

雷帕链霉菌未知天然产物合成基因簇异源表达与新结构混源萜 rapamylic acids A-C 鉴定

虞旭昶^{1,2}, 游蕤翔², 吴雨洙², 孙润泽², 陈少欣³, 吴辉^{1*}, 李雷^{2*}

1 华东理工大学 生物工程学院, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海

2 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

3 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院, 先导物成药性研究全国重点实验室, 上海

虞旭昶, 游蕤翔, 吴雨洙, 孙润泽, 陈少欣, 吴辉, 李雷. 雷帕链霉菌未知天然产物合成基因簇异源表达与新结构混源萜 rapamylic acids A-C 鉴定[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2214-2228.

YU Xuchang, YOU Ruixiang, WU Yuzhu, SUN Runze, CHEN Shaoxin, WU Hui, LI Lei. Heterologous expression of unknown natural product biosynthetic gene clusters from *Streptomyces rapamycinicus* and identification of novel meroterpenoids rapamylic acids A-C[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(5): 2214-2228.

摘要:【目的】雷帕链霉菌编码 55 个天然产物合成基因簇, 蕴藏着丰富的生物合成潜力, 但绝大部分基因簇尚未被鉴定。本研究旨在通过构建细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)文库, 批量克隆雷帕链霉菌的新型基因簇, 并将其导入模式链霉菌中进行异源表达, 从而获得一系列新结构化合物。【方法】对雷帕链霉菌 SIPI RP202 编码的合成基因簇进行新颖性分析, 挑选出 11 个编码非核糖体肽、聚酮或萜类的未知基因簇; 构建 BAC 文库, 并通过 PCR 筛选获得目标基因簇; 利用接合转移将这些基因导入 3 种异源表达底盘菌株中, 采用 3 种发酵培养基和 2 种发酵液萃取方法。利用 LC-MS 检测基因簇是否成功表达, 最终对新结构化合物进行分离、纯化与结构解析。【结果】成功在一个未知的萜类合成基因簇中实现了异源表达, 将其导入白色链霉菌 Del14 后, 获得了 3 个新结构的芳香族混源萜化合物 rapamylic acids A-C。结合化合物的结构特征与基因簇信息, 推导了其潜在的生物合成途径。【结论】本研究基于批量基因簇高效克隆与异源表达策略, 成功激活了一个雷帕链霉菌的沉默基因簇, 为其他链霉菌沉默基因簇的表征提供了新思路。同时, rapamylic acids A-C 作为全新结构的混源萜类化合物, 也进一步拓展了细菌萜类化合物的多样性。

关键词: 雷帕链霉菌; 基因组挖掘; 文库构建; 异源表达; 混源萜

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFA0916200)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFA0916200).

*Corresponding authors. E-mail: LI Lei, lei.li@sytu.edu.cn; WU Hui, huiwu@ecust.edu.cn

Received: 2024-12-12; Accepted: 2025-01-02; Published online: 2025-03-05

Heterologous expression of unknown natural product biosynthetic gene clusters from *Streptomyces rapamycinicus* and identification of novel meroterpenoids rapamylic acids A–C

YU Xuchang^{1,2}, YOU Ruixiang², WU Yuzhu², SUN Runze², CHEN Shaoxin³, WU Hui^{1*}, LI Lei^{2*}

1 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai, China

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

3 National Key Laboratory of Lead Druggability Research, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai, China

Abstract: [Objective] *Streptomyces rapamycinicus* has large biosynthetic potential with 55 natural product biosynthetic gene clusters (BGCs), most of which have not yet been identified. This study aims to obtain a series of novel compounds by Bacterial Artificial Chromosome (BAC) library-based cloning of novel BGCs from *S. rapamycinicus* on a large scale and then heterologously expressing them in model *Streptomyces* strains. [Methods] The bioinformatics analysis of the novelty of BGCs screened out 11 unknown BGCs encoding non-ribosomal peptides, polyketides or terpenoids, from *S. rapamycinicus* SIPI RP202. Then, we cloned these BGCs by constructing a BAC library and screening via PCR, and then introduced them into three heterologous expression hosts by conjugative transfer. Finally, LC-MS was employed to detect whether these BGCs were successfully expressed after fermentation in three media and fermentation broth extraction with two approaches. Novel compounds were separated, purified, and structurally elucidated. [Results] An unknown terpenoid BGC was successfully expressed in *Streptomyces albus* Del14. Three novel aromatic meroterpenoids, rapamylic acids A–C, were identified. Then, the potential biosynthetic pathways of rapamylic acids A–C were proposed based on their structural features and BGC. [Conclusion] We successfully unlocked a silent BGC from *S. rapamycinicus* by large-scale BGC cloning and heterologous expression, providing an alternative strategy for the activation of silent BGCs from other *Streptomyces* strains. Meanwhile, the discovery of this kind of novel meroterpenoids expands the structural diversity of bacterial terpenoids.

Keywords: *Streptomyces rapamycinicus*; genome mining; library construction; heterologous expression; meroterpenoid

链霉菌来源的天然产物是小分子药物的主要来源, 在医学、农业与畜牧业等领域发挥着重要作用^[1]。近年来, 随着低成本、高通量 DNA 测序技术的发展, 大规模基因组测序揭示了链霉菌蕴藏着巨大的生物合成潜力, 为新型

天然产物的挖掘提供了丰富的资源^[2-4]。然而, 研究表明超过 90% 的链霉菌天然产物生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster, BGC)在实验室条件下处于“沉默”状态。如何激活这些“沉默”基因簇, 已成为目前获取新结构天然产物的重

点与难点^[5-6]。过去 10 年间,多种合成生物学策略相继被开发用于链霉菌“沉默”基因簇的表征,包括启动子工程、调控网络优化以及文库构建与异源表达等^[7-13]。其中,(宏)基因组文库构建与基因簇异源表达的策略,因能够单次批量表征新型基因簇而受到广泛关注^[14-17]。基因组文库构建主要采用黏粒(cosmid)、细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)与 P1 人工染色体(P1-derived artificial chromosome, PAC)等可以携带大片段 DNA (40 kb 以上)的载体,其中 BAC 文库可携带 100–200 kb 的大尺度基因簇,因此被广泛用于细菌基因组文库的构建^[13-18]。结合目标基因簇靶向筛选与异源表达,能够使天然产物合成途径与编码产物快速偶联,显著加速新结构天然产物的高效挖掘。例如,上海交通大学陶美凤课题组构建了娄彻氏链霉菌 Sal35 基因组 BAC 文库,利用高通量的文库表达筛选系统,实现了“点对点”的基因簇异源表达和产物抗菌活性筛选,成功鉴定了一种新型羊毛硫肽化合物 lexapeptide^[16,19]。

雷帕链霉菌(*Streptomyces rapamycinicus*)是一种重要的工业微生物,用于生产被广泛使用的免疫抑制剂雷帕霉素^[20]。此外,大多数链霉菌基因组一般含有 20–30 个天然产物合成基因簇,但雷帕链霉菌基因组中却含有多达 55 个天然产物合成基因簇。其中,仅有 6 个基因簇的编码产物被鉴定^[21-26],绝大部分仍处于“沉默”未表征状态,尤其是结构多样、成药性高的非核糖体肽(non-ribosomal peptides, NRPs)、聚酮

(polyketides, PKs)与萜类(terpenoids)等合成基因簇,表明雷帕链霉菌仍具有巨大的挖掘潜力,有望获得更多新结构天然产物^[27-29]。本研究不再局限于雷帕链霉菌来源的基因簇原位非靶向激活,而是将克隆的基因簇导入不同的模式链霉菌底盘细胞^[30-31],采用异源表达策略批量靶向表征感兴趣的基因簇。本研究所报道的新型混源萜类化合物,不仅拓展了细菌萜类化合物的结构多样性,而且其发现策略也为其他链霉菌沉默基因簇的激活提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

