

研究报告



高产洛蒙真菌素洛蒙德链霉菌高通量筛选方法的建立与复合育种

金鸣 王威 张雪洪*

上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

摘要:【背景】洛蒙德链霉菌 S015 能生物合成具有广谱抗菌活性的吩嗪类化合物洛蒙真菌素。【目的】因 S015 菌株的洛蒙真菌素产量较低, 将 S015 菌株经复合诱变育种和基因工程改造, 提高洛蒙真菌素产量。【方法】建立洛蒙真菌素产生菌的高通量筛选方法, 对出发菌株 S015 进行常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)技术和紫外复合诱变, 筛选得到高产菌株; 并在高产菌株上敲除洛蒙真菌素的前体分支酸竞争途径中的关键基因 *trpE1*、*trpE2*, 再过表达全局调控基因 *afsR*。【结果】利用洛蒙真菌素在紫外波长 375 nm 处的特征吸收峰, 以及洛蒙真菌素浓度和 375 nm 处吸光度值的正相关关系, 建立了基于 24 孔深孔板发酵和酶标仪快速检测的高通量筛选方法。经过 6 轮 ARTP 和紫外复合诱变及高通量筛选, 从 4 320 株突变株中筛选得到遗传稳定的高产菌株 M6, 其洛蒙真菌素的产量为 61.33 mg/L, 是 S015 菌株的 7.35 倍; M6 菌株的分支途径基因 *trpE1*、*trpE2* 双敲除的洛蒙真菌素产量为 81.89 mg/L, 是 S015 菌株的 9.82 倍; 在该基因工程菌株中过表达全局调控基因 *afsR*, 产量为 109.53 mg/L, 是 S015 菌株的 13.13 倍。【结论】建立的高通量筛选方法可以有效筛选高产洛蒙真菌素的突变株, 并且操作简单快速。通过 ARTP 和紫外复合诱变, 结合高产株 M6 的基因工程改造, 能进一步提升洛蒙真菌素的产量。

关键词: 洛蒙德链霉菌, 洛蒙真菌素, 高通量筛选, 复合诱变, 基因工程

High throughput screening and combined breeding of *Streptomyces lomondensis* for high production of lomofungin

JIN Ming WANG Wei ZHANG Xue-Hong*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] Lomofungin, a phenazine compound with broad-spectrum antibacterial activity, can be biosynthesized by *Streptomyces lomondensis* S015. [Objective] Due to the low production of lomofungin in S015, this study aims to enhance its production by combined mutation breeding and genetic engineering. [Methods] A high throughput screening method was established to analyze the production of lomofungin of mutants, and the lomofungin high-production strains were screened after atmospheric and room temperature plasma (ARTP) technology and ultraviolet (UV) combined mutation breeding based on the starting strain S015. Then, *trpE1* and

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31670033)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34204854; E-mail: xuehzhong@sjtu.edu.cn

Received: 08-04-2019; Accepted: 17-05-2019; Published online: 10-06-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31670033)

*通信作者: Tel: 021-34204854; E-mail: xuehzhong@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2019-04-08; 接受日期: 2019-05-17; 网络首发日期: 2019-06-10

trpE2 genes which are key genes in chorismate-competing pathway were knocked out in the lomofungin high-production mutant, and the global regulatory gene *afsR* was overexpressed. [Results] According to lomofungin's characterized UV absorption peak at 375 nm and the positive correlation between the concentration of lomofungin and the value of A_{375} , a high throughput screening method, which is based on 24-deep-well plate culture and microplate reader, was built successfully. After 6 rounds of ARTP and UV combined mutation breeding, strain M6, a genetically stable and high lomofungin-production strain, was screened from 4 320 mutants. Its yield of lomofungin is 61.33 mg/L, which is 7.35 times the yield of starting strain S015. After two branch pathway genes *trpE1* and *trpE2* were knocked out from strain M6, the lomofungin production increased to 81.89 mg/L, and then it increased to 109.53 mg/L when *afsR* was overexpressed, which is 13.13 times the production of S015. [Conclusion] The high throughput screening method developed in this study could efficiently analyze the production of lomofungin of mutants in a simple and fast way. Combined mutation breeding of ARTP and UV as well as genetic engineering is an effective mean to obtain high-yield strains of antibiotics.

Keywords: *Streptomyces lomondensis*, Lomofungin, High throughput screening, Combined breeding, Genetic engineering

洛蒙德链霉菌(*Streptomyces lomondensis*) S015 由本实验室从植物根际土壤中分离得到, 具有广谱抑菌活性并能生物合成洛蒙真菌素(Lomofungin)^[1]。洛蒙真菌素的化学结构为 6-醛基-4,7,9-三羟基-吩嗪-1-甲酸酯, 是一种吩嗪类的广谱抗生素, 能够抗细菌、真菌及肿瘤^[2-4], 因此在很多领域都有应用价值。

洛蒙德链霉菌 S015 生物合成洛蒙真菌素的途径与其他吩嗪类化合物的合成途径非常相似, 由分支酸经过核心吩嗪合成基因簇 *lphzBCDEFG* 以及其他一系列相关修饰基因等的作用后生成洛蒙真菌素^[4]。*afsR* 基因是链霉菌中普遍存在的一个全局调控基因, 可以调控很多次级代谢产物的合成, Wang 等^[1]的研究表明, *afsR* 基因能通过提高吩嗪合成基因 *phzC* 和 *phzE* 的表达来促进洛蒙真菌素的生物合成。在洛蒙德链霉菌的色氨酸合成途径中, 由 *trpE* 基因编码的邻氨基苯甲酸合成酶能催化分支酸与氨基反应生成邻氨基苯甲酸^[5], 因此该途径会消耗洛蒙真菌素合成所需的重要前体——分支酸。

