

糖多孢菌属菌株的体内转座诱变系统

白露露 贺卫军 龙青山 王业民 邓子新 陶美凤

上海交通大学微生物代谢国家重点实验室, 上海 200030

摘要 为实现糖多孢菌的体内转座诱变, 采用刺糖多孢菌的强启动子促进 Tn5 转座酶基因 *tnp*(5) 的表达, 优化链霉菌高效转座质粒 pHL734, 构建了转座质粒 pJTn1、pJTn2、pJTn3、pJTn4、pJTn5、pJTn6。结果显示: pJTn1~pJTn6 系列转座质粒均可在红色糖多孢菌中高效转座; pJTn1 和 pJTn5 可在刺糖多孢菌中进行转座, 获得 31 个刺糖多孢菌转座突变株; 其中 30 个菌株的基因组中检测到标准的 Tn5 转座, 8 个突变株的多杀菌素产量显著降低。表明 pJTn 系列转座质粒可作为糖多孢菌的体内转座诱变工具, 为抗生素的产量调控研究和高产育种靶标基因筛选提供理论依据。

关键词 链霉菌; 高产菌种; 刺糖多孢菌; 多杀菌素; 红色糖多孢菌; Tn5 转座质粒; 体内转座

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)05-0085-07

糖多孢菌为高 G+C 革兰氏阳性菌, 是放线菌目假诺卡氏亚目假诺卡氏科中的一个属, 该属细菌是重要的抗生素资源菌, 例如刺糖多孢菌(*Saccharopolyspora spinosa*) 产生杀虫抗生素多杀菌素, 红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*) 产生抗菌抗生素红霉素。多杀菌素自 1997 年美国环境保护局(EPA)注册用于杀虫剂以来, 已被几十个国家批准用于控制农业害虫, 包括蓟马、蚊子、斑潜蝇、蜘蛛螨、白蚁、果蝇等, 对非靶标生物如哺乳动物及鸟类几乎没有毒害作用, 使用安全、见效快、残留低^[1-2]。

高产菌种是抗生素产业的核心, 多杀菌素尤其如此, 国内已攻关 20 多年, 由于菌种发酵效价低, 生产成本低, 迄今未能实现多杀菌素原料药的国产化。目前国内外采用的多杀菌素育种技术包括诱变育种和异源表达^[3-6]。异源表达研究中, 以红色糖多孢菌为宿主的产量最高^[6]。运用基因工程育种技术, 通过针对性地改造调控基因、抗性基因、外排泵基因、底物供应和竞争途径等靶标基因, 能快速地提高目标化合物的发酵效价^[7]。转座诱变可以获得大量的随机突变株, 且突变位点易于识别和定位, 有助于建立优良突变性状与突变基因间的关联性, 因此, 全基

因组转座诱变是筛选高产育种靶标基因的重要手段^[7]。

放线菌中常用的 Tn5 转座诱变系统包括体外诱变和体内诱变两大类, 都是利用 Tn5 转座酶将不含转座酶基因的 mini-Tn5 微转座子片段插入到基因组随机序列上产生插入突变。在体外诱变系统中, 需要先构建目标放线菌的基因组粘粒文库, 转座诱变每个粘粒克隆获得突变粘粒文库, 再将携带基因突变的粘粒分别引入目标放线菌中并筛选双交换重组子, 最后获得放线菌的突变体文库, 如天蓝色链霉菌和红色糖多孢菌的体外转座文库^[8-9]。体内转座系统则是将含 Tn5 转座酶基因和 mini-Tn5 的转座载体引入放线菌细胞中, 直接转座诱变放线菌产生突变体。常用的野生型转座酶转座效率不高, 只能采用温敏的复制型质粒作为载体将 mini-Tn5 带入放线菌, 发生转座后必须升温培养以消除转座载体, 如构建 *Streptomyces globisporus* 突变体库所采用的 pSG5 衍生的温敏转座载体^[10]。温敏转座载体可在细胞中复制和传代, 因此可能导致发生多次转座事件, 干扰后续研究。Xu 等^[11-12]根据 Tn5 转座酶的高活性突变序列合成了 *tnp*(5) 基因, 装到自杀性载体中构建了链霉菌高效转座载体 pHL734,

收稿日期: 2019-06-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31770036)

白露露, 硕士研究生, 研究方向: 放线菌分子生物学, E-mail: baill49@163.com

通信作者: 陶美凤, 博士, 教授, 研究方向: 抗生素生物合成及代谢调控, E-mail: tao_meifeng@sjtu.edu.cn

并用于大量筛选 2 种抗生素高产相关基因。与温敏复制型转座系统相比,pHL734 在链霉菌中不可复制,可减少多次转座事件的发生,并且不需要升温的步骤消除载体^[11]。

