



LytSR和PdtaSR双组分系统对须糖多孢菌丁烯基多杀菌素生物合成的影响

万千千[#], 罗粤雯[#], 何昊城^{*}, 夏梓源, 穰杰, 朱梓榕, 曹丽, 夏立秋^{*}

微生物分子生物学湖南省重点实验室, 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081

万千千, 罗粤雯, 何昊城, 夏梓源, 穰杰, 朱梓榕, 曹丽, 夏立秋. LytSR和PdtaSR双组分系统对须糖多孢菌丁烯基多杀菌素生物合成的影响. 微生物学报, 2022, 62(3): 1033–1048.

Wan Qianqian, Luo Yuewen, He Haocheng, Xia Ziyuan, Rang Jie, Zhu Zirong, Cao Li, Xia Liqiu. The effect of LytSR and PdtaSR two-component systems on the biosynthesis of butenyl-spinosyn of *Saccharopolyspora pogona*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1033–1048.

摘要: 【目的】须糖多孢菌(*Saccharopolyspora pogona*)基因组中存在一些双组分系统(two-component system, TCS), 包括一个LytR调控因子和一个PdtaR转录抗终止调节因子, 我们旨在通过基因工程技术改造分析这两个双组分系统蛋白在须糖多孢菌中的作用。【方法】本研究利用融合PCR和属间接转移技术, 构建了*S. pogona-ΔlytR*和*S. pogona-PdtaR*工程菌株, 研究它们对须糖多孢菌丁烯基多杀菌素生物合成的影响。【结果】HPLC检测和质谱鉴定表明, 与原始菌相比, *S. pogona-ΔlytR*中丁烯基多杀菌素产量有所提高, 而*S. pogona-PdtaR*中产量下调, 表明*lytR*和*pdtaR*对丁烯基多杀菌素生物合成有负调控作用。此外, 生长曲线测定和表型分析结果表明, *S. pogona-ΔlytR*和*S. pogona-PdtaR*对须糖多孢菌的生长发育和孢子形成也产生了一定的影响。【结论】本研究为进一步阐明丁烯基多杀菌素生物合成的调控机制奠定了理论基础。

关键词: 须糖多孢菌; 丁烯基多杀菌素; 双组分系统; 调控因子

基金项目: 国家自然科学基金(31770106)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770106)

[#]These authors contributed equally to this work.

***Corresponding authors.** Tel: +86-731-88872298; E-mail: HE Haocheng, 1136582730@qq.com, XIA Liqiu, xialq@hunnu.edu.cn

Received: 18 June 2021; **Revised:** 22 July 2021; **Published online:** 3 August 2021

The effect of *LytSR* and *PdtaSR* two-component systems on the biosynthesis of butenyl-spinosyn of *Saccharopolyspora pogona*

WAN Qianqian[#], LUO Yuewen[#], HE Haocheng^{*}, XIA Ziyuan, RANG Jie, ZHU Zirong, CAO Li, XIA Liqiu^{*}

Hunan Provincial Key Laboratory for Microbial Molecular Biology, State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China

Abstract: [Objective] There are some two-component systems in the genome of *Saccharopolyspora pogona*, including a *LytR* regulatory factor and a *PdtaR* transcription resistance termination regulator, which were analyzed through genetic engineering technology. [Methods] In this study, we performed the fusion PCR and inter-genus conjugative transfer technology to construct *S. pogona-ΔlytR* and *S. pogona-PdtaR*, and studied their effects on the biosynthesis of butenyl-spinosyn. [Results] We found that the production of butenyl-spinosyn in *S. pogona-ΔlytR* was increased compared that in the wild type, while the butenyl-spinosyn production of *S. pogona-PdtaR* was dropt through high performance liquid chromatography (HPLC) experiments, indicating that *lytR* and *pdtaR* negatively regulating the biosynthesis of butenyl-spinosyn. In addition, we found that *S. pogona-ΔlytR* and *S. pogona-PdtaR* also had certain impacts on the growth and sporulation. [Conclusion] This study laid a theoretical foundation for further elucidating the regulatory mechanism of butenyl-spinosyn biosynthesis.

Keywords: *Saccharopolyspora pogona*; butenyl-spinosyn; two-component system; regulatory factor

须糖多孢菌(*Saccharopolyspora pogona*)是一种在需氧发酵后能产生丁烯基多杀菌素(butenyl-spinosyn)的微生物资源^[1]。与已有的绿色生物杀虫剂多杀菌素相比,丁烯基多杀菌素具有更广的杀虫谱^[2],对苹果蛾和烟草蠕虫等害虫具有较好的控制作用^[3-4]。丁烯基多杀菌素是一种大环内酯类化合物,由 *bus* 基因簇合成,其长度为 110 kb,其中 5 个聚酮化合物合成酶基因: *busA*、*busB*、*busC*、*busD* 和 *busE* 是合成丁烯基多杀菌素的关键基因,其编码的聚酮合酶负责缩合前体(甲基丙二酰-CoA、丙酰-CoA、丙二酰-CoA)形成大环内酯支架^[5-7]。丁烯基多杀菌素的相对分子量为 757.99,分子式为 C₄₃H₆₇NO₁₀,其结构与多杀菌素的不同之处在

于丁烯基多杀菌素双键的 2-丁烯基团取代了多杀菌素四环核 C21 位的乙基^[3,8]。这种差异是由于与同系物聚酮合酶基因 *spnB* 相比, *busB* 编码的酶多了 5 个功能域(KS: 酮合酶, AT: 乙酰转移酶, ACP: 酰基载体蛋白, DH: 脱水酶, KR: 酮还原酶)的附加模块,这些结构域负责丁烯基侧链的生物合成。

调控因子是调节次级代谢产物生物合成的重要原因^[9]。前期研究中,对须糖多孢菌中的调控因子进行了大量的探索,如 TetR 家族调控因子、SenX3-RegX3 双组分系统和 AfsR 调控因子等^[10-11],它们都能影响丁烯基多杀菌素的生物合成,但其产量没有突破性的改变,需要对须糖多孢菌基因组进行更为深入的探索和研究。

在自然环境下细菌会受到周围环境改变引起的刺激,如温度、酸碱度、盐浓度、压力等的刺激。这时细菌就会通过自身的信号转导等途径对外界刺激作出反应,通过调节相关基因的表达以维持细胞的正常生长以及适应外界环境^[12]。微生物中共存在3大类信号转导系统,分别为单组分系统(one-component system, OCS)、双组分系统(two-component system, TCS)以及胞质外功能 σ 因子(extracytoplasmic function- σ , ECF- σ)^[13-15]。其中研究最为深入且广泛存在的是双组分系统,一般由激酶和受体2部分组成。组蛋白蛋白激酶(histidine kinase, HK)作用为感受外界信号,通过磷酸化作用将信号最终传递给与其同源的反应调节受体蛋白(response regulator, RR)^[16]。LytSR和PdtaSR双组分系统都是微生物中重要的双组分系统,目前研究已知LytSR双组分系统进行信号转导的主要过程为LytS感受外界信号即细胞膜电位的变化,然后通过磷酸化作用将信号传导给其同源的相应受体蛋白LytR,激活LytR反应调节蛋白的活性,激活后的LytR通过调节下游基因*lrg AB*的表达来调控细胞发生程序性死亡以及自溶等事件^[17-19]。PdtaSR双组分系统是由Morth等^[20]发现的一种新型双组分系统,使用生物信息学工具通过鉴定同源的HK蛋白Rv3220c (PdtaS),证实了PdtaR是被磷酸化激活的,在Mg²⁺/ATP存在的条件下, HK蛋白能自我磷酸化,将磷酸基团转移到PdtaR蛋白上。已有研究表明, PdtaR是一种转录抗终止调节因子,有一个带有完整磷酸化位点的氮末端结构域,随后被鉴定为磷酸化依赖性转录抗终止调节因子的一类新蛋白质的第一个成员,能够通过磷酸盐调控信号传递从而调节基因转录水平,以调节代谢水平^[21]。

在须糖多孢菌全基因组测序的基础上,我

们在须糖多孢菌基因组中发现一系列双组分系统基因,其具体调控功能未知。为了探索这些双组分系统的功能,我们选择其中的*lytR*基因和*pdtaR*基因进行了研究,利用融合PCR技术和属间接转移等技术,在须糖多孢菌中敲除了*lytR*基因、过表达了*pdtaR*基因,构建了*S. pogona- Δ lytR*和*S. pogona-PdtaR*须糖多孢菌工程菌株。通过HPLC检测研究*lytR*和*pdtaR*对须糖多孢菌丁烯基多杀菌素生物合成的影响,并通过生长曲线测定、孢子形态观察以及qRT-PCR分析研究了这2个基因对须糖多孢菌的影响及调控方式。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本实验所用的相关菌株和质粒见表1。