目前高产突变株的诱变手段较多, 如常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)技术利用等离子体射流中富含的化学活性粒子直接作用于细胞遗传物质, 可引发种类丰富的 DNA 损伤, 同时具有无污染和操作安全简单的优点, 在微生物突变育种和生物医学等领域应用广泛^[6-7]。紫外(ultraviolet, UV)诱变则是最为常用的诱变手段, DNA 分子经紫外辐射后, 形成嘧啶二聚体

(cyclobutane pyrimidine dimmer, CPD)影响碱基的正常配对, 从而引起突变^[8]。微波诱变育种也是常见的育种方法, 通过微波辐射, 造成细胞内分子间的强烈摩擦, 影响 DNA 分子的空间结构^[9]。亚硝基胍(1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine, MNNG)是一种传统的化学诱变剂, 常被称作超诱变剂, 它会促使 DNA 发生烷基化反应, 导致 GC 和 AT 之间互换的突变^[10]。 γ 射线(gamma-radiation)在微生物诱变育种中有着广泛的应用, γ 射线能够直接使 DNA 分子中碱基、脱氧核糖等的化学键断裂来破坏 DNA 螺旋结构^[11]。虽然目前诱变手段丰富, 设备技术也都比较成熟, 但提高筛选效率和建立有效的高通量筛选方法至关重要。

本研究建立了针对洛蒙真菌素的高通量筛选方法, 并将其运用于 ARTP 和紫外复合诱变后的菌株筛选, 成功获得了高产菌株; 之后通过基因工程改造, 阻断了由 *trpE* 基因编码的竞争前体分支酸的途径, 并过表达全局调控基因 *afsR*, 使其产量进一步提升。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

实验所用菌株和质粒及特性见表 1, 来源为本实验室保存和本研究构建。研究所用引物委托上海桑尼生物科技有限公司进行合成, 序列见表 2。洛蒙德链霉菌 S015 为诱变出发菌株。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids involved in this study

菌株和质粒	描述	来源
Strains and Plasmids	Description	Source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	For <i>E. coli</i> transformation	TransGen Biotech
ET12567(pUZ8002)	For conjugation, Km ^R , Chl ^R	[12]
<i>Streptomyces lomondensis</i>		
S015	Wild type	Lab stock
M6	High production mutant	This study
M6 Δ <i>trpE1</i>	M6 with <i>trpE1</i> deleted	This study
M6 Δ <i>trpE2</i>	M6 with <i>trpE2</i> deleted	This study
M6 Δ <i>trpE1</i> Δ <i>trpE2</i>	M6 with <i>trpE1</i> and <i>trpE2</i> deleted	This study
Plasmids		
pKC1139	Apr ^R	[13]
pKC1139- <i>trpE1</i>	pKC1139 containing <i>trpE1</i> upstream and downstream	This study
pKC1139- <i>trpE2</i>	pKC1139 containing <i>trpE2</i> upstream and downstream	This study
pIB139- <i>afsR</i>	pIB139 containing <i>afsR</i> gene	Lab stock

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	序列	用途
Primers name	Sequence (5'→3')	Purpose
<i>trpE1</i> -UF	CTAGTCTAGACGGTGC GG TAGAAGCCGTCCT	Clone of <i>trpE1</i> upstream
<i>trpE1</i> -UR	CGCGAACTCGTAGGCCATCCA	
<i>trpE1</i> -DF	TGGATGGCCTACGAGTTCGCGGCCTCCGGCATCCCCAAG	Clone of <i>trpE1</i> downstream
<i>trpE1</i> -DR	AAATTTAAGCTTTCCTGGAGCGTGGCCTTG	
<i>trpE2</i> -UF	CTAGTCTAGAGGGGCAGTACAGGCCCGTGTA	Clone of <i>trpE2</i> upstream
<i>trpE2</i> -UR	GTCATGCACATCGTCTCGACGG	
<i>trpE2</i> -DF	CCGTCGAGACGATGTGCATGACCTTGC GGGTGACCGGGATGA	Clone of <i>trpE2</i> downstream
<i>trpE2</i> -DR	AAATTTAAGCTTTTCGAGGTGACCACCCACGG	

1.1.2 主要试剂和仪器

PrimeSTAR DNA 高保真聚合酶、限制性核酸内切酶、EasyPure Genomic DNA 快速纯化试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; 质粒提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、胶回收试剂盒, 美基生物(中国)有限公司; EasyTaq Mix DNA 聚合酶、DNA Marker, 北京全式金生物技术有限公司; 乙腈、2-丁酮、甲酸、甘露醇、氯化钠、甘油等试剂, 国药集团化学试剂有限公司; 酵母粉、蛋白胨, Oxoid 公司; 黄豆饼粉, 上海五四有限公司; 麦芽提取物, 北京索莱宝有限公司。

高效液相色谱分析仪、色谱柱, 安捷伦科技(中国)有限公司; 常压室温等离子体诱变育种仪, 北京思源清生物科技公司; 全波长酶标仪, Perkin Elmer 公司; 恒温振荡培养箱, 江苏太仓实验设

备厂; 96 孔 PP 酶标板, Greiner Bio-One 公司; 24 孔深孔板, 海门雷博尔实验器材有限公司。

1.1.3 培养基及培养条件

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, 固体培养基加入琼脂 12.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。所有大肠杆菌在 LB 培养基中 37 °C 培养。

YEME 培养基(g/L): 葡萄糖 4.0, 麦芽提取物 10.0, 酵母提取物 4.0, 0.68×10^5 Pa 灭菌 30 min。洛蒙德链霉菌的发酵在 YEME 培养基中进行, 于 28 °C 培养。

MS 培养基(g/L): 在水中加入黄豆饼粉 20.0, 煮沸 30 min 后过滤, 再加入甘露醇 20.0, 琼脂 20.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。洛蒙德链霉菌在 MS 固体平板上 28 °C 倒置培养 6–8 d 可以积累足量孢子。

2×YT 孢子预萌发培养基(g/L): 氯化钠 5.0, 酵母提取物 10.0, 胰蛋白胨 15.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

