

内生链霉菌 SAT1 转录组分析和抑菌代谢产物的鉴定

麻慧慈, 王莎, 董玥, 翟柯尧, 马玉超*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

麻慧慈, 王莎, 董玥, 翟柯尧, 马玉超. 内生链霉菌 SAT1 转录组分析和抑菌代谢产物的鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3293-3309

Ma Huici, Wang Sha, Dong Yue, Zhai Keyao, Ma Yuchao. Transcriptome analysis and identification of antibacterial metabolites in endophytic *Streptomyces* sp. SAT1[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3293-3309

摘要:【背景】植物内生链霉菌 *Streptomyces* sp. SAT1 分离自药用植物芥苳根部, 对多种植物病原真菌和病原细菌具有强抑菌活性, 在农林业生物防治领域应用潜力巨大。【目的】揭示该菌在不同培养基条件下的抑菌效果和抑制细菌的活性物质类型, 为该菌生物防治应用提供理论基础和技术支撑。【方法】通过测定发酵液和菌体萃取物的抑菌活性, 研究培养基成分对抑菌活性物质生物合成的影响; 选择抑制细菌活性高和无抑菌活性的培养基进行发酵, 通过转录组测序分析差异表达基因的功能, 并利用紫外吸收光谱和 UPLC-MS/MS 鉴定活性物质的成分。【结果】所选用的 7 种链霉菌常用发酵培养基中, 无论发酵液还是菌体萃取物, TSB、GS 和 R5 培养基无抑制细菌活性; PDB、ISP2、MS 和 H 有较强的抑菌活性。对 PDB、ISP2 和 TSB 发酵菌体进行转录组测序分析, 共发现差异表达基因 3 567 个, KEGG 富集分析发现差异基因多集中在 global and overview maps、氨基酸代谢和碳水化合物代谢等通路上, 而且与 TSB 比, PDB 和 ISP2 分别有 18 个和 5 个上调基因定位于 moenomycin 类物质的生物合成基因簇上。以标准品为对照, 通过紫外光谱和 UPLC-MS/MS 确定了主要的抑菌物质为 moenomycin。【结论】SAT1 抑制细菌活性物质的生物合成受发酵培养基成分的影响, 该菌抑制细菌的活性物质以 moenomycin 类物质为主。

关键词: 差异基因表达; 次级代谢产物; 默诺霉素

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD2201203); 国家林业局林业公益性行业科研专项(201304409); 北京市科技新星项目(2011033)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2021YFD2201203); Forestry Industry Research Special Funds for Public Welfare Project of State Forestry Bureau of China (201304409); Beijing Nova Program (2011033)

*Corresponding author: E-mail: mayuchao@bjfu.edu.cn

Received: 2021-11-05; Accepted: 2022-04-09; Published online: 2022-05-26

Transcriptome analysis and identification of antibacterial metabolites in endophytic *Streptomyces* sp. SAT1

MA Huici, WANG Sha, DONG Yue, ZHAI Keyao, MA Yuchao*

College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] Endophytic *Streptomyces* sp. SAT1, isolated from the roots of the medicinal plant *Adenophora trachelioides*, exhibits strong inhibitory activity against plant pathogenic fungi and bacteria, which has great biocontrol potential in agriculture and forestry. [Objective] The inhibitory effect of SAT1 and the types of active substances against bacteria in different media were revealed to provide theoretical basis and technical support for its biocontrol application. [Methods] The effects of medium components on the biosynthesis of antibacterial metabolites were investigated by measuring the antibacterial activities of fermentation broth and the mycelium extracts. Media with high or no inhibitory activities were selected for fermentation, and transcriptome sequencing of the mycelium was performed to analyze the function of differentially expressed genes. Moreover, ultraviolet (UV) spectrum and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) were used to identify the components of active substances. [Results] After fermentation with 7 commonly used media for *Streptomyces*, the fermentation broth and the mycelium extract from TSB, GS and R5 media did not inhibit the bacteria, while those from PDB, ISP2, H and MS media had strong antibacterial activity. Transcriptome sequencing analysis of PDB, ISP2 and TSB fermentation bacteria revealed a total of 3 567 differentially expressed genes. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis demonstrated that most differentially expressed genes were enriched in metabolic pathways such as global and overview maps, amino acid metabolism and carbohydrate metabolism. As compared with TSB, 18 and 5 up-regulated genes were located in the biosynthetic gene cluster of moenomycin in PDB and ISP2, respectively. With the standard as the control, the main antibacterial substance was identified as moenomycin by UV spectrum and UPLC-MS/MS. [Conclusion] The biosynthesis of active secondary metabolites in SAT1 against bacteria could be increased by optimizing fermentation medium, with moenomycin analogues as the main active substance.

Keywords: differential gene expression; secondary metabolites; moenomycin

链霉菌次级代谢产物是抗生素(如链霉素、四环素和达托霉素)、肿瘤抑制剂(如红比霉素)、免疫调节剂(如他克莫司和雷帕霉素)及除草剂(如草铵膦)等的重要来源,对全球人类的健康和生存有突出的贡献^[1]。在当今倡导绿色农林业时代,利用植物内生链霉菌能够产生抗虫、抗病及促进植物生长物质等特性来开发生物控制菌剂具有巨大的经济价值和社会效益^[2]。随着

基因组测序技术的发展,近年来发现链霉菌基因组上存在着丰富的次级代谢基因簇,一般为几个到几十个不等,每个基因簇长度约在 1 kb 到 100 kb 之间^[3]。尽管如此,以往从同一株链霉菌中只分离出一种或几种活性代谢产物,而基因组测序技术的发展表明链霉菌能够产生比预期更丰富的、未被阐明、具有巨大工农业应用潜力的聚酮类、非核糖体多肽类、转录后修

饰的肽类、内酰胺类及萜类等天然活性产物。同时也表明链霉菌次级代谢产物的合成过程复杂, 需要特定的营养成分和生长条件激活沉默基因簇的表达^[4]。

植物内生链霉菌次级代谢产物丰富, 长期与植物协同共生、共同演化, 具有防病促生的功能, 已作为生物菌剂应用于农林业领域^[5]。深入研究链霉菌生防机制, 即抗病、抗虫次级代谢产物的结构、特征和生物合成过程, 对于生防试剂的合理开发和应用具有重要的理论指导意义。植物内生链霉菌(*Streptomyces* sp.) SAT1 分离自药用植物芥(*Adenophora trachelioides*)的根部, 对多种植物病原真菌(如栗疫病菌、苹果轮纹病菌、杨树溃疡病菌、辣椒疫霉菌、大豆菌核病和菜豆根腐病菌)、细菌性病原菌(如细菌性杨树溃疡病菌、猕猴桃溃疡病菌、水稻纹枯病菌、水稻白叶病菌)及人类机会致病菌(大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及白假丝酵母)等均具有较强的抑菌活性, 盆栽实验结果表明该菌能够明显促进植物生长, 同时能够防治大豆菌核病和板栗疫病等真菌病害^[6]。全基因组测序分析揭示该菌基因组上含有 37 个次级代谢基因簇^[7], 通过基因簇敲除证明该菌合成的潮霉素类物质起主要抑制植物真菌病原菌的功能。为了揭示该菌抑制细菌的活性物质类型和相关生物合成基因簇, 本文通过筛选发酵培养基, 选择发酵产物抑菌活性高和无抑菌活性的培养基发酵菌体进行转录测序, 分析差异表达基因与次级代谢产物生物合成的关系, 以期调控该次级代谢物的生物合成过程和开发该菌为生防菌剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和指示菌

链霉菌(*Streptomyces* sp.) SAT1 菌株^[8]、金黄

色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923。

1.2 发酵培养基

ISP2 培养基^[9]; MS 培养基^[10]; TSB 培养基^[11]; 高氏一号培养基(GS)^[12]; 黄豆饼粉培养基(H) (g/L): 可溶性淀粉 45.00, 黄豆饼粉 25.00, NaCl 1.00, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.20, Na_2SO_4 0.10, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $CaCO_3$ 3.00; R5 培养基参考文献^[11]配制: 1.636 MPa 灭菌 15 min 后每瓶(1 L)中加入: KH_2PO_4 (0.5%) 2.50 mL, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (5 mol/L) 1.00 mL, L-脯氨酸(20%) 3.75 mL, NaOH (1 mol/L) 调 pH 值至 7.3。

1.3 SAT1 的发酵培养

将 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存的 SAT1 菌株接种于 ISP2 固体培养基上, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 2 d, 挑取活化后的菌株接种至含有 40 mL ISP2 液体培养基的 100 mL 三角瓶中, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养 2 d。按照 5% 的体积分数分别接种到上述发酵培养基中, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、180 r/min 摇床发酵 7 d。

1.4 菌体萃取物的制备和抑菌活性的检测

发酵混合物经 3 500 r/min 离心 10 min, 上清液直接用于检测抑菌活性, 离心后的菌体沉淀经无菌水清洗 2 次后, 一部分用于抑菌活性物的提取, 一部分液氮速冻后放置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存, 以用于转录组测序。