1.2 引物

本实验所用的相关引物见表2。

1.3 培养基

大肠杆菌培养基为LB液体培养基(g/L): NaCl 10, 胰蛋白胨(tryptone) 10, 酵母粉(yeast extract) 5, 加水定容至1 L。

活化须糖多孢菌菌保液用CSM培养基(g/L): 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB) 45, 葡萄糖(glucose) 10, 酵母提取物(yeast extract) 9, MgSO₄·7H₂O 2.2, 加水定容至1 L。

须糖多孢菌表型观察实验用胰蛋白胨大豆肉汤(trypticase soy broth, TSB)培养基(g/L): TSB粉末 30, 加水定容至1 L。

须糖多孢菌发酵生产丁烯基多杀菌素用合成发酵培养基(g/L): KNO₃ 1, FeSO₄ 0.01, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, 葡萄糖(glucose) 20, 酵母提取物(yeast extract) 4, 胰蛋白胨(tryptone) 4, 加水定容至1 L, 固体培养基额外加琼脂粉 15。

表 1 相关菌株和质粒

Table 1 Related strains and plasmids

Types	Description	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	Host for general cloning	Lab store
<i>E. coli</i> S17-1	Donor strains for conjugation	Lab store
<i>S. pogona</i> NRRL30141	The producer strains of butenyl-spinosyn	Lab store
<i>S. pogona</i> - Δ lytR	<i>S. pogona</i> harboring pKCcasodO-codA-sgRNA-lytR _{up} -lytR _{down}	This work
<i>S. pogona</i> -PdtaR	<i>S. pogona</i> harboring pKCcas9dO-P _{KasO} -pdtaR	This work
Plasmids		
pKCcas9dO-codA	<i>E. coli</i> -cloning vector, containing sgRNA sequence	Lab store
pKCcas9dO-codA-sgRNA-lytR _{up} -lytR _{down}	sgRNA-lytR _{up} -lytR _{down} inserted into pKCcas9dO-codA by Hind III and Spe I	This work
pUC57-Amp-P _{KasO}	Containing P _{KasO} sequence	Lab store
pKCcas9dO-P _{KasO} -pdtaR	P _{KasO} -pdtaR inserted into pKCcas9dO by seamLess DNA cloning technology	This work

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>S. pogona</i> - Δ lytR	
FlytRsg	GTCCTAGGTATAATAGCGATGGGCGACATCAGCAGGTTTTAGAGCTAGAAA
RlytRsg	CTCACCAACTCAAAAAAAGCACCGACTCGG
FlytR up	TTTGAGTTGGTGAGGAGGCGAGTGTAGT
RlytR up	CTCAACGCGGACCTGGTGGCGAAGTAGAT
FlytR down	CAGGTCCGCGTTGAGCTTCGTCTTGCC
RlytR down	CGACGGCAGTGCCAGCCGGAAGTATGAGCC
<i>S. pogona</i> -PdtaR	
P _{KasO} -F	TGATGTCTGTTACATTGCAACGGTGT
P _{KasO} -R	TCCGGTCCAACCTCCCCAGTCCTGCACG
pdtaR-up-F	TTTGAGCATCGGCTGGTTGTACTGGT
pdtaR-up-R	TGTGAACAGACATCAGGTTCGATCAAGCC
pdtaR-down-F	GGGAGTTGGACCCGAGTTTTGGAGGAT
pdtaR-down-R	CGACGGCCAGTGCCAGCACATCCACGAGAAGTCCG
sgRNA-F	GTCCTAGGTATAATACCGGCTACAACCTCACACCGGTTTTAGAGCTAGAAA
sgRNA-R	AGCCGATGCTCAAAAAAAGCACCGACTCGG
qRT-PCR	
FlytR-qrt	TCACCGCCCTTGAGCGAGTA
RlytR-qrt	CAGCCGATGGACGACGAGAT
FpdtaR-qrt	TGCCTTCATCGTGGTGCG
RpdtaR-qrt	CCATCGAACTGGCGGTGTC
F16srDNAsp	CGTCAGCTCGTTCGTGAGA
R16srDNA	GTGAAGCCCTGGGCATAAGG
FbusA	GCAACCTCCCTGGATTACGG
RbusA	GCAACCTCCCTGGATTACGG
FbusB	CGGAGGACTTGTGGCAACTG
RbusB	GACACGCCCTGAAGGAAACC
FbusC	TGTCCGATGTGGACGTTGTG
RbusC	GCCTGCGTATGACCGATGTT
FbusD	GTTGCATTTGGCGTGCCAGT
RbusD	ACAACCGCTCCAGCAGAACC
FbusE	CGGTCTCCTGGGCAGTGATC
RbusE	CCTCGGAAGCAACCTCCAAG

接合转移用 R6 固体培养基(g/L): 蔗糖 (sucrose) 200, 小牛脑心浸出物(BHI) 13, 糊精 (dextrin) 10, 酪蛋白氨基酸(casamino acid) 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, K_2SO_4 0.1, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.001, 琼脂粉 15, 加水定容至 1 L, 倒板前加入下列 3 种物质: 1 mol/L MOPS 0.209 g/mL, 5 mol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.555 g/mL, 3.25 mol/L L-谷氨酸钠 0.608 g/mL。

须糖多孢菌表型观察实验用 BHI 固体培养基: 每 100 mL 纯水中加 BHI 3.8 g, 琼脂粉 2%。

1.4 试剂和仪器

Primer Star DNA 聚合酶、限制性内切酶 (*Hind* III/*Spe* I)、基因组提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒等购自日本 TaKaRa 公司。实验中所用抗生素, 萘啶酮酸(nalidixic acid, NA)、阿泊拉霉素(apramycin, Apra)均购于美国 Sigma-Aldrich 公司。日立 SU8010 超高分辨率扫描电子显微镜购自日本 Titachi 公司, 高效液相色谱仪(1290)购自美国安捷伦科技有限公司, GeneAmp PCR System 9700 购自美国 ABI 公司。

1.5 *lytR* 敲除载体和 *pdtaR* 过表达载体的构建

首先利用 ZIFIT 网站对目的序列 *lytR* 以及 *pdtaR* 的前间序列分别进行 sgRNA 的设计, 用于工程菌中靶序列的定位, 并在 sgRNA 识别序列的上下游设计同源臂。然后利用 Primer 5.0 引物设计软件, 对 sgRNA、*lytR* 上下游同源臂、*pdtaR* 的前间序列的上下游同源臂、强启动子 *KasOp**分别进行正、反向引物的设计与合成。利用 PCR 进行上述单片段的扩增, 然后通过融合 PCR 将相应基因的 sgRNA 与上游同源臂进行融合, 将强启动子 *KasOp**与 *pdtaR* 前间序列

的下游同源臂融合。

上述 sgRNA 序列、*KasOp**启动子和同源臂片段的 PCR 体系如下: 2×GC buffer I 10 μL, 正、反向引物各 1 μL, dNTPs 1.6 μL, 模板 2 μL, DMSO 1 μL, ddH₂O 3.25 μL, Primer Star DNA 聚合酶 0.15 μL。扩增 sgRNA 的模板是 pKCcas9dO 质粒, 扩增强启动子 *KasOp**的模板是 pUC57-*Amp-KasOp**, 它们的退火温度和延伸时间均为 61.8 °C 和 20 s; 扩增上下游同源臂的模板是须糖多孢菌基因组, 退火温度和延伸时间分别为 58 °C 和 1 min。扩增单片段所用引物对详见表 2。 *pdtaR* 的 sgRNA 序列和前间序列上游同源臂采用常规 PCR 扩增。

lytR 敲除载体和 *pdtaR* 过表达载体的 sgRNA 序列与上游同源臂融合、*KasOp**序列与 *pdtaR* 前间序列的下游同源臂融合的第一阶段体系如下: 2×GC buffer I 10 μL, ddH₂O 6.25 μL, dNTPs 1.6 μL, 2 个待融合片段各 1 μL, Primer Star DNA 聚合酶 0.15 μL。待第一阶段结束后, 在体系中加入正、反向引物各 1 μL, 再进行第二阶段。 *lytR* 敲除载体的 sgRNA 和上游同源臂融合 PCR 第一阶段(此时未加引物)反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 2 min, 10 个循环; 72 °C 10 min。融合 PCR 扩增第二阶段(添加引物 *FlytR* sg/*RlytR* up)反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 2 min, 5 个循环; 95 °C 30 s, 63 °C 30 s, 72 °C 2 min, 25 个循环; 72 °C 10 min。 *pdtaR* 过表达载体的 sgRNA 序列与上游同源臂融合、*KasOp**序列与下游同源臂融合的第一阶段 PCR 程序基本同上。第一阶段都以 58 °C 为退火温度, 延伸时间为 2 min, 进行 10 个循环的反应。第一阶段结束后在体系中加入正、反向引物各 1 μL, 前者加 sgRNA-F/*pdtaR*-up-R, 后者加 *P_{KasO}*-F/*pdtaR*-down-R。然后两者都采用降落 PCR, 分别从

