



## 阿卡波糖生物合成调控蛋白的钓取与功能解析

汪雪梅, 翁倩卉, 赵芹芹, 白林泉\*

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

**摘要:**【目的】发现游动放线菌 *Actinoplanes* sp. SE50/110 中阿卡波糖生物合成的调控因子, 并提高其产量。【方法】首先, 利用 DNA 亲和层析技术, 钓取与阿卡波糖生物合成基因簇 2 个双向启动子区域结合的调控蛋白。然后, 在阿卡波糖产生菌 QQ-2 中强化表达或敲除这些调控蛋白编码基因, 进行体内功能验证。同时, 利用大肠杆菌 BL21(DE3) 异源表达获得可溶性蛋白, 通过凝胶阻滞实验验证蛋白与启动子区域的结合能力。【结果】经 DNA 亲和层析及蛋白质质谱分析, 钓取出 9 个与双向启动子  $P_{WV}$  和  $P_{AB}$  结合的调控蛋白。在 QQ-2 中分别强化表达和缺失这 9 个调控基因后发现, 基因 *ACPL\_1889* 的强化表达使阿卡波糖产量提高 25%, 而该基因的缺失使产量降低 22%; 基因 *ACPL\_5445*、*ACPL\_3989* 的强化表达使阿卡波糖产量分别降低 12% 和 39%, 而这两个基因的缺失使产量分别提高 15% 和 8%。对阿卡波糖生物合成基因转录水平的检测发现, 强化表达基因 *ACPL\_1889* 使 *acbA*、*acbB*、*acbW*、*acbV* 的转录水平升高, 而缺失该基因使这 4 个基因的转录水平降低; 敲除基因 *ACPL\_5445* 使这 4 个基因转录水平均有提高; 强化表达基因 *ACPL\_3989* 使这 4 个基因的转录水平均下降, 而其敲除使 *acbW* 和 *acbA* 的转录水平分别提高了约 100 倍和 40 倍。在凝胶阻滞实验中, *ACPL\_1889* 与 *ACPL\_3989* 均能与 *acb* 基因簇的启动子区域结合。最后将正调控基因的强化表达和负调控基因的敲除进行组合, 使阿卡波糖产量提升 32%。【结论】本研究发现了 9 个与阿卡波糖生物合成基因簇的启动子区域结合的调控蛋白, 通过体内、体外实验证明 *ACPL\_1889* 为阿卡波糖生物合成的正调控因子、*ACPL\_5445* 和 *ACPL\_3989* 为负调控因子, 不但为揭示阿卡波糖生物合成的转录调控机制奠定了基础, 而且这些调控基因的改造显著提升了阿卡波糖的产量。

**关键词:** 阿卡波糖, DNA 亲和层析, 转录调控, 凝胶阻滞实验

目前, 糖尿病患者的数量在全球范围内持续增长, 其中以 2 型糖尿病为主, 约占患者总数的 90% 以上<sup>[1-2]</sup>。临床研究表明, 口服降糖药、合理控制饮食以及适当的运动可有效改善餐后血糖浓

基金项目: 国家自然科学基金(31830104)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-21-34206722; E-mail: bailq@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2021-02-10; 修回日期: 2021-03-03; 网络出版日期: 2021-09-08

度, 从而能够减缓部分心脑血管病等慢性并发症的发生<sup>[3]</sup>。目前用于治疗糖尿病的降糖药主要有胰岛素增敏剂、促胰岛素分泌剂、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂等<sup>[4]</sup>。由于阿卡波糖不仅可以降低血糖水平, 还具有预防心血管疾病等功效, 自上市以来便成为治疗 2 型糖尿病的理想药物<sup>[5]</sup>。在 2017 年版的《中国 2 型糖尿病防治指南》中, 阿卡波糖被列入治疗 2 型糖尿病的一线用药。

20 世纪 70 年代, 在游动放线菌 SE50 (*Actinoplanes* sp.) 的发酵产物中首次分离得到阿卡波糖<sup>[6]</sup>。其化学结构由氨基环醇、4-氨基-4,6-脱氧

葡萄糖和麦芽糖三部分组成(图 1)。负责阿卡波糖生物合成的相关基因在游动放线菌 SE50 的染色体上成簇分布, 组成 *acb* 基因簇<sup>[7]</sup>。该基因簇(图 5-A)由 22 个基因构成, 长约 30 kb, 按照基因功能的不同可将已知基因分为 2 个大类: *acbAB* 和 *acbVUSRPIJKMLNOC* 为阿卡波糖生物合成基因; *acbWXY* 和 *acbFGH* 为转运蛋白基因<sup>[8]</sup>。在 *acb* 基因簇中没有任何与调控相关的基因, 推测存在簇外调控因子对 *acb* 基因簇的转录起到调控作用, 这为研究其生物合成基因的调控机制带来了挑战。

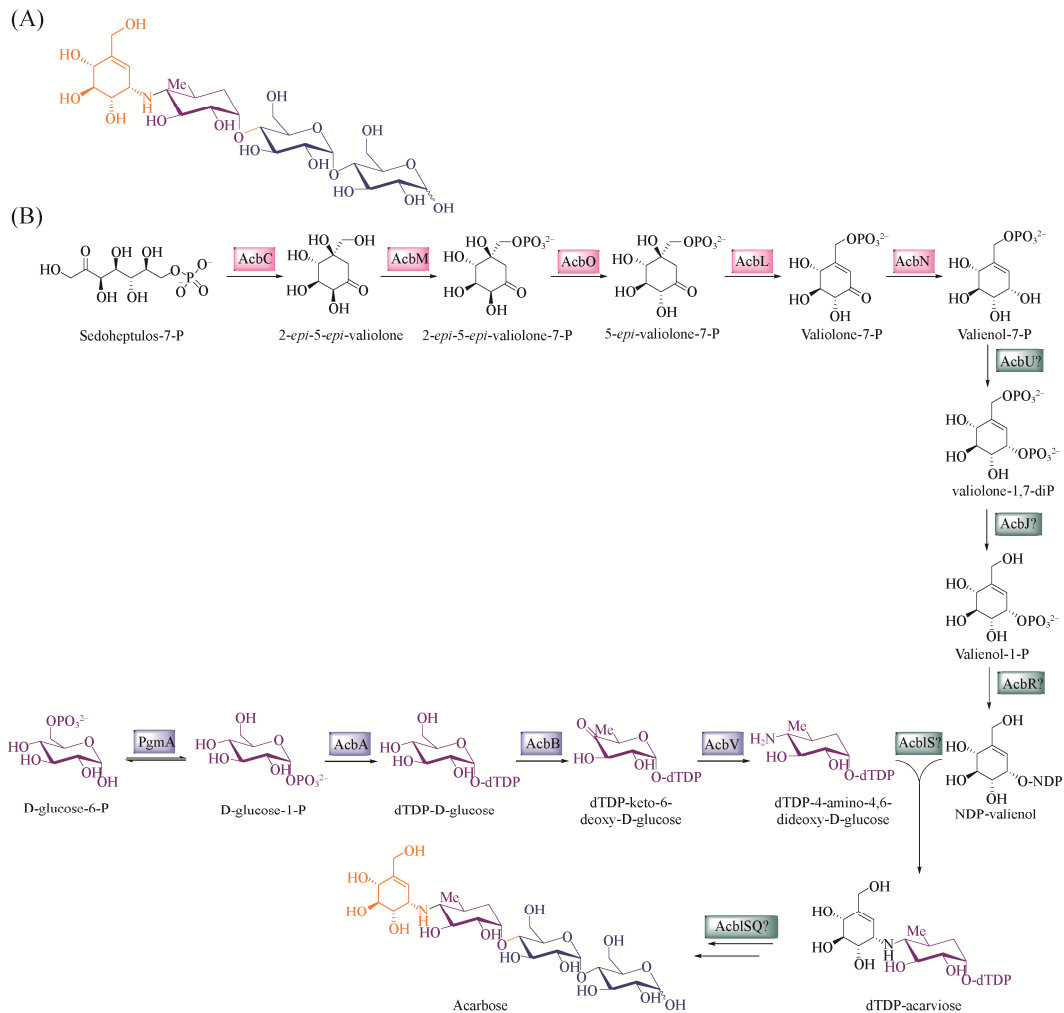


图 1. 阿卡波糖化学结构式及生物合成途径

Figure 1. The structure of acarbose and its biosynthetic pathway. A: The structure of acarbose; B: The biosynthetic pathway of acarbose.

调控因子可以通过直接或间接识别并结合特定的 DNA 序列, 从而调控基因的转录效率<sup>[9]</sup>。有些调控因子是全局性或多效性调控因子, 调控范围比较广泛, 如天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 中的 Crp、WblA、GlnR, 均能参与多条代谢途径的调控<sup>[10-14]</sup>。途径特异性调控因子通常在基因簇内, 能特异性地调控簇内结构基因的转录, 如 PapR6 能特异性地调控普那霉素生物合成, 在 SE50/110 中麦芽糖酶基因 *amlE* 受到其上游转录因子 AmlR 的调控, 在 *Streptomyces* sp. FR-008 中, *fscR1*、*fscR2*、*fscR3* 和 *fscR4* 四个调控基因对多烯抗生素杀念菌素的生物合成具有重要调控作用<sup>[15-17]</sup>。由于放线菌的转录调控系统非常复杂, 对于调控因子的寻找及其功能解析比较困难。通过启动子区域 DNA 亲和层析技术钓取与 DNA 片段特异结合的蛋白, 继而验证其功能, 是解析放线菌生物合成调控机制的一种新策略<sup>[18]</sup>。在恰塔努加链霉菌 *Streptomyces chattanoogensis* L10 中, 利用 *wblAch* 启动子 DNA 亲和层析技术成功钓取到正调控蛋白 AdpAch<sup>[19]</sup>。因此, 本研究以 *acb* 基因簇的 2 个双向启动子  $P_{WV}$ 、 $P_{AB}$  为探针, 利用 DNA 亲和层析技术钓取到与该启动子区域结合的调控蛋白, 并通过体内基因强化表达与敲除确定了它们与阿卡波糖产生、阿卡波糖生物合成基因转录水平的相关性, 并实现了高产改造, 为深入解析阿卡波糖生物合成的转录调控机制及其高产奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒、引物:** 本研究中所用菌株、质粒和引物见表 1。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 实验所用限制性内切酶、反转录酶、EMSA 试剂盒等购自 Thermo Scientific 公司; 胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 各种抗生素购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白胨、酵母提取物等培养基相关试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司; 本研究所用引物和 DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。本研究所用仪器主要包括安捷伦公司的液相色谱、伯乐生命医学产品有限公司的 PCR 仪、宁波新芝生物科技有限公司的超声破碎仪、德国耶拿分析股份公司的荧光定量 PCR 仪、GE 公司的多功能激光扫描成像仪。

