

多杀菌素生物合成基因簇启动子探测和转录时序

冯晓洲^{1*}, 王为善^{3*}, 任晓慧³, 刘新利¹, 毛相朝², 杨克迁³

1 山东轻工业学院食品与生物工程学院 山东省微生物工程重点实验室, 山东 济南 250353

2 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003

3 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

冯晓洲, 王为善, 任晓慧, 等. 多杀菌素生物合成基因簇启动子探测和转录时序. 生物工程学报, 2013, 29(7): 914-926.

Feng XZ, Wang WS, Ren XH, et al. Promoter detection and transcriptional analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster. Chin J Biotech, 2013, 29(7): 914-926.

摘 要: 多杀菌素是对农业虫害防治及粮食仓储安全均具有重大意义的农用抗生素。为了深入揭示刺糖多孢菌合成多杀菌素的调控特点, 首先通过建立基于报告基因的启动子探测技术, 探测了多杀菌素生物合成基因簇的 9 个启动子活性。并进一步通过荧光定量 PCR, 分析了这 9 个基因和不在基因簇内的负责糖基前体供应和鼠李糖合成的 4 个基因的转录时序, 结果表明多杀菌素生物合成基因簇内的 9 个基因在菌体生长进入稳定期时有较高的转录, 这和发酵液中此时开始大量积累多杀菌素一致; 同时还发现, 簇外的 4 个与糖基供应相关的基因和基因簇内基因的转录时序不同, 它们在菌体生长对数期有较高的转录活性, 这暗示多杀菌素聚酮链的合成速率和参与后修饰的糖基底物供应的最优化匹配有可能是提高生物合成多杀菌素的前提和关键。

关键词: 多杀菌素, 生物合成基因簇, 启动子探测, 转录时序

Received: January 10, 2013; **Accepted:** March 28, 2013

Supported by: Shandong Province Outstanding Young and Middle-aged Scientists Research Award Fund Plan (No. BS2010NY031).

Corresponding author: Keqian Yang. Tel: +86-10-64807459; E-mail: yangkq@im.ac.cn

Xiangzhao Mao. Tel: +86-532-82031360; E-mail: xzhmao@ouc.edu.cn

*These authors contributed equally to this study.

山东省优秀中青年科学家科研奖励基金计划 (No. BS2010NY031) 资助。

Promoter detection and transcriptional analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster

Xiaozhou Feng^{1*}, Weishan Wang^{3*}, Xiaohui Ren³, Xinli Liu¹, Xiangzhao Mao²,
and Keqian Yang³

¹ Shandong Provincial Key Laboratory of Microbial Engineering, School of Food and Bioengineering, Jinan 250353, Shandong, China

² Ocean University of China, College of Food Science and Engineering, Qingdao 266003, Shandong, China

³ State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Spinosad represents a new class of insecticides produced by *Saccharopolyspora spinosa*. To understand the transcription of the spinosad biosynthetic gene cluster, two promoter detection plasmids based on different reporter genes were constructed and used to detect 9 promoters in the spinosad biosynthetic gene cluster. In addition, the temporal transcriptional profiles of the corresponding genes controlled by the 9 promoters, together with 4 genes outside of the spinosad cluster but are required for the synthesis of sugars in spinosad, were examined by real-time PCR. The results indicate that the 9 spinosad biosynthetic genes were highly expressed at the stationary phase, which coincides with the accumulation of spinosad in the fermentation broth. Of particular note is that the transcription of the 4 sugar synthetic genes showed higher level at the exponential phase, suggesting the expression of sugar synthetic genes is not correlated with the spinosad synthetic genes. The data suggest that spinosad biosynthesis could be improved by engineering the expression pattern of the sugar synthetic genes that lie outside the spinosad gene cluster.

Keywords: spinosad, biosynthetic gene cluster, promoter detection, transcription profile

多杀菌素 (Spinosad) 是由土壤放线菌刺糖多孢菌 *Saccharopolyspora spinosa* 产生的一类具有触杀及摄食毒性的新型大环内酯类农用抗生素^[1-2], 其结构式如图 1 所示。因其具有杀虫广谱高效, 对人、非靶标动物和环境极为安全, 在环境中快速降解等优点^[3-4], 于 1999 年获得美国总统绿色化学品挑战奖 (Presidential Green Chemistry Challenge Award)^[5]。多杀菌素能有效防治多种害虫, 用药量极少, 持效期长, 且没有交叉抗性^[6-8], 当浓度为 1 mg/L 时就能有效地保护谷物至少 4 个月, 被认为是一种极具前景的绿色杀虫防护剂^[9]。2005 年, 美国环保局 (United States Environmental Protection Agency) 批准将多杀菌素作为储粮防护剂。2008 年, 欧盟批准多

杀菌素可在有机作物上使用, 多杀菌素已成为目前国际上最具有发展前景的生物杀虫剂。多杀菌素的开发也是杀虫剂研究开发史上最为成功的范例之一。目前, 多杀菌素主要由美国陶氏益农公司 (Dow Agrosciences Company) 生产, 国内市场上销售的多杀菌素产品全部为美国进口。我国对多杀菌素的研究还处于实验室阶段, 尚无工业化生产的相关报道。因此我国急需加大对多杀菌素生物合成的相关研究。

国外的前期研究已经阐明了多杀菌素部分生物合成基因的功能, 并且其应用研究的成果均已申请了专利保护。多杀菌素生物合成共涉及 23 个基因, 这些基因大部分组织成簇排列在长约 80 kb 的基因簇中, 其基因簇包括 I 型聚酮合成

