

· 天然产物生物合成 ·

赫卫清 博士，中国医学科学院医药生物技术研究所抗生素生物工程重点实验室硕士研究生导师、副研究员。主要研究方向：利用合成生物学方法改造微生物药物产生菌来获得新的药用化合物或提高目标化合物的产量；微生物来源的糖基转移酶和糖基修饰酶的功能鉴定与改造；可利霉素及其工程菌的升级改造。承担国家自然科学基金面上项目、国家科技重大专项子课题和中国医学科学院医学与健康科技创新工程等项目，入选北京市科技新星计划。在 *J Bacteriol*、*Appl Microbiol Biotechnol* 和 *Microbiology-sgm* 等国内外期刊发表论文 30 余篇，获得授权专利 8 项，转让专利 1 项。



利用 CRISPR-Cas9 系统与核糖体工程获得新型可利霉素产生菌

刘娟娟¹，张妍²，赫卫清¹

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 中国医学科学院药物合成生物学重点实验室，北京 100050

2 沈阳同联集团有限公司，辽宁 沈阳 110042

刘娟娟，张妍，赫卫清. 利用 CRISPR-Cas9 系统与核糖体工程获得新型可利霉素产生菌. 生物工程学报, 2021, 37(6): 2116-2126.

Liu JJ, Zhang Y, He WQ. Construction of a novel carrimycin-producing strain by using CRISPR-Cas9 and ribosome engineering techniques. Chin J Biotech, 2021, 37(6): 2116-2126.

摘要: 可利霉素 (Carrimycin, CAM) 是将异戊酰基转移酶基因 (Isovaleryltransferase gene, *ist*) 导入到螺旋链霉菌中产生的以异戊酰螺旋霉素 (Isovalerylspiramycin, ISP) 为主组分的抗生素。原工程菌中的 *ist* 基因与螺旋霉素 (Spiramycin, SP) 生物合成基因簇相距较远，且具有两种抗性基因，难以对其进行基因改造，因此需要构建新型 CAM 工程菌株。文中通过 CRISPR-Cas9 基因编辑系统靶向切割 2 个位点，将 *ist* 和其正调控基因 *acyB2* 通过同源重组插入到 SP 生物合成基因簇附近且不参与 SP 合成的 *orf54* 基因下游，获得 2 种无外源抗性基因插入的 CAM 产生菌 54IA-1 和 54IA-2，经发酵产物检测发现 54IA-2 菌株中的 ISP 产量明显高于 54IA-1 菌株。通过实时定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 检测证实 54IA-2 菌株中 *ist* 和 *acyB2* 基因以及部分 SP 生物合成基因的表达式均高于 54IA-1 菌株。为进一步获得高产菌株，以 54IA-2 为出发菌株，利用核糖体工程的方法筛选利福平 (Rifampicin, RFP) 抗性菌株，在 RFP 浓度为 40 μg/mL 的抗性菌株中，ISP 的产量明显提高，最高可达 842.9 μg/mL，比原始菌株提高约 6 倍。对其中 7 株菌的 *rpoB* 基因进行测序分析，每株菌的第 576 位丝氨酸都突变为丙氨酸，

Received: November 28, 2020; **Accepted:** February 9, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81773617), 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

国家自然科学基金 (No. 81773617)，中国医学科学院创新工程项目 (No. 2017-I2M-1-012) 资助。

网络出版时间: 2021-02-23

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210222.1632.010.html>

在其他错义突变中产量最高的菌株 RFP40-6-8 在第 424 位的谷氨酰胺突变为亮氨酸。综上所述,本研究应用 CRISPR-Cas9 系统成功构建了无任何抗性标记的新型 CAM 工程菌株 54IA-1 和 54IA-2,并通过核糖体工程技术筛选获得了新型 CAM 高产菌株 RFP40-6-8,为 CAM 工程菌株的进一步优化改造奠定了基础。

关键词:可利霉素, 4"-O-异戊酰基转移酶基因, CRISPR-Cas9 系统, 核糖体工程

Construction of a novel carrimycin-producing strain by using CRISPR-Cas9 and ribosome engineering techniques

Juanjuan Liu¹, Yan Zhang², and Weiqing He¹

¹ CAMS Key Laboratory of Synthetic Biology for Drug Innovation, 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: Carrimycin (CAM) is a new antibiotics with isovalerylspiramycins (ISP) as its major components. It is produced by *Streptomyces spiramyceticus* integrated with a heterogenous 4"-O-isovaleryltransferase gene (*ist*). However, the present CAM producing strain carries two resistant gene markers, which makes it difficult for further genetic manipulation. In addition, isovalerylation of spiramycin (SP) could be of low efficiency as the *ist* gene is located far from the SP biosynthesis gene cluster. In this study, *ist* and its positive regulatory gene *acyB2* were inserted into the downstream of *orf54* gene neighboring to SP biosynthetic gene cluster in *Streptomyces spiramyceticus* 1941 by using the CRISPR-Cas9 technique. Two new markerless CAM producing strains, 54IA-1 and 54IA-2, were obtained from the homologous recombination and plasmid drop-out. Interestingly, the yield of ISP in strain 54IA-2 was much higher than that in strain 54IA-1. Quantitative real-time PCR assay showed that the *ist*, *acyB2* and some genes associated with SP biosynthesis exhibited higher expression levels in strain 54IA-2. Subsequently, strain 54IA-2 was subjected to rifampicin (RFP) resistance selection for obtaining high-yield CAM mutants by ribosome engineering. The yield of ISP in mutants resistant to 40 µg/mL RFP increased significantly, with the highest up to 842.9 µg/mL, which was about 6 times higher than that of strain 54IA-2. Analysis of the sequences of the *rpoB* gene of these 7 mutants revealed that the serine at position 576 was mutated to alanine existed in each sequenced mutant. Among the mutants carrying other missense mutations, strain RFP40-6-8 which carries a mutation of glutamine (424) to leucine showed the highest yield of ISP. In conclusion, two markerless novel CAM producing strains, 54IA-1 and 54IA-2, were successfully developed by using CRISPR-Cas9 technique. Furthermore, a novel CAM high-yielding strain RFP40-6-8 was obtained through ribosome engineering. This study thus demonstrated a useful combinatory approach for improving the production of CAM.

