



slnN 基因在盐霉素生物合成中的调控功能分析

朱振洪^{1*}, 李函², 李永泉^{2*}

¹浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053

²浙江大学药物生物技术研究所, 浙江 杭州 310012

摘要:【目的】研究盐霉素生物合成基因簇上游潜在调控基因 *slnN* 的功能。【方法】本实验利用遗传操作技术, 分别对白色链霉菌出发菌株 *Streptomyces albus* BK3-25 中的 *slnN* 基因进行敲除和过表达, 然后利用抑菌圈实验和发酵实验, 分别检测不同衍生菌株中盐霉素生物合成产量的变化。同时利用 qRT-PCR 分析衍生菌株与原始出发菌株之间的结构基因表达差异。【结果】结果表明在 *slnN* 基因缺失株(slnNDM)中, 盐霉素的表达水平提高了 35%左右; 而在 *slnN* 基因过表达株(slnNOE)中, 盐霉素产量下降达 43%左右。qRT-PCR 分析进一步发现 *slnN* 基因缺失, 会引起 *slnO* 和 *slnAI* 基因的上调; 而 *slnN* 基因过表达后, 一方面会下调 *slnO* 与 *slnAI* 基因的表达, 另一方面引起 *slnT1*、*slnF* 基因上调。【结论】本研究证实 *slnN* 基因对盐霉素的生物合成具有明显的负调控作用, 其机制有待进一步研究。

关键词: 白色链霉菌, 盐霉素, 生物合成, *slnN* 基因, 调控功能

盐霉素(Salinomycin)属典型的离子载体抗生素。其主要的抗菌机制是对细胞中的阳离子, 尤其 K^+ 、 Na^+ 、 Rb^+ 的亲合力特别强, 使生物所必需的阳离子通过膜上脂质屏障的浸透性增强, 妨碍细胞内外阳离子的传递, 从而影响渗透压, 最终使细胞崩解, 起到杀菌作用^[1]。盐霉素已广泛作为畜禽业抗球虫剂使用, 具有广谱、高效、低毒、低残留等特点。另外盐霉素还具有抑制肿瘤干细胞的活性, 在实验室研究期间, 其杀死小鼠

身上乳腺癌干细胞的效力比普通抗癌药物紫杉醇高出 100 倍^[2], 还具有抑制肝癌、卵巢癌及胰腺癌等多种肿瘤的生长, 有望成为新的抗肿瘤药物^[3-4]。

Yurkovich 等^[5]通过对 *Streptomyces albus* DSM41398 盐霉素生物合成基因簇的解析, 注释了 3 个调控基因, 分别是基因簇下游的 *salJ* 基因和基因簇上游的 *salN*、*salO* 基因。而 Jiang 等^[6]在 *S. albus* XM211 菌株中仅注释了一个簇内调控

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY16C010001)

*通信作者。李永泉, Tel: +86-571-88206632, E-mail: lyq@zju.edu.cn; 朱振洪, Tel: +86-571-86613713, E-mail:

zhenhongzhu@aliyun.com

收稿日期: 2018-05-24; 修回日期: 2018-07-16; 网络出版日期: 2018-08-02

基因 *slnR*, 序列分析表明与 *salJ* 基因序列完全一致。在本实验所用的 *S. albus* BK3-25 菌株中^[7], 序列分析表明同样存在与 *S. albus* DSM41398 序列完全一致的 3 个潜在的调控基因, 在此统一命名为 *slnR*、*slnN* 和 *slnO*^[8]。其中 *slnR* 基因经研究证实为盐霉素生物合成簇内途径特异性正调控基因^[9], 而 *slnN*、*slnO* 基因功能未知, 通过 NCBI Protein-Blast 软件比对, 发现 *slnN* 基因编码蛋白与多重耐药性转录因子(Multiple antibiotic resistance regulator, MarR)家族同源性达 61%。MarR 是广泛存在于细菌和古细菌中一类保守的转录调控因子, 不同细菌种属的 MarR 同源蛋白可以响应来自环境或宿主免疫应答产生的有害

因子, 包括抗生素抗性、环境胁迫响应、菌体毒力以及芳香族化合物代谢等^[10]。本文通过对 *S. albus* BK3-25 菌株中 *slnN* 基因敲除、基因过表达, 并利用荧光定量 PCR 技术检测衍生菌株与出发菌株之间的基因表达差异, 探讨 *slnN* 基因对于盐霉素生物合成的潜在调控功能。为进一步通过转录调控水平改造盐霉素高产菌株打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物: 如表 1、2、3 所示。

