

## 工业生物技术

# 耐热链霉菌 4"-O-异戊酰基转移酶基因在变铅青链霉菌 TK24 中的表达

张家瑚<sup>1</sup>, 钟晶晶<sup>2</sup>, 戴剑滢<sup>2</sup>, 王以光<sup>2</sup>, 夏焕章<sup>1</sup>, 赫卫清<sup>2</sup>

1 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016

2 中国医学科学院/中国协和医科大学医药生物技术研究所 卫生部抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050

张家瑚, 钟晶晶, 戴剑滢, 等. 耐热链霉菌 4"-O-异戊酰基转移酶基因在变铅青链霉菌 TK24 中的表达. 生物工程学报, 2014, 30(9): 1390-1400.

Zhang JH, Zhong JJ, Dai JL, et al. Expression of 4"-O-isovaleryltransferase gene from *Streptomyces thermotolerans* in *Streptomyces lividans* TK24. Chin J Biotech, 2014, 30(9): 1390-1400.

**摘要:** 拟研究异源调控系统提高耐热链霉菌 *Streptomyces thermotolerans* 4"-O-异戊酰基转移酶基因 (*ist*) 表达的可能性。在麦迪霉素产生菌 *Streptomyces mycarofaciens* 1748 中曾克隆到 *Bam*H I ~8.0 kb 片段, 含此基因片段的变铅青链霉菌 TK24 *Streptomyces lividans* TK24 转化子可将螺旋霉素高效转化为丙酰螺旋霉素。序列分析表明此片段除包含麦迪霉素 4"-O-丙酰基转移酶基因 (*mpt*) 外还存在与其连锁的两个正调控基因 *orf27* 和 *orf28*。将这个基因簇中 *mpt* 基因的 *orf* 替换为 *ist* 基因的 *orf*, 然后与两个正调控基因或者单独一个 *orf27* 连接, 将这些构建好的片段分别克隆到中等拷贝数及高拷贝数载体 pKC1139 和 pWHM3 上, 再转化到 *S. lividans* TK24 中。通过测定 *S. lividans* TK24 转化子中螺旋霉素生物转化为 4"-O-酰化螺旋霉素的产率来评价 *mpt* 和 *ist* 基因的表达水平。结果表明只有高拷贝载体 pWHM3 构建的重组质粒 *S. lividans* TK24 转化子中才能明显检测到 4"-O-异戊酰螺旋霉素的产生。*mpt* 基因的正调节系统可以提高 *ist* 基因的表达水平, 含两个调节基因的转化子转化效率高于含单一调节基因的转化子。

**关键词:** 螺旋霉素, 4"-O-酰基转移酶基因, 正调控基因, 异源表达

**Received:** November 19, 2013; **Accepted:** February 28, 2014

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 81172972), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2012N09).

**Corresponding author:** Weiqing He. Tel: +86-10-83157099; Fax: +86-10-60638137; E-mail: weiqing\_he@hotmail.com;

Huanzhang Xia. E-mail: xiahz612@sina.com

国家自然科学基金 (No. 81172972), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. 2012N09) 资助。

## Expression of 4"-O-isovaleryltransferase gene from *Streptomyces thermotolerans* in *Streptomyces lividans* TK24

Jiahu Zhang<sup>1</sup>, Jingjing Zhong<sup>2</sup>, Jianlu Dai<sup>2</sup>, Yiguang Wang<sup>2</sup>, Huanzhang Xia<sup>1</sup>, and Weiqing He<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Life Science and Biopharmaceuticals, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning, China

<sup>2</sup> Key Lab of Antibiotic Biotechnology, Minister of Health, Institute of Medicinal Biotechnology Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

**Abstract:** 4"-O-isovaleryltransferase gene (*ist*) was regulated by positive regulatory genes of midecamycin 4"-O-propionyltransferase gene (*mpt*) in *Streptomyces lividans* TK24. A BamH I ~8.0 kb fragment from *Streptomyces mycarofaciens* 1748 was proved that it contained *mpt* gene and linked with two positive regulatory genes, *orf27* and *orf28*. Orf of *mpt* was replaced by orf of *ist* and linked with two regulatory genes or *orf27* single, and individually cloned into the vectors pKC1139 or pWHM3 (high copy number), and then transformed into *S. lividans* TK24. The levels of *mpt* and *ist* expression were evaluated by the bio-transformation efficacy of spiramycin into 4"-O-acylsiramycins in these transformants. The results showed that 4"-O-isovalerylsiramycins could be detected only in the transformants containing the plasmids constructed with pWHM3. The efficacy of bio-transformation of the transformants containing two regulatory genes was higher than that of *orf27* single. So, the positive regulatory genes system of *mpt* gene could enhance *ist* gene expression.

**Keywords:** spiramycin, 4"-O-acyltransferase gene, positive regulatory gene, heterologous expression

碳霉素、麦迪霉素、泰乐菌素和螺旋霉素均为结构十分相似的 16 元环大环内酯类抗生素(图 1),除了碳霉素以外,它们均广泛应用于临床或畜牧业<sup>[1-4]</sup>。16 元环大环内酯如螺旋霉素在胃肠道中的稳定性好,组织分布广,体内持续时间长,无其他大环内酯类抗生素所致的肝损害,对胃肠道的反应比 14 元环大环内酯类少<sup>[5]</sup>。对 16 元环大环内酯类抗生素构效关系的研究表明,碳霉糖 4"位亲脂酰基基团对于分子向细胞的渗透有重要作用,而增加酰基碳链的长度可以提高其亲脂性,并提高其在体内的抗菌活性<sup>[6-7]</sup>。日本学者 Okamoto 先后利用碳霉素产生菌 *Streptomyces thermotolerans* 内酯环合成阻断变株或克隆 4"-O-异戊酰基转移酶基因(4"-O-isovaleryltransferase gene, *ist*),转化或在

