

除虫链霉菌 10 个聚酮类抗生素生物合成基因簇的敲除对阿维菌素产量的影响

胡敏杰 夏海洋* 覃重军*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 合成生物学重点实验室 上海 200032)

摘要:【目的】考察除虫链霉菌基因组中其它聚酮合成酶类(Polyketide synthase, PKS)抗生素生物合成基因簇的敲除突变对于阿维菌素产量的影响。【方法】构建了 11 个 PKS 基因簇的打靶 Cosmid 和质粒载体, 导入除虫链霉菌中筛选突变株。【结果】在工业菌株 MMR630 中成功敲除了 10 个 PKS 基因簇。发酵结果显示 7 个 PKS 基因簇敲除突变株中阿维菌素的产量均有不同程度的提高, 而 2 个突变株不能产生阿维菌素。然而, 在 3 个连续敲除 2 个 PKS 基因簇的突变株中阿维菌素产量没有能够超过单个 PKS 敲除突变株的提升幅度。【结论】除虫链霉菌基因组的一些 PKS 基因簇的敲除可以提高阿维菌素的产量, 同时暗示同一类次生代谢产物的代谢流之间存在复杂的相互作用关系。

关键词: 除虫链霉菌, 聚酮类抗生素生物合成基因簇, 基因敲除, 工业菌株

Effects on productivity of avermectin by knockout of 10 polyketide biosynthetic gene clusters in *Streptomyces avermitilis* genome

HU Min-Jie XIA Hai-Yang* QIN Zhong-Jun*

(Key Laboratory of Synthetic Biology, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: [Objective] We studied whether avermectin productivity could be affected by other polyketide biosynthetic gene clusters in *Streptomyces avermitilis* genome. [Methods] By constructing gene knock-out cosmids or plasmids and introducing into industrial host, 10 mutants were obtained after screening double crossover colonies from conjugants of each polyketide gene clusters knocked-out vectors. [Results] Avermectin productivities of seven polyketide null mutants were higher than that of the starting strain. Two mutants abolished avermectin production. Three mutants with combined knock-out of two of three strong effect clusters had no further increase on avermectin productivity. [Conclusion] Deletions of some polyketide gene clusters can be used to increase avermectin productivities in *Streptomyces avermitilis*. The results also suggested that there were interweaved networks among these polyketide gene clusters in *Streptomyces avermitilis*.

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA022100, 2012AA021703); 中科院知识创新工程项目(No. KSCX2-EW-G-13)

*通讯作者: 夏海洋: Tel: 86-21-54924143; 信箱: hyxia@sibs.ac.cn

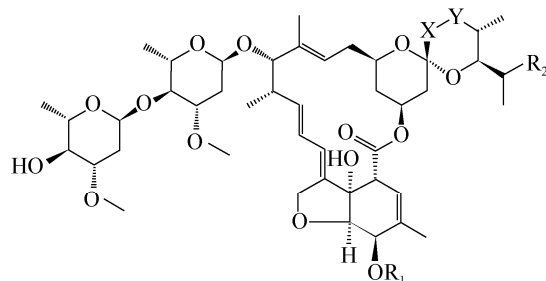
覃重军: Tel: 86-21-54924171; 信箱: qin@sibs.ac.cn

收稿日期: 2013-08-28; 接受日期: 2013-10-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-29

Keywords: *Streptomyces avermitilis*, PKS gene cluster, Gene knock-out, Industrial strain