**1.1.3 培养基和培养方法:** LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母提取物 5。STY 菌株活化培养基(g/L): 蔗糖 30, 蛋白胨 5, 酵母提取物 5, 酪蛋白水解物 1, 磷酸氢二钾 1, 氯化钾 0.5, 硫酸亚铁 0.05, 琼脂 20。SM 培养基(g/L): 葡萄糖 15, 麦芽糖 10, 麦芽提取物 10, 甘油 10, 蛋白胨 5, 酵母提取物 5, 磷酸氢二钾 1, 酪蛋白水解物 1。SAM 培养基(g/L): 黄豆饼粉 20, 甘露醇 20, 琼脂 20, pH 7.2。种子培养基(g/L): 黄豆饼粉 40, 麦芽糖 15, 葡萄糖 10, 甘油 10, 可溶性淀粉 10, 碳酸钙 2.5, pH 7.2。发酵培养基(g/L): 麦芽糖 50, 葡萄糖 30, 谷氨酸 3, 磷酸氢二钾 1, 氯化铁 0.5, 黄豆饼粉 10, 碳酸钙 2.5, pH 7.2。游动放线菌具体培养方法均参照文献[20]。

### 1.2 钓取调控蛋白

**1.2.1 游动放线菌总蛋白提取:** 收集 50 mL 发酵后的游动放线菌菌丝体, 6500 r/min 离心 10 min 后以 10 mL buffer A (300 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)重悬, 清洗 2 次, 再以 50 mL binding buffer (10%甘油, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)重悬后,

表 1. 实验中所用菌株、质粒和引物

Table 1. Strains, plasmids and primers used in this study

Strains, plasmids, primers	Related features or sequences	Sources or references
<i>Actinoplanes</i> spp.		
SE50	Acarbose producer, wild-type strain	ATCC31042
SE50/110	Acarbose producer, high-yield strain	ATCC31044
QQ-2	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 $\Delta$ <i>treY</i>	[20]
WXM-01	QQ-2::ACPL_1889	This work
WXM-02	QQ-2::ACPL_4236	This work
WXM-03	QQ-2::ACPL_7303	This work
WXM-04	QQ-2::ACPL_6479	This work
WXM-05	QQ-2::ACPL_8104	This work
WXM-06	QQ-2 $\Delta$ ACPL_5445	This work
WXM-07	QQ-2 $\Delta$ ACPL_3989	This work
WXM-08	QQ-2::ACPL_7617	This work
WXM-09	QQ-2::ACPL_8270	This work
WXM-10	QQ-2::ACPL_5445	This work
WXM-11	QQ-2::ACPL_3989	This work
WXM-12	QQ-2 $\Delta$ ACPL_1889	This work
WXM-13	QQ-2 $\Delta$ ACPL_4236	This work
WXM-14	QQ-2 $\Delta$ ACPL_7303	This work
WXM-15	QQ-2 $\Delta$ ACPL_6479	This work
WXM-16	QQ-2 $\Delta$ ACPL_7617	This work
WXM-17	QQ-2::ACPL_1889/ACPL_4236/ACPL_7303/ACPL_6479/ACPL_8104	This work
WXM-18	WXM-17 $\Delta$ ACPL_5445 $\Delta$ ACPL_3989	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	Cloning host	GIBCO-BRL
ET12567(pUZ8002)	<i>recE</i> , <i>dam</i> <sup>-</sup> , <i>dcm</i> <sup>-</sup> , <i>hsdS</i> , <i>Cm</i> <sup>r</sup> , <i>Str</i> <sup>r</sup> , <i>Tet</i> <sup>r</sup> , <i>Km</i> <sup>r</sup> , for conjugation	[21]
BL21(DE3)	Protein expression host	Sangon biotech
Plasmids		
pLQ752	pJTU1278-derived vector with <i>codA</i> gene and the <i>tsr</i> gene replaced by <i>aac(3)IV</i>	[20]
pDR4-K*	<i>aac(3)IV</i> , <i>xylE-neo</i> , <i>kasOp</i> *	[22]
pSET152	<i>ori</i> <sup>TK2</sup> , <i>aac(3)IV</i> , <i>Ø31int</i> , <i>attP</i>	[23]
pET30a	<i>ori</i> <sup>BR322</sup> , <i>Km</i> <sup>r</sup> , <i>lacI</i> , His-tag and S-tag coding genes	Novagen
pLQ1450	pSET152-based plasmid for <i>ACPL_1889</i> overexpression	This work
pLQ1451	pSET152-based plasmid for <i>ACPL_4236</i> overexpression	This work
pLQ1452	pSET152-based plasmid for <i>ACPL_7303</i> overexpression	This work
pLQ1453	pSET152-based plasmid for <i>ACPL_6479</i> overexpression	This work
pLQ1454	pSET152-based plasmid for <i>ACPL_8104</i> overexpression	This work
pLQ1455	pLQ752-based plasmid for <i>ACPL_5445</i> inactivation	This work

(待续)

(续表 1)

pLQ1456	pLQ752-based plasmid for <i>ACPL_3989</i> inactivation	This work
pLQ1457	pSET152-based plasmid for <i>ACPL_7617</i> overexpression	This work
pLQ1458	pSET152-based plasmid for <i>ACPL_8270</i> overexpression	This work
pLQ1459	pSET152-based plasmid for <i>ACPL_5445</i> overexpression	This work
pLQ1460	pSET152-based plasmid for <i>ACPL_3989</i> overexpression	This work
pLQ1461	pLQ752-based plasmid for <i>ACPL_1889</i> inactivation	This work
pLQ1462	pLQ752-based plasmid for <i>ACPL_4236</i> inactivation	This work
pLQ1463	pLQ752-based plasmid for <i>ACPL_7303</i> inactivation	This work
pLQ1464	pLQ752-based plasmid for <i>ACPL_6479</i> inactivation	This work
pLQ1465	pLQ752-based plasmid for <i>ACPL_8270</i> inactivation	This work
pLQ1466	pLQ752-based plasmid for <i>ACPL_8104</i> inactivation	This work
pLQ1467	pLQ752-based plasmid for <i>ACPL_7617</i> inactivation	This work
pLQ1468	pET30a-based plasmid for <i>ACPL_1889</i> expression	This work
pLQ1469	pET30a-based plasmid for <i>ACPL_4236</i> expression	This work
pLQ1470	pET30a-based plasmid for <i>ACPL_7303</i> expression	This work
pLQ1471	pET30a-based plasmid for <i>ACPL_6479</i> expression	This work
pLQ1472	pET30a-based plasmid for <i>ACPL_8104</i> expression	This work
pLQ1473	pET30a-based plasmid for <i>ACPL_5445</i> expression	This work
pLQ1474	pET30a-based plasmid for <i>ACPL_3989</i> expression	This work
pLQ1475	pET30a-based plasmid for <i>ACPL_7617</i> expression	This work
pLQ1476	pET30a-based plasmid for <i>ACPL_8270</i> expression	This work
pLQ1477	pSET152-based plasmid for the overexpression of <i>ACPL_1889</i> , <i>ACPL_4236</i> , <i>ACPL_7303</i> , <i>ACPL_6479</i> and <i>ACPL_8104</i>	This work
Primers	Sequences (5'→3')	
P <sub>WV</sub> -F	CTCGAAGCTGATGTCGTCGAC	
P <sub>WV</sub> -R	GAAGTCGAGGTATTCCACACC	
P <sub>AB</sub> -F	GAGATTTCTGAGATTGCCTC	
P <sub>AB</sub> -R	CGAGCCGTCACCCAGCAAC	
ACPL_1889GB-F	TTGAAGAGGTGACGTCATGGCAGCCACTGGCACAGCT	
ACPL_1889GB-R ( <i>Bam</i> H I)	CTGGATCCTCACGCCTTCTTGCG	
ACPL_4236GB-F	TTGAAGAGGTGACGTCATGGGAAGGCCGCGAGCGTT	
ACPL_4236GB-R ( <i>Not</i> I)	CTGCGGCCGCTCACCGACAACGCTGATCTTGCC	
ACPL_7303GB-F	TTGAAGAGGTGACGTCATGAAGCTGGTGACCGCGGT	
ACPL_7303GB-R ( <i>Bam</i> H I)	CTGGATCCTCAGAGGGCGTCGAGGC	
ACPL_1889GB-F	TTGAAGAGGTGACGTCATGGCAGCCACTGGCACAGCT	
ACPL_1889GB-R ( <i>Bam</i> H I)	CTGGATCCTCACGCCTTCTTGCG	
ACPL_5445GB-F	GTTGAAGAGGTGACGTCGTGCGCGTGAAGTTGATGGC	
ACPL_5445GB-R ( <i>Bam</i> H I)	GTGGATCCTCAGTACTTGC GGTCGGAA	
ACPL_3989GB-F	GTTGAAGAGGTGACGTCGTGCCATTGACCTGATCGC	
ACPL_3989GB-R ( <i>Bam</i> H I)	GTGGATCCCTAAAGCAGATTGAGGGCCC	

(待续)

(续表 1)

