

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-024

利用异源表达挖掘纤维堆囊菌 So0157-2 的新型天然产物

周海波, 申琪瑶, 陈汉娜, 王宗杰, 李越中, 张友明, 卞小莹
(山东大学, 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 黏细菌是天然产物的重要来源。纤维堆囊菌 So0157-2 是抗癌药物埃博霉素的产生菌, 并且是已知基因组最大的原核生物。生物信息学分析发现该菌一共含有 35 个次级代谢产物生物合成基因簇, 除了已知的埃博霉素基因簇和其他两个萜类化合物生物合成基因簇与已知基因簇的相似度为 100% 之外, 其他基因簇与已知化合物基因簇相似度均较低, 其中包括 17 个聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS)、非核糖体肽合成酶 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS) 及其杂合的基因簇。由于纤维堆囊菌 So0157-2 生长缓慢、培养困难且难以在本源菌中进行遗传改造。因此, 将其生物合成基因簇转移到简单宿主中, 利用异源表达策略是挖掘该菌中新型天然产物的一个有效途径。本文利用直接克隆技术从纤维堆囊菌 So0157-2 基因组 DNA 中克隆了 1 个包含 NRPS 和 PKS 结构域的基因簇 BGC18, 将其转移至伯克氏菌 DSM 7029 中进行异源表达。通过液质联用分析, 色谱柱靶向分离纯化, 进而通过 NMR 结构鉴定和 Marfey 反应确定了 3 个化合物分别为 Cyclo (N-Me-L-Leu-L-Val)(1)、Cyclo (N-Me-L-Leu-L-Leu)(2)、Cyclo (N-Me-L-Leu-L-Ile)(3)。化合物结构的多样性来源于第 1 个腺苷化结构域对底物识别的宽泛性 (Val/Leu/Ile)。生物合成途径分析推测由于缺少硫醇化结构域导致 PKS 模块被跳过, 从而只获得了 NRPS 指导合成的环二肽产物 1~3, 这可能是细菌中一种实现化合物多样性的方式。本论文以基因簇直接克隆与异源表达相结合的策略, 成功实现了一个来源于纤维堆囊菌 So0157-2 中的 NRPS-PKS 杂合基因簇的异源表达, 分离并鉴定了 3 个该基因簇对应的表达产物。本研究为后续从该菌株中挖掘更多活性天然产物奠定了技术基础, 也为其他难培养菌株的次级代谢产物的挖掘提供了思路。

关键词: 异源表达; 纤维堆囊菌; 基因组挖掘; 非核糖体肽; 二酮哌嗪

中图分类号: Q936 **文献标志码:** A

Genome mining for novel natural products in *Sorangium cellulosum* So0157-2 by heterologous expression

ZHOU Haibo, SHEN Qiyao, CHEN Hanna, WANG Zongjie, LI Yuezhong, ZHANG Youming, BIAN Xiaoying
(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China)

Abstract: Myxobacteria are an important source for natural products. *Sorangium cellulosum* So0157-2 produces

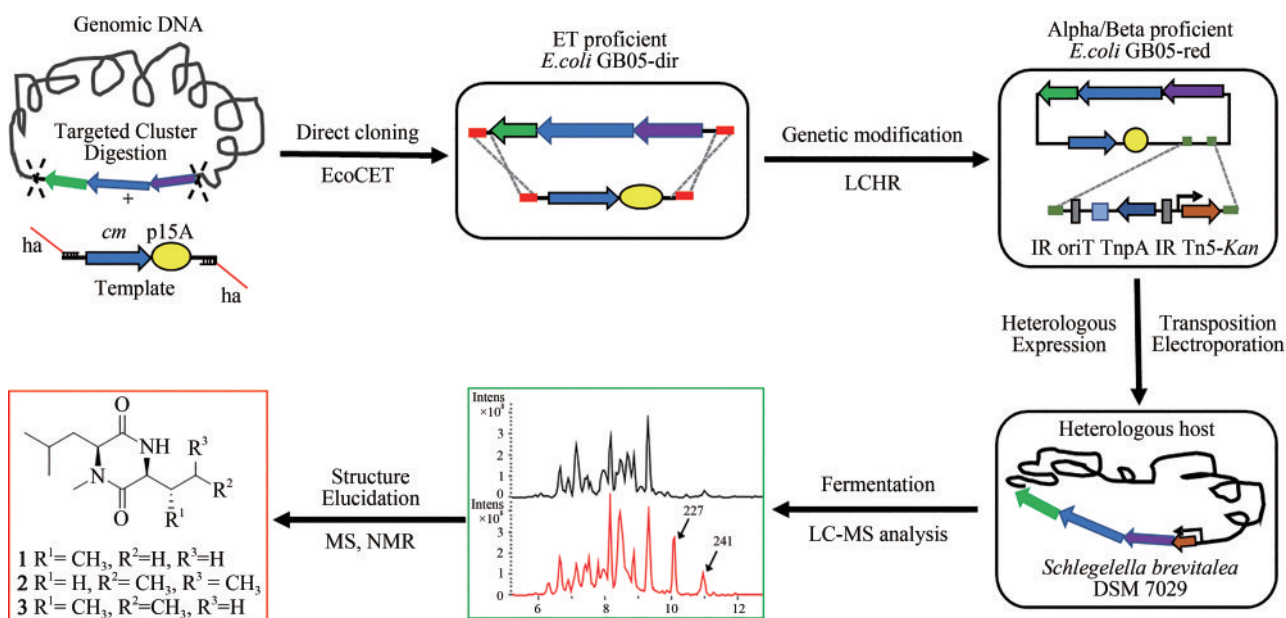
收稿日期: 2021-02-20 修回日期: 2021-04-06

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0905700); 国家自然科学基金 (32070060, 31670098); 山东省自然科学基金 (ZR2020QH345, ZR2019JQ11)

引用本文: 周海波, 申琪瑶, 陈汉娜, 王宗杰, 李越中, 张友明, 卞小莹. 利用异源表达挖掘纤维堆囊菌 So0157-2 的新型天然产物[J]. 合成生物学, 2021, 2(5): 837-849

Citation: ZHOU Haibo, SHEN Qiyao, CHEN Hanna, WANG Zongjie, LI Yuezhong, ZHANG Youming, BIAN Xiaoying. Genome mining for novel natural products in *Sorangium cellulosum* So0157-2 by heterologous expression[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(5): 837-849

anticancer epothilone, and its genome of 14.78 Mb is the largest prokaryotic genome sequenced to date. Bioinformatic analysis indicated that the genome harbors 35 biosynthetic gene clusters (BGCs). In addition to the known epothilone BGC and another two terpene BGCs with 100% similarity to their predicted BGCs, there are 17 BGCs for polyketide synthases (PKSs), nonribosomal peptide synthetases (NRPSs), and PKS-NRPS hybrids, which mean this strain has great potential to produce novel natural products. However, limits on slow growth, difficult culture, and the absence of efficient genetic manipulation tools for So0157-2 impede the deep mining of its metabolic potential. Therefore, transferring its BGCs to a simple heterologous host and using heterologous expression strategy to achieve genome mining would be an effective way for discovering novel natural products produced by this strain. In this work, a PKS-NRPS hybrid BGC (BGC18) was directly cloned into an *Escherichia coli* expression vector and transferred into the heterologous host *Schlegellella brevitalea* DSM 7029. Fractionation was conducted by using repeated column chromatography (HPLC-MS) over a RP-C₁₈ column packing with silica gel, and three pure products were obtained, which were identified by extensive NMR analysis and the Marfey's method as new compounds: (1) cyclo(*N*-Me-L-Leu-L-Val), (2) cyclo(*N*-Me-L-Leu-L-Leu), and (3) cyclo(*N*-Me-L-Leu-L-Ile). Analysis of BGC18 reveals that the lack of thiolation domain in the PKS module might lead to the skipping of this PKS module, and only three cyclodipeptides were synthesized by the two NRPS modules, which might be a strategy for structural diversity in the bacterial NRPS-PKS BGCs. A NRPS-PKS hybrid BGC in *S. cellulosum* So0157-2 was successfully cloned, and expressed by using direct cloning and heterologous expression strategy with three corresponding products isolated and identified. This study lays a solid foundation for subsequent discovery of more active natural products in *S. cellulosum* So0157-2, and also provides theoretical guidance for mining secondary metabolites from other microbes which are difficult for culture.