抗生素: 配制母液浓度为 50 mg/L 的硫酸安普霉素(apramycin, Apr), 50 mg/L 的卡那霉素(kanamycin, Km), 25 mg/L 的氯霉素(chloramphenicol, Chl), 40 mg/L 的萘啶酮酸(nalidixic acid)。使用时按 1/1 000 的比例加入培养基中。

本研究中洛蒙德链霉菌的培养条件与操作均参照文献[4]。

1.2 方法

1.2.1 高通量筛选及验证方法

将经诱变后在 MS 平板上生长出的单菌落全部接种于每孔含有 3 mL YEME 培养基的 24 孔深孔板中, 贴上透气封口膜后, 置于恒温振荡培养箱中于 28 °C、400 r/min 培养 60 h。吸取 24 孔板中各孔的菌液 400 μ L 于 96 孔深孔板中, 并加入每孔 400 μ L 的 2-丁酮和 2 μ L 的 6 mol/L 盐酸, 加密封膜后振荡萃取 10 min, 取每孔 200 μ L 上清液于新的 96 孔 PP 酶标板中, 使用酶标仪对 375 nm 处的吸光度值 (A_{375}) 进行检测。每一轮的诱变共筛选 720 株突变株, 从中选取 A_{375} 值最大的 10 株进行摇瓶发酵复筛, 用 HPLC 检测产物, 并将洛蒙真菌素的产量最高的菌株作为下一轮诱变的出发菌株。

1.2.2 洛蒙真菌素产量测定

发酵液的处理^[14]: 取培养了 4 d 后的发酵液 2 mL 于 5 mL 离心管中, 加入适量的 6 mol/L 盐酸调节 pH 至 2.0, 再加入 2 mL 的 2-丁酮, 充分振荡萃取 10 min 后, 以 12 000 r/min 离心 3 min, 吸尽上层有机相于干净的 1.5 mL 离心管中, 在真空旋转蒸发仪中 35 °C 蒸干后, 用 1 mL 乙腈加 1 mL 甲酸水(0.1%)充分溶解, 使用 0.22 μ m 有机相滤头过滤。

产物的 HPLC 分析^[15]: 以 0.1% 甲酸水溶液(A) 和乙腈(B)为流动相, 1–4 min, A:B=8:2; 4–20 min, A:B=6:4; 20–25 min, A:B=8:2。检测波长为 270 nm, 流速 1 mL/min, 柱温 30 °C, 使用 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱(250×4.6 mm, 5 μ m)检测洛蒙真菌素, 保留时间为 18 min 时的产物为洛蒙真菌素。

1.2.3 ARTP 和紫外复合诱变

(1) ARTP 诱变筛选

参考 Du、江耀祖等^[16-17]的 ARTP 诱变方法, 并结合 ARTP 诱变育种仪针对孢子的操作要求, 具体如下: 在超净工作台中刮取并收集 MS 平板上培养好的洛蒙德链霉菌孢子, 在光学显微镜下用血细胞计数板进行孢子浓度的测定, 然后用无菌水稀释成 10^6 – 10^8 cells/mL 的孢子悬液。打开 ARTP 诱变育种仪, 将功率设定为 100 W, 气体流量为 10 SLM, 取 10 μ L 制备好的孢子悬液涂抹于诱变用的金属载片上, 输入相应的处理时间后开始诱变。每次对菌株进行诱变之前, 先以处理时间为变量, 制作不同处理时间下的诱变致死率曲线, 确定该菌株的最佳 ARTP 诱变处理时间。致死率=(诱变前的孢子总数–诱变后存活的孢子数)/诱变前的孢子总数×100%^[17-18]。确定最佳的处理时间后, 将处理后的金属载片倒入含有 1 mL 无菌水的 1.5 mL 离心管中, 充分涡旋后用无菌水稀释 100 倍, 取 100 μ L 均匀涂布与 MS 平板上, 28 °C 培养 3 d 后, 对长出的菌落进行高通量筛选。

(2) 紫外诱变筛选

紫外诱变采取与 ARTP 诱变筛选保持一致的原则。仍然取 10 μ L 制备好的孢子悬液涂于金属载片上, 将金属载片置于 30 W 紫外灯正下方 20 cm 处, 紫外照射一定时间后, 将处理后的金属载片倒入含有 1 mL 无菌水的 1.5 mL 离心管中, 涡旋稀释 100 倍后涂布于 MS 平板上, 过程中用锡箔纸将离心管和培养的平板包裹, 以避免紫外诱变后的光修复现象。紫外诱变处理时间的确定和高产株的筛选步骤均与 ARTP 诱变筛选一致。

1.2.4 基因缺失、过表达菌株的构建

(1) 构建同源重组质粒 pKC1139-*trpE1*、pKC1139-*trpE2*

以菌株 S015 基因组为模板, 使用引物 *trpE1*-UF/*trpE1*-UR 和 *trpE1*-DF/*trpE1*-DR 分别扩增 *trpE1* 基因上、下游同源臂。PCR 反应体系: ddH₂O 8.5 μ L, DMSO 1.25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 0.75 μ L, DNA 模板 1.25 μ L, Primer STAR DNA

高保真聚合酶 12.5 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。以纯化后的 *trpE1* 基因上、下游同源臂为模板, *trpE1*-UF 和 *trpE1*-DR 为引物进行融合 PCR, 扩增 *trpE1* 基因上游同源臂与下游同源臂的融合片段。PCR 反应体系: ddH₂O 8.5 μL , DMSO 1.25 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.75 μL , DNA 模板 1.25 μL , Primer STAR DNA 高保真聚合酶 12.5 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。将融合片段纯化后与 pKC1139 质粒用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切、连接, 并转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态中。抽提质粒, 测序验证后, 将重组质粒 pKC1139-*trpE1* 转化到穿梭大肠杆菌 ET12567(pUZ8002)中。按相同步骤构建 pKC1139-*trpE2* 载体, 并转化到 ET12567 中。

