

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-004

庆大霉素及其相关产物在工业底盘细胞中的高效合成

吴亮亮¹, 常莹莹¹, 邓子新^{1,2}, 刘天罡^{1,2}

(¹ 武汉大学药学院, 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 湖北 武汉 430071; ² 武汉生物技术研究院, 合成微生物技术湖北省工程实验室, 湖北 武汉 430075)

摘要: 庆大霉素是一种氨基糖苷类抗生素, 在临床上广泛应用于治疗由革兰氏阴性菌引起的严重感染。它可由棘孢小单孢菌 *Micromonospora echinospora* 产生, 生物合成途径清晰。为了提高庆大霉素的产量, 本文以工业菌株 *M. echinospora* J1-020 为基础, 确定庆大霉素合成基因簇信息, 建立了稳定的遗传操作方法。在此基础上, 使用强 (*kasOp**)、中 (*rpsLp-cf*)、弱 (*ermE**) 三种强度的启动子评估磷酸转移酶 GenP 的最适过表达水平, 构建对应 *attB/attP* 位点整合突变株 YC002、YC003、YC001。摇瓶发酵结果显示, YC001、YC002、YC003 菌株的庆大霉素 C 组分的产量较原始菌株 [(1008±57) mg/L] 分别提高了 16.9% [(1178±39) mg/L]、30.8% [(1319±29) mg/L] 和 18.8% [(1198±46) mg/L]; 同时, 结合杂质含量, 在以上三株菌株中确定了中强度启动子控制 *genP* 过表达的效果最佳, 以此构建对应的稳定整合在基因组上的 *genP* 过表达菌株 YC004。使得庆大霉素 C 组分摇瓶发酵产量提高了 34.5% [(1427±37) mg/L]。此外, 以工业菌株 *M. echinospora* J1-020 为底盘, 构建 *genQ* 敲除菌株, 获得了只产生 G418 单一组分的菌株 YC005, 其摇瓶发酵产量为 460 mg/L。以 YC004 为出发菌株, 依次敲除 *genB4*、*genK*, 获得了只产生西索米星单一组分的菌株 YC007, 其摇瓶发酵产量达 1046 mg/L。综上, 以该工业菌株 *M. echinospora* J1-020 为底盘, 借助合理的代谢工程策略有望快速获得多种氨基糖苷类抗生素的高产菌株。

关键词: 庆大霉素; G418; 西索米星; 氨基糖苷类抗生素; 棘孢小单孢菌

中图分类号: **文献标志码:** A

Efficient synthesis of gentamicin and its related products in industrial chassis cells

WU Liangliang¹, CHANG Yingying¹, DENG Zixin^{1,2}, LIU Tiangang^{1,2}

(¹Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, Wuhan University School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan 430071, Hubei, China; ²Hubei Engineering Laboratory for Synthetic Microbiology, Wuhan Institute of Biotechnology, Wuhan 430075, Hubei, China)

Abstract: Gentamicin is a kind of aminoglycoside antibiotic, widely used to treat severe Gram-negative bacterial

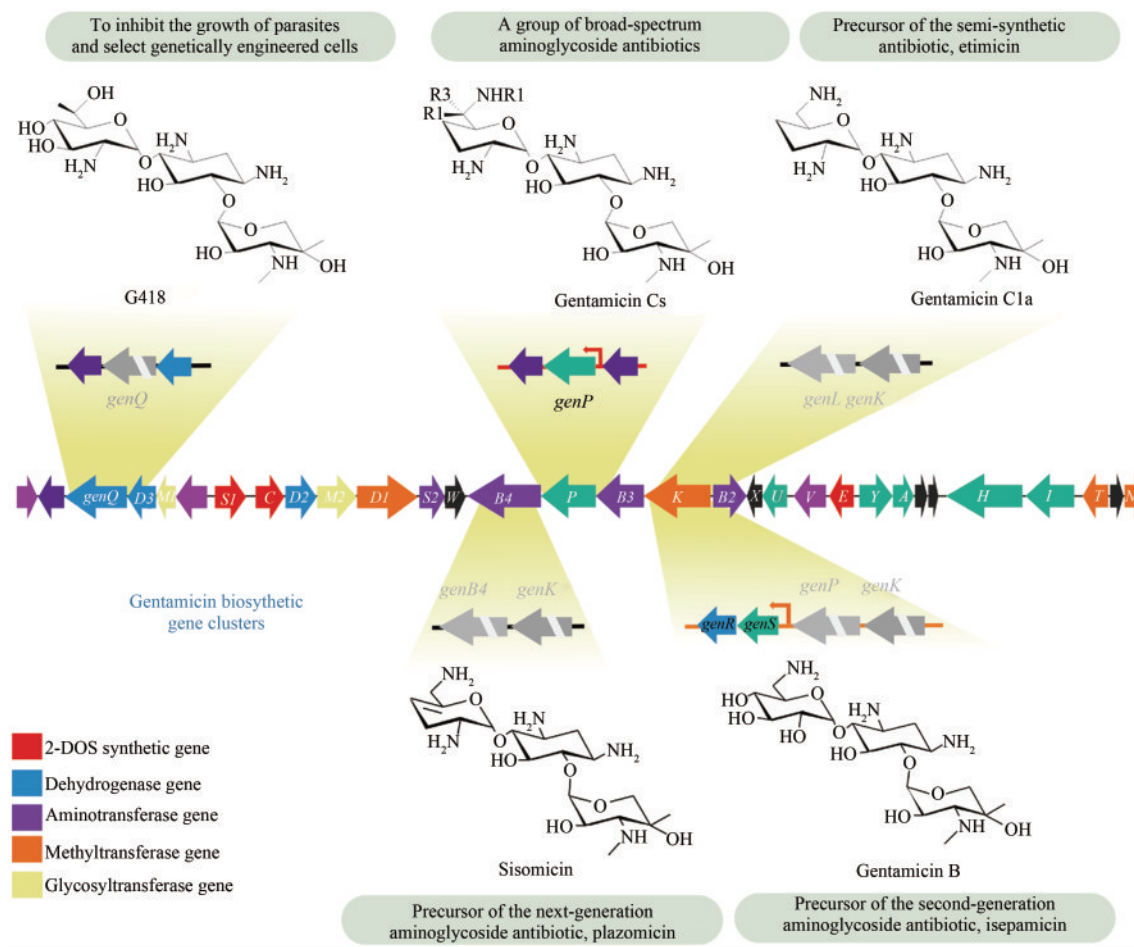
收稿日期: 2022-01-05 修回日期: 2022-02-23

基金项目: 国家重点研发计划“合成生物学”重点专项 (2018YFA0900400)

引用本文: 吴亮亮, 常莹莹, 邓子新, 刘天罡. 庆大霉素及其相关产物在工业底盘细胞中的高效合成[J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1277-1291

Citation: WU Liangliang, CHANG Yingying, DENG Zixin, LIU Tiangang. Efficient synthesis of gentamicin and its related products in industrial chassis cells[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1277-1291

infections. As an important secondary metabolite produced by *Micromonospora echinospora*, its biosynthetic pathway has been studied for years and scientists have a clear understanding for the biosynthetic gene cluster. In order to increase the titer of gentamicin, this study used the industrial strain *M. echinospora* J1-020 to determine the gentamicin synthetic gene cluster and established a stable genetic manipulation method. On this basis, three promoters with strong (*kasOp**), medium (*rpsLp-cf*), and weak (*ermE**) strengths were used to evaluate the optimal overexpression level of phosphotransferase GenP, and the corresponding *attB/attP* site integration mutant strains YC002, YC003, YC001 was then constructed. After shaking flask fermentation, the results showed that the titer of gentamicin C component of YC001, YC002 and YC003 strains were increased by 16.9 % [(1178±39)mg/L], 30.8 % [(1319±29)mg/L] and 18.8%[(1198±46)mg/L] respectively, compared with the original strain [(1008±57)mg/L]. At the same time, combined with the impurity content, it was determined that the medium-strength promoter has the best effect on controlling the overexpression of gene *genP* in the above three strains, so that the corresponding overexpression strain YC004 of the *genP* stably integrated in the genome was constructed through homologous recombination. After shaking flask fermentation, the results showed that the titer of gentamicin C component increased by 34.5 %[(1427±37)mg/L]. Then, using *M. echinospora* J1-020 as the chassis, the *genQ* knockout strain YC005 was constructed to produce the G418 as the single component. The results showed that the titer of G418 was 460 mg/L. Finally, the gene *genP* overexpression strain YC004 as the starting strain, in which *genB4* and *genK* were knocked out, was used to construct a double knockout mutant YC007 in order to produce sisomicin as a single component. After shaking flask fermentation, the titer of sisomicin was 1046 mg/L. It is expected that overproduction strains of various aminoglycoside antibiotics can be readily constructed by rational metabolic engineering strategies in the industrial chassis.



