



## 黄脂菌素生物合成基因簇中调控基因 *xanR3* 的功能

陈国锋<sup>1</sup>, 孔令新<sup>1</sup>, 王轲<sup>2</sup>, 褚以文<sup>2</sup>, 由德林<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

<sup>2</sup>成都大学四川抗菌素工业研究所, 四川 成都 610052

**摘要:**【目的】研究黄脂菌素产生菌灰黄链霉菌中编码 ArsR 家族转录调控蛋白(Arsenical resistance regulator)的 *xanR3* 基因的功能。【方法】利用大肠杆菌和链霉菌双亲本接合转移的方法, 构建 *xanR3* 基因缺失突变株及回补突变株。利用 cDNA 在相邻同方向的基因间隔区进行 PCR 确定黄脂菌素生物合成基因簇中的转录单元。利用荧光定量 RT-PCR 方法进行突变株中黄脂菌素生物合成基因簇转录水平的检测。【结果】对得到的 *xanR3* 基因缺失突变株及回补突变株进行发酵, 发现 *xanR3* 基因缺失突变株产黄脂菌素能力下降, 回补菌株中黄脂菌素产量相比缺失突变株有一定程度的恢复, 但仍未达到野生型水平。经鉴定, 黄脂菌素生物合成基因簇中共有 18 个共转录单元, 其中 4 个共转录单元在  $\Delta xanR3$  突变株中转录水平明显下降。【结论】ArsR 家族转录调控基因 *xanR3* 是黄脂菌素生物合成的正调控基因。

**关键词:** 黄脂菌素, AsrR 家族转录调控蛋白, RT-PCR, 生物合成

黄脂菌素(Xantholipin, 图 1)是 2003 年 Terui 等<sup>[1]</sup>在筛选热休克蛋白 HSP47 基因表达抑制剂的过程中发现的。它由灰黄链霉菌(*Streptomyces flavogriesus*)发酵产生, 属于多环咕吨酮(Xanthone)类化合物。多环咕吨酮类化合物(图 1)含有高度氧化且呈角状折叠排列的六环骨架和典型的咕吨酮核心环(图 1 所示 A-C 环)<sup>[2]</sup>。多环咕吨酮类化合物独特的分子结构赋予其多样性的生物活性, 包括抗细菌(主要抗革兰氏阳性菌, 如金黄色葡萄球菌)、抗真菌(如抗酵母)、抗寄生虫(如抗鸡球虫)

以及抗肿瘤细胞等活性<sup>[3]</sup>。自 1959 年俄国科学家从 *Actinomycealbusvar fugatas* 的发酵液中首次分离得到 albofungin, 目前共分离得到约 40 多种多环咕吨酮类化合物<sup>[4-7]</sup>。

黄脂菌素除了可以有效地抑制热休克蛋白 HSP47 基因的表达(半抑制浓度 IC<sub>50</sub> 为  $2 \times 10^{-7}$  mol/L), 同时还具有极强的抗真菌、抗革兰氏阳性菌活性。此外, 黄脂菌素还可以有效抑制人类成纤维细胞胶原分子的合成(半抑制浓度 IC<sub>50</sub> 为  $2.7 \times 10^{-8}$  mol/L), 暗示黄脂菌素可以作为治疗纤维化疾病的药物<sup>[1]</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金(31630002, 31170085, 31470183)

\*通信作者。Tel: +86-21-62932943; E-mail: dlyou@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-04-14; 修回日期: 2017-06-14; 网络出版日期: 2017-07-18

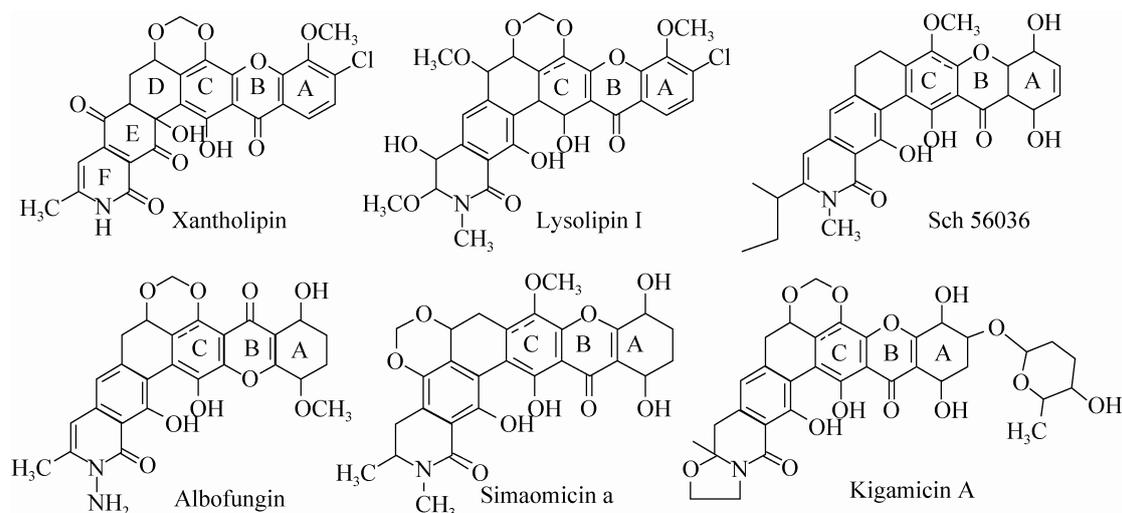


图 1. 微生物来源的多环咕吨酮类代表性化合物<sup>[8]</sup>

Figure 1. Examples of polycyclic xanthone antibiotics. Ring A, B and C were the characteristic xanthone ring nucleus<sup>[8]</sup>.