表 1. 本实验所用的菌株
Table 1. List of strains used in this study

| Strains | Description | Source/Reference |
|--------------------------|---|---|
| <i>S. albus</i> BK3-25 | The original strain for salinomycin production | Zhejiang Shenghua Biok Biological Company (China) |
| slnNDM | <i>slnN</i> gene-deleted strain | This study |
| slnNOE | <i>slnN</i> gene-overexpressing strain | This study |
| BL21(DE3) | Strain for recombinant protein expression | Invitrogen |
| <i>TGI</i> | Used for usual transformation in plasmid construction | Amersham |
| BW25113/pKD46 | Strain used for PCR-targeted mutagenesis | Chunyan Jiang et al, 2012 |
| ET12567/pUZ8002 | Non-methylating ET12567 containing non-transmissible RP4 derivative plasmid pUZ8002 | [11] |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Indicator strain for salinomycin bioassays | CGMCC 1.3358 |

表 2. 本实验所用的质粒
Table 2. List of plasmids used in this study

| Plasmids | Description | Source/Reference |
|--------------|---|------------------|
| pIJ8660 | Site-specific integration vector carrying <i>ermEp*</i> , <i>φC31 int</i> , and <i>attP</i> | [9] |
| pIJ8661 | pIJ8660 with extra MCS including <i>Nde</i> I and <i>Kpn</i> I restriction sites | This study |
| 15D8 | Fosmid carrying the <i>slnN</i> gene | This study |
| pIJ8661-slnN | pIJ8661 with a 984 bp <i>Nde</i> I/ <i>Kpn</i> I DNA fragment | This study |

表 3. 本文所用的 PCR 扩增及荧光定量 PCR 引物
Table 3. List of PCR primers and fluorescence quantitative PCR primers used in this study

| Primer names | Sequences (5'→3') |
|--------------|---|
| Ntar-F | GGCGACGGCAGGGCAACGGCCGGAGGA GGAAGGCGGATGATTCCGGGGATCCGTCG ACC |
| Ntar-R | GCAAAAGCCGTGGCCGCGCGCCCCGGTG GACCGGGCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC |
| JDN-F | AGTCGCCCCGATCCCTGTCCCATGC |
| JDN-R | TGCCCCGAGCTTCGCCTTCCGT |
| GN-F | GGAATTCATATGCACGGCTATACGCACTT GCG |
| GN-R | GGGTACCTCAGGAGAGCAGGTCGAGTA CGGAG |
| HN-F | GCCAACTCCCCTGCCTGGTGCGGTT |
| HN-R | TCAGGAGAGCAGGTCGAGTACGGAG |
| N-F | CGGGATCCATGCACGGCTATACGCACTTG CG |
| N-R | CGGAATTCTCAGGAGAGCAGGTCGAGTA CGGAG |
| Tsr-F | TTGGACACCATCGCAAATC |
| Tsr-R | AAACCGAGGCGGAAGACG |
| qhrdB-F | AGGACGACGCCCCCGCACAG |
| qhrdB-R | CCGGCCTCGATCCGCTTGGCG |
| qN-F | CCCACCGCCTGCATGCCCCGA |
| qN-R | CGCTCCACCACCGGCTGCCA |
| qA1-F | ACCTCGCTCTCGCCGGAGGC |
| qA1-R | CCGTCGGCCCCGCTCGTCGAA |
| qF-F | CGGCCACGAGACCACCGCGA |
| qF-R | CCCGGTGCCGAGCGGGATGT |
| qT1-F | AACGCGGTGGCCGAGGGCAA |
| qT1-R | CGGGGGCGTCGCCGTAGTGG |
| qC-F | GGCGCGCACCGCCTCTACCT |
| qC-R | TGGCGGCGCACCCAGTC |
| qB3-F | CTGCCACGCGCCGATCC |
| qB3-R | CTCGTGCCCCAATAGGCCCGCA |
| qR-F | CGGGCACCCAGGCCGACGAG |
| qR-R | GCGGTCCGGCTGGTCGGTGT |
| ermE*P-F | AAGCTTGGCGGCTTGCGCCCGATGCTAGTC |

F stands for forward primer, and R stands for reverse primer.

1.1.2 培养基: 大肠杆菌采用 LB 培养基和 SOB 培养基; 链霉菌平板培养采用 ISP4 固体培养基; 盐霉素生产菌的发酵种子培养基为: 3.0% TSB; 发酵培养基为 YMG 培养基: 酵母提取物 0.4%, 麦芽提取物 1.0%, 葡萄糖 0.4%, CaCO₃ 0.2%, 用 10 mol/L NaCl 调至 pH 7.2, 接种前另加 10% 的灭菌大豆油。

1.1.3 主要试剂: 本实验所用的内切酶、连接酶均购自 TaKaRa 公司, KOD 高保真 DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司。DNA marker 和 rTaq 酶均购自 TaKaRa 公司。PCR 产物回收纯化试剂盒、DNA 质粒抽提试剂盒购自 Axygen 公司。RNA 抽提试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒为 TaKaRa 公司产品。盐霉素检测用显色剂 4-二甲氨基苯甲醛和本实验所用的抗生素均为 Sigma 公司产品。

