

红霉素大环内酯合成通路在大肠杆菌中的重建

何彰华, 王洋, 叶丙雨, 师明磊, 王东, 范秋声, 黄芬, 赵志虎

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

何彰华, 王洋, 叶丙雨, 等. 红霉素大环内酯合成通路在大肠杆菌中的重建. 生物工程学报, 2012, 28(2): 222-232.

He ZH, Wang Y, Ye BY, et al. Reconstruction of erythromycin macrocyclic lactone synthesis pathway in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2012, 28(2): 222-232.

摘要: 研究在大肠杆菌中重建了红霉素大环内酯 (6-脱氧-红霉内酯 B, 6dEB) 合成通路。先将参与 6dEB 合成所必需的基因分别克隆于多基因串联共表达载体中, 获得单基因重组质粒; 再利用载体中 *Xba* I /*Spe* I 互为同尾酶的特性实现相关基因的串联组合, 获得多基因重组质粒 pBJ130 和 pBJ144。将多基因重组质粒共转化 BAP1, 获得含 6dEB 合成通路的工程菌株 BAP1 (pBJ130/pBJ144), SDS-PAGE 检测结果显示通路中各基因均有明显的表达; 进行低温发酵, 产物粗提后质谱检测到 6dEB, 其产量约 10 mg/L。表明成功实现了 6dEB 合成通路在大肠杆菌中的重建, 为红霉素大环内酯的改造和修饰提供了平台, 也为红霉素合成通路在大肠杆菌中的完整重建以及聚酮类抗生素的组合性生物合成提供了参考。

关键词: 6dEB, 共表达, SDS-PAGE, 质谱

Reconstruction of erythromycin macrocyclic lactone synthesis pathway in *Escherichia coli*

Zhanghua He, Yang Wang, Bingyu Ye, Minglei Shi, Dong Wang, Qiusheng Fan, Fen Huang, and Zhihu Zhao

Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

Abstract: We reconstructed the erythromycin macrocyclic lactone (6-deoxyerythronolide B, 6dEB) synthesis pathway in *Escherichia coli*. We first cloned all the genes needed to synthesize the 6dEB into multi-gene co-expressed vectors. Then using the recognition sequences of isoschizomers *Xba* I /*Spe* I of vectors, we assembled the related genes into a series multiple-genes recombinant plasmids pBJ144, pBJ130. The recombinant plasmids pBJ144, pBJ130 were cotransformed into BAP1 to get the

Received: August 17, 2011; **Accepted:** November 28, 2011

Supported by: Major National Key Technology Platform for Drug Discovery (No. 2008ZXJ09007-01).

Corresponding author: Zhihu Zhao. Tel: +86-10-66948775; E-mail: zhaozh@bmi.ac.cn

国家重大新药创制关键技术平台 (No. 2008ZXJ09007-01) 资助。

recombinant BAP1(pBJ144/pBJ130). SDS-PAGE analysis showed that individual genes were expressed correctly. After inducing at low temperature, adding propionate as substrate, we validated the crude product by mass spectrometry and the 6dEB yield was about 10 mg/L. These results indicated that the synthetic pathway of 6dEB was successfully assembled and reconstructed in *Escherichia coli*, which will greatly facilitate the reconstruction of whole erythromycin synthesis pathway and finally help to establish a stable research platform for developing of new derivatives of erythromycin and combinatorial biosynthesis of polyketide-type antibiotics.

Keywords: 6dEB, co-expression, SDS-PAGE, mass spectrometry

天然小分子药物一直是人类抵御疾病的重要手段, 抗生素的发现及其使用, 拯救了成千上万人的生命, 但是大量抗性致病菌如耐万古霉素、甲氧西林抗性等“超级细菌”的出现, 极大地威胁着人类生命健康^[1]。一些危险的致病菌正对现有抗生素产生耐药性, 它们进化的速度甚至超过了科学家开发新型药物的速度。因此如何建立组合性生物合成平台, 更加有效利用现有天然小分子资源, 开发新型抗生素, 意义重大。

聚酮是来源于放线菌等的一大类结构复杂、活性多样、临床应用广泛的化合物。负责聚酮合成的模块性聚酮合成酶 (Polyketide synthase, PKS) 的多个基因成簇排列、活性位点的排列顺序与聚酮分子的合成步骤、产物结构间具有一一对应关系, 特别适合利用基因工程等手段, 进行组合性改造^[2-3]。红霉素是一种典型的模块类聚酮抗生素, 对红霉素结构的改造和修饰最有可能产生新型抗生素^[4-6]。6-脱氧-红霉内酯 B (6dEB) 是红霉素生物合成过程中可分离出来的第一个中间体, 其合成的分子机制已经研究得比较透彻, 合成过程由红霉素聚酮合成酶模块介导完成^[7], 但在大肠杆菌中异源合成 6dEB 却存在几个难点^[8]。2001 年 Pfeifer 等^[9]选择基因组中整合有枯草杆菌磷酸泛酰巯基转移酶基因 *sfp* 的大肠杆菌 BAP1 作为表达宿主, 以实现聚酮合成酶中