(2) 接合转移、双交换突变株的筛选与验证

接合转移的受体菌为 M6, 供体菌为携带相应载体的穿梭大肠杆菌 ET12567(pUZ8002), 接合转移、双交换突变株的筛选与验证操作主要参照盛超兰等^[19]。

2 结果与分析

2.1 高通量筛选方法的建立

2.1.1 洛蒙真菌素的浓度和 A_{375} 的关系

首先将适量本实验室制备的洛蒙真菌素样品溶解于 2-丁酮中, 并用盐酸将 pH 调至 2.0, 模拟发酵液用 2-丁酮萃取后的状态, 取 200 μL 该溶液在酶标仪中进行波长为 350–420 nm 的吸光度值测定(图 1A), 发现 375 nm 处存在一个吸收峰, 所以推测 375 nm 就是洛蒙真菌素的一个特征吸收波长, 处理

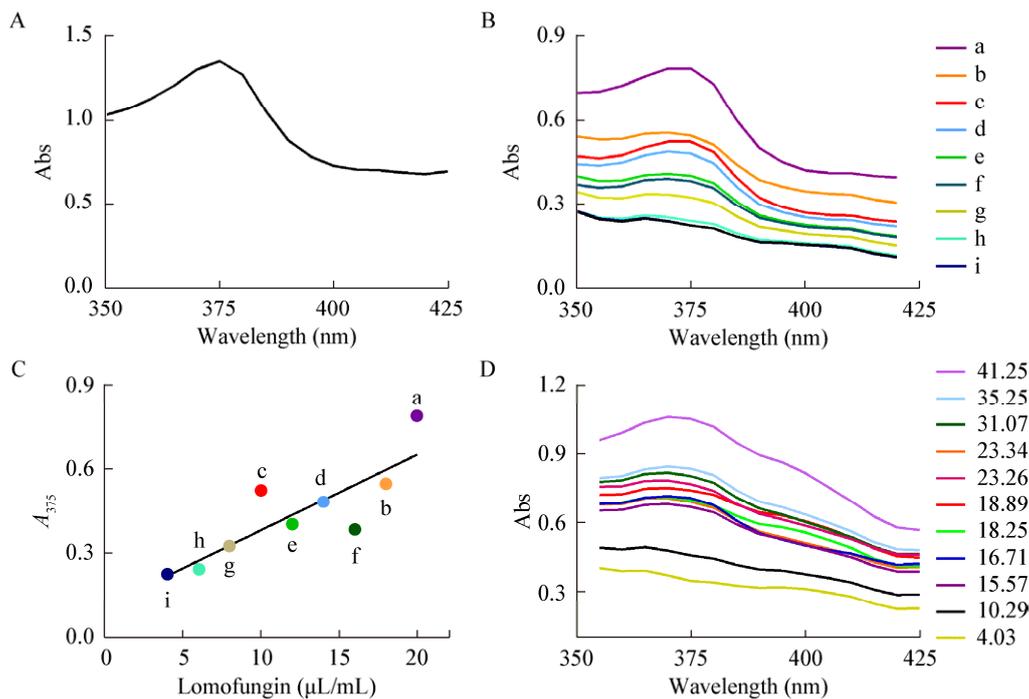


图 1 洛蒙真菌素的 2-丁酮溶液的吸光度值检测

Figure 1 Absorbance detection of lomofungin in methyl ethyl ketone

注: A: 配制的含有洛蒙真菌素样品的 2-丁酮溶液的吸光度值检测; B: 配制的 9 种不同洛蒙真菌素浓度的 2-丁酮溶液的吸光度值检测; C: 不同浓度的洛蒙真菌素溶液与 375 nm 处吸光度值的对应关系及线性拟合图; D: 11 株不同洛蒙真菌素产量的洛蒙德链霉菌的发酵液处理后上层有机相的吸光度值检测, 图例中数字为各样品的实际洛蒙真菌素浓度(mg/L)。

Note: A: Scanning of lomofungin in methyl ethyl ketone solution; B: Scanning of 9 lomofungin solution; C: Correlation between lomofungin concentration and absorbance at 375 nm; D: Scanning of methyl ethyl ketone extract from 11 samples of fermentation liquor, and the legend shows the lomofungin production (mg/L) of each sample.

后的发酵液上层有机相的 A_{375} 值一定程度上能反映其洛蒙真菌素的含量。

为验证以上猜想, 将洛蒙真菌素样品用 2-丁酮配成 9 种不同浓度的溶液后, 用酶标仪进行 350–420 nm 的吸光度值检测, 结果如图 1B 所示, 可见各曲线在 375 nm 处确实都有一明显的吸收峰, 并且满足洛蒙真菌素浓度越高则 A_{375} 值越大的规律, 说明该条件下吸光度值可以用于检测 2-丁酮溶液的洛蒙真菌素的含量。将图 1B 中的 9 种溶液的 A_{375} 和相应的洛蒙真菌素样品浓度做一散点图, 如图 1C 所示, 进行线性拟合后 $R=0.85$ 。说明 2-丁酮的酸性溶液中 A_{375} 值的大小能反映其洛蒙真菌素浓度。

为了检验实际洛蒙德链霉菌的发酵液中是否存在其他化合物干扰或掩盖发酵液萃取后的上层有机相的 A_{375} 值, 取 11 株不同洛蒙真菌素产量洛蒙德链霉菌的 4 d 后发酵液, 按 1.2.3 中的步骤处理后, 再用酶标仪对吸取的上层有机相进行 350–420 nm 的吸光度测定, 结果如图 1D 所示, 各曲线 375 nm 处都存在吸收峰, 除个别本身洛蒙真菌素浓度非常接近的结果有所差异, 整体均满足洛蒙真菌素浓度越高则 A_{375} 值越大的规律。表明实际情况下, 干扰影响可以忽略。

