

抗性基因报告系统辅助选育厦门霉素 A 高产菌株

李嘉欣¹, 步绪亮², 张贵振^{1,3}, 江向海², 徐俊², 徐岷涓^{*1}

1 上海交通大学系统生物医学教育部重点实验室 系统生物医学研究院, 上海 200240

2 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240

3 上海中医药大学中药学院, 上海 200240

李嘉欣, 步绪亮, 张贵振, 江向海, 徐俊, 徐岷涓. 抗性基因报告系统辅助选育厦门霉素 A 高产菌株[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4821-4831

Li Jiaxin, Bu Xuliang, Zhang Guizhen, Jiang Xianghai, Xu Jun, Xu Minjuan. Breeding of a high xiamenmycin A-producing strain by random mutagenesis and reporter-based selection[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4821-4831

摘要:【背景】厦门霉素 A 是厦门链霉菌(*Streptomyces xiamenensis*) 318 菌株的主要次级代谢产物, 具有显著的抗纤维化活性及药用潜力。但野生型菌株中厦门霉素 A 的产量仅有 14 mg/L, 其生产水平亟待提升。【目的】通过随机诱变-抗性标记筛选获得高产菌株并进行培养基优化, 以提高厦门霉素 A 的产量。【方法】在厦门霉素 A 的生物合成基因簇后融合一个抗性基因, 用于报告整个基因簇的表达水平。对构建的基因工程菌株进行常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变, 从抗性水平高的突变菌株中筛选高产菌株, 并通过培养基优化, 使厦门霉素 A 产量显著提升。【结果】构建携带卡那霉素抗性标记的产厦门霉素 A 的工程菌 MT-XN 作为出发菌株, 对该菌株进行一轮 ARTP 诱变, 使用 90 mg/L 卡那霉素筛选, 得到了厦门霉素 A 产量为 101.7 mg/L 的突变菌株 MA-8。进一步通过响应面法优化培养基配方, 在最佳培养基中 MA-8 菌株产生的厦门霉素 A 达到 134.2 mg/L, 较野生型菌株提高了 845.1%。【结论】采用随机诱变-报告基因筛选系统, 可快速筛选出厦门霉素 A 产量大幅提升的高产菌株, 为后续的药物开发奠定良好的基础。

关键词: 厦门霉素; 报告基因筛选系统; 随机诱变; 响应面法优化; 抗纤维化

基金项目: 国家重大科技专项(2018YFA0901900)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901900)

*Corresponding author: E-mail: minjuanxu@sytu.edu.cn

Received: 2022-03-09; Accepted: 2022-04-04; Published online: 2022-07-05

Breeding of a high xiamenmycin A-producing strain by random mutagenesis and reporter-based selection

LI Jiabin¹, BU Xuliang², ZHANG Guizhen^{1,3}, JIANG Xianghai², XU Jun², XU Minjuan^{*1}

1 Key Laboratory of Systems Biomedicine (Ministry of Education), Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

3 School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] Xiamenmycin A, which shows significant anti-fibrotic activity and can serve as a potential medicinal candidate, is a major secondary metabolite of *Streptomyces xiamenensis* 318. However, the yield of xiamenmycin A in the wild-type strain is only 14 mg/L. Thus, it is urgent to improve the production of this compound in the strain. [Objective] Random mutagenesis and resistance reporter-based selection was used to develop a high xiamenmycin A-producing strain and further improve the yield of the compound through medium optimization. [Methods] An antibiotic resistance gene was fused at the 3' end of the last gene (*ximE*) of xiamenmycin A biosynthesis gene cluster, and thus the expression of the entire gene cluster could be indicated by antibiotic resistance level. After atmospheric and room temperature plasma (ARTP) treatment, the high-yielding strain was selected as the mutant with high antibiotic resistance level. The yield of xiamenmycin A in the mutant was further enhanced by medium optimization. [Results] A *neo*-labeled strain MT-XN was constructed as a starting strain. After one round of ARTP mutagenesis, a mutant MA-8 with resistance to 90 mg/L kanamycin and xiamenmycin A yield of 101.7 mg/L was obtained. Moreover, the yield of xiamenmycin A in MA-8 reached 134.2 mg/L with the medium optimized by response surface methodology, 845.1% higher than that in the wild-type strain. [Conclusion] Random mutagenesis combined with reporter-based selection can be used to identify high xiamenmycin A-yielding strain, which lays a foundation for drug development of this compound.

Keywords: xiamenmycin; reporter-based selection system; random mutagenesis; response surface methodology; anti-fibrosis

苯并吡喃类化合物是多种传统药用植物中的主要活性成分^[1], 广泛分布于胡椒科 (*Piperaceae*)^[2-3]、伞形科 (*Umbelliferae*)^[4-5]、金丝桃科 (*Clusiaceae*)^[6]、紫金牛科 (*Myrsinaceae*)^[7] 等植物中。这类化合物在抗菌^[3]、抗炎^[7-8]、神经保护^[9]等方面都有着重要的应用。从植物中提取苯并吡喃类活性化合物需要解决天然药源质量控制难和种植周期长等问题, 而采用微生物底盘细胞生产植物来源的活性天然产物已成为国际关注的热点。

厦门霉素 A (xiamenmycin A) 是红树林来源

厦门链霉菌 (*Streptomyces xiamenensis*) 318 菌株的主要次级代谢产物, 该化合物的结构特点是具有苯并吡喃母核、异戊烯基侧链和苏氨酸取代基^[10]。厦门霉素 A 抗纤维化活性显著, 是具开发潜力的抗纤维化药物候选物^[11-13]。负责厦门霉素 A 生物合成的基因簇 (*ximA-E*) 包含 5 个基因, 其中编码的 4 个关键酶分别是异戊烯基转移酶 XimB、依赖 FAD 的单加氧酶 XimD、环合酶 XimE 和酰胺合成酶 XimA^[10]。利用 XimB 的底物宽泛性, 通过饲喂非天然底物已获得苯环上有不同基团取代的 3-羟基色原烷醇及母核

