



## *Streptomyces coelicolor* A3(2)中新型 I 型羊毛硫肽的挖掘及异源表达

钱润泽, 罗云孜\*

天津大学化工学院, 合成生物学前沿科学中心, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

钱润泽, 罗云孜. *Streptomyces coelicolor* A3(2)中新型 I 型羊毛硫肽的挖掘及异源表达. 微生物学报, 2022, 62(10): 3899–3912.

Qian Runze, Luo Yunzi. Heterologous expression of novel class I lanthipeptide in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3899–3912.

**摘要:** 【目的】I 型羊毛硫肽通常具有广泛的生物活性, 且抑菌机制独特, 较少产生耐药性, 因而在临床上具有很好的应用前景。本文对 *Streptomyces coelicolor* A3(2)基因组上 2 个新颖的 I 型羊毛硫肽生物合成基因簇进行研究, 以实现目标羊毛硫肽的表达。【方法】首先, 通过 antiSMASH 分析 *S. coelicolor* A3(2)基因组序列, 挖掘羊毛硫肽生物合成基因簇, 使用 BLAST 进行基因功能注释, 选择可能参与生物合成过程的基因; 然后利用基因组组装技术构建异源表达质粒, 通过接合转移在链霉菌底盘细胞中进行异源表达; 最后对发酵产物进行高效液相色谱、质谱及生物活性检测。【结果】通过添加启动子元件重构 *S. coelicolor* A3(2)上基因簇 3 (8.9 kb)和基因簇 24 (9.0 kb), 得到 pYES-ColE1-SCO-cluster3 和 pYES-ColE1-SCO-cluster24。pYES-ColE1-SCO-cluster3 在底盘细胞 *Streptomyces coelicolor* M1152 和 *Streptomyces* sp. A14 中成功表达, 得到潜在目标化合物 coelin 3; pYES-ColE1-SCO-cluster24 在底盘细胞 *Streptomyces* sp. ZM13 中成功表达, 得到潜在目标化合物 coelin 24。其中 coelin 3 对 *Bacillus subtilis* 168 和 *Escherichia coli* ATCC 25922 具有抑制作用, 并且抑菌圈均达到 28 mm。【结论】本研究成功使用启动子激活和异源表达策略实现了 coelin 3 和 coelin 24 的表达和活性测试, 为后续新颖的羊毛硫肽结构解析和作用机制研究奠定了基础。

**关键词:** 羊毛硫肽; 链霉菌; 异源表达

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFA0903300); 国家自然科学基金(32071426); 天津市自然科学基金(19JCYBJC24200)  
Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0903300), by the National Natural Science Foundation of China (32071426) and by the Natural Science Foundation of Tianjin City (19JCYBJC24200)

\*Corresponding author. E-mail: luoyunzi827@aliyun.com

Received: 21 February 2022; Revised: 16 April 2022; Published online: 9 June 2022

# Heterologous expression of novel class I lanthipeptide in *Streptomyces coelicolor* A3(2)

QIAN Runze, LUO Yunzi\*

Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Frontiers Science Center for Synthetic Biology (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

**Abstract:** [Objective] Class I lanthipeptides usually have a wide range of biological activities, with unique antibacterial mechanism and little drug resistance, which leads to the promising clinical applications. This work intended to explore two novel class I lanthipeptides in *Streptomyces coelicolor* A3(2). [Methods] First, antiSMASH was used to analyze the *S. coelicolor* A3(2) genome sequence and mine lanthipeptide biosynthetic gene clusters. BLAST was employed to annotate gene function and select genes that might be involved in the biosynthesis process. Then, we constructed plasmids via DNA assembly and transferred them into *Streptomyces* chassis cells for heterologous expression. Finally, high performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry (MS) and bioactivity assay were performed to detect the fermentation products. [Results] We reconstituted cluster 3 (8.9 kb) and cluster 24 (9.0 kb) of *S. coelicolor* A3(2) by adding promoter elements, and pYES-ColE1-SCO-cluster3 and pYES-ColE1-SCO-cluster24 were obtained. pYES-ColE1-SCO-cluster3 was successfully expressed in *S. coelicolor* M1152 and *Streptomyces* sp. A14 separately, and the potential target compound coelin 3 was obtained. pYES-ColE1-SCO-cluster24 was heterologously expressed in *Streptomyces* sp. ZM13, and the potential target compound coelin 24 was obtained. Coelin 3 exerted inhibitory effects on *Bacillus subtilis* 168 and *Escherichia coli* ATCC 25922, with the inhibition zone reaching 28 mm. [Conclusion] This study realized the expression of coelin 3 and coelin 24 and conducted the bioactivity assay by promoter activation and heterologous expression, which laid a foundation for subsequent structural and mechanism analysis of the novel class I lanthipeptides.

**Keywords:** lanthipeptide; *Streptomyces*; heterologous expression

羊毛硫肽是一类由核糖体合成并经过翻译后修饰而形成含有特征性硫醚键连接的羊毛硫氨酸(lanthionine, Lan)和/或甲基化羊毛硫氨酸(methylanthionine, Me Lan)等特殊氨基酸的多肽<sup>[1]</sup>。羊毛硫肽具有多种生物活性和广泛的应用价值,在抑制革兰氏阳性致病菌方面表现突出,尤其是对临床上产生多重耐药性的微生物也具有极强的抑菌作用<sup>[2]</sup>。具有抗菌活性的羊毛硫肽被称为羊毛硫抗生素(lantibiotic)。由于抗菌机制独特<sup>[3-5]</sup>,较难产生耐药性,因此羊毛硫抗生素对药物发展或新药的发现具有重要意义。

根据羊毛硫肽合成酶的类型可将其分为五类<sup>[6]</sup>,其中I型羊毛硫肽由脱水酶 LanB 和环化酶 LanC 分别进行脱水和环化翻译后修饰生成<sup>[1]</sup>。I型羊毛硫肽作为研究最早且已有产业化成功案例的一类,其产量提高、分离纯化、结构鉴定及临床应用的研究引起了研究者的广泛关注。1928年从 *Lactococcus lactis* 中分离的I型羊毛硫肽 nisin,自1951年作为食品防腐剂使用以来,尚未出现明显的 nisin 抗性菌,这得益于其特殊的结构(图 1)和抑菌机制<sup>[7]</sup>。来源于 *Streptococcus mutans* 的I型羊毛硫肽

