



基于转录组学分析刺糖多孢菌多杀菌素合成代谢途径关键酶基因挖掘

王晓宇^{1,2}, 蔡朝辉², 乔长晟¹, 薛超友^{2*}

1 天津科技大学, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

王晓宇, 蔡朝辉, 乔长晟, 薛超友. 基于转录组学分析刺糖多孢菌多杀菌素合成代谢途径关键酶基因挖掘[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3762-3779.

WANG Xiaoyu, CAI Zhaohui, QIAO Changsheng, XUE Chaoyou. Mining of crucial enzyme genes in the synthesis of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* based on transcriptomics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3762-3779.

摘要: 【目的】通过对不同时期的刺糖多孢菌进行转录组分析, 探究多杀菌素生物合成的相关代谢通路, 挖掘代谢途径关键酶基因, 探究多杀菌素竞争基因簇, 为高产工程菌的构建奠定基础。

【方法】选取刺糖多孢菌株对数生长期(T2-48 h)和稳定期(T6-144 h)进行比较转录组分析, 并通过实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)与转录组测序进行相互验证。采用基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)对差异表达基因进行功能和代谢通路注释并进行中心碳代谢分析。【结果】刺糖多孢菌通过转录组测序发现有 2 542 个差异表达基因, 其中具有显著上调基因 1 188 个, 显著下调基因 1 354 个。GO 注释表明, 差异表达基因主要参与羧酸代谢过程、含氧酸代谢过程、有机酸代谢过程和氨基酸代谢过程。KEGG 富集结果表明, 差异表达基因主要参与甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 以及氧化磷酸化和精氨酸生物合成等通路。进一步分析得到 7 个与多杀菌素生物合成相关的基因, 其中 *accB*、*Pfk*、*G6PD*、*dsdA* 表达量显著上调, 而涉及多杀菌素前体消耗的 *GAPDH*、*aceE*、*DLAT* 以及 TCA 循环和精氨酸生物合成途径中的基因表达量都呈现显著性下调趋势。qRT-PCR 与转录组测序结果发现双方同时上调的基因有 12 个, 分别为 BGC2 (43 846 bp)、BGC4 (18 330 bp)、BGC9 (20 501 bp)、BGC18 (62 621 bp)、BGC22 (19 626 bp)、BGC25 (42 896 bp)、

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFC3402301); 海河实验室项目(22HHSWSS00024); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-CXRC-025)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFC3402301), the Haihe River Laboratory Project (22HHSWSS00024), and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-CXRC-025).

*Corresponding author. E-mail: xuecy@tib.cas.cn

Received: 2024-03-24; Accepted: 2024-06-28; Published online: 2024-06-29

BGC26 (40 086 bp)、BGC28 (39 392 bp)、BGC30 (20 282 bp)、BGC31 (53 657 bp)、BGC34 (20 787 bp) 和 BGC35 (40 232 bp)。【结论】本研究通过转录组学分析获得了不同时期刺糖多孢菌的差异基因以及多杀菌素生物合成通路，并分析了刺糖多孢菌中多杀菌素的竞争基因簇，为后期开展多杀菌素生物合成途径的优化和对刺糖多孢菌进行遗传改造从而达到提高多杀菌素产量的目的奠定了基础。

关键词：多杀菌素；刺糖多孢菌；转录组分析；代谢途径；实时荧光定量 PCR

Mining of crucial enzyme genes in the synthesis of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* based on transcriptomics

WANG Xiaoyu^{1,2}, CAI Zhaohui², QIAO Changsheng¹, XUE Chaoyou^{2*}

1 Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: [Objective] To mine the key enzyme genes associated with spinosad synthesis and the biosynthetic gene clusters (BGCs) in *Saccharopolyspora spinosa* at different developmental stages by transcriptomics, thus laying the groundwork for the construction of high-yield strains. **[Methods]** The transcriptomes of *S. spinosa* during the logarithmic phase (T2-48 h) and the stationary phase (T6-144 h) were compared. The results from qRT-PCR and transcriptome sequencing were mutually validated. Gene ontology (GO) annotation and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment were performed for the differentially expressed genes (DEGs). Central carbon metabolism analysis was performed. **[Results]** The transcriptome sequencing of *S. spinosa* revealed 2 542 DEGs, including 1 188 genes with significantly up-regulated expression and 1 354 genes with significantly down-regulated expression. GO annotation indicated that the DEGs were primarily involved in carboxylic acid metabolic process, oxoacid metabolic process, organic acid metabolic process, and amino acid metabolic process. KEGG enrichment analysis demonstrated DEGs were mainly involved in pathways such as glycine, serine, and threonine metabolism, oxidative phosphorylation, and arginine biosynthesis. Further analysis identified seven genes related to spinosad biosynthesis. Among them, *accB*, *Pfk*, *G6PD*, and *dsdA* showed significantly up-regulated expression, while *GAPDH*, *aceE*, *DLAT* involved in the consumption of spinosad precursors, as well as genes in the TCA cycle and arginine biosynthesis, exhibited significantly down-regulated expression. The results of qRT-PCR were consistent with the trends observed in transcriptome sequencing, which revealed 12 upregulated BGCs: BGC2 (43 846 bp), BGC4 (18 330 bp), BGC9 (20 501 bp), BGC18 (62 621 bp), BGC22 (19 626 bp), BGC25 (42 896 bp), BGC26 (40 086 bp), BGC28 (39 392 bp), BGC30 (20 282 bp), BGC31 (53 657 bp), BGC34 (20 787 bp), and

BGC35 (40 232 bp). **[Conclusion]** This study elucidated DEGs in *S. spinosa* at different developmental stages through transcriptome analysis, and analyzed the biosynthetic pathways and BGCs of spinosad. These findings pave the way for optimizing the spinosad biosynthetic pathways and genetically modifying *S. spinosa* to enhance the spinosad production in subsequent studies.

Keywords: spinosad; *Saccharopolyspora spinosa*; transcriptomics; metabolic pathways; qRT-PCR

近年来,随着全球变暖加剧,农业病虫害的发生范围不断扩大,危害程度日益加重,造成重大经济损失和粮食安全问题^[1-2]。传统化学杀虫剂长期滥用会导致害虫耐药性的增加,污染环境,危及人类健康,阻碍农业的可持续发展^[3]。为降低化学农药的使用量,发展绿色防控技术迫在眉睫,微生物杀虫剂因其具有高效、广谱和安全等特点而得到广泛关注^[4]。多杀菌素(spinosad)是由刺糖多孢菌(*Saccharopolyspora spinosa*)经过好氧发酵产生的具有高效杀虫活性的天然大环内酯类次级代谢产物,兼具化学农药的高效性和生物农药的安全性^[5],也是唯一可用于粮食存储的生物杀虫剂^[6],被认为是最有发展前景的生物农药之一。

目前,关于多杀菌素的研究和开发仍然面临一系列挑战,包括较低的生物合成产量和较长的生长发育周期等关键技术问题,这些问题直接影响了该新型农业杀虫剂的大规模工业化生产和在农业领域的应用^[7]。截至目前,虽然科学家们已经对刺糖多孢菌的全基因组进行了测序^[8],但有关的转录组学分析却很少,并且多杀菌素的形成与代谢网络之间的联系也仍未揭示^[9]。

通过转录组能够发现调控代谢网络的关键基因^[5],解析包括多杀菌素在内的许多次级代谢产物的生物合成途径^[10-11],通过敲除或者阻断与代谢产物生成不相关的基因,达到提高次级代谢产物产量以及缩短培养时间的目的^[12-13]。Liu等^[14]通过对刺糖多孢菌的转录组学初步分析,

发现敲除磷酸烯醇式丙酮酸磷酸变位酶(phosphoenolpyruvate phosphomutase)基因后,多杀菌素的产量提高了 2.14 倍。因此了解刺糖多孢菌在发酵过程中各个时期与多杀菌素生物合成直接相关的基因转录水平,是对刺糖多孢菌的理性改造的重要前提^[15]。

本研究旨在揭示刺糖多孢菌生长过程中转录组的差异,采用高通量 RNA 测序(RNA-seq)技术对刺糖多孢菌的不同生长时期的转录组进行分析,发现了大量差异表达基因,并通过结合基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析进行了分类,分析了多杀菌素生物合成与中心碳代谢网络之间的联系,并探究了刺糖多孢菌中多杀菌素的竞争性基因簇,为下一步基因工程研究提供方向,对多杀菌素的工业化生产具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

