

解硫胺类芽孢杆菌SY20中多粘菌素A1合成与调控相关基因表达分析

吴雅萍^{1,2}, 杨技欣², 陈健凯¹, 黄丽卿¹, 黄锦峰¹, 李梦思¹, 刘冬梅^{2*}

(1.漳州职业技术学院漳州市食品产业技术研究院, 福建漳州 363000)

(2.华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 该研究以前期筛选的多粘菌素 A1 产生菌株 *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20 为研究对象, 首先探究菌株在不同生长阶段的抑菌活性变化规律; 随后, 利用实时荧光定量 PCR, 研究多粘菌素 A1 合成基因簇 (*pmx*) 五个基因 *pmxA*、*pmxB*、*pmxC*、*pmxD* 和 *pmxE* 在发酵过程中的表达情况。最后, 探究多粘菌素调控基因 *sfj*、*ectB*、*spo0A* 和 *abrB* 表达水平。结果表明, 在 M63T 培养基中, *P. thiaminolyticus* SY20 抑菌物质在菌株生长的对数前期产生, 至对数末期或平台前期 (84 h) 达到最大值; *pmx* 基因簇各基因在菌生长对数前期 (36 h) 表达水平显著提高且基本呈现同步趋势; *ectB* 与 *pmxA*、*pmxE* 基因的表达水平也基本同步; *sfj* 和 *spo0A* 基因表达与抑菌活性呈正相关, 而 *abrB* 基因与抑菌活性呈负相关。因此, 在 *P. thiaminolyticus* SY20 发酵过程中, *pmx* 基因簇表达水平先于抑菌活性达到最大值, *ectB* 基因与多粘菌素 A1 合成密切相关, *sfj* 和 *spo0A* 基因为正调控基因, 而 *abrB* 基因为负调控基因, 为多粘菌素合成与调控机制提供理论基础。

关键词: 解硫胺类芽孢杆菌 SY20; 荧光定量 PCR; 多粘菌素 A1; 基因表达

文章编号: 1673-9078(2024)09-118-126

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.0947

Polymyxin A1 Synthesis-related Gene Expression and Regulation in *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20

WU Yaping^{1,2}, YANG Jixin², CHEN Jiankai¹, HUANG Liqing¹, HUANG Jinfeng¹, LI Mengsi¹, LIU Dongmei^{2*}

(1.Zhangzhou Food Industrial Technology Research Institute, Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, China)(2.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20 strain, which was previously screened and identified as polymyxin A1-producing strain, was evaluated for antimicrobial activity at different stages of growth. Subsequently, the expression levels of five genes, namely *pmxA*, *pmxB*, *pmxC*, *pmxD*, and *pmxE* in the polymyxin A1 synthetic gene cluster (*pmx*), were investigated during the fermentation process using real-time PCR. Finally, the expression levels of regulatory genes for

引文格式:

吴雅萍,杨技欣,陈健凯,等.解硫胺类芽孢杆菌SY20中多粘菌素A1合成与调控相关基因表达分析[J].现代食品科技,2024,40(9):118-126.

WU Yaping, YANG Jixin, CHEN Jiankai, et al. Polymyxin A1 synthesis-related gene expression and regulation in *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20 [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 118-126.

收稿日期: 2023-08-08

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2021A1515012451); 漳州市食品产业技术研究院开放课题项目 (ZSY2021114; ZSY2022112)

作者简介: 吴雅萍 (1990-), 女, 研究生, 讲师, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 787410180@qq.com

通讯作者: 刘冬梅 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物的利用与控制, E-mail: liudm@scut.edu.cn

polymyxin (*sfp*, *ectB*, *spo0A*, and *abrB*) were also explored. The results indicated that, in the M63T medium, the antimicrobial substances were produced from *P. thiaminolyticus* SY20 in the early logarithmic phase of bacterial growth, and reached a maximum value at the end of the logarithmic phase or early stationary phase (84 h). Pmx expression showed a synchronous trend of significant increase in the early logarithmic stage (36 h). The *ectB* expression was synchronized with the *pmxA* and *pmxE* genes. The *sfp* and *spo0A* expression was positively correlated with antimicrobial activity, while *abrB* expression indicated the opposite. In conclusion, during fermentation in *P. thiaminolyticus* SY20, the *pmx* cluster expression reached a maximum before exhibiting antimicrobial activity, and *ectB* was verified as closely related to polymyxin A1 synthesis. Both *sfp* and *spo0A* were identified as positive regulatory genes, while *abrB* was a negative one. This study provides a theoretical basis for understanding the synthesis and regulation mechanisms of polymyxin.

Key words: *paenibacillus thiaminolyticus* SY20; real-time PCR; polymyxin A1; gene expression

日益严重的多重耐药 (Multidrug-resistant, MDR) 致病菌感染对人类健康构成了严重威胁。随着 β -内酰胺、喹诺酮或氨基糖苷类抗生素在治疗 MDR 感染中逐渐失效, 多粘菌素被视为是对抗 MDR 感染的最后一道防线^[1]。多粘菌素是一种非核糖体合成的环状脂肽类抗生素, 由广泛分布的土壤细菌多粘菌芽孢杆菌产生, 其基本结构是由 N 端被脂肪酸酰化的环状十肽构成^[2]。目前, 至少有 25 种多粘菌素家族同系物被发现, 其中多粘菌素 B、多粘菌素 E (粘菌素) 及其衍生物已经被商业化用于治疗革兰氏阴性细菌感染, 如铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌等^[3,4]。

