

研究报告

拟无枝酸菌属次级代谢潜能分析及代表菌株基因编辑体系建立

杨英哲^{1,2}, 范可强², 王海燕², 向丽军^{2,3}, 张书平¹, 赵燕¹, 潘国辉^{*2,3}

1 山东第一医科大学(山东省医学科学院) 生物医学科学学院(省医药生物技术研究中心), 山东 济南 250117

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学存济医学院, 北京 101408

杨英哲, 范可强, 王海燕, 向丽军, 张书平, 赵燕, 潘国辉. 拟无枝酸菌属次级代谢潜能分析及代表菌株基因编辑体系建立[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1713-1731.

YANG Yingzhe, FAN Keqiang, WANG Haiyan, XIANG Lijun, ZHANG Shuping, ZHAO Yan, PAN Guohui. Secondary metabolic potential of *Amycolatopsis* and development of gene editing systems for representative strains[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1713-1731.

摘要: 【背景】拟无枝酸菌属作为一类重要的稀有放线菌, 是抗菌、抗癌类药物的重要来源, 其合成天然产物的潜能尚待系统分析及发掘。【目的】揭示拟无枝酸菌属不同结构类型次级代谢产物合成潜能, 并建立两个代表性菌株的遗传操作体系, 为结构新颖或生物活性优良的次级代谢产物发掘及研究提供条件。【方法】使用多位点序列分析(multi-locus sequence analysis, MLSA)方法评价已公布的拟无枝酸菌基因组之间的相似度。同时, 使用 antiSMASH 分析所有基因组的基因簇, 预测其合成产物结构信息, 并利用 BiG-SCAPE 对基因簇进行聚类分析。利用 pSET152 整合载体优化两个代表性拟无枝酸菌的接合转移条件, 以建立遗传操作体系。采用 CRISPR-cBEST 碱基编辑和传统的同源重组确定靶基因失活方案。【结果】146 个拟无枝酸菌基因组的生物信息学分析显示, 平均每个基因组中含有 33 个基因簇。其中聚肽、聚酮及萜类合成基因簇的丰度较高, 并且大多数基因簇与已知化合物基因簇不同。成功确定了拟无枝酸菌属两个代表菌株的最适接合转移条件。尽管 CRISPR 基因编辑质粒能够转入拟无枝酸菌, 但 6 个载体均未成功编辑目标基因, 而利用传统同源重组方法则成功敲除目标基因, 建立了目的基因敲除系统。【结论】次级代谢潜能分析显示拟无枝酸菌属中蕴含丰富的新颖天然产物资源。此外, 成功建立的基因编辑体系实现了外源基因整合及内源基因敲除, 为该属新颖次级代谢产物的挖掘及生物合成研究提供了坚实的研究基础。

关键词: 拟无枝酸菌属; 次级代谢; 天然产物; 生物合成基因簇; 基因编辑

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2303100); 国家自然科学基金(32270080)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2303100) and the National Natural Science Foundation of China (32270080).

*Corresponding author. E-mail: panguohui@im.ac.cn

Received: 2024-02-02; Accepted: 2024-03-13; Published online: 2024-04-22

Secondary metabolic potential of *Amycolatopsis* and development of gene editing systems for representative strains

YANG Yingzhe^{1,2}, FAN Keqiang², WANG Haiyan², XIANG Lijun^{2,3}, ZHANG Shuping¹, ZHAO Yan¹, PAN Guohui^{*2,3}

1 Biomedical Sciences College & Shandong Medicinal Biotechnology Centre, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, Shandong, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China

Abstract: [Background] As an important group of rare actinomycetes, *Amycolatopsis* serves as a significant source of antimicrobial and anticancer drugs. The rich biosynthetic gene clusters (BGCs) of secondary metabolites in the genomes of *Amycolatopsis* await systematic analysis and mining. **[Objective]** To unveil the biosynthetic potential of secondary metabolites with different structural types in *Amycolatopsis* and establish genetic manipulation systems for two representative strains, laying a foundation for mining structurally novel or bioactive secondary metabolites. **[Methods]** The multi-locus sequence analysis (MLSA) was performed to evaluate the similarity among publicly available *Amycolatopsis* genomes. Simultaneously, antiSMASH was employed to analyze the gene clusters in all genomes and predict the structural information of the products. BiG-SCAPE was used for cluster analysis. The integration plasmid pSET152 was employed to optimize the conjugation transfer conditions for two representative *Amycolatopsis* strains, and then genetic manipulation systems were established. CRISPR-cBEST and homologous recombination were employed to determine the strategies for target gene inactivation. **[Results]** Bioinformatics analysis of 146 *Amycolatopsis* genomes revealed an average of 33 BGCs per genome. The BGCs associated with peptides, polyketides, and terpenes exhibited high abundance, with the majority differing from known BGCs. The optimal conjugation transfer conditions for two representative *Amycolatopsis* strains were successfully determined. Although CRISPR gene editing plasmids could be transferred into *Amycolatopsis*, none of the six vectors successfully edited the target gene. Conversely, target genes were successfully knocked out by homologous recombination, on the basis of which the gene editing systems were established. **[Conclusion]** The secondary metabolic potential unveils a rich repository of novel natural products within *Amycolatopsis*. Moreover, the successfully established genetic editing system enables the integration of exogenous genes and the inactivation of endogenous genes, laying a solid foundation for the mining and biosynthesis of novel secondary metabolites in this genus.

Keywords: *Amycolatopsis*; secondary metabolism; natural products; biosynthetic gene clusters; gene editing

放线菌(*Actinomycete*)是一类非常重要的微生物资源,可产生化学结构丰富、生物活性多样的次级代谢产物。微生物来源的生物活性化合物中,放线菌来源的物质占大约 2/3。其中,拟无枝酸菌(*Amycolatopsis* sp.)作为一类重要的稀有放线菌,曾一度被认为是抗菌、抗癌类药物的重要来源^[1]。拟无枝酸菌属的概念由 Lechavalier 等根据 IV 型细胞壁组成及缺少分枝菌酸等特征提出,目前该属已公布了 94 个种及 4 个亚种^[2]。拟无枝酸菌属代谢产物类型丰富^[3]、结构多样,目前已发现的有多酚类、线型聚酮类、大环内酯类、大环内酰胺类、噻唑肽、环肽、糖肽、酰胺、氨基衍生物、糖苷衍生物、烯二炔衍生物和倍半萜等类型化合物(图 1)。这些化合物活性多样,具有抗菌、抗癌、抗氧化、抗高血糖和酶抑制活性等^[2]。其中抗菌药物“明星”——万古霉素(*vancomycin*)^[4]由菌株 *Amycolatopsis orientalis* ATCC 43491 产生,同时该菌株还可产生与万古霉素结构相似、活性较好的化合物;临床抗生素利福霉素(*rifamycin*)^[5]产生菌 *A. mediterranei* 仍广泛应用于工业生产。*A. sulphurea* 中发现的四环素类化合物 *chelocardin*^[6], *A. sulphurea* MK299-95F4 产生的酰胺类衍生物 *epoxyquinomicins A-D*^[7], 以及其他拟无枝酸菌产生的 *kigamicins*^[8]、*macrotermycins A*^[9]、*thiazomycin*^[10]等也表现了良好的抗菌活性。此外, *A. mediterranei* MI710-51F6 中发现的线性聚酮类化合物 *dethymicin* 是一种免疫抑制剂,临床应用用于器官移植^[11]; *Amycolatopsis* sp. ML1-hF4 菌株产生的 *valgamicins V* 对一系列人类肿瘤细胞系具有优良的细胞毒性^[12], *Amycolatopsis* sp. ICBB 8242 菌株分离出的 2'-O-琥珀酰凋亡蛋白 A 和 3'-O-琥珀酰凋亡蛋白 A 可以抑制人类 H292 和 HeLa 细胞的增殖和活力^[13]。有些

Amycolatopsis 菌株还具有生物降解、生物转化和生物吸附的潜力,比如 *Amycolatopsis* sp. M3-1 可以降解环境中的除草剂^[14]。综上所述,拟无枝酸菌属及其次级代谢产物具有重要的研究价值。

拟无枝酸菌次级代谢产物的发现前期主要是通过筛选得到具有生物活性的次级代谢产物,再进行后续研究。随着测序技术的发展,拟无枝酸菌属的基因组逐渐丰富,目前还在不断增多。如今,随着对生物合成基因簇及生物合成途径认识深化以及下一代测序技术发展,我们能够利用细菌基因组信息预测其中蕴含的新天然产物合成能力。对万古霉素生产菌株 *A. orientalis* ATCC 43491 进行基因组测序分析,发现其不仅可以产生万古霉素,还可能产生其他 10 种有良好生物活性的次级代谢产物^[4]。然而,目前尚无文献对拟无枝酸菌属的次级代谢产物合成潜能进行系统的预测及统计分析。本文利用生物信息学分析,系统揭示了拟无枝酸菌属的次级代谢产物合成潜能,并选择了两个具有丰富且新颖次级代谢产物生物合成基因簇的代表性菌株建立基因编辑体系,为后续挖掘结构新颖、活性良好的化合物奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种和质粒

淡红拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis rubida*) CGMCC 4.1541 和木聚糖拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis xylanica*) CGMCC 4.7269 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ET12567/pUZ8002、*E. coli* JM109、质粒 pSET152-kasO*(pBS21003)^[15]和 pKC1139,本实验室保存。pCRISPR-cBEST^[16]由上海交通大学童焱俊课题组惠赠。