除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)产生的十六元大环内酯化合物阿维菌素(Avermectin, 图 1), 以及重要的衍生物如依维菌素(Ivermectin)和多拉菌素(Doramectin), 被广泛用于防治动植物的线虫类和节肢动物类害虫, 是主要的生物农药和兽药品种之一, 有很好的市场前景^[1-2]。2003 年 Ikeda 等^[3]报道了除虫链霉菌全基因组的测序和分析, 发现除了阿维菌素生物合成基因簇外, 还预测编码其它 11 种聚酮合成酶类(Polyketide synthase, PKS)抗生素生物合成基因簇, 大小从 2 kb 的 III 型聚酮合成基因簇 RPP 到 104 kb 的寡霉素(OLM)生物合成基因簇, 基因数从 2 到 18 个不等。由于聚酮化合物生物合成途径利用相同或者类似的前体, 因此, 推测不同的聚酮合成途径之间可能存在竞争关系。

在前期工作中, 夏海洋等构建了有序排列的除虫链霉菌 NRRL8165 基因组文库, 并在工业生产菌株中建立了高效的基因敲除系统^[4]。本研究在工业菌株 MMR630 中分别敲除阿维菌素生物合成基因簇以外的 10 个 PKS 基因簇, 并检测所构建的各个突变株中阿维菌素发酵产量的变化。



	R ₁	R ₂	X-Y
Avermectin Ala	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=CH
Alb	CH ₃	CH ₃	CH=CH
A2a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
A2b	CH ₃	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)
B1a	H	C ₂ H ₅	CH=CH
B1b	H	CH ₃	CH=CH
B2a	H	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
B2b	H	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)

图 1 阿维菌素化学结构

Figure 1 The chemical structure of avermectin

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 和 ET12567 为本实验室保存菌株。阿维菌素的工业菌株 MMR630 由浙江海正药业集团公司生物技术中心提供。构建有序排列的除虫链霉菌 NRRL8165 基因组文库的载体为 SuperCos-1^[4], 进行基因敲除的质粒 pIJ773 和 pIJ778 以及携带 λ -Red 重组系统的大肠杆菌 BW25113 (pIJ790)等^[5]由英国约翰·英纳斯研究中心(John Innes Center) Hopwood 教授提供。

1.2 培养基、试剂和 DNA 基本操作

链霉菌培养和遗传操作参照文献[6], 阿维菌素发酵培养基参照文献[1]。大肠杆菌培养、转化和质粒提取等参照文献[7]。大肠杆菌和链霉菌进行接合转移的方法参照文献[6]。所用抗生素如卡那霉素、氯霉素和阿泊拉霉素购于 Sigma 公司, 所用生化试剂购于上海生物工程公司, 所用酶类购于 MBI 和 TaKaRa 公司。

1.3 构建 PKS 生物合成基因簇打靶的 Cosmid 和质粒载体

在前期的工作中, 本实验室利用 SuperCos1 构建了除虫链霉菌 NRRL8165 有序排列的 Cosmid 文库^[4]。为敲除基因组中除了阿维菌素之外的 11 个 PKS 基因簇, 采取两种方法: 对于能被 Cosmid 所覆盖的基因簇, 利用 PCR 打靶删除 Cosmid 上的 PKS 基因簇序列^[4]。对于大于一个 Cosmid 插入容量(约 40 kb)的 PKS 基因簇(如 OLM), 以及 Cosmid 文库中没有完全覆盖的基因簇(如 PKS9), 构建载体 pHY-642 (图 2), 将敲除基因簇两端的同源序列连同阿泊拉霉素抗性基因 *aac(3)IV* 克隆该质粒的多克隆位点。采用经典的链霉菌基因中断和置换的方法^[6], 筛选发生双交换的突变株, 通过 PCR 扩增和测序验证基因簇敲除突变株。所用 PCR 扩增引物序列见表 1。

