

抗生素及其它天然产物来源的药物应用使世界上绝大多数地区的人类平均寿命从 20 世纪初的 40 岁延长到今天的 70 岁。然而, 随着抗生素的滥用, 临床耐药菌的不断出现向人类发起一轮又一轮的威胁。但是, 自 20 世纪 60 年代中叶以来, 利用传统的筛选方法已经很难从微生物代谢产物中获得具有开发价值的抗生素。随着生命科学的发展, 特别是近年来一系列新方法和新技术在放线菌研究及在新型抗生素筛选模型建立中的应用, 为人类进一步从微生物代谢产物中寻找新型抗生素展现了前景。

陈代杰

## 新方法新技术与新型抗生素发现

殷瑜<sup>1,2</sup> 戈梅<sup>2</sup> 陈代杰<sup>3\*</sup>

(1. 上海交通大学 药学院 上海 200240)

(2. 上海来益生物药物研究开发中心 上海 201203)

(3. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院 上海 200040)

**摘要:** 日趋严峻的细菌耐药性问题给“抗生素传奇时代”带来了严重威胁, 传统的抗菌药物开发手段已很难应对, 因此急需新思路来寻找新型抗生素。近年来, 一些新方法新技术如新型筛选模型的构建、基因组挖掘技术以及组合生物合成等给天然产物的筛选引发了革命性的变革, 也为放线菌来源的新型抗生素的发现带来了新的希望。本文对这些新技术及其在新型抗生素研发中的应用进展进行阐述。

**关键词:** 新方法和新技术, 新型抗生素, 新筛选模型, 基因组挖掘, 组合生物合成

## New methods, new technologies and discovery of novel antibiotics

YIN Yu<sup>1,2</sup> GE Mei<sup>2</sup> CHEN Dai-Jie<sup>3\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81273413, 81102355)

\*通讯作者: Tel: 86-21-34207004; ✉: hccb001@163.com

收稿日期: 2013-02-24; 接受日期: 2013-04-16

- (2. *Shanghai Laiyi Center for Biopharmaceutical R&D, Shanghai 201203, China*)  
(3. *Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China*)

**Abstract:** The growing bacteria drug resistance has seriously threatened the “antibiotic miracle”, while traditional approaches for new antibiotics discovery could not combat this problem and novel solutions are urgently needed. Recently, new methods and technologies such as novel screening model establishment, genome mining and combinatorial biosynthesis have revolutionized the screening of natural products. Applying these technologies offers a unique opportunity to re-establish actinobacteria as a major source for drug discovery. These new advances and technologies are described in this review.

**Keywords:** New methods and technologies, New antibiotics, Novel screening model establishment, Genome mining, Combinatorial biosynthesis

以青霉素的诞生为标志、链霉素的发现为起点、被称之为“医学王冠上的一颗明珠”的抗生素使人类健康问题发生了革命性的变化,而其中 70%左右的抗生素是由放线菌产生的<sup>[1]</sup>。但是近 40 年来,从微生物发酵产物中获得的新型抗生素只有 4 个:1985 年上市的莫匹罗星、2003 年上市的达托霉素、2007 年上市的截短侧耳菌素衍生物瑞他怕林<sup>[2]</sup>,以及 2011 年上市的非达霉素<sup>[3]</sup>。这说明利用传统的筛选方法已经很难从微生物代谢产物中获得具有开发价值的抗生素,造成这种局面的主要因素有 3 个方面:一是随着越来越多的天然产物被发现,“低垂的苹果”往往更容易被摘取,因此以传统生物活性为指导的模型筛选策略,获得具有新颖结构的化合物越来越难;其次,很多微生物在实验室条件下难以培养;再则,已知微生物合成多样性次级代谢产物的本质尚不能“被解密”<sup>[4]</sup>。

但是,随着生命科学的发展,特别是近 20 年来一系列新方法和新技术在放线菌研究以及在建立新型抗生素筛选模型中的应用和开发,为人类进一步从微生物代谢产物中寻找新型抗生素展现了前景。

## 1 传统筛选模型的不足与基于新型筛选模型的新型抗生素的发现

尽管至今为止临床使用的所有微生物来源的抗生素及其先导化合物都是通过传统的全细胞筛选技术获得的,但其存在着 3 个明显的不足:一是随着越来越多的代谢产物被分离,许多在天然产物样品中含量非常低的抗生素无法被探测到;二是许多已知的抗生素类物质频繁出现于被研究过的微生物发酵产物中,极大地干扰了新抗生素的发现;三是不能排除所筛选获得的物质是细胞毒作用还是靶标作用所致,即特异性差和敏感性低。另外,尽管基于分子靶标的体外筛选方法对小分子化合物的筛选起到了重要的作用,但也存在两方面的不足:一是由于微生物代谢产物的复杂性导致产生假阳性或假阴性;二是难以辨别药物能否进入细胞的可能性。

