

研究报告

卡西霉素生物合成调控基因 *calR2* 的功能盖婧璇¹ 韩铁生^{2*} 刘文秀¹ 武策¹ 汪志军³ 苟丽霞^{1*}

(1. 华北理工大学生命科学院 河北 唐山 063210)

(2. 华北理工大学公共卫生学院 河北省煤矿卫生与安全重点实验室 河北 唐山 063210)

(3. 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)

摘要:【背景】卡西霉素(Calcimycin)是由链霉菌 NRRL3882 产生的吡咯聚醚类抗生素, 结构独特且具有广泛的生物活性, 但其生物合成调控机制尚不清楚。【目的】研究卡西霉素生物合成基因簇上编码 LuxR 家族同源蛋白的潜在调控基因 *calR2* 的功能。【方法】通过 PCR-targeting 的方法对卡西霉素基因簇上的 *calR2* 基因进行中断, HPLC 对突变株及回补菌株的代谢产物进行分析。利用荧光定量 RT-PCR 分析 $\Delta calR2$ 突变菌株和野生菌株的基因转录水平差异。【结果】*calR2* 基因中断的突变株不能产生卡西霉素, 回补菌株则恢复产生卡西霉素的能力。RT-PCR 结果表明卡西霉素生物合成的一些重要骨架基因在 $\Delta calR2$ 突变株中的转录水平明显降低。【结论】LuxR 家族转录调控基因 *calR2* 在卡西霉素生物合成过程中起正调控作用。

关键词: 卡西霉素, LuxR 家族, 调控基因, 生物合成

Function of the regulatory gene *calR2* involved in calcimycin biosynthesis

GE Jing-Xuan¹ HAN Tie-Sheng^{2*} LIU Wen-Xiu¹ WU Ce¹ WANG Zhi-Jun³
GOU Li-Xia^{1*}

(1. School of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

(2. Hebei Province Key Laboratory of Occupational Health and Safety for Coal Industry, School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

(3. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: **[Background]** Calcimycin is a structural unique pyrrole polyether antibiotic produced by *Streptomyces chartreusis* NRRL3882, and exhibits multiple biological effects, but the regulatory mechanism of calcimycin biosynthesis remains unclear. **[Objective]** To study on the function of the

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31700083); Natural Science Foundation of Hebei Province (C2015209051)

*Corresponding authors: Tel: 86-315-8805566

E-mail: HAN Tie-Sheng: ts_han@163.com; GOU Li-Xia: lixia_gou@163.com

Received: February 09, 2018; **Accepted:** April 20, 2018; **Published online** (www.cnki.net): May 09, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31700083); 河北省自然科学基金(C2015209051)

*通信作者: Tel: 86-315-8805566

E-mail: 韩铁生: ts_han@163.com; 苟丽霞: lixia_gou@163.com

收稿日期: 2018-02-09; 接受日期: 2018-04-20; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-05-09

potential regulatory gene *calR2* encoding LuxR family homologous protein in calcimycin biosynthesis gene cluster. **[Methods]** The *calR2* gene on calcimycin biosynthesis gene cluster was disrupted by PCR-targeting, and metabolites of the Δ *calR2* mutant and complementation strain were analyzed by HPLC. The calcimycin biosynthesis gene expression levels of Δ *calR2* mutant compared with the wild-type strain was analyzed by RT-qPCR. **[Results]** HPLC analysis of the fermentation products showed that the Δ *calR2* mutant could not produce calcimycin and the complementation strain restored the production of calcimycin. Gene expression analysis showed that the transcription levels of some essential genes in calcimycin biosynthesis obviously declined in Δ *calR2* mutant. **[Conclusion]** The putative LuxR family homologous protein CalR2 acts as a positive regulator involved in calcimycin biosynthesis.

Keywords: Calcimycin, LuxR family, Regulatory gene, Biosynthesis

卡西霉素 (Calcimycin) 是由教酒链霉菌 *Streptomyces chartreusis* NRRL3882 产生的聚醚类抗生素, 化学结构包括吡咯环、螺旋环及含有取代基团的苯并噁唑环^[1](图 1A)。卡西霉素独特的分子结构赋予其多样的生物活性, 最显著的特点是能特异螯合二价阳离子, 被广泛应用于增加细胞内游离二价金属离子浓度等细胞生物属性的研究中^[2]。此外, 卡西霉素还具有抑菌活性, 而且是哺乳动物细胞氧化磷酸化的解偶联剂及 ATP 酶的抑制剂, 近几年研究表明其具有诱导哺乳动物精子顶体反应、辅助卵子激活等功能^[3-4]。鉴于卡西霉素具有广泛的生物活性, 而目前市场上销售的卡西霉素及其衍生物

