

合成生物学作为一门新兴的具有工程化思想的交叉学科，未来将推动生物医药领域的进一步发展；其中，放线菌所产生的次级代谢产物将在合成生物学新理论及技术的指导下被大力开发。

张立新

## 利用合成生物学技术深入挖掘放线菌中 活性次级代谢产物

白超弦<sup>1,2</sup> 卓英<sup>1</sup> 张立新<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室 北京 100101)

(2. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要：**放线菌是一类能够产生丰富生物小分子药物的微生物，对人类的健康事业做出了杰出的贡献。但近几十年来，来源于微生物并最终上市的药物越来越少，而病原菌的抗药性问题却越发严重，人们对新药的期待越来越迫切。本文介绍了近十年里发展迅速的合成生物学对微生物次级代谢产物研发的促进作用。合成生物学以工程化的思想对生命系统进行设计与改造，使传统方法难以获取的放线菌次级代谢产物通过外源宿主得以产生，充分利用了自然资源；此外，对次级代谢基因簇的合理设计和对生物元件的应用不仅使人们获得了自然界中原本不存在的新化合物，还能使某些具有广泛应用价值药物的产量得以显著提高；最后，还介绍了合成生物学领域近些年DNA组装的新技术和新方法，为从事次级代谢产物研发的工作者提供便利。

**关键词：**放线菌，次级代谢产物，合成生物学

基金项目：国家 973 计划项目(No. 2013CB73400, 2012CB725203, 2012CB721006)

\*通讯作者：Tel: 86-10-62566511; ✉: lzhang03@gmail.com

收稿日期：2013-05-07; 接受日期：2013-08-23

# Bioprospecting secondary metabolites of actinomycetes through synthetic biology

BAI Chao-Xian<sup>1,2</sup> ZHUO Ying<sup>1</sup> ZHANG Li-Xin<sup>1\*</sup>

(1. CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Actinobacteria are a class of microorganisms that can produce plenty of bioactive small molecule drugs, making an outstanding contribution to the human health. During the past decades, microorganisms derived and eventually marketed drugs become fewer and fewer, in the meanwhile, the problem caused by drug resistance pathogens become more and more serious, so people look forward to the new drugs urgently. Synthetic biology, which is developing fast in the past 10 years, plays an important role in the research and development of secondary metabolites. The biosystem is designed and rebuilt under the guidance of engineering science, from which the undiscoverable secondary metabolites can be obtained through heterologous expression. What is more, the rational designed gene cluster and the utilization of bio-elements lead to the new compounds that do not exist in nature as well as yield improved strains. The new techniques and methods of DNA assembly are also introduced, which make convenience to the researchers on secondary metabolites.

**Keywords:** Actinobacteria, Secondary metabolites, Synthetic biology

人类的生存和发展离不开医药,而微生物来源的小分子药物占了先导药物的一半以上,最终上市的微生物药物价值约为500亿美元,占整个药物市场价值的一半<sup>[1]</sup>。放线菌是一类高(G+C) mol%含量的革兰氏阳性细菌,其在自然界中分布很广,相较于其他微生物它能够产生更为丰富的生物活性物质,目前已知的15 000多种微生物来源的天然抗生素中,有将近70%是由放线菌产生的。20世纪中叶,人类开创了抗生素的黄金时代,大量的抗生素被发现和使用(如四环素类、大环内酯类、氨基糖苷类),但是自20世纪70年代以来,不断增加的研发成本使得新抗生素的发现变得越来越困难<sup>[2]</sup>。与此同时,一些抗生素耐药菌株(如MRSA和MDRTB)的出

现使得人类在对抗疾病的斗争中渐渐处于下风。

造成这一不利局面的主要原因有以下两点:

(1) 新发现的抗生素大多是已知结构化合物的类似物,结构新颖性不足,病原菌容易产生交叉耐药现象;(2) 一些具有应用前景的微生物药物产量过低以至于难以进行大规模发酵生产。若这两个问题能够得到解决,全球的医药行业将会取得质的飞跃。

好在自然界总有无穷的宝藏等待我们去发掘,随着越来越多微生物的基因组被解析,人们惊喜地发现原来微生物基因组中存在许多次级代谢产物生物合成基因簇,而目前人们获得的抗生素只是其中的冰山一角。以放线菌中的模式生物天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)

为例<sup>[3]</sup>, 在其约 8.7 Mb 的基因组中, 除了已经发现的聚酮类抗生素放线紫红素、非核糖体多肽类抗生素 CDA (Calcium-dependent antibiotic)<sup>[4]</sup>之外, 还有十多个负责其他次级代谢产物合成的基因簇。此外, 不容忽视的是, 由于自然界中存在着大量的不可培养微生物, 因此我们有理由相信次级代谢产物的实际数量将会大大超出人们的预期。

