表达。本研究选择了 4 个大肠杆

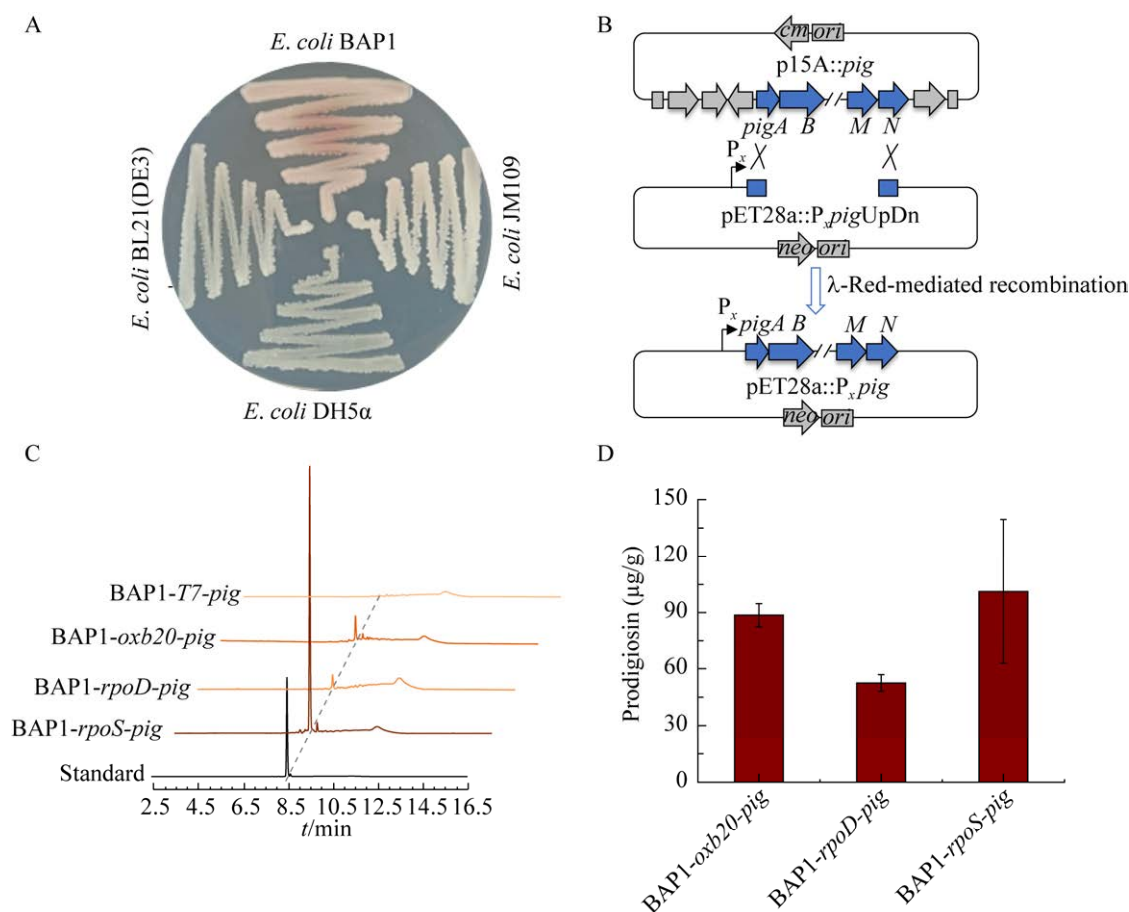


图 11 灵菌红素合成基因簇在大肠杆菌中的异源表达及其产物分析 灵菌红素基因簇在不同大肠杆菌宿主中异源表达(A), 大肠杆菌常用启动子驱动灵菌红素基因簇的重组质粒构建示意图, 其中  $P_x$  为 T7 启动子、 $P_{oxb20}$ 、 $P_{rpoD}$  或  $P_{rpoS}$  (B)及其重组菌株产量分析(C、D)。

Figure 11 Heterologous expression the prodigiosin gene cluster in *Escherichia coli*. Heterologous expression of the cloned prodigiosin gene cluster in *Escherichia coli* BAP1, BL21(DE3), DH5α and JM109 cultivated on LBG agar plates (A), and a simplified schematic diagram for the construction of the recombinant plasmids with commonly used promoters including T7,  $P_{oxb20}$ ,  $P_{rpoD}$  and  $P_{rpoS}$  in *Escherichia coli* to drive the expression of the prodigiosin gene cluster, respectively (B) and HPLC analysis of recombinant strains with the four promoters (C and D).

