

• 工业生物技术 •

fcl 基因对须糖多孢菌丁烯基多杀菌素生物合成及生长发育的影响

彭胜男, 何昊城, 苑爽芹, 穰杰, 胡胜标, 孙运军, 余子全, 黄伟涛, 胡益波, 丁学知, 夏立秋

学部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室 湖南师范大学 生命科学学院 微生物分子生物学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410081

彭胜男, 何昊城, 苑爽芹, 等. *fcl* 基因对须糖多孢菌丁烯基多杀菌素生物合成及生长发育的影响. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1662–1675.

Peng SN, He HC, Yuan SQ, et al. Effect of *fcl* gene for butenyl-spinosyn biosynthesis and growth of *Saccharopolyspora pogona*. Chin J Biotech, 2019, 35(9): 1662–1675.

摘要: *fcl* 基因编码的 GDP-岩藻糖合成酶 (GDP fucose synthetase, GFS), 能催化由 GDP-D-甘露糖合成 GDP-L-岩藻糖过程中的两步差向异构酶和还原酶反应; 还参与氨基糖和核糖的生物合成, 是调控生物体糖代谢、核苷酸代谢的关键酶之一。通过前期基因组测序表明须糖多孢菌 *Saccharopolyspora pogona* 中存在 *fcl* 基因。利用基因工程技术构建了 *fcl* 基因的过表达菌株 *S. pogona-fcl* 和敲除菌株 *S. pogona-Δfcl*。结果表明该基因对菌株生长发育、蛋白表达及其转录水平、杀虫活性、丁烯基多杀菌素的生物合成均存在影响。经 HPLC 分析显示, *S. pogona-Δfcl* 的丁烯基多杀菌素产量增加为野生型菌株的 130%, *S. pogona-fcl* 的丁烯基多杀菌素产量降低了 25%。生测结果显示, 与野生型菌株相比 *S. pogona-Δfcl* 对棉铃虫的杀虫活性明显增强, 而 *S. pogona-fcl* 的杀虫活性降低。利用扫描电镜观察发现, *S. pogona-Δfcl* 菌丝体表面出现褶皱, 呈现短棒状, *S. pogona-fcl* 菌丝形态与野生型菌株一致。以上结果表明, *fcl* 基因的敲除影响菌丝体的生长发育, 能促进丁烯基多杀菌素的生物合成和增强杀虫活性, 该基因的过表达抑制了丁烯基多杀菌素的生物合成和降低了杀虫活性。SDS-PAGE 结果表明, 三株菌株在 96 h 时蛋白表达差异最为明显。对差异蛋白通过实时荧光定量聚合酶链式反应结果显示, 三菌株蛋白的转录水平存在显著表达差异。通过研究结果构建了网络代谢调控图, 分析 *fcl* 基因对须糖多孢菌生长发育及丁烯基多杀菌素生物合成代谢调控网络途径的影响, 初步构建了 *fcl* 基因调控的代谢途径, 为揭示丁烯基多杀菌素生物合成的调控机制及相关后续研究提供了实验依据。

关键词: 须糖多孢菌, 丁烯基多杀菌素, *fcl* 基因, 生物合成, 生长发育

Received: April 17, 2019; **Accepted:** June 3, 2019

Supported by: Major Program of Hunan Province (No. 2017NK1030), National Basic Research Program of China (863 Program) (No. 2011AA10A203), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB722301), National Natural Science Foundation of China (No. 31770106), Hunan Province Biological Development Engineering and New Product Development Collaborative Innovation Center (No. 20134486), Hunan Education Department Project (No. 10CY013).

Corresponding authors: Shengbiao Hu. Tel: +86-731-88872905; E-mail: shengbiaohu@hunnu.edu.cn

Liqiu Xia. Tel: +86-731-88872298; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

湖南省重大项目 (No. 2017NK1030), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA10A203), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB722301), 国家自然科学基金 (No. 31770106), 湖南省生物发育工程及新产品研发协同创新中心项目 (No. 20134486), 湖南省教育厅项目 (No. 10CY013) 资助。

Effect of *fcl* gene for butenyl-spinosyn biosynthesis and growth of *Saccharopolyspora pogona*

Shengnan Peng, Haocheng He, Shuangqin Yuan, Jie Rang, Shengbiao Hu, Yunjun Sun, Ziquan Yu, Weitao Huang, Yibo Hu, Xuezhi Ding, and Liqiu Xia

State Key Laboratory Breeding Base of Microbial Molecular Biology, College of Life Sciences, Hunan Normal University, State Key Laboratory of Development Biology of Freshwater Fishes, Changsha 410081, Hunan, China

Abstract: The *fcl* gene encodes GDP-fucose synthase, which catalyzes two-step differential isomerase and reductase reactions in the synthesis of GDP-L-fucose from GDP-D-mannose. It also participates in the biosynthesis of amino sugar and ribose sugar, and is one of the key enzymes to regulate the metabolism of sugar and nucleotides in organisms. The presence of *fcl* gene in *Saccharopolyspora pogona* was found through sequencing result of genome. The mutant *S. pogona-fcl* and *S. pogona-Δfcl* were constructed by gene engineering technology. The results showed that the gene had an effects on growth and development, protein expression and transcriptional level, insecticidal activity, and biosynthesis of butenyl-spinosyn of *Saccharopolyspora pogona*. The results of HPLC analysis showed that the yield of butenyl-spinosyn in *S. pogona-Δfcl* was 130% compared with that in *S. pogona*, which reduced by 25% in *S. pogona-fcl*. The results of determination of insecticidal activity showed that *S. pogona-Δfcl* had a stronger insecticidal activity against *Helicoverpa armigera* than that of *S. pogona*, while the *S. pogona-fcl* had a lower insecticidal activity against *Helicoverpa armigera* compared with *S. pogona*. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the morphology of the mycelia. It was found that the surface of the *S. pogona-Δfcl* was wrinkled, and the mycelium showed a short rod shape. There was no significant difference in mycelial morphology between *S. pogona-fcl* and *S. pogona*. Above all showed that deletion of *fcl* gene in *S. pogona* hindered the growth and development of mycelia, but was beneficial to increase the biosynthesis of butenyl-spinosyn and improve insecticidal activity. Whereas the *fcl* gene over-expression was not conducive to the biosynthesis of butenyl-spinosyn and reduced their insecticidal activity. SDS-PAGE results showed that the difference of protein expression among the three strains was most obvious at 96 hours, which was identified by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, the results showed that there were significant differences of related genes in transcriptional levels among the three strains. Based on the results of the study, a network metabolic control map was constructed to analyze the effect of *fcl* gene on growth and the regulation pathway of butenyl-spinosyn biosynthesis, which provided an experimental basis for revealing the regulation mechanism of butenyl-spinosyn biosynthesis and related follow-up studies.

Keywords: *Saccharopolyspora pogona*, butenyl-spinosyn, *fcl* gene, biosynthesis, growth and development

须糖多孢菌 *Saccharopolyspora pogona* 属于放线菌糖多孢菌家族中成员, 是一种革兰氏阳性好氧型菌^[1]。丁烯基多杀菌素 (Butenyl-spinosyn) 是由须糖多孢菌经过有氧发酵后获得的一类次级代谢产物, 其分子结构为类似于多杀菌素的大环内酯类化合物, 由丁烯基取代多杀菌素结构上的乙基而成^[2-3]。在须糖多孢菌中, 丁烯基多杀菌素的合成受到基因簇的严格调控, 包括编码合成糖苷配基、福乐糖胺、鼠李糖和使鼠李糖甲基化的 23 个基因^[4-5]。作为一种绿色、安全、高效的天然杀虫剂, 丁烯基多杀菌素的理化性质^[6-8], 生物合

成途径^[9]、发酵工艺^[10-12]及杀虫机理^[13-15]等均有研究和报道。相比于多杀菌素和其他化学农药而言, 丁烯基多杀菌素具有更广的杀虫谱和对环境更为友好等优点^[16-17]。例如, 针对多杀菌素防治效果不佳的苹果毒蛾和烟青虫, 丁烯基多杀菌素的防治效果则很好, 因而被期望用于大范围的害虫防治^[6,18]。但野生型须糖多孢菌产生丁烯基多杀菌素的含量极低, 使其在推广应用上受到极大的限制^[19-20]。因此, 通过对须糖多孢菌基因组进行定向遗传改造^[21-23], 促进对丁烯基多杀菌素的生物合成, 已成为近年研究的热点之一。

