

喷他霉素新生产菌的发现及产量提高

孙佳宁^{1,2}, 王海燕², 范可强², 何信⁴, 廖振翔⁴, 王立艳⁴, 黄英^{2,3}, 任晋玮⁵, 孟大利¹, 潘国辉^{2,3}

1 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学, 北京 101408

4 中国矿业大学(北京) 化学与环境工程学院, 北京 100083

5 中国科学院微生物研究所 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

孙佳宁, 王海燕, 范可强, 何信, 廖振翔, 王立艳, 黄英, 任晋玮, 孟大利, 潘国辉. 喷他霉素新生产菌的发现及产量提高[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2888-2904.

SUN Jianing, WANG Haiyan, FAN Keqiang, HE Xin, LIAO Zhenxiang, WANG Liyan, HUANG Ying, REN Jinwei, MENG Dali, PAN Guohui. Discovery and production improvement of new pentamycin-producing bacteria[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2888-2904.

摘要:【背景】喷他霉素(pentamycin)是一种多烯大环内酯类抗生素, 对白色念珠菌(*Candida albicans*)、阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)和其他几种病原菌有显著的抑制活性, 在瑞士已被注册用于治疗阴道念珠菌病、滴虫病和混合感染。【目的】发掘新的喷他霉素生物合成基因簇及其生产菌株, 并通过基因工程改造方法提高其产量, 为进一步提高喷他霉素产量、推动其工业化生产应用提供新思路及理论基础。【方法】通过 BLASTp 分析从细菌基因组中搜索喷他霉素已知生物合成酶的同源蛋白, 进一步筛选出可能合成喷他霉素及其类似物 filipin 的新基因簇, 使用多位点序列分析(multi-locus sequence analysis, MLSA)方法比较其所在宿主菌株的基因组相似性。利用组成型启动子 *kasOp** 过表达 LuxR 家族转录调控基因 *ptnF* 以提高喷他霉素的产量。【结果】从细菌基因组中发掘获得了 27 个新的含有喷他霉素/filipin 生物合成基因簇的菌株。并通过培养基筛选、发酵及代谢产物分析等证实了其中的米修链霉菌(*Streptomyces misionensis*)能够合成喷他霉素、filipin III 等一系列化合物。进一步通过基因工程方法将喷他霉素的产量较野生菌株提高了 4.34 倍, 达到 101.7 mg/L, 并且喷他霉素及 filipin 类似物总量达到 146.1 mg/L, 较野生菌株提高了 3.28 倍。【结论】本研究系统分析了细菌基因组中喷他霉素类天然产物生物合成基因簇及其所在菌株的多样性, 通过实验证实其中的米修链霉菌能够合成喷他霉素及 filipin 类天然产物。此外, 通过基因工程改造实现了喷他霉素产

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2303100); 国家自然科学基金(32270081)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2303100) and the National Natural Science Foundation of China (32270081).

*Corresponding author. E-mail: panguohui@im.ac.cn

Received: 2024-04-03; Accepted: 2024-04-23; Published online: 2024-05-09

量的提高。本研究为构建更优的喷他霉素工业化生产菌株提供了新的元件、途径、菌株及理论基础。
关键词：次级代谢产物；喷他霉素；生物合成基因簇；基因工程改造

Discovery and production improvement of new pentamycin-producing bacteria

SUN Jianing^{1,2}, WANG Haiyan², FAN Keqiang², HE Xin⁴, LIAO Zhenxiang⁴, WANG Liyan⁴, HUANG Ying^{2,3}, REN Jinwei⁵, MENG Dali¹, PAN Guohui^{*2,3}

1 Traditional Chinese Medicine College, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China

4 School of Chemical & Environmental Engineering, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China

5 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: **[Background]** Pentamycin is a polyene macrolide with significant inhibitory activities against *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis*, and several other vaginal pathogens and has been registered in Switzerland for treating vaginal candidiasis, trichomoniasis, and mixed infections. **[Objective]** To explore new biosynthetic gene clusters and production strains and improve the yield of pentamycin by genetic engineering, providing new ideas and a theoretical basis for further increasing the yield and promoting the industrial production and application of pentamycin. **[Methods]** BLASTp was used to search for the homologous proteins of known enzymes involved in the biosynthesis of pentamycin from bacterial genomes, and new gene clusters for synthesizing pentamycin and its analogues were identified. Then, multi-locus sequence analysis (MLSA) was performed to compare the genomic similarity among the strains possessing the biosynthetic gene clusters. The constitutive promoter *kasOp** was used to overexpress the positive transcriptional regulatory gene *ptnF* for increasing pentamycin production. **[Results]** A total of 27 new strains containing the biosynthetic gene clusters of pentamycin/filipin were discovered from the bacterial genome. The results from medium screening, fermentation, and metabolite analysis indicated that *Streptomyces misionensis* can synthesize multiple compounds such as pentamycin and filipin III. The genetic engineering increased the yield of pentamycin by 4.34 folds (reaching 101.7 mg/L) compared with that of the original strain. The total production of pentamycin and filipin analogues by the engineered strain reached 146.1 mg/L, which was 3.28 times higher than that of the original strain. **[Conclusion]** This study systematically analyzed the biosynthetic gene clusters of pentamycin in bacterial genomes and the diversity of the strains carrying these gene clusters. The experimental data confirmed that *S. misionensis* can produce natural products including pentamycin and filipin. In addition, the production of pentamycin was improved by genetic engineering. This study provides new elements, pathways, strains, and theoretical foundations

for constructing elite strains for the industrial production of pentamycin.

Keywords: secondary metabolites; pentamycin; biosynthetic gene cluster; genetic engineering

喷他霉素(pentamycin)是一类多烯大环内酯类抗生素,能靶向真菌细胞膜中的麦角固醇,使其不稳定,最终导致细胞死亡,因而具有广谱抗真菌活性^[1](图1)。由于喷他霉素对白色念珠菌(*Candida albicans*)、阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)及其他几种阴道致病细菌都具有显著的抑制活性,并且对健康人阴道定殖的关键自然菌群——乳酸杆菌(*Lactobacillus* sp.)无负面影响,因此被开发成治疗感染性阴道炎的独特新疗法。2009年,喷他霉素3 mg片剂在瑞士被批准用于治疗阴道念珠菌感染、滴虫病和混合感染等常见的阴道疾病^[2-4]。Filipin III和喷他霉素的化学结构非常相似,二者的骨架结构都是28元环五烯大环内酯,区别仅在于喷他霉素的C14位被羟基化修饰(图1)。与喷他霉素相似,filipin III也能够靶向真菌细胞膜中的麦角固醇,但其对麦角固醇和哺乳动物细胞膜中的胆固醇亲和力相似,导致其不能作为药物使用。不过,filipin III由于胆固醇亲和力高并且与胆固醇形成的复合物能够发出荧光,其在临床上被注册用于诊断具有胆固醇脂沉积现象的C型尼曼匹克氏症^[5],也可用作细胞膜中胆固醇检测及定量的探针^[6]。

目前已报道的喷他霉素产生菌株多为链霉菌,如最早报道的纤维素链霉菌(*Streptomyces cellulosa*),之后陆续发现的弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)、灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)、耳状链霉菌(*Streptomyces padanus*)、罗氏链霉菌(*Streptomyces rochei*)、肉桂链霉菌(*Streptomyces cinnamomeum*)等链霉菌以及杨凌糖丝菌(*Saccharothrix yanglingensis*)等^[1,7-13]。丝状链霉菌(*Streptomyces filipinensis*)、阿维链霉菌

(*Streptomyces avermitilis*)和米哈拉链霉菌(*Streptomyces miharaensis*)都能够产生 filipin III及其类似物^[14-16]。大部分喷他霉素产生菌由于其发酵产物显示出抗真菌活性而被发现,也有个别报道的喷他霉素产生菌基于基因组挖掘分析被发现。例如,有研究通过在链霉菌基因组中搜索喷他霉素生物合成关键酶细胞色素 P450 蛋白 PtnJ 的同源蛋白,提出了可能产生喷他霉素的链霉菌^[17]。但尚无研究报道对细菌中喷他霉素、filipin III及其类似物的生物合成潜力进行系统评估和发掘。目前,喷他霉素和 filipin 类化合物的生物合成途径已经基本研究清楚^[15,17-18]。相关研究表明喷他霉素和 filipin III的生物合成过程相似,其生物合成基因簇也高度相似,二者的大环内酯骨架均由 I 型聚酮合酶(type I polyketide synthase, PKS I)催化合成^[17]。具体而言,模块化的 PKS I 合成含有 5 个双键的聚酮链。聚酮链在硫酯酶结构域的作用下环化成多烯大环内酯结构(filipin I),之后在 2 个细胞色素 P450 蛋白 PtnD 和 PtnC 的作用下, C1 位和 C26 位分别发生羟基化修饰,形成 filipin II 和 filipin III(图1)。有研究表明在 *S. filipinensis* 中, PtnD 和 PtnC 的同源蛋白 FilD 和 FilC 催化形成羟基的先后顺序可变^[18]。在 *Streptomyces* sp. S816 中的喷他霉素生物合成基因簇比 *S. avermitilis* 中的 filipin 生物合成基因簇多编码一组细胞色素 P450 蛋白 PtnJ 及其辅助蛋白铁氧还蛋白 PtnI,负责催化 C14 位羟基化反应,将 filipin III 氧化形成喷他霉素^[17](图1)。簇内编码的其他生物合成蛋白与 filipin 簇编码蛋白序列一致性都大于 75%^[17]。此外,2 个簇内都具有编码 SARP-LAL 家族转录因子 PtnR 和 PAS-LuxR 家族转录因子