目前在糖多孢菌属细菌中并没有合适的体内转座体系,制约了抗生素高产相关基因的筛选。同时,刺糖多孢菌对外源 DNA 具有很强的限制性,其遗传操作尤其困难^[13-14]。本研究通过序列优化去除链霉菌转座质粒 pHL734 上的放线菌来源的限制性酶切位点,采用刺糖多孢菌特异性强启动子高效表达转座酶,旨在构建可以用于红色糖多孢菌和刺糖多孢菌的体内转座工具,为放线菌中转座子诱变技术的优化及推广应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养条件

大肠杆菌 DH10B 为克隆宿主。*Saccharopolyspora erythraea* SLQ185 衍生自 *Sa. erythraea* NRRL23338,为笔者所在课题组构建,用于测试转座效率;*Saccharopolyspora spinosa* NRRL18395 为野生型多杀菌素产生菌,其基因组已测序^[15]。pHL734 含有 mini-Tn5、高效转座酶基因 *tnp* (5)、氨基青霉素抗性基因 *bla*、接合转移起始区 *oriT_{RK2}*^[11]。pUZ8002 为 RK2 衍生的不能自我转移的质粒,含卡那霉素抗性基因 *neo* 和四环素抗性基因 *Tet^r*,能诱导含 *oriT_{RK2}* 质粒的属间接合转移^[16]。

大肠杆菌、红色糖多孢菌和刺糖多孢菌分别于

37、34 和 30 ℃ 培养。大肠杆菌培养基为 LB 及 LA^[17]。糖多孢菌液体培养基为 TSBY^[18]。红色糖多孢菌的接合转移培养基为 ISP4,产孢培养基为 ESM (1 L)^[19]:玉米淀粉 10 g,玉米浆 10 g,NaCl 3 g,(NH₄)₂ SO₄ 3 g,CaCO₃ 5 g,琼脂 20 g,pH 7.0~7.2。刺糖多孢菌产孢培养基为 BM (1 L)^[18]:酵母提取物 1 g,牛肉浸膏 1 g,N-Z-Amine A 2 g,葡萄糖 10 g,琼脂 20 g,pH 7.2。刺糖多孢菌接合转移培养基为 R6(1 L)^[13]:蔗糖 200 g,糊精 10 g,酪蛋白水解物 1 g,K₂ SO₄ 0.1 g,FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g,MnCl₂ · 4H₂O 0.001 g,ZnSO₄ · 7H₂O 0.001 g,BHI 13 g,琼脂 20 g,pH 7.2,115 ℃ 灭菌 30 min,待培养基冷却到 50 ℃ 以下,加入以下 3 种经过孔径 0.22 μm 滤膜过滤除菌的溶液:1 mol/L L-谷氨酸钠 65 mL,1 mol/L CaCl₂ · 2H₂O 48 mL 以及 1 mol/L 丙磺酸 5 mL。刺糖多孢菌的发酵培养基为 CTF4 (1 L)^[20]:葡萄糖 48 g,淀粉 20 g,黄豆饼粉 20 g,棉籽粉 2.5 g,玉米浆 15 g,酵母提取物 1.2 g,豆油 3 g,CaCO₃ 2.5 g,pH 7.2。

1.2 DNA 克隆与质粒构建

质粒 DNA 提取、放线菌基因组少量快速提取、大肠杆菌转化及 PCR 扩增方法参照文献^[17]进行。质粒的 PCR 引物序列及用途见表 1。DNA 片段的纯化采用 Gel Extraction Kit (OMEGA)。DNA 片段的限制性酶切和酶连方法分别参见供应商 (Thermo Fisher) 的使用手册。DNA 片段在苏州鸿迅生物科技股份有限公司合成。

表 1 寡核苷酸(引物)
Table 1 Oligonucleotides (Primers)

引物 Primers	序列(5'→3') Sequences (5'-3')	用途 Usage
pHHB736-seg1-F	AGCGGATACATATTTGAATG	质粒 pHHB736 验证
pHHB736-seg1-R	GATTTTTGTGATGCTCGTCA	Verification of pHHB736
Prom-F	ATGTGTATAAGAGACAGGCTAG	质粒 pJTnX 验证
Prom-R	CGAGATGGTGTGACTTG	Verification of pJTnX
Tn-F	AAGCACGATGCCAACACAA	mini-Tn5 插入位点测序
Tn-R	CGGTACCAGGTTTTTGACG	Sequencing the mini-Tn5 insertion site