结构改变的四氢喹啉类产物^[14]; 而对 XimA 进行蛋白质工程改造, 则可以扩大其识别的氨基酸底物的种类, 获得更多厦门霉素 A 的类似产物^[15]。此外, 通过生物合成途径重构, 可在厦门链霉菌中产生线型吡喃香豆素(decursinol)和角型吡喃香豆素(lomatin)等植物天然产物^[14]。厦门链霉菌 318 具有天然简化的基因组, 其线性染色体仅有 5.96 Mb^[16]。该菌生长迅速, 易于遗传操作, 具有发展成为苯并吡喃类化合物生物合成底盘的潜力。

在厦门链霉菌野生型 318 菌株中, 厦门霉素 A 的产量约为 14 mg/L, 无法满足后续药学研究的需要。考虑到随机诱变能够得到大量的突变菌株, 构建能直接报告目标化合物生物合成基因簇转录水平的筛选系统, 可对高产菌株进行定向筛选^[17]。为了进一步提高厦门霉素 A 的产量, 本研究通过在 *xim* 生物合成基因簇后融合一个抗性报告基因 *neo*, 获得含有筛选标记的出发菌株 MT-XN 并对菌株 MT-XN 进行常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变, 以期通过抗性筛选获得高产突变株。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

研究中用到的菌株及质粒详见表 1。

1.1.2 培养基

基础培养基: MS 固体培养基、LB 培养基、GYM 固体培养基^[12]; GYM1 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 15.0, 酵母提取物 10.0, 麦芽提取物 15.0, pH 7.2–7.3。培养基在 1×10^5 Pa 条件下灭菌 30 min; 抗生素由 0.2 μ m 滤膜过滤除菌, 获得无菌溶液, 接种前再分别加入到培养基中。

1.1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶与 DNA Marker, Thermo 公司; DNA 连接酶和 PCR 所用的 DNA 聚合酶, TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; ZORBAX Extend-C18 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), Agilent 公司。

恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 恒温摇床, 上海智诚仪器设备有限公司; 高效液相色谱仪 (high performance liquid chromatography, HPLC), Shimadzu 公司; ARTP 诱变育种仪, 无锡源清天木生物科技有限公司。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	Relevant properties	Source
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Host for general DNA manipulation	TaKaRa
ET12567/pUZ8002	Donor strain for conjugation between <i>E. coli</i> and <i>Streptomyces</i> , <i>recF dam dcm hsdS</i> /pUZ8002	[18]
<i>Streptomyces</i>		
<i>S. xiamenensis</i> 318	Wild-type xiamenmycin-producing strain	[19]
Δ <i>xim</i>	Wild-type strain with deletion of <i>xim</i>	[14]
MT-XN	Δ <i>xim</i> containing pSET152- <i>xim-neo</i>	This study
MA-8	High-yield strain obtained by ARTP mutagenesis and selected with 90 mg/L kanamycin	This study
MA-1/2/3/4/5	Mutants obtained by ARTP mutagenesis and selected with 70 mg/L kanamycin	This study
MA-6/7/9/10/11	Other mutants obtained by ARTP mutagenesis and selected with 90 mg/L kanamycin	This study
Plasmid		
pSET152	Apr, vector for heterologous expression	[20]
pSET152- <i>xim-neo</i>	pSET152 derivative for expression of <i>xim</i> and <i>neo</i>	This study

1.2 含有报告基因的出发菌株 MT-XN 的构建

通过 PCR 扩增长度为 5 189 bp 的 *xim* 基因簇和长度为 795 bp 的 *neo* 基因, 通过一步组装法将这两个片段克隆到 pSET152 的酶切位点 *Xba* I/*Eco*R I, 将带有融合基因簇 *xim-neo* 的重组质粒 pSET152-*xim-neo* 转入 *E. coli* ET12567 (pUZ8002), 将验证正确的转化子与 *xim* 敲除菌株进行接合转移, 操作方法参考《链霉菌操作手册》^[21]。通过阿泊拉霉素(apramycin)抗性筛选, 并用引物对 *check-ximE-F* 和 *check-neo-R* 进行 PCR 验证, 得到质粒成功整合的出发菌株 MT-XN。所用引物见表 2。

1.3 菌株的培养与发酵

将厦门链霉菌 318 或其衍生菌株的孢子接种于 100 mL 的 TSB 种子培养液中, 30 °C、220 r/min 振荡培养 72 h 左右。活化的种子液以 10% (体积分数) 的接种量接种至 100 mL 的发酵培养基 GYM1 中, 30 °C、220 r/min 发酵 7 d, 设置 3 个平行实验组。

1.4 ARTP 诱变

取 10 μL 孢子悬液置于无菌铁圈上放置于 ARTP 诱变仪中。参数设置: 射频功率为 100 W, 气流量为 10 标准升/分钟 (standard liter per minute, SLM), 等离子体炬出口与样品之间的距离是 2 mm。设置照射时间为 15、30、45、60、90、120、150 和 180 s, 取照射后的孢子悬

液稀释一定的倍数涂板, 以未诱变孢子作为对照, 统计菌株的生长个数, 计算致死率。

按照致死率选择最佳的诱变时间为 60 s, 其他参数与上述一致, 将相应的孢子进行 ARTP 诱变仪诱变, 然后涂布于无抗 MS 平板上, 30 °C 正置孵育 36 h, 待略有菌体长出后, 覆盖含有 70 mg/L 和 90 mg/L 卡那霉素的水溶液, 吹干后倒置于 30 °C 恒温培养箱生长。待突变株长出后, 挑取突变株进行摇瓶发酵, 取第 7 天的发酵液进行 HPLC 检测分析, 对厦门霉素 A 进行定量。

