

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(3):402-409; 4 March 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

粤蓝链霉菌榴菌素生物合成基因 *orf20* 的功能

邓名荣, 郭俊, 黄永恒, 朱红惠*

广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广州 510070

摘要:【目的】在大肠杆菌中, 转录因子 SoxR 作为胞内氧化还原感应器, 参与抗氧化胁迫的全局性调控。粤蓝链霉菌榴菌素生物合成基因簇内存在一个类 *soxR* 基因 *orf20*, 但其生理功能仍不清楚。【方法】将 *orf20* 基因在大肠杆菌中进行表达, 分析携带重组质粒的大肠杆菌对百草枯抗性的变化。同时通过修改后的 PCR-targeting 方法构建粤蓝链霉菌 *orf20* 删除的突变株, 分析突变株的表型变化和对百草枯抗性水平的变化。【结果】重组 ORF20 在羧基端含有组氨酸标签, 并在大肠杆菌中获得可溶性表达, 携带重组质粒 pET28b-*orf20* 的大肠杆菌对百草枯的抗性水平显著提高。粤蓝链霉菌 *orf20* 删除突变株仍具有产孢能力, 生长特性没有改变, 对百草枯的抗性水平也没有变化, 但榴菌素的产量大幅提高, 是野生株的 3.3 倍。【结论】在大肠杆菌中, *orf20* 基因的编码产物能够被百草枯激活, 替代 SoxR 参与抗氧化胁迫的调控。在粤蓝链霉菌中, *orf20* 基因不参与抗氧化胁迫, 而对榴菌素的产生有负调控效应。

关键词: 粤蓝链霉菌, 榴菌素, 生物合成, *orf20* 基因, 转录因子 SoxR

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0402-08

榴菌素 (Granaticin, GRA) 最早于 1957 年在橄榄色链霉菌 (*Streptomyces olivaceus*) 中被分离发现^[1], 后在紫红链霉菌 (*S. violaceoruber*) 等几个菌株中也被分离得到^[2-5]。该抗生素的化学结构于 1968 年确定^[6-7], 属于芳香聚酮中的苯并异色烷醌 (benzoisochromanquinone, BIQ) 类抗生素。BIQ 抗生素已成为研究 II 型聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS)、抗生素生产、次级代谢及调控的模式化合物, 放线紫红素 (Actinorhodin, ACT) 是最著名的 BIQ 成员。GRA 与 ACT 有相似的碳骨架, 但是吡喃环上的立体化学结构与其刚好相反, 糖基附着 (sugar attachment) 也非常特殊, 因此也引起了化学家、生物

化学家的兴趣。1998 年 Ichinose 等^[8]首先报道了紫红链霉菌 GRA 的完整基因簇, 并通过序列同源性, 对簇内大部分基因进行了功能注释。但此后仅有少数几篇在体外开展有关负责糖基附着^[9-10]、吡喃环立体化学^[11-12]基因的功能研究报道, 而有关 GRA 生物合成调控机制的研究未见任何报道, 这主要是由于未能建立紫红链霉菌的有效遗传转化体系。

粤蓝链霉菌 (*S. vietnamensis*) 是我们近年从热带原始森林土壤中分离获得的链霉菌新种^[13]。该菌能在多种培养基中产生水溶性紫罗兰蓝色素, 乙酸乙酯粗提物对革兰氏阳性细菌有较强的广谱抗菌活性, 对部分革兰氏阴性菌也有不同程度的抑制作

基金项目: 科技部国际合作计划专项 (2008DFA31560); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-G-075-11); 广东省科学院科技创新引导项目 (cx200702); 广东省科学院青年基金项目 (qnjj20092)

* 通信作者。Tel: +86-20-87684632; E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

作者简介: 邓名荣 (1979-), 男, 江西安义人, 助理研究员, 主要从事微生物资源、放线菌次级代谢产物及其调控。E-mail: dengmingrong@tom.com

收稿日期: 2010-09-20; **修回日期:** 2010-12-21

用,同时对 HeLa 细胞也显示了很强的抗肿瘤活性; TLC - 生物显影试验进一步表明,两个蓝色组分 B1、B2 是主要的抗菌活性成分^[14],后被分别鉴定为 GRA 和 GRA B。并采用分段、分步的克隆策略获得了粤蓝链霉菌 GRA 生物合成基因簇全长序列,与已报道的 GRA 生物合成基因簇^[8]相比,各编码基因有较高的序列相似率,在 70% - 92% 之间,但 *orf35* 完全缺失,并存在大量的小片段的插入或缺失(未发表)。我们进一步尝试并成功建立了基于 *Escherichia coli-Streptomyces* 属间结合转移的粤蓝链霉菌遗传转化体系^[15]。