多粘菌素 A1 是很少被研究的多粘菌素家族同系物, 自从 1947 年被发现之后就很少被报道^[5], 且市面上也未见其标准品。前期从福建笋芽样品中分离得到一株解硫胺类芽孢杆菌命名为 *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20, 并从其发酵上清中分离鉴定出多粘菌素 A1^[6], 其结构如图 1 所示。同时, 对 *P. thiaminolyticus* SY20 全基因组进行挖掘, 获得多粘菌素 A1 合成酶基因簇。该基因簇长度为 40.8 kb 包括 5 个基因 *pmxA*、*pmxB*、*pmxC*、*pmxD* 和 *pmxE*, 其中 *pmxA*、*pmxB* 和 *pmxE* 编码多粘菌素合成的基因, 而 *pmxC* 和 *pmxD* 基因负责多粘菌素的转运和免疫^[6]。据报道, 除了多粘菌素合成酶基因簇外, 调控多粘菌素合成的基因还包括磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶基因 (*sfp*)、二氨基丁酸氨基转移酶基因 (*ectB*) 以及 DNA 结合蛋白基因 (*spo0A*、*abrB*) 等^[7,8]。目前, 国内对多粘类芽孢杆菌的研究主要集中在多粘菌素高产菌株的诱变育种及发酵工艺研究; 而国外主要集中在多粘菌素抑菌机理、临床毒性、合成酶基因簇的研究, 且研究主要针对商业化应用的多粘菌素 B 和多粘菌素 E。对于多粘菌素

A1 合成相关基因及其表达、调控机理的研究国内外罕有报道。为了进一步揭示该活性菌株发酵过程中多粘菌素 A1 合成与调控相关基因的表达规律, 本研究主要探究多粘菌素 A1 合成与调控相关的基因 *pmxA*、*pmxB*、*pmxC*、*pmxD*、*pmxE*、*sfp*、*ectB*、*spo0A* 和 *abrB* 基因表达水平与抑菌活性之间的关系以及各基因之间表达水平的关系, 进一步丰富对多粘菌素合成与调控机制的探究。

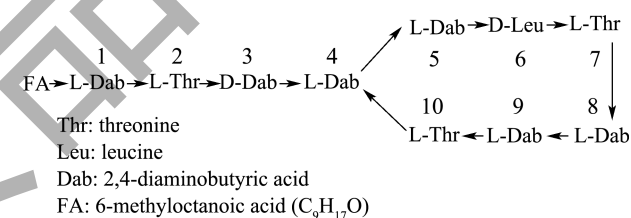


图 1 多粘菌素 A1 化学结构

Fig.1 The structure of polymyxin A1

1 材料与方法

1.1 菌种来源

解硫胺类芽孢杆菌 *P. thiaminolyticus* SY20 保存于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为 GDMCC NO:61909; 指示菌大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC 25922 购于中国工业微生物菌种保藏中心 (CICC)。

1.2 菌种活化与发酵培养

将 *P. thiaminolyticus* SY20 接种于 LB 培养基 (酵母粉 0.5 g/L, 蛋白胨 1 g/L, 氯化钠 1 g/L) 中, 28 °C 振荡活化过夜, 活化后的菌液以 5% (V/V) 接种于 M63T 培养基 [KH₂PO₄ 4.5 g/L, K₂HPO₄·3H₂O 11.3 g/L, (NH₄)₂SO₄ 6 g/L, 葡萄糖 6 g/L, 硫胺素 0.001 g/L, MgSO₄·H₂O 0.2 g/L]。

表 1 *P. thiaminolyticus* SY20多粘菌素合成与调控相关基因引物序列Table 1 Primer sequences of polymyxin synthesis and regulation genes in *P. thiaminolyticus* SY20

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物大小/bp
<i>pmxA</i>	GAAGAACTGCCGCACTG AACCGCAGACCGTTCATAG	165
<i>pmxB</i>	GGTCGGCGTAAAGGATAACT GGAGGGAAGCAGAACACATT	234
<i>pmxC</i>	TTGACGGAGGAAGCCAG AAGCAGCGGATTGACCCA	192
<i>pmxD</i>	TGCTGTCCTCCGTGGTCA AGCGTCTGCGTCATTTGTT	193
<i>pmxE</i>	CAGCAGTCCGAACCTGTAAA GATTGAATAGACCGCCGATA	240
<i>spo0A</i>	GAACAGACGAGAGCGGTGC GTTGCGGAGACAGATTCATACT	109
<i>abrB</i>	GTCCACTGGTATCGTTTCG TCTCCATCCACGTAAATCTCC	117
<i>ectB</i>	GAGCACAACGGCACCTTC TTCCTTCTGCTTCACCTCG	108
<i>sfp</i>	AGAGGTGGGCATTGATGTAGA CGGCTGGAGTATGGAGAGAG	248
内参基因 <i>ftsZ</i>	GCGAAATCCGAGCACAAG TTCCCGTTCCTCCACCCA	175

1.3 *P. thiaminolyticus* SY20生长曲线测定

采用 5% (V/V) 的接菌量将活化的 SY20 菌株接入 M63T 培养基中, 于 37 °C、180 r/min 下培养。每隔 12 h, 在无菌环境下取样, 测定菌液 OD₆₀₀ 值, 绘制菌株生长曲线。

1.4 *P. thiaminolyticus* SY20发酵上清抑菌活性检测及抑菌曲线测定

被测菌株发酵上清对大肠杆菌抑制活性采用琼脂平板扩散法^[9,10]进行检测。简要地, 每 12 h 所取的样品在 10 000 r/min 下离心 10 min, 然后使用 0.22 μm 滤器去除发酵上清液残留的菌体后在大肠杆菌平板上检测抑菌活性, 使用抑菌圈直径来表征发酵上清液对大肠杆菌的抑菌能力。另外, 已完成了对 *P. thiaminolyticus* SY20 全基因组编码的抗菌物质进行了基因分析和体外检测, 证明对革兰氏阴性菌的抑菌活性仅来源于菌体产生的多粘菌素 (数据另外发表), 因此用抑菌活性来表征多粘菌素的产量。