针对黄脂菌素抗肿瘤细胞活性的研究中还发现其对人类鼻咽腔癌细胞 KB 细胞株和骨髓性白血病细胞株 HL60 都具有极高的活性(半抑制浓度分别为  $IC_{50} < 2 \times 10^{-9}$  mol/L,  $IC_{50} < 3 \times 10^{-7}$  mol/L), 具有作为抗肿瘤药物开发的潜力<sup>[2]</sup>。然而, 黄脂菌素产生菌较低的产素水平(约 10 mg/L)是限制其未来开发应用的主要因素。前期研究已克隆鉴定了黄脂菌素生物合成基因簇, 研究了黄脂菌素生物合成基因簇中关键结构基因的功能以及黄脂菌素中核心咕吨酮环形成机制, 确定了黄脂菌素生物合成途径<sup>[8]</sup>, 本研究在此基础上, 继续深入研究黄脂菌素生物合成中调控蛋白的具体功能, 揭示调节基因对黄脂菌素产量的影响机制。预期对黄脂菌素生物合成调控机制的研究, 将深化对黄脂菌素生物合成的理解, 为通过基因工程进行定向遗传改良构建黄脂菌素高产菌株提供理论依据。

通过对黄脂菌素生物合成基因簇的生物信息学分析, 发现 3 个可能的转录调控基因(*xanR1*、*xanR2* 和 *xanR3*)。其中, *XanR3* 蛋白序列中包含典

型的螺旋-转角-螺旋(HTH, helix-turn-helix) DNA 结合结构域和锌离子的结合位点, 属于 *ArsR* 家族调节蛋白。尽管随着基因组测序的展开, 在许多链霉菌中发现了 *ArsR* 同源蛋白, 但它们的功能并不清楚。本研究利用 PCR-targeting 的方法, 以阿泊拉霉素抗性基因置换 *xanR3* 基因的部分片段构建了  $\Delta xanR3$  突变株, 利用整合型回补质粒 pJTU824 载体构建了  $\Delta xanR3::xanR3$  回补菌株, 通过对基因缺失突变株、回补菌株和野生型菌株 SIIA-A02191 发酵产量的对比分析, 考察了 *xanR3* 对黄脂菌素产量的影响, 为黄脂菌素生物合成调控机制研究奠定了基础, 并为后续提高黄脂菌素产量提供了参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株与质粒:** 黄脂菌素产生菌 *S. flavogriseus* SIIA-A02191、大肠杆菌 DH10B、ET12567/pUZ8002 以及质粒 pJTU824、质粒 pIJ773、fosmid 22E4 均

由上海交通大学微生物代谢国家重点实验室保藏。调控基因 *xanR3* 缺失突变株 CGF-3 与回补突变株 CGF-6 为本研究构建。

**1.1.2 主要试剂仪器:** PCR 反应使用 TaKaRa *Taq* 试剂盒, 1 kb Plus DNA ladder 为 Invitrogen 公司产品, RNA 提取试剂盒为北京赛百盛基因技术有限公司 Total RNA Isolation Kit, RNA 反转录试剂盒为 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), 荧光实时定量 (q-Real time) PCR 反应试剂盒为上海翊圣生物科技有限公司 Hieff™ qPCR SYBR® Green Master Mix (low Rox Plus)。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Nde* I 购自 Fermentas 公司。ISP3 (燕麦) 培养基: 燕麦 5 g, 青岛琼脂 5 g, ddH<sub>2</sub>O 250 mL, 加入 250 μL 微量元素母液 (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.1 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, ddH<sub>2</sub>O 100 mL; 加 1 mol/L HCl 50 μL) 用 4 mol/L NaOH 调节 pH 到 7.0–7.5, 灭菌, 用于灰黄链霉菌及其衍生菌株产孢。孢子预萌发培养液: 酵母粉 1 g, 水解酪蛋白氨基酸 1 g, 定容至 100 mL, 灭菌。接合转移培养基: 黄豆饼粉 20 g, 自来水 1000 mL, 灭菌过滤定容至 1000 mL, 分装补加甘露醇 5 g/250 mL, 琼脂 5 g/250 mL, 燕麦 5 g/250 mL, 加入 250 μL 微量元素母液, 用 4 mol/L NaOH 调节 pH 到 7.2, 灭菌。种子培养基: 葡萄糖 10 g, 可溶性淀粉 25 g, 酵母提取物 2 g, 鱼粉 5 g, 棉籽粉 3 g, 酪蛋白水解物 (Casein) 3 g, ddH<sub>2</sub>O 1 L, 调节 pH 至 7.2, 补加碳酸钙 2 g, 灭菌。发酵培养基: 葡萄糖 10 g, 糊精 25 g, 燕麦粉 20 g, 棉子粉 10 g, 鱼粉 5 g, 酵母提取物 2 g, ddH<sub>2</sub>O 1 L, 调节 pH 至 7.2, 碳酸钙 3 g, 灭菌。高效液相色谱 (HPLC) 使用 Agilent 1200 Series, 液质联用 [LC-MS(n)] 分析使用 Agilent 1100 series LC/MSD Trap System, 色谱柱均采用 Agilent