Keywords: heterologous expression; *Sorangium cellulosum*; genome mining; non-ribosomal peptide; diketopiperazines

黏细菌属于革兰氏阴性细菌，是新颖活性天然产物的重要来源，具有巨大的药用开发潜力。目前已从黏细菌中发现了大约 100 多种次级代谢产物的基本结构和 600 多种结构类似物。这些化合物

不仅结构类型丰富，包括聚酮类、非核糖体肽、萜类以及其他杂合的结构类型，同时也显示了广泛的生物活性，如抗菌、抗肿瘤、抗病毒、免疫抑制、抗疟等^[1-6]。

随着基因组测序技术的发展,越来越多的基因组信息分析表明黏细菌基因组所蕴藏的生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster, BGC)合成新颖次级代谢产物的潜力远远超出了目前已分离获得的化合物的数目。例如,抗肿瘤药物埃博霉素(epothilone)的产生菌纤维堆囊菌 So0157-2 (*Sorangium cellulosum* So0157-2)的基因组测序结果表明,该菌株拥有14.78 Mb的环状染色体,是目前已知基因组最大的原核生物^[7-9]。除了已知的埃博霉素系列衍生物^[10-15]之外仍未见其他化合物从该菌株中分离报道,这预示着该菌株仍具有较大的代谢潜能。对隐性基因簇进行有效的激活和改造,能够为药物先导结构的发现提供更多的化合物资源。由于纤维堆囊菌 So0157-2 生长相对较慢、培养困难,本源菌也缺乏合适的遗传操作体系,对其天然产物的开发存在着诸多挑战。

近年来天然产物生物合成基因簇的异源表达策略受到了越来越广泛的关注。异源表达是将完整的基因簇克隆到穿梭载体上然后转移到合适的异源宿主中进行表达,是挖掘难培养或未培养微生物次级代谢产物的有效手段。相比于原始宿主,异源宿主在遗传操作和生长速度上有较大优势。一方面,异源表达可以用于提高次级代谢产物的产量。另一方面,异源表达可以用于鉴定已知天然产物的生物合成途径。此外,异源表达还可以用于鉴定隐性基因簇,发现新型天然产物,特别有利于难培养或未培养微生物次级代谢产物的挖掘^[16-19]。

异源表达的难点之一在于大部分天然产物生物合成基因簇都相当大(>10 kb),PCR扩增很难得到如此长的DNA序列。通过构建和筛选基因文库虽然能够获得目的基因簇,但是工作量非常大,且不一定能获得完整的基因簇。随着基因编辑技术的发展和进步,可以利用直接克隆技术(direct cloning)从基因组中克隆大型基因簇,比如LLHR(linear-linear homologous recombination)、TAR(transformation-associated recombination)、CATCH(Cas9 assisted targeting of chromosome segments)等^[20]。其中LLHR是由本团队于2012年开发的基于Red/ET重组工程技术(recombineering)的直接克隆技术^[21],并与异源表达相结合,广泛应用于天然

产物基因簇的挖掘。2018年将Red/ET重组工程技术与核酸外切酶体外处理技术相结合,开发了ExoCET(exonuclease combined with RecET recombination)克隆技术,进一步提高了BGCs直接克隆的效率^[22]。此外,Red/ET重组工程技术还可以用于基因簇的无痕定点突变,结构域替换等等,极大促进了大型基因簇的遗传操作^[22-28]。

异源表达的另一个难点在于异源宿主的选择。大肠杆菌和酿酒酵母都是表征良好、易于遗传操作的模式菌株,为细菌和真菌中天然产物的表达提供了良好的异源宿主^[29-31]。研究者也发现,当宿主菌与包含目标基因簇的菌株在进化上相近时,异源表达就更易成功。所以,很多链霉菌被开发为异源宿主菌,用于放线菌中基因簇的异源表达^[32-33]。可用于黏细菌异源表达的异源宿主菌相对缺乏,目前常用的有黄色黏球菌(*Myxococcus xanthus*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)以及*Schlegelella brevitalea* DSM 7029(曾用名:*Burkholderiales* Strain DSM 7029, [*Polyangium*] *brachysporum* DSM 7029)等^[16-18]。除了黄色黏球菌和*S. brevitalea* DSM 7029之外,其他异源宿主产量普遍较低。黄色黏球菌也属于黏细菌属,自身生长周期慢、难于进行遗传操作等劣势也限制了其应用。*S. brevitalea* DSM 7029是一株能够产生多种非核糖体肽、聚酮-非核糖体肽杂合化合物的革兰氏阴性细菌,相较于黄色黏球菌具有生长快、易操作、代谢背景清晰等诸多优点,特别是在表达纤维堆囊菌来源埃博霉素中显示了作为通用底盘菌的潜力^[34-37]。因此,该菌株可作为本研究的异源宿主候选菌。

基于纤维堆囊菌 So0157-2 基因组信息预测分析所显示出的代谢潜能,本论文利用ExoCET直接克隆技术从该菌基因组DNA中克隆了1个未知功能的NRPS-PKS杂合的基因簇BGC18。通过启动子插入,并以*S. brevitalea* DSM 7029为异源宿主进行异源表达,经过液质联用(HPLC-MS)分析,正相与反相色谱柱靶向分离纯化,获得了3个该基因簇对应的表达产物。最后,通过核磁共振(NMR)结构鉴定和Marfey反应确定了3个化合物分别为新天然产物Cyclo(*N*-Me-L-Leu-L-Val)(**1**)和Cyclo(*N*-Me-L-Leu-L-Leu)(**2**),新化合物Cyclo(*N*-Me-L-Leu-L-Ile)(**3**)。将化合物结构与生

物合成基因簇对比分析发现化合物结构的多样性来源于第1个腺苷化结构域 (A domain) 对底物识别的宽泛性。此外, 推测由于缺少硫醇化结构域 (T domain) 导致 PKS 模块被跳过, 从而只获得了两个 NRPS 模块指导合成的环二肽产物。该研究成功构建了基于 Red/ET 重组工程技术的纤维堆囊菌 So0157-2 基因簇的直接克隆、遗传修饰和异源表达体系, 不仅丰富了纤维堆囊菌 So0157-2 的代谢产物库, 也为挖掘该菌株中其他新颖的天然产物用于药物筛选评价奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究所用的菌株和质粒见表1。寡核苷酸引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 本研究所用的寡核苷酸序列见表2。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 酵母粉 0.5%, 蛋白胨 1%, NaCl

表1 本研究所用的菌株和质粒

Tab. 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Description	Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> GB05-dir	GB2005, araC-P _{BAD} -ETgA; <i>recE</i> , <i>recT</i> , <i>redy</i> , and <i>recA</i> regulated by arabinose-induced promoter are inserted at <i>ybcC</i> locus	[21]
<i>E. coli</i> GB05-red	GB2005, araC-P _{BAD} -αβγA; <i>reda</i> , <i>redβ</i> , <i>redy</i> , and <i>recA</i> regulated by arabinose-induced promoter are integrated at <i>ybcC</i> locus	[38]
<i>S. cellulosum</i> So0157-2	wild type harboring BGC18	[7-8]
<i>S. brevitalea</i> DSM 7029	Burkholderiales strain DSM 7029, [<i>Polyangium</i>] <i>brachysporum</i> DSM 7029 (K481-B101; ATCC 53080)	[35-36,39]
DSM7029:P _{km} -BGC18	P _{km} -BGC18 was inserted into genome of <i>Schlegelella brevitalea</i> DSM 7029, km ^R	This work
Plasmids		
p15A-cm-tetR-tetO-hyg-ccdB	direct cloning vector, p15A replicon, containing a tetracycline inducible promoter P _{tetO} , cm ^R /hyg ^R	[24]
pR6K-oriT-TnpA-IR-km	R6K replicon, containing MycoMar transposase gene (<i>mpA</i>) and conjugation element <i>oriT</i> , km ^R	[24]
p15A-cm-BGC18	BGC18 was cloned into cloning vector, cm ^R	This work
p15A-oriT-IR-P _{km} -BGC18	Expression vector of BGC18 with P _{km} was inserted into upstream of the first core gene of BGC18, containing transposon elements <i>oriT-tnpA-IR</i> , km ^R	This work

