



异源重构白色链霉菌土霉素生产菌株

刘文溪¹, 李子龙², 闫浩², 张立新^{1,3*}, 王为善^{2,4*}

1 安徽大学物质科学与信息技术研究院, 安徽 合肥 230039

2 中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

3 华东理工大学生物工程学院, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

4 中国科学院大学, 北京 100049

刘文溪, 李子龙, 闫浩, 张立新, 王为善. 异源重构白色链霉菌土霉素生产菌株. 微生物学报, 2022, 62(10): 3858–3870.

Liu Wenxi, Li Zilong, Yan Hao, Zhang Lixin, Wang Weishan. Heterologous reconstitution of oxytetracycline producing strain in *Streptomyces albus* Del14. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3858–3870.

摘要:【目的】土霉素(oxytetracycline, OTC)属于第一代四环素类抗生素, 对革兰氏阳性菌和阴性菌具有很好的抑菌效果, 目前主要应用于畜牧业、水产养殖业和作为原料药生产二代、三代四环类抗生素。因此, 在生产上具有提高产量、降低成本的迫切需求。为了解决工业菌株改造中面临着遗传操作比较困难、周期长的问题, 我们通过异源重构白色链霉菌(*Streptomyces albus*) Del14 并作为底盘生产菌株, 进而评估该菌株 OTC 生物制造细胞工厂的潜力。【方法】通过理性工程重构, 获得一系列衍生菌株 Del14:Oxy、Del14:Oxy1K、Del14:Oxy1K Δ otrR、Del14B:Oxy1K Δ otrR。对上述菌株进行摇瓶发酵以及 HPLC 检测发酵产物; 通过 RT-qPCR 检测 OTC 生物合成基因簇(*otc* cluster)相关结构基因的转录水平。【结果】*S. albus* Del14 生长快、不结球, 对 OTC 具有一定的耐受性。通过操纵簇内调控因子 OtcR 和 OtrR, 最终使重组菌株 Del14B:Oxy1K Δ otrR OTC 产量在第 6 天达到了 1.1 g/L, 与原始生产菌株龟裂链霉菌(*S. rimosus*) M4018 在第 8 天产量相当。【结论】本研究首次在 *S. albus* Del14 中异源表达了土霉素生物合成基因簇, 初步证实了一个很有潜力的 OTC 生物制造底盘, 为这一 OTC 生产菌株的进一步优化改造奠定了基础。

关键词: 白色链霉菌; 异源表达; 土霉素; 簇内调控因子

基金项目: 国家自然科学基金(31922002, 32100066); 国家重点研发计划(2021YFC2100600)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31922002, 32100066) and by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100600)

*Corresponding authors. E-mail: WANG Weishan, wangws@im.ac.cn; ZHANG Lixin, lxzhang@ecust.edu.cn

Received: 18 February 2022; Revised: 21 March 2022; Published online: 6 June 2022

Heterologous reconstitution of oxytetracycline producing strain in *Streptomyces albus* Del14

LIU Wenxi¹, LI Zilong², YAN Hao², ZHANG Lixin^{1,3*}, WANG Weishan^{2,4*}

1 Institutes of Physical Science and Information Technology, Anhui University, Hefei 230039, Anhui, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology (ECUST), Shanghai 200237, China

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] Oxytetracycline (OTC) is one of the first-generation tetracycline antibiotics, with good inhibitory effects on Gram-positive and Gram-negative bacteria. It is mainly used in animal husbandry and aquaculture industry, and also served as the raw material of second-generation and third-generation tetracyclic antibiotics. Therefore, there is an urgent need to improve productivity and reduce costs in production. To simplify genetic manipulation and shorten cultivation time, we evaluated the OTC biomanufacturing capacity of *Streptomyces albus* Del14 by heterologous expression and cluster refactoring. [Methods] Through rational cluster refactoring, we obtained a series of derivative strains: Del14:Oxy, Del14:Oxy1K, Del14:Oxy1K Δ otrR and Del14B:Oxy1K Δ otrR. The above strains were fermented in shake flask and OTC was analyzed by HPLC. Additionally, the transcriptional levels of structural genes related to *otc* cluster were detected by RT-qPCR. [Results] *S. albus* Del14 showed rapid growth and sufficient dispersed mycelia as well as high resistance to OTC. By manipulation of the expression of two cluster-situated regulators OtcR and OtrR, the OTC yield of the recombinant strain Del14B:Oxy1K Δ otrR reached 1.1 g/L on the 6th-day of fermentation, which was comparable to the production by the native host *S. rimosus* M4018 on the 8th day. [Conclusion] In this study, the *otc* cluster was expressed in *S. albus* Del14 for the first time and the potential for OTC biomanufacture as a chassis strain was preliminarily confirmed, laying the foundation for further OTC production optimization.

Keywords: *Streptomyces albus*; heterologous expression; oxytetracycline; cluster-situated regulators

土霉素(oxytetracycline, OTC)是由 *Streptomyces rimosus* 产生的第一代天然的四环素类抗生素。作为一类具有独特化学结构的芳香聚酮类化合物, OTC 具有广谱的抗菌活性, 对革兰氏阳性菌、阴性菌、立克次氏体等细菌均具有较好的抑制作用, 其抑菌机制主要是抑制细菌蛋白质的合成^[1]。目前, OTC 虽然在临床上不再大范围使用, 但是在兽药领域依然占有较大的市场份额, 广泛地应用于饲料添加剂以及水产养殖

等方面。另外, 临床上广泛使用的二代和三代四环素类抗生素同样需要 OTC 作为原料药进行半合成生产。因此, OTC 具有切实的市场需求。

OTC 的生物合成途径已经得到详细的解析。Tang 等^[2-4]确定了成簇排列的 30 kb 土霉素生物合成基因簇(*otc* cluster) (图 1A), 并且解析了簇内各个结构基因的功能, 其合成过程为 (图 1B): 首先, 通过最小聚酮合成酶 PKS (OxyA、OxyB、OxyC)和酰胺基转移酶 OxyD 催化底物