菌株 *S. spinosa* SAS-002 由本实验室基于野生型刺糖多孢菌菌株诱变获得。

1.2 培养基

胰蛋白胨大豆肉汤(trypticase soy broth, TSB)培养基: TSB 30 g/L, 往液体 TSB 中加入 2%琼脂粉可制成固体 TSB 培养基, 121 °C灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 酵母抽提

物 4.0, 蛋白胨 4.0, KNO_3 1.0, FeSO_4 0.01, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 115 °C 灭菌 30 min。

1.3 主要试剂和仪器

胰蛋白胨大豆肉汤(TSB), 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 葡萄糖, 北京酷来博科技有限公司; 酵母抽提物、蛋白胨, 北京拜尔迪生物技术有限公司; KNO_3 、 FeSO_4 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、乙酸铵, 上海麦克林生化科技股份有限公司; EASYspin Plus 细菌 RNA 快速提取试剂盒, 北京艾德莱生物科技有限公司; DNase I (RNase-free), NEB 公司; 快速逆转录试剂盒 Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus)、Hieff UNICON[®] Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix 试剂, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司; 乙腈、甲醇, Sigam-Aldrich 公司。

实时荧光定量 PCR 仪, 上海罗氏制药有限公司; 电子精密天平, 天津天马衡基仪器有限公司; 立式高压灭菌锅, 山东新华医疗器械股份有限公司; 洁净工作台, 力康生物医疗科技控股有限公司; 生化培养箱, 菲斯福仪器(河北)有限公司; 叠加式恒温振荡器, 苏州捷美电子有限公司; 超微量分光光度计, 上海宝予德科学仪器有限公司; 凝胶成像分析系统, 上海天能科技有限公司; PCR 仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; 液相色谱仪, 上海伍丰科学仪器有限公司。

1.4 刺糖多孢菌生长过程和多杀菌素积聚量分析

取适量孢子接入装有 5 mL TSB 液体培养基的 50 mL 摇瓶中, 在 30 °C、220 r/min 的条件下活化 48 h 后, 按 3% 的比例转接至装有 50 mL 合成发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 并在 30 °C、280 r/min 的条件下进行培养。每隔 12 h 取 500 μL

菌液, 采用分光光度法进行菌体生长情况的检测, 取样周期为 12 d, 进行 3 次生物学重复。检测过程中, 使用未接种的发酵培养基作为空白对照。

称取 15 mg 多杀菌素标准品(上海源叶生物科技有限公司), 配制 1 mg/mL 的多杀菌素母液, 用色谱级乙腈进行稀释, 得到不同稀释梯度的溶液。为降低操作误差, 从低浓度开始分别检测不同标准浓度的多杀菌素标准溶液。每个标准样品重复 3 次测定, 最终取平均值。

将刺糖多孢菌每隔 12 h 取得的发酵液与乙腈溶液体积比 1:2 涡旋振荡混匀, 超声 30 min 后, 4 °C 避光静置 2 h, 以 15 871 \times g 离心 15 min, 然后吸取上清, 并通过 0.22 μm 的无菌过滤器过滤, 滤液利用高效液相色谱检测系统(上海伍丰科学仪器有限公司)分析多杀菌素产量。反向色谱柱规格: 4.6 mm \times 150 mm \times 5 μm , 流动相组成: 45% 甲醇、50% 乙腈、5% ddH₂O 和 0.65 mmol/L 乙酸铵, 检测波长: 253 nm, 流速: 1.6 mL/min, 柱温: 23 °C, 进样体积: 25 μL 。通过系统自带的分析软件计算得到多杀菌素 A、D 的响应峰面积之和, 进而计算出发酵液中多杀菌素的含量。

1.5 总 RNA 提取

使用 TSB 固体培养基培养刺糖多孢菌 SAS-002, 置于 30 °C 培养 7 d。取适量孢子接入装有 5 mL TSB 液体培养基的 50 mL 摇瓶中, 在 30 °C、220 r/min 的条件下活化 48 h 后, 按 3% 的比例转接至装有 40 mL 合成发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 并在 30 °C、280 r/min 的条件下培养 6 d。整个发酵过程进行 3 次平行实验。之后选取转接发酵后培养至对数生长期(T2-48 h)和稳定期(T6-144 h)的刺糖多孢菌, 采用 EASYspin Plus 细菌 RNA 快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)提取总 RNA, 再采用 NEB 酶 DNase I 去除痕量基因组 DNA,

最后将提取到的总 RNA 用扩增基因组中 IAG28_RS03480 基因的引物 F (5'-GGACACGTGTTCAAGGATC TC-3')和 R (5'-CCGCAACACCC TCTTTGT-3')进行基因组污染鉴定。将无基因组污染的 RNA 送至苏州金唯智生物科技有限公司进行转录组测序。

1.6 cDNA 合成

使用快速逆转录试剂盒 Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus) (翌圣生物科技股份有限公司)对无污染的 RNA 进行逆转录。逆转录反应体系(20 μ L): 4 \times Hifair® III SuperMix plus 5 μ L, 总 RNA 1 μ g, 用无 RNase 水补足 20 μ L。逆转录标准程序设置: 25 $^{\circ}$ C 5 min, 60 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min。

1.7 转录组数据分析

测序获得的 RNA-seq 原始数据, 首先通过 fastqc^[16]进行测序数据质量评估, fastp^[17]去除接头序列和低质量 reads 获得高质量 reads (clean reads)。过滤后的 reads 保存为 FASTQ 格式进行后续分析, 同时, 计算可分析数据的 Q20、Q30 和 G+C 含量。所有下游分析均基于高质量的可分析数据。使用 STAR 软件^[18]将质控后的原始数据与 NCBI 中 *Saccharopolyspora spinosa* 参考基因组(CP061007)进行比对, 获得用于后续分析的 mapped data (reads), 同时对本次转录组测序的比对结果进行质量评估, reads 在参考基因组不同区域分布以及 reads 在不同染色体分布分析。再使用 featureCounts^[19]软件统计基因上 mapping 的 reads 数。采用每千个碱基的转录每百万映射读取的 Transcripts 数(transcripts per million, TPM)对基因表达水平进行归一化。使用 DESeq2 包^[20]进行差异表达基因检测, 利用 read count 平均值计算 fold change (FC)值, $|\log_2 FC|>1$ 且 $P_{adj}\leq 0.05$ 的基因定义为显著差异表达基因 (differentially expression genes, DEGs), 以 \log_2

FC >1 定义为显著上调基因, $\log_2 FC<-1$ 定义为显著下调基因^[21]。

在 R 语言中, 使用 DESeq2 包进行差异基因的 PCA 分析和作图, 使用 pheatmap 包^[22]绘制热图, 使用 ggplot2 包^[23]进行火山图的绘制。使用 eggNOG-mapper 软件^[24]和 eggNOG 数据库^[25]对刺糖多孢菌参考基因组的蛋白质序列进行注释, 再利用 AnnotationHub 包^[26]构建 GO^[27]和 KEGG^[28]注释文件。之后采用 clusterProfiler 包^[29]对差异基因集进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.8 实时荧光定量 PCR

利用 antiSMASH 6.0 软件^[30]预测刺糖多孢菌基因组中存在的次级代谢产物生物合成基因簇 (secondary metabolite biosynthetic gene clusters, BGCs), 并针对预测出的每个 BGC 中的关键基因设计引物, 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)验证。此外, 为了深入了解不同发酵时间对多杀菌素产量的响应机制, 还选择了被注释为多杀菌素的相关基因 *spnE*、*spnD*、*spnH* 和 *spnI* 进行验证, 为后续敲除多杀菌素竞争性基因簇从而增加多杀菌素产量奠定基础。引物设计原则: 无引物二聚体、具有特异性、扩增产物长度为 80–150 bp、最长不超过 300 bp、引物长度为 17–25 bp, 以 16S rRNA 基因作为内参基因^[31]。引物序列见表 1, 这些引物序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成。使用 Hieff UNICON® Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix 试剂[翌圣生物科技(上海)股份有限公司]进行 qRT-PCR 的扩增。qRT-PCR 反应体系(20 μ L): Hieff UNICON® Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix 10 μ L, 模板 DNA 1 ng, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, 用无 RNase 水补足 20 μ L。qRT-PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 180 s;

95 °C变性 15 s, 60 °C退火并延伸 30 s, 共 40 个循环。溶解曲线参数: 95 °C变性 10 s, 65 °C退火并延伸 60 s, 97 °C变性 1 s, 37 °C冷却 30 s。

利用 Microsoft Excel (2019)软件进行分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析比较同一目的基因不同时期的相对表达量。内参基因和目的基因都做 3 个复孔。