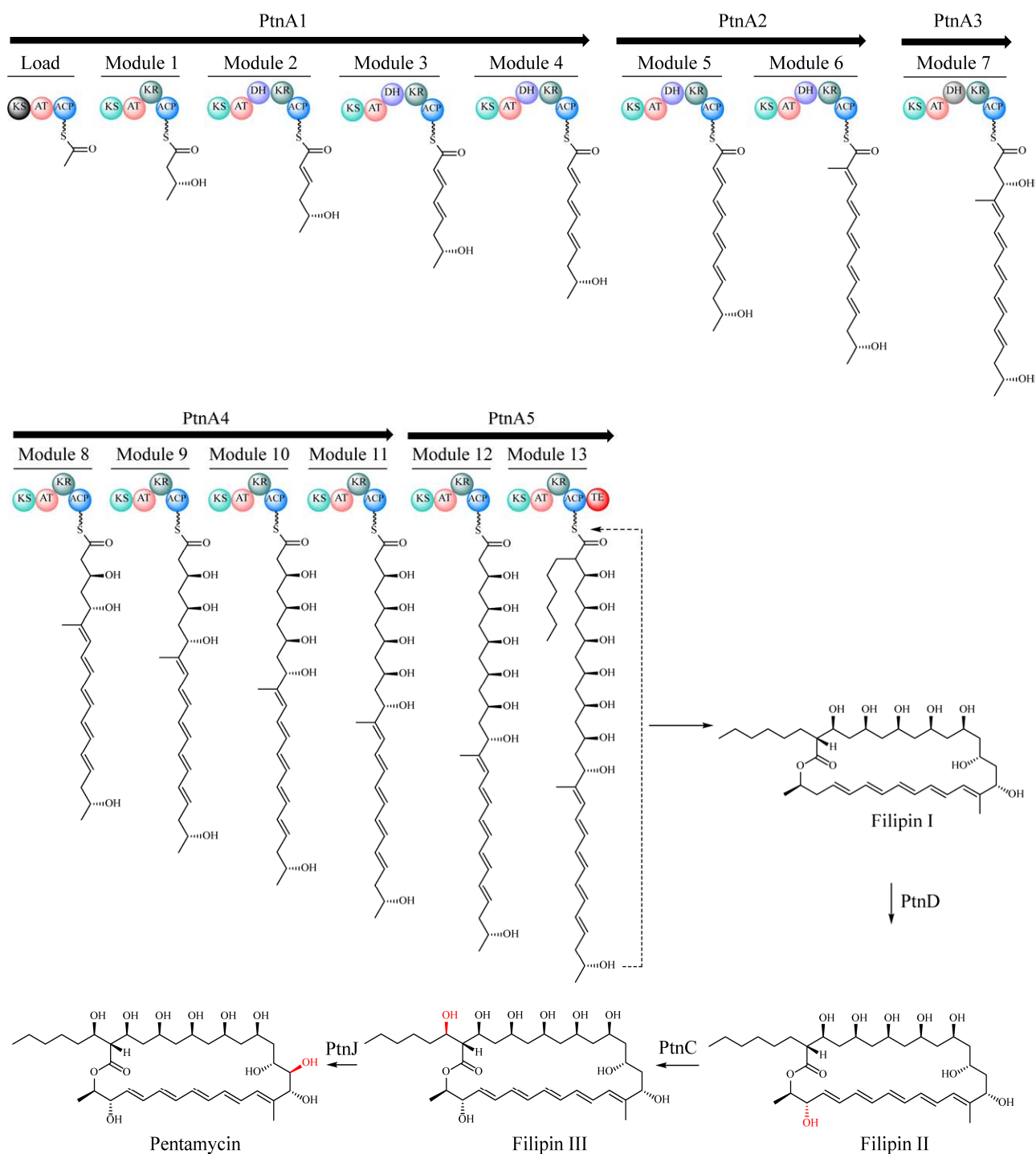


图 1 喷他霉素生物合成途径推测 KS: 酮基合酶; AT: 酰基转移酶; ACP: 酰基载体蛋白; DH: 脱水酶; KR: 酮基还原酶; TE: 硫酯酶

Figure 1 Proposed biosynthetic pathway of pentamycin in *Streptomyces misionensis*. Domain abbreviations are as follows. KS: Ketosynthase; AT: Acyltransferase; ACP: Acyl carrier protein; DH: Dehydratase; KR: Ketoreductase; TE: Thioesterase.

PtnF 的基因^[17]。最新研究表明这 2 个转录因子正调控喷他霉素及其类似物的生物合成, 分别敲除这 2 个基因都会导致喷他霉素不再合成, 分别利用 *ermEp** 过表达 *ptnR* 和 *ptnF*, 喷他霉素产量提高 52% 和 50%^[19]。

本研究拟系统分析细菌基因组中喷他霉素类天然产物生物合成基因簇及其所在菌株的多样性, 以发现新的喷他霉素生产菌, 提高喷他霉素的发酵单位产量, 为进一步构建喷他霉素高产菌株提供新的元件、途径、菌株和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

米修链霉菌(*Streptomyces misionensis*) DSM 40306 (CGMCC 4.1982) 由黄英研究员课题组保存, 大肠杆菌 *E. coli* ET12567/pUZ8002、*E. coli* JM109、质粒 pSET152-kasO* (pBS21003)、pKC1139 由本实验室保存。pCRISPR-cBEST 由上海交通大学童垚俊课题组惠赠^[20]。

1.1.2 主要试剂和仪器

抗生素, 上海源叶生物科技有限公司; 分

子克隆试剂, 北京博迈德基因技术有限公司和纽英伦生物技术(北京)有限公司。PCR 仪, Bio-Rad 公司; 小型恒温摇床, 上海博彩生物科技有限公司; 台式离心机, Thermo Scientific 公司; 液相色谱-高分辨电喷雾质谱仪, 沃特世公司; 高效液相色谱仪, 岛津公司。

本研究使用的引物见表 1。

1.1.3 培养基

LB 培养基用于培养大肠杆菌, ISP3 琼脂培养基用于米修链霉菌的孢子培养, 2×YT 培养基、MS 培养基用于接合转移, 均参照文献[21]配制。

M2、M4、M6、M8、FM2、YMS、SSM 培养基用于菌株的发酵。

M2 培养基(g/L): 蔗糖 100.00, 葡萄糖 10.00, 酸水解酪蛋白 0.10, 酵母浸粉 5.00, MOPS 21.00, 微量元素溶液 1.00 mL, K₂SO₄ 0.25, MgCl₂·6H₂O 10.00, pH 7.0。微量元素溶液(mg/L): ZnCl₂ 40.00, FeCl₃·6H₂O 200.00, MnCl₂·4H₂O 10.00, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 10.00, NaB₄O₇·10H₂O 10.00, CuCl₂·2H₂O 10.00, pH 7.0。

M4 培养基(g/L): 甘油 50.0, 可溶性淀粉 25.0, 酵母浸粉 5.0, pH 7.0。

表 1 本研究所用引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	用途 Usage
pSETMIXLuxR-f	CGTGCAGGACTGGGGGAGTTCTTAAGAAGTTTTCC GACAGGGAGCCCAC	Amplification of the <i>ptnF</i> gene fragment from <i>S. misionensis</i>
pSETMIXLuxR-r	TGCATGCAGCATCGATACGCTCTTAAGTCACTTCACG AAGTCGTCCACGAC	
Veri-lacZa	TAACGCCAGGGTTTTCCCAGTC	Validation of <i>S. misionensis</i> / pSETMIXptnF with pSET MIX LuxR-r
MIXdel6934spacer2-f	GTTTGGTAGGATCGACGGCGGGTCCACGCGGTG TGCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGA	Construction of gene editing plasmid pBEMIXptnA1 for <i>S. misionensis</i>
MIXdel6934spacer2-r	TCTATTTCTAGCTCTAAAACAGCACACCGCGTGGAC CGCCGCCGTCGATCCTACCAACC	
MIX6934spacer2seq-f	CGGCTCGCCTACGAACG	Validation of <i>ptnA1</i> gene editing in <i>S. misionensis</i>
MIX6934spacer2seq-r	CGGACCGGTGCGGCC	

