

研究报告

海洋来源链霉菌 OUCMDZ-3434 中 *wblA* 基因的功能

林筱钰 刘增智 侯路宽 刘晶 李花月 朱伟明 李文利*

(中国海洋大学医药学院海洋药物教育部重点实验室 山东 青岛 266003)

摘要:【背景】*Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 分离自山东青岛栈桥浒苔样品, 其次级代谢产物 Wailupemycin 类化合物具有良好的 α -糖苷酶抑制活性, 但产量很低, 影响了其进一步研发。【目的】建立海洋来源链霉菌 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 菌株的遗传转化系统, 通过阻断全局性调控基因 *wblA* 探究 Wailupemycin 类化合物产量变化。【方法】以 pSET152 为载体, 采用大肠杆菌-链霉菌属间接接合转移策略建立了 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 的遗传转化方法。采用 PCR-Targeting 策略构建了 *wblA* 基因阻断突变株, 通过 HPLC 分析野生型和突变株发酵产物的差异并对表型差异进行显微形态观察。【结果】建立了 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 遗传转化系统, 构建了 *wblA* 基因阻断突变株, 与野生株相比, 突变株发酵产物中 Wailupemycin G 产量提高了 3 倍, 同时丧失了产生孢子的能力。【结论】在 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 中 *wblA* 对 Wailupemycin 类化合物生物合成起到了负调控作用, 同时参与调控孢子形成, 本研究为采用遗传改造策略提高 Wailupemycin G 产量提供了参考。

关键词: *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434, 接合转移, PCR-Targeting, 基因失活

Functions of the *wblA* gene in marine-derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434

LIN Xiao-Yu LIU Zeng-Zhi HOU Lu-Kuan LIU Jing LI Hua-Yue
ZHU Wei-Ming LI Wen-Li*

(Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry Education of China, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: [Background] *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 was isolated from *Enteromorpha prolifera* collected from the Zhanqiao Beach, Qingdao, Shandong, and it produced wailupemycins with good α -glycosidase inhibitory activity, but at very low yield. [Objective] To develop the genetic system of marine-derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 and investigate the role of *wblA* gene on wailupemycins production. [Methods] *Escherichia coli*-*Streptomyces* intergeneric conjugation manipulation was established for *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 using pSET152. *wblA* gene was inactivated by using PCR-targeting strategy. After confirmation by PCR, the fermentation broths of

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81561148012)

***Corresponding author:** Tel: 86-532-82031813; E-mail: liwenli@ouc.edu.cn

Received: June 01, 2018; **Accepted:** June 08, 2018; **Published online** (www.cnki.net): July 17, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(81561148012)

***通信作者:** Tel: 86-532-82031813; E-mail: liwenli@ouc.edu.cn

收稿日期: 2018-06-01; **接受日期:** 2018-06-08; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-07-17

the wild-type and mutant strains were analyzed by HPLC, and morphological differentiation was observed by using phase contrast microscope. **[Results]** The conjugation method for *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 was established and the *wblA* gene inactivation mutant was constructed. The yield of wailupemycin G in the *wblA* inactivation mutant was increased by 3-fold compared to that of the wild-type strain. Additionally, the *wblA* gene mutant lost the ability of sporulation. **[Conclusion]** The *wblA* gene in *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 negatively regulates the biosynthesis of wailupemycins and is involved in regulation of sporulation as well. These results laid the foundation for yield improvement of wailupemycins by genetic manipulation.

Keywords: *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434, Intergeneric conjugation, PCR-Targeting, Gene inactivation

海洋链霉菌凭借其巨大的生物合成潜力在微生物种群中占据重要地位,其次级代谢产物具有多种生物活性,如抗菌、抗肿瘤以及抗氧化活性等^[1]。*Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 是一株分离自山东青岛栈桥浒苔样品的海洋链霉菌,其发酵产物中含有类型丰富的 Wailupemycin 类化合物,其 α -糖苷酶抑制活性明显优于阿卡波糖^[2],但产量较低,影响了其进一步开发应用。

