

ABC 转运蛋白基因 *slnTI* 和 *slnTII* 与盐霉素生物合成的相关性

刘静^{1,2} 姜春艳² 张部昌^{1*} 白林泉^{2*}

(1. 安徽大学 生命科学学院 安徽 合肥 230601)

(2. 上海交通大学 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要:【目的】*slnTI* 和 *slnTII* 是盐霉素生物合成基因簇中可能的两个转运蛋白基因, 根据生物信息学的分析推测它们属于 ABC 转运蛋白家族。其中, *slnTI* 编码 ABC 转运蛋白的 ATP 结合亚基, *slnTII* 编码 ABC 转运蛋白的跨膜亚基, 推测它们可能与盐霉素的外排有关。通过 *slnTI* 和 *slnTII* 的基因中断与超量表达研究它们对盐霉素生物合成产量和抗性的影响。【方法】利用 REDIRECT[®] 技术, 在盐霉素产生菌白色链霉菌 XM211 中分别构建了 *slnTI* 和 *slnTII* 的基因置换突变株 LJ01 和 LJ02, 并通过基因回补对突变株进行了验证。利用整合型表达载体 pPM927 在白色链霉菌 XM211 中对 *slnTI* 和 *slnTII* 进行串联超量表达。将 *slnTI* 和 *slnTII* 导入变铅青链霉菌 1326 中进行异源表达, 通过液体培养实验检测衍生菌株对盐霉素的抗性。【结果】相比出发菌株 XM211, 突变株 LJ01 中盐霉素的产量下降了 27.2%, LJ02 下降了 45.4%, LJ01 和 LJ02 中结构基因 *slnA3* 和调控基因 *slnR* 的转录水平都有明显降低。超量表达菌株 LJ03 中盐霉素的产量提高了 14.6%, 转录结果显示 LJ03 中不仅 *slnTI* 和 *slnTII* 自身转录水平有大幅提高, 而且 *slnA3* 和 *slnR* 转录水平也显著升高。抗性检测结果表明, 异源表达菌株变铅青链霉菌 LJ04 对盐霉素的抗性水平略有提高。【结论】*slnTI* 和 *slnTII* 是与盐霉素生物合成和外排有关的 ABC 转运蛋白基因, 但并不是白色链霉菌 XM211 对盐霉素的主要抗性基因。

关键词: 盐霉素, ABC 转运蛋白, 基因置换, 超量表达, 抗性

Involvement of ABC transporter genes *slnTI* and *slnTII* in salinomycin biosynthesis

LIU Jing^{1,2} JIANG Chun-Yan² ZHANG Bu-Chang^{1*} BAI Lin-Quan^{2*}

(1. School of Life Science, Anhui University, Hefei, Anhui 230601, China)

(2. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] In the salinomycin biosynthetic gene cluster, *slnTI* and *slnTII* encode the ABC transporter ATP-binding subunit and trans-membrane subunit, respectively. We speculate that *slnTI*

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070070)

*通讯作者: 张部昌: Tel: 86-551-63861965; 信箱: zhbc@ahu.edu.cn

白林泉: Tel: 86-21-62932418; 信箱: bailq@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2013-02-01; 接受日期: 2013-03-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

and *slnTII* are most likely related to salinomycin export. Here, the role of *slnTI* and *slnTII* on salinomycin biosynthesis and resistance was investigated by gene replacement and overexpression. **[Methods]** Using REDIRECT[®] technology, the *slnTI* mutant LJ01 and the *slnTII* mutant LJ02 were constructed, and further verified by *trans*-complementation with cloned corresponding genes. *SlnTI* and *SlnTII* were overexpressed in the wild-type *Streptomyces albus* XM211. Also, *slnTI* and *slnTII* were introduced into *S. lividans* 1326, and the resistance to salinomycin of the resulted strains was tested. **[Results]** Compared with the wild-type strain, salinomycin production in LJ01 and LJ02 decreased by 27.2% and 45.4%, respectively. The transcription of structure gene *slnA3* and regulatory gene *slnR* were both reduced in LJ01 and LJ02. The overexpression of *slnTI* and *slnTII* in the wild-type XM211 resulted in a 14.6% enhanced salinomycin production. Correspondingly, the transcription of *slnA3* and *slnR* was also increased. Additionally, heterologous expression of *slnTI* and *slnTII* in *S. lividans* 1326 slightly increased its resistance to salinomycin. **[Conclusion]** *slnTI* and *slnTII* are identified to be related to the production of salinomycin, but not to be the main resistant gene for salinomycin in the producer.

Keywords: Salinomycin, ABC transporter, Gene replacement, Overexpression, Resistance

盐霉素(Salinomycin)最早于 1971 年被日本宫崎幸雄、原正幸等发现,由白色链霉菌(*Streptomyces albus*)发酵产生^[1]。盐霉素具有抗球虫活性,是一种广泛应用于畜牧业和家禽业的聚醚类抗生素^[2]。此外,对大多数革兰氏阳性菌和梭菌等革兰氏阳性厌氧菌也有强的抑制作用^[3]。其作用机制是整合金属离子后进入细胞膜,从而改变细胞内离子梯度,最终导致细胞的死亡。而在最新的一项关于抑制肿瘤干细胞的药物筛选实验中发现,盐霉素的活性是目前临床上已经在用的紫杉醇的活性的 100 倍^[4]。

