

## 研究报告

# 阿维链霉菌孢子色素生物合成对阿维菌素产量的影响

朱娟娟, 陶美凤

华中农业大学农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要:** 以野生型阿维链霉菌 NRRL8165 为出发菌株, 用 PCR 方法克隆孢子色素基因簇直系同源基因(*whiE<sub>a</sub>*)侧翼片段, 并构建基因置换载体 pHL643。将 pHL643 跨属接合转移进入阿维链霉菌 NRRL8165, 通过置换载体和染色体之间的同源双交换, 对染色体上的 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇进行置换, 得到 3 株阿泊拉霉素抗性、硫链丝菌素敏感的重组菌株, 均表现为孢子色素合成缺陷。通过 Southern 杂交分析, 证明 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇被置换。通过摇瓶发酵和 HPLC 检测, 发现 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇置换菌株所产阿维菌素产量明显提高, 表明孢子色素与阿维菌素生物合成之间可能有竞争底物的现象。

**关键词:** 孢子色素, *whiE<sub>a</sub>*, 阿维链霉菌, 接合转移, 基因置换, 阿维菌素

## Effect on Production of Avermectins of Spore Pigment Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* NRRL8165

Juanjuan Zhu, and Meifeng Tao

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** The flanking fragments of the *whiE<sub>a</sub>* gene cluster was PCR amplified, cloned and used to construct the gene replacement plasmid pHL643. pHL643 was conjugated into *Streptomyces avermitilis* NRRL8165 followed by screening for double crossover event, yielding three apramycin resistance and thiostrepton sensitive isolates named ZJ1, ZJ2 and ZJ3, which were deficient in biosynthesis of the grey spore pigment. The *whiE<sub>a</sub>* gene replacement of these isolates was confirmed by Southern hybridization. Fermentation of the mutant strains in shaking flasks and HPLC analyses showed that the production of avermectins increased by 47% compared with that of the wild type, indicating that the spore pigment biosynthesis competes with the avermectins biosynthetic pathway.

**Keywords:** spore pigment, *whiE<sub>a</sub>*, *Streptomyces avermitilis*, conjugation, gene replacement, avermectins

阿维菌素(Avermectin)是由阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)NRRL8165产生的一组具有相似结构的十六元大环内酯类抗生素,共8个组分,分别为A1a、A1b、A2a、A2b、B1a、B1b、B2a和B2b。阿维菌素具有很强的驱虫和杀虫活性,是目前最为有效的杀虫剂之一<sup>[1]</sup>。由于阿维菌素重要的生理活性和复杂的化学结构,引起了人们的极大兴

趣。目前阿维菌素的生物合成途径已基本阐明<sup>[2,3]</sup>。Cane等通过在阿维菌素合成过程中掺入相应的<sup>13</sup>C标记的化合物,表明阿维菌素的大环内酯是由1个支链脂肪酸为生物合成起始物与7个乙酸盐和5个丙酸盐头尾缩合而形成<sup>[4]</sup>。C-25位取代基的不同将阿维菌素分为a、b组分,a组分的2-甲基丁酰基衍生自异亮氨酸,而b组分的异丁酰基衍生自缬氨酸。

Received: March 11, 2008; Accepted: April 23, 2008

Supported by: the National Natural Science of Fund of China (No. 30570030).

Corresponding author: Meifeng Tao. Tel: +86-27-87283702; E-mail: tao\_meifeng@mail.hzau.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30570030)资助。

L-异亮氨酸、L-缬氨酸通过脱氨、转氨和脱羧作用形成支链脂肪酸<sup>[5]</sup>。

阿维链霉菌还可产生多种其他的次级代谢产物，如孢子色素、黑色素和寡霉素等。其中孢子色素属于芳香族聚酮类化合物。在天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中，孢子色素编码基因 *whiE* 由 8 个开放阅读框组成，编码聚酮羟化酶(Polyketide hydroxylase)、酮缩合酶(Ketosynthase)、链长因子(Chain length factor)、酰基载体蛋白(Acyl carrier protein)、芳香化酶(Aromase)和环化酶(Cyclase)等酶蛋白<sup>[6]</sup>。由 KS、CLF、ACP 组成最小 PKS，负责将 1 个乙酰辅酶 A 起始单位与 11 个丙二酰辅酶 A 延伸单位组装成一个 16 碳链的非还原聚酮体，然后直接进入酮基还原、环化和芳香化反应，再经后修饰最后形成孢子色素<sup>[7]</sup>。阿维链霉菌基因组测序已完成<sup>[8]</sup>，经序列分析发现，在阿维链霉菌中存在 *whiE* 直系同源基因(Orthologous gene)，命名为 *whiE<sub>a</sub>*。*whiE<sub>a</sub>* 基因簇也是有 8 个开放阅读框组成，分别为 *sppF*、*sppG*、*sppH*、*sppA*、*sppB*、*sppC*、*sppD*