1.5 RNA提取及cDNA合成

根据抑菌曲线分别取抑菌活性产生初期 (第 24 小时)、抑菌活性产生前期 (第 36 小时)、抑菌活性积累期 (第 60 小时)、抑菌抑菌活性稳定期 (第 84 小时) 的菌液进行离心以收集菌体, 随后迅速在液氮中进行速冻, 最终存储在恒温 -80 °C 的环境中。样品中的总 RNA 提取利用 TrizolRNA 提取试剂 (Thermo, American), 并通过 NanoDrop 8000 仪

器 (Thermo, American) 以及琼脂糖凝胶电泳来检测 RNA 的浓度和纯度。

利用 HiScript QRT SuperMix 反转录试剂盒 (Vazyme, China) 进行样品的逆转录, 得到样品的 cDNA, 置于 -20 °C 保存用于后续的荧光定量 PCR 分析。逆转录反应体系: 各个样品 RNA 去 DNA 后进行均一化, RNA 模板 12 μL; 5×qRT SuperMixII 4 μL, 总体系为 20 μL。反转录条件: 50 °C 15 min, 85 °C 2 min 终止反应。

1.6 *P. thiaminolyticus* SY20中多粘菌素合成及调控基因引物设计

根据解硫胺类芽孢杆菌 *P. thiaminolyticus* SY20 全基因组信息 (前期委托深圳华大基因科技有限公司测序) 中检索出待测基因序列。使用 Primer 5 软件设计引物, 由武汉天一辉远生物科技公司合成, 内参基因及引物序列如表 1 所示。

1.7 实时荧光定量PCR (Real-time PCR) 分析

以 *ftsZ* 为内参基因, 使用 ABI 公司的 SYBR® Select Master Mix (2×) 实时荧光定量 PCR 试剂盒和 QuantStudio™ 5 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 实验。对于逆转录反应得到 cDNA 样品, 用 RNase Free dH₂O 稀释, 使其 Real-time PCR 反应的 Ct 值 (荧光值达到检测阈值时的循环数) 在 15~35 范围内, PCR 反应体系的组成如下: 2× qPCRmix 5 μL; cDNA 模板 2 μL; 正引物 (10 pmol/μL) 0.25 μL;

反引物 (10 pmol/μL) 0.25 μL; 无酶水 2.5 μL; 总反应体系 10 μL。PCR 扩增条件如下: 在 95 °C 进行 30 s 的初始变性, 然后进行 40 个循环, 每个循环包括 95 °C 10 s 的变性步骤, 60 °C 30 s 的退火/延伸步骤, 在延伸阶段检测荧光强度并收集信号, 最后进行 95 °C 5 s 的终止变性。熔解曲线分析是通过将样品从 60 °C 加热到 95 °C, 每升温 0.5 °C 停留 1 s 进行荧光强度变化的检测。

1.8 Real-time PCR 数据分析

每个样品测三次平行, 每组平行 Ct < 35 且差异不超过 0.5 视为符合质控标准。基因相对表达量分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行计算^[11] (以 *ftsZ* 基因作为内参基因)。所有数据的表示方法均使用平均值 ± 标准误差, 利用 GraphPad Prism 8 进行作图。

2 结果与分析

2.1 *P. thiaminolyticus* SY20 生长曲线和抑菌曲线

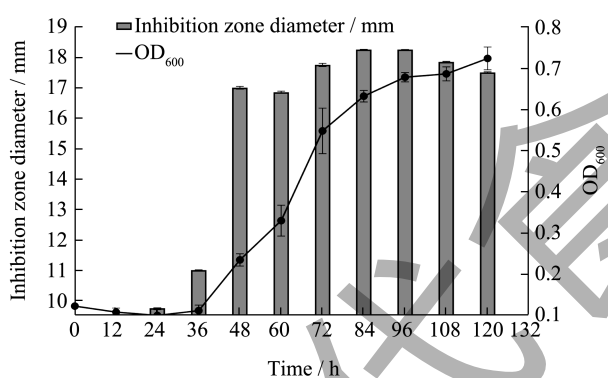


图 2 *P. thiaminolyticus* SY20 在 M63T 培养基中的生长曲线和抑菌曲线

Fig.2 Growth curve and antimicrobial curve of *P. thiaminolyticus* SY20

根据图 2 所示, 在 M63T 培养基中, *P. thiaminolyticus* SY20 在 0~24 h 处于生长迟滞期, 菌体浓度保持较低水平。从 36 h 开始, SY20 进入对数生长期, 60 h 为对数生长中期, 84 h 后进入平台期。抑菌圈直径显示, 发酵上清对大肠杆菌的抑菌活性在菌株发酵的不同阶段变化较大。在 24 h 之前, 发酵上清液对大肠杆菌几乎无抑制活性, 这可能是因为抑菌物质尚未产生或产生量太少而未达到检测阈值。在 24 h 后, 抑菌活性可被检出, 且在 24~48 h 抑菌活性

迅速增大, 这表明抑菌活性代谢产物主要在发酵 24~48 h 大量合成和积累。在 60~84 h, 抑菌活性仍略有增加但增速放缓, 并在 84 h 时达到最高水平。因此, 在后续实验中, 选择了 24、36、60 和 84 h 这四个抑菌活性差异点来探究不同发酵阶段多粘菌素 A1 的合成与调控相关基因转录水平。

2.2 样品总 RNA 提取与质量评定

四个取样点样品 RNA 检测发现 A_{260}/A_{280} 的比值在 2.0 左右, 且 A_{260}/A_{230} 在 1.8 左右, 说明 RNA 提取质量较高, 杂质较少; 琼脂糖凝胶电泳检测显示条带清晰, 可用于后续的检测分析。

