



# *Nonomuraea candida* HMC10<sup>T</sup> 中新结构套索肽 noncaromin 生物合成基因簇的克隆及异源表达

韩舒婷<sup>1,2</sup>, 马婧贤<sup>1,2</sup>, 盛勇<sup>1,2</sup>, 王珩瑜<sup>1,2</sup>, 邢利<sup>3</sup>, 罗晓霞<sup>3</sup>, 白林泉<sup>1,2</sup>, 邓子新<sup>1,2</sup>, 康前进<sup>1,2\*</sup>

- 1 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240
- 2 上海交通大学代谢与发育国际联合合作实验室, 上海 200240
- 3 塔里木大学生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300

韩舒婷, 马婧贤, 盛勇, 王珩瑜, 邢利, 罗晓霞, 白林泉, 邓子新, 康前进. *Nonomuraea candida* HMC10<sup>T</sup> 中新结构套索肽 noncaromin 生物合成基因簇的克隆及异源表达. 微生物学报, 2022, 62(12): 4927–4942.

Han Shuting, Ma Jingxian, Sheng Yong, Wang Hengyu, Xing Li, Luo Xiaoxia, Bai Linqun, Deng Zixin, Kang Qianjin. Cloning and heterologous expression of the new biosynthetic gene cluster of noncaromin from *Nonomuraea candida* HMC10<sup>T</sup>. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4927–4942.

**摘要:** 【目的】本研究旨在通过定向克隆菌株 *Nonomuraea candida* HMC10<sup>T</sup> 中一个新的 II 型套索肽类生物合成基因簇, 通过在放线菌底盘宿主中的异源表达, 获得新结构套索肽 noncaromin, 并完成其抑菌活性分析。【方法】通过 antiSMASH 软件分析菌株 *N. candida* HMC10<sup>T</sup> 全基因组序列, 确定新的 II 型套索肽 noncaromin 的生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster of noncaromin, *nonc*-BGC)。然后, 利用 ExoCET 重组技术(exonuclease combined with RecET recombination)获得完整的 *nonc*-BGC, 得到重组质粒 pJQK652, 并通过 λ-Red 重组技术改造得到整合型质粒 pJQK653。采用接合转移方法, 将该质粒分别导入白色链霉菌、2 株变铅青链霉菌、2 株天蓝色链霉菌和红色糖多孢菌宿主中进行异源表达, 再通过发酵和分离纯化获得目标套索肽 noncaromin。最后, 利用 QTOF-ESI-MS<sup>2</sup> 完成套索肽 noncaromin 的结构鉴定, 并通过抗菌活性检测确定该化合物的生物活性。【结果】本研究利用 ExoCET 技术成功获得了完整的 *nonc*-BGC, 在 6 种放线菌宿主中成

**基金项目:** 国家重点研发计划(2021YFC2100600); 国家自然科学基金(31770034, 31830104); 上海市自然科学基金(19ZR1475600)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100600), by the National Natural Science Foundation of China (31770034, 31830104) and by the Shanghai Natural Science Foundation (19ZR1475600)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-34206119; E-mail: qjkang@sjtu.edu.cn

Received: 30 March 2022; Revised: 24 April 2022; Published online: 20 June 2022

功异源表达, 完成了 noncaromin 的结构鉴定, 确定了其具有微弱的抗枯草芽孢杆菌活性。【结论】本研究在克隆得到新结构套索肽 *nonc*-BGC 的基础上, 实现了该基因簇在 6 个放线菌底盘宿主中的成功表达, 获得了 1 个具有微弱抑制枯草芽孢杆菌活性的新结构 II 型套索肽 noncaromin。本研究结果为发掘菌株 *N. candida* HMC10<sup>T</sup> 及其他放线菌中的新结构化合物提供了借鉴。

**关键词:** 念珠状野野村氏菌; 套索肽; 异源表达; 结构鉴定; 活性检测

## Cloning and heterologous expression of the new biosynthetic gene cluster of noncaromin from *Nonomuraea candida* HMC10<sup>T</sup>

HAN Shuting<sup>1,2</sup>, MA Jingxian<sup>1,2</sup>, SHENG Yong<sup>1,2</sup>, WANG Hengyu<sup>1,2</sup>, XING Li<sup>3</sup>, LUO Xiaoxia<sup>3</sup>, BAI Linqun<sup>1,2</sup>, DENG Zixin<sup>1,2</sup>, KANG Qianjin<sup>1,2\*</sup>

1 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 Joint International Research Laboratory of Metabolic & Developmental Sciences, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

3 College of Life Science, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

**Abstract:** [Objective] To obtain the new lasso peptide noncaromin, the biosynthetic gene cluster of noncaromin (*nonc*-BGC) from *Nonomuraea candida* HMC10<sup>T</sup> was cloned and the heterologous expression in actinomycete classis strains as well as the antibacterial activity were explored. [Methods] The new *nonc*-BGC was initially defined by analyzing the whole genome sequence of *N. candida* HMC10<sup>T</sup> with antiSMASH. Then, complete *nonc*-BGC was cloned by ExoCET method from the genomic DNA of *N. candida* HMC10<sup>T</sup> to obtain the recombinant plasmid pJQK652. The  $\lambda$ -Red recombination system was used to construct the integrative plasmid pJQK653, which, through conjugative manipulation, was introduced into *Streptomyces albus* J1074, *S. lividans* LJ1018, *S. lividans* 1326, *S. coelicolor* M1252, *S. coelicolor* M1452 and *Saccharopolyspora erythraea* LJ161 for heterologous expression. Subsequently target noncaromin was obtained by fermentation and purification. Finally, the chemical structure of noncaromin was determined by QTOF-ESI-MS<sup>2</sup>, and its antibacterial activity was evaluated as well. [Results] In this study, complete *nonc*-BGC was cloned by EcoCET method, and its heterogeneous expression in six different actinomycete hosts were performed separately. Furthermore, we characterized the chemical structure of noncaromin and determined its negligible inhibition activity against *Bacillus subtilis* 168. [Conclusion] On the basis of the cloning of complete *nonc*-BGC from *N. candida* HMC10<sup>T</sup>, the heterogeneous expression of *nonc*-BGC in six different actinomycete hosts was performed. As a result, a new noncaromin was discovered, with negligible inhibition activity against *B. subtilis* 168. These results provided reference for the discovery of new compounds in strain *N. candida* HMC10<sup>T</sup> and other actinomycetes.

**Keywords:** *Nonomuraea candida*; lasso peptides; heterologous expression; structural determination; bioactivity analysis

近年来,从稀有放线菌中不断发掘得到结构新颖且具有重要活性的天然产物,这些菌株逐渐成为了药物发现的重要资源<sup>[1]</sup>。野野村氏菌属(*Nonomuraea*)属于稀有放线菌类群,该类菌株能产生具有广泛生物活性的化合物<sup>[2]</sup>,包括抗菌剂(如抗革兰氏阳性菌的 maduramycin<sup>[3]</sup>)和抗肿瘤药物(如凋亡诱导剂 carminomycin<sup>[4]</sup>和 brartemicin<sup>[5]</sup>)等,在药物研发和工业用途上具有重要的研究价值<sup>[6]</sup>。其中,多肽类天然产物是生物活性化合物最丰富的来源之一<sup>[7]</sup>,依据其生物合成机制主要可分为核糖体肽类(ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, RiPPs)和非核糖体肽类(non-ribosomal peptides, NRPs)<sup>[8]</sup>。

核糖体肽类天然产物是一类由基因编码、核糖体合成的前体肽,经由翻译后修饰而得到的天然产物<sup>[9]</sup>,该类化合物广泛分布于藻类、细菌、真菌和一些高等植物中,具有广泛的结构多样性和生物活性多样性,包括抗感染、抗肿瘤、酶抑制剂和受体拮抗剂等<sup>[10]</sup>,受到了众多研究者的关注。目前已发现的核糖体肽类化合物共有 20 多种,且种类还在持续增加中。其中,套索肽类是核糖体肽类化合物中一类含有特殊的互锁拓扑结构的化合物,该结构赋予了套索肽较高的热稳定性和蛋白酶稳定性<sup>[11-12]</sup>。大部分套索肽的免疫原性极低或无免疫原性,不易引起免疫反应,且套索肽生物合成中的关键功能蛋白对底物核心肽具有高水平耐受性,有利于通过基因工程手段开展结构优化或扩大化学多样性。依据二硫键的数量和形成位置,套索肽可分为 4 类。I 类由 2 个二硫键连接,如 siamycin I 是肌球蛋白轻链激酶的抑制剂和抗 HIV 药物<sup>[13]</sup>; II 类无二硫键,主要通过空间相互作用稳定结构,约占全部套索肽的 95%<sup>[14]</sup>,如

microcin J25 能拮抗肠杆菌科<sup>[15]</sup>; III 类和 IV 类均只含 1 个二硫键,其中 III 型由二硫键连接肽环与肽链尾,而 IV 型二硫键则仅存在于肽链尾。目前 III 类和 IV 类均只发现 1 个化合物,分别为胰高血糖素受体拮抗剂 BI-32169<sup>[16]</sup>和抗革兰氏阳性菌的 LP2006<sup>[14]</sup>。研究发现,套索肽的分子靶标不同于其他抗生素,主要集中在细胞膜<sup>[13]</sup>(主要为肽聚糖)、RNA 聚合酶<sup>[17]</sup>和 ClpC1P1P2 蛋白酶<sup>[18]</sup> 3 个方面,说明探索套索肽的多样性有助于增加抑菌靶点的选择性。