本研究中采用的基因簇克隆与表达菌株及其用途如表 1 所示,活性测试菌株与细胞信息的原始数据存储在微生物科学数据中心(<http://nmdc.cn>),编号为 NMDCX0002077。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0,用于大肠杆菌培养;YPD 培养基(g/L):酵母提取物 10.0,蛋白胨 20.0,葡萄糖 20.0,用于真菌培养;TSBY 培养基(g/L):胰蛋白胨大豆肉汤(TSB) 30.0,蔗糖 103.0,酵母提取物 5.0, 115 °C 灭菌 30 min,灭菌后添加终浓度为 0.5% 的甘氨酸,用于文库构建时雷帕链霉菌培养;YENB 培养基(g/L):酵母提取物 7.5,蛋白胨 5.0,牛肉浸膏 3.0, pH

表1 本研究中所用菌株及其用途

Table 1 Strains and their functions in this study

Strains	Description
<i>Streptomyces rapamycinicus</i> SIPI RP202	Mutated strain of <i>S. rapamycinicus</i> ATCC 29253 for BAC library construction
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Donor strain carrying BAC plasmids for conjugative transfer
<i>Escherichia coli</i> ET12567/pUB307	Donor strain carrying the assisted plasmid pUB307 for conjugative transfer
<i>Streptomyces albus</i> Del14 ^[31]	Heterologous expression host
<i>Streptomyces lividans</i> SBT5	Heterologous expression host
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1152	Heterologous expression host

7.0, 用于制备高效大肠杆菌 DH10B 电转感受态; 2×YT 培养基(g/L): 胰蛋白胨 16.0, 酵母提取物 10.0, NaCl 5.0, pH 7.2, 用于异源表达底盘链霉菌的收集及接合转移; MS 培养基(g/L): 黄豆饼粉 20.0, 甘露醇 20.0, 琼脂粉 20.0, 用于 3 种异源表达底盘链霉菌孢子培养及发酵; MISP4 培养基(g/L): 黄豆饼粉 5.0, 甘露醇 5.0, 可溶性淀粉 5.0, 蛋白胨 2.0, 酵母粉 1.0, NaCl 1.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, K₂HPO₄ 1.0, CaCO₃ 2.0, 琼脂粉 20.0, 微量元素溶液(ZnSO₄ 1.0, FeSO₄ 1.0, MnSO₄ 1.0) 1 mL, pH 7.0, 灭菌后加入终浓度为 10 mmol/L MgCl₂ 用于接合转移; TSB 培养基(g/L): 胰蛋白胨大豆肉汤 30.0, 用于发酵时异源表达底盘链霉菌种子培养; A3M 培养基(g/L): 葡萄糖 5.0, 甘油 20.0, 可溶性淀粉 20.0, 棉籽粉 15.0, 酵母提取物 3.0, pH 7.0, 用于发酵培养; R5a 培养基(g/L): 蔗糖 100.0, MOPS 21.0, 葡萄糖 10.0, MgCl₂·6H₂O 10.12, 酵母提取物 5.0, 酪蛋白氨基酸 0.1, NaOH 2.0, K₂SO₄ 0.25, CaCl₂ 0.005 88, ZnCl₂ 0.000 08, FeCl₃·6H₂O 0.000 4, MnCl₂ 0.000 02, CuCl₂ 0.000 02, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.000 02, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.000 02, pH 6.9, 用于发酵培养。

1.1.3 主要试剂和仪器

分析级甲醇、乙酸乙酯, 上海泰坦科技股份有限公司; 色谱级甲醇、乙腈, 北京迪科马科技有限公司; 限制性内切酶、FastAP 去磷酸化酶, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; T4 连接酶, 纽英伦生物技术(北京)有限公司; 2×PCR Mix, 上海圣尔生物科技有限公司; Ultra GelRed Nucleic Acid Stain, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; HP20 大孔吸附树脂, 上海源叶生物科技有限公司; DNA 胶回收试剂盒、小质粒提取试剂盒和细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; BAC/PAC DNA 小量提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; Griess 试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司; PCR 引物合成及产物测序由上海擎科生物科技

有限公司完成, BAC 末端测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

600 MHz 核磁共振仪, 布鲁克(北京)科技有限公司; 1260 系列高效液相色谱、6230 系列 TOF 质谱联用仪(Agilent XBridge C18 柱, 4.6 mm×150 mm, 5 μm)以及 1260 系列半制备高效液相色谱仪(XBridge BEH C18 OBD Prep 柱, 10 mm×150 mm, 5 μm), 安捷伦科技(中国)有限公司; PCR 仪、脉冲场凝胶电泳仪和电洗脱仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 真空浓缩仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 振荡培养箱, 上海旻泉仪器有限公司。

1.2 雷帕链霉菌天然产物合成基因簇分析

将测序完整的雷帕链霉菌 ATCC 29253 基因组序列上传至 antiSMASH 网站(<https://antismash.secondarymetabolites.org/>)进行天然产物合成基因簇分析, 并结合 NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对各基因簇中基因的功能进行分析注释。通过 antiSMASH 及 MIBiG 数据库对基因簇的新颖性进行分析, 从中选择 11 个与已知基因簇相似度较低的、新颖的非核糖体肽、聚酮或萜类合成基因簇进行研究。

1.3 雷帕链霉菌基因组 BAC 文库构建与基因簇筛选鉴定

1.3.1 BAC 载体制备

使用小质粒提取试剂盒(TIANprep Mini Plasmid Kit)提取 pHZAUFJXJ 质粒(简称 pHZ, 由武汉八颗星生物科技有限公司提供), 用 BamHI 酶切质粒, 并用 FastAP 去磷酸化酶进行载体去磷处理, 通过胶回收纯化获得脱磷载体片段。

1.3.2 雷帕链霉菌大片段基因组 DNA 制备

采用低熔点琼脂糖包埋法提取雷帕链霉菌基因组 DNA。首先, 用 TSBY 培养基培养雷帕链霉菌 SIPI RP202 菌株 48 h, 收集 5–10 g 菌体; 然后用 1.5% 低熔点琼脂糖包埋菌体, 获得菌体包埋块。依次用 2 mg/mL 溶菌酶(1×TE)、

1% SDS 和 1 mg/mL 蛋白酶 K (1×TE) 预处理菌体包埋块, 并用含 1 mmol/L PMSF (10×TE) 溶液处理后, 获得雷帕链霉菌基因组 DNA 包埋块, 悬浮于 1×TE 中 4 °C 保存备用。

对 DNA 包埋块进行 *Bam*H I 部分酶切, 确定最佳酶切时间和酶切浓度, 并通过脉冲场电泳确定电泳条件, 确保酶切获得的片段大小在 100–300 kb 之间; 通过大规模包埋块酶切与脉冲电泳, 获得大量 >100 kb 的大片段基因组 DNA 片段。将 100–300 kb 范围内的 DNA 胶块切下, 用电洗脱仪将 DNA 洗脱至 1×TAE 缓冲液中。

1.3.3 载体与大片段 DNA 连接以及文库构建

将载体与电洗脱回收的大片段 DNA 立即进行 T4 连接酶连接反应, 16 °C 连接过夜。将连接产物在脱盐胶上冰浴静置 1 h 以实现脱盐; 将脱盐后的连接产物与大肠杆菌 DH10B 感受态混匀, 进行电转; 37 °C 复苏 1 h 后, 涂布于含有阿普拉霉素 (50 µg/mL)、IPTG (100 µg/mL) 和 X-gal (80 µg/mL) 的 LB 固体培养基上, 37 °C 倒置培养 16–20 h。从 LB 平板上挑取 30 个白色克隆, 提取对应 BAC 质粒, 通过酶切与脉冲电泳验证 BAC 大小和文库质量。

从 LB 平板上挑取大量白色克隆转移至 384 孔板中, 37 °C 培养 20 h, 待转化子长出后保存。BAC 文库构建流程参照文献 [13, 19, 32] 中的方法。

1.3.4 目标基因簇筛选鉴定

从 antiSMASH 上下载对应基因簇序列, 分别设计上、中、下 3 对引物。用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取雷帕链霉菌 SIPI RP202 基因组, 以此为模板验证引物的可用性 (国家微生物科学数据中心编号为 NMDCX0002077)。利用 BAC/PAC DNA 小量提取试剂盒提取 BAC 文库各行列池的混合质粒, 以混合质粒为模板, 在每个基因簇的上、中、下游位置分别设计引物, 对每块 384 孔板的所有行列池进行 PCR 筛选,