链霉菌具有复杂的发育及形态分化过程,能够产生多种次级代谢产物,为了适应生长环境中温度、pH 值、营养条件等变化,链霉菌需要复杂的调控网络对外界环境变化做出反馈^[3]。调控因子对基因表达的调控作用主要分为途径特异性调控以及全局性调控两种。途径特异性调控基因通常位于次级代谢产物生物合成基因簇中,对该基因簇编码产物的合成具有调控作用^[4]。全局性调控基因大多位于基因簇外,能够将对外界环境反馈的信号传递给不同的途径特异性调控基因,从而调控多个代谢途径^[5]。在全局性调控基因中,WhiB-like (Wbl)家族的 *wblA* 在不同的链霉菌中参与了多种次级代谢产物的生物合成以及形态分化的调控^[6]。例如,在天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)中 *wblA* 是一个负调控因子,阻断 *wblA* 基因后,放线紫红素 Actinorhodin 的产量增多,突变株的气生菌丝变为红色,产孢能力减弱^[7];通过阻断 *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66 中的 *wblA_{so}* 基因,一个 III 型 PKS 生物合成基因簇被激活,在该突变株中分离到了具有抗耐

甲氧西林金黄色葡萄球菌活性的次级代谢产物——Violapyrone B,并且该突变株丧失了产生孢子的能力^[8]。

在我们的前期研究中,通过对 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 全基因组测序及生物信息学分析,发现其基因组中含有一个 *wblA* 基因,推测该基因对 OUCMDZ-3434 的次级代谢产物具有调控作用。为进一步明确其功能,实验建立了 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 的遗传转化系统,并通过敲除其 *wblA* 基因,研究了 *wblA* 基因对 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 次级代谢与形态分化的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株、质粒及其特性参见表 1。*Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 分离自山东青岛栈桥浒苔样品^[2]。大肠杆菌 ET12567/pUZ8002^[10]和 *E. coli* BW25113/pIJ790^[11]为常用工程菌。

1.2 培养基

常用培养基 LB、TSBY、MS 配方参见文献^[11]。发酵培养基(g/L):可溶性淀粉 10.0,酵母膏 10.0,葡萄糖 20.0,牛肉膏 3.0,玉米膏 4.0, KH_2PO_3 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCO_3 2.0,海水素 30.0,调节 pH 值至 7.0。

1.3 主要试剂和仪器

Taq 聚合酶, TIANGEN 公司; DNA 胶回收试剂盒, OMEGA 公司;阿普拉霉素(Apramycin, Apr)、卡那霉素(Kanamycin, Km)、萘啶酮酸(Nalidixic

表 1 本研究中用到的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strain/plasmids	相关特性 Correlation characteristics	来源或参考文献 Reference or source
<i>Streptomyces</i> sp. OUCMDZ-3434	野生株	[2]
LX01	OUCMDZ-3434 wild type strain	本研究 This study
LX02	野生株含有 pSET152 质粒	
	OUCMDZ-3434 harboring pSET152	
DH5 α	<i>wblA</i> 双交换阻断突变株	本研究 This study
BW25113	OUCMDZ-3434 <i>wblA</i> gene inactivation mutant	
ET12567	<i>supE44</i> , <i>AlacU69</i> (Ψ 80 <i>lacZ</i> AM15), <i>hsdR17</i> , <i>recA</i> , <i>endA1</i>	Stratagene
pIJ773	K12 derivative: Δ <i>araBAD</i> , Δ <i>rhaBAD</i>	[9]
pSET152	(<i>dam</i> - <i>dcm</i> - <i>hsdM</i>), Cm ^R	[9]
WB	<i>aac(3)IV</i> (Apr ^R), <i>oriT</i>	[10]
WB Δ <i>wblA</i>	<i>aac(3)IV</i> , <i>int</i> , <i>oriT</i> , <i>attP</i>	[10]
	含有 <i>wblA</i> DNA 片段的 Cosmid	本研究 This study
	Cosmid harboring <i>wblA</i>	
	WB 中 <i>wblA</i> 基因被 Apr ^R 取代的重组 Cosmid	本研究 This study
	WB with <i>wblA</i> replaced by Apr ^R	

