



金霉素生物合成基因簇中调控基因 *ctcB* 的功能

刘佳¹, 朱涛¹, 王鹏飞², 孔令新¹, 王松梅¹, 刘运添², 谢昌贤², 邓子新¹, 由德林^{1,2*}

¹ 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

² 金河生物科技股份有限公司, 内蒙古 呼和浩特 010200

摘要: 【目的】研究金霉素产生菌中SARP家族转录调控基因*ctcB*的作用。【方法】利用大肠杆菌、链霉菌的属间接合转移和同源重组双交换的方法, 构建*ctcB*基因缺失突变株。通过cDNA在相邻同转录方向的基因间隔进行PCR验证, 确定金霉素生物合成基因簇中的转录单元。利用荧光定量RT-PCR方法进行突变株金霉素生物合成基因簇的转录水平检测。随后, 生物信息学预测分析了金霉素生物合成基因簇内CtcB与DNA的结合位点。【结果】获得了*ctcB*基因缺失的双交换突变株。发酵结果显示, 该突变株失去产生金霉素与四环素的能力。金霉素生物合成基因簇内有6个共转录单元, 其中4个共转录单元在*ctcB*基因缺失突变株中转录水平明显下降。软件分析预测到一致性较高的CtcB结合重复序列。【结论】*ctcB*正调控金霉素生物合成结构基因*ctcG-D*、*ctcH-K*、*ctcN-P*、*ctcW-T* 4个转录单元和*ctcQ*, 为进一步研究*ctcB*调控机制奠定了基础。

关键词: 金霉素, SARP家族转录调控基因, 基因敲除, 生物合成

金霉素(Chlortetracycline, CTC)作为第1个被发现的四环素家族成员, 于1948年由Duggar从土壤微生物金黄色链霉菌(*Streptomyces aureofacines*)中分离得到^[1]。金霉素同四环素(Tetracycline, TC)、土霉素属第一代四环素类抗生素, 它们是由微生物发酵产生天然产物, 而第二、三代四环素类抗生素如强力霉素和替加环素属半合成类四环素^[2-3]。金霉素属于广谱抗生素, 通过与细菌核糖体30S亚基的氨酰-tRNA特异性结合, 阻止肽链

的延伸, 抑制细菌蛋白质的合成, 从而发挥抗菌作用^[4], 金霉素对多种革兰氏阳性和阴性致病菌有明显抑菌活性, 对立克次氏体、支原体、衣原体和阿米巴原虫亦有作用。由于金霉素在临床和畜牧水产业的广泛应用^[5], 因此, 从50年代就开展了金霉素产生菌随机诱变^[6-7]、同位素喂养^[8]等生物合成方面的研究, 1995年Dairi通过抗性筛选与回补突变株方法确定了含氯代酶基因的片段序列^[9]。2013年上海交通大学以氯代酶基因序列为

基金项目: 国家自然科学基金(31470183, 31400029); 国家“973计划”(2012CB721004)

*通信作者。Tel: +86-21-62932943; E-mail: dlyou@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2015-12-14; 修回日期: 2016-01-13; 网络出版日期: 2016-01-20

探针, 从高产金霉素的金黄色链霉菌工业菌株 F3 中, 成功地克隆了完整的金霉素生物合成基因簇, 揭示了金霉素是由 II 型聚酮合酶合成并经多酶催化形成的生物合成途径^[10]。生物信息分析发现, 金霉素生物合成基因中 *ctcA*、*ctcB* 和 *ctcS* 分别与大器环素生物合成基因簇内 *dacT3*、*dacT1*^[11] 和土霉素生物合成基因簇内 *oxyTAl*^[12] 同源, 然而它们在金霉素生物合成中可能的调控作用目前尚不清楚。本研究在前期金霉素生物合成研究的基础上, 利用体内基因置换, 获得了敲除金霉素生物合成基因簇内 SARP 家族调控基因 *ctcB* 的菌株, 通过确认生物合成基因簇内转录单元, 并测试其结构基因转录水平, 研究该基因的调控作用, 为解析金霉素生物合成机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒: 本实验使用的金霉素产生菌金黄色链霉菌 *Streptomyces aureofaciens* F3^[10]、大肠杆菌 DH10b、ET12567/pUZ8002 和质粒 pIJ778、fosmid 11D1 均由上海交通大学微生物代谢国家重点实验室保藏。调控基因 *ctcB* 缺失的双交换突变株 LJIA-2 为本研究构建。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 反应使用 TaKaRa Taq 试剂盒, 1 kb Plus DNA ladder 购自 Invitrogen 公司, RNA 提取所用 Total RNA Isolation Kit 购自北京赛百盛基因技术有限公司, 限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、反转录 PCR 反应所用 RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit 和荧光实时定量 (*q*-Real-time) PCR 反应所用 MaximaTM SYBR Green/ROX *q*PCR Maxter Mix(2×) 均购自 Fermentas 公司。四环素、金霉素标准品购自上海生工生物工程有限公司。OM 培养基(燕麦 34 g/L, MgSO₄ 0.05 mg/L, KH₂PO₄