菌体萃取物的制备: 向含有 1 g 鲜重菌体的离心管中加入 8 mL 的甲醇, 重悬菌体后用封口膜封紧管口, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、180 r/min 振荡过夜; 6 000 r/min 离心 10 min, 保留上清液, 使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

采用滤纸片法^[13]检测抑菌活性: 将浓度为 10^8 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌菌液 200 μL 涂布至 LB 培养基, 吹干培养基表面水分, 然后将直径 0.5 cm 滤纸片放在培养基上, 分别取 10 μL 发酵液(以无菌水为对照)或菌体萃取物(以甲醇为对照)滴加在相应的滤纸片上,

37 °C 培养 24–48 h 后观察抑菌圈大小。

1.5 链霉菌 SAT1 总 RNA 的测序及比对分析

选择 ISP2、PDB 和 TSB 这 3 种培养基平行发酵的菌体经 2 次无菌水清洗之后,液氮速冻后送诺禾致源生物技术有限公司进行 RNA 提取、反转录、PCR 扩增及测序,测序平台为 NovaSeq 6000。使用 TopHat 和 cufflinks 将转录组测序完成后得到的 clean data 与基因组进行比对,并使用 fragment per kilobase of exon model per million mapped reads (FPKM)法进行基因定量;利用 R 语言中的 DESeq2 进行基因差异表达分析,显著差异表达基因筛选条件为 $abs[\log_2(\text{fold change})] \geq 1.5$ 且调整后的 P 值(即 FDR) ≤ 0.05 ,并将筛选得到的差异基因汇总。通过在线维恩图制作工具 Jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>)进行可视化分析。

1.6 差异基因 KEGG 途径、GO 富集分析

通过 OmicShare 平台(<https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/pathwaygsea>)对各实验组中差异基因进行 KEGG 富集分析^[14-16]。利用 R 语言中的 clusterProfiler V3.16.1 超几何检验方法从生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)及细胞组分(cellular component, CC)这 3 个方面对基因和基因产物进行 GO 富集分析^[17]。

1.7 默诺霉素物质的鉴定

菌体甲醇提取物于 EP 管中旋干后定量加入 100 μL 甲醇/二氯甲烷溶液(8:2, 体积比),涡旋 1 min 后超声 5 min, 20 °C、13 000 r/min 离心 10 min, 定量吸取上清液放入干净的样品瓶中进行 UPLC-MS/MS 检测。

利用岛津紫外分光光度计 UV-2600i 进行紫外光谱检测。采用 UPLC-MS/MS (配有岛津 Nexera X2 LC-30AD 超高效液相色谱及 SCIEX QTRAP 6500 三重四极杆串联线性离子阱质谱)

系统分析 moenomycin 组分。色谱柱为 Waters XBridge BEH C8 (2.5 μm , 2.1 mm \times 100 mm), 柱温为 50 °C, 自动进样器温度为 10 °C, 流动相 A 为乙腈:异丙醇溶液体积比为 2:8, 流动相 B 为 5 mmol/L 乙酸铵的水溶液, 流速为 0.2 mL/min, 进样体积为 2 μL 。梯度洗脱程序为: 0 min, 20% 流动相 A; 3 min, 20% 的流动相 A; 6 min, 40% 的流动相 A; 12 min, 90% 的流动相 A; 15 min, 90% 的流动相 A; 15.1 min, 20% 的流动相 A; 19 min, 20% 的流动相 A。质谱采用多反应监测(multiple-reaction monitoring, MRM)的负离子模式, 电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI)电压为 -4.5 kV, 离子源温度 500 °C, 气帘气 30 psi, 喷雾气和辅助加热气均为 50 psi。

2 结果与分析

2.1 SAT1 菌株发酵培养基的选择

培养基成分和添加前体物对链霉菌次级代谢产物的合成具有重要的影响^[18-19]。选择 7 种放线菌常用发酵培养基发酵培养 SAT1, 滤纸片法检测发酵液和菌体萃取物抑菌活性, 以无菌水和甲醇作为阴性对照, 以 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 moenomycin 作为阳性对照。结果表明抑菌活性最强是 PDB 培养基, 其次是 ISP2 培养基、可溶性淀粉为碳源的黄豆饼粉培养基和 MS 培养基, 而以 TSB 培养基、高氏一号培养基和 R5 培养基的菌体萃取物及发酵液几乎无抑菌活性(图 1A)。

2.2 测序数据质量评估

鉴于不同发酵培养基影响抑菌活性物质的合成, 选择抑菌活性高的 2 种培养基(PDB 和 ISP2)和一种几乎无抑菌活性的 TSB 培养基进行 SAT1 的发酵培养, 对发酵菌体进行转录组测序, 分析差异基因的表达, 进而推断抑菌活性物质的类型。测序共获得原始数据 15.07 Gb, 平均每个样品 1.67 Gb, 过滤低质量数据后平均每个

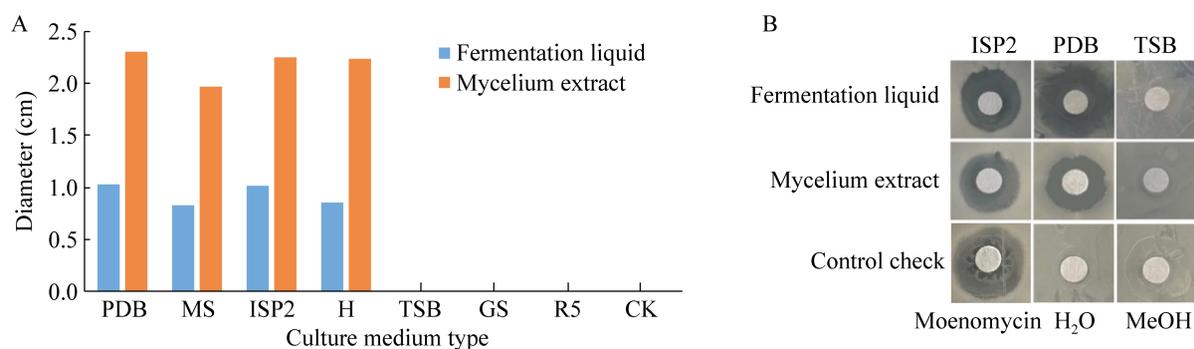


图 1 不同发酵培养基的抑菌实验结果 A: 不同发酵培养基中菌体萃取物和发酵液抑菌实验结果; B: ISP2、PDB 和 TSB 培养基中发酵液和萃取物抑菌实验结果。无菌水作为发酵液对照, 甲醇作为菌体粗提物对照。H 为黄豆饼粉培养基; GS 为高氏一号培养基。本实验设置 3 组平行

Figure 1 Experimental results in different fermentation media. A: Experimental results of bacteriostasis of extracts and fermentation liquid in different fermentation media; B: Experimental results of bacteriostasis of extracts and fermentation liquid in ISP2, PDB and TSB media. Sterile water was used as the control of fermentation broth and methanol as the control of thallus crude extract. H is soybean cake powder culture medium; GS is Gause No. 1 medium. Three parallel groups were set up in this experiment.

样品总碱基数达到 1.64 Gb。经 PDB 培养基发酵的 SAT1 测序所得 Q20 及 Q30 均大于 95.05%, 碱基错误率大于 0.02%, GC 含量大于 70.17%; 经 ISP2 培养基发酵的 SAT1 测序所得数据的 Q20 和 Q30 均大于 92.31%, 碱基错误率大于 0.03%, GC 含量大于 69.03%; 经 TSB 发酵培养基发酵的 SAT1 测序所得数据 Q20 和 Q30 均大于 95.19%, 碱基错误率大于 0.02%, GC 含量

大于 69.49% (表 1)。以上结果说明本次测序数据可靠, 可用于后续深入分析。

2.3 差异基因的筛选

三种培养基发酵菌体的转录测序结果表明, 共有差异表达基因 3 567 个, 其中差异共表达基因 117 个(图 2A)。在 ISP2 培养基和 TSB 培养基(I vs T)中, 差异基因共 1 387 个, 包括上调基因 862 个和下调基因 525 个; 在 PDB 培养基和

表 1 转录组测序质量

Table 1 The quality of transcriptome sequencing data

Sample	Raw base (G)	Clean base (G)	Q20 (%)	Q30 (%)	Clean reads rate (%)	Error rate (%)	GC content (%)
P1	1.63	1.60	98.31	95.06	98.28	0.02	70.44
P2	1.87	1.83	98.33	95.19	97.84	0.02	70.22
P3	2.04	1.99	98.25	95.05	97.72	0.02	70.17
I1	1.60	1.56	97.20	92.44	97.69	0.03	70.38
I2	1.42	1.40	97.17	92.31	98.10	0.03	69.03
I3	1.28	1.25	97.32	92.66	97.70	0.03	69.87
T1	1.55	1.52	98.32	95.20	97.87	0.02	69.49
T2	1.95	1.92	98.34	95.19	98.41	0.02	70.12
T3	1.73	1.70	98.41	95.34	98.23	0.02	70.06

注: P: PDB 培养基; I: ISP2 培养基; T: TSB 培养基

Note: P: PDB medium; I: ISP2 medium; T: TSB medium.