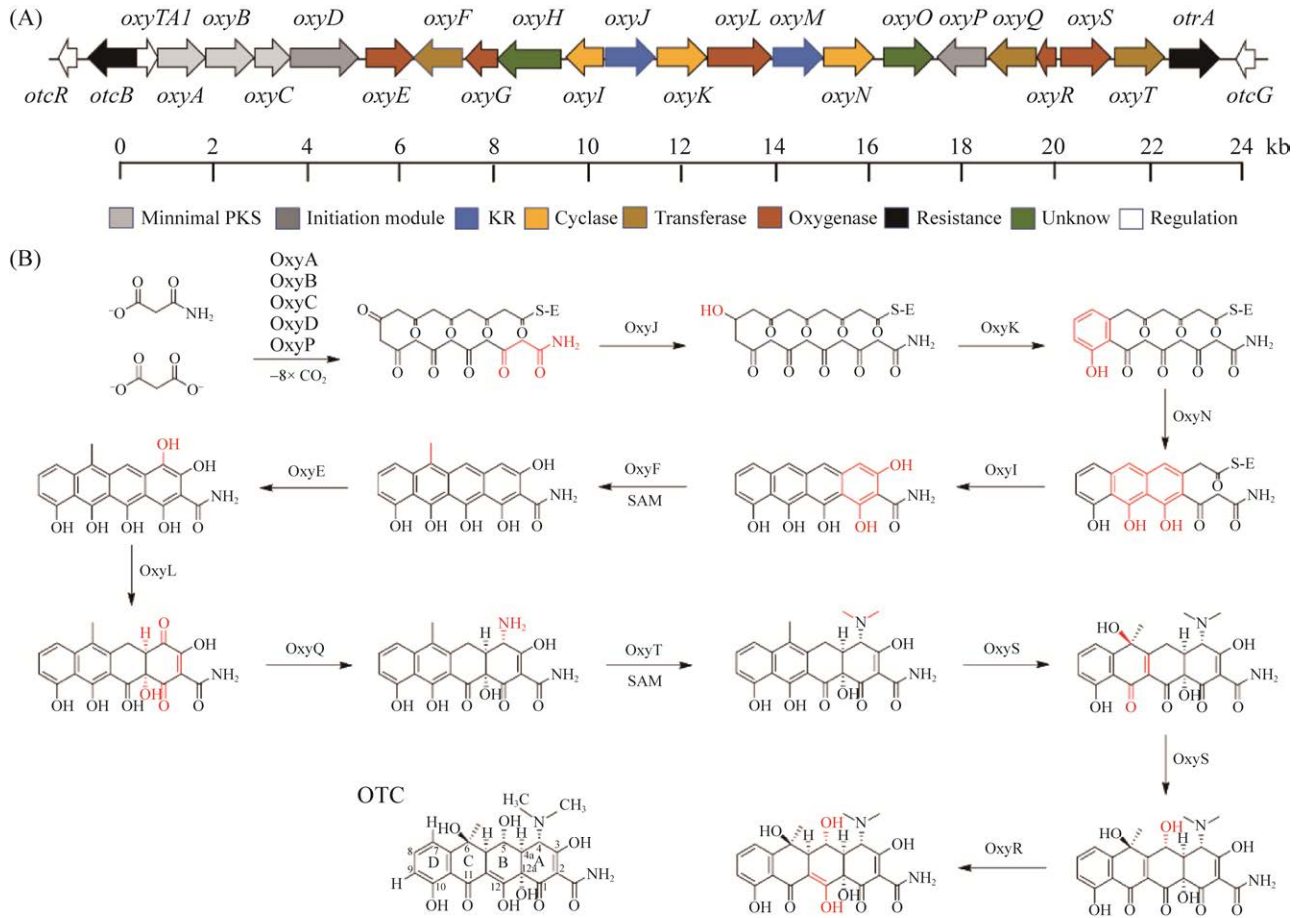


图 1 土霉素生物合成基因簇示意图(A)和土霉素的生物合成途径^[2](B)

Figure 1 Schematic diagram of *otc* cluster (A) and the pathway of biosynthesis of OTC^[2] (B).

(丙二酸单酰辅酶 A)进行克莱森缩合反应形成 OTC 聚酮骨架；接着在酮基还原酶 OxyJ 催化作用下使聚酮链 C8 位酮基还原，并在 OxyK、OxyN 和 OxyI 环化酶/芳香化酶作用下催化形成 D 环、C 环、B 环和 A 环；同时在其他后修饰酶 OxyE、OxyF、OxyL、OxyR、OxyS、OxyT、OxyQ 作用下对四环骨架上的基团修饰，最终形成 OTC。然而，目前对 OTC 生物合成的调控机制研究尚不系统，Butler 等^[5]对土霉素生物合成基因簇两端抗性基因 *otrB* 和 *otrA* 的功能进行了诠释；此外，本实验室对簇内调控基因 *otrR* 和 *otcR* 的功能进行了研究，其中 OtrR 直接抑制编码 OTC 外排泵基因 *otrB* 的表达，进而影

响 OTC 的外排，而 OtcR 直接正调控土霉素生物合成基因簇相关结构基因的转录^[6-7]。因此，对 OTC 的合成途径以及 OTC 生物合成调控机制的研究为我们后续的工程改造奠定基础。

目前，实现链霉菌次级代谢产物的高效生产是亟须解决的问题，但是在工业菌株改造中面临着改造周期长、遗传操作困难的问题，因此，利用合成生物学手段将目标代谢途径基因簇在异源宿主中表达是一种有效策略。白色链霉菌生长周期短、遗传操作容易，常作为异源表达次级代谢产物的模式菌株。Rebets 等^[8]在白黑链霉菌(*Streptomyces alboniger*)中克隆出生产帕马霉素(pamamycin)的完整生物合成基因簇，

并成功在 *S. albus* J1074/R2 中实现异源表达。Fisomigrastatin 和 steffimycin 在异源宿主 *S. albus* J1074 中成功异源表达,且产量比其他异源宿主如 *S. lividans*、*S. coelicolor* 高^[9-10]。*S. albus* Del14 是在 *S. albus* J1074 的基础上敲除 15 个次级代谢产物合成基因簇得到的衍生菌株,不仅具有生产次级代谢产物的能力,而且遗传背景更简单,不产生 II 型聚酮类化合物,可以一定程度上减少前体竞争途径^[11-12]。Luzhetskyy 等在 *S. albus* Del14 中成功异源合成了 nybomycin、tunicamycin B2、aloesaponarin 等 9 种次级代谢产物,其中 6 种天然产物的产量高于常用的 *S. albus* J1074 和 *S. coelicolor*^[11,13]。我国是 OTC 原料药生产大国,工业上生产 OTC 的菌株是 *S. rimosus*, 同样面临着遗传操作困难、发酵周期长(一般需要 8-10 d)的问题,这些因素限制了对工业菌株的进一步改造。因此,亟须通过菌种工程改造以缩短发酵周期,从而提高生产效率。为了解决这个

问题,将土霉素生物合成基因簇在遗传操作容易、遗传背景简单、生长速度比较快的白色链霉菌菌株中异源表达是一个有效的策略^[14-15]。因此,本研究拟在底盘菌株 *S. albus* Del14 中异源表达土霉素生物合成基因簇。实现异源表达后,我们基于前期认识,进一步进行理性工程改造,以期达到高效发酵生产 OTC 的目的。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和培养条件

本研究所用的菌株、质粒和引物分别如表 1 和表 2 所示。*S. albus* Del14 来自于 Andriy Luzhetskyy 实验室,作为生产 OTC 的异源宿主菌株。链霉菌的培养基包括 MS 和 R5。白色链霉菌在 MS 平板上培养 3 d 开始产孢,培养温度 30 °C。结合子的筛选需要用 50 µg/mL 安普抗生素。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids for this work