泰乐菌素产生菌中表达均获得了 4"-O-酰基化泰乐菌素<sup>[8-9]</sup>。本实验室在 1994 年从我国自主分离的麦迪霉素产生菌 *Streptomyces mycarofaciens*1748 中克隆了麦迪霉素 4"-O-丙酰基转移酶基因(Midecamycin 4"-O-propionyltransferase gene, *mpt*),并在螺旋霉素产生菌 *Streptomyces spiramyceticus* 中表达,首次获得了基因工程技术制造的新抗生素丙酰螺旋霉素<sup>[10-11]</sup>。药效学研究证明其体内外活性均优于螺旋霉素<sup>[12]</sup>。继而克隆出 *S. thermotolerans* 中的 *ist* 基因,并在 *S. spiramyceticus* 中表达,获得了基因工程必特螺旋霉素(现在的商品名为可利霉素)产生菌<sup>[13]</sup>,研究证实螺旋霉素在 4"位的异戊酰化更加增强其亲脂性,从而增加其组织浓度和体内抗菌活性<sup>[14]</sup>,可利霉素已经完成 III 期临床试验,目前已进入新药证书待批阶段。

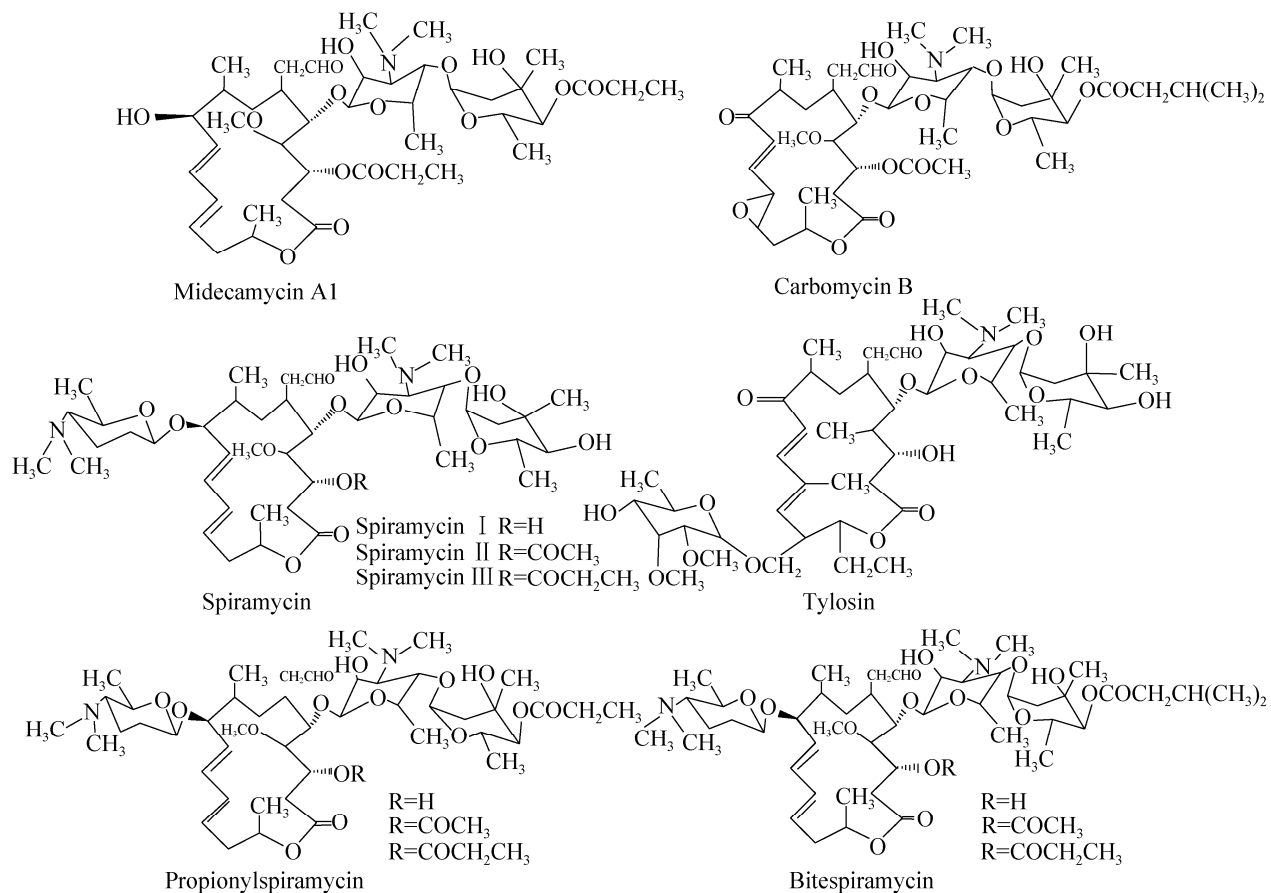


图 1 16 元环大环内酯类抗生素

Fig. 1 16 membered macrolide antibiotics.

在链霉菌的抗生素生物合成基因簇中常包含一个或多个途径特异性调控基因,它们一般调控一种抗生素或几种具有共同生物合成途径的抗生素的生物合成,这些途径特异性调控基因还受到其他调控基因的调控,通过改造这些调控基因可以提高抗生素的产量<sup>[15-17]</sup>。原来研究发现从 *S. mycarofaciens* 1748 中克隆的 *Bam*H I ~8.0 kb 片段含有 *mpt* 基因,而从 *S. thermotolerans* 中克隆的 *ist* 基因位于 *Bam*H I ~2.3 kb 片段中, *mpt* 基因与 *ist* 基因都是编码催化 16 元环大环内酯 4"-O-酰基转移酶,二者在蛋白序列上有 70% 的一致性,但 *mpt* 在 *S. lividans* TK24 中的表达效果较好,