Keywords: Carrimycin, 4"-O-isovaleryltransferase gene, CRISPR-Cas9 system, ribosome engineering

可利霉素 (Carrimycin, CAM), 原名为必特螺旋霉素 (Bitespiramycin), 是将耐热链霉菌 *Streptomyces thermotolerans* 中的 4"-O-异戊酰基转移酶基因 (4"-O-isovaleryltransferase gene, *ist*) 整合至螺旋链霉菌 *Streptomyces spiramyceticus* 的基因组中所获得的基因工程菌株的发酵产物^[1]。CAM 的主组分是异戊酰螺旋霉素 (Isovalerylspiramycin, ISP) I、II 和 III, 它对革兰氏阳性菌有较强的活性, 尤其是对肺炎链球菌、肺炎支原体和衣原体的活性较强^[2]。由于 CAM

较螺旋霉素 (Spiramycin, SP) 在结构上增加了 4"-O-异戊酰基侧链, 使其亲脂性与体内的抗菌活性增强, 且半衰期延长^[3-5]。III 期临床试验证实, CAM 的药效和安全性都优于阿奇霉素。2019 年, CAM 作为国家 1 类创新药获得国家药品监督管理局批准 (国药证字: H20190009), 并于同年上市。

原有的 CAM 工程菌由于经过多轮遗传改造和诱变育种, 已具有安普霉素和硫链丝菌素两种抗性基因, 难以通过抗性基因再对其进行遗传操作。CRISPR-Cas9 系统可以高效地对基因组特定

位点进行靶向编辑,包括敲除、修复和替换等^[6],而且能够不利用抗性基因同时敲除多个基因。近年来,CRISPR-Cas9系统已经广泛应用于链霉菌基因组遗传改造中^[7],包括基因定点突变^[8]、验证基因功能^[9]、激活沉默次级代谢产物生物合成基因簇^[10]等。利用该系统,我们成功将 *S. spiramyceticus* 中负责 SP 3 位的酰化基因 *bsm4* 替换为 *ermEp** 启动子控制下的 *ist* 基因,获得了只产 ISPI 且不带有抗性基因的新型工程菌^[11]。

微生物次级代谢产物的生物合成与核糖体密切相关,通过核糖体工程技术对核糖体、RNA 聚合酶及转录因子进行修饰改造可以提高次级代谢产物的合成能力^[12-13]。该方法常用靶向核糖体或 RNA 聚合酶的抗生素来筛选抗性突变株^[14],一般采用的抗生素包括链霉素 (Streptomycin, STR)、利福平 (Rifampicin, RFP)、庆大霉素 (Gentamicin, GEN)、巴龙霉素 (Paromomycin, PRM) 和夫西地酸 (Fusidic acid) 等。因其获得突变株的过程简单、获得高产菌株效率高、应用时无需了解菌株的遗传背景等优点,该技术已被广泛应用于菌种改良等方面^[15]。

为了满足对 CAM 工程菌进一步遗传改造的需要,本研究采用 CRISPR-Cas9 系统将 *ist-acyB2* 连锁基因克隆至 SP 生物合成基因簇的下游附近,构建不带任何抗性标记的新型 CAM 工程菌。并且通过核糖体工程技术对构建成功的 CAM 工程菌株进行菌种诱变,筛选获得新型 CAM 高产菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

螺旋霉素产生菌 *S. spiramyceticus* 1941 由本实验室保藏。耐热链霉菌 *S. thermotolerans* ATCC 11416^T, 用于提取基因组 DNA 扩增 *ist* 基因和正调控基因 *acyB2*, 购于美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC)。新型无抗性 CAM 产生菌 54IA-1 和 54IA-2, 由本研究室

构建。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞,用于基因克隆和重组质粒构建,购自北京全式金生物技术有限公司。*E. coli* ET 12567/pUZ8002 甲基化缺陷型大肠杆菌,用于重组质粒去甲基化;枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* CICC 100029,用于工程菌发酵产物的活性检测,均为本实验室保存。

CRISPR-Cas9 基因组编辑质粒 pKCcas9do^[8], 由中国科学院上海生命科学研究院姜卫红研究员惠赠。重组质粒 pKCcas-ia-1 和 pKCcas-ia-2 由本研究室构建。

本研究所用引物序列见表 1。

1.1.2 试剂

氯霉素 (Chloramphenicol, CM) 购自北京市医药公司制药厂。安普霉素 (Apramycin, AM) 购自武汉远城科技发展有限公司。硫链丝菌素 (Thiostrepton, TSR)、氨苄青霉素 (Ampicillin, AMP) 和利福平 (RFP) 购自 Sigma 公司。SP 对照品,购自河南天方药业股份有限公司。CAM 标准品,沈阳同联集团有限公司提供。溶菌酶购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。链霉菌基因组快速提取试剂盒购自广州东盛生物科技有限公司。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。KOD FX Neo DNA 聚合酶 (TOYOBO) 购自北京百灵克生物科技有限公司。

1.1.3 培养基

R₂YE 培养基用于 *S. spiramyceticus* 1941 原生质体的制备和再生^[16], *S. spiramyceticus* 1941 的斜面、种子、发酵和生物检定培养基均按参考文献^[17]配制。