表2 本研究所用的引物

Tab. 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')
BGC18-HAF	cagatggccgctcggggtgtcagcggtcaacacgcgagctcgtcgtctgtggcggcgtctcatggtcAACGCTCTCTACTAGAGTCA
BGC18-HAR	gacgtgaccgggtatcgttaggtccaccaccaggagtcggccaggatccggagagtgagagttcaacgcGGGTCTTAAGACGTCGATATCT
IR-Pkm-C18-HAF1	gcctgcgatcgtaccattacgtatcttgcgcgagcggaacggtatgcagGCTGATCTTCAGATCCTCTAC
IR-Pkm-C18-HAR1	tegagccgcaaggcgattctgtcctcagagagagcggcatagtagtaccacacctctTCAGAAGAAGTCTCAAGAAG
detect-C18 in 7029-F1	GATGGGTTATCAGGACTACGC
detect-C18 in 7029-R1	CGAGGAGCCTGTAGAACGCGT
detect-C18 in 7029-F2	TCGACGATCAGGTGAAGATCCA
detect-C18 in 7029-R2	AGCTCTCCATAGGTGAGCGAA
detect-C18 in 7029-F3	TGAAGATCCGCGGTATCGCA
detect-C18 in 7029-R3	CGGGAAGTGAACAGGTCCAT
detect-C18 in 7029-F4	TTCTTCGTCAACGCCGCGCC
detect-C18 in 7029-R4	GCGATAGGCGTGACCGTGC
detect-C18 in 7029-F5	TCACGCTGCCGAAGCACTC
detect-C18 in 7029-R5	GCTCTGCGAAGGACGTCCTC

注: 小写部分为同源臂序列

0.1%, pH 7.0。

CYMG 培养基: 胰蛋白胨 0.8%, 酵母粉 0.4%, $MgCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.4%, 甘油 5 mL/L。

M26 培养基: 土豆淀粉 0.8%, 葡萄糖 0.2%, 蛋白胨 0.2%, 酵母提取物 0.2%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1%, 微量元素液 1 mL/L; pH 7.0。

VY/2 培养基: 鲜酵母 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4%, 维生素 B_{12} 0.005%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1%。

以上固体培养基均添加 1.5% 的琼脂。

1.1.3 主要试剂和仪器

限制性 DNA 内切酶、T4 DNA 聚合酶购自 New England BioLabs 公司; PrimeSTAR Max DNA 聚合酶、DNA Marker 购自 Takara 公司; 卡那霉素 (kanamycin, km)、氯霉素 (chloramphenicol, cm) 购自上海生工生物工程有限公司; 培养基组分购自北京索莱宝生物科技有限公司; 分析纯甲醇、无水乙醇、异丙醇购自国药集团化学试剂有限公司; 色谱级甲醇、乙腈购自 Thermo Fisher 科技有限公司。

液质联用仪型号为 Thermo Fisher UltiMate3000 与 Bruker Amazon SL 联用; 高效液相色谱仪型号为 Agilent 1260; 电转仪型号为 Eppendorf AG 4309; 核磁共振波谱仪型号为 Agilent 500 MHz DD2; HPLC 制备所用色谱柱型号为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈, 9.4 mm×250 mm, 5 μm; 液质分析所用色谱柱为 Thermo Scientific Acclaim RSLC 120 C₁₈, 2.1 mm×100 mm, 2.2 μm。

1.2 BGC18 基因簇的直接克隆与异源表达

1.2.1 *S. cellulosum* So0157-2 基因组提取

将 -80 °C 保藏的 *S. cellulosum* So0157-2 接种到 VY/2 平板上, 30 °C 恒温培养, 待长出菌膜, 转接到表面湿润的 M26 平板上。刮取 M26 平板培养 5~7 d 的菌落置于 50 mL 离心管中, 水洗两次, 然后根据菌量加入适量的无菌水, 涡旋混匀。吸取 1.8 mL 菌液分装到 2 mL EP 管中, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清。加入 450 μL Tris-HCl (10 mmol/L, pH 8.0), 吹打混匀。加入 30 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K, 颠倒混匀。加入 40 μL 10% SDS (sodium laurylsulfonate) 后, 轻轻混匀。50 °C 水浴 1~2 h, 中间间断颠倒直

至溶液变澄清。加入 500 μL 苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1), 快速混匀, 至溶液呈乳浊状, 13 800 r/min 离心 15 min。用去尖的移液吸头吸取 300 μL 上清置于新的 2 mL EP 管中。加入 35 μL 3 mol/L NaAc (pH 7.5), 混匀后, 加入 1.2 mL 无水乙醇, 混匀。准备新的 2 mL EP 管并加入 1 mL 70% 乙醇, 用黄色吸头将悬浮的 DNA 挑至该 EP 管中。10 000 r/min 离心 1 min。弃上清, 倒置于吸水纸上并用吸水纸将管壁上的水吸掉。室温干燥 15~20 min。加入 200 μL 双蒸水 (double-distilled H₂O, ddH₂O), 放置 4 °C 冰箱备用。

1.2.2 *S. cellulosum* So0157-2 基因组酶切产物制备

将基因组 DNA 利用限制性内切酶 *Dra* I 和 *Hind* III 酶切, 释放目标基因簇片段。取上述制备的基因组 DNA 200 μL, 加入 40 μL 10×Cutsmart buffer、12 μL 限制性内切酶 *Dra* I 和 *Hind* III、1.5 μL RNase A, 用 ddH₂O 补齐至 400 μL, 37 °C 反应 3 h。取 10 μL 酶切产物跑琼脂糖凝胶电泳进行检测。检测之后用等体积的苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 抽提酶切产物除去蛋白, 然后进行乙醇沉淀。

1.2.3 直接克隆载体的制备

以 BGC18-HAF 和 BGC18-HAR 为 PCR 引物, 以质粒 p15A-cm-tetR-tetO-hyg-ccdB 为 PCR 模板, 进行 PCR 扩增。取 2 μL PCR 产物进行电泳检测, 确认正确后将剩余 PCR 产物切胶回收目的片段。

1.2.4 目的基因簇 BGC18 的直接克隆

直接克隆载体和酶切基因组产物在体外用 T4 DNA Polymerase 退火: 取 200 ng 克隆载体、2 μL 10×NEB Buffer 2.1、0.13 μL T4 DNA Polymerase 混匀后, 轻轻加入 12 μL 基因组酶切产物, 再用 ddH₂O 将酶切体系补足到 20 μL。PCR 反应程序为: 25 °C, 60 min; 75 °C, 20 min; 50 °C, 30 min; 4 °C 保温。反应完成之后将产物室温除盐 40 min。将上述除盐后的产物电转化到经 L-Ara 诱导的感受态细胞 *E. coli* GB05-dir/pSC101-BAD-ETgA 中。从 LB 转化平板上挑取单菌落, 少量提取质粒, 进行酶切分析。

1.2.5 目的基因簇 BGC18 的遗传修饰

分别对质粒 p15A-cm-BGC18 进行转座元件和启动子的插入。利用带有同源臂的引物对 IR-Pkm-

C18-IR-HAF1/HAR1 对质粒 pR6K-oriT-TnpA-IR-km 进行扩增, 得到 oriT-IR-P_{km} PCR 产物, PCR 产物通过切胶回收纯化; 随后将回收的产物与质粒 p15A-cm-BGC18 共同转入 *E. coli* GB05-red 感受态细胞中, 使用合适的抗生素 (km/cm) 筛选重组子; 重组质粒通过限制性内切酶 *Apa*I 进行酶切鉴定及测序鉴定。