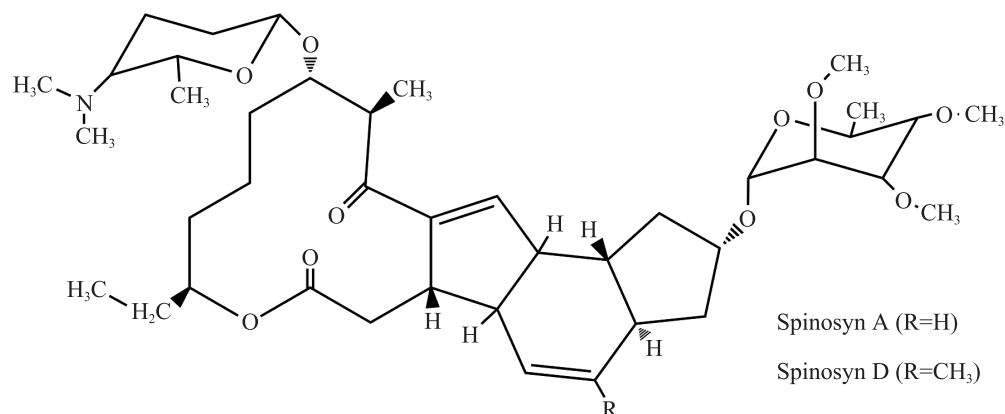


图 1 多杀菌素结构式^[11-21] (多杀菌素 A (R=H), 多杀菌素 D (R=CH₃))

Fig. 1 The structure of spinosad^[11-21]. Spinosyn A (R=H); spinosyn D (R=CH₃).

酶 (PKS) 的 1 个装载模件和 10 个延伸模件, 这些模件的基因按顺序头尾相连, 分属 5 个同一转录方向的开放阅读框 *spnA*、*spnB*、*spnC*、*spnD*、*spnE*^[10]; 聚酮链分子内交联基因 *spnF*、*spnL* 和 *spnM*; 鼠李糖后修饰相关基因和福乐糖胺后修饰相关基因^[10-12]。但是, NDP-鼠李糖合成基因不在这一基因簇中^[13]。至今尚未有多杀菌素生物合成调控相关基因的报道, 对多杀菌素生物合成基因簇的几个侧翼基因 (ORF-L15、ORF-L16、ORF-R1 和 ORF-R2) 进行了序列比对和研究, 最终发现这些基因与多杀菌素生物合成无关^[10-11]。

Madduri 等^[14]将同时带有 *gtt*、*gdh* 和 *kre* 基因的质粒转化、整合到菌刺糖多孢菌染色体基因组中, 重组菌株多杀菌素的产量提高了近 3 倍, 另外, 迄今为止已从菌刺糖多孢菌培养液中分离出 20 多种多杀菌素组分, 但多杀菌素的杀虫活性几乎都是由 spinosyn A 和 spinosyn D 组分产生, 因此可以通过抑制多杀菌素次要组分的合成有可能提高 spinosad 的产量^[15]。Jin 等^[16]采用循

环诱变和理性化定向筛选方法选育菌刺糖多孢菌, 成功筛选到抗鼠李糖、抗多杀菌素、抗 2-脱氧葡萄糖的突变菌株。Sheehan 等^[17]将刺糖多孢菌 PKS 起始模件替换, 构建的杂合 PKS 通过同源重组整合到刺糖多孢菌染色体上, 发酵工程菌得到了多杀菌素的衍生物, 进一步在工程菌发酵培养基中补加不同羧酸底物获得了具有新的杀虫活性的多杀菌素组分, 说明应用组合生物学方法合成多杀菌素新衍生物是一条切实可行的途径。

对多杀菌素生物合成调控和代谢的全面认识, 是指理性改造其生物合成的前提。本实验室对生物合成调控的关键位点进行了分析, 并提出用合成生物学手段组装多杀菌素细胞工厂的策略^[18], 另外朱宝利等^[19]将刺糖多孢菌合成多杀菌素的基因组测序, 进一步为多杀菌素生物合成改造提供便利。本研究旨在对多杀菌素生物合成基因簇的启动子的分布情况及其转录时序特征进行深入分析。由于刺糖多孢菌的遗传操作存在困难, 本研究首先建立了基于异源宿主的启动子

探测技术,对刺糖多孢菌的基因簇的一些区域进行启动子探测,确定了基因簇中的一些关键基因启动子区域;接着对这些启动子的转录时序进行了系统分析。通过以上研究,本工作首次探测发现了多杀菌素生物合成基因簇的9个启动子,并进一步通过转录时序分析发现多杀菌素生物合成转录表达与后修饰底物鼠李糖的供应的基因转录水平存在不匹配。本研究为对后续多杀菌素生物合成调控的研究提供了思路,也为我们正在进行的合成生物学设计多杀菌素生物合成模块

提供了依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

刺糖多孢菌 *Saccharopolyspora spinosa* NRRL18395 购于 NRRL 菌保中心;变铅青链霉菌 *Streptomyces lividans* TK24, 大肠杆菌 JM109、ET12567/pUZ8002 为本实验室保存。