1.2 实验方法

1.2.1 CRISPR-Cas9 基因编辑质粒的构建

链霉菌基因组 DNA 的提取按照文献^[18]进行。*E. coli* ET12567/pUZ8002 感受态细胞的制备,目的片段的扩增,PCR 产物纯化,限制性酶切,DNA 连接与转化,重组转化子的筛选与鉴定等分子克隆操作按照文献^[19]进行。DNA 测序由中美泰和生物技术 (北京) 有限公司完成。

表 1 本文中所用引物

Table 1 Primers used in this study

Oligos	Sequences (5'-3')
<i>orf54</i> -sgRNA-F1	GGACTAGTCTTGCGCACCGCTGCCCCAGTTTTAGAGCTAGAAAT
<i>orf54</i> -sgRNA-F2	GGACTAGTGC GCGGTGCCCGCACCCAGTTTTAGAGCTAGAAAT
<i>orf54</i> -Down	GCTCTAGACTCAAAAAAAGCACCGACTCGG
<i>orf54</i> -LF	GCTCTAGAGCCACTGGCGAGGATGTTCA
<i>orf54</i> -LR	CGGAATTCTGCGGCGGTATCGGGAAGA
<i>ist-acyB2</i> -F	CGGAATTCACCCAGCTCGAATACGCC
<i>ist-acyB2</i> -R	CCGGATATCGACCTTGACAGTCTCGCCTC
<i>orf54</i> -RF	CCGGATATCCCTCGGAATCCTTCTCACAG
<i>orf54</i> -RR	CCCAAGCTTGCTGCTGCCATTCTCATC
54IA-YF	GGCCTCGGTGCTCGATAAG
54IA-YR	GCATGGACACCATCACCTCT
IA-F	GCGAACACCGCTGAGAACA
IA-R	AGATCGCCGCTCACCTTA
16S RNA-F	GGTAGAGCTTGTTGACGCAGAG
16S RNA-R	ATGAGGGCGAGGACAGCGATGC
<i>ist</i> -F	GTCTCCATCCCCCTGGTCGCAC
<i>ist</i> -R	CTGGATGATCAGGTAGTGCACG
<i>acyB2</i> -F	GCCCAGCACCTCATGGAACA
<i>acyB2</i> -R	ACCCCGAACAGCAGGAGCGT
<i>bsm3</i> -F	AGACGTTGCCTGGAGTTGGG
<i>bsm3</i> -R	GCTGGGTGAACCGCTGATAG
<i>bsm5</i> -F	GACGGCCTGCTGCGTGAAC
<i>bsm5</i> -R	GGGCCACTTGTCGCTGATGT
<i>bsm9</i> -F	ATGTTTCAGCTCCATAGGCCACC
<i>bsm9</i> -R	GCACAGAATGCGAGACCCG
<i>bsm42</i> -F	TCTCGTGGGTCTGCCCTTCA
<i>bsm42</i> -R	AAGTCGGCGTCCACCTGCT
<i>rpoB</i> -F	GAGCGCATGACCACCCAG
<i>rpoB</i> -R	TCGTAGTTGTGACCCTCCC

以提取的 *S. spiramyceticus* 1941 基因组 DNA 为模板, 用引物 *orf54*-LF/LR、*orf54*-RF/RR 进行扩增获得 *ist-acyB2* 基因整合位点两端的左和右同源臂。大小为 988 bp 的左同源臂用 *Xba* I 和 *EcoR* I 进行酶切回收, 大小为 980 bp 的右同源臂用 *EcoR* V 和 *Hind* III 酶切回收。以 *S. thermotolerans* ATCC 11416^T 基因组 DNA 为模板, 用 *ist-acyB2*-F/R 引物扩增出 3 335 bp *ist-acyB2* 基因片段, 并用 *EcoR* I 和 *EcoR* V 酶切回收。分别用引物 *orf54*-sgRNA-F1、*orf54*-sgRNA-F2 与 *orf54*-Down 配对, 以 pKCas9do

质粒为模板进行 PCR, 获得 2 条 150 bp 左右的引导 RNA (Single-guide RNA, sgRNA) 的 DNA 序列 sgDNA-1 和 sgDNA-2, 用 *Spe* I 和 *Xba* I 酶切回收。再分别将 sgDNA-1、sgDNA-2 与左右同源臂和 *ist-acyB2* 基因片段克隆至 pKCas9do 载体的 *Spe* I 和 *Hind* III 位点获得重组质粒 pKCas-ia-1 和 pKCas-ia-2。

1.2.2 目的菌株的筛选

将构建好的重组质粒 pKCas-ia-1 和 pKCas-ia-2 通过原生质体转化法^[16]分别导入到 *S. spiramyceticus*

1941 中, 利用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TSR 诱导 Cas9 表达, 由 sgRNA 引导 Cas9 对 SP 生物合成基因簇下游 *orf54* 基因的靶位点进行切割形成双链断裂, 重组质粒上带有同源臂的 *ist-acyB2* 基因通过同源重组插入到靶位点。将发生同源双交换的目的菌株于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 使质粒停止复制, 通过 AM 抗性和无抗性平板进行筛选, 获得 *ist-acyB2* 基因插入到靶位点且不带有抗性基因的菌株, 并进行 PCR 鉴定和测序验证。

1.2.3 菌株发酵及发酵产物的提取

挑取阳性转化子接种于斜面培养基上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5–7 d, 挖块面积为 1 cm^2 左右的菌落, 接种到装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶, 每个菌株接种 3 瓶, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 96–120 h 后, 发酵液经离心取上清液稀释, 进行抗菌活性检测。

发酵产物的提取: 发酵液室温 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 8.5–9.0 之间, 用 1/2 体积的乙酸乙酯萃取, 吹干后用 100 μL 乙酸乙酯或甲醇溶解于 1.5 mL 离心管中。