0.1 mg/L, (NH₄)₂HPO₄ 0.15 mg/L, 琼脂粉 16 g/L) 用于产生孢子(30 °C, 7 d) 以及接合转移。金霉素发酵培养基[玉米淀粉 80 g/L, 黄豆饼粉 40 g/L, Difco 酵母提取物 1 g/L, Difco 胰蛋白胨 14 g/L, 玉米浆 8 g/L, 碳酸钙 7 g/L; (NH₄)₂SO₄ 3.5 g/L, NaCl 2.5 g/L, MgSO₄ 0.25 g/L, 大豆油 15 mL/L] 用于液体发酵。*q*-Real-time PCR 使用 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, 高效液相色谱(HPLC)使用 Agilent 1200 Series, 液质联用[LC-MS(n)]分析使用 Agilent 1100 series LC/MSD Trap System, 色谱柱均采用 Agilent TC C₁₈ 反向柱(5.0 μm, 4.6 mm×250 mm)。

1.2 *ctcB* 基因敲除突变株的构建

提取质粒 pIJ778, 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行酶切, 琼脂糖凝胶电泳回收 1425 bp 片段(包含壮观霉素抗性基因 *aadA* 以及接合转移使用的 *oriT*)。以此片段为模板, 设计 1 对引物 targB-F(5'-ATTCTGGGTCCGCTGGAAGTCCTCGACAAGGGAATTCCGATTCCGGGGATCCGTCGACC-3') 和 targB-R(5'-CCGCGCGGCAAGCGCCTGGAACCTGCCGAGTGGGCGATGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'), PCR 扩增得到带有壮观霉素抗性基因的 DNA 片段, 通过与携带金霉素生物合成基因的文库质粒 fosmid 11D1 双交换, 得到敲除质粒 pLJIA02, 然后通过接合转移筛选得到 *ctcB* 双交换突变株 LJIA02。在中断基因的两侧设计引物对突变株进行验证, 确定相应基因被壮观霉素抗性基因替换, 由此实现中断 *ctcB* 的目的。对于突变株 LJIA02, *ctcB* 内部 684 bp 在双交换后被 1365 bp 的 *oriT-aadA* 替代, 因此以 1 对验证引物 targBC-F(5'-GGACGGGCCTCAGGCCGAAC-3') 和 targBC-R(5'-CTGGGGCCGAGGGAAATCCGAGCG-3') 进行 PCR 时, 野生型条带为 857 bp, 而双交换突变株应为 1538 bp (图 1-A, 1-B)。