自过去半个世纪以来, 传统的化学分离手段在微生物次级代谢产物的挖掘过程中起到了十分重要的作用, 以此为基础建立的以生物活性为导向的高通量筛选模型<sup>[5]</sup>使得有生物活性的新化合物的积累速度大大提高, 但仍不足以满足人们对具有更优活性、更低副作用新药的需求, 但这显然不是加大人力物力的投入就能够解决的问题, 而是需要新理念和新技术的支持, 例如 21 世纪初兴起的合成生物学。

合成生物学的概念最初是由 Hobom 于 1980 年提出用来表述基因重组技术<sup>[6]</sup>, 不过生物大分子人工全合成方面的很多工作早已经开展, 比如, 诺贝尔奖得主 Khorana 教授 1961 年首先采用化学法合成了第一个基因<sup>[7]</sup>; 1965 年, 中国科学家首先合成了有活性的牛胰岛素; 1981 年, 中国科学家又首先合成了有活性的 tRNA 分子。合成生物学以解决人类社会中的重大问题为出发点, 将工程学思想引入到生物学研究中, 以“合成”指导研究, 以“系统构建”指导技术发展, 是一门涉及生物、化学、物理、工程、计算机与信息化技术等多领域的综合交叉学科。它利用工程化的生物系统或生物模型来处理信息、操纵生物体合成新化合物, 以达到制造材料、生产能源、提供食物、保持和增强人类健康以及改善环境等目的。不同于传统的代谢工程着眼于对细胞已有代谢途径的定向改造, 合成生物学强调的是针对代谢通路乃至生命系统的重新设计和合成,

具体体现在 DNA、元件(Parts)、装置(Devices)、系统(Systems)这 4 个层面上, 其中 DNA 是人们熟知的遗传物质, 元件指发挥特定生物学功能的生物大分子, 不同的生物元件组合成为能够发挥人为设定功能的装置, 而多个装置最终组装成为复杂的生物系统<sup>[8]</sup>。

合成生物学在生物医药领域发挥了巨大的作用, 尽管目前成功的例子还不多, 但仅仅利用微生物细胞生产植物来源的天然药物青蒿素及紫杉醇就已经足够引人瞩目了。青蒿素是目前最有效的抗疟疾药物之一, 但天然的青蒿素产量稀少, 提取困难使得其生产成本十分昂贵。Keasling 等<sup>[9]</sup>使用酵母菌为宿主, 结合来自细菌、酵母及植物(青蒿)等多种酶及代谢途径的组装、精密调控等, 对有关代谢途径作了重新设计, 解决了天然或非天然代谢物大量积累对寄主的毒性问题, 使青蒿素的合成能力提高到 25 g/L<sup>[10]</sup>。他们采用的一些开创性方法为后来的研究提供了重要思路, 例如: 将合成底物的甲羟戊酸途径分成上下两个模块分别研究再组合, 大大降低了复杂度; 建立了一套研究基因间可调区域(Tunable intergenic regions)控制基因表达水平的方法<sup>[11]</sup>等。

Stephanopoulos 实验室<sup>[12]</sup>借鉴了 Keasling 的成功经验, 将从三磷酸甘油等底物到合成紫杉醇的第一个中间产物 Taxadiene 的代谢途径分成了合成 IPP (Isopentenylpyrophosphate)和从 IPP 到 Taxadiene 两个模块, 然后利用多变量研究的方法协调两个模块之间表达水平, 限制有毒代谢产物吲哚的积累, 最终将大肠杆菌中 Taxadiene 的产量提高了约 15 000 倍, 达到约 1 g/L 的水平。众所周知, 紫杉醇是植物来源的抗癌药物, 但其结构复杂, 化学合成得率很低, 而合成生物学则为我们开启了将植物来源的活性小分子进行微生物表达的大门。

放线菌作为微生物次级代谢产物最主要的来源之一,其次级代谢产物的合成潜力将在合成生物学的推动下被大大开发。

## 1 利用合成微生物体系表达异源次级代谢产物

人们已经知道大多数的次级代谢生物合成基因簇是沉默的这一事实,其中很大原因是由于实验室的培养条件无法模拟自然界中的实际情况,因此过去人们更多的是凭猜测及经验来促使微生物产生一般情况下难以表达的次级代谢产物,例如添加外源性化学物质如生物激素以及采用共培养的方式<sup>[13]</sup>,但随着对微生物基因组的了解逐步加深,人们可以采取更为高效和直接的策略来获得新的次级代谢产物。另外,次级代谢产物生物合成基因簇的异源表达不仅适用于那些不可培养微生物产生的次级代谢产物,还适用于可培养但是培养条件苛刻或遗传改造困难的微生物。如果把微生物细胞比作为一个小型工厂,那么次级代谢产物合成基因簇就是一条生产线,而事实上聚酮类化合物生物合成基因簇表达的聚酮合酶也的确和工业生产中的生产流水线十分相似<sup>[14]</sup>,这一特点也恰恰符合合成生物学一直所倡导的工程化思想。