推测在 *Bam*H I ~8.0 kb 序列中存在 *mpt* 的正调控基因<sup>[10]</sup>。文中将分析 *S. mycarofaciens* 1748 中含 *mpt* 的 *Bam*H I ~8.0 kb 片段的基因信息,并探索在 *S. lividans* TK24 中利用 *mpt* 的调控基因提高 *ist* 基因表达的可能性,为构建新的必特螺旋霉素基因工程菌奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种、基因和载体

*S. lividans* TK24 为异源表达宿主,本实验室保存。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态

细胞, 基因克隆和重组质粒构建受体菌, 购自北京全式金生物技术有限公司。pKC1139 温敏型链霉菌/大肠埃希菌穿梭载体, pWHM3 链霉菌/大肠埃希菌穿梭高拷贝载体, pUC19 重组质粒构建载体, 本实验室保存。pSW4 质粒携带有从 *S. thermotolerans* 中克隆的含 *ist* 基因 *Bam*H I ~2.3 kb 片段<sup>[13]</sup>, 本实验室构建。pWF5 质粒含 *mpt* 基因的 *Bam*H I ~8.0 kb 片段<sup>[10]</sup>, 本实验室构建。pKC-e-ist-ist 质粒含链霉菌中组成型启动子 *PerME\**和两个连锁的 *ist* 基因, 本实验室构建<sup>[18]</sup>。

### 1.1.2 试剂

螺旋霉素购自河南天方药业股份有限公司, 主要组分为螺旋霉素 II (SP II) 和螺旋霉素 III (SP III)。必特螺旋霉素对照品, 本实验室自制, 主要组分为 4"-异戊酰螺旋霉素 (I + II + III)。阿普拉霉素 (Apramycin, Am) 购自武汉远城科技发展有限公司。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。KOD *Taq* DNA 聚合酶购自北京天佑恒远生物科技有限公司。TLC 硅胶板 (GF<sub>254</sub>) 购自山东烟台吉德精化工有限公司。

### 1.1.3 培养基

MY 固体培养基 (100 mL): 酵母提取物 0.4 g, 麦芽提取物 1.0 g, 葡萄糖 0.4 g, 琼脂粉 1.5 g; 用于 *S. lividans* TK24 的固体培养。含有重组质粒的转化子培养在培养基中加入终浓度为 50 μg/mL 的 Am。

R<sub>2</sub>YE 培养基配方见文献[19], 用于 *S. lividans* TK24 原生质体的制备和再生。

生物转化培养基 (100 mL): 淀粉 2.0 g, 葡萄糖 2.0 g, 硫酸铵 0.3 g, 酵母粉 0.5 g, 黄豆饼粉 1.0 g, 磷酸二氢钾 0.05 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02 g, 碳酸钙 0.5 g。

## 1.2 方法

### 1.2.1 分子克隆

PCR 产物纯化, 限制性酶切, DNA 连接反应, 转化和重组质粒筛选, 按照文献[20]进行。将 pWF5 质粒上的 *Bam*H I ~8.0 kb 片段亚克隆到 pUC19 载体, 利用 M13 通用引物在中美泰和生物技术有限公司进行测序。

### 1.2.2 重组质粒的构建

利用 *Sal* I 酶切 (图 2) pUC19 重组质粒中 *Bam*H I ~8.0 kb 外源片段, 回收 4.2 kb 片段, 此 *Sal* I 片段只包含 *orf27* (*acyB2* 同源基因) 和 *mpt* 连锁基因, 将其克隆至 pUC19 载体, 再用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切, 亚克隆至 pKC1139 或者 pWHM3 载体上获得重组质粒 pKC-*orf27-mpt* 或者 pWH-*orf27-mpt*。

根据 *ist* 基因的核苷酸序列 (GenBank Accession No. D31821.1) 设计 PCR 引物 (表 1)。上游引物为 *ist-F*, 在 5'端加上 *mpt* 基因起始密码子上游相邻的 50 bp 碱基; 下游引物为 *ist-R*, 在 5'端加上 *mpt* 基因终止密码子下游相邻的 50 bp 碱基。以 pSW4 质粒为模板, 通过 PCR 得到包含 *mpt* 基因 *orf* 上下游各 50 bp 序列的 *ist* 基因片段, 在重叠 PCR 中当作其中一个模板 (图 3)。以 pUC19-8.0 kb 质粒为 DNA 模板, 利用 *orf27* 上下游基因序列引物 *mpt-LF* 和 *mpt-LR* 扩增出 1.6 kb 的 PCR 产物 (*mpt-L*), 包含 *orf27* 基因和 *mpt* 基因起始密码子之前序列。利用 *mpt* 基因下游引物 *mpt-RF* 和 *mpt-RR* 扩增出 250 bp 的 PCR 产物 (*mpt-R*), 包含了 *mpt* 基因的下游终止区序列。再以 *mpt-L* 片段、*mpt-R* 片段和带有 50 bp 同源臂的 *ist-orf* 为模板, 用 *mpt-LF* 和 *mpt-RR* 为引物, 利用重叠 PCR 反应得到 3.0 kb 产物, 这样就将 *mpt* 基因的 *orf* 替换为 *ist* 基因的 *orf*,

并直接使 *ist* 基因位于 *orf27* 基因的下游。将 PCR 产物克隆至 pUC19 载体，测序验证后，再分别亚克隆到 pKC1139 和 pWHM3 载体上得到重组质粒 pKC-*orf27-ist* 和 pWH-*orf27-ist*。

用 *Sca* I 酶切 *Bam*H I ~8.0 kb 外源片段 (图 2)，回收 3.9 kb 片段，此片段包含 *orf28* 基因和部分 *orf27* 序列，将 *orf27-ist* 外源片段也用 *Sca* I 酶切，回收 2.0 kb 片段，连接 3.9 kb 和 2.0 kb 片段得到 *orf28-orf27-ist* 连锁基因，将此片段通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 位点连接到 pKC1139 和 pWHM3 载体上获得重组质粒 pKC-*orf28-orf27-ist* 和 pWH-*orf28-orf27-ist*。

