

· 生物技术与方法 ·

# 利用 CRISPR-Cas9 系统构建新型异戊酰螺旋霉素产生菌

张晓婷<sup>1</sup>, 张妍<sup>2</sup>, 戴剑澍<sup>1</sup>, 王以光<sup>1</sup>, 赫卫清<sup>1</sup>

1 中国医学科学院 医药生物技术研究所 卫健委抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050

2 沈阳同联集团有限公司, 辽宁 沈阳 110042

张晓婷, 张妍, 戴剑澍, 等. 利用 CRISPR-Cas9 系统构建新型异戊酰螺旋霉素 I 产生菌. 生物工程学报, 2019, 35(3): 472-481.  
Zhang XT, Zhang Y, Dai JL, et al. Construction of a new isovalerylspiramycin I producing strain by CRISPR-Cas9 system. Chin J Biotech, 2019, 35(3): 472-481.

**摘要:** 异戊酰螺旋霉素 (Isovalerylspiramycin, ISP) I 是必特螺旋霉素 (Bitespiramycin, BT) 的一种主组分, 其抗菌活性与 BT 相似, 而且作为单一组分在质控和剂型上更具优势, 目前正在进行临床前研究。原有的 ISP I 工程菌株经过 3 次基因改造, 已经具有 2 种抗性基因, 很难再进行遗传操作。前期研究利用经典同源重组的方法无法构建无抗性的 ISP I 产生菌, 文中利用 CRISPR-Cas9 基因编辑系统在螺旋霉素 (Spiramycin, SP) 产生菌中成功将 3 位酰基化酶的基因 *bsm4* 替换为组成型强启动子 *ermEp\** 控制下的异戊酰基转移酶基因 (Isovaleryltransferase gene, *ist*)。删除 *bsm4* 后突变株只能产生 SP I 组分, 外源基因 *ist* 的表达产物催化 SP I 在其 4"位进行异戊酰化修饰形成 ISP I。经过 HPLC 和质谱鉴定, 阳性菌株  $\Delta EI$  的发酵产物中只有 ISP I 一种 ISP 组分, 证实新的 ISP I 工程菌株构建成功。 $\Delta EI$  菌株不带有抗性基因, 可重复利用 CRISPR-Cas9 系统进行基因操作来获得新的改良菌株。

**关键词:** 异戊酰螺旋霉素 I, 酰基转移酶基因, CRISPR-Cas9 系统

## Construction of a new isovalerylspiramycin I producing strain by CRISPR-Cas9 system

Xiaoting Zhang<sup>1</sup>, Yan Zhang<sup>2</sup>, Jianlu Dai<sup>1</sup>, Yiguang Wang<sup>1</sup>, and Weiqing He<sup>1</sup>

1 NHC Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

2 Shenyang Tonglian Group Co., LTD., Shenyang 110042, Liaoning, China

**Abstract:** Isovalerylspiramycin (ISP) I, as a major component of bitespiramycin (BT), exhibits similar antimicrobial

**Received:** July 5, 2018; **Accepted:** October 11, 2018

**Supported by:** National Science and Technology Major Project (No. 2014ZX09201003-002), National Natural Science Foundation of China (No. 81773617), the Innovation of Chinese Academy of Medical Sciences (No. 2017-I2M-1-012).

**Corresponding author:** Weiqing He. Tel/Fax: +86-10-63038137; E-mail: heweiqing@imb.pumc.edu.cn

国家科技重大专项 (No. 2014ZX09201003-002), 国家自然科学基金 (No. 81773617), 医科院创新工程项目 (No. 2017-I2M-1-012) 资助。

activities with BT and has advantages in quality control and dosage forms. It has been under preclinical studies. The existing ISP I producing strain, undergoing three genetic modifications, carries two resistant gene markers. Thus, it is hard for further genetic manipulation. It is a time-consuming and unsuccessful work to construct a new ISP I strain without resistant gene marker by means of the classical homologous recombination in our preliminary experiments. Fortunately, construction of the markerless ISP I strain, in which the *bsm4* (responsible for acylation at 3 of spiramycin) gene was replaced by the Isovaleryltransferase gene (*ist*) under control of the constitutive promoter *ermEp\**, was efficiently achieved by using the CRISPR-Cas9 gene editing system. The mutant of *bsm4* deletion can only produce SP I. Isovaleryltransferase coded by *ist* catalyzes the isovalerylation of the SP I at C-4'' hydroxyl group to produce ISP I. As anticipated, ISP I was the sole ISP component of the resultant strain ( $\Delta EI$ ) when detected by HPLC and mass spectrometry. The  $\Delta EI$  mutant is suitable for further genetic engineering to obtain improved strains by reusing CRISPR-Cas9 system.