### 1.1 底盘细胞的选择及改造

利用合成生物学改造微生物的目的之一是建立高效的微生物体系以满足人们对微生物药物日益增长的需求,而任何一个合成微生物体系的建立首先需要有一个底盘细胞,因为底盘细胞是生物元件、装置和代谢通路发挥生物学功能的基础。良好的底盘细胞应该具有易于培养和遗传操作容易、生长迅速、发酵友好及遗传稳定性这些特点。因此大肠杆菌以及一些放线菌中的模式生物(如天蓝色链霉菌、变铅青链霉菌等)已成为次级代谢产物异源表达的首要选择。

为实现目标代谢产物在底盘细胞中的高效生物合成,首先需要对底盘细胞进行一系列改造。以大肠杆菌为例,抗生素中的聚酮类化合物在大肠杆菌中表达面临3个不可规避的问题:(1)聚酮合酶在大肠杆菌中的正确折叠及翻译后修饰;(2)聚酮化合物的合成前体物质供给;(3)聚酮合酶的生物活性和前体供给的同步,解决这3个问题才能够高效地表达目标代谢产物。Pfeifer等<sup>[15]</sup>通过解决上述3个问题以实现红霉素前体6-dEB在大肠杆菌中的异源表达。他们首先向大肠杆菌基因组中整合了磷酸泛酰巯基乙胺转移酶 *sfp*,从而解决了聚酮合酶的翻译后修饰问题;并在将 *sfp* 整合到基因组上的同时删除了丙酸盐分解代谢的相关基因 *prpRBCD*,而只保留将丙酸盐转化为丙酰辅酶A的基因 *prpE*,使得6-dEB的前体供给得到满足;最后通过在聚酮合酶 DEBS 经诱导表达的同时外源添加丙酸盐使得聚酮合酶的活性与前体物质供给得以同步。他们最终在大肠杆菌中表达得到的6-dEB产量甚至达到了经过多年随机诱变得到的工业菌株的水平,之后他们再次以大肠杆菌为底盘成功得到了红霉素A及一系列衍生物<sup>[16]</sup>。

由于和次级代谢产生菌株的亲缘关系更为接近,链霉菌也同样是次级代谢产物异源表达的理想宿主。例如,Mamoru等<sup>[17]</sup>建立了一系列用于表达次级代谢产物的通用宿主——基因组简约化的阿维链霉菌,这些阿维链霉菌的基因组经过大片段删减非必需基因,最终只保留了80%左右的原始基因组。尽管基因组规模减小,但其生长速率却提高了。最终他们成功地将超过20个次级代谢产物在这些阿维链霉菌中进行了表达,部分次级代谢产物的产量甚至要高于原始菌株<sup>[18]</sup>。此外,基因组最小化的阿维链霉菌作为底盘细胞进行异源表达的另一个好处是阿维链霉菌基因组上的末端反向重复区很短,而且

原来基因组中很大一部分的转座元件被敲除, 因而其遗传稳定性要高于大多数放线菌, 这一特点可以避免工业菌株高产性状的丢失。当然, 由于工业链霉菌经过长期传统育种方法诱变筛选后, 生物体内的代谢网络, 尤其前体供给达到最佳适配, 通过对这些工业链霉菌的改造也可以作为异源表达的优良宿主。

## 1.2 生物合成基因簇的加工

外源基因的成功表达, 仅仅依靠改造底盘细胞还远远不够, 还需要对目标代谢产物的合成基因簇进行设计和加工。例如, Jonathan Kennedy 等<sup>[19]</sup>根据大肠杆菌密码子的偏好性对埃博霉素(Epothilone)的生物合成基因簇进行了重新设计和合成, 继而在大肠杆菌中实现了高效表达。

合成生物学不仅可以帮助我们获得传统方法难以得到的新次级代谢产物, 还可以帮助我们在已有化合物的基础上进行定向改造以获得结构修饰的新化合物, 而这些新化合物是自然界中原本不存在的。

以常见的聚酮类化合物为例, James Staunton<sup>[20-26]</sup>从 4 个方面为我们提供了改造途径: (1) 采用不同的起始模块替换聚酮生物合成基因簇中原有的起始模块, 从而引入不同的起始单元; (2) 在聚酮合酶中掺合进不同的酰基转移酶结构域来引入不同的延伸单元; (3) 在氧化水平上对链延伸单元进行选择性的修饰; (4) 通过改变硫酯酶的位置改变链的长度。这些策略已经在红霉素的改造中得到良好的应用, 并且得到了一系列红霉素的衍生物<sup>[27]</sup>。