1.2.4 抗生素生物效价测定

以 *Bacillus subtilis* CICC 100029 为检定菌, 参考《中华人民共和国药典》2020 年版 (二部) 乙酰螺旋霉素含量测定项下微生物检定法^[20]。采用管碟法, 用标准曲线法进行测定。

1.2.5 qPCR 分析

用 TSB 培养基^[16]培养 54IA-1 和 54IA-2 菌株, 取培养 72 h 的菌丝分别提取总 RNA, 进行反转录 PCR (Reverse transcription PCR, RT-PCR) 和 qPCR 分析。以 16S rRNA 作为内参基因 (引物 16S RNA-F/R, 表 1), 对每个样品中 *ist* 和 *acyB2* 及与 SP 生物合成相关基因表达进行定量分析, 每个样品做 3 个重复。使用 SYBR Green I 染料法进行定量分析, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算不同菌株中的基因表达量。qPCR 反应条件: 96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 96 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共

计 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min (罗氏公司 LightCycler 96)。

1.2.6 高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 分析

发酵液经提取、挥干后溶于色谱纯乙腈, 0.22 μm 的滤膜过滤后进样 10 μL 。色谱仪: 岛津 LC-10ATvp 液相色谱仪, 色谱柱: Kromasil C18 (4.5 mm \times 150 mm, 5 μm), 流动相: $\text{CH}_3\text{OH}/1\% \text{CH}_3\text{COONH}_4$ (65 : 35), 检测波长: 231 nm, 流速: 1 mL/min, 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。以 CAM 标准品为对照, 检测并计算 ISP I、II 和 III 的峰面积, 确定 CAM 主组分的相对含量。

1.2.7 抗药性突变株筛选

取扩大培养的 54IA-2 菌丝体, 放入带玻璃珠和无菌水的试管中, 剧烈振荡 5 min, 制成孢子悬液。制备不同浓度 (20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 RFP 筛选平板, 将孢子悬液涂布在筛选平板上, 并设置空白对照组, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3–4 d。再将生长起来的单菌落用同样浓度的抗生素传代培养, 进行摇瓶复筛: 挑选传代后的菌株接种于种子培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48–52 h, 以 10% 的接种量转入发酵培养基 (每个 500 mL 三角瓶装 100 mL 发酵培养基), 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 96 h, 提取发酵产物进行 HPLC 检测。

1.2.8 RFP 抗性突变株的突变位点分析

RFP 抗性突变株是由于 RNA 聚合酶 β 亚基的基因 (*rpoB*) 发生突变从而获得抗性。为研究 54IA-2 的 RFP 抗性突变株中 *rpoB* 基因的碱基变化部位, 提取 RFP 突变株 DNA, 利用 *rpoB*-F/R 引物扩增出在 RFP 抗性压力下 *rpoB* 基因容易发生变化的区域, 分析其中发生突变的碱基, 找出发生突变的对应氨基酸残基。

2 结果与分析

2.1 *ist-acyB2* 基因片段的插入位点分析

CAM 生物合成基因簇^[21]中负责 SP 生物合成

的部分为 89 kb 左右, 包含在一个约 110 kb 的序列中 (GenBank 登录号: MH460451)。这个序列中包含了 54 个预测的开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 经鉴定与 SP 生物合成相关的有 42 个, 按顺序依次命名为 *bsm1* 至 *bsm42*^[22], 它们与生二素链霉菌 *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 中公布的 SP 生物合成基因簇^[23]同源性较高。*bsm42* 与 *S. ambofaciens* 中位于整个基因簇边界附近的 SP 正调控基因 *srm40*^[24]是同源基因; 其下游的 *orf43-orf48* 是一些未知功能的基因和与 ATP 酶驱动运输相关的基因, 推测是负责 SP 的运输; *orf49-orf53* 绝大部分是功能未知基因; *orf54* 基因编码一种包含 WD40 重复序列的蛋白^[25], 在真核细胞中 WD40 蛋白家族成员常作为生物大分子相互作用的支架蛋白, 在原核细胞中这类蛋白常参与信号传导和营养物质的合成, 因此这个基因应该与 SP 的生物合成无关。在原 CAM 产生菌中 *ist* 基因整合在一个 II 型 PKS 基因中间, 距离

SP 的生物合成基因簇 3 Mb 以上, 空间上的距离会影响异戊酰基转移酶对 SP 的后修饰效率。若将 *ist* 基因整合在 SP 生物合成基因簇附近, 可能提高 SP 转化为 ISP 的效率。因此将带有 *ist* 和其正调控基因 *acyB2* 的重组质粒 pKCas-ia-1 和 pKCas-ia-2 通过 CRISPR-Cas9 系统插入到 SP 生物合成基因簇的相邻基因 *orf54* 的下游 (图 1A)。

2.2 新型 CAM 工程菌株的鉴定

利用 *Spe* I 和 *Hind* III 对构建成功的质粒 pKCas-ia-1 和 pKCas-ia-2 进行酶切鉴定, 结果如图 1B 中泳道 1 和 2 所示, 13 kb 左右的条带为 pKCcas9dO 载体, 5 kb 左右的条带为带有同源臂的 *ist-acyB2* 基因片段, 片段大小与预期相符, 并经测序确证。将两个质粒导入 *S. spiramyceticus* 1941 中, 通过 TSR 诱导、抗性和温度筛选出两种目的菌株 54IA-1 和 54IA-2。利用鉴定引物 IA-F/R 和 54IA-YF/R 对原株 *S. spiramyceticus* 1941 和 *ist-acyB2* 基因片段插入后的 54IA-1、54IA-2 变株进行鉴定 (图 1B)。