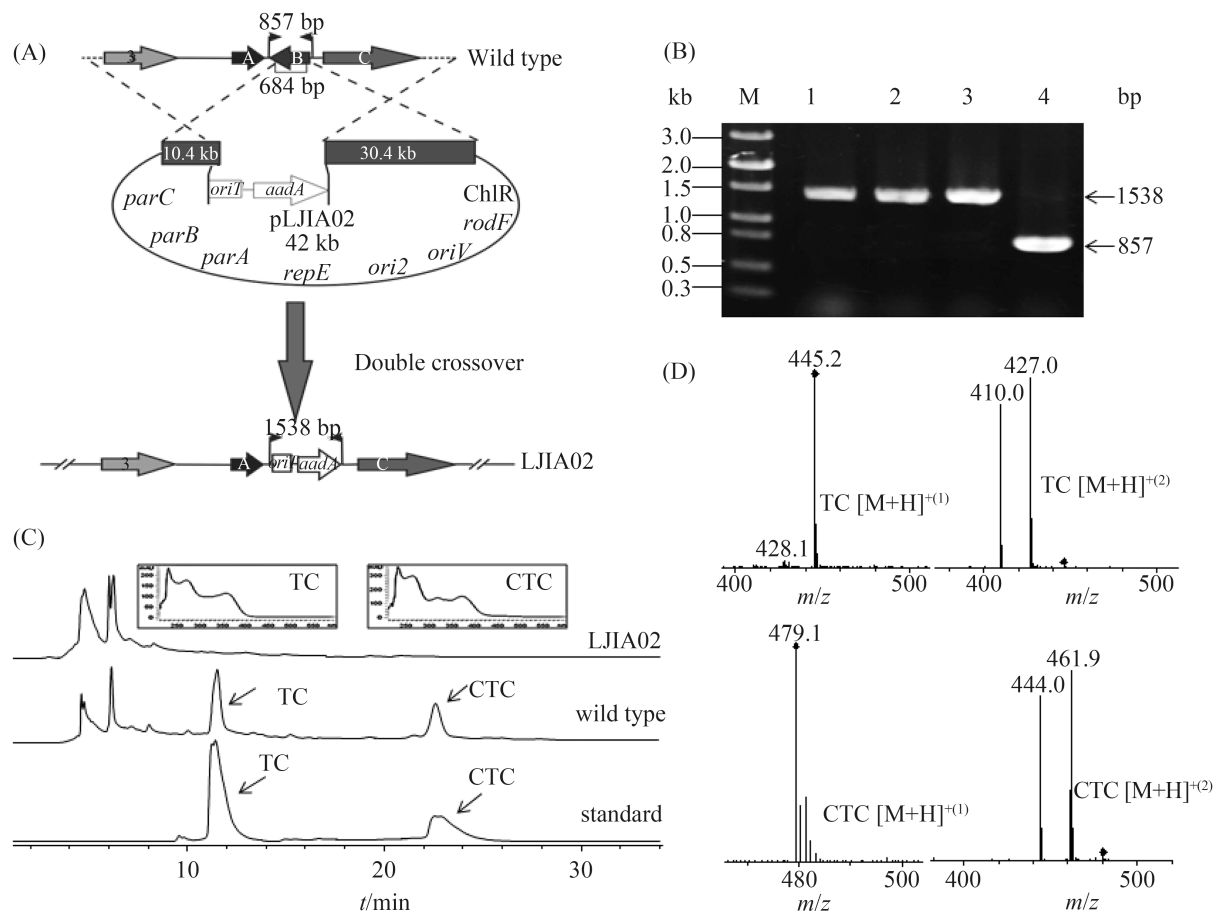


图 1. *ctcB*基因敲除突变株的构建(A, B)和发酵产物的LC-MS检测(C, D)

Figure 1. Construction and LC-MS analysis of the *ctcB* disruption mutant LJIA02. A: construction of the *ctcB* disruption mutant LJIA02. The 0.68 kb region in chromosome was replaced by 1.39 kb *aadA* gene. B: PCR confirmation of the *ctcB* disruption mutant LJIA02. M, 1 kb DNA ladder; lane 1-3, double crossover recombinant; lane 4, wild-type strain. C: HPLC analysis of the fermentation extracts of $\Delta ctcB$, wild type (*Streptomyces aureofaciens* F3), standard. D: validation of tetracycline and chlortetracycline from the fermentation extracts by mass spectrum analysis.

1.3 链霉菌发酵、发酵产物的HPLC与LC-MS检测

以TSBY培养基^[13]为种子培养基, 将野生型菌株和突变株LJIA02接种并于30 °C摇床培养24 h。将其转接至发酵培养基中, 于30 °C摇床培养5 d。发酵液用固体草酸酸化使pH值到1.2–1.4, 然后在5000 r/min条件下离心10 min, 收集的上清用0.22 μm 滤膜过滤得提取液。利用高效液相色谱(HPLC)对发酵提取液进行检测, 流动相A相为0.02 mol/L草酸

和0.01 mol/L三乙胺, B相为乙腈。检测程序如下: 0–40 min, B相20%等度洗脱。流速: 0.6 mL/min; 检测波长: 360 nm; 柱温: 25 °C。

液质[LC-MS(n)]分析是在正离子模式下进行, 喷雾器压力为30 Psi, 干燥气流为10 L/min, 干燥气温为325 °C, 分子量扫描范围为200至700, 多级质谱断裂分析轰击电压在1.0–1.5 V之间。流动相A相为0.01 mol/L甲酸, B相为乙腈。检测程序如下: 0–30 min, B相20%等度洗脱; 20–50 min,

B相20%–40%梯度洗脱。流速：0.3 mL/min；检测波长：360 nm，柱温：25 °C。

1.4 链霉菌总RNA的提取与反转录PCR

将野生型菌株和突变株LJIA02的等量孢子接种于TSBY培养基并于30 °C摇床培养24 h。选取等量菌丝体，将其转接至发酵培养基中，于30 °C摇床培养48 h。使用Total RNA Isolation Kit进行RNA提取，再用DNase I消化残留的基因组DNA，并通过PCR验证其无残留，并用Nanodrop定量且参考 OD_{260}/OD_{280} 分析RNA质量。随后进行PCR反转录，加入模板RNA 10 ng，随机六聚体引物1 μ L，加入DEPC处理的水至12 μ L，充分混匀后，置于PCR仪上65 °C反应5 min，立即置于冰浴上。随后加入1 μ L RNase抑制剂，4 μ L 5 \times Buffer，2 μ L 10 mmol/L dNTPs混合物，1 μ L逆转录酶，充分混匀后进行PCR，程序设置为25 °C 5 min，42 °C 60 min，72 °C 5 min。

1.5 金霉素生物合成基因共转录单元的确证

在2个相邻同转录方向的基因间隔区域设计引物，即正向引物在上游基因终止密码子的上游200 bp内设计，反向引物在下游基因起始密码子

起200 bp内设计引物。若2个基因同属一转录单元，则转录后位于同一mRNA上，可在RT-PCR反应中扩增到条带，反之则无。金霉素生物合成基因簇内部相邻同向基因存在序列交叉重叠，则判断为同一转录单元，无交叉重叠情况，设计10对引物进行PCR验证(表1)。

1.6 金霉素生物合成基因转录水平检测

荧光相对定量Real-time PCR法，是指在不同样本中某目标基因相对于参照基因的数量变化。相对定量的具体计算方法是比较 C_t 值法， C_t 值是每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数。利用公式(1)计算出样品组目标基因相对变化量。

$$\Delta \Delta C_t = (C_{t \text{ 目标基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})_{\text{样品组}} - (C_{t \text{ 目标基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})_{\text{参照组}} \quad \text{公式(1)}$$

在7个目标基因和内参基因*hrdB*内部分别设计1对引物(表2)，反应体系为12.5 μ L MaximaTM SYBR Green/ROX qPCR Maxter Mix，0.6 μ L cDNA模板，2条引物各7.5 pmol，DEPC处理的水补足至25 μ L。使用ABI 7500 Fast，循环条件为50 °C 2 min；95 °C 10 min；95 °C 15 s，60 °C 1 min，40个循环。