在对聚酮类化合物的合成机理和聚酮合酶结构的了解不断加深的基础上, 我们除了能够对聚酮化合物基因簇进行改造之外, 还能重新设计聚酮合酶模块的排列组合方式以获得种类繁多的化合物。Menzella 等<sup>[28]</sup>使用了来自 8 个不

同聚酮类化合物基因簇的 14 个模块, 并将其分解成起始模块、延伸模块、多肽内接头、多肽间接头和硫酯酶这些独立的结构单元, 利用这些结构单元之间特定的酶切位点进行重新排列组合, 得到了 154 个新的基因簇, 其中近一半能够表达产生预期产物。这一例子向人们展示了利用合成生物学进行基因簇的重新设计及从头组装产生新颖聚酮类化合物的巨大潜力。

## 2 利用合成生物学元件开发放线菌产素潜力

提高放线菌的单位产素能力一直是发酵工业关注的焦点, 传统的诱变选育可以使野生菌株转化成为工业生产菌株, 但这却需要数年甚至是数十年重复的诱变、筛选工作, 耗费大量人力、物力及资源; 此外, 菌株的筛选工作存在着一定的盲目性, 往往向菌株引入有利变异的同时也会产生很多有害的变异, 从而影响发酵过程的优化和放大。由于微生物具有复杂的代谢调控网络, 传统的基因工程方法主要针对单个代谢途径或基因进行操作, 对于菌株产量提高的效果有限。

### 2.1 基因簇扩增元件

放线菌产生次级代谢产物始于营养消耗殆尽或生长速率降低的时候, 这往往也是菌体生长进入稳定期的时候, 初级代谢的产物往往是次级代谢的前体, 如乙酰辅酶 A、氨基酸、核苷等, 因此为了获得尽可能多的次级代谢产物, 人们采用了很多方法使初级代谢的中间产物流向次级代谢, 这时过表达某些基因或删除前体竞争途径是最为直接有效的方法之一。对于抗生素合成过程中关键步骤的某个基因来说, 增加其拷贝数提高表达量并非难事, 但涉及到动辄数十 kb 甚至上百 kb 的基因簇的操作则十分困难, 首先, 获得如此之大的基因簇往往需要建立细

菌人工染色体文库(Bacterial artificial chromosome library)并从中筛选获得,其次向放线菌中进行转化要比向大肠杆菌困难得多。随着越来越多的工业生产菌株的基因组得到解析,人们发现许多工业生产菌株基因组上都携带多个拷贝的基因簇,例如,在青霉素的高产菌株中,负责青霉素合成的基因(*pcbAB*、*pcbC*、*pcbDE*)所在的 35 kb 基因簇的拷贝数扩增至原来的 6–16 倍<sup>[29]</sup>;一株卡那霉素高产菌株重复的基因簇数目甚至高达 36 个,而且其重复的片段长达 145 kb<sup>[30]</sup>;本实验室从事了多年的阿维链霉菌菌株选育工作,得到的一株高产菌包含 2 个拷贝的阿维菌素生物合成基因簇(数据未发表)。由此可见,基因簇的多拷贝现象在高产的工业生产菌株中十分常见,只是这种基因簇多拷贝的菌株都是经过不断地诱变筛选获得的。

Takeshi 等<sup>[31]</sup>揭示了卡那霉素链霉菌中基因扩增的机制,他们发现在卡那霉素链霉菌中的一个假定的移动元件中存在一个具有 DNA 释放酶活性的与穿梭质粒中 *tra-A* 同源的基因 *ZouA*,而卡那霉素基因簇的扩增发生在与 *oriT* 序列相似的重组位点 *RsA* 和 *RsB* 之间,这说明卡那霉素链霉菌中 DNA 的扩增是由 DNA 释放酶所介导的同源重组引发的。紧接着他们将这套系统导入到天蓝色链霉菌中成功实现了放线紫红素基因簇的扩增,并且使放线紫红素的产量较原始菌株提高了 20 倍<sup>[32]</sup>。由此可见,使用合成生物学元件能够人为的再现自然发生或传统诱变方法才能实现的基因簇扩增以提高次级代谢产物的产量,从而节省了大量的人力、物力及时间。

## 2.2 调控元件

随着越来越多的启动子(Promoter)、激活子(Activator)、抑制子(Repressor)、群体感应(Quorum sensing)元件被发现,外源基因簇的激活和可调节将成为现实。目前已知抗生素的合成