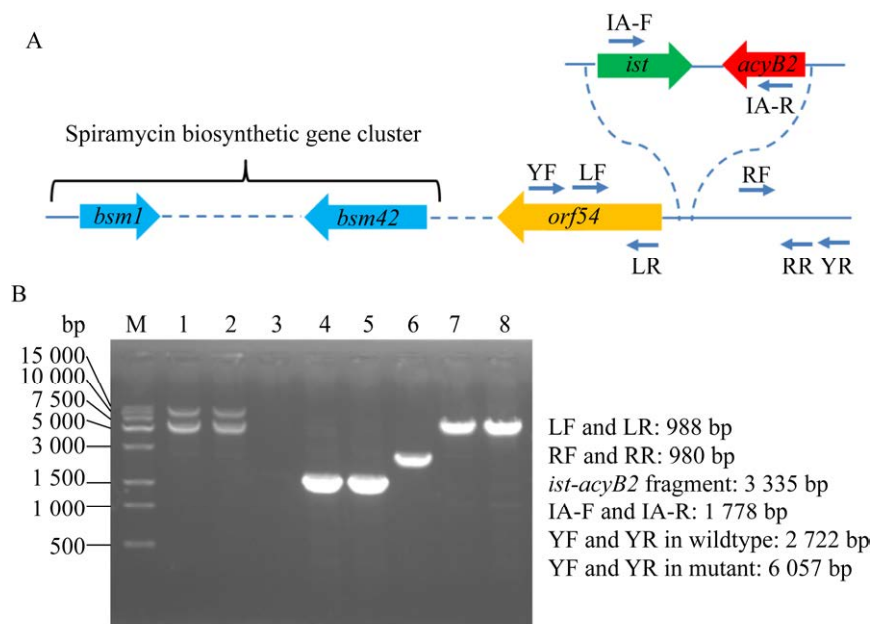


图 1 在 SP 生物合成基因簇下游插入 *ist-acyB2* 基因变株的构建 (A) 和验证 (B)

Fig. 1 Construction (A) and validation (B) of a mutant with *ist-acyB2* genes inserted downstream of the SP biosynthetic gene cluster. M: *Trans* 15k DNA marker; 1: pKCas-ia-1 (*Spe* I /*Hind* III); 2: pKCas-ia-2 (*Spe* I /*Hind* III); 3-5: IA-F and IA-R primer, 3: wildtype strain, 4: 54IA-1, 5: 54IA-2; 6-8: 54IA-YF and 54IA-YR primers, 6: wildtype strain, 7: 54IA-1, 8: 54IA-2.

泳道 3-5 显示 IA-F/R 鉴定引物在原株中没有扩增产物的, 在 54IA-1、54IA-2 变株中扩增出约预期大小的 1.8 kb 目的片段; 泳道 6-8 显示 54IA-YF/R 鉴定引物在原株中扩增出约 2.7 kb 的特异性片段, 在两种变株中扩增出 6 kb 的特异性片段, 二者之差为 3.3 kb 左右, 符合 *ist-acyB2* 片段的大小, 证明 *ist-acyB2* 基因片段已成功插入到 *orf54* 基因的下游。同时, 将 54IA-YF/R 鉴定引物 PCR 扩增产物进行测序, 证实两种变株中 *ist-acyB2* 片段在 *orf54* 基因下游的插入位点完全一致。

2.3 新型 CAM 工程菌株的发酵检测

将 54IA-1 和 54IA-2 菌株进行发酵, 对发酵产物进行鉴定。虽然设计了两种不同的 Cas9 切割位点, 但是通过测序证实, 两种工程菌株插入目的基因的位置与序列完全相同。但对两种变株在发酵培养基中的发酵上清进行抗菌活性测定发现, 54IA-1 上清液形成的抑菌圈明显小于 54IA-2 的抑菌圈。54IA-1 的效价为 $(57 \pm 5.1) \mu\text{g}/\text{mL}$, 而 54IA-2 的效价达到 $(179 \pm 8.2) \mu\text{g}/\text{mL}$, 明显高于 54IA-1 的效价。通过 HPLC 检测 (图 2) 也发现 54IA-2 菌株中 ISP 的产量明显高于 54IA-1。

2.4 新型 CAM 工程菌株的基因表达情况

通过 qPCR 检测 54IA-1 和 54IA-2 中 *ist* 和 *acyB2* 以及与 SP 生物合成相关基因的表达情况, 结果显示, 54IA-2 中 *ist* 和 *acyB2* 的表达量分别比在 54IA-1 中高 5 倍和 1.5 倍左右 (图 3), 且 *bsm3*、*bsm5*、*bsm9* 和正调控基因 *bsm42* 的表达量 (表 2) 也明显高于 54IA-1。其中 *bsm3* 编码 23S rRNA 的甲基转移酶, 是一种修饰 23S rRNA 而获得抗生素抗性的基因, 抗性基因的高表达通常能提高抗生素的产量^[11,26]; *bsm5* 编码 O-甲基转移酶, 参与聚酮合酶底物的合成; *bsm9* 编码 SAM 依赖的甲基转移酶, 参与 NDP-脱氧糖基的生物合成; *bsm42* 是 SP 生物合成的正调控基因^[22-23]。菌株 54IA-2 中 *ist*、*acyB2* 以及部分与 SP 生物合成相关基因的表达情况与其 CAM 产量高于 54IA-1 相