本实验室原来构建的 pKC-e-*ist-ist* 质粒带有 *PermE\** 启动子和两个连锁的 *ist* 基因，利用 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶切可以获得 *PermE\** 启动子和一个 *ist* 基因，将此片段亚克隆到 pWHM3 载体的相同位点得到质粒 pWH-*PermE\*-ist*，此质粒作为 *ist* 基因表达的阳性对照。

### 1.2.3 *S. lividans* TK24 原生质体制备和转化

具体操作按文献[19]进行。

### 1.2.4 生物转化产物检测

*S. lividans* TK24 转化子在含 Am (50 μg/mL) 的 MY 平板上 28 °C 培养 6–8 d，挖块至生物转化培养基 (50 mL 生物转化培养基/500 mL 三角

表 1 本文所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primers sequence (5'-3')
ist-F	CTAGAAATCCCCTCTCATCCACGCCCATTTACCTG CGAGGTACTGCTATGCCCCTGCCGAAACATCTT
ist-R	ACACCCTGCGGGCGCCACCCCGCACACTGTTGTG CCGCCGACCCGCTCACGGAGTGCCGGACGGGGC
mpt-LF	GCTCTAGACTGCGGTGCACCCCAACA
mpt-LR	GCATAGCAGTACCTCGCAG
mpt-RF	TGAGCGGGTCCGCGGCA
mpt-RR	CCCAAGCTTCACGCGCGCAACCGGTAC

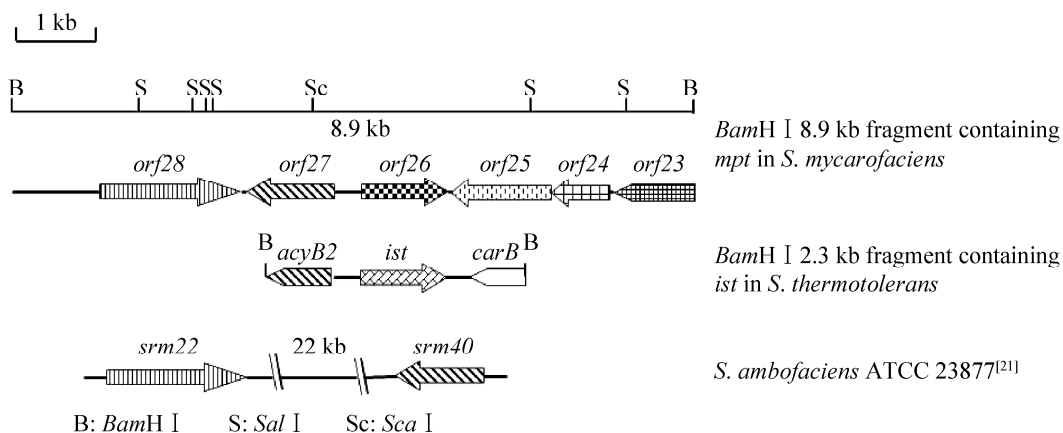


图 2 调控基因在 3 种大环内脂类抗生素生物合成基因簇中的位置

Fig. 2 Organization of regulatory genes in biosynthetic gene clusters of three macrolide producers.

瓶),每种转化子各接3瓶,28℃振荡(200 r/min)培养48 h,加入螺旋霉素至终浓度50 μg/mL,继续培养48 h,离心取10 mL上清液,用NaOH(1.0 mol/L)调至pH 8.5–9.0,等体积乙酸乙酯萃取,萃取液等分两份,室温吹干。一份溶于100 μL乙酸乙酯,用于TLC检测,展开剂为乙酸乙酯:环己烷:丙酮:氨水=5:5:1:0.1(V/V);碘熏显迹;另一份溶于300 μL甲醇,取4 μL进行HPLC检测(日本岛津高效液相色谱仪,LC-10ATvp CLASS-VP V6.10),色谱柱为Kromasil C18 4.6 mm×150 mm,流动相为乙腈/10 mmol/L 乙酸铵溶液(50/50),流速为1 mL/min,检测波长231 nm。LC-MS(美国Thermo公司LTQ型液相色谱-质谱联用仪)检测在本所仪器室进行,质谱条件:ESI源;正离子检测;鞘气(N<sub>2</sub>)流速0.3 L/min;辅助气(He)流速0.1 L/min;源电压4.5 kV;毛细管温度350℃;毛细管电压4.5 V。

## 2 结果

### 2.1 *S. mycarofaciens* 1748 克隆的 *Bam*H I ~8.0 kb 片段测序结果与生物信息学分析

*Bam*H I ~8.0 kb 片段实际测序结果为8.9 kb,与Mido等<sup>[22]</sup>报道*S. mycarofaciens*中麦迪霉素生物合成基因簇(GenBank Accession No. BD420675)完全一致,位于其14 616 bp至23 507 bp之间,通过生物信息学分析其中包含*orf28*到*orf23*共6个基因,*orf23*是不完整的基因片段(图2)。从*S. mycarofaciens* 1748克隆的*Bam*H I 8.9 kb片段中*orf26*是*mpt*基因,与之连锁的是两个调控基因*orf27*和*orf28*。*orf25*、*orf24*和*orf23*是与糖基合成相关基因,分别为dTDP-4-酮-6-脱氧葡萄糖-2,3-脱水酶基因、II型硫酸酯酶基因和dTDP-葡萄糖-4,6-脱水酶基因。BlastP分析显示*S. mycarofaciens*的Orf27与生二素链霉菌*Streptomyces ambofaciens*中Srm40