1.2 质粒与引物

文章所用质粒见表1,引物见表2。

表1 质粒特征描述及其来源

Table 1 Plasmids used in this study, characteristics and sources

Plasmids	Description	Source or reference
pSET152	Apr ^r ; <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> shuttle vector capable of integration into <i>Streptomyces</i>	[20]
pSneo	Apr ^r ; insert <i>neo</i> in pSET152	This work
pUC119-kmR	Amplify <i>neo</i> gene	[21]
pIJ4083	Amplify <i>xylE</i> gene	[22]
pSxylE	Apr ^r ; insert <i>xylE</i> in pSET152	This work
pSneo-PspnA	Insert the promoter of <i>spnA</i> in pSneo, upstream of <i>neo</i>	This work
pSneo-PspnP	Insert the promoter of <i>spnP</i> in pSneo, upstream of <i>neo</i>	This work
pSneo-PspnQ	Insert the promoter of <i>spnQ</i> in pSneo, upstream of <i>neo</i>	This work
pSxylE-PspnA	Insert the promoter of <i>spnA</i> in pSxylE, upstream of <i>xylE</i>	This work
pSxylE-PspnP	Insert the promoter of <i>spnP</i> in pSxylE, upstream of <i>xylE</i>	This work
pSxylE-PspnQ	Insert the promoter of <i>spnQ</i> in pSxylE, upstream of <i>xylE</i>	This work
pSxylE-PspnG	Insert the promoter of <i>spnG</i> in pSxylE, upstream of <i>xylE</i>	This work
pSxylE-PspnF	Insert the promoter of <i>spnF</i> in pSxylE, upstream of <i>xylE</i>	This work
pSxylE-PspnM	Insert the promoter of <i>spnF</i> in pSxylE, upstream of <i>xylE</i>	This work
pSxylE-PspnO	Insert the promoter of <i>spnO</i> in pSxylE, upstream of <i>xylE</i>	This work
pSxylE-PspnL	Insert the promoter of <i>spnL</i> in pSxylE, upstream of <i>xylE</i>	This work
pSxylE-PspnK	Insert the promoter of <i>spnK</i> in pSxylE, upstream of <i>xylE</i>	This work
pSxylE-PspnJ	Insert the promoter of <i>spnJ</i> in pSxylE, upstream of <i>xylE</i>	This work
SxylE-PspnI	Insert the promoter of <i>spnI</i> in pSxylE, upstream of <i>xylE</i>	This work

表 2 引物序列及其用途

Table 2 Primers and their sequences used in this study

Primers	Primer sequence (5'–3')	Restriction sites
neo-F	ATCTAAGTAGCTGATGAGTTGAAGAGGTGACGTCATGATTGAACAAG ATGGATTGC	
neo-R	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG	
xyle-F	ATCTAAGTAGCTGATGAGTTGAAGAGGTGACGTCATGAACAAAGGTG TAATGCCGAC	
xyle-R	TTACGAATTCTCAGGTCAGCACGGTC	<i>EcoR</i> I
PspnA-F	ACAGAGCGGCCCGCCACGACATGGGCTATGC	<i>Not</i> I
PspnA-R	ACAGAGCGGCCCGCGGTGATGGCGTCCGTTCC	<i>Not</i> I
PspnPQ-F	ACAGAGCGGCCCGCTAGCGGTAGCGCAAGTGTC	<i>Not</i> I
PspnPQ-R	ACAGAGCGGCCCGCAACAGGACACGCATGAACTC	<i>Not</i> I
PspnGF-F	ACAGAGCGGCCCGCGACCTCGTGCCCGGATG	<i>Not</i> I
PspnGF-R	ACAGAGCGGCCCGCTGGTGGATGGCGCAGGG	<i>Not</i> I
PspnM-F	ACAGAGCGGCCCGCGCCAAGGGCGGAGTTGGACCGGT	<i>Not</i> I
PspnM-R	ACAGAGCGGCCCGCGCTGATCGCCGCGGTTGCGGAA	<i>Not</i> I
PspnO-F	ACAGAGCGGCCCGCTCTGATGGCCATCCGTGAGCAAC	<i>Not</i> I
PspnO-R	ACAGAGCGGCCCGCGCCCAATCCCTCACTGCCGTGA	<i>Not</i> I
PspnJI-F	ACAGAGCGGCCCGCGGGTTCGACGATTCATGGGTGC	<i>Not</i> I
PspnJI-R	ACAGAGCGGCCCGCACGAGTTCGTGACGATGGCGT	<i>Not</i> I
PspnK-F	ACAGAGCGGCCCGCGTGATGAGCTCCTCATGGCTG	<i>Not</i> I
PspnK-R	ACAGAGCGGCCCGCCATCAACTACCCGGACACCGAC	<i>Not</i> I
spnA-F	GACCACTCGATCCGCGCTAC	qPCR
spnA-R	GAAGTCGCGCCGTGGCAC	qPCR
spnP-F	TGATTCTTGGCATGCTTCCCG	qPCR
spnP-R	AAGAAGTGCGAACTCGCCGG	qPCR
spnQ-F	CCGGTCAACACGCAGCCAC	qPCR
spnQ-R	GACGGCTGACCGGAACCTT	qPCR
spnG-F	ATGCGCCGCTTCCGTTGTA	qPCR
spnG-R	CCCACTCCCGAGCTCATCCT	qPCR
spnF-F	GACCGGCTCACCGACCTTG	qPCR
spnF-R	GGTGATGCCGGTGATCTGGA	qPCR
spnJ-F	GGATCCGTGCCGTCCAGGT	qPCR
spnJ-R	CCTGAATCCACGCAACTCGG	qPCR
spnM-F	GTTCAGGTGCGTAGGTGGG	qPCR

续表 2

spnM-R	CAACGGCTACCGGGCTCC	qPCR
spnO-F	GAGCAGTTCTGTCTGAAGCTGAG	qPCR
spnO-R	TCAGCGCAGAGTCGACGAAC	qPCR
gtt-F	GTGAAGGGGATCGTGCTGGC	qPCR
gtt-R	CAGCGGGTAGTAGATCATCGGC	qPCR
gdh-F	CTGGTAGGGCCCGTAGTTGTTG	qPCR
gdh-R	AGCCGAATCCCCGTA CTG	qPCR
epi-F	GTGCATACGAGTTCACCCCGA	qPCR
epi-R	GTGGTTGGTCTGCGCGACTC	qPCR
kre-F	GGACAGGACCGAGTAGGCCG	qPCR
kre-R	ACCTGGTACGAGTTCGCGCG	qPCR
sigA-F	CTCTACCTCAAGCAGATCGGCA	qPCR
sigA-R	CATCTGGGTGGTCAGCTGCTC	qPCR