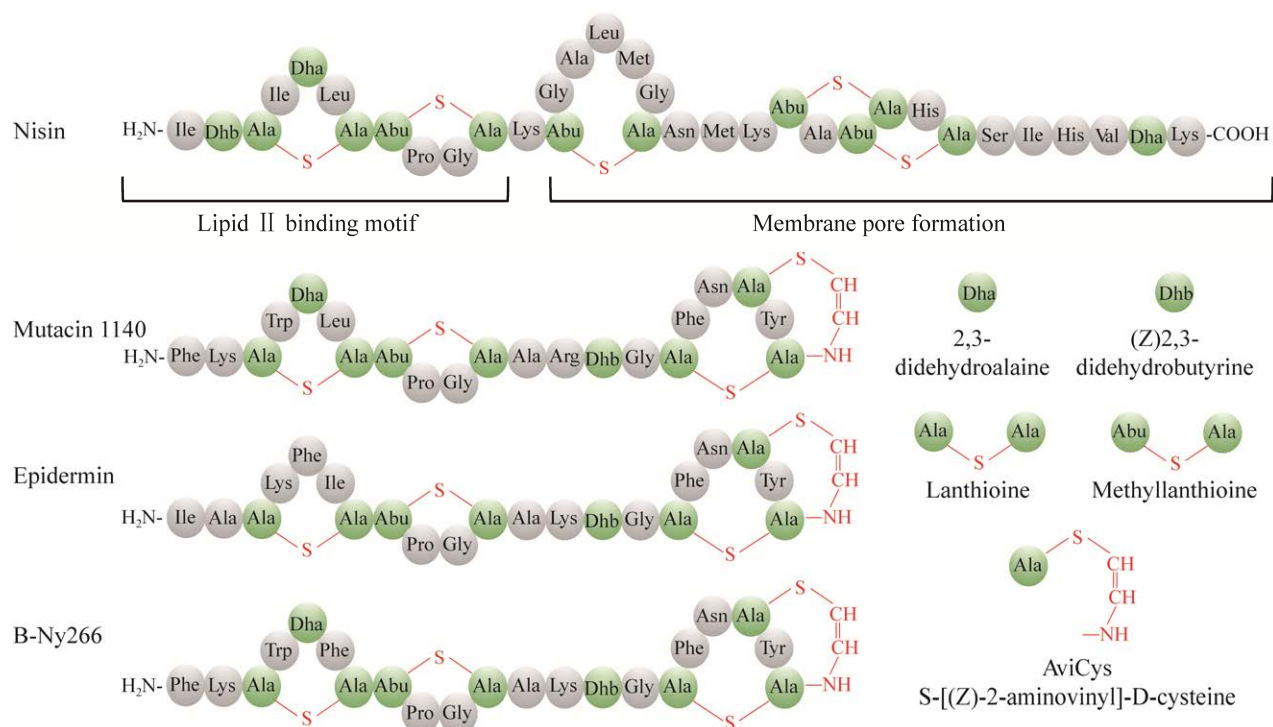


图 1 典型 I 型羊毛硫肽化合物的结构

Figure 1 Structure of typical class I lanthipeptide compounds.

mutacin 1140 和 B-Ny266 具有广泛的生物活性, 对黄微球菌、艰难梭菌、耐万古霉素肠球菌 (vancomycin-resistant *Enterococci*, VRE)、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、草分枝杆菌和铜绿假单胞菌均具有较强的抑制作用<sup>[8]</sup>, 同时可用于预防龋齿<sup>[9-10]</sup>。来源于 *Staphylococcus epidermidis* 的 5 种 I 型羊毛硫肽 Pep5、epidermin、epicidin 280、epilancin K7 和 epidermicin NI01 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 具有抑制作用<sup>[11-12]</sup>, 同时可以有效地预防和治疗痤疮<sup>[13]</sup>。基于 I 型羊毛硫肽的广泛生物活性和临床应用前景, 挖掘新颖的 I 型羊毛硫肽具有重要的意义。

链霉菌中含有大量羊毛硫肽基因簇, 但由于大部分羊毛硫肽基因簇处于沉默状态, 难以实现目标化合物稳定的可持续生产。如来源于 *Streptomyces venezuelae* 的 venezuelin<sup>[14]</sup> 和

*Streptomyces globisporus* NRRL B2293 的 globisporin<sup>[15]</sup> 实现了在 *E. coli* BL21(DE3) 中稳定表达, 但产量较低, 低于 1 mg/L; 来源于 *Streptomyces collinus* Tü 365 的 streptocollin 在 *Streptomyces coelicolor* M1146 和 M1152 中异源表达后, 产量分别提高了 3.5 和 5.5 倍, 并在 *S. coelicolor* M1152 中产量达到 10 mg/L<sup>[16]</sup>。因此, 如何激活或持续表达其产物成为近年来的研究热点。

本研究通过挖掘 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 中沉默的羊毛硫肽基因簇, 并添加启动元件<sup>[18-20]</sup> 对 2 个新颖羊毛硫肽基因簇进行了重构, 在链霉菌底盘细胞中以异源表达实现新型羊毛硫肽的合成, 将所获得的化合物分别命名为 coelin 3 和 coelin 24, 并对化合物进行了初步的生物活性测试, 为后续新颖的羊毛硫肽结构解析和作用机制研究奠定了基础。

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌DH10B和载体pYES-ColE1用于质粒构建;大肠杆菌ET12567/pUZ8002用于接合转移; *Streptomyces coelicolor* M1152、*Streptomyces* sp. ZM13 (*Streptomyces* sp. ZM12 ΔSCO6931 ΔSCO6932)、*Streptomyces* sp. A14和*Streptomyces* sp. SUKA17用于基因簇异源表达; *Streptomyces coelicolor* A3(2)为I型F<sub>x</sub>LD家族羊毛硫肽合成基因簇来源菌株; *Bacillus subtilis* 168和*Escherichia coli* ATCC 25922用于产物的生物活性测试; 以上所有菌株和质粒由本实验室保存。

### 1.1.2 引物

本研究中使用到的引物如表1所示。

### 1.1.3 培养基

链霉菌培养使用ISP2培养基(g/L): 麦芽浸取物10, 酵母提取物4, 葡萄糖4, 琼脂粉20, 调节pH至7.2, 115 °C灭菌20 min。大肠杆菌培养使用LB培养基(g/L): 胰蛋白胨10, 酵母提取物5, 氯化钠10, 调节pH至7.2, 121 °C灭菌20 min。属间接接合转移使用MISP4培养基(g/L): 甘露醇5, 豆粉5, 淀粉5, 胰蛋白胨2, 硫酸铵2, 碳酸钙2, 酵母提取物1, 氯化钠1, 无水磷酸氢二钾1, 调节pH至7.2, 121 °C高压灭菌20 min后加入配制好的salt mix溶液1 mL, 5 mol/L氯化镁溶液2 mL; salt mix溶液

(g/L): FeSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub>各1。2×YT培养基(g/L): 酵母提取物10, 胰蛋白胨16, 氯化钠5, 调节pH至7.2, 115 °C高压灭菌20 min。链霉菌发酵使用MYG培养基(g/L): 麦芽浸取物10, 酵母提取物4, 葡萄糖4, 调节pH至7.2, 115 °C灭菌20 min。

### 1.1.4 主要试剂和仪器

质粒小提试剂盒、细菌基因组DNA提取试剂盒、通用型DNA纯化回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; PCR引物合成、测序工作由北京擎科生物科技有限公司完成; KOD FX DNA聚合酶购自东洋纺(上海)生物科技有限公司; 2×T5 Super PCR Mix购自北京擎科生物科技有限公司; HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; BACTERIAL Total RNA Isolation Mini Kit购自Omega Bio-Tek; 正丁醇试剂购自天津江天化工; 色谱级甲醇、乙腈购自赛默飞世尔; 色谱级三氟乙酸购自北京索莱宝科技有限公司; 限制性内切酶*Apa*I、*Xcm*I、*Nco*I和*Nhe*I购自NEB(北京)。

PCR仪, 杭州朗基公司; SC12型水平电泳系统, 北京凯元信瑞仪器有限公司; 蓝光切胶仪G00312, 生工生物工程(上海)有限公司; 旋转蒸发仪, 东京理化器械株式会社; 高效液相色谱仪SPD-M20a, 岛津公司; C<sub>18</sub>反相色谱柱(5 μm, 150 mm×4.6 mm), 成都思为科学仪器有

表1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')
F-SCO266	GTGCGAGTATCTGAAAGGGGATACGCATGGCTCTTCTCGTTCGATGCC
R-SCO266	AGCGCCCGCGGCGGGTCACGTGACGGGCTCCGGC
F-SCO267	CCAGAGAACACCGACAGACGGAGACGTACATGAGCACCACGCAGCAC
R-SCO267	GTGGTGCGGTTCGGCGCCTCAGACCGCCGTGGCG
F-SCO268	CAGTCCTGGGAGGACCACTTCACCCGTCCCCGCGGCTCC
R-SCO268	GGCCGCGGCGCGGATCAGCAGCAGATGGGGCAGC

(待续)

(续表 1)