1.2 *slnN* 基因敲除株和回补株的构建

利用前期构建的 BK3-25 菌株的基因组 Fosmid 文库, 利用 PCR 技术筛选到含 *slnN* 基因的 fosmid 15D8。首先将 15D8 转入大肠杆菌 BW25113 (pKD46) 中, 再利用 Ntar-F/Ntar-R 为引物, 以 pIJ773 (经 *Hind* III+*Eco*R I 双酶切) 作模板, PCR 扩增并割胶回收 1.38 kb 左右条带。采用 PCR-targeting 技术和抗性平板[含氯霉素(chl)、阿泊拉霉素(Apra)]筛选, 获得用于双交换的质粒 pSL2 (图 1)。

再将 pSL2 质粒转入大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002) 中, 利用链霉菌-*E. coli* 属间接合转导实验, 通过含 Apra 的抗性平板筛选, 获得抗性接合子, 然后挑取抗性接合子松弛二代培养后, 利用 *slnN* 基因两侧同源臂引物 JDN-F/JDN-R, 采用 PCR 方法验证获得 *slnN* 基因缺失的双交换突变株, 命名为 *slnNDM*。

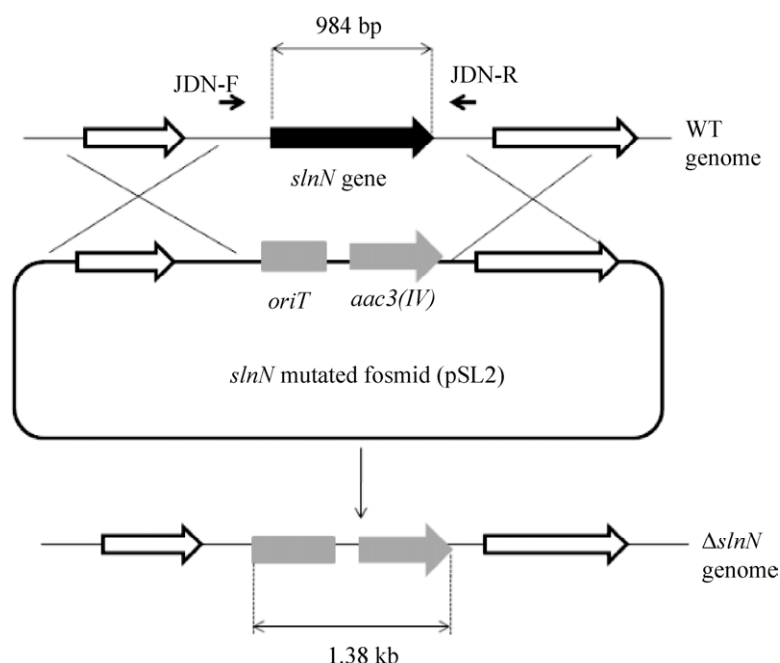


图 1. *slnN* 基因敲除株的构建示意图

Figure 1. Construction sketch of *slnN* gene knockout strain.

为验证 *slnN* 表型是由于 *slnN* 基因突变引起的，同时又构建了 *slnN* 株的回补株。采用 Wt 基因组为模板，以特异性引物 JDN-F/JDN-R 扩增 1560 bp 的序列(含 *slnN* 基因及可能的启动子序列 576 bp)，该片段与 pIJ8600 相连接后，转入大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002)中，与 *slnN* 菌株进行接合转导，经过 Apra+Tsr 双抗性筛选，并提取基因组 DNA 验证，最终获得回补株，命名为 *slnN*COM。

1.3 *slnN* 基因高表达株的构建

设计特异性引物 (GN-F/GN-R) 扩增完整的 *slnN* 基因(984 bp)，然后该基因经过 *Nde* I/*Kpn* I 双酶切并割胶回收，然后与 *Nde* I/*Kpn* I 双酶切后的 pIJ8661 质粒相连接，使该基因在 *ermEp** 强启动子控制之下，构建整合型重组质粒 pIJ8661-*slnN*。该质粒转化 ET12567/pUZ8002 菌，与 BK3-25 菌株进行接合转导，Apra 抗性平板筛选，PCR 验证 *ermEp** 启动子序列是否整合到染色体基因组上 (引物分别为：ermE*P-F/JDN-R)。将获得的高表