酰基运载蛋白 ACP 的翻译后修饰; 再应用天蓝色链霉菌的丙酰-CoA 羧化酶基因 *accA1*、*pccB* 以保障 6dEB 合成前体的供给; 将合成 6dEB 必需的基因克隆于双质粒系统 pBP130 和 pBP144 (表 3), 首次在大肠杆菌 BAP1 中以丙酸钠为底物异源合成了 6dEB。

本研究旨在建立一个红霉素组合性生物合成的平台, 即在大肠杆菌中重建红霉素大环内酯 (6-脱氧-红霉内酯 B, 6dEB) 合成通路。实验中先将参与 6dEB 合成所必需的基因分别克隆于多基因串联共表达载体^[10], 获得单基因重组质粒; 再利用载体中 *Xba* I /*Spe* I 互为同尾酶的特性实现相关基因的串联组合, 获得多基因重组质粒 pBJ130 和 pBJ144。将多基因重组质粒共转化 BAP1, 获得含 6dEB 合成通路的工程菌株 BAP1 (pBJ130/pBJ144), 并对其进行了鉴定。研究中克服了高 GC、长片段基因的 PCR 扩增, 成功获取聚酮合成酶基因 *eryA1*、*eryAII*、*eryAIII*; 构建的多基因重组质粒中各基因分别位于独立的表达盒中, 每个基因含单独的启动子和终止子, SDS-PAGE 检测结果显示通路中各基因均有明显的表达; 初步进行低温发酵, 乙酸乙酯萃取后制样质谱检测到 6dEB, 用红霉素标准品作内参得出其产量约 10 mg/L。研究成功实现了 6dEB 合成通路在大肠杆菌中的重建, 为红霉素大环内

酯的改造和修饰提供了平台,也为红霉素合成通路在大肠杆菌中的完整重建以及聚酮类抗生素的组合性生物合成奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

红霉素链霉菌 *Streptomyces erythraea* 购于中国农业菌种保藏管理中心;天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 购于 ATCC;表达宿主 BAP1 由塔夫茨大学化学与生物工程系 Blaine Pfeifer 教授惠赠;大肠杆菌 DH5a 感受态和 BL21 感受态均购于天根公司;多基因串联表达载体 pET-m22b (+) 和 pET-m28a (+) 由本实验室构建保存,(+)代表含有 f1 复制区。

1.2 工具酶与化学试剂

T4 DNA 连接酶购于 NEB;DNA marker 购于北京全式金生物公司;蛋白 marker 为 Fermentas 产品;限制性内切酶和 Primer STAR 聚合酶为 TaKaRa 产品;普通质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、普通 DNA 产物纯化试

剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购于天根公司。

氨苄青霉素、卡那霉素购自 AMRESCO 公司;其他试剂均为国产分析纯产品。

1.3 研究中使用的基因

基因的信息均源自 NCBI 数据库。分子伴侣基因 *groES-EL* 为本实验室克隆保存,其他基因为本实验克隆(表 1)。

1.4 引物设计与片段的扩增

引物的设计依照 NCBI 数据库中报道的基因序列,上、下游引物中分别设计合适的酶切位点用于克隆,具体信息见表 2。

研究中的基因序列均富含 GC,且聚酮合成酶 3 个基因片段较长,约 10 kb,PCR 反应条件要求较严格。高 GC、长片段 PCR 反应程序为(两步法):94 °C 2 min;98 °C 10 s,70 °C 11 min,25 个循环;72 °C 10 min,体系中加入 5%的 DMSO;高 GC、短片段 PCR 反应程序为:94 °C 2 min;98 °C 10 s,64 °C 5 s,72 °C 90 s,30 个循环;72 °C 5 min。

表 1 文中所使用的基因

Table 1 Gene used in the study

Gene name	Length (bp)	Protein molecular weight (kDa)	Function	Resource
<i>eryAI</i>	10 638	390.1	Biosynthesis of 6dEB	<i>S. erythraea</i>
<i>eryAII</i>	10 704	392.5	Biosynthesis of 6dEB	<i>S. erythraea</i>
<i>eryAIII</i>	9 516	349.0	Biosynthesis of 6dEB	<i>S. erythraea</i>
<i>accAI</i>	1 773	65.0	Propionyl-CoA carboxylase	<i>S. coelicolor</i>
<i>pccB</i>	1 593	58.4	Propionyl-CoA carboxylase	<i>S. coelicolor</i>
<i>groEL</i>	1 647	60.4	Chaperon	<i>E. coli</i>
<i>groES</i>	294	10.8	Chaperon	<i>E. coli</i>

表 2 文中所用引物及其序列

Table 2 Primer and sequence used in the study

Primer name	Sequence (5'-3')
<i>eryAI-F</i>	AAACATATGGCGGACCTGTCAAAGCTCTCC
<i>eryAI-R</i>	AAAAAGCTTTCAATCGCCGTCGAGCTCCCGGCC
<i>eryAII-F</i>	AAACATATGACTGACAGCGAGAAGGTGGCG
<i>eryAII-R</i>	AAAAAGCTTATGCCGTTGTCACCGCTCATCTAC
<i>eryAIII-F</i>	AAACATATGAGCGGTGACAACGGCAT
<i>eryAIII-R</i>	AAAAAGCTTTCATGAATTCCTCCGCCCA
<i>accAI-F</i>	AAACATATGCGCAAGGTGCTCATCGC
<i>accAI-R</i>	AAAAAGCTTTCAGTCCTTGATCTCGCAGA
<i>pccB-F</i>	AAACATATGTCCGAGCCGGAAGAGCA
<i>pccB-R</i>	AAAAAGCTTTTACAGGGGGATGTTGCCGT

Italic shows restriction enzyme cutting site.