Becker 等的研究表明, 细胞质中 GDP-岩藻糖的生物合成途径主要分为从头合成途径和补救合成途径^[24]。Silvia 等研究表明, 岩藻糖与细胞间的识别和粘附有关^[25]。Zhou 等对人源的 GDP-岩藻糖合成酶 (FX 蛋白) 的研究结果表明, FX 蛋白在结构上由两个同二聚体组成, 且与大肠杆菌的 GFS 存在一定差别^[26]。Somers 等的研究表明, GFS 在发挥催化作用时结合 NADPH, 并保留 Ser-Tyr-Lys 催化三联体结构^[27]。在细菌细胞中, GDP-甘露糖主要参与两个方面的代谢过程: 一是在 GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和 GDP-岩藻糖合成酶的作用下合成 GDP-岩藻糖, 进入氨基糖和核

表 1 菌株、质粒及引物

Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study

	Related description	Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	Host for general cloning	Lab store
<i>E. coli</i> S17	Donor strains for conjugation	Lab store
<i>S. pogona</i>	The producer strains of butenyl-spinosyn	Lab store
<i>S. pogona-fcl</i>	<i>S. pogona</i> harboring pOJ260- <i>P_{ermE}-fcl</i>	This work
<i>S. pogona-Δfcl</i>	<i>S. pogona</i> harboring pOJ260- <i>fcl</i>	This work
Plasmids		
pOJ260	<i>E. coli</i> -cloning vector, containing pUC18 replicon, oriT, AprR	Lab store
pOJ260-cm- <i>P_{ermE}</i>	Containing <i>P_{ermE}</i> sequence	Lab store
pOJ260- <i>P_{ermE}-fcl</i>	<i>P_{ermE}-fcl</i> inserted into pOJ260 by <i>Hind</i> III and <i>Eco</i> R I	This work
pOJ260- <i>fcl</i>	Homologous arm inserted into pOJ260 by <i>Hind</i> III and <i>Eco</i> R I	This work
Primers		
<i>P_{ermE}</i> -F	CCCAAGCTTCTGGACTTCTAGAGCTAGCC	
<i>P_{ermE}</i> -R	GCATGCCGGTCGACTCTA	
<i>fcl</i> -F	GGTAGGATCCTCTAGAGTCGACCGGCATGCGGAGATCCTCGTGCCCT GAC	
<i>fcl</i> -R	CCGGAATTCCACTGCGATGACATCAGCGTAC	
Apr-F	AGCCCTAACGGCAAGTTTGCAAGCAGCAGATTACG	
Apr-R	GGTACTGTCCGTGCTATCCGTCGACCTGCATACTA	
<i>fcl</i> -up-F	CCGGAATTCGCACATCCAGCGAACCTG	
<i>fcl</i> -up-R	TCTGCTGCTTGCAAACCTGCCGTTAGGGCTTTCTC	
<i>fcl</i> -down -F	TGCAGGTCGACGGATAGCACGGACAGTACCCTCGTT	
<i>P_{ermE}</i> -F	CCCAAGCTTCTGGACTTCTAGAGCTAGCC	
<i>fcl</i> -down-R	ACCAAGCTTTACGCATCGGTCGCCAAAT	
16S-F	CGTCAGCTCGTGTCGTGAGA	
16S-R	GTGAAGCCCTGGGCATAAAGG	
<i>rpoE</i> -F	TGACCCAGGAGACCTTCATCC	
<i>rpoE</i> -R	CGAGGAGGGTGTCTGTTGAAGA	
<i>groEL</i> -F	GGTTCAGGTCCGCGTTCTC	
<i>groEL</i> -R	GCCACCCTGGTCGTCAACA	
<i>rpoB</i> -F	GACATTCGCCAGTGGTCGTAC	
<i>rpoB</i> -R	CTCGCAGATGATGCCCTTG	

酸糖的代谢过程二是转化为 GDP-D-鼠李糖, 进而合成丁烯基多杀菌素^[28-29]。GFS 在放线菌中也可能发挥着重要作用, 但当下对放线菌中的 GFS 研究甚少。本文利用遗传修饰技术获得 *fcl* 基因的过表达菌株和敲除菌株, 研究该基因对须糖多孢菌的生长发育和丁烯基多杀菌素的生物合成等方面产生的影响, 为促进丁烯基多杀菌素高效生物合成和构建高产工程菌株提供了新的技术途径。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究中使用的菌株、质粒及引物见表 1。

1.2 培养基

大肠杆菌 *Escherichia coli* 接种于 LB 培养基中, 37 °C 培养过夜; 须糖多孢菌 *S. pogona* 接种于种子活化培养基 (CSM) 中, 280 r/min、30 °C 培养 2 d; 接合转移实验采用 R6 培养基, 工程菌株的发酵采用半合成发酵培养基, 280 r/min、30 °C 培养 10–12 d; 产孢能力实验采用 CSM、TSB、BHI 和 R6 培养基。

1.3 *fcl* 基因重组载体的构建

1.3.1 过表达载体 pOJ260-*P_{ermE}-fcl* 的构建及鉴定

过表达载体 pOJ260-*P_{ermE}-fcl* 的构建流程如图 1A 所示。以 pOJ260-cm-*P_{ermE}* 为模板, 以引物对 *P_{ermE}-F/P_{ermE}-R* 进行 PCR 扩增, 得到 300 bp 左右的 *P_{ermE}* 基因片段。以须糖多孢菌为模板, 引物对 *fcl-F/fcl-R* 进行常规扩增, 得到约 1.5 kb 的 *fcl* 基因。然后通过重叠延伸 PCR 得到 1.8 kb 左右的

P_{ermE}-fcl 融合片段 (图 1B)。该重组质粒经过 *Hind* III/*EcoR* I 单双酶切验证, 结果表明载体 pOJ260-*P_{ermE}-fcl* 构建成功 (图 1C)。

1.3.2 敲除载体 pOJ260-*fcl* 的构建及鉴定

敲除载体 pOJ260-*fcl* 的构建流程如图 2A 所示。以须糖多孢菌为模板, 引物对 *fcl-up-F/fcl-up-R*, 常规 PCR 扩增得到约 1 kb 的 *fcl* 基因上游臂片段; 引物对 *fcl-down-F/fcl-down-R*, 常规 PCR 扩增得到约 1 kb 的 *fcl* 基因下游臂片段; 引物对 *Apr-F/Apr-R*, 常规 PCR 扩增得到约 1.5 kb 的 *aac(3) IV* (图 2B)。然后通过重叠延伸 PCR 得到 3.5 kb 左右的敲除融合片段。该重组质粒经过 *Hind* III/*EcoR* I 单双酶切验证, 结果表明敲除载体 pOJ260-*fcl* 构建成功 (图 2C)。

1.4 *fcl* 基因工程菌株的构建和鉴定

1.4.1 *fcl* 基因过表达菌株的构建和鉴定

以含目标质粒的 *E. coli* S17 作为供体菌, 以

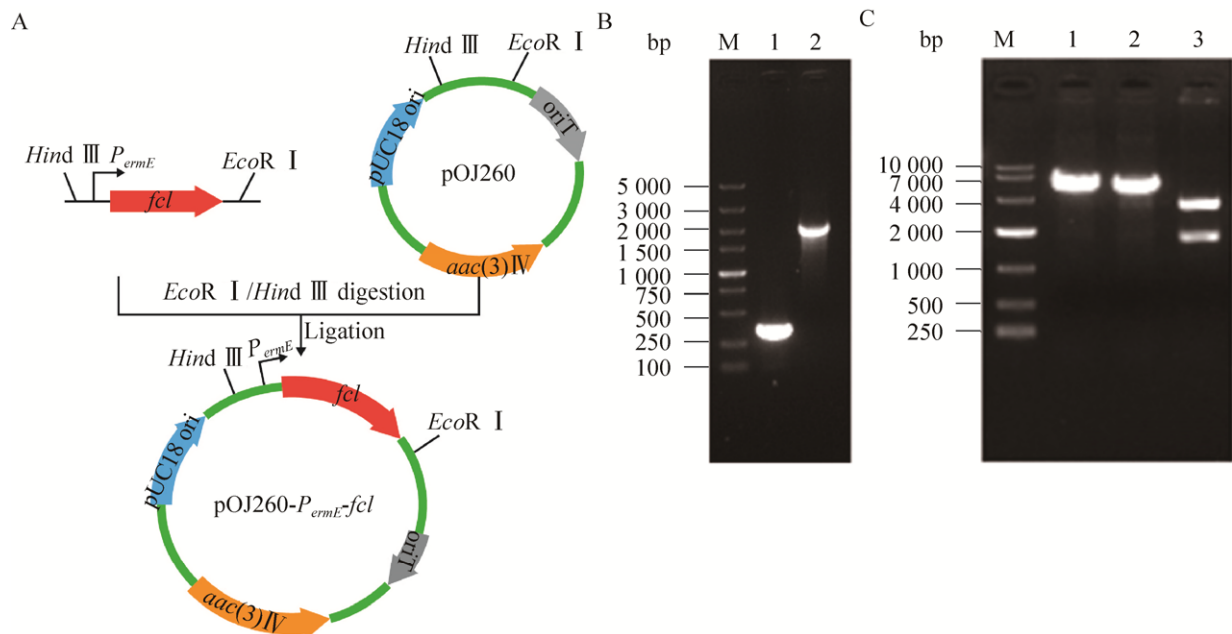


图 1 过表达载体的构建与鉴定

Fig. 1 Construction and identification of overexpression vectors. (A) The vector map of pOJ260-*P_{ermE}-fcl*. (B) *P_{ermE}* and *P_{ermE}-fcl* fragment. M: DL 5000; 1: *P_{ermE}*; 2: *P_{ermE}-fcl*. (C) Enzyme digestion of recombinant plasmid. M: DL 10000; 1: The pOJ260-*P_{ermE}-fcl* digested with *Hind* III; 2: The pOJ260-*P_{ermE}-fcl* with *EcoR* I; 3: The pOJ260-*P_{ermE}-fcl* with *Hind* III/*EcoR* I.