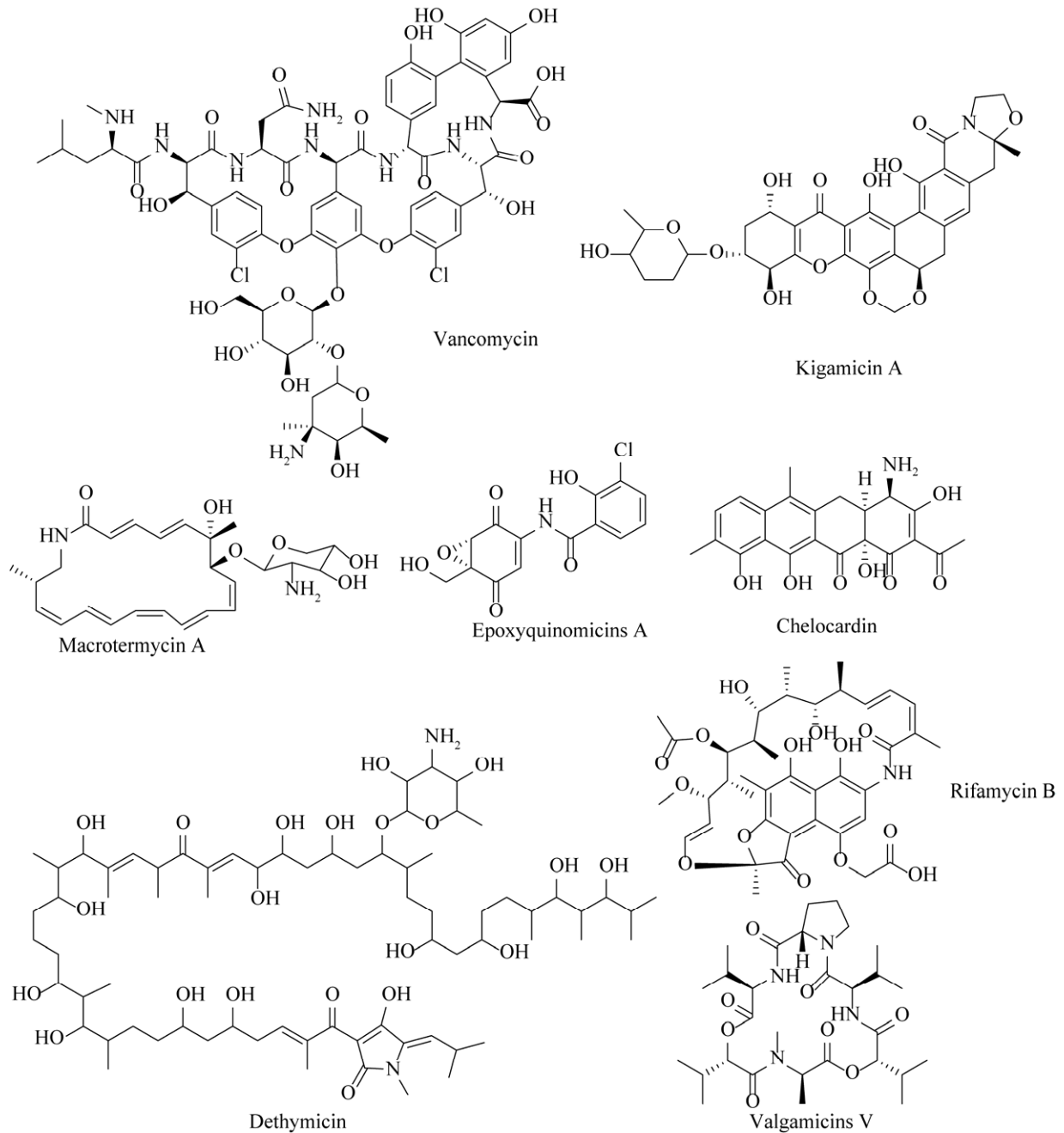


图 1 拟无枝酸菌属中发现的重要次级代谢产物

Figure 1 Representatives of the secondary metabolites discovered in *Amycolatopsis*.

1.2 主要试剂和仪器

抗生素, 上海源叶生物科技有限公司。分子克隆试剂, 北京博迈德基因技术有限公司、纽英伦生物技术(北京)有限公司。PCR 仪, Bio-Rad 公司; 移液器, 艾本德公司; 台式离心

机, Thermo Scientific 公司; 小型空气浴恒温摇床, 上海博彩生物科技有限公司; 凝胶成像仪, 上海天能科技有限公司; 水浴锅, 上海森信实验仪器有限公司。

本研究使用的引物信息见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	用途 Usage
pBE _{danh291} -f	ggttgtaggatcgacggcccatgctgtggatcgccatcgttttagagctagaaataga	Construction of gene editing plasmid
pBE _{danh291} -r	tctatttctagctctaaaacgatgccgatccacagcatggccgctcgatcctaccaacc	pBE _{danh291} for <i>A. rubida</i>
pBE _{mutLuxR} -f	ggttgtaggatcgacggcgcgaatccggctgctcgaacgttttagagctagaaataga	Construction of gene editing plasmid
pBE _{mutLuxR} -r	tctatttctagctctaaaacgttcgacgagccgattcgcgccgctcctaccaacc	pBE _{mutLuxR} for <i>A. xylanica</i>
pBE _{mutksβ} -f	ggttgtaggatcgacggcgcctggtcatctggtcgttttagagctagaaataga	Construction of gene editing plasmid
pBE _{mutksβ} -r	tctatttctagctctaaaacgaccgaccagatgaccaggcgcctcgatcctaccaacc	pBE _{mutksβ} for <i>A. xylanica</i>
BE _{sgdanhKSα} -f	ggttgtaggatcgacggcgcaggcgttcaagaattcgcgttttagagctagaaataga	Construction of gene editing plasmid
BE _{sgdanhKSα} -r	tctatttctagctctaaaacgcgaattcttgaacgcctcgcgccgctcctaccaacc	pBE _{danhKSα} for <i>A. rubida</i>
BE _{sgdanhKSβ} -f	ggttgtaggatcgacggcctcagaacatgtggagcaagtttagagctagaaataga	Construction of gene editing plasmid
BE _{sgdanhKSβ} -r	tctatttctagctctaaaactgtctccatgtctcagccgctcctaccaacc	pBE _{danhKSβ} for <i>A. rubida</i>
BE _{mutksα} -f	ggttgtaggatcgacggccccatttgcggatctcccgcgttttagagctagaaataga	Construction of gene editing plasmid
BE _{mutksα} -r	tctatttctagctctaaaacgcggagatccgcaatggggccgctcctaccaacc	pBE _{mutKSα} for <i>A. xylanica</i>
sgRNA-TEST-f	aattgtacgcggctgatctt	Validation of CRISPR-cBEST associated
sgRNA-TEST-r	tacgtaaaaaagcaccgac	conjugants
seqBEDHKS-f	ctgttcggacaccaccac	Amplification of <i>ksa/ksβ</i> gene editing
		sequence fragments in <i>A. rubida</i>
seqBEDHKSβ-r	cagttctggaagccactct	Validation of <i>ksβ</i> gene editing in <i>A. rubida</i>
seqBEDHKSα-r	caacgcctaccacatgacc	Validation of <i>ksa</i> gene editing in <i>A. rubida</i>
seq _{mutksα} -f	gacgagggcacgaagtagtc	Validation of <i>ksa</i> gene editing in <i>A.</i>
seq _{mutksα} -r	gaggtacgcgaagtggattc	<i>xylanica</i>
seqMT _{ksβ} -f	accaggcgaacgactgatag	Validation of <i>ksβ</i> gene editing in <i>A.</i>
seqMT _{ksβ} -r	actgcgacctggactacgtg	<i>xylanica</i>
seqMT _{LuxR} -f	caccggtccagttgctt	Validation of <i>luxR</i> gene editing in <i>A.</i>
seqMT _{LuxR} -r	gttgctggcggagcagat	<i>xylanica</i>
seqDH291-F	gaccctaacgacctcgtacc	Validation of 291 gene editing in <i>A.</i>
seqDH291-R	cgagcaaggcgtagatcagt	<i>rubida</i>
danH _{ksα} LHA-f	gtaaaacgacggccagtccaagcttatactcgcggtctccatcag	Amplification of homolog arm I for the
danH _{ksα} LHA-r	aggatcctccaagaattcgtgggagaac	construction of pKC _{danhKSα}
danH _{ksα} RHA-f	cgaattcttgagatgacctgcaccgaaac	Amplification of homolog arm II for the
danH _{ksα} RHA-r	tcgcgccggccgctcctctagagacacctgactgagagcag	construction of pKC _{danhKSα}
mut _{ksα} LHA-f	gtgccctcgtagaacgacaagcacgagacc	Amplification of homolog arm III for the
mut _{ksα} LHA-r	gtaaaacgacggccagtccaagcttgcggctcctcagtagcag	construction of pKC _{mutKSα}
mut _{ksα} RHA-f	tcgcgccggccgctcctctagagaagtggattcggccttctt	Amplification of homolog arm IV for the
mut _{ksα} RHA-r	ttgtcttctacgagggcacgaagtagctg	construction of pKC _{mutKSα}
veridanh _{ksα} LHA-f	atgtcgaccaccgtttcgt	Verification of Δ <i>ksα</i> mutant in <i>A. rubida</i>
veridanh _{ksα} LHA-r	caccggaataggtgtgtcg	(left homology arm)
veridanh _{ksα} RHA-f	tcttccaccaaaggaaatgt	Verification of Δ <i>ksα</i> mutant in <i>A. rubida</i>
veridanh _{ksα} RHA-r	ggtgcgcaaacgacgac	(right homology arm)
verimut _{ksα} LHA-f	gtcaggatgctgccacc	Verification of Δ <i>ksα</i> mutant in <i>A. xylanica</i>
verimut _{ksα} LHA-r	gaagtgcctgagcaaccaccg	(left homology arm)
verimut _{ksα} RHA-f	acgtagctccagctcagctc	Verification of Δ <i>ksα</i> mutant in <i>A. xylanica</i>
verimut _{ksα} RHA-r	atcagcagggtcactgg	(right homology arm)

