

链霉菌启动子及其应用研究进展

董冀欣[#], 周群[#], 罗云孜^{*}

天津大学化工学院 教育部合成生物学前沿科学中心 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

董冀欣, 周群, 罗云孜. 链霉菌启动子及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3588-3605.

DONG Jixin, ZHOU Qun, LUO Yunzi. Recent advances and applications of *Streptomyces* promoters[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3588-3605.

摘要: 链霉菌天然产物因其显著的生物活性一直是新药开发的重要来源, 测序技术的发展揭示了链霉菌强大的生物合成潜力。链霉菌中多数次级代谢生物合成基因簇(biosynthetic gene clusters, BGCs)在常规实验条件下表达水平低甚至不表达, 这使得相关天然产物的开发受到阻碍。原位激活和异源表达是挖掘链霉菌天然产物的有效方式, 启动子作为基因表达的“开关”, 在其中发挥着重要作用。因此对启动子的研究可以有效地促进 BGCs 的激活, 从而挖掘新天然产物。本文重点阐述了链霉菌启动子的结构特征及其挖掘表征和设计构建的思路, 并列举了链霉菌启动子在天然产物开发中的应用, 有望为链霉菌生物合成路径的优化以及全新生物活性物质的发现提供思路和方法学参考。

关键词: 链霉菌; 启动子; 天然产物; 生物合成基因簇

Recent advances and applications of *Streptomyces* promoters

DONG Jixin[#], ZHOU Qun[#], LUO Yunzi^{*}

Frontiers Science Center for Synthetic Biology and Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: Natural products with remarkable biological activities from *Streptomyces* are important sources for drug discovery. The advancing sequencing technology has revealed the biosynthetic potential of *Streptomyces*. Most biosynthetic gene clusters (BGCs) in *Streptomyces* are at low expression levels or even in silence under routine laboratory conditions, which

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0903300); 国家自然科学基金(32071426)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0903300) and the National Natural Science Foundation of China (32071426).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: yunzi.luo@tju.edu.cn

Received: 2023-03-04; Accepted: 2023-04-07; Published online: 2023-05-05

hinders the discovery of natural products. *In situ* activation and heterologous expression are effective ways for discovering natural products in *Streptomyces*, in which promoters as the “switch” of gene expression play a key role. Therefore, the study of promoters can promote the activation of BGCs for the mining of new natural products. We introduce *Streptomyces* promoters in terms of the structures, mining, design, and applications in natural product discovery. This review is expected to provide new insights and methodological references for the optimization of biosynthesis pathways and the discovery of new bioactive substances in *Streptomyces*.

Keywords: *Streptomyces*; promoter; natural products; biosynthetic gene clusters

天然产物是临床用药的重要组成部分和新药的重要来源^[1-2]。放线菌作为革兰氏阳性菌, 其中的链霉菌蕴含大量编码重要价值天然产物的次级代谢生物合成基因簇(biosynthetic gene clusters, BGCs)^[3-6], 近年来, 测序技术的飞速发展更加揭示了其在天然产物开发方面的巨大潜力^[7-9]。然而大多数 BGCs 在标准实验室发酵条件下不表达或处于低表达水平, 严重阻碍了链霉菌天然产物的深入挖掘^[10-11]。

原位激活和异源表达是激活沉默 BGCs、高产链霉菌天然产物的两种主要方法^[12-13]。启动子作为转录“开关”, 是基因表达的关键功能元件, 因此对启动子的挖掘探索和改造设计至关重要^[14-16]。为了实现目标产物自上而下的设计表达, 合成生物学作为联系生物学、化学、物理学、工程学等的新型交叉学科, 将生物要素模块化后进行重新构建组装, 辅以基因编辑等技术, 在底盘菌株中实现目标化合物的生物合成^[17-18]。研究者通过在原始宿主中整合路径特异性的关键基因表达盒^[19]、替换沉默基因上游的天然启动子^[20-21]以及在合适的异源宿主中利用高效功能元件重塑 BGCs^[22]等方式得到目标产物, 在这些过程中针对启动子的探究主要着眼于新天然启动子的挖掘、人工启动子的理性或非理性的改造构建、全新启动子的智能设计等, 以期打破现有“质”与“量”的瓶颈(图 1)。

本文综述了链霉菌启动子的结构特征, 常

见的挖掘与表征方法、设计与改造的一般策略以及链霉菌启动子在天然产物开发中的部分应用实例。启动子工程是合成生物学和代谢工程中调节基因表达、优化代谢产物生物合成的重要策略, 通过合理、精确地控制多基因途径中各个基因的表达调控代谢通量分布, 最大限度地产生目标代谢产物(图 2)。因此, 启动子相关的研究将为链霉菌天然产物的生物合成路径的优化以及高价值的生物活性物质的发现提供思路和技术手段。

1 链霉菌启动子的结构特征

一般来说, 典型的原核启动子主要由 4 个部分组成(图 3A): 转录起始序列、2 个较为保守的区域-10 区(pribnow box)和-35 区(sextama box)以及位于 2 个保守区之间的间隔区。转录起始序列通常编码一个嘌呤。-10 区是 RNA 聚合酶的结合位点, 位于转录起始位点上游约 10 bp 处, 含有一个保守的共有序列, 在大肠杆菌中一般为 TATAAT^[23]。-35 区在-10 区上游, 是 RNA 聚合酶的识别位点, 其序列中心在转录起始位点上游约 35 bp 处, 同样含有一个保守的共有序列, 在大肠杆菌中一般为 TTGACA^[24]。通常情况下, -10 区和-35 区之间的间隔区长度与转录强度相关联, 间隔区长度为 17 bp 或 18 bp 时, 启动子具有较强的转录功能, 间隔区长度较短或较长时转录功能将被减弱^[25-26]。

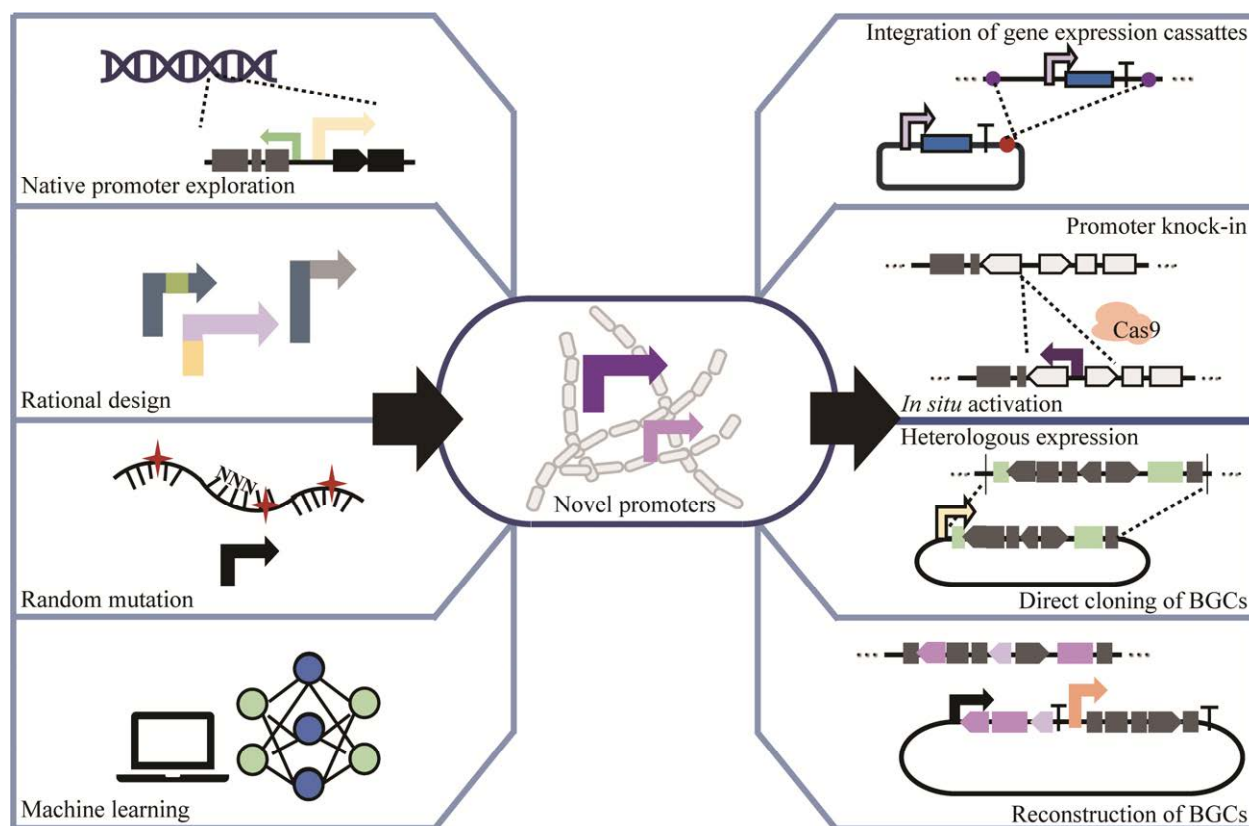


图 1 启动子工程在链霉菌天然产物开发中的应用

Figure 1 Natural product discovery in *Streptomyces* via promoter engineering.