Name	Description	Sources
Strains		
DH5α	Cloning host	This lab
ET12567/pUZ8002	<i>recE</i> , <i>dcm</i> ⁻ , <i>dam</i> ⁻ , <i>hdsS</i> , <i>Cmr</i> , <i>Tetr</i> , <i>Strr</i> , <i>Kmr</i>	This lab
Epi300	Cloning host	Commercial
JM109	Cloning host	This lab
GB08-red	Harboring an arabinose inducible RED/ET recombination system	
DH5α (BT340)	Containing the temperature sensitive FLP recombination plasmid pCP20	[16]
<i>S. venezuelae</i> WVR2006	Mutant strain, which deleted the jadomycin biosynthetic gene cluster	[17]
<i>S. venezuelae</i> V2006::oxy2K	Integrated the plasmid pSET153-OTCΔotrR and pSOK616-KotcR in the genome of WVR2006	This lab
<i>S. albus</i> J1074	Strain, which derived from <i>S. albus</i> DSM 41398	
<i>S. albus</i> Del14	Mutant strain, which deleted 15 biosynthetic gene clusters of <i>S. albus</i> J1074	Andriy Luzhetskyy
Del14:Oxy	Integrated the plasmid pSET153-OTC in the genome of <i>S. albus</i> Del14	This study
Del14:Oxy1K	Integrated the plasmid pSET153-OTC-KotcR in the genome of <i>S. albus</i> Del14	This study
Del14:Oxy1KΔotrR	Integrated the plasmid pSET153-OTCΔotrR-KotcR in the genome of <i>S. albus</i> Del14	This study
Del14B:Oxy1KΔotrR	Integrated the plasmid pSET153-OTCΔotrR-KotcR-BT1 in the genome of <i>S. albus</i> Del14	This study

(待续)

(续表 1)

Plasmids		
pLC803	Integrative vector, containing the BT1 sequence	This lab
pSET153	Integrative vector	This lab
pSET153-BT1	Derived from pSET153, containing AmR, oripUC18, attPBT1, oriT and BT1 site	This study
pSET153-BT1tu	Mutant NheI restriction site of BT1 sequence	This study
pSET153-OTC	Derived from pSET153, containing <i>otc</i> cluster	This study
pSET153-OTC-KotcR	Derived from pSET153-OTC, <i>kasOp*</i> -driven <i>otcR</i>	This study
pSET153-OTC Δ otrR-KotcR	Derived from pSET153-OTC-KotcR, knocked out <i>otrR</i>	This study
pSET153-OTC Δ otrR-KotcR-BT1	Derived from pSET153-OTC Δ otrR-KotcR, containing BT1	This study
pSOK616-kotcR	Derived from pSOK616, containing one copy of <i>kasOp*</i> -driven <i>otcR</i>	This lab
pIJ779	Containing FRT site, <i>addA</i>	This lab

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers for this study

Primers	Sequences (5'→3')
Del14- <i>otc</i> -F	CGAGATGCCCGCAGTGACCG
Del14- <i>otc</i> -R	GGCGGAGCAGACGCTCGTC
OTC-Sok616-kotcR-F	CATCGGTGCGATCATGGTTC
OTC-Sok616-kotcR-R	GTCGACCTGCAGGCATGCTC
Del14- <i>otc</i> -OtrRDM-BT1-F	GCCGCGATACTGGGCGTATG
Del14- <i>otc</i> -OtrRDM-BT1-R	ACTCACCGCGACGTATCGG
otrRDM-BT1-pSOK616-kotcR-F	GAGCTCGTCAGCACGAGCGTG
otrRDM-BT1-pSOK616-kotcR-R	CGAGGATCGTGGCATCACCG
Nd-F	GCCAACATAGTAAGCCAGTATACACTCCGCTAGCGCTGATGTCC
Nu-R	CTCACCGCGACGTATCGGGCCCTGGCCAGCTAGCTAGAGTCGACCTG
oxyA-F	GCGTGCTTCGACGCGATCAAG
oxyA-R	GTGCGGTAATCCTCCAGGAC
oxyI-F	TGGGCGTTGGCGACGAAGA
oxyI-R	CGCTCTACCAGGAGATCCAGCA
oxyJ-F	GTCACCGTCAACGCCGTGTGC
oxyJ-R	CCAGCGGGATCTTGTCGTTG
oxyR-F	GATCATCTCGTCGGCGCAGTG
oxyR-R	TCGTGGACGACGTGCCGTGC
oxyS-F	GTACGAGGTCGAGTGCGCGT
oxyS-R	GCGATCACCGCGAACATGTG
otcR-F	GGAACCATTCGTCTAGGGG
otcR-R	CGTCCGCAAACCTCCGCAT
HrdB-F	CGACATGTTGAGCGAGACCG
HrdB-R	GAGTTCAACCGCGAGAACGGC
OtrB-F	GATGCCGACGCCGAGCCAGAG
OtrB-R	GATCGTGGGCTGGGCTCG
kasO*-F	GAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGATTGTTCCACATTCGAACGGTCTC
kasO*-R	GGACGGTGTACGTGCCGGTGCCGATTCAAGACGCCGACCTCAACA
otrR-FRT-F	GGCTTTTGACAAGGTCTTGTCGTTCTCCGGGGAGTACATACGCTGTGGCC AATTCCGGGATCCGTCGACC
otrR-FRT-R	ACGCCCCGGGCCACTCCGGAGAGACGGCCGGGCGGGGCGGGCCGCTCA GGTGTAGGCTCCAGCTGCTTC

大肠杆菌 DH5 α 、JM109、ET12567/pUZ8002 均由本实验室保藏, 分别用于质粒 DNA 操作、质粒去甲基化的模板菌株。大肠杆菌 BT340 用于 FLP 介导的位点特异性重组^[16]。大肠杆菌菌株在 LB 培养基中培养, 抗生素使用浓度: 安普霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 氯霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10; 酵母提取物 5; NaCl 10, 加水溶解, 调节 pH 7.0, 加蒸馏水定容 1 000 mL; 固体培养基需加入 1.5% 的琼脂粉。121 $^{\circ}\text{C}$ 、 1.01×10^5 Pa 灭菌 30 min。

R5 培养基(g/L): 蔗糖 103; K_2SO_4 0.25; $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10.12; 葡萄糖 10; 酪蛋白氨基酸 0.1; 微量元素 2 mL (ZnCl_2 40 mg; $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg; $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; 加水定容至 1 000 mL); 酵母提取物 5; TES 5.73, 加蒸馏水定容至 1 000 mL, 磁力搅拌器搅拌混合均匀, 分装入 500 mL 的三角摇瓶中, 每瓶 200 mL, 固体培养基加入 4 g 的琼脂粉, 115 $^{\circ}\text{C}$ 、 1.01×10^5 Pa 灭菌 30 min。