2.3 引物扩增特异性

熔解曲线上看, 9 个待测基因与内参基因在扩增过程中只出现单一信号峰 (图 3), 说明没有引物二聚体和非特异性产物的产生。通过 2% 琼脂糖凝胶电泳对扩增片段进行了检测显示, 每种引物均成功扩增并与预期大小相符 (图 4), 这表明所使用的引物在反应体系中具有良好的特异性, 能够特异地扩增目标基因片段。

2.4 发酵过程中 *pmx* 基因簇的表达情况

以 *ftsZ* 为内参基因, 24 h 为对照样本, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法得出多粘菌素 A1 合成基因簇在不同培养阶段的表达情况, 结果如图 5。对于 *pmxA*、*pmxC* 和 *pmxE* 基因, 在 24~36 h, 随着抑菌活性的增加, 这些基因的表达水平显著上升; 36~60 h 抑菌活性快速增加, 但基因表达水平反而下降; 在 60~84 h, 这些基因表达水平有所回升 (图 5a、5c 和 5e)。对于 *pmxB* 基因, 在 24~36 h 抑菌活性逐渐升高, 但该基因的表达水平变化不大; 36~60 h, 随着抑菌活性的进一步升高, 该基因表达水平有所下降, 在 84 h 抑菌活性达到最大值, 此时该基因的表达水平有所增加 (图 5b)。而对于 *pmxD*, 在 24~36 h, 随着抑菌活性的增加, 该基因的表达水平有所上升; 36~60 h 抑菌活性继续增加, 但基因表达水平却随之下降, 在 84 h 该基因表达水平增加 (图 5d)。总的来说, 多粘菌素 A1 合成基因簇 *pmx* 包含的 5 个基因 *pmxA*、*pmxB*、*pmxC*、*pmxD* 和 *pmxE* 在不同生长阶段表达水平呈现基本同步的趋势 (图 5f)。