表1. 用于确定金霉素生物合成基因转录单元的PCR引物

Table 1. Primers used for RT-PCR of transcript assay of the chlortetracycline biosynthetic gene cluster

Primers	Gene tested	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
ctcFG-RT	<i>ctcF-ctcG</i>	CCCCAGCTCCTCGCGCTCGACGTG	GACCACCGAGGAGGACGTGCTCTC
ctcHI-RT	<i>ctcH-ctcI</i>	GGCCTGGTGCTCGCCAAGACCTAC	GCCTCCAGCGCGGCGTGGTCGAGC
ctcIJ-RT	<i>ctcI-ctcJ</i>	GCGGCGAGGGCGTCGACCCGGCCG	TCCCACTCGGCGGTCTCCACGTAC
ctcJK-RT	<i>ctcJ-ctcK</i>	GTACGTGGAGACCGCCGAGTGGGA	GGCCCGGGCCAGCTCGGCCGCGCC
ctcNO-RT	<i>ctcN-ctcO</i>	TCGCCGCTGGCCGCCTGGGCGGAC	AGCCGGTGCTGGACGCCAGTTTCG
ctcOP-RT	<i>ctcO-ctcP</i>	GCGACCCGGAGGTCCTGCTGCAGC	GAAGCGGGGGTGGTGGGCACCGTC
ctcQR-RT	<i>ctcQ-ctcR</i>	CAGGGGCGGGCCTTGAGACGCT	CCGACCCGGACGAGGCCGTGCGCC
ctcUV-RT	<i>ctcU-ctcV</i>	TGCCGCGCTCGCGCTCGATGGTGT	CGCGCTGCTCTCCCTGCGGGACGG
ctcZ1-RT	<i>ctcZ-ctc1</i>	CAGGGCCAGCAGGGCGATCACCAG	TGCTCGGCGACCTGCTGATGGGGC
ctc12-RT	<i>ctc1-ctc2</i>	CGACGGCGGTGAAGATGGCCTGCT	CGCGCTCTCGGTCCGCATCTCGCT

表2. 荧光定量PCR使用的引物
Table 2. Primers used for quantitative real-time PCR

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
ctcG-RT	ACGTCGCCCTGGTGACCGGGGCGA	GACCGTGCTCACGTCTCGCGGGA
ctcH-RT	ACCACCGACGCAACGAGGAGGCC	GGCGCCCTGCTCGATCGCCGCGCG
ctcM-RT	CCGCCTACCTGGCCTCGCAGCCGC	CACGATGTCGTCCACCACCAGTGA
ctcN-RT	CGGGAGCGGGGCCGACCGGCCTGA	GTTGCCGCCCTGCAGCACGCCCGC
ctcQ-RT	TGCCGCTGGACCTGGCCCCGGCC	CAGCACCCGGCTGTCGCGGTTGAT
ctcW-RT	GCCGGCGCGTGGTGGTCACCGGA	ACGGATCTGACGCTGCGTCAATCC
ctcX-RT	GCGTGGTCGGCGCGGCCCGGCCG	GTCGTGCTCGACGGCGCCGTGCGC
hrdB-RT	CGCTCCCGCCGAGATCGCCGATT	CGCGGCACTGACCATCAGTGTCAC

2 结果和分析

2.1 *ctcB*基因敲除突变株的构建和发酵产物分析

对金霉素生物合成基因*ctcB*进行同源序列比对分析,发现它编码的蛋白与3个四环素类抗生素生物合成基因簇内的调控蛋白同源性较高,包括大器环素生物合成基因簇内的DacT1(57% identity)^[11]、SF2575生物合成基因簇内的SsfT1(51% identity)^[14]、土霉素生物合成基因簇内的OtcR(46% identity)^[15]。序列分析表明,CtcB具有N端的OmpR类型DNA结合结构域和C端的BTAD细菌转录激活结构域^[16],属于链霉菌抗生素调控蛋白家族(*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins, SARP)^[17]。为了确认*ctcB*基因的功能,利用大肠杆菌、链霉菌的属间接转移和同源重组双交换的方法,构建了*ctcB*基因敲除突变株LJIA02。将野生型和获得的突变株LJIA02,用金霉素发酵培养基进行发酵培养,30 °C培养5 d后,发酵液酸化后用于HPLC与LC-MS分析。从HPLC检测结果(图1-C)中可以看出,野生型11.7 min处的色谱峰与四环素(TC)标准品一致,22.5 min处的峰与金霉素(CTC)标准品一致,2个色谱峰的特征吸收光谱也与标准品一致。而突变株LJIA02在11.7 min和22.5 min处均无明显色谱峰。随后,通过LC-MS进一步检测了在11.7 min和22.5 min是否

有痕量四环素和金霉素产生(图1-D),发现野生型菌株的发酵产物与标准品在这2个出峰位置具有一致的四环素(445.4 *m/z* [M+H]⁺)和金霉素(479.6 *m/z* [M+H]⁺)质谱峰,而突变株LJIA02没有检测到相同*m/z*值的一级质谱峰,对应同*m/z*值的二级质谱碎片峰也没有检测到。这些结果确定了*ctcB*基因缺失菌株失去了产生四环素与金霉素的能力,暗示*ctcB*基因对金霉素生物合成基因簇起正调控激活作用,为金霉素生物合成必需基因。