表 1 本研究使用的 qRT-PCR 引物

Table 1 qRT-PCR primers used in this study

Genes name	Primers name	Primer sequences (5'→3')	Product (bp)
16S rRNA	16S rRNA-F	F: GCTCCTCAGCGTCAGTATCGG	228
	16S rRNA-R	R: GTAGGGTTCGAGCGTTGTCC	
IAG28_RS00170	WX566	F: ACAGTGCCTTCGAGCTTT	84
	WX567	R: CAACCAGCTGTACCAGATCTAC	
IAG28_RS00395	WX393	F: CCACGTTGGCCAGATAAA	89
	WX394	R: CCAGCAAACCTGGCATTGATAC	
IAG28_RS00620	WX425	F: GCCTTCATCGCGTAGAACAT	149
	WX426	R: CGTGACCAACTGGTGAAACT	
IAG28_RS00960	WX303	F: GACGACCACACCTTCTTTCTC	105
	WX304	R: CAGAGTGACCATCCGGTTTC	
IAG28_RS01350	WX307	F: GAAGAGAACTTCTTCGTCGCT	102
	WX308	R: TACGTCCACAATCGACACATC	
IAG28_RS02195	WX562	F: TCGGTCCACTCAGGACA	134
	WX563	R: GCGATCTGGTCGAACTTCTT	
IAG28_RS02415	WX461	F: GTGAGCAGGATGCGATACA	126
	WX462	R: CCACCACATGGCGATCAA	
IAG28_RS03445	WX269	F: GTAATGCCCTGGTGGGTAAT	115
	WX270	R: GGACTGGAAGTGGATCAATGT	
IAG28_RS03940	WX257	F: GTAGAGGACCTGTTTGACGAC	141
	WX258	R: TGGTACAACGGAAACACCTAC	
IAG28_RS04310	WX261	F: CTCGGACCGTTGAATCAC	110
	WX262	R: GCTCCGTTGTCTTCGAACT	
IAG28_RS05015	WX387	F: GGGTGTGTTTCATGGACTGG	104
	WX388	R: TCTCCTCGAGCAGTACCC	
IAG28_RS17280	WX247	F: GGGTGTCTCGTCGTCCT	97
	WX248	R: ACGGTGTGCGTGTTCAA	
IAG28_RS19485	WX558	F: GGTCCGAAGTGGACTGATG	134
	WX559	R: ACGAGAACAGGACGAGGA	
IAG28_RS21680	WX455	F: TGGAGCCGTAGAGGTTGTA	115
	WX456	R: TACGACCACAGCACGTTG	
IAG28_RS27575	WX453	F: CGTTTGTCTCGCGTGTAGT	110
	WX454	R: GTCGTGGTGGGCAACAA	
IAG28_RS28375	WX556	F: CTCACCACGGTTCTCATCAA	89
	WX557	R: GTCGCGCGAAGTACAA	
IAG28_RS28930	WX431	F: GTCCGACTTCGAGTCCTTTAC	120
	WX432	R: ATCACCGTGGCGATGTC	
IAG28_RS41855	WX522	F: GGTGATCCTCTTCGACACCTA	83
	WX523	R: GCTCGAACATCGCTGTCATAA	

(待续)

(续表 1)

Gene name	Primer name	Primer sequences (5'→3')	Product (bp)
IAG28_RS29870	WX433	F: TGGAAACCGTAGATCTCGAATG	101
	WX434	R: GAGATCGGGTTCGTGATGAAT	
IAG28_RS30210	WX355	F: ACGCCTTCAATCCGACAC	80
	WX356	R: CTTGACATCGGTGGTTACTC	
IAG28_RS30460	WX309	F: CCAGTGTGGATGCAGTTGATG	121
	WX310	R: CTCCATCGTTGAGAACTTCCTG	
IAG28_RS31085	WX449	F: CGAAGGAAACCACTTCTACCTC	111
	WX450	R: GGCATGTCCGTCCATTCA	
IAG28_RS31250	WX317	F: AGAACCGATGGCATTCTCAC	126
	WX318	R: GTGGTAGCAGAACACAGTCTC	
IAG28_RS31565	WX429	F: GCCATCAGGACCACTTCTTC	95
	WX430	R: GGACAGGTCGATGTCGAAAG	
IAG28_RS34085	WX213	F: GAAGCCGAACTCCTGCAT	111
	WX214	R: GAACTGTGGCGAACTTCTA	
IAG28_RS34730	WX574	F: GTCACGTGCAAGACCTAGT	86
	WX575	R: ATGCAGGTCGACGATTCC	
IAG28_RS35620	WX550	F: CTACTGGGCCACCAAGAAC	89
	WX551	R: AGATGGTGTGACGGTGATG	
IAG28_RS36170	WX333	F: GGAAGTTGGTGAGCTGGAAAG	96
	WX334	R: TCCAGTTGCTCCCGGTATT	
IAG28_RS36440	WX447	F: GCCGTGCTCCTTGATGA	97
	WX448	R: GATGTCGCAGTCGTTGGA	
IAG28_RS36875	WX542	F: GTATCCGTCGTTTCATCAGGTAG	142
	WX543	R: CAAGAAGTGGCGTTTCAACC	
IAG28_RS37920	WX389	F: CAGTGC GGATTTCCGGTGAG	81
	WX390	R: CGACAGTGCTGGTCCTAGA	
IAG28_RS38995	WX443	F: ACCTTCGCGTTGTAGGTAATC	141
	WX444	R: GGTGCTGCCGTTTCTACTT	
IAG28_RS39220	WX467	F: AGCTCTACCTGGGCTACAA	102
	WX468	R: GGCGGAACGAGTTCATCTG	
IAG28_RS39440	WX572	F: ATCCGCCGTGACGACTA	90
	WX573	R: CGTGACGTAAGCGGAGAAG	
IAG28_RS39740	WX241	F: TCCCTCGATGACATGGTCTA	100
	WX242	R: CCAGATGCGGTACGGTTT	
IAG28_RS39845	WX534	F: AAGCACATACCGGTGAAGAC	113
	WX535	R: TTGTCCGGCGTTGAGAAG	
<i>spnE</i>	WX504	F: GTACTGCTGGACACCTACATC	88
	WX505	R: AAGTCGCGAGCTTCTCATAAC	
<i>spnD</i>	WX506	F: AACGAGAAACCGCCATCA	102
	WX507	R: GATCCACGATCTCTTCCAACA	
<i>spnH</i>	WX510	F: AAGCACGTCGTTGACTCG	103
	WX511	R: TACCGTCTGGGTAGTGGATT	
<i>spnI</i>	WX512	F: ATCGACGGCCTGCATTATC	106
	WX513	R: CGAATACCAGGTTGTGGTAGAA	

2 结果与分析

2.1 刺糖多孢菌菌体生物量分析

以多杀菌素标准品溶液的峰面积(mAU·s)为横坐标, 标准多杀菌素样品浓度(mg/L)为纵坐标, 得到多杀菌素的线性回归方程: $y=0.0824x$ ($R^2=0.9998$)。刺糖多孢菌生长发育过程和多杀菌素累计分析如图 1 所示。刺糖多孢菌在 24–144 h 达到对数生长期, 144–156 h 进入稳定期, 156–264 h 步入衰退期。刺糖多孢菌次级代谢产物多杀菌素的产量在对数生长期时增加较为明显, 168 h 时达到最高值, 之后趋于稳定。随后选取 48 h (T2)和 144 h (T6)两个关键时间节点作为后续提取刺糖多孢菌转录组的时间点。

2.2 转录组数据质量评估

转录组数据质量评估结果汇总如表 2 所示。在过滤和清除不可信数据后, 各组分别产生了 3.5、4.0、4.1、4.4、4.2、4.4 Gb 数据。Q30 比率在 92.59%–93.23%之间, Q20 的平均百分比为 96.83%–97.22%, G+C 含量在 67.00%左右, 与刺糖多孢菌基因组 G+C 含量相一致, 表明获得数据质量较好, 均达到后续分析标准。Clean reads 比对到参考基因组, 样本的单一匹配率均在 88.00%以上, 并且多匹配率远低于 10.00%。

2.3 刺糖多孢菌不同生长发育时期 PCA 分析

RNA-seq 数据的主成分分析 (principal

component analysis, PCA) (图 2)可以很好地区分刺糖多孢菌不同生长发育时期的样品, PCA 二维图上, 横坐标表示第一主成分 PC1, 纵坐标表示第二主成分 PC2, 不同时期样品的位置分散、距离较远, 生物学重复则比较聚集, 表明重复性良好, 组别间差异较大。数据差异性最大和次大 2 个主成分因子的百分比(即对总体方差的贡献率)分别为 62%和 32%, PC1 和 PC2 可以解释总体方差(反应样本离散程度)的 94%, 通过数据的降维处理, 丢失了约 6%的离散关系信息。