ACPL_7617GB-F	TTGAAGAGGTGACGTCGTGTACGTCTCGGCTCGCAC
ACPL_7617GB-R ( <i>Bam</i> H I)	GTGGATCCCTAGTTCTTCTTTATTGAGG
ACPL_8270GB-F	TTGAAGAGGTGACGTCATGACCGCTGAGCAGCTCATCTCGT
ACPL_8270GB-R ( <i>Bam</i> H I)	GCGGATCCCTACCGGCCCGGACCTCGTCGAT
ACPL_8104GB-F	TTGAAGAGGTGACGTCATGGATGAGGTACTGGCGCG
ACPL_8104GB-R ( <i>Bam</i> H I)	CTGGATCCCTCAGACCCGGGCGCGCCGGGCGAGAC
kasOp*-F ( <i>Xba</i> I)	GCTCTAGATGTTACATTTCGAACGGTCTC
kasOp*-R	GACGTCACCTCTTCAACTCAG
ACPL_1889-LF ( <i>Xba</i> I)	GCTCTAGAAAGGGCATCTGCTGCTCGA
ACPL_1889-LR ( <i>Eco</i> R I)	CGGAATTCGAATCCTCACGTCGAGACA
ACPL_1889-RF ( <i>Eco</i> R I)	CGGAATTCGAAGAAGGCGTGACGGCGGACA
ACPL_1889-RR ( <i>Hind</i> III)	CCAAGCTTCGTCGAGGTTGTACGACTCG
ACPL_1889-YZ-F	TCTTGAGAGCCTTCCGGGT
ACPL_1889-YZ-R	TGGAAGCCGGCTATCCGATC
ACPL_4236-LF ( <i>Xba</i> I)	GCTCTAGACTGCGATGAACGATGTCGCG
ACPL_4236-LR ( <i>Eco</i> R I)	CTGGATCCCTCATGCCGTCACCCGCCCGGCTCG
ACPL_4236-RF ( <i>Eco</i> R I)	GAGAATTCATGCCGGTCTATGACAAACCGATG
ACPL_4236-RR ( <i>Hind</i> III)	GCAAGCTTTCACCCGGGCGCGGCGGTCA
ACPL_4236-YZ-F	GAGAATTCATGAAAATCTTGGTCACCGG
ACPL_4236-YZ-R	GCAAGCTTTCAGGTCCACCAGGAACGGT
ACPL_7303-LF ( <i>Xba</i> I)	GAGAATTCGTGAGCAGGCAGGCCGACCT
ACPL_7303-LR ( <i>Eco</i> R I)	CGGAATTCGCTTCATGCTCAGTCCCTCC
ACPL_7303-RF ( <i>Eco</i> R I)	CGGAATTCACGCCCTCTGATCCCATGAC
ACPL_7303-RR ( <i>Hind</i> III)	CCAAGCTTGATGTCCGGCAGCAGCAAGT
ACPL_7303-YZ-F	ACCGTGTCTCCCTGGTTCGT
ACPL_7303-YZ-R	CAGGTCGAGGTCGCTGTA
ACPL_6479-LF ( <i>Xba</i> I)	GCTCTAGACTGTCCAGGTCGTACGAGAC
ACPL_6479-LR ( <i>Eco</i> R I)	CGGAATTCGTACTGTGCTGTGCCTTCCC
ACPL_6479-RF ( <i>Eco</i> R I)	CGGAATTCGTTCTTCGCGAGCTGACGCGCT
ACPL_6479-RR ( <i>Hind</i> III)	CCAAGCTTCCAACGCCGAGTACGAGATG
ACPL_6479-YZ-F	CACGGGACGGGTCGTTAAAG
ACPL_6479-YZ-R	CTACGAGCTGCTCTTCGAGC
ACPL_7617-LF ( <i>Xba</i> I)	GCTCTAGAGGAGGATCTCGGTCATGAGG
ACPL_7617-LR ( <i>Eco</i> R I)	GTGAATTCCTTGACCAGACGTGGGTGC
ACPL_7617-RF ( <i>Eco</i> R I)	GTGAATTCGAACTCTCCACCACCTCAA
ACPL_7617-RR ( <i>Hind</i> III)	GCAAGCTTCTCGTCCATCAGCAGCACGTC
ACPL_7617-YZ-F	GAGCCCTGGAACATCAGGTG
ACPL_7617-YZ-R	CGATGTAGGTGGCGTTCGATC
ACPL_5445-LF ( <i>Xba</i> I)	GCTCTAGAGTTGGACCACCACGTTGGAC
ACPL_5445-LR ( <i>Eco</i> R I)	GTGAATTCCTGGATCGACTTGGTGTTCG

(待续)

(续表 1)

ACPL_5445-RF ( <i>EcoR</i> I)	GTGAATTCGTCAAGGACAAGCAGGACGTC
ACPL_5445-RR ( <i>Hind</i> III)	GCAAGCTTGTGTTGTCCAGCTCCTCGAC
ACPL_5445-YZ-F	CTCTCTTGACGCGCACGATG
ACPL_5445-YZ-R	CTGGTACACGGTGCTGATCC
ACPL_3989-LF ( <i>Xba</i> I)	GCACTAGTGGAACTGCAGGAGTCCTTCC
ACPL_3989-LR ( <i>EcoR</i> I)	GTGAATTCGCTACGACCAGAAGGTGGTC
ACPL_3989-RF ( <i>EcoR</i> I)	GTGAATTCCTCGATGTACGTCTCGGTG
ACPL_3989-RR ( <i>Hind</i> III)	GCAAGCTTGCTCGATGAACAGGTTGGC
ACPL_3989-YZ-F	CGCATGTTCTAGCCGTGAAG
ACPL_3989-YZ-R	GCTGATCGAGACGGACTACC
ACPL_1889-EX-F ( <i>EcoR</i> I)	CGGAATTCATGGCAGCCACTGGCACAGCT
ACPL_1889-EX-R ( <i>Hind</i> III)	CCAAGCTTTCACGCCTTCTTGCG
ACPL_3989-EX-F ( <i>EcoR</i> I)	CTGAATTCGTGTCCATTGACCTGATCGCGGATTCACC
ACPL_3989-EX-R ( <i>Hind</i> III)	GCAAGCTTCTAAAGCAGATTGAGGGCCCCG
ACPL_4236-EX-F ( <i>EcoR</i> I)	CGGAATTCATGGGAAGGCCGCGAGCGTT
ACPL_4236-EX-R ( <i>Hind</i> III)	CCAAGCTTTCACCGACAACGCTGATCTTGCC
ACPL_5445-EX-F ( <i>EcoR</i> I)	CTGAATTCGTGCGCGTGAAGTTGATGGC
ACPL_5445-EX-R ( <i>Hind</i> III)	GCAAGCTTTCAGTACTTGCGGGTCGGAAGCG
ACPL_6479-EX-F ( <i>EcoR</i> I)	CTGAATTCATGCCGTCTGAGTACGCGAAGTCAC
ACPL_6479-EX-R ( <i>Hind</i> III)	GCAAGCTTTCAGCTCGCGAAGAACGCCCG
ACPL_7303-EX-F ( <i>EcoR</i> I)	CGGAATTCATGAAGCTGGTGACCGCGGT
ACPL_7303-EX-R ( <i>Hind</i> III)	GCAAGCTTTCAGAGGGCGTCGAGGC
ACPL_8104-EX-F ( <i>EcoR</i> I)	CGGAATTCATGGATGAGGTACTGGCGCG
ACPL_8104-EX-R ( <i>Hind</i> III)	CCAAGCTTTCAGACCCGGGCGCGCCGGGCGAGAC
ACPL_8270-EX-F ( <i>EcoR</i> I)	CTGAATTCATGACCGCTGAGCAGCTCATCTCGT
ACPL_8270-EX-R ( <i>Hind</i> III)	GCAAGCTTCTACCGCCCCGGACCTCGTCGAT
ACPL_7617-EX-F ( <i>EcoR</i> I)	CTGAATTCGTGTACGTCTCGGCTCGCACGGACTA
ACPL_7617-EX-R ( <i>Hind</i> III)	GCAAGCTTCTAGTTCTTCTTTATTGAGGTGGTGGAG
hrdB-F	GAGGTCGAGCTCTCCAAGG
hrdB-R	CGATCGAGACGACCAGTCG
acbA-q-F	GTGCTGTCCATCGAGGAGAAAC
acbA-q-R	GTTGACCTCGGTGATCTCCAG
acbB-q-F	CCTCGTTTCAGCTTCGTTTCG
acbB-q-R	CGTCCAGTAGCACCTGAGTG
acbW-q-F	CAGTCCTTCGGTGATGATGC
acbW-q-R	GACATCACCAGCATCTGCG
acbV-q-F	GACCACCTCACCACGCTC
acbV-q-R	CACGTCCCAGTGACCAG
Pw-FAM-F	ACGATCATGCCGGTCGTGC
Pw-R	CGCGACATTGTGGAAACTCGG
Pv-F	CTGAGTGTGCGGCTCGCTG
Pv-FAM-R	CGCCGGTGTGAAACGAAC
Pa-F	CCGCCGGTGACCAAGATTTT
Pa-FAM-R	TCACCGGTCGAAGCCGTGAG
Pb-FAM-F	GTTACAAAATGGGACCCG
Pb-R	CCAGCAATATCCGCGCAC

使用超声破碎仪进行破碎, 超声一个工作周期总时长 5 min, 超声 3 s, 暂停 5 s, 功率为 40%, 共重复 3 个工作周期。超声破碎结束后在 4 °C、12000 r/min 离心 25 min, 取上清, 重复离心 1 次, 使用 3 kDa 超滤管超滤, 得到浓缩的游动放线菌总蛋白。

**1.2.2 DNA 亲和层析:** 通过 PCR 扩增得到生物素标记的 DNA 探针, 将 100  $\mu$ L 亲和层析所用填料(GE 公司的 Streptavidin-agarose)离心弃去上清, 用 100  $\mu$ L binding buffer 重悬后与 10  $\mu$ g 左右 DNA 探针混合均匀, 离心弃去上清, 加入 1 mL binding buffer 重悬后离心除去未与填料结合的 DNA。将结合有探针的填料与 150 mg 左右的总蛋白均匀混合, 同时加入 250  $\mu$ g 左右鱼精 DNA 以减少非特异性蛋白的结合。将整个体系放置于 4 °C 冰浴环境, 旋转混匀 1 h。离心, 弃去上清, 将沉淀重悬在 1 mL binding buffer 中, 离心并去上清, 重复 1-2 次。将结合有蛋白的 DNA 探针沉淀用 100  $\mu$ L 的 elution buffer (10% V/V 甘油, 20 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, 1 mol/L EDTA, pH 6.8)重悬, 离心, 上清液即为与 DNA 探针相结合的蛋白。蛋白质谱检测由上海厚基生物科技有限公司完成, 采用 Label-free 定量蛋白质组学分析技术, 通过 LC-MS/MS 技术对蛋白质酶解肽段进行质谱分析。