Ichinose 等^[8]在基因注释分析时发现, GRA 基因簇内 *orf20* 基因的编码产物在氨基端含有螺旋 - 转角 - 螺旋 (helix-turn-helix, HTH) 结构,在羧基端存在模体序列“CX₂CXCX₅C”,与大肠杆菌 (*E. coli*) *soxR* 基因的编码蛋白存在 53% 的序列相似度。粤蓝链霉菌 *orf20* 基因与紫色链霉菌 *orf20* 基因和大肠杆菌 *soxR* 基因的序列相似度分别为 86%、56%,其编码产物也存在 HTH 结构及模体序列“CX₂CXCX₅C”。*soxR* 基因在大肠杆菌中参与抗氧化胁迫 (oxidative stress) 的全局性调控^[16],鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)^[17]、根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)^[18]、创伤弧菌 (*Vibrio*

vulnificus)^[19] 等多个物种的类 *soxR* 基因都与抗氧化胁迫调控相关。但研究发现铜绿假单胞 (*Pseudomonas aeruginosa*) 中类 *soxR* 基因并不参与抗氧化胁迫,而是受内源的绿脓菌素 (pyocyanin, PYO) 的激活参与群体感应 (quorum sensing, QS) 和致病过程^[20]。生物信息学分析结果表明^[21],类 *soxR* 基因也广泛存在于放线菌类群中,但对其生理功能并不清楚。目前仅知道^[22],在天蓝色链霉菌 (*S. coelicolor*) A3(2) 野生株中,受类 SoxR 调控的目标基因的表达水平要比不产 ACT 和十一烷基灵菌红素 (undecylprodigiosin, UP) 的突变株的提高了 250 - 6000 倍,提示类 SoxR 能够应答这些抗生素。GRA 生物合成基因 *orf20* 的特殊性在于:作为类 *soxR* 基因,位于 GRA 生物合成基因簇内,参与 GRA 的生物合成,而目前其它所有已知的 *soxR* 均位于基因组独立的座位上。那么该基因在粤蓝链霉菌中究竟有何生理功能? 在榴菌素生物合成中又起何作用? 本文报道我们对该基因功能研究的初步结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所用菌株和质粒列于表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain/plasmid	description	Reference/source
<i>S. vietnamensis</i>		
GIMV4.0001	Wild type	[13]
DMR20	$\Delta gra-orf20::aac(3)-IV$	this study
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi - 1, hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1, supE44, \Delta(lac - proAB)</i> , [F' , <i>traD36, proAB, lacI^Z\Delta M15</i>]; general cloning strain	[22]
BL21 (DE3)	F^- , <i>ompT, hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>gal, dcm, \lambda</i> (DE3); expression host	Novagen
ET12567	<i>dam, dcm, hsdM, hsdS, hsdR, cat, tet</i> ; for intergeneric conjugation	[23]
BW25113	$\Delta araBAD, \Delta rhaBAD$; for PCR-targeted disruption	[24]
Plasmids		
pET28b(+)	<i>neo, T7lac</i> ; expression vector	Invitrogen
pET28b- <i>orf20</i>	<i>gra-orf20</i> inserted between the <i>NcoI</i> and <i>XhoI</i> on pET28b(+)	this study
pCR2.1	<i>bla, neo</i> ; TA cloning vector	Invitrogen
pCR-xgra-20	A 4.6-kp fragment containing <i>gra-orf20</i> and flanking region cloned into pCR2.1, serving as the target plasmid	this study
pCR-xgra-20-apra	Mutant pCR-Xgra-20 with <i>gra-orf20</i> replaced by the <i>aac(3)-IV/oriT</i> cassette	this study
pUZ8002	<i>tra, neo, RP4</i> ; helping plasmid for conjugation	[25]
pIJ773	<i>oriT, aac(3)-IV</i>	[26]
pIJ790	λ -RED (<i>gam, bet, exo, cat, araC, rep101</i>) ^{ts}	[26]

1.1.2 主要试剂和培养基: DNA 聚合酶 LA Taq, 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶、IPTG、X-Gal 等均购自宝生物工程(大连)有限公司, 胶回收纯化试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。百草枯(paraquat, PQ)为梯希爱(上海)化成工业发展有限公司产品, 阿普拉霉素(Apramycin, Apra)、萘啶酮酸(Nalidixic acid)为 Sigma 产品, 其他抗生素为常规产品。LB、NA、YEME、高氏合成一号、YD、2 × YT、SOB 等培养基均按标准配方配制。