达菌株命名为 *slnNOE*。

1.4 盐霉素产生菌的发酵实验

在超净台中，挖取 1 cm² 大小的 BK3-25 菌落 (已在 ISP4 固体培养基上培养 1 周)，放入已灭菌的装有 30 mL 3% TSB 培养基的锥形瓶中(含 18 颗小玻璃珠)，置于 33 °C、240 r/min 的恒温摇床中培养 26–30 h。然后将培养好的种子液按 10% 比例接种到 40 mL YMG 发酵培养液中(含 10% 的大豆油，含 18 颗玻璃珠)，用 10 层纱布封口，置于 33 °C、240 r/min 恒温摇床培养 4 d，补加 5% 的大豆油，继续培养 4 d，最后将发酵液收至 50 mL 离心管。发酵期间每日取 1–2 mL 发酵液进行盐霉素产量的检测。

1.5 盐霉素发酵产物的分光光度法检测

发酵液第 1 步用无水乙醇稀释定容后，超声波提取 20 min，过滤，取滤液 1 mL 至 10 mL 容量瓶用无水乙醇定容；再准确吸取第 2 步稀释液 0.5 mL 于具塞试管中，加入无水乙醇 4.5 mL，显色剂 5 mL。对照液：准确吸取 0.5 mL、100 μg/mL

对照液于具塞试管中加入无水乙醇 4.5 mL, 显色剂 5 mL, 摇匀。把试样液和对照液同时放入 70 °C 恒温水浴 20 min, 冷却后用紫外分光光度计, 在 OD_{600} 以无水乙醇为空白, 测定对照液和试样液的吸光值。对照品测 2 次, 绝对差值小于 0.01。

$$\text{发酵效价 } U_0 = \frac{OD_{\text{样}} \times C}{OD_{\text{标}}} \times n \quad (\text{公式 1})$$

公式 1 中: $OD_{\text{样}}$: 样品液吸光值; $OD_{\text{标}}$: 对照液吸光值; C : 标准样品的浓度; n : 稀释倍数。

1.6 盐霉素发酵产物的 HPLC 检测

取发酵液 2 mL, 按 1:9 的比例加入甲醇, 超声 20 min; 12000×g 离心 10 min, 取上清; 利用有机滤膜将上清过滤后, 取 200 μ L 进行 HPLC 检测。检测条件为: A: 超纯水; B: 乙腈; A: B=9:91; 流速为 0.4 mL/min; 进样量: 10 μ L; 样品检测时间: 45 min; 色谱柱: Angilent XDB C₁₈ 4.6 mm×150 mm, 3.5 μ m。

1.7 盐霉素产生菌的生物指示实验

先挑取枯草芽孢杆菌单菌落, 在 5 mL Media Number 51 (MN51) 培养基中培养, 30 °C、245 r/min 培养 16–18 h。然后在超净台中, 取菌液 100 μ L 在 MN51 平板中涂布均匀, 正放 30 min。30 min 以后在平板上做好标记, 用蓝色枪头取培养白色链霉菌的培养基, 必要时可用镊子取下, 正放在平板上并稍稍按下。完成后正放在 4 °C 冰箱过夜 (至少 14 h 以上), 30 °C 培养 12 h 左右, 观察抑菌圈的形成并拍照。

1.8 白色链霉菌的 RNA 提取、DNA 消解及反转录实验

RNA 提取采用 EASY spin Plus 细菌 RNA 快速提取试剂盒 (北京艾莱德生物科技有限公司) 抽提, 操作方法见试剂盒说明书。基因组 DNA 消解

过程: Total RNA 40 μ g; 10×buffer 10 μ L; rDNase I 4 μ L; RNase Inhibitor 1 μ L; 加 DEPC H₂O 补充至 100 μ L, 37 °C, 45 min。然后加等体积的苯酚/氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤沉淀, 最后加 25 μ L ddH₂O (RNase free) 溶解沉淀, -80 °C 冻存。反转录实验: 本实验采用 TaKaRa 公司的 Reverse Transcriptase M-MLV 反转录试剂盒, 具体操作见产品说明书。

1.9 荧光定量 PCR(qRT-PCR) 实验

采用反转录后的 cDNA 作为模板, 利用 TaKaRa 公司的 2×SYBR premix Ex Taq 试剂进行荧光定量 PCR 实验。以 *hrdB* 基因为参比基因, 采用表 3 中的引物 (首字母含 q 的引物), 分别对 *slnN*、*slnA1*、*slnF*、*slnT1*、*slnC*、*slnB3*、*slnR* 基因进行荧光定量分析, mRNA 相对表达量的变化计算方法为 $F=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