F-SCO269	AGTGAACAAGTGGACTCATGAGGAGGAACCCCGGACCGAGGCCCCCTC
R-SCO269	GTGAGCGTGAGGAGAGGTCCGGTCATCGTCCGCTCCCGATCC
F-SCO270	GTTCCACTCAAGTAGTCAGCTGGAGGAATTGACATGAGCGGCACCACCGAGG
R-SCO270	CCTGACTTCCGCCTGCAGGGCTCAGGCCAGCAGCAACGGC
F-SCO271	TCCGTGAGCTCGAGAAGACGACGGAGACGTACCCGCGGGGCCGGGGAC
R-SCO271	CGGGCCGGATATGGCCGGGCTCAGGCCAGGTCCGAGCGG
F-SCO272	GATCTCCGAAGGGGGAGGTCCGATCGGAGCAGACCATGACACACATCAGG
R-SCO272	ATTATTTTTATAGCACGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGTCACTTCATGCCGG TGAAGTTCAGG
F-SCO6927	CCAGAGAACACCGACAGACGGAGACGTACATGGACGTCGGCCAGATAGC
R-SCO6927	ATTATTTTTATAGCACGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGTCAAGAGTCGAGG TTGCGCGAC
F-SCO6928	GAGCTCGAGAAGACGACGGAGACGTAACGACGAGAAGAGGGGAACATGAC
R-SCO6928	TCCAGCGCCCGCGGCGGGTCACTGCCATTTCGATGACGATGC
F-SCO6929	CTTAGTGCGAGTATCTGAAAGGGGATACGCATGAATCTGCGTGACAGCGCAC
R-SCO6929	CTGACTTCCGCCTGCAGGGCCTAGTTGGTCAGAAAGCAGGTCTCCAC
F-SCO6930	CCACTCAAGTAGTCAGCTGGAGGAATTGACCCTCGGCGCATTGATCTGCC
R-SCO6930	CGTCCGACCGAAGGAGCAGCTCACGCAGATTCATGGTGATCTCCTCGG
F-SCO6932	GAACAAGTGGACTCATGAGGAGGAACCCGTCCTGTGCGCGCCGCC
R-SCO6932	GTGAGCGTGAGGAGAGGTCCGGTCAGGCCACGTTGGTGGCG
F-SCO6933	CCAGTCCTGGGAGGACCACTTCACGTGGTGATTCCCTCCGTTGTGCGTG
R-SCO6933	GTCGGGCCGCGGCGCGGATCACCCGGGTGCTGGAC
F-SCO6934	TCTCCGAAGGGGGAGGTCCGATCACAAGCCGAACACCGCGGTC
R-SCO6934	GTGGTGCGGTCCGCGCCTCAGGCTGCCGCGGGCTG
F-SCO266-qPCR	GTCGCGCGATGGTGAAA
R-SCO266-qPCR	GCCGAACGTCATCGTCTC
F-SCO267-qPCR	GGACATCACCGAGCACAC
R-SCO267-qPCR	AGGTAGGGCACCAAGTT
F-SCO269-qPCR	TGTTTCGTCAAGTGGTACGC
R-SCO269-qPCR	AACCGCAGTCGCAGATG
F-SCO270-qPCR	TTCGGACTGCGCTTCAC
R-SCO270-qPCR	CAACGGCATGTCCCAGT
F-SCO271-qPCR	TCACCGACTACAGCCTCAT
R-SCO271-qPCR	TCTGCGACACGATGTTTAC
F-SCO272-qPCR	CTGTTTCGCGACCGTCTT
R-SCO272-qPCR	CACCCGCAGGAAGTTGAT
F-SCO6934-qPCR	GGCCAACCGACTCATCTG
R-SCO6934-qPCR	GCAGACGTCACTGCTCAT
F-SCO6933-qPCR	CACTTCGAATCGGTGTGTTG
R-SCO6933-qPCR	CGGTTACCTTTCGGACTT
F-SCO6930-qPCR	GGACTTCCACAACCGATTCTT
R-SCO6930-qPCR	TTGCGCATCGCGGTATC
F-SCO6929-qPCR	ACATCGGGCTCCTCGAA
R-SCO6929-qPCR	CTAGTTGGTCAGAAAGCAGGTC
F-SCO6928-qPCR	CACGGCATCTTCCACTTCA
R-SCO6928-qPCR	CGTTCCCATGACTACCTCTTTC
F-SCO6927-qPCR	CCTGGAACCACTGGTCAAC
R-SCO6927-qPCR	GTCTTCGATCTGACTGCTCTG

限公司; C<sub>18</sub>反相色谱柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm), 波士顿分析(Boston Analytics)有限公司。

## 1.2 次级代谢产物生物合成基因簇分析

将菌株 *Streptomyces coelicolor* A3(2)的基因组序列上传到 antiSMASH 网站(<https://antismash.secondarymetabolites.org#!/start>)进行次级代谢产物生物合成基因簇的分析。使用 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 软件对目标基因簇中的基因进行功能注释。

## 1.3 异源表达菌株构建

将验证正确的异源表达质粒转入大肠杆菌 ET12567/PUZ8002 中得到供体菌株。在加入相应抗生素(25 μg/mL 的卡那霉素、阿泊拉霉素和 12.5 μg/mL 的氯霉素)的 LB 培养基中过夜振荡培养构建的供体菌株(37 °C, 220 r/min), 按 1%–4%的比例转接过夜培养菌液到 50 mL 新鲜的 2×YT 培养基中培养至 OD<sub>600</sub>=0.4–0.6; 收集菌体, 并用新鲜的 2×YT 培养基洗 3 次, 作为接合转移供体备用。使用棉签和新鲜的 2×YT 培养基将培养 5–7 d 的孢子从固体培养基表面刮下, 离心收集孢子; 加入 1 mL 新鲜的 2×YT 培养基, 50 °C 热激 10 min, 放置至室温, 将处理好的含有异源表达质粒的大肠杆菌悬液与链霉菌单孢子悬液混合均匀后涂布在 MISP4 培养基平板上, 30 °C 培养 12–24 h; 用 1 mL 含 1.5 mg 阿泊拉霉素、1.25 mg 萘啶酮酸和 1.25 mg 甲氧苄啶的水溶液覆盖, 30 °C 培养 3–7 d 后检查平板上的菌落。

## 1.4 翻译后修饰酶的 RT-PCR 测定

异源表达菌株培养 3 d 后收集 500 μL 菌液, 使用 OMEGA 公司的 BACTERIAL Total RNA Isolation Mini Kit 提取总 RNA, 使用诺唯赞公司的 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒去除基因组 DNA 并反转录得到 cDNA。以 cDNA 为模板, 使用 2×T5

Super PCR Mix 对目标基因进行扩增。PCR 反应程序如下: 98 °C 5 min; 98 °C 10 s, 57 °C 10 s, 72 °C 5 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。

## 1.5 异源表达菌株发酵与检测

将包含目标基因簇的异源表达菌株接种至 ISP2 平板上, 30 °C 恒温培养 7 d, 刮取适量孢子接种于 50 mL MYG 培养基中 28 °C、220 r/min 振荡培养 3 d, 作为种子液; 取 20 mL 种子液接种至 500 mL MYG 培养基中 28 °C、180 r/min 发酵培养 7 d。向发酵液中加入等体积的正丁醇萃取至少 3 h 后, 取上层有机相使用旋转蒸发仪减压旋蒸, 旋蒸后的固体溶于 2 mL 色谱级甲醇。

HPLC 检测条件为: 流动相 A 相为 0.1%三氟乙酸水, 流动相 B 为 0.1%三氟乙酸乙腈, 进样体积 10 μL, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 215 nm。液相检测方法为: 0–5 min 10% B 相, 5–30 min 梯度洗脱到 100% B 相, 30–40 min 维持 100% B 相, 40–41 min 降回 10% B 相, 41–60 min 10% B 相平衡。

对 HPLC 检测含有稳定新峰的样品取 300 μL 进行半制备收集新产物峰, 旋蒸后的固体溶于 150 μL 色谱级甲醇。HPLC 半制备条件为: 流动相 A 相为 0.1%甲酸水, 流动相 B 为乙腈, 进样体积 50 μL, 流速为 3 mL/min, 检测波长为 215 nm。液相检测方法为: 0–5 min 5% B 相, 5–30 min 梯度洗脱到 60% B 相, 30–32 min 梯度洗脱到 60% B 相 32–42 min 维持 100% B 相, 40–41 min 降回 5% B 相, 42–60 min 5% B 相平衡。