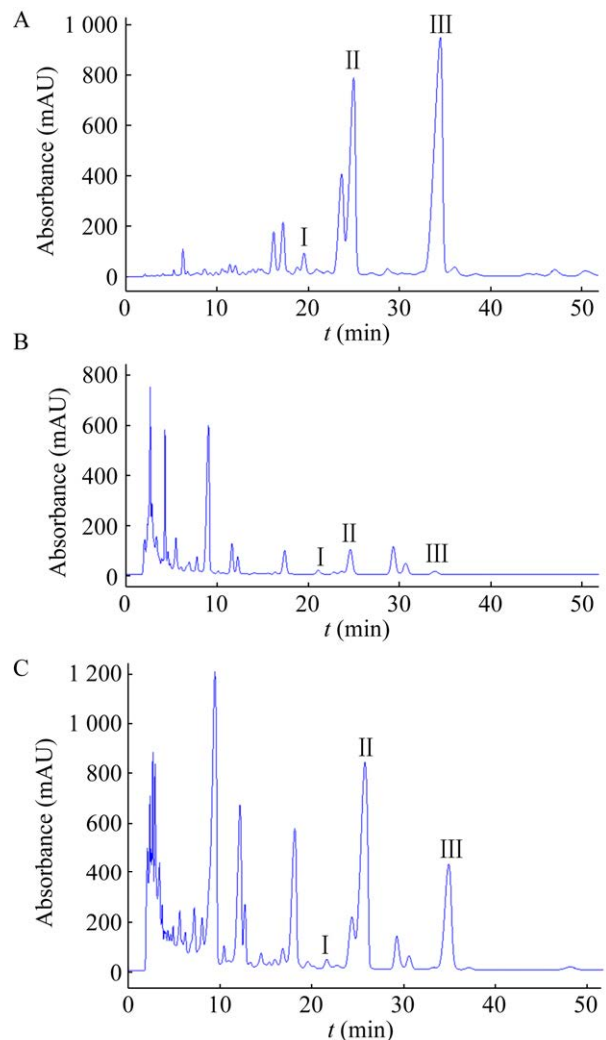


图 2 菌株 54IA-1 和 54IA-2 发酵产物的 HPLC 检测
 Fig. 2 HPLC analysis of the fermentation products of strains 54IA-1 and 54IA-2. (A) Control of CAM. (B) 54IA-1. (C) 54IA-2. I: ISP I; II: ISP II; III: ISP III.

符, 表明工程菌株 54IA-1 的 ISP 产量低于 54IA-2 可能是由于相关基因表达受影响引起的。

2.5 核糖体工程提高 CAM 产量

由于新构建菌株发酵水平远远达不到工业需求, 所以通过核糖体工程方法来提高菌株的 CAM 产量。对新构建的菌株 54IA-2 进行核糖体工程常用抗生素的敏感性测试发现, 该菌株对 RFP 比较敏感, 其 MIC 为 $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$, 因此选择 RFP 作为抗性压力筛选 54IA-2 突变株。对一系列 RFP^R 菌

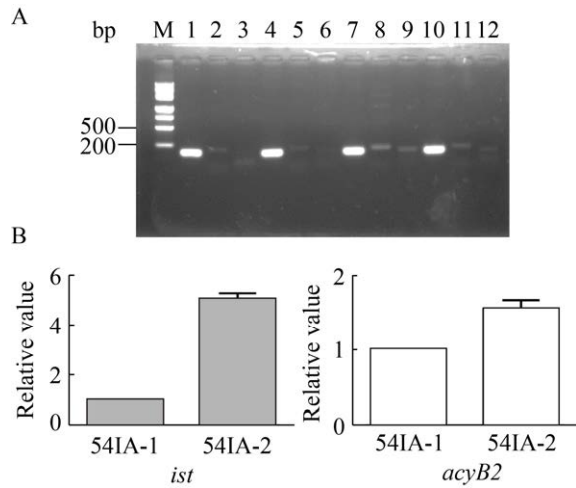


图3 菌株 54IA-1 和 54IA-2 中 *ist* 和 *acyB2* 基因表达情况

Fig. 3 The expression level of *ist* and *acyB2* in 54IA-1 and 54IA-2 strains. (A) RT-PCR detection of *ist* and *acyB2* in 54IA-1 and 54IA-2 strains. 1–6: 54IA-1, 1&4:16S rRNA, 2&5: *ist*, 3&6: *acyB2*; 7–12: 54IA-2, 7&10:16S rRNA, 8&11: *ist*, 9&12: *acyB2*. (B) qPCR detection of *ist* and *acyB2* in 54IA-1 and 54IA-2 strains.

株进行发酵, 并对发酵产物进行检测, 发现在 40 $\mu\text{g/mL}$ RFP 平板上生长的抗性突变株 RFP40-6 的 ISP 产量最高, 为 290.4 $\mu\text{g/mL}$ 。将突变菌株 RFP40-6 进行自然分离, 选取 15 个由单个孢子长成的菌落进行摇瓶复筛。HPLC 检测结果显示, ISP 产量最高的为 RFP40-6-8, 可达 842.9 $\mu\text{g/mL}$, 较原始菌株提高了约 6 倍 (表 3)。将产量变化较大的 7 株菌进行 *rpoB* 基因测序, 结果发现所有菌株都存在 576 位的丝氨酸 (Serine, Ser) 突变为丙氨酸 (Alanine, Ala), 突变情况见表 3。RFP40-6-1、RFP40-6-5 均在基因序列的 1 319 位发生突变, 碱基鸟嘌呤 G 突变为腺嘌呤 A, 使得 440 位精氨酸 (Arginine, Arg) 变为组氨酸 (Histidine, His)。RFP40-6-2、RFP40-6-3 和 RFP40-6-7 均在基因序列的 1 281 位发生突变, 碱基 A 突变为 G, 427 位天门冬氨酸 (Aspartic acid, Asp) 变为谷氨酸 (Glutamic acid, Glu)。突变株 RFP40-6-12 中基因

表 2 54IA-1 和 54IA-2 菌株中与 SP 生物合成相关基因的表达情况

Table 2 Expression of genes related to SP biosynthesis in strains 54IA-1 and 54IA-2