主要以化学及半化学合成为主, 成本较高, 因此在了解卡西霉素生物合成途径基础上, 提高卡西霉素产生菌的产素水平具有重要的实际应用价值。

前期工作中, 我们已从教酒链霉菌 NRRL3882 总 DNA 中获得了卡西霉素的生物合成基因簇(图 1B), 鉴定了卡西霉素生物合成基因簇中部分结构基因的功能。通过对基因簇上的 *calB1* 及 *calB3* 基因进行敲除, 以及突变株体外喂养实验证实这 2 个基因参与苯并噁唑环结构单元的前体物 3-羟基邻氨基苯甲酸的生物合成^[5]。对后修饰基因 *calM* 进行体内体外功能研究, 证实 *calM* 负责苯并噁唑环上的 N-甲基转移功能^[6]。对 *calD* 基因进行敲除、回补及

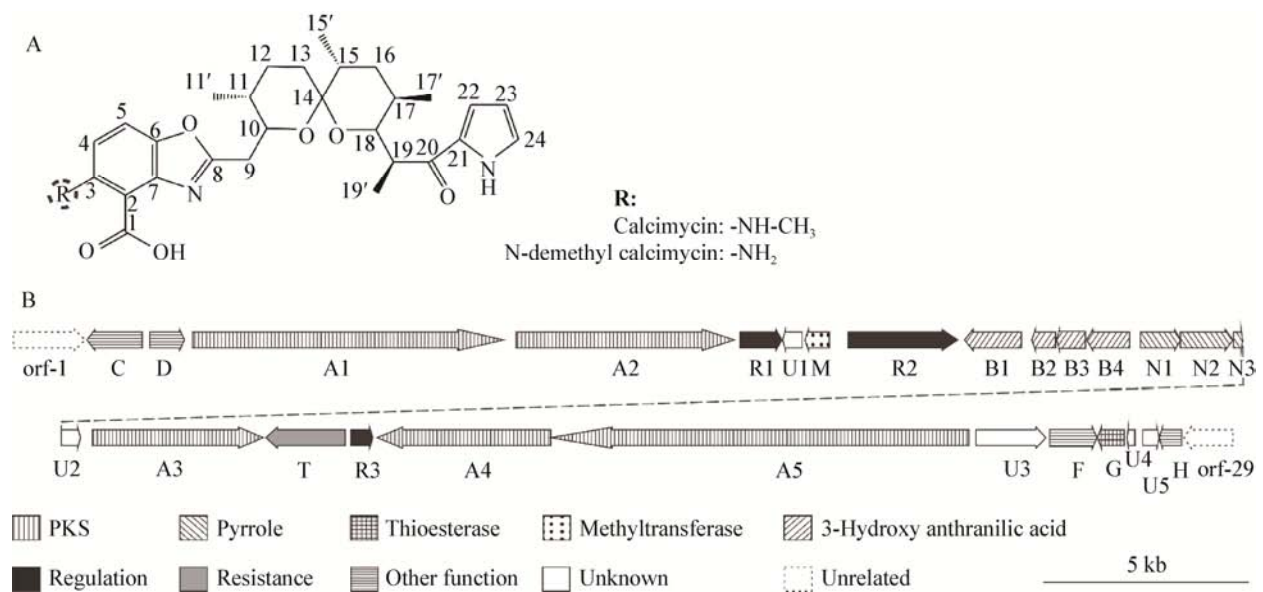


图 1 卡西霉素化学结构(A)及生物合成基因簇(B)

Figure 1 Structure (A) and biosynthetic gene cluster (B) of calcimycin

突变株代谢产物分析表明其参与苯并噁唑环结构单元 3 位羟基上的氧化反应^[7]。本研究在此基础上,进一步对卡西霉素生物合成基因簇上的调控基因进行功能研究,揭示调控基因对 Calcimycin 产量的影响。

根据 NCBI 提供的检索引擎,对卡西霉素基因簇上的基因序列进行比对分析,发现卡西霉素生物合成基因簇上共有 3 个可能的转录调控基因:*calR1* (TylR 家族)、*calR2* (LuxR 家族)和 *calR3* (TetR 家族)。近期通过体内遗传学实验及体外反应已证实 *calR3* 在卡西霉素的生物合成中起负调控作用^[8]。本研究选取 *calR2* 为研究对象,生物信息学比对分析发现 CalR2 蛋白属于 LuxR 家族同源蛋白,N 端具有 ATP 结合位点,C 端具有保守的螺旋-转角-螺旋 DNA 结合结构域。随着基因组测序技术的迅速发展,在许多细菌中都发现了 LuxR 家族同源蛋白,但大部分该类蛋白的功能尚未见报道。我们通过对 *calR2* 基因进行中断、回补,对突变菌株及回补菌株的代谢产物及突变菌株和野生菌株的基因转录水平进行比较分析,揭示了 *calR2* 基因对 Calcimycin 生物合成的影响,为 Calcimycin 生物合成调控网络的研究

提供了基础,为利用分子生物技术手段从基因水平上对 Calcimycin 产生菌进行定向遗传育种以提高抗生素产量提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