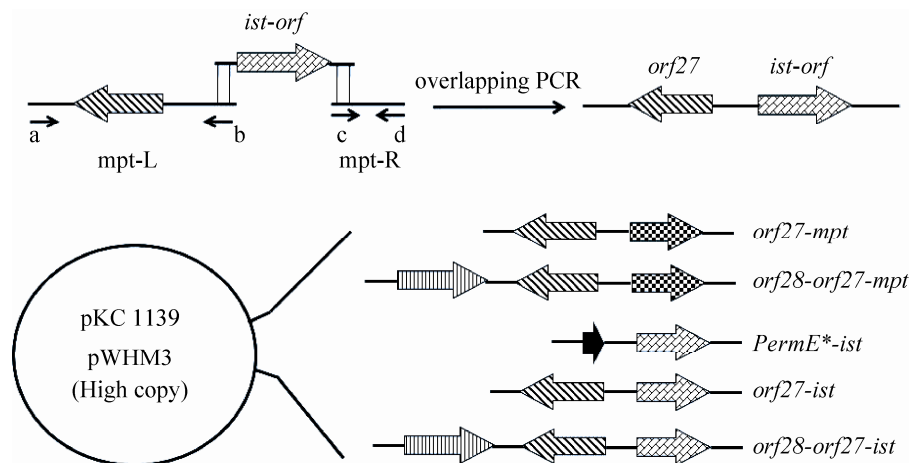


图3 重组质粒的构建

Fig. 3 Construction of the recombinant plasmids. → primer; a: mpt-LF; b: mpt-LR; c: mpt-RF; d: mpt-RR.

在蛋白水平的同源性的为 68% ,与 *S. thermotolerans* 中的 *AcyB2* 的同源性为 70%。Orf28 与 *S. ambofaciens* 中的 *SrmR* 的同源性为 68% ,在 *S. thermotolerans* 中至今尚无类似蛋白的报道。*srm40* 和 *srmR* 均为螺旋霉素生物合成的正调控基因,并且这两个基因的转录处于级联反应系统,*SrmR* 正调控 *srm40* 的转录,后者再激活螺旋霉素生物合成基因的转录<sup>[21,23]</sup>。推测 *orf27* 和 *orf28* 在麦迪螺旋霉素生物合成中起类似调控作用。但是 *orf27* 和 *orf28* 与 4"-O-酰基转移酶基因 *orf26* (*mpt*) 是连锁的,而在 *S. ambofaciens* 中 *srmR* 和 *srm40* 是不连锁的,相隔约 22 kb (图 2)。类似的两个调控基因还存在于其他大环内酯类抗生素安哥拉霉素 (GenBank Accession No. EU232693) 和蔷薇霉素生物合成基因簇<sup>[24]</sup>。

## 2.2 重组质粒的异源表达和生物转化

将按方法 1.2.2 构建的重组质粒通过原生质体转化法导入到 *S. lividans* TK24 中,经 Am 抗性筛选获得包含相应重组质粒的 TK24 转化子: TK24 (pKC-*orf27-mpt*) 和 TK24 (pWH-*orf27-mpt*)、TK24 (pKC-*orf28-orf27-mpt*) 和 TK24 (pWH-*orf28-orf27-mpt*)、TK24 (pKC-*orf27-ist*) 和 TK24 (pWH-*orf27-ist*)、TK24 (pKC-*orf28-orf27-ist*) 和 TK24 (pWH-*orf28-orf27-ist*)。这些阳性转化子经 PCR 方法确证后,再进行生物转化螺旋霉素的检测。TLC 检测表明,以 pKC1139 为载体构建的 4 种重组质粒的转化子,没有发现 Rf 值类似于 4"-O-异戊酰螺旋霉素的产物。而以 pWHM3 为载体构建的 4 种重组质粒的转化子,在其产物中都检测到 Rf 值类似于 4"-O-异戊酰螺旋霉素的产物 (图 4,泳道 5-8 所示)。

为了评价 *ist* 基因的表达情况,又构建了 TK24 (pWH-*PerME\*-ist*) 转化子作为 *ist* 基因表

达的阳性对照,通过 HPLC 检测 TK24 (pWH-*PerME\*-ist*) 和其他转化子中酰化螺旋霉素的峰面积,根据峰面积的大小估算 *ist* 基因的表达情况,每种转化子重复 3 次取平均值,利用 LC-MS 测定典型生物转化产物的分子量和碎片峰,以确定其酰化产物,结果见图 5 和表 2。

以必特螺旋霉素标准品为对照,5 种转化子中的 4"-O-酰化螺旋霉素都进行了 HPLC、LC-MS 及其各自碎片峰的鉴定。产物 1 为 4"-O-丙酰螺旋霉素 III,分子量为 955.62,产物 2 为 4"-O-异丁酰螺旋霉素 II,分子量和产物 1 一致为 955.69,但二者的碎片峰不一样,丙酰螺旋霉素 III 的碎片峰为 755.50、596.53 和 355.20,而异丁酰螺旋霉素 II 的碎片峰为 741.50、582.38 和 388.27。产物 3、5 和 6 分别是 4"-O-异戊酰化螺

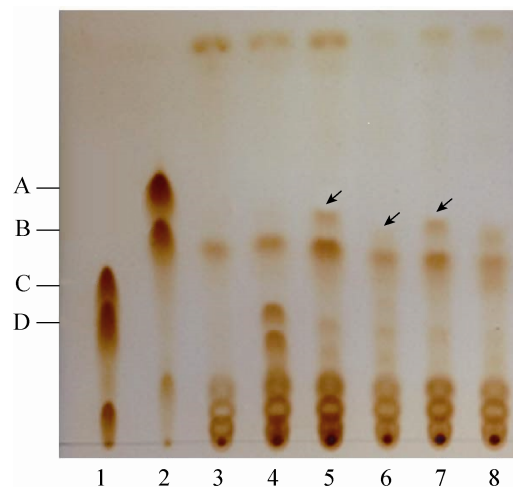


图 4 TLC 检测生物转化螺旋霉素的产物

Fig. 4 Detection of bio-transformation products of spiramycin by TLC. 1: spiramycin; 2: bitespiramycin; 3: TK24 (pWHM3); 4: TK24 (pWHM3) with addition of spiramycin, as a control; 5: TK24 (pWH-*orf27-ist*); 6: TK24 (pWH-*orf27-mpt*); 7: TK24 (pWH-*orf28-orf27-ist*); 8: TK24 (pWH-*orf28-orf27-mpt*). A: 4"-O- isovalerylsiramycin III; B: 4"-O- isovalerylsiramycin II; C: spiramycin III; D: spiramycin II. —> The product with Rf value similar to 4"-O- isovalerylsiramycin.