1.3 工具酶与化学试剂

T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购于 NEB 公司；荧光定量分析试剂购自 Life Technology (ABI) 公司；普通质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购于天根公司。

卡那霉素、安普霉素购自 AMRESCO 公司；其他试剂均为国产分析纯产品。

1.4 培养基及培养条件

大肠杆菌培养基 LB，变铅青链霉菌 TK24 固体培养基为 MS 培养基^[23]。

刺糖多孢菌固体培养基为 SGC (玉米淀粉, 2.0 g/L; 葡萄糖, 0.5 g/L; 酵母抽提物, 0.3 g/L; 玉米浆, 1.0 g/L; 琼脂 2.0 g/L), 刺糖多孢菌种子培养基为: 葡萄糖 0.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, 酵母膏 0.3 g/L, 胰蛋白营养液 (胰蛋白胨 1.7 g/L, NaCl 0.5 g/L, K₂HPO₄ 0.25 g/L, 葡萄糖 0.25%)。重组链霉菌菌株在培养基上使用的

安普霉素终浓度为 25 μg/mL。

1.5 质粒构建

无启动子探测质粒 pSneo: 以质粒 pUC119-kmR 为模板, 用引物 neo-F 和 neo-R 扩增卡那抗性基因, 经 *EcoR* I 酶切后, 插入 pSET152 的 *EcoR* I 和 *EcoR* V 位点。

无启动子探测质粒 pSxylE: 以质粒 pIJ4083 为模板, 用引物 xylE-F 和 xylE-R 扩增 *xylE* 基因, 插入 pSET152 的 *EcoR* V 位点, 然后筛选正向插入克隆。

不同启动子探测质粒的构建: 以刺糖多孢菌 NRRL18395 基因组为模板, 用表 2 引物分别扩增多杀菌素生物合成基因簇的各个启动子, 然后经 *Not* I 酶切后, 插入 pSneo 或者 pSxylE, 然后筛选正确插入克隆; 其中, 双向启动子分别筛选正反两个方向的克隆, 最终得到不同启动子探测质粒 pSneo-PspnA, pSneo-PspnP, pSneo-PspnQ, pSxylE-PspnA, pSxylE-PspnP, pSxylE-PspnQ,

pSxylE-PspnG, pSxylE-PspnF, pSxylE-PspnM, pSxylE-PspnO, pSxylE-PspnL, pSxylE-PspnK, pSxylE-PspnJ 和 pSxylE-PspnI。

1.6 抗性梯度比较

通过接合转移的方法将构建好的启动子探测质粒转入变铅青链霉菌 TK24 中, 然后在含有不同卡那霉素浓度 (100~1 000 $\mu\text{g/mL}$) 的 MS 固体平板上培养重组菌, 从而实现卡那霉素抗性表达情况监测。将平板在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 d 观察结果。

1.7 菌丝干重测定方法

细胞干重采用如下方法计算: 10 mL 发酵液 10 000 r/min 离心 10 min, 菌体沉淀用去离子水清洗 1 次, 然后在 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 48 h, 干物质用天平称量, 折算成每升的质量。

1.8 xylE 显色法比较启动子活性

方法同文献[24], 取 5 mL 发酵液, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 菌体用蒸馏水洗 1 次, 重悬于 5 mL 冰冷的 PEA 缓冲液中; 细胞悬浮液置冰上超声破碎 (4 \times 15 s, 间隔 30 s); 加入 Triton X-100 到终浓度 0.1% (V/V), 10 000 r/min 低温离心 5 min; 将上清转入另一个离心管, 冰上放置; 取 20 μL 粗提液加入到 1 mL 检测液 (含 0.2 mmol/L 邻苯二酚, 之前需 30 $^{\circ}\text{C}$ 预热) 中并立即混匀; 30 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min 后立即用分光光度计 (岛津 BioSpec-mini) 检测反应液在 375 nm 处的光吸收。xylE 相对活性计算方法: 样品 xylE 活性= A_{375}/mL , 突变株发酵液 xylE 活性除以出发菌株的活性, 即得突变株 xylE 的相对活性。

1.9 链霉菌 RNA 的制备

刺糖多孢菌总 RNA 的提取方法同文献[25],

提取的总 RNA 经 RNase-free Dnase (Promega 公司) 消化残留的基因组 DNA, 并通过 PCR 验证其残留情况。

1.10 多杀菌素的提取

取 5.0 mL 发酵液, 加入 5.0 mL 甲醇, 充分振荡, 超声波处理 15 min, 室温下萃取 12 h; 8 000 r/min 离心 10 min; 取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取 1 mL 冷冻离心干燥, 重新溶解于 100 μL 甲醇进行 HPLC 检测。HPLC 检测条件: 色谱柱: YMC 普通反相 C18 柱 (250 mm \times 4.6 mm); 流动相: 甲醇: 乙腈: 水=40: 55: 5 (含 0.05% 的乙酸铵); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测器波长: 246 nm; 进样量: 20 μL (色谱仪配套定量环为 20 μL); 流速: 1 mL/min。

1.11 荧光定量 PCR 分析

2 μg RNA 样品用于 cDNA 单链的反转录, 反转录酶用 SuperScript III (Invitrogen 公司), 方法同说明书。

荧光定量 PCR 仪器选用 ABI 7500, 试剂选用 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 公司)。参数设置如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 接着 40 个两步扩增循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s 退火和延伸)。结果分析用 ABI7500 software v2.0.1, 内参基因选用刺糖多孢菌主要 sigma 因子 sigA。