1.3 大肠杆菌-糖多孢菌属接合转移

转座质粒在红色糖多孢菌中的转座参考标准接合转移方法^[21],并进行部分改进。具体过程如下:含有不同转座质粒的大肠杆菌 DH10B/pUZ8002 作为接合转移供体菌;新鲜的红色糖多孢菌孢子悬液作为接合转移受体;洗涤过的大肠杆菌与 50 ℃ 热激处理后的孢子悬液混合后,涂于 ISP4 培养基(加入终浓度为 20 mmol/L 的 MgCl₂)上,30 ℃ 培养

20 h后覆盖阿泊拉霉素(终质量浓度 50 μg/mL)及 TMP(终质量浓度 100 μg/mL);继续培养 7 d 即可观察到明显的接合子菌落。

转座质粒在刺糖多孢菌中的转座参考刺糖多孢菌接合转移方法^[13]。本研究对供体菌类型、受体菌形态、培养基、覆盖时间等条件进行了摸索,改进的接合转移条件如下:含转座质粒的大肠杆菌 DH10B/pUZ8002 为接合转移供体菌;刺糖多孢菌

于 TSBY 液体培养基中震荡培养,收取菌丝体,作为接合转移受体菌;供体菌与受体菌混合后,涂于 R6 培养基上(加入 MgCl_2 至终浓度 20 mmol/L), 30 °C 培养 20 h 后覆盖阿泊拉霉素(终质量浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及 TMP(终质量浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$);培养 7~15 d 可观察到接合子菌落。

1.4 刺糖多孢菌转座突变株中 mini-Tn5 的拯救定位

刺糖多孢菌转座突变株在 TSBY 液体培养基中培养 48 h,收集菌丝体,提取基因组 DNA,用 *Apa* I 酶切,酶切混合物用 T4 DNA 连接酶连接,转化至大肠杆菌感受态 DH10B 中,用阿泊拉霉素筛选抗性转化子。提取转化子质粒,根据 mini-Tn5 序列设计向外的测序引物 Tn-F/Tn-R,送公司测序。根据测序结果在 *Sa. spinosa* NRRL18395 基因组序列中对转座插入位点进行定位。

1.5 刺糖多孢菌发酵及多杀菌素抽提检测

将刺糖多孢菌转座突变株及野生型菌株 NRRL18395 的孢子接种至 25 mL TSBY 液体培养基中,30 °C 摇床振荡培养 24 h,吸取 1 mL 种子液至 50 mL CTF4 培养基中,30 °C、220 r/min 避光发酵 10 d。发酵结束后,取 700 μL 发酵液,加入 1 倍体积的甲醇萃取,超声处理 30 min,避光静置 12 h。12 000 r/min 离心 15 min,取上清经 0.22 μm 滤膜过滤,滤液用安捷伦 1200 series 高效液相色谱(HPLC)检测分析多杀菌素的产量。色谱柱为 ZORBAX SB-C18 柱,4.6 mm $\times$ 250 mm,流动相为甲醇/乙腈/0.05% 乙酸钠溶液(体积比为 47.5 : 47.5 : 5)。流速为 1 mL/min,柱温为室温,检测波长为 250 nm。根据标准曲线,计算多杀菌素的产量。