### 1.3 突变株构建

**1.3.1 基因敲除:** 以 *ACPL\_1889* 基因(本实验调控蛋白基因序列均可在 NCBI 数据库中获得, GenBank: CP003170.1)敲除菌株的构建为例。以游动放线菌 SE50/110 基因组 DNA 为模板, 利用 *ACPL\_1889-LF/R* 和 *ACPL\_1889-RF/R* 两对引物, 分别扩增出带有酶切位点的上游和下游同源臂。将测序正确的片段经酶切后连接至游离型载体

pLQ752 中, 获得同源重组质粒 pLQ1461。将重组质粒转入大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)中, 采用菌丝体接合转移的方式<sup>[20]</sup>将质粒导入游动放线菌 QQ-2 中, 于 SFM 培养基 30 °C 培养 5-7 d 后, 挑出接合子扩大培养, 经转接 2 轮无抗性 SM 培养基松弛培养和双交换筛选, 获得基因缺失突变候选株。提取基因组 DNA, 以 *ACPL\_1889-YZ-F/R* 为引物进行 PCR 验证, 得到突变株 WXM-12。

**1.3.2 基因强化表达:** 以 *ACPL\_1889* 基因强化表达菌株的构建为例。以 pDR4-K\*质粒 DNA 为模板, 利用引物 *kasOp\*-F/R*, 通过 PCR 扩增得到 126 bp 的 *kasOp\**启动子片段。以游动放线菌 SE50/110 基因组 DNA 为模板, 利用引物 *ACPL\_1889GB-F/R*, 通过 PCR 扩增得到 228 bp 的 *ACPL\_1889* 基因片段。以获得的 *kasOp\**启动子片段和 *ACPL\_1889* 基因片段为模板, 利用引物 *kasOp\*-F/ACPL\_1889GB-R*, 通过重叠 PCR 扩增得到 354 bp 的 *kasOp\*-ACPL\_1889* 基因片段。将测序正确的基因片段经酶切后连接至载体 pSET152 中, 得到整合型质粒 pLQ1450。将质粒转入大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)中, 采用菌丝体接合转移的方式<sup>[20]</sup>将质粒导入 QQ-2 中。于 SFM 培养基 30 °C 培养 5-7 d 后, 挑出接合子扩大培养, 经过抗性验证及提取基因组 DNA 和 PCR 验证后, 得到基因强化表达突变株 WXM-01。

### 1.4 突变株发酵

将菌液涂布至 STY 平板 30 °C 培养 2-3 d 后, 将菌体接种至 SM 培养基, 30 °C、220 r/min 培养 30-36 h, 转接 4 mL 至 40 mL 种子培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 30-36 h, 然后转接 7.5 mL 种子液至 42.5 mL 发酵培养基中, 根据实验需求于 30 °C、220 r/min 培养 2-4 d。



## 1.5 RT-qPCR 分析阿卡波糖生物合成基因的转录水平

收取 1 mL 发酵 48 h 的菌体, 离心弃去上清加入 1 mL 带有玻璃珠的 Redzol 溶液, 在细胞破碎仪中破碎细胞。加入 300  $\mu$ L 酚-氯仿, 混合均匀于 4  $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 重复此步骤 3-4 直到蛋白几乎除净。加入 200  $\mu$ L 无水乙醇, 充分混匀后加入离心柱中, 于 4  $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 2 min, 弃去收集管内液体, 向离心柱中心加入 50  $\mu$ L DEPC 处理过的水, 静置片刻后于 4  $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 2 min, 获得总 mRNA, 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板、编码 RNA 聚合酶 Sigma 因子的 *hrdB* 基因 (GenBank No. AEV82165.1) 作为内参进行 RT-qPCR, 使用 SYBR Green 为信号检测染料, 具体计算分析方法参照文献[24]。

## 1.6 体外蛋白表达及纯化

**1.6.1 体外蛋白菌株的构建:** 以 ACPL\_1889 蛋白表达菌株的构建为例。以游动放线菌 SE50/110 基因组 DNA 为模板, 利用引物 ACPL\_1889-EX-F/R, 通过 PCR 扩增得到 228 bp 带有 *EcoR* I/*Hind* III 的 ACPL\_1889 基因片段。将测序正确的基因片段经酶切后连接至载体 pET30a 中, 得到蛋白表达质粒 pLQ1466。将蛋白表达质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 获得蛋白表达菌株。

**1.6.2 蛋白表达与纯化:** 将构建好的蛋白表达菌株在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中于 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 条件过夜培养, 然后按 2% 的转接量转接至 1 L 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基继续培养至  $OD_{600}$  达到 0.6-0.8 时, 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG, 在 16  $^{\circ}$ C 条件下继续诱导培养 18-20 h。然后离心收集菌体, 用 buffer A 重悬菌体。利用

超声破碎仪进行破碎, 离心收集上清, 经镍柱亲和层析后, 以 20 mL 浓度为 50 mmol/L 的咪唑洗去杂蛋白, 再以 10 mL 浓度为 250 mmol/L 的咪唑洗脱目的蛋白。经 Millipore 超滤管脱盐浓缩后, 保存于 10% 甘油中。

## 1.7 凝胶阻滞实验

以游动放线菌 SE50/110 基因组 DNA 为模板, 利用 FAM 荧光标记的引物 P<sub>w</sub>-FAM-F/P<sub>w</sub>-R, 通过 PCR 扩增得到 100 ng 荧光标记的 DNA 探针。将获取的目的蛋白依次稀释到不同浓度 (0-4000 nmol), 配制 EMSA 反应体系, 同时以 1  $\mu$ g 非标记探针作为特异性竞争对照、1  $\mu$ g poly(dI:dC) 作为非特异性竞争对照, 25  $^{\circ}$ C 反应 30 min。在 4  $^{\circ}$ C、100 V 下进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 60 min, 在多功能激光扫描仪中观察结合情况。

## 1.8 阿卡波糖产量分析

取 1 mL 发酵液离心, 收集上清, 用 ddH<sub>2</sub>O 将上清稀释 5 倍后加入等体积氯仿, 离心除去蛋白质杂质。取上清, 经滤膜过滤, 利用 HPLC 进行含量检测。使用 Agilent phenomenex NH<sub>2</sub> 柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为 65% 乙腈-35% 磷酸盐 (0.6 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.704 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 100 mL 乙腈), 检测波长为 210 nm。

## 2 结果和分析

### 2.1 钓取阿卡波糖生物合成基因簇的转录调控蛋白

在 SE50/110 中, 负责阿卡波糖生物合成的基因成簇分布, 组成 *acb* 基因簇。其中 P<sub>WV</sub>、P<sub>AB</sub> 两个双向启动子控制了阿卡波糖生物合成基因的转录, P<sub>AB</sub> 控制 *acbA* 与 *acbB* 的转录, P<sub>WV</sub> 控制

*acbVUSRPIJKMLNOC* 及转运基因 *acbWXY* 的转录。但是在 *acb* 基因簇中未发现调控基因的存在, 因此我们推测 *acb* 基因簇的转录很可能受到基因组中其他位置的调控因子的调控。基于上述假设, 本研究利用  $P_{WV}$ 、 $P_{AB}$  两个双向启动子区域的 DNA 作为探针(图 5-A), 以亲和层析的方式钓取与启动子特异结合的蛋白, 并结合蛋白质组质谱分析, 从中筛选出可能的转录调控因子。亲和层析后将洗脱液经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测, 初步判断是否存在蛋白及洗脱特异性。

将洗脱 2 次与 3 次的蛋白洗脱液分别进行蛋白质组质谱检测, 质谱鉴定结果显示, 与  $P_{AB}$  结合的蛋白共有 228 个, 与  $P_{WV}$  结合的蛋白共有 220 个。通过与 KEGG 数据库进行比对分析, 在  $P_{AB}$  结合蛋白中有 23 个、在  $P_{WV}$  结合蛋白中有 16 个被注释为转录调控相关的蛋白; 被直接注释为调控因子的蛋白共有 14 个, 其中 ACPL\_566、ACPL\_1896、ACPL\_6780、ACPL\_3083 只与  $P_{AB}$  启动子区域结合, ACPL\_151 只与  $P_{WV}$  启动子区域结合, ACPL\_1889、ACPL\_4236、ACPL\_7303、ACPL\_6479、ACPL\_8104、ACPL\_3989、ACPL\_5445、ACPL\_7617、ACPL\_8270 与  $P_{AB}$ 、 $P_{WV}$  两个启动子区域均结合, 最终确定这 9 个蛋白

(表 2)的编码基因为候选基因, 进行后续的体内、体外功能验证。

## 2.2 候选基因体内功能分析

### 2.2.1 候选基因强化表达菌株构建及产量分析:

将 ACPL\_1889、ACPL\_4236、ACPL\_7303、ACPL\_6479、ACPL\_8104、ACPL\_7617、ACPL\_8270、ACPL\_5445、ACPL\_3989 经 PCR 扩增后, 引入强启动子 *kasOp\** 并克隆至载体 pSET152 中获得整合型质粒 pLQ1450 (图 2-A)、pLQ1451、pLQ1452、pLQ1453、pLQ1454、pLQ1457、pLQ1458、pLQ1459、pLQ1460, 采用菌丝体接合转移的方式将质粒导入游动放线菌 QQ-2 中, 分别获得基因强化表达突变株 WXM-01 (图 2-B)、WXM-02、WXM-03、WXM-04、WXM-05、WXM-08、WXM-09、WXM-10、WXM-11。将质粒整合菌株与突变株进行发酵, 利用 HPLC 检测发酵液中阿卡波糖产量。结果显示(图 2-C), 强化表达 ACPL\_1889、ACPL\_4236、ACPL\_7303、ACPL\_6479、ACPL\_8104, 突变株的产量比整合有载体 pSET152 的对照菌株分别提高了 25%、26%、18%、22%、15%; 强化表达 ACPL\_5445、ACPL\_7617、ACPL\_3989、ACPL\_8270, 突变株的产量比对照菌株分别降低了 12%、23%、39%、9%。

表 2. 质谱分析确定 9 个候选调控蛋白

Table 2. Nine candidate regulatory proteins identified by mass spectrometry

Proteins	Score	Putative gene products
ACPL_6479	79	XRE-family transcriptional regulator
ACPL_5445	72	HTH-type transcriptional repressor PurR
ACPL_1889	54	Transcriptional regulator
ACPL_8104	51	Regulatory protein HlyX
ACPL_7303	47	Nitrogen regulatory protein P-II
ACPL_8270	39	GntR-family transcriptional regulator
ACPL_4236	35	YezE-like HTH-type transcriptional regulator
ACPL_3989	23	HTH-type transcriptional regulator MalT
ACPL_7617	16	BadM/Rrf2-family transcriptional regulator

\*score: The score of the results of mass spectrometry and the comparison results of the corresponding proteins in the database provided.

