



基于转录组分析的染色体大片段缺失及其对井冈霉素高产菌株的影响

芦晨阳^{1,2}, 吴杭³, 苏秀榕^{1*}, 白林泉²

¹ 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211

² 上海交通大学微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

³ 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230029

摘要:【目的】测试大片段删减低转录区域对菌体生长和井冈霉素产量的影响。【方法】通过转录组分析, 选择染色体上连续的基因低转录区域进行大片段缺失, 通过 Cre-loxP 位点特异性重组得到 1.2 Mb 片段缺失突变株 LCY-4。HPLC 检测缺失株井冈霉素产量的变化, 并测定干重绘制生长曲线。【结果】通过转录组分析, 我们在井冈霉素高产菌株 TL01 染色体左侧末端发现了 1.9 Mb 的连续基因低转录区, 使用 Cre-loxP 系统对其中的 1.2 Mb 区域进行大片段缺失, 成功得到了 1.2 Mb 缺失突变株 LCY-4。和出发菌株 TL01 相比, 缺失突变株 LCY-4 中井冈霉素发酵产量基本保持不变, 生物量有显著提高, 最高增幅达到 44%。【结论】1.2 Mb 区域的成功缺失, 意味着基于转录组分析寻找连续的基因低转录区域并加以缺失的策略的可行性。1.2 Mb 片段缺失对菌体生物量积累具有明显促进作用, 为后续将其开发成氨基环醇类药物异源表达的通用高产宿主奠定了基础。

关键词: 井冈霉素, 转录组, Cre-loxP 系统, 大片段缺失

农用抗生素井冈霉素属于 C₇N 氨基环醇类化合物, 可高效防治水稻纹枯病, 广泛应用于亚洲的水稻产区^[1]。同时, 井冈霉素生物合成中间产物可用于生产治疗 II 型糖尿病的药物阿卡波糖和伏格列波糖, 具有极高的经济价值^[2]。2005 年, 井冈霉素生物合成基因簇被克隆, 随后通过同位素标记、基因缺失和体外酶促等实验, 证明其合成前体是来

源于磷酸戊糖途径的 7-磷酸景天庚酮糖、UDP-葡萄糖和谷氨酸^[3-4]。2012 年, 井冈霉素野生型菌株吸水链霉菌井冈变种 5008 (*Streptomyces hygroscopicus* var. *jinggangensis* 5008) 及其衍生的高产菌株 TL01 (*S. hygroscopicus* var. *jinggangensis* TL01) 全基因组被测定, 通过多组学手段对井冈霉素高产机理进行了详尽的阐述^[4]。

基金项目: 国家自然科学基金(31070070)

*通信作者。Tel: +86-574-87608368; E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2016-10-04; 修回日期: 2016-12-02; 网络出版日期: 2016-12-30

5008 及其衍生的高产菌株 TL01 基因组大小分别为 10.1 Mb 和 9.84 Mb。与天蓝色链霉菌^[5](*S. coelicolor* 8.67 Mb)、阿维链霉菌^[6](*S. avermitilis* 9.03 Mb)、灰色链霉菌^[7](*S. griseus* 8.55 Mb)、棒状链霉菌^[8](*S. clavuligerus* 6.76 Mb)、白色链霉菌^[9](*S. albus* 8.38 Mb)相比, 井冈霉素产生菌具有较大的基因组规模, 这可能导致了一些能量、前体和还原力的浪费, 阻碍了抗生素产量的进一步提高。同时, 前期的实验证明, 大片段删减有利于减少前体、能量和还原力在复制、转录和翻译过程中的消耗, 同时可以降低基因组的复杂性, 提高菌株的发酵性能^[10-12]。但是, 针对全新的菌株, 目前尚缺乏有效的策略来精确确定可删减的大片段区域, 这限制了大片段删减技术的推广应用。

同源重组双交换技术是在链霉菌中使用最广泛的基因删减技术^[13-14], 但是在对大片段区域进行删减的过程中, 研究者发现其往往会导致不规则敲除现象的发生^[10]。同源臂长度的增加对降低不规则敲除现象出现的频率没有明显帮助。以 Cre-loxP 为代表的位点特异性重组系统可以很好地解决这一问题, 在酵母、植物、果蝇和哺乳动物遗传操作方面具有广泛的使用^[15-17]。Fedoryshyn 和 Lopatniuk 等研究者利用 Cre-loxP 系统在阿维链霉菌和加纳链霉菌中成功实现了大范围的基因组删减^[18-19]。

本研究中, 通过对井冈霉素野生型菌株 5008 及其衍生的高产菌株 TL01 的全局性转录谱分析, 我们发现在 TL01 染色体左侧末端存在 1.9 Mb 的连续基因低转录区域, 判断其可能是生长非必需区域。随后, 使用 Cre-loxP 特异性重组系统对该区域中 1.2 Mb 片段进行缺失, 考察了 1.2 Mb 片段缺失对井冈霉素产量和菌体生物量的影响, 并对突变株相关表型产生的机理进行了初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒及引物: 本研究所用的菌种、质粒及引物见表 1。

1.1.2 培养基: 大肠杆菌培养采用 LB (Luria-Bertani) 和 LA 培养基; 链霉菌培养采用 TSBY 液体培养基: 胰酪豆汤粉 30 g, 蔗糖 103 g, 酵母提取物 10 g, 蒸馏水 1000 mL; 黄豆饼粉浸汁琼脂(SFM): 黄豆饼粉 20 g, 甘露醇 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL; YMG 培养基: 酵母提取物 4 g, 麦芽提取物 10 g, 葡萄糖 4 g, 蒸馏水 1000 mL; 井冈霉素发酵培养基: 大米粉 95 g, 花生粉 18 g, K₂HPO₄ 0.7 g, NaCl 1.4 g, CaCO₃ 0.6 g, 蒸馏水 1000 mL^[22]。

