

链霉菌次级代谢产物高产菌株的构建策略

陈奕公, 徐春燕, 岳思君, 李雅楠, 苏建宇*

(宁夏大学生命科学学院 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021)

摘要 随着基因测序技术的发展, 人类获得了大量有关链霉菌次级代谢产物合成基因簇的信息, 通过合理的构建策略可以激活其中的隐性基因簇或提高基因簇的表达水平, 从而获得新的链霉菌次级代谢产物, 或显著提高已知次级代谢产物的发酵水平。从基因表达调控、转座子突变、合成生物学方法、组学方法等四个方面, 综述了提高链霉菌次级代谢产物产量的构建策略及其研究进展。

关键词 链霉菌; 次级代谢产物; 高产菌株; 菌株构建

中图分类号 Q939.97

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2019)04-0091-09

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2019.04.015

Construction Strategies of High-Yielding *Streptomyces* Strain of Secondary Metabolites

CHEN Yi-gong, XU Chun-yan, YUE Si-jun, LI Ya-nan, SU Jian-yu

(Schl. of Life Sci., Key Lab. of Min. of Educ. for Protect'n and Utilizat'n of Special Bio-resources in W. China, Ningxia Uni., Yinchuan 750021)

Abstract With the development of genetic sequencing techniques, a large number of information of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* have been obtained. Activating the cryptic gene clusters among them or increasing the expression of gene clusters by rational constructing genetic engineering strains, thus obtain new secondary metabolites or significantly increase the fermentation level of known secondary metabolites. This paper summarized the advances in the promotion of the *Streptomyces* strain secondary metabolites production through the construction strategies from gene expression regulation, transposon mutation, synthetic bio-methods, omics methods these four aspects.

Keywords *Streptomyces*; secondary metabolites; high-producing strain; construction of strain

来源于链霉菌的次级代谢产物在医学、畜牧兽医、植物保护等领域具有重要的应用价值^[1]。由于部分链霉菌次级代谢产物难以实现高通量筛选, 且绝大多数新发现的次级代谢产物基因簇在常规发酵中不表达或者表达量极小, 因此, 需要对野生链霉菌菌株进行改造, 使其高效表达这些次级代谢产物基因簇, 从而支撑相应次级代谢产物的产品开发和产业化生产^[2-3]。传统的物理化学诱变通过单一或复合的诱变筛选, 得到次级代谢产物高产突

变菌株, 但长期重复使用某种诱变方式会导致菌株抗性饱和、突变率降低以及突变谱变窄。随着全基因组测序技术的普及, 通过对比分析野生菌株和正向突变菌株的基因组序列, 结合转录组学、蛋白质组学、代谢组学以及酶学研究, 使得在基因组水平上研究自发突变和诱导突变的过程以及基因突变与产量性状之间的关系成为可能, 从而有助于通过代谢工程手段进一步提高菌株次级代谢产物产量。本文综述了近年来链霉菌次级代谢产物高产菌株

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2016KJHM36)

作者简介: 陈奕公 男, 博士研究生。主要从事应用微生物学研究。Tel: 0951-2062051, E-mail: 499399990@qq.com

* 通讯作者。男, 博士, 教授。主要从事工业微生物技术研究。Tel: 0951-2062881, E-mail: su_jy@nxu.edu.cn

收稿日期: 2018-10-07

构建的相关研究进展。

1 基因表达调控提高产量

细胞代谢调控网络决定着链霉菌次级代谢产物基因的表达。对于次级代谢产物基因表达的调控,目前常采用启动子优化选择、正调控基因过表达、负调控基因阻断抑制、转录及翻译元件修饰、转运蛋白翻译后磷酸泛酰巯基乙胺羟基化等策略,提高细胞次级代谢产物的表达量。

1.1 启动子优化选择

强启动子可有效提高目的基因的表达量,因此被广泛应用于次级代谢产物高产菌株的构建。*ermEp** 是链霉菌中使用最为普遍的组成型强启动子,此外,诱导型强启动子 *tcp830*^[4]、*PA3*^[5]、*tipAp*、*nitAp*^[6]、*actIp*、*TREp*^[7] 等也广泛应用于链霉菌代谢工程和合成生物学改造。针对不同的链霉菌宿主采用不同启动子,目的基因的表达效果可能会存在差异,因此需要在工程菌株构建时对启动子进行优化选择。李佳等^[8] 将加纳链霉菌 (*S. ghanaensis*) phage I19 中的多重强启动子 *Psf* 与 *ermEp** 通过卡那霉素抗性梯度及邻苯二酚 2,3-双加氧酶显色系统进行比较,发现在大部分链霉菌中 *Psf* 与 *ermEp** 均可使目的基因高效表达,但棒状链霉菌 (*S. clavuligerus*) 以及 *S. coelicolor* 中 *Psf* 的表达活性要高于 *ermEp**。杨克迁课题组将 *Kasop** 与链霉菌中已有的强启动子 *ermEp** 和 *SF14p* 在 *S. coelicolor* 中进行对比,发现 *Kasop** 具有最高的转录及蛋白水平活性^[9]。该课题组对 *S. coelicolor* 中不同时序转录组数据进行分析 and 实验验证,获得了 116 个不同强度的组成型启动子,为链霉菌合成生物学研究提供了有力的元件支持^[10]。