从生物合成机制来分析,套索肽的生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster, BGC)主要有 3 个,即前体肽(precursor peptide)、前导肽酶(transglutaminase-like protease)和套索环化酶(asparagine synthase-like protein)<sup>[9]</sup>。其中,前体肽分为前导肽(leader peptide)和核心肽(core peptide)两部分;前导肽酶属于类转谷氨酰胺酶蛋白酶,负责识别并剪切前导肽以暴露出大内酰胺环所需的核糖肽的 N 末端氨基<sup>[19]</sup>,在放线菌中前导肽酶可分为负责识别的 B1 蛋白和负责切割的 B2 蛋白;套索肽环化酶则依赖 ATP,通过腺苷化激活 Asp/Glu 残基的羧酸盐侧链,亲核攻击 N 端氨基形成大内酰胺环<sup>[20]</sup>。

前期研究中,我们发现念珠状野野村氏菌 HMC10<sup>T</sup> 的全基因组<sup>[6]</sup>中存在着较多核糖体肽类生物合成基因簇,包括 4 个套索肽类、5 个羊毛硫肽类、1 个 Ranthuopeptide、1 个硫肽类和 2 个混合基因簇。为了对该菌株的新颖核糖体肽类化合物进行发掘,本研究选取了一个编码新颖结构的 II 型套索肽生物合成基因簇作为研究对象,利用 ExoCET 重组技术(exonuclease combined with RecET recombination),克隆得到了完整的基因簇 *nonc*-BGC,通过异源表达方法,实现了该基因簇在 6 个底盘菌株(白色链霉

菌、2株变铅青链霉菌、2株天蓝色链霉菌和红色糖多孢菌)中的成功表达,新结构套索肽通过 QTOF-ESI-MS 进行了确定,命名为 *noncaromin*。抗菌活性检测显示该产物对枯草芽孢杆菌具有微弱的抑制作用,本研究为挖掘该菌株中的新型天然产物提供了参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要生化试剂和仪器

生化试剂:甲醇、乙醇、丙酮、三氯甲烷购自国药集团化学试剂股份有限公司;阿泊拉霉素、卡那霉素、氯霉素和萘啶酮酸购自西格玛奥德里奇贸易有限公司;DNA连接酶和 *Pfu* 高保真 DNA 聚合酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司;限制性核酸内切酶均购自赛默飞世尔科技有限公司。仪器:恒温振荡摇床 ZQZY-70BS 购自上海知楚仪器有限公司;电转仪购自 Eppendorf 公司;高速离心机 CR21G III 购自 Hitachi 公司;旋转蒸发仪 Rotavapor R-210 购自 BUCHI 公司;PCR 仪购于 Thermo Fisher Scientific 公司;电泳仪 EPS-300 购自上海天能科技有限公司;凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司;生化培养箱 LRH-250A 购自韶关市泰宏医疗器械有限公司;生物安全柜购自江苏埃德伯格电气有限公司。分析仪器:化合物分析采用高效液相色谱 Agilent 1262 series HPLC,精确分子量和二级质谱数据采集使用 Agilent 1290 Infinity II/6545 QTOF LC/MS。

#### 1.1.2 培养基

(1) 大肠杆菌培养基采用 LB (Luria-Bertani) 液体/固体培养基<sup>[21]</sup>。(2) 链霉菌发酵种子培养基采用液体培养基 TSBY<sup>[22]</sup>;链霉菌的培养和孢子萌发采用 SFM 固体培养基<sup>[22]</sup>、发酵培养基为固体培养基 R3<sup>[23]</sup>和 R5<sup>[22]</sup>。(3) 野野村氏菌

培养与发酵均使用固体培养基 R3<sup>[23]</sup>。(4) 红色糖多孢菌产孢培养基 ISP4 购自 BD-Difco 公司;红色糖多孢菌的培养和孢子萌发采用固体培养基 ESM<sup>[24]</sup>,其发酵培养基为 EFM<sup>[24]</sup>。

#### 1.1.3 菌株和质粒

本文所用菌株见表 1,所用质粒见表 2。

#### 1.1.4 引物

本文所用引物见表 3 (所用引物均由擎科生物技术有限公司提供)。

### 1.2 基因簇的克隆和整合型质粒的构建

#### 1.2.1 *N. candida* HMC10<sup>T</sup> 基因组 DNA 的提取

取冻存的菌液涂布于 R3 固体培养基,30 °C 活化培养 7 d 后,取适量孢子于 TSBY 液体培养基中,在恒温摇床中 30 °C、220 r/min 条件下培养 3 d。收集菌体后,用 10 mL TE 缓冲液洗涤 1 次并重悬,加入终浓度为 1 mg/mL 的溶菌酶,于 37 °C 孵育 1.5 h。再加入终浓度为 1%的 SDS 和终浓度为 0.2 mg/mL 的蛋白酶 K,于 55 °C 水浴诱导 3 h,并在水浴 1.5 h 时加入 2 mL 5 mol/L NaCl 和 1.5 mL 10% CTAB。向菌体裂解液中加入酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)重复 2 次抽提 DNA,利用等体积异丙醇和 1/10 体积的 3 mol/L NaOAc 沉淀基因组,挑出沉淀的大片段 DNA,放入 70%乙醇重复洗涤 2 次,干燥后用无菌水溶解,定量后于 -30 °C 保存待用。

#### 1.2.2 基因组的酶切与回收

利用 Frameplot 和 BLAST 分析软件进一步分析显示,利用 *Hind* III 和 *EcoR* V 双酶切,可获得包含完整基因簇的 DNA 片段 *nonc-cluster*,约 25.6 kb。取 10 μg 的总 DNA 基因组,分别加入 3 μL 的 *Hind* III 和 *EcoR* V,定容至 50 μL 后,于 37 °C 水浴锅中酶切 2 h。酶切完成后,利用等体积异丙醇和 1/10 体积的 3 mol/L NaOAc 沉淀基因组回收酶切产物,经 75%乙醇洗涤、烘干后,用无菌水进行溶解,获得浓度为 2 683.5 ng/μL 的线性化 DNA 混合样品。

