



## *Streptomyces* sp. NO1W98 中杀黑星菌素的分离和生物合成基因簇的鉴定

张少飞<sup>1,3</sup>, 张园<sup>1,2</sup>, 申传璞<sup>3\*</sup>, 陈奇<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup> 淮北师范大学生命科学学院, 安徽 淮北 235000

<sup>2</sup> 安徽医科大学生命科学学院, 安徽 合肥 230032

<sup>3</sup> 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

<sup>4</sup> 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东省海洋药物重点实验室, 中国科学院海洋微生物研究中心, 广东 广州 510301

**摘要:** 【目的】分离*Streptomyces* sp. NO1W98中的杀黑星菌素并鉴定其生物合成基因簇。【方法】利用有机溶剂萃取法对*Streptomyces* sp. NO1W98放大规模发酵产物进行提取;以正向、反向色谱柱层析进行化合物的分离纯化;借助波谱学手段进行单体化合物的结构鉴定;采用Illumina HiSeq技术进行基因组序列测定,对得到的序列进行生物信息学分析、注释并定位杀黑星菌素的生物合成基因簇*vtd*,利用基于PCR-targeting的遗传操作系统构建*vtd*内相关基因的阻断突变株,同时利用pSET152AKE进行基因回补,并分析与野生菌株的发酵产物差异。【结果】从NO1W98发酵产物提取物中初步分离鉴定了2个大环内酯类化合物杀黑星菌素A (1)和B (2);NO1W98的基因组大小约为11.6 Mb,蕴涵49个次级代谢产物生物合成基因簇,其中scaffold 3上的Region 3.3可能负责杀黑星菌素的生物合成;基因阻断和回补实验初步鉴定了杀黑星菌素的生物合成基因簇,包含6个骨架基因、5个转运基因、2个调控基因以及9个后修饰基因。【结论】杀黑星菌素的分离、结构鉴定和基因簇的鉴定以及生物合成途径的推导为其遗传改造和工程菌株的构建奠定了分子基础。

**关键词:** *Streptomyces* sp. NO1W98, 杀黑星菌素, 基因簇, PCR-targeting, 生物合成途径

锥虫病是一种因寄生于人和动物血液或组织中的锥虫引起的感染性疾病,其中引起关注最多的是一种易被忽视的热带寄生虫病——非洲锥虫病(Human African Trypanosomiasis, HAT),一

基金项目: 国家自然科学基金(41806158); 广东省海洋药物重点实验室开放课题基金及中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室开放课题基金(2018011007)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-551-65172130; E-mail: 申传璞, scp1001@126.com, 陈奇, chenqi@ahmu.edu.cn

收稿日期: 2020-01-13; 修回日期: 2020-03-19; 网络出版日期: 2020-06-15

直以来严重威胁着撒哈拉以南非洲 30 多个国家近 6000 万人民的健康和生命<sup>[1-3]</sup>。HAT 也称睡眠病，是被布氏锥虫罗德西亚种 (*Trypanosoma brucei rhodesiense*) 或布氏锥虫冈比亚种感染的舌蝇(俗称采采蝇)叮咬传播引起的一种寄生虫病。针对 HAT 的治疗，目前注册在用的药物有 4 种，分别为苏拉明(suramin)、戊烷脒(pentamidine)、美拉肿醇(melarsoprol)和依氟鸟氨酸(eflornithine)，各自适用的病症和作用机制不尽相同<sup>[1-4]</sup>。然而，由于这些药物开发的年代较为久远，出现的问题也越来越显著，如用药困难、副作用大、产生耐药性等等，在治疗的过程中给病人带来很多痛苦<sup>[2-4]</sup>。此外，目前虽然还有一些进入临床实验阶段的候选药物和一些作用靶点不明确的活性化合物，但它们仍未成药，远不能满足人们对 HAT 防治的需求<sup>[1,3-4]</sup>。

杀黑星菌素(venturicin, VTD)也叫阿博霉素，属于 20-元大环内酯类抗生素(图 1)，最初分离自 3 株不同的链霉菌菌株 *Streptomyces* sp. AA32、AA117、AA590，对一系列植物病原菌具

有显著的抑制活性<sup>[5-6]</sup>。由于杀黑星菌素分子量相对较大，在植物体表一般具有较强的渗透性，但无内吸性，因此，发病后用药量大且防治效果不好，被开发成为农用抗生素的前景并不广阔<sup>[7]</sup>。随着研究的深入，研究者们发现杀黑星菌素在体外能显著抑制 *T. b. brucei* GUTat3.1 亚株和 *T. b. rhodesiense* STIB900 亚株 (IC<sub>50</sub> 达到 0.12–0.54 μg/mL)，同时不具细胞毒性<sup>[3,8]</sup>。杀黑星菌素还能够通过抑制 ATP 驱动的质子转运和 ATP 的水解抑制 *E. coli* H<sup>+</sup>-ATP 酶<sup>[9-10]</sup>，在一些真菌和细菌中，能够抑制 ATP 的合成<sup>[11-12]</sup>。另据研究表明，杀黑星菌素通过抑制大鼠肝脏线粒体的磷酸基转移反应发挥作用，抑制梨形四膜虫 (*Tetrahymena pyriformis* ST) 的线粒体 ATP 酶，具有抗疟活性<sup>[13-15]</sup>。因此，杀黑星菌素抗锥虫活性的作用机制与线粒体 ATP 合成酶系统有着密切联系，有望被开发成为具有新作用位点的抗锥虫药物。此外，Shaaban 等还从 *Streptomyces* sp. TS-2-2 中分离得到了该家族的一个新成员杀黑星菌素 C (图 1)<sup>[8]</sup>。

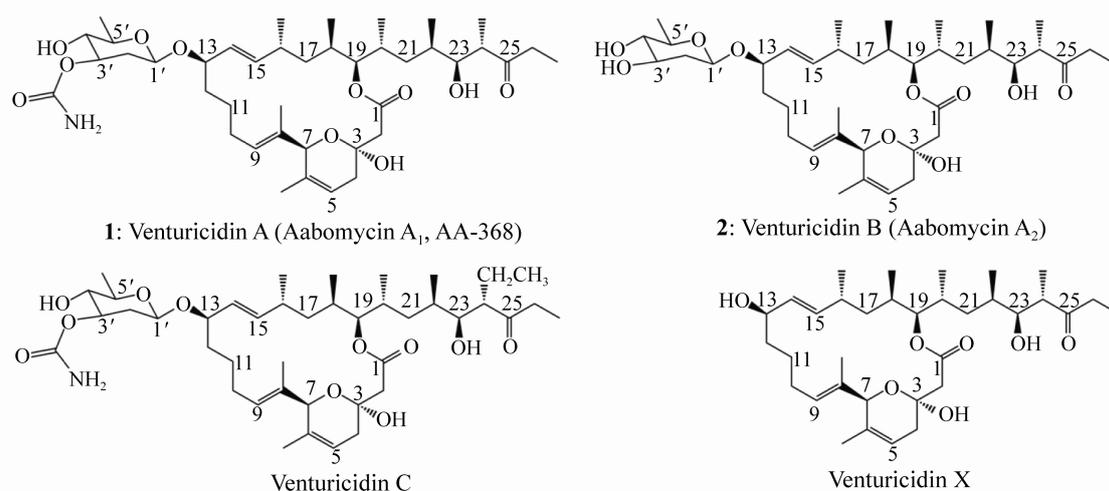


图 1. 大环内酯类化合物杀黑星菌素 A、B、C 和 X 的化学结构  
Figure 1. Chemical structures of venturicidins A (1), B (2), C and X.