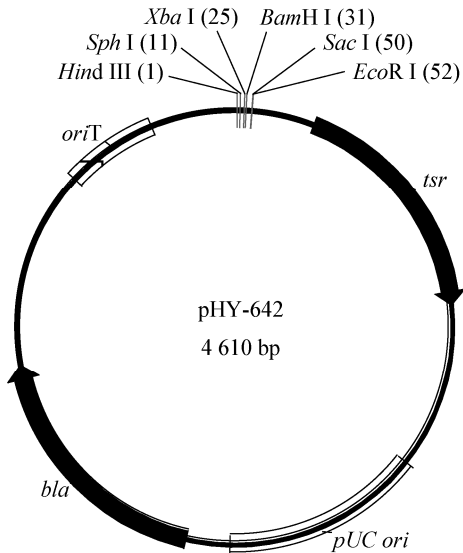


图 2 质粒 pHY-642 的物理图谱
Figure 2 Physical map of plasmid pHY-642

1.4 利用高效液相色谱(HPLC)测定阿维菌素的含量

除虫链霉菌发酵液中的菌丝体用甲醇浸泡过

夜，离心取上清液。利用 HPLC 测定阿维菌素含量的条件是：流动相为甲醇:水=85:15；流速为 1 mL/min；检测波长 246 nm。

2 结果与讨论

2.1 构建 PKS 生物合成基因簇打靶 Cosmid/质粒载体和敲除突变株的筛选

采取两种方法构建了阿维菌素之外的 11 个 PKS 基因簇的打靶 Cosmid 和质粒载体。将这些打靶载体通过接合转移导入到除虫链霉菌 MMR630 工业菌株中，筛选发生双交换的突变株。表 2 的结果显示，除 PKS8 以外，其它 10 个 PKS 生物合成基因簇均能被成功敲除。推测工业菌株 MMR630 经过了多轮诱变，在 PKS8 基因簇所在区域可能发生了突变或缺失。不同 PKS 基因簇的敲除效率差别较大(12.5%–96%)，打靶质粒的两个同源交换臂的长度小至 3.6 kb 也能高效敲除约 100 kb 的寡霉素基因簇序列。

表 1 构建打靶载体所用的引物		
Table 1 Primers for construction of targeting vectors		
基因簇	引物序列	
Gene clusters	Primer sequences (5'→3')	
PKS1	F	GTACGTCGATGCCGTTCAACCGCAGGGTCGCCACCGTCAATTCCGGGGATCCGTCGACC
	R	GCACCGCCCGGGACGTCGAACGATCGTCGGTCACAACATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
PKS2	F	GCGCCGGCCTGGTGGTGGAGTCGGTCGTCCTGAAGATCAATTCCGGGGATCCGTCGACC
	R	TGGGTGCCGCGGTCCGCGGTGATGGCTCGTGCGTTCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
PKS3	F	GCAGATCTGCGCAGGGAGACGAACGCGTCGGGCCCCGGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	R	AGGCCCGCGCCGCGCGCCCTTGGGCGCTCAGCGGGGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC
PKS4	F	CCGGGGCCGCGGTGAGCGTCCGAGGAGCGGCCTCGGTCAATTCCGGGGATCCGTCGACC
	R	CGCCATCCGCGTAATTGCGAGACTAGAAGGGGATCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
PKS5	F	CAGGCCGACTTGGAGCGCCCCGAGACCCTGCCCGCGGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC
	R	CCTCGATCCATCCCCGTGCTTTCGCGGGGCGGTGACTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
PKS8	F	GCCGCCTGCGACGGCGCCCCGCGCACGCGCGCTCAATTCCGGGGATCCGTCGACC
	R	AATGATCGCTCGGCGATCGAATTGAGTCGGTCTCGGGTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
PKS9	Left-F	TTCTCTAGAATGACAGCGGAATCTCACTCTG
	Left-R	GGCGCTAGCCGTGGACGGCTCACCAAGGA
	Right-F	CCAGGATCCGGGGCATGTCGATCTCGTGA
	Right-R	ACCGAATTCGCGTAAAGGAGTCCGGAACCTT
PKS11	F	CTCCCGCTCCAGCCACCCGACCCAGGAAGGCTCTCATGATTCGGGGATCCGTCGACC
	R	CGCCCCGAACGGCGGGTGTACGCCGAGGGGTGCCCTTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
OLM	Left-F	CGGAAGCTTTCCTCGAGGGACTCACCGAC
	Left-R	GAGGGATCCTGAGAGCGCTCCAGTTCCC
	Right-F	TGCGGATCCCCATAGAACCTTTCGTGCTA
	Right-R	TACGAATTCAACTCGGCGTCCATGTGGAT
RPP	F	GCACGAGGAGTCCTTCGGTGGCCGTCATGAGCCCCGCTCAATTCCGGGGATCCGTCGACC
	R	ACGAAGAGTCCTCCGGAAGGCGAAAGAAGGTCCTCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
PTE1	F	CGACGAACGTGGTCACGCCCAGCTCGTGCAGGGTGTGCAATTCCGGGGATCCGTCGACC
	R	GCCACACCCGCGTCGCCAGAACTCCCGACCTGCGCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