TSB 培养基(P vs T)中, 差异基因共 918 个, 包括上调基因 560 个和下调基因 358 个; 在 PDB 培养基和 ISP2 培养基(P vs I)中, 差异基因共 1 262 个, 包括上调基因 587 个和下调基因 675 个(图 2B)。值得注意的是, 与 TSB 相比, PDB 和 ISP2 培养基中共同发生显著上调/下调的基因有 299 个, 这些共差异表达基因可能在 SAT1 菌株的抑菌活性物质生物合成过程中起重要作用(图 2A)。

2.4 差异表达基因 KEGG 通路富集分析

对差异表达基因进行 KEGG 通路分析, 差异基因主要富集到代谢(metabolism)、遗传信息处理(genetic information processing)、环境信息处理(environmental information processing)、细胞过程(cellular processes)及有机系统(organismal systems)这 5 个分支中。

在 I vs T 比较组中, 共有 687 个差异基因在 KEGG 数据库中得到富集, 其中 84.4% 的差异基因富集于代谢途径。富集程度较高的是 I 型聚酮化合物(type I polyketide structures)和

12-、14 和 16 元大环内酯类化合物(biosynthesis of 12-, 14- and 16-membered macrolides)等(图 3A)。

在 P vs T 比较组中, 共有 553 个差异基因在 KEGG 数据库中得到富集, 其中 88.6% 的差异基因富集于代谢途径。富集程度较高的也是 I 型聚酮化合物和 12-、14 和 16 元大环内酯类化合物生物合成途径(图 3B), 这两类合成途径的次级代谢产物是链霉菌重要的抑菌活性物质类型。在 P vs I 比较组中, 共有 711 个差异基因在 KEGG 通路中得到富集, 其中 86% 的差异基因富集于代谢途径。富集程度较高的途径主要有丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(alanine, aspartate and glutamate metabolism)、嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)、丁酸类代谢(butanoate metabolism)及脂肪酸代谢(fatty acid metabolism)等, 这些过程可产生能量供菌株所需或合成次级代谢活性产物的前体物, 可能不同程度地影响抑菌效果(图 3C)。

2.5 差异表达基因 GO 富集分析

将各实验组差异表达基因进行 GO 数据库

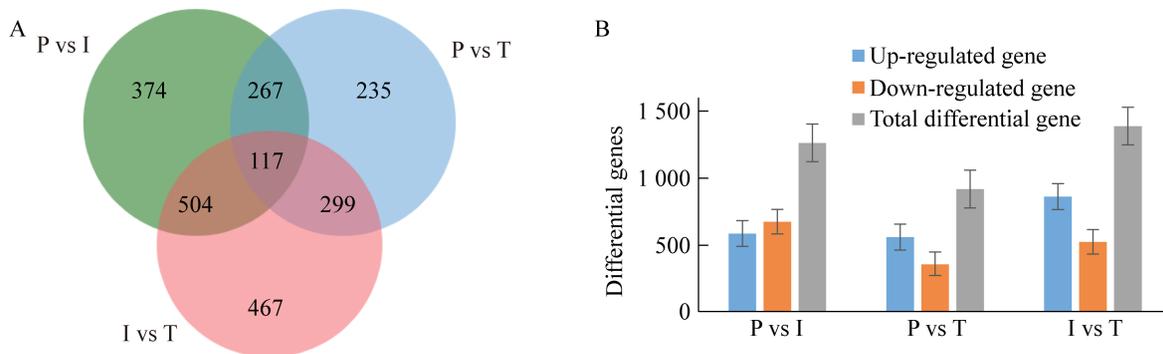
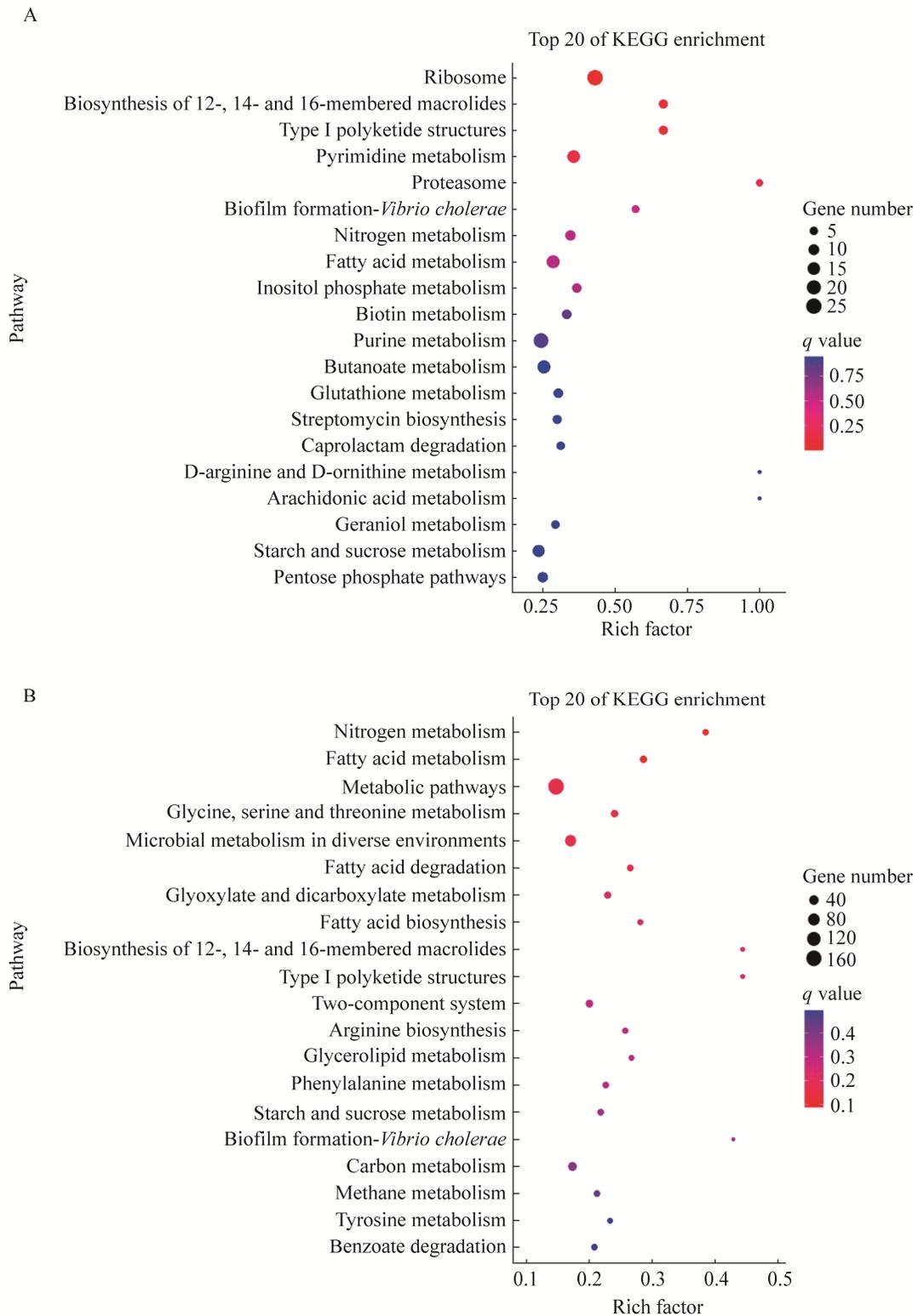


图 2 不同发酵培养基中 SAT1 菌株转录情况分析 A: 样品间差异基因韦恩图; B: 样品间差异基因上调和下调情况。P vs I: PDB 培养基与 ISP2 培养基相比; P vs T: PDB 培养基与 TSB 培养基相比; I vs T: ISP2 培养基与 TSB 培养基相比, 下同

Figure 2 Transcriptome analysis in different fermentation medium. A: Venn diagram of differential expressed genes among different samples; B: The differential expressed gene numbers of up-regulated and down-regulated among different samples. P vs I: PDB medium versus ISP2 medium; P vs T: PDB medium compared with TSB medium; I vs T: ISP2 versus TSB. The same below.