然而, 到目前为止, 杀黑星菌素的生物基因簇并未被鉴定, 限制了人们从分子遗传水平上操纵相应产生菌的代谢途径, 构建适于发酵的基因工程菌株, 也限制了利用组合生物合成技术对其生物合成途径进行改造, 获得相应的结构类似物用于抗锥虫活性的筛选。鉴于此, 本文采用放线菌大规模发酵培养和产物的提取分离、基因组序列测定、文库构建和基于 PCR-targeting 的遗传操作等方法, 结合相关生物信息学分析, 从一株放线菌 *Streptomyces* sp. NO1W98 中分离得到了杀黑星菌素并鉴定了其生物合成基因簇, 为后续的遗传改造和工程菌株的构建奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒、菌株: *Streptomyces* sp. NO1W98

(NO1W98)由华北制药集团有限责任公司分离、鉴定和馈赠, 菌株保存和传代使用固体 ISP2 培养基, 于 28 °C 下培养; 生产代谢产物使用液体 A-培养基。包含有目的基因的 cosmid 18H11[阻断突变 *orf(-1)*和 *vtDA1*]、11H10 [阻断突变 *orf(+1)*]为本研究中构建, 研究中使用的其他菌株和质粒参见表 1。

**1.1.2 培养基和培养条件:** (1) LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1 L, pH 7.0, 固体添加 1.5%–2.0%琼脂粉, 121 °C 灭菌 30 min 备用; (2) M-ISP4 培养基: 可溶性淀粉 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, NaCl 1 g, 蛋白胨 1 g, 酵母粉 0.5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, 自来水 1 L, pH 7.2–7.4, 固体添加 1.5%–2%琼脂粉, 121 °C 灭菌 30 min 备用; (3) ISP2 培养基: 葡萄糖 4 g, 酵母粉 4 g; 麦芽提取粉 10 g, 自来水 1 L, pH 7.2–7.4, 固体添加

表 1. 文中所用的菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Description	Reference/Source
Strains		
<i>E. coli</i> LE392	Host strain of cosmid vector SuperCos 1	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Host strain for general clone	Stratagene
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	Host strain for conjugation	[16]
<i>E. coli</i> BW25113/pIJ790	Host strain for PCR-targeting	[16]
<i>Streptomyces</i> sp. NO1W98	VTDs biosynthesis strain <i>Streptomyces</i> sp. NO1W98	Laboratory stock
$\Delta$ <i>vtDA1</i>	The <i>vtDA1</i> gene disrupted mutant of <i>Streptomyces</i> sp. NO1W98	This study
$\Delta$ <i>orf(-1)</i>	The <i>orf(-1)</i> gene disrupted mutant of <i>Streptomyces</i> sp. NO1W98	This study
$\Delta$ <i>orf(+1)</i>	The <i>orf(+1)</i> gene disrupted mutant of <i>Streptomyces</i> sp. NO1W98	This study
$\Delta$ <i>vtDA1::vtDA1</i>	$\Delta$ <i>vtDA1</i> complemented with <i>vtDA1</i>	This study
Plasmids		
SuperCos1	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , cosmid vector	Stratagene
pIJ773	Apm <sup>r</sup> , source of <i>acc(3)IV</i> and <i>oriT</i> fragment	[16]
pIJ790	Cml <sup>r</sup> , including $\lambda$ -RED ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ) for PCR-targeting	[16]
pUZ8002	Kan <sup>r</sup> , including <i>tra</i> for conjugation	[16]
pSET152AKE	Apm <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , <i>int C31</i> , <i>ermE</i> *	[17]
pCJ 2001	Cosmid18H11 derivative in which <i>vtDA1</i> was disrupted by <i>aac(3)IV</i>	This study
pCJ 2002	Cosmid 18H11 derivative in which <i>orf(-1)</i> was disrupted by <i>aac(3)IV</i>	This study
pCJ 2003	Cosmid 11H10 derivative in which <i>orf(+1)</i> was disrupted by <i>aac(3)IV</i>	This study

1.5%–2.0%琼脂粉, 115 °C 灭菌 30 min 备用;  
(4) A-培养液<sup>[8]</sup>: 葡萄糖 10 g, 酵母粉 5 g, 可溶性淀粉 20 g, 蛋白胨 5 g, NaCl 4 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, 自来水 1 L, pH 7.0, 121 °C 灭菌 30 min 备用。

大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  和 ET12567/pUZ8002 用 LB 于 37 °C 下培养, 而 BW25113/pIJ790 相关菌株使用 30 °C 或 37 °C 培养。

**1.1.3 试剂和主要仪器:** 限制性核酸内切酶和 DNA Marker 等购自上海生工生物工程有限公司; 高保真 DNA 聚合酶购自 TransGen 公司; 长片段 DNA 的扩增使用宝生物公司的 PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase; DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。其他常规试剂均为国产分析纯级产品, 各种抗生素均购自国内的试剂公司, 使用浓度为氨苄青霉素(Ampicillin, Amp) 100  $\mu$ g/mL, 卡那霉素(Kanamycin, Kan)

50  $\mu$ g/mL, 安普霉素(Apramycin, Apm) 50  $\mu$ g/mL, 氯霉素(Chloramphenicol, Cml) 25  $\mu$ g/mL, 甲氧苄氨嘧啶(Trimethoprim, Tmp) 50  $\mu$ g/mL。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成, DNA 测序由上海生工生物工程有限公司完成。Eppendorf 5331 梯度 PCR 仪, Eppendorf 5810R 台式大容量多功能冷冻离心机, Eppendorf 5418 小型台式高速离心机, BIO-RAD Molecular Image Gel Doc<sup>TM</sup> XR<sup>+</sup> Imaging System 凝胶成像系统, SONICS 超声波破碎仪 VCX-130, Eppendorf Concentrator plus 旋转浓缩仪, Heidolf Laborota4000 eco/WB/G3 旋转蒸发器, Agilent 1260 infinity 高效液相色谱仪(High Performance Liquid Chromatography, HPLC), 分析型色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m), Bruker maXis 超高分辨液质联用仪, Bruker AVANCE DRX 500 M 核磁共振波谱仪(500/125 MHz, TMS 为内标)。