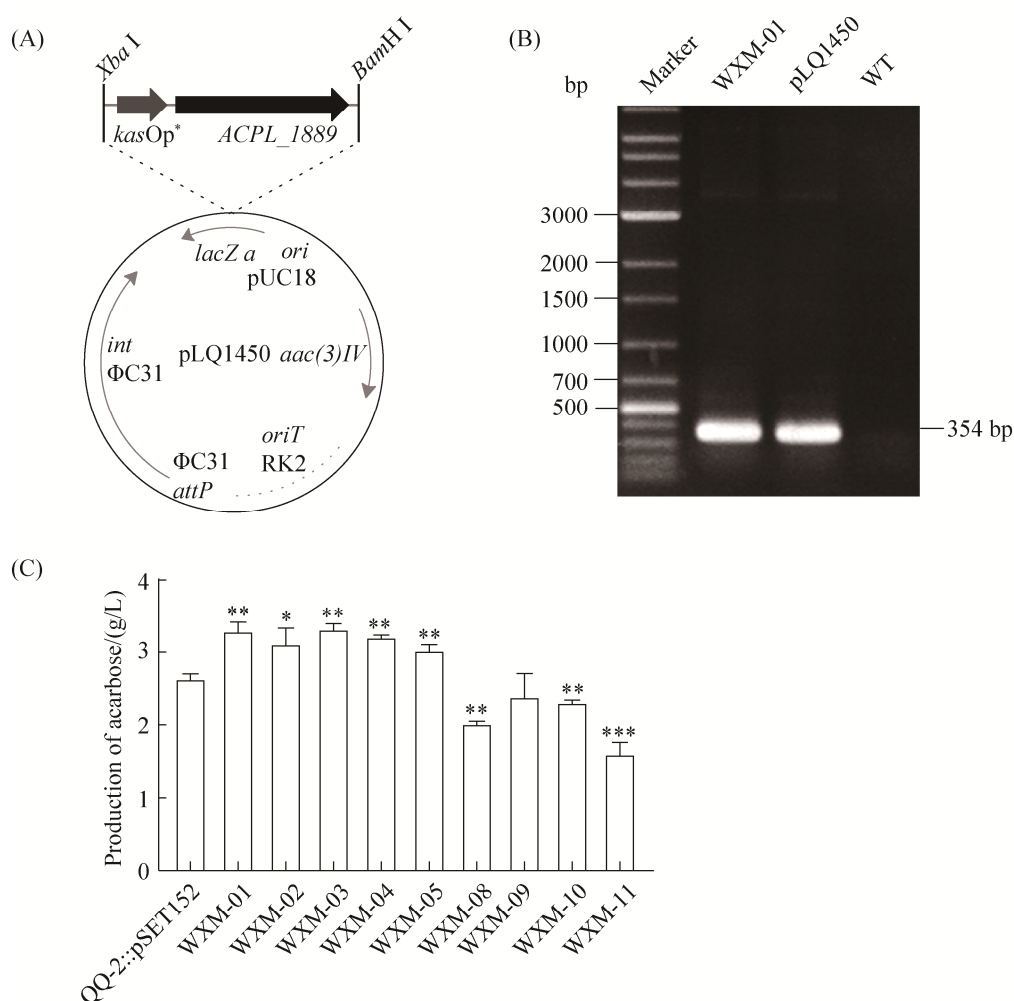


图 2. 调控基因强化表达对阿卡波糖产量的影响

Figure 2. Effects of the overexpression of regulatory genes on acarbose yield. A: recombinant plasmid pLQ1450 for the overexpression of *ACPL\_1889*; B: verification of WXM-01 by PCR amplification of the *kasOp\**-*ACPL\_1889* fragment; C: yield analysis of mutants with gene overexpression. \*: significant difference at  $P < 0.05$ ; \*\*: significant difference at  $P < 0.01$ ; \*\*\*: significant difference at  $P < 0.001$ . Error bars, mean  $\pm$  SD ( $n=3$  biological replicates).

**2.2.2 候选基因敲除菌株构建及产量分析:** 通过 PCR 扩增, 分别获得 *ACPL\_5445*、*ACPL\_3989*、*ACPL\_1889*、*ACPL\_4236*、*ACPL\_7303*、*ACPL\_6479*、*ACPL\_8270*、*ACPL\_8104*、*ACPL\_7617* 的左右同源臂, 酶切连接至 pLQ752 中构建同源重组质粒 pLQ1455、pLQ1456、pLQ1461、pLQ1462、pLQ1463、pLQ1464、pLQ1465、pLQ1466、pLQ1467。采用菌丝体接合转移的方式

将质粒导入游动放线菌 QQ-2 中, 获得基因缺失突变株 WXM-06、WXM-02、WXM-12、WXM-13、WXM-14、WXM-15、WXM-16。未能获得 *ACPL\_8270*、*ACPL\_8104* 这 2 个基因的敲除突变菌株, 推测它们可能为必需基因。将出发菌株与突变株进行发酵, 利用 HPLC 检测发酵液中阿卡波糖含量。结果显示(图 3-C), 相较于出发菌株, *ACPL\_5445* 和 *ACPL\_3989* 突变株的产量分别提高

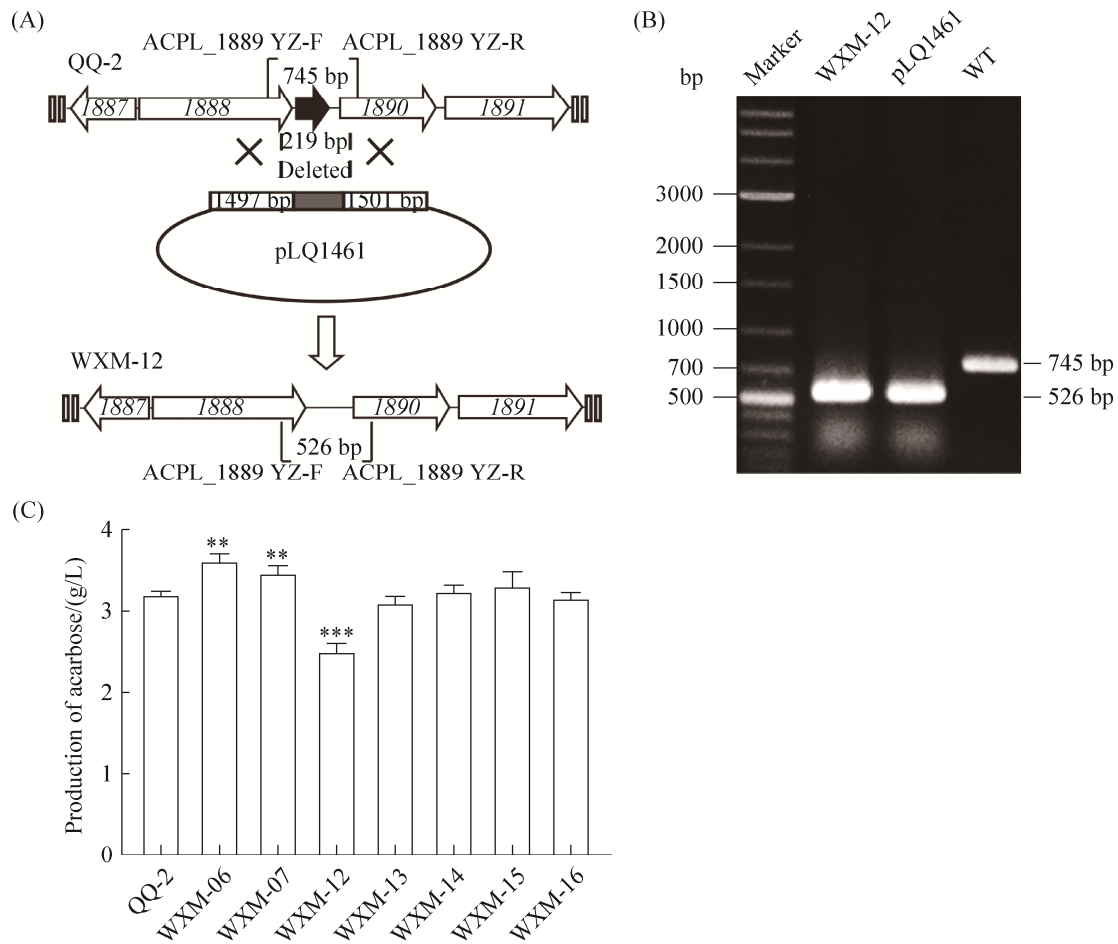


图 3. 调控基因缺失对阿卡波糖产量的影响

Figure 3. Effects of the deletions of regulatory genes on acarbose yield. A: schematic deletion of *ACPL\_1889*; B: verification of WXM-12 by PCR amplification; C: yield analysis of mutants with gene deletion. \*: significant difference at  $P < 0.05$ ; \*\*: significant difference at  $P < 0.01$ ; \*\*\*: significant difference at  $P < 0.001$ . Error bars, mean  $\pm$  SD ( $n=3$  biological replicates).