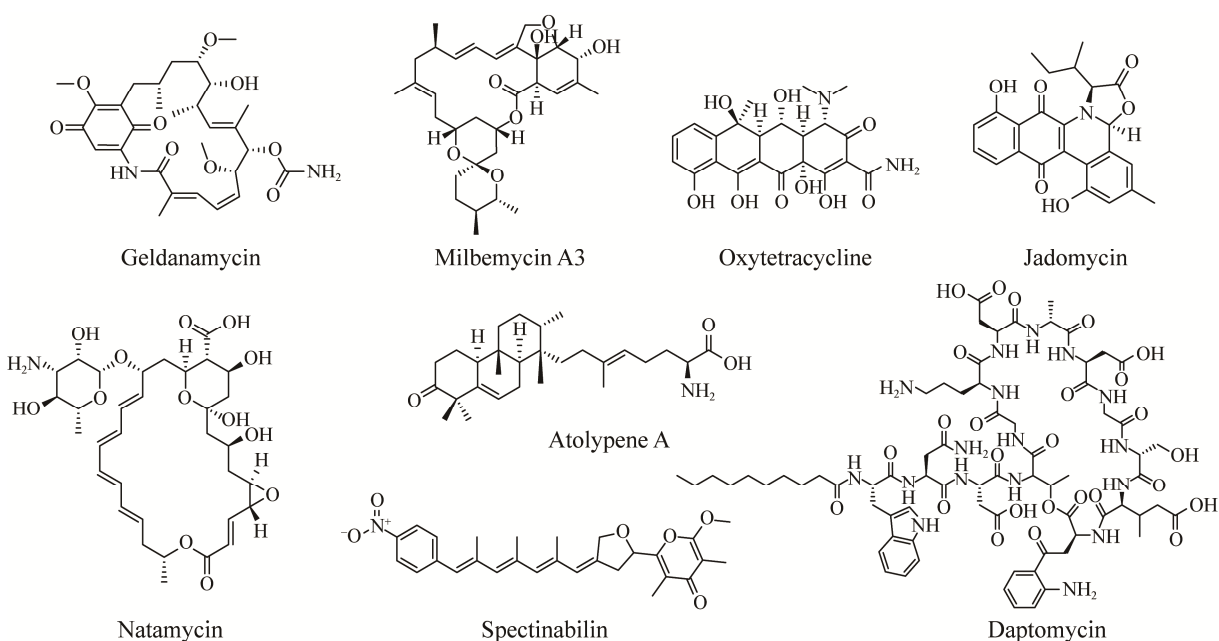


图 2 运用启动子工程策略激活的链霉菌天然产物结构

Figure 2 The structures of natural products activated by promoter engineering in *Streptomyces*.

不同于大肠杆菌中典型的原核启动子, 链霉菌启动子序列特征更为复杂。目前链霉菌启动子主要分为 3 类: 第 1 类与典型原核启动子相似, 这些通常也可在大肠杆菌中驱动表达。例如, 红霉素(erythromycin)抗性基因相关启动子 *ermEp1* 和 *ermEp2*^[27]。第 2 类仅与典型原核启动子的-10 区相似, -35 区则不同, 甚至无-35 区序列。例如, 研究者们对具有链霉菌启动子活性的 DNA 片段进行了克隆, 其中分别构建在 pMEL16 和 pMEL18 质粒上的 2 个具有明显启动子活性的片段显示出与硫链丝菌素(thiostrepton)抗性基因启动子 *tsrp1* 相似的-10 区序列, 而-35 区序列不同^[28]。第 3 类则与典型原核启动子无任何相似性。早前的研究对 139 个启动子进行了比较, 其中许多并未显示典型的-10 区和-35 区^[29]。另外, 针对链霉菌启动子序列的分析表明, 其保守区域更加灵活。2011 年, 研究人员分析了可被 σ^{hrdB} 识别的链霉菌启动子, 明确了其相对固定的-35 区序列 TTGACN (其中 N=A、T、C、G), 以及较为可变的-10 区序列 TASVDT (其中 S=G 或 C, V=G、A 或 C, D=A、T 或 G) (图 3B)^[30]。近年来, 基于转录组学、翻译组学和蛋白质组学等研究, 对多种链霉菌基因组进行了进一步的分析与注释, 如 *Streptomyces coelicolor*、*Streptomyces clavuligerus*、

Streptomyces lividans 和 *Streptomyces avermitilis* 等, 它们同样呈现出较为一致的启动子特征, -10 区和-35 区的保守序列分别为 TANNNT 和 NTGACN^[31-34]。而且研究表明, 与其他基因相比, 驱动次级代谢相关基因启动子序列的-35 区保守性更低, 这表示每个次级代谢产物 BGCs 的激活都需要特定的刺激^[34]。

2 链霉菌天然启动子的挖掘

具有良好特性的启动子是合成生物学和代谢工程的重要工具。目前链霉菌常用的天然启动子有红霉素抗性基因启动子 *ermEp1*^[27]、由链霉菌噬菌体 I19 中筛选得到的 *SF14p*^[35]和来源于 *S. coelicolor* 的 *kasOp*^[36]等(表 1)。组成型启动子的调控基本不受外界环境的影响, 其驱动基因的表达在不同的生长阶段具有持续性及稳定性。因此组成型强启动子常被用于天然产物的挖掘。与之不同的诱导型启动子在受到外界物理或化学信号的刺激后方可调控基因的表达, 常见的诱导因素有光、温度、抗生素、糖类等^[44-45]。高性能的诱导型启动子能够在时间和强度 2 个维度上令目标产物的合成更为可控、便捷, 促进天然产物的高效生产。随着生物信息学技术的发展, 研究人员得以从 DNA、RNA、蛋白质等多个层面对天然启动子进行预

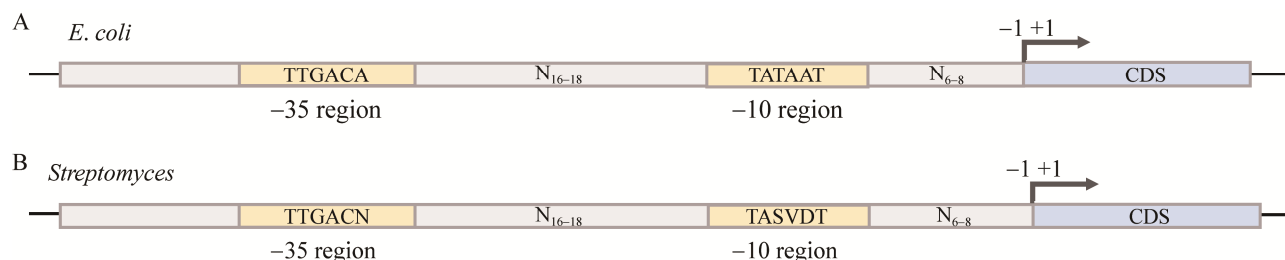


图 3 大肠杆菌启动子结构(A)和 σ^{hrdB} 识别的链霉菌启动子结构(B) CDS: 编码序列

Figure 3 The prokaryotic promoter structures (A) *Escherichia coli* promoter structure (B) *Streptomyces* promoter structure recognized by σ^{hrdB} . CDS: Coding sequence.

表 1 链霉菌常用天然启动子

Table 1 Commonly used native promoters in *Streptomyces*

Promoter	Strain	-35 region	Distance (bp)	-10 region	Function	Type	References
<i>ermEp1</i>	<i>S. erythraeus</i>	TGGACA	14	TAGGAT	Erythromycin gene promoter	Constitutive	[27]
<i>ermEp2</i>	<i>S. erythraeus</i>	TTGACG	18	GAGGAT	Erythromycin gene promoter	Constitutive	
<i>SF14p</i>	<i>S. ghanaensis</i> phage 119	TTGACC	19	TACAAT	Promoter recognized by σ^{hrdB}	Constitutive	[35]
<i>kasOp</i>	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	TTGACA	18	TAAAGT	Promoter of a SARP family regulator	Constitutive	[36]
<i>gapdhp</i>	<i>S. aureofaciens</i>	TAAACA	17	TACGCT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter	Constitutive	[37]
<i>tsrPIp</i>	<i>S. lividans</i>	TTGATT	17	TAGGGT	β -galactosidase gene promoter	Constitutive	[38]
<i>rpslp</i>	<i>S. ramocissimus</i>	TAACGC	18	TAGGCT	Promoter of 30S ribosomal protein S12	Constitutive	[39]
<i>galPIp</i>	<i>S. lividans</i>	TGACAG	23	TATGTT	Galactose inducible promoter	Inducible	[40]
<i>nitAp</i>	<i>Rhodococcus</i> <i>rhodochrous</i> J1	TTGACG	17	TGCAAT	Nitrase gene promoter	Inducible	[41]
<i>chi63p</i>	<i>S. plicatus</i>	TTGACC	17	TATTCT	Chitinase gene promoter	Inducible	[42]
<i>chi35p</i>	<i>S. plicatus</i>	TTGACC	18	TACGGT	Chitinase gene promoter	Inducible	
<i>tipAp</i>	<i>S. lividans</i>	TTGCAC	19	CAGCGT	Thiostrepton inducible promoter	Inducible	[43]