LC-QQQ MS 检测条件为: 流动相 A 相为 0.1%甲酸水, 流动相 B 为乙腈, 进样体积 5 μL, 流速为 0.5 mL/min, 电压设置为 135 V (+/-)。液相检测方法为: 0–5 min 15% B 相, 5–35 min 梯度洗脱到 100% B 相, 35–45 min 维持 100% B 相, 45–46 min 降回 10% B 相, 46–60 min 10% B 相平衡。

## 1.6 异源表达产物的抗菌活性检测

采用滤纸片琼脂扩散法(滤纸直径 6 mm)测定异源表达产物的生物活性。在均匀涂布指示菌 *B. subtilis* 168 和 *E. coli* ATCC 25922 的 LB 平板上放置滤纸片,每个滤纸片滴加 5  $\mu$ L 样品。甲醇溶剂、底盘细胞发酵液提取物作为阴性对照, 氨苄青霉素和卡那霉素作为阳性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Streptomyces coelicolor* A3(2)中核糖体肽基因簇的挖掘

通过对 *S. coelicolor* A3(2)基因组的生物信息学分析, 发现其基因组上共含有 3 个核糖体肽基因簇, 且均为羊毛硫肽生物合成基因簇。其中 cluster 21 为文献已报道的 III 型羊毛硫肽 SapB<sup>[17]</sup>, cluster 3 和 cluster 24 均为 I 型 FxLD 家族羊毛硫肽(图 2), 且与已报道的羊毛硫肽的同源性都不高, 判断为新颖的 I 型羊毛硫肽, 具有潜在的研究价值, 所以对这 2 个基因簇作进一步研究。

在使用 BLAST 对 *S. coelicolor* A3(2) cluster

3 和 cluster 24 上的基因进行功能注释时, 发现 cluster 3 中含有特殊的  $\alpha/\beta$  水解酶基因, 其与 cypemycin 生物合成过程中参与半胱氨酸脱硫的 CypH 的 C 端  $\alpha/\beta$  水解酶结构域<sup>[21]</sup>的同源性为 17.77%; cluster 24 中含有特殊的 L-异天冬氨酸 O-甲基转移酶基因和醇脱氢酶基因, 其中 L-异天冬氨酸 O-甲基转移酶的 N 端含有环化酶(LanC)的结构域, C 端为 FxLD 家族羊毛硫肽甲基转移酶, 且与已报道的 OlvS<sub>A</sub><sup>[22]</sup>的同源性仅有 35.97% (图 2)。这些酶可能会对产物进行新的修饰, 形成新颖的结构, 所以选择可能参与羊毛硫肽生物合成的基因构建异源表达质粒。

### 2.2 I 型羊毛硫肽 coelin 3 和 coelin 24 的异源表达

链霉菌基因簇中约 90%在实验室培养条件下是沉默的<sup>[23]</sup>, 为了激活沉默基因簇, 在所选择的每个基因前面加上 1 个强启动子<sup>[24]</sup>, 构建得到 2 个羊毛硫肽异源表达质粒 pYES-CoIE1-SCO-cluster3 和 pYES-CoIE1-SCO-cluster24 (图 3A), 使用 SnapGene 软件选择合适的限制性内切酶对所构建质粒进行酶切验证, 酶切结果如图 3B 所示。

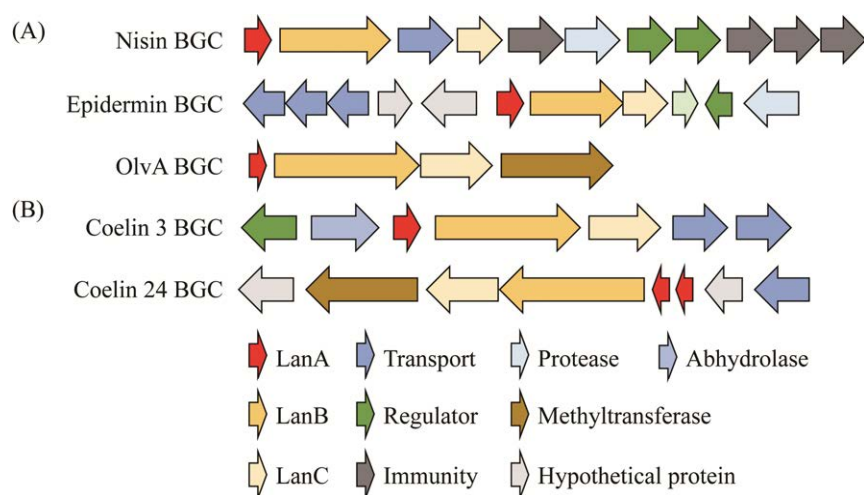
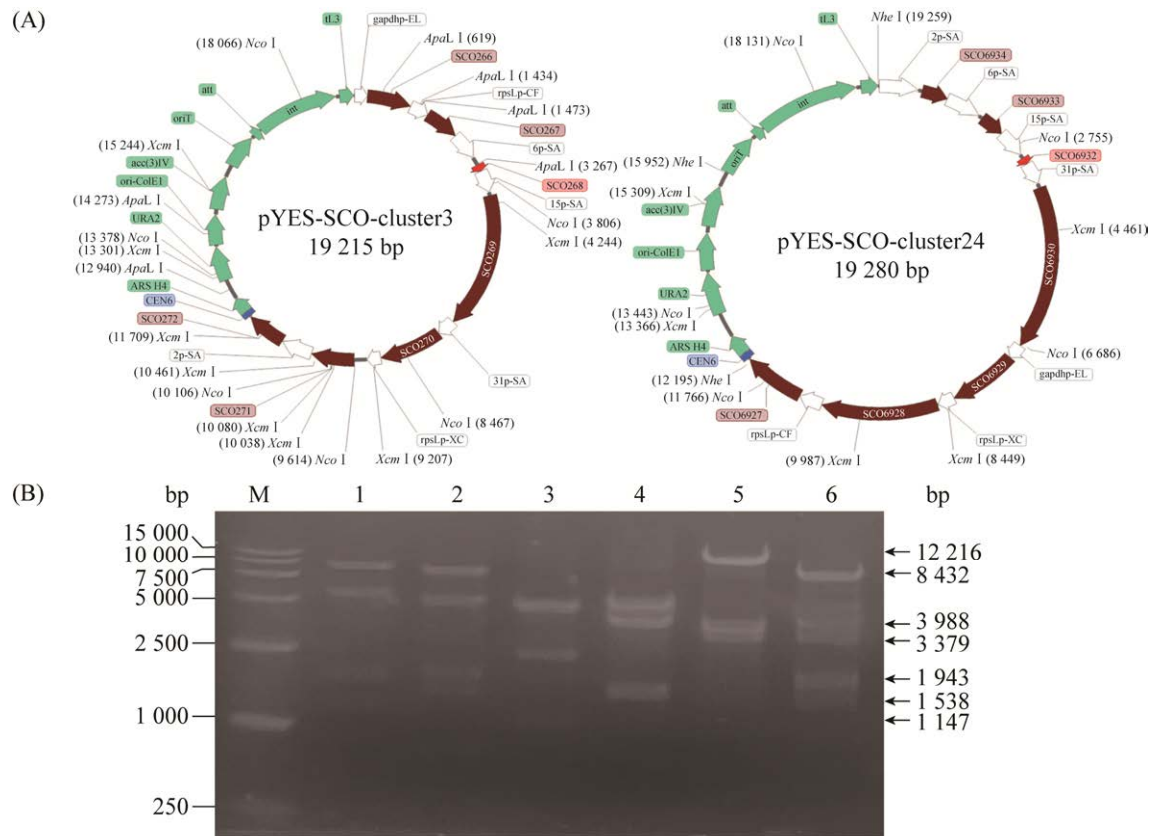


图 2 羊毛硫肽生物合成基因簇

Figure 2 Lanthipeptide biosynthetic gene cluster. A: biosynthetic gene cluster of known class I lanthipeptide; B: biosynthetic gene cluster of coelin 3 and coelin 24.