实验所用的菌株和质粒见表 1, *Escherichia coli* BW25113/pIJ790 用于基因中断, ET12567/pUZ8002 用于大肠杆菌与链霉菌两亲本接合转移, pJTU2170 由 pIB139 衍生而来(用氨基霉素和卡那霉素抗性基因取代阿泊拉霉素抗性基因),用于突变菌株的回补。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB (Luria-Bertani)培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 5.0, pH 7.0; LA 培养基: 在 LB 培养基中加入琼脂粉,使其终浓度为 1.5%, LA 及 LB 培养基用于大肠杆菌的培养; SFM 固体培养基^[6]用于酿酒链霉菌孢子收集及接合转移; SFM 液体培养基^[6]用于酿酒链霉菌的发酵; TSBY 液体培养基^[6]用于链霉菌总 DNA 及 RNA 的提取。

rTaq, TaKaRa 公司; KOD plus, TOYOBO 公司;限制性内切酶, New England Biolabs 公司; DNA

表 1 本研究所用到的菌株和质粒及其特性

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strain or plasmid	特征 Characteristics	来源 Reference or source
Strains		
<i>Streptomyces chartreusis</i> strains		
NRRL3882	Calcimycin producer, wild type	NRRL
GLX25 (<i>ΔcalR2</i>)	<i>calR2</i> -deletion mutant	This work
GLX28 (<i>ΔcalR2:calR2</i>)	<i>ΔcalR2</i> complementation strain	This work
<i>Escherichia coli</i> strains		
DH10B	F ⁻ <i>recA lacZ ΔM15</i>	Invitrogen
ET12567(pUZ8002)	CmL, Kan, <i>dam dcm hsdS</i> Tra ⁺ CmL	[9]
Plasmids		
pJTU2170	<i>aac(3)IV, lacZ, rep^{pu}, attΦC31, oriT</i>	[10]
p16F9	CmL	[1]
pJTU3790	p16F9 derived plasmid carrying an apramycin resistance gene and a defective <i>calR2</i>	This work
pJTU2170-R2	pJTU2170 derived plasmid carrying <i>calR2</i> for expression in <i>Streptomyces</i>	This work

胶回收试剂盒、RNA 提取试剂盒、FastQuant RT Kit 及 SuperReal qPCR PreMix (SYBR Green)试剂盒, 天根生化科技有限公司; 卡那霉素(50 mg/mL)、氨基糖苷类(100 mg/mL)、氯霉素(25 mg/mL)、阿泊拉霉素(30 mg/mL)及乙酸乙酯, 天津润泰生物公司; 卡西霉素标准品及甲醇, Sigma-Aldrich 公司。HPLC、LC/MS 及 ZORBAX SB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm), 安捷伦科技有限公司; ScanDrop200, 德国耶拿分析仪器股份公司; ABI7900HT, 美国应用生物系统公司。

1.2 方法

1.2.1 *calR2* 基因的生物信息学分析

CalR2 的结构域及其功能预测采用 NCBI 的 CDD 工具^[11]; 同源序列比对采用 Clustal Omega 工具^[12], 比对后将各同源蛋白相关同源区域的保守氨基酸标记在下方。

1.2.2 *calR2* 基因中断突变菌株的构建

通过 PCR-targeting 的方法, 选用从 pIJ773 载体中双酶切(*Hind* III 和 *Eco*R I)并回收的含有 Apramycin 抗性基因及 *oriT* 的片段为模板设计引物 R2-F1 和 R2-F2 (表 2), 扩增用于替换 *calR2* 基因的 PCR cassette 序列。将 PCR 扩增回收的片段, 利用 BW25113/pIJ790 的重组系统与携带有 *calR2* 基因的柯斯质粒 p16F9, 通过同源臂交换获得含有 Apramycin 抗性基因及 *oriT* 且同时 *calR2* 基因中断的重组质粒 pJTU3790, 最后将含有重组质粒 pJTU3790 的 ET12567/pUZ8002 与野生型酿酒链霉菌 NRRL3882 进行两亲本接合转移, 30 °C、220 r/min 培养 16 h 后用阿泊拉霉素及萘啶酮酸进行覆盖, 继续培养 4 d 后筛选具有阿泊拉霉素抗性的接合转移子, 将筛选的接合子扩大培养后提取基因组 DNA, 利用验证引物 R2-F3 和 R2-F4 (表 2)对其进行 PCR 验证。

1.2.3 *calR2* 基因回补菌株的构建

使用高保真 KOD-plus 聚合酶, 以酿酒链霉菌 NRRL3882 的总 DNA 为模板, 使用引物 R2-F5 和 R2-F6 (表 2)扩增完整的 *calR2* 基因, 通过 *Eco*R I

及 *Nde* I 双酶切后克隆到由 pIB139 衍生来的携带有红霉素强启动子的整合型载体 pJTU2170 (氨基糖苷类和卡那霉素抗性)上, 获得回补质粒 pJTU2170-R2。然后通过接合转移的方法将回补质粒引入到 *calR2* 基因缺失的突变株中, 进一步利用卡那霉素抗性筛选回补菌株, 并通过引物 PCR 验证回补菌株的正确性。