M6 培养基(g/L): 黄豆饼粉 10.0, 麦芽提取物 10.0, 葡萄糖 50.0, 玉米淀粉 20.0, NaNO₃ 5.5, NH₄Cl 3.5, CaCO₃ 6.0, pH 7.2。

M8 培养基(g/L): 蔗糖 120.00, 脱脂奶粉 11.00, 棉籽饼粉 11.00, 黄豆饼粉 11.00, K₂HPO₄·3H₂O 1.00, FeSO₄·7H₂O 0.10, CaCO₃ 3.00, 微量元素溶液 5.00 mL, pH 7.2。其中微量元素溶液(mg/L): ZnSO₄·7H₂O 0.01, NaMoO₄·2H₂O 0.05, CuSO₄·5H₂O 0.05, pH 7.2。

FM2 培养基(g/L): 酵母提取物 2.0, 玉米淀粉 5.0, 蛋白胨 2.0, 葡萄糖 20.0, 黄豆粉 5.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, CaCO₃ 3.0, NaCl 4.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, pH 7.2。

SSM 培养基(g/L): 黄豆饼粉 20.0, 蔗糖 80.0, 脱脂奶粉 1.0, K₂HPO₄·3H₂O 1.0, CaCO₃ 3.0, FeSO₄·7H₂O 0.1, pH 7.2。

YMS 培养基(g/L): 酵母提取物 4.0, 可溶性淀粉 4.0, 麦芽糖 1.0, CoCl₂·6H₂O 痕量, pH 7.2。

1.2 生物信息学分析方法

细菌基因组数据下载自 NCBI Genome 数据库(截止到 2024 年 2 月)。使用已知喷他霉素与 filipin 生物合成基因簇编码的蛋白序列为查询蛋白, 使用 BLASTp 在已下载的细菌基因组中搜索其同源蛋白^[22]。找出成簇排列的同源蛋白编码基因, 并与 MIBiG 数据库中已知天然产物生物合成基因簇进行比较^[23], 通过人工复筛挑选出可能合成喷他霉素或 filipin 类天然产物的生物合成基因簇。蛋白序列比较使用 parasail_aligner 完成^[24]。

使用多位点序列分析(multi-locus sequence analysis, MLSA)方法比较喷他霉素生物合成基因簇所在宿主菌株的基因组相似性。参考文献[25-26]中的方法, 选择 ATP 合酶 β 链基因(*atpD*)、DNA 旋转酶 β 亚基基因(*gyrB*)、重组酶 A 基因(*recA*)、RNA 聚合酶 β 亚基基因(*rpoB*)、色氨酸合酶 β 亚基基因(*trpB*)等 5 个基因进行。以天

蓝色链霉菌(*S. coelicolor*) A3(2)中相应基因编码的氨基酸序列作为查询蛋白, 使用 BLASTp 在链霉菌基因组中搜索其同源蛋白, 使用基因编码区的 DNA 序列进行分析。多重序列比对、Kimura 双参数距离计算以及进化树构建使用 MEGA 11 完成^[27], 使用 iTOL 进行可视化^[28]。

1.3 菌株培养及分子克隆基本操作

大肠杆菌培养、转化、质粒提取、基因组 DNA 提取及 PCR 等方法参照文献[29], 米修链霉菌所有菌株采用 ISP3 琼脂培养基 28 °C 培养。

1.4 敲除核心基因 *ptnA1* 质粒的构建

根据网站 <https://crispy.secondarymetabolites.org/>设计目标敲除基因的 sgRNA。由网站所提供的 Off target hits with mismatches 数据, 选择脱靶位点最少、脱靶概率最低的序列作为失活该基因的 sgRNA^[20], 添加质粒的同源序列后合成引物, 将引物退火、连接, 将得到的双链 sgRNA 与 *Nco* I 酶切回收后的 pCRISPR-cBEST 质粒以 Gibson 组装方式进行组装, 组装产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 最后经菌落 PCR 验证及测序验证确定获得单碱基编辑质粒 pBEMIXΔptnA1。

1.5 过表达 *ptnF* 质粒的构建

以米修链霉菌基因组为模板, 使用表 1 中引物 pSETMIXLuxR-*f/r* 扩增 *ptnF* 基因片段(692 bp), 以 Gibson 组装方式连接到经 *Afl* II 酶切消化后的线性化质粒 pSET152-kasO* 上, 连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 最后经菌落 PCR 验证和测序验证后获得过表达质粒 pSETMIXptnF。

1.6 大肠杆菌-放线菌接合转移

通过接合转移将构建好的质粒载体转入链霉菌中, 具体操作如下: 将质粒转化大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 感受态细胞, 涂布在含有 100 μg/mL 安普霉素、50 μg/mL 卡那霉素、25 μg/mL 氯霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 培

养;挑取单菌落接种到含有相应浓度抗生素的4 mL LB 液体培养基中,37 °C、220 r/min 培养过夜;取1 mL 培养好的菌液转接至50 mL LB 液体培养基中,37 °C培养至 OD_{600} 为0.4–0.6后4 000 r/min 离心5 min 收集菌体,用50 mL 液体LB 培养基轻轻洗涤菌体2次,最后用500 μ L LB 培养基重悬细胞。用无菌水收集米修链霉菌新鲜孢子,用1 mL 2 \times YT 培养基洗涤2次后50 °C热激10 min,28 °C培养1 h;将500 μ L 的大肠杆菌细胞与500 μ L 链霉菌孢子混合,涂布在含有10 mmol/L $MgCl_2$ 和30 mmol/L $CaCl_2$ 的MS 固体培养基上,风干后于28 °C培养16 h,每个平板加终浓度为30 μ g/mL 的茶啉酮酸和60 μ g/mL 的安普霉素,继续于28 °C培养3–5 d后,将长出的接合子挑至含有相应抗生素的适宜培养基上,产孢后进行菌落PCR 鉴定。

1.7 菌株的发酵

米修链霉菌野生型及重组菌株均可在ISP3 琼脂培养基上生长,培养7 d 收集新鲜孢子进行发酵,其种子培养基为ISP2,28 °C、180 r/min 培养48 h后,取2 mL 种子液转接50 mL 发酵培养基(M2、M4、M6、M8、FM2、YMS、SSM 培养基),28 °C、180 r/min 培养24 h后加入大孔吸附树脂,再继续以相同条件培养6 d。用于对比产量的发酵过程不加入树脂,转接至发酵培养基后直接以相同条件培养7 d。

1.8 发酵液处理及高效液相色谱检测

发酵结束后6 000 r/min 离心5 min 收集树脂,晾干后用5 mL 甲醇浸泡,浸取液用0.22 μ m 微孔滤膜过滤后使用HPLC 分析喷他霉素及filipin 类化合物产量。取250 μ L 用于对比产量的菌株发酵产物,加入750 μ L 甲醇混匀,12 000 r/min 离心15 min,取上清用0.22 μ m 微孔滤膜过滤后,使用HPLC 分析喷他霉素及filipin 类化合物产量。

使用高效液相色谱仪定量分析喷他霉素及filipin 类化合物的产量,色谱柱为安捷伦Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HT (4.6 mm \times 100 mm, 粒径1.8 μ m)。洗脱条件为水+0.1%甲酸(A相)/乙腈+0.1%甲酸(B相),流速为0.4 mL/min,梯度洗脱总时间25 min:前3 min 保持5%的B相,然后在17 min 的时间间隔内B相由5%升到95%,随后95% B相维持3 min,5% B相平衡2 min。检测波长为339 nm,全波长扫描范围190–800 nm。

1.9 液相色谱-高分辨质谱分析

液相色谱-高分辨电喷雾质谱检测使用ACQUITY 2D I-Class UPLC-XEVO G2-XS QTOF 质谱仪,采用ACQUITY UPLC Ben C18 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 粒径1.7 μ m)分离。洗脱条件为水+0.1%甲酸(A相)/乙腈+0.1%甲酸(B相),流速为0.4 mL/min,梯度洗脱总时间25 min:前0.5 min 保持5%的B相,然后在10 min 的时间间隔内B相由5%升至95%,随后95% B相维持4.5 min。全波长扫描范围200–600 nm。