表 2. 本研究中使用的引物  
Table 2. Primer pairs used in this study

Primers	Sequence (5'→3')	Purpose
orf(-)-ts-F	GACCATCGCGTACATCAACG	$\Delta$ orf(-) confirmation and genomic library screening, 1497 bp
orf(-)-ts-R	GCGAGCGACACATAGAGCAT	
vtdA1-ts-F	TGAGGAGTCGAGGAGTTCGG	$\Delta$ vtdA1 confirmation and genomic library screening, 1675 bp
vtdA1-ts-R	CGCAGTAGTCGGGATATCCG	
orf(+)-ts-F	GATCAAGGTGGGGATCACC	$\Delta$ orf(+1) confirmation and genomic library screening, 644 bp
orf(+)-ts-R	CAACTCGTCGTTCTCGCCTA	
orf(-)-del-F	CGGTTCTTCTACGCCACCGTCATGCTGCCGCTCGAGCACattccgggatccgtcgacc	orf(-) disruption
orf(-)-del-R	CTTCGACGTGGCCAGGCCCTTGATGACGTAGCGGATGTAtgtaggctggagctgcttc	
vtdA1-del-F	GACCCCCAGCAGCGACTCGCCCTCGAACTCGGCTGGGAGattccgggatccgtcgacc	vtdA1 disruption
vtdA1-del-R	TGCGTCGGGCCGCGGCCACGGGGTCAGCCCGGTCTGCACttaggctggagctgcttc	
orf(+)-del-F	ACCGAGCGCGAGGGCGCGCGGCTGCTCGAACAGGCCGCGattccgggatccgtcgacc	orf(+1) disruption
orf(+)-del-R	GGCCACCTCCGCCGTGGTGCGGCGTCCGCGGGGCCGttaggctggagctgcttc	

## 1.2 *Streptomyces* sp. NO1W98 野生型菌株、基因阻断突变株的培养和发酵

*Streptomyces* sp. NO1W98 野生型和相关的基因阻断突变株培养时使用 ISP2 固体培养基, 根据需要在 28 °C 下培养 3–7 d, 与相应的 *E. coli* ET12567/pUZ8002 系列菌株进行接合转移实验时使用 M-ISP4 固体培养基。NO1W98 野生型和相应突变株发酵生产相应代谢产物时使用 A-培养液<sup>[8]</sup>, 小瓶发酵时采用一步培养法, 在 250 mL 锥形瓶中装入 50 mL A-培养液(无菌), 接入适当 NO1W98 或突变株的菌体, 28 °C 下 200 r/min 振荡培养约 1 周; 放大规模发酵时采用两步培养法, 以小瓶振荡培养 36–48 h 的产物作为种子, 转入到含 200 mL A-培养液的 1 L 锥形瓶中(无菌), 28 °C 下 200 r/min 继续振荡培养约 1 周, 以实际检测结果为准。

## 1.3 *Streptomyces* sp. NO1W98 发酵产物的提取与分离

对 *Streptomyces* sp. NO1W98 的发酵产物(约 8 L)进行离心得到菌液和菌体两部分, 分别用等体积的乙酸乙酯和丙酮萃取 3 次, 得到各自对应的粗提物。HPLC 检测后合并两份粗提物, 得到总浸膏约 6 g。将合并的粗提物用适量氯仿-甲醇混合溶剂和硅胶进行拌样, 挥干后装柱进行柱层析分离。采用氯仿-甲醇系统(A 柱)进行梯度洗脱, 二者比例依次为 100/0、98/2、96/4、94/6、92/8、90/10 和 80/20, 分别得到 Fr.1、Fr.2、Fr.3、Fr.4、Fr.5、Fr.6 和 Fr.7 共计 7 个组分。含有目标物的组分再用石油醚-乙酸乙酯系统进行梯度洗脱(B 柱), 二者比例依次为 90/10、80/20、70/30、60/40、50/50、40/60、30/70、20/80、10/90 和 0/100, 共得到 10 个组分(B1–B10); 将含有目标物的组

分再用乙腈-水系统进行 MPLC (C 柱), 每 10 min 收集 1 瓶, TLC 和 HPLC 检测后旋干, 含目标物的组分用甲醇溶解并用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤除去不溶物, 高速离心后进行半制备, 半制备的条件为: Hitachi 半制备 HPLC, 装配有 Hitachi 泵、二极管阵列检测器和 D2000 模块精英数据工作站, 采用 YMC-Pack ODS 的半制备柱(YMC, 250 mm×10 mm, 5 μm)。流动相 A 相为 15%乙腈, 流动相 B 相为 85%乙腈, 均含 0.1% 冰乙酸(glacial acetic acid, GAA); 流速为 2.5 mL/min, 检测波长为 210 nm 和 254 nm。HPLC 走样程序: HPLC 走样程序: 0–20 min, 30%–90% B 相; 20.1–21.0 min, 90%–100% B 相; 21.1–26.0 min, 100% B 相; 26.1–30.0 min, 0% B 相。

## 1.4 *Streptomyces* sp. NO1W98 基因组 DNA 的提取、测序及蕴含基因簇的生物信息学分析

*Streptomyces* sp. NO1W98 基因组 DNA 的提取参考链霉菌实验手册<sup>[18]</sup>, 并略有改动; 得到的基因组 DNA 分别进行全基因组扫描、序列拼接和基因功能注释, 由上海凌恩生物科技有限公司采用 HiSeq 4000 测序技术完成。基因组序列使用 antiSMASH 软件 (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>)进行蕴藏的次级代谢产物的预测, 各目标基因簇利用 2ndFind 在线软件 (<http://biosyn.nih.gov.jp/2ndfind/>)分析内部涵盖的次级代谢产物生物合成基因。读码框的分析采用 FramePlot 4.0 beta 软件 (<http://nocardia.nih.gov/jp/fp4/>), 对应的基因功能注释采用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>); PKS (polyketide synthase, 聚酮合酶)内部的结构域预测采用 PKS/NRPS Analysis 软件 (<http://nrps.igs.umaryland.edu/>)。

### 1.5 *Streptomyces* sp. NO1W98 基因组文库的构建和筛选

参考 SuperCos1 Cosmid Vector Kit 和 Gigapack III XL Packaging Extracts 操作手册, 构建 *Streptomyces* sp. NO1W98 的基因组文库, 挑取 2400 个克隆子于 96 孔板中并保存到低温冰箱中, 对应制成混合模板 500 个。设计 3 对引物筛选 *orf(-1)*-ts-F/R、*vtdA1*-ts-F/R 和 *orf(+1)*-ts-F/R 分别筛选含有 *orf(-1)*、*vtdA1* 和 *orf(+1)* 的 cosmid。最后对得到的 cosmid 进行末端测序, 以确定各自的末端序列, 选择合适的 cosmid 进行后续的基因阻断实验。

### 1.6 *Streptomyces* sp. NO1W98 的抗生素敏感性实验及基因阻断突变株的构建

测试 *Streptomyces* sp. NO1W98 对安普霉素 (Apm)、氨苄西林 (Amp)、卡那霉素 (Kan)、氯霉素 (Cml) 和三甲氧苄胺嘧啶 (Tmp) 等抗生素的敏感性, 作为后续基因阻断时的抗性筛选标记。

基因阻断突变株的构建流程参考文献[19], 以 *vtdA1* 的阻断实验为例。首先用 *vtdA1*-ts-F/R 这对引物进行筛选, 得到目标大小为 1675 bp 的阳性克隆子分别对应划线至 Kan+Amp 的固体 LB 平板上, 置于 37 °C 培养箱中过夜培养。分别从固体平板上挑取单克隆摇菌, 菌液 PCR 进一步验证。提取 cosmid, 用 *Bam*H I 及 *Eco*R I/*Bgl* II 进行酶切分析, 选择 cosmid 18H11 转化至 *E. coli* BW25113/pIJ790 得到 *E. coli* BW25113/pIJ790/18H11, 成功转入相应 cosmid 的菌株分别制备感受态细胞备用。接下来的步骤参照基于  $\lambda$ -RED 介导的 PCR-Targeting 技术<sup>[16]</sup>, *vtdA1* 被 Apm 抗性片段置换掉的重组 cosmid 分别标记为 pCJ 2001。将这些重组的 cosmid 分别转化 *E. coli*