大多受到转录因子的调控,一些转录调控基因位于抗生素生物合成基因簇之中,如天蓝色链霉菌中放线紫红素基因簇中的 *actII-ORF4*<sup>[33]</sup>及十一烷基灵菌红素合成基因簇中的 *redD*<sup>[34]</sup>。也有一些转录因子位于基因簇之外,如红糖多孢菌中红霉素的合成受到调控因子 *BldD* 影响:*BldD* 可以和红霉素生物合成基因簇中 5 个启动子区结合<sup>[35]</sup>。很多研究表明,增加调控基因的表达量可以显著地提高抗生素的产量<sup>[36–38]</sup>。除了抗生素合成途径特异性的调控因子,一些全局调控因子对抗生素的合成也起着关键的作用,*Zhuo* 等<sup>[39]</sup>通过反向生物工程对阿维菌素合成相关基因进行精确定位,通过转录组芯片比较模式菌株与工业生产菌株的转录组差异,发现工业生产菌株中上调表达的阿维菌素合成基因簇中调控基因 *aveR* 及其他与阿维菌素合成相关的基因上游启动子区域包含  $\sigma^{hrdB}$  所识别的保守区域,这表明  $\sigma^{hrdB}$  起着全局转录调控的作用,以此为出发点构建了  $\sigma^{hrdB}$  突变子文库,最终筛选得到了一株产量较出发菌株提高 52% 的高产菌株。

## 2.3 耐药元件

耐药泵(Drug resistance efflux pumps)元件是细菌抵抗抗生素及其他药物的自我保护机制之一。由于放线菌产生的抗生素对其自身也有一定的毒性,因此一些放线菌的抗生素合成基因簇中往往包含与药物转运相关的基因。阿维菌素合成基因簇上游的 *avtAB* 基因编码的 ABC 家族的多药外排泵被认为可以外排阿维菌素,通过采用多拷贝质粒增加其表达,使一种高产菌株阿维菌素的产量提高了 50%,并使阿维菌素在胞内胞外的分布比例从 6:1 降为 4.5:1<sup>[40]</sup>。

以上例子说明合成生物学元件的有效利用可以显著提高放线菌次级代谢产物的产量,相比于传统的诱变-筛选-诱变的方法,合成生物学为从事抗生素产量提高研究的科研工作者提供

了更为理性的指导方法和工具。

### 3 合成生物学新技术

科学的进步离不开技术的发展, DNA 双螺旋结构的发现, 核酸限制性内切酶的发现和应用以及 PCR 技术的广泛使用使分子生物学有了蓬勃的发展。近十年来, 伴随合成生物学而来的新技术极大地促进了生命科学的进步, 这些新技术不仅体现了合成生物学工程化及标准化的思想, 更使得生物元件的设计和制造变得十分容易。近十年来, 有关 DNA 的组装技术越发成熟, 根据原理不同主要分为两大类——基于限制性内切酶的 DNA 连接技术和基于同源重组的 DNA 拼接技术。

#### 3.1 基于限制性内切酶的 DNA 连接技术

生物元件包括启动子、终止子、核糖体结合位点(RBS)、操纵子及蛋白质编码区, 只有当这些生物元件按照特定的方式组合, 生物学功能才能得以发挥。工程学的重要理念之一是标准化, 而作为合成生物学的重要物质基础, 将各个生物元件进行标准化组装恰恰是合成生物学区别于其他生命科学的特点, 这是因为标准化能够使生物元件的组装和改造更易于进行, 从而大大减轻人们的工作量。

生物积木(BioBrick)是一个由美国麻省理工大学 Tom Knight 等<sup>[41]</sup>提出的标准化生物元件名词。BioBrick 建立在一套特定的限制性内切酶(*EcoR* I、*Xba* I、*Spe* I 和 *Pst* I, 其中 *Xba* I 和 *Spe* I 是同尾酶)之上, 由于不同的 BioBrick 之间经常需要重新组合, 酶切后的片段经连接之后依然只会含有这 4 个单一的酶切位点, 这一特点使生物积木保持了分子克隆操作的可重复性(图 1A)。美国麻省理工大学建立的标准生物元件库(Registry of standard biological parts)至今已经拥有了超过 5 000 个可用的生物积木, 随着人们对

生命体认识的进一步加深, 会有越来越多的生物元件被发现并开发出新的用途。

另一项基于 Type IIS 限制性内切酶<sup>[42-43]</sup>的 DNA 组装技术也十分有效, 特别是针对重复序列 DNA 的拼接。Type IIS 限制性内切酶切割它们识别位点之外的序列, 切割之后会留下 4 bp 的粘性末端(理论上 240 种不同可能, 因此足以完成多个片段的连接反应), 进而可以用于后续的无痕拼接(图 1B)。基于此原理人们开发出了一系列方法, 如 Golden Gate<sup>[44]</sup>和 MASTER (Methylation-assisted tailorable ends rational)<sup>[45]</sup>。