64 °C 降至 56 °C、70 °C 降至 60 °C，然后进行常规 PCR。

接着,用 *Hind* III 和 *Spe* I 对质粒 pKCcas9dO-*codA* 进行双酶切,与目的片段进行同源重组,经热转挑取阳性单克隆并验证,获得 *lytR* 敲除载体 pKCcas9dO-*codA*- Δ *lytR* 和 *pdtA*R 过表达载体 pKCcas9dO-*P*_{KasO}-*pdtA*R。其中,该过程所涉及的酶切、同源重组反应体系及条件如下:双酶切反应体系 50 μ L: pKCcas9dO-*codA* 质粒载体 25–30 μ L, 10 \times M buffer 5 μ L, *Hind* III 限制性内切酶 2 μ L, *Spe* I 限制性内切酶 2 μ L, ddH₂O 补齐至 50 μ L。反应条件: 37 °C 恒温培养箱处理 5–6 h。

同源重组反应体系 20 μ L: 重组质粒 X μ L, 插入片段 Y μ L, 5 \times CE II Buffer 4 μ L, Exnase II 2 μ L, ddH₂O 补齐至 20 μ L。反应条件: 37 °C 水浴 30 min。其中重组质粒 X μ L 及插入片段 Y μ L 由公式(1–2)计算。

最佳克隆载体使用量(X μ L)=[0.02 \times 克隆载体碱基对数]ng(0.03 pmol) 公式(1)

最佳插入片段使用量(Y μ L)=[0.04 \times 插入片段碱基对数]ng(0.06 pmol) 公式(2)

根据本实验克隆载体质粒大小为 10 kb, 插入片段大小各约为 1.5 kb, 可以算出最佳克隆载体使用量即质粒需要大于 200 ng, 最佳插入片段使用量即同源重组使用的片段需要大于 60 ng。

1.6 敲除和过表达菌株的构建

构建工程菌株 *S. pogona*- Δ *lytR* 和 *S. pogona*-*PdtA*R 的过程采用的是大肠杆菌与放线菌的属间接转移实验。首先获得电击阳性转化子 *E. coli* S17-pKCcas9dO-*codA*- Δ *lytR* 和 *E. coli* S17-pKCcas9dO-*P*_{KasO}-*pdtA*R, 以该菌株作为供体菌与须糖多孢菌野生菌株作为受体菌进行接合转移^[21], 将重组载体导入受体菌须糖多孢菌野生

菌株中。然后在无菌操作台中将长出的转化子挑取至 CSM 固体培养基上纯化 2 次, 然后将 CSM 固体平板上长出的单克隆挑至 20 mL 加有阿泊拉霉素的 CSM 液体培养基中, 30 °C 培养 48 h。通过对转化子进行 PCR 验证, 获得敲除菌株 *S. pogona*- Δ *lytR* 与过表达菌株 *S. pogona*-*PdtA*R。

1.7 工程菌株的生长发育及丁烯基多杀菌素的产量分析

对构建的敲除工程菌株 *S. pogona*- Δ *lytR* 和过表达工程菌株 *S. pogona*-*PdtA*R 进行生长曲线测定、丁烯基多杀菌素含量测定(高效液相色谱分析)、菌丝体生长发育形态和棉铃虫生测实验等后续实验研究, 比较原始菌与工程菌之间各实验数据区别, 对二者的实验数据和结果进行观察、汇总、比较和分析, 从而分别研究 *lytR* 敲除与 *PdtA*R 过表达对须糖多孢菌生长发育进程和形态、丁烯基多杀菌素产量等的影响。

1.8 菌丝体形态及孢子表型观察

分别取 1 mL *S. pogona*- Δ *lytR*、*S. pogona*-*PdtA*R 和 *S. pogona* 的菌保液于 50 mL CSM 中, 30 °C 恒温 180 r/min 振荡培养 2 d。从 CSM 液体中分别转接 100 μ L 菌液涂布于 CSM、TSB、BHI 固体培养基上, 观察不同培养基下原始菌和工程菌的产孢情况。挑取 CSM 板上面的菌丝体涂布于盖玻片, 经过 60 s 喷金后利用日立 SU8010 超高分辨率扫描电子显微镜对菌丝形态进行观察。

1.9 生长曲线测定

分别取 1 mL *S. pogona*- Δ *lytR*、*S. pogona*-*PdtA*R 和 *S. pogona* 的菌保液于 20 mL CSM 液体培养基中, 30 °C 恒温 180 r/min 振荡培养 2 d, 取 1 mL 菌液用于测初始 *OD*₆₀₀ 值。随后将活化后的菌液转接到 50 mL 合成发酵培养基中, 30 °C 摇床 220 r/min 振荡培养, 每隔 1 d 取样测定 *OD*₆₀₀ 值, 连测 10 d, 绘制生长曲线。

1.10 丁烯基多杀菌素含量测定

分别取相同发酵条件下不同时间点的 *S. pogona-ΔlytR*、*S. pogona-PdtaR* 和 *S. pogona* 的发酵液各 500 μL, 与等量的乙酸乙酯颠倒混匀, 60 °C 水浴保温 1 h 左右。然后静置分层(可适当辅以离心分层), 取上清于一新的 EP 管中, 使用真空冷冻干燥机对上清进行冻干处理。冻干后分别加入 50 μL 甲醇溶解, 10 000 r/min 离心后去上清, 利用 Agilent 1290 超高效液相色谱仪(UHPLC)检测丁烯基多杀菌素含量, 色谱检测条件如 Li 等^[10]所述。

1.11 杀虫活性比较

分别取相同发酵条件下培养了 10 d 的 *S. pogona-ΔlytR*、*S. pogona-PdtaR* 和 *S. pogona* 的发酵液 1 mL, 与 20 mL 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 饲料均匀混合, 然后平均倒入 24 孔的培养板中。饲料冷却凝固后在每个孔中放入一条生长状态相同的棉铃虫, 放置于 26–28 °C 处恒温培养, 每隔 24 h 记录棉铃虫存活条数。

1.12 qRT-PCR 分析

分别收集培养了不同时间的 *S. pogona-ΔlytR*、*S. pogona-PdtaR* 和 *S. pogona* 菌体细胞, 按照总 RNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)的说明进行总 RNA 提取。利用试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本)将 RNA 样品反转录为 cDNA, 并使用 SYBR Premix Ex Taq GC 进行 qRT-PCR 扩增(TaKaRa, 日本)。在 7500 实时荧光定量 PCR 系统(Applied Biosystems, 美国)上测定转录水平。实验中利用 16S rRNA 基因用作对照。

2 结果与分析

2.1 工程菌株的构建与鉴定

经过 PCR 扩增、电泳检测, sgRNA 的片段

在 100–200 bp 区域, 上下游同源臂的单片段大小在 1 000 bp 左右, 大小符合预期。sgRNA 与上游同源臂的融合片段, 检测结果与上游同源臂片段对比大 100 bp 左右。*KasOp**与下游同源臂的融合片段, 检测结果与下游同源臂相比大 100 bp 左右。

用 *Hind* III 和 *Spe* I 对质粒 pKCcas9dO-*codA* 进行双酶切, 将目的片段和酶切质粒进行同源重组。挑取热转单克隆转化子扩培, 对扩培出来的菌体进行菌液 PCR 验证, 并提取质粒进行单、双酶切验证。电泳检测结果显示, 双酶切结果出现 2 条带, 其中 pKCcas9dO-*codA-ΔlytR* 的条带为 sgRNA 和上下游同源臂的融合片段, 大小约 2 200 bp, pKCcas9dO-*P_{KasO}-pdtaR* 的条带为 sgRNA、上游同源臂、*KasOp**和下游同源臂的融合片段, 大小约 2 300 bp, 通过对比条带的大小进行鉴定, 从而筛选获得正确的重组质粒载体(图 1)。

R6 接合转移板挑取阳性接合子扩培后进行 PCR 验证, 通过加引物扩增完整的 *lytR* 基因, 原始菌能够扩增出完整条带, 然而敲除工程菌没有条带, 证明 *lytR* 基因已经被成功敲除, 将工程菌命名为 *S. pogona-ΔlytR* (图 1)。

以 *pdtaR* 转化子基因、重组载体 pKCcas9dO-*P_{KasO}-pdtaR* 和 pUC57-Amp-*P_{KasO}* 质粒为模板, 能扩增出 *KasOp** 的片段, 而以须糖多孢菌野生型基因组则不能扩增出来, 从而获得过表达菌株 *S. pogona-PdtaR* (图 2)。

最后对所得工程菌进行 qRT-PCR 验证, 发现在 *S. pogona-ΔlytR* 中, 几乎无法检测到 *lytR* 基因的转录水平, 证明该基因敲除成功; 在 *S. pogona-PdtaR* 中, *pdtaR* 基因的转录水平随着时间推移与原始菌的差异逐渐扩大, 表明 *pdtaR* 基因的过表达成功(图 3)。