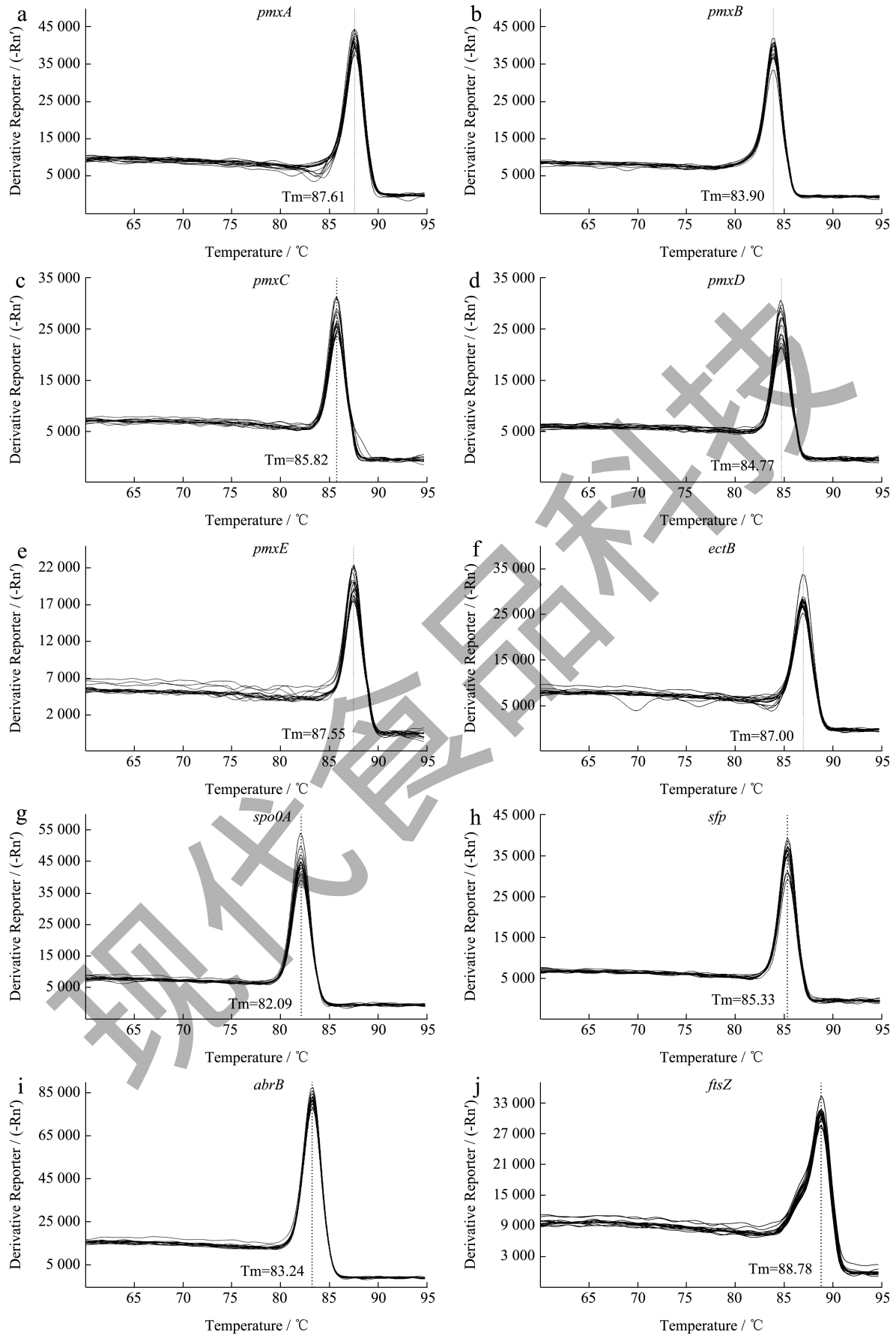


图3 九个待测基因以及内参的溶解曲线

Fig.3 Melting curves generated for a reference gene and nine tested genes

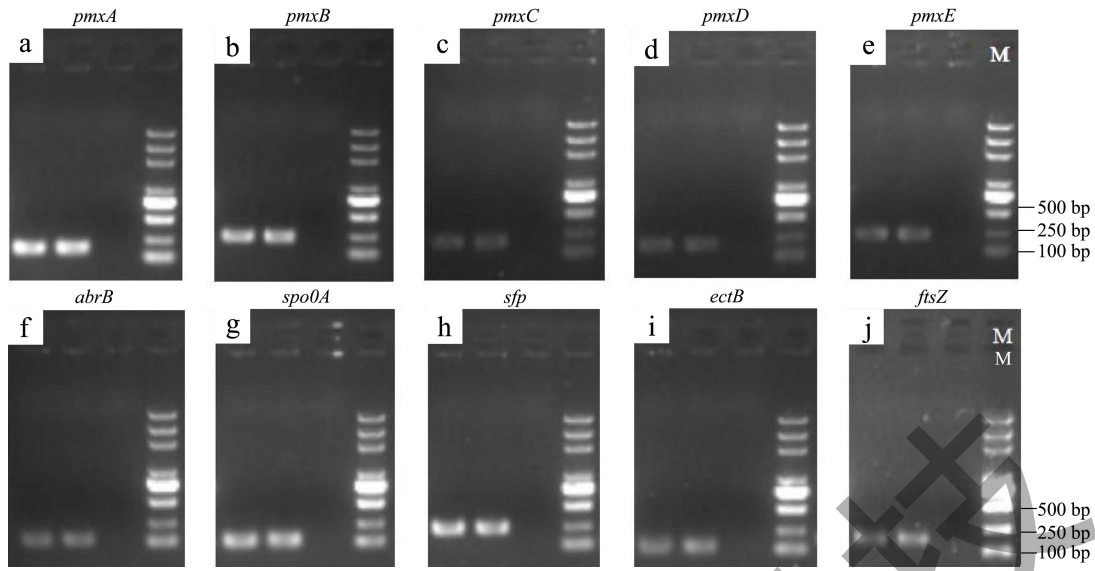


图 4 九个待测基因以及内参基因扩增片段凝胶电泳

Fig.4 The gel electrophoresis of nine tested genes and reference gene amplification fragment