1.5 菌种的复苏培养与 DNA 的提取

菌种的复苏培养参照中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提供的真空冷冻干燥菌种的恢复培养方法。复苏好的菌种挑单菌落转接入新鲜液体培养基, 30 °C 振荡培养 3~5 d, 离心收集菌体, 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取全基因组 DNA。菌种的复苏培养采用高氏一号培养基。

1.6 重组质粒的构建

先将 PCR 获取的目的基因分别克隆入多基因串联表达载体 pET-m28a (+) 或 pET-m22b (+), 进行酶切及测序鉴定; 再利用多基因串联表达载体中 *Xba* I 和 *Spe* I 互为同尾酶的特性, 通过酶切、连接实现相关基因的串联组合。多基因的组合策略如图 1 所示, 组合模式见表 3。

1.7 基因的表达鉴定

将构建成功的单基因重组质粒分别转化 BL21 进行诱导表达鉴定; 将构建正确的多基因

重组质粒 pBJ130 和 pBJ144 分别转化 BAP1, 用相应的抗生素筛选单克隆, 获得表达菌株 BAP1 (pBJ130) 和 BAP1 (pBJ144); 将重组质粒 pBJ130 和 pBJ144 共转化 BAP1, 用氨苄青霉素和卡那霉素筛选单克隆, 获得含 6dEB 合成通路的工程菌株 BAP1 (pBJ130/pBJ144)。诱导前先接菌至相应抗生素培养基中培养至饱和, 诱导时按 1% 的比例转接至 2 mL 新鲜的培养基中, 37 °C 培养约 1 h, 待 OD_{600} 值达到 0.4~0.6, 加入 IPTG (终浓度为 0.5 mmol/L), 于 37 °C 继续培养 4 h。各取 1 mL 菌液高速离心 1 min, 沉淀悬于 100 μ L 1 \times SDS 凝胶上样缓冲液, 沸水浴 6 min, 离心收集上清, 取少量样品进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.8 6dEB 的合成与检测

接菌 BAP1 (pBJ130/pBJ144) 至 2 mL 新鲜的氨苄青霉素和卡那霉素 LB 培养基中 37 °C 过夜培养。将活化的菌按 1% 的接菌量转接至 2 mL 新鲜的 LB (加双抗) 培养基中, 37 °C、

250 r/min 振荡培养, 待 OD_{600} 值达到 0.6 时将菌液于 22 °C 放置 5 min, 加入 0.5 mmol/L IPTG、2.5 g/L 丙酸钠, 置于 22 °C、200 r/min 继续培养 72 h。

将上述低温诱导产物转移至离心管中 12 000 r/min 离心 1 min, 上清移至另一无菌的离心管中, 加入等体积的乙酸乙酯萃取。将萃取的有机相在室温下风干, 再溶于 100 μ L 甲醇, 样品送至军事医学科学院仪器中心进行质谱检测。在用乙酸乙酯萃取前, 往发酵液中加入 10 mg/L 的红霉素标准品作内参^[11]。

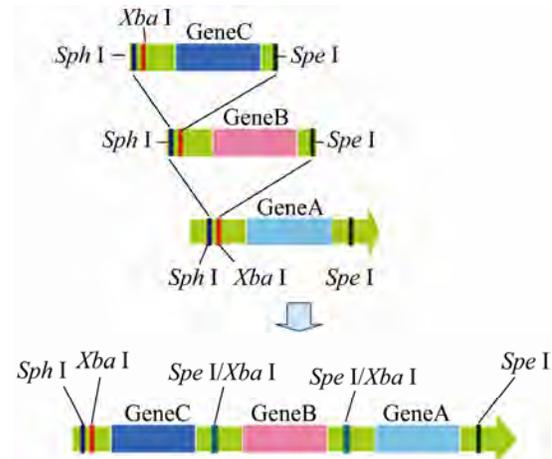


图 1 多基因表达盒的串联策略

Fig. 1 Schematic diagram of combination strategies.