测和表征,越来越多的启动子表达系统被开发。然而当前链霉菌中具有良好特性的启动子仍非常有限,亟待进一步开发以满足科研与生产中的多种需求。

2.1 组成型启动子的挖掘

一直以来,研究者们致力于从链霉菌基因组中挖掘天然启动子来优化产物的表达。随着生物信息学相关技术的发展,启动子的挖掘方法也更加多元化。借助生物信息学工具对 DNA 序列进行分析及预测,从而挖掘潜在的功能性启动子并加以验证。2016 年, Liu 等基于缺失分析,在转谷氨酰胺酶的基因片段中确定了 TGase 启动子的完整序列区域,并鉴定出 TGase 启动子中的一段阻遏序列;在 *S. lividans* 中的测试表明,该阻遏序列的缺失使转谷氨酰胺酶的产量增加了 81.3%,进一步结合基因密码子优化,转谷氨酰胺酶产量和产率可分别达到

5.73 U/mL 和 0.14 U/(mL·h)^[46]。

以 DNA 为模板合成 RNA 的转录过程是基因表达的第一步,启动子在其中发挥“开关”的作用,因此不少研究者尝试从基因转录水平进行探究以期获得新的启动子元件。Luo 等通过 RNA-Seq 分析从 *Streptomyces albus* J1074 中确认并测试了 32 个候选启动子,强度是 *ermE**p 的 4%–1 300%,通过进一步测定报告基因的转录水平,鉴定出 10 个强启动子;之后,将这些启动子用于“即插即用”平台,成功重构激活了来源于 *Streptomyces griseus* 的一个沉默 BGC,在 3 种异源链霉菌宿主中均能检测到目标产物^[47]。2017 年,为了提高聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)基因的表达,通过转录组数据分析和儿茶酚 2,3-双加氧酶报告系统验证,获得了一个内源强启动子 5063p;使用 5063p 替换原 PKS 启动子 *gdmA1p*,PKS 表达量相对于野生型增加了

4-141 倍, 其中格尔达霉素(geldanamycin)产量提高了 39%^[48]。2020 年, 考虑到糖源摄取不足对目标产物米尔贝霉素(milbemycin)合成的阻碍, Jin 等首先鉴定出 2 个有效的糖源转运蛋白 TP2 和 TP5, 并在此基础上进一步比较转录组数据, 筛选得到最合适的天然启动子, 最终 *Streptomyces bingchengensis* 中米尔贝霉素 A3/A4 产量增加 36.9%, 达到目前已报道的最高产量 3 321 mg/L^[49]。

除转录水平外, 研究者们还尝试从翻译层面进行启动子的挖掘。2019 年, 通过对初级和次级代谢的蛋白质组比较分析, Wang 等在链霉菌 *Streptomyces chattanoogensis* L10 中发现了一个强启动子 *groESp*, 相较于 *ermE**p, 使用 *groESp* 表达的次级代谢产物产量提高了 20%左右^[50]。这说明蛋白质组学是一种有效的强启动子鉴定方法, 并有望用于其他链霉菌的强启动子挖掘, 以充分开发具有潜在生物活性的次级代谢产物。

基于生物信息学方法, 除挖掘获得标准启动子外, 研究者们还发现了一些具有特殊性质的启动子。2019 年, Wang 等基于微阵列和绿色荧光蛋白报告基因分析获得了一个新启动子 *thlM4p*, 该启动子在链霉菌的初级代谢过程中沉默, 而在次级代谢过程中强烈驱动表达; *thlM4p* 的活性在发酵的前两天无法检测, 但在随后几天出现明显增强, 可达到 *ermE**p 启动子的 7 倍; 之后使用 *thlM4p* 驱动正调控基因 *scnR11* 表达, 相较于 *ermE**p, 纳他霉素(natamycin)产量提高了 30%^[51]。同年的另一项研究鉴定了四环素 BGC 上位于 *otrB* 和 *otrR* 这 2 个基因中间的启动子 *otrBp*, 发现其反向互补序列可驱动 *otrR* 的表达, 通过序列分析确定其具有 2 个不同方向的转录起始位点, 并用绿色荧光蛋白报告系统测试了该双向启动子的活性^[52]。双向启

动子可实现基因的共表达, 同时被证实能够在多种链霉菌中稳定地发挥作用, 这项研究为其在合成生物学设计中的各项应用奠定了坚实的基础。

另外, 在其他微生物底盘中也成功应用了一些新的启动子鉴定方法。Pan 等使用超声破碎和酶消化两种方法随机打断细菌基因组获得大量 DNA 片段, 再用其分别驱动绿色荧光蛋白报告基因表达, 之后运用流式细胞仪进行筛选, 在此基础上最终获得数个启动子; 其中, $P_{BS76-100}$ 使 *Escherichia coli* 中 L-缬氨酸的产量增加 1.73 倍, 强启动子 P_{SM} 实现了 *Serratia marcescens* 中灵菌红素产量提升 34.81%^[53]。链霉菌启动子的开发同样可借鉴具体方法扩展挖掘角度, 进一步促进天然启动子的发现。

2.2 诱导型启动子的开发

在过去的几十年中, 基于链霉菌的菌株工程已经发展出包括组成型和诱导型启动子在内的遗传工具。诱导型启动子对于基因表达的控制是有利的, 但目前只有有限数量的诱导型启动子可用于链霉菌中基因表达的精确调节。

结合生物信息学分析与诱导调控效果观察, 已成功表征了一些诱导型表达元件, 并随之开发了四环素、间苯二酚和 *cumate* 诱导表达系统等^[54-55]。近年来, Wang 等通过比较链霉菌基因组和蛋白质序列, 从 *Streptomyces rimosus* 中选择了土霉素诱导型调节因子 *OtrR*、操纵子 *otrO* 和启动子 *otrBp*, 利用这些特征明确的遗传要素开发了土霉素诱导表达系统 P_{otr} *; P_{otr} * 在多种链霉菌中显示出高水平的诱导表达, 并被用于激活 *Streptomyces venezuelae* ISP5230 中沉默的捷达霉素(jadomycin) BGC, 体现了该系统在链霉菌天然产物开发中的价值^[56]。有研究对上述 4 个系统进行测试比较, 最终选定 *cumate* 诱导表达模块并优化启动子元件, 构建得到一个高性能的合成诱导调控系统, 该系统的动态调

控范围可达 66.4 倍,且泄漏表达情况微弱、灵敏度适当,能够有效实现基因的可预测性调控^[57]。使用纤维二糖作为诱导剂的 *Cel-RS₁* 和 *Cel-RS₂* 也成功建立,进一步扩展了链霉菌中高效的表达调控工具库^[58]。2018 年, Noguchi 等首次报道了链霉菌中的木糖诱导蛋白表达系统;为了确定候选启动子,研究人员在分别投入不同碳源后对 *S. avermitilis* MA-4680 的蛋白表达情况进行测定,由于木糖异构酶 *xylA* 在 D-木糖存在下呈现强表达,因此选用 *xylA* 启动子进行系统构建,该系统可严格调节蛋白质的合成^[59]。2019 年,为实现磷脂酶 D 的大规模生产,研究者们在 *S. lividans* 中构建了诱导型(*tipAp*)/组成型(*ermE**p)双启动子表达系统,其可在非诱导条件下实现高活性磷脂酶 D 的组成型表达,以及低浓度诱导条件下磷脂酶 D 的最佳生产^[60]。另外, Torres-Bacete 等在 *E. coli* 中利用无机磷饥饿响应系统,将一个强启动子的-35 区替换为保守的 PHO 区操纵序列,筛选得到目标启动子后,仅通过调整培养基中无机磷的浓度即可调节菌体的生长与生产^[61]。PHO 调控子系统在细菌中广泛分布,同源的 PhoB 应答调控蛋白在放线菌中也被发现,这对天然产物工业化生产具有启发意义^[62]。

基于已有的诱导表达系统,研究者们开发出了一系列链霉菌诱导表达载体。Matsumoto 等在链霉菌的诱导型表达载体 pSH19 (含有表达调控系统 P_{nitA} -NitR)上引入大肠杆菌质粒的复制起点(CoIE1)和抗生素抗性基因,开发了 6 种用于链霉菌-大肠杆菌的诱导型穿梭载体,其中 3 个载体在 *S. lividans* TK24 中具有诱导表达能力,是有效的链霉菌基因表达工具^[63]。为了避免大型发酵中添加诱导剂所带来的费用和不便,2017 年, Li 等提出了一种通用的不依赖于诱导剂的自动调节策略,微调链霉菌中次级

代谢产物 BGCs 的表达:首先,采用诱导型启动子控制基因的表达,通过响应面模型确定最佳诱导时间和诱导剂用量;然后,分析时程转录组数据,筛选得到在最佳条件下与诱导型启动子效果相似的内源组成型启动子;最后,替换原有诱导型启动子,从而在不需要任何诱导剂的情况下实现 BGCs 的最佳表达^[64]。运用这一策略,放线紫红素(actinorhodin)和土霉素(oxytetracycline)产量相比使用传统方法进行启动子优化的菌株分别提高了 1.3 倍和 9.1 倍,表明该自动调节策略在链霉菌应用中的高效性和巨大潜力,为启动子开发拓展了思路^[64]。

尽管相较于组成型启动子,诱导型启动子更便于调节基因表达,但其自身存在局限性。首先,大多诱导型启动子在缺少诱导信号时仍然存在泄漏表达。其次,诱导信号有概率会对菌体自身产生毒性或其他负面效应,例如在正常情况下出现不同基因对同一诱导信号的响应。再者,部分诱导剂的高使用成本使工业化生产受阻。随着生物技术的发展,我们期望开发出越来越多的诱导型启动子,在链霉菌基因表达微调中发挥重要作用,并广泛用于合成生物学中遗传回路的构建。