1.2 基因的正、负调控表达

过表达正调控基因可在很多次级代谢产物的合成中发挥促进作用。弗氏链霉菌 (*S. fradiae*) 泰乐菌素的生物合成受多个正、负调控因子调控^[11-12]。将正调控基因 *tylR* 插入弗氏链霉菌基因组 ϕ C31 *attB* 位点,使其在胞内形成双拷贝,在组成型强启动子 *ermEp** 转录控制下,可使 Lilly 公司 *S. fradiae*C4 菌株的泰乐菌素产量提高 50%^[13]。同样是 16 元大环内酯类抗生素,螺旋霉素的生物合成中的关键基因 *SrmR* (*Srm22*) 受到 *Srm40* 的正调控^[14-15],在 *ermEp** 转录调控下导入

含 *srm40* 的多拷贝质粒,可以使螺旋霉素的效价提升近 4 倍。

敲除或抑制负调控基因,也是显著提高链霉菌次级代谢产物产量的途径之一。野生型链霉菌 *S. rapamycinicus* 的雷帕霉素产量低于 10 mg/L。雷帕霉素合成受 5 个调控基因的影响^[16],其中负调控基因 *rapY*、*rapR*、*rapS* 分别编码 TetR 家族阻遏蛋白双组分应答调控因子、应答因子以及组氨酸激酶,过表达任何一个负调控基因都会导致雷帕霉素产量的下降,而敲除 *rapS* 或 *rapY* 都会使雷帕霉素效价提高。Yoo 等^[17] 通过敲除 *rapS* 基因,并在 *ermEp** 转录控制下双拷贝过表达能抑制 *rapY* 表达的 *rapX*,最终 *S. rapamycinicus* 的雷帕霉素的产量达到 49 mg/L,较出发菌株提高 6.7 倍。而单独组成型表达 *rapX* 能使雷帕霉素产量提高 3.5 倍。Wu 等^[18] 发现 TetR 家族负调控基因 *SACE_3986* 对红色糖多孢菌 (*S. erythraea*) 红霉素生物合成具有负调控作用,敲除 *SACE_3986* 后, *S. erythraea* 的红霉素产量可增加 54%。阻断负调控基因同样可以提高核苷类抗生素的产量,在 Muraymycin 生产菌株 *Streptomyces* sp. NRRL30471 中,阻断其基因簇中的负调控基因 *mur34*,可以将 Muraymycin C1 和 D1 产量提高 10 倍^[19]。

1.3 转录与翻译元件的修饰

研究表明,链霉菌利福平抗性突变株中编码 RNA 聚合酶 β 亚基的 *rpoB* 基因发生点突变,其结果使变铅青链霉菌 (*S. lividans*) 的十二烷基灵菌红素、放线紫红素和钙依赖性抗生素产量均有所提高^[12],同样的现象也存在于 *S. erythraea* 合成红霉素、灰色链霉菌 (*S. griseus*) 合成链霉素、抗菌素链霉菌 (*S. antibioticus*) 合成放射霉素、白色链霉菌 (*S. albus*) 合成盐霉素^[20]。除 *rpoB* 外, RNA 聚合酶主要的 σ 亚基 (*HrdB* 或 σ^{HrdB}) 已被确定为提高阿维链霉菌 (*S. avermitilis*) 阿维菌素产量的有效作用靶点^[21-22]。

研究发现,阻断编码 30S 核糖体亚基装配辅助因子的 *rimP* 基因,可提升 *S. coelicolor* 的放线紫红素以及钙依赖性抗生素的产量^[23],也会提高异源表达的华光霉素和多氧霉素合成基因的水平。*rimP* 突变体生长较亲代缓慢,但有着更高的转录和翻译保真度,会提升 5 种全局调控基因 *absR1*、*adpA*、*afsR*、*atrA* 和 *rnc* 的转录,减少 3 种负调控因

子 *phoP*、*ndgR* 和 *ssgA* 的转录,提升 *metK* (编码 S-腺苷甲硫氨酸合成酶) 以及放线紫红素和钙依赖性抗生素合成代谢通路上的特异性激活因子 *ActII-ORF4* 和 *CdaR* 的翻译水平。而过表达编码核糖体循环因子的 *frr* 基因,可使 *S. coelicolor* 的放线紫红素产量及 *S. avermitilis* 的阿维菌素产量得到提高^[12]。

链霉菌在稳定期合成蛋白的能力是启动次级代谢产物合成的关键。*S. coelicolor* 合成放线紫红素过程中,特异性转录调控蛋白 *ActII-ORF4* 的浓度决定着同源合成结构基因的转录效率^[24]。Wang 等^[25] 通过向 *S. coelicolor* 中引入多重抗生素抗性基因 (*str*、*gen*、*rif*、*par*、*gnt*、*fus*、*tsp*、*lin*),筛选到能同时耐受 7~8 种抗生素的突变菌株 C7、C8,其突变核糖体有异常的蛋白和 ppGpp 合成活性,结果使放线紫红素的产量较野生型提高 180 倍。大量同类研究表明对核糖体进行修饰改造是提升次级代谢产物产量的有效途径之一。