定位目标阳性克隆。PCR 反应体系 (25 µL): 2×PCR Mix 12.5 µL, 上、下游引物 (10 µmol/L) 各 1 µL, DNA 模板 0.5 µL, ddH₂O 10 µL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。挑取定位的阳性克隆, 提取 BAC 质粒, 通过二次 PCR 鉴定与产物测序进行 BAC 鉴定。将 BAC 质粒进行末端测序, 确定 BAC 所含基因簇的大小及基因组所在位置。

1.4 异源表达工程菌构建

1.4.1 异源宿主底盘链霉菌的选择与生孢

研究表明白色链霉菌、天蓝色链霉菌以及变铅青链霉菌系列底盘菌株具有遗传操作简便、生长快速、使用范围广且异源表达产量高等优势, 已作为通用宿主广泛应用于外源基因簇的表达鉴定^[30,33-34]。此外, Myronovskiy 等在白色链霉菌 J1074 基础上开发了 Del14 系列菌株, 使其遗传背景更为干净, 在天然产物表征方面具有显著优势^[31]。因此, 本研究选用白色链霉菌 Del14、天蓝色链霉菌 M1152 和变铅青链霉菌 SBT5 作为异源表达宿主, 将 3 种异源表达菌株分别涂布于 MS 培养基上, 30 °C 培养箱培养 5–7 d 获得孢子。

1.4.2 三亲接合转移获得异源表达工程菌

从 BAC 文库中筛选出含有目标基因簇的供体菌大肠杆菌 DH10B/BACs (阿普拉霉素抗性) 和辅助菌大肠杆菌 ET12567/pUB307 (卡那霉素与氯霉素抗性), 划三线并挑取单菌落接种于 6 mL LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养过夜。按 1% 接种量接种于 50 mL LB 液体培养基中, 继续培养 2–3 h, 至 *OD*₆₀₀ 为 0.4–0.6, 4 °C、4 500 r/min 离心 5 min 后收集菌体, 弃上清, 用新鲜 LB 洗涤 2 遍以去除残留抗生素, 并用 LB 重悬至 100 µL, 将 2 种大肠杆菌等体积混合。

从新鲜生孢的培养基上刮取各异源表达宿主

链霉菌孢子, 用 2×YT 洗涤孢子后重悬至 100 μL , 并与上述大肠杆菌混合, 涂布于接合转移培养基 MISP4 (含 10 mmol/L Mg^{2+}) 上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16–18 h 后, 覆盖萘啶酮酸和阿普拉霉素至接合转移平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 3–5 d 获得接合子。

1.4.3 异源表达工程菌纯化与保菌

挑取阳性接合子, 转接至含有萘啶酮酸和阿普拉霉素的生孢培养基上, 经三代纯化后, 待长出孢子菌落, 通过 PCR 验证含有目标基因簇。用 20% 甘油收集异源表达工程菌孢子, -80°C 保存备用。

1.5 异源宿主发酵检测

1.5.1 异源宿主工程菌种子与发酵培养

用灭菌牙签刮取所有异源底盘工程菌孢子, 接种于 TSB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 48 h 获得种子液; 收集工程菌种子液, 固定每一组实验组与对照组的菌体湿重, 并以相同的种子湿重接种于发酵培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 7 d。

针对新型天然产物的挖掘, 过去的研究已采用多种常规发酵培养基进行菌株发酵。例如, 2018 年, He 等采用 A3M 培养基从印度异壁链霉菌(*Streptoalloteichus hindustanus*)中分离出 4 种新的邻苯二酚衍生物 hinduchelins A–D^[35]。2022 年, Libis 等利用白色链霉菌 J1074 和变铅青链霉菌 RedStrep 1.7 进行异源表达, 采用 R5a 培养基进行发酵, 从中分离出 prolinolexin、cinnaemexin 和 conkatamycin 3 种新化合物^[17]。Zhang 等^[36]采用 MS 培养基对 PPTase 激活的菌株进行发酵测试, 从中获得了多个新结构天然产物。鉴于此, 本研究采用 MS、A3M 与 R5a 这 3 种发酵培养基进行后续的工程菌发酵。

1.5.2 发酵样品处理

培养结束后, 收集发酵液 35 mL, 4 500 r/min 离心 10 min。取发酵液上清 15 mL 与质量体积分数为 4% 的 HP20 大孔吸附树脂在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 条件下孵育 3–5 h, 用两层纱布过滤。将树脂洗

涤后收集在 50 mL 离心管中, 加 12 mL 甲醇超声 20 min, 使树脂吸附的化合物溶解于甲醇溶液中, 收集甲醇溶液 10 mL。将剩余 20 mL 发酵液用等体积乙酸乙酯萃取, 4 500 r/min 离心 10 min, 收集上层萃取液 10 mL。将 2 种处理方式获得的样品进行真空浓缩, 用 200 μL 甲醇溶解, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清进行 LC-MS 检测。

1.5.3 发酵处理液 LC-MS 检测

采用安捷伦 Xbridge C18 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 在安捷伦 1260 系列高效液相色谱仪上采集并与 6230 系列 TOF 质谱仪连接, 由 MassHunter 软件控制, 进行发酵代谢物检测与分析。对于所有液相色谱分析, 使用溶剂 A: H_2O (含 0.1% 体积分数的甲酸) 和溶剂 B: CH_3CN (含 0.1% 体积分数的甲酸)。乙酸乙酯萃取液检测条件: $t=0-1$ min, 5% 溶剂 B; $t=1-2$ min, 5%–30% 溶剂 B; $t=2-20$ min, 30%–95% 溶剂 B; $t=20-25$ min, 95% 溶剂 B; $t=25-26$ min, 95%–5% 溶剂 B; $t=26-30$ min, 5% 溶剂 B; 流速 0.4 mL/min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 。HP20 提取物检测条件: $t=0-1$ min, 5% 溶剂 B; $t=1-15$ min, 5%–50% 溶剂 B; $t=15-20$ min, 50%–95% 溶剂 B; $t=20-25$ min, 95% 溶剂 B; $t=25-26$ min, 95%–5% 溶剂 B; $t=26-30$ min, 5% 溶剂 B; 流速 0.4 mL/min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.6 放大发酵与目标化合物分离纯化

将白色链霉菌 Del14/pHZ-1-7B 工程菌的孢子悬浮液接种到 50 mL TSB 中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 48 h。将 10 mL 种子培养物转移到 500 mL R5a 发酵液中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡 7 d 后, 用乙酸乙酯萃取 12 L 发酵培养物, 经旋蒸与真空浓缩得到 2.78 g 粗提取物。随后用 Sephadex LH-20 凝胶分离, 甲醇洗脱后收集含有目标化合物的组分(0.84 g)。对合并的含目标化合物组分的样品采用安捷伦 1260 系列高效液相色谱(Xbridge BEH Prep C18 柱, 10 mm×150 mm, 5 μm , 130 $\text{\AA}$)进行二轮纯化。对于所有液相色谱分析, 使用溶剂 A: H_2O (含 0.1% 体积分数的

甲酸)和溶剂 B: CH₃CN (含 0.1% 体积分数的甲酸)。洗脱条件: $t=0-2$ min, 35% 溶剂 B; $t=2-35$ min, 35%-65% 溶剂 B; $t=35-36$ min, 65%-95% 溶剂 B; $t=36-38$ min, 95% 溶剂 B; $t=38-39$ min, 95%-35% 溶剂 B; $t=39-40$ min, 35% 溶剂 B; 流速 2 mL/min, 25 °C。馏分收集器收集对应目标化合物, 通过 LC-MS 分析确定目标化合物的保留时间与纯度。