1.2.4 菌株发酵及代谢产物分析

将 20% 甘油保存的野生菌株、突变菌株及回补菌株的孢子按 1:1 000 的比例接种于 TSBY 培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 3 d, 之后将种子液按 1:50 的比例转接于 100 mL 液体 SFM 培养基中扩大培养, 30 °C、220 r/min 发酵培养 7 d。用 2 倍体积的乙酸乙酯对所得发酵液进行萃取, 之后 4 000 r/min 常温离心 5 min, 将所得上清液进行旋转蒸发, 所得沉淀物用 1 mL 甲醇溶液进行溶解, 过滤后用于 HPLC 或 LC/MS 检测分析。使用 Agilent 1100 System 及 ZORBAX SB-C18 分析柱对样品进行检测。流动相 A 相选用含有 0.1% 的三氟乙酸(TFA)的水溶液, B 相为甲醇(70%–100%), 流速为 0.3 mL/min, 检测波长为 280 nm。

1.2.5 链霉菌总 RNA 的提取和反转录

将野生菌株及突变菌株在 TSBY 培养基中 30 °C、220 r/min 培养 4 d, 分别吸取 1 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 1min 弃上清, 然后按照 RNA 提取试剂盒操作说明提取 RNA, 并根据说明书用 DNase I 对所获得 RNA 进行去除基因组 DNA 处理, 最后用 ScanDrop200 及琼脂糖凝胶对所得 RNA 的浓度和质量进行检测, 并设计引物 RT16S-F1 及 RT16S-F2 (表 2)扩增 16S rRNA 基因作为内参基因来检测 DNA 是否消化完全。确认所得 RNA 没有 DNA 残留后, 根据 FastQuant RT Kit 操作说明书, 将 RNA (2 μg)反转录为 cDNA。

1.2.6 野生菌株与突变菌株中卡西霉素生物合成相关基因转录水平检测

采用荧光定量 PCR (Real-Time PCR)比较野生菌株及突变菌株的 Calcimycin 生物合成相关基因的

表 2 本研究所用 PCR 引物

Table 2 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Primers sequence (5'→3')	用途 Usage
R2-F1	GTGACGCATCGGCCTTCGGCCCAGGAGCGCGGGTGTGCGATTCCGGGGATCCGTCGACC	Disruption of <i>calR2</i>
R2-F2	CGTCCGTTCCGCGGTCTCTGCGGGCATCGGCCGCGCCCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
R2-F3	CGCCGACTGCCTTTCCG	Confirmation of <i>calR2</i>
R2-F4	CGATGAGCCGTCCTCCGTC	disruption in <i>AcalR2</i> mutant
R2-F5	GGAGTTCCATATGTTGGAACGTCGGGGGACGCACA	Complementation of
R2-F6	CCGGAATTCAGGAGATACTCGCCGACATCGTCAGA	GLX25 (<i>ΔcalR2</i>)
RT16S-F1	CTCCTCAGCGTCAGTATCGGC	internal reference
RT16S-F2	CGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAG	
RTA1-F1	ACCCGACCGCCAGGAGATT	<i>calA1</i> RT-PCR
RTA1-F2	CAGCAGACGCCCCAAGGAG	
RTR1-F1	TGGACGAGGTGCTGCACGAT	<i>calR1</i> RT-PCR
RTR1-F2	TGGATCAGCCCGTGGAGGTA	
RTM-F1	ACCCTATGAACAGCCTGCCG	<i>calM</i> RT-PCR
RTM-F2	CGTCTACACCAAGGATCTGGAGC	
RTR2-F1	GTTCTCCTCCCTCAGCGAACTG	<i>calR2</i> RT-PCR
RTR2-F2	AGTACCGCAGCCGCCGTA	
RTB4-F1	CGTCGTGTACTTCTGCCTACCT	<i>calB4</i> RT-PCR
RTB4-F2	TCCAGTGCGCCGTTCTGTC	
RTN1-F1	CGTTCACCGACTGCCACGT	<i>calN1</i> RT-PCR
RTN1-F2	GCTCCATCAACCCGAGGTAGAC	
RTU2-F1	GACGCGGGCAAGATCAACAC	<i>calU2</i> RT-PCR
RTU2-F2	CCCAGAAAGGAAGTCCAGGT	
RTA3-F1	ACACCCAGTGCACCTCCTCGAT	<i>calA3</i> RT-PCR
RTA3-F2	TCGGCAACGACATGACGCAG	
RTR3-F1	CGAGCATCCGGGGAAGATCA	<i>calR3</i> RT-PCR
RTR3-F2	TCGATCGTCGTCGCCTCGTA	
RTA5-F1	TGTCGGGGAAGTCGTATGTGC	<i>calA5</i> RT-PCR
RTA5-F2	ATCGCCAACGCCTCACGC	
RTU3-F1	CAGTCCCAGCCATCTGCTGAT	<i>calU3</i> RT-PCR
RTU3-F2	GCTTCGCCAGTCGTACAGA	
RTG-F1	GTGCGTGGTCGACGAGGAAGAAGT	<i>calG</i> RT-PCR
RTG-F2	AAGGCGAGCCATGACGAGGTAC	