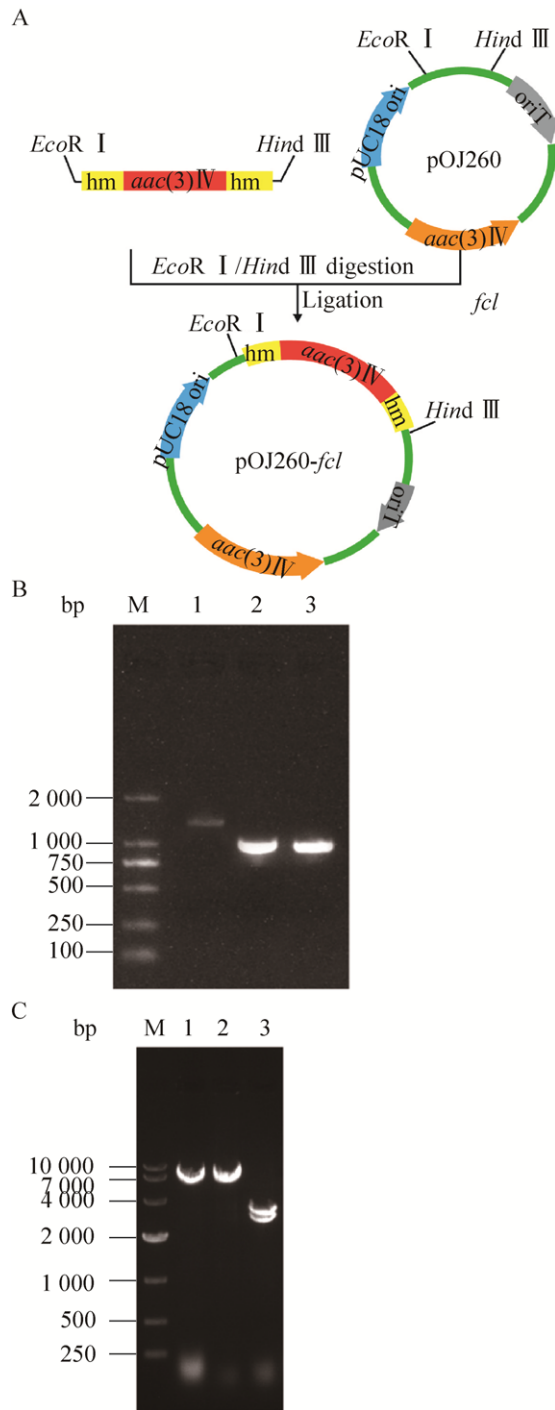


图2 *fcl* 基因敲除载体的构建与鉴定

Fig. 2 Construction and identification of knockout vectors. (A) The vector map of pOJ260-*fcl*. (B) *aac(3)IV* gene and homologous arm fragments of *fcl* gene. M: DL 2000; 1: *aac(3)IV*; 2: *fcl*-up; 3: *fcl*-down. (C) Enzyme digestion of pOJ260-*fcl*. M: DL 10 000; 1: the pOJ260-*fcl* digested with *Hind* III; 2: the pOJ260-*fcl* digested with *EcoR* I; 3: the pOJ260-*fcl* digested with *Hind* III/*EcoR* I.

须糖多孢菌 *S. pogona* 作为受体菌,进行属间接转移,根据同源重组原理将重组质粒整合到须糖多孢菌基因组上。提取 *S. pogona* 和 *S. pogona-fcl* 基因组作为模板,以引物对 *P_{ermE}-F/fcl-R* PCR 扩增大小为约 1.8 kb 的 *P_{ermE}-fcl* 融合片段;以引物对 *Apr-F/Apr-R* PCR 扩增 *aac(3)IV* 片段。结果表明,过表达菌株 *S. pogona-fcl* 构建成功(图3)。

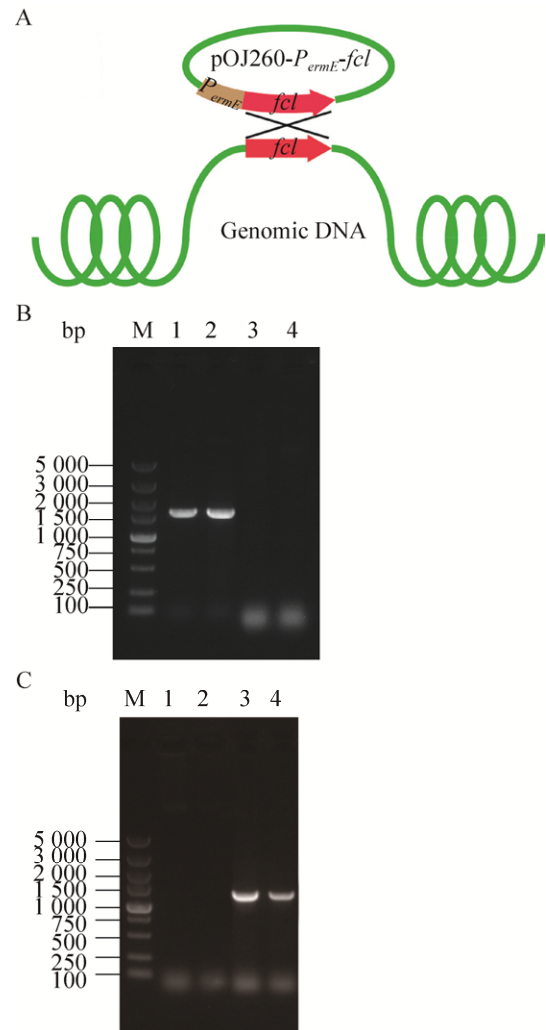


图3 *fcl* 基因过表达菌株的构建及 PCR 鉴定

Fig. 3 Construction and PCR identification of *S. pogona-fcl*. (A) Schematic diagram of *S. pogona-fcl*. (B) *P_{ermE}-fcl*. M: DL 5000; 1,2: *S. pogona-fcl* genome; 3,4: *S. pogona* genome. (C) *aac(3)IV*. M: DL 5000; 1,2: *S. pogona* genome; 3,4: *S. pogona-fcl* genome.

1.4.2 *fcl* 基因敲除菌株的构建和鉴定

以含重组质粒的 *E. coli* S17 作为供体菌, 以须糖多孢菌 *S. pogona* 作为受体菌, 进行属间接合转移试验, 根据同源重组原理将质粒整合至须糖多孢菌基因组上。提取 *S. pogona* 和 *S. pogona-Δfcl* 基因组作为模板, 以引物对 *fcl*-F/*fcl*-R 扩增长度约为 1.5 kb 的 *fcl* 基因, 以引物对 Apr-F/Apr-R PCR 扩增 *aac(3)IV* 基因片段。结果表明, 成功获得敲除菌株 *S. pogona-Δfcl* (图 4)。