1.7 化合物活性测试

1.7.1 抗菌活性测试

所有抗菌实验均在 96 孔微量滴定板上使用培养基微量稀释法进行。对于 *Staphylococcus aureus* Newman 菌株, 过夜培养后 LB 稀释 10 000 倍; 对于 *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 菌株, 过夜培养后 LB 稀释 2 000 倍; 其余菌株过夜培养后用 LB 稀释 5 000 倍。过夜培养的真菌使用 YPD 培养基稀释 5 000 倍。将 100 μ L 稀释菌液与 100 μ L 2 倍连续稀释的化合物混合, 终浓度范围为 64–0.125 μ g/mL。将 96 孔微量滴定板在 37 °C 下培养 16 h 后观察抑菌情况。抑制可见微生物生长的最低浓度被记录为最小抑制浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), 所有 MIC 测定均重复 2 次。

1.7.2 细胞毒性测试

采用 CCK-8 法测试 3 种化合物的细胞毒性, 测试的人源细胞系为 HEK293T 和 HeLa。在 96 孔板中每孔加入 100 μ L 测试细胞, 使细胞数约为 5 000 个。将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h, 使细胞贴壁。每孔分别加入 32、16、8、4、2、1、0.5、0.125 μ g/mL 的化合物(以 2 μ mol/L 紫杉醇为阳性对照), 置于细胞培养箱中孵育。24 h 后加入 CCK-8 溶液, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 计算细胞存活率。

1.7.3 抗炎活性测试

利用小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 极化产生的 NO 含量来表征炎症程度。实验中, NO 含量的减少表明化合物具有抑制炎症的活性。首先准

备 RAW 264.7 细胞, 将生长状态良好的 RAW 264.7 细胞接种于 96 孔板中, 密度为 5×10^4 /孔, 每孔体积为 200 μ L。细胞培养 20 h 后, 用不同浓度的化合物进行处理(以 L-NMMA 为阳性对照), 随后加入 1 μ g/mL LPS, 放入培养箱中孵育过夜, 12 h 后取细胞上清液, 利用 Griess 试剂盒测定 570 nm 处的吸光度, 从而确定 NO 浓度。

2 结果与分析

2.1 雷帕链霉菌来源的天然产物合成基因簇新颖性分析

antiSMASH 7.1.0 预测结果表明, 雷帕链霉菌 SIPI RP202 基因组中包含 55 个天然产物合成基因簇。其中, 只有 6 个基因簇被鉴定, 其产物包括雷帕霉素、放线菌酸、尼日利亚菌素、洋橄榄叶素、安莎类抗生素和六烯类抗生素^[21-26]。虽然剩余基因簇中 15 个被预测编码已知化合物, 但仍有 35 个基因簇具有不同程度的新颖性, 可能编码多种新结构天然产物。其中, 编码非核糖体肽、聚酮或萜类的基因簇多达 16 个(图 1A)。基于 antiSMASH 结果, 系统分析了这 16 个基因簇的新颖性, 并选择 11 个进行后续研究(图 1B、1C), 包括 3 个萜类、4 个聚酮类、3 个非核糖体肽类和 1 个聚酮与非核糖体肽杂合类的合成基因簇。

2.2 高质量雷帕链霉菌基因组 BAC 文库构建与 11 个目标基因簇批量克隆

为了同时克隆所有 11 个目标基因簇, 构建了雷帕链霉菌基因组 BAC 文库, 包含 2 304 个克隆, 分布在 6 块 384 孔板中(图 2A)。随机挑取 30 个 BACs 进行文库质量鉴定, 平均插入片段大小为 150.5 kb, 表明所构建的文库覆盖基因组倍数约为 27.3 倍, 每块 384 孔板的基因组覆盖倍数为 4.6 倍(国家微生物科学数据中心编号为 NMDCX0002077)。在获得高质量雷帕链霉菌基因组 BAC 文库后, 针对 11 个基因簇分别设计了行列池 PCR 筛选引物, 获得了包含目标基

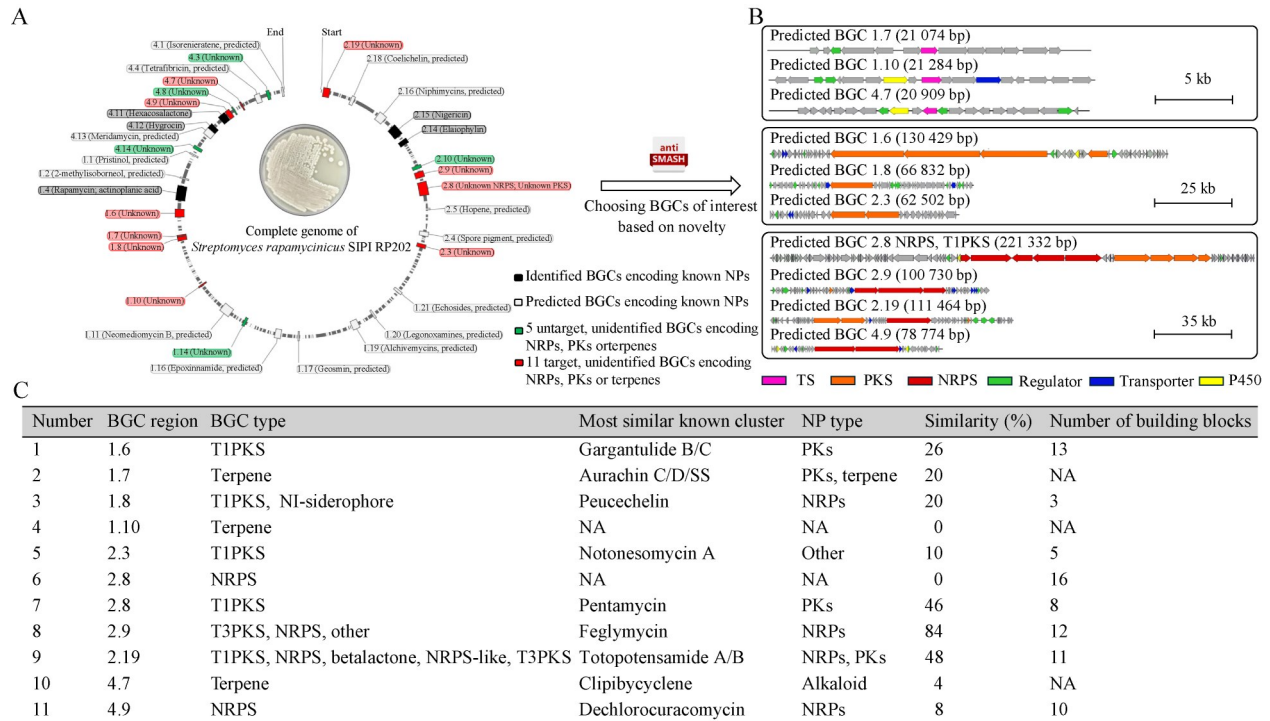


图1 雷帕链霉菌来源的天然产物合成基因簇与本研究选择的基因簇新颖性分析。A: 雷帕链霉菌中已知与未知基因簇分布, 红色底纹标注的基因簇表示本研究选择的11个未知的、编码非核糖体肽、聚酮或萜类化合物的合成基因簇; B: 选择的11个基因簇结构; C: 选择的11个基因簇新颖性分析。

Figure 1 The natural product BGCs and the novelty analysis of selected BGCs in this study from *Streptomyces rapamycinicus* SIPI RP202. A: The known and unidentified BGCs in *Streptomyces rapamycinicus* SIPI RP202. 11 selected new BGCs are marked in red, which encode NRPs, PKs or Terpenes; B: Schematic diagram of 11 selected BGCs; C: The novelty analysis of 11 selected BGCs.