3 链霉菌人工启动子的设计和构建

3.1 链霉菌启动子的理性设计

链霉菌中高效且适用性强的启动子仍然非常有限,仅凭借天然启动子挖掘难以满足实际应用的需求。基于此,研究者们尝试对已知启动子进行理性设计改造,以期获得更多性能良好的启动子元件。

随着对作用机理的深入研究,研究人员发现调控因子会对启动子的性能产生影响,因此

尝试对调控因子-启动子结合位点进行合理设计。来源于 *S. coelicolor* 的启动子 *kasOp* 受到两种调控因子 ScbR 和 ScbR2 的严格控制, 研究人员首先将 *kasOp* 核心区域上游的 ScbR 及 ScbR2 的相同结合位点 OB 移除并进行不同长度截短, 获得了强度比 *kasOp* 高将近 40 倍的启动子 *kasOp3*; 随后在其基础上对位点 OA 随机突变建库, 最终筛选得到 *kasOp361*, 即目前仍被广泛应用的强启动子 *kasO*p*, 进一步与已知的强启动子 *ermE*p* 和 *SF14p* 比较, *kasO*p* 展示出更高的驱动表达水平^[36]。由于调控因子通常结合在启动子的特定区域, 2018 年的一项研究分析发现了对调控因子具有结合偏好的七肽重复序列, 在原本 *pimMp* 启动子基础上, 使用定量转录分析等方法设计开发了新的启动子序列, 这为理性改造提供了重要思路^[65]。

由于缺乏强有力的基因表达调控元件, 链霉菌的工程开发往往受到限制。5'非翻译区(5' untranslated region, 5'UTR)位于编码区上游而不被翻译, 该区域通常含有一些调控序列, 如核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)。Yi 等基于 *S. coelicolor* M145 多组学数据的分析, 将 2 个具有恒定强度的启动子与 4 个 5'UTR 区域进行组合构建, 获得了 8 组启动子序列, 这些启动子驱动报告基因的表达水平是 *ermE*p* 所驱动的 0.03–2.4 倍; 使用相同策略对 3 个已报道的启动子进行优化, 发现同样都成功实现基因表达的增强^[66]。 σ^{70} 依赖性启动子可被链霉菌管家因子 σ^{hrdB} 有效识别, 具有较高的转录效率, 然而其翻译效率并不理想。Zhao 等在 2019 年开发了一种有效策略, 将 σ^{70} 依赖性启动子 *tacp* 的核心启动子区与源于 *S. lividans* TK24 的 *kasO*p_{R15}* 的 5'UTR_{R15} 融合得到了 *tac*p*, 其活性分别是 *tacp* 和 *kasO*p_{R15}* 的 8.1 倍和 1.7 倍; 之后, 通过随机突变优化 5'UTR_{R15} 得到了最佳

启动子 *tac*p_{RBS3}*, 其活性分别是 *tac*p*、*kasO*p_{R15}* 和 *tacp* 的 2.1、3.6 和 17.6 倍^[67](图 4)。这一研究为链霉菌启动子的工程化改造提供了有效佐证。

生物信息学软件同样为链霉菌启动子的改造提供了巨大帮助。2022 年, Xu 等借助 *BPRom*、*BacPP* 这 2 个在线预测工具, 成功实现天然启动子的有效截短, 所验证的 10 条启动子中有 8 条启动子的强度呈现出不同程度的提高, 在最佳组合条件下, 绿色荧光蛋白产量达到(515.7±25.3) $\mu\text{g/mL}$, 是截至目前在链霉菌无细胞表达系统中报道的最高水平^[68]。

3.2 链霉菌启动子文库的构建

为了获取及表征更多不同强度、不同功能的启动子, 对菌体代谢进行更为精细的调节, 研究人员着眼于构建人工启动子文库。链霉菌启动子文库构建主要基于非保守序列的随机化、功能模块文库的组合等。

基于启动子非保守序列的随机化, Siegl 等在组成型启动子 *ermEp1* 的基础上进行改造, 建立了一个合成启动子库, 其中-35 区和-10 区的上游、中间、下游序列完全随机, 随后用报告基因测定分析了 56 个合成启动子, 这些启动子的强度是 *ermEp1* 的 2%–319%, 其中 21 表现最佳^[69]。这项研究从代谢调控网络的角度提供了观点, 认为合成启动子比天然启动子更有利, 因其不易受菌体内复杂调控的干扰。同样地, Bai 等在随后的研究中以 *kasO*p* 启动子为模板, 构建了 2 个随机突变的启动子文库, 分别对 *kasO*p* 的-10 区下游序列、-10 区和-35 区之间的间隔序列进行突变, 所得到的 180 个合成启动子的活性范围是 *kasO*p* 的 0.95%–187.5%, 有 6 个启动子表现优于 *kasO*p*, 其中 5 个来自第一个文库; 另外对部分启动子做进一步测序后发现, 工程化的短序列强启动子不太可能对全局调控因子造成干扰, 这为合理设计 BGCs

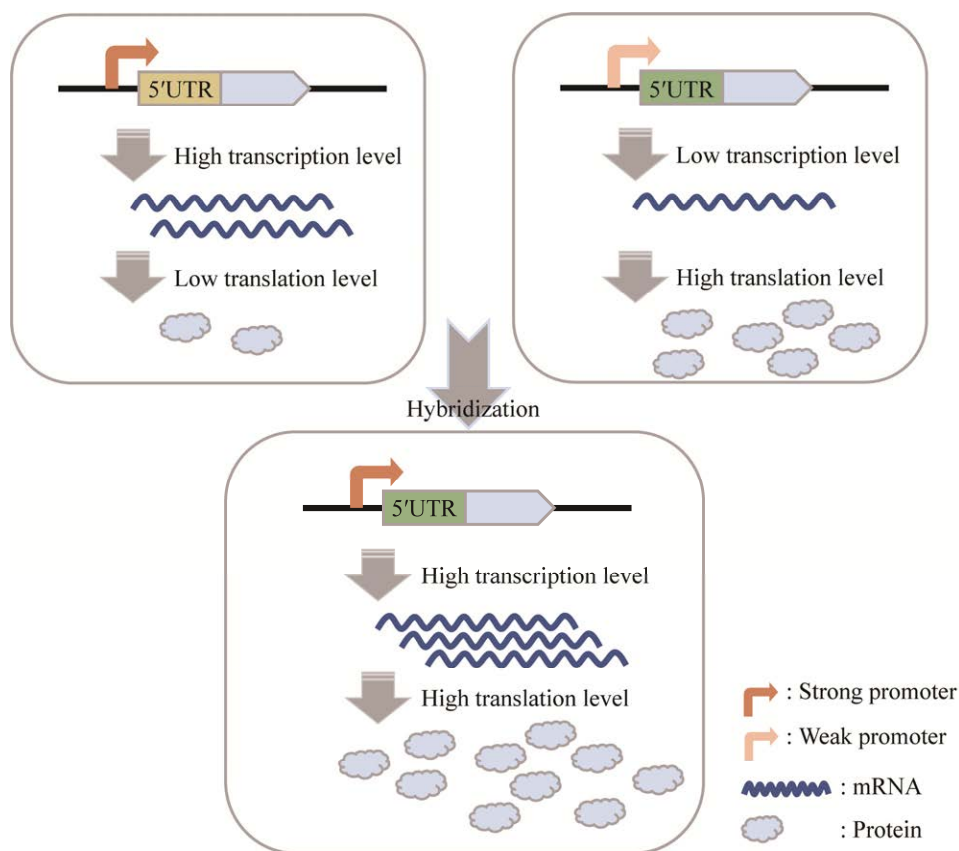


图 4 启动子-5'UTR 融合设计

Figure 4 Promoter and 5'UTR fusion strategy.

的通路特异性调控系统提供了一个巨大的契机^[70]。因此，合成启动子文库的构建对激活和优化次级代谢产物生物合成路径具有重要的应用价值。

2018年，Ji等构建了一个具有组合活性的链霉菌人工序列库，他们利用单模块的非核糖体肽合酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)开发了启动子报告系统，该酶可催化合成靛蓝色素(indigoidine)，从而能够快速筛选大量序列；之后对*S. albus* J1074中启动子与RBS高度随机组合的序列进行筛选，并依据色素生产能力划分出强、中、弱的不同活性，其中A26、A35表现最佳，所测定的强度与*kasO**p相当^[71]。2023年，该研究团队报道在CaExTun平台构建

中使用同样的人工序列库驱动Cas9蛋白表达并进行筛选，在保证剪切能力的同时减轻Cas9相关毒性，最终成功实现了链霉菌底盘的特异性基因编辑^[72]。

除-10区和-35区典型的特征序列外，还有一些特殊碱基序列在启动子功能发挥上产生关键影响。之前已有研究表明链霉菌启动子-10区的扩展序列与强度高低具有相关性，*E. coli*和*Bacillus subtilis*的研究中也提及-15区序列^[30,73]这一概念。2019年，Han等基于前期研究工作，针对源于*B. subtilis*的强启动子*P_{srfA}*的-15区进行两轮迭代突变，依次构建2个启动子文库，最终获得强度比*P_{srfA}*高约3倍的突变体*P_{BH4}*^[74]。另外，*E. coli*中-35区上游的UP元件也曾被设