2012 年我们实验室在白色链霉菌 XM211 中重新定位了盐霉素的生物合成基因簇^[5],并对基因簇中各基因的功能进行了较为详尽的分析。生物信息学分析显示,此基因簇含有可能与盐霉素生物合成有关的 21 个基因,包括典型的 I 型聚酮合酶基因(*slnA1*–*slnA9*),以及负责氧化环化、羟基化、转运、调控等基因。其中,*slnTI* 和 *slnTII* 是两个相邻的基因,分别编码 ABC 转运蛋白 ATP 结合蛋白亚基和 ABC 转运蛋白跨膜蛋白亚基。

腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporters)是广泛存在于原核和真核生物中的一类跨膜蛋白,由于含有一个腺苷三磷酸(ATP)的结合盒(ATP-binding cassette, ABC)又被称为 ABC 转运蛋白^[6]。ABC 转运蛋白能够结合和水解 ATP,利用水解 ATP 的能量跨膜转运各种生物

分子,例如糖、氨基酸、金属离子、多肽、蛋白质、细胞代谢产物和药物等^[7]。研究证实 ABC 转运蛋白可以用来提高次级代谢产物的产量。例如:邱竞帆等通过提高基因拷贝数的方法,在阿维链霉菌中超量表达 *avtAB*,使阿维菌素的产量得到大幅提高^[8]。而且在青霉素产生菌全基因组测序的文章中,就曾提出过负责青霉素分泌的 ABC 转运蛋白与青霉素高产相关的概念^[9]。另外,ABC 转运蛋白的异源表达,可以使异源宿主产生相应的抗性。例如:在变铅青链霉菌 TK24 中超量表达聚酮抗生素 Landomycin E (LaE)生物合成基因簇中的 ABC 转运蛋白编码基因 *lndW*,可以使异源宿主对 LaE 产生抗性^[10]。因此我们推想如果 *slnTI* 和 *slnTII* 是白色链霉素 XM211 对盐霉素的主要抗性基因,那么 *slnTI* 和 *slnTII* 应该能够显著提高异源宿主对盐霉素的抗性。

我们研究了 *slnTI* 和 *slnTII* 的体内中断以及超量表达对盐霉素产量的影响,同时通过实时定量 PCR 检测了突变株中相关基因的转录水平,最后探讨了 *slnTI* 和 *slnTII* 与盐霉素抗性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒及引物: 本研究所用的菌种、质粒及引物见表 1。

表 1 本研究所用的菌株、质粒及引物
Table 1 Strains, plasmids and primers in this study

菌株、质粒及引物 Strains, plasmids and primers	相关特征及引物序列 Related characters and sequences	来源 Resource
链霉菌 <i>Streptomyces</i>		
白色链霉菌 <i>S. albus</i> XM211	盐霉素产生菌	本室保存
变铅青链霉菌 <i>S. lividans</i> 1326	异源表达宿主	本室保存
LJ01	XM211 的 <i>slnTI</i> 突变株	本研究
LJ02	XM211 的 <i>slnTII</i> 突变株	本研究
LJ01:: pLQ24	LJ01 的 <i>slnTI</i> 回补菌株	本研究
LJ02:: pLQ25	LJ02 的 <i>slnTII</i> 回补菌株	本研究
LJ01:: pJTU824	LJ01 中转入载体 pJTU824 的对照菌株	本研究
LJ02:: pJTU824	LJ02 中转入载体 pJTU824 的对照菌株	本研究
LJ03	XM211 中高拷贝表达 <i>slnTI</i> 和 <i>slnTII</i>	本研究
LJ04	变铅青链霉菌 1326 中异源过量表达 <i>slnTI</i> 和 <i>slnTII</i>	本研究
LJ05	XM211 中转入载体 pPM927 的对照突变株	本研究
LJ06	变铅青链霉菌 1326 中转入载体 pPM927 的对照突变株	本研究
大肠杆菌 <i>E. coli</i>		
DH10B	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK λ-rpsL nupG</i>	GIBCO BRL
BW25113(pKD46)	<i>Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(: : rrnB-4), lacIp-4000(lacI^Q), rpoS369(Am), rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514; pKD46</i>	[11]
ET12567(pUZ8002)	<i>recF, dam⁻, dcm⁻, cml, str, tet, km</i>	[12]
质粒 Plasmid		
pBluescript II SK(+)	<i>bla, lacZ, ori(f1)</i>	Stratagene
pPM927	<i>pSAM2, tsr, oriT</i>	本室保存
pJTU968	<i>bla, Perme*, pRSETb</i>	本室保存
pJTU824	<i>tsr, bla, Perme*, int, oriT</i>	本室保存
Fosmid 25E8	包含部分盐霉素生物合成基因簇的 Fosmid	本室保存
pLQ20	含有 <i>aac(3)IV</i> 和 <i>oriT</i> 的基因片段, 与 Fosmid 25E8 在大肠杆菌 BW25113(pKD46) 中重组得到, 用于置换 <i>slnTI</i> 的质粒	本研究
pLQ21	含有 <i>aac(3)IV</i> 和 <i>oriT</i> 的基因片段, 与 Fosmid 25E8 在大肠杆菌 BW25113(pKD46) 中重组得到, 用于置换 <i>slnTII</i> 的质粒	本研究
pLQ22	pJTU968 的 <i>Nde I/EcoR I</i> 位点插入 <i>slnTI</i> 和 <i>slnTII</i>	本研究
pLQ23	pPM927 携带 <i>Perme*</i> 启动子和 <i>slnTI</i> 和 <i>slnTII</i>	本研究
pLQ24	pJTU824 的 <i>Nde I/EcoR I</i> 位点插入 <i>slnTI</i>	本研究
pLQ25	pJTU824 的 <i>Nde I/EcoR I</i> 位点插入 <i>slnTII</i>	本研究
引物 Primer		
SlnT1-F	TTGGCGCCCAACGAGTACGCAATCACCGCGGAAGGCCTCATTCCGGGGATCCGTCGA	
SlnT1-R	TGGCGAGTACGGGCTCCAAGTGGGCGTTGTCCACGTCGATGTAGGCTGGAGCTGCTT	
SlnT1-test-F	TAAACACCCCTGACTGTCCGGTTCC	
SlnT1-test-R	TAGTGGCGCATGAACAGCTCCTCCA	
SlnT2-F	TCCCCCTACACCGGTACGCAGGCGCTGCTGAAGCTCGCCATTCCGGGGATCCGTCGACC	
SlnT2-R	TCAGGGGGCGAGGTCGCGCCTGCGGAAGAGGGCGGCACCTGTAGGCTGGAGCTGCTT	
SlnT2-test-F	TGGAGGAGCTGTTTCATGCGCCACTA	
SlnT2-test-R	TTCCCCCTCCTGTGGGCTTTCCCGGA	
SlnT-F	GCGCATATGTTGGCGCCCAACGAGTAC	
SlnT-R	GGGGAATTCTCAGGGGGCGAGGTCGCG	
E-SlnT1-F	GCGCATATGTTGGCGCCCAACGAGTAC	
E-SlnT1-R	CGCGAATTCTCATCGGGTGGCCGCCCTC	
E-SlnT2-F	CCGCATATGAGCGAGAAGTCCCCCTACA	
E-SlnT2-R	GGGGAATTCTCAGGGGGCGAGGTCG	
Tsr-F	TTGGACACCATCGCAAATC	
Tsr-R	AAACCGAGGCGGAAGACG	