表 1 菌株及其特征和来源

Table 1 Properties and sources of strains used in this study

Strains	Genotype/description	References
<i>Escherichia coli</i> DH10B	<i>lacZ, recA, ΔM15</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> GB05-dir	RecET mediated linear-linear recombination system	[25]
<i>Escherichia coli</i> GB08	Redαβ mediated linear-circular recombination system	[26]
<i>Escherichia coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>recE, dcm<sup>-</sup>, dam<sup>-</sup>, hsdS, Cm<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup>, Str<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup></i>	[27]
<i>Streptomyces albus</i> J1074	Chassis strain used for heterologous expression	[28]
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1252	Strain M1152 with two artificial $\Phi C31$ - <i>attB</i> sites, <i>Δact, Δred, Δcpk, Δcda, rpoB</i> [C1298T]	[29]
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1452	Strain M1152 with four artificial $\Phi C31$ - <i>attB</i> sites, <i>Δact, Δred, Δcpk, Δcda, rpoB</i> [C1298T]	[29]
<i>Streptomyces lividans</i> LJ1018	Strain LJ101:: <i>ImrA<sub>co</sub>::mdfA<sub>co</sub>::nusG::afsR<sub>cla</sub>::afsS<sub>cla</sub></i>	[30]
<i>Streptomyces lividans</i> 1326	Chassis strain used for heterologous expression	[31]
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> LJ161	Derivative of SLQ185 with deletion of the <i>pke</i> cluster	[32]
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Indicator strain used for bioassay	Lab preservation
<i>Staphylococcus aureus</i> SG511	Indicator strain used for bioassay	Lab preservation
<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665	Indicator strain used for bioassay	Lab preservation
<i>Escherichia coli</i> K-12	Indicator strain used for bioassay	Lab preservation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29853	Indicator strain used for bioassay	Lab preservation
<i>Candida albicans</i> AKU 4596	Indicator strain used for bioassay	Lab preservation
<i>Nonomuraea candida</i> HMC10 <sup>T</sup>	Wild-type	Lab preservation
HST06	<i>S. albus</i> J1074 containing pJQK653	This work
HST07	<i>S. lividans</i> LJ1018 containing pJQK653	This work
HST08	<i>S. lividans</i> 1326 containing pJQK653	This work
HST09	<i>S. coelicolor</i> M1252 containing pJQK653	This work
HST10	<i>S. coelicolor</i> M1452 containing pJQK653	This work
HST11	<i>Sac. erythraea</i> LJ161 containing pJQK653	This work
HST06-control	<i>S. albus</i> J1074 containing pSET152	This work
HST07-control	<i>S. lividans</i> LJ1018 containing pSET152	This work
HST08-control	<i>S. lividans</i> 1326 containing pSET152	This work
HST09-control	<i>S. coelicolor</i> M1252 containing pSET152	This work
HST10-control	<i>S. coelicolor</i> M1452 containing pSET152	This work
HST11-control	<i>Sac. erythraea</i> LJ161 containing pSET152	This work

表 2 质粒及其特征和来源

Table 2 Plasmids and their properties and sources

Plasmids	Genotype/description	References
pBluescript SK (+)	<i>ColE, lacZ, bla, orif1</i>	[33]
p15A-cm-ccdB	<i>ori(p15A), chl, ccdB</i>	[25]
pSET152	<i>attP, Int, oriT, aac(3)IV</i>	[34]
pJQK652	A p15A-cm-ccdB based plasmid containing <i>nonc</i> -BGC	This work
pJQK653	A pSET152 based plasmid containing <i>nonc</i> -BGC	This work

表3 引物及其序列

Table 3 PCR primers and their sequences

Primers	Sequences (5'→3')	Usage
<i>nonc</i> -HA-p15A-1-F	<u>TATGCACCCTCTAGATGAGGTCGTGTGTTATGGAGATATCCCCAGCCC</u> <u>Gcccagcccgccctaatgagcg</u>	p15A vector fragment carrying the 80 bp target gene cluster
<i>nonc</i> -HA-p15A-1-R	<u>GCATCCAACGAACATGAGGAAGGCTTGTGCTTCGAAGCTTA</u> tctgacctct ggttatg	homology arm
<i>nonc</i> -HA-p15A-2-F	<u>TAAGCTTGCTGGACACCCGCTCGAAGCGGCATGCATATTTAGGGTGAT</u> <u>ATGCACCCTCTAGATGAGG</u> ( <i>Hind</i> III)	
<i>nonc</i> -HA-p15A-2-R	<u>TAAGCTTTCTGGGACACCCCCCTCAGCCTGCCGCGACGGCTCTGC</u> <u>GCATCCAACGAACATGAGGA</u> ( <i>Hind</i> III)	
<i>nonc</i> -pSET152-F	<u>TTCCATGGTTAGCCCTCCCACACATAACCAGGAGGTCAGAT</u> gaagatccttt gatcttttc	Vector fragment with gene cluster homology arms and conjugation transfer element
<i>nonc</i> -pSET152-R	<u>CGCGGGAGCGCGTCCGAGGGCGCCCTCCGCCGAATATGAGTTTCGTT</u> <u>CAT</u> cgatctttgtagaaaccatc	
<i>nonc</i> -MV-F	AAGAGCGTGTGGTCGGCCA	Verification of functional gene
<i>nonc</i> -MV-R	TGTCCGCGCACCGGGCCAGA	
Apr-F	TTCGCATCCCGCTCT	Verification of resistance gene
Apr-R	CGCCTGCCAAATGTAAAGC	

Underlined uppercase letters indicate homology arms, lowercase letters indicate vector fragments, and italic letters indicate enzyme cleavage sites.

### 1.2.3 基因簇克隆载体片段的制备及基因簇的克隆

在两端酶切位点 *Hind* III和 *EcoR* V处分别选取 80 bp 作为体外克隆的同源臂。利用引物对 *nonc*-HA-p15A-1-F/R, 以载体质粒 p15A-cm-ccdB 进行第 1 次扩增, 胶回收纯化获得 1.9 kb 的 PCR 扩增产物。以回收产物为模板, 再利用引物对 *nonc*-HA-p15A-2-F/R 进行第 2 次 PCR 回收, 最终获得浓度为 49.7 ng/μL 的带有 80 bp 同源臂的线性化载体 DNA 片段。混合 3.7 μL 酶切回收后的 DNA 片段(10 μg)、4.0 μL 带有同源臂的线性化载体 p15A (200 ng)、1.3 μL T4 DNA 聚合酶(3 U/μL)和 2 μL 的 10× NEB buffer 2.1, 并加水补足至 20 μL 体系。经 25 °C 反应 1 h、75 °C 反应 20 min 和 50 °C 反应 30 min 完成体外退火后, 脱盐备用。同时, 制备大肠杆菌 GB05-dir 的电转化感受态细胞<sup>[26]</sup>。将混合脱盐产物与 GB05-dir 感受态细胞加入 1 mm 电转杯中, 通过电转化法(电压 1 800 V)导入细胞中完成 2 个线

性片段的重组, 并涂布于带有 0.05% 氯霉素的 LB 固体培养基上, 于 37 °C 培养过夜后, 挑取多个单克隆进行 PCR 验证和酶切验证, 确定目标基因簇体外克隆的完成, 并将质粒命名为 pJQK652。

### 1.2.4 整合型质粒的构建

重组质粒 pJQK652 缺少接合转移必需的整合元件, 故以载体质粒 pSET152 为模板, 利用引物对 *nonc*-pSET152-F/R 进行 PCR 扩增回收, 获得同时带有目标基因簇中 49 bp 同源臂、整合酶编码基因( $\phi$ C31)、*attP* 整合位点( $\phi$ C31)、阿伯拉霉素抗性基因和接合转移元件(*oriT*)的 4.5 kb 载体片段。利用  $\lambda$ -Red 系统介导的线性环性重组技术, 将接合转移元件整合到目标质粒中, 并去除 4 个非目标生物合成基因簇的基因。获得的质粒含有氯霉素和阿伯拉霉素 2 个抗性基因, 通过 *Pst* I 和 *Bgl* II 双酶切验证, 确保同源表达重组质粒构建正确, 命名为 pJQK653。

### 1.3 接合转移和接合子的筛选

通过电转化法将整合型质粒 pJQK653 和

对照质粒 pSET152 分别转入大肠杆菌宿主 ET12567/pUZ8002<sup>[35]</sup>中。培养过夜后, 以 10% 比例接种, 培养 3 h, 用无抗 LB 溶液 2 次洗涤菌体以完全去除抗生素并重悬。同时, 于 TES 溶液中洗涤 3 次后, 50 °C 水浴热激 10 min, 再加入等体积的 2×孢子预萌发培养基和 0.01 mol/L 氯化钙, 于 37 °C 下预萌发 2.5 h, 洗涤并混合后, 涂布于 SFM 固体培养基上。于 30 °C 培养 13–17 h 后, 用含 50 µg/mL 阿泊拉霉素及 40 µg/mL 萘啶酮酸的水进行覆盖, 再于 30 °C 倒置培养 5 d 后, 可观察到接合子。宿主为红色糖多孢菌时, 采用 ISP4 培养基, 于 35 °C 培养 15–20 h 后, 以甲氧苄啶和阿泊拉霉素覆盖。待接合子长出后, 取适量孢子于 TSBY 中培养 1–2 d, 以 2 对特异性引物 *nonc-MV-F/R* 和 *Apr-F/R* 进行 PCR 验证, 确定接合子中目标基因簇整合至异源表达宿主的染色体上。

#### 1.4 链霉菌的培养和保藏

验证正确的阳性接合子分别为以链霉菌为宿主的 HST06、HST07、HST08、HST09、HST10 和以红色糖多孢菌为宿主的 HST11。扩大培养时, 以无菌棉棒刮取板上新鲜孢子均匀涂布培养基表面, 于恒温培养箱中倒置培养 7 d。其中, 链霉菌采用新鲜的 SFM 固体培养基和 30 °C 培养箱, 红色糖多孢菌则采用新鲜的 ESM 固体培养基和 35 °C 培养箱。菌株生长完成后, 利用无菌棉棒刮取培养基表面的新鲜孢子, 重悬于装有 20% 无菌甘油的菌种保藏管中, 充分振荡混匀后于 -30 °C 低温保藏。