为了克服以上的不足,近年来进行了很多研究。特别是以下简要阐述的 4 种模型在新型抗生素的筛选应用中取得了显著的进展。

### 1.1 基于基因沉默技术的超敏全细胞抗生素筛选模型

基因沉默技术是通过基因表达调控使靶基

因不表达或低表达,包括翻译前(主要指启动子调控技术)及翻译水平调控(主要指反义 RNA 沉默技术)。若受下调的是菌体生长的必需基因,菌株对特异性的靶向抑制剂敏感性则会增加。近年来,基因沉默技术已成功应用于各类靶向性超敏全细胞抗菌药物筛选模型的构建。主要包括:启动子调控技术,即将靶基因(*genX*)克隆至受诱导性强启动子调控的表达载体上,将所构建质粒导入目的菌株,随后用基因敲除的手段将染色体上的该靶基因敲除。这样就能利用调节诱导剂浓度来有效控制靶蛋白的含量<sup>[5]</sup>;以及反义 RNA 沉默技术,即通过重组表达技术向菌体内导入一段与机体内源 mRNA (由靶基因转录而成)互补的 RNA 序列,令反义 RNA 和正义 mRNA 杂交,抑制靶基因的表达,从而影响细胞的功能<sup>[6]</sup>。利用该技术构建的反义菌株随着诱导剂浓度的增加,菌体内反义 RNA 表达量增多,靶蛋白含量则随之降低,菌体对该靶标的特异抑制剂敏感度增加<sup>[7]</sup>。

反义 RNA 技术目前已受到越来越多的新药筛选模型研究者的关注。2006 年 Merck 公司研究小组利用反义 RNA 技术构建的 FabF 超敏全细胞筛选模型,成功地从 250 000 份天然产物中筛选出具有特异性 FabF 抑制剂平板霉素<sup>[8]</sup>,其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐万古霉素肠球菌(VRE)显著有效。作者研究团队也已将该技术用于针对 *Escherichia coli* 必需基因如 *fabI*、*acpP*、*ftsZ*、*murA*、*folA* 等抗菌筛选模型的构建<sup>[9-10]</sup>,并从微生物发酵产物中筛选并分离纯化获得了能够有效抑制 ACP 的新结构活性化合物<sup>[11]</sup>。此外,靶向性超敏细胞也可用于协同增效剂筛选模型的构建,Merck 公司研究小组利用该模型发现细菌分裂蛋白 FtsZ 抑制剂 PC190723 与  $\beta$ -内酰胺类合用对抗 MRSA 有明显的增效作用<sup>[12]</sup>。

## 1.2 多点抗性排除已知抗生素的全细胞筛选模型

像链霉素这样的抗生素,可以在 1% 的土壤放线菌中发现,因而大大地掩盖了发现其它感兴趣的微量代谢产物的可能性。为此,Cubist 公司利用藻酸钙球珠微量发酵技术提高样品制备效率。同时考虑到 60% 的已知药物对 G<sup>+</sup> 都有效、而对 G<sup>-</sup> 菌有效的并不多,因此先用大肠杆菌进行样品体外活性检测,以寻找更有潜力的活性化合物。并将常见抗生素的已知耐药基因整合至大肠杆菌基因组,结合这些多重耐药的大肠杆菌工程菌可以排除已知抗生素的干扰,每年可以筛选几百万个发酵液样品,大大提高了发现新型抗生素的几率和效率<sup>[13-14]</sup>。

## 1.3 基于基因敲除技术的增效剂筛选模型

20 世纪 90 年代以来,随着基因组学、转录组学和蛋白组学等的迅猛发展,人们获得了丰富的生物学信息与数据。因此,有可能利用分子生物学方法在不同的水平来阐明这些基因或蛋白的功能。基于针对与细菌生长繁殖或致病性有关的蛋白建立的各种筛选模型,有可能获得直接具有抗菌能力的抗生素;而针对那些并不直接跟菌体生长或致病性相关,但能够增强已知抗生素的敏感性的蛋白建立的各种筛选模型,有可能获得已知抗生素的增效剂。

Cindy Tamae 等利用基因敲除的手段获得了针对不同靶点的 4 000 株单基因敲除突变株,利用高通量筛选技术、结合亚剂量的已知抗生素进行筛选,发现了 140 株菌对已知抗生素的敏感性增强<sup>[15]</sup>,这 140 株菌相应的蛋白有可能作为增效剂筛选模型的靶点。

## 1.4 基于秀丽隐杆线虫的抗生素筛选模型

生物学界对秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的研究始于 20 世纪 60 年代。英国科学家 Brenner 选择了线虫作为确定完整神经系统

的较为简单的生物模型<sup>[16]</sup>。随后,经过 Sulston 和 Horvitz 等的研究,使秀丽隐杆线虫成为当代生命科学和医学研究中最重要模式生物之一,也正在成为研究药物作用靶点和新药筛选模型的研究热点。