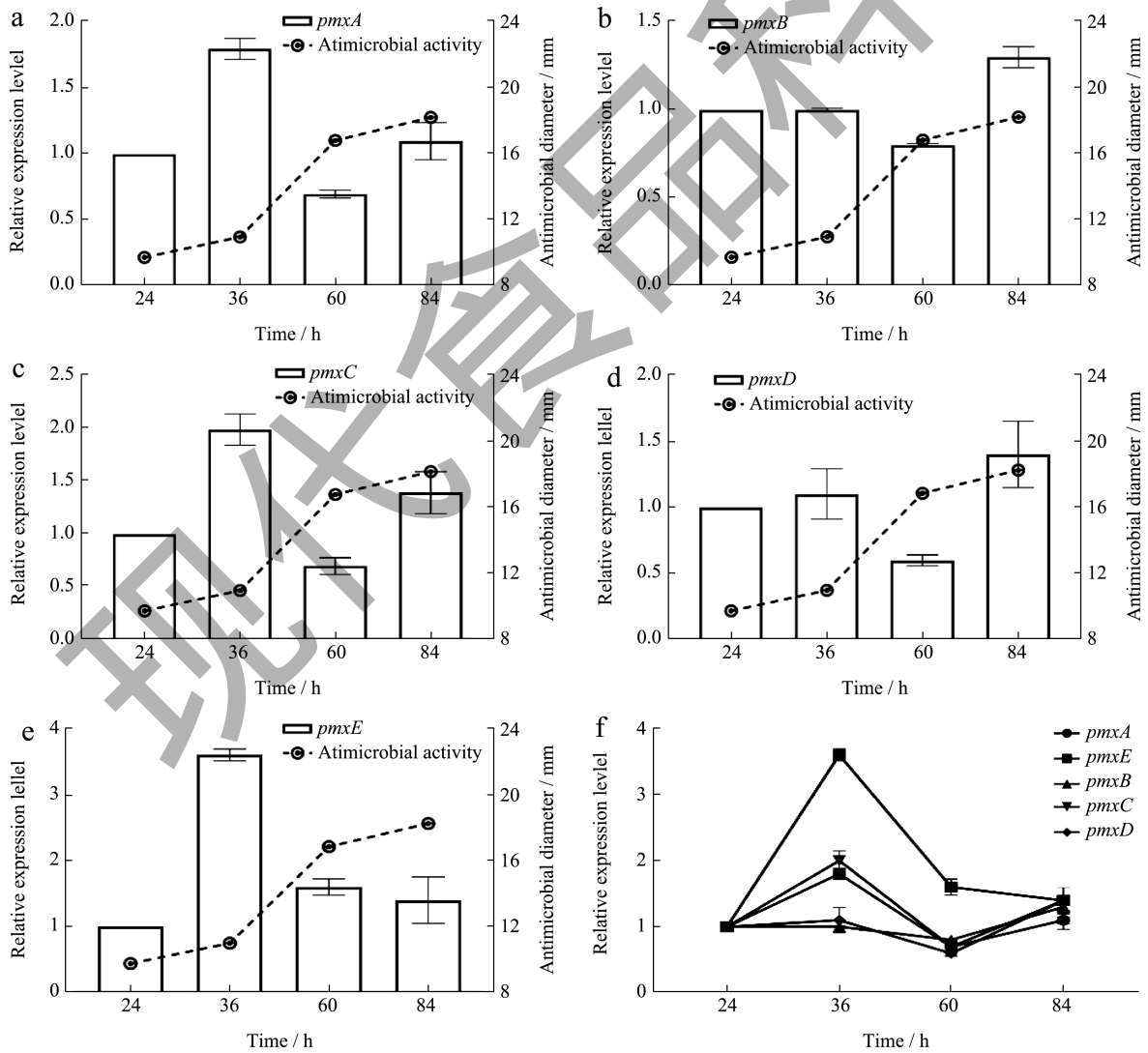


图 5 *pmx* 基因簇的表达情况

Fig.5 The relative expression levels of *pmx* cluster

2.5 *ectB* 基因转录情况

多粘菌素 A1 调控基因 *ectB* 转录水平如图 6a 所示, 在 24~36 h, 随着抑菌活性的增加, 该基因的表达水平显著上升; 36~60 h 抑菌活性快速增加, 但基因表达水平反而下降; 在 60~84 h, 该基因表达水平有所回升 (图 6a)。此外, 由图 6b 所示, *ectB* 基因与 *pmxA* 和 *pmxE* 基因的表达水平呈现明显同步的趋势。

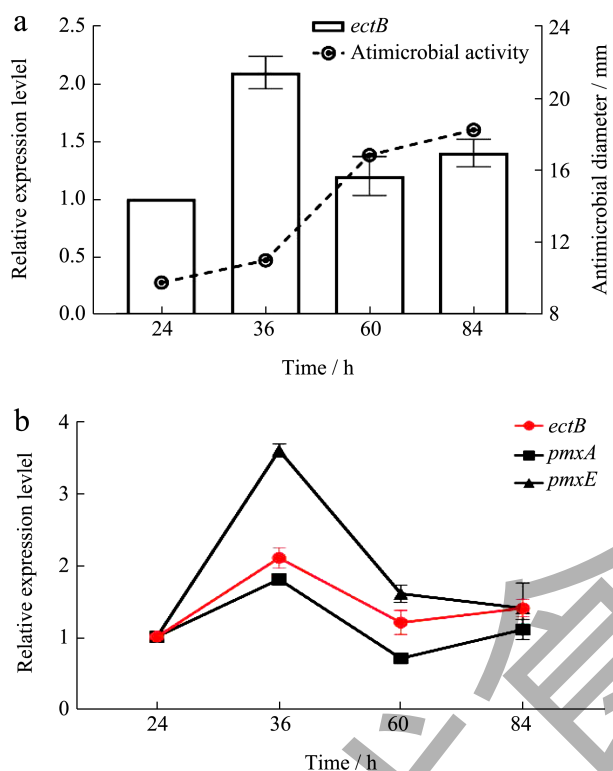


图 6 *ectB* 基因的相对表达水平及与 *pmxA*、*pmxE* 基因的关系

Fig.6 The relative expression level of *ectB* gene and the relationship of *pmxA* and *pmxE* gene

注: (a) *ectB* 基因表达水平; (b) *ectB* 与 *pmxA*、*pmxE* 基因表达水平关系。

2.6 *spo0A*、*abrB*、*sfp* 基因转录水平

与 24 h 相比, 其他三个观测点 *spo0A* 基因转录水平均高于 24 h。其中, 在 24~60 h, *spo0A* 基因表达水平基本随着抑菌活性的提高逐渐上升; 在 84 h, 该基因表达水平与 60 h 相比变化不大 (图 7a)。相反, *abrB* 基因表达水平在 24~60 h 随着抑菌活性的增加而减少, 而在 84 h 表达水平有所回升 (图 7b)。对于 *sfp* 基因, 在 24~84 h 之间随着抑菌活性的增加其表达水平逐渐增加 (图 7c)。综上可知, *spo0A*、*sfp* 基因表达水平与抑菌活性基本呈正相关, 而