#### 1.5 链霉菌的发酵和样品制备

链霉菌宿主发酵采用 R3 和 R5 固体培养基, 红色糖多孢菌采用 EFM 固体培养基。将所得突变株和相应的对照菌株接种于液体培养基 TSBY, 在 30 °C 恒温摇床以转速 220 r/min 振荡培养 1 d 后得到发酵种子液。以 1% (V/V) 比例将种子液均匀接种于制备好的固体培养基

后, 于 30 °C 倒置培养 7 d。发酵完成后, 用无菌解剖刀将固体培养基及其表面菌丝体切割成体积约为 0.5 cm<sup>3</sup> 的小块, 使用甲醇提取培养物, 超声处理 30 min 后获得发酵产物萃取液。离心取上清液减压真空干燥后, 用 1 mL 甲醇溶解, 经 0.22 µm 滤器过滤后即得可用于 HPLC 和 UPLC-QTOF 检测分析的发酵样品。

#### 1.6 发酵产物的分离纯化

选取突变株 HST11 为发酵菌株, 采用 50 mL TSBY 液体培养基, 于 30 °C 振荡培养 2–3 d 获得种子液。配制 10 L EFM 固体培养基, 于每个 15 cm×15 cm×2 cm 培养皿上分别平铺 50 mL, 完成发酵培养基的制备。接种后, 于 30 °C 倒置培养 7 d。发酵完成后, 以 10 L 纯甲醇重复浸泡萃取 4 次, 减压浓缩后获得发酵粗产物 5 g。将所有粗产物上样于 MCI 反向分离柱后, 分别配制甲醇占比 30%、50%、75% 和 100% 的溶液各 1 L 进行梯度分离, 并经检测与浓缩获得初次纯化产物 0.9 g。利用二维高通量分离制备色谱系统对初纯样品进行二次纯化后发现, 减压浓缩的 13 mg 产物纯度低于 80%。因此, 利用 HPLC 在 280 nm 处检测, 以 65% 甲醇、0.4 mL/min 流速对样品进行精细分离纯化, 最终在 20 min 处获得了约 2 mg 纯化样品。

#### 1.7 产物 HPLC 和 UPLC-QTOF MS/MS 检测条件

本研究采用 150 mm×4.6 mm、粒径 5 µm 的 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱; HPLC 检测条件: 以 0.1% 甲酸水为流动相 A, 以纯甲醇为流动相 B, 检测流速为 0.4 mL/min, 检测波长为 280 nm, 进样量为 20 µL; 0–25 min, B 相占比 5%–60%; 25–45 min, B 相占比 60%–100%; 45–53 min, B 相占比 100%; 53–54 min, B 相占比 100%–5%; 54–60 min, B 相占比 5%。UPLC-QTOF 检测时, 柱温为 30 °C, 离子源为

电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI), 雾化温度为 350 °C, 通气量为 8 L/min; 质谱检测采用正离子模式, 扫描范围为 100–3 000 ( $m/z$ ), 二级碰撞能设置为 10、25、40、60 eV。

### 1.8 套索肽 *noncaromin* 的生物活性检测

选取金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* SG511)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 168)、藤黄八叠球菌(*Micrococcus luteus* NCTC 2665)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29853)、大肠杆菌(*Escherichia coli* K-12)和白色念珠菌(*Candida albicans* AKU 4596)共 6 株指示菌, 接种于 LB 液体培养基中, 经 37 °C 培养活化 24 h 后, 取 200  $\mu$ L 与加热溶解并冷却至适当温度的 40 mL 固体培养基 LB 充分混合, 均匀平铺于方形培养皿中。将分离纯化获得的纯品 *noncaromin* 以 65% 甲醇溶解, 获得浓度分别为 2、1、0.5 mg/mL 的产物溶解液, 分别取 100  $\mu$ L 溶液滴加至灭菌牛津杯(放置于生物活性培养基表面)中, 于 37 °C 恒温培养箱正置培养 24 h 后, 观察不同浓度下抑菌圈的大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 II 型套索肽 *noncaromin* 基因簇的选择与分析

通过 antiSMASH 软件分析<sup>[36]</sup>, 我们在野野

村氏菌 HMC10<sup>T</sup> 的全基因组(genome sequence: JOAG00000000.1)中选择了 1 个 II 型套索肽(lasso peptide)类生物合成基因簇作为研究对象。根据核心肽氨基酸的组成预测, 该基因簇可能编码了一个新颖结构的套索肽类化合物, 且核心肽中的芳香氨基酸占比高达 43%, 有利于后续实验中进行色谱相关的分析检测。通过软件分析发现, 该基因簇的完整片段大小约 23.7 kb, 命名为 *nonc*-BGC。利用 FramePlot<sup>[37]</sup> 和 BLAST 软件进一步分析发现, 该基因簇共有 16 个 ORF, 其中包含了负责套索肽合成和成熟的前体肽 A 编码基因(*noncA*)、前导肽酶 B 编码基因(*noncB1* 和 *noncB2*)、套索环化酶 C 编码基因(*noncC*)与负责外排的转运蛋白编码基因(*noncD*)共 5 个关键编码基因(图 1, 表 4)。

### 2.2 利用 DNA 重组技术直接克隆套索肽生物合成基因簇 *nonc*-BGC

使用 *EcoR* V 和 *Hind* III 消化 10  $\mu$ g 的总 DNA, 获得线性化 DNA 样品。同时, 为防止引物过长导致碱基错误率提升, 本研究利用 *nonc*-HA-p15A-1-F/R 和 *nonc*-HA-p15A-2-F/R 这 2 对引物, 以载体质粒 p15A 为模板, 制备两端分别含有 80 bp 同源臂的线性化载体片段。将酶切回收后的 DNA 片段、带有同源臂的线性化载体 p15A 经 T4 聚合酶处理后, 将反应样品进

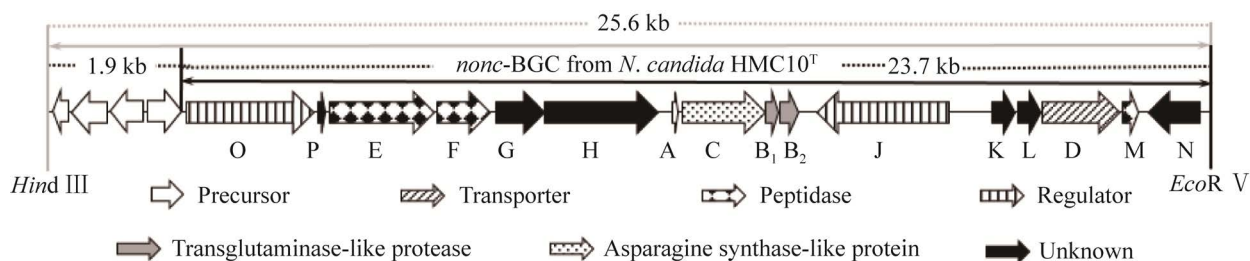


图 1 念珠状野野村氏菌 HMC10<sup>T</sup> 中套索肽 *noncaromin* 的生物合成基因簇  
Figure 1 The biosynthetic gene cluster of *noncaromin* in *N. candida* HMC10<sup>T</sup>.