Keywords: gentamicin; G418; sisomicin; aminoglycoside antibiotics; *Micromonospora echinospora*

氨基糖苷类抗生素是一大类广泛应用于临床的广谱抗菌化合物,已被证明可以有效治疗由铜绿假单胞菌、肺炎杆菌等革兰氏阴性菌引起的严重感染^[1]。1943年,Waksman从灰白色链霉菌中分离出了第一个氨基糖苷类抗生素——链霉素,之后研究者陆续发现了多种氨基糖苷类抗生素^[2],如新霉素^[3](1949)、卡那霉素^[4](1957)、庆大霉素^[5](1963)等。其中,庆大霉素可由棘孢小单孢菌 *Micromonospora echinospora* 产生。它由2-脱氧链霉胺(2-deoxystreptamine, 2-DOS)和两个糖基(加拉糖胺和绛红糖胺)组成,因C6'位甲基化程度不同而分为C1、C1a、C2、C2a四种主要成分。庆大霉素可以通过与靶细胞内核糖体30S亚基16S rRNA上的氨酰基位点结合,引起mRNA发生错译,干扰蛋白质的合成从而杀死病原菌^[6]。

自1963年庆大霉素被发现至20世纪末,研究者利用随机诱变突变株的中间体喂养和组分转化实验,初步建立了庆大霉素生物合成途径的框架^[7]。随着DNA测序技术的发展,人们逐步从分子水平解释了庆大霉素的生物合成途径。近两年,随着越来越多的庆大霉素下游合成酶功能被证明,庆大霉素生物合成途径变得十分明晰。庆大霉素合成途径(图1)起始于D-葡萄糖-6-磷酸,在异构酶GenC的作用下转化为2-脱氧肌醇(2-deoxy-scyllo-inosose)^[8],之后依次在氨基转移酶GenS1、脱氢酶GenE作用下通过两步氨基转移和一步脱氢合成2-脱氧链霉胺(2-deoxystreptamine),并以此为底物在糖基转移酶GenM1和GenM2的作用下在C4以及C6加载1分子UDP-N-乙酰基葡萄糖胺和1分子UDP-木糖,形成首个类三糖中间体庆大霉素A2^[9]。接下来,庆大霉素A2依次在GenD2、GenS2以及甲基转移酶GenN、GenD1^[10]和GenK^[11-12]形成的甲基化网络作用下通过脱氢、氨基化以及甲基化合成重要中间体庆大霉素X2和G418^[13]。庆大霉素X2和G418在脱氢酶GenQ和氨基转移酶GenB1作用下分别形成J1-20A和J1-20B^[14],一方面以J1-20A和J1-20B为底物,在磷酸转移酶GenP^[15]、磷酸吡哆醛依赖的酶GenB3和GenB4协同修饰以及GenB2作用

下^[16-17],完成庆大霉素3'、4'双脱氧生成西索米星和庆大霉素C1a、C2a和C2,最后通过GenL甲基化修饰产生庆大霉素C2b和C1^[18];另一方面,J1-20A依次在GenR、GenS的作用下可合成庆大霉素B^[19-20]。

伴随庆大霉素C组分的合成,产生了一系列具有高应用价值的氨基糖苷类抗生素中间体,如G418、西索米星、庆大霉素B等。本文借助发酵工艺成熟、产物合成高效的工业菌株 *M. echinospora* J1-020作为底盘,通过合理的代谢工程改造,以实现庆大霉素及其相关中间体的高效合成。首先,建立了适用于 *M. echinospora* J1-020菌株的高效遗传操作体系,通过磷酸转移酶GenP的适度过表达,得到庆大霉素C组分产量提升的菌株YC004,庆大霉素C组分产量提升了34.5%。之后,为评估此工业菌株合成其他氨基糖苷类单一中间体的能力,一方面,在 *M. echinospora* J1-020菌株中通过敲除 *genQ*,阻断G418向下游的转化,得到产生G418单一组分菌株YC005;另一方面,在YC004菌株中敲除 *genB4*和 *genK*,不仅获得产生西索米星的单一组分菌株YC007,而且使得西索米星的产量提高了约21倍。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

本研究中所使用的的菌株和质粒见表1。本研究中所使用的寡核苷酸引物见表2。

1.2 培养基及用途

(1) LB培养基 蛋白胨1%,酵母提取物0.5%,氯化钠1%,用于 *E. coli* 培养。

(2) ABB13培养基 大豆蛋白胨0.5%,可溶性淀粉0.5%,碳酸钙0.3%,MOPS 0.21%,硫酸亚铁0.0012%,维生素B₁ 0.001%,琼脂2.0%,用做接合转移平板培养基。

(3) 平板培养基 玉米淀粉3%,酵母提取物

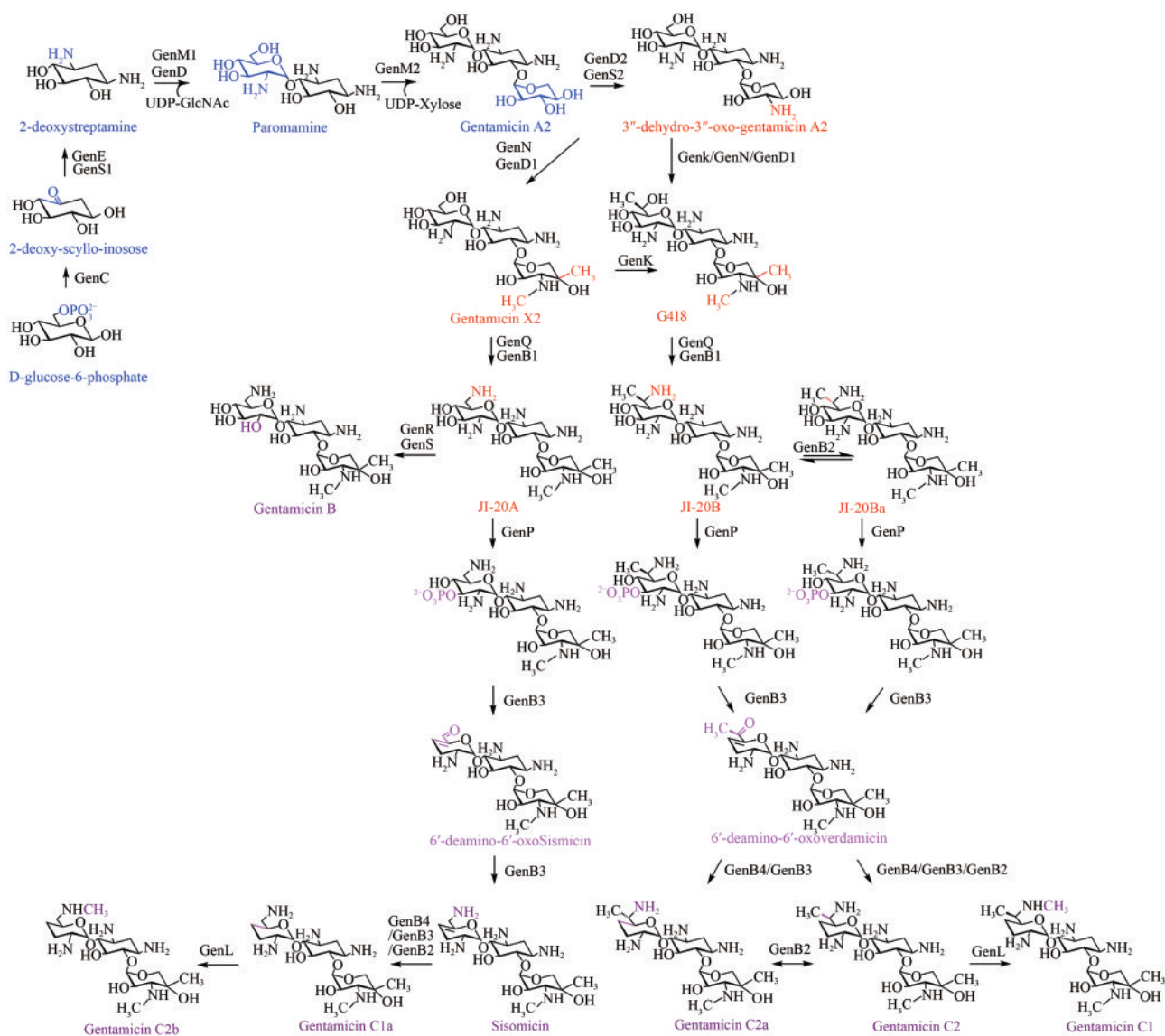


图1 庆大霉素生物合成途径

Fig. 1 The biosynthetic pathway of gentamicin

0.5%，氯化钠 0.2%，磷酸二氢钾 0.01%，硝酸钾 0.3%，碳酸钙 0.6%，琼脂 2.0%，pH7.2，用于接合子培养及筛选。

(4) 斜面培养基 可溶性淀粉 1.0%，硝酸钾 0.2%，磷酸氢二钾 0.06%，氯化钠 0.05%，碳酸钙 0.1%，天冬酰胺 0.002%，琼脂条 1.6%，麸皮 2.0%，pH 7.2，用于 *M. echinospora* J1-020 野生型及其突变株的菌株培养和分离。