了 13%、8%，*ACPL\_1889* 突变株的产量降低了 22%，*ACPL\_7617*、*ACPL\_7303*、*ACPL\_4236*、*ACPL\_6479* 突变株的产量无明显变化。

**2.2.3 阿卡波糖生物合成基因转录水平分析：**基因强化表达和敲除突变株产量结果显示，*ACPL\_1889* 可能是正调控因子，*ACPL\_5445* 和 *ACPL\_3989* 可能是负调控因子，因此，利用 qPCR 分析这 3 个基因的突变株中阿卡波糖生物合成基因 *acbW*、*acbV*、*acbA* 和 *acbB* 的转录水平。收集

发酵第 2 天的菌体进行 RNA 提取和 qPCR 分析。结果显示(图 4)，与对照菌株相比，强化表达 *ACPL\_3989* 使 *acbW*、*acbV*、*acbB* 的表达水平分别下调约 4 倍、2 倍和 5 倍，敲除 *ACPL\_3989* 使 *acbW* 和 *acbA* 的表达水平分别提高了约 90 倍和 40 倍；强化表达 *ACPL\_1889* 使 *acbW*、*acbV*、*acbA* 的表达水平均提高了约 2 倍、*acbB* 的表达水平提高了约 6 倍，敲除 *ACPL\_1889* 使 *acbW*、*acbA*、*acbB* 的表达水平下调约 2 倍，*acbV* 表达水平下调

约 9 倍; 强化表达 *ACPL\_5445* 后 *acbW*、*acbV*、*acbA*、*acbB* 表达水平变化不大, 而敲除 *ACPL\_5445* 使 *acbW*、*acbV*、*acbA*、*acbB* 的表达水平分别提高了约 3 倍、2 倍、5.6 倍和 4.7 倍。这些结果进一步表明, *ACPL\_1889* 对阿卡波糖的生物合成起到正调控作用, *ACPL\_5445* 和 *ACPL\_3989* 对阿卡波糖的生物合成起到负调控作用。

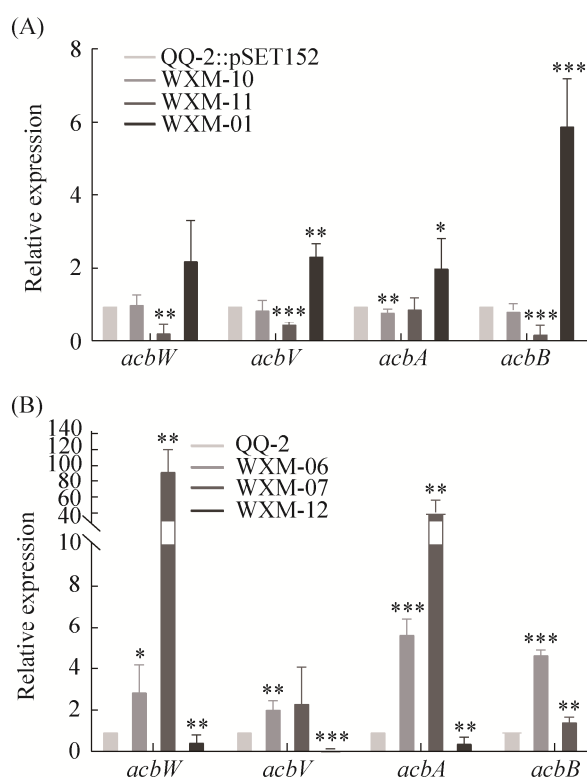


图 4. 调控基因的强化表达或缺失对阿卡波糖生物合成基因转录水平的影响

Figure 4. Effects of the overexpression or deletions of regulatory genes on the transcription of acarbose biosynthetic genes. A: effects of the overexpression of regulatory genes on the transcription of acarbose biosynthetic genes *acbW*, *acbV*, *acbA* and *acbB*; B: effects of the deletions of regulatory genes on the transcription of acarbose biosynthetic genes *acbW*, *acbV*, *acbA* and *acbB*. \*: significant difference at  $P < 0.05$ ; \*\*: significant difference at  $P < 0.01$ ; \*\*\*: significant difference at  $P < 0.001$ ; Error bars, mean  $\pm$  SD ( $n=3$  biological replicates).

## 2.3 候选调控蛋白的体外功能分析

为实现候选调控蛋白的异源表达, 首先利用 pET30a 载体构建 *ACPL\_1889*、*ACPL\_4236*、*ACPL\_7303*、*ACPL\_6479*、*ACPL\_8104*、*ACPL\_5445*、*ACPL\_3989*、*ACPL\_7617*、*ACPL\_8270* 的表达质粒 pLQ1468、pLQ1469、pLQ1470、pLQ1471、pLQ1472、pLQ1473、pLQ1474、pLQ1475、pLQ1476。将这些质粒导入 BL21(DE3), 经诱导表达和镍柱纯化得到可溶性蛋白。

按照 1.6 的实验方法, 分别以 FAM 荧光标记的  $P_{WV}$  和  $P_{AB}$  中 4 个启动子区域 DNA  $P_W$ 、 $P_V$ 、 $P_A$ 、 $P_B$  (图 5-A) 为探针, 利用凝胶阻滞实验 (EMSA) 检测候选蛋白与启动子区域的结合特异性, 以 10 倍浓度非标记启动子探针作为特异性竞争对照、poly (dI:dC) 作为非特异性竞争对照。结果显示, *ACPL\_1889* 蛋白与  $P_{AB}$  和  $P_{WV}$  两个启动子 DNA 均能结合, 发生迁移阻滞, 随着蛋白浓度的增加阻滞越明显, 加入特异性竞争性探针的阻滞明显减弱, 加入非特异性竞争性探针的阻滞也有不同程度的减弱, 说明 *ACPL\_1889* 能特异性地结合  $P_{AB}$  和  $P_{WV}$  两个启动子 DNA, 但结合能力不强; *ACPL\_3989* 蛋白能与  $P_{AB}$  启动子 DNA 结合, 发生迁移阻滞, 随着蛋白浓度的增加阻滞越强, 加入特异性竞争性探针的阻滞消失, 加入非特异性竞争性探针的阻滞无明显变化, 说明 *ACPL\_3989* 蛋白与  $P_{AB}$  启动子 DNA 有特异性结合。

## 2.4 组合突变提高阿卡波糖产量

候选调控蛋白的体内验证结果显示, 强化表达 *ACPL\_1889*、*ACPL\_4236*、*ACPL\_7303*、*ACPL\_6479*、*ACPL\_8104* 或者敲除基因 *ACPL\_5445*、*ACPL\_3989*, 突变株的产量提高了 8%–26%。因此, 为获取更高产的阿卡波糖

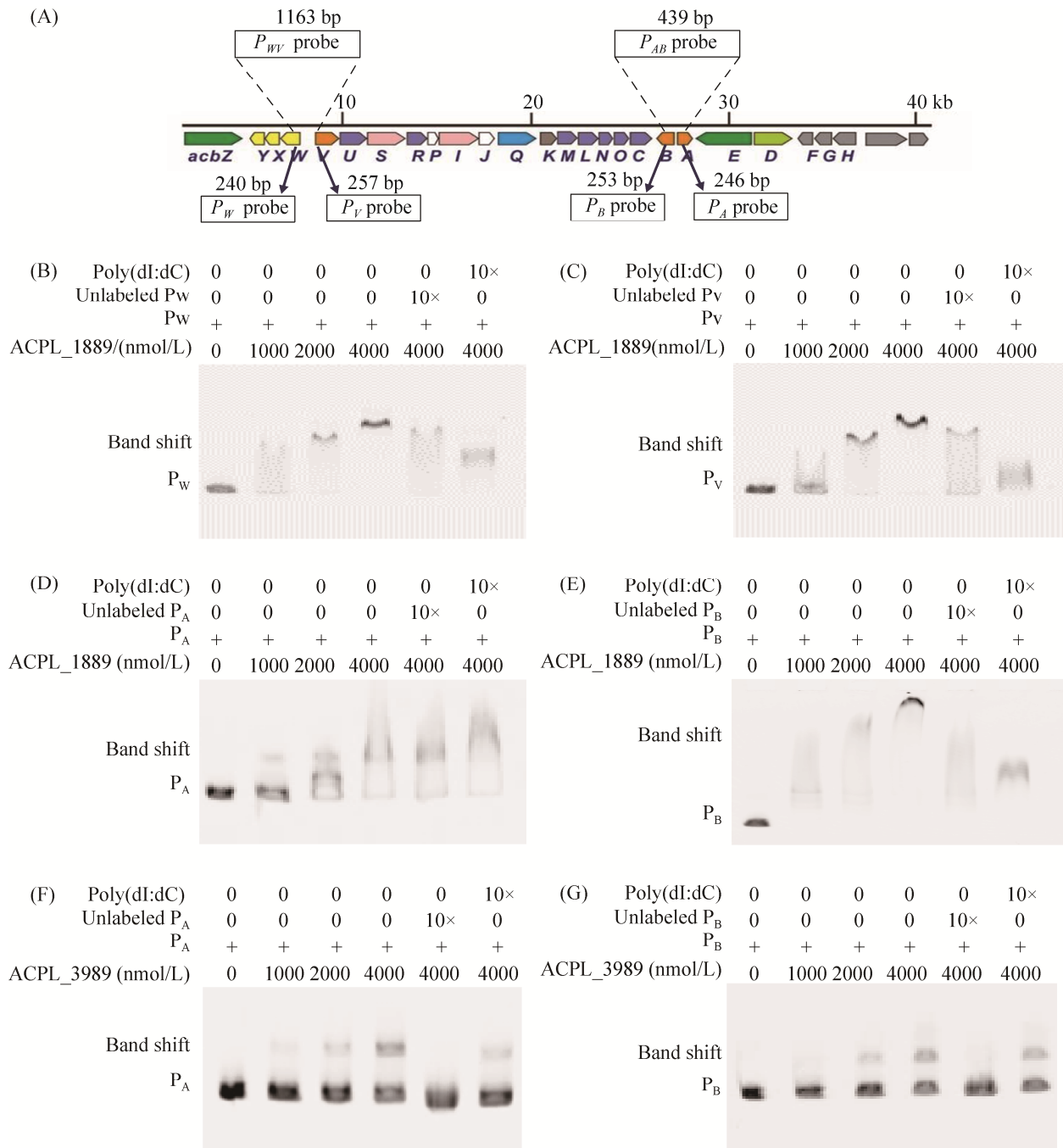


图 5. 调控蛋白与启动子探针的相互作用

Figure 5. Acarbose biosynthetic gene cluster and interactions between proteins and promoter probes. A: acarbose biosynthetic gene cluster. The  $P_{WW}$  and  $P_{AB}$  probes for DNA affinity chromatography are indicated. The probes  $P_W$ ,  $P_V$ ,  $P_A$ , and  $P_B$  for EMSA are also indicated. B: the interaction between ACPL\_1889 and  $P_W$ . C: the interaction between ACPL\_1889 and  $P_V$ . D: the interaction between ACPL\_1889 and  $P_A$ . E: the interaction between ACPL\_1889 and  $P_B$ . F: the interaction between ACPL\_3989 and  $P_A$ . G: the interaction between ACPL\_3989 and  $P_B$ . Lane 1–4: increasing amounts of proteins (0, 1000, 2000, 4000 nmol/L) were used with 100 ng biotin-labeled probes; lane 5: 1  $\mu$ g of unlabeled probe was added as specific competition control; lane 6: 1  $\mu$ g of poly(dI:dC) was added as nonspecific competition control.