1.4 载体蛋白翻译后的修饰

I 型和 II 型聚酮合酶 (PKS) 与非核糖体肽合成酶 (NRPS) 中,酰基载体蛋白 (ACP)、肽酰载体蛋白 (PCP) 及巯基化区域需经磷酸泛酰巯基乙胺转移酶 (PPTases) 修饰连接磷酸泛酰巯基乙胺基团使其发挥生物活性^[26]。在链霉菌中,有 AcpS 型和 Sfp 型两种 PPTases^[27],是控制合成聚酮的限速酶。

Fernández-Martínez 等^[28] 确定了 *S. venezuelae* 中一个编码与氯霉素生物合成有关的 Sfp 型 PPTase 基因 *cmlL*,通过在 *S. coelicolor* M1152 中表达 *cmlL*,使得氯霉素产量达到 50 mg/L,当敲除该 PPTase 基因后,氯霉素产量只有 20 mg/L。Hui 等^[29] 发现在聚烯大环内酯类抗生素游霉素生产菌株 *S. chattanoogensis* L10 中,有两种 PPTases (Sfp 型 SchPPT 和 AcpS 型 SchACPS),其中 SchPPT 可以激活 I 型及 II 型聚酮合酶的酰基载体蛋白, SchACPS 可以激活 II 型聚酮合酶和脂肪酸合成酶的酰基载体蛋白。阻断 SchPPT 基因会导致游霉素合成受阻,而过表达 SchPPT 的重组子,游霉素产量较亲本菌株可提高 40%。

2 转座子突变提高产量

转座子可在链霉菌中用来阻断、比对次级代

谢产物生物合成基因,通过插入基因片段来提高次级代谢产物产量。转座子还可用来鉴定链霉菌染色体中的中性插入位点^[30-31]。

链霉菌中导入自我复制的质粒后会明显影响次级代谢产物的产量。将编码泰乐菌素生物合成关键酶——大菌素甲基转移酶的 *tylF* 基因插入自我拷贝质粒 pIJ702 中,导入泰乐菌素生产菌 *S. fradiae* 内,会导致泰乐菌素前体物质合成量及泰乐菌素产量显著降低。通过 pKC796 质粒将 *tylF* 插入 ϕ C31 *attB* 位点并整合至染色体,导致 *S. fradiae* 所有大环内酯产量降低^[32]。解决这一问题的有效办法就是把基因插入到染色体的中性位点内。可以采取的策略:①将目的基因插入转座子中并导入染色体,再筛选中性位点插入基因的重组子;②首先通过转座子突变鉴定宿主菌染色体中性位点,再通过同源重组向转座子序列插入目的基因;③克隆染色体中性位点,插入目的基因,再通过同源重组整合进中性位点。Solenberg 等^[33] 对 Lilly 公司泰乐菌素生产菌株 *S. fradiae* C373.17 进行中性位点分析,结果表明其染色体中有约 50% 的插入位点为中性,其他位点则会导致泰乐菌素发酵效价降低,揭示了 *S. fradiae* 编码的大约 3 000 个基因并不是高产泰乐菌素所必须的。通过转座子 Tn5099 互换,该课题组将 *tylF* 的第二个拷贝插入 *S. fradiae* C373.17 染色体的中性位点上,可将泰乐菌素的发酵产量提高 30%。

3 合成生物学方法提高产量

借助基因组挖掘技术,已有越来越多的次级代谢产物合成基因簇被人们所了解。通过对次级代谢产物合成基因(簇)的复制及扩增、删除或阻断次级代谢产物的竞争通路、重构未知次级代谢产物基因簇及其异源表达、次级代谢产物高效表达体系构建等合成生物学手段在提高次级代谢产物产量方面发挥着越来越重要的作用。

3.1 次级代谢产物合成基因的复制及扩增

独立基因或完整的次级代谢产物基因簇的复制及高度扩增是提高次级代谢产物效价的有效方法^[12]。针对次级代谢产物合成前体的供给等问题,在插入解除限速的基因后,原次级代谢产物产生菌也可充当宿主,借助诱变、重组和其他靶向分子遗传途径来进一步提高次级代谢产物的产量。

细菌人工染色体(BAC)和由 P1 噬菌体衍生的人工染色体(PAC)载体中,可以克隆很大的链霉菌 DNA 片段^[34],因而可以插入次级代谢产物基因簇或外源功能基因片段,实现增加目的基因拷贝数或增加次级代谢产物产量的目的^[35]。Yanai 等^[36]以卡那霉素生产菌株系为出发菌株,通过增加卡那霉素基因簇拷贝数,筛选到卡那霉素高产菌株卡那霉素链霉菌(*S. kanamyceticus*) 12-

6,其卡那霉素产量可达到 376 mg/L,是亲本产量水平的 2 倍。Murakami 等^[37]构建了 ZouA 介导的 DNA 扩增系统^[38],使 *S. coelicolor* 放线紫红素产量达到 450 mg/L,高于对照水平 20 倍。Zhou 等^[39]在吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*) 5008 中应用了这个系统扩增井冈霉素 A 的基因簇,将井冈霉素的基因簇进行多拷贝串联,使井冈霉素 A 产量由 15 g/L 提高至 21 g/L(图 1)。