秀丽隐杆线虫既提供了完整动物实验系统,又避免了小鼠模型的高价费时,是最适合大规模药物筛选的多细胞动物。Moy 等利用秀丽隐杆线虫这一特性,建立了粪肠球菌感染高通量筛选模型,对 37 200 个化合物和天然提取物分析,发现了 28 个未经报道的具有提高线虫存活率的活性化合物,其中有 6 个结构新颖的化合物体外不影响病原菌生长,说明它们与临床上所用的抗生素具有明显不同的作用机制<sup>[17]</sup>。作者研究团队利用建立的秀丽隐杆线虫-耐铜绿假单胞菌和 MRSA 感染模型,进行药物毒性评价研究和微生物代谢产物的活性筛选,取得了一些可喜的进展<sup>[18-20]</sup>。

## 2 基于基因组挖掘的新型抗生素发现

自从链霉素发现以来,已从放线菌中发现了大量的天然产物,其中链霉菌是主要产生菌。随着发现的天然产物逐渐增多,在链霉菌中发现活性新天然产物的几率越来越小,人们开始在稀有放线菌、粘细菌,以及一些极端环境下的微生物中寻找新的代谢产物,并取得了一系列的进展。如从游动放线菌中发现的雷莫拉宁正在进行 III 期临床,用于治疗抗 MRSA 的感染<sup>[21]</sup>;从粘细菌中发现的埃坡霉素,其衍生物 Ixabepilone 已经作为抗乳腺癌新药用于临床<sup>[22]</sup>。尽管在上述新种属微生物和特殊生态微生物中蕴含着丰富的资源,但是大约只有不到 1% 的微生物能够通过实验室培养方法获得,因此必须通过探索新的方法来获取新的微生物资源,并从中发现新型活性代谢产物。

### 2.1 基因组挖掘与新型抗生素发现

早在 20 世纪末,科学家就提出了一株菌—许多化合物(OSMAC)的理论,这揭示了天然化合物的多样性,表明通过环境和培养条件的改变,某一菌株可产出多样的天然产物<sup>[23]</sup>。但是,由于难以深入洞悉这些菌株的生理生态特性,因此其潜在的活性代谢产物往往在实验室条件下难以被发现;而传统的新化合物发现大都是以生物活性为导向的开发策略,这种方式易导致已存在化合物的重复发现,事倍功半<sup>[24]</sup>。

DNA 测序技术的突飞猛进,使得基因组挖掘(Genome mining)具有更加快速和低成本的优势。随着不断增长的大量基因组数据的获得,人们可以清楚地认识到现在已经被鉴定和分离的化合物仅仅是冰山一角,仍然有大量的天然产物资源等待挖掘。一些已发表的放线菌基因组序列指出,这些生物体中差不多 90% 的天然产物潜能是未被发现的<sup>[25-26]</sup>。虽然这些潜在天然产物生物合成途径据分析是有功能的,但是有很多因素导致它们所“编码”的化合物在实验室培养条件下不能够产生。因此,科学家们提出了基因组挖掘的方法,用于向这些隐秘的天然产物进军,利用大量的基因组测序信息来发掘新的天然产物多样性。

过去的几年里,发表了一些重要的基于基因组挖掘的应用报导。如邓子新研究组通过对受热调控的井冈霉素高产菌 *Streptomyces hygroscopicus* 5008 的基因组和转录组分析发现,谷氨酸脱氢酶与井冈霉素的合成相关<sup>[27]</sup>,同时也发现敲除糖基转移酶基因 *valA* 可以获得井冈霉素 A 的前体井冈胺 A<sup>[28]</sup>;该组也通过基因簇挖掘寻找到了南昌霉素合成的两个正调控基因 *nanR1* 和 *nanR2*<sup>[29]</sup>。Challis G. L. 等通过对 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 的全基因组测序,发现该菌含有许多未知的生物合成代谢基因簇,并

挖掘到了一个新的 NRPS 化合物 Coelichelin<sup>[25,30]</sup>。Nina Geib 等通过对 *Amycolatopsis balhimycina* 的基因组挖掘发现了一个铁硫氧化还原蛋白有助于其糖肽类抗生素合成中 P450 功能的发挥<sup>[31]</sup>。作者研究团队通过基因组挖掘,在万古霉素产生菌 *Amycolatopsis orientalis* HCCB10007 代谢产物中也发现有聚酮体化合物 ECO-0501 (该化合物首先由 Banskota A. H. 等通过基因扫描发现<sup>[32]</sup>),并构建了产去甲基-ECO-0501 的工程菌<sup>[33]</sup>。这些研究发现表明,基因组研究可作为发现新天然产物的强有力的工具。除了发现新化合物之外,通过全基因组测序也解决了一些生物合成过程中让人们感兴趣的问题<sup>[34-35]</sup>,如对烯二炔类天然产物的挖掘研究<sup>[36]</sup>。ECO-04601 则是另一个例子,它是一个法呢酰双苯并二氮化合物,通过对一个小单孢菌的基因组扫描被发现。ECO-04601 是细胞凋亡诱导剂,现在已经处于抗实体瘤一期临床试验<sup>[37]</sup>。另外,作者研究团队通过微生物代谢产物组挖掘从达托霉素产生菌小链霉菌 HCCB10043 中发现了一个新化合物 LYRM03,其初步的体内外抑瘤活性显著高于已经上市的免疫增强剂乌苯美司(Bestatin),体内急性毒性比乌苯美司低 10 倍以上,目前正在进行全面的临床前研究<sup>[38-39]</sup>;此外在这个产生菌中还发现了 I 型信号肽酶抑制剂 Arylomycins,并通过对其生物合成途径的改构,获得了两个新 Lipopentapeptides 化合物<sup>[40]</sup>。