1.1.3 主要试剂: 实验中所用抗生素购自 Sigma 公司; 连接酶和 KOD 高保真 DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司; PCR 产物回收试剂盒购自 Omega 公司; 限制性内切酶购自 Fermentas 公司; RNA 快速提取试剂盒购自赛百盛公司。

1.2 loxP 位点插入质粒构建

以 TL01 基因组 DNA 为模板, 用同源臂扩增引物扩增得到预测大小的同源臂片段。以 pJTU472 或者 SuperCos1 为模板, 用 loxP 片段引物扩增得到预测大小的 loxP+aac3(IV)或 neo+loxP 片段。三片段连接载体 pJTU1278 后得到的质粒验证正确即为 loxP 位点插入质粒。

1.3 Cre 蛋白表达质粒构建

以质粒 pUWLCRE 为模板, 使用 cre 基因扩增引物得到基因片段。此片段经 Nde I/EcoR I 酶切之后连接到载体 pJTU968, 随后将验证正确的质粒用 Mun I/EcoR I 双酶切处理, 将其中 1.2 kb 的片段连接到用 EcoR I 单酶切处理后的载体 pJTU1278, 得到目的质粒 pLQ102。

表 1. 本研究所用的菌株、质粒及引物
Table 1. Strains, plasmids and primers used in this study

Strains, plasmids and primers	Related characters and sequences	Sources
<i>S. hygroscopicus</i> var. <i>jinggangensis</i>		
5008	Wild-type producer of validamycin A	Shanghai Jiao Tong University
TL01	High-yielding producer of validamycin A	Zhejiang Tonglu Huifeng Biosciences Co., Ltd.
LCY-1	Replacement of 452,301-453,069-bp region with loxP+ <i>aac3(IV)</i> cassette in TL01 (Apr ^R)	This study
LCY-2	Replacement of 1,610,359-1,610,972-bp region with <i>neo</i> +loxP cassette in LCY-1 (Apr ^R Kan ^R)	This study
LCY-3	Over-expression of the plasmid pLQ102 carrying gene <i>cre</i> in LCY-2 (Apr ^R Kan ^R Thio ^R)	This study
LCY-4	Deletion of 1.2 Mb region in TL01 (Apr ^S Kan ^S Thio ^S)	This study
<i>E. coli</i>		
DH10B	F'(traΔ36 lacIq proAB lacZΔM15) rpsL (strR)thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dcm dam supE44 Δ(lac-proAB)Δ(mcrC-mrr)102::Tn10 (tetR)	GIBCO BRL
ET12567(pUZ8002)	<i>recE dcm- dam- hsdS Cm^r Tet^r Str^r Km^r</i>	[20]
Plasmids		
pBluescript II SK(+)	<i>Bla lacZ orif1</i>	Stratagene
pJTU1278	<i>Bla tsr lacZ oriT oripIJ101 oriColE1</i>	[21]
pUWLCRE	Plasmid with the gene <i>cre</i>	[18]
pLQ100	Construct with region (452,301-453,069 bp) replaced by loxP+ <i>aac3(IV)</i> cassette	This study
pLQ101	Construct with region (1,610,359-1,610,972 bp) replaced by <i>neo</i> +loxP cassette	This study
pLQ102	Plasmid pJTU1278 carrying gene <i>cre</i> under the control of <i>PerME*</i> promoter	This study
Primers		
	5'→3'	
loxP+ <i>aac3(IV)</i> -F- <i>Bgl</i> II	ATATAAGATCTATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTATGATATCGAATTCCTCCCAATGT (loxP site in bold)	
loxP+ <i>aac3(IV)</i> -R- <i>Hind</i> III	ATATAAAGCTTGCATGCCGGTCTGACTCTAGA	
Arm1-F- <i>Spe</i> I	ATATAACTAGTGGCGATGATGATGCTCTC3	
Arm1-R- <i>Bgl</i> II	ATATAAGATCTCAGCGACCAGATGAAGAC	
Arm2-F- <i>Hind</i> III	ATATAAAGCTTGCAGGTAAGTCTCGCTCTTGT	
Arm2-R- <i>Kpn</i> I	TCCTACGTCACCGTGTTG	
loxP-A-F	CTTGACAGCGTTGTGCGAG	
loxP-A-R	CGAAGTACAAGAGCGAGTA	
<i>neo</i> +loxP-F- <i>Bam</i> H I	ATATAGGATCCCACGCTGCCGCAAGCACTCA	
<i>neo</i> +loxP-R- <i>Hind</i> III	TATAAAGCTTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTCCCGCTCAGAAGAAGTCCG (loxP site in bold)	
Arm3-F- <i>Spe</i> I	ATATAACTAGTTGGAAGGTGATGTCGATGAG	
Arm3-R- <i>Bam</i> H I	ATATAGGATCCGCTCGGTCAAGACCAATCTC	

(待续)

续表 1

Arm4-F- <i>Hind</i> III	ATATAAATCTTTGGTCCATGTAGTCGTTGTA
Arm4-R- <i>Kpn</i> I	ATATAGGTACCGAGTTCTTCTCACGCCACTA
loxP-B-F	CACAGGACGGTCTTGATC
loxP-B-R	CTTCACAGGACTGAGTTACA
Cre-F- <i>Nde</i> I	ATATATCATATGTCCAACCTGCTGACCGT
Cre-R- <i>Eco</i> R I	ATATATGAATTCTCAGTCGCCGTCTTCCAGCA
Cre-RT-F	GGAAGAACCTGATGGACAT
Cre-RT-R	GGAGGTACAGGAGGTAGTC
loxP-C-F	TCTCCAGCAGCGAGTTGA
loxP-C-R	CGATTCTCCAGCATCCTTATG
SHJG0599-F	CCTACGACGGGTTGTGGGAACG
SHJG0599-R	GCAGCAGCATGTCGCGGAAGA
SHJG1058-F	GGTGGTCATCCCGTCCCTGTC
SHJG1058-R	CGAGGGTGCCGTGGAAGAAG
SHJG1338-F	ACCGGCTCGCCCTGTTGATG
SHJG1338-R	TGACGCTGATGCCGTA CTGACG