2.1.2 运用 A_{375} 建立高通量筛选方法

因洛蒙真菌素溶液中浓度和 A_{375} 呈良好的正相关关系, 可将洛蒙德链霉菌发酵液处理后的上层有机相的 A_{375} 值作为快速判断其洛蒙真菌素含量的标志, 运用于 ARTP、紫外诱变筛选过程中, 用 24 孔深孔板对突变株进行大批量发酵后, 按照 1.2.1 中步骤对发酵液进行批量萃取, 将上层有机相转移至 96 孔酶标板中进行 A_{375} 值的测定, A_{375} 值越高, 即代表该突变株的产量越高。

每一轮筛选过程利用 24 孔深孔板可以同时进行 720 株突变株的发酵, 使用酶标仪能以每分钟约 100 个菌株样品的速度进行检测, 在短时间内完成大量样品的分析, 并从中快速筛选出洛蒙真菌素产量较高的突变株进入复筛。

2.2 ARTP、紫外复合诱变及高产菌株筛选

2.2.1 诱变与致死率曲线

运用已建立的针对洛蒙真菌素的高通量筛选方法, 按照 1.2.1 中的步骤及操作要求进行 ARTP 和紫外复合诱变及筛选。按照 ARTP 诱变 2 轮紫外诱变 2 轮, 最后再 ARTP 诱变 2 轮的顺序进行。每一轮诱变以上一轮诱变的最高产突变株为出发菌株, 筛选 720 株突变株, 分 3 批进行, 每一批共培养 240 株突变株, 以 24 株出发菌株作参照。

根据文献[17-18]报道及本实验室前期研究, 诱变过程中将致死率保持在 70%–80% 可以获得较高的正突变率。由于诱变轮次较多, 以第一轮 ARTP 诱变的致死率曲线和第一批筛选为例, 如图 2A

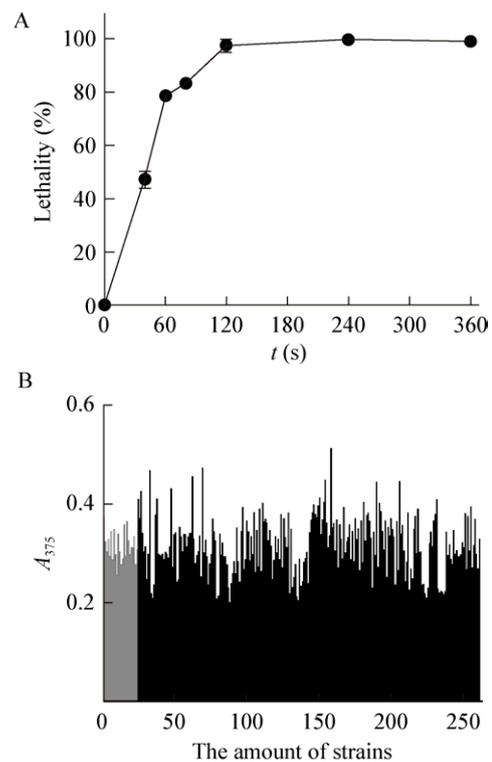


图 2 致死率曲线和高产菌株筛选

Figure 2 Lethality curve and screening for high-production strains

注: A: S015 菌株的 ARTP 诱变致死率曲线; B: 第 1 批的 ARTP 诱变后 A_{375} 检测结果, 包含 24 个 S015 菌株(灰色)和 240 个突变株(黑色)。

Note: A: Lethality curve of S015 by ARTP mutation; B: A_{375} of mutants in 1st round ARTP mutation breeding, including 24 S015 strains (gray) and 240 mutant strains (black).

所示, 选取 60 s 作为 S015 菌株的 ARTP 诱变处理时间, 致死率为 79%。确定处理时间后, 将诱变后的菌株和这一轮的出发菌株 S015 接种于 24 孔深孔板中进行发酵, 将发酵液处理用酶标仪检测 A_{375} 值, 如图 2B 所示, 选取 A_{375} 值最高的若干菌株进行摇瓶发酵复筛。

共经历了 6 轮 ARTP 和紫外复合诱变后, 累计筛选了 4 320 株突变株。1-6 轮诱变后筛选得到的最高产菌株分别为 M1、M2、M3、M4、M5 和 M6。最终得到的高产株 M6 的洛蒙真菌素产量为 61.33 mg/L, 是出发菌株洛蒙德链霉菌 S015 的 7.35 倍, 如图 3 所示。在 ARTP 和紫外的交替诱变下, 从野生株出发筛选获得的菌株其洛蒙真菌素产量逐步提升, 说明了 ARTP 和紫外的复合诱变效果良好, 并且也验证了本研究建立的高通量筛选高产洛蒙真菌素菌株的方法切实可行, 并且快速高效, 为实验节约了大量时间。

2.2.2 菌株稳定性检验

获得了高产株 M6 之后, 不断将其在 MS 平板上进行划线, 传代培养, 每隔 2 d 传代一次, 传代 30 次后对其进行发酵并通过 HPLC 进行洛蒙真菌素产量的检测。结果如图 4 所示, 连续传代 30 次后, M6 菌株仍能保持生长的稳定性, 菌落形态与 S015 相比无明显差异, 并且洛蒙真菌素的产量仍能维持在 60 mg/L 左右的水平, 可见 M6 菌株稳定性良好。

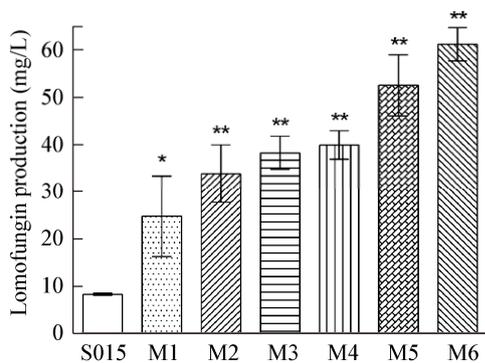


图 3 S015 和 M1-M6 的洛蒙真菌素产量

Figure 3 Lomofungin production of S015 and strain M1-M6

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

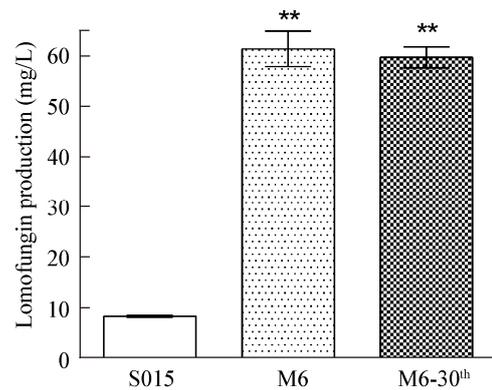


图 4 S015、M6 和传代 30 次 M6 的洛蒙真菌素产量

Figure 4 Lomofungin production of S015, M6 and M6-30th

Note: **: $P < 0.01$.