Acid, NA)、氯霉素(Chloramphenicol, Cm)、氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)、四环素(Tetracycline, Tet)、硫链丝菌素(Thio)等, 生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 引物合成和测序工作由青岛擎科梓熙生物技术有限公司完成, 本研究所使用的引物见表 2。化合物 Wailupemycin G 标准品由中国海洋大学朱伟明老师实验室提供。生化培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 冷冻离心机, Thermo 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 抗生素敏感性试验

将 Apr、Km、NA、Cm、Tet 等多种抗生素分别配置成储备浓度, 取一定量加入到 MS 固体培养基中, 在含有不同浓度抗生素的培养基上培养 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434, 每个浓度做 3 个平行对照, 置于 30 °C 培养箱中培养 3-5 d 观察菌株的生长情况。

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Primer pairs used in this study

引物 Primer pairs	序列 Sequence (5'→3')	描述 Description
WBSF	GACGACGAGTCCATCAACAACG	基因文库筛选引物 Primers for gene library screening
WBSR	GCCGACTCCTGTTCTACTGC	
APRF	GTGCAATACGAATGGCGAA	<i>aac(3)IV</i> 验证引物 Primers for <i>aac(3)IV</i> confirmation
APRR	TCAGCCAATCGACTGGCG	
WBMF	GCAGCCGCGCGTAGACCTCGCGGTCGTCGGGTCAGTGATTCCGGGGATCCGTCGACC	<i>wblA</i> 阻断引物
WBMR	CGAGCGCTTGTTCCTCCATGAGAGGCAGCCTAATCCGTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Primers for <i>wblA</i> gene inactivation
WBCF	ATGAGAGGCAGCCTAATCCGTC	<i>wblA</i> 突变株验证引物 Primers for <i>wblA</i> mutant verification
WBCR	GCTCTAGACTAGCCGACGGCG	

1.4.2 大肠杆菌与 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 属间接转移方法建立

属间接转移具体操作参考文献[10]。转接 ET12567/pUZ8002/pSET152 菌株于添加 100 $\mu\text{g/mL}$ Km、25 $\mu\text{g/mL}$ Cm、25 $\mu\text{g/mL}$ Tet 和 50 $\mu\text{g/mL}$ Apr 的 50 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.6, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 LB 液体培养基等体积洗涤 2 次, 收集菌体悬浮于 200 μL LB 液体培养基中备用。刮取生长在 MS 固体培养基上的 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 链霉菌孢子, 悬浮于 1 mL TSBY 液体培养基中热激, 30 $^{\circ}\text{C}$ 萌发后与大肠杆菌混合涂布于 MS 固体培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12–24 h 后覆盖 NA 25 $\mu\text{g/mL}$ 和 Apr 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 3–5 d, 通过抗生素筛选到正确的接合子后将其转接到 MS 固体平板上培养。接合转移效率=(接合子数 \times 稀释倍数)/孢子数。

1.4.3 *wblA* 基因阻断突变株的构建及验证

本研究中基因阻断采用的是 PCR-Targeting 方法^[11]。从接合转移平板上挑取接合子分别对应接种在只含有 Apr 的 MS 单抗平板和含有 Apr 和 Km 的 MS 双抗平板上, 目的基因被成功替换的基因阻断突变株会在单抗平板上生长, 在双抗平板上不生长。提取双交换基因阻断突变株的基因组 DNA, 进一步用基因敲除验证引物进行 PCR 验证, 若 *wblA* 基因被成功替换则 PCR 产物片段大小为 1.7 kb, 若 *wblA* 基因未被替换则 PCR 产物片段大小为 1.1 kb。

1.4.4 Wailupemycin G 标准曲线的确立

配制 10 mg/mL Wailupemycin G 甲醇溶液, 用甲醇将其进行梯度稀释后 HPLC 分析, 使 Wailupemycin G 的进样量分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 μg , 根据不同进样量相对应的峰面积建立标准曲线。

1.4.5 基因阻断突变株发酵高效液相色谱及质谱检测

刮取适量成熟孢子接种至发酵培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 8 d, 发酵后离心分离上清和菌体。菌体用丙酮浸泡, 超声辅助裂解后低压