**图3** 异源表达质粒 pYES-ColE1-SCO-cluster3 和 pYES-ColE1-SCO-cluster24 构建形式(A)及酶切结果(B)  
**Figure 3** Construction forms (A) and digestion results (B) of heterologous expression plasmids pYES-ColE1-SCO-cluster3 and pYES-ColE1-SCO-cluster24. M is DL15000 DNA marker. 1–3 are *ApaI* I, *Xcm* I and *Nco* I digestion results of plasmid pYES-ColE1-SCO-cluster3 respectively. 4–6 are *Nco* I, *Nhe* I and *Xcm* I digestion results of plasmid pYES-ColE1-SCO-cluster24 respectively. 1: 9 673 bp, 5 561 bp, 1 794 bp, 1 333 bp, 815 bp, 39 bp. 2: 8 215 bp, 4 963 bp, 1 943 bp, 1 592 bp, 1 248 bp, 831 bp, 381 bp, 42 bp. 3: 4 955 bp, 4 688 bp, 4 661 bp, 3 272 bp, 1 147 bp, 492 bp. 4: 5 080 bp, 4 688 bp, 3 931 bp, 3 904 bp, 1 677 bp. 5: 12 216 bp, 3 757 bp, 3 307 bp. 6: 8 432 bp, 3 988 bp, 3 379 bp, 1 943 bp, 1 538 bp.

验证正确的异源表达质粒通过接合转移的方式转入 *S. coelicolor* M1152、*S. ZM13*、*S. A14* 和 *S. SUKA17* 底盘细胞中，通过菌落 PCR 筛选得到正确的异源表达菌株 *Streptomyces coelicolor* M1152/pYES-ColE1-SCO-cluster3、*Streptomyces* sp. A14/pYES-ColE1-SCO-cluster3、*Streptomyces* sp. ZM13/pYES-ColE1-SCO-cluster24 和 *Streptomyces* sp. SUKA17/pYES-ColE1-SCO-cluster24。每个表达菌株分别挑取 3 个不同的单克隆进行 3 次重复发酵检测，同时以底盘细胞作为阴性对照。

pYES-ColE1-SCO-cluster3 在 *S. coelicolor* M1152 和 *S. A14* 底盘细胞中异源表达后分别在 13.7、14.6、22.0 min 左右有新峰的出现，推测 pYES-ColE1-SCO-cluster3 在 *S. coelicolor* M1152 和 *S. A14* 底盘细胞中可能成功表达，将目标羊毛硫肽命名为 coelin 3；pYES-ColE1-SCO-cluster24 在 *S. ZM13* 底盘细胞中异源表达后分别在 16.1、19.5 min 有新峰出现，而在 *S. SUKA17* 底盘细胞中异源表达后没有新峰的产生，推测 pYES-ColE1-SCO-cluster24 在 *S. ZM13* 底盘细胞可能成功表达，将



目标羊毛硫肽命名为 *coelin 24* (图 4)。通过 RT-PCR 验证, 确认 *Streptomyces* sp. A14/pYES-ColE1-SCO-cluster3、*Streptomyces coelicolor* M1152/pYES-ColE1-SCO-cluster3 和 *Streptomyces* sp. ZM13/pYES-ColE1-SCO-cluster24 的修饰基因在体内均可表达(图 5)。

### 2.3 I 型羊毛硫肽 *coelin 3* 和 *coelin 24* 的质谱检测与分析

为了进一步验证目标产物是否表达以及修饰是否和预期一致, 对发酵产物的新产物峰进行了半制备和质谱检测。根据文献报道, 当核心肽中存在 2 个连续丝氨酸时, 通常第 2 个丝氨酸不会发生脱水反应<sup>[22]</sup>; 当核心肽的最后 1 个氨基酸为

半胱氨酸时可能会形成 2-氨基乙烯基-半胱氨酸结构(aminovinyl-cysteine, AviCys)<sup>[25]</sup>。*coelin 3* 的核心肽为 FGEGTFTSPSSYAIGTRC PICC, 发生理论修饰后的分子量为 2 125.95; *coelin 24* 的核心肽为 TLINLTDDGCGSTCSSPC ATNVA, 发生理论修饰后的分子量为 2 133.89。*Streptomyces coelicolor* M1152/pYES-ColE1-SCO-cluster3 和 *Streptomyces* sp. A14/pYES-ColE1-SCO-cluster3 的 1 号半制备样品在 LC-QQQ MS 负离子模式下检测到了分子量为 1 061.9 的质谱峰, 与 *coelin 3* 的[M-2H]<sup>2-</sup>分子量一致; *Streptomyces* sp. ZM13/pYES-ColE1-SCO-cluster24 的 2 号半制备样品在 LC-QQQ MS 正离子模式下检测到了分子量为

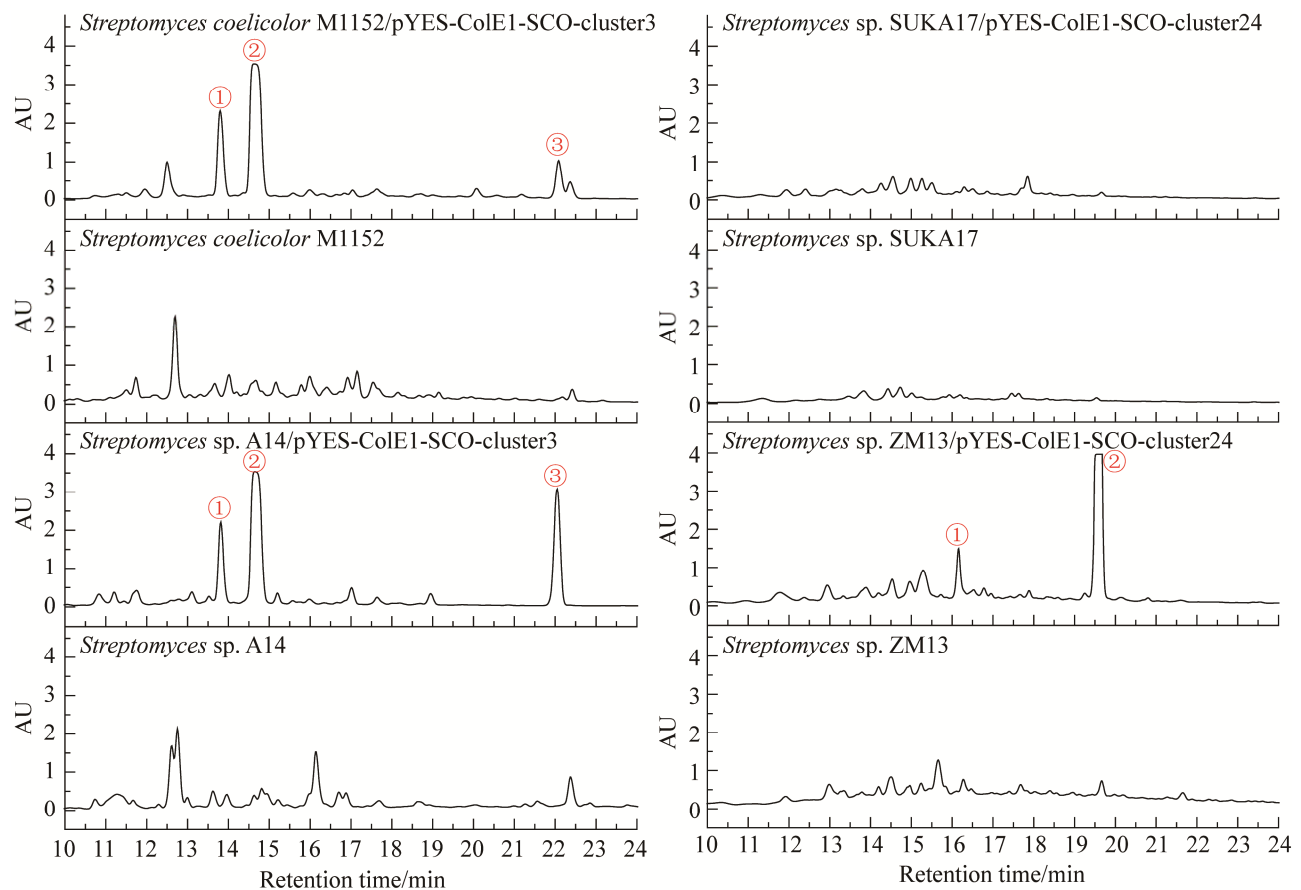


图 4 异源表达菌株及底盘细胞发酵产物的液相检测

Figure 4 HPLC detection of fermentation products of heterologous expression strains and chassis cells. New product peaks in heterologous expression strains are numbered in order of retention time.