2 结果与分析

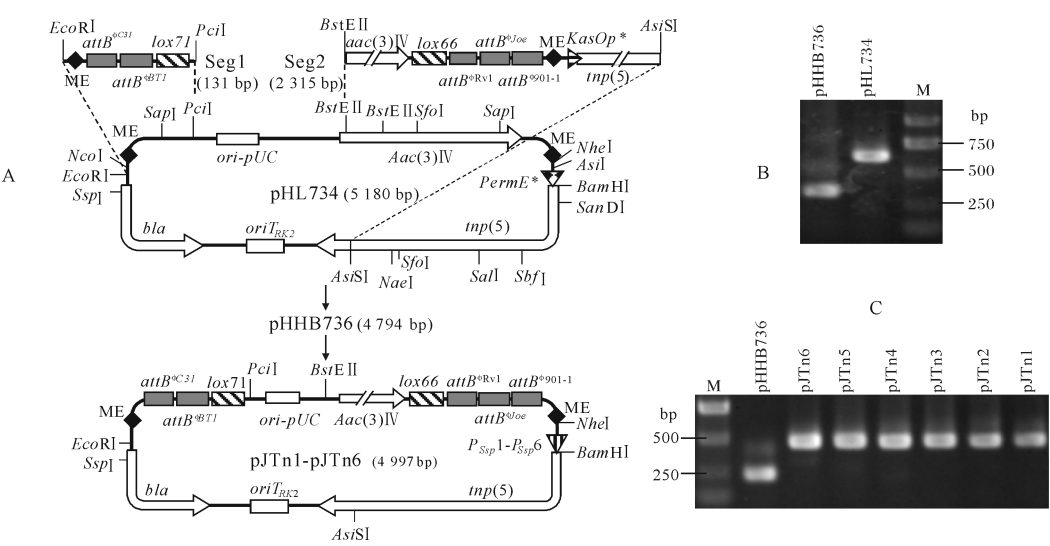
2.1 转座质粒的结构优化

本研究尝试利用 pHL734 对刺糖多孢菌进行转座诱变,始终无法得到接合子。推测可能原因为:(1)质粒含有特定的限制性酶切位点,使其在刺糖多孢菌细胞中被内源限制性内切酶切割;(2)转座酶 Tnp(5)的表达量不足。为针对性地改造 pHL734,我们合成了 Seg1(两端分别含 *Eco*R I 和 *Pci* I 位点)和 Seg2(两端分别含 *Bst*E II 和 *Asi*S I 位点)2 个 DNA 片段,分别替换掉 pHL734 相应的酶切片

段,得到质粒 pHHB736(图 1A)。在 pHHB736 中,采用强启动子 *KasOp* * 替换掉 *tnp*(5)上游的 *Perme* * 启动子,以增强转座酶基因在放线菌的转录;据报道刺糖多孢菌中具有 *Sal* I、*Nco* I 和 *Nae* I 内源限制性内切酶活性^[14],新构建的 pHHB736 中去除了 mini-Tn5 上的 *Sal* I、*Nco* I 和 *Nae* I 酶切位点;同时,还去除了 mini-Tn5 和转座酶基因上的 *Sfo*I、*Ssp*I、*San*DI、*Sap*I 和 *Sbf*I 等放线菌源限制性内切酶的识别切割位点。经 PCR 扩增(图 1B)及测序验证 pHHB736 序列正确。

但是,含 pHHB736 的 DH10B 经传代培养后,提取的质粒 DNA 变成大小不一的质粒群体,提示传代后该质粒结构不稳定。在 pHHB736 中转座酶基因 *tnp*(5)的表达受强启动子 *KasOp* * 控制,而 Wang 等^[22]报道 *KasOp* * 在大肠杆菌也具有启动子活性,推测大肠杆菌 DH10B/pHHB736 中表达了转座酶 Tnp(5),后者催化质粒上的 mini-tn5 转座而导致质粒结构发生变化。以红色糖多孢菌为受体、pHHB736 为转座载体的接合转移实验也未得到接合转移子,表明 pHHB736 确实不适合用于糖多孢菌转座。

为消除 pHHB736 质粒结构不稳定问题,根据刺糖多孢菌蛋白质组数据选择糖多孢菌特异性的强启动子来控制 *tnp*(5) 基因的表达。选择的 6 个组成型高表达的刺糖多孢菌蛋白质包括:Fe-Zn 超氧化物歧化酶 1(WP_010308738.1)、Fe-Zn 超氧化物歧化酶 2(WP_101376528.1)、冷休克 DNA 结合域蛋白(WP_010308657.1)、伴侣蛋白 GroEL1(WP_010316107.1)、伴侣蛋白 GroEL2(WP_010308482.1)和延伸因子 EF-Tu(WP_010315430.1),这几个蛋白质在刺糖多孢菌生长早期就大量表达^[23]。根据这 6 个蛋白质基因的编码区上游序列,合成包括可能的启动子和附带的核糖体结合位点的 300 bp 序列(分别记为 *P_{Ssp}1*、*P_{Ssp}2*、*P_{Ssp}3*、*P_{Ssp}4*、*P_{Ssp}5* 和 *P_{Ssp}6*,片段两端都加上 *Nhe* I 及 *Bam*H I 位点);用合成的序列替换 pHHB736 中的相应酶切片段,得到的重组子用引物 Prom-F/R 进行 PCR 验证,PCR 扩增结果如图 1C,验证正确,6 个质粒分别命名为 pJTn1、pJTn2、pJTn3、pJTn4、pJTn5、pJTn6。在质粒 pJTn1~pJTn6 中,转座酶基因 *tnp*(5)上游的启动子分别换成了刺糖多孢菌特异性启动子 *P_{Ssp}1*~*P_{Ssp}6*,其他部分完全相同(图 1A)。