1.3 培养基

LB 培养基用于培养大肠杆菌, ISP2 培养基、ISP3 培养基、ISP4 培养基用于拟无枝酸菌的培养, 2×YT 培养基、MS 培养基用于接合转移, 培养基均参照文献[17]配制。

1.4 生物信息学分析方法

所有拟无枝酸菌属细菌基因组数据下载自 NCBI Genome 数据库(截至 2023 年 11 月)。多位点序列分析 (multi-locus sequence analysis, MLSA) 使用 ATP 合酶 β 链(*atpD*)、DNA 旋转酶 β 亚基(*gyrB*)、重组酶 A(*recA*)、RNA 聚合酶 β 亚基(*rpoB*)、色氨酸合酶 β 亚基(*trpB*)等 5 个基因^[18-19], 以天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)中相应基因编码蛋白的序列为查询蛋白, 利用 BLASTp 程序在所有拟无枝酸菌基因组中搜索这 5 个蛋白的同源蛋白, 提取其编码基因的 DNA 序列, 按照文献[18,20]的方法进行分析。多重序列比对、Kimura 双参数距离计算及系统发育树的构建使用 MEGA 11.0 完成^[21], 系统发育树的可视化使用 Interactive Tree of Life (iTOL)网站完成^[22]。

天然产物生物合成基因簇预测使用 antiSMASH 7.0.0 完成^[23]。基因簇的相似性比对使用 BiG-SCAPE 完成^[24], 使用命令行参数: --mix--no_classify--mibig, 默认 cutoff 为 0.3。所有结果使用 python 脚本完成统计分析, 可视化分析使用 Cytoscape 3.10.0 完成^[25]。

1.5 菌株培养及分子克隆基本操作

大肠杆菌培养、转化、质粒提取及放线菌基因组 DNA 提取等分子克隆实验参照文献[26], PCR 反应体系及反应条件按照说明书进行, 所选两株拟无枝酸菌均采用 ISP3 固体培养基 28 °C 培养。

1.6 基于 CRISPR 系统的 cBEST 碱基编辑质粒构建

使用 <https://crispy.secondarymetabolites.org/>

网站设计目标失活基因的 sgRNA。根据网站提供的 off target hits with mismatches 数据, 选择脱靶位点最少、脱靶概率最小的序列^[16]作为敲除该基因的 sgRNA, 两侧添加质粒的同源序列, 合成引物。引物退火连接后与 *Nco* I 酶切回收后的 pCRISPR-cBEST 进行 Gibson 组装, 获得的质粒经酶切验证及测序验证后即为相应基因的 cBEST 碱基编辑质粒 pBE_{danh} Δ ks α 、pBE_{danh} Δ ks β 、pBE_{danh} Δ 291、pBE_{mutks} α 、pBE_{mut} Δ ks β 和 pBE_{mut} Δ LuxR。

1.7 基于 pKC1139 骨架的同源重组质粒构建

以淡红拟无枝酸菌基因组 DNA 为模板, 使用表 1 中两对引物 danHks α LHA-f/r 和 danHks α RHA-f/r 分别扩增靶基因上下游同源臂 I (1 785 bp)和 II (1 921 bp)。然后将同源臂 I 和 II 与经 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切消化后的 pKC1139 载体进行 Gibson 组装, 经酶切验证及测序验证后获得靶基因敲除质粒 pKC_{danh} Δ ks α 。

类似地, 以木聚糖拟无枝酸菌基因组 DNA 为模板, 使用表 1 中两对引物 mutks α LHA-f/r 和 mutks α RHA-f/r 分别扩增靶基因上下游同源臂 III (1 627 bp)和 IV (1 695 bp)。然后将同源臂 III 和 IV 与经 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切消化后的 pKC1139 载体进行 Gibson 组装, 经酶切验证及测序验证后获得靶基因敲除质粒 pKC_{mut} Δ ks α 。

1.8 大肠杆菌-放线菌接合转移

将本研究构建的质粒转化大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 感受态细胞, 涂布在含有 100 μ g/mL 安普霉素、50 μ g/mL 卡那霉素、25 μ g/mL 氯霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养过夜; 挑取单菌落接种到含有相应浓度抗生素的 4 mL LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养过夜; 取 1 mL 培养过夜的菌液接种在含有相应浓度抗生素的 10 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 *OD*₆₀₀ 为 0.4–0.6; 28 °C、4 000 r/min 离心

5 min 收集菌体, 用等体积 LB 液体培养基洗涤菌体 2 次, 用 500 μL 的 LB 液体培养基悬浮; 在洗涤大肠杆菌细胞的同时, 用 2 \times YT 培养基收集拟无枝酸菌的孢子, 50 $^{\circ}\text{C}$ 热激 20 min, 随后于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 摇床复苏 1 h; 将 500 μL 大肠杆菌细胞与 500 μL 拟无枝酸菌孢子混合, 涂布在含有不同浓度的 MgCl_2 、 CaCl_2 的 MS 固体培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12–18 h 后, 每板加终浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的萘啶酮酸和不同浓度的抗生素, 28 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 7–10 d 获得接合子。

1.9 抗生素敏感性检测

针对常用的接合转移抗生素筛选压力, 分别考察木聚糖拟无枝酸菌、淡红拟无枝酸菌对壮观霉素、卡那霉素、潮霉素、安普霉素和萘啶酮酸的耐受情况。具体步骤为将抗生素按不同梯度浓度加入 45 $^{\circ}\text{C}$ 左右的 ISP3 培养基中倒平板, 凝固后均匀涂布约含 1×10^8 个单孢子的悬液, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5–7 d, 观察平板上菌落的生长状态, 按照抗生素浓度由低到高的顺序, 选择完全抑制菌落生长的抗生素浓度作为最低抑菌浓度。

1.10 基于 CRISPR 的单碱基编辑突变株构建及验证

经接合转移得到淡红拟无枝酸菌/pBEDanh $\Delta\text{ks}\alpha$ 接合子, 挑取长势良好的接合子, 使用 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫链丝菌素诱导培养三代后, 使用引物对 seqBEDHKS-f/seqBEDHKS α -r 进行菌落 PCR 扩增包含碱基突变位点的基因片段, 得到清晰明亮的扩增条带, 用引物 seqBEDHKS α -r 测序, 检测是否发生碱基编辑。其余基于 CRISPR 系统的 cBEST 碱基编辑的重组菌株使用同样方法构建及验证。

1.11 基于传统同源重组的基因敲除重组菌株获得及验证

经接合转移得到淡红拟无枝酸菌/pKCdanh $\Delta\text{ks}\alpha$ 接合子, 挑取长势良好的接合

子, 在含有 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 安普霉素的 ISP3 平板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养一代后, 传代于不含抗生素的 ISP3 平板于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 待菌落正常生长后在 ISP3 平板划线, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 待长出分散良好的单菌落后, 将单菌落一次接种于含有 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 安普霉素和不含抗生素的 ISP3 平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d。选取在无抗平板上生长且在有抗平板上不生长的菌株, 使用引物 veridanhks α LHA-f/r、veridanhks α RHA-f/r 进行敲除菌株验证。由于 pKC1139 的温敏型复制子在高温时不能复制, 迫于选择压力, 重组质粒 pKCdanh $\Delta\text{ks}\alpha$ 依靠同源臂与宿主基因发生同源重组整合到宿主菌株基因中, 从而获得相关双交换敲除重组菌株。木聚糖拟无枝酸菌/pKCmut $\Delta\text{ks}\alpha$ 接合子使用同样方法得到基因敲除菌株。

2 结果与分析

2.1 拟无枝酸菌属的次级代谢物合成潜力分析

从 NCBI Genome 数据库中共下载得到 152 个拟无枝酸菌属细菌基因组(截至 2023 年 11 月)。为了比较这些拟无枝酸菌基因组的相似程度, 我们参考文献[18-19]采用多位点序列分析方法(multi-locus sequence analysis, MLSA)计算基因组之间的 Kimura 双参数距离, 使用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树, 以天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)及阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*) MA-4680 为外群。其中 6 个拟无枝酸菌基因组中未能提取到所有 5 个代表性核心基因。这 6 个基因组均为基因组草图, 可能是由于这几个基因组的测序及组装质量较差导致未能找全完整的 5 个代表性核心基因。因此, 在后续分析中剔除了这 6 个基因组。