行脱盐待用。制备含有 RecET 重组系统的菌株 *E. coli* GB05-dir 的感受态, 将处理好的脱盐反应物通过电转化导入该菌株中(图 2A)。过夜培养后, 挑取单克隆进行培养, 再利用 *nonc-*

MV-F/R 引物对通过 PCR 筛选, 挑选出正确的克隆。接着, 提取正确克隆的质粒, 再利用 *Pst* I 和 *Bgl* II 酶切验证, 获得正确的目标质粒, 命名为 pJQK652 (图 2B)。

表 4 套索肽 *noncaromin* 生物合成基因簇中编码蛋白的功能预测

Table 4 Proposed functions of proteins encoded by *nonc*-BGC

Gene	aa	Proposed function	Identity aa/%	Accession No.
O	975	CsgD family transcriptional regulator	97	MBB6547160.1
P	58	Hypothetical protein B0I32_13224	73	PRX52274.1
E	800	Peptidase S8 and S53	86	SBO95635.1
F	414	Peptidase S8	91	WP_185101844.1
G	405	Hypothetical protein B0I32_13221	90	PRX52271.1
H	867	S8 family serine peptidase	96	WP_148436427.1
A	42	Hypothetical protein HMPREF1486_02664	57	EPD94850.1
C	634	Asparagine synthase	47	RMI42804.1
B1	96	Coenzyme PQQ synthesis protein D (PqqD)	69	MBB6347668.1
B2	139	Transglutaminase superfamily protein	81	MBB6347667.1
J	1 044	Transcriptional activator of the SARP family	80	SEG88985.1
K	183	Hypothetical protein	77	WP_132603269.1
L	179	Hypothetical protein	78	WP_132632875.1
D	599	ABC transporter	81	KJK45081.1
M	125	S26 family signal peptidase	79	WP_109638471.1
N	404	Subtilase family protein	86	PRX69084.1

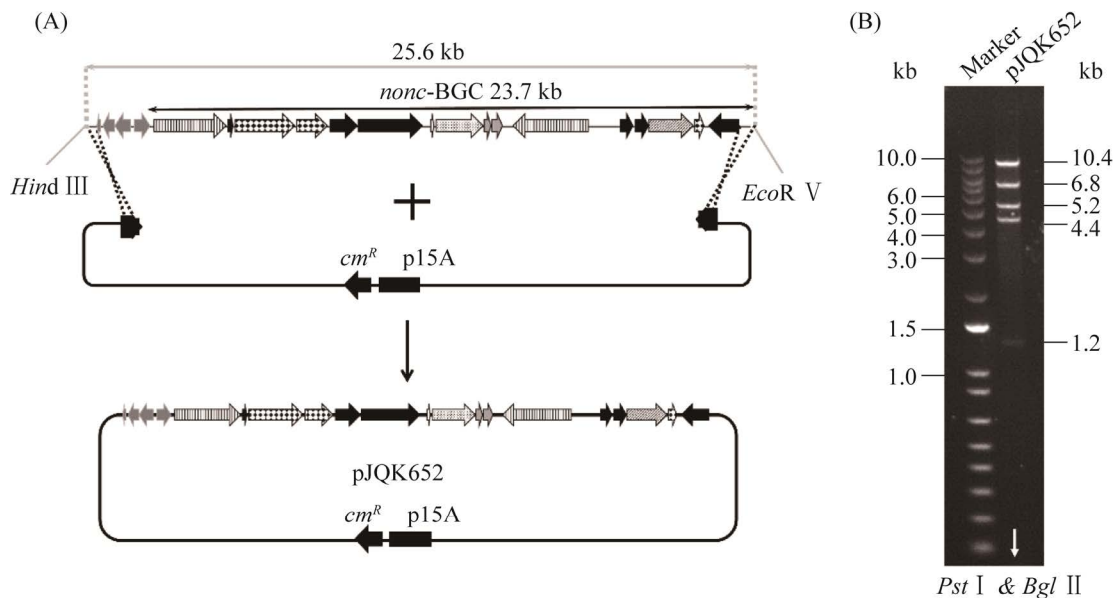


图 2 pJQK652 质粒的构建和验证

Figure 2 Construction and validation of pJQK652. A: cloning of *nonc*-BGC using ExoCET strategy; B: enzymatic verification of pJQK652 by the digestion of *Pst* I and *Bgl* II.

### 2.3 利用 $\lambda$ -Red 系统介导的重组技术改造异源表达质粒

以载体质粒 pSET152 为模板, 利用引物对 *nonc*-pSET152-F/R 进行 PCR 扩增, 回收带有同源臂、阿伯拉霉素抗性基因和接合转移所需整合元件的片段共 4.5 kb (图 3B)。同时, 制备大肠杆菌宿主 GB08 的感受态细胞(诱导重组系统的表达), 将质粒 pJQK652 与片段同时通过电转化导入宿主 *E. coli* GB08 中, 利用  $\lambda$ -Red 系统介导的线性环性重组技术<sup>[26]</sup>, 将 4.5 kb 片段替换质粒 pJQK652 中 4 个不需要的基因(图 3A)。挑取重组克隆进行培养, 提取质粒, 通过 *Pst* I 和 *Sac* I 酶切进一步验证, 确定酶切条带与预期的

目标条带完全相符, 证明整合型重组质粒的构建完成, 并命名为 pJQK653 (图 3C)。

### 2.4 生物合成基因簇的异源表达

我们选择了 5 个链霉菌底盘宿主(*S. albus* J1074、*S. lividans* 1326、*S. lividans* LJ1018、*S. coelicolor* M1252 和 *S. coelicolor* M1452) 和 1 个红色糖多孢菌底盘宿主 *Sac. erythraea* LJ161 对所克隆的目标基因簇进行表达。通过接合转移将质粒 pJQK653 分别导入 6 个目标底盘菌株后, 分别利用引物对 *Apr*-F/R 和 *nonc*-MV-F/R 进行 PCR 验证, 预期扩增的目标条带分别为 474 bp 和 901 bp (图 4)。筛选获得正确的异源表达菌株并分别命名为 HST06 A-C (*S. albus* J1074::pJQK653)、

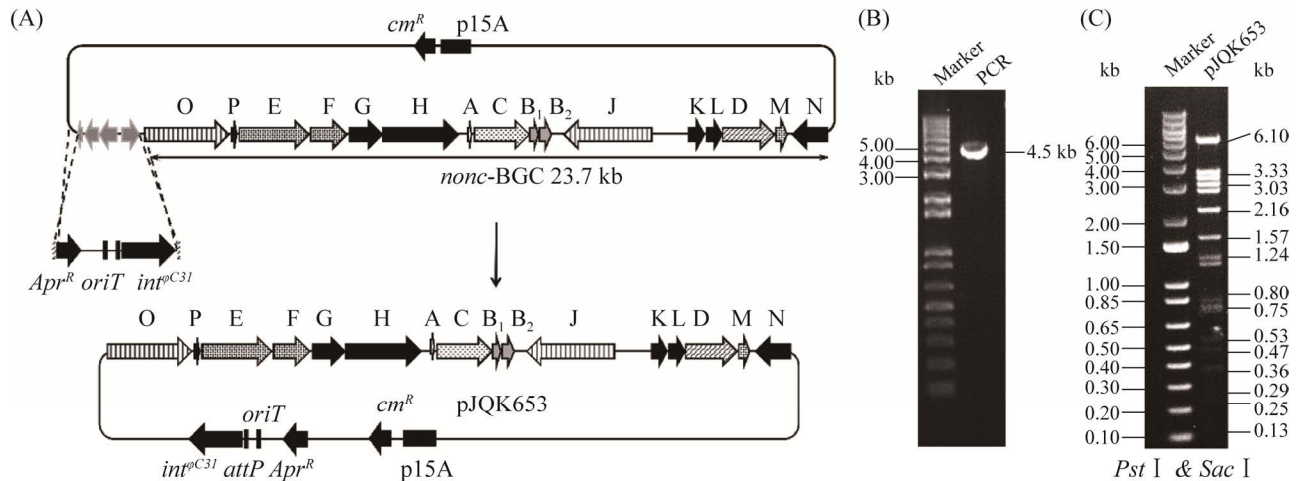


图 3 pJQK653 质粒的构建和验证

Figure 3 Construction and validation of pJQK653. A: the construction of integrative plasmid pJQK653; B: PCR recovery of 4.5 kb gene fragment; C: enzymatic verification for pJQK653 by *Pst* I and *Sac* I.

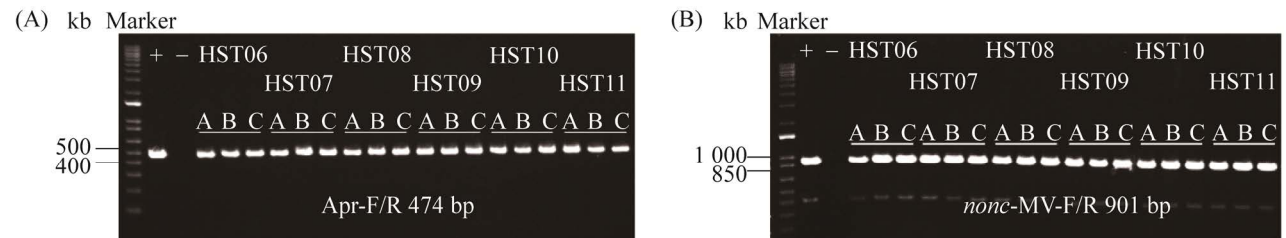


图 4 异源表达菌株的 PCR 验证结果

Figure 4 PCR validation of the recombinant strains. A: PCR amplification results of apramycin resistance gene; B: PCR amplification results of the target functional gene.