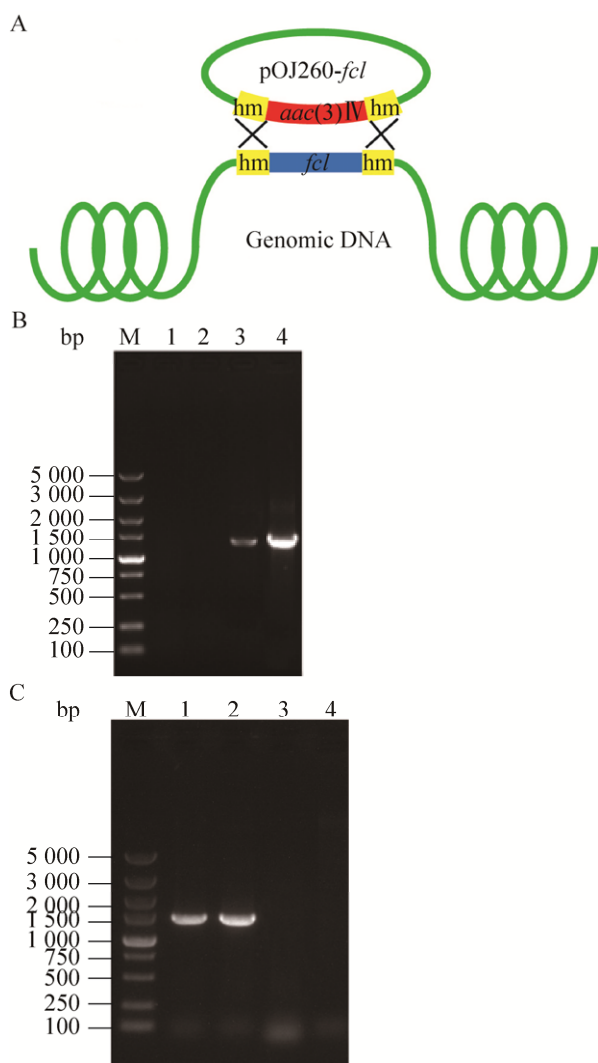


图 4 *fcl* 基因敲除菌株的构建及 PCR 验证

Fig. 4 Construction and PCR identification of *S. pogona-Δfcl*. (A) Schematic diagram of *S. pogona-Δfcl*. (B) *fcl* gene. M: DL 5000; 1: *S. pogona-Δfcl* genome; 2: *S. pogona* genome. (C) *aac(3)IV*. M: DL 5000. 1, 2: *S. pogona-Δfcl* genome. 3, 4: *S. pogona* genome.

1.5 *fcl* 基因对菌株生长发育及菌丝体形态特征的影响

生长曲线测定: 以半合成发酵培养基为空白对照, 每 12 h 测定培养基中 OD_{600} 值, 按稀释倍数计算各瓶培养基中的实际 OD_{600} 值。实验重复 3 次, 绘制生长曲线。

产孢能力和菌丝体形态的观察: 取 100 μ L 野生型菌株和工程菌株 *S. pogona-fcl*、*S. pogona-Δfcl* 菌液分别涂布于 BHI、CSM、TSB 以及 R6 培养基固体平板中间区域。每 24 h 观察不同平板上孢子的产生情况并记录。同时各取 1 mL 培养 96 h 的发酵液, 超纯水灭菌后清洗菌体沉淀 15 次以上, 在液氮中固定, 低温、真空条件下镀金, 利用日立 SU8010 冷场扫描电子显微镜观察。此外, 对菌体沉淀加入戊二醛溶液进行固定, 用不同浓度的乙醇溶液进行梯度脱水, 低温下镀金, 利用日立 SU8010 超高分辨率扫描电子显微镜进行菌丝体形态观察。

1.6 *fcl* 基因对菌株发酵液杀虫活性的影响

各取 1 mL 三株菌发酵 10 d 的发酵液, 分别与 20 mL 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 饲料进行混匀后倒入 24 孔板中, 待凝固后, 每个孔内放置 1 条生长状态相同的棉铃虫, 置于 26–28 $^{\circ}$ C 恒温培养 6 d, 期间每 24 h 观察并记录棉铃虫存活数。

1.7 *fcl* 基因对菌株丁烯基多杀菌素生物合成产量的影响

超声破碎细胞法对第 10 天的发酵液 (等体积乙酸乙酯萃取) 进行破碎, 经真空冷冻浓缩完全冻干等处理后, 加入 50 μ L 甲醇溶解沉淀。利用 Agilent 1290 超高效液相色谱仪 (UHPLC) 检测丁烯基多杀菌素含量, 检测条件如文献[3]所述, 并收集目的峰进行质谱鉴定。

1.8 *fcl* 基因对须糖多孢菌菌体蛋白的影响

参照文献[10]进行菌株第 2、4、6、8、10 天

蛋白的提取,经 SDS-PAGE 检测发现第 4 天蛋白差异最大。

1.9 转录水平的 qRT-PCR 测定

利用 Trizol 试剂提取菌株 *S. pogona*、*S. pogona-fcl*、*S. pogona-Δfcl* 的 RNA。分别以野生型菌株及工程菌株第 4 天的反转录 cDNA 作为模板,16S RNA 作为内参,利用 7500 实时荧光定量 PCR 系统仪器(Applied Biosystems, USA),对基因 *rpoE*、*groEL*、*rpoB* 进行转录水平验证。

2 结果与分析

2.1 *fcl* 基因对须糖多孢菌生长发育的影响

为确定 *fcl* 基因对须糖多孢菌生长的影响,利用分光光度计每 12 h 对发酵液 OD_{600} 进行测定。结果发现,直至 72 h 时,过表达菌株 *S. pogona-fcl* 的生长变化与野生型菌株 *S. pogona* 基本一致;野生型菌株从 96 h 开始进入稳定期,过表达菌株从 84 h 开始进入稳定期;相较于野生型菌株而言,*S. pogona-fcl* 的 OD_{600} 值略有降低,但与 *S. pogona* 生长趋势基本一致;两株菌株均于 156 h 进入衰退期,216 h 衰退稳定。敲除菌株 *S. pogona-Δfcl* 生长缓慢,108 h 进入稳定期,132 h 进入衰退期,228 h 衰退稳定, OD_{600} 值明显下降。说明 *fcl* 基因的敲除抑制了须糖多孢菌的生长,使细胞密度下降;该基因过表达后,菌株细胞密度与野生型菌株基本一致(图 5)。

2.2 *fcl* 基因对须糖多孢菌体形态和产孢能力的影响

为研究 *fcl* 基因对菌体形态的影响,利用超高分辨率扫描电镜和冷场扫描电镜对发酵 96 h 的野生型菌株 *S. pogona*、过表达菌株 *S. pogona-fcl* 与敲除菌株 *S. pogona-Δfcl* 的菌丝体形态进行观察。结果表明,*S. pogona-fcl* 与野生型菌株菌丝体表面光滑无褶皱,分支较多;*S. pogona-Δfcl* 菌丝表面褶皱明显,菌丝体呈现短棒状;说明 *fcl* 的过表达对菌体生长无明显影响,敲除后对菌丝体的生长发育具有抑制作用(图 6、7)。

为研究 *fcl* 对须糖多孢菌在不同固体培养基上产孢能力的影响,分别观察野生型菌株和工程菌株在 4 种培养基上的产孢情况。结果发现,3 株菌株均从第 48 h 开始产生孢子;120 h 时,

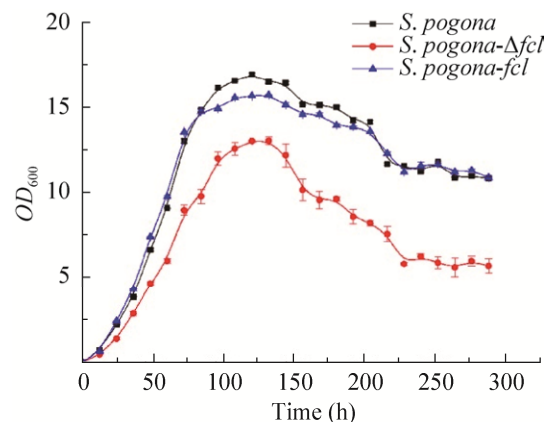


图 5 *fcl* 基因工程菌株的生长曲线

Fig. 5 Growth curve of *fcl* gene engineered strains.

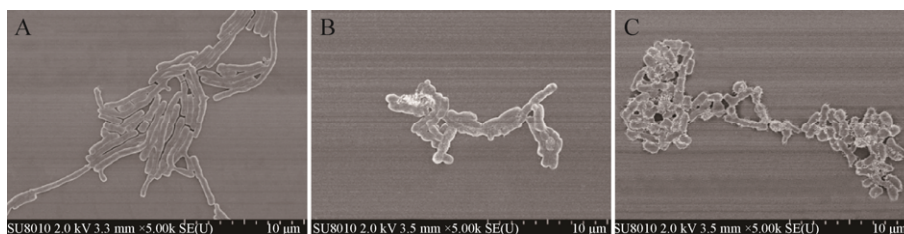


图 6 *fcl* 基因工程菌株超高分辨场扫描电子显微镜观察

Fig. 6 Scanning electron microscopy observation of *fcl* gene engineered strains. (A) *S. pogona*. (B) *S. pogona-fcl*. (C) *S. pogona-Δfcl*.