2.3 高产菌株 M6 的基因工程改造

色氨酸合成途径中, *trpE* 基因编码的邻氨基苯甲酸合成酶能催化分支酸与氨基反应生成邻氨基苯甲酸^[5], 该反应会消耗洛蒙真菌素合成所需的重要前体分支酸, 因此推测将 *trpE* 基因敲除可以阻断该途径, 可能会使高产株 M6 在生长过程中积累更多的洛蒙真菌素合成前体分支酸, 从而合成更多的洛蒙真菌素。在本实验的前期工作中, 已经对洛蒙链霉菌 S015 进行了全基因组测序^[4], 其结果显示, S015 菌株中存在 2 个功能相同的 *trpE* 基因序列, 为作区分, 分别将其命名为 *trpE1* 和 *trpE2*。对 M6 的 *trpE1* 和 *trpE2* 进行测序, 发现未在诱变中发生碱基变化。

前期研究表明, 在洛蒙链霉菌 S015 中, 全局调控基因 *afsR* 能通过提高吩嗪合成基因 *phzC* 和 *phzE* 的表达来促进洛蒙真菌素的生物合成。在突变株 M6 的基础上进行 *afsR* 基因的过表达, 验证该调控机制在诱变后的菌株中是否依然可行。

2.3.1 高产菌株 M6 中 *trpE1*、*trpE2* 基因的敲除

在 *trpE1* 基因上、下游设计了长度为 1 670 bp 的上游同源臂和 1 544 bp 的下游同源臂, 同源臂融合片段长度为 3 214 bp, 预计敲除片段长度为 759 bp。按 1.2.2 中步骤对 M6 菌株的 *trpE1* 进行敲除, 以 *trpE1*-UF 和 *trpE1*-DR 为引物, 对筛选到的双交换株的基因组进行 PCR 验证, 预计 M6 菌株的

PCR 扩增条带为 3 952 bp, *trpE1* 缺失菌株的 PCR 扩增条带为 3 214 bp, PCR 验证结果如图 5A 所示, 与预期相符, 然后将样品送公司测序, 比对正确则表明 *trpE1* 基因敲除成功。

同理, 在 *trpE2* 基因上、下游设计了长度为 1 689 bp 的上游同源臂和 1 573 bp 的下游同源臂, 同源臂融合片段长度为 3 262 bp, 预计敲除片段长度为 1 044 bp。从 M6 的 *trpE1* 基因敲除株出发, 进一步敲除 *trpE2* 基因, 出发菌株的 PCR 扩增条带为 4 306 bp, *trpE2* 缺失菌株的 PCR 扩增条带为 3 262 bp, PCR 验证结果如图 5B 所示, 与预期相符, 然后将样品送公司测序, 比对正确则表明 *trpE2* 基因敲除成功。

2.3.2 *trpE* 基因敲除株的发酵验证

对 M6 菌株 *trpE1*、*trpE2* 基因的单敲株和双敲株进行发酵, 并用 HPLC 检测洛蒙真菌素的产量, 其结果如图 6 所示, M6 菌株 *trpE1*、*trpE2* 基因单敲株的洛蒙真菌素产量分别为 71.38 mg/L 和 66.17 mg/L, 分别比 M6 菌株提升了 18.38% 和 9.72%; M6 菌株 *trpE1*、*trpE2* 基因双敲株的洛蒙真菌素产量为 81.89 mg/L, 比 M6 菌株提升了 35.21%。发酵结果说明, 通过对 *trpE1*、*trpE2* 基因的敲除, 能够比较有效地阻断分支酸消耗途径——色氨酸合成途径, 从而使代谢流更多地流向洛蒙真菌素合成途径。

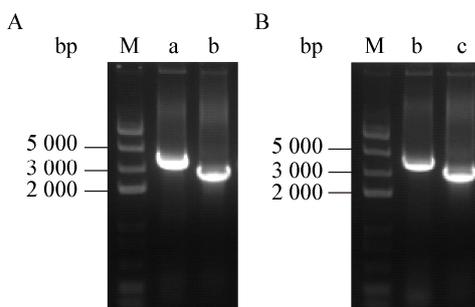


图 5 M6 菌株中 *trpE1* (A) 和 *trpE2* (B) 基因敲除的 PCR 验证

Figure 5 PCR confirmation of *trpE1* (A) and *trpE2* (B) gene deletion in M6 strain

Note: M: DNA marker; a: M6 strain; b: M6 Δ *trpE1* mutant; c: M6 Δ *trpE1* Δ *trpE2* mutant.