1.4 接合转移及突变株筛选

将 pLQ100 转入大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002) 中, 通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移导入井冈霉素高产菌株 TL01 中。16 h 后用含安普霉素和甲氧苄啶两种抗生素的无菌水覆盖, 待 SFM 平板吹干后, 倒置培养 3–4 d 可以观察到接合子。将接合转移子划线接种至含上述两种抗生素的 SFM 平板上 30 °C 培养。用验证引物验证接合转移子是单交换菌株后, 将正确的单交换菌株进行松弛培养, 收集孢子进行梯度稀释, 得到单菌落。随后用 PCR 扩增方法筛选得到双交换突变株。

1.5 *cre* 基因转录水平检测

在添加安普霉素、卡那霉素和硫链丝菌素的 YMG 培养基中培养 LCY-3 48 h 之后, 收集菌丝体抽提 RNA。将抽提的 RNA 用 DNase-I 消化 4 h 之后作为模板, 使用引物 cre-RT-F/cre-RT-R 进行 PCR 验证, 以确定基因组 DNA 消化干净。随后, 对 RNA 进行逆转录, 以得到的 cDNA 作为模板、

cre-RT-F/cre-RT-R 为引物进行 PCR 验证, 检测是否有 *cre* 基因转录产生的 RNA。

1.6 1.2 Mb 片段缺失突变株的筛选和验证

将同时携带 2 个 loxP 位点和 *cre* 基因的突变株在无抗 TSBY 培养基中转接 2 轮, 随后涂布在无抗的 SFM 培养基中进行松弛培养, 收集孢子进行梯度稀释, 得到单菌落。筛选对安普霉素和卡那霉素均敏感的单克隆, 使用验证引物进行验证, 正确即为 1.2 Mb 片段缺失突变株, 命名为 LCY-4。

1.7 井冈霉素发酵及含量检测

将得到的突变株 LCY-4 与出发菌株 TL01 在种子培养基 TSBY 中 30 °C、220 r/min 振荡培养 36–48 h 后, 按体积比 1 : 10 接入发酵培养基, 37 °C、220 r/min 振荡发酵 5 d。每隔 24 h 准确量取 1 mL 的发酵液, 采用高效液相色谱(HPLC)法测定, 操作如下: 将发酵液 12000 r/min 离心 15 min 取上清, 用 0.2 μm 一次性水相过滤器过滤, 过滤后的样品稀释 10 倍, 用 HPLC 检测井冈霉素产量。

所用仪器为安捷伦 1200 系列高效液相色谱仪, 色谱柱为 Agilent 公司的 ZORBAX SB-C₁₈ 柱(3.5 μm, 2.1×150 mm), 流动相为 98% 的 0.5 mmol/L 磷酸盐缓冲液和 2% 甲醇, 流速为 0.1 mL/min, 柱温为室温, 检测波长为 210 nm。每针进样量为 5 μL, 检测时间为 15 min。根据标准曲线, 计算出井冈霉素产量。

1.8 菌体干重测定

菌体干重测定采用 YMG 培养基, 37 °C、220 r/min 振荡发酵 4 d, 每隔 24 h 准确量取 1 mL 的菌液放于已称重的离心管中, 8000 r/min 离心弃上清, 用无菌水清洗 1–2 遍, 以除去残留的培养基。将离心管放在 70 °C 烘箱中, 烘至恒重称量, 计算菌体干重。

2 结果和分析

2.1 基于转录谱分析, 确定井冈霉素产生菌中“非必需区域”

通过转录组芯片分析(Microarray analysis), 我们比较了井冈霉素产生菌野生型菌株 5008 及其衍生的高产菌株 TL01 在高产培养基条件下全局性的基因表达谱($P < 0.05$) (图 1)。从染色体左侧末端开始接近 1.9 Mb 的区域内, 只有井冈霉素合成基因簇和一个 II 型 PKS 生物合成基因簇是转录上

调, 其余都是转录下调的(图 1)。这种染色体上区域性的转录谱变化, 暗示着 TL01 上这段低转录区域可能是生长非必需的, 可以进行缺失来减少基因组规模、降低基因组复杂度。为了保留井冈霉素生物合成基因簇, 我们选择了图 1 所示 1.2 Mb 的区域进行后续的缺失实验。

2.2 利用 Cre-*loxP* 特异性重组完成 1.2 Mb 片段缺失

我们采用 Cre-*loxP* 特异性重组对大片段进行缺失(图 2)。具体流程如下: (1) 在 1.2 Mb 区域的左侧边界和右侧边界分别插入 *loxP*+*aac3(IV)* 和 *neo*+*loxP* 片段, 得到突变株 LCY-2; (2) 在 Cre 蛋白介导下, 2 个同向的 *loxP* 位点之间发生片段环出, 实现片段缺失, 突变株 LCY-4 中保留一个 *loxP* 位点。