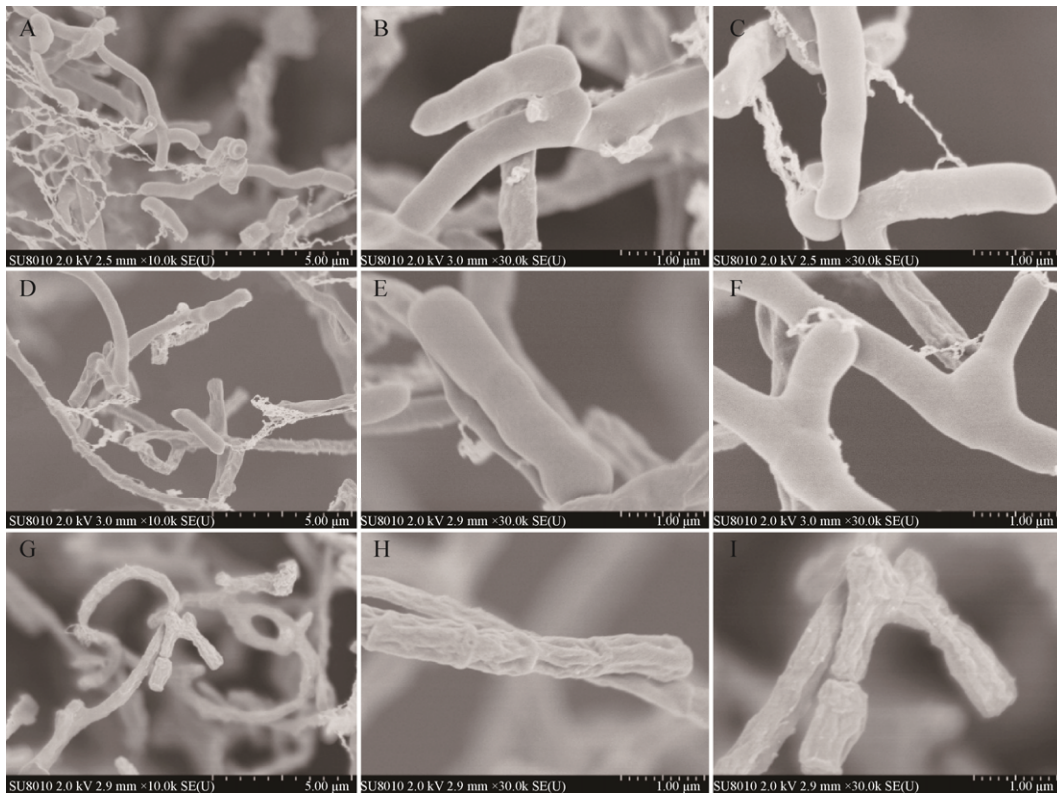


图 7 *fcl* 基因工程菌株冷场扫描电子显微镜观察

Fig. 7 Observation of *fcl* gene engineered strains by scanning electron microscope. (A–C). *S. pogona*. (D–F) *S. pogona-fcl*. (G–I) *S. pogona-Δfcl*.

S. pogona-fcl 和野生型菌株在 CSM 和 TSB 培养基上的产孢能力最强；*S. pogona-Δfcl* 在 R6 培养基上的产孢能力最弱，三菌株在 BHI 培养基上产孢能力相同。三菌株自身在 4 种培养基上产孢能力也存在差异，由强到弱依次为 CSM、TSB、BHI、R6。可能是由于培养基营养成分的不同，从而导致须糖多孢菌同一菌株在上述 4 种培养基中的产孢能力出现明显差异 (图 8)。

2.3 *fcl* 基因对丁烯基多杀菌素产量影响的比较

为确定 *fcl* 基因对丁烯基多杀菌素生物合成的影响，利用 HPLC 分析野生型菌株 *S. pogona*、过表达菌株 *S. pogona-fcl* 以及敲除菌株 *S. pogona-Δfcl* 发酵液中丁烯基多杀菌素的产量。利用质谱对 13 min 的色谱峰进行鉴定，结果发现该时间点的色谱峰含有分子量为 189.1 的

三甲基鼠李糖碎片峰 (图 9)，证明该物质是丁烯基多杀菌素组分^[30]。HPLC 结果显示，*S. pogona* 在保留时间为 13 min 处的丁烯基多杀菌素峰面积为 606.2 mAU。*S. pogona-fcl* 在该时间段的峰面积为 455.4 mAU，丁烯基多杀菌素的产量降低为野生型菌株的 75%。*S. pogona-Δfcl* 在该段时间内的峰面积为 786 mAU，丁烯基多杀菌素的产量提高至野生型菌株的 130% (图 10)。表明 *fcl* 基因的敲除能促使丁烯基多杀菌素产量的提高，过表达使产量降低。

2.4 *fcl* 基因对菌株发酵液杀虫活性的影响

为研究 *fcl* 基因工程菌株发酵液对棉铃虫 *H. armigera* 杀虫活性的影响，利用三菌株第 10 天的发酵液对棉铃虫进行生物杀虫活性测定。结果显示，与野生型菌株相比，*S. pogona-fcl* 的杀虫活性最弱，半致死时间较野生型菌株推迟约 0.7 d。

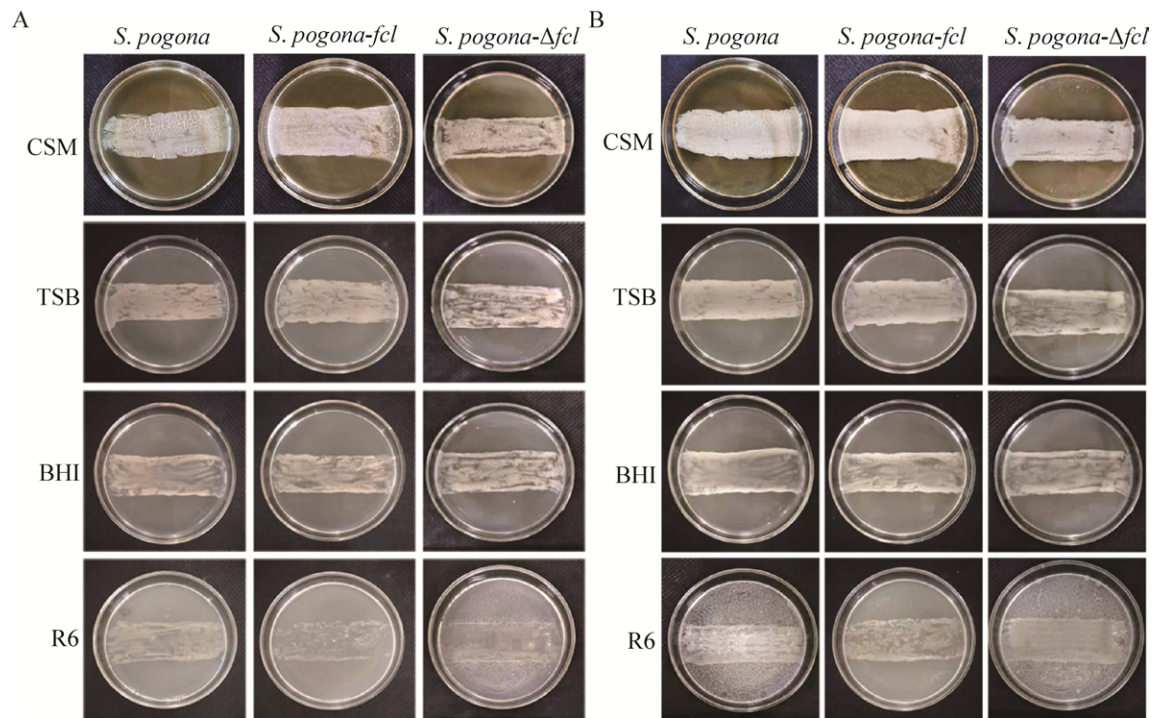


图 8 *fcl* 基因工程菌株在固体培养基上产孢能力比较

Fig. 8 Comparison of sporulation ability of *fcl* gene engineered strains on solid media. (A) Sporulation ability at 48 h. (B) Sporulation ability at 120 h.