2.2 金霉素生物合成基因共转录单元的确证

为了确定*ctcB*基因对金霉素生物合成的调控作用,对其生物合成基因的共转录单元进行了确证。分析金霉素生物合成基因簇,发现基因转录方向一致且首尾相连的基因共有8组(即可能的共转录单元有8个):包括*ctcG-D*、*ctcH-K*、*ctcM-L*、*ctcN-P*、*ctcR-Q*、*ctcT-W*、*ctcX-Y*和*ctc2-Z*(图2-A)。其中可能形成的基因间隔有16个,但发现因为相邻2个基因交叉重叠而并不存在的间隔区有6个,这6个假间隔区前后的2个基因应该属于同一转录单元。因此,为了判断前后基因是否属于同一转录单元,需要在跨相邻基因间隔区设计引物,对剩下的10个基因间隔区进行RT-PCR反应,属于不同转录单元的基因会转录到不同的RNA链上,则无法获得扩增产物。根据前期发酵实验,发现金

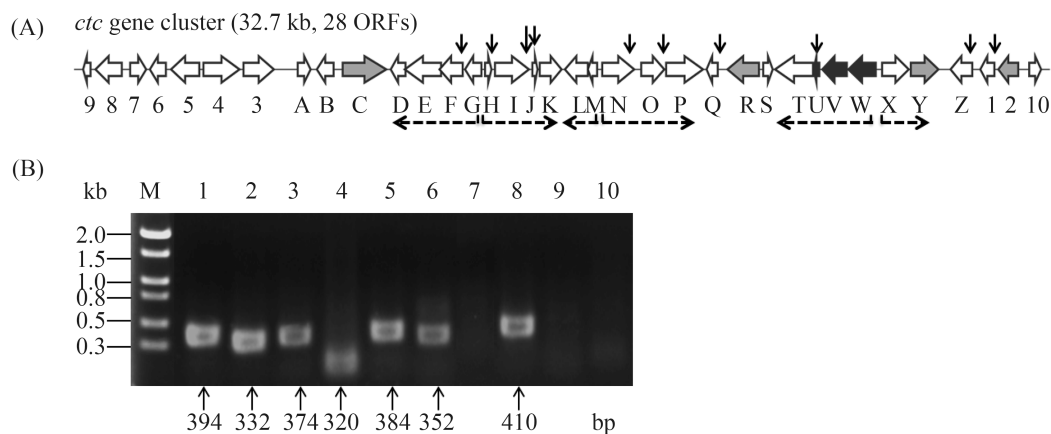


图 2. 金霉素生物合成基因簇(A)和相邻基因共转录分析(B)

Figure 2. Organization of the gene cluster for chlortetracycline biosynthesis and verification of the operons in chlortetracycline biosynthetic gene cluster. A: organization of the gene cluster for chlortetracycline biosynthesis, in which mini-PKS genes (black) and resistance genes (gray) are highlighted. The vertical solid arrows show the intervals between the adjacent genes without overlap. The horizontal dashed arrows indicate the different mRNAs transcribed by specific transcription units. B: PCR confirmation of the amplicons fragments (300–400 bp) on an ethidium bromide-dyed agarose gel. The amplicons were designed to covering of the adjacent genes. M, 1 kb DNA ladder; lane 1, *ctcF-ctcG*; lane 2, *ctcH-ctcI*; lane 3, *ctcI-ctcJ*; lane 4, *ctcJ-ctcK*; lane 5, *ctcN-ctcO*; lane 6, *ctcO-ctcP*; lane 7, *ctcQ-ctcR*; lane 8, *ctcU-ctcV*; lane 9, *ctcZ-ctc1*; lane 10, *ctc1-ctc2*. RT-PCR bands indicate that most genes are transcribed from the same mRNA.

色链霉菌在发酵48 h时生长良好且产生了金霉素, 因此选取发酵48 h的菌体提取RNA, 进行cDNA合成和PCR。根据实验电泳结果(图2-B)显示的相邻基因的共转录关系, 金霉素生物合成基因簇的共转录单元共有6个(图2-A), 分别是*ctcG-D*, *ctcH-K*, *ctcM-L*, *ctcN-P*, *ctcT-W*, *ctcX-Y*。

2.3 *ctcB*基因缺失突变株LJIA02和野生型菌株中金霉素生物合成基因转录水平检测

在确定共转录单元基础上, 选取6个转录单元中的第一个基因, 以及单独转录的*ctcQ*作为检测对象, 共设计了7对引物, 分别对野生型菌株和突变株LJIA02的*ctcG*、*ctcH*、*ctcM*、*ctcN*、*ctcQ*、*ctcW*和*ctcX*进行荧光定量RT-PCR。内参基因选择在不同样品中有稳定转录表达量的sigma因子*hrdB*^[18]基因。根据 $\Delta\Delta C_t$ 计算公式, 在突变株LJIA02中目标基因按照系统算法测得的数值大于2.0或者低于0.5, 即判断该基因的转录被显著的增