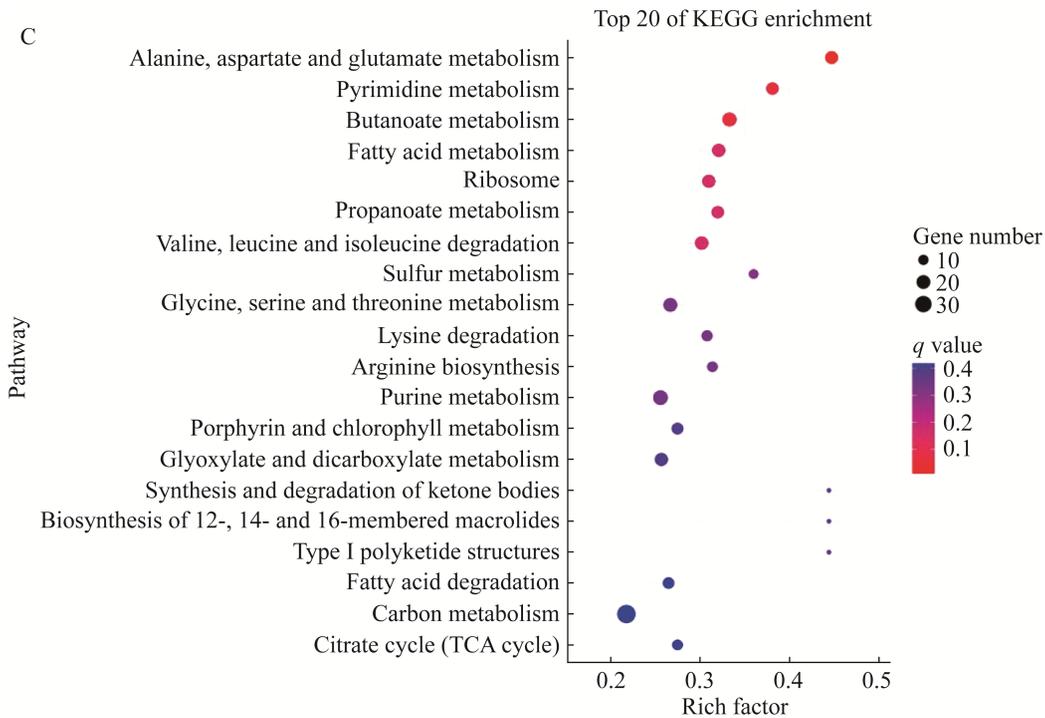


图3 SAT1菌株在不同发酵培养基中差异基因富集因子前20的KEGG通路富集 A: PDB与ISP2比对; B: PDB与TSB比对; C: ISP2与TSB比对

Figure 3 The KEGG pathway of SAT1 strain was enriched in the first 20 differential gene enrichment factors in different fermentation media. A: Comparison in PDB and ISP2; B: Comparison in PDB and TSB; C: Comparison in ISP2 and TSB.

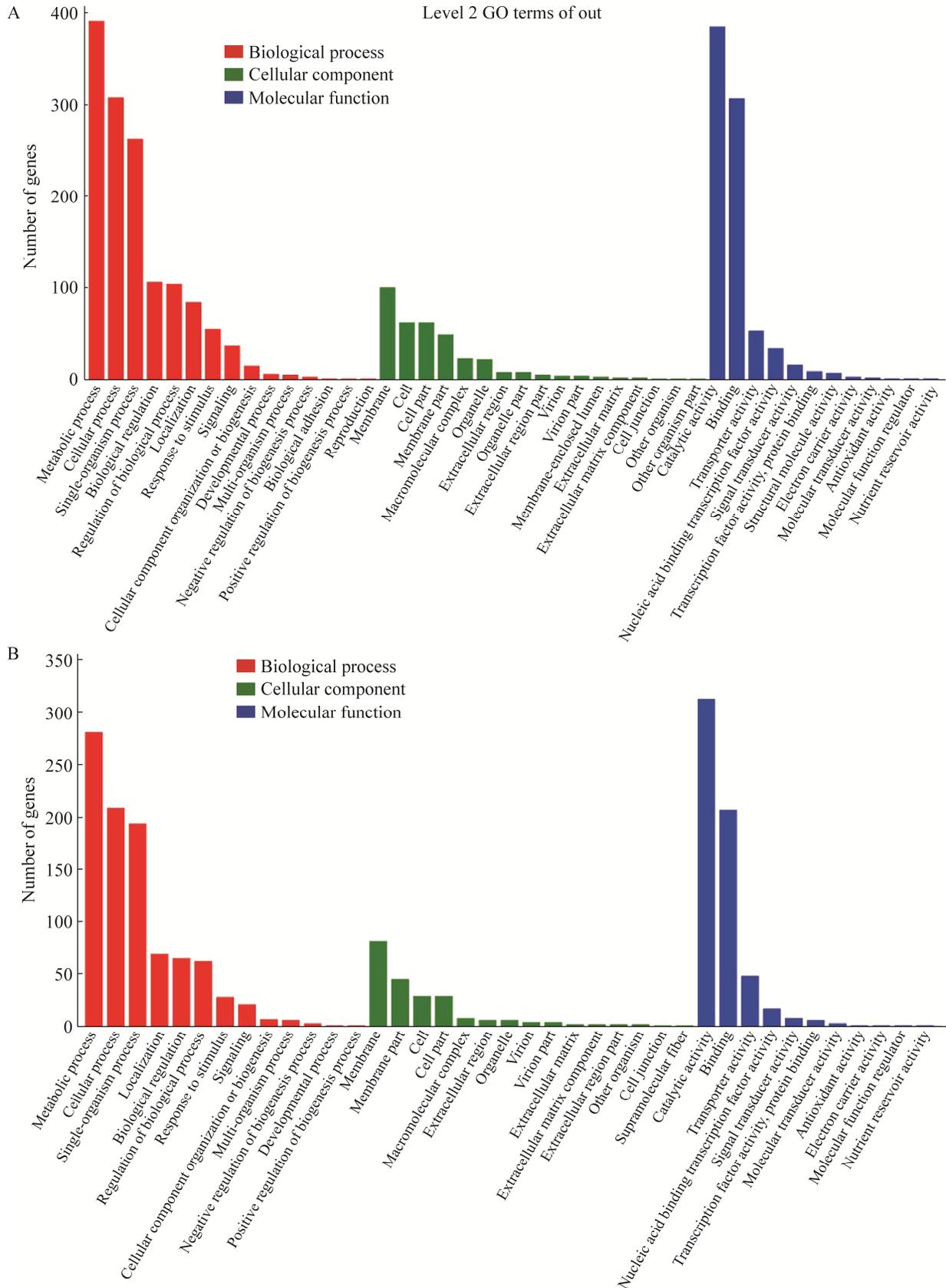
基因富集分析,发现不同培养基发酵条件下的SAT1菌株中的差异基因多富集在生物学过程(biological process, BP)分类中,其次是分子功能(molecular function, MF)分类,而在细胞组分(cellular component, CC)分类中差异基因富集数目相对较少(图4)。在BP分类中,富集数目排名较靠前的几个二级分类主要是代谢过程(metabolic process)、细胞过程(cellular process)、单有机体过程(single-organism process)、生物调控(biological regulation)、生物过程调控(regulation of biological process)及定位(localization)等。然而在MF分类中,富集基因数目较多的为催化活性(catalytic activity)、结合(binding)、转运(transporter)核酸与转录因子结合(nucleic acid binding transcription factor activity)等。这表明不

同培养基中SAT1菌株主要在代谢及代谢调控方面发生了基因的差异表达,从而对SAT1菌株的抑菌活性造成显著影响。

2.6 次级代谢基因簇相关差异表达基因

我们实验室前期测序了SAT1的全基因组序列,并预测到该菌存在37个次级代谢基因簇^[7],其中预测的7种可能的抑制细菌次级代谢产物主要有stenothricin、oxazolomycin、albaflavenone、hopene、informatipeptin、moenomycin和lactonamycin等。为了探究SAT1不同发酵培养基的抑菌机制,进一步深入分析差异基因所在位置和功能。

在I vs T比对组中,共20个基因簇相关基因出现显著性差异表达。其中oxazolomycin和albaflavenone合成基因簇中的部分基因显著下调;informatipeptin基因簇相关所有差异基因下