1.2.6 目的基因簇 BGC18 异源表达

S. brevitalea DSM 7029 已作为异源宿主表达了多个黏细菌来源的基因簇, 所以本研究中选择野生型的 *S. brevitalea* DSM 7029 作为首选异源宿主。首先将质粒 p15A-oriT-TnpA-IR-P_{km}-BGC18 (约 1 μg) 电转入野生型 *S. brevitalea* DSM 7029 中^[24], 通过含卡那霉素的 CYMG 平板筛选重组子。分别利用 detect-C18 in 7029-F1/R1, detect-C18 in 7029-F2/R2, detect-C18 in 7029-F3/R3, detect-C18 in 7029-F4/R4, detect-C18 in 7029-F5/R5 五对引物对重组子进行菌落 PCR 鉴定。

1.2.7 菌株的发酵提取分离与 LC-MS 检测

将正确的重组子接种于含有 50 mL CYMG 培养基 (km 3 μg/mL) 的 300 mL 锥形瓶中, 30 °C, 180 r/min 培养过夜制备种子液。转接 50 μL 种子液于相同的培养基相同培养条件下培养 2 d, 然后每瓶加入 1 mL 经前处理的 XAD16 大孔树脂, 继续恒温摇床培养 2 d。

将菌体和大孔树脂通过 100 目筛进行分离, 并用双蒸水将树脂洗涤 3 次 (尽量去除菌体)。将树脂倒入新的干燥的锥形瓶中, 加入 50 mL 的甲醇, 30 °C, 180 r/min 浸泡 1 h。通过滤纸过滤将树脂和甲醇分离, 并将甲醇组分减压浓缩蒸干得到粗提物。加入 1 mL 色谱甲醇或乙腈溶解粗提物, 然后 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清过 0.22 μm 微孔滤膜并转移至 HPLC 进样管中, 待 HPLC-MS 进行质谱检测。

液质检测条件如下: 液质分析色谱柱: 流动相, A 相为水+0.1% 甲酸, B 相为乙腈+0.1% 甲酸; 流速 0.3 mL/min; 进样 3 μL; 检测波长 190~400 nm; 洗脱程序 0~3 min, 5% B; 3~18 min, 5%~95% B; 18~22 min, 95% B; 22~25 min, 5% B。质谱检测条件: 电喷雾离子源, 正离子模式, 二级质谱 AutoMS², 检测范围 *m/z* 70~2200。

1.2.8 氨基酸绝对构型的确定

采用 Marfey 法将化合物 1~3 分别进行酸水解, 水解产物分别与 L-FDAA (1-fluoro-2-4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide) 或 D-FDAA 反应^[35]。采用同样的方法制备标准品 *N*-Me-L-Leu 与 L/D-FDAA 的衍生产物, L/D-Val、L/D-Leu、L/D-Ile、L/D-*allo*-Ile 与 L-FDAA 的衍生产物, 随后进行 LC-MS 分析。*N*-Me-L-Leu、L/D-Val 与 L/D-FDAA 的衍生产物的分析条件与 1.2.7 液质检测条件一致, 检测波长 330 nm。L/D-Leu、L/D-Ile、L/D-*allo*-Ile 的衍生产物洗脱程序为 0~45 min, 5%~50% B。对应衍生物的参照分子量为 [M+H]⁺ *m/z* 398 (*N*-Me-L-Leu)、370 (L/D-Val)、384 (L/D-Leu, L/D-Ile, L/D-*allo*-Ile)。

2 结果和分析

2.1 *S. cellulorum* So0157-2 生物信息学分析

通过 antiSMASH 分析, *S. cellulorum* So0157-2 基因组 (NCBI 数据库登录号: CP003969.1) 共包含 35 个 BGCs (表 3), 编码聚酮 (PKS)、非核糖体肽 (NRPS)、PKS-NRPS 杂合以及萜类 (terpene) 等多种结构类型化合物。除了已知的 epothilone^[8] 及另外两个萜类生物合成基因簇 geosmin^[40] 和 eremophilene^[41] 之外, 其余基因簇与目前已知的生物合成基因簇都存在着较大的不同, 相似度较低, 这预示着该菌株仍具有较大的代谢潜能。PKS-NRPS 杂合的化合物通常具有新颖的结构以及广泛的生物活性^[42], 因此优先选取该类型基因簇进行激活。BGC18 预测为 PKS-NRPS 杂合基因簇, 长度约为 26.7 kb (图 1)。核心基因 (SCE1572_24725) 包含 3 个模块共有 10 个结构域 (C₁-A₁-T₁, C₂-A₂-MT-T₂, KS-AT-TE) (图 1)。其中 A₁ (adenylation) 被预测可能识别缬氨酸/丙氨酸/甘氨酸/亮氨酸/异亮氨酸 (Val/Ala/Gly/Leu/Ile), A₂ 被预测可能识别亮氨酸, 然后被 *N*-甲基化形成 *N*-甲基亮氨酸 (*N*-Me-Leu), AT (acyltransferase) 则可能识别丙二酰辅酶 A (Malonyl-CoA), 但是缺少 PKS 所必需的硫醇化 (thiolation, T) 结构域, 这些底物能否通过 NRPS 和 PKS 的延伸单元被

表3 antiSMASH 预测 So0157-2 基因组编码的生物合成基因簇

Tab. 3 Biosynthetic gene clusters in the genome of so0157-2 predicted by antiSMASH

Gene Clusters	Type	Similar known cluster	Similarity
BGC1	RiPP-like	—	—
BGC2	NRPS	—	—
BGC3	Thioamitides	—	—
BGC4	NRPS-PKS	pyxipyrrolone A/B	11%
BGC5	NRPS-PKS	kirromycin	5%
BGC6	hglE-KS	—	—
BGC7	RiPP-like	—	—
BGC8	RiPP-like	—	—
BGC9	Indole	—	—
BGC10	T3PKS	alkylpyrone-407/393	6%
BGC11	NRPS-T1PKS	disorazol A	23%
BGC12	Terpene	geosmin	100%
BGC13	T1PKS	pallasoren	50%
BGC14	NRPS	—	—
BGC15	RiPP-like	—	—
BGC16	thioamitides	—	—
BGC17	NRPS	myxochelin A/B	50%
BGC18	NRPS-T1PKS	—	—
BGC19	NRPS-T1PKS	Epothilone	100%
BGC20	hglE-KS	—	—
BGC21	NRPS-T1PKS	—	—
BGC22	NRPS-T1PKS	Hapalosin	40%
BGC23	arylpolyene	N-tetradecanoyl tyrosine	6%
BGC24	LAP, RRE-containing	—	—
BGC25	RiPP-like	—	—
BGC26	RiPP-like	—	—
BGC27	T1PKS	—	—
BGC28	T1PKS	—	—
BGC29	microviridin	microviridin J	66%
BGC30	phosphonate	—	—
BGC31	NRPS	coelibactin	45%
BGC32	RiPP-like	—	—
BGC33	NRPS-T1PKS	crochelin A	26%
BGC34	terpene	eremophikene	100%
BGC35	NRPS	—	—

注：“—” indicates unknown.