菌常用启动子 T7、 $P_{oxb20}$ 、 $P_{rpoD}$  和  $P_{rpoS}$ , 用于替换基因簇的原始启动子(图 11B), 获得了 BAP1-T7-pig、BAP1-oxb20-pig、BAP1-rpoD-pig 和 BAP1-rpoS-pig 重组菌株。所得菌株分别在 LBG 培养基上进行固体发酵后, 刮取菌体经酸性甲醇破胞萃取, 萃取液呈现不同程度红色。HPLC 分析结果显示, 除 BAP1-T7-pig 外, 其余 3 株菌均检测到灵菌红素, 其中 BAP1-rpoS-pig

产量最高, 约 101.0 μg/g (图 11C、11D)。

### 3 讨论与结论

来源于根际的优异菌株不仅可以被加工成微生物肥料及微生物农药等生物制剂<sup>[31]</sup>, 还是挖掘许多新型次级代谢产物的资源库。本研究从甘蓝根分离得到一株产红色素的微生物, 通过基因组测序和生物信息学分析发现该菌为黏质沙



雷氏菌。该菌株共有 11 个次级代谢产物生物合成基因簇, 其中 2 个与已知化合物灵菌红素和 Yersinopine 合成基因簇相似性高, 另外 9 个与现有化合物编码基因簇相似性较低, 表明该菌还具有合成新化合物的潜力, 本研究为开发新功能性化合物提供了新菌种资源。

灵菌红素及其衍生物具有多种医药活性和广泛应用前景<sup>[32-33]</sup>, 因而国内外研究者一直致力于实现这些化合物的绿色高效合成, 但是其天然宿主黏质沙雷氏菌是机会致病菌且遗传背景不清晰, 难以进行基因操作, 因此现有研究主要集中在基因簇的异源表达<sup>[34-35]</sup>。目前具有遗传背景清晰、遗传操作简单、生物安全的常用异源宿主包括大肠杆菌、链霉菌和酿酒酵母<sup>[36-37]</sup>, 本研究选择了大肠杆菌作为异源表达宿主。本研究通过 Red/ET 重组工程技术, 克隆得到了完整的灵菌红素基因簇, 该基因簇在大肠杆菌 BAP1 中表达, 推测是因为 BAP1 基因组中特有的 *sfp* 基因, 该基因编码的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTase)对 PKS 和 NRPS 类化合物酰基化起到了关键作用<sup>[38]</sup>。以上分析表明选择含有 PPTase 的宿主, 有利于 PKS 和 NRPS 类化合物异源表达。后续在大肠杆菌 BAP1 中引入修饰基因或采用组合生物合成等手段, 有望拓展灵菌红素的结构多样性。

优化调控元件、增加基因簇拷贝数和启动子改造是提高外源基因表达效率<sup>[39-41]</sup>, 高效合成天然产物的通用策略。鉴于灵菌红素基因簇中基因形成一个转录单元, 本研究将灵菌红素基因簇 *pigA* 启动子替换为大肠杆菌中的常用启动子, 发现不同启动子表达产量存在差异, 其中 BAP1-*oxb20-pig* 和 BAP1-*rpoS-pig* 重组菌株的产量较高, 推测大肠杆菌内源启动子有利于该基因簇的高效表达。为进一步提高灵菌红素产量, 挖掘异源宿主内源强启动子是一种有效途径。相比黏质沙雷氏菌, 大肠杆菌中灵菌红素的产量仍偏