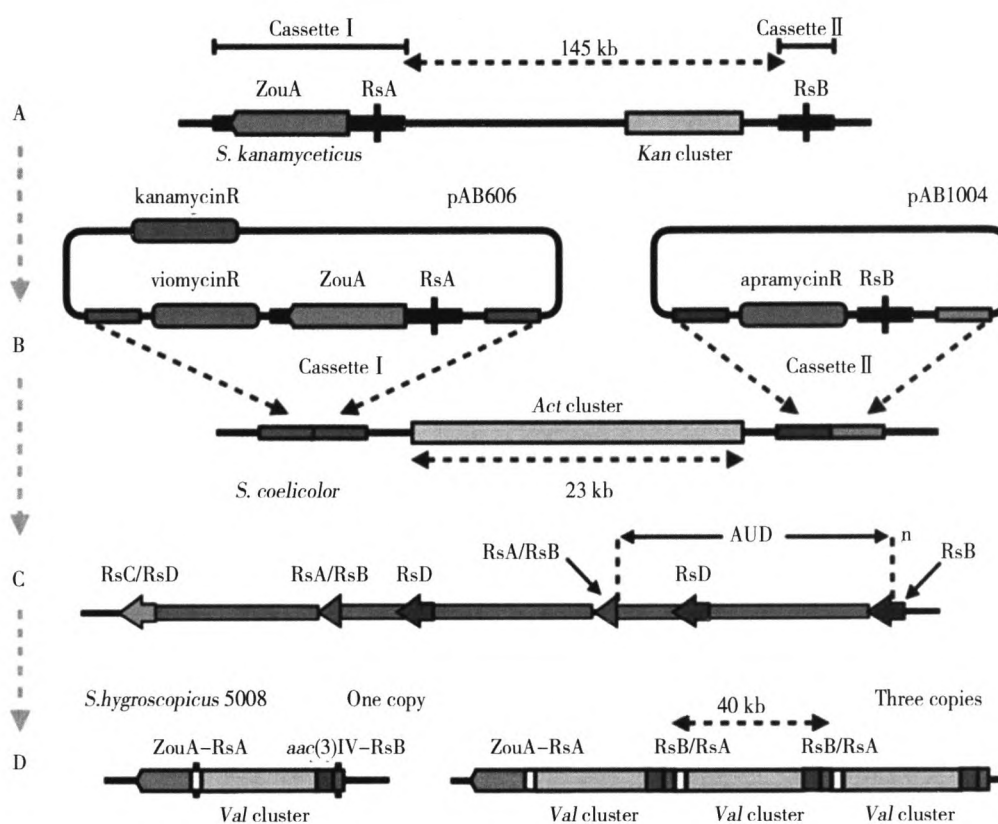


图 1 ZouA 介导的 DNA 扩增系统在不同宿主内的应用

Fig. 1 Application of ZouA mediated DNA amplification system in different hosts

Kan: 卡那霉素; Act: 放线紫红素; Val: 井冈霉素

Kan: Kanamycin; Act: Actinomycin; Val: Jinggangmycin

3.2 删除或阻断次级代谢产物的竞争通路

链霉菌合成的具有生物活性的次级代谢产物在胞内过量积累会影响其自身生长或对其合成途径产生反馈抑制,从而限制产物产量的提高。此外,次级代谢产物发酵中,副产物的积累也会影响目的产物的合成及产品纯度,限制了目的产物的发酵水平与实际应用。删除或阻断次级代谢产物

的竞争通路可有效解决这一问题。

在尼莫克汀发酵生产中,LL-F28249λ(该组分难以去除)、LL-F28249γ和LL-F28249ω三种副产物的生成影响了尼莫克汀的产量和产品纯化。研究发现,尼莫克汀生物合成基因簇中,nemD失活可导致C5-OH基团不能被进一步甲基化,从而阻断LL-F28249λ和LL-F28249γ的合成。党福军

等^[40]通过构建和筛选蓝灰链霉菌(*S. cyaneogriseus*)基因组文库,获得与 LL-F28249 ω 合成相关基因 *nolB*,采用连续敲除的方法定向改造尼莫克汀生产菌株,获得敲除 *nemD* 和 *nolB* 的分子改造菌株,不仅使尼莫克汀发酵水平提高 27.4%,且发酵产物中不再含有上述三种杂质成分。肖剑萍等^[41]通过敲除黑暗链霉菌(*S. tenebrarius*) Tt-49 中磷酸变位酶基因 *aprJ*,阻断了安普霉素合成,使菌体代谢流转向合成氨甲酰妥布霉素。在此基础上,再进一步敲除氨甲酰基转移酶基因 *tobZ*,使妥布霉素无法正常氨甲酰化,从而构建了大量积累妥布霉素、不再合成安普霉素和氨甲酰妥布霉素的工程菌株。