转录水平差异,以反转录的 cDNA 为模板,16S rRNA 基因为内参,根据公式 $\Delta\Delta C_t = (C_t \text{ 目标基因} - C_t \text{ 内参基因})_{\text{样品组}} - (C_t \text{ 目标基因} - C_t \text{ 内参基因})_{\text{参照组}}$,对 C_t 值进行比较,计算出目标基因的相对变化量。根据基因簇上基因的功能及位置,随机筛选了 12 个基因检测其在突变株中的转录水平较野生菌株对应基因的转录差

异,目标基因及内参基因引物见表 2。Real-time PCR 反应根据 SuperReal qPCR PreMix (SYBR Green) 试剂盒配制 20 μL 反应体系:80 ng 模板 cDNA,300 nmol/L 引物;10 μL SuperReal SYBR Green PreMix,参照试剂盒说明书的两步法进行:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。

2 结果与分析

2.1 CalR2 的生物信息学分析

通过 NCBI 的 BLASTp 序列比对分析表明 CalR2 属于 LAL (Large ATP-binding regulators of the LuxR family) 转录调控家族, 该家族为 LuxR 转录调控家族的一个分支。CalR2 由 1 040 个氨基酸组成, 与麦芽糖操纵子调控蛋白 MalT 家族有较高的一致性(一致性约为 29%, 图 2A)。通过与其它链霉菌来源的 LAL 家族蛋白序列进行比对分析表明, CalR2 的 N 端具有该家族的 ATP/GTP 结合结构域 Walker A 和 Walker B, C 端具有 LuxR 家族典型的 HTH (helix-turn-helix) DNA 结合结构域(图 2B, 保守氨基酸如图底所示), 说明 CalR2 对卡西霉素的生物合成起调节作用。

2.2 *calR2* 基因中断突变菌株与回补菌株的构建

为了确定 *calR2* 基因在卡西霉素生物合成中的功能, 通过 PCR 介导的 REDIRECT^R Technology 技术对卡西霉素产生菌染色体上的 *calR2* 基因进行中

断, 通过同源臂交换构建 *calR2* 基因被阿泊拉霉素抗性基因置换的重组质粒 pJTU3790 (图 3A)。通过两亲本接合转移将 pJTU3790 导入酿酒链霉菌 NRRL3882 中, 通过同源重组构建 *calR2* 基因中断突变菌株。提取野生菌株及突变菌株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增验证, 野生菌株的 PCR 片段大小为 987 bp, 对应的突变株 GLX25 ($\Delta calR2$) 的扩增片段大小为 1 568 bp (图 3B), 说明突变菌株 GLX25 为 *calR2* 基因中断的双交换突变株。

将构建的含有完整 *calR2* 基因的整合型回补质粒 pJTU2170-R2 通过接合转移的方法导入到突变菌株 GLX25 ($\Delta calR2$) 中获得回补菌株 GLX28 ($\Delta calR2:calR2$), 所得回补菌株则应同时含有被阿泊拉霉素抗性基因片段中断的 *calR2* 基因及整合型回补质粒 pJTU2170-R2 携带的完整 *calR2* 基因, 因此以回补菌株 GLX28 所提取的 DNA 为模板, PCR 扩增验证得到两条带, 包括 1 568 bp 大小的重组条带及 987 bp 的野生条带(图 3C)。