微生物来源的环肽类药物在临床上起着重要的作用,如抗细菌感染药物万古霉素和达托霉素;免疫抑制剂环孢菌素 A 等。这些物质都是微生物代谢过程中产生的次级产物,需要通过非核糖体途径合成(NRPS)。但是,近年来越来越多的研究发现,由核糖体途径合成的肽类物质经过几步后修饰反应,能够直接产生各种具有生理活性的肽类(环肽类)物质(RiPPs),

这为通过基因组挖掘这类物质提供了新的机遇。目前,已经挖掘到各种肽类物质的新衍生物,如 Lantipeptides<sup>[41]</sup>、Cyanobactins<sup>[42]</sup>、Microviridins<sup>[43]</sup>、毒伞肽类(Amatoxins)及芋螺毒素(Conopeptides)等<sup>[44]</sup>。

## 2.2 宏基因组研究与新型抗生素发现

宏基因组即为“特定生态环境中所有生物遗传物质的总和”。宏基因组学则以环境样品中微生物群体基因组为研究对象,采用功能基因筛选和测序分析等研究工具,从不可培养微生物中来寻找新基因或开发新生物活性物质<sup>[45]</sup>。由基因组挖掘衍生出来的宏基因组挖掘(Metagenome mining)是天然产物研究的又一个新发展,它能完全克服天然宿主菌不可培养的困难,因此宏基因组的方法显得更有潜力。一些生物技术公司已经开始研究宏基因组挖掘在天然产物筛选中应用的可能性。目前还存在一些技术上的难题,使得这种技术的推广受到限制,例如,常用的少数几种异源表达宿主不适应所有的环境 DNA,有些还存在调控和遗传上的兼容性问题。另外,建立足够高效的筛选系统以应付大量的文库克隆也是困难所在。尽管如此,目前已经有一些环境 DNA 和共生菌 DNA 的宏基因组挖掘成功的报道,并且鉴定出一些新的天然产物<sup>[46-47]</sup>。

## 3 组合生物合成与新型抗生素发现

### 3.1 利用组合生物合成发现新型抗生素的优越性

所谓组合生物合成,即在掌握了某个天然产物的生物合成机制后,特异性地从遗传水平上操纵天然产物的代谢途径,以此获得基因重组菌株来合成特定的天然产物及其类似物;或者从基因水平对天然产物的生物合成途径进行重组,建立结构复杂的天然产物类似物库,以

利于从中发现和发展更具应用价值的药物。这种定向的和“自由”组合的操作,能够产生结构多样的新型“非天然”杂合天然产物,即:通过重组 DNA 技术构建的人工生物合成途径所产生的结构新颖的化合物。这种方法尤其适合于获得那些难以用受专利保护外的化学方法合成的化合物:因为能够进行化学修饰的位点都早已被尝试过并具有专利保护,而生物合成途径的遗传修饰则可以在很多化学修饰所不能进行的位点处进行改造。

目前已报道的微生物次级代谢天然产物有数千种,其中非核糖体多肽类(NRPs)和聚酮类(PKs)占据相当大的比例,部分已成为人类疾病治疗的重要药物。而大多数试图通过组合生物合成方法发现新型抗生素或先导化合物的研究都集中在一些已经成为药物的“明星分子”中<sup>[48]</sup>。

### 3.2 NRPS 的组合生物合成与新型抗生素的发现

在一些 NRPS 途径中,负责催化聚肽骨架合成的模块分布于不同的 NRPS 蛋白中,聚肽链在合成过程中需要在不同蛋白之间转移,这就要靠蛋白与蛋白之间的特异性识别来完成,这种负责蛋白之间相互识别的区域也可以称为对接结构域或停泊结构域(Docking domain)<sup>[49-50]</sup>。这种由 N-端和 C-端的氨基酸残基组成的对接结构域,在相关的基因替换或重组中需要加以重视,因为保留或者去除这些结构域可能改变蛋白与上下游之间的连接方式。

对 NRPS 的组合生物合成主要涉及到 NRPS 模块的重组、功能结构域的重组、功能结构域关键氨基酸的突变、前体导向的生物合成以及后修饰基因的替换等。如 Baltz 等在脂肽类抗生素达托霉素(Daptomycin)、CDA 和 A54145 的 NRPS 模块重组方面的工作,得到了一系列全新的化合物,其中有的化合物显示出