1.5 代谢产物的提取及 HPLC 分析

快速检测厦门霉素 A 的方法: 取适量发酵液, 加入等体积甲醇混匀, 超声 (500 W, 40 Hz) 处理 0.5 h, 置于 4 °C 过夜后, 以 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清进行 HPLC 检测, 进样量为 20 μL。

使用 HPLC 对发酵粗提物进行检测, 所用的液相色谱柱为 Agilent ZORBAX Extend-C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 粒径为 5 μm), 柱温为 40 °C, 流动相为乙腈 (B)-水 (A), 均含 0.5% 三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA), 梯度洗脱, 0 min 25% B, 5–30 min 25%–90% B, 流速为 1 mL/min。检测波长为 190–800 nm。通过 LC Solution 工作站进行数据查看和分析。

1.6 培养基优化

对 GYM1 发酵培养基进行单因素优化: 酵母提取物和麦芽提取物含量不变, 将葡萄糖含

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')
pET152- <i>xim-F</i>	GCCAAGCTTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGACACCGTCCAAGACCAGCGGAAACGG
<i>xim-neo-R</i>	TCAGCCCGGCGTACGGGTGTACCGG
<i>xim-neo-F</i>	CCGGTACACCCGTACGCCGGGCTGATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC
pSET152- <i>neo-R</i>	ACAGCTATGACATGATTACGAATTCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGA
<i>check-ximE-F</i>	ATGGGCCAGACGACGCACAC
<i>check-neo-R</i>	TCAGAAGAACTCGTCAAGAA

注: 限制性内切酶位点用下划线标出

Note: Restriction endonuclease sites are underlined.

量调整为 10、15、20、25、30 和 35 g/L; 葡萄糖和麦芽提取物含量不变, 将酵母提取物含量调整为 5、10、15、20、25 和 30 g/L; 葡萄糖和酵母提取物含量不变, 将麦芽提取物含量调整为 5、10、15、20、25 和 30 g/L; 分别配制培养基用于发酵培养实验。

GYM1 培养基优化响应面试验: 以厦门霉素 A 产量(Y)为响应值, 以葡萄糖浓度(A)、麦芽提取物浓度(B)、酵母提取物浓度(C)为考察因素, 利用 Box-Behnken 设计原则^[22-23]进行三因素三水平响应面试验, 试验因素与水平见表 3。

2 结果与分析

2.1 报告基因筛选系统的构建

对厦门霉素 A 生物合成基因簇 *xim* 进行改造, 使其最下游的 *ximE* 基因的 3'端与一个无启动子的 *neo* 抗性基因相连, 即抗性基因 *neo* 的

表 3 培养基优化 Box-Behnken 试验因素与水平
Table 3 Factors and levels of Box-Behnken tests for medium optimization

Item	A Glucose (g/L)	B Malt extract (g/L)	C Yeast extract (g/L)
-1	15	10	5
0	20	15	10
1	25	20	15

第一个密码子 ATG 与位于 *xim* 基因簇末端的 *ximE* 基因的终止密码子 TGA 共用一个碱基 A (图 1A)。无启动子 *neo* 基因的表达依赖于上游 *ximE* 的转录通读, 因此与 *xim* 基因簇融合表达的基因 *neo* 可以作为报告基因。*neo* 基因编码新霉素磷酸转移酶, 因此, 导入融合基因簇链霉菌的卡那霉素抗性水平与整个生物合成基因簇的表达水平正相关。将构建的 *xim-neo* 基因簇整合到敲除了 *xim* 基因簇的 Δxim 菌株的染色体上 (图 1B), 从而得到出发菌株 MT-XN。