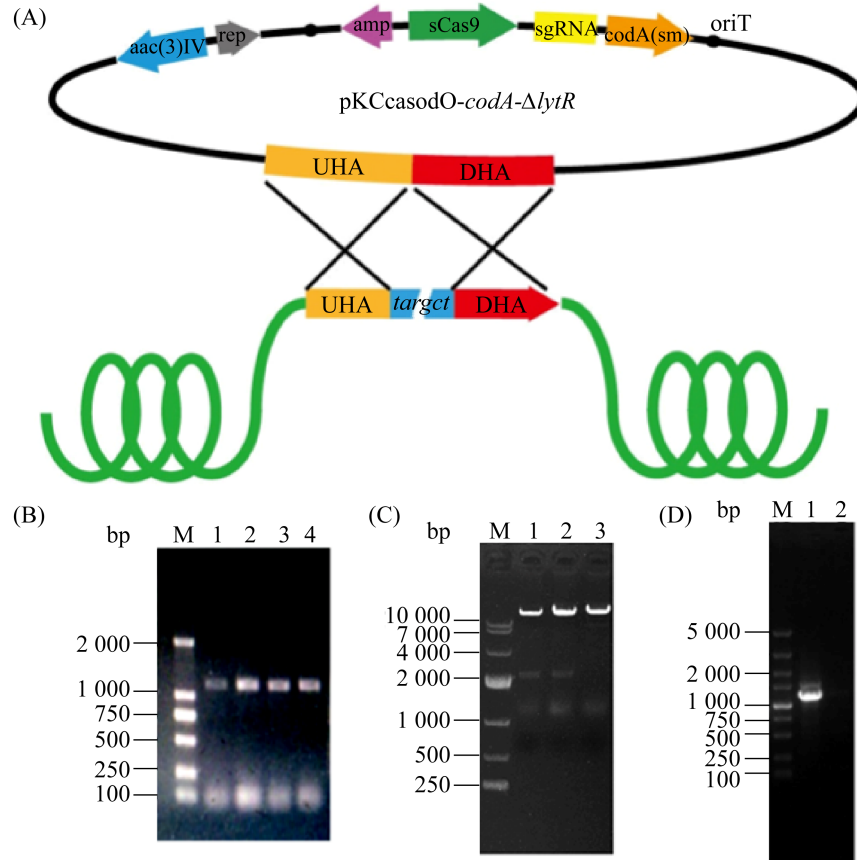


图 1 *S. pogona-ΔlytR* 构建和鉴定

Figure 1 Construction and identification of *S. pogona-ΔlytR*. A: schematic diagram of pKCcas9dO-*codA-ΔlytR*. B: the identification of pKCcas9dO-*codA-ΔlytR*. M: DL 2 000 DNA marker; lane 1–4: the fusion fragment of sgRNA and upstream homology arm. C: enzyme digestion verification of pKCcas9dO-*codA-ΔlytR*. M: DL 10 000 DNA marker; lane 1–2: double enzyme digestion verification; lane 3: single enzyme digestion verification. D: amplify the *lytR* in the wild-type and *S. pogona-ΔlytR*. M: DL 10 000 DNA marker; lane 1: the original bacteria *S. pogona*; lane 2: engineering bacteria *S. pogona-ΔlytR*.

2.2 工程菌株丁烯基多杀菌素产量分析

经过高效液相色谱(HPLC)分析发现,丁烯基多杀菌素的特征色谱峰在 13 min 左右,对其进行质谱鉴定,获得了质荷比为 634.99 的多杀菌素 α (spinosyn α) 碎片峰,其二级质谱包含了 1 个质荷比为 189.1 的三甲基鼠李糖结构化合物,最终确定该色谱峰为丁烯基多杀菌素(图 4)。HPLC 结果表明,第 8 天时 *S. pogona-ΔlytR* 和 *S. pogona* 的峰面积分别为(135.2 \pm 13.6) mAU·s 和(162.0 \pm 5.1) mAU·s,

前者较后者产量提高了 19.8%,但在第 10 天, *S. pogona-ΔlytR* 中丁烯基多杀菌素的峰面积为 (129.5 \pm 20.1) mAU·s,而 *S. pogona* 的峰面积则为(147.6 \pm 16.1) mAU·s,产量相比原始菌反而下降了 12.3%。总体而言, *S. pogona-ΔlytR* 中丁烯基多杀菌素的最高产量与原始菌的最高产量相比提高了 9.8%,没有显著的差异,但是其增长的趋势与原始菌相比发生了变化,前期增长速度较快,后期出现了降低(图 5A 和图 5B)。

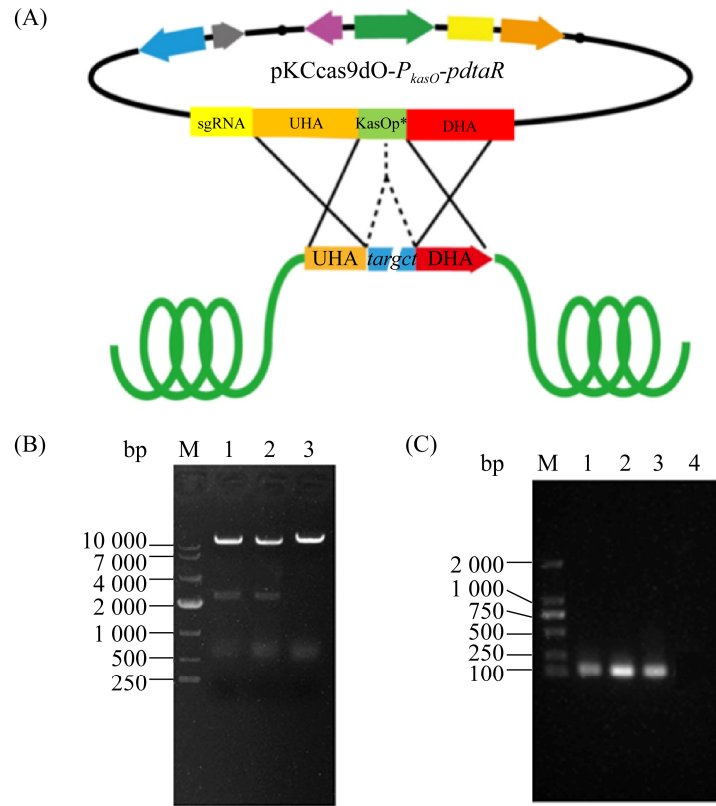


图 2 *S. pogona*-PdtaR 构建和鉴定

Figure 2 Construction and identification of *S. pogona*-PdtaR. A: schematic diagram of pKCcas9dO-*P_{KasO}*-*pdtaR*. B: the identification of pKCcas9dO-*P_{KasO}*-*pdtaR*. M: DL 10 000 DNA marker; lane 1–2: double enzyme digestion of pKCcas9dO-*P_{KasO}*-*pdtaR*; lane 3: single enzyme digestion of pKCcas9dO-*P_{KasO}*-*pdtaR*. C: *KasOp** fragment detection. M: DL 2 000 DNA marker; lane 1: the amplification result of *KasOp** in *S. pogona*-PdtaR; lane 2: the *KasOp** amplification result of pKCcas9dO-*P_{KasO}*-*pdtaR*; lane 3: the *KasOp** amplification result of pUC57-Amp-*P_{KasO}* plasmid as a template; lane 4: the amplification result of *KasOp** in *S. pogona*.

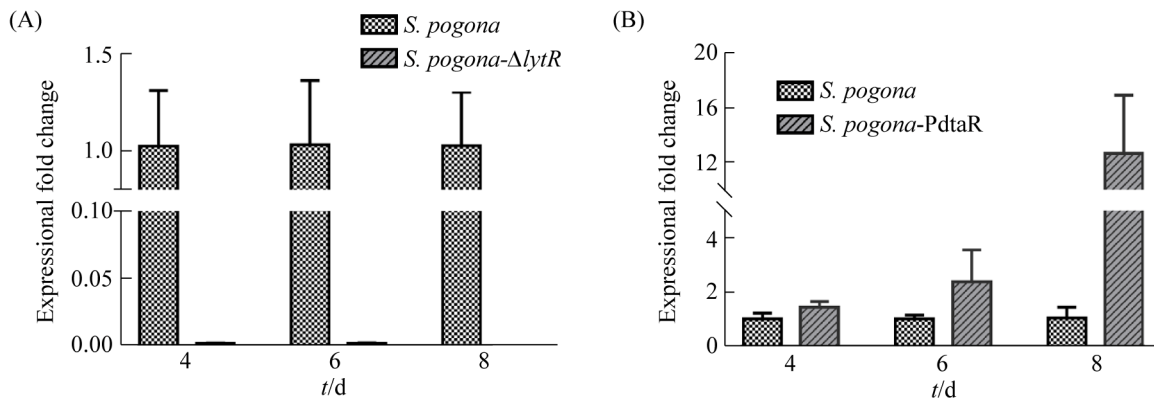


图 3 *S. pogona*-PdtaR 和 *S. pogona-ΔlytR* 的 qRT-PCR 验证

Figure 3 The qRT-PCR verification of *S. pogona*-PdtaR and *S. pogona-ΔlytR*. A: the expression level of *lytR* gene in *S. pogona* and *S. pogona-ΔlytR*; B: the expression level of *pdtaR* gene in *S. pogona* and *S. pogona*-PdtaR. Data are represented as mean±SD ($n=3$).