2 结果和分析

2.1 *slnN* 基因突变株的筛选与鉴定

为了探讨 *slnN* 基因与盐霉素产量的关系, 我们用图 1 中的方法将原始出发菌中的 *slnN* 基因 (984 bp) 序列置换为 Apra 抗性基因 (1.38 kb), 筛选并获得双交换菌株 *slnNDM*。利用同源臂引物 JDN-F/JDN-R 对 *slnNDM* 双交换菌株进行 PCR 验证 (图 2), 从图 2 中可以看出, 以原始出发菌 (*S. albus* BK3-25) 基因组为模板扩增的条带大小为 1.2 kb 左右, 而以突变株 *slnNDM* 为模板扩增的条带大小为 1.6 kb 左右。*slnNDM* 菌株回补株的验证, 采用扩增硫链丝菌素基因的引物 (Tsr-F/Tsr-R) 和扩增 *slnN* 基因的引物 (N-F/N-R) 进行 PCR 鉴定, 结果分别能扩增出 0.7 kb 的 Tsr 抗性片段和 1 kb 左右的目的基因条带 (DNA 电泳图略)。

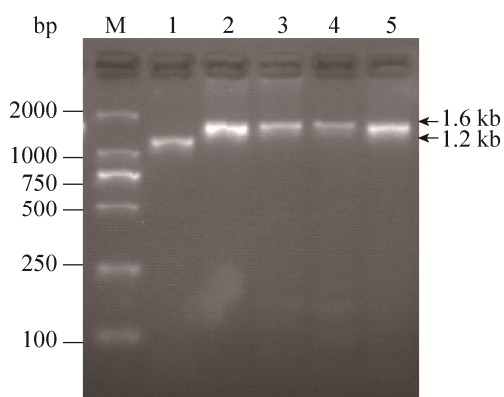


图 2. *slnN* 基因缺失突变株的 PCR 鉴定

Figure 2. PCR identification of deletion mutant of *slnN* gene. M: DNA marker; lane 1: Amplification by using the WT genome as a template; lane 2–5: Amplification by using the *slnNDM* genome as a template.

2.2 *slnN* 基因高表达株的构建与筛选

利用整合型质粒 pIJ8661, 使 *slnN* 基因处于 *ermEp** 强启动子控制之下, 构建整合型重组质粒 pIJ8661-*slnN*。该质粒转化 ET12567/pUZ8002 菌, 与原始出发菌株进行接合转导, Apra 抗性平板筛选, PCR 验证 *ermEp** 启动子序列是否整合到染色体基因组上(图 3)。发现从 WT 基因组中扩不出条

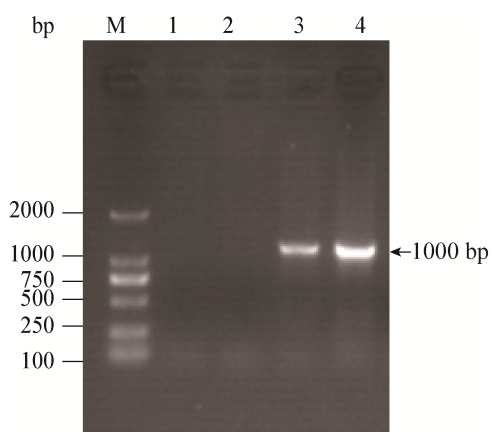


图 3. *slnN* 基因高表达株的 PCR 鉴定

Figure 3. Identification of *slnN* gene over-expression strain by PCR. M: DNA marker; lane 1–2: Amplification by using the WT genome as a template; lane 3–4: Amplification by using the *slnNOE* genome as a template.

带, 而在 *slnNOE* 菌株基因组中可以扩出 1000 bp 左右条带, 说明 *ermEp** 启动子已经融合到染色体上。

2.3 不同 *slnN* 基因突变株的抑菌实验

采用生物指示试验(枯草芽孢杆菌), 检测白色链霉菌出发菌(WT)与 *slnNDM*、*slnNCOM*、*slnNOE* 三种突变菌株之间抑菌效果的比较。结果发现 *slnNDM* 菌株的抑菌圈比 WT 明显增加(图 4), 而在 *slnN* 基因高表达后, *slnNOE* 菌株中抑菌圈比 WT 明显减小。回补株 *slnNCOM* 的抑菌圈与 WT 接近。上述实验现象表明: *slnN* 基因可能是一个负调控基因, 其高表达对盐霉素的生物合成有一定的抑制作用, 但不会完全抑制; 而 *slnN* 基因缺失后会明显增加盐霉素的生物合成, 说明 *slnN* 基因的缺失可以解除其对某些靶基因的阻遏作用。

2.4 不同菌株的发酵实验

从摇瓶发酵实验结果可以看出, *slnN* 基因缺失株(*slnNDM*)的盐霉素产量明显比出发菌的产量要高, 产量提高约 35% 左右; 而 *slnN* 基因高表达株(*slnNOE*)中, 发现与出发菌株的产量相比是明显降低的, 盐霉素产量下降最大达 43% 左右(如图 5 所示)。其发酵结果与抑菌圈实验结果相符, 说明 *slnN* 基因可能属于一个负调控基因, 其对盐霉素的产生具有某种程度的抑制作用, 但又不会完全抑制。