A:转座质粒 pJTn1~pJTn6 的构建; B:pHHB736 Seg1 部分的 PCR 验证,pHL734 和 pHHB736 的预期产物分别为 622 bp 和 337 bp; C:pJTn1~pJTn6 转座酶基因 *Tnp*(5) 启动子部分的 PCR 验证,pHHB736 和 pJTn1~pJTn6 的预期产物分别为 250 和 470 bp。M:DNA ladder。A:Construction of the transposition plasmids pJTn1~pJTn6. B:PCR validation of the Seg1 region in pHHB736. The sizes of the calculated bands of pHL734 and pHHB736 are 622 bp and 337 bp respectively. C:Verification of the promoters of the transposase gene *tnp*(5) in pJTn1~pJTn6. The calculated bands of pHL736 and pJTn1~pJTn6 are 250 bp and 470 bp respectively. M:DNA ladder.

图 1 转座质粒的构建及结构验证

Fig.1 Construction and confirmation of transposition plasmids

pJTn1~pJTn6 的载体中含有分别由刺糖多孢菌特异性启动子 $P_{Ssp\ 1}\sim P_{Ssp\ 6}$ 控制表达的 *tnp*(5) 基因;还有接合转移起始区 ori_{RK2} ,可在 RK2 的衍生质粒 pUZ8002 帮助下从大肠杆菌接合转移进入放线菌中。6 个质粒都含有以 2 个 ME 为边界的 mini-Tn5;mini-Tn5 内部含有大肠杆菌高拷贝质粒复制子 $ori-pUC$ 和阿泊拉霉素抗性基因 $aac(3)IV$;阿泊拉霉素抗性基因两侧插入了 *lox66* 及 *lox71* 序列,可通过 Cre-*loxP* 重组系统消除抗性基因^[24]。此外,因红色糖多孢菌和刺糖多孢菌基因组没有标准的 $\phi C31$ 噬菌体的基因组整合位点 $attB^{\phi C31}$,我们在 mini-Tn5 内部还装上了 $attB^{\phi C31}$ 、 $attB^{\phi BT1}$ 、 $attB^{\phi Rv1}$ 、 $attB^{\phi Joe}$ 和 $attB^{\phi 901-1}$ 这 5 个位点特异性整合位点(图 1A),以便后续利用相应的 *attP* 载体进一步改造突变株。由于质粒 pJTn1~pJTn6 中并不含有放线菌质粒复制区,接合转移进入放线菌细胞后质粒本身不能复制、也不能稳定遗传,只有进一步发生转座,使 mini-Tn5 插入到染色体 DNA 上得到的转座突变子才能够在补加了阿泊拉霉素的接合转移培养基上生长。因此,理论上将质粒 pJTn1~pJTn6 接合进入糖多孢菌,所得到的接合转移子菌落就是转座突变株。

2.2 转座质粒转座效率的比较

以分别含有 pJTn1~pJTn6 的 DH10B/pUZ8002 为供体菌,以红色糖多孢菌 *Sa. erythraea* SLQ185 为受体菌做双亲本接合转移,测试转座质粒 pJTn1~pJTn6 是否可以在糖多孢菌中转座,并比较这些质粒的转座效率。每个转座质粒重复 3 次实验;在每个接合转移实验中,供体菌和受体菌孢子均为 1×10^9 cfu,接合转移培养基为 ISP4 (添加 20 mmol/L $MgCl_2$)。得到的阿泊拉霉素抗性接合子数如表 2 所示。其中,转座质粒 pJTn3、pJTn4 可得到接合子约 200/皿;pJTn2、pJTn5 和 pJTn6 的接合子数较多,达 1 000/皿;pJTn1 的接合子数最多,接近 2 000/皿。

2.3 刺糖多孢菌中的转座及转座定位

选择红色糖多孢菌中转座效率较高的 pJTn1 和 pJTn5 对刺糖多孢菌中进行转座诱变,每个质粒进行 6 次接合转移实验。每个接合平板上均长出 1~4 个接合子,pJTn1 和 pJTn5 的转座效率没有显著差异。从 12 个接合转移平板上共得到 31 个转座突变株,命名为 BLL01~BLL31。提取转座突变株的总 DNA,通过总 DNA 酶切、自连、转化大肠杆菌,