因簇的 BACs, 并通过 BAC 末端测序确定了克隆的基因簇大小(图 2B)。

2.3 11 个目标基因簇的异源表达

将筛选到的含有目标基因簇的 BACs 的克隆载体 pHZ (作为阴性对照)通过三亲接合转移方式分别导入 3 种模式链霉菌进行异源表达, 包括白色链霉菌(*Streptomyces albus*) Del14、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) M1152 与变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*) SBT5 (表 1)。通过抗性筛选获得接合子, 并经菌落 PCR 鉴定, 成功获得了所有 11 个基因簇的 3 种异源表达工程菌。采用 R5a、MS、A3M 等 3 种发酵培养基对上述所有工程菌在 30 °C、200 r/min 条件下发

酵 7 d 后, 通过大孔吸附树脂 HP20 和乙酸乙酯分别处理发酵液, 并基于液相色谱-质谱(LC-MS)分析检测目标化合物是否产生(图 2C)。与导入空载体 pHZ 的白色链霉菌 Del14 (*S. albus* Del14/pHZ)相比, 导入 1.7 BGC region 对应的萜类合成基因簇的白色链霉菌 Del14 工程菌(*S. albus* Del14/pHZ-1.7B)在 R5a 培养基中鉴定到 3 个新的紫外吸收差异峰, 保留时间分别为 10.0、13.5 和 15.0 min (图 2C)。特别地, 这 3 个新峰在质谱负模式检测下显示出非常干净的 $[M-H]^-$ 数据, 分别为 276.125 0、318.171 5 和 344.187 3, 表明工程菌可能产生了 3 个潜在的新化合物(图 2D)。同时, 还能观察到这 3 个潜在化合物在质谱检测时对应的 $[2M-H]^-$ 结果(图 2D)。

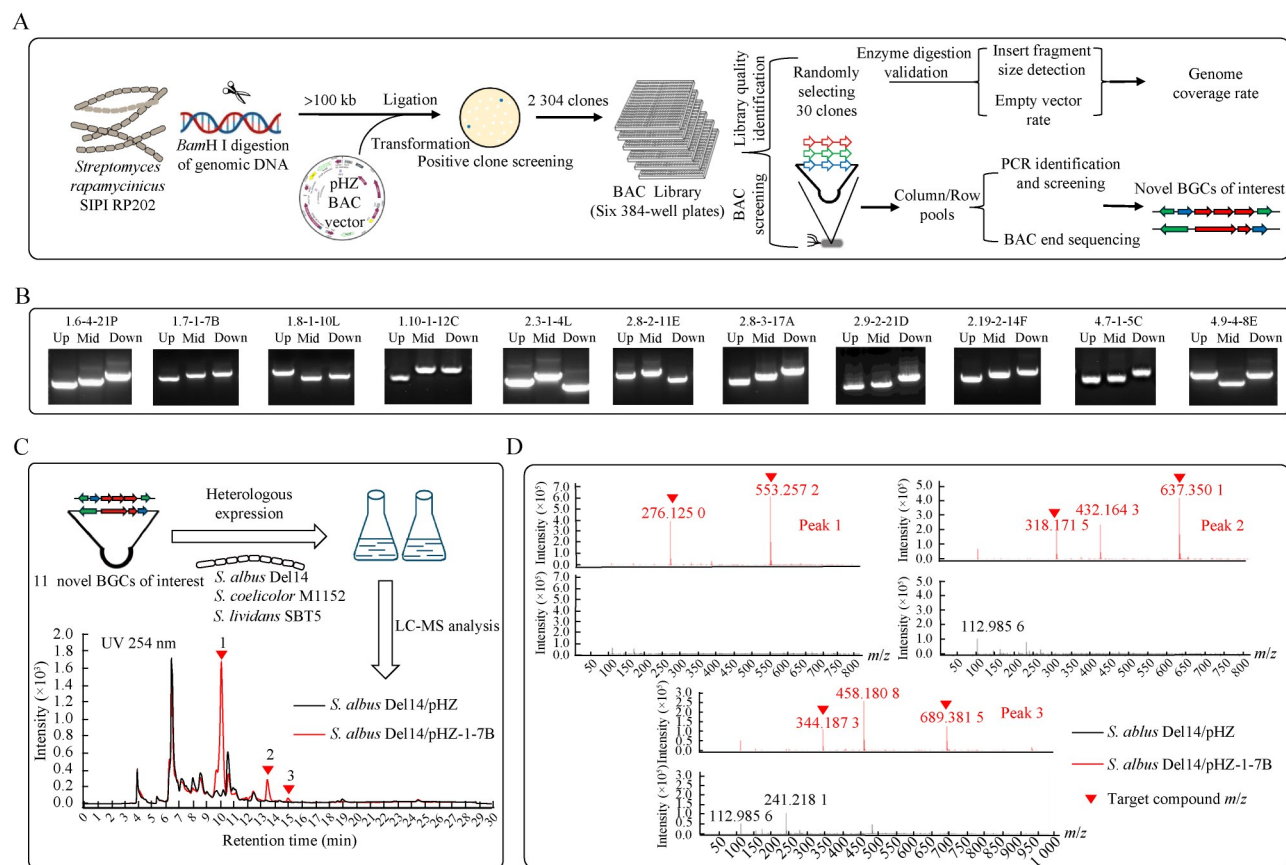


图2 雷帕链霉菌基因组BAC文库构建、目标基因簇筛选及异源表达。A：雷帕链霉菌基因组BAC文库构建流程图；B：含11个目标基因簇的BAC质粒PCR筛选鉴定；C：11个基因簇异源表达与发酵结果分析，其中白色链霉菌Del14/pHZ-1-7B工程菌相对白色链霉菌Del14/pHZ多出3个紫外吸收差异峰；D：白色链霉菌Del14/pHZ-1-7B工程菌中3个紫外吸收差异峰对应的化合物质谱分析。

Figure 2 BAC library construction for the genome of *Streptomyces rapamycinicus* as well as screening and heterologous expression of target BGCs. A: Pipeline for constructing BAC library of *S. rapamycinicus* SIPI RP202; B: PCR screening of BAC plasmids containing 11 target BGCs; C: Heterologous expression followed by fermentational analysis of 11 target BGCs. The target peaks are marked in red arrow; D: MS analysis of three target peaks in *S. albus* Del14/pHZ-1-7B.

2.4 异源宿主工程菌白色链霉菌 Del14/pHZ-1-7B 中潜在新化合物的分离纯化与结构鉴定

为了获得白色链霉菌 Del14/pHZ-1-7B 产生的潜在新化合物，对其进行了大规模发酵。采用 R5a 培养基发酵获得 12 L 发酵液后，通过乙酸乙酯萃取发酵液并旋蒸浓缩，待蒸发至恒重后称重，获得棕色油膏状粗样 2.78 g。使用

Sephadex LH-20 凝胶柱进行潜在新化合物的第一轮纯化，从第 31–60 管的甲醇洗脱液中检测到目标化合物，合并后共收集浓缩获得粗样 0.84 g。利用安捷伦半制备高效液相色谱进行纯化，最终分离出 3 个紫外吸收差异峰对应的目标化合物，其中 Peak 1 为 36.1 mg、Peak 2 为 8.2 mg、Peak 3 为 1.8 mg。

紫外吸收图谱显示，Peak 1 在 204、222、

244 和 280 nm 处有最大吸收峰, Peak 2 在 204、222、244 和 284 nm 处有最大吸收峰, Peak 3 在 204、244 和 286 nm 处有最大吸收峰。Peak 1 和 Peak 2 的紫外吸收图谱十分接近(国家微生物科学数据中心编号为 NMDCX0002077)。通过高分辨质谱并结合氢谱和碳谱核磁数据, 确定了 3 个目标化合物的分子式, 分别为 Peak 1: $C_{15}H_{19}NO_4$, $[M-H]^-$ 理论值为 276.124 1, 实际观察值为 276.124 3; Peak 2: $C_{18}H_{25}NO_4$, $[M-H]^-$ 理论值为 318.171 1, 实际观察值为 318.171 1; Peak 3: $C_{20}H_{27}NO_4$, $[M-H]^-$ 理论值为 344.186 7, 实际观察值为 344.186 7。结合一维和二维核磁数据, 分别归属了 3 个化合物的碳原子和氢原子, 从而解析了它们对应的化学结构(图 3A)。通过与 SciFinder 和微谱等已知数据库比对, 确认 Peaks 1-3 对应的化合物均为新结构化合物。作为一类新型芳香族混源萜化合物, 3 个化合物的结构中均含有 1 个苯环骨架, 并包含 3 个取代基: 第 1 个是羟基, 第 2 个是酰胺基, 第 3 个是不同碳链长度并修饰的异戊烯基。结合该类化合物的来源与结构特征, 将其分别命名为 Rapamylic acids A、B 和 C (图 3A)。