abrB 基因表达水平与抑菌活性呈现一定的负相关, 同时 *spo0A* 基因和 *abrB* 基因的表达水平也呈负相关 (图 7d)。

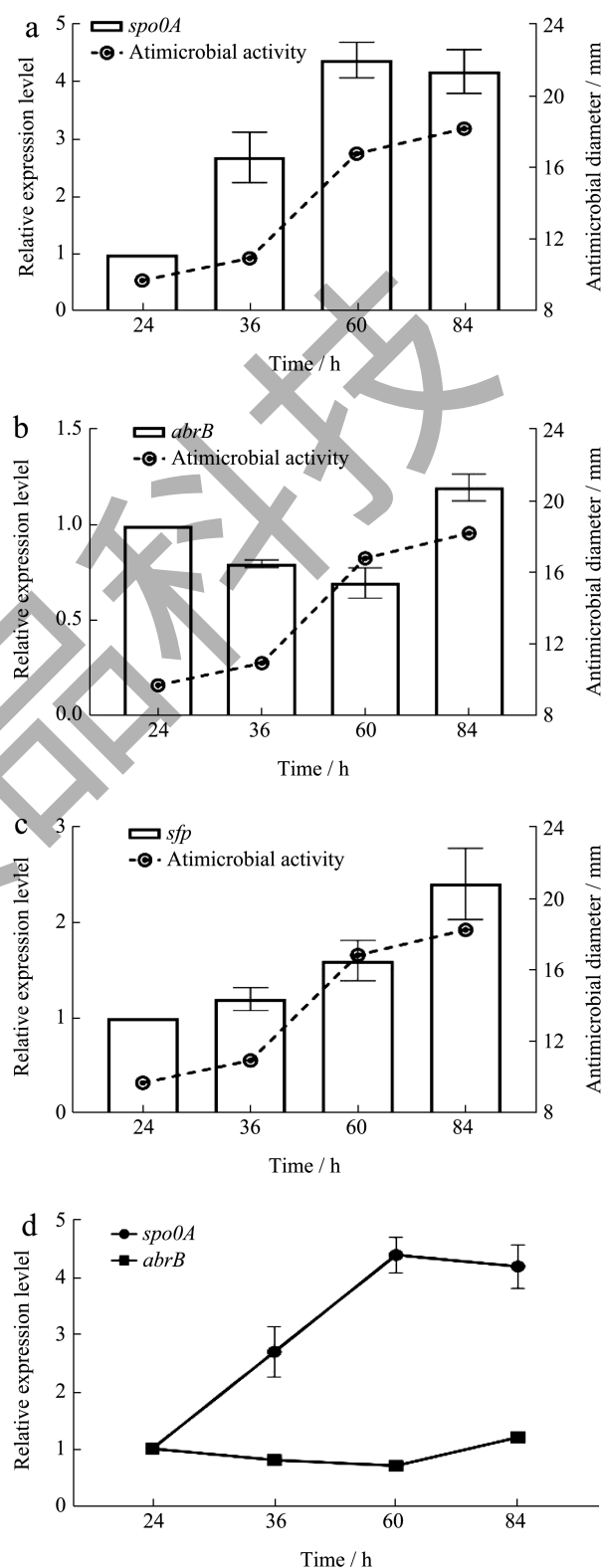


图 7 *spo0A*、*abrB*、*sfp* 基因相对表达水平

Fig.7 The relative expression level of *spo0A*, *abrB*, and *sfp* genes

3 讨论

多粘菌素是一种非核糖体合成的脂肽抗菌物质,是由模块化结构的多酶复合体系产生,该多酶复合体系由 *pmx* 基因簇进行编码^[12-14]。作为一种次级代谢产物,多粘菌素一般在菌株生长的对数期开始合成至对数末期(或者平台前期)达到最高^[12]。*P. thiaminolyticus* SY20 在 M63T 培养基中的生长曲线和抑菌曲线关系也说明了抑菌活性物质主要在对数期产生,在平台前期达到最大,该结果与文献报导一致。另外,在 M63T 培养基中,平台期菌密度 OD₆₀₀ 仅为 0.7 左右,这可能是由于该培养基营养相对匮乏,菌株在贫营养条件下繁殖受到一定限制,也可能因为菌株产生的次级代谢产物对本身的生长繁殖具有一定的抑制作用所致^[15]。

P. thiaminolyticus 最早从硫胺缺乏的临床患者的粪便中分离出来,由于它能够产生硫胺降解酶,因此它被当做研究硫氨基酶 I 的模式生物^[16,17]。多粘菌素主要由多粘类芽孢杆菌产生,前期从 *P. thiaminolyticus* SY20 中分离出多粘菌素 A1,这是第一次发现该菌种具有产多粘菌素的能力^[10,13,14]。因此考察该菌株基因组中多粘菌素 A1 的合成和调控相关基因的表达情况有利于丰富对多粘菌素合成与调控机制的探究。在 *P. thiaminolyticus* SY20 中,多粘菌素 A1 合成与转运主要由 *pmx* 基因簇编码,其五个基因 *pmxA*、*pmxB*、*pmxC*、*pmxD* 和 *pmxE* 是与多粘菌素 A1 合成和转运的直接调控基因^[6]。从五个基因的转录水平上看,它们的表达水平呈现基本同步的趋势;结合抑菌活性,发现 *pmx* 基因簇表达水平的最高点基本出现在菌生长的对数前期(36 h),它先于抑菌活性的最高点(84 h)出现,这可能是因为在对数前期 *pmx* 基因簇高水平表达为后续多粘菌素合成和积累准备条件,而之后随着产物的积累,*pmx* 基因簇表达受到一定的抑制。

除了 *pmx* 基因簇外,参与多粘菌素合成的调控基因还包括 *sfp*、*ectB*、*spo0A* 和 *abrB* 基因。*sfp* 基因编码的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(Sfp),该酶在聚酮合酶、非核糖体多肽合成酶、铁载体合成酶的作用过程中扮演至关重要的角色^[7]。例如,在枯草芽孢杆菌脂肽类抗生素 surfactin 的合成过程中,Sfp 通过催化共价结合把辅酶 A 中的磷酸泛酰巯基乙胺基团部分连接到 surfactin 合成酶的每个肽载体蛋白结构域的丝氨酸残基上,使该多结构域的酶从未激活的形式成为激活状态,因此该基因在脂肽合

成过程中起到正调控作用^[18]。在 *P. thiaminolyticus* SY20 发酵过程中,*sfp* 基因的表达水平随着抑菌活性的增加不断提高,说明该基因在多粘菌素 A1 合成中也起到正调控作用。此外,文献报道多粘菌素合成酶基因簇在枯草芽孢杆菌中外源表达,如果缺少 *ectB* 基因则不能产生多粘菌素,当 *ectB* 基因重新插入枯草芽孢杆菌后,该重组菌株又能成功产生多粘菌素^[19]。这主要是因为多粘菌素的 10 个氨基酸残基中 6 个非蛋白氨基酸 Dab 是由 *ectB* 基因编码的二氨基丁酸氨基转移酶(EctB)合成,因此 *ectB* 基因对多粘菌素的产生是必需的^[7,19]。在 *P. thiaminolyticus* SY20 中,*pmxA* 与 *pmxE* 基因负责所有 Dab 残基肽段的合成,而 Dab 又由 *ectB* 基因编码的酶合成,因此 *pmxA*、*pmxE* 与 *ectB* 基因表达水平应该存在着一定的相关性。本研究发现,*pmxA*、*pmxE* 与 *ectB* 基因表达水平呈现出同步的趋势。此外,多粘菌素合成受到 *spo0A-abrB* 系统的调控^[20-22]。Park 等^[19] 研究发现,在人工构建的包含多粘菌素合成基因簇的 *Bacillus subtilis* 3S 中,敲除 *abrB* 基因的突变株可使多粘菌素产量增加,但敲除 *spo0A* 基因却不产生多粘菌素。本研究中,*spo0A* 基因的表达水平与抑菌活性呈正相关,而与 *abrB* 基因的表达呈现负相关,该研究结果与文献报道相一致。同时,该结果也表明 *spo0A* 基因是 *P. thiaminolyticus* SY20 中多粘菌素 A1 合成的间接正调控基因,而 *abrB* 基因为负调控基因。