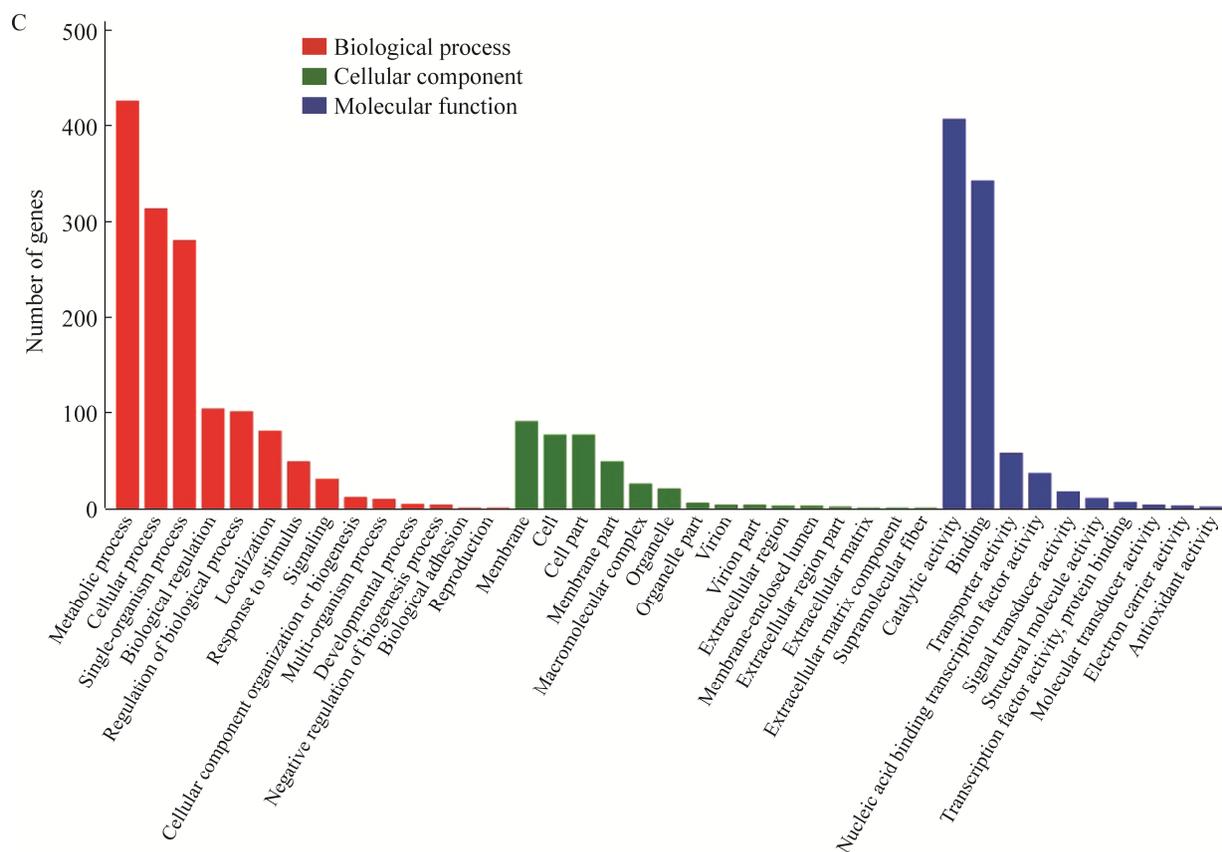


图4 不同实验组之间差异基因GO富集情况 A: PDB与ISP2比对; B: PDB与TSB比对; C: ISP2与TSB比对

Figure 4 The GO enrichment of differential genes in different test groups. A: Comparison in PDB and ISP2; B: Comparison in PDB and TSB; C: Comparison in ISP2 and TSB.

调; stenothricin 基因簇中有 3 个基因下调表达, 只有 1 个基因上调表达; 而 moenomycin 基因簇中有 5 个相关基因上调表达(图 5A)。

在 P vs T 比对组中, 共 29 个基因簇相关基因出现显著性差异表达。其中有 4 个可能合成抑菌活性物质的基因簇相关基因表达发生了显著变化, 变化最明显的是 informatipeptin 和 moenomycin 基因簇。informatipeptin 基因簇有超过 71% 的基因表达量显著降低, 呈整体下调趋势; 而 moenomycin 基因簇呈整体上调趋势, 有 18 个基因表达量显著上升(图 5A)。

在 P vs I 比对组中, 共 30 个次级代谢基因

簇相关基因出现上调/下调表达。在 PDB 培养基发酵条件下的 SAT1 菌株, 除 lactonamycin 基因簇未出现基因的显著变化, 其余 6 个可能合成抑菌物质的次级代谢基因簇的大部分基因表达量都出现显著性上调。其中, informatipeptin 基因簇中 4 个基因、stenothricin 基因簇中 5 个基因及 moenomycin 基因簇中 11 个基因表达量明显升高(图 5A)。

上述分析发现, 默诺霉素生物合成基因簇的多个基因在 3 组对比中均发生了显著上调表达, 这可能是抑菌效果差异的主要原因。默诺霉素家族抗生素的化学结构含有 1 个 3-磷酸甘

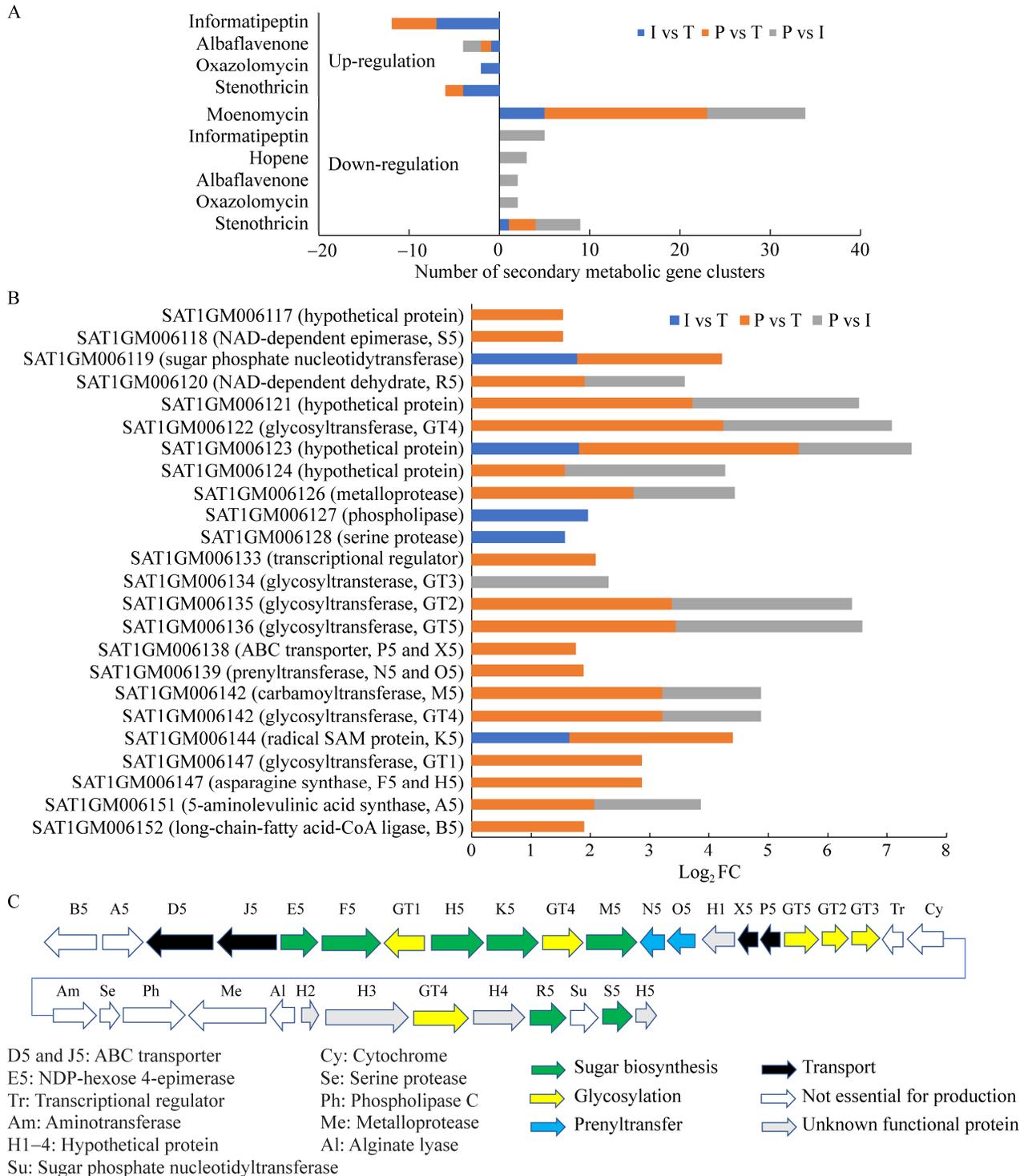


图 5 次级代谢生物合成基因的差异表达分析 A: 各次级代谢基因簇差异基因数目; B: 默诺霉素生物合成基因的差异表达分析; C: 默诺霉素生物合成基因簇

Figure 5 Differential expression analysis of secondary metabolic biosynthetic genes. A: Number of differential genes in each secondary metabolic gene cluster; B: Differential expression analysis of moenomycin biosynthetic genes; C: Moenomycin biosynthetic gene cluster.