使用前, 每瓶加入 2 mL KH_2PO_4 缓冲液 (0.5%); 0.8 mL CaCl_2 缓冲液 (5 mol/L); 3 mL 20% 的 L-脯氨酸; 1 mol/L 1.4 mL NaOH。

MS 培养基(g/L): 甘露醇 20; 黄豆粉 20; 琼脂 15; 加自来水定容至 1 000 mL。121 $^{\circ}\text{C}$ 、 1.01×10^5 Pa 灭菌 30 min。

2 \times YT 培养基(g/L): 胰蛋白胨 16; 酵母提取物 10; NaCl 5; 可用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 加蒸馏水定容 1 000 mL。121 $^{\circ}\text{C}$ 、 1.01×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。限制性内切酶和 Q5

DNA 聚合酶购自 NEB 公司, T4 DNA 连接酶和 *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; 色谱柱 (5 μm , 4.6×150 mm)、HPLC (岛津)。OTC 分析标品购自北京沃凯生物科技有限公司。实时荧光定量 PCR 仪采用 ABI 7500 Fast Real-Time PCR Systems, 荧光染料 SystemsPowerUpTM SYBRTM green master mix (ABI)。

1.2 重组质粒的构建

pSET156 质粒构建: 通过 PCR 扩增 pLC803 质粒上 BT1 片段。通过 *Sph* I 和 *Pvu* I 酶切 BT1 序列和载体 pSET152, 通过 T4 DNA 连接酶连接载体和片段。通过菌落 PCR 验证以及双酶切验证后, 我们将构建好的质粒进行测序, 测序结果正确即重组质粒构建成功。

pSET153-BT1 质粒构建: 通过 *Sph* I 和 *Pvu* II 酶切质粒 pSET156 和载体 pSET153, 通过 T4 DNA 连接酶连接载体和片段, 通过菌落 PCR 验证并进行测序, 测序结果正确即重组质粒构建成功。

pSET153-BT1tu 质粒构建: 在 pSET153-BT1 质粒的基础上, 首先设计带有 *Nhe* I 突变位点的引物(primer 突变 1 和 primer 突变 2)使其扩增成线性片段, 然后 *Dpn* I 消化 1 h, 电泳鉴定并胶回收后转入 JM109 感受态细胞中, 最后在安普抗性平板筛选出阳性克隆并测序。

pSET153-OTC-KotcR 质粒构建: 用 kaso*-F/kaso*-R PCR 扩增 pSOK616-KotcR^[18]上一段含有 *kasOp**启动的 *otcR* 基因片段 936 bp, 与此同时用 *EcoR* V 酶切 pSET153-OTC 获得线性载体片段, 然后将线性载体和片段在大肠杆菌 Epi300 进行 Gibson 组装, 并通过安普霉素抗性筛选出阳性克隆。

pSET153-OTC Δ otrR-KotcR 质粒构建: 通过 PCR-targeting 技术敲除 pSET153-OTC-KotcR 质粒上的负调控基因 *otrR*。首先是利用引物对

otrR-FRT-F/otrR-FRT-R 在 pIJ779 质粒中扩增出一个 1 406 bp 的片段(FRT 位点、壮观霉素抗性基因和 *otrR* 基因同源臂 50 bp 重叠区域)。将纯化后的 PCR 片段和质粒 pSET153-OTC-KotcR 导入大肠杆菌 GB08-red 中发生 Red/ET 重组, 壮观霉素抗性筛选获得目的质粒 pSET153-OTC-KotcR-FRT, 并转化到含有温敏型质粒 pCP20 的大肠杆菌 BT340 细胞中, 通过 PCR 和测序证实了 *otrR* 的破坏。

pSET153-OTC- Δ otrR-BT1 质粒构建: 设计带有同源臂的一对引物(Nd-F/Nu-R), 获得 BT1 序列, 与此同时, 通过 *Nhe* I 酶切质粒 pSET153-OTC Δ otrR-KotcR, 然后通过重组酶(NovoRec[®] PCR 一步定向克隆试剂盒)重组, 并转化大肠杆菌 EPi300 筛选得到正确的质粒后送擎科生物公司(北京)测序。

1.3 RNA 的分离以及逆转录

利用 Trizol 法提取链霉菌样本的总 RNA, 然后配制 DNase I (TaKaRa) 消化基因组 DNA 以消除染色体 DNA 污染。向 2 μ g 总 RNA 中加入 4 μ L Random 6 mers (TaKaRa), 70 °C 变性 10 min, 立即冰浴冷却 3 min, 利用反转录酶(Promega)进行反转录获得 cDNA。取 1 μ L cDNA 作为模板进行荧光定量 PCR。以 *hrdB* 基因作为内参基因用于定量基因的相对转录水平^[19]。RT-qPCR 所用引物列在表 2。

1.4 接合子的筛选以及菌株发酵

通过链霉菌接合转移实验、安普霉素抗性筛选以及 PCR 验证得到正确的接合子。将验证正确的重组菌株在 MS 平板上培养 3–4 d, 产孢后用菌种铲通过挖块(1 cm \times 2 cm)处理, 在 R5 培养基中进行种子和发酵摇瓶实验。其中种子培养时间是 36 h, 按 5%接种量转接至发酵培养基中培养 6 d, 220 r/min、30 °C 摇床发酵培养。

1.5 高效液相色谱分析

OTC 产量定量分析: 取发酵液 1 mL, 然后用 9 mol/L 盐酸酸化, PH 范围在 1.5–2.0 之间。12 000 r/min 离心 10 min 左右, 取上清于新的 EP 管, 0.22 μ m 滤膜过滤后取 200 μ L 于样品瓶内衬管中。色谱柱选择的是 Diamonsil C₁₈ 反向柱(250 \times 4.6 mm), HPLC 检测时流动相为 60%去离子水、10%甲醇、20%乙腈和 10%磷酸(2 mmol/L)。检测过程中 A 泵流速为 0.35 mL/min, B 泵流速为 0.15 mL/min, 检测的波长是 350 nm, OTC 吸收峰的保留时间是 6.0 min 左右^[7]。

2 结果与分析

2.1 土霉素生物合成基因簇的异源表达

为了解决生产菌株发酵周期长、生产效率不高的问题, 本实验室前期以 *S. venezuelae* WVR2006 作为异源表达土霉素生物合成基因簇的宿主。通过一系列工程改造使 *S. venezuelae* V2006::oxy2K OTC 产量达到 320 mg/L^[18]。虽然 *S. venezuelae* WVR2006 具有生长速度快、发酵周期短、分散性生长等优势, 但是我们在后续遗传改造中很难实现 OTC 产量大幅度提升。因此, 为了寻找更合适的宿主, 在本研究中我们选择 Andriy Luzhetskyy 实验室开发的底盘菌株 *S. albus* Del14 作为 OTC 生产宿主。*S. albus* Del14 是在 *S. albus* J1074 的基因组上敲除 15 个次级代谢产物基因簇获得的衍生菌株, 因此基因组更小, 遗传稳定性更好。相对于前期我们使用的 *S. venezuelae* WVR2006 宿主, 其优势总结见表 3。