**Keywords:** Isovalerylspiramycin I, acyltransferase gene, CRISPR-Cas9 system

必特螺旋霉素 (Bitespiramycin, BT) 是将耐热链霉菌 *Streptomyces thermotolerans* 的 4''-异戊酰基转移酶基因 (4''-Isovaleryltransferase gene, *ist*) 导入到螺旋霉素 (Spiramycin, SP) 产生菌螺旋链霉菌 *Streptomyces spiramyceticus* 中进行表达, 所产生的发酵产物<sup>[1]</sup>。BT 的主组分是异戊酰螺旋霉素 (Isovalerylspiramycin, ISP) I、II 和 III, 其结构式如图 1 所示。因为 SP 的 3 位酰基化酶的底物特异性不强, 可以同时识别乙酰基和丙酰基底物, 导致出现 3 种主组分。3 位只是羟基的为 I 组分, II 组分是 3 位羟基乙酰化产物, III 组分是丙酰化产物。BT 是多组分药物, 在发酵产物提纯和质控方面难度较大。经研究初步证实 ISP I 的药物活性与 BT 相当, 因此可以作为一种单组分药物进行后续开发。前期研究中通过阻断 SP 的 3 位酰基化酶基因 *bsm4*, 获得只产 SP I 的基因工程菌株<sup>[2]</sup>, 再导入 2 个拷贝的 *ist* 基因<sup>[3]</sup>, 得到只产 ISP I 的工程菌株<sup>[4]</sup>。但此菌株 ISP I 的产量很低, 发酵液的效价只有 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。为了提高 ISP I 的发酵产量, 又将 *ist* 基因和其正调控基因 *acyB2* 整合到 ISP I 菌株的染色体上, 通过育种筛选, 获得效价在 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  左右的高产菌株 *S. spiramyceticus* WSJ-IA<sup>[5-6]</sup>。此高产菌株中已经包含硫链丝菌素和阿普拉霉素两种抗性基因, 利用现有的链霉菌质粒很难再对其进行定向遗传操作。因此采用等离子诱变和传统诱变相结合的方法对

WSJ-IA 菌株进行诱变育种, 获得效价在 2 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  左右的高产菌株<sup>[7]</sup>, 基本满足大型发酵的要求。此菌株共进行 3 次遗传操作, 特别是将 *bsm4* 基因进行部分删除后, 菌株的产量下降为原株的 50% 左右。在菌株染色体的 2 个不同位置中还包含 3 个 *ist* 基因, 在传代过程中有发生同源重组的可能性, 不利于菌株的遗传稳定。

为了获得遗传更加稳定的 ISP I 菌株, 利用近几年新出现的 CRISPR-Cas9 基因编辑系统<sup>[8-9]</sup>, 可以方便地对靶基因进行阻断或替换。本研究拟将组成型强启动子 *ermEp\** 控制下的 *ist* 基因替换 *bsm4* 基因, 从而获得新的 ISP I 菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒

螺旋霉素产生菌 *S. spiramyceticus* 1941 由本

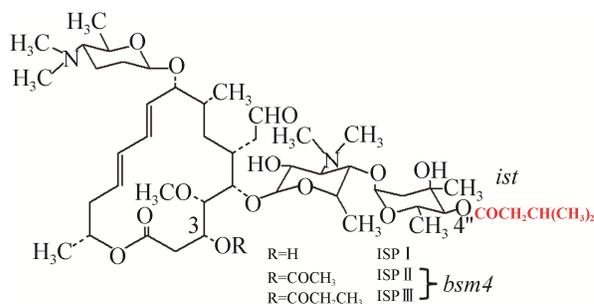


图 1 异戊酰螺旋霉素的结构

Fig. 1 Structure of isovalerylspiramycin.

实验室保存。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞、基因克隆和重组质粒构建的受体菌, 购自北京全式金生物技术有限公司。pKC1139<sup>[10]</sup> 链霉菌和大肠杆菌穿梭质粒, 带有 Apramycin 抗性基因, 本实验室保存。CRISPR-Cas9 基因组编辑质粒 pKCcas9do<sup>[11]</sup>, 由中国科学院上海生命科学研究院姜卫红研究员惠赠。pKCcas9do 是以链霉菌温敏质粒 pKC1139 为出发质粒, 在培养温度为 37 °C 时停止复制。pKCcas9do 质粒含有优化的 *cas9* 基因, 由硫链丝菌素诱导的启动子 *tipA* 进行调控; 人工合成的 *j23119* 启动子控制引导 RNA (Single-guide RNA, sgRNA) 基因的转录; sgRNA 由 crRNA 和 tracrRNA 组成, 在 crRNA 中人工设计 20 bp 的靶结合序列, sgRNA 引导 Cas9 蛋白对靶位点进行切割。之后可以通过在 37 °C 培养和传代, 从宿主菌中去除此质粒, 获得没有抗性而靶基因被改造的目的菌株。实验中用于构建质粒的引物序列见表 1。

### 1.1.2 试剂

BT 和 ISP I 的对照品, 本实验室自制。阿普拉霉素 (Apramycin, Am) 购自武汉远城科技发

表 1 本文中引物

Table 1 Primers used in this study

Oligos	Primer sequence (5'-3')	Use
<i>bsm4</i> -LF	GCTCTAGATACCGCTCTGGCACGGGACT	Amplifying left arm
<i>bsm4</i> -LR	CGGCCGATGTCGTGATCGGGTCCGAGGATG	
ei-F	CATCCTCGGACCCGATCACGACATCGGCCGGTACCAG CCCGACCCGA	Cloning <i>ermEp*-ist</i> gene
ei-R	ACTTCGGGGCGCAGGGGCGGTGCCGGGCTTCTCACTAC GGAGTGCCGGACGGGG	
<i>bsm4</i> -RF	GAAGCCCGGCACCCGCCCTGCGCCCCGAAGT	Amplifying right arm
<i>bsm4</i> -RR	CCCAAGCTTATCCTGCTGCCCTCGCTGTG	
sgRNA-1	GGACTAGTCCGCTGCACATCGTCACGTTGTTTTAGAGCT AGAAAT	Forward primer for guide sequence of sgRNA-1
sgRNA-2	GGACTAGTAGATTCCGGTGGGGCGACTGGTTTTAGAGCT AGAAAT	Forward primer for guide sequence of sgRNA-2
sgRNA-R	GCTCTAGACTCAAAAAAAGCACCGACTCGG	Reverse primer for sgRNA
Hist-F	GCTCTAGACTCACCGACGACAGGAGAAGC	Amplifying 4.0 kb fragment
Hist-R	CCCAAGCTTACCCACTTCGCCAACTACCG	