2 结果与分析

2.1 启动子探测质粒的构建

为了探测刺糖多孢菌中多杀菌素生物合成基因簇的各启动子的位置和相对活性, 本工作首先构建了启动子探测质粒, 报告基因分别选用了

卡那霉素抗性基因 *neo* 和邻苯二酚双加氧酶基因 *xyIE* 基因为报告基因, 构建了 2 个启动子探测质粒。如图 2 所示, 构建的 2 个启动子探测质粒选用质粒骨架为 pSET152。pSET152 能够方便地通过结合转移整合到链霉菌基因组的 *attB* 位点; 另外, 由于多杀菌素生物合成基因簇内存在几个双向启动子, 本工作克隆的启动子长度有些已延伸到结构基因的 ORF 内部, 为了避免结构基因 ORF 翻译对报告基因的影响, 在报告基因的上游插入了三联终止密码子 (Tri stop codon), 来终止结构基因 ORF 的翻译; 同时为了比较各启动子的相对活性, 本工作在报告基因和三联终止密码子之间插入了相同的核糖体结合位点。三联终止密码子和 RBS 序列通过设计到报告基因的上游引物

的 5'端来实现。

2.2 多杀菌素生物合成基因簇启动子探测

刺糖多孢菌中, 多杀菌素生物合成基因簇排布^[8]如图 3 所示, 在整个簇中, 5 个 I 型聚酮链合成 ORF 同方向紧密排列; 而其他大环内酯内部交联基因和后修饰基因散乱排布, 且方向不同。因此, 本工作重点探测了这些散乱排布的基因的启动子。

由于对刺糖多孢菌的遗传操作存在困难, 本工作决定将多杀菌素生物合成基因簇的启动子连入启动子探测质粒, 转入遗传操作相对容易的变铅青链霉菌 TK24 进行活性分析。根据基因排布, 选取了多杀菌素生物合成基因簇的 *spnA*、*spnP*、*spnQ*、*spnG*、*spnF*、*spnJ*、*spnI*、*spnM*、

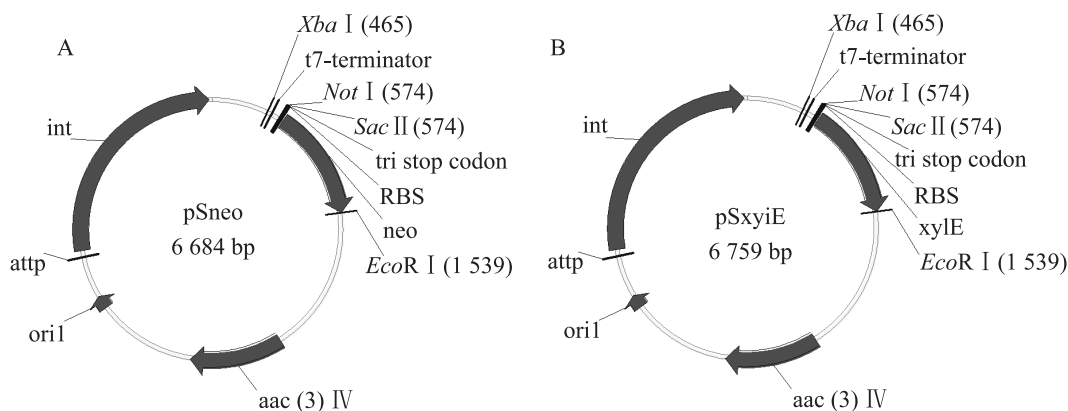


图 2 启动子探测质粒示意图

Fig. 2 Genetic maps of integrating plasmids used for promoter detection.

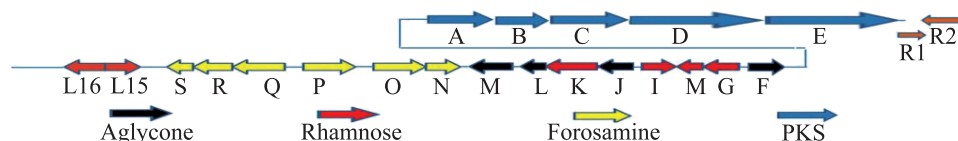


图 3 刺糖多孢菌多杀菌素生物合成基因簇

Fig. 3 Organization of spinosad biosynthetic gene cluster.

spnO 和 *spnK* 等 10 个基因启动区进行探测。首先, 将这些启动子连入 pSneo 的 *Not* I 位点, 结合转移到 TK24 菌株后进行分析发现, 这些启动子除 *spnK* 之外均有不同程度的活性, 图 4 显示了 *spnA*、*spnP* 和 *spnQ* 等启动子的相对活性, 可以看出 *spnA* 启动子的活性相对较强, *spnQ* 次之, *spnP* 在这 3 个启动子中表现最差。这一结果表明, 本工作建立的启动子探测方法能够较好地探测不同强度的启动子, 另外, 我们的工作也表明刺糖多孢菌启动子能够在变铅青链霉菌 TK24 中进行有效评价。

为了进一步量化各个启动子的相对活性, 本工作进一步将这些启动子连入质粒 pSxylE, 转化 TK24 后, 通过邻苯二酚双加氧酶活性进行量化分析。除 *spnK* 之外, 根据基因排布预测的各启动子均有活性, 这与卡那霉素抗性质粒检测的结果一致; 同时也发现, 这些启动子的活性并不相同, 其中负责聚酮链合成的第一个基因 *spnA* 的启动子活性最强, 其次为 *spnJ* 的启动子。然而,

spnJ 基因上游同向的 *spnK* 基因的上游序列用 2 个启动子探测质粒都没有发现启动子活性, 这可以判断 *spnJ* 和 *spnK* 是共转录的, 而在上游的 *spnM* 基因尽管也是和 *spnJ*、*spnK* 同向, 用双报告质粒却监测到了启动子活性, 这表明 *spnM* 应该是独立转录的, 结果如图 5 所示。

