



构建链霉菌无细胞平台挖掘套索肽类天然产物

潘陈梦笑¹, 刘天罡¹, 刘然^{2*}

1 武汉大学药学院, 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 武汉 湖北 430071

2 中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学研究所, 中国科学院定量工程生物学重点实验室, 深圳 广东 518055

潘陈梦笑, 刘天罡, 刘然. 构建链霉菌无细胞平台挖掘套索肽类天然产物. 微生物学报, 2022, 62(5): 1754–1768.

Pan Chenmengxiao, Liu Tiangang, Liu Ran. Developing a *Streptomyces*-based cell-free platform for discovery of lasso peptides. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1754–1768.

摘要: 【目的】套索肽作为一类核糖体翻译后修饰肽(RiPPs)广泛分布于放线菌中, 以其独特的修饰结构和多样的生理活性受到了广泛的关注。为了更好地研究未知的套索肽, 期望开发基于链霉菌的无细胞转录翻译平台(下称“无细胞平台”)实现无细胞合成套索肽或其前体肽。【方法】首先尝试以不同的链霉菌构建无细胞合成平台, 并以绿色荧光蛋白为报告蛋白对平台产率进行优化; 在构建合适稳定的表达体系后, 将包含有套索肽生物合成基因的质粒引入体系中以探索套索肽的无细胞合成。【结果】在对基于模式菌株 *Streptomyces lividans* TK24 的无细胞体系进行制备工艺、体系组分、反应条件等多个参数进行优化后, 该体系最高能达到 90 $\mu\text{g/mL}$ 的荧光蛋白表达量; 基于该体系成功表达了目标套索肽的前体肽, 并通过融合 SUMO 标签增加前体肽在该体系中的稳定性。【结论】本研究成功构建了一类链霉菌无细胞平台, 为丰富来源的基因表达提供了可能性。尽管该体系在对表达套索肽未知蛋白的适用性上仍有待进一步提升, 但无细胞平台在天然产物的探索中将起到越来越重要的作用。

关键词: 链霉菌; 无细胞平台; 套索肽; 天然产物

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0900400, 2021YFC2101000); 国家自然科学基金(31971341, 32100053); 深圳合成生物学研究所科研项目(HSY89901038)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900400, 2021YFC2101000), by the National Natural Science Foundation of China (31971341, 32100053) and by the Shenzhen Institute of Synthetic Biology Scientific Research Program (HSY89901038)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-755-26405754; E-mail: ran.liu@siat.ac.cn

Received: 6 September 2021; Revised: 14 November 2021; Published online: 24 February 2022

Developing a *Streptomyces*-based cell-free platform for discovery of lasso peptides

PAN Chenmengxiao¹, LIU Tiangang¹, LIU Ran^{2*}

1 Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

2 CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

Abstract: [Objective] As a type of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) rich in *Actinomycetes*, lasso peptides have received increasing attention for their distinct modified structures and diverse biological activities. Therefore, we endeavored to develop a *Streptomyces*-based cell-free protein transcription/translation platform suitable for cell-free synthesis of lasso peptides or their precursors. [Methods] We first developed the cell-free platform with different *Streptomyces* strains and then optimized the preparation method, system components, and reaction conditions to improve the platform efficiency according to the expression of enhanced green fluorescent protein (eGFP). The core genes of the targeted lasso peptides were then introduced to the optimized platform for expression. [Results] We increased the titer of eGFP in a cell-free platform based on *Streptomyces lividans* TK24 to 90 $\mu\text{g/mL}$ under the optimized conditions. With this cell-free platform, we expressed the precursors of lasso peptides and further fused SUMO-tag to the targeted precursors to increase their stability. [Conclusion] In this study, we constructed a *Streptomyces*-based cell-free platform for the expression of unexplored genes. Although the applicability of the platform for expressing unknown lasso peptides still calls for further improvement, cell-free platforms will facilitate the research on natural products.