1.10 化合物的分离纯化

以50 mL 摇瓶发酵产量最高的发酵条件对菌株进行大批量发酵,方法同1.5。发酵结束后收集树脂,用甲醇浸取,将收集的甲醇浸取液旋干后用甲醇重溶,首先使用C18 硅胶柱进行分离,液相分析后将有目标产物的样品旋干,用甲醇重溶,再使用Sephadex LH20 凝胶柱进行分离,将有目标产物的样品合并,最后使用半制备HPLC 进行纯化,使用Waters 2487 高效液相色谱仪,色谱柱为YMC-Pack ODS-A (10 mm \times 250 mm, 粒径5 μ m),以水+0.1%甲酸(A相)/乙腈+0.1%甲酸(B相)作为流动相,使用45% B相等度洗脱,流速为3 mL/min,制得化合物纯品。化合物避光处理冻干后进行核磁分析。

1.11 二苯胺法测定生物量

取0.5 mL 菌株发酵液,5 000 r/min 离心15 min

收集菌体,使用等体积蒸馏水洗涤菌体,再使用 300 μL 的蒸馏水重悬菌体。随后向其中加入 600 μL 的二苯胺试剂,充分搅拌至均匀,将混合液置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中孵育 1 h 后进行离心,收集上清液,最后利用 96 孔板测定上清液在 595 nm 波长下的吸收值。二苯胺试剂的配制如下:1 g 二苯胺溶解于 100 mL 的冰乙酸中,加入 1.5 mL 的浓硫酸和 1 mL 的 1.6%乙醛,充分混合。

2 结果与分析

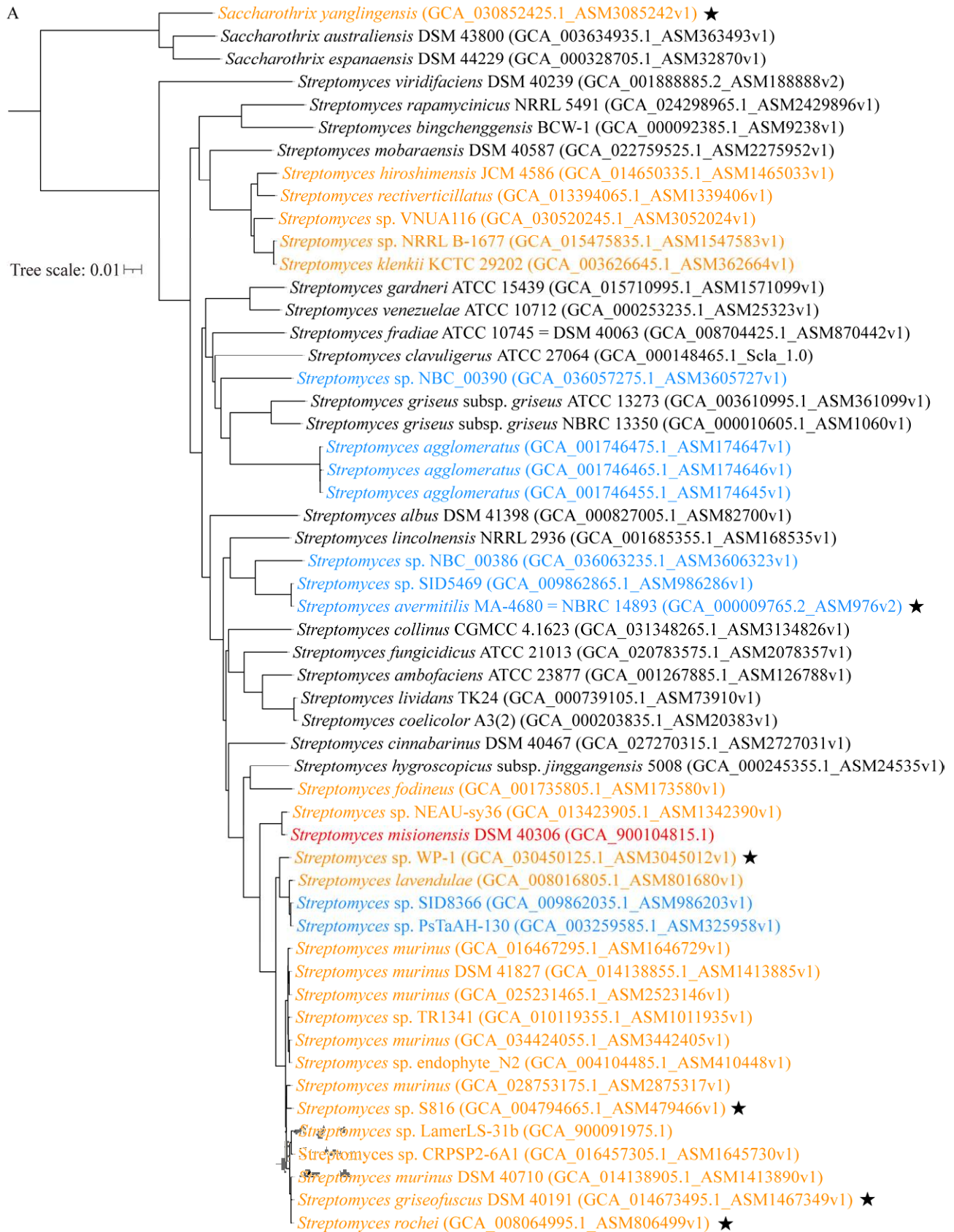
2.1 喷他霉素类天然产物生物合成基因簇及其所在菌株的系统发掘与分析

我们从 NCBI Genome 数据库中共下载得到 55 597 个细菌基因组(截至 2024 年 2 月),其中包含了已报道可以合成喷他霉素的 *Streptomyces* sp. S816 以及可以合成 filipin 的阿维链霉菌(*S. avermitilis*) MA-4680 等菌株的基因组序列^[15]。根据文献报道的序列特征,我们定位了基因组中完整的喷他霉素与 filipin 生物合成基因簇(图 2)。随后,我们以此基因簇中蛋白为查询序列,在细菌基因组中搜索编码基因成簇排列的同源蛋白,并进一步与 MIBiG 数据库中已知天然产物生物合成基因簇编码的蛋白进行序列比较^[23]。经过人工检验复核,排除合成其他天然产物的生物合成基因簇,最终获得了 33 个可能的喷他霉素/filipin 生物合成基因簇。依据基因簇中是否含有喷他霉素生物合成途径中必要的细胞色素 P450 氧化酶 PtnJ (GenBank: TGZ15169.1)同源蛋白的编码基因,预测其中 24 个基因簇合成产物为喷他霉素,9 个基因簇合成产物为 filipin 类。这些基因簇中基因的组成与排列顺序与已知喷他霉素/filipin 生物合成基因簇基本一致,编码蛋白序列相似性较高(序列一致性为 70%–100%)。

这些新的含有喷他霉素与 filipin 生物合成基因簇的宿主菌大多为链霉菌,个别为糖丝菌,这与已报道的此类化合物的产生菌主要为链霉菌相符^[1,7-16]。我们进一步使用 MLSA 计算这些链霉菌以及 21 个模式链霉菌之间的基因组相似度,以澳大利亚糖丝菌(*Saccharothrix australiensis*) DSM 43800 和西班牙糖丝菌(*Saccharothrix espanaensis*) DSM 44229 为外群。分析结果如图 2A 所示,24 个含有喷他霉素生物合成基因簇的链霉菌分布在不同的分支,其中一个分支包含了已知喷他霉素产生菌(*Streptomyces* sp. S816);另一个喷他霉素产生菌为 *Saccharothrix yanglingensis*,与澳大利亚糖丝菌及西班牙糖丝菌聚成一个分支。含有 filipin 生物合成基因簇的 9 个链霉菌形成 3 个小分支,其中一个分支包含了已知 filipin 产生菌(*S. avermitilis*) MA-4680。这种分散分布的高度保守的基因簇提示我们,这些链霉菌在早期可能通过水平基因转移获得了喷他霉素与 filipin 生物合成基因簇。

2.2 米修链霉菌中喷他霉素生物合成基因簇分析

在这些预测能够合成喷他霉素和 filipin 类天然产物的菌株中,我们对米修链霉菌有一定研究。该菌株生长旺盛、产孢丰富,并且我们前期已建立了基于大肠杆菌-放线菌属间接转移的遗传操作体系,其接合转移效率高,并能利用 CRISPR 系统快速进行基因组编辑。米修链霉菌中喷他霉素生物合成基因簇与 *Streptomyces* sp. S816 中喷他霉素生物合成基因簇及 *S. avermitilis* MA-4680 中 filipin III 生物合成基因簇较为相似,其编码的 PKS I 与另外 2 株菌中同源蛋白的序列一致性大于 80% (图 2B)。米修链霉菌中喷他霉素生物合成基因簇编码有将 filipin III 羟化形成喷他霉素的细胞色素 P450 蛋