强或者抑制。荧光定量RT-PCR结果显示(图3), 突变株内不同功能的基因转录水平受到影响不同, 发现对比野生型菌株, *ctcG-D*、*ctcH-K*、*ctcQ*、*ctcN-P*和*ctcT-W*的转录水平下降明显, 除*ctcH-K*约为野生型菌株的20%外, 其余均降低到野生型的10%以下, 最低为野生型的2%。转录水平下降基因涵盖了*ctcU-W*中合成碳链骨架的mini-PKS, *ctcG*中负责11位酮基还原为羟基的酮还原酶, *ctcD/F/H*形成四环素核心结构的环化酶/芳香化酶, *ctcO*负责加载C₄位氨基的双甲基的甲基转移酶等^[10], 而*ctcM-L*和*ctcX-Y*的转录水平与野生型菌株相当。金霉素生物合成基因簇内的6个共转录单元中的4个转录水平大幅度下降, 表明*ctcB*是金霉素生物合成的正调控基因。另外, 这些金霉素生物合成基因转录水平的降低也与*ctcB*基因缺失突变株LJIA02丧失金霉素和四环素生物合成能力具有对应关系。

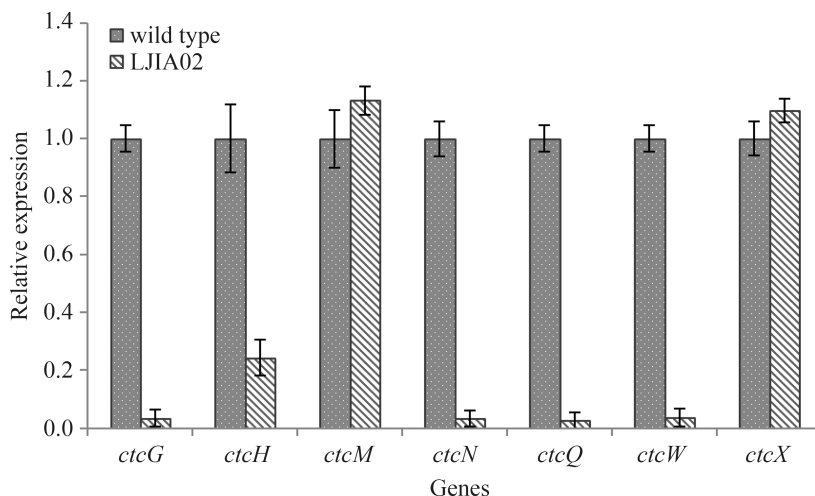


图 3. 金霉素生物合成基因转录水平检测

Figure 3. Transcriptional analysis of the chlortetracycline biosynthetic gene cluster in wild type and mutants LJA02 by quantitative realtime RT-PCR. The measurements of *ctcG*, *ctcH*, *ctcN*, *ctcQ*, *ctcW* gave values lower than 1.0 indicating that the mutants produced less mRNA than in the wild-type strain. Error bars were calculated from three independent experiments each of which was performed in duplicate.

3 讨论

本研究构建了 *ctcB* 基因缺失突变株 LJA02, 发现其丧失了四环素和金霉素的产生能力, 进一步通过荧光定量 RT-PCR, 确定了 *ctcB* 基因作为正调控基因, 调控金霉素生物合成基因的转录。同源比对分析显示 CtcB、DacT1、SsfT1 和 OtcR 是 SARP 家族蛋白, 系统进化树分析表明这 4 个 SARP 蛋白同属于一个小的分支(图 4)。SARP 家族蛋白作为转录激活因子, 大多存在于链霉菌中, 直接调控次级代谢产物生物合成基因的转录^[16], 只有少部分存在于 *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Thermobifida*, *Lechevalieria* 等放线菌中。SARP 家族蛋白的 DNA 结合区域一般具有明显的串联重复保守序列特征, 该串联重复序列与 -10 区距离 8 个碱基保证与 SARP 结合后, -10 区位于 DNA 上背向 SARP 的一侧, 留出空间使 RNA 聚合酶与其形成稳定的四聚体复合物; 重复序列间处在相距 11 个核苷酸的 2 个区域, 在 DNA 上处于双螺旋大沟同侧, 保证了 2 个 SARP 分子结合于 DNA 骨架的同

侧, 形成稳定的双体形态^[19-20]。因此, 我们考察了 *ctcB* 调控的 *ctcG-D*、*ctcH-K*、*ctcQ*、*ctcN-P* 和 *ctcT-W* 转录单元的 DNA 结合区域保守性。结果显示在图 5-A, 转录单元 *ctcG-D*、*ctcQ*、*ctcN-P* 和 *ctcT-W* 具有同样保守的串联重复序列。MeMe^[21] 软件比对分析表明一致性较好, 结合区域重复序列保守性较高(图 5-B), 这与 SARP 家族蛋白 OtcR^[15] 和 SanG^[22] 的 DNA 结合区域串联重复保守序列具有类似的特征。*ctcG-D*、*ctcQ*、*ctcN-P* 和 *ctcT-W* 基因前具有保守的串联重复序列, CtcB 与之结合激活这些基因的转录, 这与 *ctcB* 基因缺失突变株中荧光定量 RT-PCR 的实验结果是相吻合的。然而 *ctcH-K* 前并未找到该保守序列, 而是在推测的 -10 区前距离 8 个碱基的位置上有序列 GAACCCGGGGGACAGG, 可能正是该序列与保守序列之间的差异, 使 CtcB 与之结合作用减弱, 从而导致 *ctcH-K* 转录水平下降不如 *ctcG-D*、*ctcQ*、*ctcN-P* 和 *ctcT-W* 明显。以上 DNA 结合序列保守性分析, 进一步证实了 *ctcB* 是金霉素生物合成的正调控基因。为解析金霉素生物合成的调控