TC-C<sub>18</sub> 反相柱 (5.0 μm, 250 mm×4.6 mm)。

## 1.2 *xanR3* 基因敲除突变株 CGF-3 的构建

参照 PCR-targeting 的操作方法, 碱裂解法提取质粒 pIJ773, 并用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 切下包含阿泊拉霉素抗性基因 *aac(3)IV*、*oriT* 以及 FRT 序列大小约为 1.4 kb 的片段。然后, 以此片段为模板设计用于 *xanR* 敲除的一对引物 targetR3-F/R (表 1), 将 PCR 扩增后得到的片段, 利用大肠杆菌 Red 重组系统与包含黄脂菌素生物合成基因簇的 fosmid 22E4 进行重组, 获得可用于敲除的质粒 pCGF03。最后, 用含此质粒的大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 与野生型灰黄链霉菌进行两亲本接合转移, 30 °C、28 h 后用阿泊拉霉素和萘啶酮酸进行覆盖, 7 d 后即可挑取双交换接合转移子。将接合转移子接种至液体种子培养基中培养 3 d, 提取基因组 DNA, 并在 *xanR3* 基因的两侧设计一对验证引物 YZR3-F/R (表 1) 对其进行 PCR 验证。本研究中, 经过 PCR 扩增, 双交换突变株产物片段大小为 4.1 kb, 野生型对照菌株得到产物大小为 3.4 kb (图 2)。

## 1.3 *xanR3* 基因回补菌株 CGF-6 的构建

利用目的基因 *xanR3* 首末端序列, 设计一对 PCR 引物 huibuR3-F/R, 以野生型灰黄链霉菌基因组 DNA 为模板, 扩增得到 *xanR3*, 经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Nde* I 酶切后, 连接到整合型载体 pJTU824 上, 获得回补质粒 pCGF06。将质粒 pCGF06 利用前述接合转移的方法整合到  $\Delta xanR3$  突变株 CGF-3 中。在回补菌株 CGF-6 的基因组中, 同时含有被阿泊拉霉素抗性片段部分替换的 *xanR3* 基因和整合型质粒 pJTU824 所携带的完整的 *xanR3* 基因, 因此经过 PCR 扩增可同时得到两条大小分别为 1.0 kb 和 1.7 kb 片段的接合转移子即为  $\Delta xanR3$  回补菌株 CGF-6。

表 1. 构建 *xanR3* 基因敲除突变株和回补菌株所用 PCR 引物Table 1. Primers used for construction and verification of the *xanR3* disruption mutant strain and the complementation strain

Primer	Sequence (5'→3')
targetR3-F	CAGGTACGGCCGCGGGTG GCGGCCGCCGGGCTCGACCGGATTCCGGGGATCCGTCGACC
targetR3-R	GCGCAGGGCGGTCAGGTTCTGGGACACGCCCGCCGGGGATGTAGGCTGGAGCTGCTTC
YZR3	ACGCCCTGACGGTGATGCT
YZR3	CCAGTAGTCAAGGGACCGCTG
huibuR3-F	AAACATATGCGCGAATCCTCGGGGGGG
huibuR3-R	AAAGAATTCTCACCTGCGAGGAGGGA

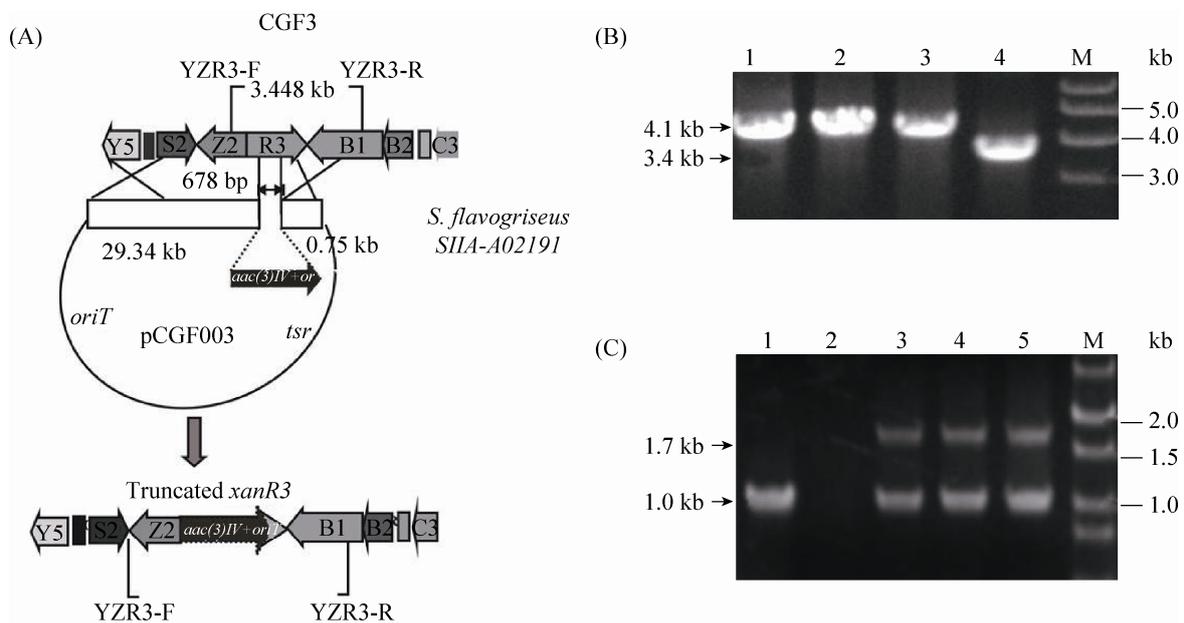
图 2. *xanR3* 基因敲除突变株的构建及验证(A, B)和回补突变株 CGF-6 的验证(C)

Figure 2. Construction and verification of the *xanR3* disruption mutant CGF-3 and the complementary strain CGF-6. A: the construction of the *xanR3* disruption mutant CGF-3. The 0.68 kb region in *xanR3* was replaced by 1.4 kb *aac(3)IV* gene. B: PCR verification of the *xanR3* disruption mutant CGF-3. M: 1 kb DNA ladder; lane 1–3: double crossover recombinant; lane 4: wild-type strain. C: PCR verification of the complementary strain CGF-6. M: 1 kb DNA ladder; lane 1: wild-type strain; lane 2: pJTU824 control; lane 3–5: complementary strains CGF-6.