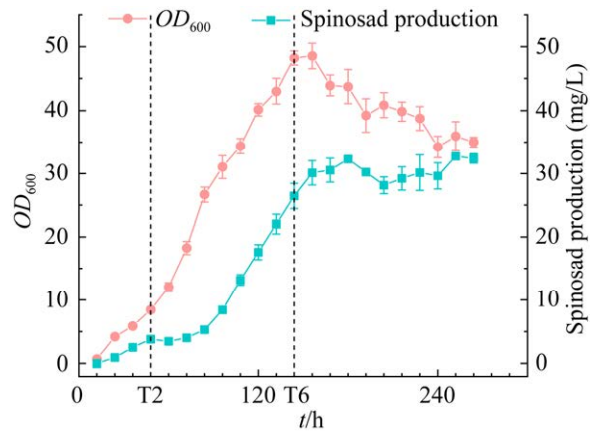


图 1 刺糖多孢菌 SAS-002 不同时期菌体生长情况以及多杀菌素积聚量

Figure 1 The growth of *Saccharopolyspora spinosa* SAS-002 in different periods and the amount of spinosad.

表 2 数据过滤与质量统计

Table 2 Filtered data and quality statistics

Samples	RAW reads (million)	Clean reads (million)	Total bases (Gb)	Q20 (%)	Q30 (%)	G+C content (%)	Uniquely mapped (%)	Multiple mapped (%)	Total mapped (%)
T2-1	33.26	23.06	3.5	96.83	92.59	67.82	88.25	6.55	94.80
T2-2	37.89	26.48	4.0	97.05	92.91	67.72	89.84	6.11	95.95
T2-3	37.65	27.00	4.1	97.19	93.11	67.85	90.26	5.53	95.79
T6-1	41.25	29.58	4.4	97.22	93.23	67.92	88.58	5.68	94.26
T6-2	38.01	27.69	4.2	97.12	93.01	67.63	88.16	6.17	94.33
T6-3	40.73	29.20	4.4	96.99	92.72	67.69	88.54	5.63	94.17

Q20: The percentage of bases with a Phred value>20; Q30: The percentage of bases with a Phred value>30.

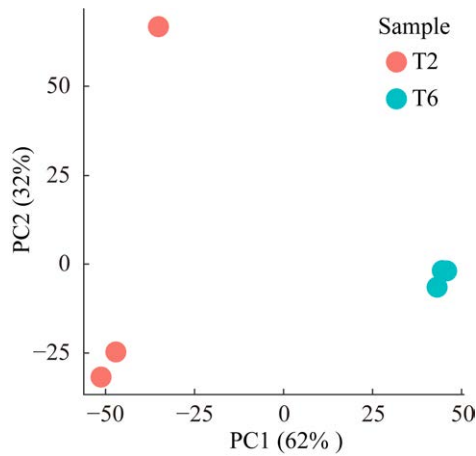


图2 刺糖多孢菌 SAS-002 转录组在 T6 (144 h) vs. T2 (48 h) 时期样品的 PCA 分析

Figure 2 PCA analysis of transcriptome samples at T6 (144 h) vs. T2 (48 h) periods in *Saccharopolyspora spinosa*-SAS-002.

2.4 差异表达基因分析

基因表达以 TPM 计算，为了表征刺糖多孢菌 SAS-002 不同生长发育时期的 mRNA 的表达模式，使用 TPM 值构建了热图，以确定两个时期的总体转录组差异(图 3)。结果显示，在转录组中有 89.58% 的基因表达(TPM>1)。颜色从浅黄到红，表示基因表达量逐渐升高。

刺糖多孢菌不同时期的差异表达基因火山图如图 4 所示，图中越靠近 X 轴两端的基因，基因的翻译效率差异程度越大。使用 DESeq2 对不同时期的刺糖多孢菌样本进行分析，筛选阈值为 $|\log_2 FC| \geq 1$ 且 $P_{adj} < 0.05$ 。刺糖多孢菌转录组 T6 vs. T2 共有 2 542 个基因的转录水平发生显著变化。1 188 个基因的转录水平显著上调($P_{adj} < 0.05$)，其中 932 个基因的转录水平极显著上调($P_{adj} < 0.01$)。1 354 个基因的转录水平显著下调($P_{adj} < 0.05$)，其中 922 个基因的转录水平极显著下调($P_{adj} < 0.01$)。通过差异火山图，能够清晰地洞察差异基因的分布和表达情况。通过对不同时期样品之间的比较分析，能够有针对性地将上调基因和下调基因进行分类，并高效地识别出表达差异显著的基因。

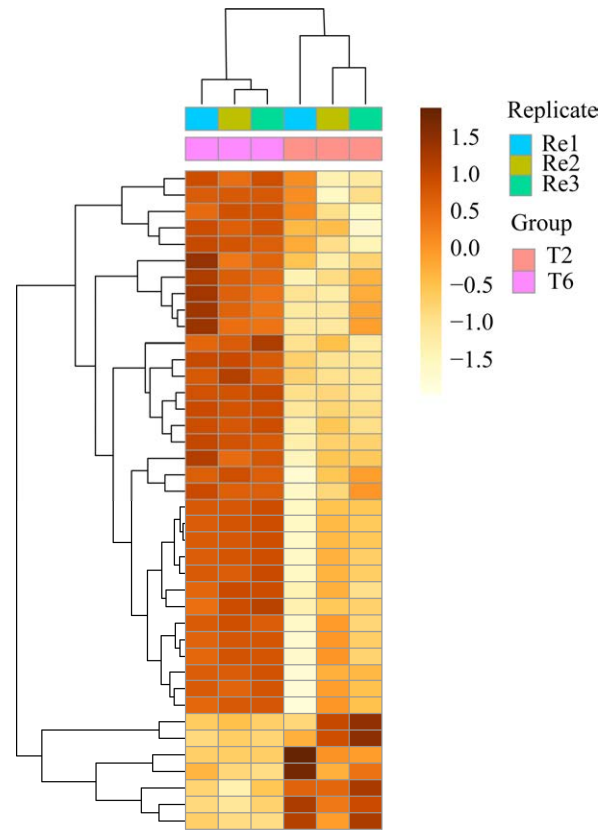


图3 刺糖多孢菌 SAS-002 转录组在 T6 (144 h) vs. T2 (48 h) 时期差异表达基因聚类分析

Figure 3 Cluster analysis of differentially expressed genes at T6 (144 h) vs. T2 (48 h) periods in transcriptome samples of *Saccharopolyspora spinosa* SAS-002.

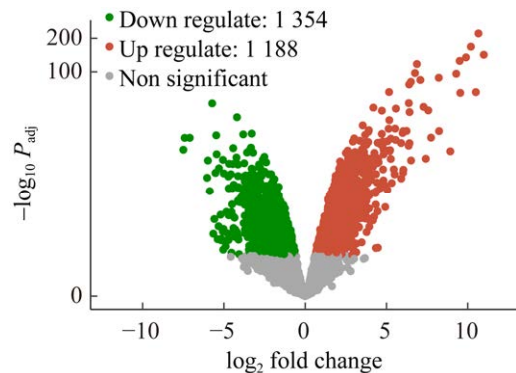


图4 刺糖多孢菌 SAS-002 转录组在 T6 (144 h) vs. T2 (48 h) 时期差异表达基因火山图

Figure 4 Difference analysis volcano plot for differentially expressed genes (DEGs) at T6 (144 h) vs. T2 (48 h) periods in transcriptome samples of *Saccharopolyspora spinosa* SAS-002.