2.5 Rapamylic acids 潜在的生物合成途径推测

通过对 rapamylic acids 合成基因簇的注释以及对不同编码蛋白功能的详细分析(图 3B、3C), 进一步分析了该基因簇在其他链霉菌中的分布情况。结果表明, rapamylic acids 合成基因簇并非雷帕链霉菌所独有, 其高度同源基因簇在多种链霉菌中广泛分布, 例如 *Streptomyces rhizosphaericus*、*Streptomyces* sp. MK37H 和 *Streptomyces* sp. NPDC059455 等, 其中关键功能蛋白萜类合酶和异戊烯基转移酶的相似性均达到 97% 以上。

本研究所发现的 rapamylic acids 是一类含有典型异戊烯基侧链的芳香族混源萜类化合物。芳香族混源萜类化合物多为 1,2,4-三取代苯基萜

类化合物, 其芳香族骨架主要来源于为莽草酸途径^[37]。萜类合成起始于异戊烯基焦磷酸(isoprenyl diphosphate, IPP)与二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP), 在异戊烯基转移酶(prenyltransferase, PT)的催化下生成不同碳链长度的异戊烯基骨架。最后, 在萜类合酶(terpene synthases, TS)的催化下, 将异戊烯基加载至苯环上, 形成芳香族混源萜^[38]。

本研究同时推测了这 3 个新化合物的潜在合成途径。首先, 在由 *rmaB*、*rmaD* 和 *rmaE* 等基因组成的甲基赤藓糖醇磷酸(MEP)途径催化下合成 IPP 和 DMAPP, 并通过 *rmaI* 编码的酶催化形成法尼基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)^[38-39]。1,2,4-三取代的苯环骨架则通过 *rmaF*、*rmaH* 和 *rmaG* 等基因催化形成。Rapamylic acids 合成基因簇缺乏编码 3-羟基-4-氨基苯甲酸酰化酶、3-羟基-4-氨基苯甲酸脱羧酶和异戊烯基链羧化酶相关基因。推测这些功能可能由异源表达宿主白色链霉菌中的内源性酶替代, 这或许也是在原始宿主雷帕链霉菌中未检测到 rapamylic acids 的原因之一^[40]。其次, 在 *ramC* 编码的萜类合酶的催化下形成法尼基焦磷酸修饰的 3-羟基-4-酰胺化的混源萜前体。最后, 受脂肪酸 β -氧化(peroxisomal β -oxidation)中“Cleavage Pathway”途径的启发^[41-42], rapamylic acids 中不同碳链长度的异戊烯基侧链的形成很可能通过 β -氧化途径实现异戊烯基链的不同碳原子数目的丢失, 最终形成结构多样的 3 类新型芳香族混源萜(图 4)。

2.6 Rapamylic acids A-C 化合物活性测试

本研究对 rapamylic acids A-C 的生物活性进行了测试, 包括抗菌活性(涵盖 4 株革兰氏阳性菌、4 株革兰氏阴性菌和 2 株真菌)、细胞毒性与抗炎活性。遗憾的是, 这些化合物均未表现出明显的活性(国家微生物科学数据中心编号为 NMDCX0002077)。

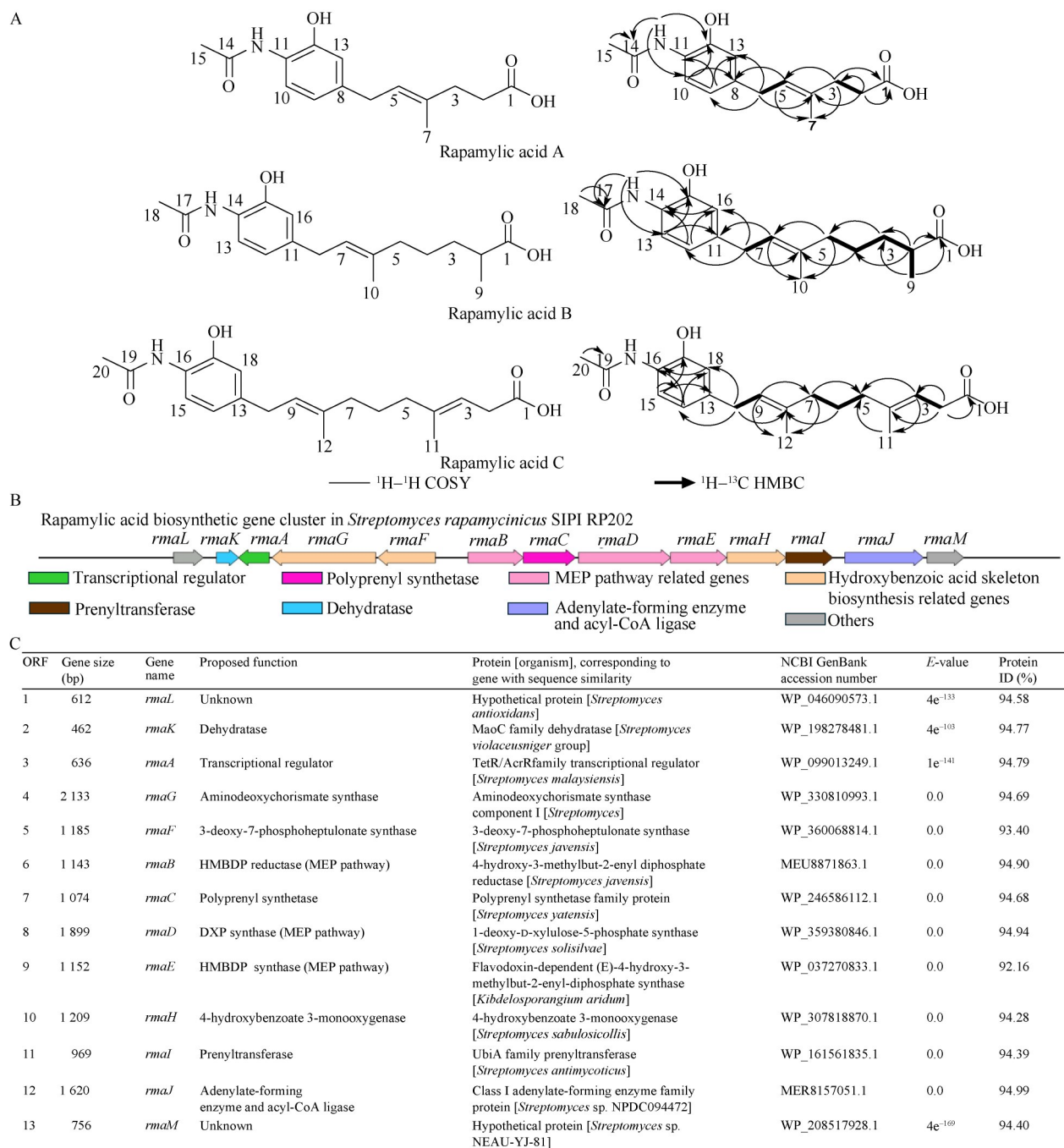


图3 Rapamylic acids的化学结构、合成基因簇与生物合成基因功能分析。 A: Rapamylic acids A、B、C的结构(加粗的键表示 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY信号, 箭头代表 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 关键的HMBC信号); B: 雷帕链霉菌中 rapamylic acids合成基因簇; C: Rapamylic acids生物合成基因功能预测。

Figure 3 Structures, biosynthetic gene clusters and gene functional analysis of rapamylic acids. A: The structures of rapamylic acids A, B, C (Bold lines and arrows represent $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY and key $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC signals, respectively); B: Schematic diagram of the rapamylic acids BGC in *S. rapamycinicus* SIPI RP202; C: The functional prediction of rapamylic acids biosynthetic genes.