依次加载、缩合，形成的终产物最后被硫酯酶 (TE) 结构域释放是一个值得研究的问题。

2.2 BGC18的直接克隆、改造、异源表达

利用 *Dra* I 和 *Hind* III 酶切基因组，释放出 27 kb 的完整 BGC18，将酶切后的基因组回收备

用。然后 PCR 扩增 1.79 kb 的直接克隆载体 p15A-cm，得到的片段两端各带有 72 bp 的同源臂。参照 ExoCET 的方法^[22]，对基因簇进行克隆 (图 2)。复苏后的菌体涂布含氯霉素的 LB 筛选平板，过夜培养后挑取 24 个转化子，用 *Msc* I 酶切鉴定 (图 3)，将其中 4 个所有酶切条带均正确的质粒，对它们的同源臂部分进行测序，测序正确的命名为 p15A-cm-BGC18。为了让质粒 p15A-cm-BGC18 能在异源宿主中成功表达，需要插入转座元件 *oriT-tnpA-IR* 将基因簇通过转座的方式整合至异源宿主的基因组上。此外，来源于黏细菌的启动子在 DSM 7029 中可能无法正常工作，所以将 BGC18 的结构基因的启动子替换成异源宿主中可以工作的组成型启动子 *Tn5-kan* (P_{km})。用带有 50 bp 同源臂的引物对 pR6K-*oriT-TnpA-IR-km* 进行扩增，得到 *oriT-TnpA-IR-km* 片段，将这个片段与 p15A-cm-BGC18 发生线环重组 (LCHR)，挑选 7 个转化子进行酶切分析和同源臂部分测序，成功获得重组质粒 p15A-*oriT-IR-P_{km}*-BGC18 (图 3)。

将质粒 p15A-*oriT-IR-P_{km}*-BGC18 电转入野生型的 *S. brevitalea* DSM 7029 中，从含卡那霉素的 CYMG 平板上挑取重组子进行菌落 PCR 鉴定，挑选 3 个正确的重组子 (DSM7029: P_{km} -BGC18) 进行发酵检测，并以野生型 DSM 7029 作为阴性对照。利用 HPLC-MS 对发酵结果进行分析。HPLC-MS 结果显示，所有带有 BGC18 的突变体均产生了两个显著的化合物峰 m/z 227 $[M+H]^+$ 、241 $[M+H]^+$ ，且这些峰在阴性对照中未发现，推测是 BGC18 在 DSM 7029 中表达的产物 (图 4)。

2.3 产物的分离纯化

将突变菌株 DSM7029: P_{km} -BGC18 采用 CYMG 培养基批量发酵 10 L，大孔树脂 XAD-16 吸附目标化合物，然后用甲醇提取发酵粗提物。发酵粗提物首先经过正相硅胶柱色谱分离，干法上样，以 CH_2Cl_2 -MeOH 为流动相，梯度洗脱 (100:1、50:1、30:1、20:1、10:1)，得到 5 个组分 Fr1~Fr5。液质检测将含有目标化合物的组分 Fr3 继续通过反相中压液相色谱制备，水和甲醇为流动相，梯度洗脱。最终通过 HPLC 制备，30% 乙腈水溶液

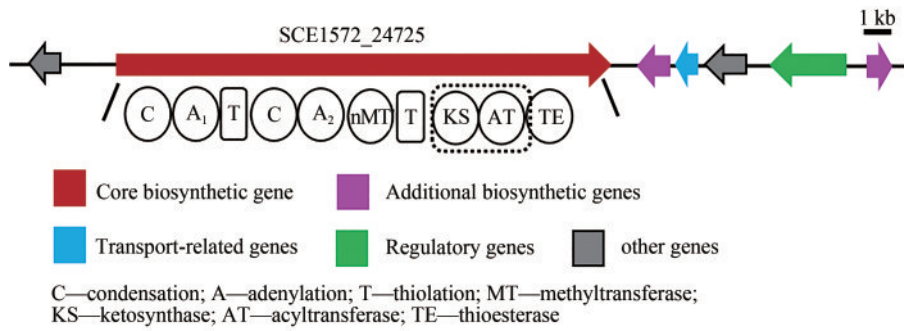


图1 BGC18基因簇结构

Fig. 1 Organization of the biosynthetic gene cluster BGC18

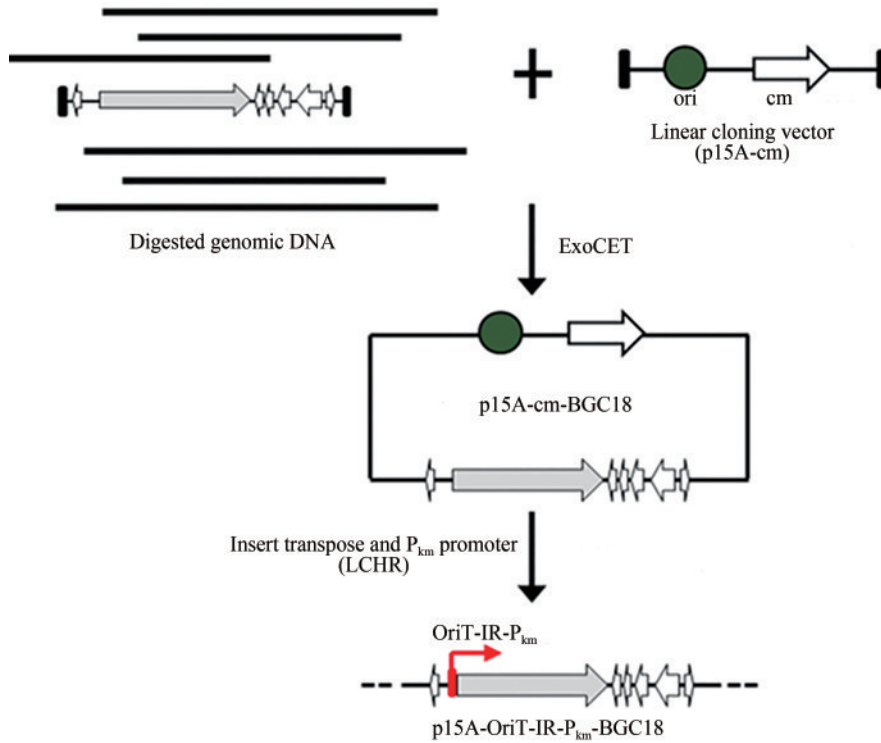


图2 基因簇BGC18的直接克隆与遗传修饰

Fig. 2 Direct cloning and modification of BGC18

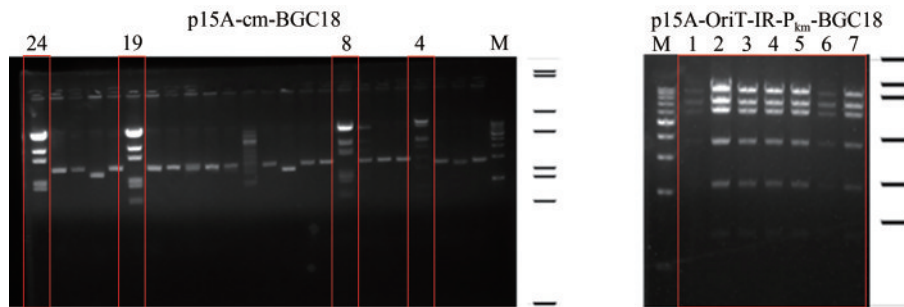


图3 重组质粒 p15A-cm-BGC18(a) 和 p15A-OriT-IR- P_{km} -BGC18(b) 分别以 *MscI* 和 *ApaLI* 酶切鉴定 (红色方框代表酶切条带正确)

Fig. 3 a: Restriction analysis of the recombinant plasmids p15A-cm-BGC18 by *MscI* (a) and p15A-OriT-IR- P_{km} -BGC18 by *ApaLI* (b) (Red box indicates right recombinant plasmids)