低, 推测是由于内源供给生物合成前体不足。采用代谢工程改造及内源前体物的生物传感器动态调控系统, 提高胞内关键中间体水平, 有望实现目标化合物的增产。

## 作者贡献声明

张雨欣: 数据收集与处理, 论文撰写; 王美燕: 基因簇克隆与异源表达; 李殿怡: 微生物分离培养; 司军: 采集甘蓝根样品, 微生物分离培养, 论文修改; 卞小莹: 基因簇克隆指导, 课题讨论, 论文修改; 牛国清: 课题设计, 实验指导, 论文修改; 刘蓉: 实验指导与论文构思, 论文撰写及修改。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] 杨丽梅, 方智远, 庄木, 张杨勇, 吕红豪, 刘玉梅, 李占省. “十二五”我国甘蓝遗传育种研究进展[J]. 中国蔬菜, 2016(11): 1-6.  
YANG LM, FANG ZY, ZHUANG M, ZHANG YY, LÜ HH, LIU YM, LI ZS. Advances of research on cabbage genetics and breeding during ‘the twelfth five-year plan’ in China[J]. China Vegetables, 2016(11): 1-6 (in Chinese).
- [2] SARKAR D, RAKSHIT A, PAREWA HP, DANISH S, ALFARRAJ S, DATTA R. Bio-priming with compatible rhizospheric microbes enhances growth and micronutrient uptake of red cabbage[J]. Land, 2022, 11(4): 536.
- [3] DHAR PURKAYASTHA G, MANGAR P, SAHA A, SAHA D. Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0191761.
- [4] ADAM E, MÜLLER H, ERLACHER A, BERG G. Complete genome sequences of the *Serratia plymuthica* strains 3Rp8 and 3Re4-18, two rhizosphere bacteria with antagonistic activity towards fungal phytopathogens and plant growth promoting