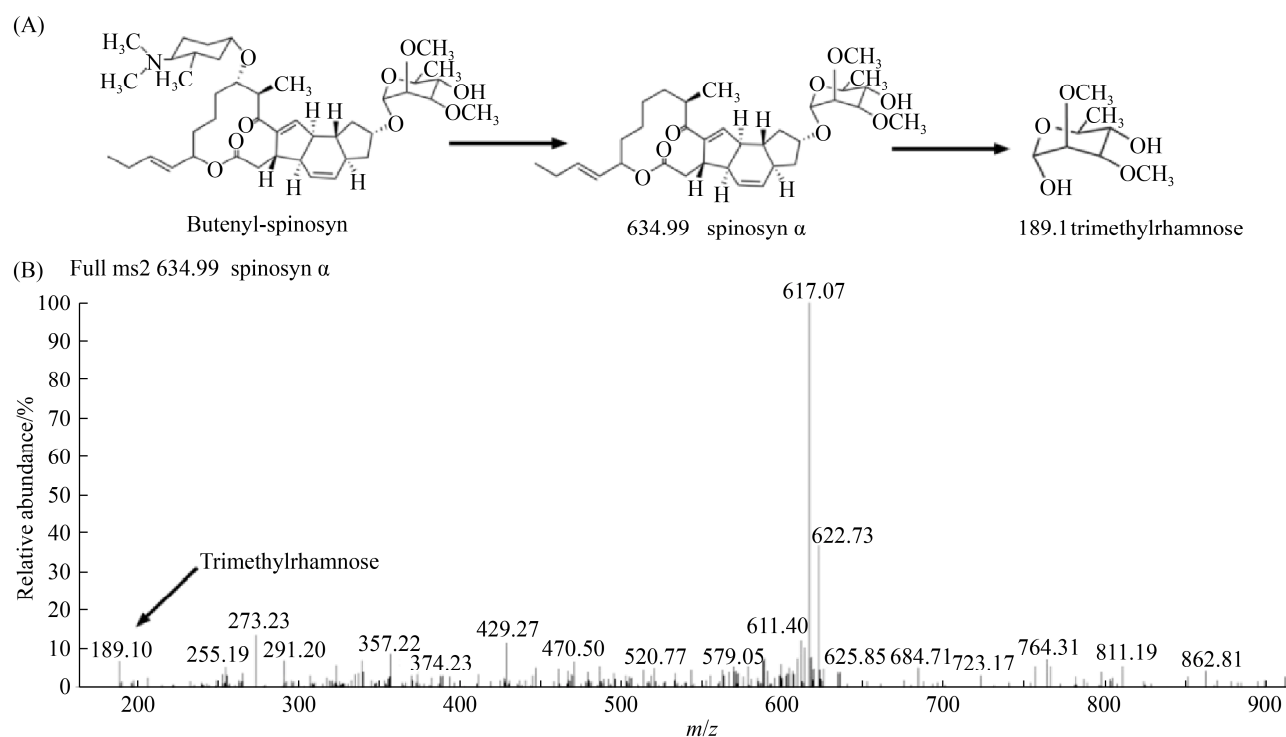


图 4 丁烯基多杀菌素特征峰质谱鉴定

Figure 4 Mass spectrum identification of the characteristic peak of butenyl-spinosyn. A: the chemical structure and cleavage of butenyl-spinosyn; B: identification of butenyl-spinosyn by MS2.

S. pogona 和 *S. pogona*-PdtaR 第 8 天的丁烯基多杀菌素峰面积分别为(135.2±13.6) mAU·s 和 (64.8±7.3) mAU·s, 相比产量降低了 52.1%。此外, 在保留时间 14.8 min 左右处, 出现了一个明显的差异峰, *S. pogona* 和 *S. pogona*-PdtaR 在该峰面积分别为(115.9±13.2) mAU·s 和(549.3±42.1) mAU·s, PdtaR 过表达使该物质产量提高了 3.74 倍。该峰所代表的物质未知, 其产量的显著提高推测可能受到了 PdtaR 的调控(图 5A 和图 5B)。

根据不同时间产量变化情况可以发现, 丁烯基多杀菌素的产量从第 4 天开始积累, 第 6 天处于较快的增长阶段, 而到了第 8 天产量基本稳定。为了验证引起产量差异的原因, 对丁烯基多杀菌素合成的聚酮合酶进行了转录水平分析。结果发现, 在第 4 天和第 6 天, *S. pogona*-PdtaR

中所有的聚酮合酶基因的表达水平都极低, 远低于原始菌的表达水平; 在 *S. pogona*- Δ lytR 中, 第 4 天时 *busA* 的基因表达水平较低, 只有原始菌的 0.24 倍, 而 *busC* 的表达水平比原始菌高 1.31 倍, *busB*、*busD* 和 *busE* 的表达水平则与原始菌没有太大差异。在第 6 天, *S. pogona*- Δ lytR 中 *busA*、*busB*、*busC*、*busE* 的表达水平分别上调了 1.03、0.27、0.56 和 1.16 倍, 而 *busD* 的表达水平下调了 0.54 倍, 整体来看, *S. pogona*- Δ lytR 中聚酮合酶基因的表达水平相比原始菌出现了上调(图 5C 和图 5D)。在 4–6 d 阶段内, *S. pogona*- Δ lytR 中丁烯基多杀菌素的增长速度是 41.2 mAU·s/d, 而原始菌的则为 35.6 mAU·s/d, 这一增长趋势与聚酮合酶转录水平的结果相吻合。

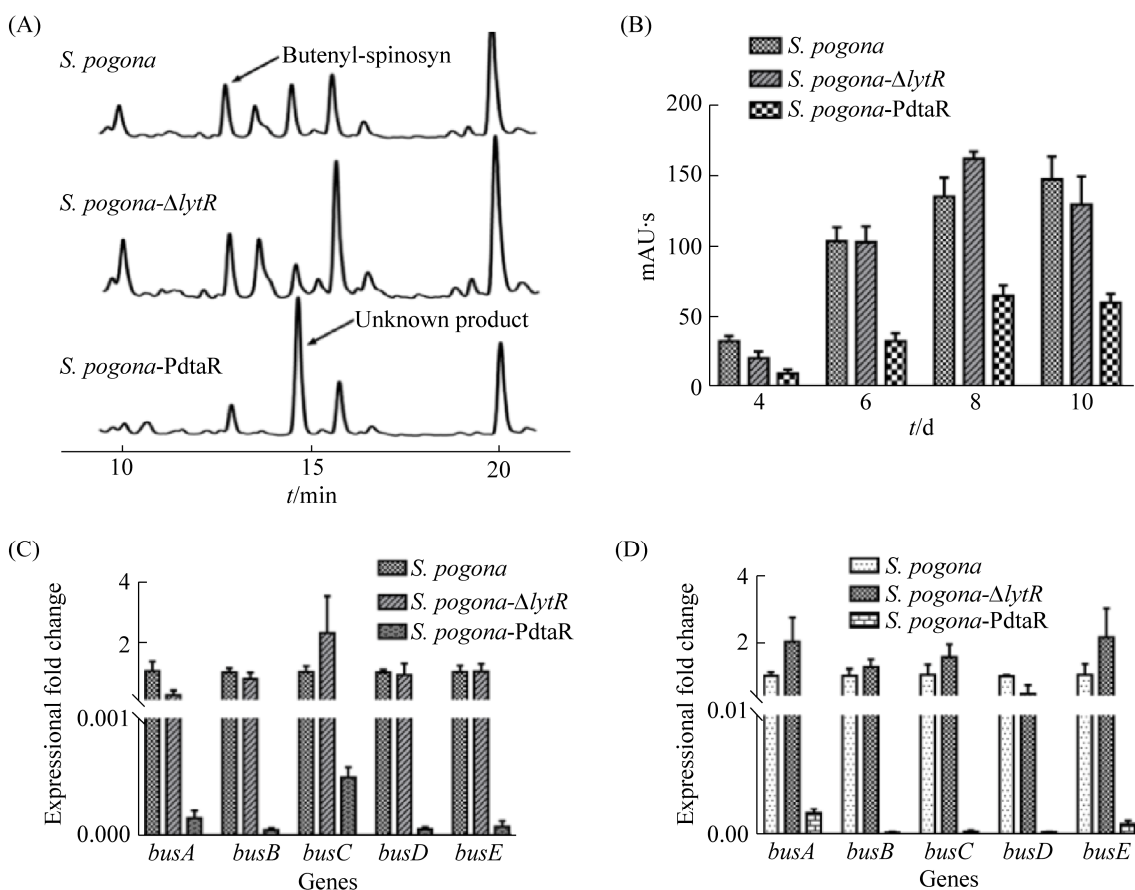


图 5 *S. pogona*、*S. pogona-ΔlytR* 和 *S. pogona-PdtaR* 丁烯基多杀菌素产量差异及聚酮合酶基因 qRT-PCR 分析