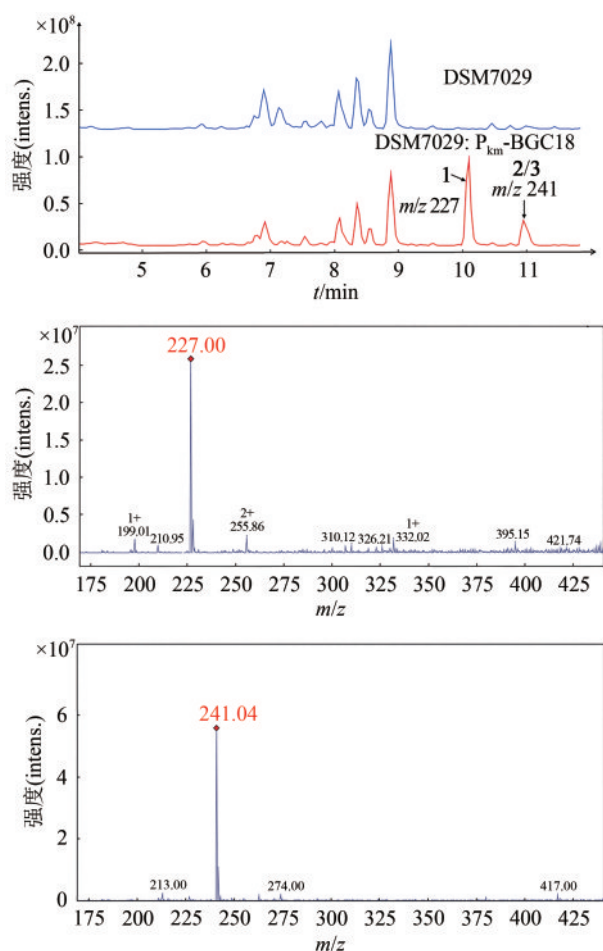


图4 BGC18在*S. brevitalea* DSM 7029中的异源表达产物 LC-MS分析 (BPC+: m/z 200~300)

Fig. 4 LC-MS analysis for the heterologous products of BGC18 expressed in *S. brevitalea* DSM 7029

恒梯度洗脱得到化合物**1** (33 mg), 40%乙腈水溶液恒梯度洗脱得到化合物**2** (7 mg)和化合物**3** (4 mg)。

2.4 化合物1-3结构鉴定

化合物**1**为白色固体, 阳离子质谱ESIMS在 m/z 227.0处给出 $[M+H]^+$ 分子离子峰, 结合化合物的一维 1H 谱、 ^{13}C 谱(表4)可以得到化合物分子式为 $C_{12}H_{12}O_2N_2$ 。分析 ^{13}C NMR, DEPT谱发现, 化合物**1**具有2个酰胺羰基(δ_c 167.6, 165.1); 4个次甲基(δ_c 60.1, 59.2, 32.6, 25.1); 1个亚甲基(δ_c 42.7); 5个甲基(δ_c 32.1, 23.1, 21.8, 19.2, 18.0)其中1个与氮相连; 进一步通过HMBC二维核磁数据确定化合物**1**的结构与已知有

机合成中间体Cyclo(*N*-Me-L-Leu-L-Val)相同^[43-44](图5), 但是其核磁数据未见报道, 因此对其核磁数据H和C谱进行了解析与指认(表4)。

化合物**2**和**3**均为白色固体, 阳离子质谱ESIMS在 m/z 241.0处给出 $[M+H]^+$ 分子离子峰, 提示化合物分子式为 $C_{13}H_{24}O_2N_2$ 比**1**多一个 CH_2 。与化合物**1**的氢谱数据比较发现(表4), 化合物**2**中的两个氨基酸均为亮氨酸(Leu)。进一步查阅文献发现化合物**2**为已知有机合成中间体Cyclo(*N*-Me-L-Leu-L-Leu)(图5)^[45]。化合物**3**与化合物**2**的氢谱数据非常类似, 除了一个二重峰(d)的甲基变成了三重峰(t)的甲基(δ_H 0.84)以及一个与氮相连的CH信号由dt峰变为dd峰(δ_H 3.61), 这就表明化合物**3**中的氨基酸为Ile, 为新化合物(图5)。采用Marfey法对氨基酸的绝对构型进行了确定, 4种氨基酸(*N*-Me-Leu、Val、Leu、Ile)均为L构型(表5)。

2.5 化合物1~3的生物合成途径分析

根据化合物的结构及其生物合成基因簇的生信分析, 对化合物**1~3**的生物合成途径进行了推测(图6)。A₁结构域可识别L型的Val/Leu/Ile。A₂结构域可识别的L-Leu, 然后经过*N*-甲基转移酶甲基化修饰后形成*N*-Me-Leu。两部分经过缩合与TE介导的环化, 最终形成化合物**1~3**的完整结构。尽管该基因簇含有PKS模块, 推测可能因为缺少PKS所必需的T结构域导致PKS模块被跳过, 从而只获得了NRPS指导合成的环二肽产物**1~3**。

2.6 化合物1~3的抗菌活性测试

本研究采用96孔板二倍稀释法^[35]测定了化合物**1~3**对下列指示菌株(*E. coli* ATCC 35218、*P. aeruginosa* ATCC 27853、*Staphylococcus aureus* ATCC 29213、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Helicobacter pylori* G27、*H. pylori* 159、*Enterococcus faecalis* ATCC 19434、*Mycobacterium smegmatis* ATCC 607、*Candida albicans* SC5314)的抗菌活性, 结果显示化合物**1~3**对所测菌株均无抑制作用(MIC>32 μ g/mL)。

表4 化合物1~3的NMR核磁数据

Tab. 4 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) data of 1~3 in $\text{DMSO-}d_6$

No	1		2	3	
	δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_H (J in Hz)	δ_H (J in Hz)	
<i>N</i> -Me-Leu	1	167.6, C			
	2	59.2, CH	3.78, dd (4.5, 8.2)	3.79, t (6.7)	3.78, dd (4.5, 8.1)
	3	42.7, CH ₂	1.58, m	1.59, t (7.0)	1.58, m
	4	25.1, CH	1.87, m	1.79, m	1.87, m
	5	23.1, CH ₃	0.89, d (6.7)	0.90, d (6.5)	0.89, d (6.5)
	6	21.8, CH ₃	0.93, d (6.7)	0.93, d (6.5)	0.93, d (6.5)
	<i>N</i> -Me	32.1, CH ₃	2.82, s	2.82, s	2.82, s
Val/Leu/Ile	1	165.1, C			
	2	60.1, CH	3.55, dd (3.6, 5.2)	3.73, dt (3.9, 8.7)	3.61, dd (3.8, 4.8)
	3	32.6, CH	2.01, m	1.52, m 1.45, m	1.73, m
	4	19.2, CH ₃	0.92, d (6.8)	1.79, m	1.43, m 1.11, m
	5	18.1, CH ₃	0.84, d (6.8)	0.86, d (6.5)	0.84, t (6.5)
	6			0.90, d (6.5)	0.89, d (6.5)
	NH		8.24, d (2.4)	8.39, d (2.6)	8.23, d (1.6)

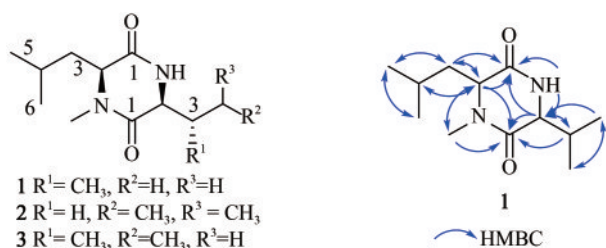


图5 化合物1~3的结构式及化合物1的HMBC相关信号

Fig. 5 Structures of 1~3 and HMBC correlations of 1

表5 化合物1~3氨基酸与marfey试剂衍生产品的保留时间

Tab. 5 Retention time of amino acids derivatized with Marfey's reagent

Amino acid	Configuration	Retention time			
		Standard	1	2	3
<i>N</i> -Me-L-Leu	L	12.9	12.9	12.9	12.9
	D	13.2			
Val	L	11.6	11.6		
	D	12.5			
Leu	L	29.7		29.7	
	D	33.1			
Ile	L	29.1			29.1
	D	32.5			
<i>allo</i> -Ile	L	29.2			
	D	32.6			