(5) 发酵培养基 玉米淀粉 6.0%，黄豆饼粉 2.0%，硫酸铵 0.3%，硝酸钾 0.05%，葡萄糖 0.3%，蛋白胨 0.60%，氯化钴 0.0001%，碳酸钙 0.60%，用于 *M. echinospora* J1-020 的发酵。

1.3 全基因组测序和组装

M. echinospora J1-020 全基因组测序由武汉未来组生物科技有限公司使用 PromethION 测序平台完成，测序了 1 个 cell，质控后的数据用 flye（参数：--nano-raw）进行组装后，用 racon（参数：default）结合三代测序数据进行矫正，用 pilon（参数：default）和 nextpolish（参数：default）结合二代测序数据进行矫正。编码基因用 prodigal（参数：-p None -g 11）进行预测，保留完整的 CDS。利用 COG、KEGG、GO、Refseq、Pfam 和 TIGRFAMs 数据库对编码蛋白进行功能注释。使用

表1 本研究中使用的菌株和质粒

Tab. 1 Strains and plasmids used in this study

Strain	Description	Reference
<i>M. echinospora</i> J1-020	Wild-type	This study
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)	Gibco-BRL
ET12567(pUZ8002)	<i>dam dcm hsdS</i> /pUZ8002, for intergeneric conjugation	[21]
ET12567(pUB307)	<i>dam dcm hsdS</i> /pUB307, for intergeneric conjugation	[22]
YC001	<i>genP</i> gene overexpression strain	This study
YC002	<i>genP</i> gene overexpression strain	This study
YC003	<i>genP</i> gene overexpression strain	This study
YC004	<i>genP</i> gene overexpression strain	This study
YC005	<i>genQ</i> gene knockout strain	This study
YC006	<i>genB4</i> gene knockout strain	This study
YC007	<i>genB4</i> and <i>genK</i> gene knockout strain	This study
Plasmid		
pWHU77	<i>int</i> , <i>att</i> , <i>tsr</i> , <i>ermE</i> *	[18]
pYH7	<i>sti</i> ⁻ , <i>rep</i> *, <i>orf85</i> ⁻ , R1 ⁻ , <i>tsr</i> , <i>aac(3)IV</i>	[23]
pXS001	<i>E.coli-actinomycete</i> integrated shuttle plasmid, pWHU77 carries <i>genP</i> under the control of the <i>ermE</i> * promoter	This study
pXS002	<i>E.coli-actinomycete</i> integrated shuttle plasmid, pWHU77 carries <i>genP</i> under the control of the <i>kasOp</i> * promoter	This study
pXS003	<i>E.coli-actinomycete</i> integrated shuttle plasmid, pWHU77 carries <i>genP</i> under the control of the <i>rpsLp-cf</i> promoter	This study
pXS004	<i>E.coli-actinomycete</i> replicating shuttle plasmid, pYH7 carries <i>genP</i> under the control of the <i>rpsLp-cf</i> promoter	This study
pXS005	<i>E.coli-actinomycete</i> replicating shuttle plasmid, <i>genQ</i> gene knockout plasmid	This study
pXS006	<i>E.coli-actinomycete</i> replicating shuttle plasmid, <i>genB4</i> gene knockout plasmid	This study
pXS007	<i>E.coli-actinomycete</i> replicating shuttle plasmid, <i>genK</i> gene knockout plasmid	This study

antiSMASH 3.0 软件预测次级代谢产物合成基因簇^[24]。

1.4 GenP 过表达菌株的获得

1.4.1 接合转移

(1) 三亲本接合转移 (菌丝体和孢子)

质粒测序正确后, 转化入 DH10B 中作为供体菌, 同时培养菌株 ET12567 (pUB307)^[22], 37 °C 培养过夜, 1:10 (体积比) 转接至 4 mL 含相应抗生素的 LB 中培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6~0.8, 收集菌体, 等体积无抗 LB 洗涤菌体三次, 后用 100 μL 无抗 LB 重悬。

菌丝体收集: 50 mL 平板液体培养基培养 *M. echinospora* J1-020 至生长中期, 收集菌体, 等体积 LB 洗涤菌体两次, 5 mL 无抗 LB 重悬, 作为受体菌。

孢子收集: 平板培养基培养 *M. echinospora* J1-020 9 d, 使用棉签刮取 1 个平板的孢子于 5 mL TES 溶液中, 50 °C 热激 10 min, 后加入 20 μL 5 mol/L CaCl₂ 溶液和 5 mL 预萌发培养基 (酵母浸膏 1%, 酪蛋白氨基酸 1%), 37 °C 220 r/min 培养 2 h, 培养完成后, 培养液离心收集菌体, 使用 1 mL LB 溶液重悬, 作为受体菌。将 100 μL 供体菌、100 μL ET12567 (pUB307) 和 100 μL 受体菌 (菌丝体或孢子) 混合, 均匀涂布于含有 30 mmol/L Mg²⁺ 的 ABB13 平板, 37 °C 培养 13~16 h, 使用硫链丝菌素 (12.5 μg/mL) 和甲氧苄啶 (40 μg/mL) 覆盖平板, 37 °C 继续培养, 6~9 d 长出接合子。

(2) 二亲本接合转移 (菌丝体)

质粒测序正确后, 转化入 ET12567 (pUZ8002) 中作为供体菌, 37 °C 培养过夜, 1:10 (体积比) 转接至 4 mL 含相应抗生素的 LB 中培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8, 收集菌体, 等体积无抗 LB 洗涤菌体三

表2 本研究中使用的寡核苷酸引物
 Tab. 2 Oligonucleotide primers used in this study

Primers	Sequence(5' to 3')	Restriction site
XS001-genP-F	CCAC <u>ATAT</u> GGTGAAGATGGTTGCAGCACC	<i>Nde</i> I
XS001-genP-R	TACGA <u>ATT</u> TCTCAGAGAAATTCGTCCAGCAG	<i>EcoR</i> I
XS001-YZ-F	GCGAGTGTCCGTTTCGAGTGG	
XS001-YZ-R	TCAGAGAAATTCGTCCAGCAG	
XS002-kasOp*-F	GCAGGTCGACTCTAGTATGCAT <u>TTCTAG</u> AGGAACGATCGTTGGCTGTGTTC	<i>Xba</i> I
XS002- kasOp*-R	GTGCTGCAACCATCTTCATATGGCGTATCCCCTTTCAGATACC	
XS002-genP-F	TCTGAAAGGGGATACGCCATATGAAGATGGTTGCAGCACC	
XS002-genP-R	GGAAACAGCTATGACATGATTACGA <u>ATT</u> TCTCAGAGAAATTCGTCCAGCAG	<i>EcoR</i> I
XS002-YZ-F	GGAACGATCGTTGGCTGTGTTC	
XS003-rpsLp-cf-F	AGGTCGACTCTAGTATGCAT <u>TTCTAG</u> AGGAACGATCGTTGGCTGCCC GCCGGGCGCTG	<i>Xba</i> I
XS003-rpsLp-cf-R	GGTGTGCAACCATCTTCATATGGCGTATCCCCTTTCAGATACC	
XS003-genP-F	TCTGAAAGGGGATACGCCATATGAAGATGGTTGCAGCACC	
XS003-genP-R	TTTCACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACGA <u>ATT</u> TCTCAGAGAAATTCGTCCAGCAG	<i>EcoR</i> I
XS003-YZ-F	GGAACGATCGTTGGCTGCCC GCCGGGCGCTG	
XS004-leftarm-F	ACCTGCAGGTCGACTCTAGACACGTCTGAAGCTAGCGCACGTATCCTGGAGAATCCGTC	<i>Nhe</i> I
XS004-leftarm-R	CCTCCAGCGCCCGCGGGCAGCCAACGATCGTTCCTCACGCCTTGTGGATCGCCACC	
XS004-rpsLp-cf-F	CCTGGTGGCGATCCACAAGGCGTGAGGAACGATCGTTGGCTGCCC GCCGGGCGCTGG	
XS004-genP-R	AGACCACCGCATCGTCGAGCGCCTCTGGGAGGACTGATCAGAGAAATTCGTCCAGCAG	
XS004-rightarm-F	GCTGACCTACATCCAAGTCTGGACGAATTTCTCTGATCAGTCTCCAGAGGCGCTCG	
XS004-rightarm-R	TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGA <u>ATT</u> CAGCGTGACGGTGTGAGTGCG	<i>EcoR</i> I
XS004-YZ-F	CCGTTACCCGTGCCCTGGCTGCGCGAGGTG	
XS004-YZ-R	CTCGACCCGGCGTCTGGATCGTGGCGAAG	
XS005-leftarm-F	CGGCCATCGTGCTCCCACTCCTGCAG <u>AT</u> CTGACATCGCGTGCGGCTGAACCCGTTTC	<i>Hind</i> III
XS005-leftarm-R	GTGCGGCCTTCCGCGAATTCGGGACCGGGCCGACTGGAG	
XS005-rightarm-F	CGGGCCCGGTCCCGGAATTCGCGGAAGGCCGCACCGCCGAAG	
XS005-rightarm-R	AGCGGAAAAGATCCGTCGACCTGCAGGCATGCA <u>AGCT</u> CTGGGCGTGCCGTACGTGCTC	<i>Bgl</i> II
XS005-YZ-F	TCCGCTCGATTCTGTTCCGTTCCGAC	
XS005-YZ-R	GCACGGGACCACCGGGCAGGTGCTC	
XS006-leftarm-F	CTGCAGGTCGACTCTAGACACGTCTGAAGCTAGCAGCGTTCAAGGGTGCCACG	<i>Nhe</i> I
XS006-leftarm-R	AAGCTGACCTACATCCAAGTCTGGACGAATTTCTCTGATCAGCGCTGGTAGGTGCTCG	
XS006-rightarm-F	AGCGCTGGCGGCTGCGCGCACCTACCAGCGCTGCTAAGAGAAATTCGTCCAGCAGTTGG	
XS006-rightarm-R	GGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGA <u>ATT</u> TCTGCGAGCGGTAAGAGTATGCGGAG	<i>EcoR</i> I
XS006-YZ-F	GGCAGCCGACTGGGCGACCATCCGGATCG	
XS006-YZ-R	CCGAGGACGATCTCGTCTGCTGCCACGGTG	
XS007-leftarm-F	CTGCAGGTCGACTCTAGACACGTCTGAAGCTAGCCGAATGCCCTCACTGGTCAGGATC	<i>Nhe</i> I
XS007-leftarm-R	CCCCCTACTACGAGAGCGCCTACGAGCTGGCCCGGATGATGGCGCAGCTCGACCCGGAG	
XS007-rightarm-F	GTTCTCCGGGCTCTCCGGGTCGAGCAGCGCCATCATCCGGGCCAGCTCGAGGCGCTC	
XS007-rightarm-R	ATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGA <u>ATT</u> CTCGTCCGTCGTCACCACGGTTTCG	<i>EcoR</i> I
XS007-YZ-F	CGTCACGCGATGGGAGCAGGGCGGAGTATC	
XS007-YZ-R	CCGAGCATCACGCTGCCGAAGGAGTTGGAG	