2.5 *slnN* 基因敲除株与过表达株的 qRT-PCR 分析

在前期对 *slnN* 基因的 Protein BLAST 比对分析发现, 该基因属于 Mar 家族的调控基因, 但是 MarR 家族调控基因既可以是正向调控, 又可以负向调控。本研究通过前面的基因敲除和基因过表

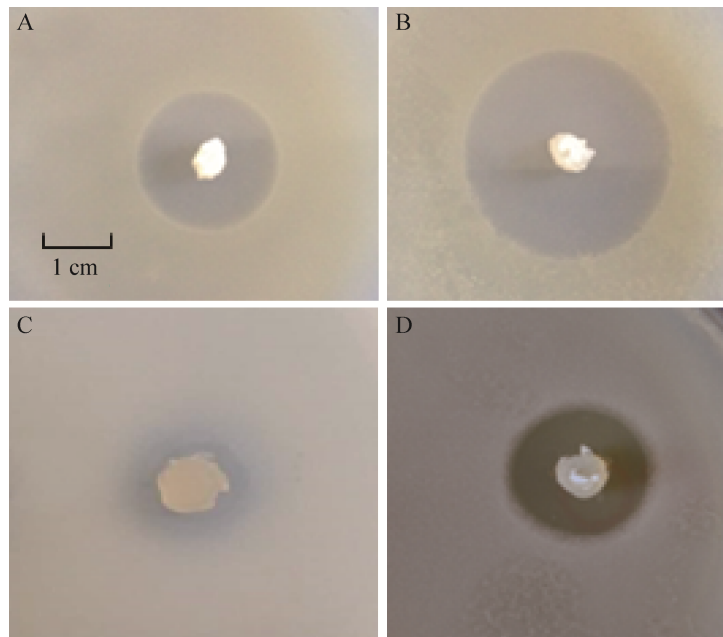


图 4. WT 与 *slnN* 基因不同突变株之间的抑菌圈比较

Figure 4. Comparison of inhibition zones between WT and *slnN* gene mutants. A: WT; B: *slnNDM*; C: *slnNOE*; D: *slnNCOM*.

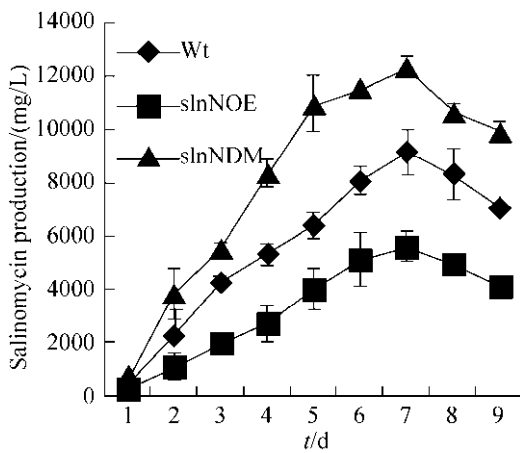


图 5. WT 与 *slnNDM*、*slnNOE* 菌株之间的盐霉素产量比较

Figure 5. Comparison of salinomycin production between WT, *slnNOE* and *slnNDM* strains.

达实验验证, 发现其对盐霉素的生物合成实际起负调控作用。为了进一步研究 *SlnN* 蛋白的调控机制, 本实验提取 WT 和 *slnNDM* 两种菌株的发酵

菌丝总 RNA, 以 *hrdB* 基因为参比基因, 采用 qRT-PCR 的方法, 研究盐霉素合成基因簇中结构基因的转录差异。结果表明, 在 *slnN* 基因缺失株 (*slnNDM*) 中, 发现 *slnO* 和 *slnA1* 基因的表达水平明显上调, 而其他基因表达水平基本无影响。说明 *slnN* 基因的缺失可能对 *slnO* 和 *slnA1* 有较大影响(图 6), 其中 *slnA1* 是盐霉素分子骨架第一个关键的合成酶基因, 并且与后续 8 个合成基因 (*slnA2*–*slnA9*) 进行共转录, 该基因的表达上调意味着盐霉素骨架的合成速度将会加快。而 *slnO* 基因从生物信息学上分析其实也属于 MarR 家族的调节基因, 其调节功能尚需进一步实验证实。

而在 *slnN* 基因过表达菌株中(图 7), qRT-PCR 分析发现一方面 *slnO* 基因、*slnA1* 基因表达水平明显降低, 而 *slnF*、*slnT1* 的表达水平显著上调。MarR 家族调节蛋白本身就是负责多药耐药表型,