计改造用于微调基因表达。Presnell 等通过对 UP 元件区域实施随机突变建库, 鉴定获得 5 个新的 UP 元件序列, 将其用于激活 *E. coli* 核心启动子 *rrnD*, 最终所得强度比广泛存在的细菌强启动子 *OXB15* 更高^[75]。这项工作提出并验证了一种新的启动子工程策略, 对链霉菌人工启动子构建同样具有借鉴意义。

3.3 启动子的人工智能学习设计

已有的人工启动子开发策略难以获得全新的正交性链霉菌人工启动子, 容易受到宿主菌株内源代谢环境影响, 无法保证合成生物系统的绝缘性与稳定性, 而人工智能技术的迅猛发展为序列的全新设计提供了新的机遇(图 5)。该方法已用于 *E. coli* 及 *Saccharomyces cerevisiae*

等的相关研究。

2020 年, Wang 等报道了一种基于人工智能的新型 *E. coli* 启动子从头设计模型, 该模型以天然启动子序列特征为指导, 通过捕获不同位点核苷酸间的相互作用, 设计了一批全新的人工启动子, 并将引导人工序列搜索的深度生成模型与预测模型相结合, 预选出最有可能的启动子序列; 经过两轮优化, 70.8% 人工智能设计的启动子在体内试验中呈现功能性, 且很少与 *E. coli* 基因组序列存在显著相似性^[76]。Zhao 等则首先对 P_{rc} 开展 83 轮突变试验以得到一个丰富有效的启动子文库, 优化后的 XgBoost 模型在启动子序列与转录强度内在关系探究中表现良好, 精准预测了人工启动子序列的强度^[77]。

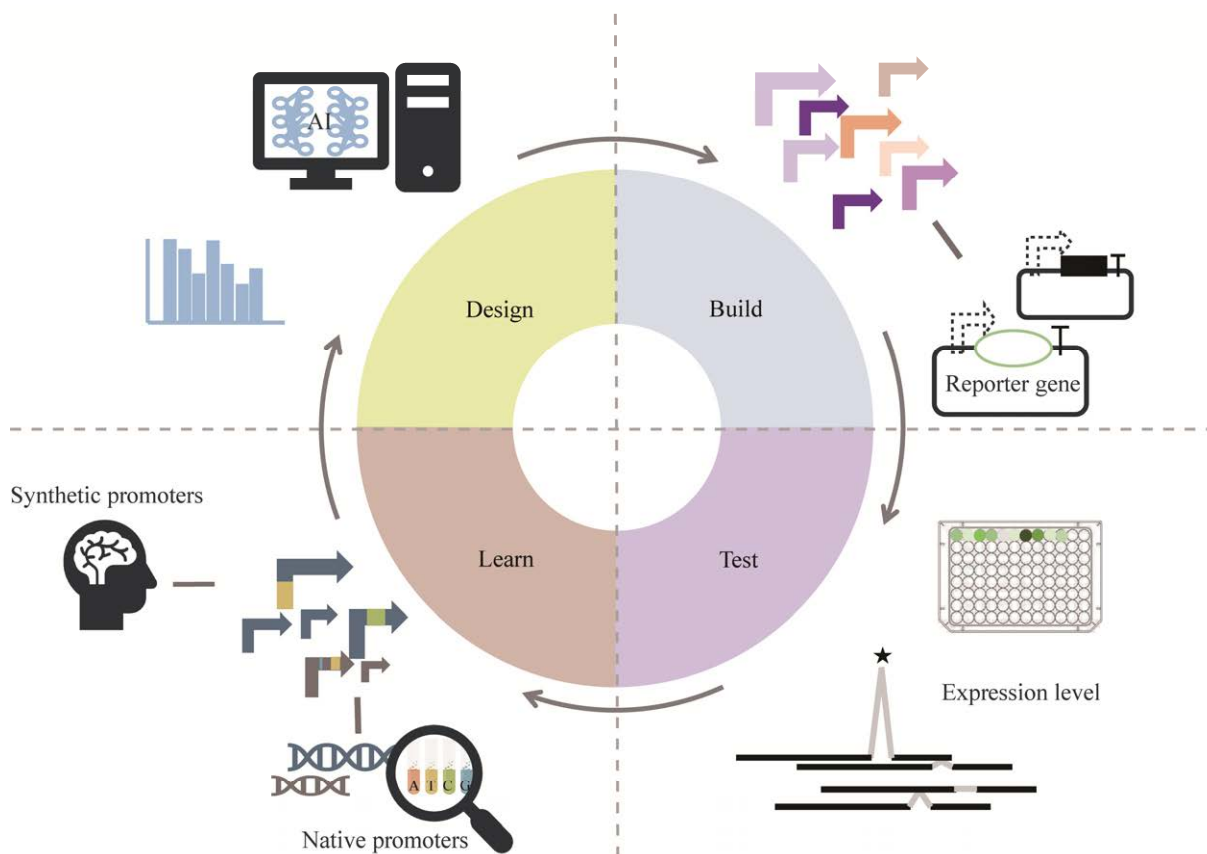


图 5 人工智能技术辅助启动子开发

Figure 5 Artificial intelligence technology-assisted promoter development.

Vaishnav 等在 2022 年利用两项关键技术 in *S. cerevisiae* 中成功构建基因表达的“神预言”模型；第一项技术是高通量实验，在 *S. cerevisiae* 细胞群体中，不同的细胞携带不同的启动子，数量共计超 3 000 万个，每条启动子长度为 80 bp，测试所有启动子下游编码黄色荧光蛋白 *yfp* 基因的表达并加以量化；之后，将得到的表达数据输入第二项技术——卷积神经网络，训练神经网络预测基因表达，并验证了该网络预测基因表达的能力，展现出极大的潜力^[78]。

在挖掘重要生物学特征、探求特征之间隐含的复杂关系等方面，人工智能技术表现出独特的优势。同时有望改进算法，进一步精简计算结果，从而减轻试验验证负担，提高启动子设计和优化的效率。目前，链霉菌启动子库的精准构建和强启动子的高效筛选依旧是研究者们追求的目标，人工智能技术的不断革新为这一领域注入活力，引导启动子的开发由随机走向理性，未来有望为链霉菌天然产物合成提供新的理论基础。

4 链霉菌启动子在天然产物合成中的应用

4.1 原位激活

激活链霉菌中沉默 BGCs 的策略按照表达宿主分类可大致分为原位激活和异源表达。原位激活是在原始宿主中利用表达调控元件微调基因表达而改善代谢网络，实现沉默 BGCs 的生产。为了发现和表征新的天然产物，无须对目标 BGC 进行完全重构即可实现激活目的这一普适性方法非常理想，具体可以通过整合途径特异性的关键基因表达盒、替换沉默基因上游的天然启动子等。2015 年，Li 等鉴定和评价了一系列链霉菌组成型启动子，并将其中 4 个

不同强度的启动子应用于“即插即用”平台，实现了捷达霉素 B 多层次水平的生产，这项研究同时也丰富了已有的链霉菌启动子工具箱^[79]。同年，利用组成型启动子 *ermE**p 过表达通路特异性调控基因 *chal*，成功激活了 *S. chattanoogensis* L10 中的 angucyline BGC^[19]。2022 年，为表征 *S. chattanoogensis* L10 中的另一天然产物 lanthomicins A-C，Liu 等将多顺反子表达盒 *ltmF1-D3* 克隆至整合载体，设计使用强启动子 *kasO**p 驱动，在质粒导入宿主后，核心基因的过表达使固体平板与液体培养基均呈现明显棕色，证明了该基因簇被成功激活^[80]。

伴随 CRISPR 技术的发展，链霉菌基因编辑工具库得以扩充。Zhang 等报道了一种基于 CRISPR-Cas9 的启动子敲入策略(图 6)，他们使用 *kasO**p 启动子激活了 5 株链霉菌中的多个沉默 BGCs，并在 *Streptomyces viridochromogenes* 中发现了一种新型芳香聚酮类天然产物^[21]。运用相同策略，在编码 LAL 转录激活因子的 *aurR1* 基因前敲入启动子 *kasO**p，成功获得具有强大抗菌活性的奥罗霉素(auroramycin)^[81]。研究人员设计了一个链霉菌自维持系统(*Streptomyces* self-sustained system, *StSS*)，其包含初级代谢功能模块(primary metabolism module, PM)和次级代谢功能模块(secondary metabolism module, SM)；在 PM 设计中，使用 CRISPR-Cas9 将强启动子 *PkasO**_{R15} 突变体 *P12-16* 插入至 BGC 关键基因前，加以在 SM 中使用次级代谢启动子驱动表达 σ^{hndB} ，最终实现多个天然产物产量的明显提升，其中十一烷基灵菌红素达到目前报道的最高产量 1.1 g/L^[82]。随着 CRISPR 工具在链霉菌中得到广泛应用，2020 年，本课题组 Zhang 等开发了 3 个高效的 CRISPR-*FnCas12a* 系统，每个系统在不同的应用中展现出独特的优势，并利用该工具在 *Streptomyces roseosporus*