剩余 146 个拟无枝酸菌基因组的建树分析结果如图 2 所示, 所有拟无枝酸菌基因组聚成

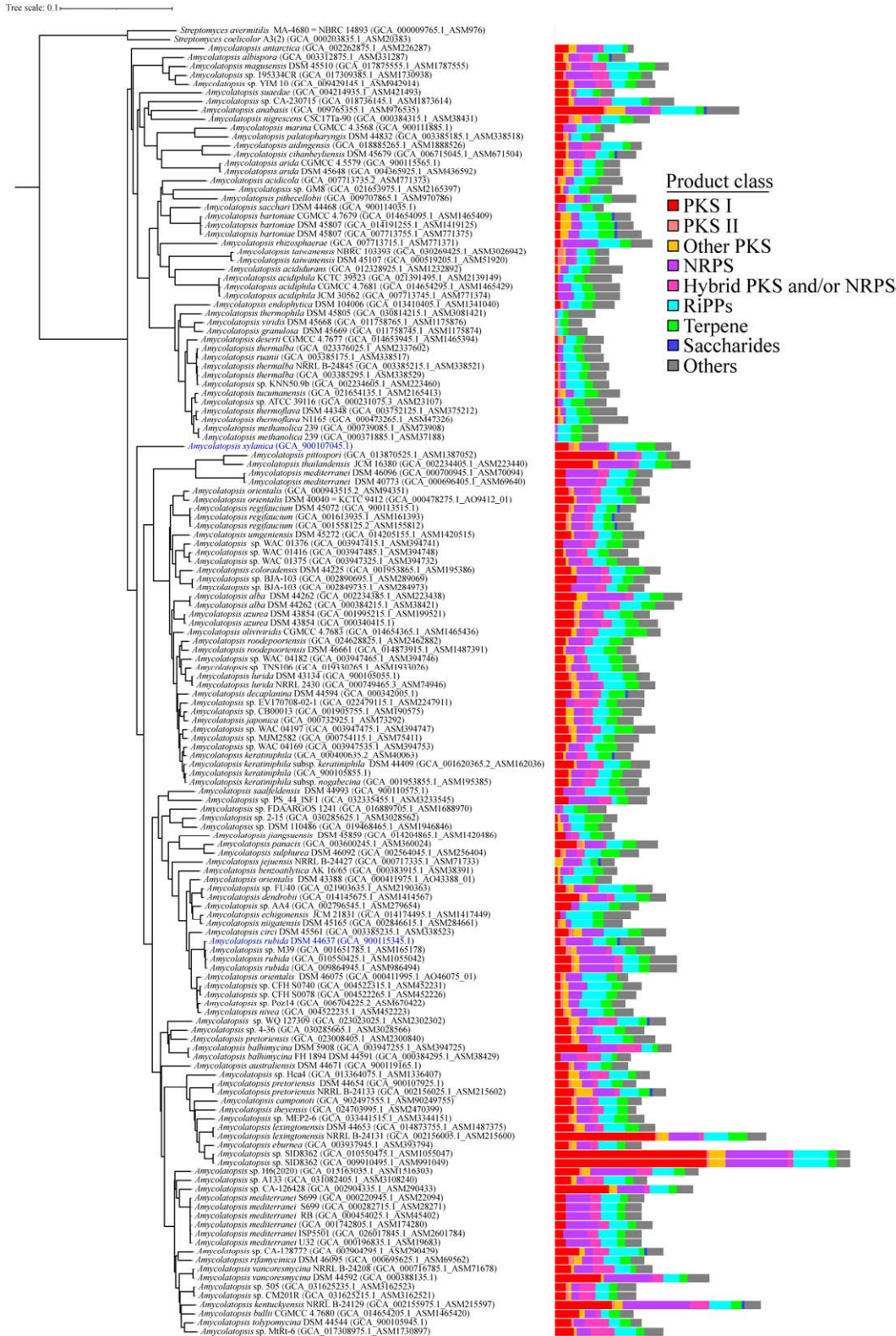


图 2 拟无枝酸属 146 个细菌基因组的多位点序列分析(MLSA)及生物合成基因簇分析结果
 Figure 2 The multi-gene sequence analysis and biosynthetic gene cluster analysis of 146 *Amycolatopsis* bacterial genomes.

一个大的分支，并且除一部分来源于同一拟无枝酸菌物种的基因组外，不同基因组之间的相似度较低。大部分拟无枝酸菌基因组之间的 Kimura 双参数距离在 0.05–0.16 之间，表明这些已测序的拟无枝酸菌基因组可以一定程度上代表该属细菌的多样性。

使用 antiSMASH 对这 146 个拟无枝酸菌基因组进行次级代谢产物生物合成基因簇分析，共找到 4 782 个基因簇，平均每个基因组中含有 33 个基因簇(图 2, 图 3)。将 antiSMASH 预测的产物类型分成九大类型进行统计, 结果显示(图 3)在拟无枝酸菌属细菌中蕴含着丰富多样的聚肽类天然产物生物合成基因簇, 如非核糖体肽合成酶(non ribosomal peptide synthetase, NRPS)基因簇、核糖体合成和翻译后修饰肽(ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide, RiPP)基因簇, 并且在归类为其他类型的生物合成基因簇中还含有较丰富的多聚氨基酸肽类合成基因簇。此外, I 型聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)与萜类(terpene)基因簇的丰度也相对较高, 平均每个基因组中含有

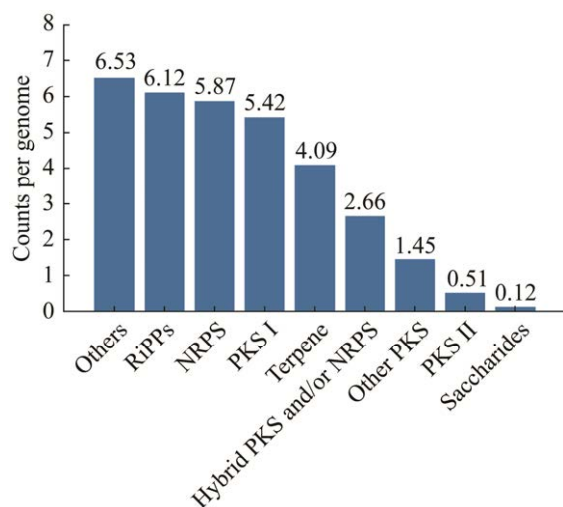


图 3 拟无枝酸菌属细菌基因组中天然产物生物合成基因簇的分类统计结果

Figure 3 The classification and statistical results of natural product biosynthetic gene clusters in the genomes of *Amycolatopsis* sp.

4 个以上。而其他聚酮合酶与多糖类的基因簇丰度较低, 特别是 II 型聚酮合酶和多糖类基因簇, 平均在每个基因组中含有不到一个基因簇。

使用 BiG-SCAPE 将这 4 782 个基因簇聚类成 1 666 个基因簇家族(gene cluster family, GCF, 相似度阈值为 0.7), 进一步聚集成 236 个基因簇集团(gene cluster clan, GCC, 相似度阈值为 0.3)。在这 1 666 个基因簇家族中, 仅 28 个家族中包含 MIBiG 数据库中的已知基因簇(共 68 个已知基因簇), 其他家族目前无已知基因簇。另外, 1 027 个家族仅包含一个基因簇(图 4)。这些结果表明, 在拟无枝酸菌属中蕴含着丰富多样的新颖天然产物资源, 有待于深入挖掘。

2.2 淡红拟无枝酸菌及木聚糖拟无枝酸菌次级代谢产物合成基因簇分析

在目前所有已测序的拟无枝酸菌中, 淡红拟无枝酸菌和木聚糖拟无枝酸菌分别处于不同的进化分支, 并且含有丰富的次级代谢产物生物合成基因簇(图 2 及表 2)。antiSMASH 分析结果表明淡红拟无枝酸菌含有至少 33 个基因簇, 预测这些基因簇与聚酮类化合物、萜类化合物、非核糖体肽类化合物和其他类别化合物的生物合成相关, 其中包含与常用络合剂乙二胺二琥珀酸(ethylenediamine disuccinic acid, EDDS)、萜类化合物 geosmin、芳香聚酮类 mutaxanthene 以及脂肽类抗生素 lipopeptide A 和 B 等生物合成基因簇高度相似的基因簇, 表明淡红拟无枝酸菌也可能具有合成这些化合物或其类似物的能力。其余的基因簇则较为新颖, 可能产生具有新颖结构的化合物。通过 antiSMASH 分析发现, 木聚糖拟无枝酸菌基因组至少含有 43 个基因簇, 预测与聚酮类化合物、萜类化合物、非核糖体肽类化合物和其他类别化合物的生物合成相关。其中含有与常用络合剂 EDDS、萜类化合物 geosmin、核糖体肽类 citrulassin D 等生

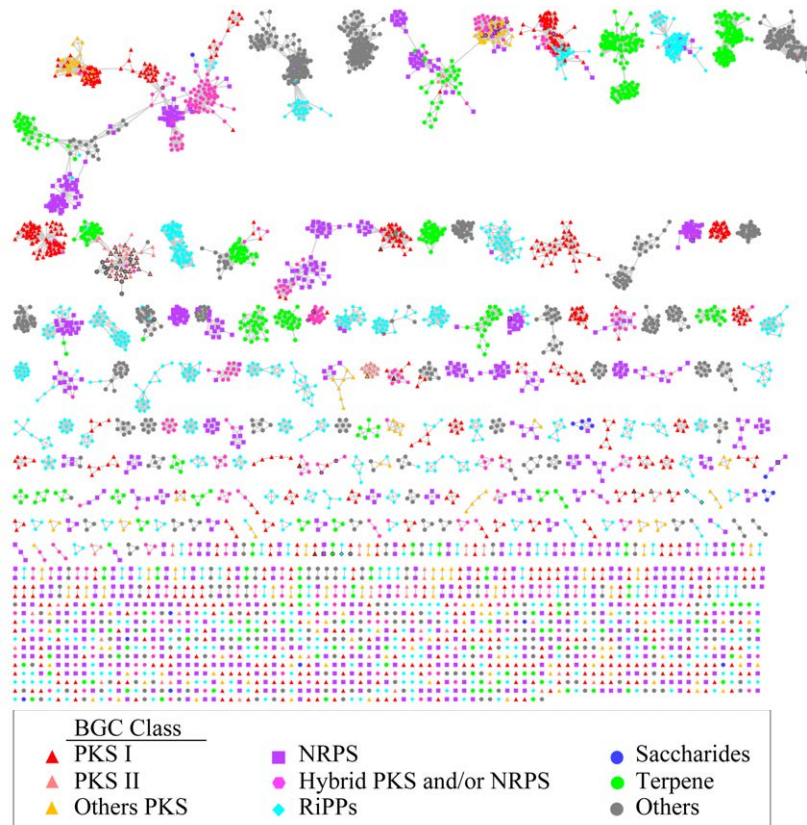


图4 拟无枝酸菌属细菌基因组中天然产物生物合成基因簇的 BiG-SCAPE 聚类结果 黑色边框符号表示来源于 MIBiG 数据库的已知生物合成基因簇

Figure 4 BiG-SCAPE clustering of natural product biosynthetic gene clusters in the genomes of *Amycolatopsis* strains. Symbols with black border represent known biosynthetic gene clusters from MIBiG database.