1.1.2 培养基: 大肠杆菌培养采用 LB (Luria-Bertani) 和 LA 培养基; 链霉菌培养采用 TSBY (Tryptone soya broth) 液体培养基、SFM (Mannitol soya flour medium) 固体培养基和 ISP4 培养基。盐霉素种子瓶培养基: 葡萄糖 4%, 黄豆饼粉 3%, 酵母粉 1%, 碳酸钙 0.2%, pH 自然。盐霉素发酵培养基: 葡萄糖 3%, 酪蛋白水解物 1%, 氯化钠 0.2%, 氯化钾 0.2%, 硫酸铵 0.5%, 磷酸氢二钾 0.02%, 硫酸镁 0.01%, 氯化钙 0.01%, 碳酸钙 0.5%。

1.1.3 主要试剂: 实验中所用抗生素购自 Sigma 公司; 限制性内切酶购自 Fermentas 公司; 连接酶和 KOD 高保真 DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司; DNA marker 和 *rTaq* DNA 聚合酶购自东盛生物科技有限公司; PCR 产物回收试剂盒购自 Omega 公司; RNA 快速提取试剂盒购自赛百盛公司。

1.2 方法

1.2.1 *slnTI* 突变菌株的构建: 将 Fosmid 25E8 转入大肠杆菌 BW25113 (pKD46), 同时以 *slnT1*-F/R 为引物、pIJ773 为模板, 扩增得到 1 449 bp 并携带 *aac(3)IV-oriT* 的片段。通过 REDIRECT[®] 技术将 *slnTI* 替换为 *aac(3)IV-oriT*, 得到用于双交换的质粒 pLQ20。将 pLQ20 转入大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002), 验证正确后通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移导入白色链霉菌 XM211 中。用阿泊拉霉素覆盖后培养 3–5 d, 挑取抗性接合子, 再经过两轮松弛培养后稀释获得单菌落, 筛选有阿泊拉霉素抗性的菌株扩大培养, 通过 PCR 验证, 得到双交换突变株 LJ01。

1.2.2 *slnTH* 突变菌株的构建: 方法同 1.2.1, 以 *slnT2*-F/R 为引物进行扩增, 通过 REDIRECT[®] 技术将 *slnTH* 替换为 *aac(3)IV-oriT*, 得到用于双交换的质粒 pLQ21。将 pLQ21 通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移导入白色链霉菌 XM211 中, 得到双交换菌株 LJ02。

1.2.3 *slnTI* 回补突变株 LJ01::pLQ24 的构建: 以

E-*slnT1*-F/R 为引物, Fosmid 25E8 为模板, 采用 KOD DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 通过 PCR 的方法在 *slnTI* 的两侧分别引入 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切位点。琼脂糖凝胶电泳回收 0.96 kb 的 PCR 产物, 克隆到 pBluescript II SK(+) 并测序。测序正确的片段经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 连接到 pJTU824 上得到质粒 pLQ24。pLQ24 包含有红霉素抗性基因强启动子 *PermE*^{*} 以及转运蛋白基因 *slnTI*, 用于回补突变株 LJ01。将 pLQ24 通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移导入突变株 LJ01 中, 筛选既带有阿泊拉霉素抗性又带有硫链丝菌素抗性的接合子, 得到 *slnTI* 回补菌株 LJ01::pLQ24。

1.2.4 *slnTH* 回补突变株 LJ02::pLQ25 的构建: 方法同 1.2.3, 以 E-*slnT2*-F/R 为引物, Fosmid 25E8 为模板, 扩增 1.63 kb 条带。测序正确的片段经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 连接到 pJTU824 上得到克隆 pLQ25。将 pLQ25 通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移导入突变株 LJ02 中, 得到 *slnTH* 回补菌株 LJ02::pLQ25。