次，后用 100 μL 无抗 LB 重悬。

50 mL 平板液体培养基培养 *M. echinospora* J1-020 至生长中期，收集菌体，等体积 LB 洗涤菌体两次，5 mL 无抗 LB 重悬，作为受体菌。

将 100 μL 供体菌和 100 μL 受体菌混合，均匀涂布于含有 30 mmol/L Mg^{2+} 的 ABB13 平板，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 14~16 h，使用硫链丝菌素（12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）和甲氧苄啶（40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）覆盖平板，37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养，6~9 d 长出接合子。

1.4.2 位点整合型菌株的获得

以 pWHU77^[18] 质粒作为位点整合型质粒构建的载体，以 *M. echinospora* J1-020 基因组为模板、XS001-genP-F/R 为引物扩增得到 001-genP 片段，得到的片段与载体均使用 *Nde*I/*Eco*RI 双酶切，后连接得到 pXS001。

以 pN1 为模板^[20]、XS002-kasOp*-F/R 为引物扩增得到 *kasOp**片段，以 *M. echinospora* J1-020 基因组为模板、XS002-genP-F/R 为引物扩增得到 002-genP 片段，*kasOp**片段、002-genP 片段与经过 *Xba*I/*Eco*RI 酶切的载体使用多片段一步法快速克隆试剂盒（翊圣生物科技有限公司，中国）进行组装，得到 pXS002。

以 pN2 为模板^[20]、XS003-rpsLp-cf-F/R 为引物扩增得到 *rpsLp-cf* 片段，以 *M. echinospora* J1-020 基因组为模板、XS003-genP-F/R 为引物扩增得到 003-genP 片段，*rpsLp-cf* 片段、003-genP 片段与载体使用与 pXS002 相同的方法进行组装，得到 pXS003。

质粒测序正确后，按照 1.4.1 方法接合转移至 *M. echinospora* J1-020 中，接合子在含硫链丝菌素（25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的平板培养基上筛选并提取基因组进行 PCR 验证。

1.4.3 同源重组型菌株的获得

以复制型穿梭质粒 pYH7^[23] 为载体，以 pXS003 为模板、XS004-rpsLp-cf-F/XS004-genP-R 为引物扩增得到 *rpsLp-cf-genP* 片段，以 *M. echinospora* J1-020 基因组为模板，分别以 XS004-leftarm-F/R、XS004-rightarm-F/R 为引物扩增得到左右同源臂片段，扩增得到的 3 个片段与经过 *Nhe*I/*Eco*RI 酶切后的 pYH7 载体使用多片段一步法快速克隆试剂盒进行组装，得到 pXS004。

质粒测序正确后，按照 1.4.1 方法接合转移至 *M. echinospora* J1-020 中，接合子在含有硫链丝菌素（25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的平板培养基上培养，后在无抗平板液体培养基中传代松弛培养，稀释涂板后长出的单菌落在含硫链丝菌素（25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）和无抗的平板培养基平板上影印验证抗性，并提取基因组进行 PCR 验证。

1.5 *genQ* 敲除菌株的获得

以质粒 pYH7 为载体，以 *M. echinospora* J1-020 基因组为模板，分别以 XS005-leftarm-F/R、XS005-rightarm-F/R 为引物扩增得到左右同源臂片段，扩增得到的左右同源臂片段与经过 *Hind*III/*Bgl* II 酶切后的 pYH7 载体使用多片段一步法快速克隆试剂盒进行组装，得到 pXS005。质粒测序正确后，按照 1.4.1 方法进行接合转移和突变株筛选验证。

1.6 *genB4* 和 *genK* 敲除菌株的构建

以质粒 pYH7 为载体，以 *M. echinospora* J1-020 基因组为模板，分别以 XS006-leftarm-F/R、XS006-rightarm-F/R 为引物扩增得到左右同源臂片段，扩增得到的左右同源臂片段与经过 *Nhe* I / *Eco* R I 酶切后的 pYH7 载体使用多片段一步法快速克隆试剂盒进行组装，得到 pXS006。质粒测序正确后，按照 1.4.1 方法进行接合转移和突变株筛选验证。

以质粒 pYH7 为载体，以 *M. echinospora* J1-020 基因组为模板，分别以 XS007-leftarm-F/R、XS007-rightarm-F/R 为引物扩增得到左右同源臂片段，扩增得到的左右同源臂片段与经过 *Nhe*I/*Eco*RI 酶切后的 pYH7 载体使用多片段一步法快速克隆试剂盒进行组装，得到 pXS007。质粒测序正确后，按照 1.4.1 方法进行接合转移和突变株筛选验证。

1.7 发酵及产量检测

斜面培养基平板培养的 *M. echinospora* J1-020 及其突变株取 1 cm \times 2 cm 菌块于 50 mL 发酵培养基中，35 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养 70 h 后，加入 1 mL 强酸性阳离子树脂，后继续培养 135 h。发酵结束后，使用 3 mol/L 硫酸调节 pH 至 2.0，静置 40 min，用

水清洗得到树脂，加入 7 mL 氨水（浓度不大于 5%），轻柔颠倒 12 h，后重复洗脱一次，一定比例稀释后过膜并进行 HPLC-ELSD 检测。

(1) 检测方法 色谱柱为 Ultimate[®]LP-C₁₈ (Welch, 250 mm×4.6 mm, 5 μL)。流动相：A 相为 1.5% 三氟乙酸的水溶液，B 相为纯甲醇溶液，A 相：B 相=96：4，流速 0.6 mL/min，等度洗脱。进样量 20 μL；ELSD 检测器温度 100 °C，气体流速 2.5 L/min；检测时间为 65 min。

(2) 定量方法 庆大霉素 C 组分标准品、庆大霉素 C2b 标准品购自中国食品药品检定研究院，G418 标准品购自 biofexx，西索米星标准品购自 GLP BIO。使用外标法，通过绘制标准曲线对其定量。

2 结果

2.1 *M. echinospora* J1-020 全基因组测序分析

为获得工业菌株 *M. echinospora* J1-020 基因组信息、定位庆大霉素合成基因簇，使用 PromethION 测序平台进行了全基因组测序，并依据二代测序结果进行校正。825.95 Mb 的测序数据组装成一个 7 294 917 bp 大小的基因组，其包含 6260 个预测的完整编码区，平均 G+C 含量为 72.41%，未发现明显的质粒序列。使用 antiSMASH 3.0 预测到了一个与先前报道的 *M. echinospora* ATCC15835 庆大霉素合成基因簇 (GenBank 登录号：KY971520)^[21] 基因序列一致性达到 96.08% 的基因簇，位于

2 726 320 ~ 2 768 160 bp，包含 32 个开放阅读框，与 *M. echinospora* ATCC15835 庆大霉素合成基因簇有着相同的基因排布，而此基因簇与报道的庆大霉素 B 工业菌株 *M. echinospora* CCTCC M 2018898 的庆大霉素合成基因簇的基因序列一致性达到 99.99%^[20]。