- abilities[J]. Standards in Genomic Sciences, 2016, 11(1): 61.
- [5] DAHLSTROM KM, MCROSE DL, NEWMAN DK. Keystone metabolites of crop rhizosphere microbiomes[J]. Current Biology, 2020, 30(19): R1131-R1137.
  - [6] YASMIN S, HAFEEZ FY, MIRZA MS, RASUL M, ARSHAD HMI, ZUBAIR M, IQBAL M. Biocontrol of bacterial leaf blight of rice and profiling of secondary metabolites produced by rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* BRp3[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1895.
  - [7] LIU P, TAN Y, YANG J, WANG YD, LI Q, SUN BD, XING XK, SUN D, YANG SX, DING G. Bioactive secondary metabolites from endophytic strains of *Neocamarosporium betae* collected from desert plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1142212.
  - [8] YIP CH, MAHALINGAM S, WAN KL, NATHAN S. Prodigiosin inhibits bacterial growth and virulence factors as a potential physiological response to interspecies competition[J]. PLoS One, 2021, 16(6): e0253445.
  - [9] LI D, LIU J, WANG X, KONG D, DU W, LI HB, HSE CY, SHUPE T, ZHOU DP, ZHAO K. Biological potential and mechanism of prodigiosin from *Serratia marcescens* subsp. *lawsoniana* in human choriocarcinoma and prostate cancer cell lines[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(11): 3465.
  - [10] PAUL T, BANDYOPADHYAY TK, MONDAL A, TIWARI ON, MUTHURAJ M, BHUNIA B. A comprehensive review on recent trends in production, purification, and applications of prodigiosin[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2022, 12(4): 1409-1431.
  - [11] LIU WJ, YANG J, TIAN YN, ZHOU XG, WANG SW, ZHU JR, SUN D, LIU C. An *in situ* extractive fermentation strategy for enhancing prodigiosin production from *Serratia marcescens* BWL1001 and its application to inhibiting the growth of *Microcystis aeruginosa*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 166: 107836.
  - [12] KRISHNA JG, BASHEER SM, ELYAS KK, CHANDRASEKARAN M. Prodigiosin from marine bacterium: production, characterization and application as dye in textile industry[J]. International Journal of Biotechnology and Biochemistry, 2011, 7: 155-191.
  - [13] KRISHNA JG, Jacob A, KURIAN P, ELYAS KK, CHANDRASEKARAN M. Marine bacterial prodigiosin as dye for rubber latex, polymethyl methacrylate sheets and paper[J]. African Journal of Biotechnology, 2013, 12: 2266-2269.
  - [14] PAPIREDDY K, SMILKSTEIN M, KELLY JX, SHWETA, SALEM SM, ALHAMADSHEH M, HAYNES SW, CHALLIS GL, REYNOLDS KA. Antimalarial activity of natural and synthetic prodiginines[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 54(15): 5296-5306.
  - [15] VONBERG RP, WEITZEL-KAGE D, BEHNKE M, GASTMEIER P. Worldwide Outbreak Database: the largest collection of nosocomial outbreaks[J]. Infection, 2011, 39(1): 29-34.
  - [16] DESSÌ A, PUDDU M, TESTA M, MARCIALIS MA, PINTUS MC, FANOS V. *Serratia marcescens* infections and outbreaks in neonatal intensive care units[J]. Journal of Chemotherapy, 2009, 21(5): 493-499.
  - [17] SHIKOV AE, MERKUSHOVA AV, SAVINA IA, NIZHNIKOV AA, ANTONETS KS. The man, the plant, and the insect: shooting host specificity determinants in *Serratia marcescens* pangenome[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1211999.
  - [18] MORADIGARAVAND D, BOINETT CJ, MARTIN V, PEACOCK SJ, PARKHILL J. Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland[J]. Genome Research, 2016, 26(8): 1101-1109.
  - [19] WILLIAMSON NR, SIMONSEN HT, AHMED RAA, GOLDET G, SLATER H, WOODLEY L, LEEPER FJ, SALMOND GPC. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amy1-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*[J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(4): 971-989.
  - [20] WILLIAMSON NR, FINERAN PC, LEEPER FJ, SALMOND GPC. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4: 887-899.
  - [21] COULTHURST SJ, KURZ CL, SALMOND GPC. LuxS mutants of *Serratia* defective in autoinducer-2-dependent 'quorum sensing' show strain-dependent impacts on virulence and production of carbapenem and prodigiosin[J]. Microbiology, 2004, 150(6): 1901-1910.
  - [22] HORNG YT, CHANG KC, LIU YN, LAI HC, SOO PC. The RssB/RssA two-component system regulates biosynthesis of the tripyrrole antibiotic, prodigiosin, in *Serratia marcescens*[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2010, 300(5): 304-312.
  - [23] PAN XW, YOU JJ, TANG M, ZHANG X, XU MJ, YANG TW, RAO ZM. Improving prodigiosin production by transcription factor engineering and promoter engineering in *Serratia marcescens*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 977337.