1.2 pET28b-orf20 载体的构建及表达

大肠杆菌和链霉菌相关的分子生物学操作分别按文献^[27]和文献^[28]进行。根据粤蓝链霉菌的榴菌素生物合成基因簇序列(登录号: GU233672), 设计引物 ET28-ORF20F (5'-CATGCCATGGGCACCGTCCCGGCCCGCTAC-3') 和 ET22-ORF20R (5'-TCCTTCGAGTCTCGGGCCCTCCTGGCA-3'), 从粤蓝链霉菌基因组中扩增出 *orf20* 基因, 使扩增产物两端分别带上 *NcoI* 和 *XhoI* 酶切位点, 双酶切、胶回收后, 与同样双酶切的 pET28b(+) 载体相连接, 即可获得 pET28b-*orf20*。重组表达载体经 PCR 和酶切验证后, 并进一步测序验证基因序列及读码框准确性。pET28b-*orf20* 转化 *E. coli* BL21(DE3), 以 *E. coli* BL21(DE3)/pET28b(+) 为对照, 进行诱导表达。表达形式鉴定时, 取诱导培养液 3 mL, 收集细胞, 重悬于 1.5 mL TE (pH8.0) 中, 利用高压破碎仪破碎(172 MPa)后, 4℃、15000 × g 离心 15 min, 收集上清和沉淀, 沉淀用 1.5 mL TE 重悬, 分别进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳检测。通过调节 IPTG 浓度、诱导起始 OD_{600} 值, 诱导表达时间等参数进行优化, SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达量和表达形式。重组蛋白用 HisTrap FF crude 柱(1 mL)在 AKTA 蛋白层析系统(FPLC)上用咪唑梯度洗脱。

1.3 粤蓝链霉菌突变株的构建及表型分析

突变株 DMR20 的构建采用 PCR-targeting 方法^[25], 有所改动: 利用引物 *xgra20F* (5'-CCG CTGCTGCCCAACTC-3') 和 *xgra20R* (5'-GTCCCGTACGTCGAGGAACT-3') 从粤蓝链霉菌基因组中扩增出榴菌素生物合成基因簇中 *orf20* 基因及上下游各约 2 kb 共 4.6 kb 的片段, TA 克隆至 pCR2.1, 获得 pCR-xgra-20, 并将此重组质粒作为突变母体质粒导入 *E. coli* BW25113/pIJ790, 获得 *E. coli* BW25113/pIJ790/pCR-xgra-20。利用引物 TAR-ORF20F (5'-

ACCAGCTGCACCAGGCCCTGGTGGAGGCCGGCTGACATGATTCCGGGGATCCGTCCGACC-3') 和 TARORF-20R (5'-ACCCGCCGCCCGGTCCCGCGCCCGCCCGTTCCCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3') 扩增 pIJ773 质粒上包含 Apra 抗性基因和转移起始序列的 1.4 kb 片段(*aac(3)-IV/oriT* cassette), PCR 产物纯化后电击法转化 *E. coli* BW25113/pIJ790/pCR-xgra-20。 λ /RED 重组系统将质粒 pCR-xgra-20 上的 *orf20* 基因替换成 *aac(3)-IV/oriT* cassette, 而获得 pCR-xgra-20-apra。pCR-xgra-20-apra 转化 *E. coli* ET12567/pUZ8002, *E. coli* ET12567/pUZ8002/pCR-xgra-20-apra 与粤蓝链霉菌孢子进行接合转移, 在 YD 平板上筛选接合子。覆盖抗生素时, 仅加入 Apra 和萘啶酮酸。待接合子长出后, 随机转移 100 个至含有卡那霉素(Kanamycin, Kan)和 Apra 以及只含 Apra 的两种 NA 平板上, 获得 12 个单一抗性表型(Kan⁻、Apra⁺)的接合子。随机选择 2 个, 利用 PCR 方法进行基因型的验证。PCR 采用 4 条引物 *xgra20F*, *xgra20R*, *apraF* (5'-GGTCCACAGCTCCTTCGTA-3'), *apraR* (5'-TTATGAGCTCAGCCAATCGAC-3') 组合成的 4 个引物对进行验证。在高氏合成一号培养基平板上测定突变株的产孢能力, 在 YEME 液体培养基中测定生长曲线和产色素(榴菌素)能力。产色素能力采用比色法进行相对定量, 培养 24 h 后, 离心, 取 50 μ L 上清用 TE (pH8.0) 缓冲液定容至 1 mL, 测定 580 nm 波长处的光吸收值。