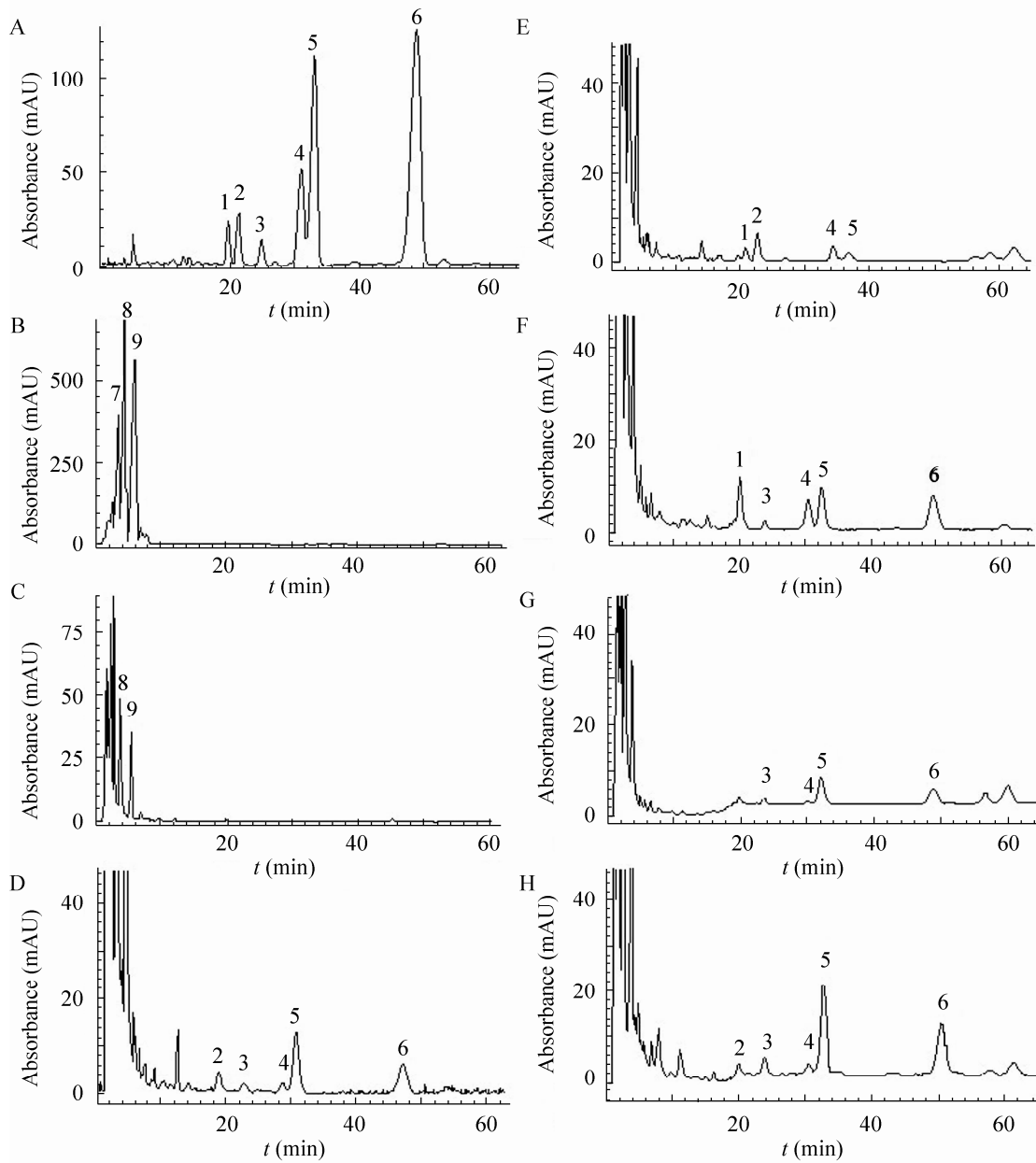


图 5 HPLC 检测生物转化螺旋霉素的产物

Fig. 5 Detection of bio-transformation products of spiramycin by HPLC. (A) Bitespiramycin. (B) Spiramycin. (C) TK24 (pWHM3). (D) TK24 (pWH-*PermE*\*-*ist*). (E) TK24 (pWH-*orf27-mpt*). (F) TK24 (pWH-*orf28-orf27-mpt*). (G) TK24 (pWH-*orf27-ist*). (H) TK24 (pWH-*orf28-orf27-ist*). 1: 4''-O-propionylspiramycin III; 2: 4''-O-isobutyrylsiramycin II; 3: 4''-O-isovalerylspiramycin I; 4: 4''-O-isobutyrylsiramycin III; 5: 4''-O-isovalerylspiramycin II; 6: 4''-O-isovalerylspiramycin III; 7: spiramycin I; 8: spiramycin II; 9: spiramycin III.