ET12567/pUZ8002 感受态细胞, 与 *Streptomyces* sp. NO1W98 进行接合转移并挑选双交换突变株。利用微波法<sup>[20]</sup>对疑似双交换突变株进行快速抽提基因组 DNA 以及 PCR 验证: 以 *vtdA1*-ts-F/R 作为其阻断突变前后的验证引物, 扩增产物野生型大小为 1675 bp, 相应突变型大小为 2168 bp。

### 1.7 *vtdA1* 基因阻断突变株( $\Delta$ *vtdA1*)的回补

*vtdA1* 基因阻断突变株( $\Delta$ *vtdA1*)的回补参考文献[17], 简要流程为: 以 *Streptomyces* sp. NO1W98 的基因组 DNA 为模板, 用引物 *vtdA1*-c-F (CGCCATATGGTGACCCCGGTGCCGCCCGG) 和 *vtdA1*-c-R (TGCTCTAGATCAGGAGATCCCGAA TTCCT) 进行 PCR 扩增, 经 *Nde* I 和 *Xba* I 双酶切后, 连接至同样酶切处理的载体 pSET152AKE, 得到 pSET152AKE-*vtdA1*, 转化 *E. coli* ET12567/pUZ8002 感受态细胞, 与  $\Delta$ *vtdA1* 进行接合转移并挑选双交换突变株, 得到对应的回补突变株  $\Delta$ *vtdA1*::*vtdA1*。

### 1.8 *Streptomyces* sp. NO1W98 野生型及其突变株的 HPLC 检测

采用 1.2 部分进行 *Streptomyces* sp. NO1W98 野生菌株及其相应的基因阻断和回补突变株的小瓶发酵, 用 100 mL 乙酸乙酯萃取发酵产物, 上清于旋转蒸发仪上蒸干, 得到的提取物以 1 mL 甲醇作为溶剂制成相应的粗提物, 离心后取 20  $\mu$ L 进行 HPLC 检测。条件为: 流动相 A 相为 15% 乙腈, 流动相 B 相为 85% 乙腈, 均含 0.1% 冰乙酸 (glacial acetic acid, GAA); 流速为 1 mL/min, 检测波长为 210 nm 和 254 nm。HPLC 走样程序: 0–20 min, 0%–70% B 相; 20–21 min, 70%–100% B 相; 21–26 min, 100% B 相; 26.0–26.1 min, 100%–0%; 26.1–30.0 min, 0% B 相。

## 2 结果和分析

### 2.1 化合物 1 和 2 的分离和结构鉴定

经过正向柱层析, HPLC 制备分离得到化合物 1 约 20.5 mg, 化合物 2 约 5.6 mg。结构解析如下。

化合物 1 白色粉末, (+)ESI-MS 给出的准分子离子峰  $m/z$  772  $[M+Na]^+$ , 提示其分子量为 749, 提示化合物中可能还有一个氮原子。根据氢谱和碳谱的信息可以推测其分子式为  $C_{41}H_{67}NO_{11}$ , 不饱和度为 9。在化合物 1 的  $^1H$  NMR 中可以发现 5 个双峰甲基质子信号, 4 个单峰甲基信号, 2 个孤立的烯质子信号 ( $\delta_H$  5.49, br m;  $\delta_H$  5.44, dd,  $J=10.5, 5.5$  Hz) 以及一组反式烯质子信号 ( $\delta_H$  5.39, dd,  $J=15.0, 7.5$  Hz;  $\delta_H$  5.34, dd,  $J=15.0, 8.5$  Hz)。在化合物 1 的  $^{13}C$  NMR 谱中可以观察到 41 个碳信号, 其中有 6 个烯碳信号, 1 个酰胺羰基信号以及 1 个酮羰基碳信号。综合以上信息, 通过文献查阅<sup>[8]</sup>确定化合物 1 为 venturicidins A。

化合物 2 白色粉末, (+)ESI-MS 给出的准分子离子峰  $m/z$  729  $[M+Na]^+$ , 提示其分子量为 706。根据氢谱和碳谱的信息可以推测其分子式为  $C_{40}H_{66}O_{10}$ , 不饱和度为 8。在化合物 2 的  $^1H$  NMR 中可以发现 5 个双峰甲基质子信号, 4 个单峰甲基信号, 2 个孤立的烯质子信号 ( $\delta_H$  5.48, m;  $\delta_H$  5.44, m) 以及一组反式烯质子信号 ( $\delta_H$  5.38, dd,  $J=15.0, 8.5$  Hz;  $\delta_H$  5.30, dd,  $J=15.0, 8.5$  Hz)。在化合物 2 的  $^{13}C$  NMR 谱中可以观察到 41 个碳信号, 其中有 6 个烯碳信号以及 1 个酮羰基碳信号。综合以上信息, 可以推导出该化合物依然为 venturicidin 型的化合物, 通过数据的比对发现该化合物与化合物 1 之间结构上的区别是在 C-3' 位置上的酰胺基团。通过文献查阅<sup>[8]</sup>确定化合物 2 为 venturicidins B。

### 2.2 *Streptomyces* sp. NO1W98 菌株的生物信息学分析和杀黑星菌素生物合成基因簇的初步定位

根据上海凌恩生物科技有限公司对 NO1W98 进行基因组测序和拼接的结果, 我们得到 107 个 scaffold 文件, 约 11.6 Mb 个碱基序列。利用 antiSMASH 软件对基因组序列进行分析, 结果表明 NO1W98 中共有 49 个 cluster (基因簇), 其中包括 18 个 I 型 PKS 及相关杂合形式。I 型 PKS 中与杀黑星菌素的生物合成可能相关的为位于 Scaffold3 上面的 Region 3.3, 该段序列与已鉴定的氯丝菌素 (chlorothricin) 有着 25% 的基因相似性<sup>[21]</sup>, 与伴刀球霉素 A (concanamycin A) 有着 35% 的基因相似性<sup>[22]</sup>。我们进一步利用 2ndFind 软件进行分析, 结果表明位于 scaffold3 上从 179998 bp 到 295375 bp 的 DNA 序列与杀黑星菌素的生物合成可能相关, 但在该段序列内部含有多个 gap。鉴于此, 我们对 gap 进行填补, 最终拼接得到约为 90.5 kb 的 DNA 序列, 命名为 *vtd*。接下来, 利用 FramePlot 4.0 beta 和 Blast 软件对该段基因进行功能注释, 同时结合 PKS/NRPS Analysis 软件对相应 PKS 和模块的结构域组成进行分析, 表明该段基因含有 6 个 PKS 编码基因, 对应含有 13 个模块, 与杀黑星菌素的骨架结构匹配。另外, 杀黑星菌素和氯丝菌素在结构上除了共有大环内酯骨架外, 还共有 D-olivose 结构单元, 对应在该段序列中我们也得到了相应的糖基修饰基因。最后, 该段序列中还含有 1 个糖基转移酶和 1 个氨甲酰转移酶编码基因, 可以跟杀黑星菌素的结构中的糖基的装载以及氨甲酰化修饰对应起来。综上所述, 我们推测 *vtd* 与杀黑星菌素的生物合成密切相关。杀黑星菌素疑似生物合成基因簇 (*vtd*) 的组织排布和基因功能注释结果见图 2 和表 3。