3.3 重构未知次级代谢产物基因簇及其异源表达

基因组测序和分析技术的进步,使得链霉菌中大量与次级代谢产物合成相关的隐性基因簇被逐渐发现。为了激活细胞内隐性基因簇,常用的方法是将某个基因簇完整地转入另一宿主进行表达,或者采用各种极端条件刺激菌体以启动其隐性基因簇的表达。这些方法操作繁琐,且大量试验后未必能获得理想的效果。

Luo 等^[42]采用 DNA assembler 技术,将启动子插入一个隐性基因簇中单个基因之间,来协助调控邻近基因表达的数量和时机,使基因簇中的每个基因均能被持续激活,进而改编细胞内的基因表达调控。他们将 6 个启动子插入 *S. griseus* 中的隐性基因簇(包含 6 个基因)中并导入异源宿主 *S. lividans* 内进行表达,重构的菌株合成了一些大环内酰胺代谢产物(PTM),很多具有生物医学应用的潜力。在进一步的研究工作中,该课题组^[43]通过对 *S. albus* J1074 进行 RNA 序列分析,从筛选得到的 32 个强启动子中选取 5 个强度最高的启动子,引入 *S. griseus* 基因组扩增出的 PTM 基因簇开放阅读框内进行重构,并分别在 *S. lividans* 66、*S. albus* J1074 和 *S. coelicolor* M1146 中成功表达,PTM 的效价相较于对照得到了明显提升。

3.4 高效表达底盘的构建

链霉菌属的微生物是很多天然活性产物的合成载体,可充当宿主并借助同源的合成通路来表达相应的次级代谢产物基因簇。应用于基因组挖

掘技术及次级代谢产物生物合成的链霉菌表达宿主需要在不影响自身生长和目标产物合成的前提下,去除一些非必须次级代谢产物基因簇,将基因组简化或删除部分竞争途径^[44]。利用同源重组方法敲除基因需要消耗大量时间,Zhou 等^[45]耗时多年通过连续敲除,构建了一个去除 900 kb 端粒序列(占全基因组的 14%)以及全部 10 个 PKS、NRPS 基因簇的 *S. coelicolor* 菌株,并在此基础上实现了放线紫红素的过表达。

ϕ BT1 整合酶能在体外高效催化 *attB* 和 *attP* 之间的重组反应,快速构建基因打靶载体,完成靶标基因的替换。Zhang 等^[46]运用此方法在阻断 *S. coelicolor* M145 中钙依赖性抗生素以及放线紫红素合成通路的基础上,敲除十二烷基灵菌红素合成负调控基因 *rrdA*,从而得到比野生型十二烷基灵菌红素产量高 5 倍以上的突变株 ZB8。

CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的出现,为多个不同基因组的编辑以及改造表达体系提供了新的途径。CRISPR/Cas9 技术可在链霉菌中高效删除基因或基因簇,实现基因的精确替换,并能可逆地控制靶基因的表达^[47]。

Cobb 等^[48]将 CRISPR/Cas9 系统应用于链霉菌多基因快速编辑,在 *S. lividans*、*S. albus*、绿色产色链霉菌(*S. viridochromogenes*)中能够删除单个或两个次级代谢产物合成基因簇片段(20 ~ 30 kb),删除效率高达 70% ~ 100%。他们运用 pC-RISPomyces 系统在 *S. lividans* 中高效删除了十二烷基灵菌红素完整合成途径的基因簇(31.4 kb),在 *S. albus* J1074 中删除了聚酮合酶-非核糖体肽合成酶(PKS-NRPS)杂合基因簇(13.2 kb),从而切断了该代谢通路。

Huang 等^[49]建立了用于链霉菌基因操控的高效 CRISPR/Cas9 基因组编辑质粒 pKCcas9d0,包括一个靶向特异性向导 RNA、密码子优化的 *cas9* 以及两个同源介导的双链 DNA 修复(HDR)模板(图 2)。通过一步接合转移,将 pKCcas9d0 系列编辑质粒导入模式菌 *S. coelicolor* M145 中,获得不同编辑水平的基因组,包括 *actII-orf4*、*redD* 和 *glnR* 单基因的缺失,放线紫红素(21.3 kb)、十二烷基灵菌红素(31.6 kb)以及钙依赖性抗生素(82.8 kb)独立次级代谢产物基因簇的缺失,编辑效率可达 60% ~ 100%。