#### 1.4 灰黄链霉菌发酵及发酵产物的分离与检测

将野生型菌株 SIIA-A02191、突变株 CGF-3 和回补菌株 CGF-6 的孢子按 0.1% 的接种量接种于种子摇瓶中，30 °C、220 r/min 培养 3 d，将种子液按 1/20 的量转接于 80 mL 发酵培养基的摇瓶中继续培养 6 d。所得发酵液利用乙酸乙酯萃取粗提，用 1 mL 甲醇溶解后，用于 HPLC 或者 LC/MS

检测分析。HPLC 检测流动相 A 相为含 0.2% 甲酸的水溶液，B 相为乙腈，流速为 0.6 mL/min，检测波长为 274 nm。检测程序为：0–5 min，30% 等度洗脱；5–35 min，30%–70% 梯度洗脱；35–40 min，70%–80% 梯度洗脱；40–41 min，80–100% 梯度洗脱；41–45 min，100% 等度洗脱；45–46 min，100%–30% 梯度洗脱；46–60 min，30% 等度洗脱(此

处的百分比表示的是有机相乙腈在水溶液中所占的体积百分数)。

LC/MS 分析条件为: 正离子模式, 干燥气流 10 mL/min, 喷雾器压力为 30 psi, 干燥气体温度 350 °C, 分子量扫描范围为 200 至 1000, 多级质谱断裂分析轰击电压为 1.0–1.5 V, 检测程序设置与高效液相色谱(HPLC)检测相同。

### 1.5 灰黄链霉菌总 RNA 的提取与反转录 PCR

将野生型菌株 SIIA-A02191、突变株 CGF-3 和突变回补菌株 CGF-6 转入发酵培养基中培养 48 h 后, 分别取 1 mL 菌液, 按照 Total RNA Isolation Kit 操作说明提取 RNA。Nanodrop 测定浓度及  $OD_{260}/OD_{280}$ , 并配合琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 的质量与含量。加入 2  $\mu$ L 5 $\times$ gDNA Erase Buffer, 1  $\mu$ L gDNA Eraser, 1  $\mu$ g RNA, 加 RNaseFree H<sub>2</sub>O 至 10  $\mu$ L, 42 °C、2 min 对基因组 DNA 进行消化, 利用 1 对

反向基因间隔区两侧设计的引物进行 PCR 验证无基因组残留, 引物序列为 xanWR2-F/R (表 2)。确认无基因组 DNA 残留后, 取上步反应液按照反转录试剂盒操作说明配制成 20  $\mu$ L 体系, 将所提取 RNA 反转录为 cDNA。

### 1.6 黄脂菌素生物合成基因共转录单元的确证

将同方向有交叉重叠序列的 2 个基因视为同一个转录单元, 转录方向相反的 2 个相邻基因视为 2 个不同的转录单元。对其余同方向且有间隔区序列的 2 个基因设计引物, 进行 PCR 验证, 引物设计原则为正向引物和反向引物分别在间隔区的两侧, PCR 扩增的片段应包含间隔区序列。黄脂菌素的生物合成基因簇共 54 kb, 含有 49 个基因, 为确定其共转录单元本研究设计 19 对引物, 以野生型菌株 SIIA-A02191 总 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板进行 PCR 验证(表 2)。

表 2. 确定黄脂菌素的生物合成基因转录本所用的 PCR 引物

Table 2. Primers used for the identification of the transcripts in xantholipin biosynthetic gene cluster

Primer	Gene tested	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
xanWR2	<i>xanW-xanR2</i>	ATCTGGATTGTGCAGGGTTGA	GTGACACTGCCCGTGGTGA
xanP-ben	<i>xanP-xanG</i>	TTCAGCAGCGACTTCCACCAC	TCGGCACCAGCGCATAACAG
xanA-ben	<i>xanA-xanR1</i>	GAGCGGCGCAACGTGGAGAT	CCTGGAAGAACGAGCAGTGGG
xanR1-ben	<i>xanR1-xanO2</i>	ACGCCACTGCTCGTTCTTC	TCGGCAGGGTCACTTCCAT
xanO2-ben	<i>xanO2-xank</i>	ACGCCATCGACGACATCCC	CACGCGGTACACGCACAGAC
xanU-ben	<i>xanU-xanO3</i>	ATCGGCAAGGGCATGTGG	CGCTTCTGTGCGTTCGT
xanO3-ben	<i>xanO3-xanL</i>	TCACTCCAAGACCCGTTACACC	CATCCAGATTTCCACGCACA
xanL-ben	<i>xanL-xanH</i>	ACCCTCGTCTCGCCCTCTT	AACCACGCATGTATTTCTCCAA
xanM1-ben	<i>xanM1-xanZ1</i>	GAGCCACCGAAGGCAAGACC	GAACGAGTAGTACGCCCGCAGA
xanN-ben	<i>xanN-xanW</i>	CTACGGAGCACAGTGAGACGC	ACGGCACCACCGCACAGAT
xanM2-ben	<i>xanM2-xanO4</i>	AGGAAGTGGTCCGGTGCCC	CCTTCGTCTCCTGGCGGTC
xanM3-ben	<i>xanM3-xanO5</i>	CAGAACCCGCACATCCTCAA	CGACCAGCGAACGTATCCC
xanO5-ben	<i>xanO5-xanS2</i>	TGAACTGGCTGCTGCTGTGG	GGCGATGCCGATGGTGAA
xanB2-ben	<i>xanB2-xanB3</i>	CCCACTCGACCTCGATGCTG	CCAACGATCCGGGAACACG
xanB3-ben	<i>xanB3-xanO6</i>	GCTTCTGGCGGATGGTCTGTT	ACGAGGTTGAGGCGGCCTACTG
xanZ3-ben	<i>xanZ3-xanO8</i>	ACGGGATGTGGCTGATGGC	CGCACTGCTGCTGACTGAC
xanO8-ben	<i>xanO8-xanC1</i>	AGCGAGATGGTGACGGTGCC	GATCAAGCAGAAGGTTCGAGGC
xanC1-ben	<i>xanC1-xanE</i>	GCGTGCATCACGATGCTGTT	CCGCACCAAGACGCTGAC
xanT-ben	<i>xanT-xanO9</i>	ACACCGTCGAGGGCTTCATC	ATCGCCACATCGGCTTCC
xanO10-ben	<i>xanO10-xanZ4</i>	GGCATCGTCCGGTCCCAGTT	CCATCGTCAACATCGGTTTCGTC