前期通过 Red-ET 重组技术获得完整的土霉素生物合成基因簇, 并构建了 pSET153-OTC 质粒(图 2A)。本研究将空载质粒 pSET153 以及 pSET153-OTC 质粒整合到 *S. albus* Del14 中, 并设计一对嵌合引物 Del14-otc-F/Del14-otc-R

表 3 *S. albus* Del14、*S. rimosus* M4018 和 *S. venezuelae* WVR2006 宿主的比较Table 3 Characteristics of *S. albus* Del14, *S. rimosus* M4018 and *S. venezuelae* WVR2006

Strains	Genome size/Mb	G+C/%	Fermentation time/d	Resistance/($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. venezuelae</i> WVR2006	8.16	72.3	4	100–150
<i>S. albus</i> Del14	6.34	73.3	6	200–300
<i>S. rimosus</i> M4018	8.90	72.0	8	500

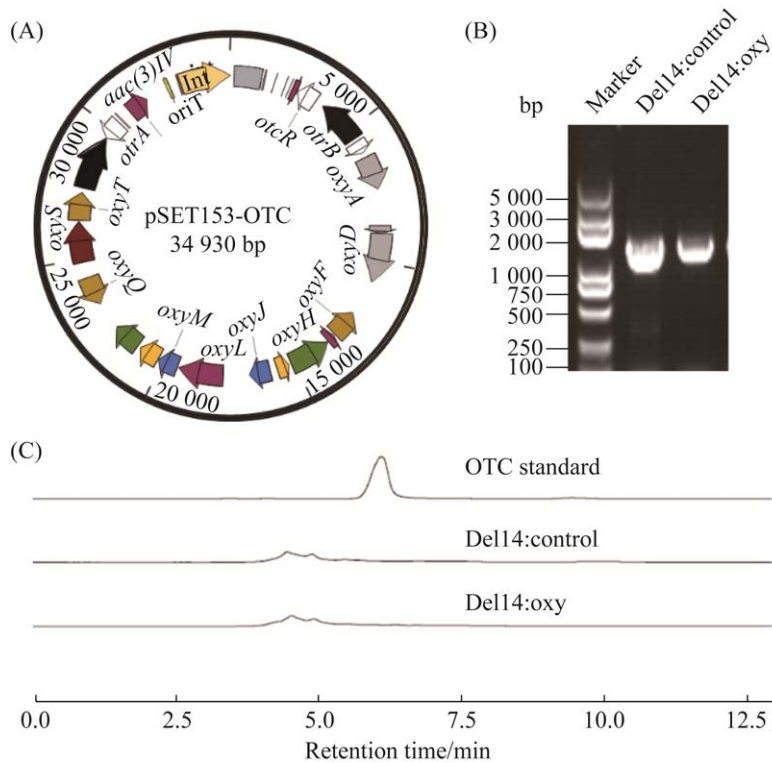


图 2 pSET153-OTC 质粒图谱(A)、接合子验证(B)以及 HPLC 检测相关菌株 OTC 产量(C)

Figure 2 The plasmid map of pSET153-OTC (A), the results of the colony PCR (B) and HPLC analysis of OTC production (C). A: the *otc* cluster is inserted into the vector pSET153 to obtain the recombinant plasmid pSET153-OTC; B: Del14:control: a derivative strain obtained by integrating the empty pSET153 plasmid into *S. albus* Del14; C: OTC titers of strains Del14:control and Del14:Oxy is detected by HPLC.

进行菌落 PCR 验证, 筛选得到了衍生菌株 Del14:control 和 Del14:Oxy (图 2B)。通过摇瓶发酵实验检测相关菌株合成 OTC 的能力, 结果发现, 在菌株 Del14:control 和 Del14:Oxy 发酵液中没有检测到 OTC 的合成(图 2C)。

2.2 激活土霉素生物合成基因簇的表达

OtcR 是 OTC 产生所必需的 SARP 激活因子, 直接激活土霉素生物合成基因簇中 *oxyA*、

oxyI、*oxyJ*、*oxyR* 和 *oxyS* 所在的 5 个操纵子的表达^[7] (图 3A)。本研究在 *S. albus* Del14 中异源表达土霉素生物合成基因簇, 并未检测到 OTC 的合成。猜测其原因可能是在异源宿主中簇内激活因子 OtcR 未表达, 从而无法激活土霉素生物合成基因簇的表达。为了证实这一猜想, 我们通过 RT-qPCR 实验检测重组菌株 Del14:Oxy 发酵第 1 天(对数期)和第 3 天(稳定期)簇内激活基因

otcR 和土霉素生物合成基因簇相关结构基因的转录水平,结果显示 Del14:Oxy 中 *otcR*、*oxyA*、*oxyI*、*oxyJ*、*oxyR* 和 *oxyS* 均未表达。因此,为了激活 *otcR* 转录表达进而激活土霉素生物合成基因簇的表达,在 pSET153-OTC 质粒的基础上,增加一拷贝利用强启动子 *kasOp**启动 *otcR* 表达的重组质粒 pSET153-OTC-KotcR,经结合转移将 pSET153-OTC-KotcR 转入 Del14 菌株,并通过菌落 PCR 验证获得重组菌株 Del14:Oxy1K (图 3B)。进一步利用 RT-qPCR 检测 Del14:Oxy1K 中 *otcR* 和 5 个结构基因(*oxyA*、*oxyI*、*oxyJ*、*oxyR* 和 *oxyS*)的转录水平。结果显示,在 Del14:Oxy1K 第 1 天和第 3 天中均能检测到 *otcR* 和 5 个结构基因的转录表达(图 3C)。上述结果表明,通过增强转录激活因子 OtcR 的表达进而激活土霉素生物合成基因

簇的表达来提高 OTC 的产量这一策略是可行的。此外,摇瓶发酵实验结果显示,菌株 Del14:Oxy1K 在 R5 培养基中 OTC 产量约 140 mg/L,比前期实验室改造的 WVR2006 菌株 OTC 产量提高了 1.08 倍,这表明 *S. albus* Del14 作为 OTC 生产底盘菌株优于 *S. venezuelae* WVR2006 (图 3D)。

2.3 敲除负调控基因提高 OTC 产量

研究表明,簇内调控因子 OtrR 是 MarR 家族的负调控因子,它可以通过响应胞内 OTC 信号进而从 *otrB* 的启动子区脱阻遏,以激活外排泵基因 *otrB* 的表达并将 OTC 分泌到胞外,从而降低 OTC 对细胞的生理性伤害^[6,20] (图 4A)。因此,在底盘菌株 Del14:Oxy1K 中通过敲除负调控基因 *otrR* 促进 OTC 的外排来提高 OTC 的产量是一种潜在的有效策略。