表2 淡红拟无枝酸菌及木聚糖拟无枝酸菌天然产物合成基因簇分析

Table 2 The classification of natural product biosynthetic gene clusters in *Amycolatopsis rubida* and *Amycolatopsis xylanica*

天然产物合成基因簇结构类型 The type of natural product BGCs	淡红拟无枝酸菌 <i>Amycolatopsis rubida</i>	木聚糖拟无枝酸菌 <i>Amycolatopsis xylanica</i>
I 型 PKS PKI	2	5
II 型 PKS PKII	2	2
其他 PKS Other PKS	0	2
NRPS	9	10
PKS 与 NRPS 杂合 Hybrid PKS and/or NRPS	1	1
RiPP	5	10
萜类 Terpene	4	7
多糖 Saccharides	1	0
其他 Others	9	6
合计 Total	33	43

物合成基因簇相似的基因簇。其余的基因簇较为新颖，具有产生新颖结构化合物的潜力。我们选择这两个代表性菌株进行后续的遗传操作体系建立，并进行了 II 型聚酮合酶基因簇中酮基合成酶 α 亚基(KS α)编码基因等基因的敲除，以便后续进行新颖聚酮类化合物的发掘研究。

2.3 产孢培养基的选择

为了方便进行孢子接合转移，先分别筛选了两个菌株的最适产孢培养基，此前报道的拟无枝酸菌常用产孢培养基有 YD 培养基和 ISP2 培养基^[27]。淡红拟无枝酸菌和木聚糖拟无枝酸菌此前也报道了在葡萄糖天门冬素琼脂培养基和 ISP2 培养基上生长良好^[28-29]。因此我们选择 ISP2、ISP3、ISP4、MS 这 4 种培养基观察淡红拟无枝酸菌、木聚糖拟无枝酸菌的产孢情况。28 °C 培养 5 d 后，观察到两种菌在 ISP2、ISP4 培养基均呈扁平片状且孢子稀薄，而在 ISP3、MS 平板培养基上则生长较旺盛，有丰富的白色孢子产生，其中在 ISP3 培养基上两个菌都生长最快且孢子量最多，因此我们采用 ISP3 平板为淡红拟无枝酸菌、木聚糖拟无枝酸菌的产孢培养基。

2.4 抗生素敏感性试验结果

在遗传操作体系中需要选择合适的抗生素抗性基因作为筛选标记，此前拟无枝酸菌属的东方拟无枝酸菌株和地中海拟无枝酸菌株的研究均表明，拟无枝酸菌对许多抗生素都有抗性。虽然也有不少拟无枝酸菌株对安普霉素具有不同程度的抗性，但不易产生耐受突变菌株^[3]，选择合适的安普霉素使用浓度能够获得较高的属间接合转移效率，并且不产生较多的假阳性菌落。我们对这两株菌也分别进行了壮观霉素、卡那霉素、潮霉素等抗生素的敏感性试验，但這些抗生素在测试的最高浓度(600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)仍不能有效抑制野生型菌株的生长，因此本研究也优先采用安普霉素作为接合转移筛选抗生素。此外，萘啶酮酸用于抑制接合转移平板上的大肠

杆菌生长，但有些放线菌菌株对萘啶酮酸也表现一定的敏感性，过高浓度的萘啶酮酸会导致菌株生长缓慢，甚至不能生长。因此本研究分别对淡红拟无枝酸菌和木聚糖拟无枝酸菌进行了安普霉素和萘啶酮酸的抗生素敏感性测试，以便选择合适的安普霉素和萘啶酮酸涂抗浓度。

经在 ISP3 培养基上测试淡红拟无枝酸菌的抗生素敏感性可知，该菌在安普霉素 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时不再生长，耐受 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的萘啶酮酸(表 3)。由此确定 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的安普霉素用于接合子的筛选，30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的萘啶酮酸用来抑制接合转移平板上大肠杆菌的生长。

木聚糖拟无枝酸菌在 ISP3 平板上测试的抗生素敏感性结果显示，该菌在 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 安普霉素时不再生长，能够耐受 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的萘啶酮酸(表 4)。由此确定 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的安普霉素用于木聚

表 3 淡红拟无枝酸菌抗生素敏感性

Table 3 Antibiotic sensitivity of *Amycolatopsis rubida*

抗生素浓度	安普霉素	萘啶酮酸
Antibiotic concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Apramycin	Nalidixic acid
30	++	+
50	++	-
100	++	-
200	++	-
400	++	-
600	-	-
800	-	-

-: 不生长; +: 生长缓慢; ++: 正常生长

-: Does not grow; +: Grows slowly; ++: Grows normally.

表 4 木聚糖拟无枝酸菌抗生素敏感性

Table 4 Antibiotic sensitivity of *Amycolatopsis xylanica*

抗生素浓度	安普霉素	萘啶酮酸
Antibiotic concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Apramycin	Nalidixic acid
30	++	++
50	++	-
100	++	-
200	++	-
400	-	-
600	-	-

-: 不生长; +: 生长缓慢; ++: 正常生长

-: Does not grow; +: Grows slowly; ++: Grows normally.

糖拟无枝酸菌接合子的抗性筛选, 30 $\mu\text{g/mL}$ 的萘啶酮酸用于抑制大肠杆菌生长。

2.5 淡红拟无枝酸菌、木聚糖拟无枝酸菌接合转移条件的优化

为了摸索淡红拟无枝酸菌和木聚糖拟无枝酸菌的最适接合转移条件, 分别以整合型载体 pSET152-kasO* 作为大肠杆菌-放线菌穿梭质粒, 分别测试不同 $\text{Mg}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$ 浓度、热激温度 (45、50、55 $^{\circ}\text{C}$)、供体菌与受体菌比例、涂抗时间 (10、12、14、16、17 h) 对接合转移效率的影响, 结果见表 5。

淡红拟无枝酸菌对孢子浓度较为敏感, 合适的孢子浓度有利于高效获得接合子。经多次

实验, 按 3×10^7 CFU/mL 的孢子浓度较为合适, 过多会使菌体连片生长, 干扰接合子的挑选, 过少则会降低结合效率, 无接合子产生。采用适当的温度热激孢子可提高接合转移效率。在其他条件不变的情况下使用 45、50、55 $^{\circ}\text{C}$ 分别热激, 观察接合转移平板发现均可产生接合子。对比不同条件下接合子的生长状况可知, 50 $^{\circ}\text{C}$ 、20 min 条件下接合转移效率为 1.0×10^{-6} , 而其他热激条件下接合转移效率较低。MS 培养基中的 MgCl_2 和 CaCl_2 浓度也会影响接合转移的效率。将孢子热激 20 min, 受体菌浓度 3×10^7 和供体菌混合后, 涂布在不同 MgCl_2 、 CaCl_2 浓度的 MS 培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16–17 h 后覆盖萘啶酮酸和安

表 5 两株拟无枝酸菌接合转移效率

Table 5 Conjugation efficiency of the two *Amycolatopsis* strains

测试条件 Experimental condition	淡红拟无枝酸菌接合转移效率 (接合子个数/受体菌个数) Conjugation efficiency of <i>Amycolatopsis rubida</i> (number of conjugants/number of recipients)	木聚糖拟无枝酸菌接合转移效率(接合子个数/受体菌个数) Conjugation efficiency of <i>Amycolatopsis xylanica</i> (number of conjugants/number of recipients)
Concentration of Mg^{2+} and Ca^{2+}		
Mg^{2+} 10 mmol/L	2.3×10^{-7}	2.0×10^{-7}
Mg^{2+} 10 mmol/L + Ca^{2+} 30 mmol/L	4.0×10^{-7}	4.7×10^{-7}
Mg^{2+} 30 mmol/L	1.3×10^{-6}	1.2×10^{-6}
Mg^{2+} 30 mmol/L + Ca^{2+} 30 mmol/L	6.7×10^{-7}	7.3×10^{-7}
Heat shock temperature ^a		
45 $^{\circ}\text{C}$	3.3×10^{-7}	2.1×10^{-7}
50 $^{\circ}\text{C}$	1.0×10^{-6}	1.2×10^{-6}
55 $^{\circ}\text{C}$	2.3×10^{-7}	3.3×10^{-7}
Antibiotic overlaid time ^b		
10 h	0	0
12 h	4.3×10^{-7}	3.7×10^{-7}
14 h	6.6×10^{-7}	7.2×10^{-7}
16 h	1.4×10^{-6}	1.5×10^{-6}
17 h	生长成片 Spreading growth	生长成片 Spreading growth
Number of recipients		
1×10^7 CFU/mL	7.1×10^{-7}	6.7×10^{-7}
3×10^7 CFU/mL	1.6×10^{-6}	1.3×10^{-6}
6×10^7 CFU/mL	5.2×10^{-7}	6.1×10^{-7}

a: 测试热激温度时, Mg^{2+} 浓度为 30 mmol/L, 其他条件参照 1.2.5; b: 测试涂抗时间时, Mg^{2+} 浓度为 30 mmol/L, 其他条件参照 1.2.5

a: When the heat shock temperature was tested, the concentration of Mg^{2+} was 30 mmol/L, and other conditions were referred to 1.2.5; b: When the time of antibiotic overlaid tested, the concentration of Mg^{2+} was 30 mmol/L, and other conditions were referred to 1.2.5.