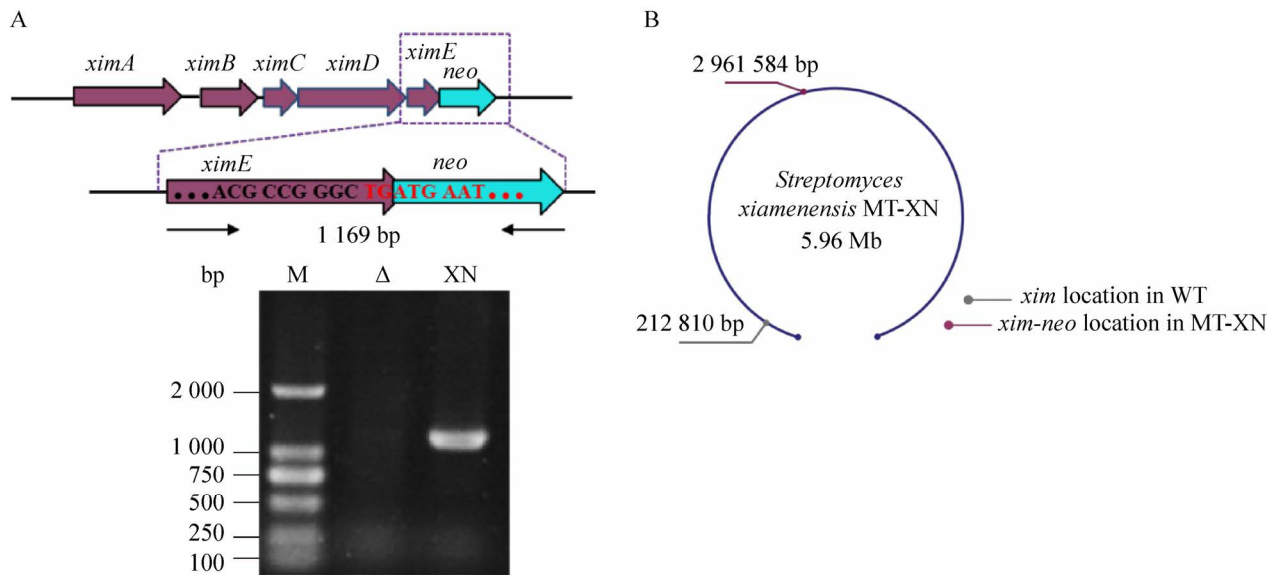


图 1 *neo* 标记菌株 MT-XN 的构建 A: 构建 *xim-neo* 融合基因簇示意图及基因簇整合菌株 MT-XN 的 PCR 验证; M: DL2000 DNA Marker; Δ : Δxim ; XN: MT-XN. B: *xim* 及 *xim-neo* 基因簇位置示意图
Figure 1 Construction of a *neo*-labeled strain MT-XN. A: Schematic diagram of fusion of *neo* following *ximE* and confirmation of the integration of *xim-neo* gene cluster in strain MT-XN. M: DL2000 DNA Marker; Δ : Δxim ; XN: MT-XN. B: Location of *xim* gene cluster on the chromosome of *S. xiamenensis* 318 (WT) and location of *xim-neo* gene cluster on the chromosome of strain MT-XN.

2.2 考察报告基因的引入对厦门霉素 A 产量的影响

将菌株 MT-XN 与野生型菌株(WT)在相同培养条件下培养。结果显示, 菌株 MT-XN 产生厦门霉素 A 的水平与野生型菌株相比无显著差异(图 2A)。后续的诱变筛选将使用卡那霉素抗性作为筛选标记, 因此首先考察菌株 MT-XN 对卡那霉素的本底抗性。结果如图 2B 所示, 在卡

那霉素浓度高于 3.5 mg/L 的抗性平板上, MT-XN 和 Δxim 菌株均不能生长。

2.3 ARTP 随机诱变结合卡那霉素抗性筛选高产突变株

选择 ARTP 对菌株进行诱变育种。首先, 将菌株 MT-XN 的孢子悬液进行不同时间的 ARTP 诱变, 绘制致死率曲线(图 3A)。当诱变时间为 60 s 时致死率达到 99%, 选择该照射

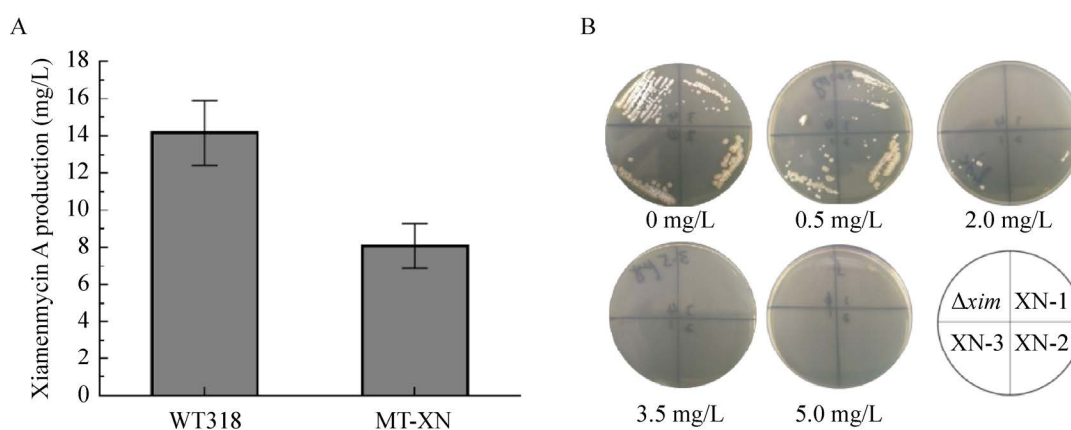


图 2 MT-XN 菌株的产量水平与本底卡那霉素抗性 A: 菌株 WT 和 MT-XN 的厦门霉素 A 生产水平; B: 菌株 Δxim 和 MT-XN 在含有不同浓度卡那霉素的 GYM 平板上的生长情况

Figure 2 Production and kanamycin resistance of the strain MT-XN. A: The production of xiamenmycin A in strain WT and MT-XN; B: The growth of strain Δxim and MT-XN on the GYM agar plate containing different concentration of kanamycin. XN: MT-XN.

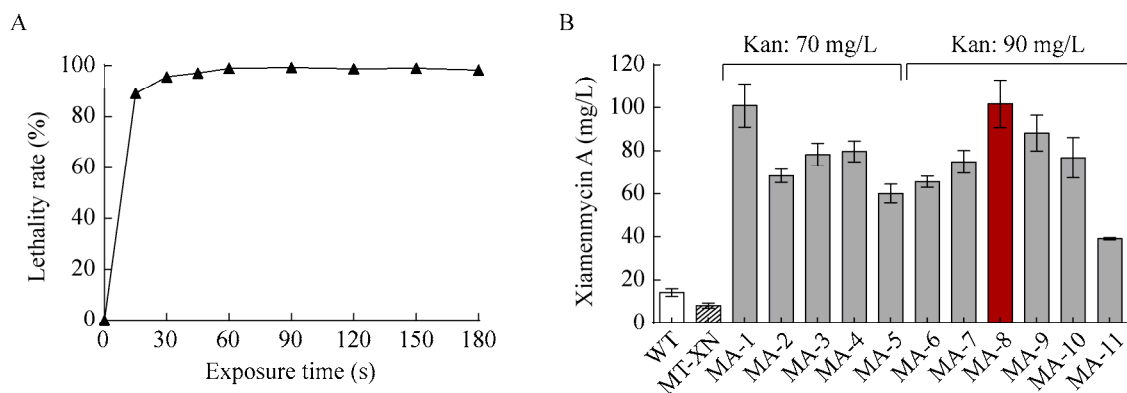


图 3 ARTP 诱变及高产菌株筛选 A: 菌株 MT-XN 在 ARTP 诱变下的致死率曲线; B: 菌株 MT-XN 诱变后突变菌株的厦门霉素 A 的产量

Figure 3 ARTP mutagenesis and screening of high-yielding mutants. A: The lethality curve of strain MT-XN treated by ARTP; B: The production of xiamenmycin A produced by strain MT-XN derivatives. Kan: Kanamycin.