油酸单元、4-5 个糖基和 1 个特殊的异戊烯基脂肪链, 也被称为磷酸糖脂类抗生素(图 6A)。默诺霉素生物合成过程中 2 个异戊二烯转移酶 MoeO5 和 MoeN5 通过顺式烯丙基乙醚连接到磷酸甘油酯上形成不规则类异戊二烯链; MoeGT1-5 负责糖基的加载; MoeE5 编码核苷酸糖差向异构酶, 负责将 UDP-葡萄糖醛酸转变为 UDP-半乳糖醛酸, 为默诺霉素的生物合成提供第一个糖基; *moeR5* 和 *moeS5* 编码 4,6 脱水酶/酮还原酶组合, 负责将 UDP-GlcNAc 转化为 UDP-chinovosamine; *moeH5* 和 *moeF5* 编码转移酶, 负责默诺霉素家族末端修饰; *moeX5* 与 *moeP5* 及 *moeD5* 与 *moeJ5* 编码两对 ATP 依赖的转运蛋白, 用以促进默诺霉素排出菌体外^[20]。我们将默诺霉素差异表达基因定位于生物合成基因簇上发现, 与 TSB 培养基相比, PDB 和 ISP2 培养基, 尤其是 PDB 培养基发酵后, 异戊二烯转移酶编码基因 *moeO5* 和 *moeN5*、糖合成相关基因(*moeF5*、*moeH5*、*moeK5*、*moeM5*、*moeR5* 和 *moeS5*)、5 个糖基转移酶基因 *moeGT1-5*、转运相关基因 *moeX5* 和 *moeP5* 都发生了显著的上调表达。同时, 文献报道的一些默诺霉素生物合成的非必需基因, 包括 spherulation-specific protein、sugar phosphate nucleotidyltransferase、metalloprotease、phospholipase 和 serine protease 的编码基因, 以及 *moeA5* 和 *moeB5* 也发生了上调表达。另外, 有 3 个未知功能蛋白和一个转录调控蛋白的编码基因也发生了显著上调表达(图 5B)。

2.7 默诺霉素类物质的检测

次级代谢基因簇相关基因差异表达分析结果表明, 默诺霉素类代谢物可能为该菌抑制细菌的主要活性物质。为了证实这一推测, 我们对菌体粗提物进行了 C18 小柱纯化、紫外光谱和 UPLC-MS/MS 检测。默诺霉素标准品中主要

有 5 个活性成分, 分别为 A₁₂、C₁、A、C₃ 和 C₄(图 6A)。*Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 为已知的默诺霉素产生菌^[21]。以默诺霉素标准品和 ATCC14672 菌体提取物为对照进行了紫外吸收光谱检测, 结果发现默诺霉素化合物中 A 环为 2-氨基环戊烷-1,3-二酮(C5N)发色基团, 标准品在约 258 nm 出现吸收峰, 而 ATCC14672 及 SAT1 的提取物在近 258 nm 处也出现吸收峰(图 6B-6E)。

为了进一步确认主要抑制细菌的活性物质为默诺霉素, 利用 UPLC-MS/MS 检测了 SAT1 菌体萃取物。在 ESI-MS 的负离子一级图谱中出现默诺霉素 A、A₁₂、C₁、C₃ 和 C₄ 的[M-H]⁻离子基峰, *m/z* 分别为 1 580、1 566、1 388、1 402 和 1 418。在 ESI-MS/MS 质谱中, 出现了这 5 个化合物的特征裂解峰, 即磷酸二酯(G)和羧基乙二醇(H)之间酯键的切割导致丢失 H-I 产生 [M-H-(H+I)]⁻, *m/z* 分别为 1 152、1 138、960、974 和 990。同时观察到[H-M]⁻和[M-H-(H+I)]⁻ 丢失 F 环上氨基甲酸基团的异氰酸(OCNH), 产生了[M-H-OCNH]⁻和[M-H-(H+I+OCNH)]⁻ 这 2 个低强度的碎片离子。默诺霉素 A 产生 2 个碎片离子的 *m/z* 分别为 1 537 和 1 109; A₁₂ 产生 2 个碎片离子的 *m/z* 分别为 1 523 和 1 095; C₁ 产生 2 个碎片离子的 *m/z* 分别为 1 346 和 917; C₃ 产生 2 个碎片离子的 *m/z* 分别为 1 359 和 931; C₄ 产生 2 个碎片离子的 *m/z* 分别为 1 375 和 947。因 A₁₂ 和 C₁ 这 2 种化合物中 R₁ 为 H, 从 [M-H-(H+I)]⁻ 上丢失了 OCNH 和 H₂O, *m/z* 分别为 1 077 和 899。其他 3 个化合物(A、C₃ 和 C₄)的相应片段离子强度非常低, 说明 R₁ 被 CH₃ 取代影响分子的片段化(图 7)。上述质谱结果表明, SAT1 菌体提取物中存在默诺霉素 A、A₁₂、C₁、C₃ 和 C₄ 共 5 个主要抑制细菌的活性组分。

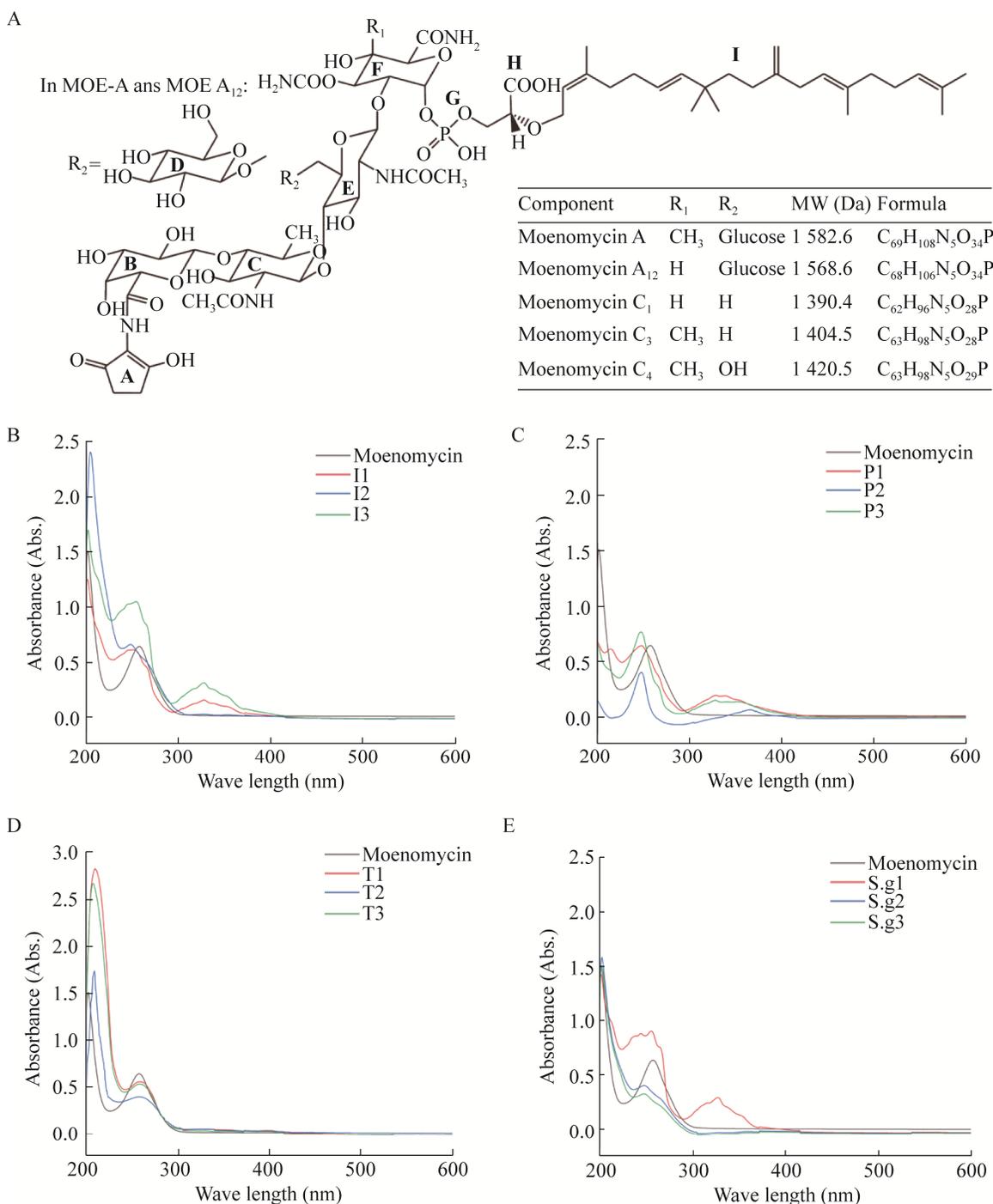


图 6 SAT1 菌体提取物的紫外光谱图 A: 默诺霉素的化学结构和分子量; B: 培养于 ISP2 培养基的提取物; C: 培养于 PDB 培养基的提取物; D: 培养于 TSB 培养基的提取物; E: *S. ghanaensis* ATCC14672 培养于 TSB 培养基的菌体提取物。S.g 表示 *S. ghanaensis* ATCC14672 菌株, 每组设置 3 个平行

Figure 6 Ultraviolet spectrum of SAT1 mycelium extracts. A: Chemical structure and molecular weight of moenomycins; B: Mycelium extract in ISP2; C: Mycelium extract in PDB; D: Mycelium extract in TSB; E: Mycelium extract of *S. ghanaensis* ATCC14672 in TSB. S.g stands for *S. ghanaensis* ATCC14672, with 3 parallels for each group.