1.2.5 *slnTI* 和 *slnTH* 的串联超量表达: 以 Fosmid 25E8 作为模板, *SlnT*-F/*SlnT*-R 为引物, 通过 PCR 扩增得到含有目的基因 *slnTI* 和 *slnTH* 的 2.6 kb 片段, 同时在两端分别引入 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切位点。将 PCR 片段克隆到 pBluescript II SK(+) 上并测序。测序正确的片段经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 连接到 pJTU968 上, 得到重组质粒 pLQ22。以 *Eco*R I 和 *Mun* I 对 pLQ22 进行酶切, 回收带有 *slnTI* 和 *slnTH* 和红霉素抗性基因强启动子 *PermE*^{*} 的 2.8 kb 片段, 克隆到 pPM927 上, 得到用于串联超量表达的质粒 pLQ23。将 pLQ23 和载体 pPM927 分别转入大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002) 后, 通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移导入白色链霉菌 XM211, 得到 *slnTI* 和 *slnTH* 超量表达菌株 LJ03 及载体对照菌株 LJ05。

1.2.6 *slnTI* 和 *slnTH* 的异源表达: 将 pLQ23 和载体 pPM927 通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移分

别导入变铅青链霉菌 1326 ,得到 *slnTI* 和 *slnTII* 异源表达菌株 LJ04 及载体对照菌株 LJ06。

1.2.7 盐霉素发酵及含量检测: 将得到的突变株与出发菌株白色链霉菌 XM211 在 TSBY 中 33 °C 培养 36 h 后 ,按 1/1 000 (体积比)比例接入种子培养基中 , 33 °C 培养 24–28 h 后 ,再按 1/100 (体积比)比例接入发酵培养基 , 33 °C 发酵 5 d。发酵结束后经乙酸乙酯萃取、浓缩后再溶于甲醇中 , 然后进行 HPLC 检测。仪器为 Agilent 600 高效液相色谱仪。检测条件 : 色谱柱为安捷伦分析型 TC-C18 (5 μm , 4.6 mm×250 mm) , 流动相为 2%的乙酸:乙腈(9:91 , 体积比) , 检测波长为 210 nm , 流速为 0.4 mL/min , 进样量为 25 μL , 检测时间为 45 min。

1.2.8 实时定量 PCR 检测基因转录水平: 对待检测菌株进行发酵 , 转接入发酵培养基后 48 h 进行定量取样 , 使用 RNA 提取试剂盒提取各样品的 RNA , 将其反转成 cDNA 后作为 RT-PCR 的模板。使用 Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix 进行实时定量 PCR , 以 *hrdB* 基因为内参 , 选用 $\Delta\Delta C_T$ 法分析。除了目的基因 *slnTI* 和 *slnTII* , 我们还选择了盐霉素生物合成基因簇中的调控基因 *slnR*、PKS 合成基因 *slnA3* 进行检测。以相应的特异性引物(表 2)进行扩增 , 检测各目的基因和结构基因的转录水平。

表 2 实时定量 PCR 所用引物 Table 2 Primers used in Real-time PCR	
引物 Primers	核苷酸序列 Sequence (5'→3')
hrdB-F	TGGTCGAGGTCATCAACA
hrdB-R	GTCACCGAACTCACTGTC
slnT1-F	CCAACGAGTACGCAATCA
slnT1-R	ACGGATGGTGGTGGATT
slnT2-F	TCAAGAGCACGTATGAGAAC
slnT2-R	CGCACAGATAGGAGAAGAC
slnA3-F	GTGGAGTCCTTCGGTGTA
slnA3-R	AGGCATCCTCAAGAGACA
slnR-F	ATCTCGGCGAAGCTCTAC
slnR-R	CTCGAAGTGCAGGTCCAT

1.2.9 异源表达菌株对盐霉素抗性的检测: 将白色链霉菌 XM211、*slnTI* 和 *slnTII* 异源表达菌株 LJ04 及载体对照菌株 LJ06 按 1/100 (体积比)接种量接入含有不同浓度盐霉素的 TSBY 培养基中 , 30 °C 培养 3 d , 观察菌体生长情况。盐霉素浓度梯度为 0.125、0.250、0.375、0.500、0.625 和 0.750 mmol/L。

2 结果与分析

2.1 *slnTI* 的突变导致盐霉素产量下降

2.1.1 *slnTI* 的突变及回补: 为了探究 ABC 转运蛋白 ATP 结合亚基 SlnTI 与盐霉素产量的关系 , 我们将 *slnTI* 中 807 bp 的序列置换为阿泊拉霉素抗性基因 , 得到双交换菌株 LJ01。利用引物 slnT1-test-F 和 slnT1-test-R 对双交换菌株的基因型进行 PCR 验证(图 1A)。以白色链霉菌 XM211 的总 DNA 为模板 , 扩增条带为 1.0 kb , 以突变株 LJ01 总 DNA 为模板 , 扩增条带为 1.60 kb (图 1B)。

同时 , 为了确认 LJ01 的表型是完全由于 *slnTI* 突变引起的 , 我们设计了 *slnTI* 回补实验。将携带有 *slnTI* 的质粒 pLQ24 和载体 pJTU824 通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移分别导入突变株 LJ01 后 , 挑选抗硫链丝菌素的接合子 , 然后利用引物 Tsr-F 和 Tsr-R 进行验证 , 筛选能够扩增出 0.7 kb 的硫链丝菌素抗性基因片段的菌株 , 最终得到 *slnTI* 回补菌株 LJ01::pLQ24 及载体对照菌株 LJ01::pJTU824。