时长作为诱变时间。将菌株 MT-XN 的孢子悬液在 60 s 的照射时长下进行 ARTP 诱变, 照射后的孢子涂布于平板, 孵育 36 h 后, 选用 70 mg/L 及 90 mg/L 的卡那霉素溶液覆盖平板进行突变株筛选, 最终共筛选得到 11 株高抗性突变株。

通过对筛选得到的突变菌株进行摇瓶发酵和产物的 HPLC 分析, 发现 11 株菌的厦门霉素 A 生产水平都有大幅提升, 产量范围为 40–100 mg/L (图 3B)。其中, 从卡那霉素浓度为 90 mg/L 的平板中筛选获得的 MA-8 菌株其厦门霉素 A 产量最高, 达到 101.7 mg/L (图 3B)。

2.4 通过培养基优化提高厦门霉素 A 的产量

在 GYM1 培养基中, 高产菌株 MA-8 的厦门霉素 A 产量与厦门链霉菌野生型 318 菌株相比提高了 6 倍左右。为进一步提高产量, 针对 GYM1 培养基的 3 种主要成分, 首先进行了单因素试验。如图 4A 所示, 在保持酵母提取物与麦芽提取物浓度不变时, 当葡萄糖浓度达到 20 g/L 时厦门霉素 A 的产量达到最高; 保持麦芽提取物浓度不变, 配以最佳葡萄糖浓度, 确定最佳的酵母提取物浓度为 10 g/L (图 4B); 选

取最佳葡萄糖浓度和酵母提取物浓度, 确定麦芽提取物的最佳浓度为 15 g/L (图 4C)。如图 4C 结果显示, 在单因素试验获得的优化培养基中厦门霉素 A 的产量达到 125.5 mg/L。

基于培养基成分单因素试验的结果, 以葡萄糖(A)、麦芽提取物(B)和酵母提取物(C)的浓度为自变量, 厦门霉素 A 的产量(Y)为响应值, 通过响应面试验计算最佳成分配比。结果见表 4。

使用 Design-Expert 11 软件对 Box-Behnken 结果进行回归分析, 建立回归模型如下:

$$Y=130.12+4.41A+5.48B+14.89C-5.00AB+10.38AC+3.35BC-14.95A^2-11.42B^2-33.50C^2$$

如表 5 方差分析所示, 模型的 P 值 $<0.000 1$ 而失拟项不显著, 说明该模型的可靠性较高。拟合程度可用决定系数(R^2)与调整决定系数(R^2_{Adj})来检验。在试验中, $R^2=0.981 7$ 表明只有 1.83% 的总变差无法解释, 而调整决定系数也大于 0.9 ($R^2_{Adj}=0.958 1$), 说明模型拟合程度较好, 实验误差较小。模型显示, 一次项 C 、交互项 AC 及二次项 A^2 、 B^2 和 C^2 对厦门霉素 A 的产量影响极显著($P<0.01$)。一次项 A 和 B 对产量影

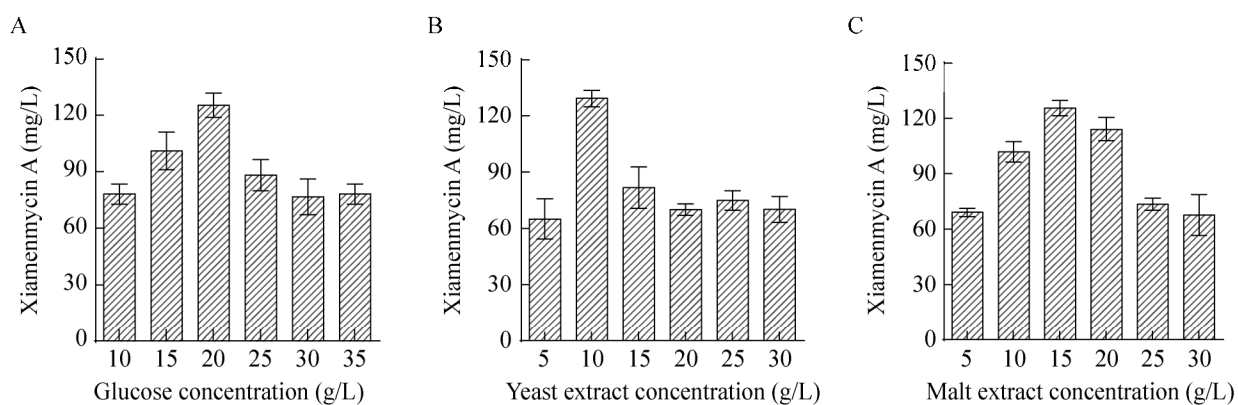


图 4 菌株 MA-8 培养基优化单因素试验 A: 葡萄糖对厦门霉素 A 产量的影响; B: 酵母提取物对厦门霉素 A 产量的影响; C: 麦芽提取物对厦门霉素 A 产量的影响

Figure 4 Single factor experiments on medium optimization of strain MA-8. A: Effect of glucose on the yield of xiamenmycin A of strain MA-8; B: Effect of yeast extract on the yield of xiamenmycin A of strain MA-8; C: Effect of malt extract on the yield of xiamenmycin A of strain MA-8.