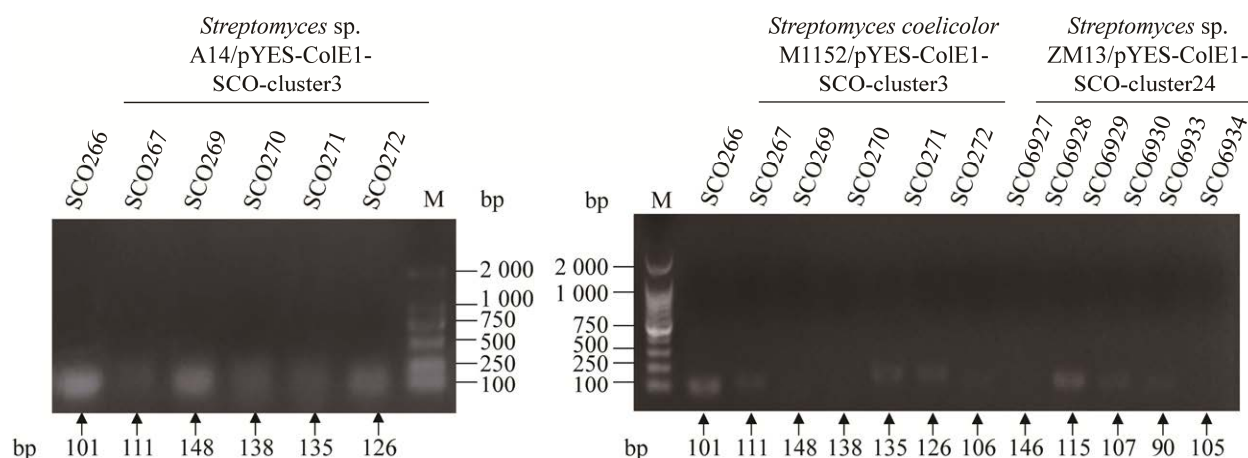


图5 表达菌株修饰酶基因 RT-PCR 验证

Figure 5 RT-PCR validation of modification enzyme gene of expression strain.

1 067.9 的质谱峰,与 coelin 24 的  $[M+2H]^{2+}$  分子量一致(图 6)。结果表明, coelin 3 和 coelin 24 的脱水修饰个数与预期一致,但半胱氨酸与 Dha/Dhb 发生的迈克尔加成具体位置、coelin 3 的 AviCys 结构位置及 coelin 24 的 2 个天冬氨酸是否发生重排仍不清楚,有待进一步的研究。根据核心肽检索时,coelin 24 与 paenicidin<sup>[26]</sup> 的相似度为 52.38%, coelin 3 没有已报道的相似产物,但与典型 I 型羊毛硫肽(图 1)的 C 端类似,推测它们的结构如图 7 所示。

#### 2.4 I 型羊毛硫肽 coelin 3 和 coelin 24 的活性测试

羊毛硫抗生素对革兰氏阳性菌具有广泛的生物活性,由于无法穿过革兰氏阴性菌的外膜,因此对阴性菌的抑制不是特别有效<sup>[27]</sup>。如与 coelin 24 相似的 paenicidin 对革兰氏阳性菌具有抑菌作用,但对革兰氏阴性菌没有抑制作用<sup>[26]</sup>; epidermin 和 B-Ny266 等对 *B. subtilis* 在内的革兰氏阳性菌表现出强的抑菌作用,但对革兰氏阴性菌效果不佳<sup>[28]</sup>。经活性测试发现,底盘细胞和溶剂未表现出抑制作用,而 coelin 3 不仅对 *B. subtilis* 168 表现出抑制活性,同时对

革兰氏阴性菌 *E. coli* ATCC 25922 也表现出抑制作用,表明 coelin 3 可能在链霉菌底盘细胞中成功表达且有抗菌活性;但 coelin 24 对 *B. subtilis* 168 和 *E. coli* ATCC 25922 均没有抑制活性,氨基青霉素和卡那霉素阳性对照有抑菌作用,表明 coelin 24 可能不具有抗 *B. subtilis* 168 和 *E. coli* ATCC 25922 的活性(图 8, 表 2)。

### 3 讨论与结论

链霉菌基因组上含有丰富的次级代谢产物基因簇,目前临床上应用的抗生素约 2/3 是由链霉菌合成的<sup>[29]</sup>,此外,链霉菌还能产生免疫抑制剂、抗肿瘤剂、杀虫剂、果胶酶、蛋白酶等代谢产物,其中包括羊毛硫肽类天然产物。因此对链霉菌次级代谢产物基因簇进行研究,对挖掘新的抗生素资源具有重要意义。本研究对链霉菌模式菌株 *S. coelicolor* A3(2)的基因组进行生物信息学分析,筛选得到 2 个新颖的羊毛硫肽基因簇 cluster3 和 cluster24,将目标羊毛硫肽产物分别命名为 coelin 3 和 coelin 24。由于链霉菌 90% 基因簇在实验室培养条件下是沉默的<sup>[23]</sup>,且 *S. coelicolor* A3(2)上的基因簇仅有一半被研