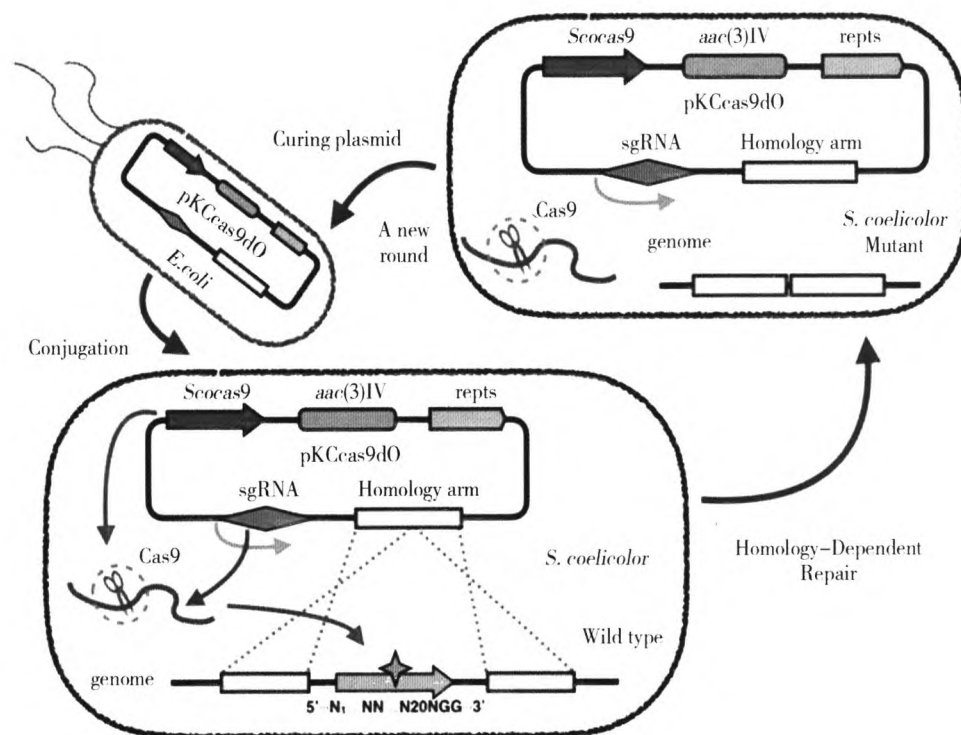


图2 CRISPR/Cas9 基因编辑质粒 pKCcas9d0 的编辑策略

Fig. 2 Editing strategy of CRISPR/Cas9 gene editing plasmid pKCcas9d0

4 组学方法的综合应用

Robles-Relglero 等^[50]通过对 *S. clavuligerus* 全霉素高产突变株进行蛋白组学分析,发现突变株中 *HlmD*、*HlmF* 以及 *HlmG* 相对野生菌株呈现表达差异,通过蛋白质质谱测定其末端蛋白序列以及在高产株中对 *hlmH*、*hlmE*、*hlmM*、*hlmI* 进行失活试验,定位了 *S. clavuligerus* 全霉素生物合成基因簇,并在 *S. albus* 中异源表达了全霉素,说明基因簇中与全霉素合成相关的结构基因是完整的^[51]。Lum 等^[52]比较分析了红霉素生产菌 *S. erythraea* 的野生型和高产菌株,发现红霉素合成基因簇中没有相关的调控基因,转录组数据表明红霉素合成基因持续协同表达可能是受一个全局调控机制的影响。为了找出可能的全局调控蛋白,Chng 等^[53]进行 DNA 结合实验发现 BldD 蛋白关联着红霉素合成基因簇内的所有 5 个启动子区域。相较于野生型,红霉素生产菌株中 *bldD* 表达水平更高,当敲除 *bldD* 后,会影响红霉素生产菌在固体培养基中的生长分化,并导致红霉素产量降低 7 倍。Kirm 等^[54]通过比较蛋白质组学对

S. erythraea 的野生型和生产菌株进行分析,寻找生产菌中的高表达调控基因。他们发现编码调控蛋白 SACE_5599 的基因与林可链霉菌 (*S. lincolnensis*) 中林可霉素合成途径中的 *lmbU* 基因以及类球形链霉菌 (*S. spheroides*) 中新生霉素基因簇内的 *novE* 正调控基因相关。转录研究表明红霉素生产菌株中 SACE_5599 表达量是野生型的 20 倍。在野生型菌株中双拷贝组成型表达 SACE_5599 可提升红霉素产量,在生产菌株中则没有提升,但在生产菌株中敲除 SACE_5599 会导致产孢缺陷,红霉素效价下降。SACE_5599 以及 *bldD* 的过表达,可提升菌体红霉素的合成和产孢能力,同时也表明这两个基因是紧密关联的。

5 展望

链霉菌基因组内含有大量的次级代谢产物生物合成基因簇,能编码丰富的次级代谢产物,是抗生素等生物活性物质筛选的重要来源。然而,许多链霉菌次级代谢产物合成基因簇处于沉默状态,实验条件下并不表达合成相应产物,或表达量很低,传统的筛选方法很难获得新的有价值的次

级代谢产物。随着全基因组测序和分析技术的不断发展,越来越多的链霉菌隐性次级代谢产物合成基因簇被发现,这些隐性基因簇所编码的产物大多数是未被鉴定的化合物。深入研究这些新发现的链霉菌次级代谢产物,对于推动新型治疗药物的开发具有重要意义。因此,必须建立使链霉菌大量表达这些产物的技术方法。

利用基因工程技术,对链霉菌隐性次级代谢产物合成基因簇的表达及产物合成代谢调控等方面进行系统研究,在此基础上,采取合理的构建策略对链霉菌菌株进行分子改造,激活其中的隐性基因簇或对隐性基因簇进行异源表达,使次级代谢产物的合成量显著提高,将为新型治疗药物的发现和研究奠定重要的基础。这方面的研究将是今后链霉菌生物活性物质研究领域的重要工作。