#### 3.2 基于同源重组的 DNA 拼接技术

2009 年, Gibson 等发明了一系列被称之为 Gibson Assembly 的 DNA 组装技术<sup>[46]</sup>。该技术的灵活性是传统方法难以企及的, 其在合成生物学领域将会发挥重要的作用。该项技术不依赖限制性内切酶的作用便可以将具有重叠区域的 DNA 片段连成完整的质粒。该类方法中的一步等温法尤其便利, 其原理如图 1C 所示: 首先由 T5 核酸外切酶从 DNA 双链 5'端进行切割露出 DNA 双链的 3'端, 两条 DNA 链露出的单链由于碱基互补而发生退火, 接着 DNA 聚合酶会以其中任意一条单链为模板自 5'向 3'进行延伸, 最后由连接酶将两条链之间的缺刻连接起来。该方法的一大好处是上述所有反应只要需在 50 °C 进行, 且同时可以进行多个片段的连接, 反应后的产物可以直接用于进行转化, 大大节省了时间, 此外, 该项技术不仅可以用来组装合成生物学元件乃至生物合成基因簇, 甚至还可以组装微生物基因组<sup>[47]</sup>。

DNA 的组装除了在体外进行, 还可以在微生物的体内实现无缝拼接, 如大肠杆菌及酵母。Zhang 等<sup>[48]</sup>于 1998 年发现由噬菌体编码的一对蛋白(RecT 和 RecE)可以介导线性 DNA 和环状质粒 DNA 之间发生同源重组, 并以此开发了一

系列基于 Red/ET 的 DNA 重组技术<sup>[49-50]</sup>, 该项技术同样避免了传统 DNA 重组技术中酶切位点选择带来的问题。Red/ET 重组技术的原理与 Gibson Assembly 类似, 区别在于 DNA 的重组发生在大肠杆菌体内, 这是因为该反应需在质粒 DNA 复制过程中进行。在 Red/ET 重组过程中, RecE 具有 5'至 3'的核酸外切酶活性, 被其切过的单链 DNA 与单链 DNA 结合蛋白 RedT 结合后与环状 DNA 上的同源区域退火进而完成重组。该项技术可以用来对构建好的载体进行点突变或添加其他生物元件, 特别是当需要改造的载体较大的时候(如包含生物合成基因簇的质粒), 这是传统的 DNA 重组技术难以做到的。Red/ET 的衍生技术还可以用来从微生物的基因组中“钓取”任意次级代谢产物合成基因簇——即利用

Red/ET 重组技术使线性 DNA (质粒骨架和线性的基因组片段)之间发生同源重组, 具体来说是将线性化的含有目的基因簇两端同源序列的载体和含有目的 DNA 片段的基因组混合物共转化大肠杆菌, 最终将会在大肠杆菌中得到含有该基因簇的重组质粒。利用该方法, Fu 等<sup>[51]</sup>从发光杆菌(*Photobadus luminescens*)中克隆了 10 个基因簇, 成功地表达了其中的 2 个并最终获得相应的代谢产物。

除了利用大肠杆菌作为 DNA 重组的宿主, Venter 实验室利用酵母细胞同源重组原理发展出了一套 TAR (Transformation-assisted recombination)克隆技术(图 1D), 利用该技术他们将 25 条长约 24 kb 的 DNA 在酵母中成功拼接了生殖支原体的基因组<sup>[52]</sup>, 由于酵母能够容纳非