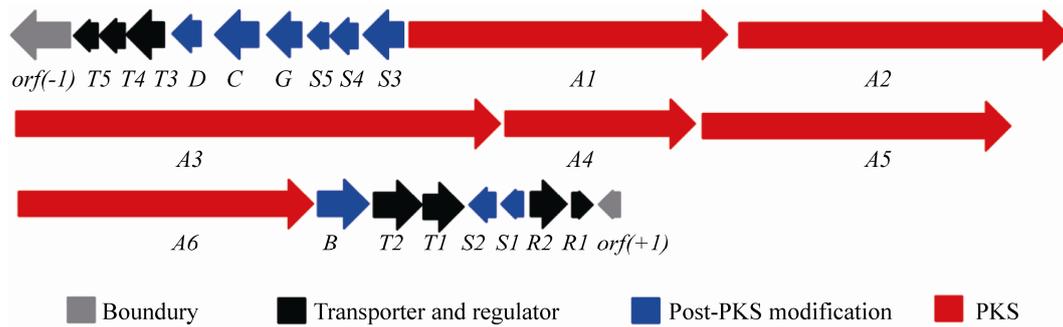


图 2. *Streptomyces* sp. NO1W98 中 *vtd* 的基因组组织排布图(相应基因的预测功能见表 3)

Figure 2. Genetic organization of the *vtd* cluster. Proposed functions of individual orfs are summarized in Table 3.

表 3. *Streptomyces* sp. NO1W98 菌株杀黑星菌素生物合成基因簇内各基因的功能注释

Table 3. Gene annotation of venturicidins' biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. NO1W98

Protein	Size/aa	Proposed function
Orf(-1)	819	Arginine-tRNA ligase
Vtd T5	305	ABC transporter permease
Vtd T4	323	Transporter
Vtd T3	445	Transporter
Vtd D	352	2-hydroxyacid dehydrogenase
Vtd C	514	(2Fe-2S)-binding protein
Vtd G	417	Glycosyltransferase
Vtd S5	245	4-ketoreductase
Vtd S4	341	3-ketoreductase
Vtd S3	477	NDP-hexose 2,3-dehydratase
Vtd A1	3590	Type I PKS: KS-AT-PP-KS-AT-PP-KS-AT-KR-PP
Vtd A2	3723	Type I PKS: KS-AT-DH-ER-KR-PP-KS-AT-KR-PP
Vtd A3	5476	Type I PKS: KS-AT-DH-ER-KR-PP-KS-AT-DH-KR-PP-KS-AT-KR-PP
Vtd A4	2171	Type I PKS: KS-AT-DH-ER-KR-PP
Vtd A5	3588	Type I PKS: KS-AT-DH-KR-PP-KS-AT-DH-KR-PP
Vtd A6	3336	Type I PKS: KS-AT-DH-KR-PP-KS-AT-DH-PP-Te
Vtd B	597	Carbamoyltransferase
Vtd T2	570	Transporter
Vtd T1	487	Transporter
Vtd S2	325	dNDP-glucose 4,6-dehydratase
Vtd S1	289	NDP-glucose synthase
Vtd R2	433	Two component system sensor kinase
Vtd R1	230	LuxR family transcriptional regulator
Orf(+1)	257	Disabled homolog 2-interacting protein

### 2.3 *Streptomyces* sp. NO1W98 中杀黑星菌素基因簇和边界基因的初步鉴定

为证实 *vtd* 确实负责杀黑星菌素的生物合成, 我们对其内部的结构基因 *vtdA1* 进行了阻断突变。为此, 首先探究了 NO1W98 对常用抗生素的敏感性, 发现安普霉素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、氯霉素 (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、氨苄青霉素 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和卡那霉素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对 NO1W98 具有较好的杀灭作用; 三甲氧苄胺嘧啶 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对 NO1W98 的生长无影响, 但对 *E. coli* 具有杀灭作用。接下来, 参考 SuperCos1 Cosmid Vector Kit 和 Gigapack III XL Packaging Extracts 操作手册, 成功构建了 NO1W98 的基因组文库, 共得到约 2400 个克隆, 制成混合模板 500 个。针对该段序列设计了相应

的文库筛选引物, 得到了相应的 cosmids。

进一步利用 PCR-targeting 技术, 构建得到了 *vtdA1* 被阻断的突变 cosmid, 将其转化 *E. coli* ET12567/pUZ8002 并与 *Streptomyces* sp. NO1W98 进行接合转移, 通过抗性筛选和 PCR 验证得到了 *vtdA1* 的基因阻断突变株  $\Delta vtdA1$  (图 3)。对得到的突变株  $\Delta vtdA1$  进行摇瓶发酵、萃取和 HPLC 分析, 与经同样条件进行发酵和分析的 *Streptomyces* sp. NO1W98 野生型进行对比, 发现突变株中完全不产生任何杀黑星菌素 (图 4)。最后, 对  $\Delta vtdA1$  进行基因回补验证, 发现回补菌株  $\Delta vtdA1::vtdA1$  恢复了杀黑星菌素的产生 (图 4)。由此, 我们证实该段 DNA 序列 *vtd* 确实负责杀黑星菌素的生物合成。