Gene	Proposed function	Proposed role in SP biosynthesis	Fold change (54IA-2/54IA-1)
<i>bsm3</i>	23S ribosomal RNA methyltransferase	Resistance	4.99
<i>bsm5</i>	O-methyltransferase	Provision of extender units for PKS	12.47
<i>bsm9</i>	SAM-dependent methyltransferase	Sugar biosynthesis	8.69
<i>bsm42</i>	DDE_5 superfamily, transcriptional regulator	Positive regulation	73.52

表 3 40 $\mu\text{g/mL}$ RFP 突变株中 *rpoB* 基因突变位点分析

Table 3 Analysis of the *rpoB* mutations in mutants resistant to 40 $\mu\text{g/mL}$ RFP

Strains	Position of mutations in <i>rpoB</i>	Amino acid exchange	Production of ISP ($\mu\text{g/mL}$)	The proportion of ISP to total (%)
54IA-2	–	–	120.1	12.3
RFP40-6	–	–	290.4	28.3
RFP40-6-1	1 319 (G→A)/1 726 (T→G)	Arg440His/Ser576Ala	329.5	12.9
RFP40-6-2	1 281 (A→G)/1 726 (T→G)	Asp427Glu/Ser576Ala	482.5	18.7
RFP40-6-3	1 281 (A→G)/1 726 (T→G)	Asp427Glu/Ser576Ala	329.5	12.9
RFP40-6-5	1 319 (G→A)/1 726 (T→G)	Arg440His/Ser576Ala	457.2	17.9
RFP40-6-7	1 281 (A→G)/1 726 (T→G)	Asp427Glu/Ser576Ala	365.3	14.3
RFP40-6-8	1 271 (A→T)/1 726 (T→G)	Gln424Leu/Ser576Ala	842.9	33.0
RFP40-6-12	1 310 (A→C)/1 726 (T→G)	His437Pro/Ser576Ala	472.5	18.5

序列的 1 310 位 A 碱基突变为胞嘧啶 C, 使得 437 位 His 突变为脯氨酸 (Proline, Pro)。CAM 产量提高最为明显的 RFP40-6-8 中基因序列的 1 271 位 A 碱基突变为胸腺嘧啶 T, 对应的 424 位谷氨酰胺 (Glutamine, Gln) 突变为亮氨酸 (Leucine, Leu)。

3 讨论

CAM 是利用基因工程方法获得的工程菌发酵产物, 具有良好的抗菌活性, 已经获得国家 1 类新药证书和生产批文, 并在抗击新冠肺炎疫情中进入科技部发布的国家新冠治疗方案。本研究应用 CRISPR-Cas9 系统成功构建了没有任何抗性标记的新型 CAM 工程菌株 54IA-1 和 54IA-2, 并进一步通过核糖体工程技术筛选获得了新型 CAM 高产菌株 RFP40-6-8, 为 CAM 工程菌株的优化奠定了基础。

原有的 CAM 工程菌, 由于经过多次的基因改造使其带有两种抗性基因, 很难进行其他的基因改造。而 CRISPR-Cas9 系统可以通过 sgRNA 指导 Cas9 蛋白对靶基因进行双链剪切, 利用细胞自身的同源定向修复机制完成基因的编辑, 目前已广泛应用于链霉菌基因组的修饰或改造。本研究在应用 CRISPR-Cas9 系统构建新型 CAM 工程菌时, 设计了两条切割位点不同的 sgRNA, 成功构建了没有任何抗性标记的新型 CAM 菌株 54IA-1 和 54IA-2。测序结果显示目的片段在两株菌中的插入位点与插入序列完全一致, 但是发酵结果却显示两株菌合成 CAM 的能力大不相同, 菌株 54IA-2 的产量明显高于菌株 54IA-1。qPCR 结果显示 54IA-2 中 *ist*、*acyB2*、*bsm3*、*bsm5*、*bsm9* 和 *bsm42* 的表达量均高于 54IA-1。推测可能是 sgRNA-1 引导 Cas9 蛋白对目的基因切割时产生脱靶, 影响 CAM 的生物合成, 导致了菌株 54IA-1 产量偏低。后续将对两株工程菌株进行全基因组测序, 以确定是否由于脱靶现象对菌株基因组产

生影响而导致的 CAM 产量差异。总之, 利用 CRISPR-Cas9 系统成功构建的新型 CAM 工程菌 54IA-1 和 54IA-2 为进一步遗传改造提供了菌种基础。

新型 CAM 工程菌 54IA-2 的发酵水平虽然高于 54IA-1, 但产量还比较低。本实验选取 RFP 为筛选压力通过核糖体工程来筛选高产菌株。研究证实, RFP 抗性突变株是由于 *rpoB* 基因 (编码 RNA 聚合酶 β 亚基) 发生突变所导致的^[27]。通过 RFP 抗性筛选 54IA-2 突变株发现, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RFP 筛选获得的抗性突变株的 CAM 产量提高比较明显, 且所有测序菌株均存在 *rpoB* 基因突变。RFP40-6-1、RFP40-6-5 菌株中 Arg440 变为 His, 与 Hu 等^[27]报道的 *Streptomyces lividans* 66 正突变株 RH-1 的突变位点相同。RFP40-6-2、RFP40-6-3 和 RFP40-6-7 的 Asp427 变为 Glu, 与 Hu 等^[27]报道的 *S. lividans* 66 正突变株 DE-1 和 Ma 等^[28]报道的 Toyocamycin 产生菌 1628 正突变株 1628-T09 的突变位点相同。文献报道^[27-30]另一个出现频率较高的 *rpoB* 基因突变位点是 1 309 位的 C 碱基和 1 310 位的 A 碱基, 即 His437 可突变为 Leu、天冬酰胺 (Asparagine, Asn)、酪氨酸 (Tyrosine, Tyr)、Arg、半胱氨酸 (Cysteine, Cys) 或 Asp, 但在突变株 RFP40-6-12 中发生了一个新的突变 His437Pro。CAM 产量提高最为明显的 RFP40-6-8 中发生了 Gln424Leu 突变, 与经过 5 轮抗性筛选 (一次 PRM 抗性突变、3 次 STR 抗性突变、一次 RFP 抗性突变) 的高产四烯类突变株 G5-59^[31]发生在 *rpoB* 基因上的突变位点相同。结果表明, 本次实验所得的 RFP 抗性突变株除 Ser576Ala 突变外, 其他突变位点均位于 *rpoB* 基因 RFP 抗性突变易发生区域。并且 *rpoB* 基因不同的突变位点会导致 CAM 产量的不同, 通过 RFP 抗性筛选能够快速有效地获得 CAM 高产菌株。进一步研究 *rpoB* 基因突变与 CAM 产量之间的关系, 将为 CAM 工程菌株的优化指明方向。