2.2.1 *loxP*+*aac3(IV)* 片段定向插入 1.2 Mb 片段缺失边界左侧: 通过同源重组双交换的方式, 将 *loxP*+*aac3(IV)* 片段定向插入染色体 452 301–453 069 bp 位置, 得到的突变株命名为 LCY-1 (图 2)。利用验证引物 *loxP*-A-F/*loxP*-A-R 对双交换菌株的基因型进行 PCR 扩增验证。以高产菌株 TL01 的总 DNA 为模板, 扩增条带为 0.90 kb; 以缺失株 LCY-1 的总 DNA 为模板, 扩增条带为 1.60 kb, 与预测一致(图 3-A)。

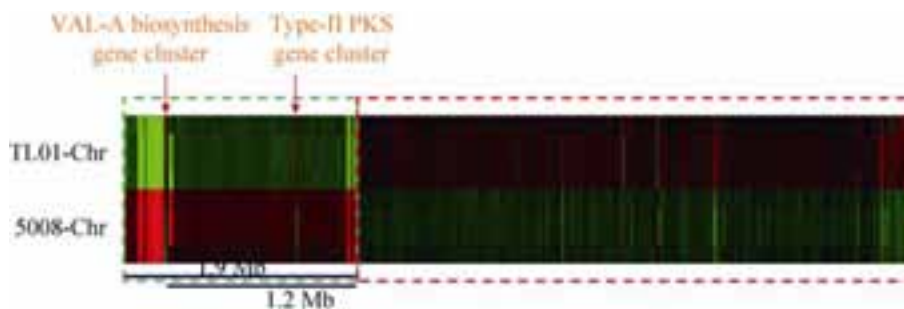


图 1. 在高产培养基条件下 5008 与 TL01 全局性的基因表达谱($P < 0.05$)

Figure 1. Global gene expression profiling of 5008 and TL01 in the high-yielding medium. $P < 0.05$.

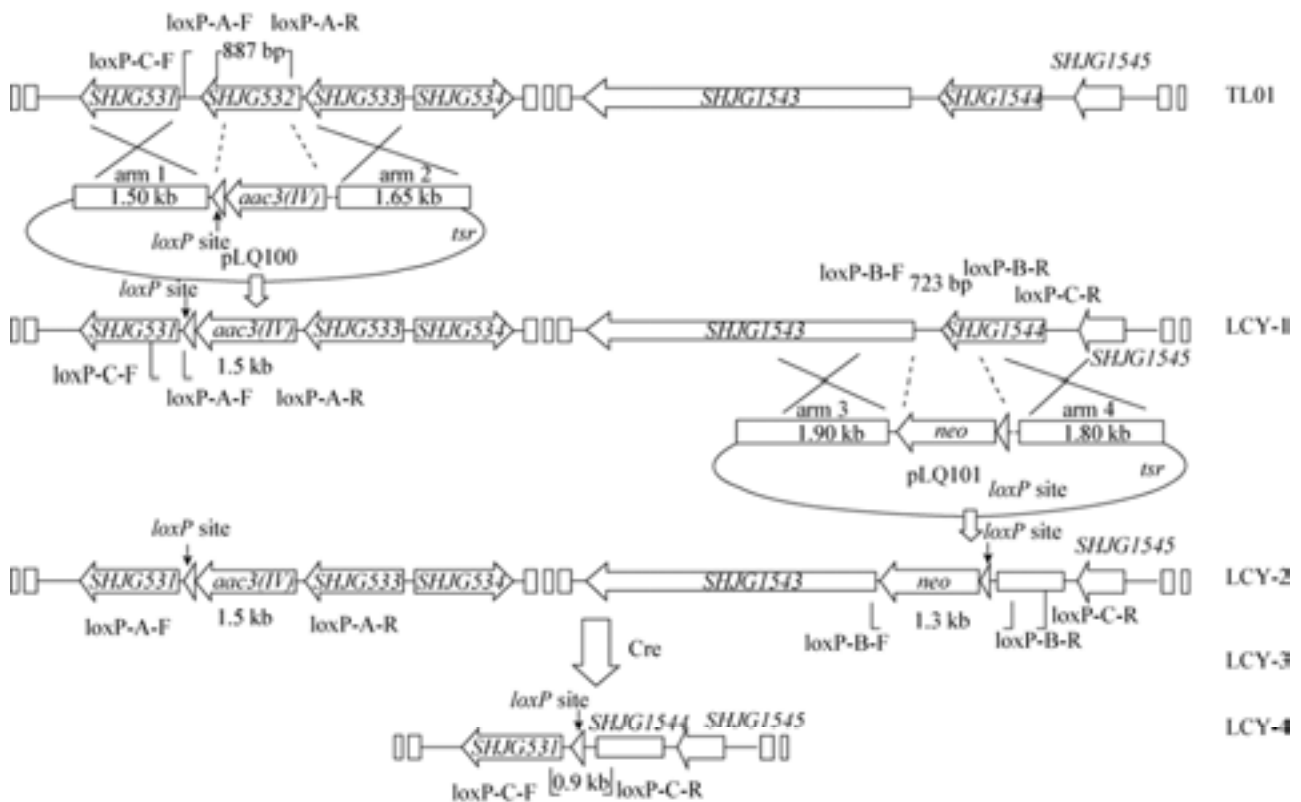


图 2. Cre-loxP 特异性重组系统敲除 1.2 Mb 片段区域的示意图

Figure 2. Schematic representation of the deletion of 1.2 Mb region via Cre-loxP system.