1.4 粤蓝链霉菌突变株及重组大肠杆菌对 PQ 的抗性分析

以不同浓度的 PQ 对细胞生长曲线的影响来判断各菌株的相对抗性水平。对于粤蓝链霉菌, YEME 液体过夜培养的种子液, 离心收集菌体, 洗涤后用无菌水稀释至 OD_{600} 为 0.6, 按 5% 比例接种, 使初始 OD_{600} 约为 0.08。接种时加入 PQ 至终浓度 0 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L。在培养的初始 6 h, 每隔 2 h 取样, 以后约隔 1 h 取样, 测定 OD_{600} , 菌株产色后, 用无菌水洗涤至目测无色后再测定, 每处理 3 个重复。对于大肠杆菌, LB 液体过夜培养的种子液用无菌水稀释至 OD_{600} 值为 0.6, 按 0.5% 比例接种, 使初始 OD_{600} 约为 0.005。接种时加入 Kan (50 mg/L)、IPTG (0.2 mmol/L), 同时加入 PQ 至终浓度 0、10、20、40、60 mg/L; 在培养的初始 4 h, 每隔 2 h 取样, 以后约隔 1 h 取样, 测定

OD_{600} , 每处理 3 个重复。在生长曲线测定取样结束后, 同时留取样品进行 SDS-PAGE 分析, 以验证在该条件下 *orf20* 的表达量和表达形式。

2 结果和分析

2.1 pET28b-*orf20* 载体的构建及表达

将构建的 pET28b-*orf20* 质粒进行 PCR 和酶切验证, 凝胶电泳显示均存在约 560 bp 大小的特异条带, 与预期结果一致; 测序结果表明, 基因序列及读码框完全正确, 进一步确证重组载体构建成功, 重组表达的 ORF20 蛋白在羧基端将带上组氨酸标签(结果未显示)。pET28b-*orf20* 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 以 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28b(+) 为对照, 进行诱导表达, SDS-PAGE 电泳检测显示, 与对照相比, BL21 (DE3)/pET28b-*orf20* 的全细胞及细胞裂解液上清泳道大量存在表观分子量约为 22 kDa 的蛋白条带, 与预期重组 ORF20 蛋白大小一致, 初步显示 *orf20* 基因在 *E. coli* 中获得了可溶性表达; 用组氨酸亲和纯化柱的成功纯化也进一步说明该蛋白确为重组 ORF20 蛋白(图 1)。通过进一步优化获得了优化的表达条件: 培养温度 37°C, 诱导起始 OD_{600} 值 0.8, 诱导剂 IPTG 浓度 0.2 mmol/L, 诱导时间 10 h。

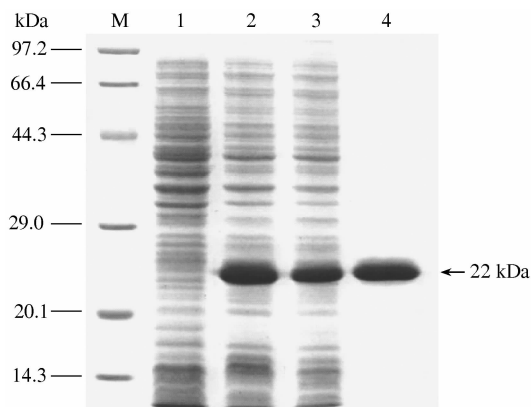


图 1 重组 ORF20 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant ORF20 protein expressed in *E. coli*. M, Protein molecular weight marker (Low); 1, Intact cell sample of BL21 (DE3)/pET28b(+) after induced; 2, Intact cell sample of BL21 (DE3)/pET28b-*orf20* after induced; 3, Supernatant sample of cell lysis of BL21 (DE3)/pET28b-*orf20* after induced; 4, purified recombinant ORF20 protein.

2.2 粤蓝链霉菌突变株的构建及表型分析

前期我们已经证实 TA 克隆载体 pCR2.1 上所携带的 Kan 抗性基因在粤蓝链霉菌中仍具有表达

活性, 可用来区分单、双交换的突变株, 因此可用 TA 克隆的重组质粒来替代基因组文库的粘粒进行 PCR-targeting 突变。在 YD 平板上覆盖 Apra 和萘啶酮酸培养 3 d 后, 长出接合子, 表现为单一抗性表型 (Kan^- 、 $Apra^+$) 的接合子约占 10%。随机选择 2 个接合子扩繁, 提取基因组 DNA, 进行 PCR 验证。电泳检测显示, 所测试的 2 个突变株均能扩增出 708 bp (*apraF/apraR*)、3343 bp (*xgra20F/apraR*)、2823 bp (*apraF/xgra20R*), 5458 bp (*xgra20F/xgra20R*) 的片段, 而野生株仅在用 *xgra20F/xgra20R* 引物对时能扩增出 4641 bp 的片段(图 2), 与预期结果一致, 提示突变株构建成功。突变株在高氏合成一号平板上仍可以产孢, 仍具有产生蓝色素即榴菌素的能力, 突变株 DMR20 在 YEME 中的生长曲线与野生型基本一致(结果未显示), 说明生长特性没有受到影响; 然而, 突变株的色素产量却是野生株的 3.3 倍(图 3), 提示 *orf20* 基因对榴菌素的生物合成存在负调控效应。