普霉素溶液。由表 5 可以看出, $MgCl_2$ 浓度为 30 mmol/L 时, 接合转移效率最高。如果用抗生素作为筛选压力, 则抗性覆盖时间很重要。覆盖过早, 则接合转移不完全, 抗性基因未得到充分表达, 最终无接合子长出; 覆盖过晚, 假阳性菌落较多, 干扰接合子的筛选。淡红拟无枝酸菌的正常菌落形态是不规则的花形, 不像很多链霉菌菌落形态规则, 大小均一。分别在 10、12、14、16、17 h 覆盖抗生素, 观察接合转移平板生长状态可知, 该菌的抗性覆盖时间应该在 16–17 h 为宜, 16 h 前无接合子长出, 超过 17 h 则会有片状菌苔出现, 严重影响正常接合子的生长。

综上所述, 经多次实验确定淡红拟无枝酸菌接合转移的最适条件是: 受体菌孢子浓度 3×10^7 CFU/mL, 孢子热激条件 50 °C、20 min, 接合转移平板为含 30 mmol/L $MgCl_2$ 的 MS 琼脂培养基, 涂抗时间 16 h、600 μ g/mL 安普霉素及 30 μ g/mL 萘啶酮酸。

同样地, 经多次实验确定木聚糖拟无枝酸菌接合转移的最适条件为: 受体菌孢子浓度 3×10^7 CFU/mL, 孢子热激条件 50 °C、20 min, 接合转移平板为含 30 mmol/L $MgCl_2$ 的 MS 琼脂培养基, 涂抗时间 16 h、400 μ g/mL 安普霉素及 30 μ g/mL 萘啶酮酸。将接合子在含萘啶酮酸和安普霉素的平板划线, 获得单菌落, 完全去除接合子携带的大肠杆菌后, 利用表 1 中的引物对接合子进行菌落 PCR 验证, 琼脂糖凝胶电泳检测确定在淡红拟无枝酸菌、木聚糖拟无枝酸菌相应接合子菌落 PCR 产物中检测到了 pSET152-kasO*质粒中目的片段大小相同的电泳条带(图 5A), 说明整合质粒已经成功转入菌株。

2.6 基于 CRISPR 的碱基编辑尝试及基于同源重组的基因敲除

2.6.1 基于 CRISPR-cBEST 的碱基编辑

CRISPR-cBEST 系统是利用单链 RNA 引导胞苷脱氨酶偶联的 nCas9 D10A 蛋白靶向目标片段, 胞苷脱氨酶使靶向链的目标胞嘧啶碱基脱氨基转变为尿嘧啶碱基, 之后利用复制过程的碱基互补配对最终变为胸腺嘧啶^[30]。基于 CRISPR-cBEST 系统工作原理, 每个菌株分别构建 3 个基于 pCRISPR-cBEST 的靶向不同基因的碱基编辑质粒, 构建成功后分别利用属间接合转移导入受体菌, 待接合子长出后, 利用引物 sgRNA-TEST-f/r 对其进行菌落 PCR 验证。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在淡红拟无枝酸菌、木聚糖拟无枝酸菌相应接合子的菌落 PCR 产物中(图 5B), 检测到了与 CRISPR-cBEST 质粒中基因大小相同的电泳条带, 说明碱基编辑质粒已经成功转入菌株, 接合转移效率为 1×10^{-7} , 是 pSET152 质粒接合转移效率的 20%。为了实现碱基编辑, 使用硫链丝菌素(0.25 μ g/mL)诱导 3 代后, 用引物扩增包含目标碱基编辑处的基因片段, 测序结果表明目标碱基均未被编辑(图 6)。此前, 我们已经成功在多个链霉菌属、小单孢菌属的菌株中利用 CRISPR-cBEST 系统实现了靶 DNA 的碱基编辑, 但拟无枝酸菌属的 6 个靶基因均未编辑, 我们猜测可能是因为 sgRNA 的脱靶、拟无枝酸菌属基因组 DNA 的高级结构或该属菌株 DNA 修复机制等导致 nCas9 蛋白未能与靶 DNA 链有效结合, 或者能够结合但脱氨产生的尿嘧啶碱基被切除, 从而影响碱基编辑效率。

2.6.2 基于同源双交换系统的基因敲除

鉴于碱基编辑未能成功获得终止密码子突

变的基因失活菌株，我们采用传统同源重组双交换进行靶基因敲除，以便获得基因缺失菌株。以 pKC1139 温敏型穿梭质粒为骨架，分别构建淡红拟无枝酸菌、木聚糖拟无枝酸菌 *KS α* 基因的敲除质粒，构建成功后分别与受体菌株进行接合转移，待接合子长出后，利用表 1 中的引物对其进行菌落 PCR 验证，确定该质粒已经成功转入菌株，得到含有质粒 pKCdanh Δ *ks α* 、pKCmut Δ *ks α* 的接合子，接合转移效率为 5×10^{-7} 。经过同源双交换筛选获得抗性丢失菌

株，并且使用引物 veridanh*ks α* LHA-f/r、veridanh*ks α* RHA-f/r 对安普霉素敏感菌株进行 PCR 验证，图 6 显示利用传统同源重组双交换成功在 *KS α* 编码基因中同框缺失了 474 bp，获得了淡红拟无枝酸菌敲除菌株 danh Δ *ks α* 。同样，使用引物 verimut*ks α* LHA-f/r、verimut*ks α* RHA-f/r 对木聚糖拟无枝酸菌双交换后的安普霉素敏感菌落进行 PCR 验证，证实其在 *KS α* 编码基因中同框缺失了 504 bp，成功获得 mut Δ *ks α* 重组菌株(图 7)。

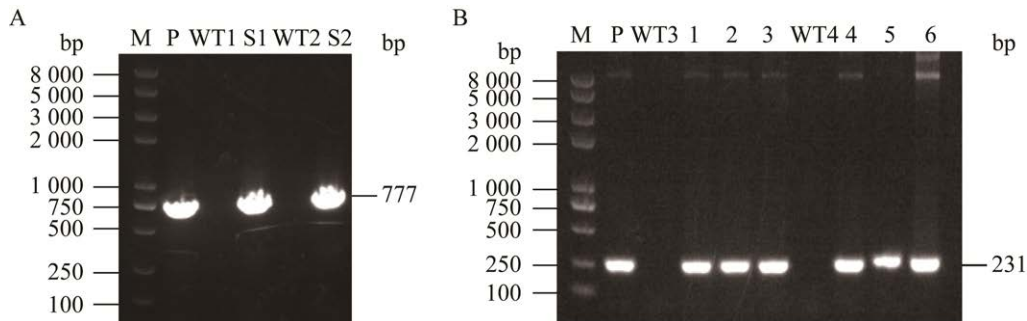


图 5 拟无枝酸菌 pSET152-kasO*整合载体接合子(A)和 cBEST 系统接合子(B)验证 M: DNA Marker; P: pSET152-kasO*质粒 DNA 作为扩增模板, 阳性对照; WT1: 淡红拟无枝酸菌野生型菌株基因组作模板, 阴性对照; WT2: 木聚糖拟无枝酸菌野生型菌株基因组作模板, 阴性对照; S1: 淡红拟无枝酸菌/pSET152-kasO*重组菌株; S2: 木聚糖拟无枝酸菌/pSET152-kasO*重组菌株. P: pCRISPR-cBEST 质粒 DNA 作为扩增模板, 阳性对照; WT3: 淡红拟无枝酸菌野生型菌株基因组作模板, 阴性对照; 1: 淡红拟无枝酸菌/pBEdanh Δ *ks α* 接合子; 2: 淡红拟无枝酸菌/pBEdanh Δ *ks β* 接合子; 3: 淡红拟无枝酸菌/pBEdanh Δ 291 接合子; WT4: 木聚糖拟无枝酸菌野生型菌株基因组作模板, 阴性对照; 4: 木聚糖拟无枝酸菌/pBEmut Δ *ks α* 接合子; 5: 木聚糖拟无枝酸菌/pBEmut Δ *ks β* 接合子; 6: 木聚糖拟无枝酸菌/pBEmut Δ LuxR 接合子

Figure 5 The verification of the pSET152-kasO* integrative vector conjugants (A) and cBEST system conjugants (B) of *Amycolatopsis* strains. M: DNA Marker; P: Positive control, pSET152-kasO* plasmid; WT1: Negative control, genome of *A. rubida*; WT2: Negative control, genome of *A. xylanica*; S1: *A. rubida*/pSET152-kasO*; S2: *A. xylanica*/pSET152-kasO*; P: Positive control, pCRISPR-cBEST plasmid; WT3: Negative control, genome of *A. rubida*; 1: *A. rubida*/pBEdanh Δ *ks α* ; 2: *A. rubida*/pBEdanh Δ *ks β* ; 3: *A. rubida*/pBEdanh Δ 291; WT4: Negative control, genome of *A. xylanica*; 4: *A. xylanica*/pBEmut Δ *ks α* ; 5: *A. xylanica*/pBEmut Δ *ks β* ; 6: *A. xylanica*/pBEmut Δ LuxR.