表 2 转座质粒 pJTn1~pJTn6 在 *Sa. erythraea* SLQ185 中的转座效率

Table 2 The transposition efficiency of pJTn1–pJTn6 in *Sa. erythraea* SLQ185

质粒 Plasmids		pJTn1	pJTn2	pJTn3	pJTn4	pJTn5	pJTn6
接合子数/皿	1	2 000	1 000	200	150	1 000	1 000
Number of	2	1 800	1 200	180	150	1 300	1 000
mutants/plate	3	1 700	1 000	230	200	1 200	1 000

将突变株基因组中的 mini-Tn5 及其邻近的 DNA 序列拯救出来,得到大肠杆菌拯救质粒。用引物 Tn-F 和 Tn-R 测定拯救质粒上 mini-Tn5 的 ME 边界两侧的序列,与刺糖多孢菌总 DNA 序列比对,定位 mini-Tn5 的插入位点。其中,30 个突变株的 mini-Tn5 插入位点具有典型 Tn5 转座所产生的 9 bp 靶序列重复;而突变株 BLL01 中,转座造成插入位点缺失 3 534 bp 基因组 DNA(表 3)。

2.4 刺糖多孢菌转座突变子发酵

对刺糖多孢菌转座突变株和野生型菌株 NR-RL18395 进行发酵,HPLC 检测发酵液中的多杀菌素,通过标准曲线计算多杀菌素的产量。各菌株 3

次发酵的结果如图 2 所示,野生型菌株产多杀菌素 128.6 mg/L。在 31 株转座突变株中,BLL08 不能产生多杀菌素;BLL01、BLL29 与野生型菌株相比产量大幅降低,分别为野生型的 34% ($P=0.006\ 4$) 和 16% ($P=0.002\ 8$);另有 5 株突变菌株产量明显降低,即 BLL02 (64%, $P=0.026$)、BLL03 (65%, $P=0.016$)、BLL05 (70%, $P=0.015$)、BLL10 (77%, $P=0.034$)和 BLL14 (80%, $P=0.048$)。此外,突变株 BLL25 的产量比野生型略有提高 (114%),但统计学上没有显著性差异($P=0.26$)。这些影响多杀菌素产量的突变株中 mini-Tn5 转座插入位点及相关基因信息如表 3 所示。

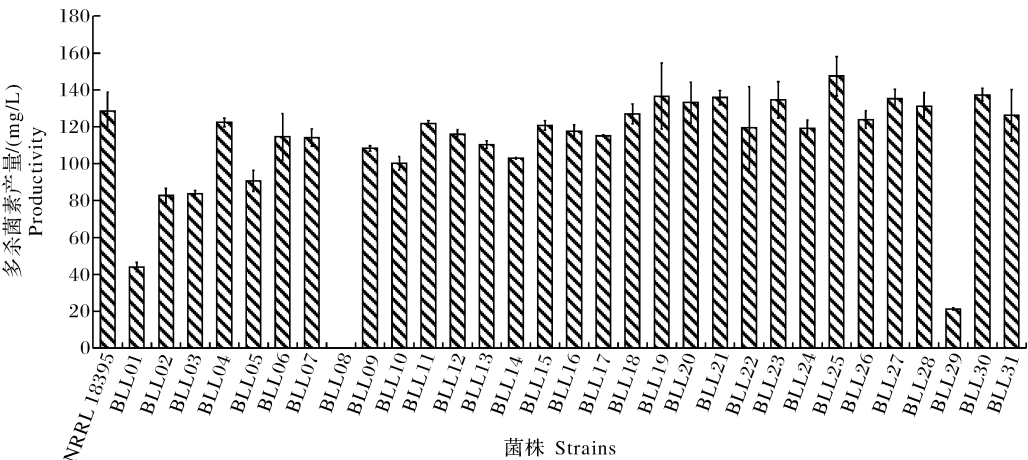


图 2 刺糖多孢菌转座突变株产多杀菌素产量

Fig.2 The yield of spinosad in the *Sa. spinosa* transposition mutants

表 3 影响多杀菌素产量的突变株中转座插入位点及相关基因

Table 3 The transposition sites and related genes in the mutants altering the production of spinosad