2.2 *M. echinospora* J1-020 遗传操作系统的建立

用于工业化生产的工业菌株比实验室菌株的目标产物产量普遍高出数十倍甚至上百倍，但是其遗传操作相对困难，甚至无法进行，这使得许多工业菌株无法通过理性的代谢工程改造进行产量提升及杂质去除等工作。因此，工业菌株要想成为合适的工业底盘，首先需要能进行简单、快速的遗传操作。*M. echinospora* J1-020 遗传操作系统的建立是首要的工作。分别以位点整合型质粒 pWHU77 (pIB139 衍生物，安普霉素抗性基因被硫链丝菌素和氨苄青霉素抗性基因取代)、结构稳定但遗传不稳定的 pIJ101 衍生质粒 pYH7 作为载体，进行了遗传操作条件摸索，包括二亲本/三亲本接合转移方式、受体菌/供体菌混合比例、覆盖时间等条件 (表 3)，最终确定：pWHU77 为载体时，二亲本和三亲本接合转移方式均可获得较多接合子；pYH7 为载体时，二亲本接合转移仅部分条件下有零星接合子，而使用孢子的三亲本接合转移方式可获得大量接合子。因此，以 pYH7 为载体时，使用 *M. echinospora* J1-020 菌株孢子进行的三亲本接合转移方式更为适用。

表 3 *M. echinospora* J1-020 接合转移条件摸索

Tab. 3 Exploration of the conjugation conditions of *M. echinospora* J1-020

Type	Morphology of actinomycetes	Plasmid	The mixing ratio (Donor: Receptor)	Incubation time /h	Number of conjugants (Cultivate to 9d)
Diparental conjugation	mycelia	pWHU77	10:1,4:1,1:1	14,16	100~200
	mycelia	pYH7	20:1,10:1		1
Triparental conjugation	mycelia	pWHU77	4:4:1,1:1:1		100~200
	mycelia	pYH7	4:4:1,1:1:1		50~100
	spore	pYH7	10:10:1,1:1:1	13	>200

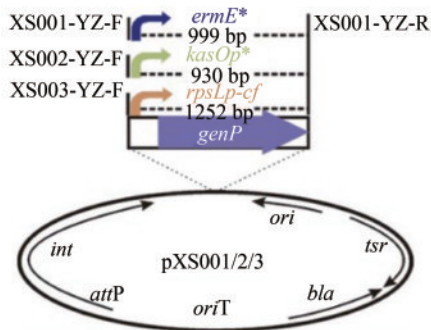
注 供体菌与受体菌混合比例说明：二亲本接合转移中，供体菌与受体菌混合比例为 X：1，即 X mL 供体菌液 (OD₆₀₀ 0.6~0.8) 的 100 μL 重悬液，与从 50 mL *M. echinospora* 培养菌液的 5 mL 重悬液中取出的 100 μL 重悬液混合；三亲本接合转移中，供体菌与受体菌混合比例为 X：X：1，即 X mL 供体菌液 (OD₆₀₀ 0.6~0.8) 的 100 μL 重悬液、X mL ET12567 (pUB307) 菌液 (OD₆₀₀ 0.6~0.8) 的 100 μL 重悬液，与从 50 mL *M. echinospora* 培养菌液的 5 mL 重悬液中取出的 100 μL 重悬液混合。

2.3 *M. echinospora* J1-020中 *genP*的过表达

经过近半个世纪的研究，庆大霉素的合成过程逐渐清晰，但是下游从J1-20A和J1-20B到庆大霉素C组分的合成过程，始终未被阐释，直到2013年，研究者通过蛋白质体外催化的方法，推测出 *genP* 负责庆大霉素C3'位磷酸转移，是脱去羟基的关键前提^[9]。由此推测，GenP的高效表达可促进庆大霉素C组分的合成。

2.3.1 通过位点整合方式实现 *genP* 的过表达

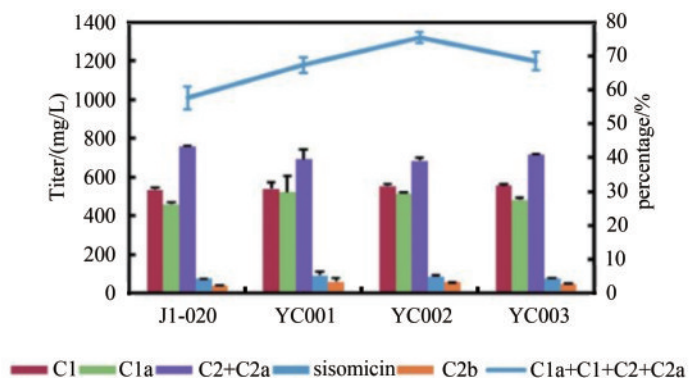
基因的过表达，往往需要考虑其表达强度与整个合成途径的代谢平衡，而表达强度的控制可以借助不同强度的启动子来实现^[25]。在以往的工作中，已经在 *M. echinospora* 中表征了一系列不同强度的组成型启动子^[20]，以此为依据，选择强 (*kasOp**)、中 (*rpsLp-cf*)、弱 (*ermE**) 三种强度的启动子来进行 *genP* 的过表达，构建对应 *attB/attP* 位点整合突变株 YC002、YC003、YC001 [图2(a)]，以确定合适的表达强度。对于硫酸庆大霉素产品，庆大霉素C1、C1a、C2、C2a为主要成分，西索米星、庆大霉素C2b为杂质。发酵及产量检测结果显示，YC002、YC003、YC001菌株庆大霉素C组分 (C1、C1a、C2、C2a) 产量较野生型菌株 *M. echinospora* J1-020 [(1008±57) mg/L] 分别提高了30.8% [(1319±29) mg/L]、18.8% [(1198±46) mg/L]、16.9% [(1178±39) mg/L]，可见启动子强度越强，GenP表达量越高，庆大霉素C组分 (C1、C1a、C2、C2a) 产量提升越明显 [图2(b)]。



(a) *genP*过表达示意图
(a) Schematic diagram of *genP* overexpression

2.3.2 通过同源重组方式实现 *genP* 的过表达

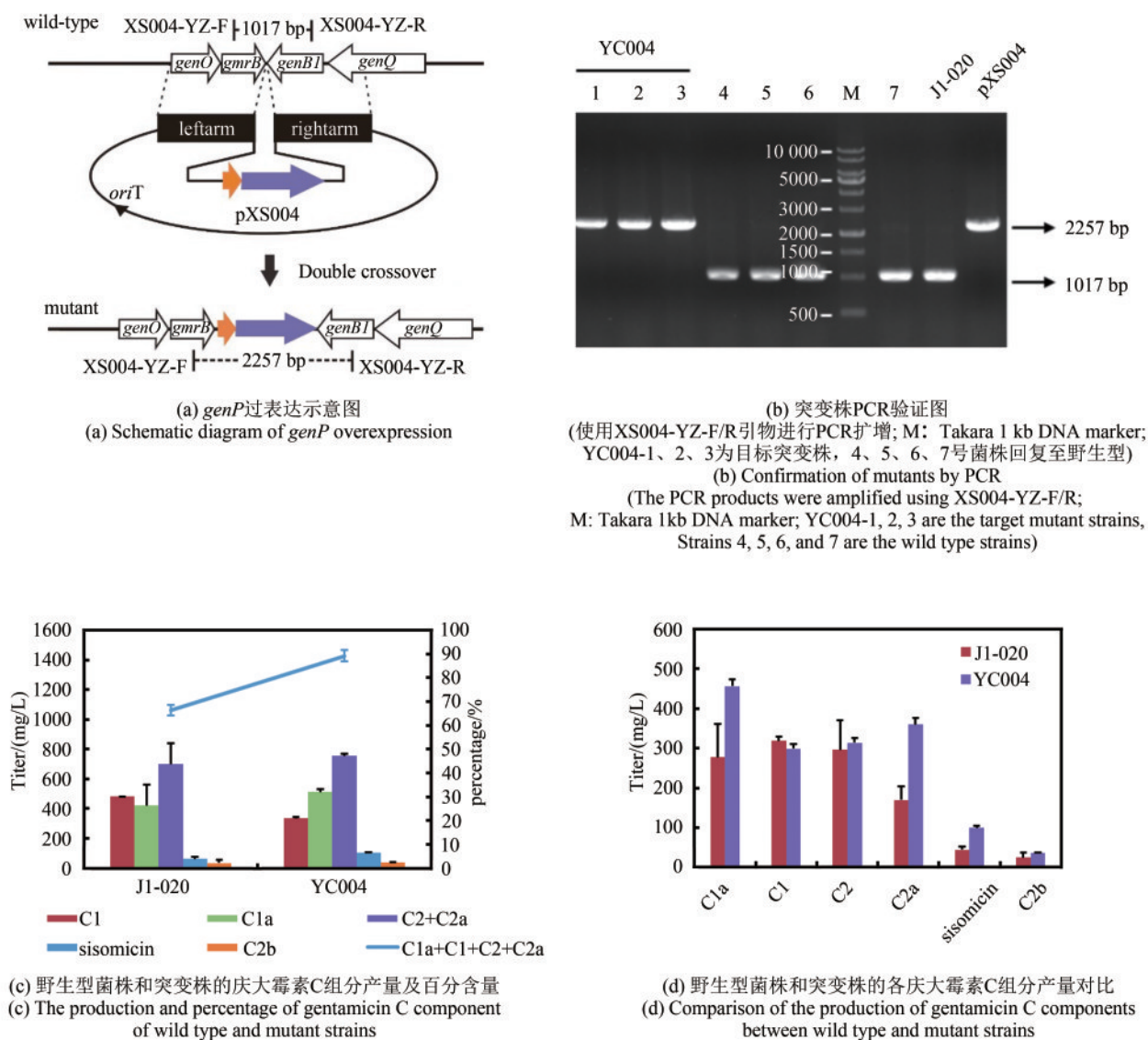
以 *attB/attP* 位点整合得到的突变株在无抗生素添加的情况下传代易回复至野生型从而导致产量的不稳定甚至下降，但添加抗生素以维持菌株稳定不利于大规模工业化生产。所以，需要将目的基因稳定重组至菌株染色体上。综合2.3.1中突变株的产量测定结果，*genP* 的过表达有利于庆大霉素的产量提升，同时，由于杂质庆大霉素C2b在液相分离中出峰时间位于庆大霉素C2与C2a之间，后期分离纯化中无法去除，所以需要在发酵中控制其百分含量在《中国药典》要求范围内 (百分含量≤3%)。菌株 *M. echinospora* J1-020、YC002、YC003、YC001庆大霉素C2b含量分别为2.15%、3.15%、2.8%、3.35%，可见中强度启动子 *rpsLp-cf* 控制 GenP 的表达更佳，其庆大霉素C2b杂质含量较低。以此，通过同源重组方式构建中强度启动子 *rpsLp-cf* 控制 *genP* 过表达的突变株 YC004 [图3(a)、(b)]，发酵及产量测定结果显示，YC004菌株庆大霉素C组分 (C1、C1a、C2、C2a) 产量 [(1427±37) mg/L] 较野生型菌株 *M. echinospora* J1-020 [(1061±37) mg/mL] 提高了34.5%，庆大霉素C2b含量2.3%符合要求 [图3(c)]。同时，对比各组分产量变化，庆大霉素C1a、C2a及西索米星产量提升明显，庆大霉素C1、C2、C2b未有明显变化 [图3(d)]，由此可以推测庆大霉素C1a、C2a下游途径相关酶GenL和GenB2表达量较低，未能进一步转化底物。