3 结论

基因组信息分析表明, 纤维堆囊菌 So0157-2

基因组中含有丰富的未知功能的基因簇, 特别是含有大量通常具有良好生物活性的 PKS、NRPS 或两者杂合的基因簇, 预示着该菌株仍具有产生新颖天然产物的潜力。BGC18 即为该菌株基因组中预测的一个 NRPS-PKS 杂合的基因簇, 大小约为 26.7 kb。该基因簇中 NRPS 模块的核心基因预测含有两个 A 结构域, 其中 A₂ 结构域被预测具有底物的专一性, 而 A₁ 结构域对底物的识别具有宽泛性, 因此该基因簇可能合成结构多样的二酮哌嗪类化合物。此外, 该基因簇 PKS 模块缺少 T 结构域, 这些底物能否通过 NRPS 和 PKS 的延伸单元被依次加载、缩合, 形成的终产物最后被 TE 结构域释放值得深入研究。然而, 由于该菌株较难培养且自身未建立遗传操作体系, 因此将该生物合成基因簇转移到合适的异源宿主中, 利用异源表达策略是激活该生物合成基因簇挖掘其次级代谢产物的一个有效途径。异源表达成功的关键主要涉及基因簇的克隆与遗传修饰以及异源宿主的合理选择。本课题组已经建立了以 Red/ET DNA 同源重组技术为核心的生物合成基因簇直接克隆与遗传修饰技术平台, 为天然产物的挖掘提供了技术支撑^[21-28]。基因簇在异源表达时, 存在着密码子偏好性的影响。选择异源宿主时, 首先考虑与原始生产菌在进化地位上亲缘关系相近的菌。本文中所选用的异源宿主 *S. brevitalea* DSM 7029 与纤维对囊菌

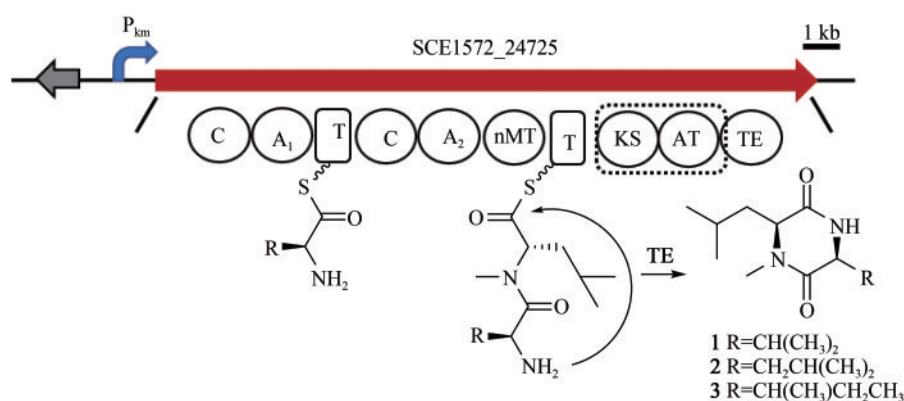


图6 化合物1~3生物合成途径推测

Fig. 6 Proposed biosynthetic pathway of 1~3

So0157-2 均为变形菌门, GC 含量相似, 分别为 68% 和 72%^[8,39]。前期, 本课题组将纤维堆囊菌来源的埃博霉素成功地在该异源宿主 *S. brevitalea* DSM 7029 中进行了表达, 说明两株菌的密码子有一定的兼容性^[36]。此外, 通过启动子工程改造以及额外补充稀有密码子的 tRNA 或者进行密码子优化等也可以提高异源表达的概率^[36-37]。

因此, 本研究成功构建了纤维堆囊菌 So0157-2 中基因簇的直接克隆与遗传修饰体系, 并将一个 NRPS-PKS 杂合的基因簇 BGC18 转入异源宿主 *S. brevitalea* DSM 7029 中实现了该基因簇的功能性表达, 成功获得了 3 个对应的代谢产物。通过正相硅胶柱色谱和 HPLC 分离纯化, 以及 MS、NMR 解析了化合物的结构。SciFinder 数据库检索证实化合物 1 和 2 仅作为有机合成中间体被报道, 为新天然产物, 而化合物 3 为新化合物。BGC18 为 NRPS-PKS 杂合基因簇, 从结构上看, 化合物 1~3 为二酮哌嗪类化合物, 其所含氨基酸与生物信息学预测一致, 但是并未见 PKS 单元。仔细分析 PKS 相关基因发现该基因簇缺少硫醇化结构域, 推测导致 PKS 不能有效组装。化合物 1~3 结构上差别主要为第 1 个氨基酸的不同 (1 Val, 2 Leu, 3 Ile), 这是由于第 1 个腺苷化结构域 (A domain) 对底物识别的非特异性所导致的。由 A 结构域对底物识别的宽泛性导致的结构多样性也在我们前期分离获得的多个脂肽类化合物得到证实^[46-47]。基于 Red/ET 重组工程技术的纤维堆囊菌 So0157-2 隐性基因簇的直接克隆、修饰和异源表达体系的建立, 不仅有助于进一步了解该菌的生物合成潜力, 而

且能够发现新颖的天然产物用于药物筛选评价。

致谢: 本工作得到国家重点研发计划(2019YFA0905700); 国家自然科学基金(32070060, 31670098); 山东省自然科学基金(ZR2020QH345, ZR2019JQ11)的支持。

参 考 文 献

- [1] HERRMANN J, FAYAD A A, MÜLLER R. Natural products from myxobacteria: novel metabolites and bioactivities[J]. Natural Product Reports, 2017, 34(2): 135-160.
- [2] WEISSMAN K J, MÜLLER R. Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action[J]. Natural Product Reports, 2010, 27(9): 1276-1295.
- [3] WENZEL S C, MÜLLER R. Myxobacteria—'microbial factories' for the production of bioactive secondary metabolites[J]. Molecular Biosystems, 2009, 5(6): 567-574.
- [4] SCHÄBERLE T F, LOHR F, SCHMITZ A, et al. Antibiotics from myxobacteria[J]. Natural Product Reports, 2014, 31(7): 953-972.
- [5] 刘冰花. 黏细菌生物活性物质的研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2011, 30(2): 108-113.
LIU B H. Study of myxobacterial bioactive substances[J]. Journal of Chengdu University (Natural Science), 2011, 30(2): 108-113.
- [6] 赵婷峰, 龚国利. 黏细菌: 天然的制药厂[J]. 生物技术通报, 2014(12): 40-46.
ZHAO T F, GONG G L. Myxobacteria: natural pharmaceutical factories[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(12): 40-46.
- [7] HAN K, LI Z F, PENG R, et al. Extraordinary expansion of a *Sorangium cellulosum* genome from an alkaline milieu[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 2101.
- [8] LI Z F, ZHU L P, GU J Y, et al. Isolation and characterisation of the epothilone gene cluster with flanks from high alkalotol-