表 3 文中所用菌株和质粒

Table 3 Strain and plasmid in the study

Strain or plasmid	Description	References
BAP1	F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)DprpRBCDHT7 prom-sfp, T7prom-prpE	[9]
pBJ130 (Amp ^R)	T7prom-eryAII-T7term-T7prom-eryAIII-T7term	This work
pBJ144 (Kan ^R)	T7prom-accA1-T7term-T7prom-eryAI-T7term-T7prom-groES-T7term-T7prom-groEL-T7term-T7prom-pccB-T7term	This work
pBP130 (Carb ^R)	T7prom-eryAII-rbs-eryAIII-T7term	[9]
pBP144 (Kan ^R)	T7prom-pccB-rbs-accA1-T7prom-eryAI-T7term	[9]

2 结果

2.1 目的基因的获取

以提取的红霉素链霉菌基因组 DNA 为模板, 用设计的引物选择 Primer STAR 分别进行 PCR 扩增, 成功获取 *eryAI*、*eryAII*、*eryAIII* 三个基因, 特异性均较好, 结果见图 2A~C。以提取的天蓝色链霉菌基因组 DNA 为模板, 用设计的引物选用 Primer STAR 聚合酶, 成功扩取 *accA1* 和 *pccB*, 结果见图 2D。

2.2 质粒的构建

2.2.1 构建单基因重组质粒

应用设计的酶切位点, 将 PCR 扩取的目的基因 *eryAI*、*accA1*、*pccB* 分别克隆入 pET-m28a (+); *eryAII*、*eryAIII* 分别克隆入 pET-m22b (+)。用 *Nde* I 和 *Hind* III 分别对构建的单基因重组质粒进行双酶切鉴定, 电泳结果见图 3, 均切下相应目的片段。利用通用引物并结合设计的测序引物将上述构建的单基因质粒分别进行测序鉴定, 序列比对结果显示各基因均无碱基突变。

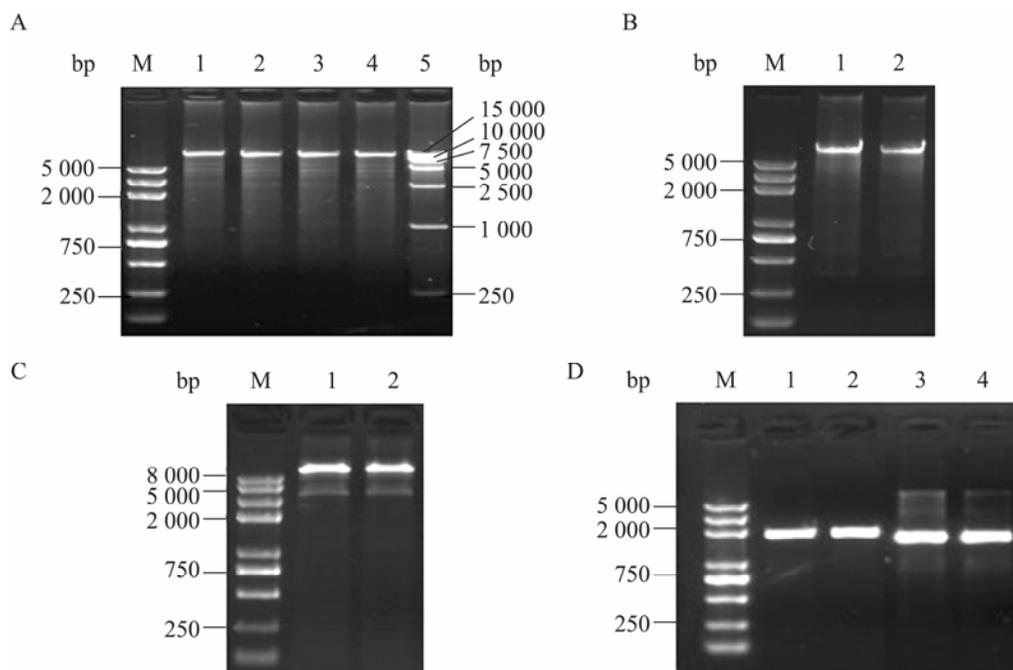


图2 目的片段的PCR扩增

Fig. 2 PCR amplification of target fragment. (A) *eryA*. (B) *eryAII*. (C) *eryAIII*. (D) 1,2: *accA1* PCR product; 3,4: *pccB* PCR product.

2.2.2 构建多基因质粒

利用 *Xba* I 和 *Spe* I 互为同尾酶的特性, 选择合适的酶切位点 (如 *Bgl* II、*Sph* I 等), 按图 1 所示多基因串联组合策略同时参照表 3 的组合模式完成相关基因的组合, 获得多基因重组质粒 pBJ130 和 pBJ144。用 *Nde* I 分别酶切多基因重组质粒, 电泳结果如图 4 所示, 切下的基因片段均与预期一致。*Nde* I 单酶切后, 基因片段上均带有约 265 bp 的连接序列。

2.3 基因的表达结果

2.3.1 单基因表达结果

单基因重组质粒转化大肠杆菌 BL21 后分别诱导, 制备蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测, 目的蛋白条带清晰, 大小正确, 单个基因均能在大肠

杆菌中表达 (图 5)。

2.3.2 多基因共表达结果

诱导后, 制备蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测, 在大肠杆菌 BAP1 中相应的基因均有较明显的表达, 其中 *eryAI*、*eryAII*、*eryAIII* 分子量较大, 表达量相对较低。编号 2 中 *eryAII*、*eryAIII* 条带均较明显, *eryAII* 表达量相对较少; 编号 3 中 5 个基因共表达, *groEL*、*pccB* 分子量接近条带重叠, *accA1* 条带均较明显, *eryAI* 表达量相对较低, *groES* 分子量较小已跑出胶底; 编号 4 中 7 个基因共表达, 其中 *eryAI*、*eryAII* 分子量接近两蛋白条带重叠, *groEL*、*pccB* 分子量接近两蛋白条带重叠, *accA1*、*eryAIII* 条带均较明显, *groES* 分子量较小已跑出胶底 (图 6)。