Figure 5 Comparison of the butenyl-spinosyn production and qRT-PCR analysis of the polyketide synthase genes in *S. pogona*, *S. pogona-ΔlytR* and *S. pogona-PdtaR*. A: HPLC analysis of butenyl-spinosyn in *S. pogona*, *S. pogona-ΔlytR* and *S. pogona-PdtaR*; B: HPLC analysis of butenyl-spinosyn at different time in *S. pogona*, *S. pogona-ΔlytR* and *S. pogona-PdtaR*; C: qRT-PCR analysis of the polyketide synthase genes at the fourth day in *S. pogona*, *S. pogona-ΔlytR* and *S. pogona-PdtaR*; D: qRT-PCR analysis of the polyketide synthase genes at the sixth day in *S. pogona*, *S. pogona-ΔlytR* and *S. pogona-PdtaR*. Data are represented as mean±SD (n=3).

对野生型须糖多孢菌 *S. pogona*、2 株工程菌 *S. pogona-ΔlytR* 和 *S. pogona-PdtaR* 的发酵液进行杀虫活性分析, 结果如图 6。就存活率而言, 前 3 天 3 种菌株发酵液相差不大; 3 d 以后, 与 *S. pogona* 相比, *S. pogona-ΔlytR* 的存活率差异不大, 而 *S. pogona-PdtaR* 的存活率明显更高。即 *S. pogona-ΔlytR* 发酵液对棉铃虫的杀虫活性没有太大影响, 而 *PdtaR* 过表达使得其发酵液

的杀虫活性下降, 这一结果与丁烯基多杀菌素的产量差异基本吻合。

2.3 工程菌株生长发育情况

为了分析 *lytR* 和 *pdtaR* 引起上述变化的原因, 我们进一步研究了 2 株工程菌的生长发育情况。通过生长曲线(图 7)发现: 在发酵起始的 3 d 内, *S. pogona* 和 *S. pogona-ΔlytR* 的生长密度呈现出快速增长的趋势, 随后, 原始菌的生

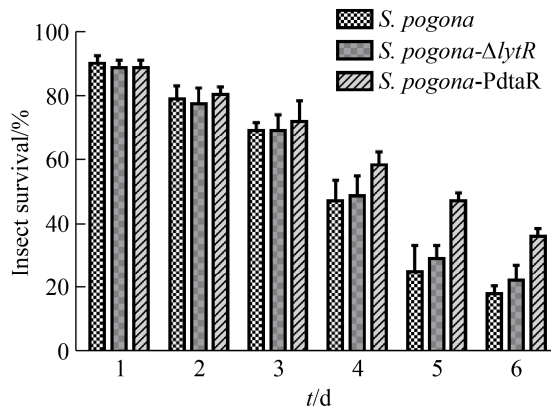


图6 *S. pogona*、*S. pogona-ΔlytR* 和 *S. pogona-PdtaR* 发酵液对棉铃虫杀虫效果比较

Figure 6 Comparison of insecticidal effects of *S. pogona*, *S. pogona-ΔlytR* and *S. pogona-PdtaR* fermentation broth on *Helicoverpa armigera*. Data are represented as mean±SD ($n=3$).

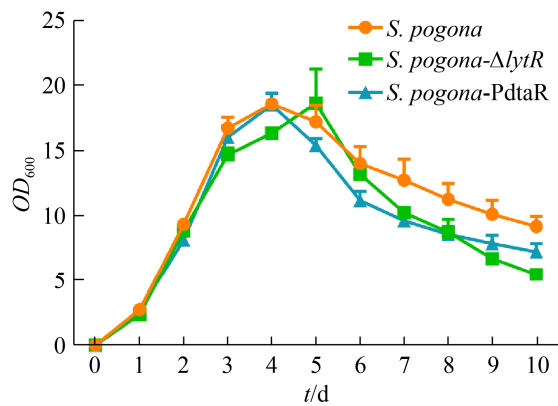


图7 *S. pogona-ΔlytR* 和 *S. pogona-PdtaR* 生长曲线的测定

Figure 7 Determination of growth curves of *S. pogona-ΔlytR* and *S. pogona-PdtaR*. Data are represented as mean±SD ($n=3$).

长趋于稳定, 而 *S. pogona-ΔlytR* 仍有一个缓慢的增长, 第5天之后急剧衰退。前期研究表明, 稳定期是须糖多孢菌生产丁烯基多杀菌素的关键时期^[22], 我们推测是由于 *S. pogona-ΔlytR* 稳定期的缩短, 使得其丁烯基多杀菌素的最大积累量时间提前, 从而表现出前期产量超出原始

菌, 而后期则低于原始菌的现象。

S. pogona 与 *S. pogona-PdtaR* 的最大生物量几乎相同, 变化历程基本同步。在发酵起始的4 d内, 两者的生长密度呈现指数型增长的趋势。随后进入稳定期, 维持不足24 h (早于5 d)开始衰退。*S. pogona* 与 *S. pogona-PdtaR* 的衰退速率有差异, 前者在4–5 d期间速率较慢趋于稳定, 5 d后速率明显增加随后又逐渐减小; 后者在5–6 d期间显著衰退, 且在6–7 d期间速率明显加剧, 随后速率逐渐减小。简而言之, PdtaR 过表达对须糖多孢菌生长的影响主要表现在衰退加剧。

2.4 工程菌株表型差异分析

除了对生长发育的影响, 在扫描电子显微镜下可以发现, 原始菌 *S. pogona* 和工程菌 *S. pogona-ΔlytR*、*S. pogona-PdtaR* 的细胞形态都为分枝丝状, 差异不大。但 *S. pogona-ΔlytR* 的菌丝体表面较 *S. pogona* 来说更为光滑平整, 毛刺结构较原始菌要少, 而原始菌的表面则是更加粗糙不平, 有明显的毛状突起结构; *S. pogona-PdtaR* 较 *S. pogona* 而言菌丝过于干瘪、表面褶皱较明显, 菌丝较细, 即 PdtaR 的过量表达一定程度上抑制了菌丝的生长(图8)。

对原始菌 *S. pogona* 和工程菌 *S. pogona-ΔlytR*、*S. pogona-PdtaR* 的产孢能力进行研究, 结果如图9。结果显示, 在BHI和TSB培养基上, 三者的产孢能力相近; 在CSM培养基上, 三者的产孢能力都略强于BHI和TSB培养基, 且 *S. pogona-ΔlytR*、原始菌 *S. pogona* 产生孢子的数量明显增多, 但 *S. pogona-PdtaR* 产孢数量与 *S. pogona* 相差不大。即就培养基营养成分而言, CSM培养基更有利于上述3种菌株产孢, *lytR* 敲除在一定程度上促进了菌体产孢, 而 PdtaR 过表达对菌体产孢能力影响不大。通过 qRT-PCR 分析, 发现在 *S. pogona-PdtaR* 中 *bldD*

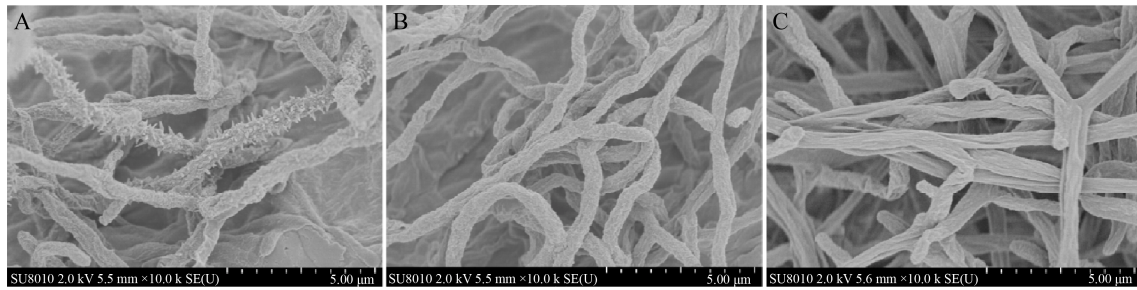


图 8 不同菌株的菌丝体形态差异

Figure 8 The mycelium morphology difference of different strains. A: the wild-type strain; B: *S. pogona-ΔlytR*; C: *S. pogona-PdtaR*.