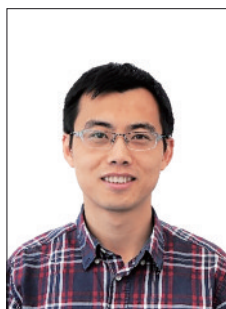
- erant strain *Sorangium cellulosum* (So0157-2)[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(7): 137.
- [9] 龚国利, 黄宇莹. 黏细菌纤维堆囊菌的基因组学研究现状[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(5): 1133-1138.
- GONG G L, HUANG Y Y. Research status of genomics of myxobacteria *Sorangium cellulosum*[J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(5): 1133-1138.
- [10] ZHAO L, LI P F, LU C H, et al. Glycosylation and production characteristics of epothilones in alkali-tolerant *Sorangium cellulosum* strain So0157-2[J]. The Journal of Microbiology, 2010, 48(4): 438-444.
- [11] WANG J, ZHANG H, YING L, et al. Five new epothilone metabolites from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2[J]. The Journal of Antibiotics, 2009, 62: 483-487.
- [12] ZHAO L, ZHAO B B, LU C H, et al. Two epothilones from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2010, 8: 298-300.
- [13] WANG J D, JIANG N, ZHANG H, et al. New epothilone congeners from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2[J]. Natural Product Research, 2011, 25(18): 1707-1712.
- [14] LU C, ZHAO L, LI Y, et al. Four natural epothilone derivatives isolated from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2013, 22(1): 28-31.
- [15] ZHANG Y J, DENG A W, ZHANG H, et al. Epothilone O, a new member of this family from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2[J]. The Journal of Antibiotics, 2013, 66(5): 285-286.
- [16] HUO L, HUG J J, FU C, et al. Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways[J]. Natural Product Reports, 2019, 36(10): 1412-1436.
- [17] ONGLEY S E, BIAN X, NEILAN B A, et al. Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways[J]. Natural Product Reports, 2013, 30: 1121-1138.
- [18] ZHANG J J, TANG X Y, MOORE B S. Genetic platforms for heterologous expression of microbial natural products[J]. Natural Product Reports, 2019, 36(9): 1313-1332.
- [19] LUO Y, ENGHAD B, ZHAO H. New tools for reconstruction and heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters[J]. Natural Product Reports, 2016, 33(2): 174-182.
- [20] LUO Y, LI B Z, LIU D, et al. Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts[J]. Chemical Society Reviews, 2015, 44(15): 5265-5290.
- [21] FU J, BIAN X Y, HU S B, et al. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(5): 440-446.
- [22] WANG H L, LI Z, JIA R N, et al. ExoCET: exonuclease *in vitro* assembly combined with RecET recombination for highly efficient direct DNA cloning from complex genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(5): e28.
- [23] 郑文韬, 张友明, 卞小莹. Red/ET同源重组技术及其在微生物基因组挖掘中的应用进展[J]. 微生物学报, 2017, 57(11): 1735-1746.
- ZHENG W T, ZHANG Y M, BIAN X Y. Advances in Red/ET recombineering and its application for microbial genome mining[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(11): 1735-1746.
- [24] WANG H, BIAN X, XIA L, et al. Improved seamless mutagenesis by recombineering using ccdB for counterselection[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(5): e37.
- [25] BIAN X, PLAZA A, YAN F, et al. Rational and efficient site-directed mutagenesis of adenylation domain alters relative yields of luminide derivatives *in vivo*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(7): 1343-1353.
- [26] WANG H L, LI Z, JIA R N, et al. RecET direct cloning and Red $\alpha\beta$ recombineering of biosynthetic gene clusters, large operons or single genes for heterologous expression[J]. Nature Protocols, 2016, 11(7): 1175-1190.
- [27] ABBASI M N, FU J, BIAN X, et al. Recombineering for genetic engineering of natural product biosynthetic pathways[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(7): 715-728.
- [28] ZHONG L, DIAO X, ZHANG N, et al. Engineering and elucidation of the lipoinitiation process in nonribosomal peptide biosynthesis[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 296.
- [29] WATANABE K, OIKAWA H. Robust platform for de novo production of heterologous polyketides and nonribosomal peptides in *Escherichia coli*[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2007, 5(4): 593-602.
- [30] 马紫卉, 李伟, 尹文兵. 真菌天然产物异源生产研究进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(3): 429-440.
- MA Z H, LI W, YIN W B. Progress in heterologous expression of fungal natural products—a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(3): 429-440.
- [31] TSUNEMATSU Y, ISHIUCHI K, HOTTA K, et al. Yeast-based genome mining, production and mechanistic studies of the biosynthesis of fungal polyketide and peptide natural products[J]. Natural Product Reports, 2013, 30(8): 1139-1149.
- [32] MYRONOVSKIY M, LUZHETSKYY A. Heterologous production of small molecules in the optimized *Streptomyces* hosts[J]. Natural Product Reports, 2019, 36(9): 1281-1294.
- [33] 王素英, 蒋雪, 张宏宇. 放线菌次级代谢产物合成基因簇异源表达体系的研究进展[J]. 科学技术与工程, 2019, 19(34): 9-16.
- WANG S Y, JIANG X, ZHANG H Y. Advances in heterologous expression system of secondary metabolite synthesis gene clusters of actinomycetes[J]. Science Technology and Engineering, 2019, 19(34): 9-16.
- [34] YU Y C, WANG H M, TANG B, et al. Reassembly of the bio-

- synthetic gene cluster enables high epothilone yield in engineered *Schlegelella brevitalea*[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(8): 2009-2022.
- [35] WANG X, ZHOU H B, CHEN H N, et al. Discovery of recombinases enables genome mining of cryptic biosynthetic gene clusters in Burkholderiales species[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(18): E4255-E4263.
- [36] BIAN X Y, TANG B, YU Y C, et al. Heterologous production and yield improvement of epothilones in *Burkholderiales* strain DSM 7029[J]. ACS Chemical Biology, 2017, 12(7): 1805-1812.
- [37] OUYANG Q, WANG X, ZHANG N, et al. Promoter screening facilitates heterologous production of complex secondary metabolites in *Burkholderiales* strains[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(2): 457-460.
- [38] FU J, TEUCHER M., ANASTASSIADIS K, et al. Chapter eight-a recombineering pipeline to make conditional targeting constructs [J]. Methods in Enzymology, 2010, 477: 125-144.
- [39] TANG B, YU Y, LIANG J, et al. Reclassification of 'Polyangium brachysporum' DSM 7029 as *Schlegelella brevitalea* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(9): 2877-2883.
- [40] GIGLIO S, JIANG J Y, SAINT C P, et al. Isolation and characterization of the gene associated with Geosmin production in cyanobacteria[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(21): 8027-8032.
- [41] SCHIFRIN A, LY T T, GÜNNEWICH N, et al. Characterization of the gene cluster CYP264B1-*geoA* from *Sorangium cellulosum* So ce56: Biosynthesis of (+)-eremophilene and its hydroxylation[J]. ChemBiochem, 2015, 16(2): 337-344.
- [42] MIYANAGA A, KUDO F, EGUCHI T. Protein-protein interactions in polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase hybrid assembly lines[J]. Natural Product Reports, 2018, 35(11): 1185-1209.
- [43] WEN S J, HU T S, YAO Z J. Macrocyclization studies and total synthesis of cyclomarin C, an anti-inflammatory marine cyclopeptide[J]. Tetrahedron, 2005, 61(21): 4931-4938.
- [44] KATSUTA R, TOYODA M, YAJIMA A, et al. Synthesis and stereochemistry of JBIR-81, a peptide enamide derived from *aspergilli*[J]. Tetrahedron Letters. 2018, 59: 1010-1013.
- [45] CRYLE M J, BELL S G, SCHLICHTING I. Structural and biochemical characterization of the cytochrome P450 CypX (CYP134A1) from *Bacillus subtilis*: A cyclo-L-leucyl-L-leucyl dipeptide oxidase[J]. Biochemistry, 2010, 49(34): 7282-7296.
- [46] CHEN H N, ZHOU H B, SUN T, et al. Identification of holrhizins E-Q reveals the diversity of nonribosomal lipopeptides in *Paraburkholderia rhizoxinica*[J]. Journal of Natural Products, 2020, 83(2): 537-541.
- [47] CHEN H N, SUN T, BAI X P, et al. Genomics-driven activation of silent biosynthetic gene clusters in *Burkholderia gladioli* by screening recombineering system[J]. Molecules, 2021, 26: 700.



通讯作者：张友明(1964—)，男，博士生导师，教授。研究方向为基因组编辑与合成生物学等。

E-mail: zhangyouming@sdu.edu.cn



通讯作者：卞小莹(1983—)，男，博士生导师，教授。研究方向为微生物天然产物合成生物学等。

E-mail: bianxiaoying@sdu.edu.cn



第一作者：周海波(1987—)，男，博士，助理研究员。研究方向为微生物次级代谢产物的发现及其生物合成途径解析。

E-mail: haibozhou@sdu.edu.cn

广告索引：武汉国家生物产业基地(后彩一)/国家合成生物技术创新中心(后彩二)/诚志生命科技有限公司(封三)