表 2 除虫链霉菌基因组中 11 个 PKS 生物合成基因簇敲除的统计数据				
Table 2 Statistical data of the knocking-out eleven PKS gene clusters in <i>S. avermilitis</i> genome				
PKS 基因簇 Gene cluster	敲除片段长度 Deletion lengths (bp)	基因组缺失区域 Deletion regions	打靶载体两个交换臂长度 Lengths of the two arms of targeting vector (bp)	双交换克隆子数目 Clones of double crossover (%)
PKS1	13 321	8 777 771–8 791 091	20 551/7 471	4/14 (28.6%)
PKS2	20 015	1 893 268–1 913 282	56 33/14 389	5/22 (22.7%)
PKS3	6 919	2 800 640–2 807 558	4 039/28 526	12/30 (40%)
PKS4	7 999	8 553 604–8 561 602	6 701/28 863	7/50 (14%)
PKS5	16 469	2 877 943–2 894 411	18 437/10 020	11/32 (34.4%)
PKS8	16 240	4 527 903–4 544 142	11 277/15 927	0/250 (0)
PKS9	16 136	2 897 380–2 913 515	4 002/4 037	8/30 (26.7%)
PKS11	5 230	113 363–118 592	24 015/6 960	4/32 (12.5%)
OLM	100 063	3 534 528–3 634 591	3 598/3 743	48/50 (96%)
RPP	2 274	8 490 209–8 492 482	18 975/17 948	23/38 (60.5%)
PTE1	21 225	546 803–568 027	4 033/14 859	5/10 (50%)

2.2 单个 PKS 生物合成基因簇的敲除对于阿维菌素产量的影响

对成功敲除的 10 个 PKS 生物合成基因簇的突变株，分别检测了发酵阿维菌素产量的变化。图 3 的结果显示，与出发菌株 MMR630 相比，7 个 PKS 基因簇(PKS1、PKS3、PKS4、PKS9、RPP、OLM 和 PTE)敲除菌株中阿维菌素的产量均有不同程度的提高，其中在 PKS3 和 PTE 突变株中提高超过 40%。PKS11 生物合成基因簇敲除后阿维菌素的产量下降。很意外的是敲除 PKS2 和 PKS5 的突变菌株不能产生阿维菌素。所有突变株发酵培养的生物量与出发菌株 MMR630 均无明显差异。

2.3 连续敲除两个 PKS 生物合成基因簇对于阿维菌素产量的影响

选取发酵阿维菌素产量明显提高的 3 个 PKS 基因簇(PKS3、OLM 及 PTE1)敲除突变株，进行两两组合的双敲除。对于 OLM/PKS3、PTE1/PKS3 与 OLM/PTE1 基因簇敲除的 3 个突变株进行了发酵。图 4 的结果显示，与单个 PKS 基因簇敲除菌株相比，两个 PKS 基因簇敲除的突变株，其阿维菌素产量的提升幅度没有能够超过单敲除后产量的提升幅度，而 PTE1/PKS3 双敲除突变株的产量还低于 MMR630 菌株，这些菌株发酵培养的生物量无明显差异。