参考文献:

- [1] Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future[J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 2016, 43 (2-3):1-22.
- [2] 王婷婷, 邓子新, 陈文青. 抗生素生物合成基因簇克隆策略的研究进展[J]. *生物加工过程*, 2016, 14(2):70-74.
- [3] 陈亮宇, 王玉梅, 赵心清. 基因组挖掘技术在海洋放线菌天然产物研究开发中的应用及展望[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(10):1896-1908.
- [4] Dangel V, Westrich L, Smith MCM, et al. Use of an inducible promoter for antibiotic production in a heterologous host[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2010, 87(1):261-269.
- [5] Horbal L, Fedorenko V, Luzhetskyy A. Novel and tightly regulated resorcinol and cumate-inducible expression systems for *Streptomyces*, and other actinobacteria[J]. *Applied Microbiology & Bio-technology*, 2014, 98(20):8641-8655.
- [6] Luo Y, Zhang L, Barton KW, et al. Systematic Identification of a Panel of Strong Constitutive Promoters from *Streptomyces albus*[J]. *Acs Synthetic Biology*, 2015, 4(9):209-223.
- [7] Rebets Y, Brötz E, Tokovenko B, et al. Actinomycetes biosynthetic potential: how to bridge in silico and in vivo? [J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 2014, 41(2):387-402.
- [8] 李佳, 向四海, 杨秀山, 等. 报告基因法比较两种放线菌启动子的活性[J]. *微生物学报*, 2009, 49(11):1454-1458.
- [9] Wang W, Li X, Wang J, et al. An engineered strong promoter for *Streptomyces*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2013, 79(14):4484-4492.
- [10] Li S, Wang J, Li X, et al. Genome-wide identification and evaluation of constitutive promoters in *Streptomyces*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1):1-11.
- [11] Fouces R, Mellado E, Diez B, et al. The tylosin biosynthetic cluster from *Streptomyces fradiae*: genetic organization of the left region[J]. *Microbiology*, 1999, 145(Pt 4)(4):855-868.
- [12] Baltz RH. Strain improvement in actinomycetes in the post-genomic era[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(6):657-666.
- [13] George S, Bate N, Cundliffe E. Positive control of tylosin biosynthesis: pivotal role of TylR[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 54(5):1326-1334.
- [14] Richardson MA, Kuhstoss S, Huber ML, et al. Cloning of spiramycin biosynthetic genes and their use in constructing *Streptomyces ambofaciens* mutants defective in spiramycin biosynthesis[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(7):3790-3798.
- [15] Karray F, Darbon E, Nguyen HC, et al. Regulation of the biosynthesis of the macrolide antibiotic spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*[M]. *The Occupation of Japan: MacArthur Memorial Foundation*, 1984:5813-5821.
- [16] Park SR, Yoo YJ, Ban YH, et al. ChemInform Abstract: Biosynthesis of Rapamycin and Its Regulation: Past Achievements and Recent Progress[J]. *Cheminform*, 2010, 41(49):434-441.
- [17] Yoo YJ, Hwang JY, Shin HL, et al. Characterization of negative regulatory genes for the biosynthesis of rapamycin in *Streptomyces rapamycinicus*, and its application for improved production[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(1):1-11.
- [18] Wu P, Hui P, Zhang C, et al. SACE_3986, a TetR family transcriptional regulator, negatively controls erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(7):1159-1167.
- [19] Xu D, Liu G, Cheng L, et al. Identification of Mur34 as the novel negative regulator responsible for the biosynthesis of mu-raymycin in *Streptomyces* sp. NRRL30471[J]. *Plos One*, 2013, 8(10):271-272.
- [20] Tanaka Y, Kasahara K, Hirose Y, et al. Activation and Products of the Cryptic Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters by Rifampin Resistance (*rpoB*) Mutations in *Actinomycetes*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(13):2959-2970.