展有限公司。硫链丝菌素 (Thiostrepton, Tsr), 购自 Sigma 公司。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。KOD FX Neo DNA 聚合酶 (TOYOBO) 购自北京天佑恒远生物科技有限公司。

### 1.1.3 培养基

*S. spiramyceticus* 1941 及其突变株的固体培养基 (g/100 mL): 黄豆饼粉 2, 葡萄糖 1, 淀粉 3, CaCO<sub>3</sub> 0.5, NaCl 0.4, 琼脂粉 1.5, 自然 pH 值。1  $\mu$ g/mL 的 Tsr 诱导 Cas9 基因表达进行定点切割。R2YE 培养基用于 *S. spiramyceticus* 1941 的原生质体的制备和转化<sup>[12]</sup>。

*S. spiramyceticus* 1941 及其突变株的种子和发酵培养基 (g/100 mL) 详见文献[13]。

*S. spiramyceticus* 1941 及其突变株的生物检定培养基 (g/L): 牛肉膏 3.0, 酵母膏 3.0, 蛋白胨(F 403) 10.0, 葡萄糖 1.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 12.0, pH 8.0。

## 1.2 方法

### 1.2.1 分子克隆

链霉菌总 DNA 的提取按文献[14]进行。*E. coli* DH5 $\alpha$  与 *E. coli* ET12567 感受态细胞的制备、分

子克隆与鉴定按文献[15]进行。PCR 反应采用 KOD FX Neo DNA 聚合酶反应体系。DNA 测序由中美泰和生物技术(北京)有限公司完成。

### 1.2.2 构建 *bsm4* 基因替换质粒

利用 3 对引物 *bsm4*-LF/LR、*ei*-F/R 和 *bsm4*-RF/RR 分别以 *S. spiramyceticus* 1941 基因组 DNA 为模板进行扩增, 获得左同源臂 (Left arm), *ermEp\*<sup>-ist</sup>* 和右同源臂 (Right arm) 3 种 PCR 产物。将这些产物纯化后, 进行重叠延伸 PCR, 获得 6.6 kb 的目的片段, 再进行 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切消化, 与用同样酶切的 pKC1139 载体进行连接, 得到 pKC-ei 重组质粒, 如图 2 所示。

利用 CRISPR-Cas9 系统进行基因替换, 先通过 sgRNA-1 和 sgRNA-R 引物扩增出引导 Cas9 进行特异性切割的引导序列 sgRNA-1, 用 *Spe* I 和 *Xba* I 进行双酶切后回收; 利用 sgRNA-2 和 sgRNA-R 引物扩增出另一个引导序列 sgRNA-2, 也用 *Spe* I 和 *Xba* I 进行双酶切后回收; 以 pKC-ei 为模板, 利用 *Hist*-F/R 引物扩展出 4.0 kb 片段, 用 *Xba* I 和 *Hind* III 进行双酶切后回收, 将

sgRNA-1 和 sgRNA-2 分别与 4.0 kb 片段克隆到 pKCcasdo 载体 (*Spe* I/*Hind* III) 上, 获得替换质粒 pKCcas-ei1 和 pKCcas-ei2。

### 1.2.3 筛选目的菌株

将构建好的重组质粒通过原生质体转化法导入到 *S. spiramyceticus* 1941 中, 利用 1 μg/mL Tsr 诱导 Cas9 表达, 由 sgRNA 引导 Cas9 对靶位点进行切割, 在质粒上有设计好的 *ermEp\*<sup>-ist</sup>* 替代 *bsm4* 基因的同源片段。将发生同源双交换的目的菌株置于 37 °C 培养, 使质粒停止复制, 之后通过 Am 和无抗性平板进行筛选, 获得 *ermEp\*<sup>-ist</sup>* 替代 *bsm4* 基因的目的菌株, 进行 PCR 鉴定和测序验证。

### 1.2.4 发酵产物检测

含 *S. spiramyceticus* 1941 转化子的斜面置于 28 °C 培养 5–7 d, 挖块至种子培养基 (50 mL 培养基/250 mL 三角瓶), 28 °C 振荡 (200 r/min) 培养 48 h, 按 1:50 的比例转接至发酵培养基中 (50 mL 培养基/500 mL 三角瓶), 28 °C 振荡 (200 r/min) 培养 4 d, 发酵液离心取上清液, 用 5.0 mol/L NaOH

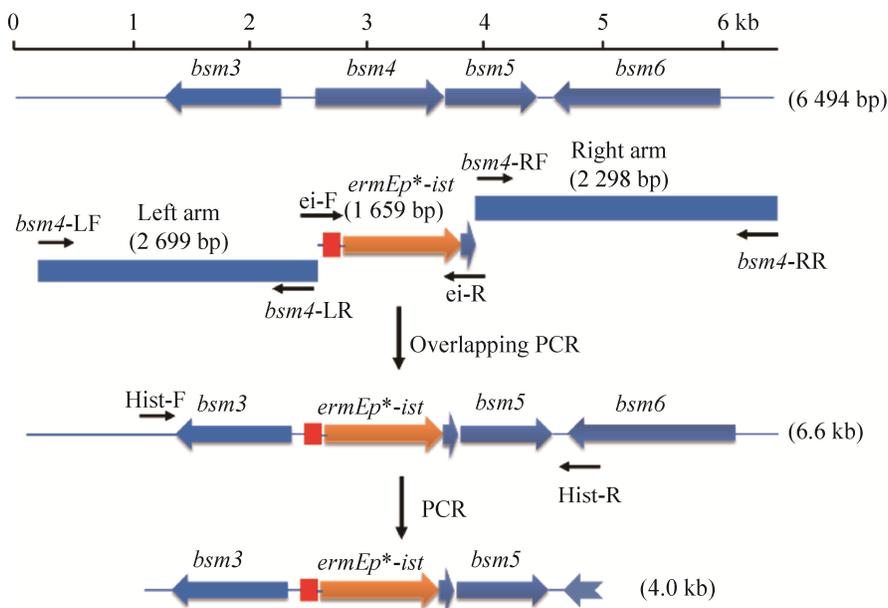


图 2 *bsm4* 基因替换质粒的构建

Fig. 2 Construction of *bsm4* replacement plasmids.