和 *sppE*(图 1)。Clustal W 程序分析显示，每个阅读框与 *whiE* 基因簇中相对应的阅读框的序列同源性高达 73% 以上。推测在阿维链霉菌中，*whiE<sub>a</sub>* 基因簇可能是孢子色素合成基因簇。

据上述分析，阿维菌素和孢子色素聚酮化合物的合成过程中都需要乙酰辅酶 A 的参与。孢子色素与阿维菌素生物合成之间可能有竞争底物的现象。本研究以野生型阿维链霉菌 NRRL8165 为出发菌株，基因置换 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇，从而可能阻断孢子色素的合成，再通过对基因置换菌株 HPLC 检测来检验孢子色素对阿维菌素生物合成的影响程度。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

阿维链霉菌 NRRL8165、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 、ET12567(pUZ8002)以及质粒 pHJL401、pIJ773 和 pIJ2925 均由华中农业大学农业微生物国家重点实验室保存(表 1)。

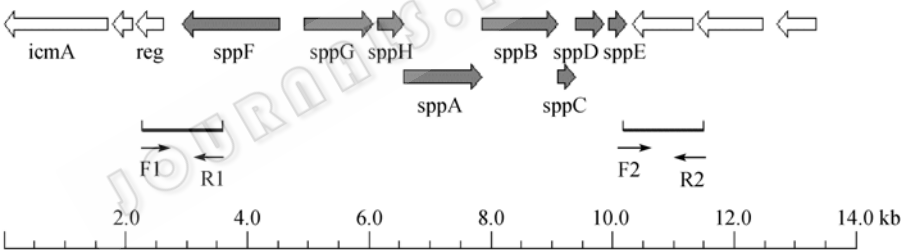


图 1 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇、引物在染色体上的示意图  
Fig. 1 Location of *whiE<sub>a</sub>* cluster, primers in the chromosome of *S. avermitilis*  
Black arrows showed *whiE<sub>a</sub>* genes eight open reading frames

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

Strains	Relevant characteristics	Reference
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	$\Delta lacU169$ ( $\Phi 80 lacZ\Delta M15$ ) <i>recA1</i>	[12]
ET12567 (pUZ8002)	<i>recF dam<sup>-</sup> dcm<sup>-</sup> cml<sup>-</sup> tet<sup>r</sup> str<sup>r</sup> pUZ8002</i>	[13]
<i>S. avermitilis</i> NRRL8165	producer of avermectin	[8]
<i>S. avermitilis</i> (ZJ1,ZJ2,ZJ3)	deficient in biosynthesis of the grey spore pigment in <i>S. avermitilis</i> NRRL8165	this article
pIJ773	4.3 kb, pBluescript KS (+), <i>aac(3)IV</i> , <i>oriT</i> (RK2), FRT sites	[14]
pIJ2925	2.69 kb, <i>bla</i> , <i>lacZa</i>	[15]
pHJL401	5.94 kb, <i>ori</i> pUC19, <i>ori</i> SCP2*, <i>bla</i> , <i>tsr</i> , <i>lacZa</i>	[16]
pHL641	3.98 kb, pIJ773 was digested by <i>EcoR</i> I and <i>Hind</i> III, a 1.29 kb fragment containing resistance marker <i>aac(3)IV</i> + <i>oriT</i> was ligated into <i>EcoR</i> I and <i>Hind</i> III site of pHL2925	this article
pHL642	9.08 kb, PCR products, 1560 bp and 1580 bp were ligated into mutiple cloning sites of pHJL401	this article
pHL643	10.37 kb, pHL641 was digested by <i>Bgl</i> II, a 1.29 kb fragment, resistance marker <i>aac(3)IV</i> + <i>oriT</i> was ligated into <i>Bam</i> H I site of pHL642	this article