突变株, 首先将 *ACPL\_1889*、*ACPL\_4236*、*ACPL\_7303*、*ACPL\_6479*、*ACPL\_8104* 这 5 个基因在 pLQ752 中串联, 构建重组质粒 pLQ1477 (图 6-A)。采用菌丝体接合转移的方式将质粒导入游动放线菌 QQ-2 中, 获得突变株 WXM-17。经

HPLC 检测, 阿卡波糖产量相较于整合空载质粒的 QQ-2 提高了 27%。在此基础上进一步敲除 *ACPL\_5445*、*ACPL\_3989*, 获得突变株 WXM-18, 其阿卡波糖产量相较于整合空载质粒的 QQ-2 提高了 32% (图 6-B)。

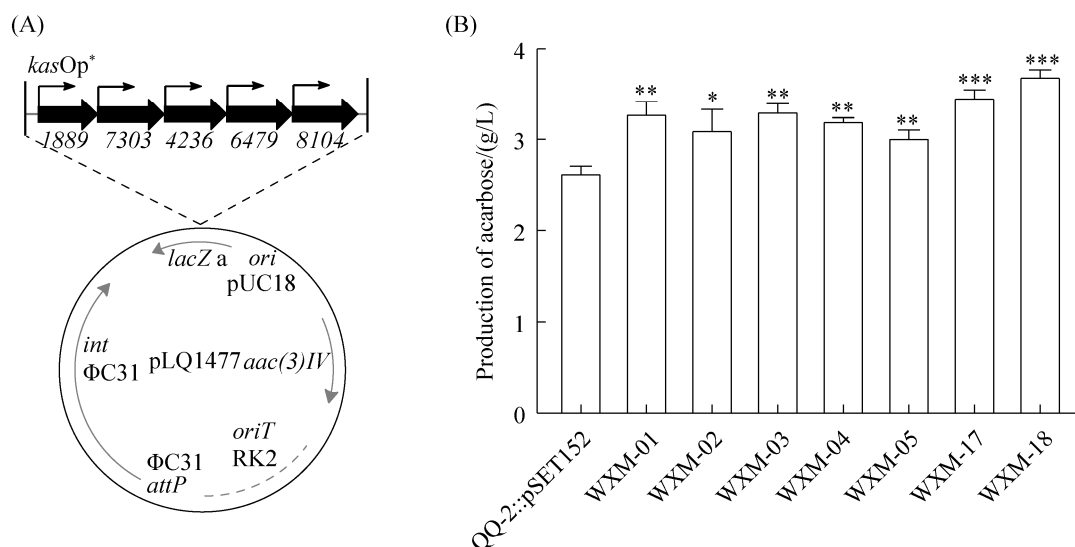


图 6. 阿卡波糖高产菌株的构建及产量

Figure 6. Construction of acarbose high-yield mutants and yields. A: recombinant plasmid pLQ1477 for the overexpression of 5 positive regulatory genes; B: yields of high-yield mutants. \*: significant difference at  $P<0.05$ ; \*\*: significant difference at  $P<0.01$ ; \*\*\*: significant difference at  $P<0.001$ . Error bars, mean $\pm$ SD ( $n=3$  biological replicates).

### 3 讨论

随着 *acb* 基因簇中各基因功能的解析, 为阿卡波糖高产菌株的工程改造提供了基础与目标。然而, 迄今为止, 涉及阿卡波糖生物合成基因的转录调控因子的研究仍旧很少。虽然有研究发现在 SE50/110 中, 蛋白 AcrC 能与 *acb* 基因簇中 *acbD* 和 *acbE* 之间的区域相结合, 对 *acbD* 和 *acbE* 的转录有抑制作用, 从而对阿卡波糖的早期合成有一

定的调控作用, 但 *acbD* 和 *acbE* 并不是阿卡波糖生物合成的关键基因, 对阿卡波糖产量并未产生明显影响<sup>[25]</sup>。因此, 本研究以 *acb* 基因簇中 2 个双向启动子区域  $P_{WV}$  和  $P_{AB}$  为探针, 通过 DNA 亲和层析结合蛋白组质谱分析, 挖掘基因簇外转录调控因子, 并结合体内体外实验, 以验证其对阿卡波糖生物合成的调控作用。

DNA 亲和层析技术目前已在放线菌中被有效应用。曲爽等在吸水链霉菌井冈变种 5008 (*S.*



*hygroscopicus* var. *jinggangensis* 5008)中以启动子 *valK-valA-int* 为探针, 钓取到全局性调控因子 GlnR<sup>[14]</sup>。Ajith 等也利用 DNA 亲和层析在 *S. peucetius* 29050 中寻找一种具有二氢脂酰胺脱氢酶(DLDH)活性的序列特异性 DNA 结合蛋白, 该蛋白可能参与了柔红霉素生物合成的调控<sup>[26]</sup>。本实验中, 通过 DNA 亲和层析和蛋白质组质谱分析, 成功钓取到 9 个与阿卡波糖生物合成簇的 2 个双向启动子区域  $P_{WV}$ 、 $P_{AB}$  均结合的调控因子 ACPL\_1889、ACPL\_4236、ACPL\_7303、ACPL\_6479、ACPL\_8104、ACPL\_8270、ACPL\_5445、ACPL\_3989、ACPL\_7617。

随后, 在体内验证中, 通过引入强启动子 *kasOp\**和同源重组的方式分别构建基因强化表达和敲除突变株, 对于 ACPL\_8270 和 ACPL\_8104 这 2 个基因, 我们未能成功在 QQ-2 中敲除。进一步分析发现 ACPL\_8270 与 ACPL\_8104 这 2 个基因在基因组中的位置距离复制起点较近, 且通过 NCBI 数据库比对发现, ACPL\_8104 同源调控因子 Crp 在 *S. coelicolor* 中缺失, 会导致菌体形态学发育缺陷, 还会导致次级代谢物生物合成的改变<sup>[27]</sup>。ACPL\_8270 属于 GntR 家族调控因子, 这类调控因子在放线菌的初级和次级代谢中都发挥重要作用, 有研究发现在 *S. coelicolor* M145 中缺失 GntR 家族调控因子 *dasR* 基因, 突变株无法正常产生气生菌丝和孢子<sup>[28]</sup>。因此, 我们判断 ACPL\_8270 与 ACPL\_8104 可能为游动放线菌 SE50/110 基因组中的必需基因。

综合体内体外实验验证, 我们推断 ACPL\_1889 可能为阿卡波糖生物合成正调控因子, ACPL\_3989 和 ACPL\_5445 可能为 2 个负调控因子。目前, 对于 ACPL\_1889 蛋白家族及其同源蛋白的有关报道非常少。在本实验中,

ACPL\_1889 能与 *acb* 基因簇中 2 个双向启动子  $P_{WV}$  和  $P_{AB}$  均结合, 并对阿卡波糖生物合成基因转录及阿卡波糖产量具有一定的促进, 强化表达基因 ACPL\_1889, 阿卡波糖生物合成相关基因 *acbW*、*acbV*、*acbA*、*acbB* 的表达水平均提高, 阿卡波糖产量提升 25%, 敲除该基因后, 阿卡波糖的产量下降了 22%, 表现出正调控作用, 其结构和作用机制有待进一步探究。ACPL\_3989 是 HTH 型调控因子 MalT, 其属于 LuxR 家族调控因子, 不同的 LuxR 家族蛋白表现出复杂的调控机制, 大部分为正调控因子, 少部分具有负调控作用。在 *S. hygrospinosus* var. *beijingensis* 中, AniF 能激活 *aniR-G* 基因的转录并参与茴香霉素生物合成<sup>[29]</sup>。本实验中, 蛋白 ACPL\_3989 能与启动子  $P_{AB}$  区域结合并调控阿卡波糖生物合成基因的转录, 强化表达基因 ACPL\_3989, 阿卡波糖产量降低 39%, 敲除该基因后, 阿卡波糖产量提高 8%, 表明其起到负调控作用。ACPL\_5445 属 HTH 型抑制因子 PurR, PurR 调控因子主要负责调控嘌呤生物合成操纵子基因 *purCSQLF* 和 *purDEK* 以及核苷 ABC 转运蛋白基因的转录<sup>[30-31]</sup>。本实验中, ACPL\_5445 虽未直接与阿卡波糖生物合成基因簇启动子区域结合, 但强化表达基因 ACPL\_5445, 阿卡波糖产量降低 12%, 敲除该基因后, 阿卡波糖生物合成基因转录水平有所提高, 阿卡波糖产量提高 13%, 表明其可能通过间接作用而发挥抑制功能。

本研究采用自下而上的研究方法, 以 *acb* 基因簇的 2 个双向启动子为探针, 利用 DNA 亲和层析技术钓取到与启动子区域结合的调控蛋白, 并结合体内体外验证实验, 寻找到阿卡波糖生物合成的调控因子, 不但为揭示阿卡波糖生物合成的转录调控机制奠定了基础, 而且这些调控基因的改造显著提升了阿卡波糖的产量。