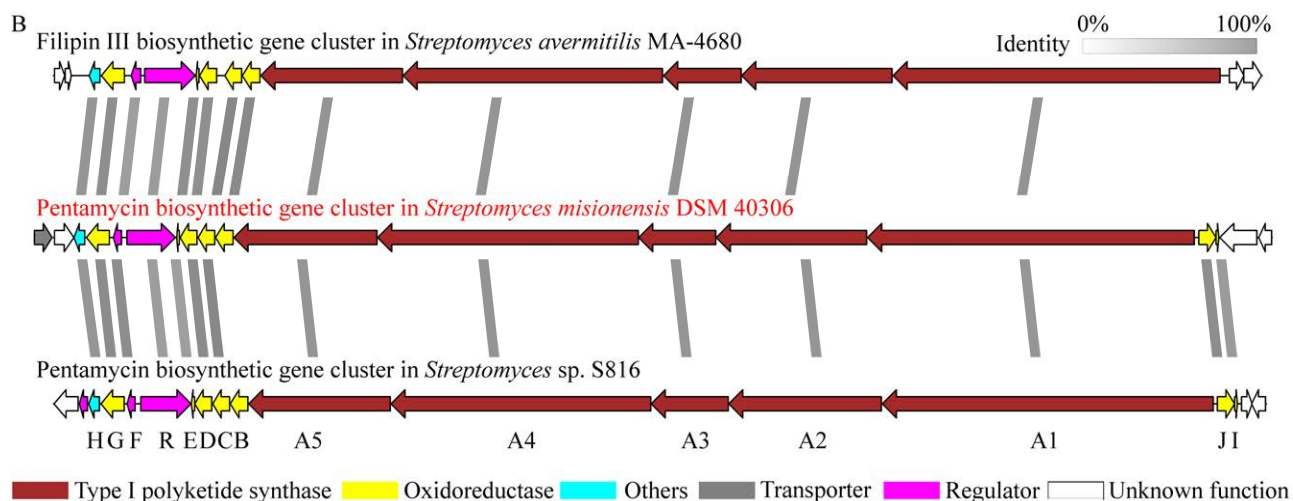


图 2 含喷他霉素与 filipin 生物合成基因簇的菌株进化树分析(A)及部分基因簇比较(B) 红色: 本研究选择的含有喷他霉素生物合成基因簇的米修链霉菌; 橙色: 含有喷他霉素生物合成基因簇的菌株; 蓝色: 含有 filipin 生物合成基因簇的菌株; 黑色: 其他模式菌株; ★: 表示对应的菌株已被报道可以产生喷他霉素或 filipin 类天然产物, 括号中是基因组序列号

Figure 2 Evolutionary tree analysis (A) and partial gene cluster comparison (B) of strains containing biosynthetic gene clusters of pentamycin and filipin. Red: *Streptomyces misionensis* selected in this study, which contains pentamycin biosynthetic genes cluster; Orange: Strains containing pentamycin biosynthetic gene clusters; Blue: Strains containing filipin biosynthetic gene clusters; Black: Other mode strains; ★: Indicating the strains reported to produce pentamycin or filipin; The genome sequence numbers are given in parentheses.

白 PtnJ 及其辅助蛋白铁氧还蛋白 PtnI (图 2B)。这些结果表明米修链霉菌具有合成喷他霉素的潜力。

2.3 米修链霉菌是新的喷他霉素生产菌

为了明确米修链霉菌是否能够合成喷他霉素相关产物, 我们利用 7 种不同培养基对其进行发酵, 并利用高效液相色谱对发酵产物进行分析。根据文献[17]报道, 喷他霉素及 filipin 类化合物在 328、339 和 356 nm 处具有特征的紫外吸收峰。基于此, 我们从多种不同培养基的米修链霉菌发酵液中检测到一系列具备上述紫外吸收峰特征的化合物, 其中使用 FM2 培养基的发酵液中相关化合物的产量最高, 并且产物数目较多(图 3)。为了明确这些化合物是由米修链霉菌中喷他霉素生物合成基因簇所合成,

我们利用 CRISPR-cBEST 系统向基因簇中 *ptnA1* 基因编码区靠近起始密码子的位置引入终止密码子, 从而使得 *ptnA1* 基因转录后不能翻译成完整的功能蛋白。由于 *ptnA1* 基因编码包括起始模块在内的 5 个聚酮合酶生物合成模块, 是聚酮链合成起始的关键酶, 因此失活该基因将导致基因簇不能合成对应的产物。DNA 测序结果证实我们成功将 *ptnA1* 基因反义链的 2 个胞嘧啶 C 编辑成了胸腺嘧啶 T, 使正义链上编码色氨酸的 TGG 密码子变成了终止密码子 TAA (图 4A), 成功获得了基因失活菌株 Δ *ptnA1*。菌株 Δ *ptnA1* 发酵液的高效液相色谱分析结果显示, 保留时间位于 13–17 min 的 7 个产物峰都消失, 表明这 7 个产物均由喷他霉素生物合成基因簇所合成(图 3A)。

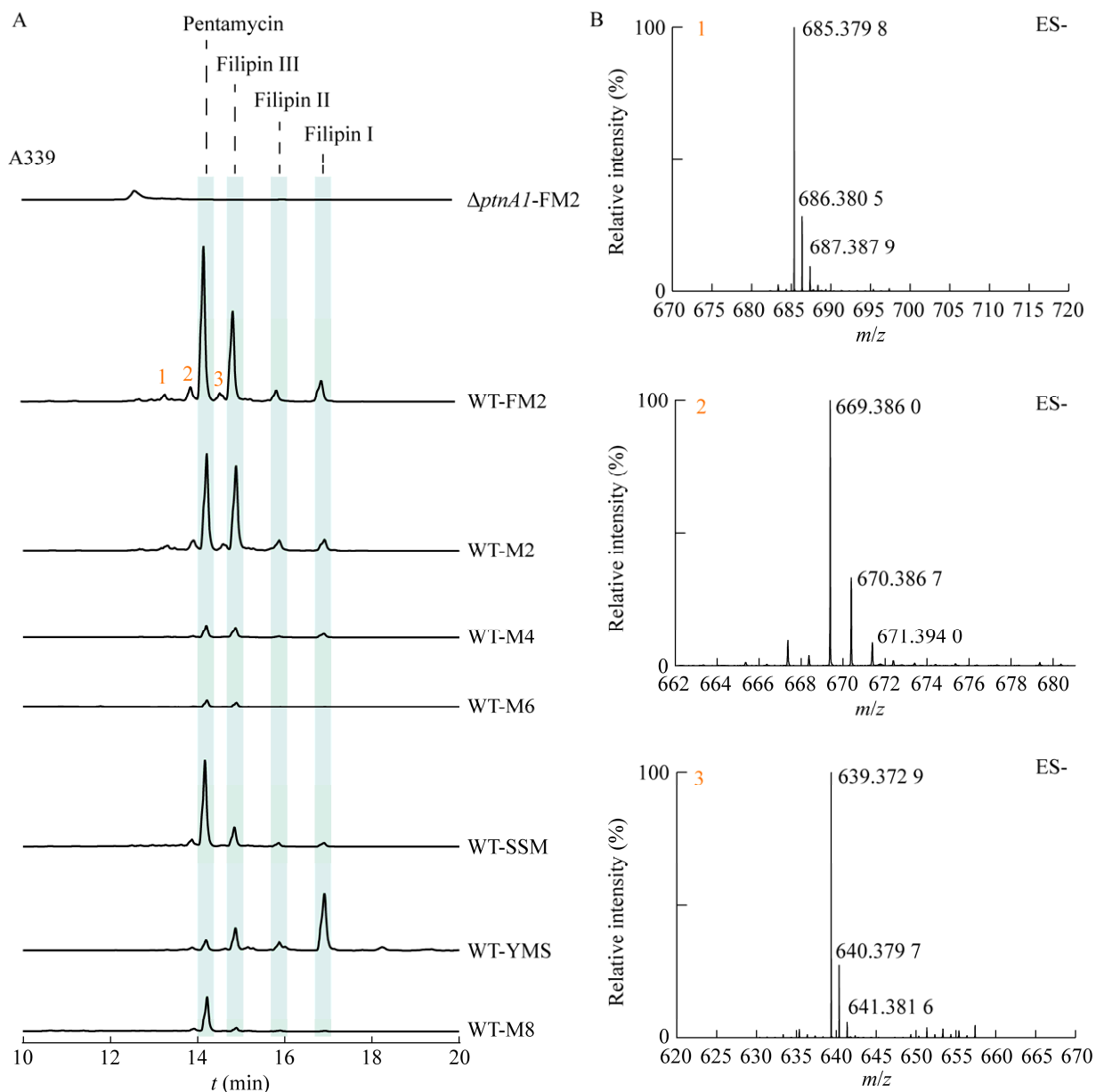


图3 米修链霉菌中喷他霉素相关代谢产物的分析 A: 不同培养基和不同菌株中喷他霉素相关代谢产物的 HPLC 分析. B: 其他 3 个未知化合物的 LC-MS 分析

Figure 3 Analysis of pentamycin-related metabolites in *Streptomyces misionensis*. A: HPLC analysis of pentamycin-related metabolites in different culture media and different strains. B: LC-MS of the other three unknown compounds.