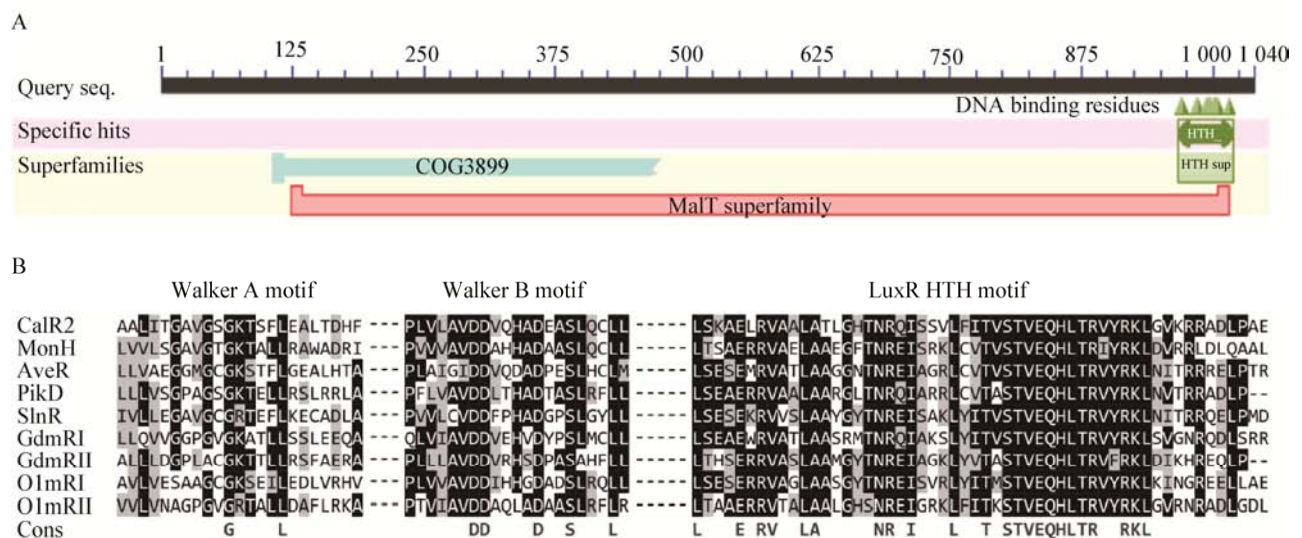


图 2 LAL 家族 CalR2 蛋白序列同源比对

Figure 2 *In silico* analysis of LAL regulator CalR2

注: A: CalR2 结构域预测; B: CalR2 与其它 LAL 家族蛋白的保守结构域同源比对。Walker A、B: NTP 结合基序; HTH: LuxR 家族 HTH-DNA 结合结构域。MonH 来源于 *S. cinnamonensis*; AveR 来源于 *S. avermitilis* K139; PikD 来源于 *S. venezuelae*; SlnR 来源于 *S. albus* XM211; GdmRI 和 GdmRII 来源于 *S. hygroscopicus* 17997; OlmRI 和 OlmRII 来源于 *S. avermitilis*。

Note: A: Conserved functional domain prediction of CalR2; B: Alignment of the conserved motifs of CalR2 with other LAL regulators from various *Streptomyces*. Walker A, B: NTP binding motifs; HTH: Lux R-family HTH DNA-binding domains. MonH from *S. cinnamonensis*; AveR from *S. avermitilis* K139; PikD from *S. venezuelae*; SlnR from *S. albus* XM211; GdmRI and GdmRII from *S. hygroscopicus* 17997; OlmRI and OlmRII from *S. avermitilis*.

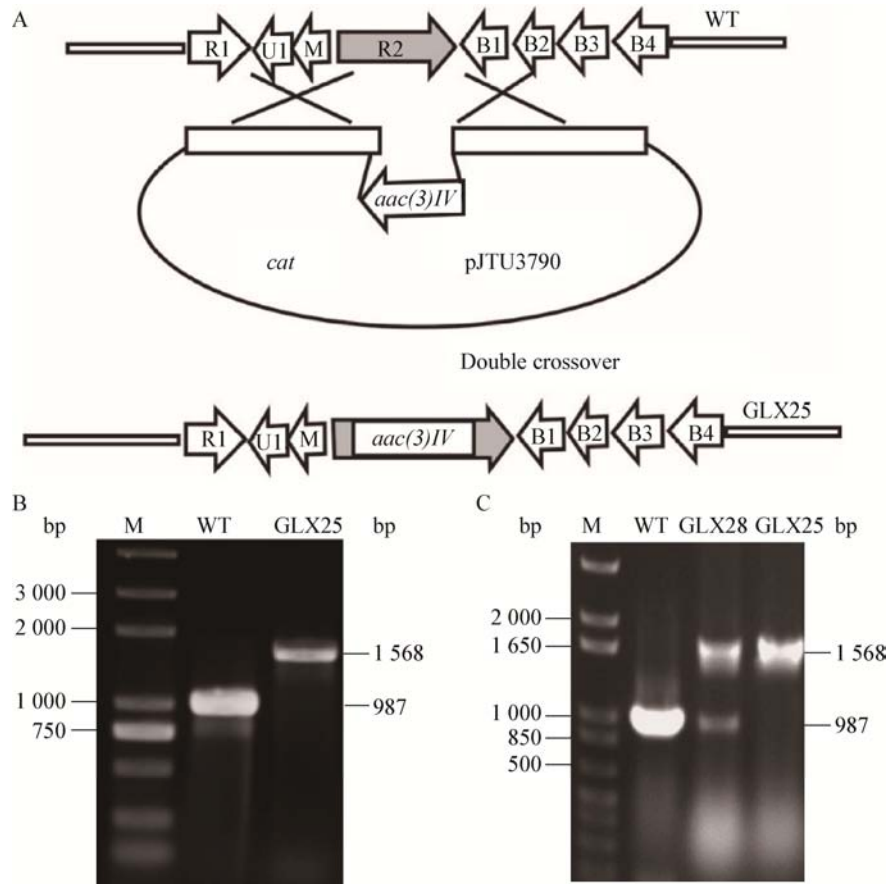


图3 *calR2* 基因中断突变菌株的构建及验证

Figure 3 Construction and verification of the *calR2* disruption mutant

注: A: 通过基因置换构建 *calR2* 基因被阿泊拉霉素抗性基因置换的 *calR2* 基因中断突变菌株 GLX25; B: *calR2* 基因中断突变株 GLX25 的 PCR 验证; C: *calR2* 基因回补菌株 GLX28 的 PCR 验证。

Note: A: A scheme showing the disruption of *calR2* by the apramycin resistance gene cassette *aac(3)IV* to generate the mutant GLX25; B: The $\Delta calR2$ mutant GLX25 was confirmed by PCR amplification; C: The *calR2* gene complementation strain GLX28 was confirmed by PCR amplification.