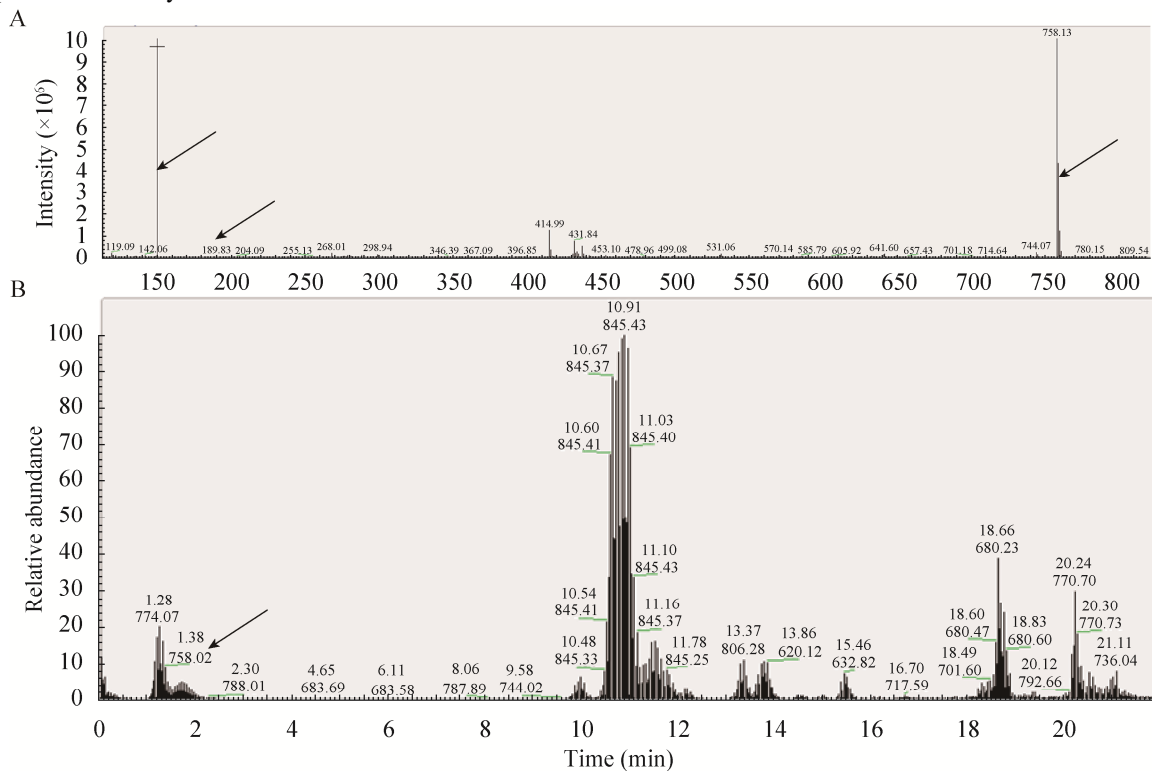


图 9 *fcl* 基因工程菌株丁烯基多杀菌素的质谱鉴定

Fig. 9 MS identification of butenyl-spinosyn from *fcl* gene engineered strain. (A) Determined by LC-MS. (B) Determined by LC-MS/MS.

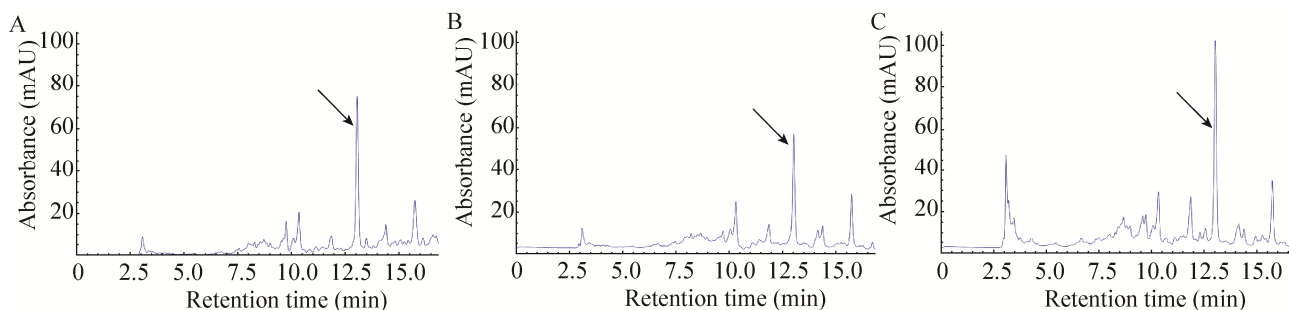


图 10 *fcl* 基因工程菌株丁烯基多杀菌素产量的比较分析

Fig. 10 The butenyl-spinosyn yield analysis of *fcl* gene engineered strains. (A) *S. pogona*. (B) *S. pogona-fcl*. (C) *S. pogona-Δfcl*.

S. pogona-Δfcl 发酵液的杀虫活性明显增强,半数致死时间较野生型菌株提前约 0.6 d (表 2)。以上结果表明, *fcl* 基因的敲除有利于菌株杀虫活性的增强,过表达后杀虫活性减弱 (图 11)。

2.5 *fcl* 基因工程菌株蛋白 SDS-PAGE 分析及差异蛋白鉴定

为研究 *fcl* 基因对须糖多孢菌蛋白表达的影响,利用 SDS-PAGE 分析野生型菌株 *S. pogona*、敲除菌株 *S. pogona-Δfcl* 和过表达菌株 *S. pogona-*

fcl 蛋白,结果发现第 4 天的菌株蛋白差异最大。第 4 天时, *S. pogona-fcl* 中蛋白条带 A、B 和 C 表达量降低; *S. pogona-Δfcl* 中蛋白条带 A 和 C 表达量明显升高,蛋白条带 B 表达量降低 (图 12)。将差异蛋白条带胶内酶解后进行质谱鉴定,发现它们分别为 35 kDa 的 ECF 亚家族 RNA 聚合酶 σ -24 亚基 (RopE)、57 kDa 的分子伴侣 (GroEL) 以及 144 kDa 的 DNA 指导的 RNA 聚合酶亚基 β (RopB)。利用在线蛋白分析软件 Uniprot 和

表 2 *fcl* 基因工程菌株对棉铃虫杀虫活性的测定

Table 2 Insecticidal activity of *fcl* gene engineered strains against *H. armigera*

Strain	Slope	Relative coefficient (R^2)	LT ₅₀ value (d)	95% confidence interval
<i>S. pogona</i>	9.571 4	0.979 3	4.346	4.005–4.741
<i>S. pogona-fcl</i>	9.400 0	0.990 3	5.069	4.710–5.529
<i>S. pogona-Δfcl</i>	9.629 0	0.981 5	3.690	3.370–4.018

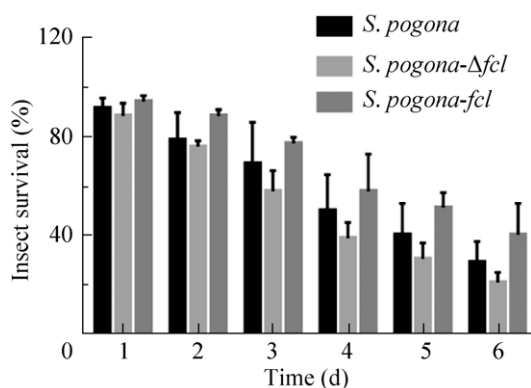


图 11 *fcl* 基因工程菌株对棉铃虫杀虫变化柱状图

Fig. 11 Insecticidal changing histogram of *fcl* gene engineered strains against *H. armigera*.

KEGG 等对其进行功能分析 (表 3)。

2.6 转录水平的 qRT-PCR 测定

为了对差异蛋白的表达量进行验证,利用荧光定量 PCR(qRT-PCR)对其转录水平进行测定。结果发现,第 4 天时,敲除菌株 *S. pogona-Δfcl* 中 *rpoB* 和 *rpoE* 转录水平相对于野生型菌株分别上调 5.422、2.189 倍; *groEL* 的转录水平下调为野生型菌株的 1.828 倍。过表达菌株 *S. pogona-fcl* 中, *rpoB*、*rpoE* 及 *groEL* 的转录水平相对于野生型菌株分别下调 4.329、1.529、2.336 倍 (图 13),证实了这些基因在转录水平和蛋白表达水平变化趋势一致。

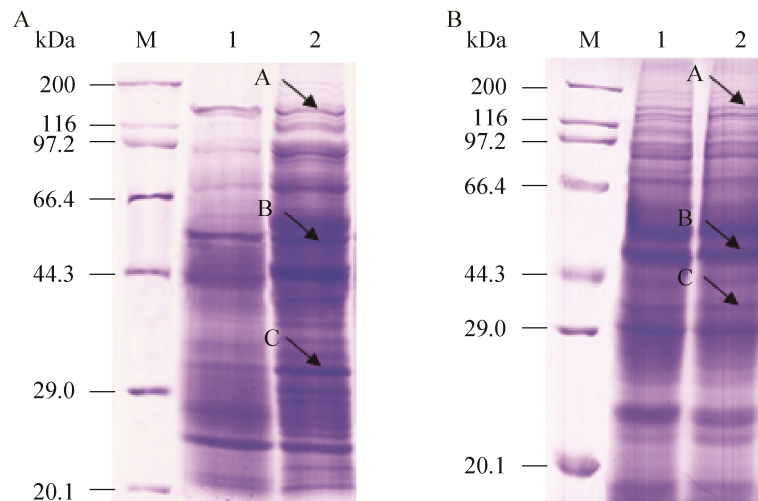


图 12 *fcl* 基因工程菌株蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 12 SDS-PAGE analysis of the protein of *fcl* gene engineered strains. M: protein marker. (A) *S. pogona* and *S. pogona-fcl* for 4 d. 1: *S. pogona-fcl*; 2: *S. pogona*. (B) *S. pogona* and *S. pogona-Δfcl* for 4 d. 1: *S. pogona*; 2: *S. pogona-Δfcl*.