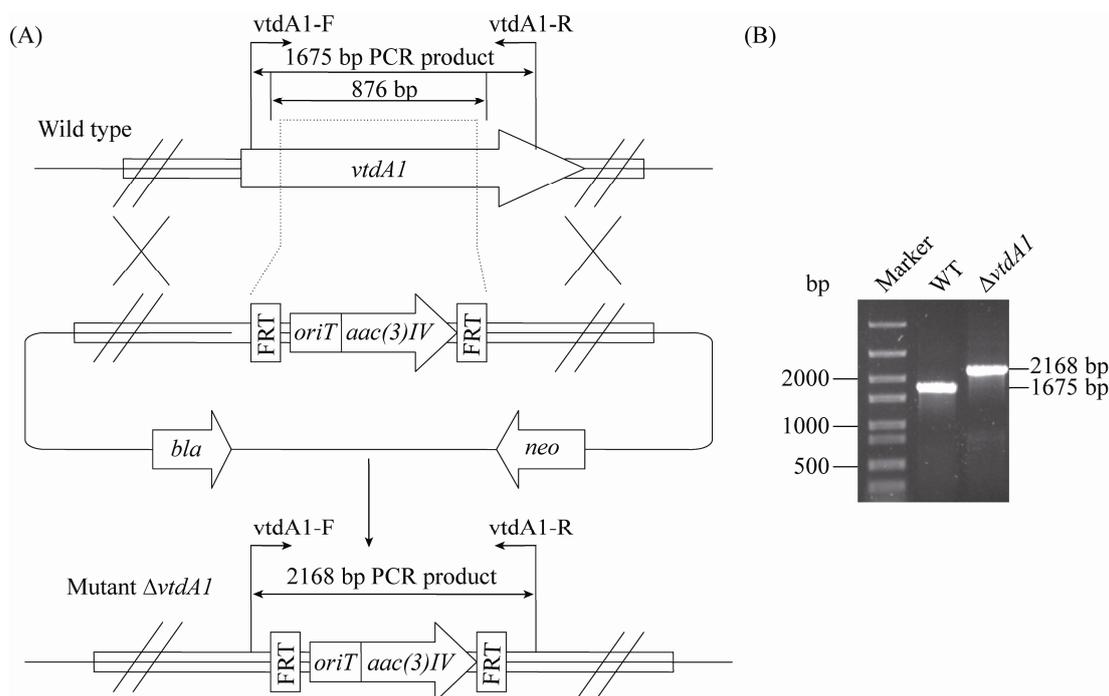


图 3. *vtdA1* 基因阻断突变株的构建

Figure 3. Construction of *vtdA1* gene disruption mutant. A: Schematic diagram. B: Gel electrophoresis analyses of PCR products. Marker: DNA molecular ladder; WT: *Streptomyces* sp. NO1W98, 1675 bp;  $\Delta vtdA1$ : mutant strain, 2168 bp.

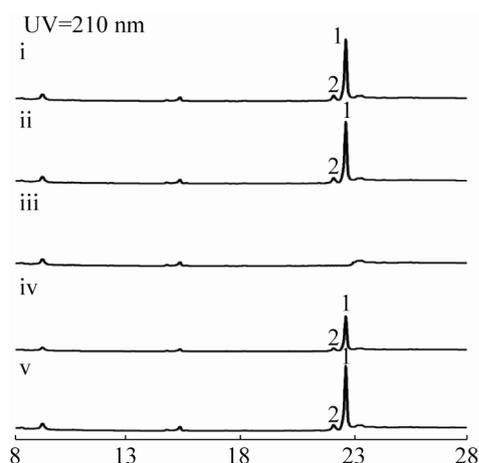


图 4. 不同菌株提取物的 HPLC 检测

Figure 4. HPLC analysis of the fermentation extracts of *Streptomyces* sp. NO1W98 wild-type and its mutant strains. i: *Streptomyces* sp. NO1W98; ii:  $\Delta orf(-1)$ ; iii:  $\Delta vtdA1$ ; iv:  $\Delta vtdA1::vtdA1$ ; v:  $\Delta orf(+1)$ .

为初步确定 *vtd* 基因簇的边界, 我们又对其内部的 *orf(-1)* 和 *orf(+1)* 进行了阻断突变, 分别得到对应的基因阻断突变株  $\Delta orf(-1)$  和  $\Delta orf(+1)$ , 并与 *Streptomyces* sp. NO1W98 同时进行摇瓶发酵、萃取和 HPLC 分析, 结果发现这些突变株均能正常产生杀黑星菌素, 与野生型没有任何区别 (图 4), 这说明 *orf(-1)* 和 *orf(+1)* 不是杀黑星菌素合成的必需基因, 可能是其边界基因 (图 2, 表 3; 相应 *vtd* 基因簇的 GenBank 登录号为 MN914689)。为最终确定其边界基因和最小生物合成基因簇, 还需对 *vtdT5*、*vtdT4*、*vtdT3*、*vtdD*、*vtdR1*、*vtdR2* 和 *vtdS1* 逐个进行阻断突变。

#### 2.4 杀黑星菌素生物合成途径的推导

根据 I 型 PKS 的装配原理和 *vtd* 内部基因功能注释的结果, 结合 I 型 PKS 的装配机制<sup>[23]</sup>, 我们推测杀黑星菌素的生物合成途径包括骨架的形成和后修饰途径两大部分 (图 5), 骨架的形成涉及 *vtdA1*、*vtdA2*、*vtdA3*、*vtdA4*、*vtdA5*、*vtdA6*

共计 6 个基因。接着通过结构域组成及功能分析, 发现该组装线涵盖 13 个模块 (module)。合成途径起始于 1 个丙酰-CoA 的装载, 酰基转移酶 (acyltransferase, AT) 特异性识别丙酰-CoA, 将其装载于 loading module 的 ACP 上作为一个三碳单元的起始点进行后续的装配步骤。在随后的骨架分子延伸释放过程中, 可以大致分为 6 种类型: (1) 模块 1 起始于三碳单元, 由甲基丙二酰-CoA 在酮基合成酶 (keto-synthase, KS) 催化下脱羧形成; (2) 模块 2、4 和 7 的结构域组成相同, 比模块 1 多了一个酮基还原酶 (keto reductase, KR) 结构域, 可将对应的酮基还原为羟基, 其中模块 4 的羟基作为后续成环的位点; (3) 模块 3、5 和 8 的结构域组成相同, 比模块 1 多了一个脱水酶结构域 (dehydratase, DH)、一个烯醇还原酶结构域 (enoyl reductase, ER) 和一个 KR, 可将对应的酮基形成饱和烃结构单元; (4) 模块 6 和 9 的结构域组成相同, 比模块 1 多了一个 DH 和一个 KR, 可将对应的酮基形成烯烃结构单元; (5) 模块 10 和 11 的结构域组成相同, 比模块 1 多了一个 DH 和一个 KR, 同时依据化合物的分子结构推测其中的 DH 功能失活, 未形成对应的烯键而保留了  $\beta$ -羟基; (6) 模块 12 比模块 1 多了一个 DH, 但功能失活, 可加载上最后一个二碳单元。最后, 装配链末端的硫酯酶结构域 (thioesterase, TE) 催化碳链上模块 4 的羟基亲核攻击模块 12 中 ACP 上的硫酯键, 最终环化解离形成大环内酯骨架结构。再经后修饰形成骨架内的吡喃环结构得到 VTD-X。

VTD 结构中的后修饰途径为: 葡萄糖-1-磷酸在 NDP-葡萄糖合成酶 *VtdS1* 的作用下活化成为 NDP-D-葡萄糖, 接着依次在 dNDP-葡萄糖 4,6-