## 1.7 黄脂菌素生物合成基因转录水平检测

采用荧光相对定量 Real-time PCR 法进行检测, 比较样品中各转录单元相对于内参基因 *hrdB* 的数量变化。具体的是利用公式  $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ 目标基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})_{\text{样品组}} - (C_{t \text{ 目标基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})_{\text{参照组}}$ , 通过比较  $C_t$  值(每个反应管内的荧光信号强度达到设定阈值所需循环数), 计算出样品中目标基因的相对变化量。对 18 个目标基因和内参基因 *hrdB* 分别设计引物(表 3), Real-time PCR 反应采用 Hieff™ qPCR SYBR® Green Master Mix (low Rox Plus)试剂盒 20  $\mu\text{L}$  体系。使用 ABI 7500 Fast, 循环条件为 95 °C 2 min; 95 °C 10 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。溶解曲线: 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s, 1 个循环。

## 2 结果和分析

### 2.1 *xanR3* 基因缺失突变株与回补菌株的构建及发酵产物的分析

为了确认 *xanR3* 基因的功能, 利用大肠杆菌和链霉菌属间双亲本接合转移, 对其进行体内缺失及回补实验, 构建了 *xanR3* 基因缺失突变株 CGF-3 和缺失突变株的体内回补菌株 CGF-6 (图 2)。

将野生型菌株 SIIA-A02191 和 CGF-3、CGF-6 进行液体摇瓶发酵。30 °C 发酵 6 d 后, 丙酮和乙酸乙酯对发酵液进行粗提, 所得发酵产物利用 HPLC 分析。从 LC-MS 检测结果(图 3)中可以看出, *xanR3* 基因敲除后突变株 CGF-3 仍然有黄脂菌素产生, 但产量只有野生型菌株

表 3. Real-time PCR 实验所用引物

Table 3. Primers used for quantitative real-time PCR

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
hrdB-RT	GTTCTGTACGGGACCAGTC	TGCGGTCGAGAAGTTCGACTA
xanO1-RT	GCTGCGGGAGCCGAACCACT	ACCTCGTCGCCCTCGCCATC
xanR1-RT	GGCTACGGCTACGCGGTGAA	GGATGCTGACGGCGAAGTGG
xanL-RT	AGCACCACGATCTCGGACTG	GGCTGGGACCGGACTACTACA
xanH-RT	TTCCACCCAGATCCTCGTCA	TGTGCCCTCCACCTTGTCCTC
xanZ1-RT	ACCGTGCCGGACATCGAC	TGAGGGGCTCGTAACTGTCGTA
xanW-RT	CGGAGCGCAGGTCCATCT	GCCTACTACACGAACGTCAAGC
xanR2-RT	GTCAAGCGATAACCGGAAGAAT	GCCCACACCGAGGCGTTCGGC
xanM2-RT	GTCGTGCCCCGAGTGAGGTGT	TGATCCGCAGCCTGAACC
xanO4-RT	GTCGCCCTTGCCGATGGTGT	CCTGTTCTGGGACTCGTTTCGTG
xanM3-RT	ACCCGCACATCCTCAAGCA	GGTCGAAGACGTGACCCTCC
xanZ2-RT	GGCAAGCACCTCGTCGCT	CAGAACCAGTACGGCATCGG
xanR3-RT	GCTGCTGCTGACCGAACTGG	TCACCCTGCGAGGAGGGATT
xanB1-RT	CGAGGAGGAGATCCGCAAGG	GAGGAAGCCACCGACCCA
xanO6-RT	TCGCTGACGATGAAGTAGACGC	TCCGCATGGAGATCAACCC
xanC1-RT	CTTCGGCCTCGACCTTCTG	TGCGGCTGTTCTGGGAGTA
xanE-RT	CAGGCGATGGACTGGTAGGC	GTACGAACTGGCCGTGGTGAC
xanT-RT	AGCGCCCGCATCCTGTCCA	CCATCGCACGAGCTTCTCC
xanO10-RT	ACATTGCACAGATGCGAGACCG	CGCAACTGGGACCCGACGAT