表 3 *fcl* 基因工程菌株差异蛋白的质谱鉴定

Table 3 MS identification of differential proteins of *fcl* gene engineered strains

Number	Protein	Gene	M _w (kDa)	Function
A	ECF subfamily RNA polymerase sigma-24 subunit	<i>rpoE</i>	35	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates.
B	Molecular chaperonin	<i>groEL</i>	57	Prevents misfolding and promotes the refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions.
C	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>rpoB</i>	144	DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription of DNA into RNA using the four ribonucleoside triphosphates as substrates.

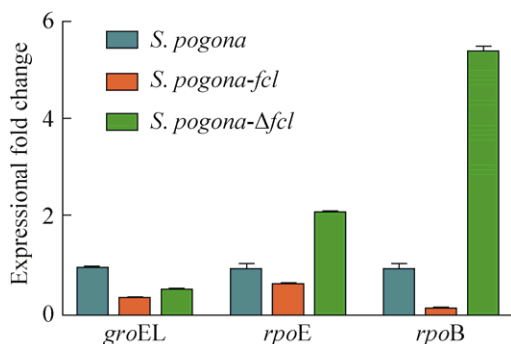


图 13 *fcl* 基因工程菌株中基因转录水平的 qRT-PCR 检测

Fig. 13 qRT-PCR detection of gene transcription level in *fcl* gene engineered strains.

3 结论

fcl 基因编码的 GDP-岩藻糖合成酶在氨基糖和核酸糖的代谢中起着至关重要的作用，是影响链霉菌生长发育的重要调控基因。丁烯基多杀菌素的推广应用受到野生型菌株产量低的限制，如何提高丁烯基多杀菌素的产量是当前亟待解决的问题。通过对须糖多孢菌基因进行基因工程改造后获得 *fcl* 基因的过表达菌株 *S. pogona-fcl* 和敲除菌株 *S. pogona-Δfcl*。

已有关于 *fcl* 基因及其编码 GDP-岩藻糖合成

酶的研究表明, 细胞的 *fcl* 基因具有重要调控作用。Mabeau 等通过从海带和褐藻小叶海胆等多种生物体的细胞壁中分离出岩藻糖后发现, 岩藻糖有助于增强细胞壁的稳定性的^[31]。Beatriz 等在盘基网柄菌中的研究结果表明, 当 HL250 菌株不能将 GDP-甘露糖转化为 GDP-岩藻糖时, 作为孢子外壳的一组蛋白质的糖基化受阻, 使得孢子外壳的完整性被破坏, 导致孢子的产生和萌发受到抑制^[32]。此外, 还有研究报道岩藻糖具有促进细胞抗病毒和抗氧化等功能^[33-34]。本研究发现 *fcl* 基因的敲除对须糖多孢菌的生长发育和产孢能力都有一定的抑制作用。与同一培养时间点的野生型菌株相比, *S. pogona-Δfcl* 的细胞密度减小, 菌株在 R6 培养基上产孢能力最弱; 但对 *fcl* 基因进行过表达后, *S. pogona-fcl* 的细胞密度无明显变化, 在 CSM 和 TSB 培养基上产孢能力与野生型菌株相同, 均表现为最强。Black 等的研究表明, 岩藻糖有助于防止细胞发生脱水^[35]。本研究中, *S. pogona-fcl* 菌丝体形态与野生型菌株一致, *S. pogona-Δfcl* 的菌丝体变短, 表面出现皱缩。结合相关研究报道及本文研究结果表明, *fcl* 基因对须糖多孢菌的生长发育具有关键调控作用。

Michela 等的研究表明, 在草履虫小球藻病毒中, GDP-甘露糖能够在 GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和 GDP-4-酮基-6-脱氧-D-甘露糖差向异构酶/还原酶的催化作用下被转化为 GDP-鼠李糖^[36]。多杀菌素的生物前体是 dTDP-鼠李糖, 包括 d(A、T、C、G) DP-鼠李糖 4 种。通过 KEGG 代谢通路分析可知, GDP 可以转化为 dGDP, 因而 GDP-鼠李糖也是参与丁烯基多杀菌素合成代谢的重要物质, 能够促进丁烯基多杀菌素的生物合成。利用 LC-MS 对 3 个差异蛋白 RNA 聚合酶亚基 β、ECF 亚家族 RNA 聚合酶 σ-24 亚单位以及分子伴侣进行鉴定, 运用 KEGG、Uniprot 和 NCBI 等软件对差异蛋白进行了功能分析。分析结果显示, *rpoB*

基因编码 DNA 指导的 RNA 聚合酶亚基 β 和 *rpoE* 编码 ECF 亚家族 RNA 聚合酶 σ-24 亚单位在 RNA 的生物合成中发挥重要的作用, RNA 作为模板大量翻译出与丁烯基多杀菌素生物合成的酶及其他相关蛋白。*groEL* 基因编码分子伴侣可以通过影响氮代谢途径中核糖体蛋白因子, 进而影响蛋白质的翻译和组装, 并且参与 RNA 的降解过程。实验结果表明, 与野生型菌株相比, *S. pogona-Δfcl* 丁烯基多杀菌素的产量增加为野生型菌株的 130%; *S. pogona-fcl* 丁烯基多杀菌素的产量下降到野生型菌株的 75%。*S. pogona-Δfcl* 中 *rpoB*、*rpoE* 以及 *groEL* 基因的转录水平表现为上调, 虽然 *groEL* 基因的转录水平也出现一定的下调, 但由于其下调倍数较小, 对于细胞中 RNA 的整体含量而言没有较大影响, 因而丁烯基多杀菌素的产量因前体物质和相关酶类含量的增多而得到增加, 对棉铃虫的杀虫活性相应显著提高。*S. pogona-fcl* 中 *rpoB* 和 *rpoE* 以及 *groEL* 基因的转录水平均表现为下调, 丁烯基多杀菌素的产量因前体物质和相关酶类含量的减少而降低, 对棉铃虫的杀虫活性相应降低。

综上所述, *fcl* 基因可以通过影响丁烯基多杀菌素的前体物质和 RNA 的合成过程、细胞脱水以及细胞壁的稳定性的等方面, 影响到菌丝体的生长发育、形态变化以及丁烯基多杀菌素的生物合成。通过对须糖多孢菌中 GDP-岩藻糖合成酶编码基因 *fcl* 进行敲除和过表达, 观察野生型菌株与工程菌株在表型和丁烯基多杀菌素生物合成之间存在的差异。结果表明 *fcl* 基因不仅在须糖多孢菌生长发育中发挥重要作用, 而且与次级代谢产物丁烯基多杀菌素的生物合成密切相关, 依据上述基础构建出了 *fcl* 基因参与的代谢调控网络图 (图 14), 为后续如何进一步促进须糖多孢菌丁烯基多杀菌素的生物合成和提高产量提供了重要基础。

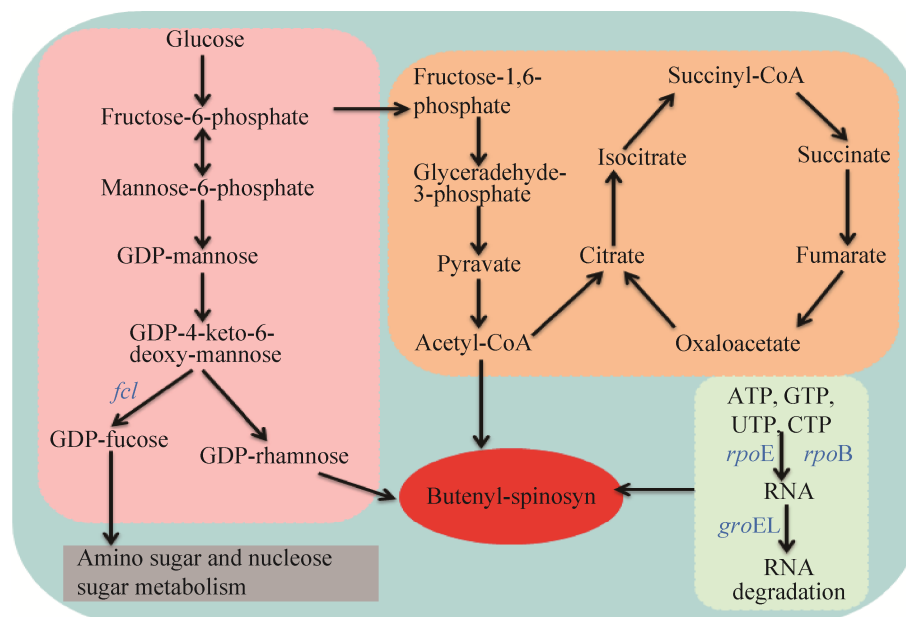


图 14 须糖多孢菌中 *fcl* 基因的代谢调控网络图

Fig. 14 Metabolic regulatory network map of *fcl* gene in *S. pogona*.