HST07 A-C (*S. lividans* LJ1018::pJQK653)、HST08 A-C (*S. lividans* 1326::pJQK653)、HST09 A-C (*S. coelicolor* M1252::pJQK653)、HST10 A-C (*S. coelicolor* M1452::pJQK653)和 HST11 A-C (*Sac. erythraea* LJ161::pJQK653)。此外,以相同方式成功构建携带空载体 pSET152 质粒的 6 个底盘菌株作为对照(分别为 HST06-control、HST07-control、HST08-control、HST09-control、HST010-control 和 HST11-control)。

## 2.5 重组菌株的发酵及套索肽的检测结果

重组菌株 HST06 及其对照菌株采用 R5 固体培养基, HST07、HST08、HST09 和 HST10 及其对照菌株采用 R3 固体培养基,这些菌株均在 30 °C 培养箱中发酵 7 d<sup>[22]</sup>。菌株 HST11 及其对照菌株选用的是 EFM 固体发酵培养基,于 35 °C 条件下发酵 7 d<sup>[24]</sup>。待发酵完成后,以甲醇超声提取发酵产物,再用减压浓缩和微孔滤器过滤获得提取物样品,即可用于后续的检测和生物活性分析实验。

结合套索肽成环位点与前体肽 A 的氨基酸组成进行分析,推测该基因簇编码的化合物可

能为一个十六肽(GYPLGDFPDSLYWYYW),且在第 9 位 Asp 与第 1 位 Gly 间通过异肽键形成大内酰胺环。利用 mMass 软件分析<sup>[38]</sup>确定化合物的预测分子式为 C<sub>104</sub>H<sub>122</sub>O<sub>25</sub>N<sub>18</sub>,质荷比为  $m/z=2\ 023.890\ 1\ [M+H]^+$ 。然后,利用 QTOF-ESI-MS 对获得的样品进行检测,结果显示,对照株(包括野生菌株)中均不存在目标产物,而 HST06-HST11 共 6 株突变株中均存在质荷比  $m/z=2\ 023.883\ 7\ [M+H]^+$  和  $m/z=2\ 045.864\ 1\ [M+Na]^+$  的信号(图 5A),这些信号与预测的分子量相一致。因此,我们将该化合物命名为 noncaromin。但是,HPLC 色谱峰显示该化合物在所有异源表达宿主中的产量均非常低(图 5B)。

## 2.6 目标产物的二级质谱鉴定和活性检测

选取相对高产的突变菌株 HST11 为发酵菌株,将发酵种子液按比例接种涂布于 10 L EFM 固体培养基上进行发酵。但由于该化合物的发酵产量太低,经过系统的精细分离只获得不到 2 mg 的纯品。经 NMR 核磁分析显示样品浓度不足后,我们利用高分辨率液相-质谱联用的 QTOF LC/MS 检测纯化得到的 noncaromin(图 6A),并

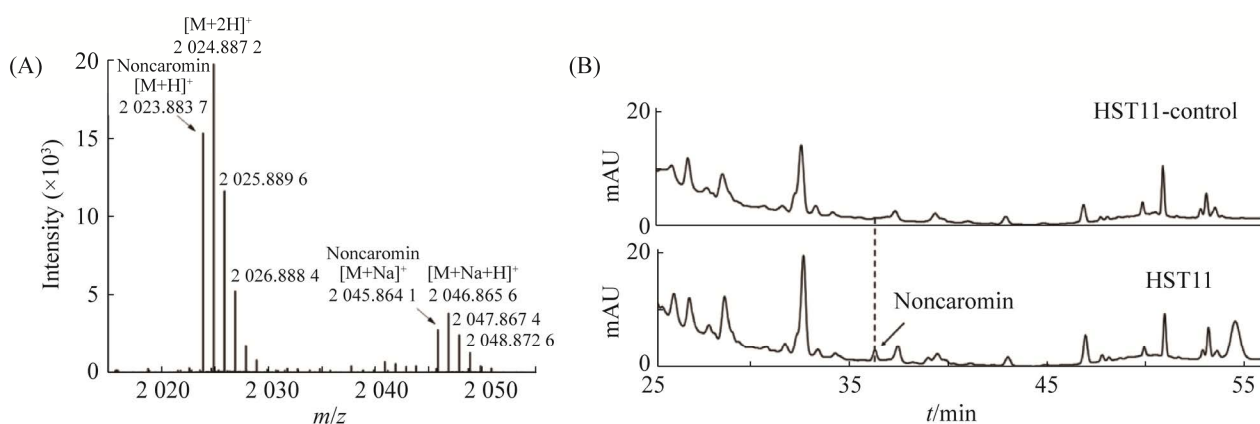


图 5 发酵产物的检测与分析结果

Figure 5 The results of detection and analysis of fermentation products. The results of QTOF-ESI-MS analysis of fermentation products in heterologous expression strains (A) and HPLC analysis results of fermentation products from strains HST11-control & HST11 (B).

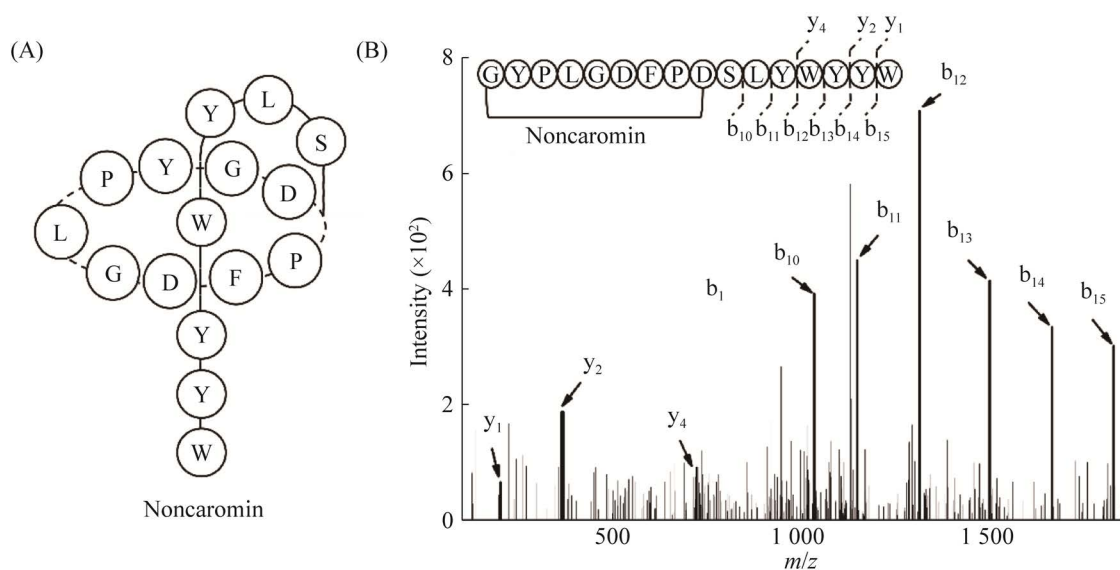


图 6 套索肽 noncaromin 的结构鉴定

Figure 6 Structural identification of the lasso peptide noncaromin. The schematic diagram of the structure of noncaromin (A) and MS/MS<sup>2</sup> spectra of noncaromin (B).