比 Daptomycin 更好的生物活性<sup>[51-53]</sup>。Marahiel 等利用定点突变将表活脂肽(Surfactin)的 NRPS 中的 A 结构域的底物识别关键氨基酸改变,使其底物选择性由原来的天门冬氨酸转变为天门冬酰氨,获得了相应位置氨基酸改变的 Surfactin 类似物<sup>[54]</sup>;利用模块的同框敲除获得了大环骨架缩小的 Surfactin 衍生物等<sup>[55]</sup>。除此之外,针对非核糖体肽天然产物的途径重组研究也包括了后修饰基因的替换和敲除等,主要包括糖基化、羟基化、甲基化、卤化和酰基化等基因的改造。

作者研究团队对万古霉素产生菌 *A. orientalis* HCCB10007 中糖基转移酶基因进行了异源置换的操作。从 *A. orientalis* NRRL18098 中“钓取”其糖基转移酶基因置换万古霉素的糖基转移酶基因,获得了在万古霉素 6-氨基酸残基上多一个万古糖胺的新型“杂合万古霉素”LYV07ww01。其经过化学修饰获得的 LYV07ww01-A9、A10 和 A14,小鼠体内的抗菌活性优于万古霉素。进一步的化学修饰和药效学研究正在进行之中<sup>[56-60]</sup>。另外,作者研究团队对雷莫拉宁产生菌游动放线菌 SIPI-A.2006 中特殊的不饱和脂肪酸侧链合成途径进行重构,通过在雷莫拉宁脂肪链合成阻断突变株中异源表达恩拉菌素产生菌中相应的基因,成功得到了不饱和脂肪酸侧链延长的雷莫拉宁新类似物 X1、X2 和 X3。其中类似物 X1 抗 MRSA 活性与雷莫拉宁 A2 相当,抗 VRE 活性高于 A2<sup>[61]</sup>。

在非天然氨基酸前体的合成途径改造方面,因为 NRPS 中的 A 结构域存在特异性底物识别,往往需要同时改变相应模块或者单元,单独改变前体合成途径的例子比较少见。

### 3.3 PKSs 的组合生物合成与新型抗生素的发现

聚酮化合物的最终化学结构与 PKSs 模块

中结构域功能(包括对底物的选择、还原程度及立体构型等)一一对应,使得通过“排列与组合”生物合成基因来设计新产物成为可能,这也是聚酮合酶的组合生物学在近 20 年来得到迅猛发展的重要原因。临床上应用的通过 PKSs 途径合成的抗生素包括大环内酯类、萜环类和四环类等抗生素。对这类抗生素进行组合生物合成的遗传操作包括 3 个方面:一是改变大环内酯的结构;二是对后修饰途径进行改造;三是改变附着在这类抗生素生物结构上糖部分的结构。

红霉素作为组合生物合成发展的模式化合物一直是人们研究的热点,其主要涉及到:负责特异性识别底物的酰基转移酶 AT 的操作;PKS 结构修饰功能域的改变;内酯环单元数的改变;以及后修饰途径过程中的组合生物合成。目前应用这一技术合成“非天然”的天然杂合红霉素类衍生物达到 100 多个,其中有些的抗菌活性优于红霉素,具有一定的开发价值。该技术被认为是今后获得第三代红霉素的最有效途径之一<sup>[62]</sup>。

通过组合生物合成方法成功开发“非天然”天然大环内酯类抗生素的一大亮点,是我国学者王以光教授团队将碳霉素产生菌中 4'-异戊酰基转移酶基因(*ist*)克隆至螺旋霉素链霉菌 F21 染色体上,获得了可产生必特螺旋霉素(生技霉素)的基因工程菌。该抗生素对临床分离的革兰阳性致病菌的抗菌活性及治疗效果优于乙酰螺旋霉素、麦迪霉素和红霉素,对肺炎支原体的活性远超过乙酰螺旋霉素。且该药生物利用度高、体内毒性低。目前已完成 III 期临床研究<sup>[63]</sup>。

至今为止,PKSs 的组合生物合成已经在一系列临床应用的重要抗生素中展开,并展现出良好的开发前景。如具有抗肿瘤作用的萜环类抗生素阿霉素和阿克拉霉素,以及大环内酯类抗

生素埃坡霉素和免疫抑制剂雷帕霉素等<sup>[64-65]</sup>。

## 4 展望

尽管近二十多年来在生命科学应用基础研究发展中出现的新方法和新技术,不断地在微生物新药的应用和开发研究中得到应用,并取得了一系列可喜的进展。但是,无论从活性物质的筛选模型,到微生物新资源的开发利用和基于组合生物合成的“非天然”天然产物的发现,都存在着许多技术瓶颈。如对于高效筛选模型的建立而言,主要挑战是如何从靶向模型到网络模型的过渡,因为越来越多的研究表明药物对病原体的作用是一种网络机制而非简单的靶向机制。对于微生物新资源的发现而言:主要挑战是如何获取极端环境下的微生物并在实验室条件下得到培养,以及如何将通过基因组挖掘获得的有用遗传信息在实验室里表达。对于“明星分子”的组合生物合成而言,主要挑战是如何设计基于“构效关系”的“杂合分子”,以达到高效发现“Me-better”微生物新药。