(b) 野生型菌株和突变株的庆大霉素C组分产量及百分含量
(b) The production and percentage of gentamicin C component of wild type and mutant strains

图2 *genP*过表达位点整合型菌株构建及产量测定

Fig. 2 Construction and production determination of *genP* overexpression site-integrated strains

图3 *genP*过表达同源重组菌株构建及产量测定Fig. 3 Construction and production determination of *genP* overexpression homologous recombination strains

2.4 以 *M. echinospora* J1-020 为底盘高效产生其他氨基糖苷类化合物

M. echinospora J1-020 菌株已用于工业生产庆大霉素数十年, 具有成熟的发酵生产工艺, 同时, 本研究确定了其全基因组信息, 建立了高效的遗传操作体系, 使得其有望作为优质的底盘菌株, 进行其他氨基糖苷类化合物的高效合成及生产。因此, 进行了该工业菌株合成单一中间体(氨基糖苷类抗生素)能力的验证。

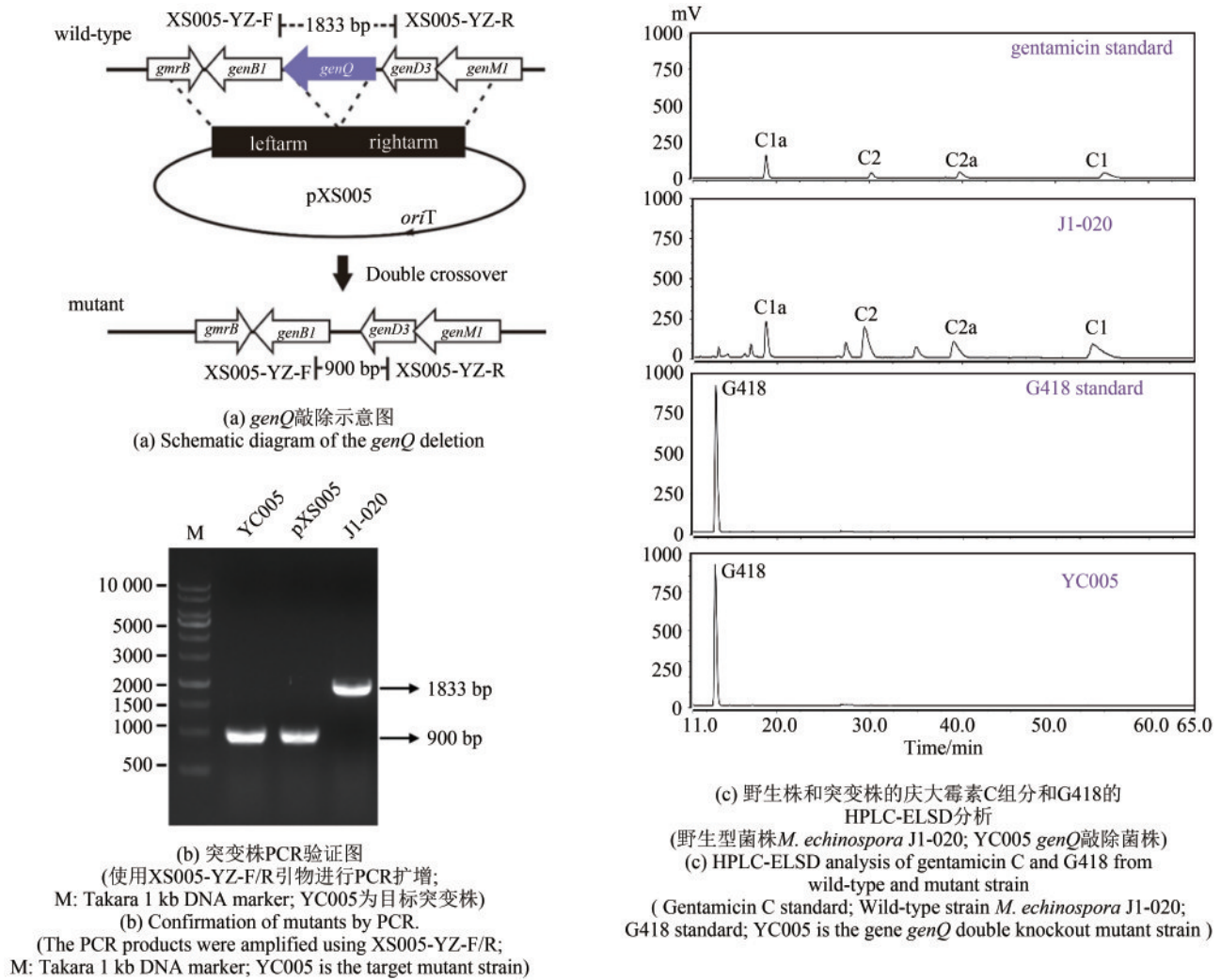
2.4.1 G418 单一组分合成菌株的获得

G418 作为一种氨基糖苷类抗生素, 是分子遗

传试验中最常用的抗性筛选试剂, 也是潜在的治疗真菌感染药物的前体^[26-27]。G418 是庆大霉素合成过程中的重要中间体, 可以通过 *genQ* 一步敲除来获得其单一组分^[28]。为测试 *M. echinospora* J1-020 作为工业底盘产生其他中间体的能力, 构建了 *genQ* 敲除突变株 YC005 [图4(a)、(b)], 此突变株确实不再产生其他庆大霉素 C 组分, G418 产量从 37 mg/L 提高至 460 mg/L [图4(c)]。

2.4.2 西索米星单一组分合成菌株的获得

西索米星主要应用于治疗革兰氏阴性菌所致的局部或系统感染。它是 2018 年 FDA 新批准的半合成抗生素普拉唑米星的前体^[29]。可以通过依次

图4 *genQ* 敲除菌株构建及HPLC-ELSD分析Fig. 4 Construction and HPLC-ELSD analysis of *genQ* knockout strain