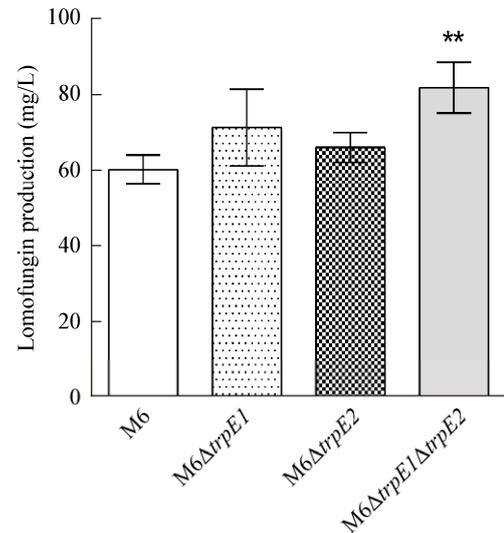


图 6 *trpE1*、*trpE2* 基因对 M6 菌株洛蒙真菌素产量的影响

Figure 6 Effects of *trpE1* and *trpE2* gene on the lomofungin production of M6 strain

Note: **: $P < 0.01$.

2.3.3 全局调控基因 *afsR* 的过表达

前期研究表明, *afsR* 基因能通过提高吩嗪合成基因 *phzC* 和 *phzE* 的表达来促进洛蒙真菌素的生物合成^[1]。因此希望通过在 M6 Δ *trpE1* Δ *trpE2* 菌株中过表达 *afsR* 基因, 探究该全局调控因子的调控机制在诱变后的菌株中是否仍然有效, M6 菌株是否适合基本的基因工程改造。

在 M6 菌株的 *trpE1*、*trpE2* 基因双敲株基础上, 利用 pIB139-*afsR* 过表达质粒进行 *afsR* 基因的过表达, 并以 pIB139 空载质粒为参照, 发酵结果如图 7 所示。在双敲株上过表达全局调控基因 *afsR* 后, 最终洛蒙真菌素产量达到 109.53 mg/L, 比双敲株提升了 33.75%, 是野生型 S015 的 13.13 倍。结果表明过表达全局调控基因 *afsR* 能有效促进 M6 Δ *trpE1* Δ *trpE2* 菌株中落蒙真菌素的生物合成, 并且该结果与 Wang 等^[1]报道的过表达 *afsR* 能提高 S015 菌株中落蒙真菌素的产量相一致, 表明过表达全局调控基因 *afsR* 来获得高产菌株这一策略在高产株 M6 Δ *trpE1* Δ *trpE2* 中仍然有效, M6 可以通过基因工程改造不断提高产量。

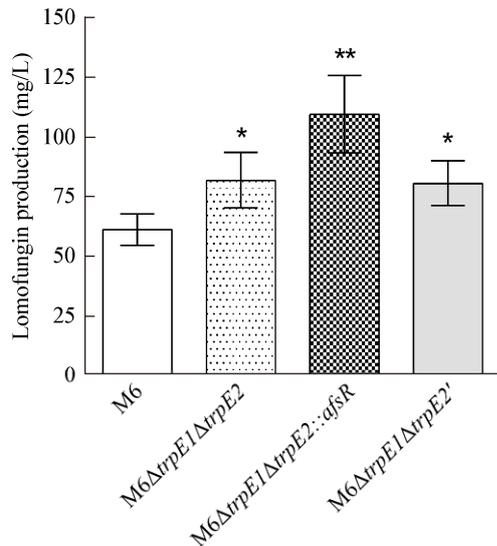


图7 *afsR* 基因对 M6ΔtrpE1ΔtrpE 突变体洛蒙真菌素产量的影响

Figure 7 Effects of *afsR* gene on the lomofungin production of M6ΔtrpE1ΔtrpE2 mutant

注: M6ΔtrpE1ΔtrpE2' 为含有 pIB139 空质粒的 M6ΔtrpE1ΔtrpE2 的菌株。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

Note: M6ΔtrpE1ΔtrpE2' mutant is M6ΔtrpE1ΔtrpE2 mutant containing vector pIB139. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论与结论

抗生素高产菌株的高通量筛选方法建立对于抗生素高产非常重要,常用的方法如荧光蛋白标记法^[20],需要对出发菌株进行基因操作,插入荧光蛋白标记基因;同时,对于某些自带荧光的菌株(如:链霉菌),往往会因其荧光背景干扰而难以奏效。HPLC 检测产物也是常用的筛选和检测手段,并具有较高精确性^[21],但是 HPLC 检测单个样品通常就需要 10–40 min 的时间,在样品数量非常大的情况下会耗费大量的时间。

本研究根据洛蒙真菌素的 2-丁酮溶液在紫外波长 375 nm 处的特征吸收峰,以及其洛蒙真菌素浓度和 A_{375} 值的正相关关系,利用 24 孔深孔板的大批量发酵和酶标仪的快速检测,成功建立了高通量筛选高产洛蒙真菌素菌株的方法。每一轮筛选过程利用 24 孔深孔板,尽管振荡培养箱的空间有限,仍可以实现同时进行 720 株突变株的发酵;使用酶

标仪能以每分钟约 100 个菌株样品的速度进行检测,在短时间内可以完成样品的快速分析,实现高通量的筛选。Bergy^[31]也曾报道洛蒙真菌素的甲醇酸性溶液在 375 nm 处有一个吸收峰,但因洛蒙真菌素在 2-丁酮中溶解度比甲醇更高,峰形清晰,所以选用 2-丁酮做溶剂。而且,与荧光蛋白标记法相比,本研究建立的高通量筛选方法无需基因操作,不受菌株自身荧光干扰,过程更为简单有效。与传统的 HPLC 检测方法相比,本研究建立的高通量筛选方法可以在短时间内对大量样品同时进行检测,更快速高效,可以节约大量时间。

利用高通量筛选方法,通过 6 轮 ARTP 和紫外复合诱变,从 4 320 株突变菌株中筛选得到一株高产菌株 M6,洛蒙真菌素产量为 61.33 mg/L,是出发菌株 S015 的 7.35 倍,并且菌株稳定性良好。Huang 等^[22]通过紫外和 MNNG 的复合诱变,使塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*) Rn14-88A 菌株的果胶酶产量提高了 161.44%; Su 等^[23]通过氮离子束诱变育种,使芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) S65 菌株的壳聚糖酶产量从 4.1 mg/L 提高至 25 mg/L,提高了 510%。从产量的提升效果和幅度来看,不论相比于传统的紫外、NTG 复合诱变,还是新型的氮离子束诱变,本研究的复合诱变与筛选过程对目标产物的产量提升更为可观,具有一定优势。