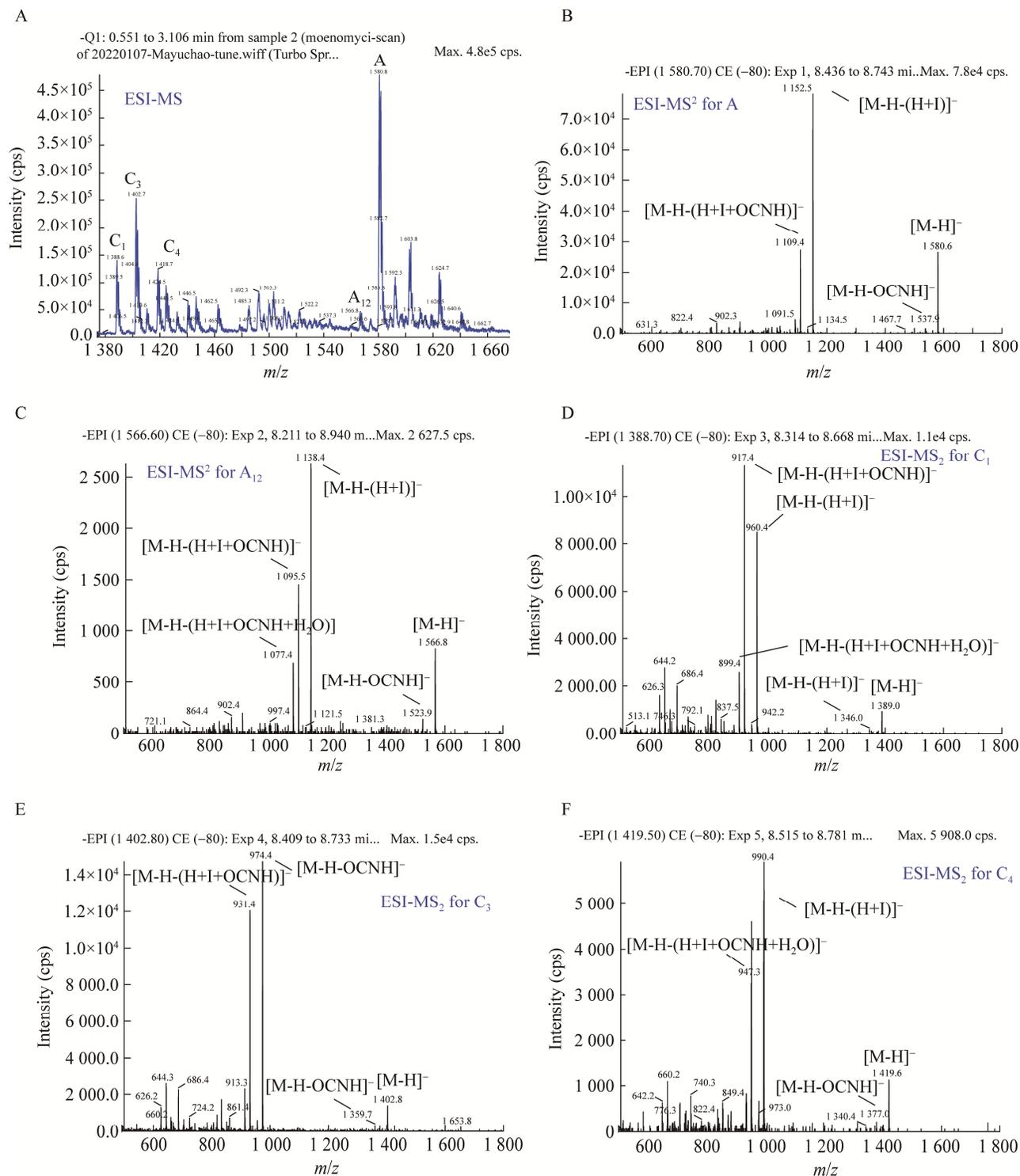


图 7 SAT1 菌体提取物的 UPLC-MS/MS 分析结果

Figure 7 UPLC-MS/MS of SAT1 mycelium extracts.

3 讨论

近十几年来的基因组测序结果表明, 链霉菌基因组上一般存在多个种类丰富的次级代谢基因簇, 如利达霉素产生菌 *Streptomyces globisporus* C-1027 有 33 个次级代谢基因簇^[22]、milbemycins 产生菌 *Streptomyces bingchenggensis* BCW-1 含有 23 个次级代谢基因簇^[23]、头孢菌素产生菌 *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 含有 48 个次级代谢基因簇^[24]、纤维素产生菌 *Streptomyces reticuli* 含有 43 个次级代谢基因簇^[25]、formicamycin 产生菌 *Streptomyces formicae* KY5 含有 45 个次级代谢基因簇^[26]等。以往从同一株链霉菌中只分离一种或几种活性代谢产物, 而基因组上却存在了几十个次级代谢基因簇, 这表明链霉菌能够产生比预期更丰富却未被阐明的各种类型的天然活性产物, 同时也说明次级代谢基因簇的表达与活性产物的生物合成需要特定的营养成分和生长条件。本研究通过不同发酵培养基发酵, 检测 SAT1 菌株发酵液和发酵菌体萃取物的抑菌活性。

在测序技术飞速发展的时代, 种类丰富的次级代谢基因簇越来越多地被人们发现, 但研究发现很多基因簇沉默、激活或强化基因簇的表达以合成目标产物是当前的研究热点^[27]。链霉菌基因组上一般含有多个次级代谢簇, 能够合成抑菌活性的次级代谢产物, 在农林业上作为生防菌剂具有巨大的应用价值, 但抑菌机制为当前的技术瓶颈。SAT1 菌株亲缘关系最近的是 *Streptomyces anandii* (相似度 98.91%)^[28], 生长条件较为严苛, 为探究不同发酵培养基对菌株次级代谢产物合成的影响, 本研究选择了营养物质具有明显差异的几种培养基, 并通过菌株萃取物抑菌实验来检验。

对不同培养基条件下的 SAT1 菌株进行转录组测序分析, 通过 KEGG 富集分析发现, 不同培养基培养条件主要对氮代谢、脂肪酸代谢、12、14 和 16 元大环内酯类化合物的生物合成、I 型聚酮化合物结构、淀粉和蔗糖代谢及生物膜形成-霍乱弧菌等 6 个分类的基因具有显著影响。其中, 氮代谢影响微生物发酵可能是由于氮代谢产物的积累影响了谷氨酰胺合成酶和丙氨酸脱氢酶的合成^[29], 而谷氨酰胺合成酶是合成氨基酸谷氨酰胺过程中最重要的酶类^[30], 同时氨基酸含量的变化能够影响碳代谢途径上关键酶的活性, 导致碳代谢的流向发生改变, 再加上丙氨酸脱氢酶在丙酮酸合成过程中的作用, 推断出氮代谢水平的变化对 SAT1 菌株次级代谢产物及其前体的积累造成了影响; 而丙酮酸的积累除了影响碳代谢外, 也影响脂肪酸代谢, 丙酮酸在初级代谢中首先合成脂肪酸^[31], 进入次级代谢途径后为聚酮类及大环内酯类次级代谢产物的合成提供前体物质, 此外培养基成分的变化也影响了淀粉和蔗糖代谢及生物膜的形成^[32]。在 GO 富集分析中, 比较 3 种培养基发酵状态下的 SAT1 菌株, 同样也是生物合成过程及脂肪酸生物合成 2 个分类所富集到的基因较多, 与 KEGG 富集分析结果相符, 进一步证实了上述分析结果的可靠性。

随着不同发酵培养基菌株萃取物抑菌活性的增强, 编码 SAT1 的次级代谢簇的基因发生了不同程度的上调和下调, 本研究发现, 相较于其他基因簇, 默诺霉素相关基因表达量几乎都是上调的, 我们对发酵液粗提物进行了 UPLC-MS/MS 检测, 发现 SAT1 菌株具有合成默诺霉素类物质的能力, 说明默诺霉素在 SAT1 菌株中是一种非常重要的抑菌活性物质。在后续实验中, 可以对默诺霉素的生物合成调控机制进行深入的研究。