### 1.1.2 试剂

本研究所用限制性内切酶和高保真 *Taq* 聚合酶 *pyrobest* 购于 TaKaRa 公司; T4 DNA Ligase 为 Promega 产品; DNA 分子量标记购于华美生物工程有限公司。DIG DNA 标记和检测试剂盒购于 Roche 公司; 阿维菌素标准品购于 Sigma 公司。

### 1.1.3 培养基

大肠杆菌培养基为 LB<sup>[9]</sup>; 阿维链霉菌固体产孢培养基为 YMS<sup>[10]</sup>, 液体培养基为 YEME<sup>[11]</sup>; 大肠杆菌与阿维链霉菌的接合转移培养基、阿维链霉菌发酵的种子培养基和生产培养基参见文献[10]; LB 中氨苄青霉素使用终浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ , 阿泊拉霉素为 30  $\mu\text{g/mL}$ , 氯霉素为 25  $\mu\text{g/mL}$ , 卡那霉素为 25  $\mu\text{g/mL}$ ; YMS 中硫链丝菌素使用终浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ , 阿泊拉霉素为 30  $\mu\text{g/mL}$ , 萘啶酮酸为 25  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 1.2 DNA 操作

质粒提取和转化等基本操作见文献[9]; 链霉菌培养、总 DNA 提取, 大肠杆菌与链霉菌的属间接合转移方法见文献[11]; 地高辛标记 DNA 探针和 Southern 杂交参照产品说明书和文献[9]。

### 1.3 引物设计和 PCR 技术

根据阿维链霉菌 MA-4680 的序列信息, 按图 1 合成 2 对引物: F1(5'-3'): CCCGGAATTCGGTCTGG AGGGTGCCGTTGA(下划线为 *EcoR* I 酶切位点), R1(5'-3'): TCGCGGATCCGTCTATTGCCGTGCCGA AGC(下划线为 *Bam*H I 酶切位点), F2(5'-3'): TCGCG GATCCCCGCACCCTGTTCCAGTTCA(下划线为 *Bam*H I 酶切位点)和 R2(5'-3'): AAAACTGCAGCG TGGGCAAGTCCGTGTTCT(下划线为 *Pst* I 酶切位点)。以阿维链霉菌 NRRL8165 的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 95°C 45 s, 65°C 50 s, 72°C 2 min 20 s, 25 个循环, 72°C 延伸 10 min。

C18 反相柱, 内径 4.6 mm, 柱长 300 mm; 流动相为甲醇-水(85:15), 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 246 nm<sup>[10]</sup>。

### 1.4 发酵液的 HPLC 分析

取 1 mL 发酵液, 加 4 mL 甲醇, 充分振荡浸泡 30 min 后, 离心取上清进行 HPLC 分析。分析条件:

## 2 结果

### 2.1 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇侧翼片段的克隆及基因置换载体的构建

为了将整个 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇基因置换, 设计 2 对引物 F1、R1 和 F2、R2。以阿维链霉菌 NRRL8165 的

总 DNA 为模板, 按 1.3 的条件扩增 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇两端侧翼序列, 分别为 1560 bp 和 1580 bp。1560 bp 的 PCR 产物用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切, 1580 bp 的 PCR 产物用 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切, 再与 *EcoR* I 和 *Pst* I 线性化的 pHL401 连接, 得质粒 pHL642。以 F1 和 R2 为引物对 pHL642 进行测序, 结果和发表序列一致。*Bam*H I 酶切 pHL642, 与 pHL641 的 1.29 kb *Bgl* II 片段相连, 得基因置换载体 pHL643。过程见图 2。

### 2.2 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇的基因置换

#### 2.2.1 置换菌株的筛选

在阿维链霉菌中, pHL643 携带的 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇侧翼序列片段通过与染色体同源片段发生两次同源重组, 使染色体上的 *whiE<sub>a</sub>* 被 *aac(3)IV+oriT* 片段所取代。将质粒 pHL643 转化到大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002), 利用属间接合转移将 pHL643 跨属转移到阿维链霉菌 NRRL8165 中。挑取阿泊拉霉素抗性的接合转移子, 划线转接至含萘啶酮酸的 YMS 培养基分离纯化, 将纯化后的接合转移子在无抗生素的 YMS 培养基上松弛培养至产孢。收集孢子稀释培养形成单菌落, 筛选得到 3 株阿泊拉霉素抗性、硫链丝菌素敏感的重组菌株, 命名为 ZJ1、ZJ2 和 ZJ3。