本研究结合基因工程改造,在诱变高产株 M6 的基础上双敲除了 *trpE1* 和 *trpE2* 基因,阻断了洛蒙真菌素的前体分支酸消耗途径——色氨酸合成途径,使得其洛蒙真菌素产量达到 81.89 mg/L。在 M6 的 *trpE1* 和 *trpE2* 基因双敲株的基础上,又过表达了全局调控基因 *afsR*,最终洛蒙真菌素产量达到 109.53 mg/L,是野生型 S015 的 13.13 倍,说明诱变菌株仍能适合基本的基因工程改造。

研究表明将不同诱变育种和基因工程改造相结合可以有效提高目标产物的产量,可为其他抗生素及次生代谢产物的高产菌株筛选与改造提供良好的借鉴。

REFERENCES

- [1] Wang W, Wang HS, Hu HB, et al. Overexpression of *afsR* and optimization of metal chloride to improve lomofungin production in *Streptomyces lomondensis* S015[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(5): 672-680
- [2] Arai J, Goto K, Tanoue Y, et al. Enzymatic inhibition of MICA sheddase ADAM17 by lomofungin in hepatocellular carcinoma cells[J]. International Journal of Cancer, 2018, 143(10): 2575-2583
- [3] Bergy ME. Lomofungin, a new broad spectrum antibiotic: isolation and characterization[J]. The Journal of Antibiotics, 1969, 22(3): 126-128
- [4] Zhang CX, Sheng CL, Wang W, et al. Identification of the lomofungin biosynthesis gene cluster and associated flavin-dependent monooxygenase gene in *Streptomyces lomondensis* S015[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136228
- [5] Ashenafi M, Reddy PT, Parsons JF, et al. The fused anthranilate synthase from *Streptomyces venezuelae* functions as a monomer[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2015, 400(1/2): 9-15
- [6] Wang Q, Feng LR, Wei L, et al. Mutation breeding of lycopene-producing strain *Blakeslea trispora* by a novel atmospheric and room temperature plasma (ARTP)[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(1): 452-460
- [7] Zong H, Zhan Y, Li X, et al. A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(13): 3154-3158
- [8] Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis[J]. Journal of Radiation Research, 2011, 52(2): 115-125
- [9] Doran TJ, Lu PJ, Vanier GS, et al. Microwave irradiation enhances gene and oligonucleotide delivery and induces effective exon skipping in myoblasts[J]. Gene Therapy, 2009, 16: 119-126
- [10] Gong CJ, Liu H, Song R, et al. ATR-CHK1-E2F3 signaling transactivates human ribonucleotide reductase small subunit M2 for DNA repair induced by the chemical carcinogen MNNG[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2016, 1859(4): 612-626
- [11] Harrell CR, Djonov V, Fellabaum C, et al. Risks of using sterilization by gamma radiation: the other side of the coin[J]. International Journal of Medical Sciences, 2018, 15(3): 274-279
- [12] MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, et al. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector[J]. Gene, 1992, 111(1): 61-68
- [13] Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.[J]. Gene, 1992, 116(1): 43-49
- [14] Li S, Ye QM, Wang W, et al. High-performance liquid chromatography analysis of lomofungin in *Streptomyces lomondensis*[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2013, 36(15): 2059-2068
- [15] Yan RB, Wang W, Zhang XH. Function of *cutR/cutS* two component system in lomofungin biosynthesis in *Streptomyces lomondensis* S015[J]. Microbiology China, 2019, 46(2): 261-268 (in Chinese)
严若冰, 王威, 张雪洪. 洛蒙德链霉菌 S015 中 *cutR/cutS* 双组分调控系统对洛蒙真菌素合成的调控[J]. 微生物学通报, 2019, 46(2): 261-268
- [16] Du ZQ, Zhang Y, Qian ZG, et al. Combination of traditional mutation and metabolic engineering to enhance ansamitocin P-3 production in *Actinosynnema pretiosum*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(12): 2794-2806
- [17] Jiang YZ, Peng HS, Zhang XH. Breeding of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 based on ARTP mutagenesis and high throughput screening[J]. Microbiology China, 2017, 44(10): 2421-2427 (in Chinese)
江耀祖, 彭华松, 张雪洪. 基于 ARTP 诱变和高通量筛选的绿针假单胞菌 GP72 育种方法[J]. 微生物学通报, 2017, 44(10): 2421-2427
- [18] Tan J, Xiong X, Liang WL, et al. Breeding of a phenazine-1-carboxamid-producing strain by ARTP mutation and its optimization of fermentation[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(1): 174-179 (in Chinese)
谭剑, 熊欣, 梁万利, 等. ARTP 技术选育吩嗪-1-甲酰胺高产菌株及发酵优化[J]. 生物技术通报, 2016, 32(1): 174-179
- [19] Sheng CL, Wang W, Hu HB, et al. Function of a methyltransferase gene *lomo3* involved in the biosynthesis of lomofungin[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 575-582 (in Chinese)
盛超兰, 王威, 胡洪波, 等. 一个甲基转移酶基因 *lomo3* 在洛蒙真菌素生物合成途径中的功能[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 575-582
- [20] Knapp A, Rippahn M, Volkenborn K, et al. Activity-independent screening of secreted proteins using split GFP[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 258: 110-116
- [21] Ganzer M, Sturm S. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis — an update covering 2011-2016[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, 147: 211-233
- [22] Huang DM, Song YY, Qin LY, et al. A new strain of *Aspergillus tubingensis* for high-activity pectinase production[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2019, 50(1): 53-56
- [23] Su CX, Zhou W, Fan YH, et al. Mutation breeding of chitosanase-producing strain *Bacillus* sp. S65 by low-energy ion implantation[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33(12): 1037-1042