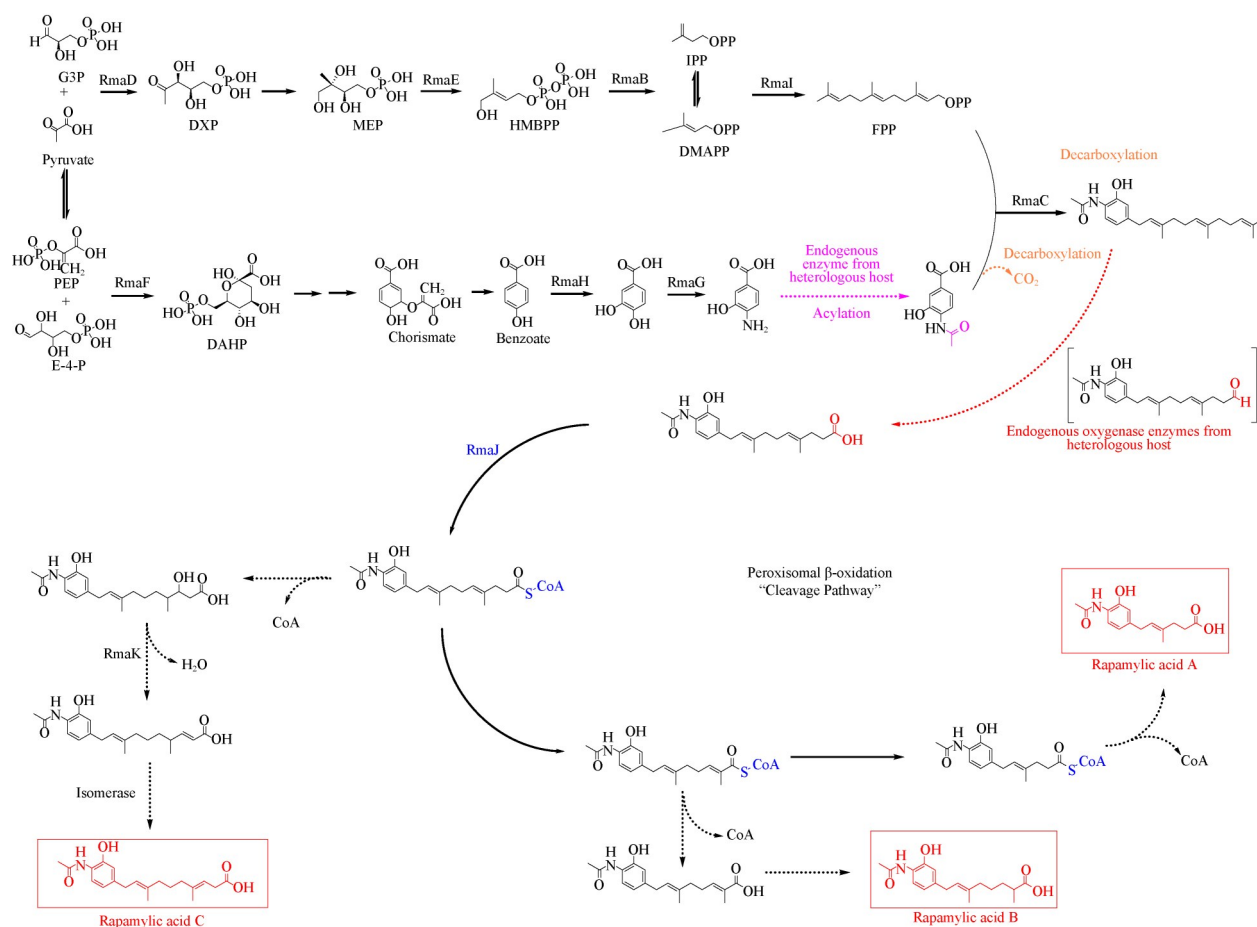


图4 Rapamylic acids A、B与C潜在的生物合成途径

Figure 4 Potential biosynthetic pathways of rapamylic acids A, B and C.

3 讨论与结论

雷帕链霉菌中蕴藏着大量功能未知的天然产物合成基因簇，其中大多数在实验室条件下处于不表达或低表达的“沉默”状态，这使得从原始菌株中发现更多新结构化合物变得极具挑战性^[6]。为了充分挖掘雷帕链霉菌的生物合成潜力，本研究采用基于 BAC 文库的批量克隆策略，成功获得了 11 个新颖的目标基因簇。在此基础上，通过不同异源宿主对目标基因簇进行表达，并结合多种发酵检测条件的优化，成功激活了 1 个新型基因簇，并分离出一类新结构芳香族混源萜类化合物 rapamylic acids。Rapamylic acids 作为全新结构的混源萜类化合物，不仅拓

展了细菌萜类化合物的多样性，而且本研究所采用的批量基因簇高效克隆与异源表达策略，也为链霉菌或其他微生物沉默基因簇的表征提供了新的思路。

通过对 rapamylic acids 潜在生物合成途径的分析，我们认为该基因簇在雷帕链霉菌原始菌株中不表达的原因，很可能是其合成过程涉及多个异源宿主中的内源性酶的参与。这恰恰表明，使用多种异源宿主底盘细胞在激活沉默基因簇方面具有明显优势。然而，本研究仅对该类化合物的生物合成途径进行了预测，后续需要通过基因敲除、前体喂养等策略进行验证，从而深入解析其生物合成途径^[43]。最后，本研究从雷帕链霉菌中筛选了 11 个未知基因簇，但

通过多底盘异源表达与不同发酵检测条件的优化,仅成功激活了1个基因簇。未来,仍需采用更多的合成生物学策略,如前体工程与启动子工程等,进一步表征雷帕链霉菌其他新颖的基因簇^[44]。

致谢

感谢山东大学吴长生教授在化合物结构解析上给予的帮助。

作者贡献声明

虞旭昶:设计并完成大部分实验,文章初稿写作;游蕤翔:雷帕链霉菌培养与基因组文库构建;吴雨洙:细胞毒性与抗炎活性测试;孙润泽:化合物波谱解析;陈少欣:提供雷帕链霉菌与文章修订;吴辉:文章修订;李雷:项目提出、实验整体设计与文章修订。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. *Journal of Natural Products*, 2020, 83(3): 770-803.
- [2] HEMMERLING F, PIEL J. Strategies to access biosynthetic novelty in bacterial genomes for drug discovery[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2022, 21(5): 359-378.
- [3] GAVRILIDOU A, KAUTSAR SA, ZABURANNYI N, KRUG D, MÜLLER R, MEDEMA MH, ZIEMERT N. Compendium of specialized metabolite biosynthetic diversity encoded in bacterial genomes[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7: 726-735.
- [4] LACEY HJ, RUTLEDGE PJ. Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species[J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 887.
- [5] 侯路宽, 李花月, 李文利. 隐性次级代谢产物生物合成基因簇的激活及天然产物定向发现[J]. *微生物学报*, 2017, 57(11): 1722-1734.
HOU LK, LI HY, LI WL. Activation of cryptic microbial biosynthetic gene clusters and structure-guided natural product discovery[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(11): 1722-1734 (in Chinese).
- [6] RUTLEDGE PJ, CHALLIS GL. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(8): 509-523.
- [7] LI L. Next-generation synthetic biology approaches for the accelerated discovery of microbial natural products[J]. *Engineering Microbiology*, 2022, 3(1): 100060.
- [8] LI L, JIANG WH, LU YH. New strategies and approaches for engineering biosynthetic gene clusters of microbial natural products[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(8): 936-949.
- [9] WANG X, ZHOU HB, CHEN HN, JING XS, ZHENG WT, LI RJ, SUN T, LIU JQ, FU J, HUO LJ, LI YZ, SHEN YM, DING XM, MÜLLER R, BIAN XY, ZHANG YM. 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.
- [10] HE FQ, LIU XP, TANG M, WANG HY, WU Y, LIANG SF. CRISPR: an efficient technology for multiplexed refactoring of biosynthetic gene clusters[J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(18): 11378-11393.
- [11] KWON MJ, STEINIGER C, CAIRNS TC, WISECAVER JH, LIND AL, POHL C, REGNER C, ROKAS A, MEYER V. Beyond the biosynthetic gene cluster paradigm: genome-wide coexpression networks connect clustered and unclustered transcription factors to secondary metabolic pathways[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(2): e0089821.
- [12] HUO LJ, HUG JJ, FU CZ, BIAN XY, ZHANG YM, MÜLLER R. Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(10): 1412-1436.
- [13] DENG Q, ZHOU L, LUO MZ, DENG ZX, ZHAO CM. Heterologous expression of avermectins biosynthetic gene cluster by construction of a Bacterial Artificial Chromosome library of the producers[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2017, 2(1): 59-64.
- [14] LIBIS V, ANTONOVSKY N, ZHANG MY, SHANG Z, MONTIEL D, MANIKO J, TERNEI MA, CALLE PY, LEMETRE C, OWEN JG, BRADY SF. Uncovering the biosynthetic potential of rare metagenomic DNA using co-occurrence network analysis of targeted sequences[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3848.
- [15] BAUER JD, KING RW, BRADY SF. Utahmycins A and B, azaquinones produced by an environmental DNA clone[J]. *Journal of Natural Products*, 2010, 73(5): 976-979.
- [16] XU M, WANG YM, ZHAO ZL, GAO GX, HUANG SX, KANG QJ, HE XY, LIN SJ, PANG XH, DENG ZX, TAO