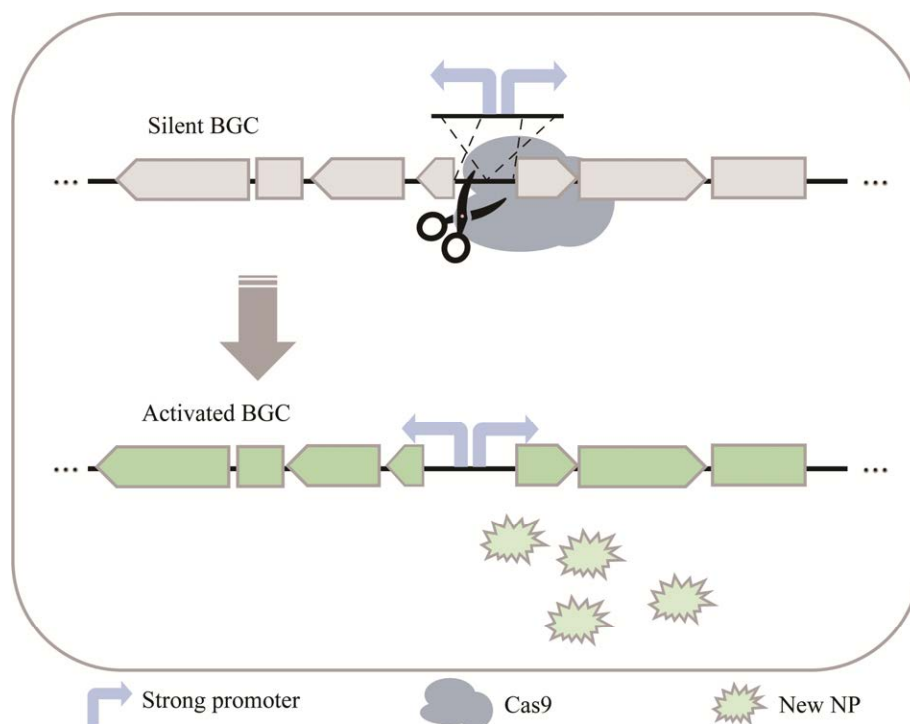


图 6 基于 CRISPR-Cas9 的启动子敲入策略 NP: 天然产物

Figure 6 The knock-in strategy based on CRISPR-Cas9. NP: Natural product.

的达托霉素(daptomycin) BGC 中敲入启动子 *kasO**p, 成功提高了产物产量^[83]。这种潜在可扩展的策略是对现有激活方法的补充, 有助于新型生物活性化合物的发现。

4.2 异源表达

在合适的异源宿主中利用高效功能元件重塑 BGCs 是常见的链霉菌天然产物激活方法, 可较为有效地绕过原本复杂的代谢调控网络, 从而实现目标产物的生物合成或大量生产。Shao 等在“即插即用”平台中利用 *gapdhp*、*rpsLp* 启动子组装生物合成基因和辅助元件成功重构生物合成路径, 在 *S. lividans* 中实现了源于 *Streptomyces orinoci* 的沉默 spectinabilin BGC 的激活^[84]。同年, Luo 等基于相近思路表征了来自 *S. griseus* 的一个沉默 BGC SGR810-815, 并发现了 3 个新型多环四酸酯大内酰胺^[85]。通过利用组成型强启动子以及 DNA 组装技术, 研

究者实现了杀虫大环内酯多杀菌素在 *S. albus* J1074 中的高效异源生产^[86]。此外, Bauman 等对由 4 个操纵子组成的总长度超过 40 kb 的 streptophenazine BGC 进行了完整重构, 通过综合利用强启动子 *ermE**p、*actIp*、sp44 和 p21, 最终在 *S. coelicolor* M1146 中实现了该 BGC 的异源表达, 产生了 100 多个具有抗菌活性的 streptophenazine 类似物^[87]。这一成果显著地扩展了现有的链霉菌天然产物资源宝库。

基因编辑技术的发展也为天然产物异源表达提供了新的机会。Kang 等结合 CRISPR-Cas9 和 TAR 技术开发了一种基于酵母的启动子工程平台 mCRISTAR, 该方法可实现单个标记的大基因簇的多重启动子工程; 在一轮操作中, 4 个启动子盒被同时插入至基因簇, 便于 BGCs 中启动子的多重替换, 有助于从微生物基因组及宏基因组测序项目中迅速增长的基因簇集合里

发现天然产物^[88]。通过 mCRISTAR 这一简单通用的方法,在酵母中实现了链霉菌 lazarimide 和 AB1210 两个 BGCs 的重构^[88],并在之后再次利用该平台顺利激活了 *S. albus* 中放线紫红素的异源表达^[71]。基于 mCRISTAR,研究人员分别在 2019、2020 年开发建立了 miCASTAR^[89]、mpCRISTAR^[90]两种新的方法。不同于 mCRISTAR 使用一个 CRISPR 阵列来实现多个启动子盒的同时替换,mpCRISTAR 将 gRNA 分别构建在不同质粒上,之后经过共转化来达到这一目标,克服了 CRISPR 阵列构建复杂、难以灵活更换等问题^[90]。miCASTAR 则利用 Cas9、sgRNAs 等在体外完成基因簇的分解步骤,再通过 TAR 实现启动子盒与基因簇的重新组装,避免了 CRISPR-Cas9 质粒构建与转化的耗时操作,成功应用激活了 atolypene BGC,鉴定得到两种尚未报道的产物 atolypene A 和 B^[89]。2022 年,Zhao 等对该方法进行改进,将筛选标记插入到载体上的独立位点,并同时引入 SP43、SP42、SP22 这 3 个启动子,最终在宿主 *S. coelicolor* M1154 中实现了 thaxtomin A 的最高产量 504.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[15]。我们相信链霉菌中类似技术的开发必将为大型 BGCs 的重构激活带来便利。

5 结论与展望

链霉菌天然产物的激活和高产主要通过原位激活、异源表达两种方式实现,具体包括在原始宿主中整合路径特异性的关键基因表达盒、替换沉默基因上游的天然启动子,以及在合适的异源宿主中利用高效功能元件重塑 BGCs 等方法,大多需要启动子的参与。天然宿主中的产物开发极大地受限于宿主本身的培养及操作条件,异源宿主的表达环境虽规避了此局限,却仍受制于 BGCs 的代谢需求。现有工具对于调控网络分析及产物预测仍然非常有

限。Liu 等报道了与非模式微生物具有生物技术相关性的 σ^{54} 依赖型启动子的 CRISPRa 激活系统,能够实现远程多层次的正交基因调控^[91]。该系统契合沉默 BGCs 激活的理论研究与工业应用,有望通过进一步修饰投入链霉菌使用。Cas9 蛋白毒性一直都是相关基因编辑工具使用受限的因素之一,2022 年,Je 等构建了 CaExTun 平台,利用随机化组成型启动子进行菌株特异性的 Cas9 表达调控,在减轻链霉菌中相关毒性的同时保证了高效的双链断裂能力^[72]。合理利用 CaExTun 平台策略,对敲入启动子以实现不同链霉菌底盘中的天然产物激活等编辑应用将十分有益。

链霉菌启动子在天然产物开发中发挥重要作用,其序列特征相较于大肠杆菌中典型的原核启动子更为复杂。目前性能优良的启动子数量有限,持续深入地研究与开发仍然十分必要,现有开发策略主要针对天然启动子的挖掘和人工启动子的设计构建。天然启动子中,诱导型启动子的理论背景与实际应用不及组成型启动子成熟、丰富,可从其他微生物底盘的研究成果里寻求共通性和新思路。UP 区域、-35 区、-10 区扩展序列、-10 区以及 5'UTR 等特征序列与启动子强度相关联,在启动子设计过程中均不可忽略。另外,人工智能技术的发展为全新链霉菌启动子开发的“质”与“量”飞跃注入了强大动力,其在模式底盘 *E. coli*、*S. cerevisiae* 中已有一定研究进展。与此同时,面对数量庞大的启动子文库,开发方便可用的高通量筛选测定方法对提高实验效率来说必不可少。随着数据资源的快速增长,人工智能技术以及自动化技术不断精进,智能制造的理念逐步引入合成生物学中,针对链霉菌启动子的设计也真正走向理性,天然产物的挖掘将迈向新的未来。