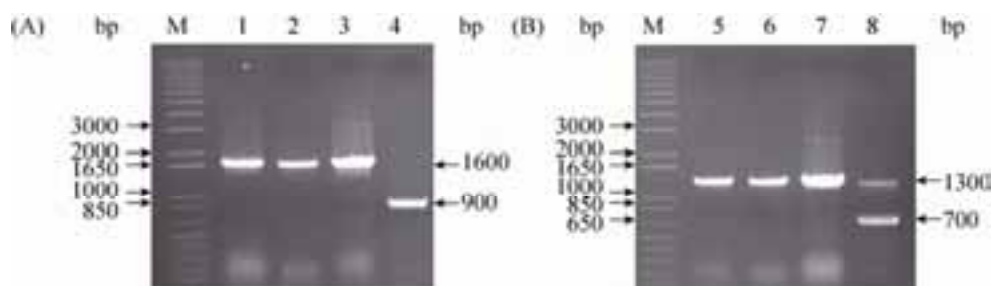


图 3. 两个同向 loxP 位点通过同源重组插入 1.2 Mb 片段边界

Figure 3. Schematic representation of the insertion of two loxP sites in the boundaries of 1.2 Mb region. A: confirmation of LCY-1 by PCR amplification; B: confirmation of LCY-2 by PCR amplification. M: 1 kb ladder DNA marker. Lane 1–2: PCR product with the genomic DNA of mutant LCY-1 as template and loxP-A-F/loxP-A-R as primers. Lane 3: PCR product with pLQ100 as template and loxP-A-F/loxP-A-R as primers. Lane 4: PCR product with the genomic DNA of strain TL01 as template and loxP-A-F/loxP-A-R as primers. Lane 5–6: PCR product with the genomic DNA of mutant LCY-2 as template and loxP-B-F/loxP-B-R as primers. Lane 7: PCR product with pLQ101 as template and loxP-B-F/loxP-B-R as primers. Lane 8: PCR product with the genomic DNA of strain TL01 as template and loxP-B-F/loxP-B-R as primers.

2.2.2 *neo+loxP* 片段定向插入 1.2 Mb 片段缺失边界右侧: 通过同源重组双交换的方式, 在突变株 LCY-1 的基础上, 将 *neo+loxP* 片段定向插入染色体 1610359-1610972 bp 位置, 得到的突变株命名为 LCY-2 (图 2)。利用验证引物 loxP-B-F/loxP-B-R 对双交换菌株的基因型进行 PCR 扩增验证。以高产菌株 TL01 的总 DNA 为模板, 扩增条带为 0.70 kb; 以缺失株 LCY-2 的总 DNA 为模板, 扩增条带为 1.30 kb, 与预测一致(图 3-B)。

2.2.3 *cre* 基因在 LCY-3 突变株中的表达: 为了检测突变株 LCY-3 中 *cre* 基因是否发生转录, 我们将 LCY-3 中提取的 RNA 样品进行 DNase I 消化之后作为模板, 使用引物 cre-RT-F/cre-RT-R 作为引物进行 PCR 扩增, 由于 DNA 聚合酶不能使用 RNA 作为模板, 因此无法得到 150 bp 的目标条带。之后以 RNA 逆转录得到的 cDNA 作为模板, 使用 cre-RT-F/cre-RT-R 作为引物进行 PCR 扩增, 得到 150 bp 的目标条带(图 4-A), 说明在突变株 LCY-3 中 *cre* 基因已经转录。

2.2.4 1.2 Mb 缺失突变株 LCY-4 的筛选和验证: 首先, 利用验证引物 loxP-C-F/loxP-C-R 对突变株进行 PCR 扩增验证(图 2)。以高产菌株 TL01 的总 DNA 为模板, 由于目标条带太大(约 1.16 Mb), 无法得到目标条带; 以突变株 LCY-4 的总 DNA 为模板, 扩增条带 0.90 kb (图 4-B)。对 0.90 kb 片段进行了测序和序列分析, 发现这一段序列主要包含: 同源臂 1 (arm 1) 序列, *Bgl* II 酶切位点, *loxP* 位点, *EcoR* V 酶切位点和同源臂 4 (arm 4) 序列, 测序结果和理论预测一致。同时, 在缺失区域中随机选择 3 个基因(*SHJG0599*、*SHJG1058* 和 *SHJG1338*), 设计内部引物进行 PCR, 以高产菌株 TL01 的总 DNA 为模板, 扩增条带分别为 0.45、0.40 和 0.45 kb; 以缺失株 LCY-4 的总 DNA 为模板, 由于此区域

已经被缺失, 均无法扩增到目标条带, 与预测一致(图 4-D)。

2.3 1.2 Mb 片段缺失突变株 LCY-4 的发酵表型

2.3.1 1.2 Mb 片段缺失不影响井冈霉素产量: 使用 Cre-*loxP* 特异性重组系统, 顺利获得了 1.2 Mb 片段缺失的突变株 LCY-4。将出发菌株 TL01 和 LCY-4 的 3 个平行株在相同条件下进行发酵, 每组 4 个重复。和出发菌株相比, 1.2 Mb 缺失突变株 LCY-4 产素曲线没有明显变化, 1.2 Mb 片段缺失对井冈霉素产量提高没有促进作用(图 5-A)。

2.3.2 1.2 Mb 片段缺失促进菌体生物量积累: 我们测定了出发菌株 TL01 和突变株 LCY-4 的生长曲线并进行比较, 突变株 LCY-4 的生物量在发酵前 24 h 内有大幅度的提升, 相比于出发菌株 TL01 上升了近 44%, 在 48 h 达到峰值, 较出发菌株增加了 26%。之后生物量在 72 h 趋近于出发菌株, 但是随着发酵过程的进一步进行, 在发酵 96 h 时突变株 LCY-4 的生物量重新回到高位, 较出发菌株增加 24% (图 5-B)。

3 讨论

随着全基因组测序的发展, 越来越多的链霉菌基因组信息被获取。由于基因组删减可以节约前体、能量和还原力, 降低基因组的复杂度, 因此在基因组改造中占有重要的位置^[9,23]。已报道的基因组删减策略主要集中在次级代谢产物生物合成基因簇敲除方面, 通过对竞争基因簇的缺失来重新导向前体代谢流, 促进目标产物的产量提高^[9, 23-24]。但是对于基因组其他位置, 如何有效界定非生长必需区域仍然是一个问题。在本文中, 我们利用转录组的手段来寻找染色体上的连续基因低转录区域, 考虑到连续的低转录区域(沉默区域)