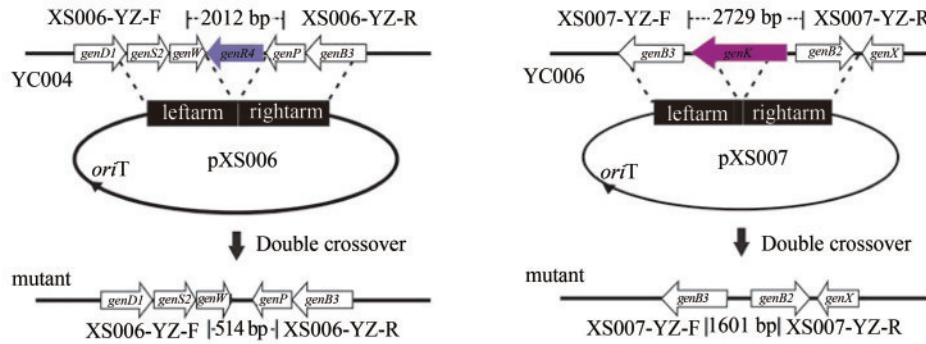
敲除 *genB4*、*genK* 来获得西索米星的大量积累 [图 5(a)、(b)]。既然 *M. echinospora* J1-020 作为工业底盘具有产生其他氨基糖苷类中间体的良好潜能，选择在西索米星积累量增加的 *genP* 过表达菌株 YC004 中敲除 *genB4* 和 *genK*，获得 *genB4* 敲除突变株 YC006 和 *genB4*、*genK* 双敲除突变株 YC007。其中单敲除 *genB4* 突变株 YC006 的西索米星产量为 145 mg/L [图 5(c)]，产量提升幅度不大；而 *genB4*、*genK* 双敲除的突变株 YC007，不产生庆大霉素 C 组分 [图 5(d)]，西索米星的产量比对照菌株 YC004 产量提升了约 21 倍，达到了 1046 mg/L [图 5(c)]，再一次证明了该底盘的潜力。

3 讨论

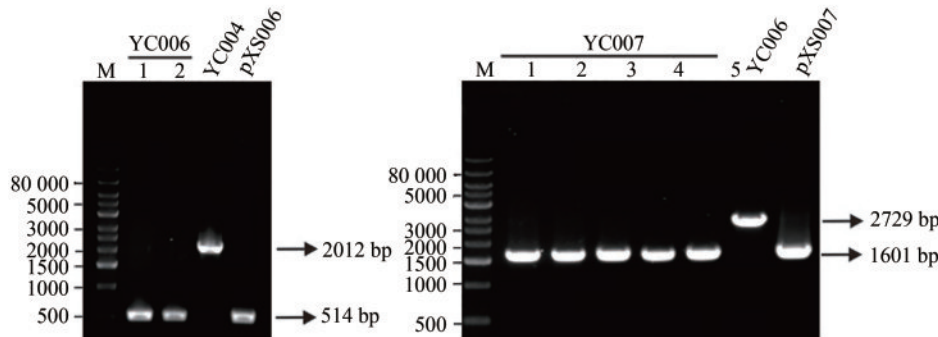
硫酸庆大霉素制剂已应用于临床治疗革兰氏阴性菌感染数十年，其工业生产菌株 *M. echinospora* J1-020 的庆大霉素 C 组分 (C1、C1a、C2、C2a) 产量约 1000mg/L，为了进一步提高该底盘菌株合成庆大霉素及其前体的能力，本文首先对此工业菌株进行了全基因组测序，定位了庆大霉素生物合成基因簇，并通过二亲本、三亲本接合转移条件摸索，建立了三亲本遗传操作体系，其中，质粒 pYH7 由于其结构稳定、遗传不稳定性，在接合子松弛传代培养的第一、二代就可以筛选到相应的突变株，说明使用 pYH7 为载体的三亲本遗传操作体系可以用于此工业菌株突变株

的快速获得。以此为基础，进行了J1-20A和J1-20B脱去羟基的关键基因 *genP* 的过表达，首先使用强 (*kasOp**)、中 (*rpsLp-cf*)、弱 (*ermE**) 三种强度的启动子进行 *attB/attP* 位点整合的过表达菌株的构建，测定综合产量和杂质含量后，确定了中强度启动子更适合于 *genP* 的过表达，进而构建了稳定重组在菌株染色体上的 *genP* 过表达突变株

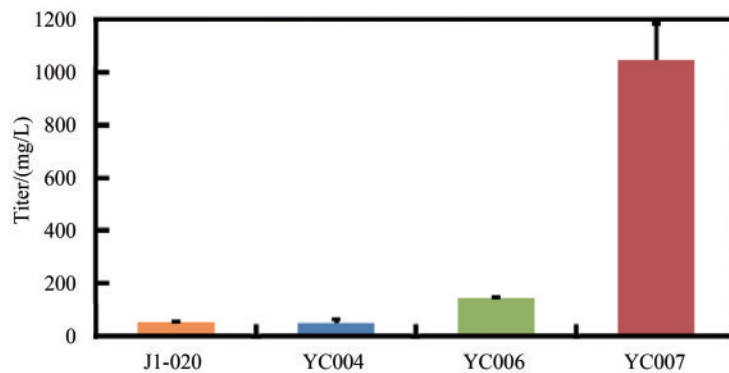
YC004。在摇瓶发酵水平上，突变株 YC004 的庆大霉素 C 组分 (C1、C1a、C2、C2a) 产量较野生型菌株 *M. echinospora* J1-020 提高了 34.5%。同时，本文进行了 *genQ* 敲除突变株 YC005 的构建，以获得 G418 单一组分，G418 产量由 37 mg/L 提高至 460 mg/L。最后，以 *genP* 过表达菌株 YC004 为出发菌株，依次敲除 *genB4*、*genK*，构建了双敲除突



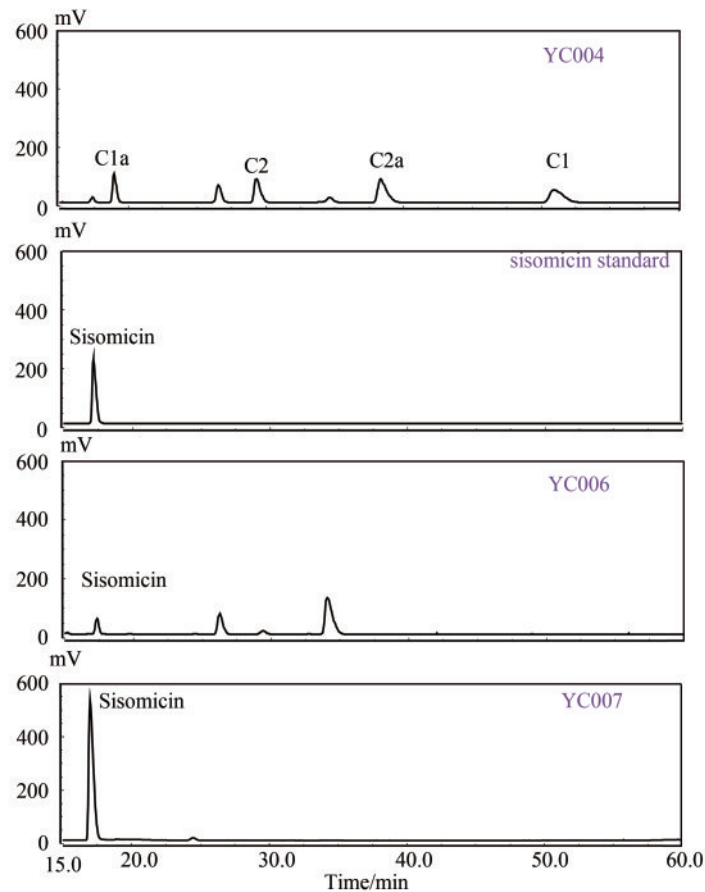
(a) *genB4*和*genK*敲除示意图
(a) Schematic diagram of the *genB4* and *genK* deletion



(b) 突变株PCR验证图
(分别使用XS006-YZ-F/R及XS007-YZ-F/R引物进行PCR扩增)
M—Takara 1 kb DNA marker; YC006—*genB4*突变株; YC007—*genB4*以及*genK*双敲除突变株
(b) Confirmation of mutants by PCR
(The PCR products were amplified using XS006-YZ-F/R and XS007-YZ-F/R, respectively.)
M—Takara 1 kb DNA marker; YC006—the *genB4* knockout strain;
YC007—the *genB4* and *genK* double knockout strain



(c) 野生型菌株和突变株的西索米星产量示意图
(c) The production of sisomicin of wild type and mutant strains



(d) 野生株和突变株的西索米星的HPLC-ELSD分析
(*genP*过表达突变株YC004; 西索米星标准品浓度为 250 mg/L;
*genB4*敲除突变株YC006; *genB4*和*genK*双敲除突变株YC007)
(d) HPLC-ELSD analysis of sisomicin from wild-type and mutant strains
(YC004 is the *genP* overexpression strain; The concentration of sisomicin
standard is 250 mg/L; YC006 is the *genB4* knockout strain; YC007 is the
genB4 and *genK* double knockout mutant strain.)