2.5 差异表达基因 GO 富集分析和 KEGG 富集分析

GO 分为分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP)和细胞组分(cell component, CC) 3 个部分。对不同时期刺糖多孢菌转录组的差异基因 GO 功能富集分析如图 5 所示, 这些差异表达基因参与的生物学功能 11 个与生物过程相关以及 1 个与分子功能相关。在生物过程方面, 差异表达基因主要富集在羧酸代谢过程(47 个)、含氧酸代谢过程(47 个)、有机酸代谢过程(47 个)、氨基酸代谢过程(35 个)、有机酸生物合成过程(31 个)、羧酸生物合成过程(31 个)、 α -氨基酸代谢过程(27 个)、氨基酸生物合成过程(26 个)、 α -氨基酸生物合成过程(22 个)、谷氨酰胺生物合成过程(9 个)和谷氨酰胺代谢过程(9 个)。在分子功能

方面, 主要富集在氧化还原酶活性(26 个)。以上结果表明, 这些差异表达基因主要集中在氨基酸代谢过程和生物合成过程有关的代谢通路中。

KEGG 功能富集分析能揭示差异基因的生化代谢途径和信号传导途径, 可系统预测靶基因参与的代谢通路。KEGG 显著富集的结果 ($P_{adj} < 0.05$) 如图 6 所示, 横坐标为显著差异表达基因个数, 纵坐标表示代谢通路的分类。结果发现, 差异转录基因富集的 3 条代谢通路分别为甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、氧化磷酸化和精氨酸生物合成, 参与这 3 条通路的注释基因分别为 38、25 和 19 个。差异表达基因分布的各种代谢通路主要存在于氨基酸代谢和能量代谢等关键途径中, 这些代谢途径可能与多杀菌素的生物合成相关。

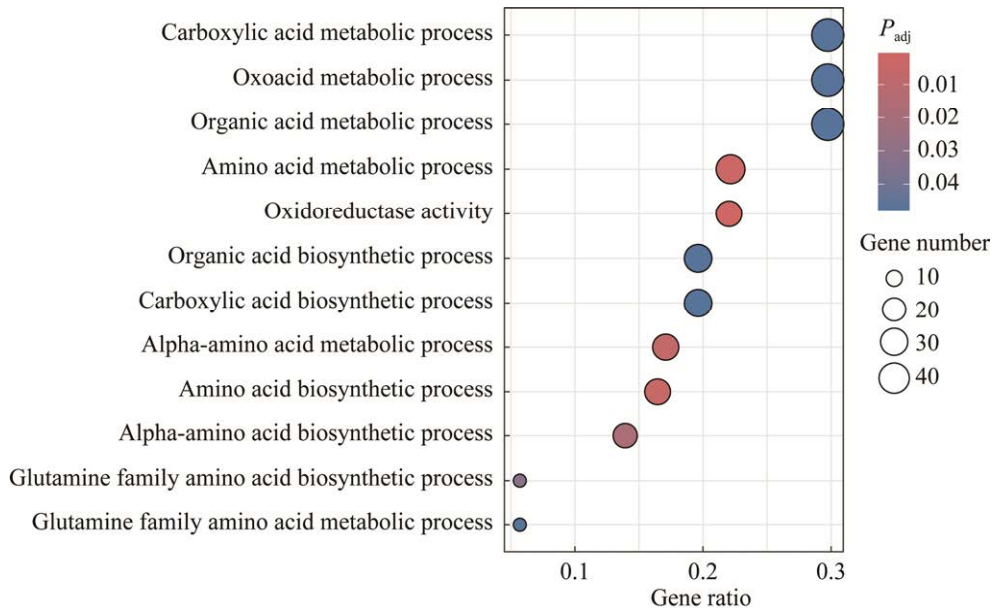


图 5 刺糖多孢菌 SAS-002 转录组在 T6 (144 h) vs. T2 (48 h) 时期差异表达基因 GO 富集分析

Figure 5 Gene ontology (GO) enrichment analysis of differentially expressed genes at T6 (144 h) vs. T2 (48 h) periods in transcriptome samples of *Saccharopolyspora spinosa* SAS-002. Y-axis label represents pathway, and X-axis label represents gene ratio (gene ratio=amount of differentially expressed genes enriched in the pathway/amount of all genes in background gene set). Size and color of the bubble represent amount of differentially expressed genes enriched in the pathway and enrichment significance, respectively.

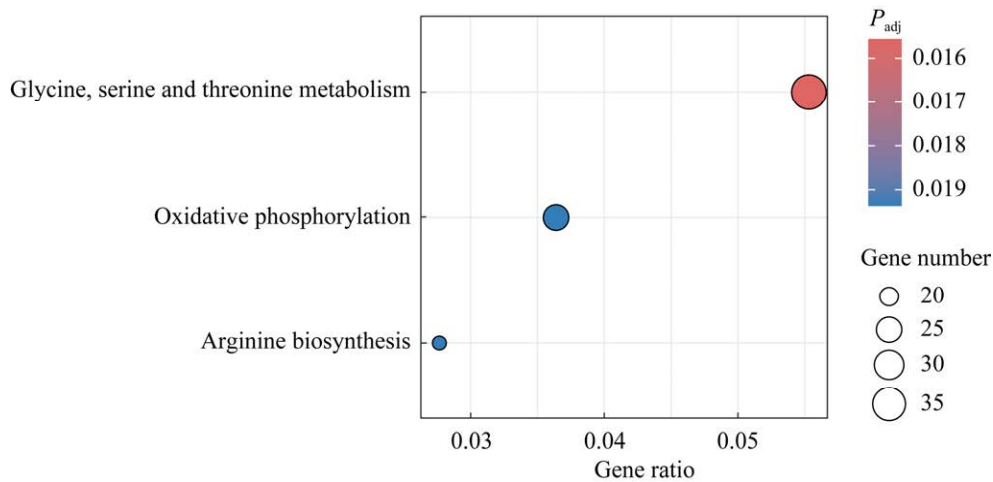


图 6 刺糖多孢菌 SAS-002 转录组在 T6 (144 h) vs. T2 (48 h) 时期差异表达基因 KEGG 富集分析

Figure 6 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis of differentially expressed genes at T6 (144 h) vs. T2 (48 h) periods in transcriptome samples of *Saccharopolyspora spinosa* SAS-002. Y-axis label represents pathway, and X-axis label represents gene ratio (gene ratio=amount of differentially expressed genes enriched in the pathway/amount of all genes in background gene set). Size and color of the bubble represent amount of differentially expressed genes enriched in the pathway and enrichment significance, respectively.

2.6 多杀菌素基因簇的基因表达量分析

基于刺糖多孢菌不同生长时期的转录组数据分析, 绘制了多杀菌素生物合成基因簇中 19 个基因表达量图(图 7)。结果表明, 共有 17 个基因上调, 2 个基因下调。其中, T6 vs. T2 表达量最高的基因为 *spnP*、*spnO*、*spnN* 和 *spnM*, 均增加了 20 倍。

2.7 多杀菌素中心碳代谢相关差异表达基因

刺糖多孢菌转录组 T6 vs. T2, 碳代谢通路发生了显著变化(图 8)。乙酰辅酶 A 生成丙二酰辅酶 A 过程中, 乙酰辅酶 A 羧化酶的生物羧基载体蛋白编码基因(*accB*)转录水平呈现显著上调趋势。糖酵解途径中检测到很多基因的转录水平

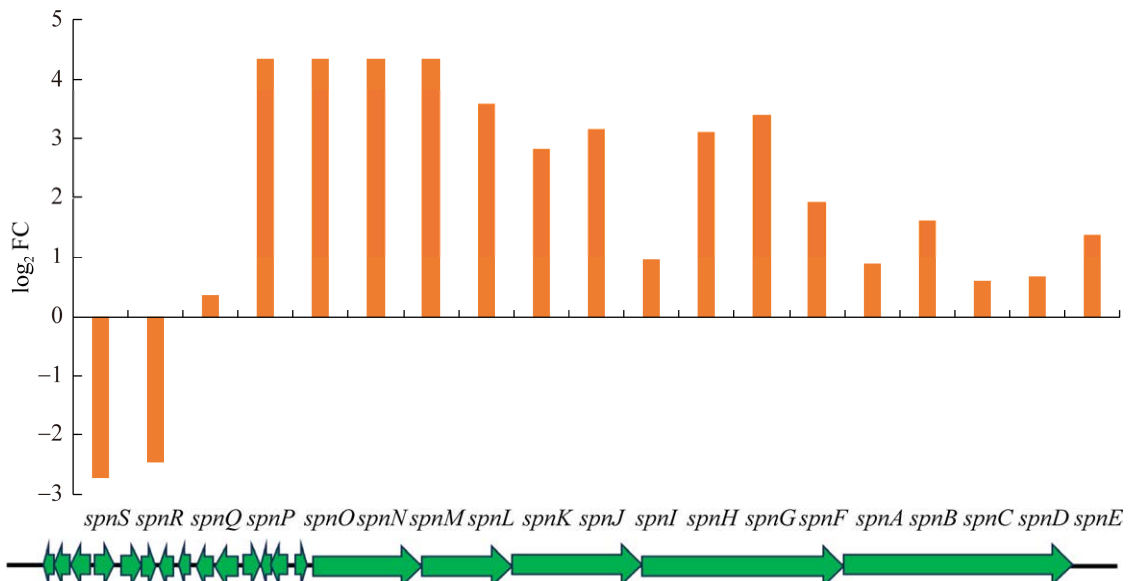


图 7 多杀菌素生物合成基因簇中 19 个基因的转录分析

Figure 7 Transcription analysis of 19 genes situated in the spinosyn biosynthetic gene clusters (BGCs).