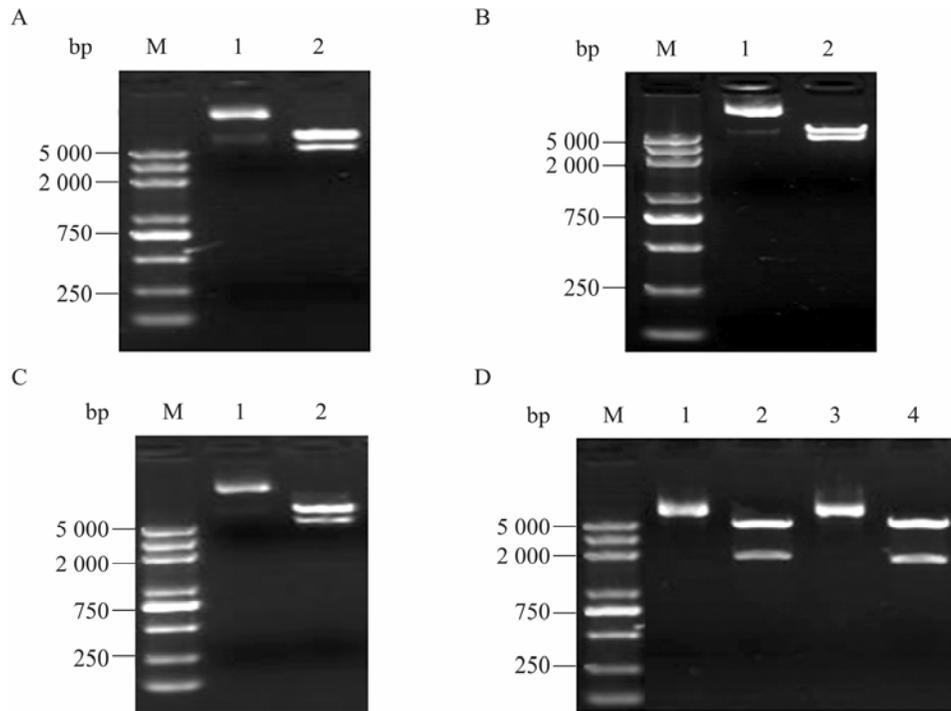


图3 单基因重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction digestion analysis of recombinant plasmid. M: DNA marker. (A) 1: pET-m28a-eryAI; 2: pET-m28a-eryAI/Nde I+Hind III. (B) 1: pET-m22b-eryAII; 2: pET-m22b-eryAII/Nde I+Hind III. (C) 1: pET-m22b-eryAIII; 2: pET-m22b-eryAIII/Nde I+Hind III. (D) 1: pET-m28a-accA1; 2: pET-m28a-accA1/Nde I+Hind III; 3: pET-m28a-pccB; 4: pET-m28a-pccB/Nde I+Hind III.

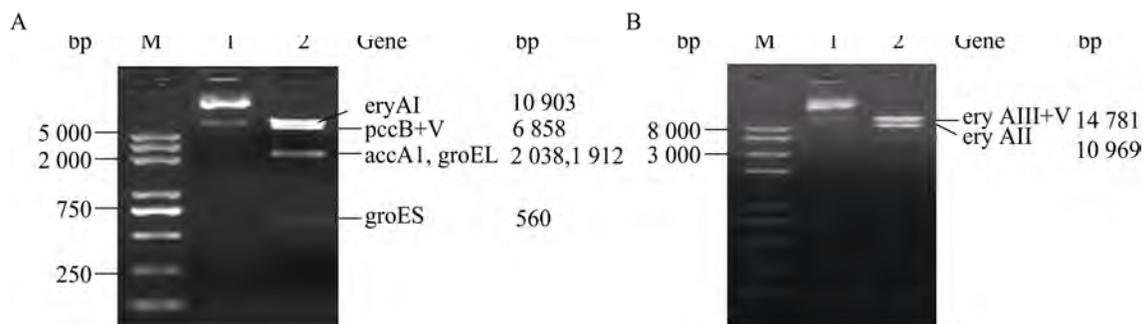


图4 多基因重组质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Enzyme digestion analysis of multi-genes recombinant plasmid. M: DNA marker. (A) 1: pBJ144; 2: pBJ144/Nde I. (B) 1: pBJ130; 2: pBJ130/Nde I. V shows vector.