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Design and results of Box-Behnken tests

Run	A	B	C	Xiamenmycin A (mg/L)	Run	A	B	C	Xiamenmycin A (mg/L)
1	0	0	0	132.0±7.1	10	0	0	0	129.7±5.9
2	1	0	1	115.1±5.1	11	1	0	-1	64.9±5.6
3	-1	1	0	114.7±8.3	12	0	1	1	108.1±6.3
4	0	1	-1	71.3±3.4	13	0	0	0	131.4±5.2
5	1	1	0	105.7±6.4	14	0	-1	-1	69.0±2.5
6	-1	-1	0	91.8±2.5	15	-1	0	1	77.7±10.0
7	-1	0	-1	69.0±0.4	16	0	0	0	124.4±5.1
8	1	-1	0	102.8±5.6	17	0	-1	1	92.4±4.0
9	0	0	0	133.1±4.6					

表 5 Box-Behnken 设计的方差分析

Table 5 ANOVA for Box-Behnken design

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value	Significance
Model	9 491.38	9	1 054.60	41.65	<0.000 1	**
A	155.76	1	155.76	6.15	0.042 2	*
B	239.81	1	239.81	9.47	0.017 9	*
C	1 773.10	1	1 773.10	70.03	<0.000 1	**
AB	100.00	1	100.00	3.95	0.087 2	
AC	430.56	1	430.56	17.01	0.004 4	**
BC	44.89	1	44.89	1.77	0.224 7	
A ²	940.75	1	940.75	37.16	0.000 5	**
B ²	549.36	1	549.36	21.70	0.002 3	**
C ²	4 724.56	1	4 724.56	186.61	<0.000 1	**
Residual	177.23	7	25.32			
Lack of fit	130.28	3	43.43	3.70	0.119 3	
Pure error	46.95	4	11.74			
Cor total	9 668.60	16				
C.V. %	4.94					
R ²	0.981 7					
R ² _{Adj}	0.958 1					

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

响显著($P < 0.05$)。

以上数据表明,各试验因素与厦门霉素 A 的产量并不是简单的线性关系。图 5 中的响应面表示了 3 个因素之间的交互作用对厦门霉素 A 的产量的影响。该模型预测,葡萄糖、麦芽提取物和酵母提取物的最佳浓度分别为 21.2、16.1 和 11.3 g/L,在该培养条件下,厦门霉素 A 的产量最高能达到 133.1 mg/L。在此最佳条件下进行了 3 次验证试验,摇瓶发酵后厦门霉素 A 的最终产量水平能够达到 134.2 mg/L,与预

测值非常接近,证实了该模型对菌株 MA-8 发酵条件优化的有效性。

3 讨论与结论

随机诱变育种是提高微生物天然产物产量的传统技术,而建立高效的筛选机制一直是提高诱变育种效率的关键所在。ARTP 诱变作为一种新型的育种手段,通过在室温范围内产生均匀等离子体射流作用于菌液,启动细胞紧急修复机制,诱使菌株发生随机突变,是一种安

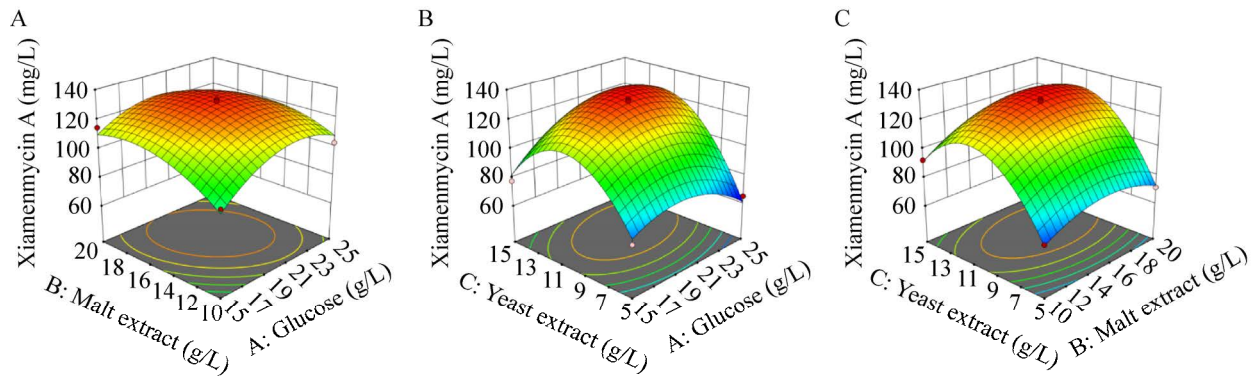


图 5 两因素交互作用对菌株 MA-8 厦门霉素 A 产量的影响的响应面及等高线 A: 麦芽提取物、葡萄糖两因素交互作用; B: 酵母提取物、葡萄糖两因素交互作用; C: 酵母提取物和麦芽提取物两因素交互作用

Figure 5 Response surface plots and contour lines of effects of interaction between two factors on xiamenmycin A production of strain MA-8. A: Effects of interaction between malt extract and glucose; B: Effects of interaction between yeast extract and glucose; C: Effects of interaction between yeast extract and malt extract.