调至 pH 8.5–9.0, 加等体积乙酸乙酯萃取, 8 mL 萃取液离心浓缩至干燥, 溶于 200  $\mu$ L 乙腈, 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤后, 取 3  $\mu$ L 进行 HPLC 检测 (日本岛津高效液相色谱仪, LC-10ATvp CLASS-VP V6.10): 色谱柱为 Kromasil C18, 5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm, 流动相为乙腈/10 mmol/L pH 7.5–8.0 的乙酸铵溶液 (65/35), 流速为 1 mL/min, 检测波长 231 nm。LC-MS (美国 Thermo 公司 LTQ 型液相色谱-质谱联用仪) 检测在本所仪器室进行, 质谱条件:ESI 源;正离子检测;鞘气 (N<sub>2</sub>) 流速 0.3 L/min; 辅助气 (He) 流速 0.1 L/min; 源电压 4.5 kV; 毛细管温度 350  $^{\circ}$ C; 毛细管电压 4.5 V。

## 2 结果与分析

### 2.1 *bsm4* 上下游基因分析

BT 产生菌 *S. spiramyceticus* WSJ 已经完成全基因组测序, 并从序列中鉴定出的螺旋霉素生物合成基因簇 (GenBank 登录号: MH 460451), 3 位的酰基转移酶基因命名为 *bsm4* (图 2), 它的上游基因为 *bsm3*, 根据同源性推测其产物为 23S rRNA 甲基转移酶, 参与核糖体 23S rRNA 的甲基化, 与抗生素的抗性相关。下游基因 *bsm5* 为 O-甲基转移酶基因, 为螺旋霉素的后修饰基因, 它与 *bsm4* 的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 之间只有 5 bp 的基因间序列, 推测二者共转录。要确保 *bsm5* 的正常转录, 在使用 *ermEp\*-ist* 替代 *bsm4* 部分序列时, 不能在 *ist* 后面设计转录终止信号, 同时需要保留 *bsm5* 翻译所需元件, 如核糖体结合位点。因此在设计时保留了 *bsm4* 基因最后部分的 111 bp 序列。*bsm6* 基因与 *bsm5* 的 ORF 方向相反, 推测为 crotonyl-CoA 还原酶。*ermEp\*-ist* 替代 *bsm4* 后对其转录和翻译没有明显影响。

### 2.2 构建重组质粒

利用 3 对引物 *bsm4*-LF/LR、eiF/eiR 和 *bsm4*-RF/RR 以 *S. spiramyceticus* 1941 基因组

DNA 为模板进行 PCR, 分别得到 2 699 bp 的左同源臂、1 659 bp 的 *ermEp\*-ist* 片段和 2 298 bp 的右同源臂 3 种目的片段 (图 3A), 将这 3 种 PCR 产物通过重叠延伸 PCR, 获得 3 个片段拼接的产物 (6.6 kb)。泳道 4 和 5 是利用 *bsm4*-LF/RR 引物鉴定构建好的 pKC-ei 重组质粒, 目的片段大小与预期相符 (图 3B), 并通过测序进行确证。将重组质粒 pKC-ei 通过原生质体转化的方法导入到 *S. spiramyceticus* 1941, 利用自然发生的同源重组来获得 *ermEp\*-ist* 替代 *bsm4* 的目的菌株。因为没有抗性标记只能利用传代和 PCR 进行筛选, 经过几百株次的筛选仍然无法获得目的菌株。

之后利用 CRISPR-Cas9 系统的质粒 pKccas9do 构建 2 种新的替换质粒 pKcas-ei1 和 pKcas-ei2。图 3C 中是 pKcas-ei1 (泳道 6 和 7) 与 pKcas-ei2 (泳道 8 和 9) 进行 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切的电泳图, 均获得了符合预期大小的 4.0 kb 片段; 泳道 10 和 11 利用 Hist-F/R 引物验证 2 种重组质粒中的 4.0 kb 的目的片段; 利用 sgRNA-1/R 和 sgRNA-2/R 引物分别从 pKcas-ei1 和 pKcas-ei2 质粒中扩增出 130 bp 左右编码 sgRNA 的小片段。最后经过测序证实 2 种质粒构建成功。通过原生质体转化的方法导入到 *S. spiramyceticus* 1941 中。

### 2.3 筛选出目的菌株

利用 Am 抗性筛选出含有 pKcas-ei1 和 pKcas-ei2 重组质粒的阳性转化子。经过 Tsr 诱导 Cas9 表达后, 通过传代和在 37  $^{\circ}$ C 培养使质粒停止复制, 筛选出 Am 抗性消失的菌株 (图 4), 再利用 PCR 筛选出既消除质粒又发生同源双交换的目的菌株。只有 pKcas-ei1 的转化子筛选出了阳性菌株  $\Delta$ EI, 而含 pKcas-ei2 的转化子均未筛选出目的菌株。通过 *bsm4*-LF/RR 引物在原株 *S. spiramyceticus* 1941 和  $\Delta$ EI 突变株中都扩增出了大约 6 kb 的特异性条带 (图 3F), 经过序列测定, 证实在  $\Delta$ EI 突变株中目的基因 *bsm4* 确实被 *ermEp\*-ist* 取代, 而且其上下游基因也未发生突变。