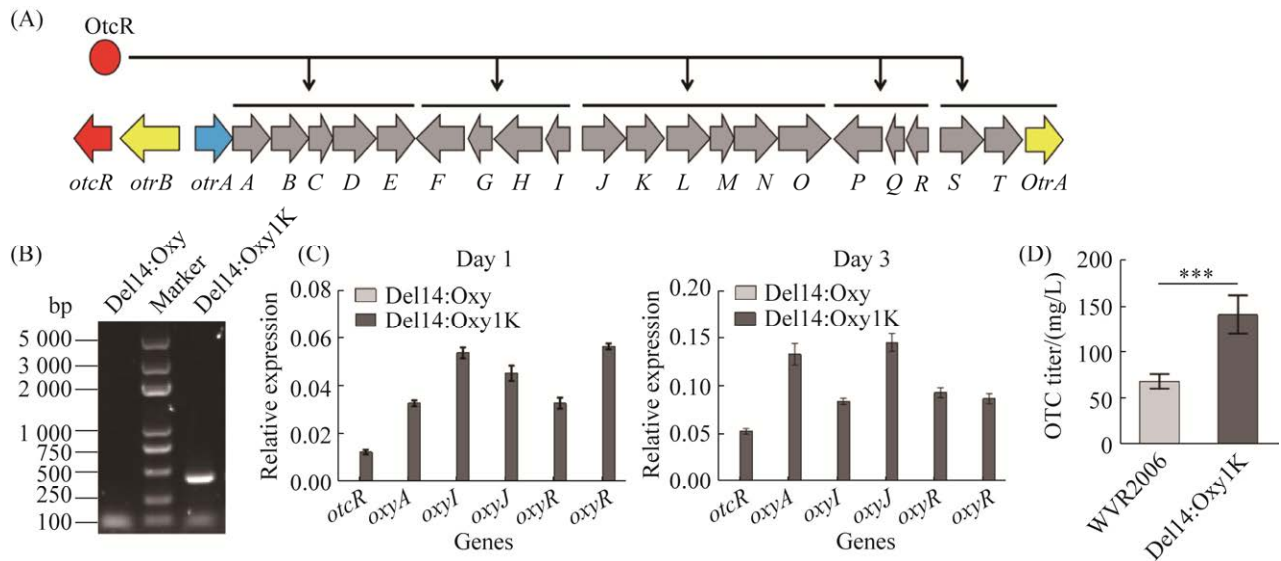


图 3 OtcR 调控土霉素生物合成基因簇示意图(A)、接合子验证(B)、RT-qPCR 检测相关结构基因的转录水平(C)以及 OTC 的滴度测定(D)

Figure 3 Schematic diagram of OtcR directly regulating *otc* cluster (A), the results of the PCR screening (B), and transcription levels of related structural genes are detected by RT-qPCR (C) and the titers of OTC of selected strain is detected. A: OtcR directly regulates the transcription and expression of *oxyA*, *oxyI*, *oxyJ*, *oxyR* and *oxyS*; B: the screening of Del14:Oxy1K; C: the level of transcription and expression of OTC cluster-related structural genes *oxyA*, *oxyI*, *oxyJ*, *oxyR* and *oxyS* is detected by RT-qPCR. The experimental results were obtained from three biological replicates and statistically analyzed by Student's *t*-test. ***: $P < 0.001$.

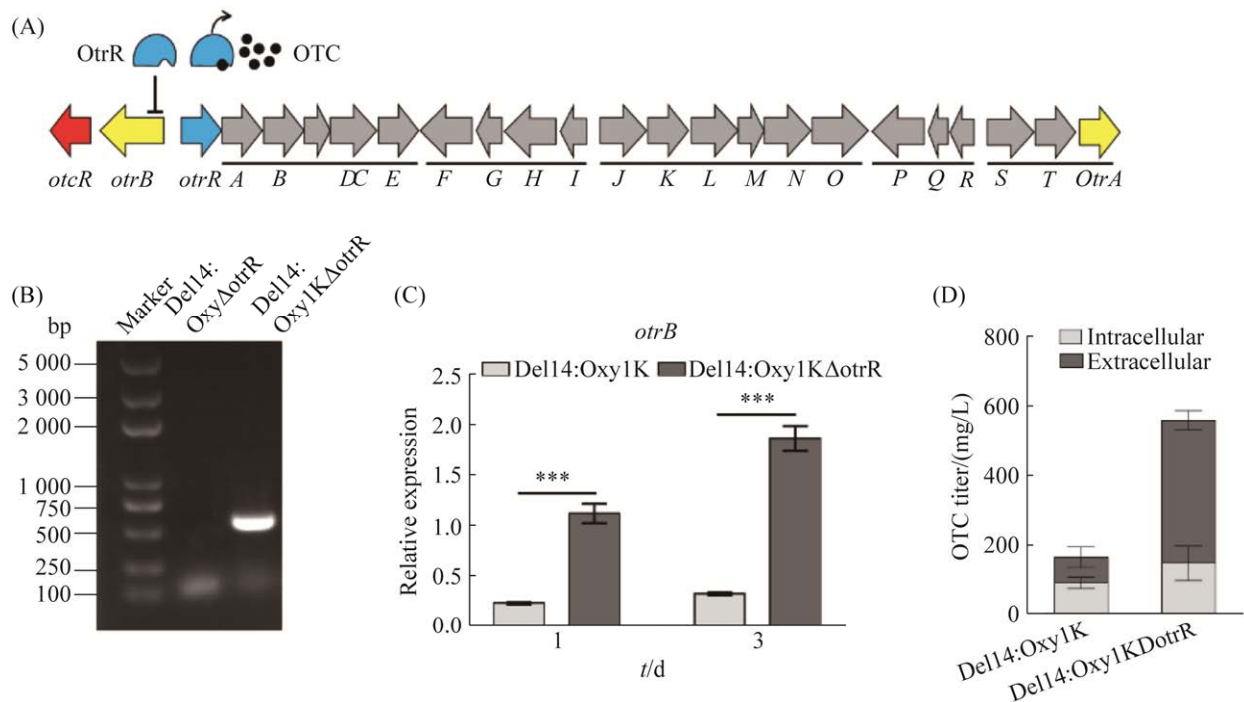


图4 OtrR 调控 *otrB* 的示意图(A)、接合子验证(B)、检测 *otrB* 转录水平(C)以及相关菌株胞内胞外 OTC 浓度的检测(D)

Figure 4 Schematic diagram of OtrR regulates the *otrB* promoter region (A), the results of the PCR screening (B), the level of transcription of *otrB* is detected (C) and comparison of intracellular and extracellular OTC titer (D). A: OtrR inhibits the level of transcription of *otrB* through binding to the promoter region of *otrB* and OTC could binds to OtrR to inhibits *otrB*, thereby allowing OTC to be effluxed; B: the results of the PCR screening; C: the transcription level of *otrB* is detected by RT-qPCR on the first and third days; D: analysis of OTC production of Del14:Oxy1KΔotrR and Del14:Oxy1K strains in intracellular and extracellular. The experimental results were obtained from three biological replicates and statistically analyzed by Student's *t*-test. ***: $P < 0.001$.