2.3 粤蓝链霉菌突变株及重组大肠杆菌对 PQ 的抗性分析

PQ 作为一种氧化还原循环剂 (redox cycling agent) 能够诱发细胞的氧化胁迫。多个物种的 SoxR 能对 PQ 进行应答, 并激活下游一系列抗氧化胁迫基因的表达。ORF20 蛋白属于 SoxR 家族成员, 为测试 ORF20 是否参与抗氧化胁迫、能否对 PQ 进行应答, 我们测试了不同浓度的 PQ 对粤蓝链霉菌野生株和突变株 DMR20 生长曲线的影响。结果显示, PQ 浓度在 20 mg/L 时对野生株生长基本没有影响, 40 mg/L 时影响微弱, 而在 80 mg/L 时, 菌体生长速度显著下降, 最大 OD_{600} 也显著降低; 各浓度 PQ 对突变株 DMR20 的影响与野生株基本一致(图 4-A), 这说明 *orf20* 基因的缺失并没有改变粤蓝链霉菌对 PQ 的抗性水平, 即 ORF20 在粤蓝链霉菌中并没有参与抗氧化胁迫调控。由于 *orf20* 基因在大肠杆菌中实现了可溶性表达, 理论上仍保留了天然结构和生物活性, 因此, 对表达菌株对 PQ 的抗性水平也进行了测试。结果显示(图 4-B), 40 mg/L、60 mg/L PQ 存在时, BL21 (DE3)/pET28b(+) 的生长急剧减慢, 滞后期长达 8 h, 而 BL21 (DE3)/pET28b-*orf20* 的滞后期仅为 5 h; SDS-PAGE 分析发现, 在该培养条件下, *orf20* 基因仍以可溶性形式表达(结果未显示), 表明重组 ORF20 蛋白能显著

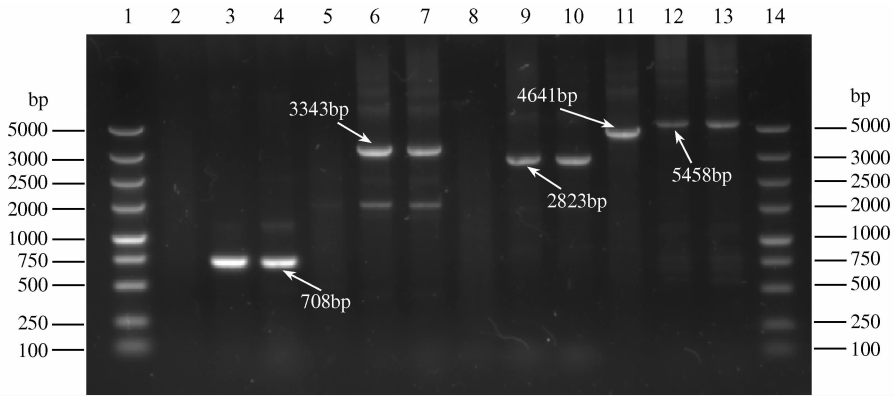


图2 粤蓝链霉菌 *orf20* 缺失突变株的 PCR 验证

Fig. 2 PCR analysis of the genome type of the *orf20* disruptant of *S. vietnamensis*. 1, 14, DS 5000 DNA marker; 2-4, wild type (WT) and disruptant DMR20-1, 2 amplified with *apraF/apraR*, respectively; 5-7, WT and DMR20-1, 2 amplified with *xgra20F/apraR*, respectively; 8-10, WT and DMR20-1, 2 amplified with *apraF/xgra20R*, respectively; 11-13, WT and DMR20-1, 2 amplified with *xgra20R/xgra20F*, respectively.

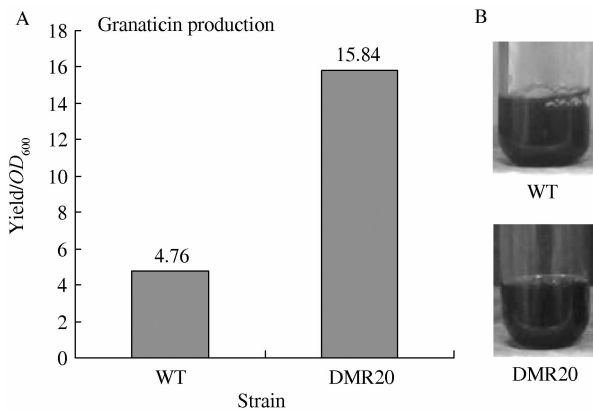


图3 粤蓝链霉菌突变株 DMR20 与野生株色素产量的比较

Fig. 3 Comparison of granaticin production of *S. vietnamensis* wild type and disruptant. WT, wild type of *S. vietnamensis*; DMR20, *orf20* disruptant of *S. vietnamensis*. A, granaticin yield assayed by OD_{580} measurement. B, photos of the fermentation broth after 24 h incubation in YEME liquid.