REFERENCES

- [1] Lewer P, Hahn DR, Karr LL, et al. Discovery of the butenyl-spinosyn insecticides: novel macrolides from the new bacterial strain *Saccharopolyspora pogona*. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(12): 4185–4196.
- [2] Hahn DR, Gustafson G, Waldron C, et al. Butenyl-spinosyns, a natural example of genetic engineering of antibiotic biosynthetic genes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33(2): 94–104.
- [3] Li L, Jie R, He HC, et al. Impact on strain growth and butenyl-spinosyn biosynthesis by overexpression of polynucleotide phosphorylase gene in *Saccharopolyspora pogona*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(18): 8011–8021.
- [4] Kim HJ, White-Phillip JA, Ogasawara Y, et al. Biosynthesis of spinosyn in *saccharopolyspora spinosa*: synthesis of permethylated rhamnose and characterization of the functions of *Spn H*, *Spn I*, and *Spn K*. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(9): 2901–2903.
- [5] Hahn DR, Jackson JD, Bullard BS, et al. Biosynthetic genes for butenyl-spinosyn insecticide production: EP1414969. 2002-03-28.
- [6] Shou JL, Qiu JP. A new type of biological pesticide—butenyl-spinosyns. *Agrochemicals*, 2011, 50(4): 239–243, 272 (in Chinese).
寿佳丽, 裘娟萍. 新型生物农药-丁烯基多杀菌素. *农药*, 2011, 50(4): 239–243, 272.
- [7] Crouse GD, Hahn DR, Graupner PR, et al. Synthetic derivatives of 21-butenyl and related spinosyns: US, 6919464. 2005-07-19.
- [8] Daeuble J, Sparks TC, Johnson P, et al. Modification of the butenyl-spinosyns utilizing cross-metathesis. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(12): 4197–4205.
- [9] Pan HX, Li JA, He NJ, et al. Improvement of spinosad production by overexpression of *gtt* and *gdh* controlled by promoter *P_{ermE}** in *Saccharopolyspora spinosa* SIPI-A2090. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(4): 733–739.
- [10] Luo YS, Ding XZ, Xia LQ, et al. Comparative proteomic analysis of *Saccharopolyspora spinosa* SP06081 and PR2 strains reveals the differentially expressed proteins correlated with the increase of spinosad yield. *Proteome Sci*, 2011, 9: 40.
- [11] Yang GJ, He YP, Jiang Y, et al. A new medium for improving spinosad production by *Saccharopolyspora spinosa*. *Jundishapur J Microbiol*, 2016, 9(6): e16765.
- [12] Zhao FL, Zhang CB, Yin J, et al. Coupling of spinosad fermentation and separation process via two-step macroporous resin adsorption method. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 176(8): 2144–2156.
- [13] Baxter SW, Chen M, Dawson A, et al. Mis-spliced transcripts of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ are associated with field evolved spinosad resistance in

- Plutella xylostella* (L.). PLoS Genet, 2010, 6(1): e1000802.
- [14] Watson GB. Actions of insecticidal spinosyns on γ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. Pesticide Biochem Physiol, 2001, 71(1): 20–28.
- [15] Orr N, Shaffner AJ, Richey K, et al. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. Pesticide Biochem Physiol, 2009, 95(1): 1–5.
- [16] Benincasa C, Perri E, Iannotta N, et al. LC/ESI-MS/MS method for the identification and quantification of spinosad residues in olive oils. Food Chem, 2011, 125(3): 1116–1120.
- [17] Young DL, Mihaliak CA, West SD, et al. Determination of spinosad and its metabolites in food and environmental matrices. 3. Immunoassay methods. J Agric Food Chem, 2000, 48(11): 5146–5153.
- [18] Millar NS, Denholm I. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. Invert Neurosci, 2007, 7(1): 53–66.
- [19] Weiss A, Dripps JE, Funderburk J. Assessment of implementation and sustainability of integrated pest management programs. Fla Entomol, 2009, 92(1): 24–28.
- [20] Bielza P, Quinto V, Contreras J, et al. Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouses of south-eastern Spain. Pest Manag Sci, 2007, 63(7): 682–687.
- [21] Song CY, Luan J, Cui QW, et al. Enhanced heterologous spinosad production from a 79-kb synthetic Multioperon assembly. ACS Synth Biol, 2019, 8(1): 137–147.
- [22] Tan GY, Deng KH, Liu XH, et al. Heterologous biosynthesis of spinosad: an omics-guided large polyketide synthase gene cluster reconstitution in *Streptomyces*. ACS Synth Biol, 2017, 6(6): 995–1005.
- [23] Tang Y, Xia LQ, Ding XZ, et al. Duplication of partial spinosyn biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora spinosa* enhances spinosyn production. FEMS Microbiol Lett, 2011, 325(1): 22–29.
- [24] Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. Glycobiology, 2003, 13(7): 41R–53R.
- [25] Sanz S, Bandini G, Ospina D, et al. Biosynthesis of GDP-fucose and other sugar nucleotides in the blood stages of *Plasmodium falciparum*. J Biol Chem, 2013, 288(23): 16506–16517.
- [26] Zhou H, Sun LH, Li J, et al. The crystal structure of human GDP-L-fucose synthase. Acta Biochim Biophys Sin, 2013, 45(9): 720–725.
- [27] Somers WS, Stahl ML, Sullivan FX. GDP-fucose synthetase from *Escherichia coli*: structure of a unique member of the short-chain dehydrogenase/reductase family that catalyzes two distinct reactions at the same active site. Structure, 1998, 6(12): 1601–1612.
- [28] Sullivan FX, Kumar R, Kriz R, et al. Molecular Cloning of human GDP-mannose 4, 6-dehydratase and reconstitution of GDP-fucose biosynthesis *in Vitro*. J Biol Chem, 1998, 273(14): 8193–8202.
- [29] Mäki M, Järvinen N, Rabinä J, et al. Functional expression of *Pseudomonas aeruginosa* GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose reductase which synthesizes GDP-rhamnose. Eur J Biochem, 2010, 269(2): 593–601.
- [30] Licon-Cassani C, Lim S, Marcellin E, et al. Temporal dynamics of the *Saccharopolyspora erythraea* phosphoproteome. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(5): 1219–1230.
- [31] Mabeau S, Kloareg B, Joseleau JP. Fractionation and analysis of fucans from brown algae. Phytochemistry, 1990, 29(8): 2441–2445.
- [32] Gonzalez YB, Mandell RB, Girard M, et al. The spore coat of a fucosylation mutant in *Dictyostelium discoideum*. Dev Biol, 1989, 133(2): 576–587.
- [33] Fitton JH, Irhimeh M, Falk N. Macroalgal fucoidan extracts: a new opportunity for marine cosmetics. Cosmet Toilet, 2007, 122(8): 55–56, 58, 60–62, 64.
- [34] Lapshina LA, Reunov AV, Nagorskaya VP, et al. Inhibitory effect of fucoidan from brown alga *Fucus evanescens* on the spread of infection induced by tobacco mosaic virus in tobacco leaves of two cultivars. Russ J Plant Physiol, 2006, 53(2): 246–251.
- [35] Black WAP, Dewar ET, Woodward FN. Manufacture of algal chemicals. IV-Laboratory-scale isolation of fucoidin from brown marine algae. J Sci Food Agric, 1952, 3(3): 122–129.
- [36] Tonetti M, Zanardi D, Gurnon JR, et al. *Paramecium bursaria Chlorella* virus 1 encodes two enzymes involved in the biosynthesis of GDP-L-fucose and GDP-D-rhamnose. J Biol Chem, 2003, 278(24): 21559–21565.

(本文责编 郝丽芳)