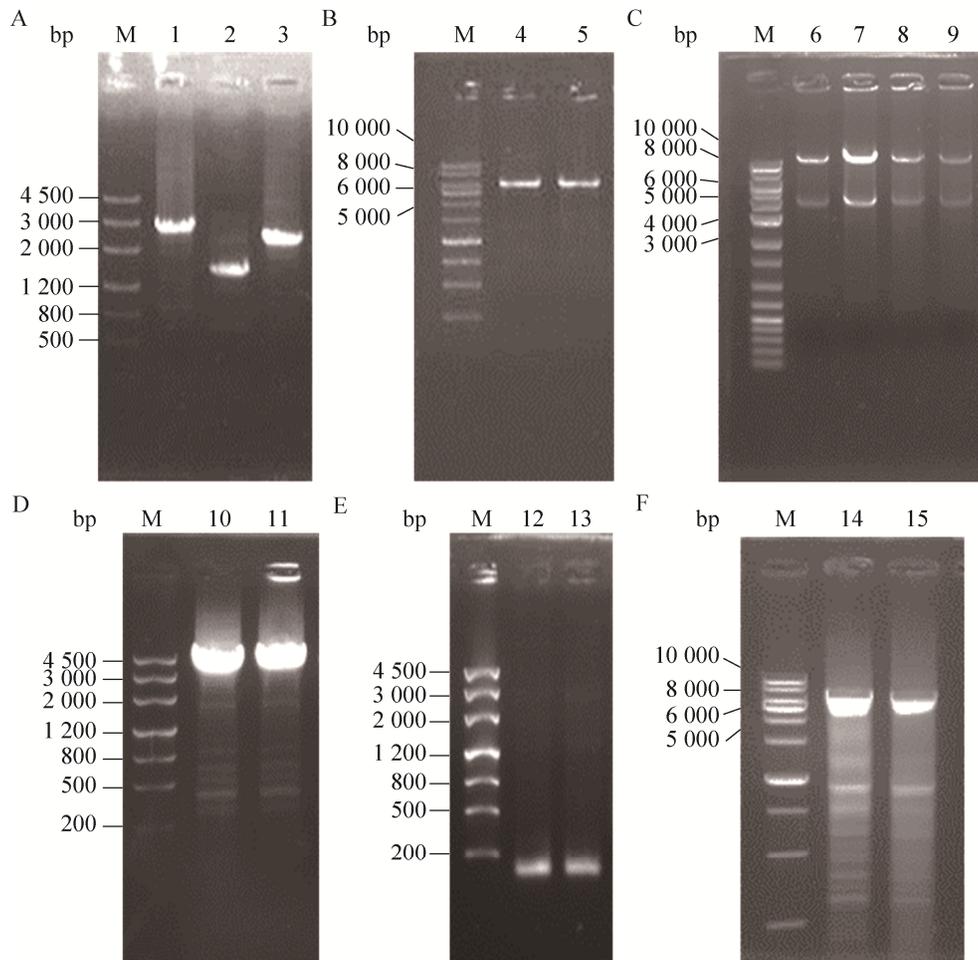


图3 三种重组质粒的电泳检测图

Fig. 3 Identification of the three recombinant plasmids by electrophoretic detection. 1: left arm; 2: *ermEp\*-ist*; 3: right arm; 4-5: pKC-ei (*bsm4-LF/RR*); 6-7: pKcas-ei1 (*Hind* III/*Xba* I); 8-9: pKcas-ei2 (*Hind* III/*Xba* I); 10: pKcas-ei1 (*Hist-F/R*); 11: pKcas-ei2 (*Hist-F/R*); 12: pKcas-ei1 (*sgRNA-1/R*); 13: pKcas-ei2 (*sgRNA-2/R*); 14: *S. spiramyceticus* 1941; 15:  $\Delta$ EI; M: DNA marker.

#### 2.4 检测目的菌株 $\Delta$ EI 的发酵产物

通过 HPLC 检测 *S. spiramyceticus* 1941 原株和  $\Delta$ EI 突变株的发酵产物,与原株 (图 5B) 相比,在  $\Delta$ EI 突变株中没有保留时间与 SP II 和 SP III 组分相似的产物出现,只有产物 a 保留时间为 4.749 min,与 SP I 的保留时间和紫外吸收光谱一致;与 BT 标准品 (图 5A) 对比, $\Delta$ EI 中产物 b 的保留时间为 16.596 min,与 ISP I 的保留时间一致 (图 5C)。 $\Delta$ EI 突变株的发酵产物经一级质谱全扫描,并未发现 ISP II 和 III 组分分子量相同的化合

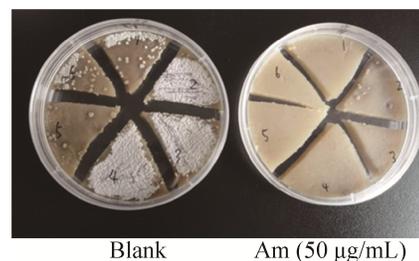


图4 通过 Am 抗性和温度筛选出的目的菌株

Fig. 4 The target strains screened by Am resistance and temperature.