我们进一步对米修链霉菌的发酵液进行液相色谱-高分辨质谱分析, 确定质荷比为 $[M-H]^-$ 669.383 9、653.383 7、637.397 3 和 621.400 1 的 4 个主要产物峰分别与喷他霉素、filipin III、

filipin II 和 filipin I 的分子量和分子式一致。之后利用 FM2 培养基对米修链霉菌进行 10 L 摇瓶发酵, 制备其中产量较高的喷他霉素和 filipin III。由于喷他霉素分解过快, 未能得到足量的纯品。

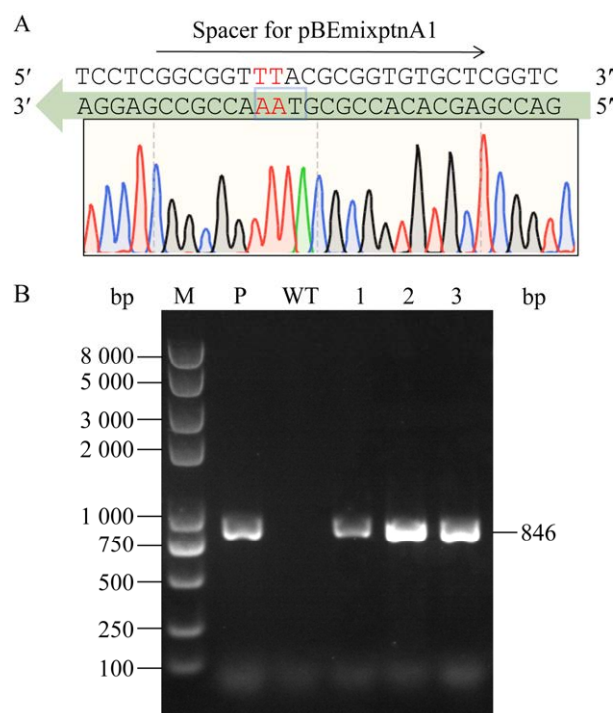


图4 米修链霉菌突变菌株 $\Delta ptnA1$ 及 *ptnF* 过表达菌株的验证 A: 基于 CRISPR-cBEST 碱基编辑工具失活 *ptnA1* 菌株的测序验证. 细箭头表示靶向目标基因的 spacer, 宽箭头表示读码框方向, 方框中是被编辑为终止密码子的密码子. B: 过表达 *ptnF* 重组菌株 PCR 验证. M: DNA marker; P: pSETMIXptnF 质粒 DNA 作为扩增模板, 阳性对照; WT: 米修链霉菌野生型菌株基因组作为模板, 阴性对照; 1-3: 米修链霉菌/pSETMIXptnF 重组菌株 DNA 作为模板

Figure 4 Verification of *Streptomyces misionensis* mutant strain $\Delta ptnA1$ and *ptnF*-overexpression strain. A: Sequencing verification of *ptnA1*-inactivation strain obtained based on CRISPR-cBEST base editing method. Thin arrows indicate the spacer targeting the genes, wide arrows indicate the direction of the open reading frame, and the box indicates the codon could be edited to a stop codon. B: Verification of recombinant strains overexpressing *ptnF*. M: DNA ladder; P: Positive control, pSETMIXptnF plasmid; WT: Negative control, genome of *S. misionensis* wild type strain; 1-3: *S. misionensis*/pSETMIXptnF.

此前文献[30]报道使用 DMSO-*d*₆:methanol-*d*₄ (2:3, 体积比)混合溶剂能够获得较清晰稳定的 filipin III 的 ¹H 谱、¹³C 谱等核磁谱图, 我们利用该混合溶剂溶解 filipin III, 并对其进行了 ¹H 谱(500 MHz)分析, 结果如下: δ 6.41 (dd, $J=14.3$, 11.3 Hz, 1H)、6.33–6.18 (m, 6H, 重叠)、5.97–5.88 (m, 2H, 重叠)、4.70–4.61 (m, 1H)、4.04 (dd, $J=12.2$, 6.0 Hz, 1H)、4.00–3.93 (m, 2H, 重叠)、3.92–3.80 (m, 5H, 重叠)、3.70 (t, $J=7.9$ Hz, 1H)、2.42 (dd, $J=8.8$, 7.3 Hz, 1H)、1.77–1.68 (m, 1H)、1.66 (d, $J=1.2$ Hz, 3H)、1.63–1.52 (m, 1H)、1.44–1.30 (m, 4H, 重叠)、1.30–1.15 (m, 17H, 重叠)、0.83–0.80 (m, 3H)。结果显示在较低场区观察到相互耦合的 9 个烯氢信号, 这与 filipin III 结构中 5 个连续的双键吻合, 其化学位移与文献报道基本一致。在较高场和高场区观察到与文献报道一致的连氧烷氢信号、烷氢信号及甲基信号。这些结果表明该化合物为 filipin III。综合上述结果, 我们将 4 个主要产物鉴定为喷他霉素、filipin III、filipin II 和 filipin I (图 3A)。相较于野生菌株, 敲除 *ptnA1* 后还导致了发酵液中另外 3 个产量较低的化合物消失, 该结果表明这 3 个化合物可能也是喷他霉素生物合成基因簇的产物(图 3A)。这 3 个化合物具有与喷他霉素、filipin III 相似的紫外吸收波谱特征, 其质荷比分别为[M-H]⁻ 685.379 8、669.386 0、639.372 9 (图 3), 分子式推测为 C₃₅H₅₈O₁₃、C₃₅H₅₈O₁₂、C₃₄H₅₆O₁₁, 与喷他霉素、filipin III 的分子式相近。因此, 我们推测这 3 个产物应该是新结构的喷他霉素/filipin 类似物。

2.4 过表达簇内正调控蛋白 PtnF 提高喷他霉素产量

与已报道的喷他霉素和 filipin III 生物合成基因簇相同, 米修链霉菌喷他霉素基因簇中也

具有编码 PAS-LuxR 家族转录因子 PtnF 的基因。此前已有研究表明 PtnF 正调控喷他霉素的生物合成^[15,17-18]。为了进一步提高米修链霉菌中喷他霉素的产量，我们利用整合型载体 pSET152 和链霉菌组成型强启动子 *kasOp** 对 *ptnF* 进行过表达(图 4B)。结果显示，在 FM2 发酵培养基中，过表达 *ptnF* (菌株 OptnF) 使喷他霉

素产量相较于野生型菌株提高了 4.34 倍(图 5A)，达到了 101.7 mg/L，并且喷他霉素及 filipin 类似物总量达到 146.1 mg/L，比野生型菌株提高了 3.28 倍。