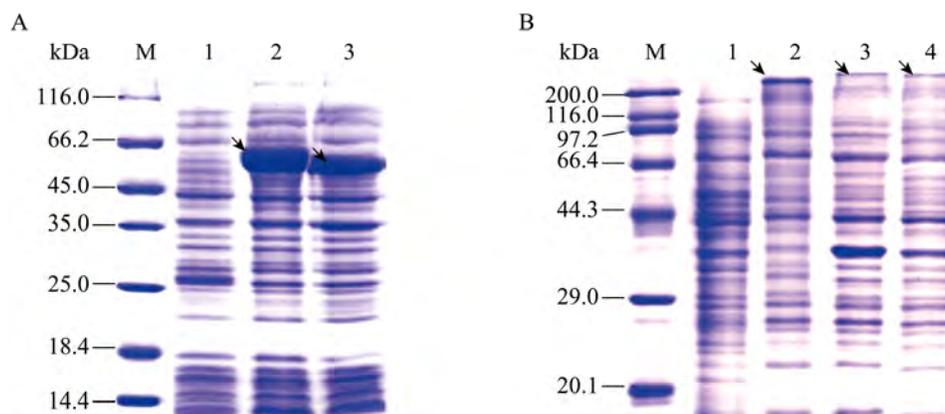


图 5 SDS-PAGE 检测单基因表达结果

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the induced single genes expression individually. M: protein marker. (A) 1: BL21 (DE3)/pET-m28a-*accA1* uninduced; 2: BL21 (DE3)/pET-m28a-*accA1* induced; 3: BL21 (DE3)/pET-m28a-*pccB* induced. (B) 1: BL21 (DE3)/pET-m22b-*eryAIII* uninduced; 2: BL21 (DE3)/pET-m22b-*eryAIII* induced; 3: BL21 (DE3)/pET-m22b-*eryAII* induced; 4: BL21 (DE3)/pET-m28a-*eryAI* induced. Arrow shows target protein.

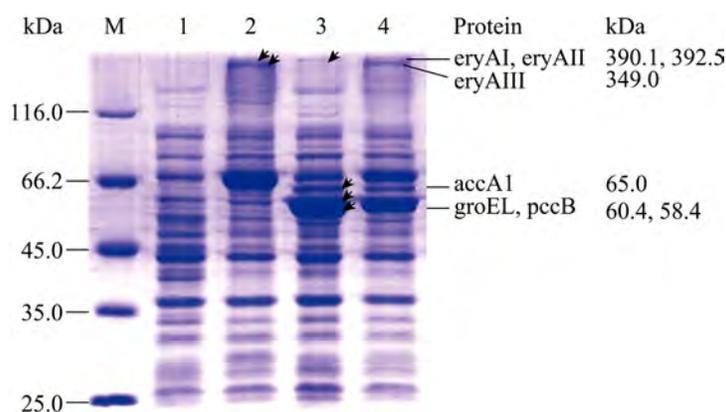


图 6 SDS-PAGE 检测多基因共表达结果

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the induced multi-genes expression simultaneously. M: protein marker; 1: BAP1 (pBJ130) uninduced; 2: (pBJ130) induced; 3: BAP1 (pBJ144) induced; 4: BAP1 (pBJ144/pBJ130) induced. Arrow shows interest protein.

2.4 6dEB 的合成与检测

收集 BAP1 (pBJ144/pBJ130) 低温诱导产物, 萃取后风干再溶于甲醇, 将样品送去做质谱检测。质谱结果如图 7 所示: 在 409.2565

处出现 6dEB 的加钠峰, 734.4753 为 10 mg/L 红霉素标准品的质谱峰; 6dEB 的峰值略高于内参红霉素标准品, 初步判断 6dEB 的产量约 10 mg/L。