蒸干; 上清发酵液用等体积乙酸乙酯萃取 2 遍, 低压蒸干。将 2 种蒸干产物混合以 1.5 mL 甲醇溶解, 经 0.22 μm 滤膜过滤进行 HPLC 分析。HPLC 系统为 Agilent 1260 Infinity, 检测器为 1260 DAD VL, 质谱仪型号为 Q-TOF Ultima Global GAA076, 色谱柱为 YMC-PACK ODS-AQ C-18 (5 μm 、12 nm、150 mm \times 4.6 mm), 流动相为 A 相: 甲醇(0.1 %甲酸); B 相: ddH₂O (0.1 %甲酸), 流速为 1 mL/min。HPLC 程序: 0–5 min, A 相 20%, B 相 80%; 5 min–45 min, A 相由 20%梯度增加至 100%, B 相由 80%降至 0; 45 min–55 min, A 相 100%清洗色谱柱。

1.4.6 常规分子生物学操作

大肠杆菌感受态的制备、转化和链霉菌 DNA 的提取参照文献[12]进行, 质粒抽提采用碱裂解法。电转化条件为 2.5 kV, 5 ms。接合转移方法建立验证 PCR 条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。*wblA* 基因阻断突变株验证 PCR 条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

2 结果与分析

2.1 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 遗传转化系统的建立

2.1.1 抗生素敏感性实验

首先对 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 进行抗生素敏感性测定。结果显示, OUCMDZ-3434 对 Amp 和 NA 不敏感, 在抗生素浓度较高(30 $\mu\text{g/mL}$)的培养基上生长不受任何抑制; 培养基中含有 5 $\mu\text{g/mL}$ Apr、Km 或 Tet 时能够完全抑制菌体的生长; 而 Thio 和 Cm 在浓度 2 $\mu\text{g/mL}$ 时就能完全抑制生长。以上结果表明 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 对 Apr、Km、Tet、Thio 和 Cm 敏感, 其相应的抗性基因可以作为遗传转化系统的标记基因。

2.1.2 接合转移条件的确立

根据 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 抗生素敏感性实验结果, 选取阿普拉霉素抗性基因作为遗传操作系统的选择性标记基因。针对接合转移过程中

的热激温度、热激时间、复苏时间、大肠杆菌和链霉菌供受体比例、抗性覆盖时间进行条件摸索: 设置 40、45、50、55 °C 四个热激温度梯度, 每个温度分别处理 5、10、15 min, 将热激处理后的孢子于 30 °C 培养箱中分别复苏孵育 1、2、3、4 h。保持 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 孢子量不变, 分别与菌体量为孢子量 1、10、100 倍的 ET12567/pUZ8002/pSET152 混合, 然后分别涂布于添加 20 mmol/L MgCl₂ 的 MS 及不添加 MgCl₂ 的 MS 固体培养基上, 30 °C 分别培养 12、18、24 h 后覆盖 25 µg/mL NA 和 20 µg/mL Apr, 30 °C 继续培养至长出接合子。最终确定 OUCMDZ-3434 接合转移最佳培养基为添加 20 mmol/L MgCl₂ 的 MS; 孢子热激条件为 50 °C, 10 min; 热激后 30 °C 复苏孵育 3 h 进行萌发; *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 孢子量与大肠杆菌数量比例为 1:10 混合涂布, 30 °C 培养约 18 h 后气生菌丝长出, 覆盖 25 µg/mL NA 和 20 µg/mL Apr。继续培养 2–3 d 后长出接合子, 接合转移效率为 6.4×10^{-5} 。