为了解除 OtrR 对 *otrB* 的抑制作用,在质粒 pSET153-OTC-KotcR 基础上敲除负调控基因 *otrR*,获得重组质粒 pSET153-OTC-KotcR-ΔotrR,并整合到 *S. albus* Del14,通过菌落 PCR 验证,筛选到正确的接合子 Del14:Oxy1KΔotrR (图 4B)。摇瓶发酵实验结果显示,重组菌株 Del14:Oxy1KΔotrR OTC 的产量达到 554 mg/L,比 Del14:Oxy1K 提高了 2.9 倍。为了进一步验证 OTC 产量的提高是否是因为敲除 *otrR* 促进了 OTC 的外排,利用 RT-qPCR 检测 *otrB* 的转录水平。结果显示,与 Del14:Oxy1K 相比,菌株

Del14:Oxy1KΔotrR 在发酵第 1 天 *otrB* 的转录水平增加了约 3.8 倍,第 3 天增加了约 4.7 倍(图 4C)。通过对 Del14:Oxy1KΔotrR 和 Del14:Oxy1K 胞内胞外的 OTC 浓度测定发现,其胞内 OTC 的产量没有显著变化,而敲除 *otrR* 的菌株胞外浓度提高了 3.6 倍(图 4D)。因此,通过敲除负调控基因 *otrR*,促进 OTC 的外排,进而提高 OTC 产量的策略切实可行。

2.4 维持细胞氧化还原稳态提高 OTC 产量

相较于游离型质粒,整合型质粒具有稳定遗传且不依赖于筛选标记等优点,因此,前期

实验选择含有 ϕ C31 attP 位点的整合型质粒 pSET153 作为克隆土霉素生物合成基因簇的质粒骨架。但是, 有研究发现, 在 *Streptomyces ambofaciens* 中, ϕ C31 整合型载体的插入位点位于 SAM23877_RS18305 (*pirA*) 基因内部, PirA 是一种新型的对氧化还原敏感的超长链酰基辅酶 A 脱氢酶抑制剂, 它催化了 β 氧化途径的第一步。因此, *pirA* 的插入失活, 会影响中心碳代谢相关基因的表达, 并对氧化损伤表现出高度敏感性, 进而抑制聚酮类抗生素的合成^[21]。在 *S. albus* Del14 菌株中, ϕ C31 整合型质粒的插入位点是否也位于 *pirA* 基因内部呢? 对比分析 *S. coelicolor*、*S. griseus*、*S. venezuelae*、*S. rimosus* 和 *S. albus* 中 *pirA* 基因的同源性发现, 其同源性高达 80%, 且 *pirA* 基因中都存在高度保守的 ϕ C31 attB 位点(图 5A), 暗示 ϕ C31

整合型载体的插入位点在链霉菌中高度保守, 位于 *pirA* 基因内部。*S. albus* Del14 *pirA* 基因的失活是否也会影响 OTC 的异源合成呢? 将 pSET153-OTC-kotcR- Δ otrR 中 ϕ C31 attP 型的整合酶及整合位点替换为 BT1 attP 型位点, 获得新的重组质粒 pSET153-OTC-KotcR- Δ otrR-BT1 并转入 *S. albus* Del14, 经菌落 PCR 验证得到重组菌株 Del14B:Oxy1K Δ otrR(图 5B)。摇瓶发酵实验结果显示, Del14B:Oxy1K Δ otrR 菌株 OTC 的产量比 Del14:Oxy1K Δ otrR 提高了 1.1 倍(图 5C)。表明, 对 *pirA* 基因的插入失活, 会影响胞内的氧化还原环境, 进而抑制 *S. albus* Del14 异源合成 OTC。综上所述, 通过选择 BT1 attP/attB 型整合系统, 可以有效避免对 *pirA* 基因的插入失活, 来维持胞内氧化还原稳态, 进一步提高 OTC 的产量。

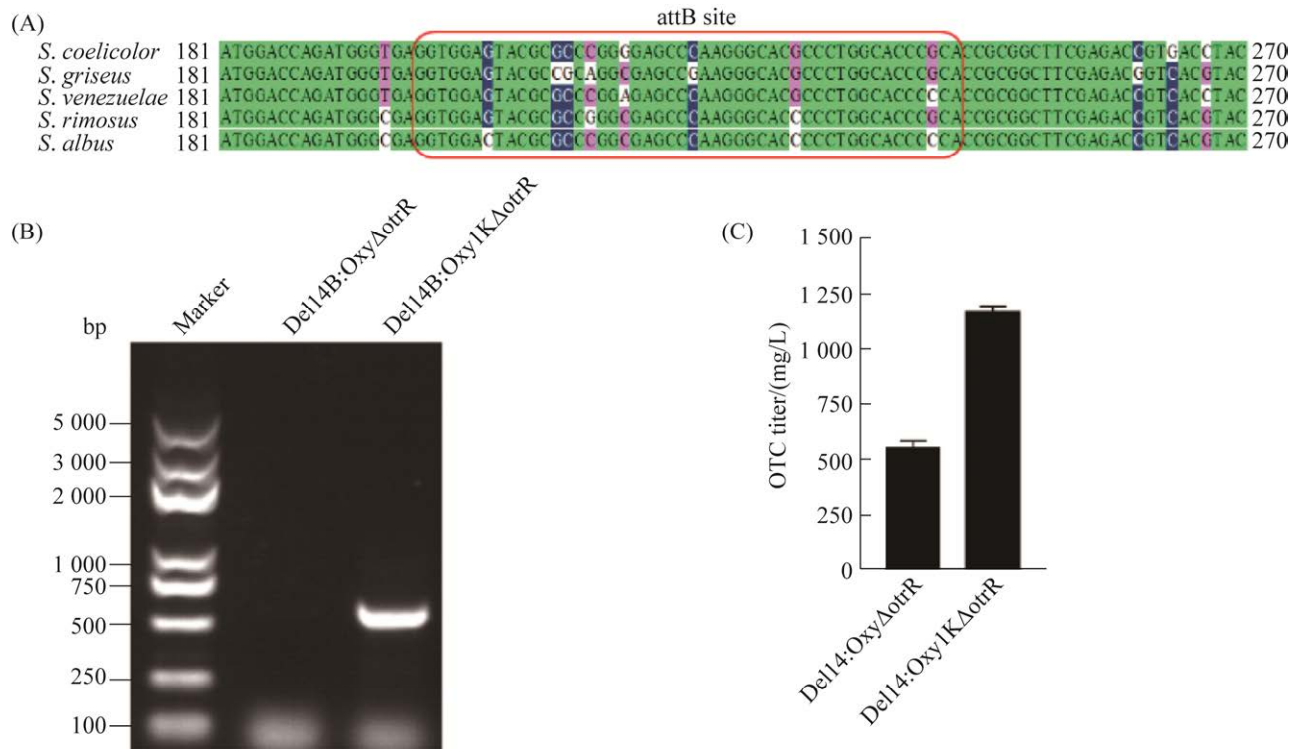


图 5 ϕ C31 整合位点保守性序列比对(A)、接合子验证(B)以及 OTC 的滴度测定(C)

Figure 5 Conserved sequence alignment of ϕ C31 integration site (A), the results of the PCR screening (B) and the titers of OTC of selected strain is detected (C).