#### 2.2.2 Southern 杂交验证基因置换

用 Southern 杂交验证 3 株置换菌株染色体上 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇片段是否被 *aac(3)IV+oriT* 片段置换。提取 NRRL8165(野生型)、ZJ1、ZJ2 和 ZJ3 总 DNA, 用 *Bam*H I 完全酶切, 经琼脂糖凝胶分离, 进行 Southern 杂交。以 F2 和 R2 为引物、NRRL8165 菌株总 DNA 为模板 PCR 扩增的 1.58 kb 片段为探针。根据序列, 野生型染色体序列出现 1 条 9022 bp 的杂交带, 置换菌株 ZJ1、ZJ2 和 ZJ3 的 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇片段被 *aac(3)IV+oriT* 片段置换, 应出现 1 条 3765 bp 的杂交带。杂交结果与预期相符(图 3), 说明在 ZJ1、ZJ2 和 ZJ3 中 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇片段已经被正确置换。

#### 2.2.3 基因置换菌株的表型观察

将基因置换菌株的单菌落与野生型菌株 NRRL8165 同时涂布 YMS 平板, 28°C 培养 4 d, 发现野生型菌株已产孢子色素, 而同期生长的基因置换菌株没有产孢子色素, 呈白色。继续培养 5~10 d 基因置换菌株仍保持白色(图 4)。这种表型能够多次得到重复。*whiE<sub>a</sub>* 基因簇置换后, 阿维链霉菌不再产生孢子色素, 这也进一步表明 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇可能是孢子色素合成基因簇。

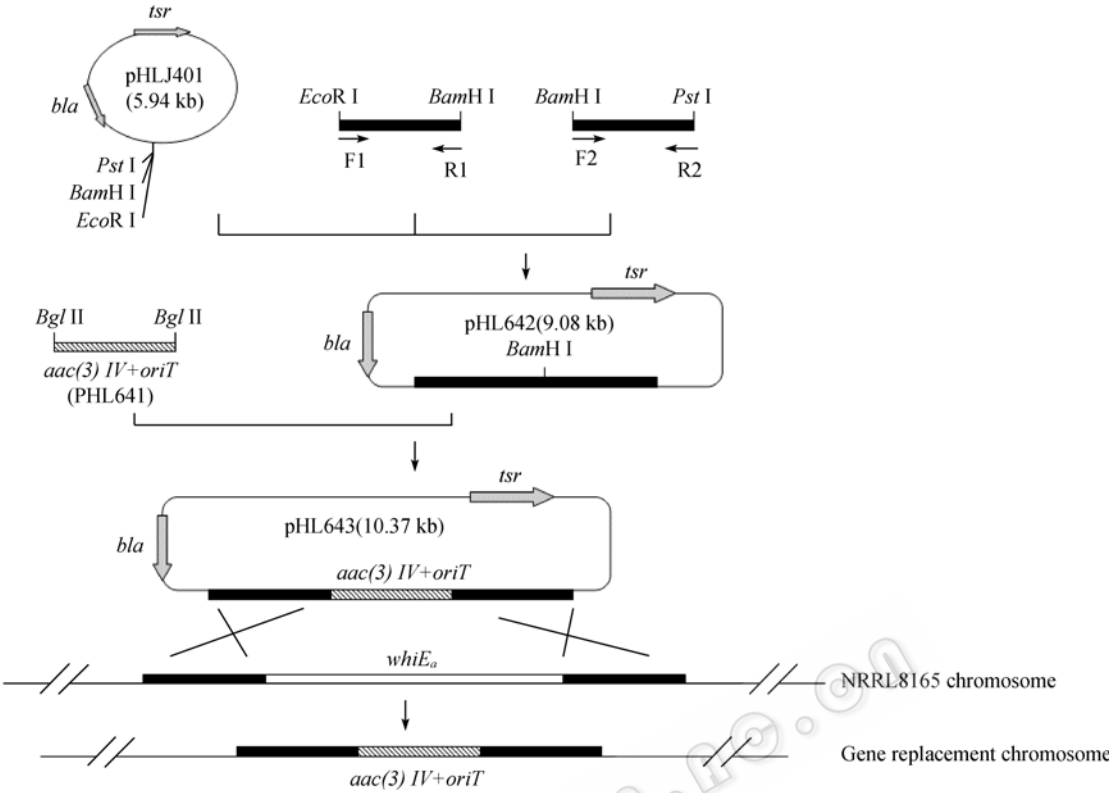


图 2 基因置换质粒 pHL643 的构建及 NRRL8165 染色体上 *whiE<sub>a</sub>* 的置换

Fig. 2 Construction of the gene replacement plasmid pHL643 and replacement of *whiE<sub>a</sub>* in NRRL8165