2.3 野生菌株、突变菌株 GLX25 与回补菌株 GLX28 的代谢产物分析

将野生菌株、突变菌株 GLX25 与回补菌株 GLX28 摇瓶发酵培养 7 d, 用乙酸乙酯对发酵液进行初步萃取, 用 HPLC 对代谢产物进行分析。用卡西霉素标准品为阳性对照, HPLC 结果显示(图 4), *calR2* 基因中断的突变菌株 GLX25 丧失产生卡西霉素的能力, 暗示 *calR2* 基因在卡西霉素的生物合成过程中起正调控的功能。对突变株 GLX25 进行 *calR2* 基因回补后, 回补菌株 GLX28 恢复产生卡西霉素的能力(约为野生型产量的 78%), 进一步

说明 *calR2* 基因在卡西霉素生物合成中的正调控作用。

2.4 *calR2* 中断突变株与野生菌株中卡西霉素生物合成相关基因转录水平分析

为了分析 *calR2* 基因对卡西霉素生物合成基因簇上基因的转录水平影响, 提取处于平台期早期(96 h)^[8]的突变菌株及野生菌株的总 RNA, 根据基因功能及位置不同, 选择了 12 个基因(*calA1*、*calR1*、*calM*、*calR2*、*calB4*、*calN1*、*calU2*、*calA3*、*calT*、*calR3*、*calA5* 及 *calG*), 测定其在突变菌株中相对于野生菌株的转录差异。结果如图 5 所示, 突变菌株

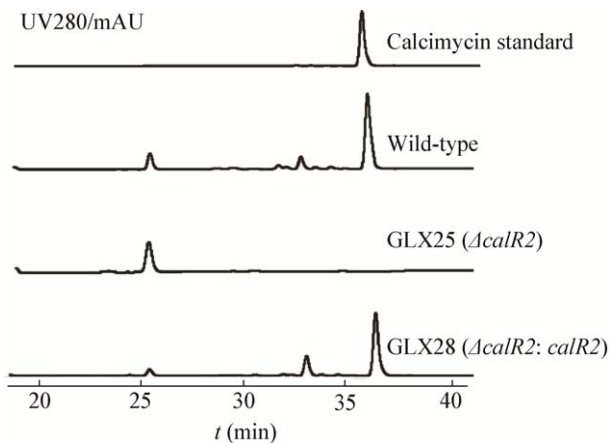


图 4 HPLC 分析野生菌株、*calR2* 基因中断突变株 GLX25 及回补菌株 GLX28 的代谢产物

Figure 4 HPLC analysis of the fermentation extracts of wild-type, GLX25 ($\Delta calR2$) and GLX28 ($\Delta calR2: calR2$)

注: 卡西霉素(Calcimycin)标准品做参照。

Note: Calcimycin standard as control.

内与卡西霉素结构单元螺旋环合成相关的 *calA1*、*calA3* 及 *calA5* 基因, 苯并噁唑环结构单元合成相关的 *calB4* 基因, 后修饰基因 *calM* 及抗性基因 *calT* 的转录水平显著降低, 未知功能基因 *calU2* 以及 *calR2* 基因自身的转录水平也略有下降。相比之下, 调控基因 *calR1*、*calR3* 和吡咯环结构单元合成相关基因 *calN1* 及功能未知的 II 型硫酯酶基因 *calG* 的转录水平较野生菌株相比变化不明显。这些重要骨架基因转录水平的显著降低与突变菌株 GLX25 中卡西霉素产生能力的丧失相一致, 进一步说明 *calR2*

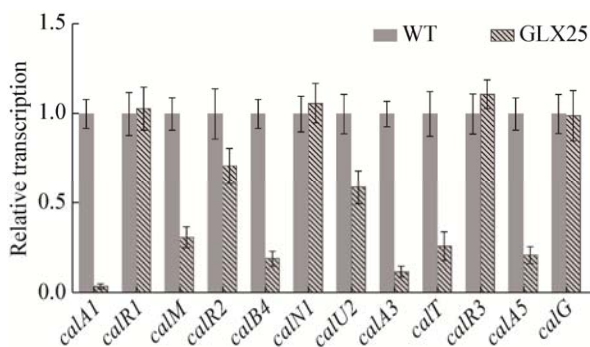


图 5 野生型菌株与 GLX25 ($\Delta calR2$) 的卡西霉素生物合成相关基因转录水平差异检测

Figure 5 The transcriptional difference detection between the wild type NRRL 3882 and the *calR2* disrupted strain GLX25