REFERENCES

- [1] RODRIGUES T, REKER D, SCHNEIDER P, SCHNEIDER G. Counting on natural products for drug design[J]. *Nature Chemistry*, 2016, 8(6): 531-541.
- [2] NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(3): 629-661.
- [3] LIU R, DENG ZX, LIU TG. *Streptomyces* species: ideal chassis for natural product discovery and overproduction[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 74-84.
- [4] BARKA EA, VATSA P, SANCHEZ L, GAVEAU-VAILLANT N, JACQUARD C, MEIER-KOLTHOFF JP, KLENK HP, CLÉMENT C, OUHDOUCH Y, van WEZEL GP. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(1): 1-43.
- [5] ZHAO QY, WANG LP, LUO YZ. Recent advances in natural products exploitation in *Streptomyces* via synthetic biology[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2019, 19(6): 452-462.
- [6] OLGA G. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics[J]. *Natural Product Reports*, 2017, 34(10): 1203-1232.
- [7] AIGLE B, LAUTRU S, SPITELLER D, DICKSCHAT JS, CHALLIS GL, LEBLOND P, PERNODET JL. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2014, 41(2): 251-263.
- [8] WARD AC, ALLENBY NE. Genome mining for the search and discovery of bioactive compounds: the *Streptomyces* paradigm[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2018, 365(24): fny240.
- [9] YANG ZJ, HE JQ, WEI X, JU JH, MA JY. Exploration and genome mining of natural products from marine *Streptomyces*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(1): 67-76.
- [10] MCLEAN TC, WILKINSON B, HUTCHINGS MI, DEVINE R. Dissolution of the disparate: co-ordinate regulation in antibiotic biosynthesis[J]. *Antibiotics*, 2019, 8(2): 83-100.
- [11] RUTLEDGE PJ, CHALLIS GL. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(8): 509-523.
- [12] XIA HY, LI XF, LI ZQ, ZHAN XQ, MAO XM, LI YQ. The application of regulatory cascades in *Streptomyces*: yield enhancement and metabolite mining[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 406.
- [13] KANG HS, KIM ES. Recent advances in heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* hosts[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 69: 118-127.
- [14] WU QB, ZHANG XY, CHEN XA, LI YQ. Improvement of FK506 production via metabolic engineering-guided combinational strategies in *Streptomyces tsukubaensis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 166.
- [15] ZHAO XJ, ZONG YQ, WEI WJ, LOU CB. Multiplexed promoter engineering for improving thaxtomin A production in heterologous *Streptomyces* hosts[J]. *Life*, 2022, 12(5): 689.
- [16] CHU LY, LI SS, DONG ZX, ZHANG YY, JIN PJ, YE L, WANG XJ, XIANG WS. Mining and engineering exporters for titer improvement of macrolide biopesticides in *Streptomyces*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2022, 15(4): 1120-1132.
- [17] CAMERON DE, BASHOR CJ, COLLINS JJ. A brief history of synthetic biology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(5): 381-390.
- [18] ZHANG XE, LIU CL, DAI JB, YUAN YJ, GAO CX, FENG Y, WU B, WEI P, YOU C, WANG XW, SI T. Enabling technology and core theory of synthetic biology[J]. *Science China Life Sciences*, 2023: 1-44.
- [19] ZHOU ZX, XU QQ, BU QT, GUO YY, LIU SP, LIU Y, DU YL, LI YQ. Genome mining-directed activation of a silent angucycline biosynthetic gene cluster in *Streptomyces chattanoogensis*[J]. *ChemBioChem*, 2015, 16(3): 496-502.
- [20] TAO WX, YANG AN, DENG ZX, SUN YH. CRISPR/Cas9-based editing of *Streptomyces* for discovery, characterization, and production of natural products[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1660.
- [21] ZHANG MM, WONG FT, WANG YJ, LUO SW, LIM YH, HENG E, YEO WL, COBB RE, ENGHIAI B, ANG EL, ZHAO HM. CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(6): 607-609.
- [22] GOMEZ-ESCRIBANO JP, CASTRO JF, RAZMILIC V, JARMUSCH SA, SAALBACH G, EBEL R, JASPARS M, ANDREWS B, ASENJO JA, BIBB MJ. Heterologous expression of a cryptic gene cluster from *Streptomyces leeuwenhoekii* C34^T yields a novel lasso peptide, leeceptin[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(23): e01752-e01719.

- [23] PRIBNOW D. Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1975, 72(3): 784-788.
- [24] LANZER M, BUJARD H. Promoters largely determine the efficiency of repressor action[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85(23): 8973-8977.
- [25] KLEIN CA, TEUFEL M, WEILE CJ, SOBETZKO P. The bacterial promoter spacer modulates promoter strength and timing by length, TG-motifs and DNA supercoiling sensitivity[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 24399.
- [26] FORQUET R, NASSER W, REVERCHON S, MEYER S. Quantitative contribution of the spacer length in the supercoiling-sensitivity of bacterial promoters[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(13): 7287-7297.
- [27] BIBB MJ, JANSSEN GR, WARD JM. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*[J]. Gene, 1985, 38(1/3): 215-226.
- [28] MANOME T, HOSHINO E. Cloning of DNA fragments containing *Streptomyces* promoter activity[J]. The Journal of Antibiotics, 1987, 40(10): 1440-1447.
- [29] STROHL WR. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters[J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20(5): 961-974.
- [30] SEGHEZZI N, AMAR P, KOEBMANN B, JENSEN PR, VIROLLE MJ. The construction of a library of synthetic promoters revealed some specific features of strong *Streptomyces* promoters[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(2): 615-623.
- [31] JEONG Y, KIM JN, KIM MW, BUCCA G, CHO S, YOON YJ, KIM BG, ROE JH, KIM SC, SMITH CP, CHO BK. The dynamic transcriptional and translational landscape of the model antibiotic producer *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11605.
- [32] HWANG S, LEE N, JEONG Y, LEE Y, KIM W, CHO S, PALSSON BO, CHO BK. Primary transcriptome and translational analysis determines transcriptional and translational regulatory elements encoded in the *Streptomyces clavuligerus* genome[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(12): 6114-6129.
- [33] DROSTE J, RÜCKERT C, KALINOWSKI J, HAMED MB, ANNÉ J, SIMOENS K, BERNAERTS K, ECONOMOU A, BUSCHE T. Extensive reannotation of the genome of the model streptomycete *Streptomyces lividans* TK24 based on transcriptome and proteome information[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 604034.
- [34] LEE Y, LEE N, HWANG S, KIM W, CHO S, PALSSON BO, CHO BK. Genome-scale analysis of genetic regulatory elements in *Streptomyces avermitilis* MA-4680 using transcript boundary information[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 68.
- [35] LABES G, BIBB M, WOHLLEBEN W. Isolation and characterization of a strong promoter element from the *Streptomyces ghanaensis* phage I19 using the gentamicin resistance gene (*aacC1*) of Tn 1696 as reporter[J]. Microbiology, 1997, 143 (5): 1503-1512.
- [36] WANG WS, LI X, WANG J, XIANG SH, FENG XZ, YANG KQ. An engineered strong promoter for *streptomycetes*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(14): 4484-4492.
- [37] SPRUŠANSKÝ O, ŘEŽUCHOVÁ B, HOMEROVÁ D, KORMANEC J. Expression of the gap gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptomyces aureofaciens* requires GapR, a member of the AraC/XylS family of transcriptional activators[J]. Microbiology, 2001, 147(5): 1291-1301.
- [38] ECKHARDT T, STRICKLER J, GORNIAC L, BURNETT WV, FARE LR. Characterization of the promoter, signal sequence, and amino terminus of a secreted beta-galactosidase from *Streptomyces lividans*[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(9): 4249-4256.
- [39] TIELEMAN LN, van WEZEL GP, BIBB MJ, KRAAL B. Growth phase-dependent transcription of the *Streptomyces ramocissimus tufl* gene occurs from two promoters[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(11): 3619-3624.
- [40] FORNWALD JA, SCHMIDT FJ, ADAMS CW, ROSENBERG M, BRAWNER ME. Two promoters, one inducible and one constitutive, control transcription of the *Streptomyces lividans* galactose operon[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84(8): 2130-2134.
- [41] HERAI S, HASHIMOTO Y, HIGASHIBATA H, MASEDA H, IKEDA H, OMURA S, KOBAYASHI M. Hyper-inducible expression system for *streptomycetes*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(39): 14031-14035.

- [42] DELIC I, ROBBINS P, WESTPHELING J. Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(5): 1885-1889.
- [43] MURAKAMI T, HOLT TG, THOMPSON CJ. Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(3): 1459-1466.
- [44] ZHANG GX, LIU P, WEI W, WANG XD, WEI DZ, WANG W. A light-switchable bidirectional expression system in filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 240: 85-93.
- [45] LI W, LI HX, JI SY, LI S, GONG YS, YANG MM, CHEN YL. Characterization of two temperature-inducible promoters newly isolated from *B. subtilis*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007, 358(4): 1148-1153.
- [46] LIU S, WANG M, DU GC, CHEN J. Improving the active expression of transglutaminase in *Streptomyces lividans* by promoter engineering and codon optimization[J]. BMC Biotechnology, 2016, 16(1): 75.
- [47] LUO YZ, ZHANG L, BARTON KW, ZHAO HM. Systematic identification of a panel of strong constitutive promoters from *Streptomyces albus*[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(9): 1001-1010.
- [48] WANG XR, NING XJ, ZHAO QQ, KANG QJ, BAI LQ. Improved PKS gene expression with strong endogenous promoter resulted in geldanamycin yield increase[J]. Biotechnology Journal, 2017, 12(11): 1700321.
- [49] JIN PJ, LI SS, ZHANG YY, CHU LY, HE HR, DONG ZX, XIANG WS. Mining and fine-tuning sugar uptake system for titer improvement of milbemycins in *Streptomyces bingchenggensis*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2020, 5(3): 214-221.
- [50] WANG K, CHEN XA, LI YQ, MAO XM. Identification of a secondary metabolism-responsive promoter by proteomics for over-production of natamycin in *Streptomyces*[J]. Archives of Microbiology, 2019, 201(10): 1459-1464.
- [51] WANG K, LIU XF, BU QT, ZHENG Y, CHEN XA, LI YQ, MAO XM. Transcriptome-based identification of a strong promoter for hyper-production of natamycin in *Streptomyces*[J]. Current Microbiology, 2019, 76(1): 95-99.
- [52] YANG TJ, YANG KQ, CHEN YH, FAN KQ. Characterization of a bi-directional promoter *otrRp* involved in oxytetracycline biosynthesis[J]. Current Microbiology, 2019, 76(11): 1264-1269.
- [53] PAN XW, TANG M, YOU JJ, HAO YN, ZHANG X, YANG TW, RAO ZM. A novel method to screen strong constitutive promoters in *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* for industrial applications[J]. Biology, 2022, 12(1): 71.
- [54] RODRÍGUEZ-GARCÍA A, COMBES P, PÉREZ-REDONDO R, SMITH MCA, SMITH MCM. Natural and synthetic tetracycline-inducible promoters for use in the antibiotic-producing bacteria *Streptomyces*[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(9): e87.
- [55] HORBAL L, FEDORENKO V, LUZHETSKYY A. Novel and tightly regulated resorcinol and cumate-inducible expression systems for *Streptomyces* and other actinobacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(20): 8641-8655.
- [56] WANG WS, YANG TJ, LI YH, LI SS, YIN SL, STYLES K, CORRE C, YANG KQ. Development of a synthetic oxytetracycline-inducible expression system for *Streptomyces* using *de novo* characterized genetic parts[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(7): 765-773.
- [57] JI CH, KIM H, KANG HS. Synthetic inducible regulatory systems optimized for the modulation of secondary metabolite production in *Streptomyces*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(3): 577-586.
- [58] WANG X, FU YD, WANG MY, NIU GQ. Synthetic cellobiose-inducible regulatory systems allow tight and dynamic controls of gene expression in *Streptomyces*[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(8): 1956-1965.
- [59] NOGUCHI Y, KASHIWAGI N, UZURA A, OGINO C, KONDO A, IKEDA H, SOTA M. Development of a strictly regulated xylose-induced expression system in *Streptomyces*[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 151.
- [60] TAO XY, ZHAO M, ZHANG Y, LIU M, LIU QH, WANG W, WANG FQ, WEI DZ. Comparison of the expression of phospholipase D from *Streptomyces halstedii* in different hosts and its over-expression in *Streptomyces lividans*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2019, 366(5): fnz051.
- [61] TORRES-BACETE J, LUÍS GARCÍA J, NOGALES J. A portable library of phosphate-depletion based synthetic promoters for customizable and automata control of gene expression in bacteria[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(6): 2643-2658.
- [62] SANTOS-BENEIT F. The Pho regulon: a huge