2.2 *wblA* 生物信息学分析

Streptomyces sp. OUCMDZ-3434 中 *wblA* 基因大小为 1 029 bp, 与许多链霉菌来源的 Wbl 家族转

录调控因子具有较高的同源性。通过比对分析发现, 它与 *Streptomyces coelicolor* A3(2) (AJ239085.1)、*Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66 (KU534996.1) 和 *Streptomyces alboblavus* MDJK44 (ARX85285.1) 的 Wbl 家族转录调控因子的基因序列一致性分别为 96%、89%和 82%。WblA 在 N 端具有一个高度保守且能结合“铁-硫”簇蛋白的 Cys-X21-Cys-X2-Cys-X5-Cys 结构域, 这是 Wbl 家族转录调控因子典型的特征。进一步将以上 4 个 WblA 的氨基酸序列进行了同源比对(图 1)。结果表明 OUCMDZ-3434 中 *wblA* 基因与其他同源基因一致, 都含有 Cys-X21-Cys-X2-Cys-X5-Cys 结构域。

2.3 基因阻断突变株的构建

2.3.1 基因组文库筛选

根据基因序列在 *wblA* 基因前后设计特异性引物 WBSF/WBSR, 通过 PCR 的方法对基因组文库进行筛选, 筛选得到阳性 Cosmid 后进行末端测序确认其边界, 阳性 Cosmid WB 能够完整包括 *wblA* 基因, 适合进行下一步的遗传操作。

2.3.2 *wblA* 基因敲除

将包含 *wblA* 基因的阳性 Cosmid WB 电转入大肠杆菌 BW25113/pIJ790 中, 获得 BW25113/pIJ790/

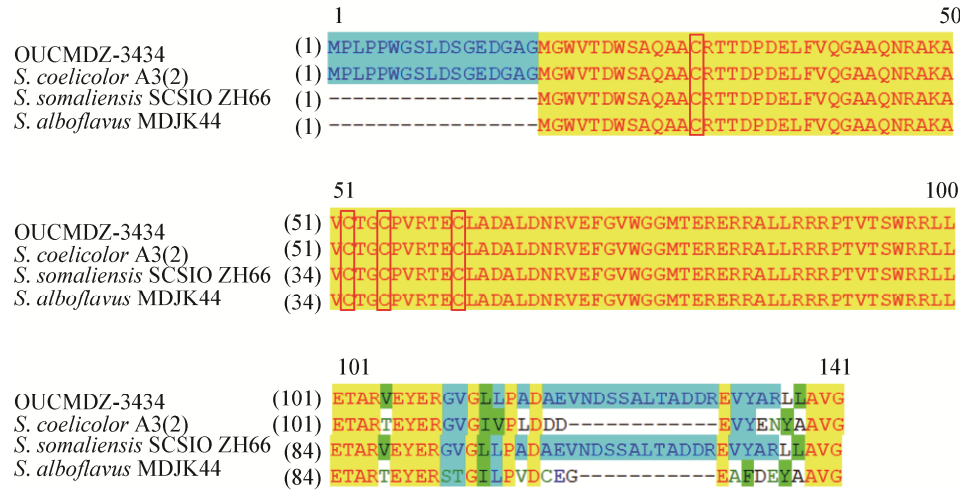


图 1 WblA 与其同源基因序列比对

Figure 1 Alignment of WblA with its orthologues

注: 红色框内为 Cys 残基。

Note: The conserved Cys residues were labeled in red frame.