全、快速、操作灵活的诱变育种手段^[24-25], 已广泛应用于多种微生物代谢产物的产量提升^[26-28]。将关键生物合成基因与抗性基因融合构建共转录的报告基因筛选系统, 是近年来发展的一种有效的筛选手段^[29-31]。该筛选策略首次应用于 *Aspergillus terreus* 中 lovastatin 产量的提升, 通过将指示腐草霉素(phleomycin)抗性的 *ble* 基因与 lovastatin 生物合成基因 *lovF* 的启动子融合, 以诱变后菌株耐药性的提升指示 lovastatin 的产量提升^[31]。此后, 选用赋予卡那霉素抗性的 *neo* 基因为标记的报告基因筛选体系被应用于选育高产 natamycin 的 *S. gilvosporeus* 菌株^[17]。

厦门链霉菌对卡那霉素的本底抗性低于 2 mg/L, 而厦门霉素的生物合成基因簇只包含 5 个基因。将 *neo* 基因与基因簇最下游的 *ximE* 基因融合后, 厦门链霉菌的卡那霉素抗性则取决于 *xim* 基因簇转录通读水平。在较高致死率条件下进行一轮 ARTP 诱变后, 卡那霉素抗性水平高的突变株中厦门霉素 A 的产量有了显著的提升。整体而言, 报告基因操纵子辅助筛选系统能够用于排除随机诱变产生的大量无效突

变株, 定向筛选出高产突变菌株。值得注意的是, 产量不相上下的两株高产菌株 MA-8 和 MA-1 分别来自于 90 mg/L 和 70 mg/L 两种卡那霉素筛选浓度。后续发现菌株 MA-1 最高的抗性水平可以达到 85 mg/L; 此外, 使用较高浓度 (90 mg/L) 卡那霉素筛选出的菌株中也有产量较低的情况, 如菌株 MA-11。以上结果暗示, 突变菌株抗性水平较好地指示了生物合成基因簇转录水平, 但目标化合物的产量提高是转录、翻译、前体供给等多方面最优化的综合效果。

厦门霉素 A 生物合成的前体包括对羟基苯甲酸、香叶草基和苏氨酸, 这 3 个前体的供给与糖酵解途径、三羧酸循环和氨基酸合成等主代谢途径密切相关。培养基中碳源的优化是影响厦门霉素 A 产量的重要因素^[32-33]。在本研究中, 针对诱变获得的高产菌株 MA-8, 对培养基成分配比进行了单因素及响应面法试验, 在优化培养基中, 菌株 MA-8 的产量进一步提升了 32.0%。

在前期的工作中, 从厦门链霉菌野生型 318 菌株出发, 无论是通过基因簇倍增^[34], 还是将

多效调控因子 AdpA_{Sr} 过表达^[35], 厦门霉素 A 产量最高仅为 76 mg/L。本研究首先将厦门链霉菌野生型 318 菌株中原来存在的厦门霉素生物合成基因簇敲除, 随后导入融合有抗性报告基因的 *xim-neo* 基因簇, 将野生型菌株转变为可以定向筛选的基因工程菌。基于此, 仅通过一轮 ARTP 随机诱变, 借助于抗性报告基因辅助筛选体系, 我们获得了厦门霉素 A 产量提高 6 倍的突变菌株。可以预期, 采用相同策略有望通过多轮诱变获得厦门霉素 A 产量大幅提升的菌株。

REFERENCES

- [1] 徐岷涓, 徐俊. 红树林来源厦门链霉菌及其产生抗纤维化活性厦门霉素的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(4): 261-268
Xu MJ, Xu J. Progress on mangrove-derived *Streptomyces xiamenensis* and its anti-fibrotic secondary metabolite xiamenmycin[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2017, 42(4): 261-268 (in Chinese)
- [2] Jeffrey CS, Leonard MD, Glassmire AE, Dodson CD, Richards LA, Kato MJ, Dyer LA. Antiherbivore prenylated benzoic acid derivatives from *Piper kelleyi*[J]. Journal of Natural Products, 2014, 77(1): 148-153
- [3] Lago JHG, Ito AT, Fernandes CM, Young MCM, Kato MJ. Secondary metabolites isolated from *Piper chimonantifolium* and their antifungal activity[J]. Natural Product Research, 2012, 26(8): 770-773
- [4] Yang M, Wang CC, Wang WL, Xu JP, Wang J, Zhang CH, Li MH. *Saposhnikovia divaricata*-an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2020, 26(11): 873-880
- [5] Wu W, Tang SN, Zhang Y, Puppala M, Cooper TK, Xing CG, Jiang C, Lü J. Prostate cancer xenograft inhibitory activity and pharmacokinetics of decursinol, a metabolite of *Angelica gigas* pyranocoumarins, in mouse models[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2017, 45(8): 1773-1792
- [6] Mamemura T, Tanaka N, Shibazaki A, Gonoi T, Kobayashi J. Yojironins A-D, meroterpenoids and prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum yojiroanum*[J]. Tetrahedron Letters, 2011, 52(28): 3575-3578
- [7] Hirota M, Miyazaki S, Minakuchi T, Takagi T, Shibata H. Myrsinoic acids B, C and F, anti-inflammatory compounds from *Myrsine seguinii*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002, 66(3): 655-659
- [8] Kim Y, Griffin JM, Nor M, Zhang J, Freestone PS, Danesh-Meyer HV, Rupenthal ID, Acosta M, Nicholson LFB, O'Carroll SJ, et al. Tonabersat prevents inflammatory damage in the central nervous system by blocking Connexin43 hemichannels[J]. Neurotherapeutics, 2017, 14(4): 1148-1165
- [9] Jacolot M, Jean M, Tumma N, Bondon A, Chandrasekhar S, Van De Weghe P. Synthesis of stachybotrin C and all of its stereoisomers: structure revision[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2013, 78(14): 7169-7175
- [10] Yang Y, Fu L, Zhang JL, Hu LH, Xu MJ, Xu J. Characterization of the xiamenmycin biosynthesis gene cluster in *Streptomyces xiamenensis* 318[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99537
- [11] Xu MJ, Liu XJ, Zhao YL, Liu D, Xu ZH, Lang XM, Ao P, Lin WH, Yang SL, Zhang ZG, et al. Identification and characterization of an anti-fibrotic benzopyran compound isolated from mangrove-derived *Streptomyces xiamenensis*[J]. Marine Drugs, 2012, 10(3): 639-654
- [12] You ZY, Wang YH, Zhang ZG, Xu MJ, Xie SJ, Han TS, Feng L, Li XG, Xu J. Identification of two novel anti-fibrotic benzopyran compounds produced by engineered strains derived from *Streptomyces xiamenensis* M1-94P that originated from deep-sea sediments[J]. Marine Drugs, 2013, 11(10): 4035-4049
- [13] Liu XJ, Xu MJ, Fan ST, Wu Z, Li J, Yang XM, Wang YH, Xu J, Zhang ZG. Xiamenmycin attenuates hypertrophic scars by suppressing local inflammation and the effects of mechanical stress[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2013, 133(5): 1351-1360
- [14] Bu XL, He BB, Weng JY, Jiang CC, Zhao YL, Li SM, Xu J, Xu MJ. Constructing microbial hosts for the production of benzoheterocyclic derivatives[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(9): 2282-2290
- [15] Weng JY, Bu XL, He BB, Cheng Z, Xu J, Da LT, Xu MJ. Rational engineering of amide synthetase enables bioconversion to diverse xiamenmycin derivatives[J]. Chemical Communications, 2019, 55(98): 14840-14843
- [16] XU MJ, WANG JH, BU XL, YU HL, LI P, OU HY, HE Y, XU FD, HU XY, Zhu XM, et al. Deciphering the streamlined genome of *Streptomyces xiamenensis* 318 as the producer of the anti-fibrotic drug candidate