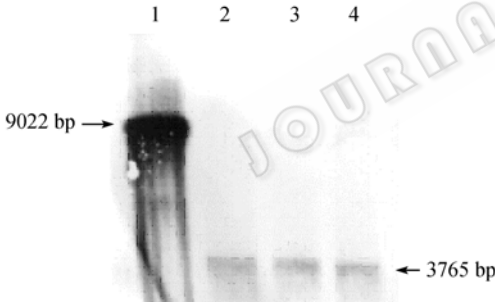


图 3 置换菌株 Southern 杂交验证

Fig. 3 Southern blotting confirmation of replacement strains

1: *S. avermitilis* NRRL8165; 2: ZJ1; 3: ZJ2; 4: ZJ3

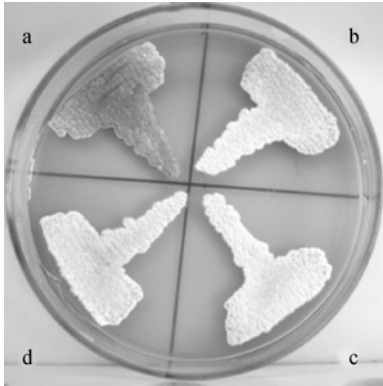


图 4 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇置换菌株的表型观察

Fig. 4 Phenotype of *whiE<sub>a</sub>* replacement mutants

A: NRRL8165; b: ZJ1; c: ZJ2; d: ZJ3

表 2 阿维链霉菌 NRRL8165 和置换菌株合成阿维菌素产量比较

Table 2 Comparison of the avermectins production between *S. avermitilis* NRRL8165 and *whiE<sub>a</sub>* replacement mutants

Stain	Titer <sup>a)</sup> (μg/mL)	Increasing rate (%)
NRRL8165	236.8	
ZJ1	344.5	45.5
ZJ2	353.3	49.2
ZJ3	343.2	44.9

a) The average of three samples

2.3 置换菌株发酵产物的 HPLC 分析

以出发菌株阿维链霉菌 NRRL8165 为对照菌株, 对置换菌株 ZJ1、ZJ2 和 ZJ3 进行摇瓶发酵实验, 甲醇提取发酵液, 具体步骤见方法 1.4。以高效液相色谱(HPLC)峰面积对照阿维菌素标准品标准曲线计算测定不同阿维菌素组分在 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇置换前后的产量(图 5)。每组试验分别有 3 个平行样。从表 2 可看出, 改造后的菌株所产阿维菌素总产量比出发菌株提高了 47%。并且各组分都有明显提高, 其中 B1a 组分和 A2a 组分提高的幅度最大, 与出发菌株相比分别提高了 44%和 53.6%。

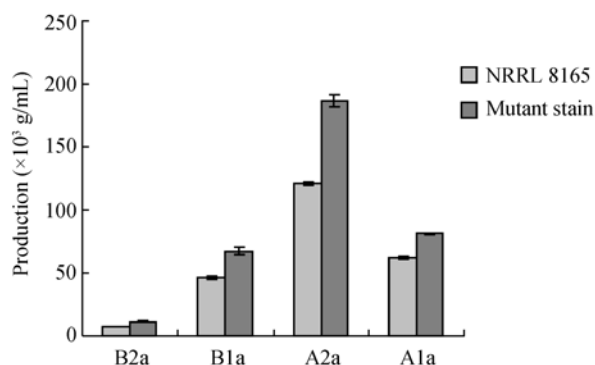


图5 *S. avermitilis* NRRL8165 和 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇置换菌株发酵产物各组分产量对比

Fig. 5 Comparison of each component of fermentation products from *S. avermitilis* NRRL8165 and *whiE<sub>a</sub>* genes replacement strain