## 参考文献

- [1] Diabetes Society of Chinese Medical Association. Guidelines for the prevention and treatment of type 2 diabetes in China (2013 Edition). *Chinese Journal of Diabetes Mellitus*, 2014, 6(7): 447–498. (in Chinese)  
中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版). 中国糖尿病杂志, 2014, 6(7): 447–498.
- [2] Petersmann A, Nauck M, Müller-Wieland D, Kerner W, Müller UA, Landgraf R, Freckmann G, Heinemann L. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2018, 126(7): 406–410.
- [3] Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England Journal of Medicine*, 2001, 345(11): 790–797.
- [4] Liu YG, Tian H, Xie XX, Shen XY, Chen CQ. Research progress in non-insulin drugs used for treating type 2 diabetes. *Drugs & Clinic*, 2013, 28(2): 108–113. (in Chinese)  
刘永贵, 田红, 解学星, 沈雪砚, 陈常青. 治疗 2 型糖尿病的非胰岛素类药物的研究进展. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 108–113.
- [5] Feng ZH, Wang YS, Zheng YG. Progress in biosynthesis pathway of acarbose. *Biotechnology Bulletin*, 2011(8): 60–67. (in Chinese)  
冯志华, 王远山, 郑裕国. 阿卡波糖的生物合成途径研究进展. 生物技术通报, 2011(8): 60–67.
- [6] He ST, Xu JY, Chen DJ. Antidiabetic drugs with  $\alpha$ -glucosidase inhibition activities. *Industrial Microbiology*, 2003, 33(1): 43–49. (in Chinese)  
何素婷, 许激扬, 陈代杰. 具有  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的抗糖尿病药物. 工业微生物, 2003, 33(1): 43–49.
- [7] Wehmeier UF, Piepersberg W. Biotechnology and molecular biology of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(6): 613–625.
- [8] Zhang CS, Stratmann A, Block O, Brückner R, Podeschwa M, Altenbach HJ, Wehmeier UF, Piepersberg W. Biosynthesis of the C<sub>7</sub>-cyclitol moiety of acarbose in *Actinoplanes* species SE50/110: 7-O-phosphorylation of the initial cyclitol precursor leads to proposal of a new biosynthetic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(25): 22853–22862.
- [9] Zhang Y, Zhou CL. Application of metabolic regulation in the antibiotic biosynthesis of actinomycetes. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2015, 46(4): 393–399. (in Chinese)  
张亚, 周长林. 代谢调控技术在放线菌生物合成抗生素的应用进展. 中国药科大学学报, 2015, 46(4): 393–399.
- [10] Gao C, Hindra, Mulder D, Yin C, Elliot MA. Crp is a global regulator of antibiotic production in streptomyces. *mBio*, 2012, 3(6): e00407–e00412.
- [11] Kang SH, Huang JQ, Lee HN, Hur YA, Cohen SN, Kim ES. Interspecies DNA microarray analysis identifies WblA as a pleiotropic down-regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(11): 4315–4319.
- [12] Wang J, Zhao GP. GlnR positively regulates *NasA* transcription in *Streptomyces coelicolor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 386(1): 77–81.
- [13] 曲爽. 井冈霉素生物合成的调控机制. 上海交通大学博士学位论文, 2015.
- [14] Tiffert Y, Supra P, Wurm R, Wohlleben W, Wagner R, Reuther J. The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes. *Molecular Microbiology*, 2008, 67(4): 861–880.
- [15] Zhang YY, Zou ZZ, Niu GQ, Tan HR. *jadR\** and *jadR2* act synergistically to repress jadomycin biosynthesis. *Science China Life Sciences*, 2013, 56(7): 584–590.
- [16] Schaffert L, Schneiker-Bekel S, Dymek S, Droste J, Persicke M, Busche T, Brandt D, Pühler A, Kalinowski J. Essentiality of the maltase AmlE in maltose utilization and its transcriptional regulation by the repressor AmlR in the acarbose-producing bacterium *Actinoplanes* sp. SE50/110. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2448.
- [17] Zhu YP, Xu WH, Zhang J, Zhang PP, Zhao ZL, Sheng DH, Ma W, Zhang YZ, Bai LQ, Pang XH. A hierarchical network of four regulatory genes controlling production of the polyene antibiotic candicidin in *Streptomyces* sp. strain FR-008. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(9): e00055–20.
- [18] Mao XM, Sun N, Zheng Y, Li YQ. Development of series of affinity tags in streptomyces. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6854.
- [19] Yu P, Liu SP, Bu QT, Zhou ZX, Zhu ZH, Huang FL, Li YQ. WblA<sub>ch</sub>, a pivotal activator of natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces*

- chattanoogensis* L10, is positively regulated by AdpA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(22): 6879–6887.
- [20] Zhao QQ, Xie HX, Peng Y, Wang XR, Bai LQ. Improving acarbose production and eliminating the by-product component C with an efficient genetic manipulation system of *Actinoplanes* sp. SE50/110. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2017, 2(4): 302–309.
- [21] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma^E$  is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 204–211.
- [22] Wang WS, Li X, Wang J, Xiang SH, Feng XZ, Yang KQ. An engineered strong promoter for streptomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(14): 4484–4492.
- [23] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Nagaraja Rao R, Schoner BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.. *Gene*, 1992, 116(1): 43–49.
- [24] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [25] Wolf T, Droste J, Gren T, Ortseifen V, Schneiker-Bekel S, Zemke T, Pühler A, Kalinowski J. The MalR type regulator AcrC is a transcriptional repressor of acarbose biosynthetic genes in *Actinoplanes* sp. SE50/110. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 562.
- [26] Ajith VK, Prasad R. A novel protein that binds to *dnrN-dnrO* intergenic region of *Streptomyces peucetius* purified by DNA affinity capture has dihydrolipoamide dehydrogenase activity. *Protein Expression and Purification*, 2009, 67(2): 132–138.
- [27] Derouaux A, Halici S, Nothaft H, Neutelings T, Moutzourelis G, Dusart J, Titgemeyer F, Rigali S. Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(6): 1893–1897.
- [28] Rigali S, Nothaft H, Noens EEE, Schlicht M, Colson S, Müller M, Joris B, Koerten HK, Hopwood DA, Titgemeyer F, van Wezel GP. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(5): 1237–1251.
- [29] Shen JF, Kong LX, Li Y, Zheng XQ, Wang Q, Yang WN, Deng ZX, You DL. A LuxR family transcriptional regulator AniF promotes the production of anisomycin and its derivatives in *Streptomyces hygrospinosus* var. *beijingensis*. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2019, 4(1): 40–48.
- [30] Beyer NH, Roepstorff P, Hammer K, Kilstруп M. Proteome analysis of the purine stimulon from *Lactococcus lactis*. *PROTEOMICS*, 2003, 3(5): 786–797.
- [31] Martinussen J, Sørensen C, Jendresen CB, Kilstруп M. Two nucleoside transporters in *Lactococcus lactis* with different substrate specificities. *Microbiology: Reading, England*, 2010, 156(Pt 10): 3148–3157.

# Mining and function studies of regulators for acarbose biosynthesis in *Actinoplanes* sp. SE50/110

Xuemei Wang, Qianhui Weng, Qinqin Zhao, Linqun Bai\*

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

**Abstract:** [Objective] Identification of regulatory factors for acarbose biosynthesis and harnessing them for the improvement of acarbose yield in *Actinoplanes* sp. SE50/110. [Methods] Firstly, regulatory proteins binding to the two bi-directional promoters of acarbose biosynthetic gene cluster were obtained using DNA affinity chromatography. Secondly, to validate functions, these coding genes of regulatory proteins were deleted or overexpressed in *Actinoplanes* sp. QQ-2. Next, soluble proteins were obtained by heterologous expression in *E. coli* BL21(DE3), and electrophoretic mobility shift assays were performed to verify the interaction between these regulatory proteins and promoter regions. [Results] By analyzing the results of affinity chromatography and mass spectra, we identified nine regulatory proteins (ACPL\_1889, ACPL\_4236, ACPL\_7303, ACPL\_6479, ACPL\_8104, ACPL\_8270, ACPL\_5445, ACPL\_3989, ACPL\_7617). Furthermore, we studied the potential function of all the nine regulatory proteins by deleting or overexpressing their coding genes in the strain QQ-2. The overexpression of ACPL\_1889 resulted in 25% yield increase, whereas its deletion led to 22% yield decrease of acarbose. Respective overexpression of ACPL\_5445 and ACPL\_3989 resulted in 12% and 39% yield decrease, whereas their deletions led to 15% and 8% yield increase, respectively. Meanwhile, transcription level of acarbose biosynthetic genes *acbA*, *acbB*, *acbW* and *acbV* increased when ACPL\_1889 was overexpressed and decreased when it was deleted; the transcription of these four genes increased to a certain extent in ACPL\_5445 mutant; whereas the transcription of these four genes decreased in the ACPL\_3989-overexpressed mutant, the transcription of *acbW* and *acbA* increased by 100 times and 40 times in the ACPL\_3989 deleted mutant, respectively. Moreover, we found both ACPL\_1889 and ACPL\_3989 were able to bind to promoters of the *acb* gene cluster in EMSA experiments. Eventually, we increased the yield of acarbose by 32% applying a combinatory strategy of overexpressing positive regulatory genes and deleting negative regulatory genes. [Conclusion] This study identified nine regulatory proteins binding to the two bi-directional promoters of acarbose biosynthetic gene cluster, among which ACPL\_1889 is a positive regulatory factor, while ACPL\_5445 and ACPL\_3989 are negative regulatory factors. This work not only laid a foundation for studying the regulatory mechanism of acarbose biosynthesis, but also substantially improved acarbose yield by manipulating these regulatory genes.

**Keywords:** acarbose, DNA affinity chromatography, transcriptional regulation, electrophoretic mobility shift assays

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31830104)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-34206722; E-mail: bailq@sjtu.edu.cn

Received: 10 February 2021; Revised: 3 March 2021; Published online: 8 September 2021