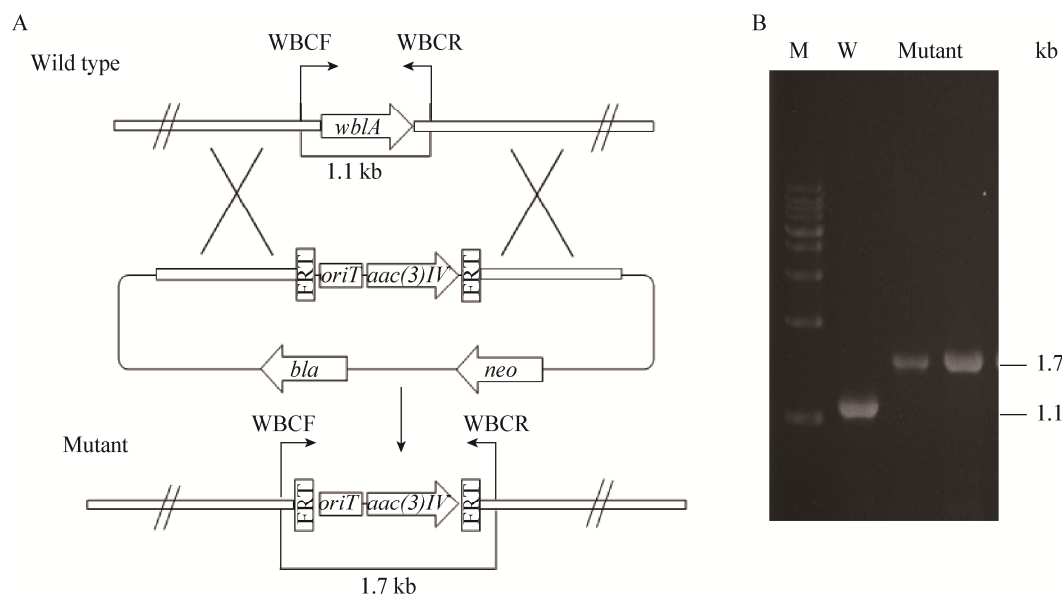


图2 同源重组示意图(A)及阻断突变株 PCR 验证图(B)

Figure 2 Construction of $\Delta wblA$ gene mutant (A) and PCR confirmation (B)

注: M: 1 kb DNA 标准 Marker; W: 野生型菌株 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434; Mutant: *wblA* 基因的阻断突变株 LX02.

Note: M: 1 kb DNA standard marker; W: *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 wild-type strain; Mutant: *wblA* disruption mutant LX02.

WB。采用 PCR-Targeting 策略,以质粒 pIJ773 中的 *aac3(IV)*抗性片段作为替换目的基因的筛选标记,37 °C 培养并用 Apr 筛选得到重组质粒。将重组质粒转入大肠杆菌 ET12567/pUZ8002,得到 ET12567/pUZ8002/WB $\Delta wblA$ 。利用建立的大肠杆菌与 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 接合转移的方法将重组质粒导入 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434,通过 MS/Apr 和 MS/Apr+Km 的平板进行单双抗筛选获得接合子,进一步提取接合子基因组 DNA,并以 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 野生型菌株基因组 DNA 作为对照,用 WBCF/WBCR 为引物进行 PCR 验证。图 2B 为双交换同源重组示意图与突变株 PCR 验证图,结果表明野生型菌株相应的 PCR 扩增条带为 1.1 kb,而双交换突变株相应的 PCR 扩增条带为 1.7 kb,与预期结果一致,证明 *wblA* 基因的双交换阻断突变株构建成功,命名为 LX02。

2.4 基因阻断突变株与野生型菌株形态分化的差异

分别将突变株 LX02 和野生型菌株 *Streptomyces*

sp. OUCMDZ-3434 转接至 MS 固体培养基上,30 °C 培养 3 d,观察二者表型。结果显示野生型菌株产孢良好,而突变株不产孢子(图 3A)。进一步在光学显微镜下观察,野生型菌株产生孢子链和孢子,而突变株中只有菌丝,未观察到孢子链和孢子产生(图 3B)。该结果表明, *wblA* 基因的敲除影响 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 的孢子形成。

2.5 双交换阻断突变株发酵产物分析

将野生型菌株 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 和突变株 LX02 在相同条件下进行发酵,对发酵产物进行 HPLC 分析,检测 *wblA* 基因敲除后突变株发酵产物的变化。以 Wailupemycin G 的质量为横坐标,以 293 nm 波长下的峰面积为纵坐标绘制标准曲线,通过标准曲线及峰面积计算可得野生型菌株中 Wailupemycin G 的产量为 2.2 mg/L,基因阻断突变株中 Wailupemycin G 的产量为 8.9 mg/L,与野生型菌株相比突变株中 Wailupemycin G 的产量提高了 3 倍(图 4 B),推测 *wblA* 基因对 Wailupemycin 类化合物的合成具有负调控作用。