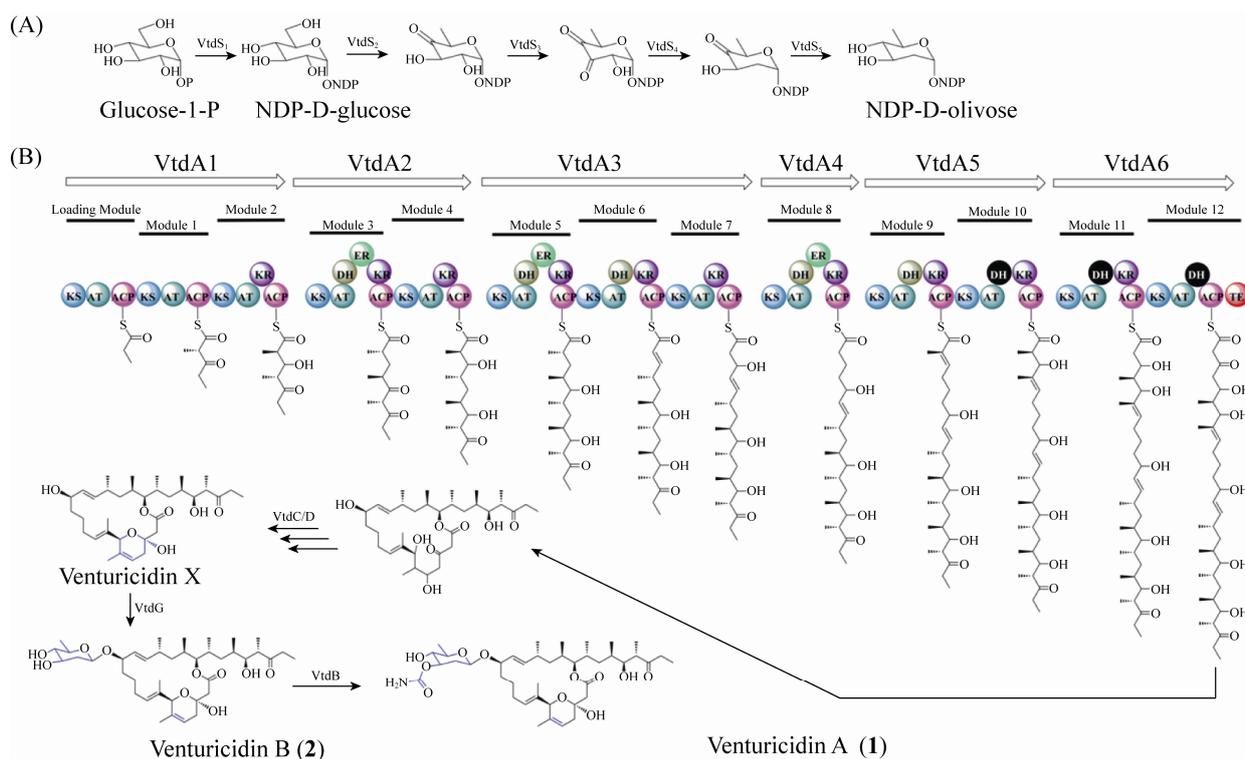


图 5. 杀黑星菌素可能的生物合成途径

Figure 5. Proposed biosynthetic pathway of venturicidins. A: olivose sugar moiety; B: PKS assembly and biosynthetic route to venturicidin A (1).

脱水酶 VtdS2、NDP-己糖 2,3-脱水酶 VtdS3、3-酮基还原酶 VtdS4 和 4-酮基还原酶 VtdS5 的作用下形成 NDP-D-olivose; VTD-X 被糖基转移酶 VtdG 催化 NDP-D-olivose 连接上糖基形成 VTD-B, 最后氨甲酰转移酶 VtdB 对 VTD-B 进行氨甲酰化修饰形成终产物 VTD-A (图 5)。

### 3 讨论

本研究首先从常规发酵分离着手得到化合物实体, 经由基因组测序, 结合相关生物信息学分析, 初步定位了杀黑星菌素的生物合成基因簇, 最后经体内基因阻断和遗传互补实验确证, 从链霉菌 NO1W98 中分离鉴定了杀黑星菌素, 并鉴定了其生物合成基因簇。

*Streptomyces* sp. NO1W98 中 VTD 的分离鉴定提供了 1 株 VTD 的产生菌, 可以用于后续基因工程菌株的构建。已有报道证实 VTD 类化合物具有显著的抗真菌和锥虫抑制活性<sup>[3,5-6,8]</sup>, 后续可以利用已得到的化合物实体拓展 VTD 的活性筛选范围, 以获得更为广泛的活性。另外, 相应的化合物实体可以作为构效关系研究的基础, 为相关的化学合成研究提供帮助, 从而为活性筛选提供更多的化合物实体。

鉴定生物合成基因簇最为常用的两种方法是基因阻断(敲除)和异源表达。本文使用的是前者, 鉴于该基因簇比较大, 而基于 SuperCos1 的 cosmid 文库容量通常只有 20–40 kb, 单一 cosmid 难以涵盖 *vtd* 的所有生物合成基因。因此, 我们同步构建了容量更大的 PAC 文库, 后续可广泛应用于该菌

株的基因组挖掘。NO1W98 相应遗传操作体系的建立, 可为后续基因簇内其他基因的阻断突变提供实例, 也为相应菌株的基因组挖掘打下基础。

杀黑星菌素生物合成基因簇的鉴定, 确定了其产生的分子基础, 可为后续产量优化和结构改造奠定基础。簇内涵盖的调控和转运基因可以借助相应的技术进行产量优化。另外, VTD 蕴含的 I 型 PKS 的机制可以借助代谢工程优化前体的供给, 从而提高产量, 构建高产基因工程菌株, 有利于后续大规模生产和研究开发。相应后修饰基因的确定, 可以依赖于组合生物合成技术得到不同修饰程度的 VTD 衍生物, 为相关的活性筛选提供化合物实体, 应用于农业和医药卫生领域。而在初步鉴定的杀黑星菌素生物合成基因簇内, 除了负责核心骨架形成的 *vtdA1-vtdA6*, 负责后修饰的 *vtdS1-vtdS5*、*vtdB*、*vtdG*, 以及调控转运相关的 *vtdR1*、*vtdR2*、*vtdT1-T5* 外, 余下的(2Fe-2S)结合蛋白编码基因 *vtdC* 和 2-羟基酸脱氢酶编码基因 *vtdD* 的具体功能无法预测, 推测其最有可能负责杀黑星菌素大环骨架初步装配之后的修饰(图 5), 与吡喃环的形成密切相关, 具体机制有待于进一步研究。与调控转运相关的 *vtdR1*、*vtdR2* 和 *vtdT1-T5* 后续需要逐个进行阻断突变, 从而确定其具体功能。

总之, 本研究通过“经典”的生物合成研究思路, 从一株链霉菌 NO1W98 中分离得到了杀黑星菌素, 并鉴定了其生物合成基因簇。研究结果扩充了 I 型 PKS 途径的家族成员, 为杀黑星菌素基因簇内其他基因的功能研究奠定了基础。后续可通过分子遗传学手段对杀黑星菌素进行结构修饰、改造以及产量优化, 以扩充该家族化合物成员, 为系统的活性筛选和构效关系研究提供支撑。