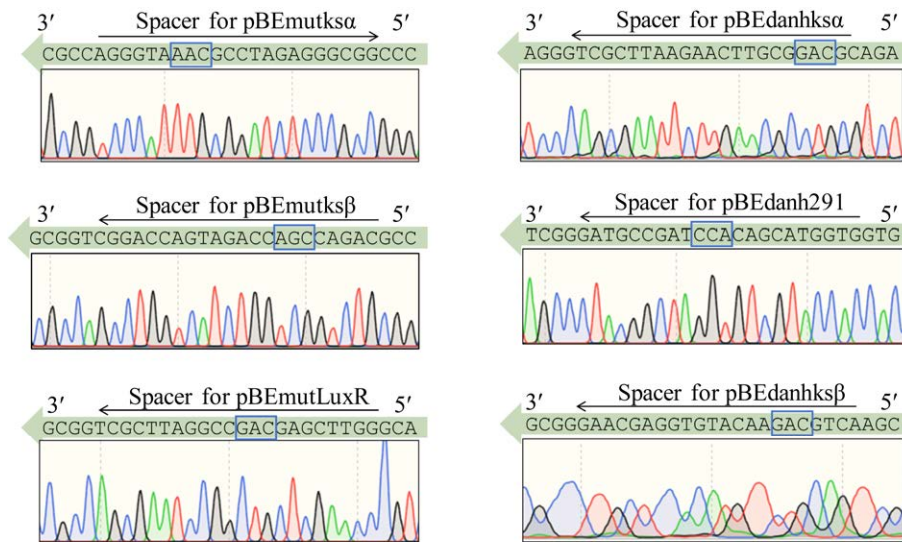


图 6 拟无枝酸菌基于 pCRISPR-cBEST 碱基编辑的菌株测序检测 细箭头表示靶向目标基因的 spacer，宽箭头表示读码框方向，方框中是可被编辑为终止密码子的密码子

Figure 6 Sequencing of *Amycolatopsis* strains obtained based on pCRISPR-cBEST base editing. Thin arrows indicate the spacer targeting the genes, wide arrows indicate the direction of the open reading frame, and the boxes indicate the codon could be edited to a stop codon.

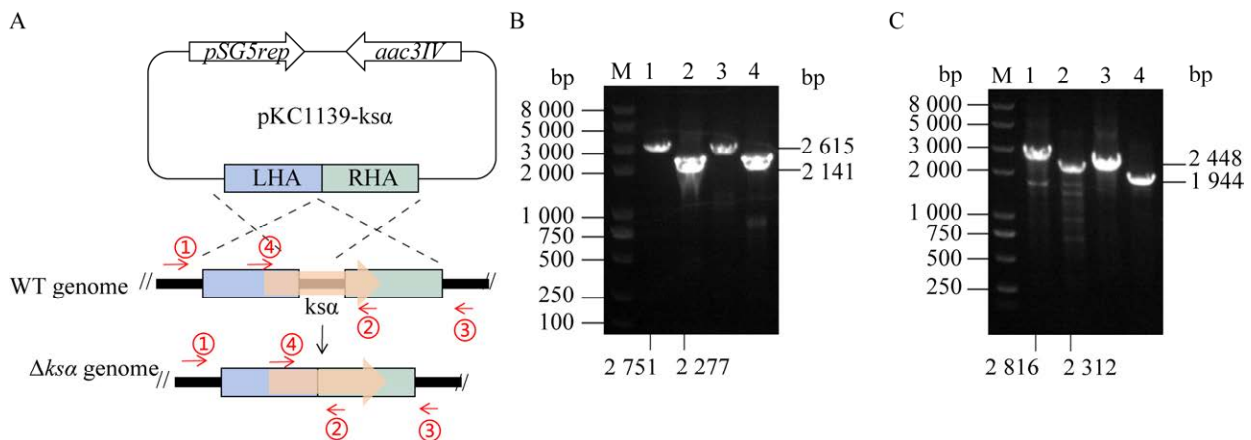


图 7 两株拟无枝酸菌 Δksa 突变株的构建和验证 A: pKC1139 骨架质粒同源重组敲除 KsA 示意图. B: 淡红拟无枝酸菌 Δksa 的 PCR 验证. C: 木聚糖拟无枝酸菌 Δksa 的 PCR 验证. M: DNA Marker; 1: 野生型菌株左侧同源臂侧验证; 2: Δksa 突变菌株左侧同源臂侧验证; 3: 野生型菌株右侧同源臂侧验证; 4: Δksa 突变菌株右侧同源臂侧验证

Figure 7 Construction and the verification of Δksa mutants. A: Construction of the pKC1139 backbone for knockdown of *ksa*; B: Verification of Δksa mutant of *Amycolatopsis rubida* by PCR; C: Verification of the Δksa mutant of *Amycolatopsis xylanica*. M: DNA Marker; 1: Left homologous arm validation of wild-type strains; 2: Left homologous arm validation of the Δksa mutant strains; 3: Left homologous arm validation of wild-type strains; 4: Left homologous arm validation of the Δksa mutant strains.

3 讨论与结论

放线菌物种丰富、种类繁多,其产生的次级代谢产物具有重要的药物开发价值^[31]。拟无枝酸菌作为一种特殊的放线菌,已从其次级代谢产物中挖掘到多种用于临床的药物,比如来源于 *A. orientalis* ATCC 43491 的抗菌药物万古霉素、菌株 *A. mediterranei* 产生的临床抗生素药物利福霉素,可见拟无枝酸菌属具有极大的研究价值^[2-3]。本研究利用 antiSMASH 从目前已有的 146 个拟无枝酸菌基因组发掘获得 4 782 个生物合成基因簇,平均每个基因组含有的基因簇数量达到 33 个。其中,拟无枝酸菌属基因组中富含聚肽类天然产物生物合成基因簇,如非核糖体肽合成酶、核糖体合成和翻译后修饰肽基因簇等。此外, I 型聚酮合酶与萜类基因簇的丰度也相对较高。BiG-SCAPE 分析显示拟无枝酸菌属中含有大量预测可以合成新颖结构天然产物的基因簇,对其进行深入发掘研究,将助力新型先导化合物的发现和药物的开发。

放线菌基因组中的 G+C 含量较高,绝大多数基因簇在常规实验室环境下处于不表达或低表达的状态,因此需要对这类菌株构建高效稳定的遗传操作体系,以便进行遗传操作激活这些基因簇^[32]。属间接合转移是链霉菌建立遗传操作体系最常用的方法,本研究对 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 浓度、热激时间及温度、孢子浓度和抗生素添加时间等条件进行了细致摸索,结果显示淡红拟无枝酸菌、木聚糖拟无枝酸菌均可以通过属间接合转移的方法建立菌株高效稳定的遗传操作体系。分析淡红拟无枝酸菌与木聚糖拟无枝酸菌的接合转移条件可知,两者除抗生素浓度耐受不同外,其余皆相同,推测该接合转移条件也可能适用于拟无枝酸菌属的其他菌株。建立该菌属具有通用性的遗传操作体系,为之后

菌株的改造及后续研究提供了坚实基础。

研究中发现 CRISPR-cBEST 质粒可以通过接合转移顺利进入拟无枝酸菌内,但是最终未能编辑目标基因。CRISPR-cBEST 系统若要发挥功能,需要 sgRNA 引导胞苷脱氨酶偶联的 nCas9 蛋白靶向结合目标片段,然后胞苷脱氨酶使靶向链的目标胞嘧啶碱基脱氨基转变为尿嘧啶碱基,之后利用复制过程的碱基互补配对最终变为胸腺嘧啶^[30]。如果硫链丝菌素诱导型启动子未在这两个拟无枝酸菌株中有效地启动下游 nCas9 基因的表达,或者 sgRNA 未能有效转录,可能导致 CRISPR-cBEST 系统表达水平低,不能有效编辑靶基因。此外,sgRNA 的脱靶或者拟无枝酸菌属基因组 DNA 的高级结构也可能导致表达的 CRISPR-cBEST 系统不能与靶 DNA 有效结合,进而导致编辑失败。另外,由于细胞中存在一系列的 DNA 修复机制,也可能导致脱氨后形成的尿嘧啶碱基被修复机制切除,回复突变从而导致编辑失败^[30]。然而,我们利用经典的同源重组双交换,在淡红拟无枝酸菌与木聚糖拟无枝酸菌中均实现了目标靶基因的敲除,因此后续的研究可使用同源重组双交换进行次级代谢产物生物合成基因簇的研究。

近期,本研究团队也对另外一个稀有放线菌家族——糖丝菌属(*Saccharothrix*)进行了次级代谢产物合成潜能分析^[33]。糖丝菌属虽然此前研究较少,但近年来随着测序技术及分析技术的发展,糖丝菌属中也陆续发现了许多具有新颖结构和优良活性的化合物,值得深入关注^[34]。拟无枝酸菌和糖丝菌同属于稀有放线菌,但两个属的菌株形态学分类及化学分类特征不同,处于不同的进化分支,其次级代谢产物合成潜能和适用的基因编辑体系可能有所差异^[35]。因之前缺乏相关研究,所以这两个研究工作分别聚焦

于拟无枝酸菌属和糖丝菌属开展系统的次级代谢潜能分析和相应的基因编辑体系构建研究。糖丝菌属目前可公开获得的全基因组数据仅有 34 个, 远少于拟无枝酸菌属的 152 个^[33]。两个属的天然产物生物合成基因簇种类相似, 但丰度有所差异。平均来看, 每个糖丝菌基因组含有 40 个基因簇, 多于拟无枝酸菌的 33 个; 在主要类型基因簇的含量上, 糖丝菌也都多于拟无枝酸菌; 例如, 糖丝菌属中非核糖体肽合成基因簇平均高达 9 个, 而拟无枝酸菌属中对应的基因簇含量平均不到 6 个^[33]。此外, 对来源于两个属的 4 个代表菌株的基因编辑体系研究结果表明, 利用基于经典同源重组方法的 pKC1139 载体可以稳定获得基因突变菌株, 预计该方法应该适用于两个属中大多数的菌株, 而利用基于 CRISPR-Cas9 或者 CRISPR-cBEST 的方法, 难以稳定获得基因编辑菌株, 存在较强的菌株特异性。

综上所述, 本研究综合分析了拟无枝酸菌属次级代谢产物生物合成潜能, 明确该菌属蕴含着丰富多样的新颖天然产物资源, 有待于深入挖掘。此外, 本研究针对两个代表性菌株淡红色拟无枝酸菌与木聚糖拟无枝酸菌成功建立了稳定的基因编辑体系, 为后续新颖天然产物发掘和生物合成研究以及其余拟无枝酸菌基因编辑体系的建立奠定了坚实基础。