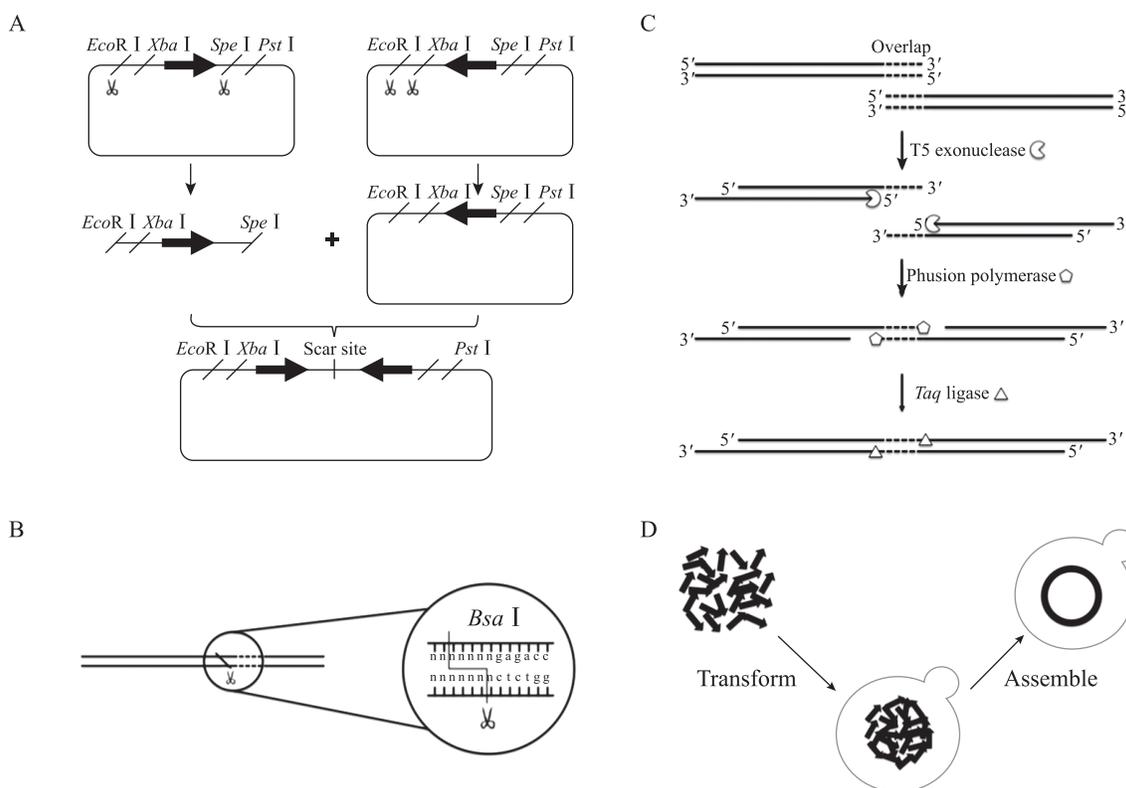


图 1 DNA 组装技术

Fig. 1 The assembly techniques of DNA

常大的外源 DNA, 因此完全可以用来组装微生物的次级代谢基因簇。

放线菌是次级代谢产物的重要来源, 随着越来越多的次级代谢生物合成基因簇被发现, 不论其是否是沉默的, 合成生物学方法可以帮助人们获得新结构和新活性的抗生素并对之加以改造, 这在病原微生物耐药性日趋严重的今天意义十分重大; 此外, 合成生物学方法可以指导人们更为理性地提高放线菌次级代谢产物的现有水平, 这将大大缩短新型抗生素研发及产业化的进程。

## 参 考 文 献

- [1] 刘志恒. 放线菌——微生物药物的重要资源[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 143–145.
- [2] Berdy J. Bioactive microbial metabolites[J]. The Journal of Antibiotics, 2005, 58(1): 1–26.
- [3] Bentley S, Chater K, Cerdeño-Tárraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Nature, 2002, 417(6885): 141–147.
- [4] Chong PP, Podmore SM, Kieser HM, et al. Physical identification of a chromosomal locus encoding biosynthetic genes for the lipopeptide calcium-dependent antibiotic (CDA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Microbiology, 1998, 144(1): 193–199.
- [5] Zhang L, Yan K, Zhang Y, et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(11): 4606–4611.
- [6] Hobom B. Gene surgery: on the threshold of synthetic biology[J]. Medizinische Klinik, 1980, 75(24): 834–841.
- [7] Moffat J, Khorana H. Nucleoside polyphosphates. XII.<sup>1</sup> The total synthesis of Coenzyme A<sup>2</sup>[J]. Journal of the American Chemical Society, 1961, 83: 663–675.
- [8] Endy D. Foundations for engineering biology[J]. Nature, 2005, 438(7067): 449–453.
- [9] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast[J]. Nature, 2006, 440(7086): 940–943.
- [10] Paddon C, Westfall P, Pitera D, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. Nature, 2013, 496: 438–446.
- [11] Pflieger BF, Pitera DJ, Smolke CD, et al. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(8): 1027–1032.
- [12] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. Science, 2010, 330(6000): 70–74.
- [13] Cueto M, Jensen PR, Kauffman C, et al. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge[J]. Journal of Natural Products, 2001, 64(11): 1444–1446.
- [14] Keatinge-Clay AT. The structures of type I polyketide synthases[J]. Natural product reports, 2012, 29(10): 1050–1073.
- [15] Pfeifer BA, Admiraal SJ, Gramajo H, et al. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*[J]. Science, 2001, 291(5509): 1790–1792.
- [16] Zhang HR, Wang Y, Wu JQ, et al. Complete biosynthesis of erythromycin A and designed analogs using *E. coli* as a heterologous host[J]. Chemistry & Biology, 2010, 17(11): 1232–1240.
- [17] Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, et al. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(6): 2646–2651.
- [18] Komatsu M, Komatsu K, Koiwai H, et al. Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites[J]. ACS Synthetic Biology, 2013, doi: 10.1021/sb3001003.
- [19] Obwald C, Zipf G, Schmidt G, et al. Modular Construction of a functional artificial epothilone