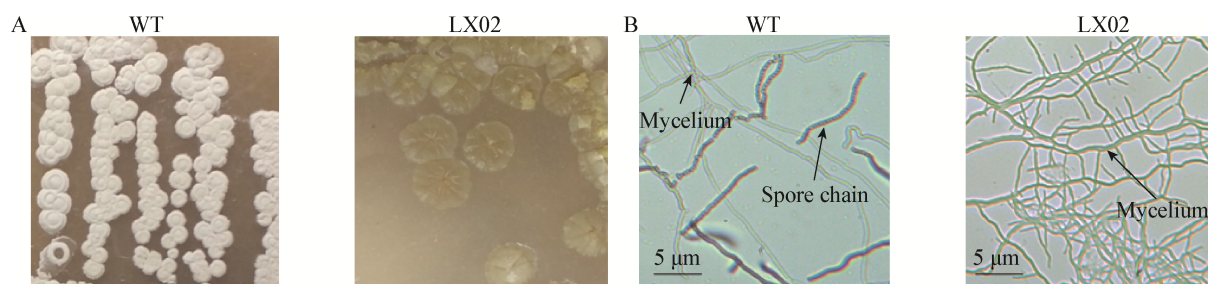


图 3 野生型菌株和突变株培养特征(A)及菌丝、孢子链形态观察(B)

Figure 3 Phenotypes of *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 and LX02 on MS plates (A) and their morphological graphs under optical microscope (B)