3 讨论与结论

我国是 OTC 生产的大国, 目前市场上对 OTC 高产菌株的需求仍然是迫切的。通过基因工程手段改造 OTC 工程菌株依然面临遗传操作困难、周期长等问题, 所以寻找一个遗传操作容易、周期短的菌株生产 OTC 是一个有效的方法策略。本研究中, 我们首次在 *S. albus* Del14 中成功表达并激活了土霉素生物合成基因簇, 并通过激活簇内调控基因 *otcR*、敲除抑制基因 *otrR* 以及选择合适的整合位点等工程手段依次实现了 OTC 产量的提高, 最终筛选到的衍生菌株 Del14B:Oxy1K Δ otrR 在第 6 天发酵液中 OTC 的产量达到了 1.1 g/L, 比前期实验室改造的菌株 V2006::oxy2K 提高了 2.7 倍, 这表明 *S. albus* Del14 作为底盘菌株是具有潜力的。

本研究通过遗传改造获得的异源表达菌株 Del14B:Oxy1K Δ otrR 是以 *S. albus* Del14 为底盘构建的, 相对于目前工业上使用的生产菌株, 该菌株发酵周期短, 并且遗传操作相对比较容易, 为后续进一步利用代谢工程和合成生物学先进技术提高 OTC 产量创造了条件。特别值得一提的是, 本研究仅是在简单的培养基中进行生产测试, 没有对其培养基以及培养条件进行任何优化, 即在摇瓶中实现了和生产菌株 *S. rimosus* M4018 相当的 OTC 产量, 这也进一步说明本研究开发的菌株的生产潜力。

致谢

本研究用到的底盘菌株 *S. albus* Del14 由 Andriy Luzhetskyy 实验室惠赠, 特此感谢。

参考文献

[1] Chopra I, Hawkey PM, Hinton M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1992, 29(3): 245–277.
[2] Pickens LB, Tang Y. Oxytetracycline biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(36):

27509–27515.

- [3] Zhang WJ, Ames BD, Tsai SC, Tang Y. Engineered biosynthesis of a novel amidated polyketide, using the malonamyl-specific initiation module from the oxytetracycline polyketide synthase. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2573–2580.
[4] Zhang WJ, Watanabe K, Clay CC, Tang Y. Investigation of early tailoring reactions in the oxytetracycline biosynthetic pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(35): 25717–25725.
[5] Butler MJ, Friend EJ, Hunter IS, Kaczmarek FS, Sugden DA, Warren M. Molecular cloning of resistance genes and architecture of a linked gene cluster involved in biosynthesis of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 1989, 215(2): 231–238.
[6] Wang WS, Yang TJ, Li YH, Li SS, Yin SL, Styles K, Corre C, Yang KQ. Development of a synthetic oxytetracycline-inducible expression system for streptomycetes using *de novo* characterized genetic parts. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(7): 765–773.
[7] Yin SL, Wang WS, Wang XF, Zhu YX, Jia XL, Li SS, Yuan F, Zhang YX, Yang KQ. Identification of a cluster-situated activator of oxytetracycline biosynthesis and manipulation of its expression for improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus*. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 46.
[8] Rebets Y, Brötz E, Manderscheid N, Tokovenko B, Myronovskiy M, Metz P, Petzke L, Luzhetskyy A. Insights into the pamamycin biosynthesis. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2015, 54(7): 2280–2284.
[9] Gullón S, Olano C, Abdelfattah MS, Braña AF, Rohr J, Méndez C, Salas JA. Isolation, characterization, and heterologous expression of the biosynthesis gene cluster for the antitumor anthracycline steffimycin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 4172–4183.
[10] Lombó F, Velasco A, Castro A, De La Calle F, Braña AF, Sánchez-Puelles JM, Méndez C, Salas JA. Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two *Streptomyces* species. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2006, 7(2): 366–376.
[11] Myronovskiy M, Rosenkränzer B, Nadmid S, Pujic P, Normand P, Luzhetskyy A. Generation of a cluster-free *Streptomyces albus* chassis strains for improved

- heterologous expression of secondary metabolite clusters. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 316–324.
- [12] Li H, Wei JX, Dong JX, Li YD, Li YQ, Chen YH, Guan WJ. Enhanced triacylglycerol metabolism contributes to efficient oil utilization and high-level production of salinomycin in *Streptomyces albus* ZD11. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(16): e00763-20.
- [13] Rodríguez Estévez M, Gummerlich N, Myronovskyi M, Zapp J, Luzhetskyy A. Benzanthric acid, a novel metabolite from *Streptomyces albus* Del14 expressing the nybomycin gene cluster. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 7: 896.
- [14] Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane DE, Ikeda H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *PNAS*, 2010, 107(6): 2646–2651.
- [15] Nelson ML, Levy SB. The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011, 1241: 17–32.
- [16] 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. *PNAS*, 2003, 100(4): 1541–1546.
- [17] Fan KQ, Pan GH, Peng XJ, Zheng JT, Gao WB, Wang J, Wang WS, Li Y, Yang KQ. Identification of JadG as the B ring opening oxygenase catalyzing the oxidative C-C bond cleavage reaction in jadomycin biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(11): 1381–1390.
- [18] Yin SL, Li ZL, Wang XF, Wang HZ, Jia XL, Ai GM, Bai ZS, Shi MX, Yuan F, Liu TJ, Wang WS, Yang KQ. Heterologous expression of oxytetracycline biosynthetic gene cluster in *Streptomyces venezuelae* WVR2006 to improve production level and to alter fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(24): 10563–10572.
- [19] Li SS, Wang WS, Li X, Fan KQ, Yang KQ. Genome-wide identification and characterization of reference genes with different transcript abundances for *Streptomyces coelicolor*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15840.
- [20] Yang TJ, Yang KQ, Chen YH, Fan KQ. Characterization of a bi-directional promoter OtrRp involved in oxytetracycline biosynthesis. *Current Microbiology*, 2019, 76(11): 1264–1269.
- [21] Talà A, Damiano F, Gallo G, Pinatel E, Calcagnile M, Testini M, Fico D, Rizzo D, Suter A, Renzone G, Scaloni A, De Bellis G, Siculella L, De Benedetto GE, Puglia AM, Peano C, Alifano P. Pirin: a novel redox-sensitive modulator of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Metabolic Engineering*, 2018, 48: 254–268.