另外,对于天然药物的开发所面临的一个共同挑战是如何开发快速分离纯化存在于微生物发酵液复杂体系中的、极其微量的活性产物,以进行一系列的评估和开发;即使利用工业生产菌种进行组合生物合成改造后获得的工程菌,很多情况下合成目标产物的产量极其微量,因而难以分离纯化获得。因此,生物技术所展示的新型抗生素开发蓝图,需要整合生物信息学、生物化学、遗传学、药物化学和天然产物化学等多学科的知识和技术,才能在宏伟的蓝图中挖掘到属于人类的“礼物”。

值得回顾的是我国学者在应用组合生物合成技术进行抗生素工业生产菌种的“理性化选育”方面取得了显著的成就:如第二代阿维菌素多拉菌素(Doramectin)高产工程菌<sup>[66]</sup>、高组分红

霉素 A 工程菌<sup>[67]</sup>、阿维菌素高产工程菌<sup>[68]</sup>, 以及直接产生阿霉素和表阿霉素的工程菌等<sup>[69]</sup>, 都已经实现了产业化或展示了产业化前景。

## 参 考 文 献

- [1] Li JWH, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?[J]. *Science*, 2009, 325(10): 161–165.
- [2] Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens[J]. *Science*, 2009, 325(5944): 1089–1093.
- [3] Lancaster JW, Matthews SJ. Fidaxomicin: the newest addition to the armamentarium against *Clostridium difficile* infections[J]. *Clinical Therapeutics*, 2012, 34(1): 1–13.
- [4] Wilkinson B, Bachmann BO. Biocatalysis in pharmaceutical preparation and alteration[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006, 10(2): 169–176.
- [5] Devito JA, Mills JA, Liu VG, et al. An array of target-specific screening strains for antibacterial discovery[J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(5): 478–483.
- [6] Good L, Stach JE. Synthetic RNA silencing in bacteria-antimicrobial discovery and resistance breaking[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011(2): 1–11.
- [7] Singh SB, Phillips JW, Wang J. Highly sensitive target-based whole-cell antibacterial discovery strategy by antisense RNA silencing[J]. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 2007, 10(2): 160–166.
- [8] Wang J, Soisson SM, Young K, et al. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties[J]. *Nature*, 2006, 441(7091): 358–361.
- [9] 陈银, 钱秀萍, 何建勇, 等. 反义 RNA 靶序列对大肠杆菌 *ftsZ* 基因沉默效果的影响[J]. *沈阳药科大学学报*, 2011, 28(7): 564–568.
- [10] 殷瑜, 戈梅, 钱秀萍, 等. 基于反义 RNA 技术的 FabI 抑制剂筛选模型的构建[J]. *中国医药生物技术*, 2012, 7(3): 197–201.
- [11] 杨志钧, 殷瑜, 杨天, 等. 一种十八碳烯丁二醇酯类化合物及其制备方法和应用: 中国, 201110191786[P]. 2011-07-11. <http://211.157.104.87:8080/sipo/zljs/hyjs-jieguo.jsp>.
- [12] Tan CM, Therien AG, Lu J, et al. Restoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics[J]. *Science Translational Medicine*, 2012, 4(126): 1–11.
- [13] Baltz RH. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8(5): 557–563.
- [14] Baltz RH. Antimicrobials from actinomycetes: back to the future[J]. *Microbe*, 2007, 2(3): 125–131.
- [15] Tamae C, Liu A, Kim K, et al. Determination of antibiotic hypersensitivity among 4,000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(17): 5981–5988.
- [16] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genetics*, 1974, 77(1): 71–94.
- [17] Moy TI, Conery AL, Larkins-Ford J, et al. High-throughput screen for novel antimicrobials using a whole animal infection model[J]. *ACS Chemical Biology*, 2009, 4(7): 527–533.
- [18] 周雨朦, 陈代杰, 李继安, 等. 秀丽隐杆线虫-耐药铜绿假单胞菌感染模型的建立[J]. *中国抗生素杂志*, 2011, 36(7): 511–514.
- [19] Zhou YM, Shao L, Li JA, et al. An efficient and novel screening model for assessing the bioactivity of extracts against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* using *Caenorhabditis elegans*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2011, 75(9): 1746–1751.
- [20] 周雨朦, 朱春宝, 陈代杰, 等. 利用秀丽隐杆线虫初步评价药物急性毒性[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(1): 99–103.
- [21] Hoertz AJ, Hamburger JB, Gooden DM, et al. Studies on the biosynthesis of the lipodepsipeptide antibiotic Ramoplanin A2[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012, 20(2): 859–865.
- [22] Steinberg M. Ixabepilone: A novel microtubule inhibitor for the treatment of locally advanced or metastatic breast cancer[J]. *Clinical Therapeutics*, 2008, 30(9): 1590–1617.
- [23] Bode HB, Bethe B, Höfs R, et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity[J]. *ChemBioChem*, 2002, 3(7): 619–627.
- [24] Scherlach K, Hertweck C. Triggering cryptic natu-