Keywords: *Streptomyces*; cell-free platform; lasso peptide; natural products

核糖体翻译后修饰肽(RiPPs)是一类广泛分布、种类丰富的天然产物^[1]。其中,套索肽(lasso peptides)以其独特的修饰结构和良好的生理活性受到了广泛的关注^[2]。成熟的套索肽活性丰富^[3],以抗菌活性为主,同时也被报道存在如抗 HIV 病毒、抗肿瘤、以及作为多种信号受体的拮抗剂等作用。通常,套索肽的生物合成基因簇由编码了前体肽 A、内酰胺环化酶 C、半胱氨酸蛋白酶 B1-B2、转运蛋白 D、调控模块 R 以及其他后修饰蛋白的基因所组成。其前体肽中的核心肽段 1 位的氨基酸和 7 到 9 位之间的某一个天冬氨酸 Asp(D)或谷氨酸 Glu(E)残基间会形成一个内酯

环,余下的 C 端肽段将穿过环内,并借助其他残基的位阻效应稳定该套索结构,使其具有较好的热稳定和抗酶解的特性。但目前,仅凭序列信息,仍无法推断一个未知的套索肽的结构及生理活性。因而,面对基因库中海量的未知生物合成基因簇,建立高效稳定的表征手段具有重要意义。

无细胞体系的发展历史悠久,自 20 世纪用于细胞中许多理化反应途径的阐明,到进入合成生物学时代后被用作快速高效的诊断途径,无细胞体系的功能被不断拓展^[4]。而在天然产物挖掘和酶学领域,由于无细胞体系能很好地

规避异源表达中的产物毒性与繁重操作,在兼具高效生物酶反应的同时,又能给予研究者更多的操作空间,因而这一方法也在不断地完善,以适应多元的研究需求^[5-6]。在2021年,美国伊利诺伊大学香槟分校的 Mitchell 课题组发表了依托大肠杆菌无细胞平台进行套索肽挖掘的成果^[7]。在此前的研究中,他们在嗜热放线菌 *Thermobifida fusca* 中发现了一个全新的套索肽合成基因簇^[8],通过体外重构其生物合成途径得到了产物 fusilassin。在这一过程中,他们发现嗜热放线菌来源的后修饰酶 FusB 和 FusC 在异源表达和体外纯化上更为稳定,同时还展现了一定的泛杂性,可以对存在一定序列差异的前体肽进行修饰。利用这些优点,该课题组在大肠杆菌无细胞体系中,通过添加前体肽基因库和纯化的后修饰酶,借助 FusB 和 FusC 将转录翻译出来的前体肽进行修饰,从而建立了一套高通量套索肽挖掘的无细胞平台。基于这一技术平台,由其创立的 Lassogen 公司正着力开发具有药物前景的套索肽药物,这与我们此前的工作——明星 RiPPs 分子 nisin 在无细胞平台中进行生物合成改造的工作一同^[9]展现了无细胞平台在 RiPPs 挖掘和高产上的巨大潜力。

套索肽基因簇广泛分布于放线菌中^[10],基因中通常 GC 含量高,以大肠杆菌为异源宿主的表达常常遇到后修饰酶不稳定的难题。因此,基于放线菌的无细胞体系可能更适合挖掘套索肽。基于链霉菌的无细胞表达体系报道有限: Jewett 等和 Li 等自 2017 年后针对模式菌株进行了较为系统的改进^[11-13],该平台利用额外添加的 T7 RNA 聚合酶转录系统,用链霉菌本底的核糖体进行蛋白翻译,最优条件下产量达到 400 μg/mL。而 Freemont 组在 2017 年发表了一套完全基于链霉菌本底的转录翻译系统的无细胞平台^[14],采用强启动子 *KasOP**,菌株选用 *Streptomyces*

venezuelae,经优化后荧光蛋白模型产量在 35 μg/mL。其报道,链霉菌系统能可溶性地表达某些在大肠杆菌体系中难以可溶表达的蛋白,展现出对于高 GC 含量基因表达的独特优势。