2.3 多杀菌素生物合成相关基因的转录时序分析

2.3.1 转录时序分析培养基确定

初步确定多杀菌素生物合成基因簇的启动子后, 继而进一步检测在刺糖多孢菌中这些启动子在不同生长阶段的受调控情况, 以在转录水平上确定限速启动子, 为进一步工程改造菌种奠定基础。我们发现用已经建立的种子培养——发酵两步发酵法菌体检测到多杀菌素产量比较高, 但在菌体接种发酵培养基后没有明显的生长周期; 且发酵培养基成分复杂, 不溶物质较多, 不方便取样和 RNA 提取。所以我们尝试了用种子培养基一步发酵法, 其中测定了在种子培养基中的菌

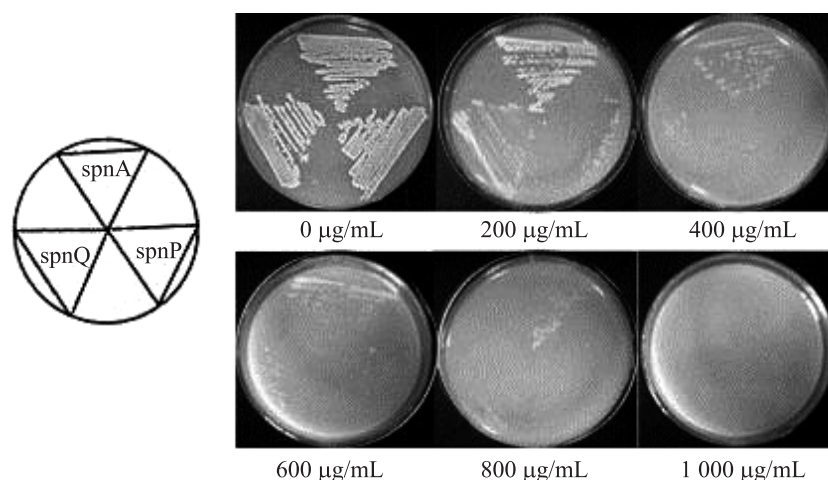


图 4 卡那抗性报告基因探测启动子活性

Fig. 4 Evaluation of promoter activities by neo reporter gene.

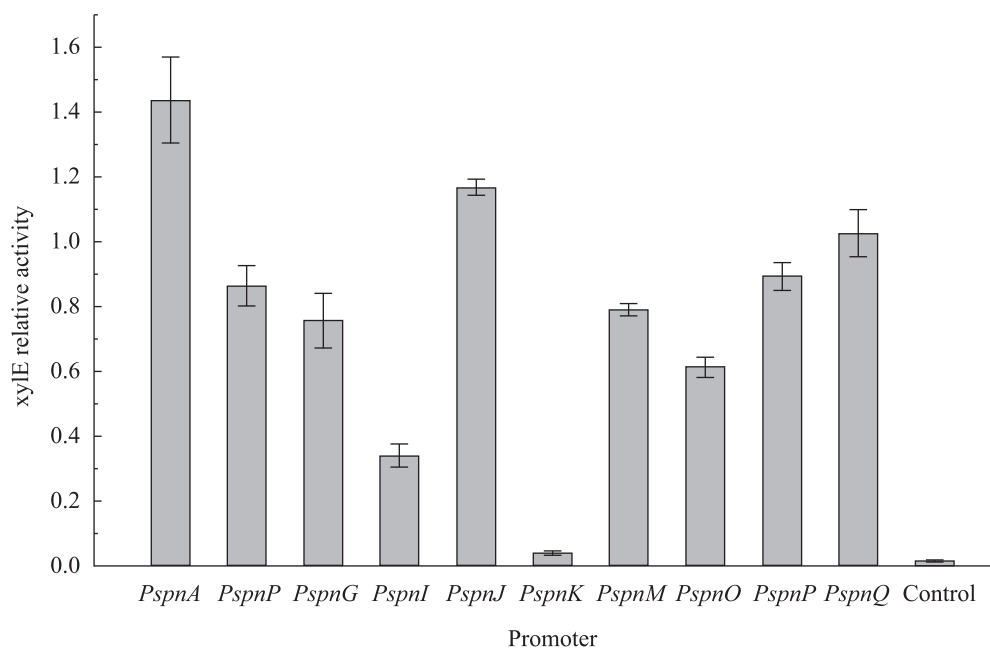


图5 xylE 报告基因探测启动子活性

Fig. 5 Evaluation of promoter activities by measuring xylE activity.

种生长和多杀菌素的产量曲线,结果表明在种子培养基中从第5天完成对数生长,而多杀菌素也正是从这个时期开始大量积累,到第7天达到最大值(图6)。

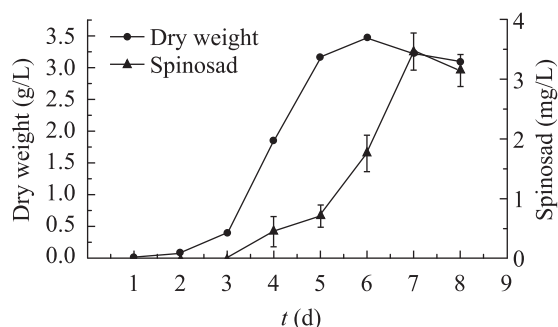


图6 多杀菌素在种子培养基中批次发酵生长与多杀菌素产量曲线

Fig. 6 Kinetic curves of growth and spinosad production in batch fermentation.