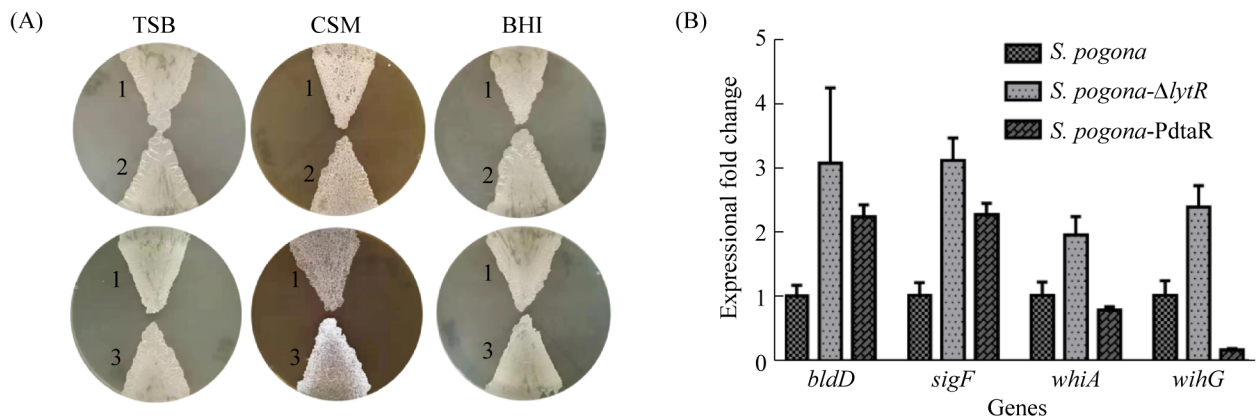


图 9 *S. pogona*、*S. pogona-PdtaR* 和 *S. pogona-ΔlytR* 的表型差异及 qRT-PCR 分析

Figure 9 The phenotype differences and qRT-PCR analysis of *S. pogona*, *S. pogona-PdtaR* and *S. pogona-ΔlytR*. A: the spore phenotype differences of *S. pogona*, *S. pogona-PdtaR* and *S. pogona-ΔlytR*. 1: the wild-type strain; 2: *S. pogona-PdtaR*; 3: *S. pogona-ΔlytR*; B: qRT-PCR analysis of genes related to spore phenotype. Data are represented as mean±SD ($n=3$).

和 *sigF* 基因的转录水平上调, 而 *whiG* 和 *whiA* 基因的转录水平下调, *bldD* 基因在相关研究中证实能够正调控次生代谢产物^[23], 这可能是 *S. pogona-PdtaR* 中未知代谢产物显著提高的原因, 而 *whiG* 和 *whiA* 基因受到该基因的负调控^[24], 这一结果与 qRT-PCR 的结果吻合。在 *S. pogona-ΔlytR* 中, 4 个调控孢子形成的基因全部表达上调, 其中 *whiG* 和 *whiA* 基因参与白色表型的调控, 与孢子观察结果吻合, 但是这 2 个基因的表达上调与 *bldD* 的结果相冲突, 可能是须糖多孢菌中存在其他的调控基因, 影响

了 *whi* 基因的转录。

上述表型实验和生长发育情况分析表明, *lytR* 和 *pdtaR* 在须糖多孢菌中具有重要的调控作用, 其中 *lytR* 基因的敲除引起了孢子表型的明显变化, 菌丝体相比原始菌也更为光滑, 其生物量增长的时间相比于原始菌更长, 说明 *lytR* 基因敲除更有利于须糖多孢菌初期的生长发育, 这可能有助该工程菌充分积累了生产丁烯基多杀菌素所需的能量和前体物质。而 *pdtaR* 的过表达导致了菌丝体发生皱缩的现象, 相比于原始菌, 其更早进入衰亡期, 表明其对须糖

多孢菌的生长发育有不利的影 响, 这可能也间接影响了丁烯基多杀菌素的生物合成, 从而使其产量显著下降。

3 讨论与结论

丁烯基多杀菌素因其高效、安全、无污染、杀虫谱广等优点, 成为当前国际上最瞩目的绿色生物杀虫剂, 而如何有效提高丁烯基多杀菌素产量成为了当前的研究热点。目前也有少量关于丁烯基多杀菌素高产菌的诱变、筛选、改造的报道。邬洋等用核糖体工程技术, 对须糖多孢菌进行巴龙霉素抗性筛选, 获得丁烯基多杀菌素产量提高 2.2 倍的突变株^[25]。罗林根等对须糖多孢菌进行链霉素抗性筛选, 获得丁烯基多杀菌素产量比原始菌株提高 1.79 倍的菌株^[26]。彭胜男等利用基因工程技术构建 *fcl* 基因的过表达菌株 *S. pogona-fcl* 和敲除菌株 *S. pogona-Δfcl*, 获得高产菌株 *S. pogona-Δfcl*^[27]。此外, 本实验室还挖掘了须糖多孢菌中的重要调控因子, 诸如 TetR 调控因子、Pnpase 和 SenX3-RegX3 双组分系统等对丁烯基多杀菌素的生物合成具有促进作用^[8,10-11], 但都没有产生重大的突破。上述研究表明, 利用生物技术提高丁烯基多杀菌素产量是极具潜力的, 而调控丁烯基多杀菌素生物合成的关键调控因子还有待挖掘。

本论文实验对须糖多孢菌中起信号转导作用的 LytSR 和 PdtaSR 双组分系统中的 LytR 调控因子和 PdtaR 受体蛋白首次进行探索研究。将 *lytR* 敲除, 构建敲除菌 *S. pogona-ΔlytR*, 将 *pdtaR* 基因置于强启动子 *KasOp** 下, 获得过表达菌 *S. pogona-PdtaR*。

通过 HPLC 检测和质谱鉴定丁烯基多杀菌素的特征峰可知, *S. pogona-ΔlytR* 第 8 天的发酵液中丁烯基多杀菌素产量与 *S. pogona* 相比提

高了 19.8%, 且其增长趋势与原始菌相比发生了变化, 表明 *lytR* 的敲除影响了须糖多孢菌的丁烯基多杀菌素的生物合成。而在 *S. pogona-PdtaR* 中, 发酵后丁烯基多杀菌素产量出现了明显的下调, 其色谱结果中一个未知代谢物的产量急剧升高。为了分析造成这一影响的原因, 我们对 2 个工程菌的生长发育和表型变化进行了全面分析。

S. pogona-ΔlytR 的生长曲线分析表明, 该工程菌株相比于原始菌衰退速率较慢, 推测是敲除了 *lytR* 基因后提高了须糖多孢菌的生存能力。观察 *S. pogona-ΔlytR* 和原始菌的细胞形态, 结果显示, *S. pogona-ΔlytR* 的菌丝体外观较光滑, 毛状突起少, 这可能有利于溶氧, 从而促进须糖多孢菌的生长发育, 也促进了有氧发酵和代谢生产。随后在培养基上培养原始菌和 *S. pogona-ΔlytR*, 结果显示在 CSM 固体培养基上 *S. pogona-ΔlytR* 产生了明显的白色表型, 由此可知培养环境是影响菌体表型的一个重要因素。此外, qRT-PCR 表明白色表型相关基因 *whiA* 和 *whiG* 在 *S. pogona-ΔlytR* 中出现了上调, 证实了观察结果的可靠性。

对 *S. pogona-PdtaR* 进行生长曲线测定, 发现 *S. pogona-PdtaR* 与 *S. pogona* 生长发育变化历程及最大生物量基本相同, 主要差异在于前者衰退速率更快、衰退程度更大。可能是由于 PdtaR 作为一种转录抗终止调节因子, 过量存在会导致某些生命活动难以适时停止, 从而对细胞状态产生一定的改变。对 *S. pogona-PdtaR* 进行电镜观察, 发现 *S. pogona-PdtaR* 与 *S. pogona* 的菌丝均呈分支状, *S. pogona* 的菌丝更长、更饱满, 而 *S. pogona-PdtaR* 的菌丝较为干瘪, 表明 PdtaR 的过量表达对菌丝的生长发育造成了不利影响。对 *S. pogona-PdtaR* 进行产孢能力分析, 发现 PdtaR 过表达对产孢能力影响不