增强 BL21 (DE3) 对 PQ 的抗性。这说明, ORF20 蛋白在大肠杆菌中可以对 PQ 进行应答, 能够受 PQ 激活。

3 结论和讨论

本文对粤蓝链霉菌榴菌素生物合成基因 *orf20* 进行了体内失活, 并在异源宿主大肠杆菌中进行了相关功能研究。结果显示, 可溶性表达的 ORF20 能够提高宿主对 PQ 的抗性, 这表明 ORF20 能够替代 SoxR 参与大肠杆菌抗氧化胁迫的调控。然而敲除 *orf20* 基因并没有改变粤蓝链霉菌对 PQ 的抗性水平, 但 GRA 产量水平却提高了两倍以上, 说明

ORF20 蛋白在原宿主粤蓝链霉菌中并不参与抗氧化胁迫的调控, 而是对 GRA 的生物合成具有负调控效应。

Park 等^[29] 也发现恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 的类 SoxR 能够恢复大肠杆菌 *soxR* 突变株对 PQ 的抗性, 国内郭书巧等也报道了硝化还原假单胞菌 (*P. nitroreducens*) 类 SoxR 能提高大肠杆菌对 PQ 的抗性^[30], 这说明不同物种来源的 SoxR 之间存在可替代性; 并且提示, 作为氧化还原感应器 (redox sensor) 可能是 SoxR 蛋白家族特征性的基本生物学功能。SoxR 成员是否参与抗氧化胁迫的调控, 关键是看其调控的目标基因是否参加了抗氧化胁迫, 本研究结果提示, 在粤蓝链霉菌中, 参与抗氧化胁迫反应的基因并不是 *orf20* 基因的调控对象。序列分析表明^[8], 在榴菌素生物合成基因簇内存在 2 个可能的类 SoxR 结合位点, 分别位于 *orf15* 和 *orf19* 的启动子区。*orf15* 编码膜转运蛋白, 负责榴菌素的输出; *orf19* 功能未知, 但与 *orf20* 共转录, 功能上可能与 *orf20* 紧密相关。因此, GRA 产量的提高, 很可能是因为 *orf20* 基因的失活改变了这些基因的表达水平。

SoxR 在羧基端含有一个 [2Fe-2S] 簇, 通过铁硫簇一个电子的得失 ($[2Fe-2S]^+ - [2Fe-2S]^{2+}$) 而使 SoxR 处于失活或激活状态; 但不管是否脱去铁硫簇或铁硫簇的电子得失, SoxR 均保持对其识别序列的高度亲和力, 即无论处于失活还是激活状态, SoxR 都能与识别序列结合^[31-33]。受铜绿假单胞和天蓝色链霉菌有关结果^[20-21] 的启发, 我们一开始推测,