2.3.2 多杀菌素合成基因转录时序分析

根据生长曲线和多杀菌素产量曲线,本工作选取了3 d、4 d和5.5 d取样,提取RNA,通过荧光定量PCR进行相对转录时序分析,根据启动子探测的结果,共分析了 *spnA*、*spnF*、*spnG*、*spnI*、*spnJ*、*spnM*、*spnO*、*spnP* 和 *spnQ* 9个基因的相对转录时序。结果见图7A,可以发现这些基因都在菌体进入稳定期(5.5 d)时转录有明显提高,这和发酵结果一致;发酵结果表明,多杀菌素在5~7 d有明显的积累。由此可以推测,刺糖多孢菌中存在控制多杀菌素生物合成基因簇的调控因素,使整个基因簇在菌体进入稳定期时启动。

另外,多杀菌素生物合成所需的鼠李糖和福乐糖胺的合成前体是TDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖

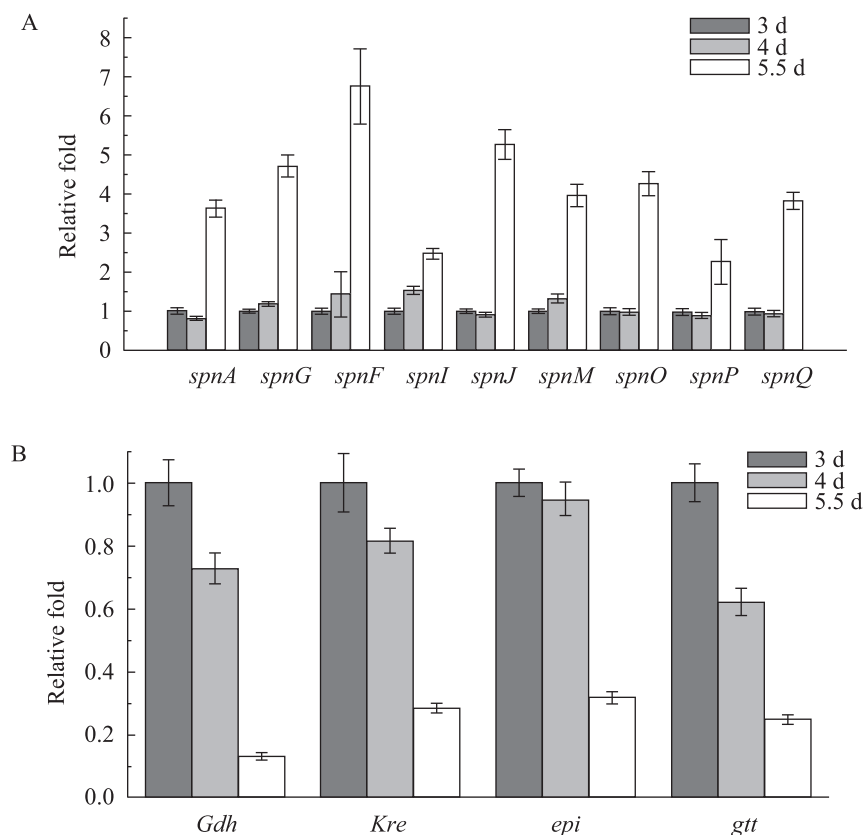


图 7 多杀菌素转录时序分析

Fig. 7 Transcriptional timing analysis of *spn* at different time points. (A) Genes in the cluster. (B) Genes out of the cluster.

糖，它同时也是其他脱氧六碳糖的生物合成的共同前体。Krishnamurthy Madduri 等^[18]发现负责合成该前体的基因和负责鼠李糖合成的基因不在多杀菌素生物合成基因簇内，这些基因为 *glt* (TDP-葡萄糖合酶)、*gdh* (4,6-葡萄糖脱水酶) *epi* (3',5'-差相异构酶) 和 *kre* (4-酮还原酶)，其中 *glt* 和 *gdh* 能够形成脱氧六碳糖的生物合成的共同前体 TDP-4-酮-6-脱氧-D-葡萄糖，*epi* 和 *kre* 负责鼠李糖的合成。我们进一步对这 4 个基因用 Real-time PCR 进行转录时序分析。结果如图 7B 所示，我们惊奇地发现这 4 个基因的转录时序与

多杀菌素生物合成完全不同，它们在对数生长期 (3~4 d) 具有较高的转录活性，而当菌体进入平台期后活性有明显降低。这表明了多杀菌素生物合成过程中糖基化后修饰的底物供应和聚酮链的合成速率不匹配可能是影响产量的关键因素。在刺糖多孢菌中，鼠李糖不仅参与多杀菌素的合成，还是合成细胞壁脂多糖的组分，细胞生长合成细胞壁需要大量的脂多糖，而刺糖多孢菌生物量的增加主要在对数期，因此我们认为刺糖多孢菌中 *epi* 和 *kre* 在对数期具有较高的转录是完全合理的。但是，这对多杀菌素的生成却是不利的，

所以我们认为通过恰当的手段来合理地适配多杀菌素生物合成过程中聚酮的合成和糖基的合成有可能显著提高其产量。

3 结论

多杀菌素是一种非常重要的农用抗生素,它毒杀害虫迅速,杀虫范围广,对保证农业生产安全具有重大的意义。然而野生刺糖多孢菌产生的多杀菌素发酵产量低,我国还没有掌握高产技术,同时刺糖多孢菌遗传操作困难,给我们的代谢工程改造造成一定的困难。