大, qRT-PCR 结果表明, 白色表型相关的基因 *whiG* 和 *whiA* 表达出现了下调。

本论文阐述了重组载体构建、工程菌株构建的实验过程, 以及工程菌株生长发育、生理形态和生物合成产量等研究结果。本实验通过敲除 *LytR* 调控因子来提高丁烯基多杀菌素的产量, 我们推测是因为敲除 *LytR* 调控因子后影响了其下游 *lrg AB* 和 *cid ABC* 操纵子的表达水平^[18], 进而影响了丙酮酸的氧化反应过程, 提高了须糖多孢菌中酮类物质的含量, 有利于聚酮化合物丁烯基多杀菌素的合成。*LytR* 调控因子的敲除也可能影响了菌丝体发育的关键基因, 进而影响细菌的生长发育情况。此外, 本研究表明, *PdtaR* 过表达加快了菌体衰亡, 这可能也是导致丁烯基多杀菌素产量降低的主要原因。推测 *pdtaR* 基因的过表达, 提高了其表达产物转录抗终止调节因子 *PdtaR* 受体调节蛋白的含量, 从而对某些生命代谢活动产生影响, 导致菌体快速衰退, 进而影响了丁烯基多杀菌素产量和杀虫活性。简而言之, *pdtaR* 基因过表达对丁烯基多杀菌素生物合成有负调控影响。为了进一步验证上述推测, 我们需要对 *LytR* 和 *PdtaR* 调控因子的具体分子调控机制、以及参与的丁烯基多杀菌素生物合成代谢通路进行更完善且深层次的研究。

综上所述, *LytR* 调控因子和 *PdtaR* 受体蛋白在须糖多孢菌中可能通过信号转导等方式广泛影响了须糖多孢菌的代谢通路, 从而影响菌体的生长发育和丁烯基多杀菌素的生物合成。本文首次研究了 *LytR* 和 *PdtaR* 受体蛋白作为关键调控因子对须糖多孢菌合成丁烯基多杀菌素的影响, 为后续利用基因工程技术提升丁烯基多杀菌素的产量提供了方向, 也为进一步阐明丁烯基多杀菌素生物合成的调控机制, 优化丁烯基多杀菌素生物合成途径奠定了重要的理论基础。

参考文献

- [1] Hahn DR, Gustafson G, Waldron C, Bullard B, Jackson JD, Mitchell J. Butenyl-spinosyns, a natural example of genetic engineering of antibiotic biosynthetic genes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2006, 33(2): 94–104.
- [2] Young DL, Mihaliak CA, West SD, Hanselman KA, Collins RA, Phillips AM, Robb CK. Determination of spinosad and its metabolites in food and environmental matrices. 3. immunoassay methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(11): 5146–5153.
- [3] Lewer P, Hahn DR, Karr LL, Duebelbeis DO, Gilbert JR, Crouse GD, Worden T, Sparks TC, Edwards PMR, Graupner PR. Discovery of the butenyl-spinosyn insecticides: novel macrolides from the new bacterial strain *Saccharopolyspora pogona*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17(12): 4185–4196.
- [4] Millar NS, Denholm I. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate Neuroscience*, 2007, 7(1): 53–66.
- [5] Hong L, Zhao ZB, Melançon CE, Zhang H, Liu HW. *In vitro* characterization of the enzymes involved in TDP-D-forsamine biosynthesis in the spinosyn pathway of *Saccharopolyspora spinosa*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(14): 4954–4967.
- [6] Kim HJ, White-Phillip JA, Ogasawara Y, Shin N, Isiorho EA, Liu HW. Biosynthesis of spinosyn in *Saccharopolyspora spinosa*: synthesis of permethylated rhamnose and characterization of the functions of SpnH, SpnI, and SpnK. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(9): 2901–2903.
- [7] Huang KX, Xia LQ, Zhang YM, Ding XZ, Zahn JA. Recent advances in the biochemistry of spinosyns. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(1): 13–23.
- [8] Li L, Rang J, He HC, He SY, Liu ZD, Tang JL, Xiao J, He L, Hu SB, Yu ZQ, Ding XZ, Xia LQ. Impact on strain growth and butenyl-spinosyn biosynthesis by overexpression of polynucleotide phosphorylase gene in *Saccharopolyspora pogona*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(18): 8011–8021.
- [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] Li L, Gong L, He HC, Liu ZD, Rang J, Tang JL, Peng SN, Yuan SQ, Ding XZ, Yu ZQ, Xia LQ, Sun YJ. AfsR is an important regulatory factor for growth and butenyl-spinosyn biosynthesis of *Saccharopolyspora pogona*. *Annals of Microbiology*, 2019, 69(8): 809–818.
- [11] Rang J, He HC, Chen JM, Hu JJ, Tang JL, Liu ZD, Xia ZY, Ding XZ, Zhang YM, Xia LQ. SenX3-RegX3, an important two-component system, regulates strain growth and butenyl-spinosyn biosynthesis in *Saccharopolyspora pogona*. *iScience*, 2020, 23(8): 101398.
- [12] de Dios R, Santero E, Reyes-Ramírez F. Extracytoplasmic function σ factors as tools for coordinating stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 3900.
- [13] Staroń A, Sofia HJ, Dietrich S, Ulrich LE, Liesegang H, Mascher T. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) *Sigma factor* protein family. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(3): 557–581.
- [14] Darnell RL, Nakatani Y, Knottenbelt MK, Gebhard S, Cook GM. Functional characterization of BcrR: a one-component transmembrane signal transduction system for bacitracin resistance. *Microbiology: Reading, England*, 2019, 165(4): 475–487.
- [15] Mehdizadeh Gohari I, Li J, McClane BA. Identifying the basis for VirS/VirR two-component regulatory system control of *Clostridium perfringens* beta toxin production. *Journal of Bacteriology*, 2021: JB0027921.
- [16] Anantharaman V, Aravind L. New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. *Genome Biology*, 2003, 4(12): R81.
- [17] Patton TG, Yang SJ, Bayles KW. The role of proton motive force in expression of the *Staphylococcus aureus* cid and lrg operons. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(5): 1395–1404.
- [18] Sadykov MR, Bayles KW. The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. *Current Opinion in Microbiology*, 2012, 15(2): 211–215.
- [19] Sharma-Kuinkel BK, Mann EE, Ahn JS, Kuechenmeister LJ, Dunman PM, Bayles KW. The *Staphylococcus aureus* LytSR two-component regulatory system affects biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(15): 4767–4775.
- [20] Morth JP, Gosmann S, Nowak E, Tucker PA. A novel two-component system found in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Letters*, 2005, 579(19): 4145–4148.
- [21] Preu J, Panjikar S, Morth P, Jaiswal R, Karunakar P, Tucker PA. The sensor region of the ubiquitous cytosolic sensor kinase, PdtaS, contains PAS and GAF domain sensing modules. *Journal of Structural Biology*, 2012, 177(2): 498–505.
- [22] Rang J, He HC, Yuan SQ, Tang JL, Liu ZD, Xia ZY, Khan TA, Hu SB, Yu ZQ, Hu YB, Sun YJ, Huang WT, Ding XZ, Xia LQ. Deciphering the metabolic pathway difference between *Saccharopolyspora pogona* and *Saccharopolyspora spinosa* by comparative proteomics and metabolomics. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 396.
- [23] Mouri Y, Konishi K, Fujita A, Tezuka T, Ohnishi Y. Regulation of sporangium formation by BldD in the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(12): e00840-16.
- [24] Kaiser BK, Stoddard BL. DNA recognition and transcriptional regulation by the WhiA sporulation factor. *Scientific Reports*, 2011, 1: 156.
- [25] 邹洋, 徐妙, 罗林根, 杨燕, 夏立秋. 丁烯基多杀菌素高产菌株的巴龙霉素抗性筛选. *中国生物防治学报*, 2015, 31(1): 106–114.
Wu Y, Xu M, Luo LG, Yang Y, Xia LQ. Screening of butenyl-spinosyn high-yield strains by paromomycin resistance. *Chinese Journal of Biological Control*, 2015, 31(1): 106–114. (in Chinese)
- [26] 罗林根, 杨燕, 魏慧, 穰杰, 唐琼, 胡胜标, 孙运军, 余子全, 丁学知, 夏立秋. 须糖多孢菌 *Saccharopolyspora pogona* 的核糖体工程改造对丁烯基多杀菌素合成的影响. *生物工程学报*, 2016, 32(2): 259–263.
Luo LG, Yang Y, Wei H, Rang J, Tang Q, Hu SB, Sun YJ, Yu ZQ, Ding XZ, Xia LQ. Effect of ribosome engineering on butenyl-spinosyns synthesis of *Saccharopolyspora pogona*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(2): 259–263. (in Chinese)
- [27] 彭胜男, 何昊城, 苑爽芹, 穰杰, 胡胜标, 孙运军, 余子全, 黄伟涛, 胡益波, 丁学知, 夏立秋. *fcl* 基因对须糖多孢菌丁烯基多杀菌素生物合成及生长发育的影响. *生物工程学报*, 2019, 35(9): 1662–1675.
Peng SN, He HC, Yuan SQ, Rang J, Hu SB, Sun YJ, Yu ZQ, Huang WT, Hu YB, Ding XZ, Xia LQ. Effect of *fcl* gene for butenyl-spinosyn biosynthesis and growth of *Saccharopolyspora pogona*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(9): 1662–1675. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)