- xiamenmycin[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 18977
- [17] Wang YM, Tao ZS, Zheng HL, Zhang F, Long QS, Deng ZX, Tao MF. Iteratively improving natamycin production in *Streptomyces gilvosporeus* by a large operon-reporter based strategy[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 418-426
- [18] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schoner BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.[J]. Gene, 1992, 116(1): 43-49
- [19] Xu J, Wang Y, Xie SJ, Xu J, Xiao J, Ruan JS. *Streptomyces xiamenensis* sp. nov., isolated from mangrove sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(Pt 3): 472-476
- [20] Flett F, Mersinias V, Smith CP. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 155(2): 223-229
- [21] Keiser T, Bib MJ, Buttner M, Chater K, Buttner M, Bipp M, Hopwood D, Buttner MJ, Chater KF, Chatter K. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich, UK: The John Innes Foundation, 2000
- [22] Guo F, Zheng H, Cheng Y, Song S, Zheng Z, Jia S. Medium optimization for ϵ -poly-L-lysine production by *Streptomyces diastatochromogenes* using response surface methodology[J]. Letters in Applied Microbiology, 2018, 66(2): 124-131
- [23] Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, Da Silva EGP, Portugal LA, Dos Reis PS, Souza AS, et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 597(2): 179-186
- [24] Zhang X, Zhang XF, Li HP, Wang LY, Zhang C, Xing XH, Bao CY. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5387-5396
- [25] Zhang X, Zhang XM, Xu GQ, Zhang XJ, Shi JS, Xu ZH. Integration of ARTP mutagenesis with biosensor-mediated high-throughput screening to improve L-serine yield in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(14): 5939-5951
- [26] Li XY, Liu RJ, Li J, Chang M, Liu YF, Jin QZ, Wang XG. Enhanced arachidonic acid production from *Mortierella alpina* combining atmospheric and room temperature plasma (ARTP) and diethyl sulfate treatments[J]. Bioresource Technology, 2015, 177: 134-140
- [27] Yu ZT, Shen XF, Wu YJ, Yang SB, Ju DW, Chen SX. Enhancement of ascomycin production via a combination of atmospheric and room temperature plasma mutagenesis in *Streptomyces hygroscopicus* and medium optimization[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 25
- [28] Jin J, Wang Y, Yao MD, Gu XL, Li B, Liu H, Ding MZ, Xiao WH, Yuan YJ. Astaxanthin overproduction in yeast by strain engineering and new gene target uncovering[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 230
- [29] Guo F, Xiang SH, Li LY, Wang B, Rajasärkkä J, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Ai GM, Metsä-Ketelä M, Yang KQ. Targeted activation of silent natural product biosynthesis pathways by reporter-guided mutant selection[J]. Metabolic Engineering, 2015, 28: 134-142
- [30] Xiang SH, Li J, Yin H, Zheng JT, Yang X, Wang HB, Luo JL, Bai H, Yang KQ. Application of a double-reporter-guided mutant selection method to improve clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*[J]. Metabolic Engineering, 2009, 11(4/5): 310-318
- [31] Askenazi M, Driggers EM, Holtzman DA, Norman TC, Iverson S, Zimmer DP, Boers ME, Blomquist PR, Martinez EJ, Monreal AW, et al. Integrating transcriptional and metabolite profiles to direct the engineering of lovastatin-producing fungal strains[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(2): 150-156
- [32] Xu MJ, Chen YC, Xu J, Ao P, Zhu XM. Kinetic model of metabolic network for xiamenmycin biosynthetic optimisation[J]. IET Systems Biology, 2016, 10(1): 17-22
- [33] Zhu XM, Zhang XX, Cheng RT, Yu HL, Yuan RS, Bu XL, Xu J, Ao P, Chen YC, Xu MJ. Dynamical modelling of secondary metabolism and metabolic switches in *Streptomyces xiamenensis* 318[J]. Royal Society Open Science, 2019, 6(4): 190418
- [34] 胡晓艳, 徐岷涓, 步绪亮, 徐俊. 发酵条件优化及基因簇加倍对厦门霉素生物合成的影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44(3): 680-688
- Hu XY, Xu MJ, Bu XL, Xu J. Medium optimization and biosynthetic gene cluster doubling enhance xiamenmycin yield[J]. Microbiology China, 2017, 44(3): 680-688 (in Chinese)
- [35] Bu XL, Weng JY, He BB, Xu MJ, Xu J. A novel AdpA homologue negatively regulates morphological differentiation in *Streptomyces xiamenensis* 318[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(7): e03107-e03118