发生了显著性上调,包括多聚磷酸盐葡萄糖激酶基因(*ppgK*)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因(*G6PD*)、磷酸果糖激酶基因(*pfk*)、果糖-二磷酸醛缩酶基因(*fbaB*)和二氢硫辛酰胺脱氢酶基因(*DLD*)。还有多个基因转录水平发生了显著性下调,包括半乳糖变旋酶基因(*galM*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)、2,3-二磷酸甘油酸依赖性磷酸甘油酸变位酶基因(*PGAM*)、烯醇化酶基因(*ENO*)、磷酸烯醇式丙酮酸合酶基因(*pps*)、二氢硫辛酰胺 S-乙酰转移酶基因(*DLAT*)和丙酮酸脱氢酶 E1 组分(*aceE*)。在 TCA 循环中,很多基因转录水平呈现出显著下调,其中涉及柠檬酸合酶基因(*CS*)、二氢硫辛酰胺琥珀酰转移酶基因(*DLST*)、琥珀酰辅

酶 A 合成酶 α 亚基基因(*sucD*)、琥珀酸脱氢酶基因(*sdhA*)、延胡索酸酶基因(*fumB*)和 L-苹果酸脱氢酶基因(*mdh*)。同时,精氨酸生物合成途径中的大部分基因转录水平也都呈现出显著下调趋势。磷酸戊糖途径的起点是葡萄糖-6-磷酸,此途径包含多个上调基因,限速酶 G6PD 也在其中。甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径中,与丙酮酸直接相关的 D-丝氨酸脱水酶基因(*dsdA*)的表达量也呈显著性上升趋势。在脂肪酸代谢方面,有 2 个差异基因转录水平显著上调,3 个差异基因转录水平显著下调。

2.8 qRT-PCR 与 RNA-seq 相互验证

antiSMASH 软件 6.0 版本预测刺糖多孢菌基因组中存在的 BGCs 模型,如图 9 所示,antiSMASH

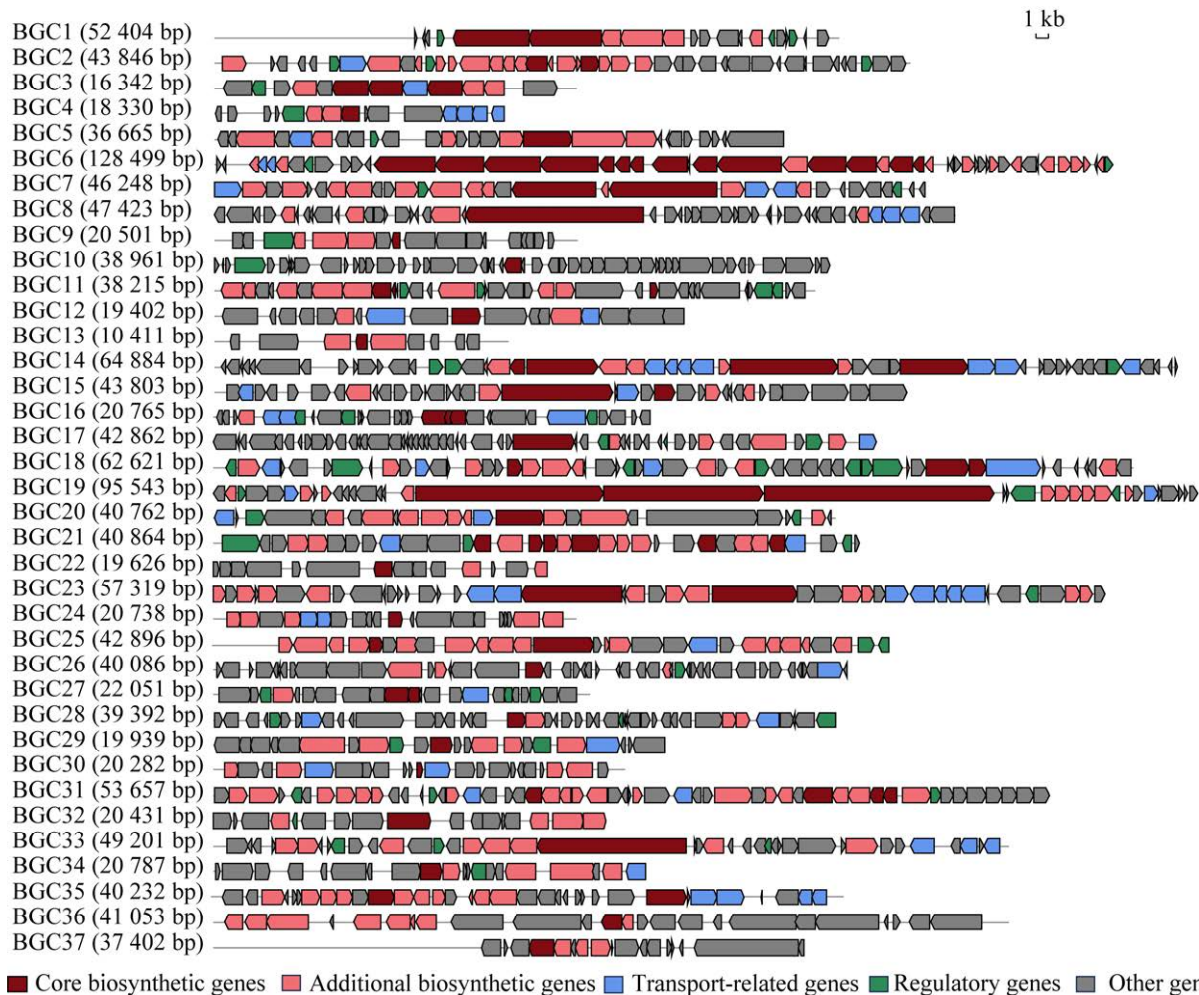


图 9 刺糖多孢菌基因组中存在的 37 个次级代谢产物生物合成基因簇模型

Figure 9 Model of 37 secondary metabolite biosynthetic gene clusters in the *Saccharopolyspora spinosa* genome.

软件共预测出 37 个 BGCs, 基因是按比例绘制并根据已知或预测的功能以颜色编码, 同源基因以相同的颜色呈现, 其中 BGC6 为多杀菌素生物合成基因簇。

刺糖多孢菌发酵过程中不是每一个 BGC 都进行表达, 还有一部分处于沉默状态, 因此筛选出具有差异表达的 BGCs 后, 可以优先进行敲除, 从而阻断多杀菌素竞争性通路, 达到提高多杀菌素产量的目的。因此, 为除了多杀菌素生物合成基因簇之外的 36 个 BGCs 中的核心基因, 以及被注释为多杀菌素相关的基因 *spnE*、*spnD*、*spnH* 和 *spnI*, 设计了 qRT-PCR 引物, 以进行 qRT-PCR 与 RNA-seq 的相互验证。结果如图 10 所示, qRT-PCR 检测了 36 个 BGCs 中关键基因, 其中上调基因有 17 个, 下调基因有 19 个。基于转录组数据, 其中上调基因有 22 个, 下调基因有 14 个。双方同时上调的基因有 12 个, 分别为 BGC2 (43 846 bp)、BGC4 (18 330 bp)、BGC9 (20 501 bp)、BGC18 (62 621 bp)、BGC22 (19 626 bp)、BGC25 (42 896 bp)、BGC26 (40 086 bp)、BGC28 (39 392 bp)、BGC30 (20 282 bp)、BGC31 (53 657 bp)、BGC34 (20 787 bp) 和 BGC35 (40 232 bp)。多杀菌素相关合成基因 *spnE*、*spnD*、*spnH* 和 *spnI* 的 qRT-PCR 和转录水平都显示上调。