物峰。在  $\Delta EI$  突变株中化合物 a 的离子峰  $[M+H]^+$  为  $m/z$  843.5, 与 SP I 一致; 产物 b 的离子峰  $[M+H]^+$  为  $m/z$  927.62 (图 5D), 与 ISP I 的一致。而且产物 b 的二级碎片离子分别为 768.36、699.39、540.37 及 402.28, 也与 ISP I 的裂解规律 (图 6) 和碎片峰数

据一致 (图 5E 和表 2)。在  $\Delta EI$  突变株的发酵产物中保留时间为 26 min 左右的峰为其他发酵产物, 其  $[M+H]^+$  为  $m/z$  279, 远小于螺旋霉素的分子量。因此  $\Delta EI$  突变株发酵产物中只有 SP I 和 ISP I 组分, 证实新的 ISP I 菌株构建成功。

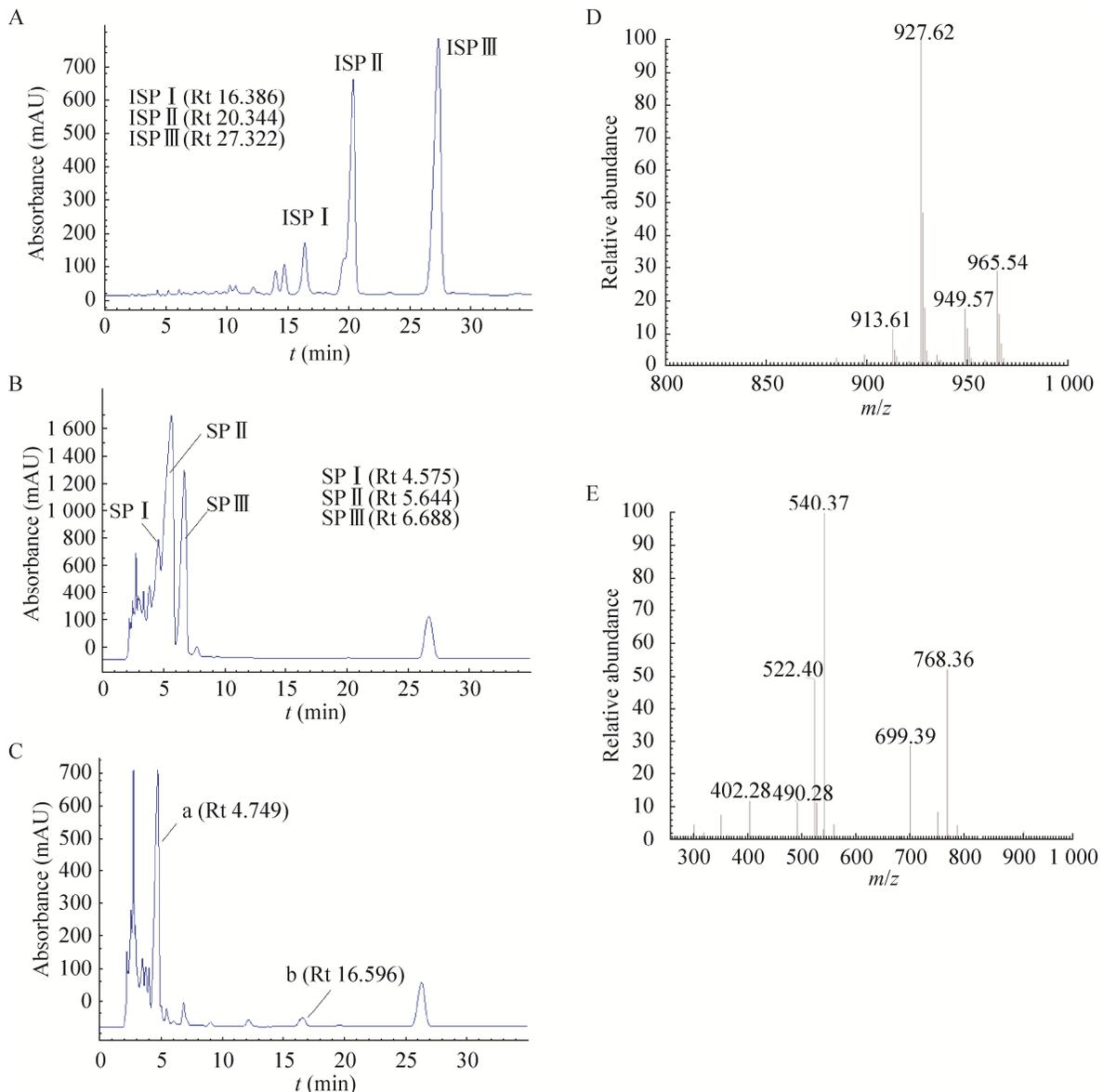


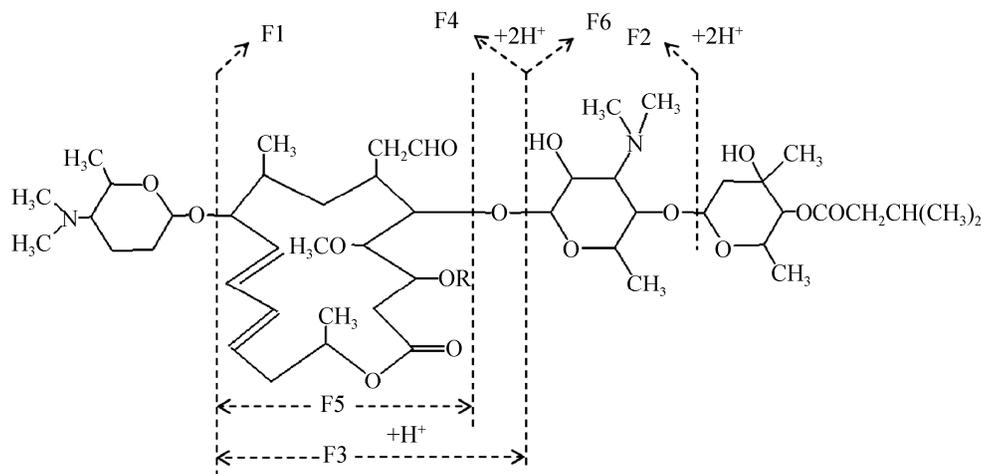
图 5  $\Delta EI$  突变株发酵产物的高效液相检测图和质谱检测图

Fig. 5 The profiles of HPLC and MS for the fermentation products of  $\Delta EI$  strain. (A–C) HPLC detection. A: BT; B: *S. spiramyceticus* 1941; C:  $\Delta EI$ . (D) The MS spectrum of compound b in  $\Delta EI$  strain. (E) Product ion spectrum of  $[M+H]^+$  of compound b at  $m/z$  927.

表 2 异戊酰螺旋霉素的二级质谱碎片峰

Table 2 The secondary MS data of isovalerylspiramycin

Component	[M+H] <sup>+</sup>	F1	F2	F3	F4	F5	F6
ISP I	927.6	768.8	699.6	540.6	526.6	349.5	402.5
ISP II	969.7	810.5	741.4	582.4	568.4	391.4	402.4
ISP III	983.7	824.5	755.6	596.5	582.5	405.4	402.7

图 6 异戊酰螺旋霉素离子的裂解规律图<sup>[16]</sup>Fig. 6 The cleavage pattern of isovalerylspiramycin's ion<sup>[16]</sup>.

### 3 讨论

ISP I 是 BT 中的一个主组分, 其抗菌活性与 BT 相似, 但其发酵产物质控更容易, 还可以做成注射剂型。本研究获得 ISP I 新产生菌, 只通过一次基因改造就实现目的基因的替换, 而且不带有抗性标记, 可以持续进行遗传操作来优化菌种。