- [21] Zhuo Y, Zhang W, Chen D, et al. Reverse biological engineering of *hrdB* to enhance the production of avermectins in an industrial strain of *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107;11250[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(25):11250-11254.
- [22] Wang H, Liu Y, Wu K, et al. Rational selection and engineering of exogenous principal sigma factor (σ^{HrdB}) to increase teicoplanin production in an industrial strain of *Actinoplanes teichomy-ceticus*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 1-8.
- [23] Pan Y, Cheng L, Dong H, et al. Disruption of rimP-SC, encoding a ribosome assembly cofactor, markedly enhances the production of several antibiotics in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12(1):1-16.
- [24] Gramajo HC, Takano E, Bibb MJ. Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated [J]. *Molecular Microbiology*, 1993, 7(6):837-845.
- [25] Wang G, Hosaka T, Ochi K. Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2008, 74(9):2834-2840.
- [26] Walsh CT, Fischbach MA. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(8):2469-2493.
- [27] Wang YY, Luo HD, Zhang XS, et al. The substrate promiscuity of a phosphopantetheinyl transferase SchPPT for coenzyme A derivatives and acyl carrier proteins[J]. *Archives of Microbiology*, 2016,198(2):193-197.
- [28] Fernández-Martínez LT, Borsetto C, GomezEscribano JP, et al. New Insights into Chloram-phenicol Biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 [J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2014, 58(12):7441-7450.
- [29] Jiang H, Wang YY, Ran XX, et al. Improvement of natamycin production by engineering of phosphopantetheinyl transferases in *Streptomyces chattanoogensis* L10 [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2013, 79(11):3346-3354.
- [30] Hahn DR, Solenberg PJ, Baltz RH. Tn5099. a xylE promoter probe transposon for *Streptomyces* spp. [J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(17):5573-5577.
- [31] Solenberg PJ, Baltz RH. Transposition of Tn5096 and other IS493 derivatives in *Streptomyces griseofuscus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(3):1096-1104.
- [32] Cox KL, Seno ET. Maintenance of cloned tylosin biosynthetic genes in *Streptomyces fradiae* on freely-replicating and integrative plasmid vectors [J]. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*, 14A (1990):93.
- [33] Solenberg PJ, Cantwell CA, Tietz AJ, et al. Transposition mutagenesis in *Streptomyces fradiae*: identification of a neutral site for the stable insertion of DNA by transposon exchange [J]. *Gene*, 1996, 168(1):67-72.
- [34] 黄胜, 李娜, 周俊, 等. 适用于链霉菌大片段基因组 DNA 克隆和异源表达的细菌人工染色体 (BAC) 载体的构建及应用[J]. *微生物学报*, 2012, 52(1):30-37.
- [35] 盖忆青, 朱丽, 陈代杰, 等. 东方拟无枝酸菌 HCCB10007 内 *attB* 位点的人工构建 [J]. *中国抗生素杂志*, 2014, 39(3):193-197.
- [36] Yanai K, Murakami T, Bibb M. Amplification of the entire kanamycin biosynthetic gene cluster during empirical strain improvement of *Streptomyces kanamyceticus* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(25):9661-9666.
- [37] Murakami T, Sumida N, Bibb M, et al. ZouA, a putative relaxase, is essential for dna amplification in *Streptomyces kanamyceticus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(8):1815-1822.
- [38] Murakami T, Burian J, Yanai K, et al. A system for the targeted amplification of bacterial gene clusters multiplies antibiotic yield in *Streptomyces coelicolor* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(38):16020-16025.
- [39] Zhou TC, Kim BG, Zhong JJ. Enhanced production of validamycin A in *Streptomyces hygroscopicus*, 5008 by engineering validamycin biosynthetic gene cluster [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2014, 98(18):7911-7922.
- [40] 党福军, 夏海洋, 覃重军. 利用基因工程定向阻断尼莫克汀工业生产菌株中多个杂质组分的生物合成 [J]. *中国抗生素杂志*, 2014, 39(8):579-583.
- [41] 肖剑萍, 温淑平, 洪文荣. 单组分妥布霉素工程菌的构建 [J]. *中国抗生素杂志*, 2014, 39(12):891-895.
- [42] Luo Y, Huang H, Liang J, et al. Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster [J]. *Nature Communications*, 2013, 4(1):94-105.
- [43] Luo Y, Zhang L, Barton KW, et al. Systematic identification of a panel of strong constitutive promoters from *Streptomyces albus* [J]. *Acs Synthetic Biology*, 2015, 4(9):209-223.

- [44] 姚永鹏, 王为善, 杨克迁. 链霉菌中高效生产聚酮化合物的研究方法及其进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(3):418-428.
- [45] Zhou M, Jing X, Xie P, et al. Sequential deletion of all the polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic gene clusters and a 900-kb subtelomeric sequence of the linear chromosome of *Streptomyces coelicolor*[J]. Fems Microbiology Letters, 2012, 333(2):169-179.
- [46] Zhang B, Zhang L, Dai R, et al. An efficient procedure for marker-free mutagenesis of *S. coelicolor* by site-specific recombination for secondary metabolite overproduction [J]. Plos One, 2013, 8(2):711-715.
- [47] Tong Y, Charusanti P, Zhang L, et al. CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes[J]. Acs Synthetic Biology, 2015, 4(9):1020-1030.
- [48] Cobb RE, Wang Y, Zhao H. High-Efficiency Multiplex Genome Editing of *Streptomyces* Species Using an Engineered CRISPR/CasSystem[J]. Acs Synthetic Biology, 2014, 4(6):723-728.
- [49] Huang, Guosong, Zheng, et al. One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces* [J]. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica, 2015, 47(4):231-243.
- [50] Robles-Reglero V, Santamarta I, Álvarez-Álvarez R, et al. Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus* [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 163(1):69-76.
- [51] Huang S, Zhao Y, Qin Z, et al. Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(3):811-816.
- [52] Lum AM, Huang J, Hutchinson CR, et al. Reverse engineering of industrial pharmaceutical-producing actinomycete strains using DNA microarrays[J]. Metabolic Engineering, 2004, 6(3):186-196.
- [53] Chng C, Kao CM. A key developmental regulator controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(32):11346-11351.
- [54] Kirm B, Magdevska V, Tome M, et al. SACE_5599, a putative regulatory protein, is involved in morphological differentiation and erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12(1):491-494.

欢迎订阅《微生物学杂志》