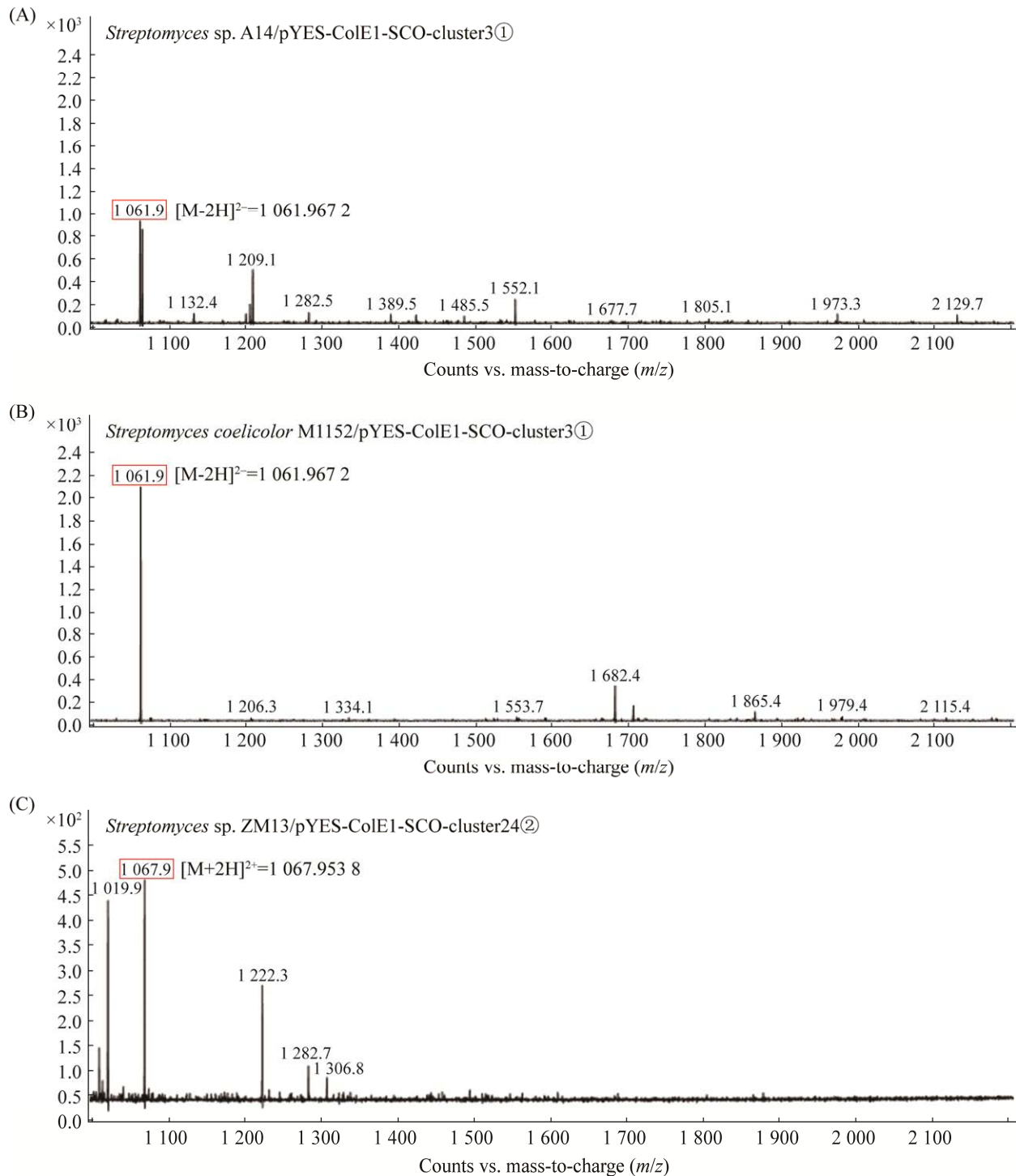


图 6 半制备样品 LC-QQQ MS 结果

Figure 6 The LC-QQQ MS results of purified samples. A: *Streptomyces* sp. A14/pYES-ColE1-SCO-cluster3①; B: *Streptomyces coelicolor* M1152/pYES-ColE1-SCO-cluster3①; C: *Streptomyces* sp. ZM13/pYES-ColE1-SCO-cluster24②.

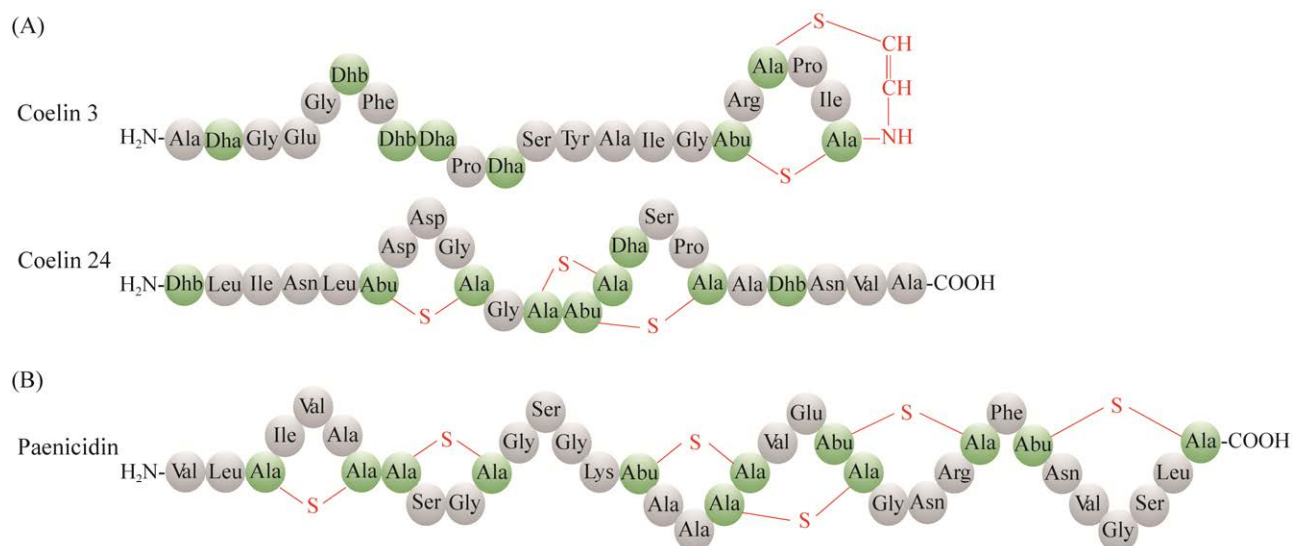


图 7 Coelin 3 和 coelin 24 推测的可能结构(A)及 coelin 24 的相似产物结构(B)<sup>[26]</sup>

Figure 7 Possible structure of coelin 3 and coelin 24 (A), and most similar product structure (B) of coelin 24<sup>[26]</sup>.

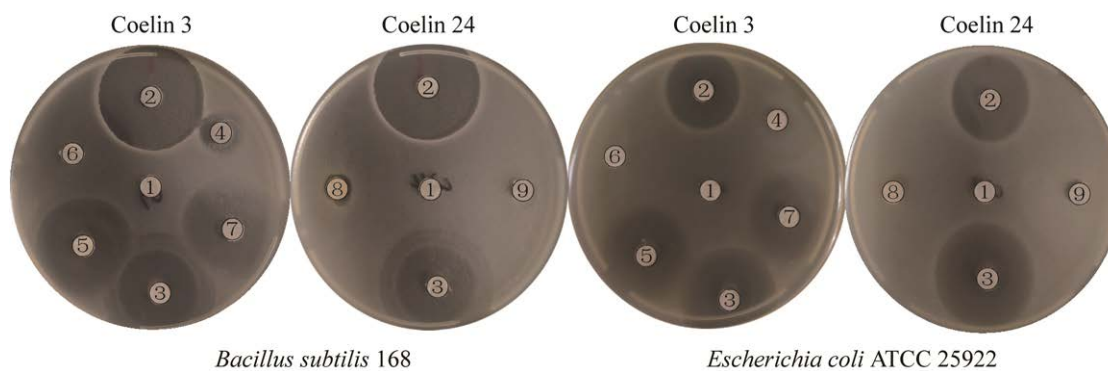


图 8 Coelin 3 和 coelin 24 对 *B. subtilis* 168 和 *E. coli* ATCC 25922 的生物活性测试

Figure 8 Bioactivity test of coelin 3 and coelin 24 against *B. subtilis* 168 and *E. coli* ATCC 25922. 1: solvent negative control; 2: ampicillin positive control; 3: kanamycin positive control; 4: *S. A14*; 5: *Streptomyces* sp. A14/pYES-Cole1-SCO-cluster3; 6: *S. coelicolor* M1152; 7: *Streptomyces coelicolor* M1152/pYES-Cole1-SCO-cluster3; 8: *S. ZM13*; 9: *Streptomyces* sp. ZM13/pYES-Cole1-SCO-cluster24.

表 2 各样品对 *B. subtilis* 168 和 *E. coli* ATCC 25922 的抑菌圈数据

Table 2 The bacteriostatic diameter data of each sample against *B. subtilis* 168 and *E. coli* ATCC 25922

Inhibition zone/mm	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Bacillus subtilis</i> 168	–	30	24	10	26	–	28	–	–
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	–	22	28	–	28	–	26	–	–

1: solvent negative control; 2: ampicillin positive control; 3: kanamycin positive control; 4: *S. A14*; 5: *Streptomyces* sp. A14/pYES-Cole1-SCO-cluster3; 6: *S. coelicolor* M1152; 7: *Streptomyces coelicolor* M1152/pYES-Cole1-SCO-cluster3; 8: *S. ZM13*; 9: *Streptomyces* sp. ZM13/pYES-Cole1-SCO-cluster24.