实验前期选择经典同源重组的方法, 通过替换质粒 pKC-ei 导入目的菌株进行同源双交换, 因为没有抗性选择压力, 自然发生同源双交换的概率比较低, 很难筛选到目的菌株。CRISPR-Cas9 作为一种新的基因编辑技术可以通过 sgRNA 指导 Cas9 蛋白完成对靶 DNA 的双链剪切而被广泛使用, 近几年已经成功将该技术应用于腺病毒<sup>[17]</sup>、果蝇<sup>[18]</sup>、拟南芥<sup>[19]</sup>、水稻<sup>[20]</sup>、斑马鱼<sup>[21]</sup>等模式物种的基因修饰或改造中。在前期工作的基础上利用 CRISPR-Cas9 基因编辑系统完成了 *bsm4* 基因

的替换。开始时将 6.6 kb 的外源片段均克隆至 pKCCas9do 质粒上, 重组质粒总长度近 20 kb, 因质粒过大导致原生质体转化试验失败。缩短左右同源片段后, 构建出的新质粒顺利导入 *S. spiramyceticus* 1941 中。经过 Tsr 的诱导、Cas9 的切割及同源片段的互补后, 最终筛选出发生同源双交换的目的菌株。但只有 pKcas-ei1 筛选出了转化子, pKcas-ei2 一直未能成功筛选出目的菌株, 原因可能是第 2 个切割位点不太适合 CRISPR-Cas9 系统, 还有可能是发生脱靶效应导致重要基因失活。

*ermEp\** 是链霉菌中组成型强启动子, 包含有 2 个 -35 区和 -10 区, 属于多重启动子, 可能还具有双向调控转录的功能<sup>[22]</sup>, 在 3 位酰基转移酶基因的上游是 23S rRNA 的甲基转移酶基因, 是一种修饰 23S rRNA 而获得抗生素抗性的基因, 抗生素产生菌的产抗生素能力与其对抗生素的抗

性之间具有一定的相关性,抗性基因的高表达通常能提高抗生素的产量<sup>[23-25]</sup>。用 *ermEp\*-ist* 基因替换 *bsm4* 基因可以同时实现 2 个目标: 1) 将 3 位酰基转移酶基因删除,菌株只产生 SP I; 2) 高表达的 *ist* 基因整合到宿主染色体上稳定存在,而且位于螺旋霉素生物合成基因簇之中,有利于进行异戊酰基化修饰。另外, *ermEp\** 还可能会提高上游的抗性基因的表达,从而增加螺旋霉素的产量。而且只经过 1 次遗传操作和含有 1 个 *ist* 基因,对菌株的影响较小,菌株的遗传稳定性更好。

从 HPLC 检测结果来看,尚有大量的 SP I 没有转化成 ISP I,说明 *ermEp\** 控制下的 *ist* 基因并没有获得理想的高表达,但其效价为 420  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,比原始的 ISP I 菌株提高了 2 倍多。通常来讲,经过基因工程操作的菌株的产量开始时一般都偏低,还需要进行相应的育种分离操作,才能筛选出效价和 ISP I 都较高的新菌株。将来还可利用 CRISPR-Cas9 系统把已经构建的 *ist* 高表达盒<sup>[26]</sup> 导入到  $\Delta\text{EI}$  菌株中,将会进一步提高 SP I 转化为 ISP I 的产量,还可进行其他遗传操作来获得更加优质高产 ISP I 的菌株。