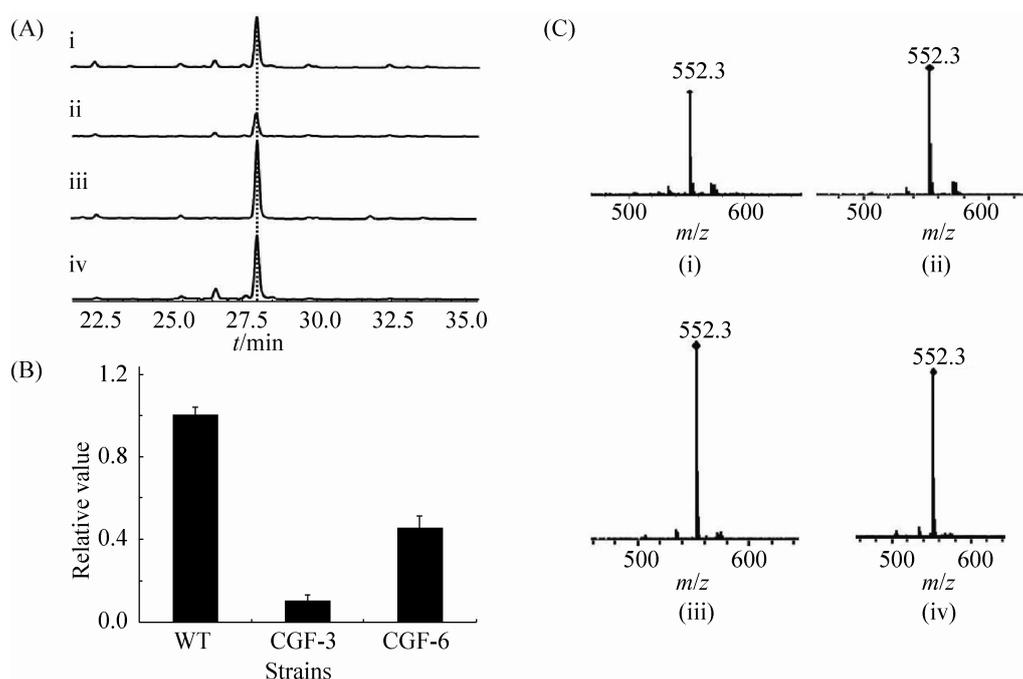


图 3. 敲除突变株 CGF-3 与回补突变株 CGF-6 发酵产物的 LC-MS 检测

Figure 3. LC-MS analysis of the *xanR3* disruption mutant CGF-3 and complementation strain CGF-6. A: HPLC analysis of the fermentation extracts of CGF-6 (i), CGF-3 (ii), wild type (iii), and xantholipin standard (iv). B: quantitative analysis of xantholipin produced by mutant strains. The yield of xantholipin in wild type strain is represented by 1, whereas it is represented by the fold to that of WT in mutants CGF-3 and CGF-6. C: validation of xantholipin from the fermentation extracts by mass spectrum analysis, CGF-6 (i), CGF-3 (ii), wild type (iii), and xantholipin standard (iv).

SIIA-A02191 的 10%左右, 暗示 *xanR3* 基因在黄脂菌素生物合成过程中起正调控作用。*xanR3* 基因回补后, 回补菌株产量较缺失突变株有一定提高, 产量恢复到野生型的 40%左右, 再次证明 *xanR3* 的正调控功能。

## 2.2 黄脂菌素生物合成基因共转录本的确定

为了确认 *xanR3* 基因在黄脂菌素生物合成过程中的调控作用, 对其生物合成基因的共转录单元进行了确认。同方向有交叉重叠序列的 2 个基因视为同一转录单元(*xanO1-xanS1*, *xanJ-xanP*, *xanG-xanA*, *xanK-xanU*, *xanH-xanM1*, *xanB1-xanB2*, *xanO6-xanZ3*, *xanV-xanC3*), 其余同方向有间隔区

的 2 个基因设计引物进行 PCR 验证, 验证其是否在同一转录本上。前期研究发现野生型菌株 SIIA-A02191 转入发酵培养基中 48 h 后即可检测到黄脂菌素的合成, 因此本研究取 48 h 发酵液中的菌体提取 RNA, 将其逆转录成 cDNA 后作为模板进行 PCR, 并根据电泳结果判断相邻 2 个基因的共转录关系(图 4), 黄脂菌素生物合成基因共有 18 个转录单元: *xanO1-xanS1*、*xanJ-xanO3*、*xanL*、*xanH-xanM1*、*xanZ1*、*xanN-xanW*、*xanR2*、*xanM2*、*xanO4*、*xanM3-xanS2*、*xanZ2*、*xanR3*、*xanB1-xanB3*、*xanO6-xanO8*、*xanC1*、*xanE-xanC2*、*xanT-xanO9* 和 *xanO10-xanC3*。