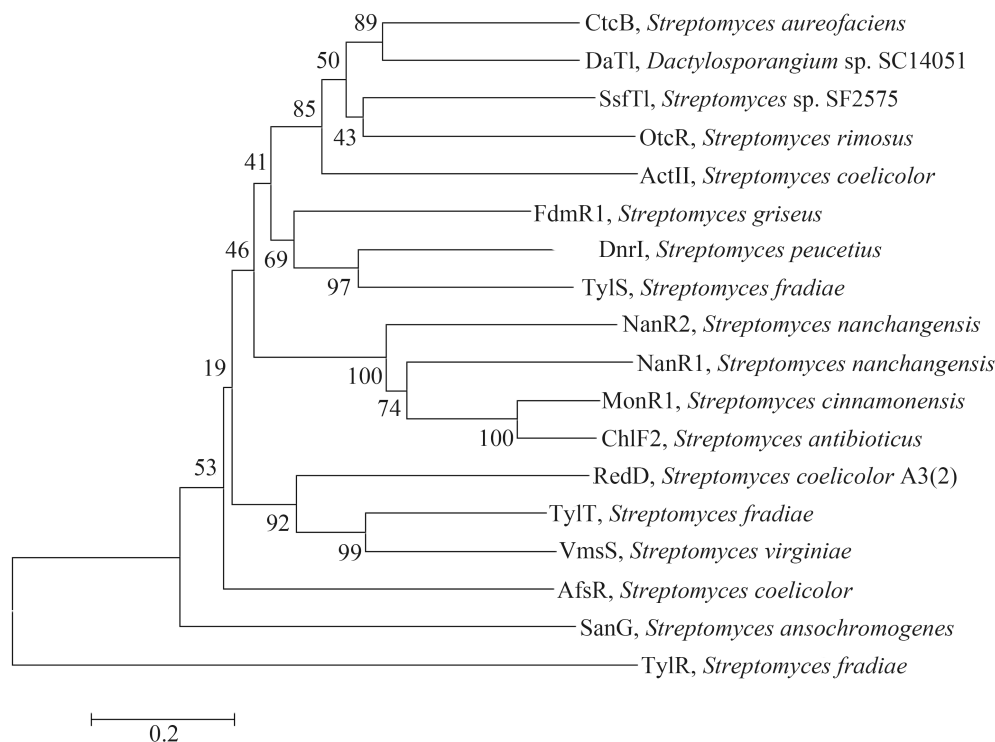


图 4. CtcB与SARP同源蛋白系统进化树分析

Figure 4. Phylogenetic analysis of CtcB with other members of SARPs. The neighbor-joining phylogenetic tree was constructed by using MEGA v5.0 with 500 bootstrap replicates. The scale 0.2 is the genetic distance. Accession number in NCBI: CtcB, AEI98645.1; DacT1, AFU65883.1; SsfT1, ADE34517.1; OtcR, AJO26937.1; ActII-ORF4, AAA26692.1; FdmR1, AAQ08934.1; DnrI, AAA26736.1; TylS, AGG68810.1; NanR2, AAP42854.1; NanR1, AAP42853.1; MonRI, AAO65809.1; ChIF2, AAZ77687.1; RedD, AAA88556.1; TylT, AGG68812.1; VmsS, WP_033220281.1; AfsR, BAA14186.1; SanG, AAV31783.1; TylR, AGG68811.1.



图 5. 金霉素生物合成基因簇的SARP结合区预测比对(A)和一致性分析(B)

Figure 5. The predicted SARP-binding sites of chlortetracycline biosynthetic gene cluster. A: the predicted SARP-binding consensus sequences of chlortetracycline biosynthetic gene cluster. The solid arrows mark the tandem repeat sequences identified in this study. Putative -10 regions are dashed underlined. B: analysis of the consensus SARP-binding sequences of the promoter regions from chlortetracycline biosynthetic gene cluster using MeMe. The solid arrows mark the tandem repeat sequences.