进行二级质谱断裂分析。该化合物的二级质谱断裂主要发生在大内酰胺环外的 C 端肽链尾上, ESI-MS<sup>2</sup> 断裂信号除了 b<sub>1</sub>-b<sub>9</sub> 碎片, 可观察到包括 b<sub>10</sub> 在内的 b 系列各种碎裂碎片, 说明在 G<sub>1</sub> 与 D<sub>9</sub> 氨基酸残基之间形成了一个环状结构, 证明套索肽 noncaromin 的结构与预测相符(图 6B)。同时, 经计算, 无论是 y 系列还是 b 系列的断裂碎片, 其检测值与预测值间的误差大都小于 10 ppm, 说明二级质谱检测数据可信度高(表 5)。

为确定 noncaromin 的生物活性, 我们针对 6 种活性指示菌(包括金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、藤黄八叠球菌和白色念珠菌)制作用于生物活性分析的固体培养基, 以 65% 甲醇溶解纯化得到的 noncaromin 制成 3 种浓度的溶液进行生物活性检测。其中, 以 1 mg/mL 卡那霉素为阳性对照, 甲醇为阴性对照, 利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 168)作为指示菌进行生物活性检测的结

果如图 7 所示, 说明 noncaromin 具有微弱的抗枯草芽孢杆菌活性。

### 3 讨论与结论

微生物是天然产物的重要来源之一, 但目前可培养的微生物种类仅占全种类的 1%<sup>[39]</sup>, 说

表 5 套索肽 noncaromin 的二级质谱断裂数据  
Table 5 MS/MS spectra data of noncaromin

Ion	Calc./Da	Obs./Da	Error/ppm
M+Na	2 045.872 1	2 045.864 1	-3.9
M+H	2 023.890 1	2 023.883 7	-3.2
b <sub>15</sub>	1 819.800 3	1 819.777 2	-12.7
b <sub>14</sub>	1 656.736 9	1 656.746 0	5.5
b <sub>13</sub>	1 493.673 6	1 493.669 6	-2.7
b <sub>12</sub>	1 307.594 3	1 307.588 2	-4.7
b <sub>11</sub>	1 144.531 0	1 144.522 1	-7.8
b <sub>10</sub>	1 031.446 9	1 031.440 3	-6.4
y <sub>1</sub>	205.097 2	205.092 9	-21.0
y <sub>2</sub>	368.160 5	368.159 1	-3.8
y <sub>4</sub>	717.303 1	717.290 2	-18.0



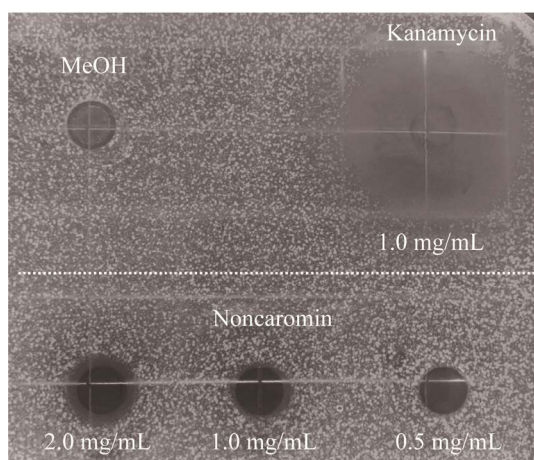


图7 套索肽 noncaromin 的抑制枯草芽孢杆菌的分析结果

Figure 7 Inhibition activity against *Bacillus subtilis* 168 of noncaromin.

明微生物在新型天然产物挖掘方面仍具有极高的潜力。而且,随着生物信息学的兴起和代谢途径的深入研究,利用基因组数据挖掘微生物中潜在的次级代谢产物生物合成基因簇成为新的手段<sup>[40]</sup>。研究表明,通过改造调控基因、优化发酵条件和共培养等方式可以激活一些沉默表达的基因簇<sup>[41]</sup>。但是,由于很多菌株的遗传操作困难而难以实现,基因簇的克隆和异源表达逐渐成为微生物次级代谢产物挖掘的重要手段。本研究通过体外克隆基因簇,利用链霉菌异源表达体系激活并高效获得沉默套索肽 noncaromin,为后续高效获得原始菌株其他新型天然产物奠定基础。

套索肽因其特殊的互锁拓扑结构而脱颖而出,该类化合物的生物合成主要依赖于前导肽酶 B 和套索环化酶 C 对前体肽 A 的作用,且目前无法通过其他合成手段获得套索肽的稳定结环结构。另外,套索肽也具有许多的翻译后修饰,如瓜氨酸化、磷酸化、巯基化和乙酰化等<sup>[42]</sup>,这些多样化的修饰不仅赋予了这类产物的结构多样性,而且对发挥其生理活性也有着重要的

影响。本研究中发掘并异源表达的新型 II 类套索肽 noncaromin 具有多个芳香氨基酸,有利于低浓度下的色谱检测,后续通过多定点突变实验和修饰酶体外反应,可构建多个套索肽类衍生物,从而扩大套索肽类产物结构多样性和功能多样性。

研究表明,天然产物 BGCs 异源表达成功的关键在于底盘宿主的选择<sup>[43]</sup>。常用的链霉菌底盘宿主要有 3 种,分别为 *S. albus* J1074、*S. coelicolor* 衍生菌株(如 M1152 和 M1146 等)<sup>[44]</sup>和 *S. lividans* 来源的菌株(如 SBT5 和 LJ1018 等)<sup>[30]</sup>。这些菌株具有遗传背景清晰、遗传操作简单、次级代谢干扰较少、能为大多数异源天然产物的合成提供足够水平的生物合成前体等特点,不同的衍生菌株还兼具着独特优势,已经成为众多天然产物 BGCs 异源表达的可靠宿主。因此,我们在实验中也选择了这些底盘菌株对获得的 nonc-BGC 进行异源表达情况的考察,结果显示,套索肽 noncaromin 的产量均较低。此外,研究发现,利用亲缘关系较近的底盘菌株来表达可以提升目标产物表达的成功率<sup>[45]</sup>,如 Kunakom 等<sup>[46]</sup>在 *Burkholderia* 中获得高产 capistrain。本研究中获得的 nonc-BGC 是克隆自稀有放线菌中的野野村氏菌属的染色体。因此,在该基因簇的异源表达研究中,还选择了我们实验室自己开发的稀有放线菌 *Sac. erythraea*<sup>[32]</sup>作为异源表达宿主。结果显示,尽管目标化合物的产量依然较低,经初步比较,套索肽 noncaromin 在宿主 *Sac. erythraea* 中的产量是最高的。该结果说明,红色糖多孢菌对 nonc-BGC 的兼容性更高,其原因可能在于稀有放线菌间亲缘性近、遗传特点类似,易于基因簇中功能基因的表达和翻译后修饰。

外源基因簇高效表达的影响因素多样,除对异源宿主优化外,异源表达效率可通过多种

手段改进, 包括提高基因簇拷贝数、启动子工程<sup>[35]</sup>、调整染色体上整合位置和调控元件优化等<sup>[47]</sup>。后续若要进一步提高套索肽 noncaromin 的产量, 可从拷贝数的增加、整合位点和正/负调控因子的改变等方向进行优化, 从而完善套索肽 noncaromin 的立体结构的确定和结构多样性的创制。总之, 本研究结合了天然产物生物合成基因簇的 ExoCET 克隆技术与多样化放线菌底盘宿主的异源表达, 在 *N. candida* HMC10<sup>T</sup> 中发掘了一个新结构 II 型套索肽 noncaromin, 为其他新型天然产物的挖掘和异源表达提供了借鉴。

## 参考文献

- [1] Tiwari K, Gupta RK. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2012, 32(2): 108–132.
- [2] Sungthong R, Nakaew N. The genus *Nonomuraea*: a review of a rare actinomycete taxon for novel metabolites. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(5): 554–565.
- [3] Fleck WF, Strauss DG, Meyer J, Porstendorfer G. Fermentation, isolation, and biological activity of maduramycin: a new antibiotic from *Actinomadura rubra*. *Z Allg Mikrobiol*, 1978, 18(6): 389–398.
- [4] Gauze GF, Sveshnikova MA, Ukholina RS, Gavrilina GV, Filicheva VA. Production of antineoplastic antibiotic carminomycin by *Actinomadura carminata* sp. nov.. *Antibiotiki*, 1973, 18(8): 675–678.
- [5] Igarashi Y, Mogi T, Yanase S, Miyanaga S, Fujita T, Sakurai H, Saiki I, Ohsaki A. Brartemicin, an inhibitor of tumor cell invasion from the actinomycete *Nonomuraea* sp.. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(5): 980–982.
- [6] Roes ML, Meyers PR. *Nonomuraea candida* sp. nov., a new species from south African soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2008, 93(1/2): 133–139.
- [7] Dang T, Süßmuth RD. Bioactive peptide natural products as lead structures for medicinal use. *Accounts of Chemical Research*, 2017, 50(7): 1566–1576.
- [8] Süßmuth RD, Mainz A. Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects. *Angewandte Chemie: International Ed in English*, 2017, 56(14): 3770–3821.
- [9] Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, Camarero JA, Campopiano DJ, Challis GL, Clardy J, Cotter PD, Craik DJ, Dawson M, Dittmann E, Donadio S, Dorrestein PC, Entian KD, Fischbach MA, Garavelli JS, Göransson U, Gruber CW, Haft DH, Hemscheidt TK, Hertweck C, Hill C, Horswill AR, Jaspars M, Kelly WL, Klinman JP, Kuipers OP, Link AJ, Liu W, Marahiel MA, Mitchell DA, Moll GN, Moore BS, Müller R, Nair SK, Nes IF, Norris GE, Olivera BM, Onaka H, Patchett ML, Piel J, Reaney MJ, Rebuffat S, Ross RP, Sahl HG, Schmidt EW, Selsted ME, Severinov K, Shen B, Sivonen K, Smith L, Stein T, Süßmuth RD, Tagg JR, Tang GL, Truman AW, Vederas JC, Walsh CT, Walton JD, Wenzel SC, Willey JM, Van Der Donk WA. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, 2013, 30(1): 108–160.
- [10] Zhong Z, He B, Li J, Li YX. Challenges and advances in genome mining of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2020, 5(3): 155–172.
- [11] Hegemann JD, Zimmermann M, Xie X, Marahiel MA. Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products. *Accounts of Chemical Research*, 2015, 48(7): 1909–1919.
- [12] Maksimov MO, Pan SJ, James Link A. Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. *Natural Product Reports*, 2012, 29(9): 996–1006.
- [13] Lin PF, Samanta H, Bechtold CM, Deminie CA, Patick AK, Alam M, Riccardi K, Rose RE, White RJ, Colonna RJ. Characterization of siamycin I, a human immunodeficiency virus fusion inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40(1): 133–138.
- [14] Tietz JI, Schwalen CJ, Patel PS, Maxson T, Blair PM, Tai HC, Zakai UI, Mitchell DA. A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(5): 470–478.
- [15] Bellomio A, Rintoul MR, Morero RD. Chemical modification of microcin J25 with diethylpyrocarbonate and carbodiimide: evidence for essential histidyl and carboxyl residues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 303(2): 458–462.
- [16] Knappe TA, Linne U, Xie X, Marahiel MA. The glucagon receptor antagonist BI-32169 constitutes a