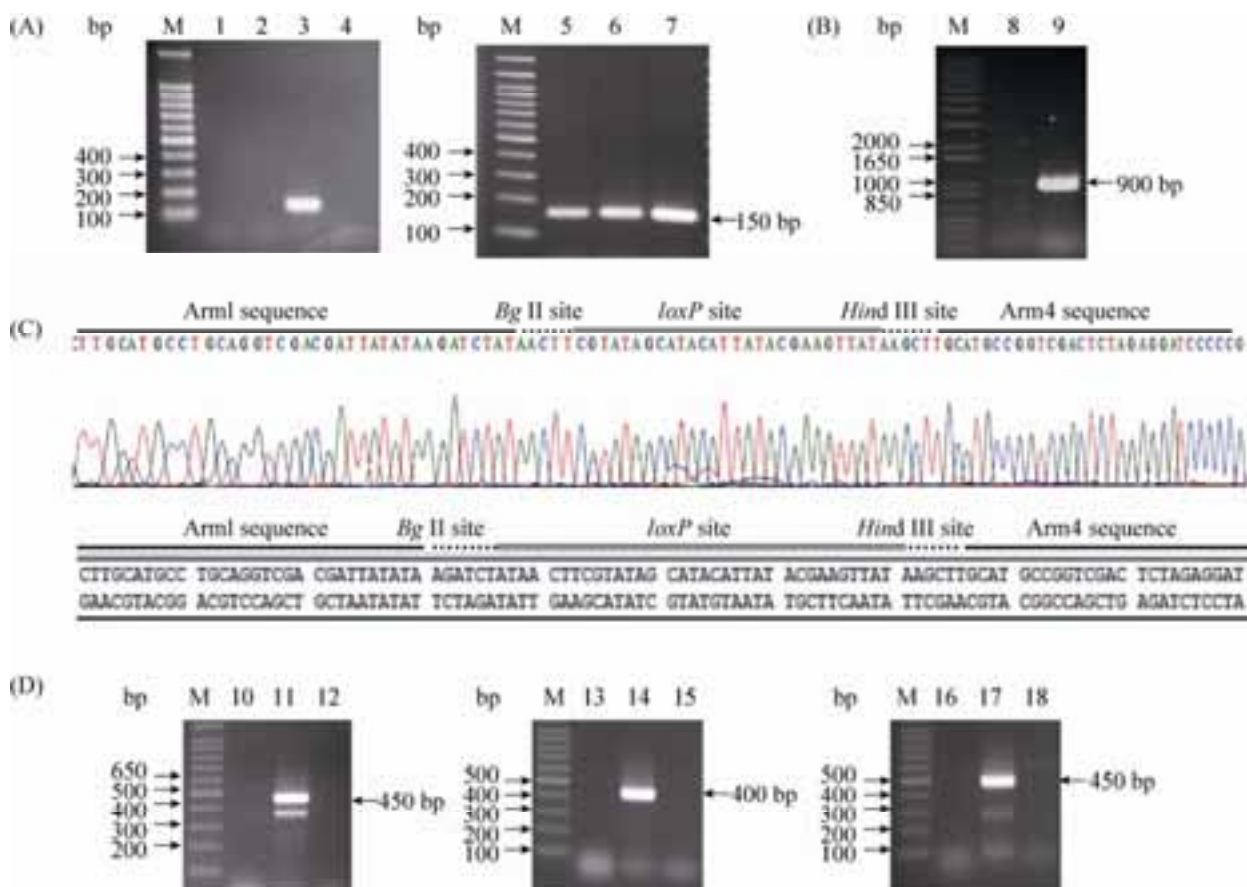


图 4. 1.2 Mb 片段缺失突变株筛选验证

Figure 4. Confirmation of mutant LCY-4 with 1.2 Mb region deletion. A: expression of gene *cre* via reverse-transcription PCR (RT-PCR); B: confirmation of LCY-4 by PCR amplification using primers *loxP*-C-F/*loxP*-C-R; C: sequencing and data analysis of PCR products; D: confirmation of LCY-4 by PCR amplification using primers designed in the 1.2 Mb large region. M: 1 kb ladder DNA marker. Lane 1–2: PCR product with the DNase I-digested RNA of mutant LCY-3 as template and *cre*-RT-F/*cre*-RT-R as primers. Lane 3 and 7: PCR product with pLQ102 as template and *cre*-RT-F/*cre*-RT-R as primers. Lane 4: PCR product with the genomic DNA of strain TL01 as template and *cre*-RT-F/*cre*-RT-R as primers. Lane 5–6: PCR product with the cDNA of mutant LCY-3 as template and *cre*-RT-F/*cre*-RT-R as primers. Lane 8: PCR product with the genomic DNA of strain TL01 as template and *loxP*-C-F/*loxP*-C-R as primers. Lane 9: PCR product with the genomic DNA of mutant LCY-4 as template and *loxP*-C-F/*loxP*-C-R as primers. Lane 10: PCR product with the genomic DNA of mutant LCY-4 as template and SHJG0599-C-F/SHJG0599-C-R as primers. Lane 11: PCR product with the genomic DNA of strain TL01 as template and SHJG0599-C-F/SHJG0599-C-R as primers. Lane 12: PCR product with the water as template and SHJG0599-C-F/SHJG0599-C-R as primers. Lane 13: PCR product with the genomic DNA of mutant LCY-4 as template and SHJG1058-C-F/SHJG1058-C-R as primers. Lane 14: PCR product with the genomic DNA of strain TL01 as template and SHJG1058-C-F/SHJG1058-C-R as primers. Lane 15: PCR product with the water as template and SHJG1058-C-F/SHJG1058-C-R as primers. Lane 16: PCR product with the genomic DNA of mutant LCY-4 as template and SHJG1338-C-F/SHJG1338-C-R as primers. Lane 17: PCR product with the genomic DNA of strain TL01 as template and SHJG1338-C-F/R as primers. Lane 18: PCR product with the water as template and SHJG1338-C-F/SHJG1338-C-R as primers.