鉴于此,本研究计划建立基于放线菌中的链霉菌的适用于众多未知套索肽挖掘的无细胞体系。本研究首先尝试以不同的链霉菌进行无细胞平台构建,并通过报告绿色荧光蛋白的表达对平台产率进行不断的优化;在获得合适稳定的表达体系后,我们将包含有套索肽生物合成基因的质粒引入体系中以实现基于模板的转录和翻译,成功表达并在 HPLC-MS 中检测到了前体肽,并随后通过融合 SUMO 标签减少前体肽被肽酶水解。接下来,我们在该无细胞表达系统中尝试多种方式合成成熟的套索肽,并对可能限制该系统的原因进行一定的讨论,以期提供有价值的经验和思路。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

1.1.1 菌株

本实验中,采用的菌株及其用途如表 1 所示。

1.1.2 质粒构建

本实验中用于无细胞表达实验的质粒均采用带有 T7 启动子的 pJL1 质粒作为载体骨架。于 T7 启动子下游插入的目的基因中, *las-6A* (129 bp), *las-8A* (168 bp), *las-6CB* (约 2.5 kb) 基因通过 PCR

表 1 本研究中所用菌株及其用途

Table 1 Strains and their usage in this study

Strains	Usage
<i>Escherichia coli</i> DH10β	Plasmid construction
<i>Streptomyces</i> sp. J1002	Gene cloning and cell-free platform lysate
<i>Streptomyces</i> sp. FR008	Cell-free platform lysate
<i>S. lividans</i> TK24	Heterologous protein expression and cell-free platform lysate
<i>E. coli</i> ET12567/pUB307	Assistant plasmid for conjugative transfer

的方法从 *Streptomyces* sp. J1002 基因组中扩增得到, sviceucin 核心生物合成基因簇 *sviACB* (包含同一转录区下 *sviA*, *sviC* 和 *sviB*, 序列两端分别预设 *Nde* I 和 *EcoR* I 位点, 共约 2.7 kb) 通过基因合成得到, 作为报告蛋白的 eGFP 的基因片段由李健老师(上海科技大学)提供, 使用引物进行 PCR 扩增。以上经合成或扩增得到的用于无细胞表达的基因片段, 经 *Nde* I 和 *EcoR* I 进行双酶切, 再通过 T4 连接酶反应插入同样以 *Nde* I 和 *EcoR* I 线性化的 pJL1 载体上, 组装产物转化入大肠杆菌, 单克隆挑点培养并提取质粒。构建目标蛋白 N 端带 SUMO 标签的 pJL1-SUMO-Las-6A 和 pJL1-SUMO-Las-8A 质粒时, 以构造完成的 pJL1-Las-6A 和 pJL1-Las-8A 质粒为载体, PCR 扩增 Histag-SUMO 蛋白基因, 用 *Nco* I 和 *Nde* I 双酶切处理后通过 T4 连接酶反应组装。为了在链霉菌中异源表达后修饰酶, 本实验采用带有链霉菌本底强启动子 *KasOP** 的 pSET152 质粒作载体, 将 PCR 扩增得到的基因 *las-6CB* 及 *sviCB* (约 2.6 kb) 以 *Nde* I 和 *EcoR* I 双酶切后 T4 酶连插入线性化载体中 *KasOP** 启动子下游。本实验所用质粒均经过酶切和测序验证, 构建时 PCR 扩增基因片段使用到相关引物见表 2。