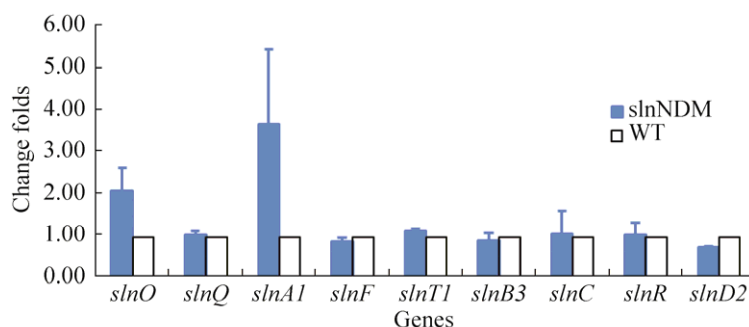


图 6. WT 与 slnNDM 菌株之间的 qRT-PCR 分析

Figure 6. Analysis of transcriptional level of genes involved in biosynthesis of salinomycin between WT and slnNDM strains. The relative expression level of each gene in WT was set to 1.

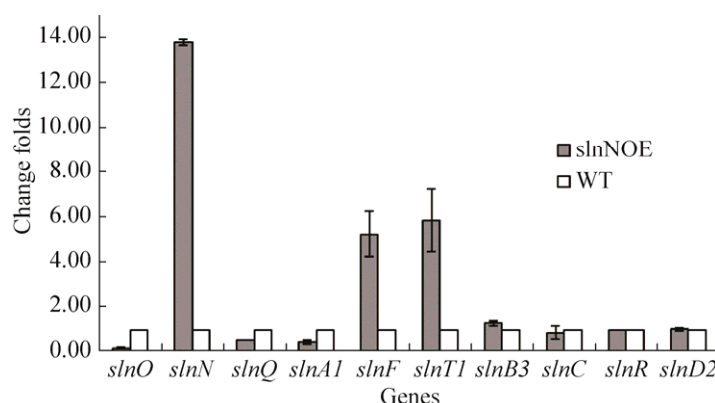


图 7. WT 与 slnNOE 菌株之间的 qRT-PCR 分析

Figure 7. Analysis of transcriptional level of genes involved in biosynthesis of salinomycin between WT and slnNOE strains. The relative expression level of each gene in WT was set to 1.

而本实验中 *slnN* 基因表达后既可以减慢盐霉素的生物合成速度，又可以促进盐霉素的外排，可能与菌体自身的多药耐药性有关。

3 分析和讨论

SlnN 属 MarR 家族调控因子，该家族调控因子主要与链霉菌的代谢途径、应激反应、毒力和抗生素的降解及排出有关，通常调控包括毒力在内的许多与细菌生理相关的通路^[10]。MarR 家族转录调控因子既可以是激活剂又可以是抑制剂，为

链霉菌中单组分的响应因子，目前已有的文献对 MarR 家族的调控机制报道有限，且大多数 MarR 家族蛋白的自然配体未知^[12]。本文通过 *slnN* 基因敲除实验和过表达实验，证实 *slnN* 基因对盐霉素的生物合成起负调控作用。qRT-PCR 分析发现 *slnN* 基因缺失会引起 *slnO* 和 *slnA1* 基因的上调，从而加快了盐霉素的生物合成速度。而 *slnN* 基因过表达会下调 *slnO* 与 *slnA1* 基因表达，减慢盐霉素的生物合成速度。结合 MarR 家族调控因子的特点，推测 *slnN* 基因受其他信号物质的刺激后

调控盐霉素生物合成速度、加快盐霉素的外排,防止盐霉素过多对菌体自身的影响,但其具体的负调控机制有待进一步解析。

对于抗生素产生菌的遗传改造,在充分了解抗生素的生物合成途径与调控机制基础上,一方面可以通过增加关键结构基因的拷贝数,或对关键酶基因进行定点突变,优化酶活力,提高产物合成速率^[13-14];另一方面也可以通过对正调控基因高表达,或对负调控基因进行敲除,从而达到提高抗生素产量的目的^[15]。本实验通过对 *slnN* 基因调控功能的初步研究,为下一步盐霉素高产菌株的遗传改造打下良好的基础。