究报道。所以本研究通过添加启动子元件<sup>[24]</sup>对基因簇上可能参与羊毛硫肽生物合成的基因进行重新构建, 得到 2 个羊毛硫肽异源表达质粒 pYES-ColE1-SCO-cluster3 和 pYES-ColE1-SCO-cluster24, 通过接合转移的方式转入 4 个链霉菌底盘细胞中, 成功得到异源表达菌株。发酵产物通过使用 HPLC 检测到新的产物峰并对新峰进行半制备, 通过 LC-QQQ MS 对半制备样品的进一步检测, 确认 coelin 3 和 coelin 24 分别在底盘细胞 *S. coelicolor* M1152、*S. A14* 和 *S. ZM13* 中成功表达, 且通过生物活性测试确认 coelin 3 对 *B. subtilis* 168 和 *E. coli* ATCC 25922 具有抑制作用, 这可能与其 AviCys 结构有关<sup>[30]</sup>。由于没有进一步进行二级质谱和核磁的检测, 尚不清楚 coelin 3 和 coelin 24 具体的 (Me)Lan 环化位置, coelin 3 的 AviCys 结构位置及 coelin 24 中天氨酸的重排与否, 但为后续 coelin 3 和 coelin 24 的结构解析及 coelin 3 的作用机制奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, Camarero JA, Campopiano DJ, Challis GL, Clardy J, Cotter PD, Craik DJ, Dawson M, Dittmann E, Donadio S, Dorrestein PC, Entian KD, Fischbach MA, Garavelli JS, Göransson U, Gruber CW, Haft DH, Hemscheidt TK, Hertweck C, Hill C, Horswill AR, Jaspars M, Kelly WL, Klinman JP, Kuipers OP, Link AJ, Liu W, Marahiel MA, Mitchell DA, Moll GN, Moore BS, Müller R, Nair SK, Nes IF, Norris GE, Olivera BM, Onaka H, Patchett ML, Piel J, Reaney MJT, Rebuffat S, Ross RP, Sahl HG, Schmidt EW, Selsted ME, Severinov K, Shen B, Sivonen K, Smith L, Stein T, Süßmuth RD, Tagg JR, Tang GL, Truman AW, Vederas JC, Walsh CT, Walton JD, Wenzel SC, Willey JM, Van Der Donk WA. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, 2013, 30(1): 108–160.
- [2] Jabés D, Brunati C, Candiani G, Riva S, Romanó G, Donadio S. Efficacy of the new lantibiotic NAI-107 in experimental infections induced by multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(4): 1671–1676.
- [3] Breukink E, Wiedemann I, Van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl HG, De Kruijff B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 1999, 286(5448): 2361–2364.
- [4] Chatterjee C, Paul M, Xie LL, Van Der Donk WA. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews*, 2005, 105(2): 633–684.
- [5] Perez R, Perez MT, Elegado F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: a review of biosynthesis, mode of action, fermentative production, uses, and prospects. *International Journal of Philippine Science and Technology*, 2015, 8(2): 61–67.
- [6] Montalbán-López M, Scott TA, Ramesh S, Rahman IR, Van Heel AJ, Viel JH, Bandarian V, Dittmann E, Genilloud O, Goto Y, Grande Burgos MJ, Hill C, Kim S, Koehnke J, Latham JA, Link AJ, Martínez B, Nair SK, Van Der Donk WA. New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering. *Natural Product Reports*, 2021, 38(1): 130–239.
- [7] Rogers LA. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 1928, 16(5): 321–325.
- [8] Kers JA, Sharp RE, Defusco AW, Park JH, Xu J, Pulse ME, Weiss WJ, Handfield M. Mutacin 1140 lantibiotic variants are efficacious against *Clostridium difficile* infection. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 415.
- [9] Hillman JD. Genetically modified *Streptococcus mutans* for the prevention of dental caries. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 82(1/2/3/4): 361–366.
- [10] Dufour D, Barbour A, Chan Y, Cheng M, Rahman T, Thorburn M, Stewart C, Finer Y, Gong SG, Lévesque CM. Genetic analysis of mutacin B-Ny266, a lantibiotic active against caries pathogens. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(12): e00762-19.
- [11] Götz F, Perconti S, Popella P, Werner R, Schlag M. Epidermin and gallidermin: staphylococcal lantibiotics. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014, 304(1): 63–71.
- [12] Sandiford S, Upton M. Identification, characterization, and recombinant expression of epidermin NI01, a novel unmodified bacteriocin produced by *Staphylococcus epidermidis* that displays potent activity against *Staphylococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(3): 1539–1547.

- [13] Christensen GJM, Scholz CFP, Enghild J, Rohde H, Kilian M, Thürmer A, Brzuszkiewicz E, Lomholt HB, Brüggemann H. Antagonism between *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* and its genomic basis. *BMC Genomics*, 2016, 17: 152.
- [14] Goto Y, Li B, Claesen J, Shi YX, Bibb MJ, Van Der Donk WA. Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. *PLoS Biology*, 2010, 8(3): e1000339.
- [15] Hegemann JD, Van Der Donk WA. Investigation of substrate recognition and biosynthesis in class IV lanthipeptide systems. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(17): 5743–5754.
- [16] Iftime D, Jasyk M, Kulik A, Imhoff JF, Stegmann E, Wohlleben W, Süßmuth RD, Weber T. Streptocollin, a type IV lanthipeptide produced by *Streptomyces collinus* Tü 365. *ChemBioChem*, 2015, 16(18): 2615–2623.
- [17] Kodani S, Hudson ME, Durrant MC, Buttner MJ, Nodwell JR, Willey JM. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *PNAS*, 2004, 101(31): 11448–11453.
- [18] De Mey M, Maertens J, Lequeux GJ, Soetaert WK, Vandamme EJ. Construction and model-based analysis of a promoter library for *E. coli*: an indispensable tool for metabolic engineering. *BMC Biotechnology*, 2007, 7: 34.
- [19] Li SS, Wang JY, Li X, Yin SL, Wang WS, Yang KQ. Genome-wide identification and evaluation of constitutive promoters in *Streptomyces*. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 172.
- [20] Myronovskiy M, Luzhetskyy A. Native and engineered promoters in natural product discovery. *Natural Product Reports*, 2016, 33(8): 1006–1019.
- [21] Claesen J, Bibb M. Genome mining and genetic analysis of cypemycin biosynthesis reveal an unusual class of posttranslationally modified peptides. *PNAS*, 2010, 107(37): 16297–16302.
- [22] Acedo JZ, Bothwell IR, An LN, Trouth A, Frazier C, Van Der Donk WA. O-methyltransferase-mediated incorporation of a  $\beta$ -amino acid in lanthipeptides. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(42): 16790–16801.
- [23] Liu ZY, Zhao YT, Huang CQ, Luo YZ. Recent advances in silent gene cluster activation in *Streptomyces*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 632230.
- [24] Luo YZ, Enghiad B, Zhao HM. New tools for reconstruction and heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters. *Natural Product Reports*, 2016, 33(2): 174–182.
- [25] Lu JX, Wu Y, Li YQ, Wang H. The utilization of lanthipeptide synthetases is a general strategy for the biosynthesis of 2-aminovinyl-cysteine motifs in thioamitides. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2021, 60(4): 1951–1958.
- [26] Lohans CT, Huang ZD, Van Belkum MJ, Giroud M, Sit CS, Steels EM, Zheng J, Whittall RM, McMullen LM, Vederas JC. Structural characterization of the highly cyclized lantibiotic paenicidin A via a partial desulfurization/reduction strategy. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(48): 19540–19543.
- [27] Van Staden A, Van Zyl WF, Trindade M, Dicks LMT, Smith C. Therapeutic application of lantibiotics and other lanthipeptides: old and new findings. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(14): e0018621.
- [28] Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, Lavoie MC. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(1): 24–29.
- [29] De Lima Procópio RE, Da Silva IR, Martins MK, De Azevedo JL, De Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2012, 16(5): 466–471.
- [30] Grant-Mackie ES, Williams ET, Harris PWR, Brimble MA. Aminovinyl cysteine containing peptides: a unique motif that imparts key biological activity. *JACS Au*, 2021, 1(10): 1527–1540.