4 结论

链霉菌 SAT1 具有广谱的抑菌活性, 在林业生物防治方面应用潜力巨大, 揭示该菌抑菌物质的类型和抑菌机制将为该菌的实际应用提供重要的理论指导和技术支撑。本研究中, 发酵培养后菌体萃取物和发酵液的抑菌活性结果表明, PDB、ISP2、H 和 MS 培养基激发和强化了抑制细菌的次级代谢产物的合成。选择抑菌活性高的 PDB、ISP2 和几乎无抑菌活性的 TSB 培养基发酵后的菌体进行转录组测序和分析, 结果表明差异基因主要富集于 12、14 和 16 元大环内酯类化合物的生物合成, I 型聚酮化合物的生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 以及嘧啶代谢和丁酸类代谢等。将差异基因定位于次级代谢基因中, 我们发现相较于 TSB, PDB 和 ISP2 中分别有 18 个和 5 个默诺霉素基因簇中重要基因上调表达, 以标准品为对照, 采用紫外光谱和 UPLC-MS/MS 法检测发酵菌体提取物, 证明默诺霉素为 SAT1 抑制细菌的主要活性物质。

REFERENCES

- [1] Hwang KS, Kim HU, Charusanti P, Palsson BØ, Lee SY. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(2): 255-268
- [2] 吕扬勇. 黑曲霉 FGSC A1279 次级代谢调控研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2014
Lv YY. Study on regulation of secondary metabolism in *Aspergillus niger* FGSC A1279[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2014 (in Chinese)
- [3] 张琳, 常恺莉, 姚感, 杜秉海, 梅显贵. *Streptomyces albireticuli* 和 *Streptomyces albofavius* 次级代谢产物的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(2): 89-96
Zhang L, Chang KL, Yao G, Du BH, Mei XG. Research progress on secondary metabolites of *Streptomyces albireticuli* and *Streptomyces albofavius*[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2021, 46(2): 89-96 (in Chinese)
- [4] 刘鑫鑫, 张雨薇, 王敏, 周迎, 段燕文, 黄勇, 颜晓晖. 信号分子在链霉菌天然产物发现和开发中的应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(7): 2467-2482
Liu XX, Zhang YW, Wang M, Zhou Y, Duan YW, Huang Y, Yan XH. Application of signal molecules in the discovery and development of *Streptomyces* natural products: a review[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(7): 2467-2482 (in Chinese)
- [5] 郝大程, 肖培根, 彭勇, 刘明, 霍利. 红豆杉药物资源的生物学和化学研究进展及趋势分析[J]. 药学报, 2012, 47(7): 827-835
Hao DC, Xiao PG, Peng Y, Liu M, Huo L. Research progress and trend analysis of biology and chemistry of *Taxus* medicinal resources[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2012, 47(7): 827-835 (in Chinese)
- [6] 葛优优, 刘晓瑜, 窦桂铭, 马玉超. 内生链霉菌 SSD49 的抑菌活性和防病促生效果[J]. 生物技术通报, 2017, 33(6): 121-127
Ge YY, Liu XY, Dou GM, Ma YC. Antimicrobial activities and efficacy of endophytic *Streptomyces* sp. SSD49 in plant disease control and plant-growth-promoting[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(6): 121-127 (in Chinese)
- [7] 王莎, 窦桂铭, 马玉超. 植物内生链霉菌 *Streptomyces* sp. SAT1 的基因组测序和比较基因组分析[J]. 微生物学通报, 2021, 48(9): 3039-3053
Wang S, Dou GM, Ma YC. Genome sequencing and comparative genome analysis of *Streptomyces* sp. SAT1[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(9): 3039-3053 (in Chinese)
- [8] 刘晓瑜, 窦桂铭, 马玉超. 生防链霉菌 SAT1 的分离、鉴定及其对辣椒疫霉的生物防治潜力[J]. 广东农业科学, 2014, 41(19): 75-79, 85
Liu XY, Dou GM, Ma YC. Screening and identification of antagonistic SAT1 and its potential for biocontrol of pepper phytophthora blight[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(19): 75-79, 85 (in Chinese)
- [9] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16(3): 313-340
- [10] 邓子新, 周秀芬. 质粒在大肠杆菌和链霉菌 FR-008 之间的属间接合转移[J]. 遗传, 1994, 16(6): 7-10
Deng ZX, Zhou XF. Intergeneric plasmid conjugal transfer between *Escherichia coli* and *Streptomyces* FR-008[J]. *Hereditas: Beijing*, 1994, 16(6): 7-10 (in Chinese)
- [11] 涂佳佳. 基于基因组信息的深海放线菌 *Streptomyces koyangensis* SCSIO 5802 中次级代谢产物的挖掘. 贵州: 遵义医科大学硕士学位论文, 2019
Tu JJ. Mining of secondary metabolites in deep-sea actinomycetes *Streptomyces koyangensis* SCSIO 5802 based on genomic[D]. Guizhou: Master's Thesis of

- Zunyi Medical University, 2019 (in Chinese)
- [12] 曹永奕, 朱秀红, 夏丹, 黄超. 高氏一号干粉培养基的性能测试[J]. 河南科学, 2013, 31(11): 1887-1890
Cao YY, Zhu XH, Xiao D, Huang C. The performance analysis of power Gause I medium[J]. Henan Science, 2013, 31(11): 1887-1890 (in Chinese)
- [13] 刘如运. 几种常用抑菌试验方法的评价及比较[J]. 现代企业教育, 2013(14): 341-342
Liu RY. Evaluation and comparison of several common bacteriostatic test methods[J]. Modern Enterprise Education, 2013(14): 341-342 (in Chinese)
- [14] Kanehisa M. A database for post-genome analysis[J]. Trends in Genetics: TIG, 1997, 13(9): 375-376
- [15] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32: D277-D280
- [16] Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S, Katayama T, Araki M, Hirakawa M. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34: D354-D357
- [17] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 25-29
- [18] Yu GH, Wang GY. Optimization of the biosynthesis conditions of daptomycin by the biostatistical methodology[J]. Interdisciplinary Sciences, Computational Life Sciences, 2017, 9(1): 80-87
- [19] Feng JS, Jiang J, Liu Y, Li W, Azat R, Zheng XD, Zhou WW. Significance of oxygen carriers and role of liquid paraffin in improving validamycin A production[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2016, 43(10): 1365-1372
- [20] 李兴, 欧一新, 康前进, 白林泉, 邓子新. 抗细菌药物默诺霉素的化学生物学研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(7): 1839-1855
Li X, Ou YX, Kang QJ, Bai LQ, Deng ZX. Advances in chemical and biological research of the antibacterial drug moenomycin[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(7): 1839-1855 (in Chinese)
- [21] Subramaniam-Niehaus B, Schneider T, Metzger JW, Wohlleben W. Isolation and analysis of moenomycin and its biosynthetic intermediates from *Streptomyces ghanaensis* (ATCC 14672) wildtype and selected mutants[J]. Zeitschrift Fur Naturforschung C, 1997, 52(3/4): 217-226
- [22] Li XX, Lei X, Zhang C, Jiang ZB, Shi YY, Wang SM, Wang LF, Hong B. Complete genome sequence of *Streptomyces globisporus* C-1027, the producer of an enediyne antibiotic lidamycin[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 222: 9-10
- [23] Wang XJ, Yan YJ, Zhang B, An J, Wang JJ, Tian J, Jiang L, Chen YH, Huang SX, Yin M, et al. Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchenggensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(17): 4526-4527
- [24] Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, Van Den Berg M, Müller U, Heijne W, Wu L, Alam MT, Ronning CM, Nierman WC, et al. The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways[J]. Genome Biology and Evolution, 2010, 2: 212-224
- [25] Wibberg D, Al-Dilaimi A, Busche T, Wedderhoff I, Schrepf H, Kalinowski J, Ortiz De Orué Lucana D. Complete genome sequence of *Streptomyces reticuli*, an efficient degrader of crystalline cellulose[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 222: 13-14
- [26] Holmes NA, Devine R, Qin ZW, Seipke RF, Wilkinson B, Hutchings MI. Complete genome sequence of *Streptomyces formicae* KY5, the formicamycin producer[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 265: 116-118
- [27] Rutledge PJ, Challis GL. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(8): 509-523
- [28] Liu XY, Dou GM, Ma YC. Potential of endophytes from medicinal plants for biocontrol and plant growth promotion[J]. Journal of General Plant Pathology, 2016, 82(3): 165-173
- [29] Reitzer L, Schneider BL. Metabolic context and possible physiological themes of ζ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(3): 422-444
- [30] 刘芸菲, 薛栋升, 宫春杰. 谷氨酰胺合成酶研究进展[J]. 山东化工, 2021, 50(5): 97-99, 101
Liu YF, Xue DS, Gong CJ. Research progress of glutamine synthetase[J]. Shandong Chemical Industry, 2021, 50(5): 97-99, 101 (in Chinese)
- [31] Krivoruchko A, Zhang YM, Siewers V, Chen Y, Nielsen J. Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2015, 28: 28-42
- [32] 宋学勤, 吴星华. 新型 14 元-16 元大环内酯类抗生素的半合成[J]. 国外医药: 抗生素分册, 1997, 18(2): 119-124, 145
Song XQ, Wu XH. Semi-synthesis of new 14-16 macrolide antibiotics[J]. World Notes on Antibiotics, 1997, 18(2): 119-124, 145 (in Chinese)