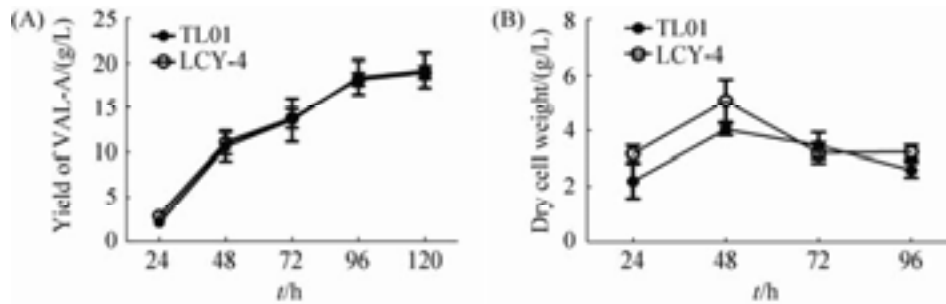


图 5. 1.2 Mb 片段缺失对井冈霉素产量和菌体生物量的影响

Figure 5. Effects of 1.2 Mb region deletion on validamycin A production and cell growth. A: validamycin A production of TL01 and LCY-4; B: dry cell weight of TL01 and LCY-4.

低效率参与转录、翻译及其他生化过程，但其在 DNA 复制过程中仍需要消耗大量的物质和能量，因此将其作为基因组删减的目标^[25-26]。通过转录组芯片技术，我们发现在染色体左侧末端的 1.9 Mb 区域均为低转录区域，对其中井冈霉素生物合成基因簇右侧的 1.2 Mb 区域进行了缺失，成功得到了 1.2 Mb 缺失突变株 LCY-4，证明了“基于转录组数据分析确定非生长必需区域”策略的可行性。

使用 Cre-loxP 系统可以非常高效精准地进行大片段缺失，但是缺失突变株中会残留一个 loxP 位点，对于后续采用该方法多个大片段的连续删减存在影响，可以采用 Cre 蛋白识别的突变 loxP 组合来克服该问题，重组完成之后残留的序列不被 Cre 蛋白识别^[27]。

和出发菌株 TL01 相比，1.2 Mb 片段缺失突变株在井冈霉素的产量上没有变化，但是生物量整体呈现增加的趋势。之所以井冈霉素产量没有增加，我们分析可能有以下几个原因：(1) 大片段删减后节约的能量、前体和还原力被用于生物量的积累，没有被井冈霉素生物合成途径有效利用；(2) 突变株 LCY-4 的发酵潜力在原高产培养基中无法体现，需要针对菌株特点重新设计优化培养基配方^[28-29]；(3) 高产菌 TL01 的井冈霉素产量已高达 18–20 g/L，此时能量、前体、还原力的供应

已不是其产量进一步提高的限制因子，尚存在其他限速因子^[22]。

虽然 1.2 Mb 片段缺失突变株 LCY-4 没有促进井冈霉素产量的进一步增加，但其仍不失为一种优良的异源表达宿主，特别是大片段缺失之后菌株生物量明显增加，这符合现代发酵工艺对次级代谢产物生产菌株的要求^[30-31]。此外，TL01 和 LCY-4 中井冈霉素产量可以达到 18–20 g/L，而游动放线菌 SE50/110 (*Actinoplanes* sp. SE50/110) 中阿卡波糖产量为 2–3 g/L，井冈霉素和阿卡波糖生物合成过程中共享部分的前体，因此后续可以考虑将此突变株开发成阿卡波糖等氨基环醇类抗生素的异源表达通用宿主。

参 考 文 献

- [1] Iwasa T, Higashide E, Shibata M. Studies of validamycins, new antibiotics. 3. Bioassay methods for the determination of validamycin. *The Journal of Antibiotics*, 1971, 24(2): 114–118.
- [2] Mahmud T, Lee S, Floss HG. The biosynthesis of acarbose and validamycin. *The Chemical Record*, 2001, 1(4): 300–310.
- [3] Bai LQ, Li L, Xu H, Minagawa K, Yu Y, Zhang YR, Zhou XF, Floss HG, Mahmud T, Deng ZX. Functional analysis of the validamycin biosynthetic gene cluster and engineered production of validoxylamine A. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(4): 387–397.
- [4] Wu H, Qu S, Lu CY, Zheng HJ, Zhou XF, Bai LQ, Deng ZX. Genomic and transcriptomic insights into the thermo-regulated biosynthesis of validamycin in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 337.