- regulatory network in bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 402.
- [63] MATSUMOTO M, HASHIMOTO Y, SAITOH Y, KUMANO T, KOBAYASHI M. Development of nitrilase promoter-derived inducible vectors for *Streptomyces*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(6): 1230-1237.
- [64] LI SS, WANG JY, XIANG WS, YANG KQ, LI ZL, WANG WS. An autoregulated fine-tuning strategy for titer improvement of secondary metabolites using native promoters in *Streptomyces*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(2): 522-530.
- [65] BARREALES EG, VICENTE CM, de PEDRO A, SANTOS-ABERTURAS J, APARICIO JF. Promoter engineering reveals the importance of heptameric direct repeats for DNA binding by *Streptomyces* antibiotic regulatory protein-large ATP-binding regulator of the LuxR family (SARP-LAL) regulators in *Streptomyces natalensis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(10): e00246-e00218.
- [66] YI JS, KIM MW, KIM M, JEONG Y, KIM EJ, CHO BK, KIM BG. A novel approach for gene expression optimization through native promoter and 5' UTR combinations based on RNA-seq, Ribo-seq, and TSS-seq of *Streptomyces coelicolor*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(3): 555-565.
- [67] ZHAO M, WANG SL, TAO XY, ZHAO GL, REN YH, WANG FQ, WEI DZ. Engineering diverse eubacteria promoters for robust gene expression in *Streptomyces lividans*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 289: 93-102.
- [68] XU HL, YANG C, TIAN XT, CHEN YL, LIU WQ, LI J. Regulatory part engineering for high-yield protein synthesis in an all-*Streptomyces*-based cell-free expression system[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(2): 570-578.
- [69] SIEGL T, TOKOVENKO B, MYRONOVSKIY M, LUZHETSKYY A. Design, construction and characterisation of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 98-106.
- [70] BAI CX, ZHANG Y, ZHAO XJ, HU YL, XIANG SH, MIAO J, LOU CB, ZHANG LX. Exploiting a precise design of universal synthetic modular regulatory elements to unlock the microbial natural products in *Streptomyces*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(39): 12181-12186.
- [71] JI CH, KIM JP, KANG HS. Library of synthetic *Streptomyces* regulatory sequences for use in promoter engineering of natural product biosynthetic gene clusters[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(8): 1946-1955.
- [72] JE HW, JI CH, KIM JY, KANG HS. CaExTun: mitigating Cas9-related toxicity in *Streptomyces* through species-specific expression tuning with randomized constitutive promoters[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(1): 61-70.
- [73] CHENG JT, GUAN CR, CUI WJ, ZHOU L, LIU ZM, LI WJ, ZHOU ZM. Enhancement of a high efficient autoinducible expression system in *Bacillus subtilis* by promoter engineering[J]. *Protein Expression and Purification*, 2016, 127: 81-87.
- [74] HAN LC, CUI WJ, SUO FY, MIAO SN, HAO WL, CHEN QQ, GUO JL, LIU ZM, ZHOU L, ZHOU ZM. Development of a novel strategy for robust synthetic bacterial promoters based on a stepwise evolution targeting the spacer region of the core promoter in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 96.
- [75] PRESNELL KV, FLEXER-HARRISON M, ALPER HS. Design and synthesis of synthetic UP elements for modulation of gene expression in *Escherichia coli*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2019, 4(2): 99-106.
- [76] WANG Y, WANG HC, WEI L, LI SL, LIU LY, WANG XW. Synthetic promoter design in *Escherichia coli* based on a deep generative network[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(12): 6403-6412.
- [77] ZHAO M, YUAN ZQ, WU LT, ZHOU SH, DENG Y. Precise prediction of promoter strength based on a *de novo* synthetic promoter library coupled with machine learning[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(1): 92-102.
- [78] VAISHNAV ED, de BOER CG, MOLINET J, YASSOUR M, FAN L, ADICONIS X, THOMPSON DA, LEVIN JZ, CUBILLOS FA, REGEV A. The evolution, evolvability and engineering of gene regulatory DNA[J]. *Nature*, 2022, 603(7901): 455-463.
- [79] LI SS, WANG JY, LI X, YIN SL, WANG WS, YANG KQ. Genome-wide identification and evaluation of constitutive promoters in *Streptomyces*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 172.
- [80] LIU XF, WANG JX, CHEN XA, LIU Y, LI YQ. Activation and characterization of lanthomicins A-C by promoter engineering in *Streptomyces chattanoogensis*

- L10[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 902990.
- [81] LIM YH, WONG FT, YEO WL, CHING KC, LIM YW, HENG E, CHEN SW, TSAI DJ, LAUDERDALE TL, SHIA KS, HO YS, HOON S, ANG EL, ZHANG MM, ZHAO HM. Auroramycin: a potent antibiotic from *Streptomyces roseosporus* by CRISPR-Cas9 activation[J]. *ChemBioChem*, 2018, 19(16): 1716-1719.
- [82] ZHAO M, WANG MR, WANG SL, XIONG LB, GAO B, LIU M, TAO XY, WANG FQ, WEI DZ. A self-sustained system spanning the primary and secondary metabolism stages to boost the productivity of *Streptomyces*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(1): 353-365.
- [83] ZHANG J, ZHANG D, ZHU J, LIU HY, LIANG SF, LUO YZ. Efficient multiplex genome editing in *Streptomyces* via engineered CRISPR-Cas12a systems[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 726.
- [84] SHAO ZY, RAO GD, LI C, ABIL Z, LUO YZ, ZHAO HM. Refactoring the silent spectinabilin gene cluster using a plug-and-play scaffold[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(11): 662-669.
- [85] LUO YZ, HUANG H, LIANG J, WANG M, LU L, SHAO ZY, COBB RE, ZHAO HM. Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2894.
- [86] SONG CY, LUAN J, CUI QW, DUAN QY, LI Z, GAO YS, LI RJ, LI AY, SHEN YM, LI YZ, STEWART AF, ZHANG YM, FU J, WANG HL. Enhanced heterologous spinosad production from a 79-kb synthetic multioperon assembly[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(1): 137-147.
- [87] BAUMAN KD, LI J, MURATA K, MANTOVANI SM, DAHESH S, NIZET V, LUHAVAYA H, MOORE BS. Refactoring the cryptic streptopenazine biosynthetic gene cluster unites phenazine, polyketide, and nonribosomal peptide biochemistry[J]. *Cell Chemical Biology*, 2019, 26(5): 724-736.
- [88] KANG HS, CHARLOP-POWERS Z, BRADY SF. Multiplexed CRISPR/Cas9- and TAR-mediated promoter engineering of natural product biosynthetic gene clusters in yeast[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(9): 1002-1010.
- [89] KIM SH, LU WL, AHMADI MK, MONTIEL D, TERNEI MA, BRADY SF. Atolypenes, tricyclic bacterial sesterterpenes discovered using a multiplexed *in vitro* Cas9-TAR gene cluster refactoring approach[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(1): 109-118.
- [90] KIM H, JI CH, JE HW, KIM JP, KANG HS. mpCRISTAR: multiple plasmid approach for CRISPR/Cas9 and TAR-mediated multiplexed refactoring of natural product biosynthetic gene clusters[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(1): 175-180.
- [91] LIU Y, WAN XY, WANG BJ. Engineered CRISPRa enables programmable eukaryote-like gene activation in bacteria[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3693.