- MF. Functional genome mining for metabolites encoded by large gene clusters through heterologous expression of a whole-genome bacterial artificial chromosome library in *Streptomyces* spp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(19): 5795-5805.
- [17] LIBIS V, MACINTYRE LW, MEHMOOD R, GUERRERO L, TERNEI MA, ANTONOVSKY N, BURIAN J, WANG ZQ, BRADY SF. Multiplexed mobilization and expression of biosynthetic gene clusters[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 5256.
- [18] 高花花, 胡娟, 刘玲丽. 基因簇大片克隆技术研究进展及挑战[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 351-367.
GAO HH, HU J, LIU LL. Research progress and challenges in cloning large gene clusters[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 351-367 (in Chinese).
- [19] XU M, ZHANG F, CHENG Z, BASHIRI G, WANG J, HONG JL, WANG YM, XU LJ, CHEN XF, CHEN XF, HUANG SX, LIN SJ, DENG ZX, TAO MF. Functional genome mining reveals a class V lanthipeptide containing a D-amino acid introduced by an F₄₂₀H₂-dependent reductase[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(41): 18029-18035.
- [20] HE WY, WANG WF, MA JX, ZHENG GS, ZIMIN AA, JIANG WH, TIAN JZ, LU YH. Crossregulation of rapamycin and elaiophylin biosynthesis by RapH in *Streptomyces rapamycinicus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(5-6): 2147-2159.
- [21] VÉZINA C, KUDELSKI A, SEHGAL SN. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. I. taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle[J]. The Journal of Antibiotics, 1975, 28(10): 721-726.
- [22] MRAK P, KRASTEL P, LUKANČIČ PP, TAO JS, PISTORIUS D, MOORE CM. Discovery of the actinoplanic acid pathway in *Streptomyces rapamycinicus* reveals a genetically conserved synergism with rapamycin[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(52): 19982-19995.
- [23] STEINRAUF LK, PINKERTON M, CHAMBERLIN JW. The structure of nigericin[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1968, 33(1): 29-31.
- [24] FANG A, WONG GK, DEMAINE AL. Enhancement of the antifungal activity of rapamycin by the coproduced elaiophylin and nigericin[J]. The Journal of Antibiotics, 2000, 53(2): 158-162.
- [25] FURUMAI T, YAMAKAWA T, YOSHIDA R, IGARASHI Y. Clethracylin, a new inhibitor of pollen tube growth with antifungal activity from *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0623. I. screening, taxonomy, fermentation, isolation and biological properties[J]. The Journal of Antibiotics, 2003, 56(8): 700-704.
- [26] CAI P, KONG FM, RUPPEN ME, GLASIER G, CARTER GT. Hygrocin A and B, naphthoquinone macrolides from *Streptomyces hygroscopicus*[J]. Journal of Natural Products, 2005, 68(12): 1736-1742.
- [27] BOZHÜYÜK KAJ, PRÄVE L, KEGLER C, SCHENK L, KAISER S, SCHELHAS C, SHI YN, KUTTENLOCHNER W, SCHREIBER M, KANDLER J, ALANJARY M, MOHIUDDIN TM, GROLL M, HOCHBERG GKA, BODE HB. Evolution-inspired engineering of nonribosomal peptide synthetases[J]. Science, 2024, 383(6689): eadg4320.
- [28] GRININGER M. Enzymology of assembly line synthesis by modular polyketide synthases[J]. Nature Chemical Biology, 2023, 19(4): 401-415.
- [29] GOZARI M, ALBORZ M, EL-SEEDI HR, JASSBI AR. Chemistry, biosynthesis and biological activity of terpenoids and meroterpenoids in bacteria and fungi isolated from different marine habitats[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 210: 112957.
- [30] 肖丽萍, 邓子新, 刘天罡. 链霉菌底盘细胞的开发现状及其应用[J]. 微生物学报, 2016, 56(3): 441-453.
XIAO LP, DENG ZX, LIU TG. Progress in developing and applying *Streptomyces* chassis-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(3): 441-453 (in Chinese).
- [31] MYRONOVSKIY M, ROSENKRÄNZER B, NADMID S, PUJIC P, NORMAND P, LUZHETSKYY A. Generation of a cluster-free *Streptomyces albus* chassis strains for improved heterologous expression of secondary metabolite clusters[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 316-324.
- [32] 刘家栋, 王革娇, 罗美中. 阿维链霉菌BAC文库的构建及分析[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(5): 45-50.
LIU JD, WANG GJ, LUO MZ. Construction and analysis of a BAC library of *Streptomyces avermitilis* genome[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2016, 35(5): 45-50 (in Chinese).
- [33] BALTZ RH. *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(8): 759-772.
- [34] ZHANG JJ, TANG XY, MOORE BS. Genetic platforms for heterologous expression of microbial natural products[J]. Natural Product Reports, 2019, 36(9): 1313-1332.
- [35] HE F, NAKAMURA H, HOSHINO S, FONG CHIN JS, YANG L, ZHANG HP, HAYASHI F, ABE I. Hinduchelins A – D, noncytotoxic catechol derivatives from *Streptoalloteichus hindustanus*[J]. Journal of Natural Products, 2018, 81(6): 1493-1496.
- [36] ZHANG BY, TIAN WY, WANG SW, YAN XL, JIA XY, PIERENS GK, CHEN WQ, MA HM, DENG ZX, QU XD. Activation of natural products biosynthetic pathways via a protein modification level regulation[J]. ACS Chemical Biology, 2017, 12(7): 1732-1736.

- [37] RUSSO D, MILELLA L. Recent Advances in Natural Products Analysis[M]. Amsterdam: Elsevier, 2020: 477-501.
- [38] RUDOLF JD, ALSUP TA, XU BF, LI ZN. Bacterial terpenome[J]. *Natural Product Reports*, 2021, 38(5): 905-980.
- [39] FRANK A, GROLL M. The methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(8): 5675-5703.
- [40] WANG HB, YANG Y, ABE I. Modifications of prenyl side chains in natural product biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(52): e202415279.
- [41] ZHANG W, DU L, QU ZP, ZHANG XW, LI FW, LI Z, QI FF, WANG X, JIANG YY, MEN P, SUN JR, CAO SN, GENG C, QI FX, WAN XB, LIU CN, LI SY. Compartmentalized biosynthesis of mycophenolic acid[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(27): 13305-13310.
- [42] HU YC, LEGAKO AG, ESPINDOLA APDM, MACMILLAN JB. Erythrolic acids A-E, meroterpenoids from a marine-derived *Erythrobacter* sp. [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2012, 77(7): 3401-3407.
- [43] PRÄVE L, SEYFERT CE, BOZHÜYÜK KAJ, RACINE E, MÜLLER R, BODE HB. Investigation of the odilorhabdin biosynthetic gene cluster using NRPS engineering[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2024, 63(33): e202406389.
- [44] XU M, WANG WL, WAGLECHNER N, CULP EJ, GUITOR AK, WRIGHT GD. GPAHe_x-A synthetic biology platform for type IV-V glycopeptide antibiotic production and discovery[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5232.