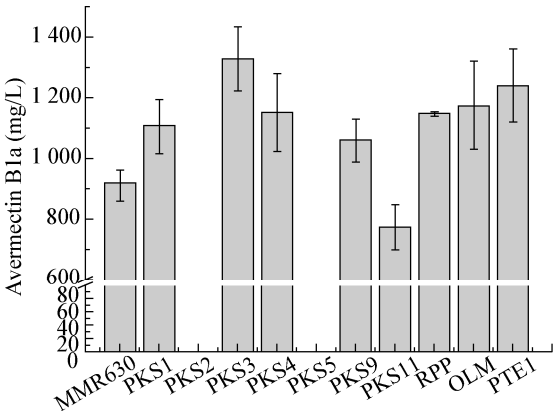


图 3 除虫链霉菌 PKS 基因簇敲除菌株中阿维菌素的产量
Figure 3 Avermectin productivity of the PKS knockedout strains

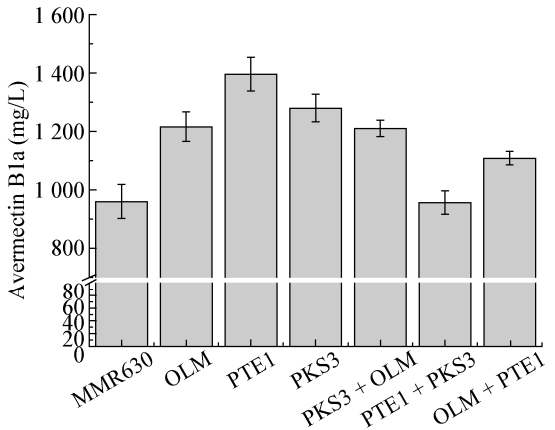


图 4 连续敲除 PKS 基因簇菌株的阿维菌素的产量
Figure 4 Avermectin productivity of the PKS sequentially knocked-out strains

这些结果暗示链霉菌抗生素的合成代谢受到复杂的调控,同一类次生代谢产物的代谢流之间存在相互影响,构成了复杂的网络关系,而不能用简单的加法或者减法来进行产量的累积计算。分析各聚酮生物合成基因簇在除虫链霉菌染色体上的位置(图 5),聚酮基因簇对阿维菌素生物合成影响位置效应不明显,不产生阿维菌素的两个突变株敲除基因簇(*pks2* 和 *pks5*)均位于阿维菌素生物合成基因簇一侧,并且位于阿维菌素生物合成基因簇和寡霉素生物合成基因簇之间。从基因簇的类型来看,各类型的 PKS 生物合成基因簇均可能影响阿维菌

素的合成。

对所有 I 型聚酮合成基因簇的部分基因进行聚类分析(图 6),很明显 3 个大的聚酮合成基因簇更加相似,因此 *ave*、*olm*、*pte* 三个基因簇之间存在明显的竞争关系。Zhang 等研究显示完整的阿维菌素生物合成基因簇能够在天蓝色链霉菌中少量合成阿维菌素^[8]。而本试验 *pks2* 和 *pks5* 基因簇分别敲除的突变菌株均未检测到阿维菌素合成,但能检测到少量寡霉素 A 合成(图 7),推测 *pks2* 和 *pks5* 基因簇的合成产物可能参与调控激活阿维菌素的合成,抑制寡霉素合成。至于何种调控方式还需进一步研究。