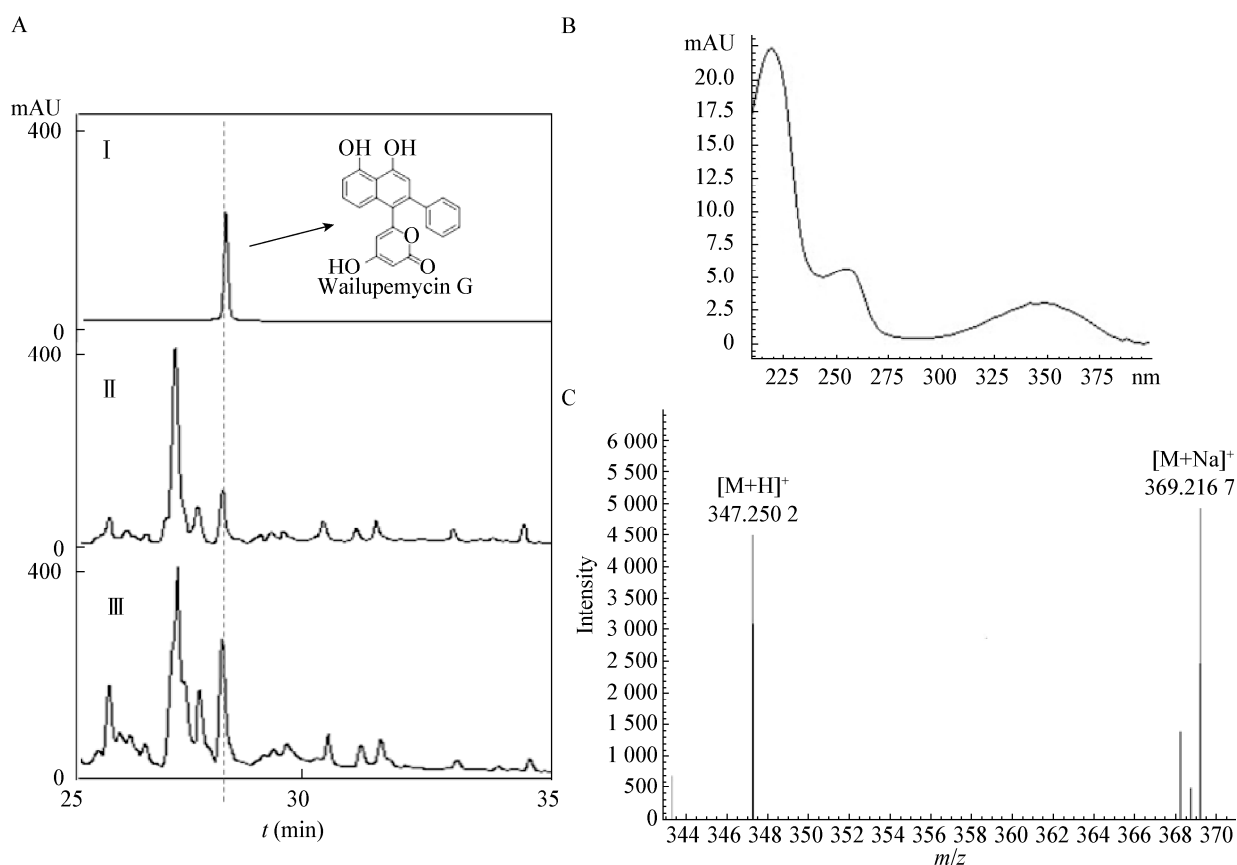


图 4 双交换阻断突变株发酵产物 HPLC 结果(A)、Wailupemycin G 的紫外吸收(B)及 Wailupemycin G 的高分辨质谱分析(C)

Figure 4 HPLC traces of the fermentation broths from *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 (A), UV spectrum of wailupemycin G (B), HRMS analysis of wailupemycin G (C)

注: I: Wailupemycin G 标准品; II: 野生型菌株 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434; III: *wblA* 基因的阻断突变株 LX02.

Note: I: Wailupemycin G; II: *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 wild-type strain; III: *wblA* inactivation mutant LX02.

3 讨论与结论

Streptomyces sp. OUCMDZ-3434 能够产生具有良好 α -糖苷酶抑制活性的 Wailupemycin 类化合物, 但该类化合物产量较低, 限制了后续研究进展。本文成功建立了 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 的遗传转化系统。利用所建立的遗传转化系统成功敲除了调控基因 *wblA*, *wblA* 基因阻断突变株中 Wailupemycin G 的产量提高 3 倍, 同时该突变株丧失了产孢能力。在已知的 Wbl 家族转录调控子中, WblA 通常对菌株的次级代谢有调控作用并能够影响菌株的形态分化过程。例如在 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 中 *wblA* 对 Actinorhodin 的生物合成起负调控作用^[6]; *wblA* 基因对 *Streptomyces ansochromogenes* 的形态分化有影响并且对其次级代谢产物 Nikkomycins 的生物合成具有正调控作用^[13]。在本研究对象 *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 中, *wblA* 基因的阻断使 Wailupemycin G 产量提高, 推测 *wblA* 对 Wailupemycins 生物合成途径起到负调控的作用。本研究结果为进一步进行 Wailupemycin 类化合物的生物合成的研究提供了基础。

REFERENCES

- [1] Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, et al. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria[J]. Microbiological Research, 2014, 169(4): 262-278
- [2] Chen ZB, Hao JJ, Wang LP, et al. New α -glucosidase inhibitors from marine algae-derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 20004
- [3] Romero-Rodríguez A, Robledo-Casados I, Sánchez S. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2015, 1849(8): 1017-1039
- [4] Lu FJ, Hou YY, Zhang HM, et al. Regulatory genes and their roles for improvement of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. 3 Biotech, 2017, 7(4): 250
- [5] Liu G, Chater KF, Chandra G, et al. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013, 77(1): 112-143
- [6] Zheng F, Long QX, Xie JP. The function and regulatory network of WhiB and WhiB-like protein from comparative genomics and systems biology perspectives[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2012, 63(2): 103-108
- [7] Fowler-Goldsworthy K, Gust B, Mouz S, et al. The actinobacteria-specific gene *wblA* controls major developmental transitions in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Microbiology, 2011, 157(5): 1312-1328
- [8] Huang HM, Hou LK, Li HY, et al. Activation of a plasmid-situated type III PKS gene cluster by deletion of a *wbl* gene in deepsea-derived *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 116
- [9] 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
- [10] Kieser T. Practical Streptomyces Genetics[M]. Norwich, UK: John Innes Foundation, 2000
- [11] Gust B, Kieser T, Chater K. PCR Targeting System in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2002
- [12] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982
- [13] Lu C, Liao GJ, Zhang JH, et al. Identification of novel tylosin analogues generated by a *wblA* disruption mutant of *Streptomyces ansochromogenes*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 173