突变株 Mutants	插入位点 Ins sites	基因产物 Genes products	基因起始位点 Start-end	NCBI 编号 ACC. No
BLL01	3733601 3737136	Protein SspiN1_33350;	3733450-3734316	WP_083833349.1
		Fumarylacetoacetase;	3734313-3735518	WP_010313392.1
		Transcriptional regulator;	3735523-3736215	WP_010313394.1
		NmrA family protein	3736453-3737178	WP_132479291.1
BLL02	1196907	Hypothetical protein SspiN1_08290	1215908-1187808	WP_101376913.1
BLL03	2096933	Serine/threonine protein kinase	2098288-2096843	WP_010306394.1
BLL05	2922968	Hypothetical protein SspiN1_40775	2923377-2922973	WP_029536211.1
BLL08	3125768	Cytochrome C biogenesis membrane protein	3126450-3124828	WP_010312419.1
BLL10	2445419	Secreted protein	2445418-2444981	WP_101305258.1
BLL14	5811851	Acetyl-CoA acetyltransferase	5812372-5811161	WP_010694583.1
BLL25	7427369	Non-ribosomal peptide synthase/amino acid adenylation enzyme	7427803-7426541	WP_083822066.1
BLL29	4913865	Mov34/MPN/PAD-1 family protein	4913599-4914054	WP_010693745.1

3 讨 论

由于刺糖多孢菌对外源 DNA 具有强烈限制性,导致该菌遗传操作特别困难^[13-14]。Chen 等^[25]通过消除载体上相应的限制酶切位点,成功地将自主复制性质粒引入到了刺糖多孢菌中。在红色糖多孢菌异源宿主中合成多杀菌素,目前报道的最高效价为 830 mg/L,距离产业化也很遥远^[6]。无论在天然宿主还是异源宿主生产,都需要系统性的遗传工程育种来大幅度提高现有菌种的发酵效价,才有可能实现多杀菌素原料的国产化。基于笔者所在课题组前期构建高效转座载体并在模式菌株筛选得到大量抗生素高产相关基因的经验,我们尝试构建可以在糖多孢菌转座诱变的载体,以便后续筛选大量高产育种靶标基因,用于多杀菌素的高产育种。

本研究采用自杀性(非复制性)载体,通过去除 *Sal* I、*Nco* I、*Nae* I 位点和多个来源于放线菌的其他限制酶的作用位点,并采用刺糖多孢菌特异性强启动子控制高效转座酶基因的表达,构建了新型 Tn5 转座载体,并成功获得刺糖多孢菌转座突变株,检测到大部分突变株中发生了典型的 Tn5 转座。获得的突变株中有 8 个突变菌株多杀菌素产量显著下降,暗示被插入失活的基因可能与多杀菌素产量关系密切。所构建的转座质粒 pJTn1~pJTn6,经验证可以在红色糖多孢菌中高效转座。pJTn 系列转座质粒可作为糖多孢菌的体内转座诱变工具,为抗生素的产量调控研究和高产育种靶标基因筛选提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] ALGADO V L, SHEETS J J, WATSON G B, et al. Studies on the mode of action of spinosad; the internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation[J]. Pesticide biochemistry and physiology, 1998, 60(2): 103-110.
- [2] THOMPSON G D, DUTTON R, SPARKS T C. Spinosad, a case study; an example from a natural products discovery programme[J]. Pest management science, 2000, 56: 696-702.
- [3] LIANG Y, LU W, WEN J. Improvement of *Saccharopolyspora spinosa* and the kinetic analysis for spinosad production[J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2009, 152(3): 440-448.
- [4] JIN Z, WU J, ZHANG Y, et al. Improvement of spinosad producing *Saccharopolyspora spinosa* by rational screening[J]. Journal of Zhejiang University Science A, 2006, 7(2): 366-370.
- [5] ZHAO C, HUANG Y, GUO C, et al. Heterologous expression of spinosyn biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* species is dependent on the expression of rhamnose biosynthesis genes[J]. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 2017, 27(3): 190-198.
- [6] HUANG J, YU Z, LI M H, et al. High level of spinosad production in the heterologous host *Saccharopolyspora erythraea* [J]. Applied and environmental microbiology, 2011, 82(18): 5603-5611.
- [7] BALTZ R H. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes[J]. Journal of industrial microbiology and biotechnology, 2016, 43(2/3): 343-370.
- [8] GEHRING A M, NODWELL J R, BEVERLEY S M, et al. Genomewide insertional mutagenesis in *Streptomyces coelicolor* reveals additional genes involved in morphological differentiation[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2000, 97(17): 9642-9647.
- [9] WEBER J M, REEVES A, CERNOTA W H, et al. Application of *in vitro* transposon mutagenesis to erythromycin strain improvement in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. Methods in molecular biology, 2017, 1498: 257-271.
- [10] HORBAL L, FEDORENKO V, BECHTHOLD A, et al. A transposon-based strategy to identify the regulatory gene network responsible for landomycin E biosynthesis[J]. Fems microbiology letters, 2013, 342(2): 138-146.
- [11] XU Z, WANG Y, CHATER K F, et al. Large-scale transposition mutagenesis of *Streptomyces coelicolor* identifies hundreds of genes influencing antibiotic biosynthesis [J/OL]. Applied and environmental microbiology, 2017, 83(6): e02889-16 [2019-06-01]. <https://doi.org/10.1128/AEM.02889-16>.
- [12] XU Z, LI Y, WANG Y, et al. Genome-wide mutagenesis links multiple metabolic pathways with actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor* [J/OL]. Applied and environmental microbiology, 2019, 85(7): e03005-18 [2019-06-01]. <https://doi.org/10.1128/AEM.03005-18>.
- [13] MATSUSHIMA P, BROUGHTON M C, TURNER J R, et al. Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production[J]. Gene, 1994, 146(1): 39-45.
- [14] MATSUSHIMA P, BALTZ R H. Transformation of *Saccharopolyspora spinosa* protoplasts with plasmid DNA modified *in vitro* to avoid host restriction[J]. Microbiology, 1994, 140(1): 139-143.
- [15] PAN Y, YANG X, LI J, et al. Genome sequence of the spinosyn-producing bacterium *Saccharopolyspora spinosa* NR-RL18395[J]. Journal of bacteriology, 2011, 193(12): 3150-3151.
- [16] PAGET M S B, CHAMBERLIN L, ATRI H A, et al. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigma E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of bacteriology, 1999, 181(1): 204-211.