- ral product biosynthesis in microorganisms[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, 7(9): 1753–1760.
- [25] Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Nature*, 2002, 417(6885): 141–147.
- [26] Oliynyk M, Samborsky M, Lester JB, et al. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338[J]. *Nature Biotechnology*, 2007(25): 447–453.
- [27] Wu H, Qu S, Lu C, et al. Genomic and transcriptomic insights into the thermo-regulated biosynthesis of validamycin in *Streptomyces hygroscopicus* 5008[J]. *BMC Genomics*, 2012(13): 337–350.
- [28] Bai LQ, Li L, Xu H, et al. Functional analysis of the validamycin biosynthetic gene cluster and engineered production of validoxyamine A[J]. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(4): 387–397.
- [29] Yu Q, Du AQ, Liu TG, et al. The biosynthesis of the polyether antibiotic nanchangmycin is controlled by two pathway-specific transcriptional activators[J]. *Archives of Microbiology*, 2012, 194(6): 415–426.
- [30] Challis GL, Ravel J. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 187(2): 111–114.
- [31] Geib N, Weber T, Wörtz T, et al. Genome mining in *Amycolatopsis balhimycina* for ferredoxins capable of supporting cytochrome P450 enzymes involved in glycopeptide antibiotic biosynthesis[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 306(1): 45–53.
- [32] Banskota AH, Mcalpine JB, Sørensen D, et al. Genomic analyses lead to novel secondary metabolites. Part 3. ECO-0501, a novel antibacterial of a new class[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2006, 59(9): 533–542.
- [33] Shen Y, Huang H, Zhu L, et al. Type II thioesterase gene (ECO-*orf27*) from *Amycolatopsis orientalis* influences ECO-0501 (LW01) production[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(11): 2087–2091.
- [34] Song L, Barona-Gomez F, Corre C, et al. Type III polyketide synthase beta-ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(46): 14754–14755.
- [35] Corre C, Challis GL. New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining[J]. *Natural Product Reports*, 2009, 26(8): 977–986.
- [36] Zazopoulos E, Huang K, Staffa A, et al. A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(2): 187–190.
- [37] Bachmann BO, Mcalpine JB, Zazopoulos E, et al. Farnesyl dibenzodiazepinones, processes for their production and their use as pharmaceuticals: International, WO/2004/065591[P]. 2004-01-21. <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2004065591>.
- [38] 戈梅, 李秋爽, 夏兴, 等. 3-氨基-2-羟基-4-苯基-缬氨酰-异亮氨酸及其制备方法和应用: 中国, 201110076554.6[P]. 2011-03-29. <http://211.157.104.87:8080/sipo/zljs/hyjs-yx-new.jsp?recid=CN201110076554.6>.
- [39] Rao M, Li QS, Feng L, et al. A new aminopeptidase inhibitor from *Streptomyces* strain HCCB10043 found by UPLC-MS[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401(2): 699–706.
- [40] Jin X, Rao M, Wei W, et al. Biosynthesis of new lipopentapeptides by an engineered strain of *Streptomyces* sp.[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34: 2283–2289.
- [41] Seebeck FP, Ricardo A, Szostak JW. Artificial lanthipeptides from *in vitro* translations[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2011, 47(21): 6141–6143.
- [42] Donia MS, Schmidt EW. Linking chemistry and genetics in the growing cyanobactin natural products family[J]. *Chemistry & Biology*, 2011, 18(4): 508–519.
- [43] Ziemert N, Ishida K, Weiz A, et al. Exploiting the natural diversity of microviridin gene clusters for discovery of novel tricyclic depsipeptides[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(11): 3568–3574.
- [44] Velásquez JE, van der Donk WA. Genome mining for ribosomally synthesized natural products[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, 15(1):