2.1.2 *slnTI* 的突变导致盐霉素产量下降: 将野生型白色链霉菌 XM211、突变株 LJ01、回补菌株 LJ01::pLQ24 及其空载对照菌株 LJ01::pJTU824 于相同条件下进行发酵。HPLC 分析显示 , 相比出发菌株 XM211 , LJ01 中盐霉素产量下降了 27.2% (图 1C)。回补菌株 LJ01::pLQ24 较其空载对照菌株 LJ01::pJTU824 盐霉素产量提高了 55.5% , 表明 LJ01 中盐霉素产量的下降的确是由 *slnTI* 的突变导致的。这些结果说明 *slnTI* 的突变降低了菌株产生盐霉素的能力 , 而且载体 pJTU824 的整合会非特异性地导致盐霉素产量显著下降。

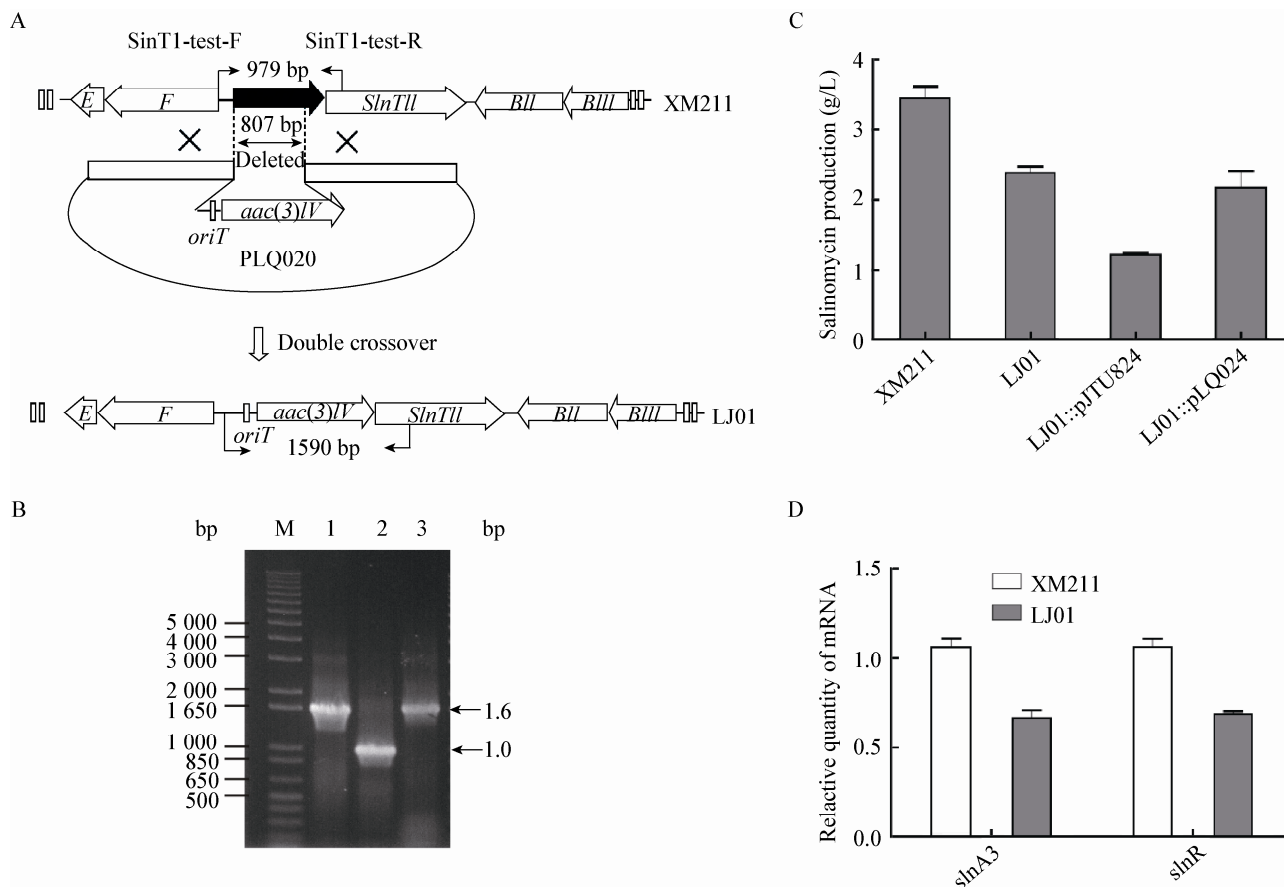


图1 *slnTI* 基因置换示意图(A), 双交换突变株 LJ01 的 PCR 验证(B), 白色链霉菌 XM211、LJ01、LJ01::pJTU824 及 LJ01::pLQ24 的摇瓶发酵产量(C)及白色链霉菌 XM211 和突变株 LJ01 中 *slnA3* 和 *slnR* 的转录水平分析(D)

Figure 1 Schematic representation of the replacement of *slnTI* (A), confirmation of LJ01 by PCR amplification (B), salinomycin production of *S. albus* XM211, LJ01, LJ01::pJTU824 and LJ01::pLQ24 (C), and real-time qPCR analysis of the expression of *slnA3* and *slnR* in wild-type XM211 and LJ01 (D)

注: M: 1 kb DNA ladder; 1: 以 pLQ20 为模板的扩增产物; 2: 以野生型 XM211 的总 DNA 为模板的扩增产物; 3: 以突变株 LJ01 的总 DNA 为模板的扩增产物。

Note: M: 1 kb DNA ladder; 1: PCR product with pLQ20 as template; 2: PCR product with the total DNA of wild-type XM211 as template; 3: PCR product with the total DNA of mutant LJ01 as template.