1.2 固体发酵

Streptomyces sp. J1002 选定了 3 种固体培养基, 分别是 ISP2 (4 g/L 葡萄糖, 4 g/L 酵母提取物, 10 g/L 麦芽提取物, 1.5% 琼脂)、ATCC172 (10 g/L 葡萄糖, 5 g/L 酵母提取物, 20 g/L 可溶性淀粉, 5 g/L 酸水解酪蛋白, 1 g/L 碳酸钙, 1.5% 琼脂) 和 YEME (3 g/L 酵母提取物, 5 g/L 蛋白胨, 3 g/L 麦芽提取物, 10 g/L 葡萄糖, 5 mmol/L 氯化镁, 1.5% 琼脂) 进行固体发酵 (200 mL, 分 10 块板), 将对数期菌丝体涂抹平板, 经过 30 °C 固体发酵 10 d 后, 用纱布挤压过滤得到滤液; 剩余琼脂块用 100 mL 甲醇室温过夜摇瓶萃取, 萃取液经纱布挤压过滤, 与前滤液合并后旋蒸去除甲醇, 每种培养基得到 10 mL 的萃取液。得到的萃取液再次过滤后单次上样至预先用 15 mL 0.1% 三氯乙酸-乙腈、50 mL 0.1% 三氯乙酸-去离子水平衡后的 C₁₈ SPE column (Waters Sep-pak C₁₈ 2 g 12 cc), 用 50 mL 0.1% 三氯乙酸-去离子水清洗, 再依次以 6 mL 20% 乙腈、40% 乙腈、80% 乙腈、100% 乙腈梯度洗脱; 合并 80% 乙腈和 100% 乙腈的洗脱液, 真空过夜蒸发去除溶剂中乙腈后进行检测。导入了 *las-6* 和 *las-8* 的 *S. lividans* TK24 在 ATCC172 (200 mL, 分 5 块) 和

表 2 本研究中质粒构建所用引物

Table 2 Primers used for plasmid construction in this study

Protein	Direction	Primer sequences (3'→5')
Las-6A	F	CGCCATATGAACATCGAGACCGCTGACGTG
Las-6A	R	CGAATTCTCACGACCACTGGTACCAGGTAGC
Las-8A	F	CGCCATATGCTGTGTGATCTGGAGGTCACCATG
Las-8A	R	CGAATTCTCAGGCCAGAACACCAGC
Las-6CB	F	CGCCATATGAGTGACACGGTGGCG
Las-6CB	R	CGAATTCCTACGGGAGACGGTCGTTGAG
Svi-CB	F	CGCCATATGGACTTCCTGATTCTGCC
Svi-CB	R	CGAATTCTCACGGCTGCCTCCC
eGFP	F	CGCCATATGGTGAGCAAGGGCGAG
eGFP	R	CGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
Histag-SUMO	F	GAGATATACCATGGGTCATCACCATC
Histag-SUMO	R	CAGCATATGAGCAGCGGCGCC

YEME (200 mL, 分5块)培养基上固体发酵 18 d, 后处理方法与上述一致。

1.3 细胞裂解液制备

将链霉菌孢子液接种至 YEME 培养基中, 依次进行 5 mL 和 20 mL 两级扩大(30 °C、220 r/min), 再将种子液以 1% *V/V* 接种至 500 mL 培养基中, 30 °C、220 r/min 摇瓶培养 24 h 至生长对数中期。4 °C、7 000×*g*, 20 min 离心收集菌体, 用 4 °C 保存的清洗缓冲液(10 mmol/L 羟乙基哌嗪乙硫磺酸钾 pH 7.5, 10 mmol/L 氯化镁, 1 mol/L 氯化铵, 5 mmol/L β-巯基乙醇)清洗菌体 2 次, 随后用 4 °C 保存的 S30 缓冲液(50 mmol/L 羟乙基哌嗪乙硫磺酸钾 pH 7.5, 10 mmol/L 氯化镁, 50 mmol/L 氯化铵, 5 mmol/L β-巯基乙醇, 4 °C)清洗菌体 1 次, 再按照 2.5 倍细胞湿重(高压匀浆破壁法)或 1 倍细胞湿重(超声破壁法)添加适量 S30 缓冲液(定容时加 10% *V/V* 甘油的 S30 缓冲液)重悬菌体后进行菌体破碎。高压匀浆法以 800–1 000 bar, 循环 1–2 min 进行破壁; 超声破壁法以 125 J/mL, 40% 振幅, 10 s on 40 s off 进行破壁, 破壁时保持浊液均匀, 避免局部能量过剩。所得裂解液经 4 °C, 16 000×*g* 离心 15 min, 收集并分装上层液体, 液氮速冻后保存在–80 °C 冰箱待取用。