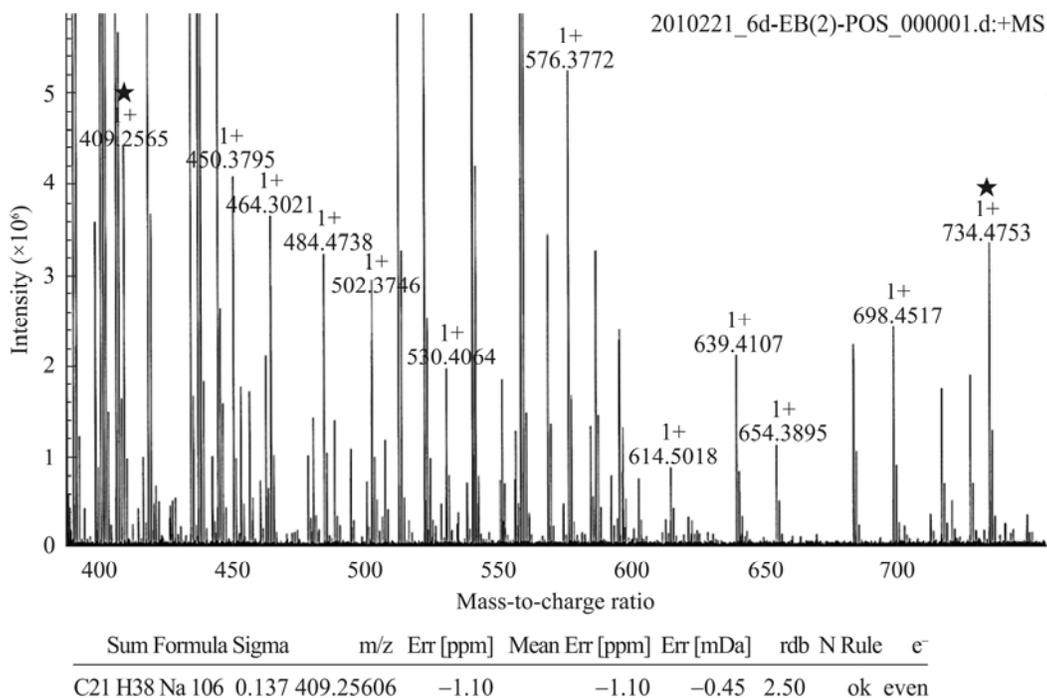


图7 质谱检测结果

Fig. 7 Mass spectrum results of 6dEB. ★ shows target profiles.

3 讨论

本研究应用多基因串联表达载体实现了参与 6dEB 合成的多个基因在大肠杆菌中的共表达,完成了 6dEB 合成通路在大肠杆菌中的重建,首次在国内实现以丙酸钠为底物在大肠杆菌中异源合成了 6dEB。初次诱导发酵,以红霉素标准品作内参得其产量约 10 mg/L,这与 2001 年 Pfeifer 等^[9]获得的产量基本一致。研究借鉴了 Pfeifer 等^[9]的表达策略,但在重组质粒的构建过程中我们做了适当的改善,应用了本实验室构建的多基因串联共表达载体,在本研究构建的 6dEB 合成通路中,各基因分别位于独立的表达盒中,每个基因含单独的启动子和终止子(表 3),避免

了多基因共用启动子时的翻译极性效应,有望在后期的研究中通过调节启动子强弱对基因的表达进行更为精细的调控,以提高 6dEB 在大肠杆菌中的合成效率。

研究中的红霉素链霉菌及天蓝色链霉菌基因组 GC 含量比较高,而富含 GC 序列的 DNA 片段特别是长片段的 PCR 扩增通常存在一定困难。在早期的研究中,我们选择 Roche 公司的 Expand Long Template PCR System,通过不同条件的优化,扩增了 5 kb 富含 GC 的基因^[12];使用 Finzyme 公司的 DynaZyme EXT,在 PCR 体系中加入 10% 的 DMSO,成功扩增了聚酮合成酶基因 *eryAIII*,但特异性不理想^[13]。本实验中,我们再次对高 GC、长片段基因的 PCR 扩增进行了探索,使用

TaKaRa 公司的 Primer STAR 聚合酶成功实现 *eryAI*、*eryAII*、*eryAIII* 的特异性扩增。将 PCR 获取的目的基因分别克隆入多基因串联共表达载体后, 酶切鉴定无误, 测序结果显示各基因均无碱基突变。

在大肠杆菌中构建 6dEB 合成通路, 需要涉及多个基因的共表达, 且巨大蛋白在大肠杆菌中的高效表达, 是一个比较棘手的问题。研究中合理的应用多基因串联表达载体, 便捷地实现了相关基因的串联组合; 通过分子伴侣的共表达, 可以促进外源蛋白的折叠, 增加巨大蛋白的可溶性^[14]。单基因的诱导表达鉴定结果显示: 参与 6dEB 合成的相关基因均能在大肠杆菌中异源表达, 且表达量较高 (图 5)。在多基因的诱导共表达鉴定结果中, 由于部分蛋白分子量接近而发生条带重叠现象, 且分子量较大的基因 *eryAI*、*eryAII*、*eryAIII* 表达量相对较低, 但仔细对比各泳道中目的蛋白的表达情况可以初步判断各基因均能协同表达。发酵产物的质谱分析直接证实相关基因的确都正确表达了, 同时这也进一步证实了本实验室构建的多基因串联共表达载体有着重要的应用前景, 可以高效介导多基因、大片段基因的共表达。

6dEB 在大肠杆菌中的成功合成意义重大, 可以认为是红霉素基因工程研究的一个转折点。至 2001 年 Pfeifer 等^[9]在大肠杆菌中异源合成 6dEB 以来, 红霉素基因工程的研究有了迅猛的发展。在提高 6dEB 合成产量方面, Lau 等^[15]采用高细胞密度分批发酵的方法, 用优化的培养基使 6dEB 的产量上升至 1.1 g/L; 另有一些研究者在基因的表达调控方面进行了探索, 均大幅度提

高了 6dEB 在大肠杆菌中的合成产量^[16-17]。在 6dEB 后修饰的研究中, Peiru 等^[11]和 Lee 等^[18]分别选取来源于其他链霉菌中的糖基化基因, 构建了 6dEB 的后修饰通路, 以 6dEB 为底物在大肠杆菌中异源合成了 Ery D 和 6dEry D 等; 2010 年 Pfeifer 等^[19]将红霉素链霉菌基因组中参与红霉素糖基化的 18 个基因克隆于 3 个不同抗性的质粒中, 以 6dEB 为底物合成了 Ery A。此外, Menzella 等^[20]合成了红霉素 PKS 基因序列, 通过改造和替换 PKS 中的模块, 合成了非天然天然产物。

本研究完成了 6dEB 合成通路在大肠杆菌中的重建, 建立了红霉素大环内酯改造和修饰的平台, 也为之后红霉素合成通路在大肠杆菌中的完整重建以及聚酮类抗生素的组合性生物合成奠定了坚实的基础。

致谢: 感谢军事医学科学院毒药物研究所王好山研究员和张诚老师在质谱检测方面的帮助和指导; 感谢军事医学科学院生物工程研究所吴军研究员和张惟材研究员为本实验提供了低温诱导条件!