2.1.3 *slnTI* 突变对盐霉素生物合成基因簇中其它基因的影响: 为了进一步研究 *slnTI* 的缺失是否影响盐霉素生物合成基因簇上其它基因的转录水平, 以看家基因 *hrdB* 为内参, 对盐霉素生物合成基因簇中的调控基因 *slnR* 和 PKS 合成基因 *slnA3* 的转录水平进行实时定量 PCR 分析。实验证实, *slnR* 和 *slnA3* 在 *slnTI* 突变株 LJ01 中的表达量较出发菌株 XM211 都有略微下降(图 1D), 说明 *slnTI* 的突变可以造成盐霉素生物合成基因簇中其它基因转

录水平的下降。

2.2 *slnTII* 的突变导致盐霉素产量下降

2.2.1 *slnTII* 的突变及回补: 为了探究 ABC 转运蛋白跨膜亚基 *SlnTII* 与盐霉素产量的关系, 本研究又将 *slnTII* 内部的 1 830 bp 片段置换为阿泊拉霉素抗性基因, 得到双交换菌株 LJ02 (图 2A)。利用引物 *slnT2-test-F* 和 *slnT2-test-R* 对双交换突变株进行 PCR 验证, 当以白色链霉菌 XM211 的总 DNA 为模板时, 扩增条带为 1.80 kb, 当以突变株 LJ02

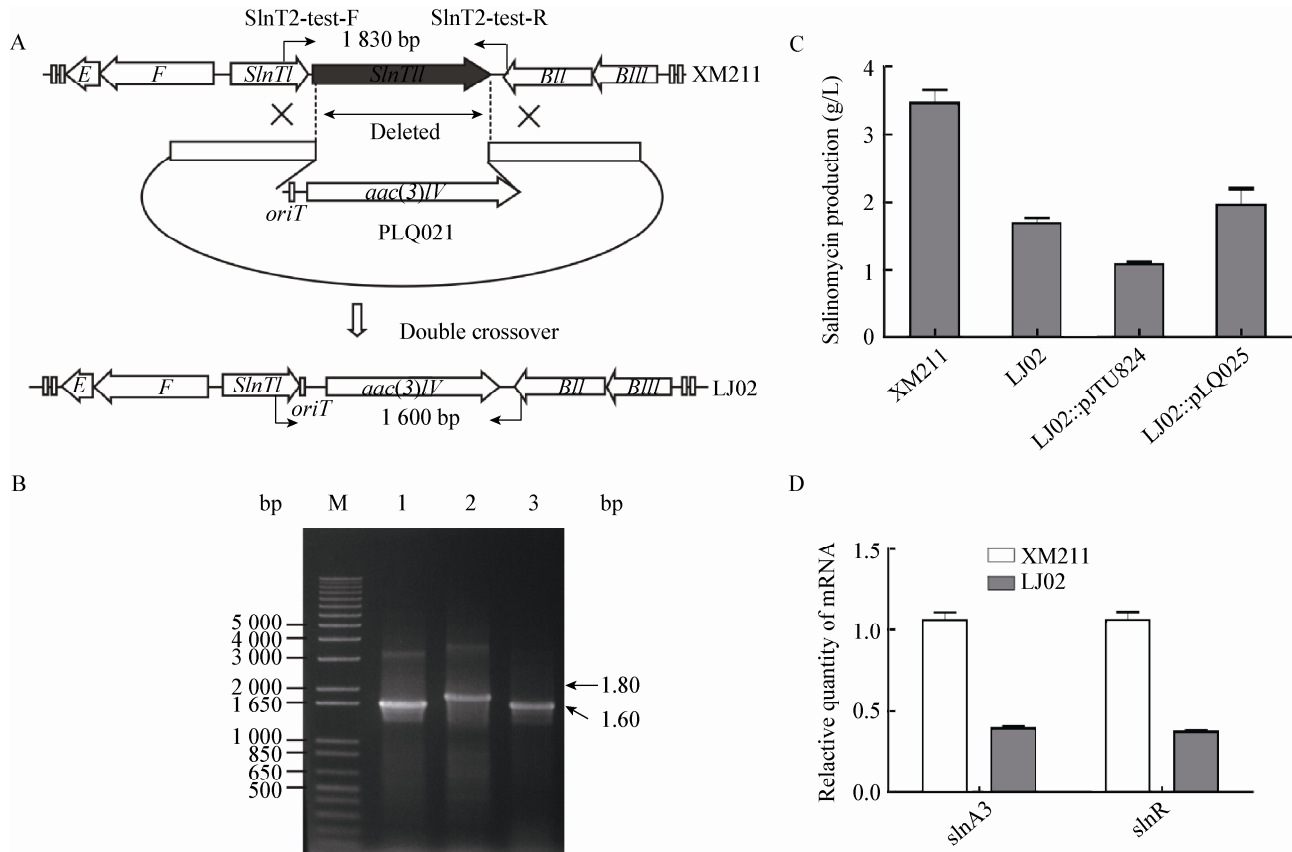


图2 *slnTII* 基因置换示意图(A), 双交换突变株 LJ02 的 PCR 验证(B), 白色链霉菌 XM211、LJ02、LJ02::pLQ25 及 LJ02::pJTU824 的摇瓶发酵产量(C)和白色链霉菌 XM211 和 LJ02 中 *slnA3* 和 *slnR* 的表达水平分析(D)