在卡西霉素生物合成过程中起正调控作用。

3 讨论与结论

LuxR 家族蛋白是一类起着重要生理功能的转录调控蛋白, 广泛存在于多种细菌中, 主要参与细菌的群体感应机制、细菌的毒力因子调控及微生物次级代谢产物的调控等多种生物学功能^[13-15]。生物信息学分析表明 *CalR2* 的 C 端具有 LuxR 家族典型的 HTH DNA 结合结构域, 暗示其可能具有 LuxR 家族成员相似的转录调控功能。LuxR 家族蛋白作为正调控因子调控抗生素的生物合成已在其它链霉菌中被证实, 例如将 *S. cinnamonensis* 菌株的 LuxR 家族同源基因 *monH* 敲除后, 突变菌株失去产生莫能霉素(Monensin)的能力^[16]; 同样, 将 *S. avermitilis* 菌株的 LuxR 家族同源基因 *olmR1* 及 *olmR2* 敲除后, 突变株不再产生寡霉素(Oligomycin)^[17]。

本研究通过 PCR-targeting 的方法, 构建了 *calR2* 中断的突变菌株 GLX25, HPLC 分析结果显示 *calR2* 基因中断的突变株丧失产生卡西霉素的能力, 通过体内基因回补构建的回补菌株 GLX28 恢复产生卡西霉素的能力; 荧光定量 RT-PCR 实验也证实 *calR2* 基因中断的突变菌株中, 卡西霉素合成相关的结构基因转录水平显著降低。这说明 *CalR2* 在卡西霉素生物合成中起正调控作用。

LuxR 家族蛋白普遍接受某种信号分子作为配体, 通过与配体结合改变蛋白构象, 调节其结合 DNA 的强度, 进而调控下游基因的表达。典型例子如 *Vibrio fischeri* 的 LuxR 蛋白能够与高丝氨酸内酯(AHL)结合, 激活下游基因表达^[18], 以及 *Streptomyces coelicolor* 中的 ScbR 蛋白与链霉菌群体感应分子 γ -丁酸内酯(GBL)结合调控抗生素基因表达等^[19]。*CalR2* 蛋白的中间区域功能尚属未知, 可能含有与信号分子结合的功能域, 因此进一步筛选 *CalR2* 的配体分子, 并测定其 DNA 识别位点等, 对进一步阐明 *CalR2* 的调控功能及卡西霉素的调控网络, 并最终确定提高抗生素产量的生物合成调控策略将有重要意义。

REFERENCES

- [1] Wu QL, Liang JD, Lin SJ, et al. Characterization of the biosynthesis gene cluster for the pyrrole polyether antibiotic calcimycin (A23187) in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(3): 974-982
- [2] Reed PW. Effects of divalent cation ionophore A23187 on potassium permeability of rat erythrocytes[J]. Journal of Biological Chemistry, 1976, 251(11): 3489-3494
- [3] Tateno H, Krapf D, Hino T, et al. Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing *in vitro* without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(46): 18543-18548
- [4] Bloemberg D, Quadraltero J. Caspase activity and apoptotic signaling in proliferating C2C12 cells following cisplatin or A23187 exposure[J]. Data Brief, 2016, 7: 1024-1030
- [5] Gou LX, Wu QL, Lin SJ, et al. Mutasynthesis of pyrrole spiroketal compound using calcimycin 3-hydroxy anthranilic acid biosynthetic mutant[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(18): 8183-8191
- [6] Wu QL, Gou LX, Lin SJ, et al. Characterization of the N-methyltransferase CalM involved in calcimycin biosynthesis by *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. Biochimie, 2013, 95(7): 1487-1493
- [7] Li YL, Gou LX, Wu QL, et al. Functional analysis of *calD* involved in calcimycin postsynthetic modification by *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 148-156 (in Chinese)
李园莉, 苟丽霞, 吴秋林, 等. 酿酒链霉菌 NRRL 3882 中钙霉素生物合成后修饰基因 *calD* 的功能分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 148-156
- [8] Gou LX, Han TS, Wang XX, et al. A novel TetR family transcriptional regulator, CalR3, negatively controls calcimycin biosynthesis in *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2371
- [9] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical *Streptomyces* genetics[J]. Norwich, United Kingdom: The John Innes Foundation, 2000: 25
- [10] Huang TT, Wang YM, Yin J, et al. Identification and characterization of the pyridomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(23): 20648-20657
- [11] Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, et al. CDD: NCBI's conserved domain database[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(Database issue): D222-D226
- [12] Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences[J]. Protein Science, 2018, 27(1): 135-145
- [13] Nasser W, Reverchon S. New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 387(2): 381-390
- [14] Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence[J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(1): 56-60
- [15] Li QL, Wang LF, Xie YY, et al. SsaA, a member of a novel class of transcriptional regulators, controls sansanmycin production in *Streptomyces* sp. strain SS through a feedback mechanism[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(10): 2232-2243
- [16] Tang ZK, Li XM, Pang AP, et al. Characterization of three pathway-specific regulators for high production of monensin in *Streptomyces cinnamonensis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(15): 6083-6097
- [17] Yu Q, Bai LQ, Zhou XF, et al. Inactivation of the positive LuxR-type oligomycin biosynthesis regulators OlmRI and OlmRII increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*[J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(8): 869-876
- [18] Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing[J]. Annual Review of Genetics, 2001, 35(1): 439-468
- [19] Takano E, Chakraborty R, Nihira T, et al. A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(5): 1015-1028