- [24] PAN XW, TANG M, YOU JJ, LIU F, SUN CH, OSIRE T, FU WL, YI GF, YANG TW, YANG ST, RAO ZM. Regulator RcsB controls prodigiosin synthesis and various cellular processes in *Serratia marcescens* JNB5-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(2): e02052-20.
- [25] 邹莹, 吴嘉炳, 张雨欣, 李殿怡, 牛国清, 司军. 茎瘤芥根际一株产紫色杆菌素杜辏氏菌的分离鉴定及其基因组分析[J]. 微生物学报, 2022, 62(11): 4122-4140.
- ZOU Y, WU JB, ZHANG YX, LI DY, NIU GQ, SI J. Identification and genome analysis of the violacein-producing *Duganella* sp. isolated from *Brassica juncea* var. *tumida* rhizosphere[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(11): 4122-4140 (in Chinese).
- [26] GUST B, CHALLIS GL, FOWLER K, KIESER T, CHATER KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [27] WANG HL, LI Z, JIA RN, YIN J, LI AY, XIA LQ, YIN YL, MÜLLER R, FU J, STEWART AF, ZHANG YM. ExoCET: exonuclease *in vitro* assembly combined with RecET recombination for highly efficient direct DNA cloning from complex genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(5): e28.
- [28] FU J, BIAN XY, HU S, WANG HL, HUANG F, SEIBERT PM, PLAZA A, XIA LQ, MÜLLER R, STEWART AF, ZHANG YM. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30: 440-446.
- [29] HARRIS AKP, WILLIAMSON NR, SLATER H, COX A, ABBASI S, FOULDS I, SIMONSEN HT, LEEPER FJ, SALMOND GPC. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species-and strain-dependent genome context variation[J]. Microbiology, 2004, 150(11): 3547-3560.
- [30] PARKHILL J, WREN BW, THOMSON NR, TITBALL RW, HOLDEN MTG, PRENTICE MB, SEBAIHIA M, JAMES KD, CHURCHER C, MUNGALL KL, BAKER S, BASHAM D, BENTLEY SD, BROOKS K, CERDEÑO-TÁRRAGA AM, CHILLINGWORTH T, CRONIN A, DAVIES RM, DAVIS P, DOUGAN G, et al. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague[J]. Nature, 2001, 413: 523-527.
- [31] SEENIVASAGAN R, BABALOLA OO. Utilization of microbial consortia as biofertilizers and biopesticides for the production of feasible agricultural product[J]. Biology, 2021, 10: 1111.
- [32] LAZIC J, SKARO BOGOJEVIC S, VOJNOVIC S, ALEKSIC I, MILIVOJEVIC D, KRETZSCHMAR M, GULDER T, PETKOVIC M, NIKODINOVIC-RUNIC J. Synthesis, anticancer potential and comprehensive toxicity studies of novel brominated derivatives of bacterial biopigment prodigiosin from *Serratia marcescens* ATCC 27117[J]. Molecules, 2022, 27(12): 3729.
- [33] KLEIN AS, DOMRÖSE A, BONGEN P, BRASS HUC, CLASSEN T, LOESCHCKE A, DREPPER T, LARAIA L, SIEVERS S, JAEGER KE, PIETRUSZKA J. New prodigiosin derivatives obtained by mutasynthesis in *Pseudomonas putida*[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(9): 1757-1765.
- [34] DOMRÖSE A, KLEIN AS, HAGE-HÜLSMANN J, THIES S, SVENSSON V, CLASSEN T, PIETRUSZKA J, JAEGER KE, DREPPER T, LOESCHCKE A. Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 972.
- [35] COOK TB, JACOBSON TB, VENKATARAMAN MV, HOFSTETTER H, AMADOR-NOGUEZ D, THOMAS MG, PFLEGER BF. Stepwise genetic engineering of *Pseudomonas putida* enables robust heterologous production of prodigiosin and glidobactin A[J]. Metabolic Engineering, 2021, 67: 112-124.
- [36] GOMES AR, BYREGOWDA SM, VEEREGOWDA BM, BALAMURUGAN V. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins[J]. Advances in Animal and Veterinary Sciences, 2016, 4(7): 346-356.
- [37] HUO LJ, HUG JJ, FU CZ, BIAN XY, ZHANG YM, MÜLLER R. Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways[J]. Natural Product Reports, 2019, 36(10): 1412-1436.
- [38] PFEIFER BA, ADMIRAAL SJ, GRAMAJO H, CANE DE, KHOSLA C. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*[J]. Science, 2001, 291(5509): 1790-1792.
- [39] XU YS, DU XH, YU XH, JIANG Q, ZHENG KW, XU JZ, WANG PM. Recent advances in the heterologous expression of biosynthetic gene clusters for marine natural products[J]. Marine Drugs, 2022, 20(6): 341.
- [40] LIU ZY, ZHAO YT, HUANG CQ, LUO YZ. Recent advances in silent gene cluster activation in *Streptomyces*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 632230.
- [41] LI X, HU XJ, SHENG Y, WANG HY, TAO MF, OU YX, DENG ZX, BAI LQ, KANG QJ. Adaptive optimization boosted the production of moenomycin A in the microbial chassis *Streptomyces albus* J1074[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(9): 2210-2221.