Figure 2 Schematic representation of the replacement of *slnTII* (A), confirmation of LJ02 by PCR amplification (B), salinomycin production of *S. albus* XM211, LJ02, LJ02::pJTU824 and LJ02::pLQ25 (C), and real-time qPCR analysis of the expression of *slnA3* and *slnR* in XM211 and LJ02 (D)

注: M: 1 kb DNA ladder; 1: 以 pLQ21 为模板的扩增产物; 2: 以野生型 XM211 的总 DNA 为模板的扩增产物; 3: 以突变株 LJ02 的总 DNA 为模板的扩增产物。

Note: M: 1 kb DNA ladder; 1: PCR product with pLQ21 as template; 2: PCR product with the total DNA of wild-type XM211 as template; 3: PCR product with the total DNA of mutant LJ02 as template.

的总 DNA 为模板时, 扩增条带为 1.60 kb (图 2B)。同时, 为了确认 LJ02 的表型是完全由于 *slnTII* 突变引起的, 我们设计了 *slnTII* 的回补实验。将携带有 *slnTII* 的 pLQ25 和载体 pJTU824 通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移分别导入突变株 LJ02, 得到 *slnTII* 回补菌株 LJ02::pLQ25 及载体对照菌株 LJ02::pJTU824。利用引物 Tsr-F 和 Tsr-R 进行验证, 在接合子中都能够扩增出 0.7 kb 的硫链丝菌素抗性基因片段。

2.2.2 *slnTII* 的突变导致盐霉素产量下降: 相比出发菌株白色链霉菌 XM211, LJ02 中盐霉素产量下降了 45.4% (图 2C)。*slnTII* 回补菌株 LJ02::pLQ25 较其载体对照菌株 LJ02::pJTU824 盐霉素产量提高了 66%, 表明 LJ02 中盐霉素产量的下降是由 *slnTII* 的突变导致的。以上结果说明 *slnTII* 的突变同样会造成盐霉素产量的下降。

2.2.3 *slnTII* 突变对盐霉素生物合成基因簇中其它基因的影响: 为了进一步研究 *slnTII* 的中断是否

也对盐霉素生物合成基因簇中其它基因的转录水平造成影响,对野生型 XM211 和突变株 LJ02 中 *slnR* 和 *slnA3* 的转录水平进行比较分析。实验结果表明,相比 XM211,突变株 LJ02 中 *slnR* 和 *slnA3* 的转录水平也略有下降(图 2D)。这说明 *slnTII* 的突变对盐霉素生物合成基因簇中的其它基因的转录造成一定影响。

2.3 *slnT1* 和 *slnTII* 串联超量表达提高盐霉素产量

为了研究 *slnT1* 和 *slnTII* 在野生型白色链霉菌 XM211 中增加拷贝后是否能够提高盐霉素产量,将 *slnT1* 和 *slnTII* 克隆到带有红霉素抗性基因强启动子 *PermE** 的整合型质粒 pPM927 上,得到 pLQ23。通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移将 pLQ23 和 pPM927 分别导入白色链霉菌 XM211 中,筛选得到 *slnT1* 和 *slnTII* 超量表达菌株 LJ03 及其载体对照菌株 LJ05。HPLC 分析发现相比载体对照菌株 LJ05, LJ03 中盐霉素产量提高了 14.6% (图 3A)。进一步的实时荧光定量 PCR 检测表明,相比 LJ05, LJ03 中 *slnT1* 和 *slnTII* 的表达量提高了 8-15 倍, *slnR* 和 *slnA3* 的表达量也提高了 3-6 倍(图 3B)。这说明 *slnT1* 和 *slnTII* 在白色链霉菌 XM211 中串联超量表达后,造成基因簇中其它基因转录水平的提

高,并提高了盐霉素的产量。但 LJ05 较出发菌株白色链霉菌 XM211 盐霉素含量下降了 47.7%,说明载体 pPM927 的整合对盐霉素的产生有较大的影响,具体原因目前尚不清楚。

2.4 *slnT1* 和 *slnTII* 的异源表达对宿主的盐霉素抗性影响

为了探究 *slnT1* 和 *slnTII* 与盐霉素抗性之间的关系,将 *slnT1* 和 *slnTII* 进行了异源表达。将含有 *slnT1* 和 *slnTII* 的串联表达载体 pLQ23 及载体 pPM927 通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移分别导入变铅青链霉菌 1326 中。利用引物 Tsr-F/R 进行验证,筛选能够扩增出 0.7 kb 的硫链丝菌素抗性基因片段的菌株,得到 *slnT1* 和 *slnTII* 异源表达菌株 LJ04 及载体对照菌株 LJ06。

将白色链霉菌 XM211、LJ04 及载体对照菌株 LJ06 接种至含有不同浓度盐霉素的液体培养基中,发现 LJ04 对盐霉素的最大耐受浓度为 0.625 mmol/L,载体对照菌株 LJ06 对盐霉素最大耐受浓度为 0.5 mmol/L,而盐霉素产生菌白色链霉菌 XM211 在 0.625 mmol/L 浓度下生长状况良好。因此, *slnT1* 和 *slnTII* 异源表达菌株 LJ04 对盐霉素的抗性只有微弱的增强,说明它们可能不是白色链霉菌 XM211 的主要盐霉素抗性基因。