REFERENCES

- [1] Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 2009, 325(5944): 1089–1093.
- [2] Keaeing TA, Walsh CT. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 3(9): 598–606.
- [3] Wu N, Kudo F, Cane DE, et al. Analysis of the molecular recognition features of individual modules derived from the erythromycin polyketide synthase. *Am Chem Soc*, 2000, 122(20): 4847–4852.

- [4] Kuhstoss S, Huber M, Turner JR, et al. Production of a novel polyketide through the construction of a hybrid polyketide synthase. *Gene*, 1996, 183(1-2): 231-236.
- [5] Ruan X, Pereda A, Stassi DL, et al. Acyltransferase domain substitutions in erythromycin polyketide synthase yield novel erythromycin derivatives. *J Bacteriol*, 1997, 179(20): 6416-6425.
- [6] McDaniel R, Thamchaipenet A, Gustafsson C, et al. Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 1846-1851.
- [7] Zhang BC, Zhao ZH, Ma QJ. Molecular biology on erythromycin biosynthesis. *Lett Biotech*, 2001, 12(2): 151-160.
张部昌, 赵志虎, 马清钧. 红霉素生物合成的分子生物学. *生物技术通讯*, 2001, 12(2): 151-160.
- [8] Zhang BC, Li LL, He BK, et al. Research advance in application of *Escherichia coli* expression system in erythromycin genetic engineering. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2003, 27(5): 381-384.
张部昌, 李凌凌, 贺秉坤, 等. 大肠杆菌表达系统在红霉素基因工程中应用的研究进展. *军事医学科学院院刊*, 2003, 27(5): 381-384.
- [9] Pfeifer BA, Admiraal SJ, Gramajo H, et al. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science*, 2001, 291(5509): 1790-1792.
- [10] He ZH, Wang Y, Zhao J, et al. Construction of a vector suitable for the tandem coexpression of multiple genes by a single plasmid. *China Biotechnol*, 2011, 31(1): 40-45.
何彰华, 王洋, 赵珺, 等. 一种多基因串联共表达载体的构建. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(1): 40-45.
- [11] Peirú S, Menzella HG, Rodríguez E, et al. Production of the Potent Antibacterial Polyketide Erythromycin C in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(5): 2539-2547.
- [12] Zhang BC, Zhao ZH, Yu XQ, et al. Optimizing conditions for PCR amplification of DNA with rich GC. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2002, 26(4): 257-261.
张部昌, 赵志虎, 于秀琴, 等. 富含 GC DNA PCR 扩增条件的优化. *军事医学科学院院刊*, 2002, 26(4): 257-261.
- [13] Zhang LH, Wang Y, He ZH, et al. Cloning and expression of polyketide synthases gene *eryAIII* of *Saccharopolyspora erythraea* in *Escherichia coli*. *Lett Biotech*, 2010, 21(6): 794-797.
张丽华, 王洋, 何彰华, 等. 红霉素链霉菌聚酮合成酶基因 *eryAIII* 的克隆及其在大肠杆菌中的表达. *生物技术通讯*, 2010, 21(6): 794-797.
- [14] Zhang JY, Zhao ZH, Cai MH. Progress in molecular chaperon GroEL. *Lett Biotech*, 2001, 12(2): 127-129.
张经余, 赵志虎, 蔡民华. GroEL 分子伴侣研究进展. *生物技术通讯*, 2001, 12(2): 127-129.
- [15] Lau J, Tran C, Licari P, et al. Development of a high cell-density fed-batch bioprocess for the heterologous production of 6-deoxyerythronolide B in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2004, 110(1): 95-103.
- [16] Wang Y, Boghigian BA, Pfeifer BA. Improving heterologous polyketide production in *Escherichia coli* by overexpression of an S-adenosylmethionine synthetase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(2): 367-373.
- [17] Zhang HR, Boghigian BA, Pfeifer BA. Investigating the role of native propionyl-CoA and methylmalonyl-CoA metabolism on heterologous polyketide production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(3): 567-573.
- [18] Lee HY, Khosla C. Bioassay-guided evolution of glycosylated macrolide antibiotics in *Escherichia coli*. *PLoS Biol*, 2007, 5(2):243-250.
- [19] Zhang HR, Wang Y, Wu JQ, et al. Complete biosynthesis of erythromycin A and designed analogs using *E. coli* as a heterologous host. *Chem Biol*, 2010, 17(11): 1232-1240.
- [20] Menzella HG, Reid R, Carney JR, et al. Combinatorial polyketide biosynthesis by de novo design and rearrangement of modular polyketide synthase genes. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(9): 1171-1176.