- [5] 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, Rabinowitsch 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.
- [6] Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Ōmura S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(5): 526–531.
- [7] Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(11): 4050–4060.
- [8] Song JY, Jeong H, Yu DS, Fischbach MA, Park HS, Kim JJ, Seo JS, Jensen SE, Oh TK, Lee KJ, Kim JF. Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(23): 6317–6318.
- [9] Lu CY, Zhang XJ, Ming J, Bai LQ. Enhanced salinomycin production by adjusting the supply of polyketide extender units in *Streptomyces albus*. *Metabolic Engineering*, 2016, 35: 129–137.
- [10] Komatsu M, Uchiyama T, Ōmura S, Cane DE, Ikeda H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(6): 2646–2651.
- [11] Liu ZQ, Xie YL, Zhang X, Hu XF, Li YS, Ding XZ, Xia LQ, Hu SB. Efficient construction of large genomic deletion in *Agrobacterium tumefaciens* by combination of Cre/loxP system and triple recombineering. *Current Microbiology*, 2016, 72(4): 465–472.
- [12] Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Müller U, Heijne W, Wu L, Alam MT, Ronning CM, Nierman WC, Bovenberg RAL, Breitling R, Takano E. The sequence of a 1.8 Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biology and Evolution*, 2010, 2: 212–224.
- [13] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, 244(4910): 1288–1292.
- [14] Yang XW, Model P, Heintz N. Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nature Biotechnology*, 1997, 15(9): 859–865.
- [15] Delneri D, Tomlin GC, Wixon JL, Hutter A, Sefton M, Louis EJ, Oliver SG. Exploring redundancy in the yeast genome: an improved strategy for use of the Cre-loxP system. *Gene*, 2000, 252(12): 127–135.
- [16] Li ZS, Xing AQ, Moon BP, Burgoyne SA, Guida AD, Liang HL, Lee C, Caster CS, Barton JE, Klein TM, Falco SC. A Cre/loxP-mediated self-activating gene excision system to produce marker gene free transgenic soybean plants. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65(3): 329–341.
- [17] Schwenk F, Baron U, Rajewsky K. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(24): 5080–5081.
- [18] Fedoryshyn M, Welle E, Bechthold A, Luzhetskyy A. Functional expression of the Cre recombinase in actinomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(6): 1065–1070.
- [19] Lopatniuk M, Ostash B, Makitrynsky R, Walker S, Luzhetskyy A, Fedorenko V. Testing the utility of site-specific recombinases for manipulations of genome of moenomycin producer *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672. *Journal of Applied Genetics*, 2015, 56(4): 547–550.
- [20] Paget MSB, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor ζ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 204–211.
- [21] He YL, Wang ZJ, Bai LQ, Liang JD, Zhou XF, Deng ZX. Two pHZ1358-derivative vectors for efficient gene knockout in *Streptomyces*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(4): 678–682.
- [22] Zhou X, Wu H, Li Z, Zhou XF, Bai LQ, Deng ZX. Over-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase increases validamycin A but decreases validoxyamine A production in *Streptomyces hygroscopicus* var. *jinggangensis* 5008. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(6): 768–776.
- [23] Wei X, Liang YX, Zheng YH. Enhancement and selective production of oligomycin through inactivation of avermectin's starter unit in *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(12): 911–916.
- [24] Schwientek P, Szczepanowski R, Rückert C, Kalinowski J, Klein A, Selber K, Wehmeier UF, Stoye J, Pühler A. The

- complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110. *BMC Genomics*, 2012, 13: 112.
- [25] Beacham IR. Silent genes in prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters*, 1987, 46(4): 409–417.
- [26] Cornish-Bowden A, Cardenas ML. Silent genes given voice. *Nature*, 2001, 409(6820): 571.
- [27] Arakawa H, Lodygin D, Buerstedde J M. Mutant loxP vectors for selectable marker recycle and conditional knock-outs. *BMC Biotechnology*, 2001, 1: 7.
- [28] Choi SY, Si JP, Kim WJ, Yang JE, Lee H, Shin J, Sang YL. One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(4): 435–440.
- [29] Kim SY, Lee J, Sang YL. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(2): 416–421.
- [30] Yuan YL, Guo XN, Zhang BR, Liu SG. Breeding of a high-biomass, iron-enriched yeast strain and its fermentation conditions. *Industrial Microbiology*, 2004, 34(4): 29–33. (in Chinese)
袁玉兰, 郭雪娜, 张博润, 刘世贵. 高生物量富铁酵母菌的选育及其发酵条件的研究. *工业微生物*, 2004, 34(4): 29–33.
- [31] Zhao XL, Zhen YG, Wang LH, Yi XF. Aerobic fermentation culture medium of *Saccharomyces cerevisiae*. *China Brewing*, 2014, 33(7): 43–47. (in Chinese)
赵小丽, 甄玉国, 王兰惠, 易晓菲. 酿酒酵母有氧发酵培养基的研究. *中国酿造*, 2014, 33(7): 43–47.

Effect of transcriptome-based large region deletion on validamycin A overproduction by *Streptomyces hygroscopicus* var. *jinggangensis* TL01

Chenyang Lu^{1,2}, Hang Wu³, Xiurong Su^{1*}, Linqun Bai²

¹ School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang Province, China

² State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

³ School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230029, Anhui Province, China

Abstract: [Objective] The effect of continuous low-expression region on validamycin A titer and biomass was evaluated through gene deletion experiments. [Methods] The deletion boundaries of large chromosome region were identified *via* transcriptome analysis. Meanwhile, deletion mutant was obtained *via* Cre-loxP system, titer of validamycin A was detected by HPLC and, biomass was represented by dry cell weight. [Results] The 1.2 Mb large region identified *via* transcriptome analysis was successfully deleted by Cre-loxP system. In comparison with parent strain TL01, deletion of 1.2 Mb region increased the biomass by 44% and showed no effect on validamycin A titer. [Conclusion] The strategy developed here can be applied to identify deletion boundaries of large chromosome region, and mutant of 1.2 Mb region deletion showed potential as host for heterologous expression of aminocyclitol biosynthetic gene clusters.

Keywords: validamycin A, transcriptome, Cre-loxP system, large region deletion

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070070)

*Corresponding author. Tel: +86-574-87608368; suxiurong@nbu.edu.cn

Received: 4 October 2016; Revised: 2 December 2016; Published online: 30 December 2016

actamicro@im.ac.cn