图5 *genB4*和*genK*敲除菌株构建及HPLC-ELSD分析

Fig. 5 Construction and HPLC-ELSD analysis of *genB4* and *genK* knockout strain

变株 YC007 从而获得单一组分西索米星以及其少量甲基化产物, 经过摇瓶发酵, 结果显示, YC007 西索米星的产量比对照菌株 YC004 产量提升了约 21 倍, 达到了 1046 mg/L。后续, 以庆大霉素 C 高产菌株 YC004 为基础, 可通过下游相关酶 GenB1、GenB2、GenB4 的高效表达 (图 1), 实现庆大霉素 C 组分产量的进一步提升; 以 YC005 菌株为基础, 结合传统的随机突变^[25]和理性的代谢工程改造 (如前体供应相关基因的过表达), 有望实现 G418 的产量提升, 应用于工业化生产。

基于已建立的高效遗传操作方法, 本研究分别使用过表达 *genP*、敲除 *genQ*、双敲除 *genB4* 和 *genK* 的策略直接且快速地获得了高产庆大霉素 C、

G418 以及西索米星单一组分的工业棘孢小单孢菌突变株。在未来, 以 *M. echinospora* J1-020 工业生产菌株为底盘, 通过简单的代谢工程策略便有望高效合成具有高市场价值的其他氨基糖苷类抗生素, 借助其明确的全基因组信息、高效的遗传操作系统和中间体、产物合成能力, 可以开展许多工作, 如可通过敲除 *genK* 和 *genP*, 过表达内源的 2'-NH₂ 向 2'-OH 转化基因 *genR* 和 *genS*^[30], 实现二代氨基糖苷类抗生素异帕米星的前体庆大霉素 B 的高效合成; 同时, 基于庆大霉素和卡那霉素的结构相似性, 对庆大霉素和卡那霉素进行基因和生化分析的报道显示, 在它们的合成基因簇中有许多酶的蛋白同源性很高, 而且卡那霉素工业菌株

具有更高的生产能力, 其相关酶的催化活性可能更高^[31], 因此, 可通过引入外源的卡那霉素合成相关同源酶以增加前体和底物转化(如过表达2'-NH₂向2'-OH转化相关酶KanJ和KanK^[30]、过表达糖基转移酶KanM1^[31]和过表达J1-20A向下游转化的脱氢酶KanQ和氨基转移酶KanB等), 进一步提高庆大霉素B的产量; 还可以通过基因*genK*、*genL*的敲除, 得到单一C组分——庆大霉素C1a, 提高其含量, 增加庆大霉素C组分的杀菌效力, 减少毒副作用等^[32]。

参 考 文 献

- [1] LLEWELLYN N M, SPENCER J B. Biosynthesis of 2-deoxystreptamine-containing aminoglycoside antibiotics[J]. Natural Product Reports, 2006, 23(6): 864-874.
- [2] Waksman SA. Antibiotics and chemotherapy[J]. California medicine, 1953, 78(5):417-423.
- [3] SWART E A, HUTCHISON D, WAKSMAN S A. Neomycin, recovery and purification[J]. Archives of Biochemistry, 1949, 24(1): 92-103.
- [4] UMEZAWA H, UEDA M, MAEDA K, et al. Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin[J]. The Journal of Antibiotics, 1957, 10(5): 181-188.
- [5] WEINSTEIN M J, LUEDEMANN G M, ODEN E M, et al. Gentamicin, a new antibiotic complex from micromonospora[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 1963, 6: 463-464.
- [6] FOURMY D, RECHT M I, BLANCHARD S C, et al. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic[J]. Science, 1996, 274(5291): 1367-1371.
- [7] TESTA R T, TILLEY B C. Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis: II. Gentamicin[J]. The Journal of Antibiotics, 1976, 29(2): 140-146.
- [8] KHAREL M K, BASNET D B, LEE H C, et al. Molecular cloning and characterization of a 2-deoxystreptamine biosynthetic gene cluster in gentamicin-producing *Micromonospora echinospora* ATCC 15835[J]. Molecules and Cells, 2004, 18(1): 71-78.
- [9] PARK J W, HONG J S J, PARAJULI N, et al. Genetic dissection of the biosynthetic route to gentamicin A2 by heterologous expression of its minimal gene set[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(24): 8399-8404.
- [10] KIM J Y, SUH J W, KANG S H, et al. Gene inactivation study of *gntE* reveals its role in the first step of pseudotrisaccharide modifications in gentamicin biosynthesis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 372(4): 730-734.
- [11] HONG W R, YAN L B. Identification of *gntK*, a gene required for the methylation of purpurosamine C-6' in gentamicin biosynthesis[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2012, 58(5): 349-356.
- [12] KIM H J, MCCARTY R M, OGASAWARA Y, et al. GenK-catalyzed C-6' methylation in the biosynthesis of gentamicin: isolation and characterization of a cobalamin-dependent radical SAM enzyme[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(22): 8093-8096.
- [13] HUANG C, HUANG F L, MOISON E, et al. Delineating the biosynthesis of gentamicin X2, the common precursor of the gentamicin C antibiotic complex[J]. Chemistry & Biology, 2015, 22(2): 251-261.
- [14] GUO J H, HUANG F L, HUANG C, et al. Specificity and promiscuity at the branch point in gentamicin biosynthesis[J]. Chemistry & Biology, 2014, 21(5): 608-618.
- [15] SHAO L, CHEN J S, WANG C X, et al. Characterization of a key aminoglycoside phosphotransferase in gentamicin biosynthesis[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013, 23(5): 1438-1441.
- [16] ZHOU S T, CHEN X T, NI X P, et al. Pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme GenB3 catalyzes C-3', 4'-dideoxygenation in gentamicin biosynthesis[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 65.
- [17] CHEN X T, ZHANG H, ZHOU S T, et al. The bifunctional enzyme, GenB4, catalyzes the last step of gentamicin 3', 4'-dideoxygenation via reduction and transamination activities[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 62.
- [18] LI S, GUO J, REVA A, et al. Methyltransferases of gentamicin biosynthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(6): 1340-1345.
- [19] BAN Y H, SONG M C, HWANG J Y, et al. Complete reconstitution of the diverse pathways of gentamicin B biosynthesis[J]. Nature Chemical Biology, 2019, 15(3): 295-303.
- [20] CHANG Y Y, CHAI B Z, DING Y K, et al. Overproduction of gentamicin B in industrial strain *Micromonospora echinospora* CCTCC M 2018898 by cloning of the missing genes *genR* and *genS*[J]. Metabolic Engineering Communications, 2019, 9: e00096.
- [21] MACNEIL D J, OCCI J L, GEWAIN K M, et al. Complex organization of the *Streptomyces avermitilis* genes encoding the avermectin polyketide synthase[J]. Gene, 1992, 115(1/2): 119-125.
- [22] FLETT F, MERSINIAS V, SMITH C P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 155(2): 223-229.

- [23] SUN Y H, HONG H, SAMBORSKY M, et al. Organization of the biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM 4137 for the novel neuroprotectant polyketide meridamycin[J]. *Microbiology*, 2006, 152(Pt 12): 3507-3515.
- [24] WEBER T, BLIN K, DUDELA S, et al. antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W237-W243.
- [25] BILYK O, LUZHETSKYY A. Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 98-107.
- [26] SASAKI K, MIZUSAWA H, ISHIDATE M, et al. Regulation of G418 selection efficiency by cell-cell interaction in transfection [J]. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 1992, 18(6): 517-527.
- [27] BAI AZITOV R Y, FRIESEN W, JOHNSON B, et al. Chemical modifications of G418 (geneticin): synthesis of novel readthrough aminoglycosides results in an improved *in vitro* safety window but no improvements *in vivo*[J]. *Carbohydrate Research*, 2020, 495: 108058.
- [28] NI X P, SUN Z P, ZHANG H Y, et al. Genetic engineering combined with random mutagenesis to enhance G418 production in *Micromonospora echinospora*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(9): 1383-1390.
- [29] SHAEER K M, ZMARLICKA M T, CHAHINE E B, et al. Plazomicin: a next-generation aminoglycoside[J]. *Pharmacotherapy*, 2019, 39(1): 77-93.
- [30] NI X P, SUN Z P, GU Y W, et al. Assembly of a novel biosynthetic pathway for gentamicin B production in *Micromonospora echinospora*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 1.
- [31] WU Z, GAO W L, ZHOU S T, et al. Improving gentamicin B and gentamicin C1a production by engineering the glycosyltransferases that transfer primary metabolites into secondary

metabolites biosynthesis[J]. *Microbiological Research*, 2017, 203: 40-46.

- [32] LI D, LI H, NI X P, et al. Construction of a gentamicin C1a-overproducing strain of *Micromonospora purpurea* by inactivation of the *gacD* gene[J]. *Microbiological research*, 2013, 168 (5): 263-267.



通讯作者: 刘天罡(1979—),男,教授,博士生导师。研究方向为天然产物高效合成与创新发现。

E-mail: liutg@whu.edu.cn



第一作者: 吴亮亮(1996—),男,硕士研究生。研究方向为定向合成代谢指导工业菌株中庆大霉素的产量提升。

E-mail: wuliangliang@whu.edu.cn



第一作者: 常莹莹(1994—),女,工程师。研究方向为定向合成代谢指导工业菌株中庆大霉素的产量提升。

E-mail: yingyingchang@whu.edu.cn

广告索引:北京华元山水生物科技有限公司(后彩一)/九天基因科技(天津)有限公司(后彩二)/诚志生命科技有限公司(封三)