表 2 5 种转化子中 4"-O-酰化螺旋霉素的 HPLC 峰面积

Table 2 HPLC peak area of 4"-O-acylated spiramycins in the 5 transformants

Name	1	2	3	4	5	6	Total acylated SP ( $\times 10^5$ )
Bitespiramycin (standard)	$9.27 \times 10^5$	$1.33 \times 10^6$	$6.86 \times 10^5$	$3.48 \times 10^6$	$7.28 \times 10^6$	$1.02 \times 10^7$	239.03
TK24 (pWH- <i>PermE</i> *- <i>ist</i> )	-	$2.53 \times 10^5$	$1.23 \times 10^5$	$1.27 \times 10^5$	$8.31 \times 10^5$	$7.68 \times 10^5$	25.93
TK24 (pWH- <i>orf27-mpt</i> )	$1.64 \times 10^5$	$3.67 \times 10^5$	-	$2.72 \times 10^5$	$1.94 \times 10^5$	-	9.97
TK24 (pWH- <i>orf28-orf27-mpt</i> )	$7.93 \times 10^5$	-	$1.17 \times 10^5$	$5.23 \times 10^5$	$6.60 \times 10^5$	$8.40 \times 10^5$	29.33
TK24 (pWH- <i>orf27-ist</i> )	-	-	$1.01 \times 10^5$	$1.07 \times 10^5$	$5.42 \times 10^5$	$5.92 \times 10^5$	13.42
TK24 (pWH- <i>orf28-orf27-ist</i> )	-	$1.17 \times 10^5$	$2.68 \times 10^5$	$1.28 \times 10^5$	$1.23 \times 10^6$	$1.18 \times 10^6$	29.23

1: 4"-O-propionylspiramycin III; 2: 4"-O-isobutyrylsiramycin II; 3: 4"-O-isovalerylspiramycin I; 4: 4"-O-isobutyrylsiramycin III; 5: 4"-O-isovalerylspiramycin II; 6: 4"-O-isovalerylspiramycin III; SP: spiramycin.

旋霉素 I、II 和 III，分子量分别为 927.61、969.74 和 983.65。产物 4 是 4"-O-异丁酰螺旋霉素 III，分子量为 969.65，和产物 5 一致，但二者碎片峰有区别。与 TK24 (pWH-*PermE*\*-*ist*) 相同，TK24 (pWH-*orf27-ist*) 以及 TK24 (pWH-*orf28-orf27-ist*) (图 5 G、H) 均可以将螺旋霉素转化为 4"-O-异戊酰化螺旋霉素 I、II 和 III，也有少量丙酰和丁酰化的产物，而含两个正调控基因的 TK24 (pWH-*orf28-orf27-ist*) 比含单一调控基因的 TK24 (pWH-*orf27-ist*) 转化效率要高，总的 4"-O-酰化螺旋霉素峰面积大于含单一调控基因的转化子，其转化效率与 TK24 (pWH-*PermE*\*-*ist*) 相当。同样，含两个正调控基因的 TK24 (pWH-*orf28-orf27-mpt*) 转化效率也明显高于 TK24 (pWH-*orf27-mpt*) (图 5 E、F)。

### 3 讨论

在研制必特螺旋霉素时，将来自 *S. thermotolerans* 中的 *ist* 基因 (*ist*-*Bam*H I 2.3 kb 片段，图 2 所示) 导入到 *S. spiramyceticus* 中，可以很容易检测到 4"-O-异戊酰螺旋霉素的产生，但将该片段通过 pKC1139 或 pSET152 等载

体导入到 *S. lividans* TK24 中，其转化子中却很难检测到 4"位酰化的螺旋霉素。在 *ist* 基因前面加上强启动子 *PermE*\* 后才在 *S. lividans* TK24 中检测到螺旋霉素的 4"-O-异戊酰化的产物<sup>[18]</sup>。本研究表明，利用 *S. mycarofaciens* 1748 中的正调控基因 *orf27* 和 *orf28* 可以实现异源 *ist* 基因在 *S. lividans* TK24 中的表达，其转化效率与组成型启动子调控下的 *ist* 基因相当。而且无论是 *mpt* 基因还是 *ist* 基因在两个调控基因存在时比在单个调控基因的情况下表达效率高。*mpt* 和 *ist* 基因产物对底物有较大的宽容性，都能催化丙酰基、丁酰基和异戊酰基对螺旋霉素 4"位进行酰化，只是 *Mpt* 倾向使用短链的丙酰或丁酰，而 *Ist* 更偏好长链的异戊酰基。在本研究中采用 *mpt* 基因的 *orf* 替换为 *ist* 基因的 *orf*，即利用 *mpt* 启动子对 *ist* 的异源表达进行了初步研究。只有在 RNA 和蛋白表达水平深入研究不同调控蛋白对 *ist* 基因转录调控的影响，才能真正了解 *ist* 在异源宿主菌中的调控和表达情况。

李佳等<sup>[25]</sup>在测定一些强启动子，如 *PermE*\* 或者 *Psf* 在不同链霉菌中表达活性时，发现 *S. lividans* 与天蓝色链霉菌 *Streptomyces*