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] He WQ, Yang CP, Zhao XF, et al. Antimicrobial activity of bitespiramycin, a new genetically engineered macrolide. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(19): 4576-4577.
- [3] 孙丽文, 朱锦桃, 林赴田. 生技霉素药代动力学性能研究. *中国药理学通报*, 2000, 16(6): 694-698. Sun LW, Zhu JT, Lin FT. Pharmacokinetics of SJ-SPM. *Chin Pharmacol Bull*, 2000, 16(6): 694-698 (in Chinese).
- [4] Shi XG, Zhong DF, Sun NL. Pharmacokinetics of a novel antibiotic bitespiramycin in rats. *Asian J of Drug Metab Pharmacokinet*, 2003, 3(2): 134-137.
- [5] Shi XG, Sun YM, Zhang YF, et al. Tissue distribution of bitespiramycin and spiramycin in rats. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(11): 1396-1401.
- [6] Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing. *Life Sci*, 2019, 232: 116636.
- [7] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [8] 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.
- [9] Qin ZW, Munnoch JT, Devine R, et al. Formicamycins, antibacterial polyketides produced by *Streptomyces formicae* isolated from African Tetraponera plantants. *Chem Sci*, 2017, 8(4): 3218-3227.
- [10] Zhang MM, Wong FT, Wang YJ, et al. CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters. *Nat Chem Biol*, 2017, 10: 10.
- [11] 张晓婷, 张妍, 戴剑灏, 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 (in Chinese).
- [12] Shima J, Hesketh A, Okamoto S, et al. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 1996, 178(24): 7276-7281.
- [13] Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(6): 1373-1386.
- [14] Ochi K, Okamoto S, Tozawa Y, et al. Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Adv Appl Microbiol*, 2004, 56: 155-184.
- [15] Zhu SB, Duan YW, Huang Y. The application of ribosome engineering to natural product discovery and yield improvement in *Streptomyces*. *Antibiotics (Basel)*, 2019, 8(3): 133.
- [16] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [17] 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. 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).
- [18] 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. Xu P, Li WJ, Xu LH, et al. A microwave-based method for genomic DNA extraction from *Actinomycetes*. *Microbiol China*, 2003, 30(4): 82-84 (in Chinese).
- [19] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20-25.
- [20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020 版, 第二部). 北京: 中国医药科技出版社. 2020: 12. National Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2020 ed, Vol II)*. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 12 (in Chinese).
- [21] 王以光, 姜洋, 赵小峰, 等. 可利霉素生物合成基

- 因簇: 中国 201511028754.9, 2019-01-22.
Wang YG, Jiang Y, Zhao XF, et al. Bitespiramycin biosynthetic gene cluster: CN, 201511028754.9. 2019-01-22 (in Chinese).
- [22] Dai JL, Wang YG, Liu JJ, et al. The regulatory genes involved in spiramycin and bitespiramycin biosynthesis. *Microbiol Res*, 2020, 240: 126532.
- [23] Karray F, Darbon E, Oestreicher N, et al. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide antibiotic spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*. *Microbiology*, 2007, 153 (12): 4111-4122.
- [24] Karray F, Darbon E, Nguyen HC, et al. Regulation of the biosynthesis of the macrolide antibiotic spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*. *J Bacteriol*, 2010, 192(21): 5813-5821.
- [25] Hu XJ, Li T, Wang Y, et al. Prokaryotic and highly-repetitive WD40 proteins: a systematic study. *Sci Rep*, 2017, 7: 10585.
- [26] Jin ZH, Jin X, Jin QC. Conjugal transferring of resistance gene *ptr* for improvement of pristnamycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(6): 1853-1864.
- [27] Hu H, Zhang Q, Ochi K. Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase β subunit) of *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*, 2002, 184(14): 3984-3991.
- [28] Ma Z, Luo S, Xu XH, et al. Characterization of representative *rpoB* gene mutations leading to a significant change in toyocamycin production of *Streptomyces diastatochromogenes* 1628. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(4): 463-471.
- [29] Liu L, Pan J, Wang ZL, et al. Ribosome engineering and fermentation optimization leads to overproduction of tiancimycin A, a new enediyne natural product from *Streptomyces* sp. CB03234. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45(3): 141-151.
- [30] Hosaka T, Ohnishi-Kameyama M, Muramatsu H, et al. Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(5): 462-464.
- [31] 汤谷. 利用核糖体工程技术提高淀粉酶产色链霉菌 1628 产量的研究[D]. 杭州: 中国计量大学, 2017. Tang G. Antibiotic overproduction of *Streptomyces diastatochromogenes* 1628 by ribosome engineering[D]. Hangzhou: China Jiliang University, 2017 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)