1.4 无细胞反应条件

最终优化的无细胞反应体系(以 40 μL 计)包含: 12 μL 细胞裂解液(其总蛋白浓度约在 25 mg/mL), 10 μL 4×预混液(200 mmol/L 羟乙基哌嗪乙硫磺酸钾 pH 8.2, 140 mmol/L 乙酸铵, 280 mmol/L 乙酸钾, 5 mmol/L ATP, 各 3.4 mmol/L 的 CTP、GTP 和 UTP, 100 mmol/L 烯醇式磷酸盐(PEP), 各 8 mmol/L 的 20 种标准氨基酸, 8% (*W/V*) PEG₈₀₀₀, 0.14 mg/mL 亚叶酸、1 μL 10 mg/mL tRNA、1 μL 1 660 U/mL 丙酮酸激酶、1.4 μL 5 mg/mL 粗纯化 T7 RNA 聚合酶、0.2 pmol 相应

质粒, 最后用无菌去离子水调整体积到 40 μL。在进行无细胞反应表达套索肽合成基因簇时, 如需总反应体积为 200 μL 或 400 μL 时, 将配置好的总反应液平分至 EP 管中以 40 μL 为一个单元进行反应后再混合。反应体系在 30 °C 的培养箱中密闭静置 3 h 反应。

1.5 eGFP 荧光定量方法

利用 Pierce™ BCA Protein Assay Kit 测定纯化的 eGFP 蛋白原液浓度。将原液进行逐级稀释, 使用带荧光检测的酶标仪(λ_{ex} 480 nm/ λ_{em} 510 nm, 探测高度 3 mmol/L)绘制荧光信号-蛋白浓度定量曲线。无细胞反应体系表达的荧光蛋白样品均取 10 μL, 用水 10 倍稀释至 100 μL 于黑色平底酶标板中用于检测, 样品荧光信号扣除阴性对照后换算为 eGFP 的表达量。

1.6 无细胞表达检测样品处理

对 200–400 μL 的无细胞反应体系, 使用 C₁₈ SPE column (Waters Sep-pak C₁₈ 50 mg 1 cc)进行脱盐富集。具体地, 用 1 mL 0.1%三氯乙酸-乙腈活化柱体, 3 mL 0.1%三氯乙酸-去离子水进行柱平衡后进行上样。上样后, 用 1 mL 的 0.1%三氯乙酸-去离子水进行清洗, 随后用 0.8 mL 乙腈洗脱。洗脱液真空离心蒸发去除溶剂, 得到的固体粉末用适量甲醇溶解后, 逐步加水至含 20% *V/V* 甲醇, 如难溶时使用冰浴超声助溶。在 HPLC-MS 上样前 13 000 r/min 离心 5 min 去除不溶沉淀。对于仅表达前体肽的体系, 在 C₁₈ 脱盐之前, 向体系中加入总蛋白含量 1%的 trypsin 进行 37 °C 3 h 酶切。

1.7 HPLC-MS 定性检测

对固体发酵萃取液或无细胞反应液进行相应后处理后, 离心取上清液进行 HPLC-MS 检测 (Thermo Fisher Ultimate 3000 UPLC 串联 Thermo Fisher Q Exactive Orbitrap MS)。质谱检测条件: 使用 Thermo Fisher Hypersil GOLD C₁₈ (2.1×100 mmol/L, 3 μm) 色谱柱, 流动相 A 为 H₂O

(0.1% 甲酸), 流动相 B 为乙腈(ACN); 梯度程序为(时间, B %) 0 min, 10% B; 5 min, 10% B; 25 min, 95% B; 35 min, 95% B; 35.1 min, 10% B; 40 min, 10% B。流速为 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 10 μL 。样品盘温度为 8 $^{\circ}\text{C}$ 。使用 ESI 阳离子模式进行检测, 全扫描触发 dd-MS² 模式, 扫描范围为 150–2 000 Da; MS 分辨率为 70 000; MS² 分辨率为 17 500; 分离窗口为 1.4 m/z ; CE 30; 动态排除 2 s。