本研究首先从认识多杀菌素生物合成基因簇的启动子出发,通过构建基于报告基因 *neo* 和 *xyIE* 的启动子探测质粒,利用异源宿主变铅青链霉菌 TK24 的易操作特点,建立用于刺糖多孢菌的启动子探测技术。并进一步利用该技术,探测到了多杀菌素生物合成基因簇的 9 个基因启动子活性。为了进一步分析这些启动子的转录时序,我们通过实时荧光定量 PCR 分析了这 9 个基因的转录时序,同时还进一步分析了不在多杀菌素生物合成基因簇内的 4 个与糖基化后修饰前体供应相关基因。此外,我们还发现簇内的多杀菌素生物合成相关基因都是在菌体进入稳定期时启动,这暗示着在刺糖多孢菌中,多杀菌素的合成存在调控因素值得深入认识。我们还发现,不在多杀菌素生物合成基因簇内的 4 个糖基化后修饰前体供应基因和基因簇内基因的转录时序相反,它们在菌体生长对数期有较高的活性,这暗示了多杀菌素聚酮链的合成速率和参与后修饰的糖基底物供应的最优化匹配有可能是代谢工程提高多杀菌素产量的关键。

REFERENCES

- [1] Raymond-Delpech V, Matsuda K, Sattelle BM, et al. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci*, 2005, 5(3/4): 119–133.
- [2] Millar NS, Denholm I. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert Neurosci*, 2007, 7(1): 53–66.
- [3] Holt KM, Opit GP, Nechols JR, et al. Testing for non-target effects of spinosad on twospotted spider mites and their predator *Phytoseiulus persimilis* under greenhouse conditions. *Exp Appl Acarol*, 2006, 38(2/3): 141–149.
- [4] Cleveland CB. An ecological risk assessment for spinosad use on cotton. *Pest Manag Sci*, 2001, 58(1): 70–84.
- [5] Thompson GD. Spinosad – a case study an example from a natural products discovery programme. *Pest Manag Sci*, 2000, 56(8): 696–702.
- [6] Crouse GD, Sparks TC, Schoonover J, et al. Recent advances in the chemistry of spinosyns. *Pest Manag Sci*, 2001, 57(2): 177–185.
- [7] Sparks TC, Crouse GD, Durst G. Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure–activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest Manag Sci*, 2001, 57(10): 896–905.
- [8] Williams T, Valle J, Viñuela E. Is the naturally derived insecticide Spinosad® compatible with insect natural enemies? *Biocontrol Sci Technol*, 2003, 13(5): 459–475.
- [9] Vayias BJ, Athanassiou CG, Milonas DN, et al. Persistence and efficacy of spinosad on wheat, maize and barley grains against four major stored product pests. *Crop Protection*, 2010, 29(5): 496–505.
- [10] Hahn DR, Gustafson G, Waldron C, et al. Butenyl-spinosyns, a natural example of genetic engineering of antibiotic biosynthetic genes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33(2): 94–104.
- [11] Waldron C. A cluster of genes for the biosynthesis of spinosyns, novel macrolide insect control agents

- produced by *Saccharopolyspora spinosa*. Antonie van Leeuwenhoek, 2000, 78(3-4): 385–390
- [12] Waldron C. Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. Chem Biol, 2001, 8(5): 487–499.
- [13] Hong L, Zhao Z, Melancon CE 3rd, et al. *In vitro* characterization of the enzymes involved in TDP-D-ferosamine biosynthesis in the spinosyn pathway of *Saccharopolyspora spinosa*. J Am Chem Soc, 2008, 130(14): 4954–4967.
- [14] Madduri K, Waldron C, Merlo DJ. Rhamnose biosynthesis pathway supplies precursors for primary and secondary metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*. J Bacteriol, 2001, 183(19): 5632–5638.
- [15] Lewer P, Hahn DR, Karr LL, et al. Discovery of the butenyl-spinosyn insecticides: novel macrolides from the new bacterial strain *Saccharopolyspora pogona*. Bioorganic Med Chem, 2009, 17(12): 4185–4196.
- [16] Jin Z, Xu B, Lin S, et al. Enhanced production of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* by genome shuffling. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 159(3): 655–663.
- [17] Sheehan LS, Lill RE, Wilkinson B, et al. Engineering of the spinosyn PKS: directing starter unit incorporation. J Nat Prod, 2006, 69(12): 1702–1710.
- [18] Li Y, Chang C, Yang K. The pathway of spinosad biosynthetic and the strategy to reconstruct it. Acta Microbiol Sin, 2011, 51(11): 1431–1439 (in Chinese).
- 李月, 常城, 杨克迁. 多杀菌素生物合成途径及改造策略. 微生物学报, 2011, 51(11): 1431–1439.
- [19] Pan Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.. Gene, 1992, 116(1): 43–49.
- [20] Liu G, Tian Y, Yang H, et al. A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development. Mol Microbiol, 2005, 55(6): 1855–1866.
- [21] Clayton TM. Streptomyces promoter-probe plasmids that utilise the xylE gene of *Pseudomonas putide*. Nucl Acid Res, 1990, 18(4): 1077.
- [22] Neugebauer E, Gamache B, Déry CV, et al. Chitinolytic properties of *Streptomyces lividans*. Arch Microbiol, 1991, 156(3): 192–197.
- [23] Xiang SH, Li J, Yin H, et al. Application of a double-reporter-guided mutant selection method to improve clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. Metab Eng, 2009, 11(4/5): 310–318.
- [24] Wang J, Wang W, Wang L, et al. A novel role of 'pseudo'gamma-butyrolactone receptors in controlling gamma-butyrolactone biosynthesis in *Streptomyces*. Mol Microbiol, 2011, 82(1): 236–250.

(本文责编 郝丽芳)