### 3 讨论

聚酮类抗生素由简单羧酸如乙酸、丙酸、丁酸等在聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)的作用下经连续脱羧缩合而成<sup>[17]</sup>。由初级糖代谢产生的乙酰辅酶 A, 除为生物体内至关重要的三羧酸循环提供前体之外, 同时也通过各种途径形成形式各异的初级羧酸辅酶 A 成为次级代谢途径如聚酮途径的前体物。另外, 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸降解产物也为聚酮合成提供了原料。生物体内存在的各种聚酮合成途径利用这些来源的小分子羧酸辅酶 A 的能力受到各种调节节点控制。相关调节机制的研究具有重要生物学意义, 并且可用于改变次级代谢的代谢流, 从而提高目标聚酮化合物, 也具有一定的经济意义。

本研究利用基因工程手段进行菌株改造。构建 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇置换菌株, 用 Southern 杂交验证了 *whiE<sub>a</sub>* 基因簇已经基因置换, 表型观察显示置换菌株不产孢子色素, 通过对基因置换菌株发酵产物 HPLC 检测中发现阿维菌素产量比出发菌株提高了 47%。说明被阻断的孢子色素聚酮途径代谢流较大, 消耗了大量的前体物。阻断孢子色素合成途径, 使代谢流向阿维菌素的生物合成, 从而提高阿维菌素产量。这也说明了前面所作的推论即利用相同底物的孢子色素和阿维菌素聚酮途径存在竞争底物的情况。同时该基因置换菌株是在染色体上通过同源双交换完成的, 理论上不会发生进一步的重组, 因而遗传上比较稳定。此项研究为利用基因工程手段进行菌株改造, 充分利用聚酮途径的生物合成潜力, 提高目标产物的产量提供一种可行依据。

### REFERENCES

- [1] Burg RW, Miller BM, Baker EE, *et al.* Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organisms and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979, **15**: 361–367.
- [2] Ikeda H, Omura S. Genetic aspects of the selective production of useful components in the avermectin producer *Streptomyces avermitilis*. *Actinomycetol*, 1993, **7**: 133–144.
- [3] Ikeda H, Omura S. Avermectin biosynthesis. *Chem Rev*, 1997, **97**: 2591–2609.
- [4] Cane DE, liang TC, kaplan K, *et al.* Biosynthetic origin of the carbon skeleton and oxygen atoms of the avermectins. *J Am Chem Soc*, 1983, **105**: 4110–4112.
- [5] Schulman MD, Valentino D, Hensens DO. Biosynthesis of the avermectins by incorporation of labeled precursors. *J Antibiotics*, 1986, **39**(4): 541–549.
- [6] Yu TW, Shen Y, McDaniel R, *et al.* Engineered biosynthesis of novel polyketides from *Streptomyces* spore pigment polyketide synthases. *J Am Chem Soc*, 1998, **120**: 7749–7759.
- [7] Yu TW, Hopwood DA. Ectopic expression of the *Streptomyces coelicolor whiE* genes for polyketide spore pigment synthesis and their interaction. *Microbiology*, 1995, **141**: 2779–1791.
- [8] Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 526–31.
- [9] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Song Y, Cao GM, Chen Z, *et al.* Selection of high avermectins producing strain and identification of avermectin B1. *Chin J Biotech*, 2000, **16**(1): 31–35.  
宋渊, 曹贵明, 陈芝. 阿维菌素高产菌株的选育及阿维菌素 B1 的鉴定. *生物工程学报*, 2000, **16**(1): 31–35.
- [11] Tobias K, Bibb MJ, Mark JB, *et al.* Practical *Streptomyces* Genetic. UK: The John Innes Foundation, 2000.
- [12] Hanahan D. Studies on the transformation of *E. coli* with plasmids. *Mol Biol*, 1983, **166**: 557.
- [13] Flett F, Mersinias V, Smith CP. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **155**: 223–229.
- [14] Gust B, Kieser T, Chater KF. PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2). UK: The John Innes Foundation, 2002.
- [15] Janssen GR, Bibb MJ. Derivatives of pUC18 that have *Bgl* II sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies. *Gene*, 1993, **124**: 133.
- [16] Larson JL, Hershberger CL. The minimal replicon of a streptomycete plasmid produces an ultrahigh level of plasmid DNA. *Plasmid*, 1986, **15**: 199–209.
- [17] Katz L, Donadio S. Polyketide synthesis: Prospects for hybrid antibiotics. *Annu Rev Microbiol*, 1993, **47**: 875–912.