- new class of lasso peptides. *FEBS Letters*, 2010, 584(4): 785–789.
- [17] Delgado MA, Rintoul MR, Farias RN, Salomon RA. *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(15): 4543–4550.
- [18] Gavrish E, Sit CS, Cao S, Kandror O, Spoering A, Peoples A, Ling L, Fetterman A, Hughes D, Bissell A, Torrey H, Akopian T, Mueller A, Epstein S, Goldberg A, Clardy J, Lewis K. Lassomycin, a ribosomally synthesized cyclic peptide, kills *Mycobacterium tuberculosis* by targeting the ATP-dependent protease ClpC<sub>1</sub>P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>. *Chemistry & Biology*, 2014, 21(4): 509–518.
- [19] Pan SJ, Rajniak J, Cheung WL, Link AJ. Construction of a single polypeptide that matures and exports the lasso peptide microcin J25. *Chembiochem*, 2012, 13(3): 367–370.
- [20] Yan KP, Li Y, Zirah S, Goulard C, Knappe TA, Marahiel MA, Rebuffat S. Dissecting the maturation steps of the lasso peptide microcin J25 *in vitro*. *Chembiochem*, 2012, 13(7): 1046–1052.
- [21] Green MR, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. *Analytical Biochemistry*, 2001, 186(1): 182–183.
- [22] Tobias K, Mervyn JB, Mark JB, Keith FC, David AH. Practical *Streptomyces* genetics. *John Innes Foundation*, 2000.
- [23] Shima J, Hesketh A, Okamoto S, Kawamoto S, Ochi K. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(24): 7276–7284.
- [24] Li YY, Chang X, Yu WB, Li H, Ye ZQ, Yu H, Liu BH, Zhang Y, Zhang SL, Ye BC, Li YX. Systems perspectives on erythromycin biosynthesis by comparative genomic and transcriptomic analyses of *S. erythraea* E3 and NRRL23338 strains. *BMC Genomics*, 2013, 14: 523.
- [25] Wang HL, Li Z, Jia RN, Yin J, Li AY, Xia LQ, Yin YL, Müller R, Fu J, Stewart AF, Zhang YM. ExoCET: exonuclease *in vitro* assembly combined with RecET recombination for highly efficient direct DNA cloning from complex genomes. *Nucleic Acids Research*, 2017, 46(5): e28.
- [26] Wang HL, Bian XY, Xia LQ, Ding XZ, Müller R, Zhang YM, Fu J, Stewart AF. Improved seamless mutagenesis by recombineering using *ccdB* for counterselection. *Nucleic Acids Research*, 2013, 42(5): e37.
- [27] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 204–211.
- [28] Chater KF, Wilde LC. Restriction of a bacteriophage of *Streptomyces albus* G involving endonuclease *Sal* I. *Archives Des Maladies Du Coeur et Des Vaisseaux*, 1976, 128(2): 644–650.
- [29] Li L, Zheng G, Chen J, Ge M, Jiang W, Lu Y. Multiplexed site-specific genome engineering for overproducing bioactive secondary metabolites in actinomycetes. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 80–92.
- [30] Peng Q, Gao G, Lü J, Long Q, Chen X, Zhang F, Xu M, Liu K, Wang Y, Deng Z, Li Z, Tao M. Engineered *Streptomyces lividans* strains for optimal identification and expression of cryptic biosynthetic gene clusters. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3042.
- [31] Cruz-Morales P, Vijgenboom E, Iruegas-Bocardo F, Girard G, Yáñez-Guerra LA, Ramos-Aboites HE, Pernodet JL, Anné J, Van Wezel GP, Barona-Gómez F. The genome sequence of *Streptomyces lividans* 66 reveals a novel tRNA-dependent peptide biosynthetic system within a metal-related genomic island. *Genome Biology and Evolution*, 2013, 5(6): 1165–1175.
- [32] Lü J, Long Q, Zhao Z, Chen L, He W, Hong J, Liu K, Wang Y, Pang X, Deng Z, Tao M. Engineering the erythromycin-producing strain *Saccharopolyspora erythraea* HOE107 for the heterologous production of polyketide antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 593217.
- [33] Kang JS, Son BW, Choi HD, Yoon JH, Son WS. Dynamics of supercoiled and linear pBluescript II SK(+) phagemids probed with a long-lifetime metal-ligand complex. *Journal of Biochemical Molecular Biology*, 2005, 38(1): 104–110.
- [34] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schonher BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.. *Gene*, 1992, 116(1): 43–49.
- [35] Li X, Hu X, Sheng Y, Wang H, Tao M, Ou Y, Deng Z, Bai L, Kang Q. Adaptive optimization boosted the production of moenomycin A in the microbial chassis *Streptomyces albus* J1074. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(9): 2210–2221.

- [36] Blin K, Shaw S, Kautsar SA, Medema MH, Weber T. The antiSMASH database version 3: increased taxonomic coverage and new query features for modular enzymes. *Nucleic Acids Research*, 2020, 49(D1): D639–D643.
- [37] Ishikawa J, Hotta K. FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G+C content. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 174(2): 251–253.
- [38] Strohal M, Hassman M, Kosata B, Kodíček M. mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008, 22(6): 905–908.
- [39] Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, Salamov AA, Chen K, Chang HW, Podar M, Short JM, Mathur EJ, Detter JC, Bork P, Hugenholtz P, Rubin EM. Comparative metagenomics of microbial communities. *PLoS One*, 2005, 308(5721): 554–557.
- [40] 杨谦, 程伯涛, 汤志军, 刘文. 基因组挖掘在天然产物发现中的应用和前景. *合成生物学*, 2021, 2(5): 697–715.  
Yang Q, Cheng BT, Tang ZJ, Liu W. Applications and prospects of genome mining in the discovery of natural products. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(5): 697–715. (in Chinese)
- [41] Rutledge PJ, Challis GL. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(8): 509–523.
- [42] Cao L, Beiser M, Koos JD, Orlova M, Elashal HE, Schröder HV, Link AJ. Cellulonodin-2 and lihuanodin: lasso peptides with an aspartimide post-translational modification. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(30): 11690–11702.
- [43] Kang HS, Kim ES. Recent advances in heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* hosts. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 69: 118–127.
- [44] Gomez EJP, Bibb MJ. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(2): 207–215.
- [45] Huo L, Hug JJ, Fu C, Bian X, Zhang Y, Müller R. Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways. *Natural Product Reports*, 2019, 36(10): 1412–1436.
- [46] Kunakom S, Eustáquio AS. Heterologous production of lasso peptide capistrucin in a *Burkholderia* host. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(2): 241–248.
- [47] Zhang JJ, Tang X, Zhang M, Nguyen D, Moore BS. Broad-host-range expression reveals native and host regulatory elements that influence heterologous antibiotic production in Gram-negative bacteria. *mBio*, 2017, 8(5): e01291-17.