- polyketide pathway[J]. ACS Synthetic Biology, 2012, doi: 10.1021/sb300080t.
- [20] Staunton J, Wilkinson B. Combinatorial biosynthesis of polyketides and nonribosomal peptides[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2001, 5(2): 159–164.
- [21] Marsden AF, Wilkinson B, Cortés J, et al. Engineering broader specificity into an antibiotic-producing polyketide synthase[J]. Science, 1998, 279(5348): 199–202.
- [22] Ruan X, Pereda A, Stassi DL, et al. Acyltransferase domain substitutions in erythromycin polyketide synthase yield novel erythromycin derivatives[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(20): 6416–6425.
- [23] Kao CM, McPherson M, McDaniel RN, et al. Gain of function mutagenesis of the erythromycin polyketide synthase. 2. Engineered biosynthesis of an eight-membered ring tetraketide lactone[J]. Journal of the American Chemical Society, 1997, 119(46): 11339–11340.
- [24] Cortes J, Wiesmann K, Roberts GA, et al. Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage[J]. Science, 1995, 268(5216): 1487–1489.
- [25] Kao CM, Luo G, Katz L, et al. Manipulation of macrolide ring size by directed mutagenesis of a modular polyketide synthase[J]. Journal of the American Chemical Society, 1995, 117(35): 9105–9106.
- [26] Böhm I, Holzbaier IE, Hanefeld U, et al. Engineering of a minimal modular polyketide synthase, and targeted alteration of the stereospecificity of polyketide chain extension[J]. Chemistry & Biology, 1998, 5(8): 407–412.
- [27] Pacey MS, Dirlam JP, Geldart RW, et al. Novel erythromycins from a recombinant *Saccharopolyspora erythraea* strain NRRL 2338 pIG1. I. Fermentation, isolation and biological activity[J]. The Journal of Antibiotics, 1998, 51(11): 1029.
- [28] Menzella HG, Reid R, Carney JR, et al. Combinatorial polyketide biosynthesis by de novo design and rearrangement of modular polyketide synthase genes[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(9): 1171–1176.
- [29] Fierro F, Barredo JL, Diez B, et al. The penicillin gene-cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(13): 6200–6204.
- [30] Yanai K, Murakami T, Bibb M. Amplification of the entire kanamycin biosynthetic gene cluster during empirical strain improvement of *Streptomyces kanamyceticus*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(25): 9661–9666.
- [31] Murakami T, Sumida N, Bibb M, et al. ZouA, a putative relaxase, is essential for DNA amplification in *Streptomyces kanamyceticus*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(8): 1815–1822.
- [32] Murakami T, Burian J, Yanai K, et al. A system for the targeted amplification of bacterial gene clusters multiplies antibiotic yield in *Streptomyces coelicolor*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(38): 16020–16025.
- [33] Gramajo HC, Takano E, Bibb MJ. Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated[J]. Molecular Microbiology, 1993, 7(6): 837–845.
- [34] Takano E, Gramajo H, Strauch E, et al. Transcriptional regulation of the redD transcriptional activator gene accounts for growth - phase - dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(19): 2797–2804.
- [35] Chng C, Lum AM, Vroom JA, et al. A key developmental regulator controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(32): 11346–11351.
- [36] Guo J, Zhao J, Li L, et al. The pathway-specific regulator AveR from *Streptomyces avermitilis*

- positively regulates avermectin production while it negatively affects oligomycin biosynthesis[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 283(2): 123–133.
- [37] Liu G, Tian YQ, Yang HH, et al. A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(6): 1855–1866.
- [38] Jung WS, Jeong SJ, Park SR, et al. Enhanced heterologous production of desosaminyl macrolides and their hydroxylated derivatives by overexpression of the pikD regulatory gene in *Streptomyces venezuelae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(7): 1972–1979.
- [39] Zhuo Y, Zhang W, Chen D, 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.
- [40] Qiu JF, Zhuo Y, Zhu DQ, et al. Overexpression of the ABC transporter AvtAB increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(2): 337–345.
- [41] Shetty RP, Endy D, Knight TF. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2008, 2(1): 1–12.
- [42] Szybalski W, Kim SC, Hasan N, et al. Class-II restriction enzymes—a review[J]. *Gene*, 1991, 100: 13–26.
- [43] Lippow SM, Aha PM, Parker MH, et al. Creation of a type IIS restriction endonuclease with a long recognition sequence[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(9): 3061–3073.
- [44] Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability[J]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3647.
- [45] Chen WH, Qin ZJ, Wang J, et al. The MASTER (methylation-assisted tailorable ends rational) ligation method for seamless DNA assembly[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(8): e93–e93.
- [46] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343–345.
- [47] Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome[J]. *Science*, 2008, 319(5867): 1215–1220.
- [48] Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP, et al. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*[J]. *Nature Genetics*, 1998, 20(2): 123–128.
- [49] Bird AW, Erler A, Fu J, et al. High-efficiency counterselection recombineering for site-directed mutagenesis in bacterial artificial chromosomes[J]. *Nature Methods*, 2011, 9(1): 103–109.
- [50] Muyrers JP, Zhang Y, Benes V, et al. Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination[J]. *EMBO Reports*, 2000, 1(3): 239–243.
- [51] Fu J, Bian X, Hu S, et al. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 440–446.
- [52] Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, et al. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(51): 20404–20409.