*coelicolor* 和委内瑞拉链霉菌 *Streptomyces venezuelae* 相比, *S. lividans* 的表达活性最低, 所以在变铅青链霉菌中外源基因的表达量是偏低的。我们也发现 *ist* 基因在 *S. lividans* TK24 宿主中即使在正调控基因 *acyB2* 存在的条件下, 其表达量也偏低, 因此, 采用不同拷贝数的质粒载体明显影响其表达效率。用复制子为 pSG5 型 pKC1139 载体构建的重组载体, 拷贝数在链霉菌中一般是 20–50 个之间, 但在 *S. lividans* TK24 转化子的产物中也只能检测到微量螺旋霉素的 4"酰化产物。而采用高拷贝 pWHM3 载体构建重组质粒, 其复制子是 pIJ 型, 拷贝数 40–300 个, 其转化效率明显提高。因此, 可以看出 *ist* 基因在 *S. lividans* TK24 中的表达量比较低, 下一步准备将这些重组质粒导入到螺旋霉素产生菌中, 检测这些转化子中 *ist* 基因的表达情况, 为构建新型高产的必特螺旋霉素产生菌奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Bunnag C, Jareoncharsri P, Voraprayoon S, et al. Efficacy of spiramycin as an alternative to amoxicillin in the treatment of acute upper respiratory tract infections. *Clin Drug Investig*, 1998, 15(6): 461–466.
- [2] Paquet C, Yudin MH. Toxoplasmosis in pregnancy: prevention, screening, and treatment. *J Obstet Gynaecol Can*, 2013, 35(1): 78–79.
- [3] Mazzariol A, Koncan R, Vitali LA, et al. Activities of 16-membered ring macrolides and telithromycin against different genotypes of erythromycin-susceptible and erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(6): 1171–1176.
- [4] Corns SM, Ashlock DA, Bryden KM. Development of antibiotic regimens using graph based evolutionary algorithms. *Biosystems*, 2013, 114(3): 178–185.
- [5] Rubinstein E, Kellern N. Spiramycin renaissance. *J Antimicrob Chemother*, 1998, 42: 572–576.
- [6] Omura S, Sano H, Sunazuka T. Structure activity relationships of spiramycins. *J Antimicrob Chemother*, 1985, 16(Suppl A): 1–11.
- [7] Sano M, Sunazuka T, Tanaka H, et al. Chemical modification of spiramycins VI. Synthesis and antibacterial activities of 3,3"-di-O-acyl-4"-O-sulfonyl and 3,3"-di-O-acyl-4"-O-alkyl derivatives of spiramycin I. *J antibiot (Tokyo)*, 1985, 38: 1350–1358.
- [8] Arisawa A, Kawamura N, Tsunekawa H, et al. Cloning and nucleotide sequences of two genes involved in the 4"-O-acylation of macrolide antibiotics from *Streptomyces thermotolerans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57(12): 2020–2025.
- [9] Arisawa A, Kawamura N, Narita T, et al. Direct fermentative production of acyltylosins by genetically-engineered strains of *Streptomyces fradiae*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1996, 49(4): 349–354.
- [10] Wang YG, Jin LF, Xu XM, et al. A genetically engineered hybrid antibiotic propionyl spiramycin. *Chin J Antibiot*, 1994(2): 109–116 (in Chinese). 王以光, 金莲舫, 徐小敏, 等. 基因工程丙酰螺旋霉素. *中国抗生素杂志*, 1994(2): 109–116.
- [11] Zhang XL, Wang YG. Studies on midecamycin 4"-O-propionyltransferase gene structure. *Acta Microbiol Sin*, 1996, 36(6): 417–422 (in Chinese). 张叙伦, 王以光. 麦迪霉素 4"-O-丙酰基转移酶 (mpt) 基因结构的研究. *微生物学报*, 1996, 36(6): 417–422.
- [12] Chen HZ, Zhang WX, Lou RH, et al. Pharmacological study on propionylspiramycin. *Chin J New Drugs*, 1992, 1(1): 11–15 (in Chinese). 陈慧贞, 张伟新, 娄人慧, 等. 丙酰螺旋霉素的药理研究. *中国新药杂志*, 1992, 1(1): 11–15.
- [13] Shang GD, Dai JL, Wang YG. Construction of a stable bioengineered strain of Biotechmycin. *Chin J Biotech*, 1999, 15(2): 171–175 (in Chinese).

- 尚广东, 戴剑滢, 王以光. 生技霉素稳定型基因工程菌的构建. 生物工程学报, 1999, 15(2): 171-175.
- [14] Shi XG, Sun YM, Zhang YF, et al. Tissue distribution of bitespiramycin and spiramycin in rats. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(11): 1396-1401.
- [15] Gilles PW, Kenneth JM. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Nat Prod Rep*, 2011, 28: 1311-1333.
- [16] Aigle B, Corre C. Waking up *Streptomyces* secondary metabolism by constitutive expression of activators or genetic disruption of repressors. *Methods Enzymol*, 2012, 517: 343-366.
- [17] Martín JF, Liras P. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13(3): 263-273.
- [18] Yang YH, He WQ, Li RF, et al. Incorporation of *PermE\**, a strong promoter, at 5'-upstream of 4"-isovaleryltransferase gene improves the bioconversion of spiramycin to 4"-isovaleryspiramycin in *Streptomyces lividans* TK24. *Chin J Antibiot*, 2010, 35(11): 826-830 (in Chinese).  
杨永红, 赫卫清, 李瑞芬, 等. 利用强启动子 *PermE\** 提高 4"-异戊酰基转移酶基因在变铅青链霉菌 TK24 中对螺旋霉素的 4"-异戊酰化水平. *中国抗生素杂志*, 2010, 35(11): 826-830.
- [19] Tobias K, Bibb MJ, Mark JB. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 2000: 232-236.
- [20] Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20-25.
- [21] Fatma K, Emmanuelle D, Nathalie O, et al. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide antibiotic spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*. *Microbiology*, 2007, 153: 4111-4122.
- [22] Mido N, Hoshigo S, Murakami T. Medicamycin biosynthetic gene cluster: JP 2004049100-A/1. 2004-02-19.
- [23] Karray F, Darbon E, Nguyen HC, et al. Regulation of the biosynthesis of the macrolide antibiotic spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*. *J Bacteriol*, 2010, 192(21): 5813-5821.
- [24] Farnet CM, Staffa A, Yang XS. Genes and proteins for the biosynthesis of rosaramicin: US 2003/0113874 A1. 2003-06-19.
- [25] Li J, Xiang SH, Yang XS, et al. Evaluation of the activities of two promoters in *Streptomyces* by reporter gene method. *Acta Microbiol Sin*, 2009, 49(11): 1454-1458 (in Chinese).  
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. *微生物学报*, 2009, 49(11): 1454-1458.

(本文责编 郝丽芳)