## 参考文献

- [1] Li GQ, He XZ. Progress in the immune mechanism of trypanosomiasis. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1996, 22(7): 44–46. (in Chinese)  
李国清, 何晓竹. 锥虫病免疫机理的研究进展. 中国兽医杂志, 1996, 22(7): 44–46.
- [2] Du J, Zhu YM. Progress in the treatment of Human African Trypanosomiasis. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015, 15(6): 1154–1159. (in Chinese)  
杜金, 朱明彦. 人类非洲锥虫病的治疗研究进展. 现代生物医学进展, 2015, 15(6): 1154–1159.
- [3] Otoguro K, Ishiyama A, Namatame M, Nishihara A, Furusawa T, Masuma R, Shiomi K, Takahashi Y, Yamada H, Ōmura S. Selective and potent *in vitro* antitrypanosomal activities of ten microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 2008, 61(6): 372–378.
- [4] Patrick DA, Gillespie JR, McQueen J, Hulverson MA, Ranade RM, Creason SA, Herbst ZM, Gelb MH, Buckner FS, Tidwell RR. Urea derivatives of 2-aryl-benzothiazol-5-amines: a new class of potential drugs for Human African Trypanosomiasis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 60(3): 957–971.
- [5] Rhodes A, Fantes KH, Boothroyd B, McGonagle MP, Crosse R. Venturicidin: a new antifungal antibiotic of potential use in agriculture. *Nature*, 1961, 192(4806): 952–954.
- [6] Aizawa S, Nakamura Y, Shirato S, Taguchi R, Yamaguchi I. Aabomycin A, a new antibiotic. I. Production, isolation and properties of aabomycin A. *The Journal of Antibiotics*, 1969, 22(10): 457–462.
- [7] Ma CZ, Wei CM, Qian ZG. Activity of agricultural antifungal agent “Nongkang 653” against some phytopathogenic fungi in laboratory assay and control effect in field test. *Acta Agriculture Shanghai*, 2000, 16(S1): 54–56. (in Chinese)  
马承铸, 魏春妹, 钱振官. 农抗 653 对几种真菌的抗菌活性和田间防效. 上海农业学报, 2000, 16(S1): 54–56.
- [8] Shaaban KA, Singh S, Elshahawi SI, Wang XC, Ponomareva LV, Sunkara M, Copley GC, Hower JC, Morris AJ, Kharel MK, Thorson JS. Venturicidin C, a new 20-membered macrolide produced by *Streptomyces* sp. TS-2-2. *The*

- Journal of Antibiotics*, 2014, 67(3): 223–230.
- [9] Nesci S, Ventrella V, Trombetti F, Pirini M, Pagliarani A. Thiol oxidation is crucial in the desensitization of the mitochondrial  $F_1F_0$ -ATPase to oligomycin and other macrolide antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2014, 1840(6): 1882–1891.
- [10] Perlin DS, Latchney LR, Senior AE. Inhibition of *Escherichia coli*  $H^+$ -ATPase by venturicidin, oligomycin and ossamycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1985, 807(3): 238–244.
- [11] Morales-Ríos E, de La Rosa-Morales F, Mendoza-Hernández G, Rodríguez-Zavala JS, Celis H, Zarco-Zavala M, García-Trejo JJ. A novel 11-kDa inhibitory subunit in the  $F_1F_0$  ATP synthase of *Paracoccus denitrificans* and related  $\alpha$ -proteobacteria. *The FASEB Journal*, 2010, 24(2): 599–608.
- [12] Griffiths DE, Houghton RL. Studies on energy-linked reactions: modified mitochondrial ATPase of oligomycin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 46(1): 157–167.
- [13] Walter P, Lardy HA, Johnson D. Antibiotics as tools for metabolic studies. X. Inhibition of phosphoryl transfer reactions in mitochondria by peliomycin, ossamycin, and venturicidin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242(21): 5014–5018.
- [14] Unitt MD, Lloyd D. Effects of inhibitors on mitochondrial adenosine triphosphatase of *Tetrahymena pyriformis* ST. *Journal of General Microbiology*, 1981, 126(2): 261–266.
- [15] Warhurst DC, Thomas SC. The chemotherapy of rodent malaria, XXXI. The effect of some metabolic inhibitors upon chloroquine-induced pigment clumping (CIPC) in *Plasmodium berghei*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 1978, 72(3): 203–211.
- [16] Gust B, Kieser T, Chater KF. REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. Norwich: John Innes Center, 2002.
- [17] Ma JY, Wang ZW, Huang HB, Luo MH, Zuo DG, Wang B, Sun AJ, Cheng YQ, Zhang CS, Ju JH. Biosynthesis of himastatin: assembly line and characterization of three cytochrome P450 enzymes involved in the post-tailoring oxidative steps. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(34): 7797–7802.
- [18] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical streptomyces genetics. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.
- [19] Chen Q, Ji CT, Song YX, Huang HB, Ma JY, Tian XP, Ju JH. Discovery of McbB, an enzyme catalyzing the  $\beta$ -carboline skeleton construction in the marinacarboline biosynthetic pathway. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(38): 9980–9984.
- [20] Xu P, Li WJ, Xu LH, Jiang CL. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes. *Microbiology China*, 2003, 30(4): 82–84. (in Chinese)  
徐平, 李文均, 徐丽华, 姜成林. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报*, 2003, 30(4): 82–84.
- [21] Jia XY, Tian ZH, Shao L, Qu XD, Zhao QF, Tang J, Tang GL, Liu W. Genetic characterization of the chlorothricin gene cluster as a model for spirotetrone antibiotic biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(6): 575–585.
- [22] Haydock SF, Appleyard AN, Mironenko T, Lester J, Scott N, Leadlay PF. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide concanamycin A in *Streptomyces neyagawaensis* ATCC 27449. *Microbiology*, 2005, 151(10): 3161–3169.
- [23] 王以光, 王勇. 抗生素生物技术. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2019.

# Isolation and identification of venturicidins biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. NO1W98

Shaofei Zhang<sup>1,3</sup>, Yuan Zhang<sup>1,2</sup>, Chuanpu Shen<sup>3\*</sup>, Qi Chen<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup> School of Life Sciences, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, Anhui Province, China

<sup>2</sup> School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

<sup>3</sup> School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

<sup>4</sup> CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, RNAM Center of Marine Microbiology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong Province, China

**Abstract:** [Objective] The aim of this study was to isolate venturicidins from *Streptomyces* sp. NO1W98 and identify their biosynthetic gene cluster. [Methods] The secondary metabolites were extracted from enlarged-scale fermentation broth of *Streptomyces* sp. NO1W98 with organic solvent, purified with normal and reverse phase silica gel chromatography and structure elucidated with spectroscopic approaches. The genomic DNA of *Streptomyces* sp. NO1W98 was extracted and sequenced by Illumina Hiseq technology. Gene cluster of venturicidins (*vtd*) was preliminarily located by bioinformatic analysis and verified by gene disruption and *trans* complementation. Different in fermentation extracts between *Streptomyces* sp. NO1W98 wild type and related mutants were analyzed with HPLC. [Results] Two macrolides, venturicidins A and B were isolated and their structures were identified from *Streptomyces* sp. NO1W98. Draft genome of *Streptomyces* sp. NO1W98 harbors 49 proposed secondary metabolite biosynthetic gene clusters, including the *vtd* located in Region 3.3 of scaffold 3 that is responsible for the biosynthesis of venturicidins. The *vtd* was preliminarily characterized by gene disruption of *vtdA1*, *orf(-1)*, *orf(+1)* and then verified by gene complementation of *vtdA1* to  $\Delta vtdA1$ . The *vtd* was found to include 6 PKS skeleton genes, 5 transporter genes, 2 regulator genes and 9 post-PKS tailoring genes. [Conclusion] The isolation and identification of venturicidins and their biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. NO1W98 provide the basis for future genetic engineering and strain improvement.

**Keywords:** *Streptomyces* sp. NO1W98, venturicidins, gene cluster, PCR-targeting, biosynthetic pathway

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41806158) and by the Open Project Program of Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica & Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, SCSIO, CAS (2018011007)

\*Corresponding authors. Tel/Fax: +86-551-65172130; E-mail: Chuanpu Shen, scp1001@126.com, Qi Chen, chenqi@ahmu.edu.cn  
Received: 13 January 2020; Revised: 19 March 2020; Published online: 15 June 2020