REFERENCES

- [1] POMA PL, NOTARBARTOLO M, LABBOZZETTA M, SANGUEDOLCE R, ALAIMO A, CARINA V, MAURICI A, CUSIMANO A, CERVELLO M, D'ALESSANDRO N. Antitumor effects of the novel NF-kappaB inhibitor dehydroxymethyl-epoxyquinomicin on human hepatic cancer cells: analysis of synergy with cisplatin and of possible correlation with inhibition of pro-survival genes and IL-6 production[J]. *International Journal of Oncology*, 2006, 28(4): 923-930.
- [2] SONG ZQ, XU TC, WANG JF, HOU YG, LIU CS, LIU SS, WU SH. Secondary metabolites of the genus *Amycolatopsis*: structures, bioactivities and biosynthesis[J]. *Molecules*, 2021, 26(7): 1884.
- [3] KISIL OV, EFIMENKO TA, EFREMENKOVA OV. Looking back to *Amycolatopsis*: history of the antibiotic discovery and future prospects[J]. *Antibiotics*, 2021, 10(10): 1254.
- [4] XU L, HUANG H, WEI W, ZHONG Y, TANG B, YUAN H, ZHU L, HUANG WY, GE M, YANG S, ZHENG HJ, JIANG WH, CHEN DJ, ZHAO GP, ZHAO W. Complete genome sequence and comparative genomic analyses of the vancomycin-producing *Amycolatopsis orientalis*[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 363.
- [5] SHI YR, YE F, SONG YL, ZHANG XC, LU CH, SHEN YM. Rifamycin W analogues from *Amycolatopsis mediterranei* S699 Δ *rif-orf5* strain[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 920.
- [6] LUKEŽIČ T, LEŠNIK U, PODGORŠEK A, HORVAT J, POLAK T, ŠALA M, JENKO B, RASPOR P, HERRON PR, HUNTER IS, PETKOVIĆ H. Identification of the chelocardin biosynthetic gene cluster from *Amycolatopsis sulphurea*: a platform for producing novel tetracycline antibiotics[J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 12): 2524-2532.
- [7] MATSUMOTO N, TSUCHIDA T, SAWA R, IINUMA H, NAKAMURA H, NAGANAWA H, SAWA T, TAKEUCHI T. Epoxyquinomicins A, B, C and D, new antibiotics from *Amycolatopsis*. III. Physico-chemical properties and structure determination[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1997, 50(11): 912-915.
- [8] LI XM, LI XM, ZHU J, WANG HX, LU CH. Carbamothioic S-acid derivative and kigamicins, the activated production of silent metabolites in *Amycolatopsis alba* DSM 44262 Δ *abm9* elicited by *N*-acetyl-D-glucosamine[J]. *Natural Product Research*, 2020, 34(24): 3514-3521.
- [9] BEEMELMANNS C, RAMADHAR TR, KIM KH, KLASSEN JL, CAO SG, WYCHE TP, HOU YP, POULSEN M, BUGNI TS, CURRIE CR, CLARDY J. Macrotermycins A-D, glycosylated macrolactams from a termite-associated *Amycolatopsis* sp. M39[J]. *Organic Letters*, 2017, 19(5): 1000-1003.
- [10] JAYASURIYA H, HERATH K, ONDEYKA JG, ZHANG CW, ZINK DL, BROWER M, GAILLIOT FP, GREENE J, BIRDSALL G, VENUGOPAL J, USHIO M, BURGESS B, RUSSOTTI G, WALKER A, HESSE M, SEELEY A, JUNKER B, CONNORS N, SALAZAR O,

- GENILLOUD O, LIU K, MASUREKAR P, BARRETT JF, SINGH SB. Isolation and structure elucidation of thiazomycin-a potent thiazolyl peptide antibiotic from *Amycolatopsis fastidiosa*[J]. The Journal of Antibiotics, 2007, 60(9): 554-564.
- [11] UENO M, IJIMA M, MASUDA T, KINOSHITA N, IINUMA H, NAGANAWA H, HAMADA M, ISHIZUKA M, TAKEUCHI T. Dethymicin, a novel immunosuppressant isolated from an *Amycolatopsis*. Fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities[J]. The Journal of Antibiotics, 1992, 45(12): 1819-1826.
- [12] HASHIZUME H, IJIMA K, YAMASHITA K, KIMURA T, WADA SI, SAWA R, IGARASHI M. Valgamicin C, a novel cyclic depsipeptide containing the unusual amino acid cleonine, and related valgamicins A, T and V produced by *Amycolatopsis* sp. ML1-hF4[J]. The Journal of Antibiotics, 2017. DOI: 10.1038/ja.2017.135.
- [13] SHENG Y, FOTSO S, SERRILL JD, SHAHAB S, SANTOSA DA, ISHMAEL JE, PROTEAU PJ, ZABRISKIE TM, MAHMUD T. Succinylated apoptolidins from *Amycolatopsis* sp. ICBB 8242[J]. Organic Letters, 2015, 17(10): 2526-2529.
- [14] CAI ZQ, CHEN QL, WANG HY, HE YC, WANG W, ZHAO XY, YE QF. Degradation of the novel herbicide ZJ0273 by *Amycolatopsis* sp. M3-1 isolated from soil[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(5): 1371-1379.
- [15] PAN GH, XU ZR, GUO ZK, Hindra, MA M, YANG D, ZHOU H, GANSEMANS Y, ZHU XC, HUANG Y, ZHAO LX, JIANG Y, CHENG JH, van NIEUWERBURGH F, SUH JW, DUAN YW, SHEN B. Discovery of the leinamycin family of natural products by mining actinobacterial genomes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(52): E11131-E11140.
- [16] TONG YJ, WHITFORD CM, ROBERTSEN HL, BLIN K, JØRGENSEN TS, KLITGAARD AK, GREN T, JIANG XL, WEBER T, LEE SY. Highly efficient DSB-free base editing for streptomycetes with CRISPR-BEST[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(41): 20366-20375.
- [17] CHEN S, WU QH, SHEN QQ, WANG H. Progress in understanding the genetic information and biosynthetic pathways behind *Amycolatopsis* antibiotics, with implications for the continued discovery of novel drugs[J]. ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology, 2016, 17(2): 119-128.
- [18] LABEDA DP, DUNLAP CA, RONG XY, HUANG Y, DOROGHAZI JR, JU KS, METCALF WW. Phylogenetic relationships in the family *Streptomycetaceae* using multi-locus sequence analysis[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017, 110(4): 563-583.
- [19] RONG XY, HUANG Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35(1): 7-18.
- [20] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, MA N, PAPADOPOULOS J, BEALER K, MADDEN TL. BLAST+: architecture and applications[J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10: 421.
- [21] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [22] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [23] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN HE, REITZ ZL, BIERMANN F, ALANJARY M, FETTER A, TERLOUW BR, METCALF WW, HELFRICH EJM, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(W1): W46-W50.
- [24] NAVARRO-MUÑOZ JC, SELEM-MOJICA N, MULLOWNEY MW, KAUTSAR SA, TRYON JH, PARKINSON EI, de LOS SANTOS ELC, YEONG M, CRUZ-MORALES P, ABUBUCKER S, ROETERS A, LOKHORST W, FERNANDEZ-GUERRA A, CAPPELINI LTD, GOERING AW, THOMSON RJ, METCALF WW, KELLEHER NL, BARONA-GOMEZ F, MEDEMA MH. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity[J]. Nature Chemical Biology, 2020, 16: 60-68.
- [25] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, BALIGA NS, WANG JT, RAMAGE D, AMIN ND, SCHWIKOWSKI B, IDEKER T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Research, 2003, 13(11):

- 2498-2504.
- [26] KIESER T, BIBB MJ, BUTTNER MJ, CHATER KF, HOPWOOD DA. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [27] EVEREST GJ, MEYERS PR. Evaluation of the antibiotic biosynthetic potential of the genus *Amycolatopsis* and description of *Amycolatopsis circi* sp. nov., *Amycolatopsis equina* sp. nov. and *Amycolatopsis hippodromi* sp. nov.[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(2): 300-311.
- [28] HUANG Y, QI W, LU Z, LIU Z, GOODFELLOW M. *Amycolatopsis rubida* sp. nov., a new *Amycolatopsis* species from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(Pt 3): 1093-1097.
- [29] CHEN J, SU JJ, WEI YZ, LI QP, YU LY, LIU HY, ZHANG YQ, ZHANG YQ. *Amycolatopsis xylanica* sp. nov., isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2010, 60(Pt 9): 2124-2128.
- [30] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. Nature, 2016, 533: 420-424.
- [31] CPARRA J, BEATON A, SEIPKE RF, WILKINSON B, HUTCHINGS MI, DUNCAN KR. Antibiotics from rare actinomycetes, beyond the genus *Streptomyces*[J]. Current Opinion in Microbiology, 2023, 76: 102385.
- [32] van BERGEIJK DA, TERLOUW BR, MEDEMA MH, van WEZEL GP. Ecology and genomics of *Actinobacteria*: new concepts for natural product discovery[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18: 546-558.
- [33] 李栋, 范可强, 胡会涛, 潘国辉. 糖丝菌属次级代谢潜能分析及代表菌株基因编辑体系建立[J]. 微生物学通报, 2024. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.240067.
- LI D, FAN KQ, HU HT, PAN GH. Secondary metabolism potential of *Saccharothrix* and establishment of gene editing systems in representative strains[J]. Microbiology China, 2024. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.240067 (in Chinese).
- [34] WEI B, LUO X, ZHOU ZY, HU GA, LI L, LIN HW, WANG H. Discovering the secondary metabolic potential of *Saccharothrix*[J]. Biotechnology Advances, 2024, 70: 108295.
- [35] 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: MMBR, 2015, 80(1): 1-43.