3 讨论与结论

本研究通过对刺糖多孢菌不同时期的转录组进行分析, 发现了多个与多杀菌素生物合成有关的重要功能基因的表达特征。研究发现刺糖多孢菌转录组 T6 vs. T2 共筛选出 2 542 个差异表达基因的转录水平发生显著变化, 其中显著上调 ($P_{adj}<0.05$) 的基因 1 188 个, 极显著上调 ($P_{adj}<0.01$) 的基因 932 个, 显著下调 ($P_{adj}<0.05$) 的基因 1 354 个, 极显著下调 ($P_{adj}<0.01$) 的基因 922 个。GO 富集分析揭示了刺糖多孢菌在不同时期下差异基因参与的生物过程和分子功能。KEGG 富集分析显示了与多杀菌素生物合成高度相关的代谢途径。为探究提高多杀菌素产量的方法提供了重要依据。

通过对多杀菌素基因簇中的基因表达量进行分析, 发现与多杀菌素生物合成相关基因 *spnP*、*spnO*、*spnN*、*spnM*、*spnL*、*spnG*、*spnJ*、*spnH*、*spnK*、*spnF*、*spnB*、*spnE*、*spnI*、*spnA*、*spnD*、*spnC* 和 *spnQ* 的转录水平都呈现出显著性上调, *spnR* 和 *spnS* 基因的转录水平呈显著性下调, *spnA*、*spnB*、*spnC*、*spnD* 和 *spnE* 这 5 个基因负责编码 I 型聚酮合成酶, 控制多杀菌素碳骨架的生物合成。*spnA*、*spnB*、*spnC*、*spnD* 和 *spnE*

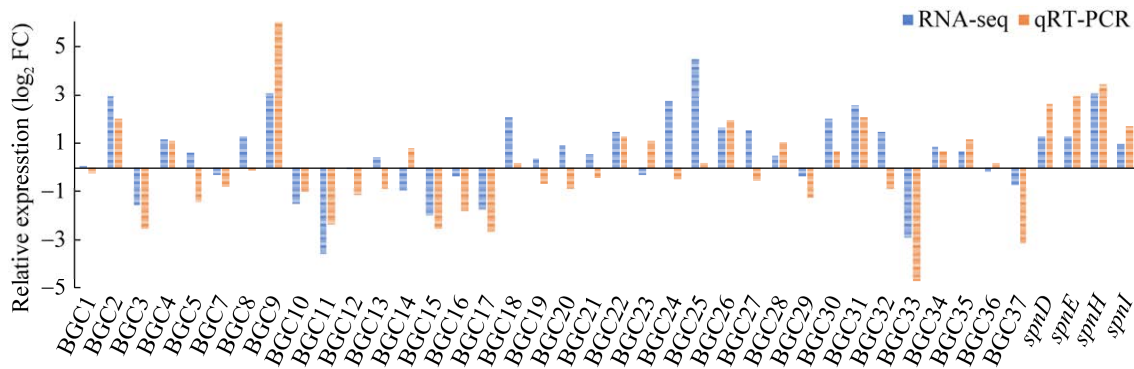


图 10 qRT-PCR 与 RNA-seq 相互验证
Figure 10 qRT-PCR and RNA-seq mutual confirmation.

这 5 个基因表达量增加有利于多杀菌素碳骨架的生成,从而有助于多杀菌素的合成^[32]。基因 *spnF*、*spnJ*、*spnM* 和 *spnL* 负责将聚酮合酶生成的产物转化为糖苷配基,在 *spnG* 基因的催化作用下,鼠李糖与糖苷配基进行连接,同时,在基因 *spnK*、*spnI* 和 *spnH* 的催化下,C2、C3 和 C4 位上的羟基进行甲基化修饰,产生三甲基鼠李糖。*spnF*、*spnJ*、*spnM*、*spnL*、*spnG*、*spnK*、*spnI* 和 *spnH* 这 8 个基因的表达量增加有助于拟糖配基的产生,从而有助于多杀菌素的合成^[32]。*spnO*、*spnN*、*spnQ*、*spnR* 和 *spnS* 这 5 个基因能够将葡萄糖脱氢酶催化产生的 NDP-4 酮-6 脱氧葡萄糖转化成 NDP-二甲基福乐糖胺,随后,在 *spnP* 基因的连接作用下,福乐糖胺和拟糖配基进行连接,最终形成完整的多杀菌素结构。其中,*spnO*、*spnN*、*spnQ* 和 *spnP* 这 4 个基因表达量的增加,可能有助于多杀菌素的合成,相反,*spnR* 和 *spnS* 这 2 个基因表达量的降低,可能导致刺糖多孢菌的副产物增加,从而限制多杀菌素的生物合成,这一发现为刺糖多孢菌菌株的改造提供了重要指导^[32]。

通过对中心碳代谢途径的差异基因进行分析,发现了调控多杀菌素合成的关键调控基因。例如,丙二酰辅酶 A 是多杀菌素的重要前体,它可由乙酰辅酶 A 和丙酮酸合成。自从 1958 年发现乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)以来^[33],所有生物体内丙二酰辅酶 A 都是通过 ACC 活性产生。ACC 催化是生物化学中典型的限速步骤,它由 4 个亚基 *accA*、*accB*、*accC* 和 *accD* 构成,通过转录组数据分析发现 *accB* 显著性表达,意味着有更多的乙酰辅酶 A 转化为丙二酰辅酶 A。因此,*accB* 编码基因表达水平的提高可能有助于多杀菌素的合成。然而乙酰辅酶 A 和丙酮酸的主要来源为糖酵解途径、TCA 循环、脂肪酸代谢、磷酸戊糖途径和甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,因此多杀菌素的生物合成与这几个途径息息相关。

糖酵解途径是葡萄糖分解产生能量,降解成丙酮酸的过程。*Pfk* 是此通路中的显著上调基因,同时也是糖酵解作用的限速酶,此酶表达量增加表明可能有更多的物质流向了丙酮酸^[34]。

GAPDH、*DLAT* 和 *aceE* 是糖酵解途径的转录水平显著下调的基因,其中 *GAPDH* 基因具有负协同效应,表达量下降会让更多的葡萄糖进入磷酸戊糖途径,从而产生更多的 NADPH,有助于抗氧化反应,使得有更多能量流向丙酮酸。据报道,孙明明等^[35]研究发现敲除 *DLAT* 基因后会阻遏戊糖磷酸途径。宋灿辉等^[36]对大肠杆菌中的 *aceE* 基因进行敲除后,阻断了丙酮酸流向 TCA 循环,促进丙酮酸的积累。因此 *GAPDH*、*DLAT* 和 *aceE* 基因都为多杀菌素的合成提供了充足的前体。TCA 循环和精氨酸生物合成途径中很多基因转录水平呈现出显著性下调趋势,表示发酵后期流向 TCA 循环的代谢流减少,暗示着可能由糖酵解过程产生的乙酰辅酶 A 将更多地流向丙二酰辅酶 A 的合成途径,从而使多杀菌素的产量上升。G6PD 是磷酸戊糖途径的限速酶,它的上调暗示着磷酸戊糖途径的活性增加,可能会产生更多的 NADPH,有助于增强对多杀菌素生物合成过程的能量供应,对鼠李糖和福乐糖胺的合成也有促进作用。基因 *dsdA* 能够对 D-丝氨酸催化脱氨基作用,生成丙酮酸盐(或脂)、水和氨水,*dsdA* 基因在甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径中的显著上调可能会促进丙酮酸的合成,进一步增加多杀菌素的产量。伍小颖^[37]考察了多种氨基酸添加对多杀菌素产量的影响,其研究结果发现精氨酸、苏氨酸、甘氨酸和丝氨酸的添加对多杀菌素产量有显著的促进作用。在脂肪酸代谢方面,研究表明在外源性脂肪酸存在的情况下,内源性脂肪酸生物合成转录显著降低,促进

乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 生成, 导致多杀菌素生物合成转录上调^[38]。因此脂肪酸代谢途径与多杀菌素的生物合成紧密相关。

本研究还通过 qRT-PCR 与 RNA-seq 相互验证, 分析了刺糖多孢菌中多杀菌素的竞争基因簇, 有研究表明通过阻断竞争性基因簇能够促进次级代谢产物的生成^[31]。大量竞争基因簇在菌株生长发育过程中消耗 ATP、NADPH、碳源和氮源等物质产生次级代谢产物, 通过阻断这些次级代谢产物生物合成基因簇能够使更多的物质流向目标产物的生物合成。

综上所述, 这些信息为研究多杀菌素在刺糖多孢菌中的生物合成过程提供了重要的参考, 通过结合基因组和转录组数据分析有助于挖掘更多相关功能基因, 为后续刺糖多孢菌的遗传改造提供了理论依据。