机制, 并通过加倍该基因提高金霉素的产量提供了理论基础。

参考文献

- [1] Duggar BM. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1948, 51(2): 177–181.
- [2] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(2): 232–260.
- [3] Zhanel GG, Homenuik K, Nichol K, Noreddin A, Vercaigne L, Embil J, Gin A, Karlowsky JA, Hoban DJ. The glycolcyclines. *Drugs*, 2004, 64(1): 63–88.
- [4] Brodersen DE, Clemons Jr WM, Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, 2000, 103(7): 1143–1154.
- [5] Nelson ML, Levy SB. The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011, 1241(1): 17–32.
- [6] McCormick JRD, Jensen ER, Miller PA, Doerschuk AP. The 6-Deoxytetracyclines. ¹ Further studies on the relationship between structure and antibacterial activity in the tetracycline series. *Journal of the American Chemical Society*, 1960, 82(13): 3381–3386.
- [7] Lein J, Sawmiller LF, Cheney LC. Chlorination inhibitors affecting the biosynthesis of tetracycline. *Applied Microbiology*, 1959, 7(3): 149–151.
- [8] Wang IK, Vining LC, Walter JA, McInnes AG. Use of carbon-13 in biosynthetic studies: origin of the malonyl coenzyme a incorporated into tetracycline by *Streptomyces aureofaciens*. *The Journal of Antibiotics*, 1986, 39(9): 1281–1287.
- [9] Dairi T, Nakano T, Aisaka K, Katsumata R, Hasegawa M. Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59(6): 1099–1106.
- [10] Zhu T, Cheng XQ, Liu YT, Deng ZX, You DL. Deciphering and engineering of the final step halogenase for improved chlortetracycline biosynthesis in industrial *Streptomyces aureofaciens*. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 69–78.
- [11] Zhang WJ, Ames BD, Tsai SC, Tang Y. Engineered biosynthesis of a novel amidated polyketide, using the malonamyl-specific initiation module from the oxytetracycline polyketide synthase. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2573–2580.
- [12] Wang P, Kim W, Pickens LB, Gao X, Tang Y. Heterologous expression and manipulation of three tetracycline biosynthetic pathways. *Angewandte Chemie*, 2012, 124(44): 11298–11302.
- [13] Kieser T, Bibb MJ, Butter MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich: John Innes Centre, 2000: 125–158.
- [14] Pickens LB, Kim W, Wang P, Zhou H, Watanabe K, Gomi S, Tang Y. Biochemical analysis of the biosynthetic pathway of an anticancer tetracycline SF2575. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(48): 17677–17689.
- [15] Yin SL, Wang WS, Wang XF, Zhu YX, Jia XL, Li SS, Yuan F, Zhang YX, Yang KQ. Identification of a cluster-situated activator of oxytetracycline biosynthesis and manipulation of its expression for improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus*. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 46.
- [16] 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.
- [17] Wietzorrek A, Bibb M. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Molecular Microbiology*, 1997, 25(6): 1181–1184.
- [18] Kormanec J, Farkašovsk M, Potůčková L. Four genes in *Streptomyces aureofaciens* containing a domain characteristic of principal sigma factors. *Gene*, 1992, 122(1): 63–70.
- [19] Chen YH, Wendt-Pienkowski E, Shen B. Identification and utility of FdmR1 as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein activator for fredericamycin production in *Streptomyces griseus* ATCC 49344 and heterologous hosts. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(16): 5587–5596.
- [20] Tanaka A, Takano Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. AfsR recruits RNA polymerase to the *afsS* promoter: a model for transcriptional activation by SARPs. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 369(2): 322–333.
- [21] Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren JY, Li WW, Noble WS. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S2):

W202-W208.
[22] Liu G, Tian YQ, Yang HH, Tan HR. A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in

Streptomyces ansochromogenes that also influences colony development. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(6): 1855–1866.

Function of *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins family transcriptional regulator *ctcB* in the biosynthetic cluster of chlortetracycline

Jia Liu¹, Tao Zhu¹, Pengfei Wang², Lingxin Kong¹, Songmei Wang¹, Yuntian Liu², Changxian Xie², Zixin Deng¹, Delin You^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

² Jinhe Biotechnology Co., Ltd., Hohhot 010200, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] In order to understand the regulatory mechanisms of chlortetracycline biosynthesis in an industrial strain, function of an *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins (SARP) family transcriptional regulator *ctcB* in the biosynthetic gene cluster of chlortetracycline was studied. [Methods] By double crossover recombination, we constructed *Streptomyces aureofaciens* F3 with disrupted SARP family transcriptional regulator *ctcB* gene. The amplicons of RT-PCR were designed to cover the adjacent genes for verification of the operons in chlortetracycline biosynthetic cluster. Transcriptional level was analyzed in the chlortetracycline biosynthetic gene cluster in the wild type strain and the *ctcB* gene disrupted mutant LJIA02 by quantitative real-time RT-PCR. [Results] The disruption mutant LJIA02 abolished tetracycline and chlortetracycline production. In RT-PCR six operons were confirmed in chlortetracycline biosynthetic cluster. Quantitative real-time RT-PCR indicated that *ctcB* directly activated five promoters from *ctcG-D*, *ctcH-K*, *ctcN-P*, *ctcW-T* and *ctcQ*. [Conclusion] CtcB is an essential activator as an SARP family transcriptional regulator in the chlortetracycline biosynthetic gene cluster.

Keywords: chlortetracycline, *Streptomyces* antibiotic regulatory proteins (SARP) family transcriptional regulator, gene disruption, biosynthesis

(本文责编: 张晓丽)

Support by the National Natural Science Foundation of China (31470183, 31400029) and by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB721004)

*Corresponding author. Tel: +86-21-62932943; E-mail: dlyou@sjtu.edu.cn

Received: 14 December 2015; Revised: 13 January 2016; Published online: 20 January 2016