4 结论

在 *P. thiaminolyticus* SY20 菌株发酵过程中,抑菌活性物质主要在对数期产生,并在平台前期(84 h)达到最大;在发酵过程中,多粘菌素合成基因簇 *pmx* 各基因的表达水平呈现同步趋势,均在对数前期(36 h)达到最大值;此外,*ectB* 基因表达水平与 *pmxA*、*pmxE* 基因的转录水平也呈现出同步的趋势,说明 *ectB* 基因与多粘菌素合成密切相关;*sfp* 和 *spo0A* 基因转录水平随着抑菌活性的增加而增加,因此它们是多粘菌素合成的正调控基因,而 *abrB* 基因为多粘菌素负调控基因。

参考文献

- [1] HAN M L, ZHU A Y, CREEK A D J, et al. Comparative metabolomics and transcriptomics reveal multiple pathways associated with polymyxin killing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. MSystems, 2019, 4(1): e00149-18.

- [2] YIN J, MENG Q, CHENG D, et al. Mechanisms of bactericidal action and resistance of polymyxins for Gram-positive bacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(3): 3771-3780.
- [3] VELKOV T, Yun B, SCHNEIDER E K, et al. A novel chemical biology approach for mapping of polymyxin lipopeptide antibody binding epitopes [J]. Acs Infectious Diseases, 2016, 2(5): 341-351.
- [4] PAJOR M, SOGIN J, WOROBO R W, et al. Draft genome sequence of antimicrobial producing *Paenibacillus alvei* strain MP1 reveals putative novel antimicrobials [J]. BMC Research Notes, 2020, 13(1): 280-286.
- [5] AINSWORTH G C, BROWN A M, BROWNLEE G. 'Aerosporin', an Antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer [J]. Nature, 1947, 159: 263.
- [6] WU Y P, LIU D M, LIANG M H, et al. Genome-guided purification and characterization of polymyxin A1 from *Paenibacillus thiaminolyticus* SY20: A rarely explored member of polymyxins [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 14(13): 962507.
- [7] 郭成林.多粘菌素合成相关基因转录水平检测与负调控基因 $abrB$ 基因突变株的构建[D].杭州:浙江工业大学,2015.
- [8] YU Z L, GUO C L, QIU J P. Precursor amino acids inhibit polymyxin E biosynthesis in *Paenibacillus polymyxa*, probably by affecting the expression of polymyxin E biosynthesis-associated genes [J]. BioMed Research International, 2015, 11: 690830.
- [9] 吴雅萍.海洋芽孢杆菌MD抗菌活性蛋白的分离纯化与特性研究[D].福州:福建农林大学,2016.
- [10] WU Y P, GUO W B, ZHAO J B, et al. Isolation and identification of a novel LCI like antibacterial protein from *Bacillus* sp. MD-5 reveals its potential application in controlling *Staphylococcus aureus* in food industry [J]. Food Control, 2018, 89: 142-149.
- [11] 贺婷婷,宋婷,王超,等.短小芽孢杆菌实时荧光定量PCR分析中内参基因的筛选[J].生物技术通报,2016,32(11): 99-106.
- [12] TAMBADOU F, CARADEC T, GAGEZ A L, et al. Characterization of the colistin (polymyxin E1 and E2) biosynthetic gene cluster [J]. Archives of Microbiology, 2015, 197(4): 521-532.
- [13] SHAHEEN M, LI J R, ROSS A C, et al. *Paenibacillus polymyxa* PKB1 produces variants of polymyxin B-Type antibiotics [J]. Chemistry & Biology, 2011, 18(12): 1640-1648.
- [14] CHOI S K, PARK S Y, KIM R, et al. Identification of a polymyxin synthetase gene cluster of *Paenibacillus polymyxa* and heterologous expression of the gene in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Bacteriology, 2009,191(10): 3350-3358.
- [15] 秦旺蓉.多粘菌素E诱导多粘类芽孢杆菌氧胁迫致死机理的研究[D].杭州:浙江工业大学,2015.
- [16] DAVID S, Esther R A. Genomic insights into the thiamin metabolism of *Paenibacillus thiaminolyticus* NRRL B-4156 and *P. apiarius* NRRL B-23460 [J]. Standards in Genomic Sciences, 2017, 12(1): 59-71.
- [17] COSTELLO C A, KELLEHER N L, ABE M, et al. Mechanistic studies on thiaminase I. Overexpression and identification of the active site nucleophile [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(7): 3445-3452.
- [18] QUADRI L E, WEINREB P H, LEI M, et al. Characterization of *Sfp*, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases [J]. Biochemistry, 1998, 37(6): 1585-1595.
- [19] PARK S Y, Choi S K, KIM J, et al. Efficient production of polymyxin in the surrogate host *Bacillus subtilis* by introducing a foreign *ectB* gene and disrupting the *abrB* gene [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(12): 4194-4199.
- [20] FUJITA M, GONZÁLEZ P J E, LOSICK R. High and low-threshold genes in the *Spo0A* regulon of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(4): 1357-1368.
- [21] MOLLE V, FUJITA M, JENSEN S T, et al. The *Spo0A* regulon of *Bacillus subtilis* [J]. Molecular Microbiology, 2003, 50(5): 1683-1701.
- [22] PEREGO M, SPIEGELMAN G B, HOCH J A. Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis* [J]. Molecular Microbiology, 1988, 2(6): 689-699.