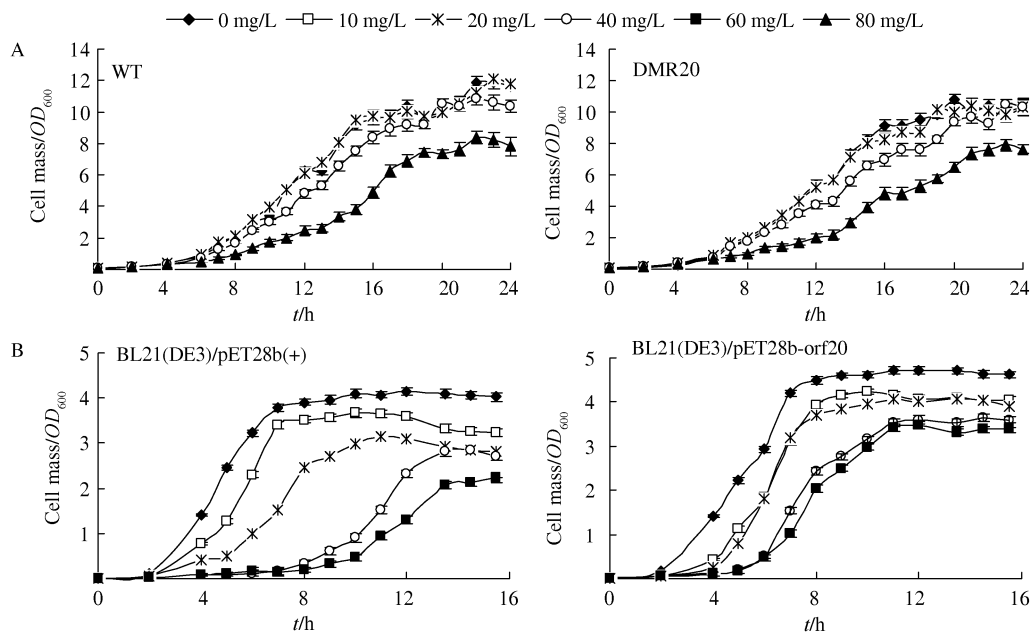


图 4 粤蓝链霉菌及重组大肠杆菌对 PQ 的抗性分析

Fig. 4 Analysis of resistance to paraquat of *S. vietnamensis* and recombinant *E. coli*. A, the growth curve of *S. vietnamensis* wild type (WT) and *orf20* deletion mutant (DMR20) treated with paraquat at 0 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L and 80 mg/L. B, the growth curve of *E. coli* BL21 (DE3) carrying pET28b (+) [BL21 (DE3)/pET28b (+)] and pET28b-orf20 [BL21 (DE3)/pET28b-orf20] treated with paraquat at 0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L and 60 mg/L.

榴菌素可能通过激活 ORF20 而进一步激活转运基因的 *orf15* 表达,使榴菌素能够及时排至胞外而不致损害自身细胞。然而,*orf20* 的敲除却使 GRA 的产量大幅提高,证明这一推测不能成立。ORF20 在 GRA 产生时可能仍处于失活状态,抑制了 *orf15* 基因的表达,从而降低了 GRA 外排的能力,表现为负调控效应,但具体机制仍在进一步研究中。

参考文献

[1] Corbaz R, Ettlinger L, Gäumann E, Kalvoda J, Keller-Schierlein W, Kradolfer F, Manukian BK, Neipp L, Prelog V, Reusser P, Zähner H. Products of metabolism of actinomycetes. IX Granaticin. *Helvetica Chimica Acta*, 1957, 40(5) :1262-1269.

[2] Fleck WF, Strauss DG, Prauser H. Naphthoquinone antibiotics from *Streptomyces lateritius*. I Fermentation, isolation and characterization of granatomeycins A, C, and D. *Journal of Basic Microbiology*, 1980, 20 (9) :543-551.

[3] Chang C, Floss HG, Soong P, Chang CT. Identity of antitumor antibiotic litmomycin with granaticin A. *Journal of Antibiotics*, 1975, 28(2) :156-156.

[4] Pyrek JS, Mordarski M, Zamojski A. Identification of antibiotic WR 141. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 1969, 17(6) :827-832.

[5] Barcza S, Brufani M, Kellerser W, Zähner H. Metabolic products from microorganisms-granaticin B. *Helvetica Chimica Acta*, 1966, 49(6) :1736-1740.

[6] Keller-Schierlein W, Brufani M, Barcza S. Products of metabolism of microorganisms . 66. Structure of granaticin and granaticin B . 1. Spectroscopic properties and chemical degradation. *Helvetica Chimica Acta*, 1968, 51(6) :1257-1268.

[7] Brufani M, Dobler M. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 67. Mitteilung 1. Die struktur des granaticins und des granaticins B. 2. Teil: Die kristallstruktur des tri-O-acetyl-0-jodacetyl-granaticins. *Helvetica Chimica Acta*, 1968, 51(6) :1269-1275.

[8] Ichinose K, Bedford DJ, Bibb MJ, Reville WP, Hopwood DA. The granaticin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22: sequence analysis and expression in a heterologous host. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(11) :647-659.

[9] Draeger G, Park SH, Floss HG. Mechanism of the 2-deoxygenation step in the biosynthesis of the deoxyhexose moieties of the antibiotics granaticin and oleandomycin.

- Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(11):2611-2612.
- [10] Tornus D, Floss HG. Identification of four genes from the granaticin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22 involved in the biosynthesis of L-rhodinose. *Journal of Antibiotics*, 2001, 54(1):91-101.
- [11] Ichinose K, Taguchi T, Bedford DJ, Ebizuka Y, Hopwood DA. Functional complementation of pyran ring formation in actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) by ketoreductase genes for granaticin biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(10):3247-3250.
- [12] Taguchi T, Ebizuka Y, Hopwood DA, Ichinose K. A new mode of stereochemical control revealed by analysis of the biosynthesis of dihydrogranaticin in *Streptomyces violaceoruber* Tü22. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(46):11376-11380.
- [13] Zhu HH, Guo J, Yao Q, Yang SZ, Deng MR, Phuong LTB, Hanh VT, Ryan MJ. *Streptomyces vietnamensis* sp. nov., a streptomycete with violet blue diffusible pigment isolated from soil in Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(8):1770-1774.
- [14] 邓名荣, 郭俊, 朱红惠. 粤蓝链霉菌代谢产物的抗菌抗肿瘤活性及相关基因的初步研究. 天然产物研究与开发 (*Natural Product Research and Development*), 2010, 22(3):367-372.
- [15] Deng MR, Guo J, Zhu HH. *Streptomyces vietnamensis* GIMV4.0001: a granaticin-producing strain that can be readily genetically manipulated. *The Journal of Antibiotics*, 2011, doi:10.1038/ja.2011.3.
- [16] Pomposiello PJ, Demple B. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in Biotechnology*, 2001, 19(3):109-114.
- [17] Fang F, Vazquez-Torres A, Xu Y. The transcriptional regulator SoxS is required for resistance of *Salmonella typhimurium* to paraquat but not for virulence in mice. *Infection and Immunity*, 1997, 65(12):5371-5375.
- [18] Eiamphungporn W, Charoenlap N, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S. *Agrobacterium tumefaciens soxR* is involved in superoxide stress protection and also directly regulates superoxide-inducible expression of itself and a target gene. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(24):8669-8673.
- [19] Kim JS, Sung MH, Kho DH, Lee JK. Induction of manganese-containing superoxide dismutase is required for acid tolerance in *Vibrio vulnificus*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(17):5984-5995.
- [20] Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(5):1308-1321.
- [21] Dietrich LEP, Teal TK, Price-Whelan A, Newman DK. Redox-active antibiotics control gene expression and community behavior in divergent bacteria. *Science*, 2008, 321(5893):1203-1206.
- [22] Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985, 33(1):103-119.
- [23] MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 1992, 111(1):61-68.
- [24] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12):6640-6645.
- [25] Paget MSB, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigma E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1):204-211.
- [26] Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4):1541-1546.
- [27] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- [28] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*, 2nd edn. Norwich: John Innes Foundation, 2000.

- [29] Park W, Pena-Llopis S, Lee Y, Dimple B. Regulation of superoxide stress in *Pseudomonas putida* KT2440 is different from the SoxR paradigm in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 341(1):51-56.
- [30] 郭书巧, 徐鹏, 张保龙, 倪万潮. 硝化还原假单胞菌 SPQ03 PnSoxRS 调控子的克隆和功能初步分析. 江苏农业学报 (*Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*), 2009, 25(3):524-528.
- [31] Hidalgo E, Dimple B. Activation of SoxR-dependent transcription in vitro by noncatalytic or NifS-mediated assembly of [2Fe-2S] clusters into Apo-SoxR. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(13):7269-7272.
- [32] Wu J, Dunham WR, Weiss B. Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(17):10323-10327.
- [33] Hidalgo E, Dimple B. An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *EMBO Journal*, 1994, 13(1):138-146.

Function of the granaticin biosynthetic gene *orf20* from *Streptomyces vietnamensis*

Mingrong Deng, Jun Guo, Yongheng Huang, Honghui Zhu *

Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

Abstract: [Objective] The transcription factor SoxR, which serves as a cellular redox sensor, is a global activator of anti-oxidative stress in *Escherichia coli*. The granaticin biosynthetic gene *orf20* from *Streptomyces vietnamensis* was found to be a soxR-like gene. This study was carried out towards understanding the physiological function of this gene. [Methods] The *orf20* gene was cloned and expressed in *E. coli*. An *orf20* deletion mutant of *S. vietnamensis* was constructed by using a modified PCR-targeting disruption method. The growth curves of the recombinant *E. coli* strains and the mutant *S. vietnamensis* at various paraquat concentrations were assayed to resolve any changes of resistance levels. [Results] Soluble expression of *orf20* gene in *E. coli* was achieved, and the recombinant ORF20 protein was tagged by seven histidines at the carboxylic end. An *orf20* deletion mutant of *S. vietnamensis* DMR20 was successfully constructed. The DMR20 mutant showed no growth changes to the wild, and the ability of sporulation was retained, too. However, the production of granaticin was improved for more than three folds. Compared to the wild type, the DMR20 mutant had no visible changes of resistance to paraquat, however, *E. coli* carrying the recombinant plasmid pET28b-*orf20* received an elevated resistance to paraquat. [Conclusion] The *orf20* gene can complement the *soxR* gene in *E. coli*, but is not involved in the regulation of anti-oxidative stress response in *S. vietnamensis*. Instead, it imposes a negative effect on granaticin production.

Keywords: *Streptomyces vietnamensis*, granaticin, biosynthetic gene, *orf20*; *soxR*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the International Science and Technology Cooperation Programs of China (2008DFA31560), by the Chinese Academy of Sciences for Key Topics in Innovation Engineering (KSCX2-YW-G-075-11), by the Science and Technology Innovation Programs of Guangdong Academy of Sciences (cx200702) and by the Foundation for Young Scientists of Guangdong Academy of Sciences (qj20092)

* Corresponding author. Tel: +86-20-87684632; E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

Received: 20 September 2010/Revised: 21 December 2010