为了进一步评估 *ptnF* 过表达菌株 OptnF 的发酵特性，我们对其进行了全产程分析，每隔 12 h 取样，检测发酵液中喷他霉素的产量，同

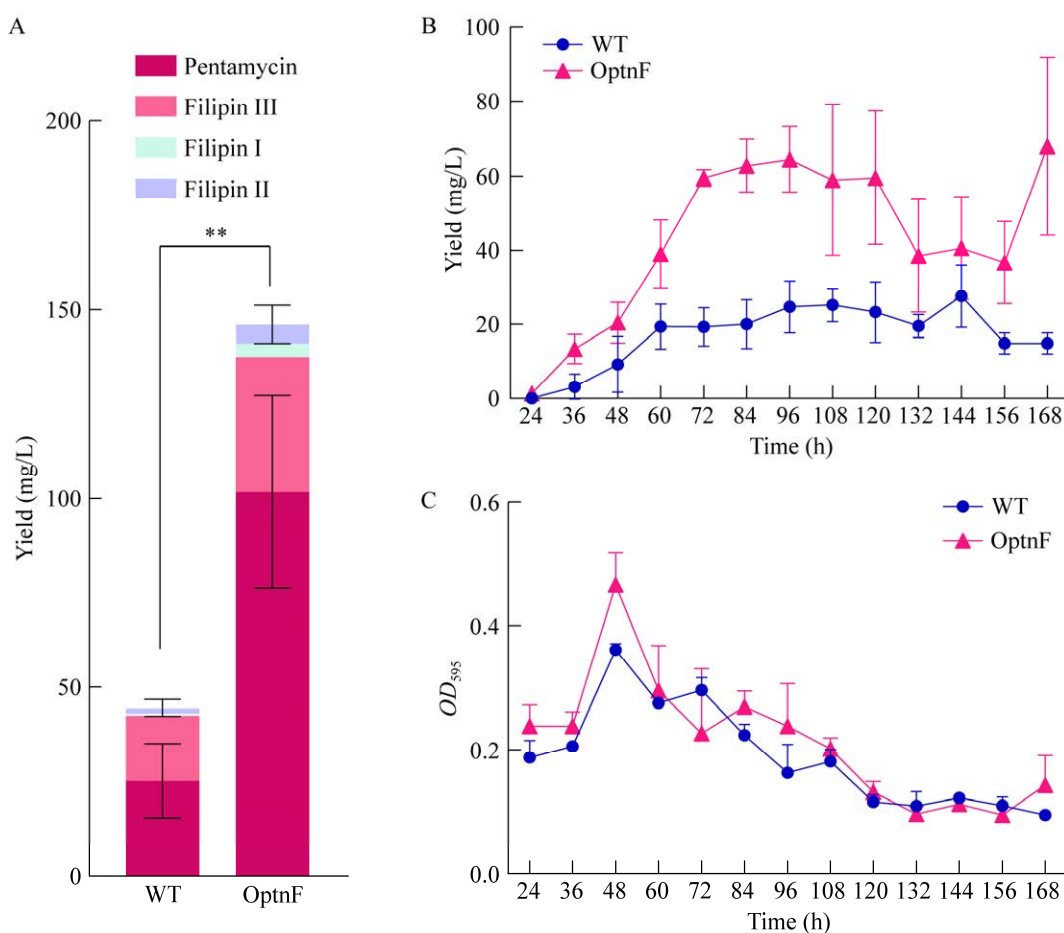


图 5 过表达正调控基因 *ptnF* 提高喷他霉素产量 A: *ptnF* 过表达菌株 OptnF 与野生型菌株在最佳发酵条件下的喷他霉素产量, **: $P < 0.01$. B: *ptnF* 过表达菌株 OptnF 与野生型菌株 168 h 内发酵时间曲线. C: 过表达菌株 OptnF 与野生型菌株 168 h 内生物量变化曲线

Figure 5 Overexpression of positive regulatory gene *ptnF* within clusters increases pentamycin production. A: Pentamycin production between *ptnF* overexpression strain OptnF and wild type strain under optimal fermentation conditions. **: $P < 0.01$. B: Time-course curves of pentamycin production of *ptnF* overexpression strain OptnF and wild type strain within 168 h. C: Time-course curves of biomass of *ptnF* overexpression strain OptnF and wild type strain within 168 h.

时利用二苯胺法分析发酵液中的菌体生物量。结果显示野生型菌株发酵 60 h 后, 喷他霉素的产量不再快速升高, 而菌株 OptnF 发酵 60 h 后发酵液中喷他霉素仍快速积累, 到 96 h 产量达到最大(图 5B)。FM2 发酵培养基中, 菌株 OptnF 的生长曲线与野生型菌株基本一致, 二者培养 48 h 后均进入衰亡期, 生物量开始下降(图 5C), 说明在 FM2 发酵培养基中过表达 *ptnF* 对菌体生长无显著影响。

3 讨论与结论

喷他霉素和 filipin III 都能靶向真菌细胞膜中的麦角固醇, 从而抑制真菌生长^[1]。但是, filipin III 对麦角固醇和哺乳动物细胞膜中胆固醇的亲合力相似, 因此不能用作药物^[1]。相比之下, 喷他霉素因为具有更特异的作用, 在瑞士已被批准用于治疗阴道念珠菌感染、滴虫病等常见的阴道疾病^[2-4]。另外, filipin III 可以被用来诊断 C 型尼曼匹克氏症, 或者作为检测和量化细胞膜中胆固醇的探针。虽然已有报道多种细菌能够产生喷他霉素和 filipin III, 但对于细菌基因组中喷他霉素类天然产物的生物合成潜力尚无系统评估和发掘研究。本研究利用喷他霉素和 filipin III 生物合成基因簇蛋白为查询序列, 从 NCBI Genome 数据库中的 55 597 个细菌基因组(截至 2024 年 2 月)中分析发现 33 个含有喷他霉素/filipin 生物合成基因簇的菌株。并依据二者基因簇中差异蛋白细胞色素 P450 氧化酶 PtnJ, 预测其中 24 个基因簇合成产物为喷他霉素类, 9 个基因簇合成产物为 filipin 类化合物。本工作发现的含有喷他霉素与 filipin 生物合成基因簇的宿主菌大多为链霉菌, 这与已报道的此类化合物的产生菌主要为链霉菌相符。这些菌株包括了此前报道的能够产生这类化合物的部分菌株(如 *S. roche*、*Saccharothrix*

yanglingensis 等), 但仍有部分已报道的喷他霉素产生菌并未被本研究包括, 这是因为这些菌株尚无基因组信息。基于本研究分析结果, 我们发现这些基因簇高度保守, 但其所在菌株的进化树分析提示这些菌株分布较为分散, 推测这些链霉菌在早期可能通过水平基因转移获得了喷他霉素与 filipin 生物合成基因簇。

本研究通过培养基筛选、发酵及代谢产物分析等证实其中的米修链霉菌能够合成喷他霉素及 filipin III 等一系列天然产物。此外, 我们还发现了 3 个新的化合物, 紫外可见光谱、质谱分析与基因敲除实验结果表明这 3 个化合物也是由喷他霉素生物合成基因簇所合成。对其进行进一步研究将有助于发现具有抗真菌活性的新结构喷他霉素类活性分子。

喷他霉素生物合成过程中需要大量的丙二酸单酰辅酶 A 和甲基丙二酸单酰辅酶 A 等作为延伸单元, 并且需要消耗大量的能量和还原力。通过优化培养基提高聚酮类天然产物的产量是一种简便有效的策略。本研究测试了 7 种不同培养基, 发现 FM2 发酵培养基中喷他霉素产量最高, 推测是因为该培养基中含有丰富的黄豆饼粉等天然碳源、氮源。此前有研究通过优化发酵培养基配方及发酵条件, 使 *S. padanus* PMS-702 的喷他霉素摇瓶产量(发酵 2 d)提高 2.86 倍, 达到 112 mg/L^[31]。多个研究表明添加植物油可以提高喷他霉素产量。例如, 培养基中添加植物油可使得 *S. padanus* 中喷他霉素的产量提高 4.9 倍^[32]。添加棕榈油使玫瑰链霉菌(*S. roseoluteus*)的喷他霉素摇瓶产量由 1.5 g/L 提高到 2.7 g/L^[33]。在人工培养基中添加豆油或油酸能将 *Streptomyces* sp. WP-1 的喷他霉素产量由 547.8 提高到 1 367.5 mg/L^[34]。添加 5.5%豆油使 *Streptomyces* sp. WP-1 工程菌株的喷他霉素摇瓶产量提高 7 倍左右, 最终达到 8.5 g/L^[19], 这也是目前报道的喷他霉素发酵

最高水平。此外,培养基中添加铵捕集剂,降低铵离子浓度,也显著提高喷他霉素产量,有研究通过添加不同浓度的磷酸镁或磷酸钙,使 *Streptomyces* sp. WP-1 中产量提高 4.1 倍,达到 5.7 g/L^[34]。添加铜离子使 *Streptomyces* sp. WP-1 中喷他霉素产量提高 90%^[19]。相比之下,通过基因工程改造提高喷他霉素产量的报道则较为少见。有研究表明 PtnF 正调控喷他霉素及其类似物的生物合成,敲除 *ptnF* 基因导致喷他霉素不再合成^[19]。利用 *ermEp** 过表达 *ptnF*, 可使喷他霉素产量提高 50%^[19]。本研究选择使用表达强度比 *ermEp** 更高的组成型启动子 *kasOp** 过表达 *ptnF* 蛋白^[35], 使米修链霉菌的喷他霉素产量提高了 4.34 倍,其提产效果高于此前的报道。

本研究通过对细菌基因组大数据的系统分析,发掘获得了 19 个新的预测可产生喷他霉素的菌株、8 个新的预测可产生 filipin 类天然产物的菌株,并对这些潜在生产菌株进行了进化分析,提示这些菌株在早期可能是通过基因水平转移的机制来获得喷他霉素/filipin 生物合成基因簇。我们通过体内遗传学及代谢产物鉴定等方法发现米修链霉菌是一株新的喷他霉素及 filipin 类天然产物生产菌株,此外还初步鉴定了多个喷他霉素类新结构产物。我们进一步通过基因工程技术成功提高了喷他霉素的产量。这些研究结果为构建更优的喷他霉素生产菌株、进一步推动其工业化生产应用提供了新的基因元件、途径、菌株及理论支持。