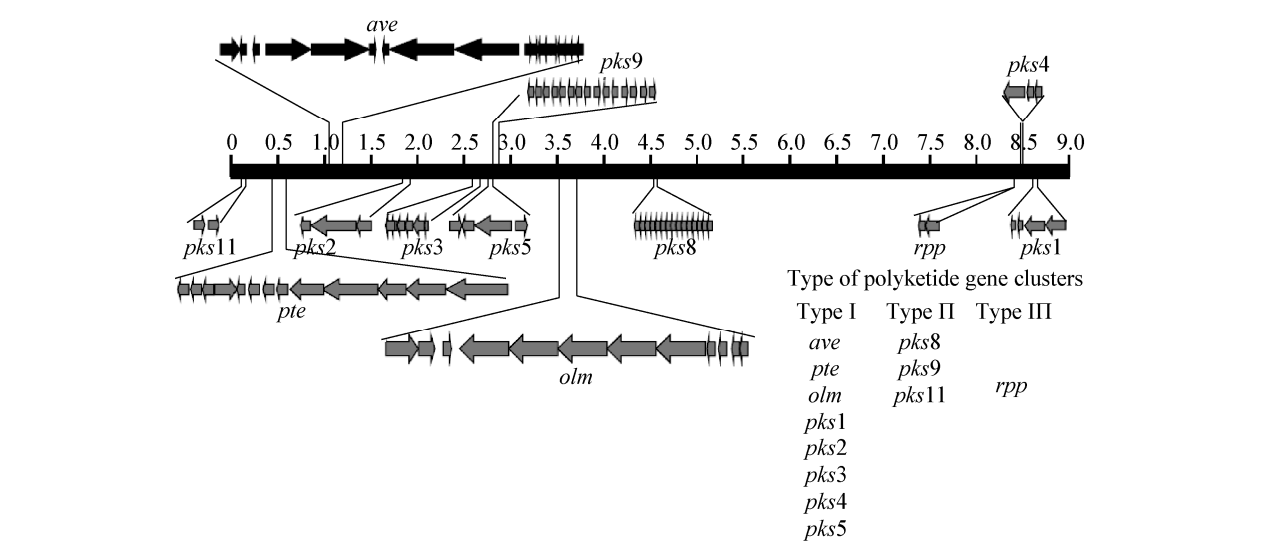


图 5 除虫链霉菌中聚酮合成基因簇的种类及其在染色体上的分布

Figure 5 The types and distribution of polyketide biosynthetic gene clusters on chromosome of *Streptomyces avermitilis*

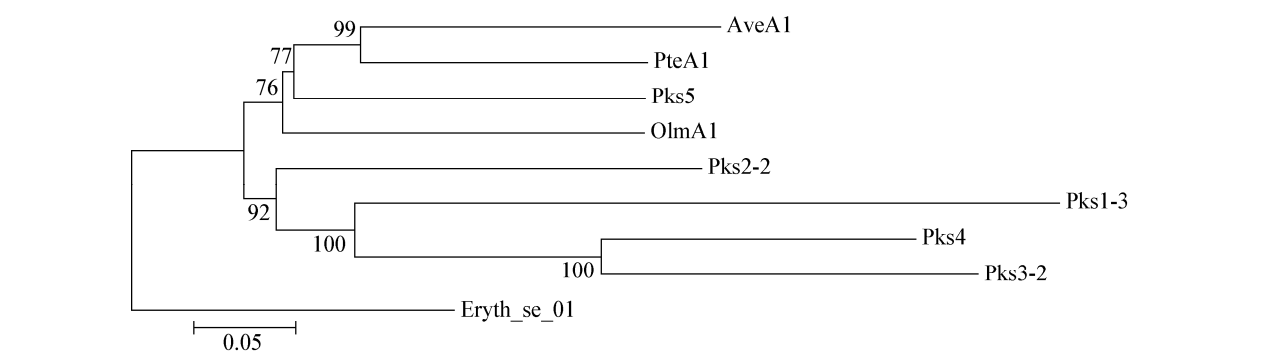


图 6 除虫链霉菌中 I 型聚酮合成基因簇部分基因编码蛋白进化分析

Figure 6 Phylogenetic analysis of amino acid sequence of the type-I polyketide synthases from *Streptomyces avermitilis*