## REFERENCES

- [1] Shang GD, Dai JL, Wang YG. Construction and physiological studies on a stable bioengineered strain of Shengjimycin. *J Antibiot (Tokyo)*, 2001, 54(1): 66-73.
- [2] Wu LZ, Ma CY, Wang YG, et al. Deletion of spiramycin 3-O-acyltransferase gene from *Streptomyces spiramyceticus* F21 resulting in the production of spiramycin I as major component. *Chin J Biotech*, 2007, 23(4): 612-617 (in Chinese).  
武临专, 马春燕, 王以光, 等. 螺旋霉素 3-O-酰基转移酶基因的删除和主要产生螺旋霉素组分 I 菌株的获得. *生物工程学报*, 2007, 23(4): 612-617.
- [3] Wang YG, He WQ, Dai JL, et al. Gene series technology for increasing main component content of gene engineering isovalerylspiramycin CN, 200910148767.8. 2011-09-07 (in Chinese).  
王以光, 赫卫清, 戴剑漉, 等. 一种提高基因工程异戊酰螺旋霉素主组分含量的基因串联技术: 中国, 200910148767.8. 2011-09-07.
- [4] Ma CY, Zhou HX, Li JY, et al. Construction of 4"-isovalerylspiramycin-I-producing strain by in-frame partial deletion of 3-O-acyltransferase gene in *Streptomyces spiramyceticus* WSJ-1, the bitespiramycin producer. *Curr Microbiol*, 2011, 62(1): 16-20.
- [5] Wang YG, Wu LZ, Jiang Y, et al. Isovalerylspiramycin I component high-content high-yield genetic engineering bacteria: CN, 201010237595.4. 2012-07-04 (in Chinese).  
王以光, 武临专, 姜洋, 等. 一株异戊酰螺旋霉素 I 组分高含量、高产量基因工程菌: 中国, 201010237595.4. 2012-07-04.
- [6] Dai JL, Lu ZL, Lin L, et al. Construction of the isomycin I high-yield strain by introducing a heterologous positive regulatory gene *acyB2*. *China Biotechnol*, 2017, 37(3): 65-72 (in Chinese).  
戴剑漉, 卢智黎, 林灵, 等. 利用异源正调控基因 *acyB2* 构建埃莎霉素 I 高产菌株. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(3): 65-72.
- [7] Dai JL, Zhang XT, Lu ZL, et al. Breeding of high isomycin-I-producing strain by MPMS composite mutagenesis with plasma and UV. *Chin J Antibiot*, 2018, 43(2): 182-188 (in Chinese).  
戴剑漉, 张晓婷, 卢智黎, 等. 新型常压室温等离子体-紫外复合诱变选育埃莎霉素 I 高产菌株. *中国抗生素杂志*, 2018, 43(2): 182-188.
- [8] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [9] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-1389.
- [10] Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*,

- 1992, 116(1): 43–49.
- [11] Huang H, Zheng GS, Jiang WH, et al. One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2015, 47(4): 231–243.
- [12] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [13] Wang YG, Jin LF, Jin WZ, et al. Cloning of midecamycin 4"-acyltransferase and expression spiramycin producing strains. *Chin J Biotech*, 1992, 8(1): 1–14 (in Chinese).  
王以光, 金莲舫, 金文藻, 等. 麦迪霉素 4"酰化酶基因的克隆及在螺旋霉产生菌中的表达. *生物工程学报*, 1992, 8(1): 1–14.
- [14] Xu P, Li WJ, Xu LH, et al. A microwave-based method for genomic DNA extraction from Actinomycetes. *Microbiology China*, 2003, 30(4): 82–84 (in Chinese).  
徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报*, 2003, 30(4): 82–84.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20–25.
- [16] Yang YL, Yang JN, Hu M, et al. Determination of the components of bitespiramycin by HPLC. *Acta Pharmac Sin*, 2009, 44(10): 1183–1186 (in Chinese).  
杨亚莉, 杨剑宁, 胡敏, 等. HPLC 法分析可利霉素的组分. *药学报*, 2009, 44(10): 1183–1186.
- [17] Bi YW, Sun L, Gao DD, et al. High-efficiency targeted editing of large viral genomes by RNA-guided nucleases. *PLoS Pathog*, 2014, 10(5): e1004090.
- [18] Gratz SJ, Wildonger J, Harrison MM, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering and the promise of designer flies on demand. *Fly*, 2013, 7(4): 249–255.
- [19] Jiang WZ, Yang B, Weeks DP. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e99225.
- [20] Jiang WZ, Zhou HB, Bi HH, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(20): e188.
- [21] Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*, 2013, 140(24): 4982–4987.
- [22] Bibb MJ, Janssen GR, Ward JM. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene*, 1985, 38(1/3): 215–226.
- [23] Villsen ID, Vester B, Douthwaite S. ErmE methyltransferase recognizes features of the primary and secondary structure in a motif within domain V of 23S rRNA. *J Mol Biol*, 1999, 286(2): 365–374.
- [24] Jin ZH, Jin X, Jin QC. Conjugal transferring of resistance gene *ptr* for improvement of pristinamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(6): 1853–1864.
- [25] Stojković V, Noda-Garcia L, Tawfik DS, et al. Antibiotic resistance evolved via inactivation of a ribosomal RNA methylating enzyme. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(18): 8897–8907.
- [26] Zhang JH, Zhong JJ, Dai JL, et al. Expression of 4"-O-isovaleryltransferase gene from *Streptomyces thermotolerans* in *Streptomyces lividans* TK24. *Chin J Biotech*, 2014, 30(9): 1390–1400 (in Chinese).  
张家瑚, 钟晶晶, 戴剑滢, 等. 耐热链霉菌 4"-O-戊酰基转移酶基因在变铅青链霉菌 TK24 中的表达. *生物工程学报*, 2014, 30(9): 1390–1400.

(本文责编 郝丽芳)