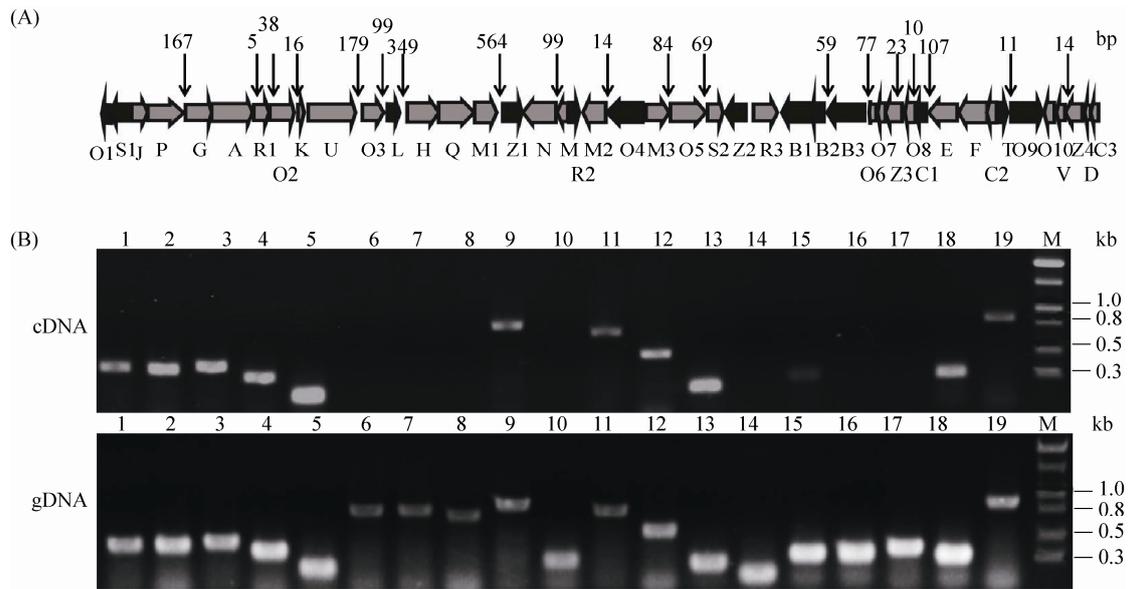


图 4. 黄脂菌素的生物合成基因簇和相邻基因共转录分析

Figure 4. Organization of the gene cluster for xantholin biosynthesis and verification of the operons in xantholin biosynthesis gene cluster. A: organization of the gene cluster for xantholin biosynthesis in which the vertical solid arrows show the position of primers used for quantitative real-time PCR, the gap is the intergenic spacer between adjacent genes. The numbers above the gene cluster represent the lengths (bp) of the intergenic regions. Genes are assigned in two colors: black and gray, the same direction genes which belong to the same mRNA transcription units were marked in the same color. B: PCR confirmation of the amplicons fragments on an ethidium bromide-dyed agarose gel. The amplicons were designed to covering of the adjacent genes, genomic DNA (gDNA) was used as the positive control. lane 1: *xanP-xanG* 465 bp; lane 2: *xanA-xanR1* 453 bp; lane 3: *xanR1-xanO2* 485 bp; lane 4: *xanO2-xank* 485 bp; lane 5: *xanU-xanO3* 266 bp; lane 6: *xanO3-xanL* 833 bp; lane 7: *xanL-xanH* 832 bp; lane 8: *xanM1-xanZ1* 762 bp; lane 9: *xanN-xanW* 888 bp; lane 10: *xanM2-xanO4* 309 bp; lane 11: *xanM3-xanO5* 799 bp; lane 12: *xanO5-xanS2* 553 bp; lane 13: *xanB2-xanB3* 278 bp; lane 14: *xanB3-xanO6* 182 bp; lane 15: *xanZ3-xanO8* 345 bp; lane 16: *xanO8-xanC1* 349 bp; lane 17: *xanC1-xanE* 390 bp; lane 18: *xanT-xanO9* 324 bp; lane 19: *xanO10-xanZ4* 882 bp; M: 1 kb DNA ladder.

### 2.3 *xanR3* 基因缺失突变株 CGF-3 和野生型菌株 SIIA-A02191 中黄脂菌素的生物合成基因转录水平的检测

确定基因簇上的共转录单元后, 在各转录本内部设计引物, 一般选取该转录本的第一个基因按 Real-time PCR 引物设计标准设计, 目的片段大小为 200–300 bp, 共设计 Real-time PCR 引物 18 对及一对内参引物 *hrdB*。先将引物以野生型基因

组为模板 PCR 扩增, 确认是否有非特异扩增, 电泳无杂带, 则初步断定所设计引物可用于 Real-time PCR 反应。根据  $\Delta\Delta C_t$  计算公式, 在突变株 CGF-3 中目标基因按照系统算法测得的数值大于 2.0 或者低于 0.5, 即判断该基因的转录被显著增强或者抑制。荧光定量结果显示 (图5), 突变株内不同基因转录受到的影响不同, 其中 *xanO1-xanS1*、*xanB1-xanB3*、*xanT-xanO9*、

*xanO10-xanC3* 转录水平下降明显, 为野生型的 10%–30%之间, 转录水平下降的基因涉及黄脂菌素生物合成中的延伸单元的供应、核心骨架形成以及生物合成后修饰等方面。其中, *xanB1-xanB3* 编码乙酰辅酶 A 羧化酶, 参与丙二酰辅酶 A 的合成; *xanO10-xanC3* 中的 *xanD* 编码 II 型聚酮合酶的亚基, 影响聚酮碳链的延伸, *xanC3* 编码环化酶, 影响合成前体的形成, *xanO10*, *xanZ4* 和 *xanO1* 均编码氧化还原相关蛋白, 影响分子骨架的氧化还原修饰。这些可能受 XanR3 调控的基因转录水平的降低, 与突变株黄脂菌素产量降低相一致, 也再次表明 *xanR3* 是黄脂菌素生物合成过程中的正调控基因。

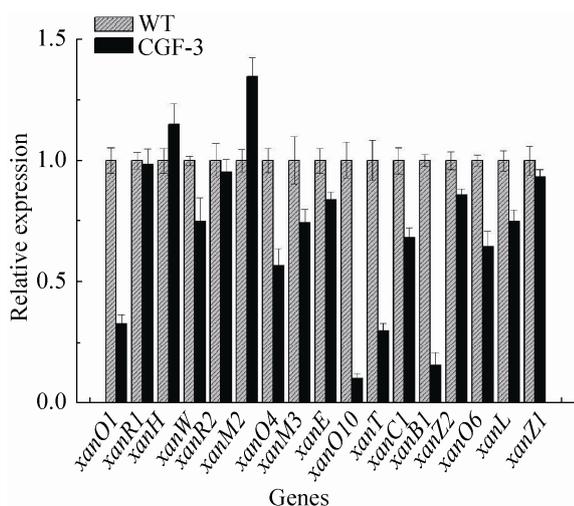


图 5. 黄脂菌素的生物合成基因转录水平检测

Figure 5. Transcriptional analysis of the xantholipin biosynthetic gene cluster in wild type strain and mutants CGF-3 by quantitative realtime RT-PCR. The relative expression value of *xanO1*, *xanO10*, *xanT* and *xanB1* were lower than 0.5 indicating less mRNA produced in mutant strains than that in the wild-type strain. Error bars were calculated from three independent experiments each of which was performed in duplicate.