参考文献

- [1] DEUTSCH CA, TEWKSBUURY JJ, TIGCHELAAR M, BATTISTI DS, MERRILL SC, HUEY RB, NAYLOR RL. Increase in crop losses to insect pests in a warming climate[J]. *Science*, 2018, 361(6405): 916-919.
- [2] ZAFEIRIADIS S, SAKKA MK, ATHANASSIOU CG. Efficacy of contact insecticides for the control of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)[J]. *Journal of Stored Products Research*, 2021, 92: 101817.
- [3] Gervais P. Chemical hazard due to insecticides-determinations of cholinesterases and hygiene of use of organophosphorus compounds[J]. *Archives Des Maladies Professionnelles De Medecine Du Travail Et De Securite Sociale*, 1976, 37(3): 320-324.
- [4] 黄振. 一种防治水稻害虫的微生物复配杀虫剂及其应用: CN201711431517.6[P]. 2018-04-13.
Huang Z. Microbial complex insecticide used for controlling insects on rice, comprises *Isaria* and pymetrozine: CN201711431517.6[P]. 2018-04-13.
- [5] HUANG KX, XIA LQ, ZHANG YM, DING XZ, ZAHN JA. Recent advances in the biochemistry of spinosyns[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(1): 13-23.
- [6] WATSON GB. Actions of insecticidal spinosyns on γ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2001, 71(1): 20-28.
- [7] THOMPSON DG, HARRIS BJ, LANTEIGNE LJ, BUSCARINI TM, CHARTRAND DT. Fate of spinosad in litter and soils of a mixed conifer stand in the Acadian forest region of New Brunswick[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(4): 790-795.
- [8] PAN HX, LI J, HE NJ, CHEN JY, ZHOU YM, SHAO L, CHEN DJ. Improvement of spinosad production by overexpression of gtt and gdh controlled by promoter *PermE** in *Saccharopolyspora spinosa* SIPI-A2090[J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(4): 733-739.
- [9] ZHAO FL, XUE CY, WANG ML, WANG XY, LU WY. A comparative metabolomics analysis of *Saccharopolyspora spinosa* WT, WH124, and LU104 revealed metabolic mechanisms correlated with increases in spinosad yield[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(8): 1661-1668.
- [10] MADDURI K, WALDRON C, MATSUSHIMA P, BROUGHTON MC, CRAWFORD K, MERLO DJ, BALTZ RH. Genes for the biosynthesis of spinosyns: applications for yield improvement in *Saccharopolyspora spinosa*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2001, 27(6): 399-402.
- [11] WALDRON C, MADDURI K, CRAWFORD K, MERLO DJ, TREADWAY P, BROUGHTON MC, BALTZ RH. A cluster of genes for the biosynthesis of spinosyns, novel macrolide insect control agents produced by *Saccharopolyspora spinosa*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, 78(3): 385-390.
- [12] YOU D, WANG MM, YE BC. Acetyl-CoA synthetases of *Saccharopolyspora erythrae* are regulated by the nitrogen response regulator GlnR at both transcriptional and post-translational levels[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 103(5): 845-859.
- [13] STAUNTON J, WEISSMAN KJ. Polyketide biosynthesis: a millennium review[J]. *Natural Product Reports*, 2001, 18(4): 380-416.

- [14] LIU ZD, ZHU ZR, TANG JL, HE HC, WAN QQ, LUO YW, HUANG WT, YU ZQ, HU YB, DING XZ, XIA LQ. RNA-seq-based transcriptomic analysis of *Saccharopolyspora spinosa* revealed the critical function of PEP phosphonmutase in the replenishment pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(49): 14660-14669.
- [15] 冯晓洲, 王为善, 任晓慧, 刘新利, 毛相朝, 杨克迁. 多杀菌素生物合成基因簇启动子探测和转录时序[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(7): 914-926.
- FENG XZ, WANG WS, REN XH, LIU XL, MAO N, YANG KQ. Promoter detection and transcriptional analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(7): 914-926 (in Chinese).
- [16] Simon A. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data[EB/OL]. [2023-08-22]. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- [17] CHEN SF, ZHOU YQ, CHEN YR, GU J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [18] DOBIN A, GINGERAS TR. Mapping RNA-seq reads with STAR[J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2015, 51: 11.14.1-11.14.11.14.19.
- [19] LIAO Y, SMYTH GK, SHI W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(7): 923-930.
- [20] LOVE MI, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [21] PERTEA M, KIM D, PERTEA GM, LEEK JT, SALZBERG SL. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11: 1650-1667.
- [22] Raivo K. pheatmap[EB/OL]. [2023-08-22]. <https://github.com/raivokolde/pheatmap>.
- [23] Winston C. ggplot2[EB/OL]. [2023-08-22]. <https://ggplot2.tidyverse.org/>.
- [24] CANTALAPIEDRA CP, HERNÁNDEZ-PLAZA A, LETUNIC I, BORK P, HUERTA-CEPAS J. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(12): 5825-5829.
- [25] HUERTA-CEPAS J, SZKLARCZYK D, HELLER D, HERNÁNDEZ-PLAZA A, FORSLUND SK, COOK H, MENDE DR, LETUNIC I, RATTEI T, JENSEN LJ, von MERING C, BORK P. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D309-D314.
- [26] Vince C. AnnotationHub[EB/OL]. [2023-08-22]. <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/AnnotationHub.html>.
- [27] ASHBURNER M, BALL CA, BLAKE JA, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY JM, DAVIS AP, DOLINSKI K, DWIGHT SS, EPPIG JT, HARRIS MA, HILL DP, ISSEL-TARVER L, KASARSKIS A, LEWIS S, MATESE JC, RICHARDSON JE, RINGWALD M, RUBIN GM, SHERLOCK G. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25-29.
- [28] AOKI-KINOSHITA KF, KANEHISA M. Gene annotation and pathway mapping in KEGG[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2007, 396: 71-91.
- [29] WU TZ, HU EQ, XU SB, CHEN MJ, GUO PF, DAI ZH, FENG TZ, ZHOU L, TANG WL, ZHAN L, FU XC, LIU SS, BO XC, YU GC. clusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. *Innovation (Cambridge (Mass))*, 2021, 2(3): 100141.
- [30] BLIN K, SHAW S, KLOOSTERMAN AM, CHARLOP-POWERS Z, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W29-W35.
- [31] 刘朱东. 刺糖多孢菌转录组学研究以及影响多杀菌素合成关键基因的挖掘[D]. 长沙: 湖南师范大学博士学位论文, 2021.
- LIU ZD. The transcriptomics analysis and mining of key genes affecting spinosad biosynthesis in *Saccharopolyspora spinosa*[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan Normal University, 2021 (in Chinese).
- [32] WALDRON C, MATSUSHIMA P, ROSTECK PR Jr, BROUGHTON MC, TURNER J, MADDURI K, CRAWFORD KP, MERLO DJ, BALTZ RH. Cloning

- and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*[J]. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(5): 487-499.
- [33] WAKIL SJ. A malonic acid derivative as an intermediate in fatty acid synthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80(23): 6465.
- [34] ZHANG XM, XUE CY, ZHAO FL, LI DS, YIN J, ZHANG CB, CAIYIN Q, LU WY. Suitable extracellular oxidoreduction potential inhibit rex regulation and effect central carbon and energy metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 98.
- [35] 孙明明, 乔亚亚, 李垒垒, 山长亮, 张帅. 二氢硫辛酰转乙酰基酶通过乙酰化磷酸葡萄糖酸脱氢酶促进核酸合成[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(3): 339-346.
- SUN MM, QIAO YY, LI LL, SHAN CL, ZHANG S. Dihydrolipoamide acetyltransferase promotes nucleic acid synthesis by controlling phosphogluconate dehydrogenase acetylation[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 37(3): 339-346 (in Chinese).
- [36] 宋灿辉, 张伟国. 敲除 *aceE* 基因对大肠杆菌生长和丙酮酸代谢的影响[J]. *生物加工过程*, 2013, 11(6): 15-18.
- SONG CH, ZHANG WG. Effects of *aceE* gene knockout on growing and pyruvate biosynthesis of *E. coli*[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2013, 11(6): 15-18 (in Chinese).
- [37] 伍小颖. 多杀菌素高产菌株育种及培养基优化[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2017.
- WU XY. Breeding of spinosad high-production strain and optimization of fermentation[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [38] XUE CY, ZHANG XM, YU ZR, ZHAO FL, WANG ML, LU WY. Up-regulated spinosad pathway coupling with the increased concentration of acetyl-CoA and malonyl-CoA contributed to the increase of spinosad in the presence of exogenous fatty acid[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 81: 47-53.