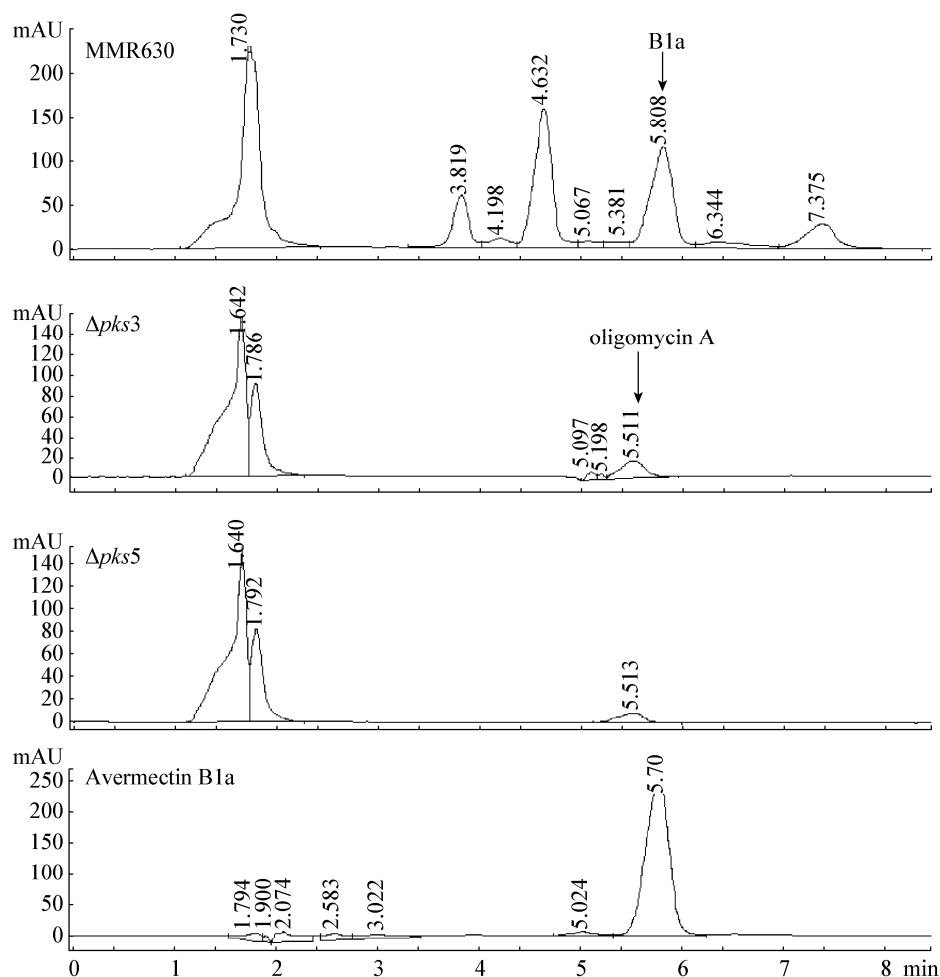


图7 部分突变菌株发酵产物液相色谱图

Figure 7 HPLC chromatograph of products of mutants

参考文献

- [1] Burg RW, Miller BM, Baker EE, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1979, 15(3): 361-367.
- [2] 徐汉虹, 梁明龙, 胡林. 阿维菌素类药物的研究进展[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(1): 1-6.
- [3] Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(5): 526-531.
- [4] 夏海洋, 黄隽, 胡敏杰, 等. 构建有序排列的除虫链霉菌基因组的柯斯文库用于工业生产菌株的遗传改造[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(7): 340-343.
- [5] Gust B, Challis GL, Fowler K, et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [6] Kieser T, Bibb MJ, Buttner M, et al. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Zhang R, Xia H, Xu Q, et al. Recombinational cloning of the antibiotic biosynthetic gene clusters in linear plasmid SCP1 of *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. FEMS Microbiology Letters. 2013, 345(1): 39-48.