### 3 讨论

本研究构建了 *xanR3* 基因缺失突变株 CGF-3, 发现突变株 CGF-3 中黄脂菌素产量下降为野生型的 10%左右, 体内回补后回补菌株 CGF-6 的产量上升为野生型的 40%左右, 进一步通过荧光定量 RT-PCR, 确定了 *xanR3* 作为正调控基因可以调控黄脂菌素生物合成相关基因的转录。生物信息学分析发现 XanR3 属于 ArsR 转录调控家族蛋白, 该家族蛋白可作为金属离子感受器发挥转录调节作用<sup>[9]</sup>, XanR3 蛋白的 C 末端含有 ArsR 家族结合 DNA 的 HTH 结构域, 暗示 XanR3 可能同样作为转录调控因子发挥调控作用。研究也发现链霉菌中的 ArsR 蛋白可以调控相关抗生素分子的生物合成, 例如在 *S. coelicolor* 中发现 *SCO0608* 基因可编码 AsrR 家族同源蛋白, 敲除该基因可加速孢子的形成及十二烷基灵菌红素和放线菌素的产生<sup>[10]</sup>。虽然该家族蛋白广泛存在于链霉菌中, 但这类蛋白参与调控抗生素生物合成的机制尚待进一步研究。本研究中, *xanR3* 基因的缺失使得参与黄脂菌素生物合成前体供应、骨架合成以及后修饰作用的基因转录量明显下降, 同时该突变株中黄脂菌素产量明显降低, 证明 XanR3 是黄脂菌素生物合成途径的正调控因子。本研究为探究黄脂菌素生物合成过程的调控机制及黄脂菌素高产菌株的构建提供了理论基础。

### 参考文献

- [1] Terui Y, Chu YW, Li JY, Ando T, Yamamoto H, Kawamura Y, Tomishima Y, Uchida S, Okazaki T, Munetomo E, Seki T, Yamamoto K, Murakami S, Kawashima A. Xantholipin, a novel inhibitor of HSP47 gene expression produced by *Streptomyces* sp.. *Tetrahedron Letters*, 2003, 44(29): 5427–5430.
- [2] Zhang WK, Wang L, Kong LX, Wang T, Chu YW, Deng ZX,

- You DL. Unveiling the post-PKS redox tailoring steps in biosynthesis of the type II polyketide antitumor antibiotic xantholipin. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(3): 422–432.
- [3] Winter DK, Sloman DL, Porco Jr JA. Polycyclic xanthone natural products: structure, biological activity and chemical synthesis. *Natural Product Reports*, 2013, 30(3): 382–391.
- [4] Kobayashi K, Nishino C, Ohya J, Sato S, Mikawa T, Shiobara Y, Kodama M. Actinoplanones A and B, new cytotoxic polycyclic xanthenes from *Actinoplanes* sp.. *The Journal of Antibiotics*, 1988, 41(4): 502–511.
- [5] Malkina ND, Dudnik YV, Lysenkova LN, Lazhko EI, Galatenko OA, Katrukha GS. 167-A, a new antibiotic produced by a mutant of an inactive wild strain of *Amycolata autotrophica*. *The Journal of Antibiotics*, 1994, 47(3): 342–348.
- [6] Solov'Eva NK, Rudaia SM. Characteristics of the organism producing a new antifungal antibiotic albofungin. *Antibiotiki*, 1958, 4: 5–10.
- [7] Nakagawa A, Omura S, Kushida K, Shimizu H, Lukacs G. Structure of cervinomycin, a novel xantone antibiotic active against anaerobe and mycoplasma. *The Journal of Antibiotics*, 1987, 40(3): 301–308.
- [8] Kong LX, Zhang WK, Chooi YH, Wang L, Cao B, Deng ZX, Chu YW, You DL. A multifunctional monooxygenase XanO4 catalyzes xanthone formation in xantholipin biosynthesis via a cryptic demethoxylation. *Cell Chemical Biology*, 2016, 23(4): 508–516.
- [9] Shi WP, Wu JH, Rosen BP. Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(31): 19826–19829.
- [10] Yang YH, Kim JN, Song E, Kim E, Oh MK, Kim BG. Finding new pathway-specific regulators by clustering method using threshold standard deviation based on DNA chip data of *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(4): 709–717.

## Function of AsrR family transcriptional regulatory gene *xanR3* in the biosynthetic cluster of xantholipin

Guofeng Chen<sup>1</sup>, Lingxin Kong<sup>1</sup>, Lu Wang<sup>2</sup>, Yiwen Chu<sup>2</sup>, Delin You<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

<sup>2</sup> Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610052, Sichuan Province, China

**Abstract:** [Objective] We revealed the function of the ArsR (Arsenical resistance regulator) family regulator XanR3 in xantholipin biosynthetic gene cluster. [Methods] Genetically, the *xanR3* disrupted mutant CGF03 and complementary strain CGF06 were constructed by conjugation between *S. flavogriseus* SIIA-A02191 and *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002. The operons within xantholipin biosynthesis cluster were grouped by RT-PCR and the transcriptional level was analyzed in the mutant CGF-3 by quantitative real-time RT-PCR. [Results] Inactivation of the *xanR3* gene dramatically reduced xantholipin biosynthesis, and its complementation partially restored xantholipin production. Totally, genes in xantholipin biosynthetic gene cluster were assigned into 18 co-transcription units, and the disruption of *xanR3* directly down-regulated the transcription of four operons as *xanO1-xanS1*, *xanB1-xanB3*, *xanT-xanO9* and *xanO10-xanC3*. [Conclusion] XanR3, a ArsR family transcriptional regulator, is an activator of xantholipin biosynthesis.

**Keywords:** xantholipin, AsrR family transcriptional regulator, RT-PCR, biosynthesis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31630002, 31170085, 31470183)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-62932943; E-mail: dlyou@sjtu.edu.cn

Received: 14 April 2017; Revised: 14 June 2017; Published online: 18 July 2017