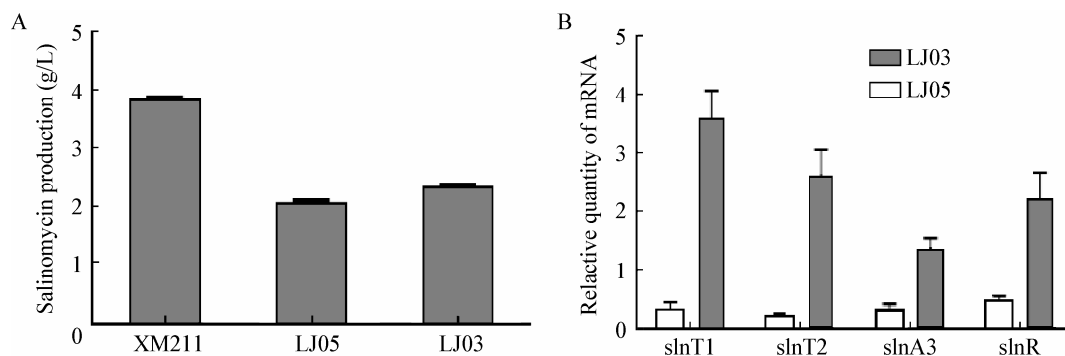


图3 白色链霉菌 XM211、载体对照菌株 LJ05 及 LJ03 的摇瓶发酵产量(A)及 LJ03 和 LJ05 中 *slnT1*、*slnTII*、*slnA3*、*slnR* 的转录水平(B)

Figure 3 Salinomycin production of *S. albus* XM211, LJ05 and LJ03 (A) and real-time qPCR analysis of the expression of *slnT1*, *slnTII*, *slnA3* and *slnR* in LJ03 or LJ05 (B)

3 讨论

根据生物信息学的分析, *SlnTI* 和 *SlnTII* 是与抗生素外排相关的 ABC 转运蛋白。*slnTI* 编码的 ATP 结合亚基可能与 *slnTII* 编码的跨膜亚基形成同源二聚体后成为有功能的 ABC 转运蛋白, 从而负责盐霉素或其中间产物的外排。与出发菌株相比, *slnTI* 和 *slnTII* 的突变株 LJ01 和 LJ02 中盐霉素产量有显著的下降。同时, *slnTI* 和 *slnTII* 的串联超量表达菌株 LJ03 的盐霉素产量有明显提高。根据上述结果, 基本可以确定 *SlnTI* 和 *SlnTII* 与盐霉素或者其代谢中间物的外排相关。

与野生型盐霉素产生菌 XM211 相比, 在 *slnTI* 和 *slnTII* 突变株 LJ01 和 LJ02 中, 结构基因 *slnA3* 和调节基因 *slnR* 的转录水平都有不同程度的下降。而且, 相比载体对照菌株 LJ05, 在超量表达菌株 LJ03 中, 除了目的基因 *slnTI* 和 *slnTII* 的转录水平明显提升外, *slnA3* 和 *slnR* 的转录水平也有一定程度的提高。这暗示 *slnTI* 和 *slnTII* 突变后, 盐霉素外运能力下降, 胞内盐霉素浓度升高, 从而反馈抑制调节基因和结构基因的转录; 当 *slnTI* 和 *slnTII* 超量表达时, 盐霉素外运能力加强, 胞内盐霉素浓度降低, 解除了对结构基因和调节基因的抑制, 从而提高了它们的转录水平并最终提高盐霉素产量。

slnTI 和 *slnTII* 异源表达变铅青链霉菌 LJ04 与载体对照菌株 LJ06 相比, 盐霉素抗性并没有显著的增加。进一步对比盐霉素产生菌白色链霉菌 XM211 的抗性水平, 我们推测白色链霉菌 XM211 的主要盐霉素抗性基因可能不是 *slnTI* 和 *slnTII*, 而是染色体上的其它基因, 这需要进一步深入研究。

许多天然产物生物合成基因簇中或者邻近区

域都有 ABC 转运蛋白的存在, 可能与相应天然产物的外排、抗性有关。本研究证明, 通过超量表达特定的 ABC 转运蛋白基因可以提高抗生素的产量, 为定向构建抗生素的高产菌株提供了新策略。

参考文献

- [1] Miyazaki Y, Shibuya M, Sugawara H, et al. Salinomycin, a new polyether type antibiotic[J]. Journal of Antibiotics, 1974, 27(11): 814-821.
- [2] 徐奇友, 许红. 盐霉素及其在饲料中的应用[J]. 饲料博览, 2002(6): 31-32.
- [3] 佟建民, 沈建忠. 饲用抗生素研究与应用[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 1-17.
- [4] Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening[J]. Cell, 2009, 138(4): 645-659.
- [5] Jiang C, Wang H, Kang Q, et al. Cloning and characterization of the polyether salinomycin biosynthesis gene cluster of *Streptomyces albus* XM211[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(4): 994-1003.
- [6] Dean M. The genetics of ATP-binding cassette transporters[J]. Methods in Enzymology, 2005, 400: 409-429.
- [7] Locher KP. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2009, 364: 239-245.
- [8] Qiu J, Zhou Y, Zhu D, et al. Overexpression of the ABC transporter AvtAB increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(2): 337-345.
- [9] van den Berg MA, Albang R, Albermann K, et al. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26, 1161-1168.
- [10] Ostash I, Rebets Y, Ostash B, et al. An ABC transporter encoding gene *lndW* confers resistance to landomycin E[J]. Archives of Microbiology, 2008, 190(1): 105-109.
- [11] Kieser HM, Kieser T, Hopwood DA. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(17): 5496-5507.
- [12] Paget M, Chamberlin L, Atrih A, et al. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(1): 204-211.