- 11–21.
- [45] Singh BK, Macdonald CA. Drug discovery from uncultivable microorganisms[J]. *Drug Discovery Today*, 2010, 15(17/18): 792–799.
- [46] Banik JJ, Brady SF. Cloning and characterization of new glycopeptide gene clusters found in an environmental DNA megalibrary[J]. *Proceedings of the National Academy Sciences of United States of America*, 2008, 105(45): 17273–17277.
- [47] Lopanik NB, Shields JA, Buchholz TJ, et al. *In vivo* and *in vitro* trans-acylation by BryP, the putative bryostatin pathway acyltransferase derived from an uncultured marine symbiont[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(11): 1175–1186.
- [48] Zhou H, Xie XK, Tang Y. Engineering natural products using combinatorial biosynthesis and biocatalysis[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(6): 590–596.
- [49] Hur GH, Meier JL, Baskin J, et al. Crosslinking studies of protein-protein interactions in nonribosomal peptide biosynthesis[J]. *Chemistry & Biology*, 2009, 16(4): 372–381.
- [50] Linne U, Stein DB, Mootz HD, et al. Systematic and quantitative analysis of protein-protein recognition between nonribosomal peptide synthetases investigated in the tyrocidine biosynthetic template[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(17): 5114–5124.
- [51] Miao V, Coëffet-Le Gal MF, Nguyen K, et al. Genetic engineering in *Streptomyces roseosporus* to produce hybrid lipopeptide antibiotics[J]. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(3): 269–276.
- [52] Nguyen KT, Ritz D, Gu JQ, et al. Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin[J]. *Proceedings of the National Academy Sciences of United States of America*, 2006, 103(46): 17462–17467.
- [53] Doekel S, Coëffet-Le Gal MF, Gu JQ, et al. Non-ribosomal peptide synthetase module fusions to produce derivatives of daptomycin in *Streptomyces roseosporus*[J]. *Microbiology*, 2008, 154: 2872–2880.
- [54] Eppelmann K, Stachelhaus T, Marahiel MA. Exploitation of the selectivity-conferring code of non-ribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(30): 9718–9726.
- [55] Mootz HD, Kessler N, Linne U, et al. Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(37): 10980–10981.
- [56] 戈梅, 黄鹤, 魏维, 等. 一种新的化合物及其应用: 中国, 200910053906.9[P]. 2009-06-26. <http://211.157.104.87:8080/sipo/zljs/hyjs-yx-new.jsp?recid=CN200910053906.9>.
- [57] 邵昌, 周伟澄, 张顺利, 等. 新型糖肽类抗生素衍生物及药物组合物、以及其制备方法和用途: 中国, 201110070599.2[P]. 2011-3-23. <http://211.157.104.87:8080/sipo/zljs/hyjs-yx-new.jsp?recid=CN201110070599.2>.
- [58] 沈芳, 周伟澄, 张顺利, 等. 单糖糖肽类衍生物及药物组合物及其制备方法和用途以及中间体的制备方法: 中国, 201110070598.8[P]. 2011-3-23. <http://211.157.104.87:8080/sipo/zljs/hyjs-yx-new.jsp?recid=CN201110070598.8>.
- [59] 周亭, 周伟澄, 张顺利, 等. 三取代糖肽类衍生物及药物组合物、以及其制备方法和用途: 中国, 201110070597.3[P]. 2011-3-23. <http://211.157.104.87:8080/sipo/zljs/hyjs-yx-new.jsp?recid=CN201110070597.3>.
- [60] Shao C, Zhou WC, Zhang SL, et al. Synthesis and antibacterial activity of N4-mono alkyl derivatives of novel glycopeptide LYV07ww01[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21(22): 6732–6738.
- [61] Pan HX, Li JA, Shao L, et al. Genetic manipulation revealing an unusual N-terminal region in a stand-alone non-ribosomal peptide synthetase involved in the biosynthesis of ramoplanins[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(1): 107–114.
- [62] 吴杰群, 刘文, 张嗣良. 红霉素的生物合成与组合生物合成[J]. *有机化学*, 2012(32): 1232–1240.
- [63] 戴剑漉, 李瑞芬, 武临专, 等. 新一代必特螺旋霉素基因工程菌的微波诱变[J]. *中国抗生素杂志*, 2009, 34(7): 406–410.
- [64] Boddy CN, Hotta K, Tse ML, et al. Precursor-directed biosynthesis of epothilone in *Escherichia coli*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(24): 7436–7437.
- [65] Gregory MA, Petkovic H, Lill RE, et al. Mutasy-

- thesis of rapamycin analogues through the manipulation of a gene governing starter unit biosynthesis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(30): 4757–4760.
- [66] 覃重军, 胡敏杰, 夏海洋. 利用基因组改组技术改良多拉菌素生产菌的方法: 中国, 200710043687.7[P]. 2007-07-12. <http://211.157.104.87:8080/sipo/zljs/hyjs-yx-new.jsp?recid=CN200710043687.7>.
- [67] Chen Y, Deng W, Wu JQ, et al. Genetic modulation of the overexpression of the overexpression of tailoring genes *eryK* and *eryG* leading to the improvement of erythromycin A purity and production in *Saccharopolyspora erythraea* fermentation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(6): 1820–1828.
- [68] Zhuo Y, Zhang WQ, Chen DF, et al. Reverse biological engineering of *hrdB* to enhance the production of avermectins in an industrial strain of *Streptomyces avermitilis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(25): 11250–11254.
- [69] Yuan TJ, Yin CH, Zhu CB, et al. Improvement of antibiotic productivity by knock-out of *dauW* in *Streptomyces coeruleobidus*[J]. *Microbiological Research*, 2011, 166(7): 539–547.

## 稿件书写规范

### 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教學类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教學栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学学科的教师提供一个发表論文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的論文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教學思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教學理念贯穿到教學之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名课讲堂”版块,邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀論文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!