[17] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指南(精编版) [M].3 版.黄培堂,等,译. 北京：化学工业出版社,2008.

[18] DHAKAL D, POKHREL A R, JHA A K, et al. *Saccharopolyspora* species; laboratory maintenance and enhanced production of secondary metabolites[M]. [S.l.]: Wiley-Blackwell, 2017.

[19] JIEQUN W U, QINGLIN Z, WEI D, et al. Toward improvement of erythromycin A production in an industrial *Saccharopolyspora erythraea* strain via facilitation of genetic manipulation with an artificial *attB* site for specific recombination[J]. 生命有机化学, 2011, 77(21): 7508-7516.

[20] 代鹏.多杀菌素生产菌株育种及发酵工艺研究[D]. 武汉：华中农业大学, 2004.

[21] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. Practical *Streptomyces* genetics[M]. Colney; John Innes Foundation, 2000.

[22] WANG W, LI X, WANG J, et al. An engineered strong promoter for streptomycetes[J]. Applied and environmental microbiology, 2013, 79(14): 4484-4492.

[23] YANG Q, DING X, LIU X, et al. Differential proteomic profiling reveals regulatory proteins and novel links between primary metabolism and spinosad production in *Saccharopolyspora spinosa* [J/OL]. Microbial cell factories, 2014, 13(1): 27[2019-06-01]. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-27>.

[24] FEDORYSHYN M, WELLE E, BECHTHOLD A, et al. Functional expression of the Cre recombinase in actinomycetes[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2008, 78(6): 1065-1070.

[25] CHEN J, XIA H Y, DANG F J, et al. Characterization of the chromosomal integration of *Saccharopolyspora* plasmid pCM32 and its application to improve production of spinosyn in *Saccharopolyspora spinosa* [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2015, 99(23): 10141-10149.

In vivo transposition mutagenesis system of *Saccharopolyspora*

BAI Lulu HE Weijun LONG Qingshan WANG Yemin DENG Zixin TAO Meifeng
State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University,
Shanghai 200030, China

Abstract To establish an *in vivo* transposition mutagenesis system of *Saccharopolyspora*, the transposition plasmids pJTn1-pJTn6 were constructed by enhancing the expression of Tn5 transposase gene *tnp* (5) with strong promoters originated from *Sa. spinosa* and optimizing the *Streptomyces* Tn5-based transposition plasmid pHL734. The results showed that plasmids pJTn1-pJTn6 transposed efficiently in *Sa. erythraea*. Plasmid pJTn1 and pJTn5 worked well in *Sa. spinosa*. Canonical events of Tn5 transposition were detected on 30 genomes out of 31 *Sa. spinosa* transposition mutants. There was a significant decrease in the yield of spinosad in eight mutants. It demonstrated that the pJTn plasmids are valuable tools for the transposition mutagenesis in the genus of *Saccharopolyspora*, which will facilitate studying the regulation of spinosad production and screening target genes for the high-yield breeding.

Keywords *Streptomyces*; high-yield strain; *Saccharopolyspora spinosa*; spinosad; *Saccharopolyspora erythraea*; Tn5 transposition plasmids; *in vivo* transposition

(责任编辑:张志钰)