REFERENCES

- [1] UMEZAWA S, TANAKA Y, OOKA M, SHIOTSU S. A new antifungal antibiotic, pentamycin[J]. The Journal of Antibiotics, 1958, 11(1): 26-29.
- [2] KRANZLER M, SYROWATKA M, LEITSCH D, WINNIPS C, WALOCHNIK J. Pentamycin shows high efficacy against *Trichomonas vaginalis*[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2015, 45(4): 434-437.
- [3] FREY TIRRI B, BITZER J, GEUDELIN B, DREWE J. Safety, tolerability and pharmacokinetics of intravaginal pentamycin[J]. Chemotherapy, 2010, 56(3): 190-196.
- [4] WINNIPS C, BALMER JA. Intravaginal pentamycin for the treatment of bacterial vaginosis[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2010, 14: e195.
- [5] VANIER MT, LATOUR P. Laboratory diagnosis of Niemann-Pick disease type C: the filipin staining test[J]. Methods in Cell Biology, 2015, 126: 357-375.
- [6] GIMPL G, GEHRIG-BURGER K. Probes for studying cholesterol binding and cell biology[J]. Steroids, 2011, 76(3): 216-231.
- [7] ROBISON RS, ASZALOS A, KRAEMER N, GIANNINI SM. Production of fungichromin by *Streptoverticillium cinnamomeum* subsp. *cinnamomeum* NRRL B-1285[J]. The Journal of Antibiotics, 1971, 24(4): 273.
- [8] PANDEY RC, KALITA CC, ASZALOS AA, GEOGHEGAN R Jr, GARRETSON AL, COOK JC Jr, RINEHART KL Jr. Field desorption mass spectrometry in structural studies of polyene macrolide antibiotics: isolation and early identification of a pentaene macrolide antibiotic[J]. Biomedical Mass Spectrometry, 1980, 7(3): 93-98.
- [9] SHIH HD, LIU YC, HSU FL, MULABAGAL V, DODDA R, HUANG JW. Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(1): 95-99.
- [10] RAKOTONIRIANA EF, CHATAIGNÉ G, RAOELISON G, RABEMANANTSOA C, MUNAUT F, EL JAZIRI M, URVEG-RATSIMAMANGA S, MARCHAND-BRYNAERT J, CORBISIER AM, DECLERCK S, QUETIN-LECLERCQ J. Characterization of an endophytic whorl-forming *Streptomyces* from *Catharanthus roseus* stems producing polyene macrolide antibiotic[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(5): 617-627.
- [11] CAO ZS, YOSHIDA R, KINASHI H, ARAKAWA K. Blockage of the early step of lankacidin biosynthesis caused a large production of pentamycin, citreodiol and epi-citreodiol in *Streptomyces rochei*[J]. The Journal of

- Antibiotics, 2015, 68(5): 328-333.
- [12] van MINH N, WOO EE, LEE GS, KI DW, LEE IK, LEE SY, PARK K, SONG J, CHOI JE, YUN BS. Control efficacy of *Streptomyces* sp. A501 against ginseng damping-off and its antifungal substance[J]. Mycobiology, 2017, 45(1): 44-47.
- [13] WANG H, TIAN RZ, TIAN QZ, YAN X, HUANG LL, JI ZQ. Investigation on the antifungal ingredients of *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015, an antagonistic endophytic actinomycete isolated from cucumber plant[J]. Molecules, 2019, 24(20): 3686.
- [14] AMMANN A, GOTTLIEB D, BROCK TD, CARTER HE, WHITFIELD GB. Filipin, an antibiotic effective against fungi[J]. Phytopathology, 1955, 45(10): 559-563.
- [15] IKEDA H, SHIN-YA K, OMURA S. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2014, 41(2): 233-250.
- [16] KIM JD, HAN JW, HWANG IC, LEE D, KIM BS. Identification and biocontrol efficacy of *Streptomyces miharaensis* producing filipin III against *Fusarium* wilt[J]. Journal of Basic Microbiology, 2012, 52(2): 150-159.
- [17] ZHOU SS, SONG LJ, MASSCHELEIN J, SUMANG FAM, PAPA IA, ZULAYBAR TO, CUSTODIO AB, ZABALA D, ALCANTARA EP, de LOS SANTOS ELC, CHALLIS GL. Pentamycin biosynthesis in philippine *Streptomyces* sp. S816: cytochrome P450-catalyzed installation of the C-14 hydroxyl group[J]. ACS Chemical Biology, 2019, 14(6): 1305-1309.
- [18] PAYERO TD, VICENTE CM, RUMBERO Á, BARREALES EG, SANTOS-ABERTURAS J, de PEDRO A, APARICIO JF. Functional analysis of filipin tailoring genes from *Streptomyces filipinensis* reveals alternative routes in filipin III biosynthesis and yields bioactive derivatives[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 114.
- [19] WAN MY, GAN L, LI ZX, WANG MR, CHEN JT, CHEN SX, HU JF, LI JY. Enhancement of fungichromin production of *Streptomyces* sp. WP-1 by genetic engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(17): 5415-5425.
- [20] TONG YJ, WHITFORD CM, ROBERTSEN HL, BLIN K, JØRGENSEN TS, KLITGAARD AK, GREN T, JIANG XL, WEBER T, LEE SY. Highly efficient DSB-free base editing for streptomycetes with CRISPR-BEST[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(41): 20366-20375.
- [21] CHEN S, WU QH, SHEN QQ, WANG H. Progress in understanding the genetic information and biosynthetic pathways behind *Amycolatopsis* antibiotics, with implications for the continued discovery of novel drugs[J]. ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology, 2016, 17(2): 119-128.
- [22] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, MA N, PAPADOPOULOS J, BEALER K, MADDEN TL. BLAST+: architecture and applications[J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10: 421.
- [23] TERLOUW BR, BLIN K, NAVARRO-MUÑOZ JC, AVALON NE, CHEVRETTE MG, EGBERT S, LEE S, MEIJER D, RECCHIA MJJ, REITZ ZL, van SANTEN JA, SELEM-MOJICA N, TØRRING T, ZAROUBI L, ALANJARY M, ALETI G, AGUILAR C, AL-SALIHI SAA, AUGUSTIJN HE, AVELAR-RIVAS JA, AVITIA-DOMÍNGUEZ LA, et al. MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D603-D610.
- [24] DAILY J. Parasail: SIMD C library for global, semi-global, and local pairwise sequence alignments[J]. BMC Bioinformatics, 2016, 17: 81.
- [25] LABEDA DP, DUNLAP CA, RONG XY, HUANG Y, DOROGHAZI JR, JU KS, METCALF WW. Phylogenetic relationships in the family *Streptomycetaceae* using multi-locus sequence analysis[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2017, 110(4): 563-583.
- [26] RONG XY, HUANG Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35(1): 7-18.
- [27] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [28] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life (iTOL) v5:

- an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [29] KIESER T, BIBB MJ, BUTTNER MJ, CHATER KF, HOPWOOD DA. *Practical Streptomyces Genetics*[M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [30] BALAKRISHNAN AR, EASWARAN KR. Conformation of polyene antibiotic, filipin III: CD and ¹H NMR studies[J]. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1993, 11(2): 417-428.
- [31] WU JY, HUANG JW, SHIH HD, LIN WC, LIU YC. Optimization of cultivation conditions for fungichromin production from *Streptomyces padanus* PMS-702[J]. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 2008, 39(1): 67-73.
- [32] ZANG CZ, CHANG YN, CHEN HB, WU JY, CHEN CI, HUANG JW, SHIH HD, LIU YC. Deciphering the roles of fatty acids and oils in fungichromin enhancement from *Streptomyces padanus*[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2011, 42(3): 413-418.
- [33] 谢秋萍, 卫腾云, 杨松柏, 吴远杰, 陈少欣. 喷他霉素的发酵培养基及工艺研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2021, 52(4): 507-512.
- XIE QP, WEI TY, YANG SB, WU YJ, CHEN SX. Fermentation medium and culture process for the production of pentamycin[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2021, 52(4): 507-512 (in Chinese).
- [34] PENG C, AN DP, DING WX, ZHU YX, YE L, LI JY. Fungichromin production by *Streptomyces* sp. WP-1, an endophyte from *Pinus dabeshanensis*, and its antifungal activity against *Fusarium oxysporum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(24): 10437-10449.
- [35] WANG WS, LI X, WANG J, XIANG SH, FENG XZ, YANG KQ. An engineered strong promoter for streptomycetes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(14): 4484-4492.