致谢

特别感谢上海交通大学微生物代谢国家重点实验室白林泉教授和姜春艳博士在本实验基因组序列分析和遗传操作技术方面的指导。

参考文献

- [1] Miyazaki Y, Shibuya M, Sugawara H, Kawaguchi O, Hirose C, Nagatsu J, Esumi S. Salinomycin, a new polyether antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, 1974, 27(11): 814-821.
- [2] Gupta PB, Onder TT, Jiang GZ, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, 2009, 138(4): 645-659.
- [3] Kim KY, Kim SH, Yu SN, Park SK, Choi HD, Yu HS, Ji JH, Seo YK, Ahn SC. Salinomycin enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in multidrug resistant MCF-7/MDR human breast cancer cells via decreased efflux of doxorubicin. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(2): 1898-1904.
- [4] Chung H, Kim YH, Kwon M, Shin SJ, Kwon SH, Cha SD, Cho CH. The effect of salinomycin on ovarian cancer stem-like cells. *Obstetrics & Gynecology Science*, 2016, 59(4): 261-268.
- [5] Yurkovich ME, Tyrakis PA, Hong H, Sun YH, Samborskyy M, Kamiya K, Leadlay PF. A late-stage intermediate in salinomycin biosynthesis is revealed by specific mutation in the biosynthetic gene cluster. *Chembiochem*, 2012, 13(1): 66-71.
- [6] Jiang CY, Wang HG, Kang QJ, Liu J, Bai LQ. Cloning and characterization of the polyether Salinomycin biosynthesis gene cluster of *Streptomyces albus* XM211. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(4): 994-1003.
- [7] Zhang XJ, Lu CY, Bai LQ. Mechanism of salinomycin overproduction in *Streptomyces albus* as revealed by comparative functional genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(11): 4635-4644.
- [8] Tan C, Tan HR, Zhang JH. Enhancement of salinomycin production and its activity optimization-A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(9): 1371-1384. (in Chinese) 谭超, 谭华荣, 张集慧. 盐霉素产量提高及其活性优化. *微生物学报*, 2016, 56(9): 1371-1384.
- [9] Zhu ZH, Li H, Yu P, Guo YY, Luo S, Chen ZB, Mao XM, Guan WJ, Li YQ. SlnR is a positive pathway-specific regulator for salinomycin biosynthesis in *Streptomyces albus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(4): 1547-1557.
- [10] Romero-Rodríguez A, Robledo-Casados I, Sánchez S. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 2015, 1849(8): 1017-1039.
- [11] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [12] Zhu DQ, Wang YP, Zhang MM, Ikeda H, Deng ZX, Cane DE. Product-mediated regulation of pentalenolactone biosynthesis in *Streptomyces* species by the MarR/SlyA family activators PenR and PntR. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(6): 1255-1266.
- [13] Novakova R, Rehakova A, Feckova L, Kutas P, Knischova R, Kormanec J. Genetic manipulation of pathway regulation for overproduction of angucycline-like antibiotic auricin in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. *Folia Microbiologica*, 2011, 56(3): 276-282.
- [14] Liu J, Jiang CY, Zhang BC, Bai LQ. Involvement of ABC

transporter genes *slnTI* and *slnTII* in Salinomycin biosynthesis. *Microbiology China*, 2014, 41(1): 58–66. (in Chinese)

刘静, 姜春艳, 张部昌, 白林泉. ABC 转运蛋白基因 *slnTI* 和 *slnTII* 与盐霉素生物合成的相关性. 微生物学通报,

2014, 41(1): 58–66.

[15] Zhang XJ, Lu CY, Bai LQ. Conversion of the high-yield salinomycin producer *Streptomyces albus* BK3-25 into a surrogate host for polyketide production. *Science China Life Sciences*, 2017, 60(9): 1000–1009.

Regulation of *slnN* gene in salinomycin biosynthesis

Zhenhong Zhu^{1*}, Han Li², Yongquan Li^{2*}

¹ College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China

² Institute of Pharmaceutical Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310012, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] To study the potential of regulatory gene *slnN* upstream of salinomycin biosynthesis gene cluster. [Methods] We used genetic manipulation technique to knock out and overexpress the *slnN* gene in the original strain *Streptomyces albus* BK3-25. Then, using inhibition zone test and fermentation experiment, we detected the changes of the production of salinomycin biosynthesis in different derivative strains. At the same time, we used qRT-PCR technique to analyze the difference of the structural gene expression between the derived strains and the original strain. [Results] The production of salinomycin was increased by about 35% in the *slnN* gene-deleted strain (slnNDM), whereas the production of salinomycin was decreased by about 43% in the *slnN* gene-overexpressing strain (slnNOE). qRT-PCR analysis revealed that loss of *slnN* gene caused up-regulation of *slnO* and *slnA1* genes. The *slnN* gene overexpression, on the one hand down-regulated the expression of *slnO* and *slnA1* gene, on the other hand caused *slnTI* and *slnF* gene up-regulation. [Conclusion] The *slnN* gene has a significant negative regulatory effect on the biosynthesis of salinomycin.

Keywords: *Streptomyces albus*, salinomycin, biosynthesis, *slnN* gene, regulation function

(本文责编: 李磊)

Supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY16C010001)

*Corresponding author. Yongquan Li, Tel: +86-571-88206632, E-mail: lyq@zju.edu.cn; Zhenhong Zhu, Tel: +86-571-86613713, E-mail: zhenhongzhu@aliyun.com

Received: 24 May 2018; Revised: 16 July 2018; Published online: 2 August 2018