1.8 RNA 提取和反转录

使用 QIAGEN RNA extraction plant mini kit 试剂盒, 采用研磨法在液氮中将菌体研磨破壁, 粉末于 50 mL 洁净无酶的离心管中用 500 μL Buffer RLC 吹吸混匀后转移至 1.5 mL EP 管中, 涡旋裂解细胞壁, 随后依次按说明书转移液体至预制离心柱 QIAshredder spin column 中离心取下滤液, 加入 0.5 倍体积(250 μL)的无水乙醇吹吸混匀, 置于 RNeasy spin column 中离心弃滤液, 经 Buffer RW1 洗涤后, 滴加现混 DNA 酶的 Buffer RDD 于膜上并静置 15 min 消化 DNA, 再经 Buffer RW1 洗涤 2 次, 含无水乙醇 Buffer RPE 洗涤 2 次, 将内管置于新 1.5 mL 离心管中, 待乙醇挥发后, 往膜中央加入 RNase-free 无菌水, 静置离心, 滤液分装保存, 提取得 RNA。

随后, 使用 TaKaRa PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒, 首先去除基因组 DNA, 使用 gDNA Eraser, 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 min; 再将反应液配制成反转录反应体系, 其中包含 PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I 和 RT Primer Mix, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min 后经短暂高温 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s 消除所有酶的残留活性, 所得反应液可进行常规 PCR, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.9 Western-blotting

蛋白与上样缓冲液预混高温结合后, 上样进行 SDS-PAGE 电泳, 结束后进行转膜, 膜材料为 PVDF; 使用含 2% 脱脂奶粉的缓冲液对膜上

杂蛋白进行封闭, 洗膜后进行过夜一抗孵育, 该抗体对蛋白携带的 His-tag 进行标记; 第二天使用辣根过氧化物酶二抗孵育, 随后将新鲜的含过氧化氢的显色液与膜作用, 选择合适时间记录发光情况。

1.10 蛋白浓度测定

选用 PierceTM BCA Protein Assay Kit 对裂解液总蛋白浓度进行测定。按说明书建议配置 BSA 梯度稀释标品用于回归曲线的建立; 将细胞裂解液分别作 50 倍、200 倍、500 倍稀释, 与 BSA 梯度标准样于细胞板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 共同孵育, 在 30 min 和 2 h 分别检测 562 nm 处的吸光度; 最终 BSA 回归曲线拟合较好。根据拟合情况以及两个不同时间检测数据, 确定对于样品而言合适的稀释浓度为 50 倍, 并以此换算各细胞裂解液总蛋白含量。

1.11 位点整合型质粒接合转移(三亲本)

将带目标质粒的 *E. coli* DH10 β 和 *E. coli* ET12567/pUB307 预先活化, 临操作前 3 h 转入抗生素减半的 LB 培养基中生长至 $OD_{600}=0.6-0.8$, 多次清洗去除抗生素后, 与经 50 $^{\circ}\text{C}$ 热激和 2 h 预萌发的 *S. lividans* TK24 孢子液进行混合, 去除多余上清后涂布在含 20 mmol/L 氯化镁的 SFM 培养基平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后覆盖抗生素; 此后生长 2 d 后长出接合子, 挑点进行抗性验证和 PCR 验证, 成功的菌株在含抗性平板上扩大培养, 20% 甘油保种。

2 结果与分析

2.1 利用基因信息挖掘目标套索肽

本课题组在此前对工业菌株 *Streptomyces* sp. J1002 基因组的 antiSMASH^[15] 分析的过程中发现存在 3 个可能的套索肽生物合成基因簇, 分别命名为 *las-6*、*las-8* 和 *las-24*, 预测的合成基因簇如图 1 所示。

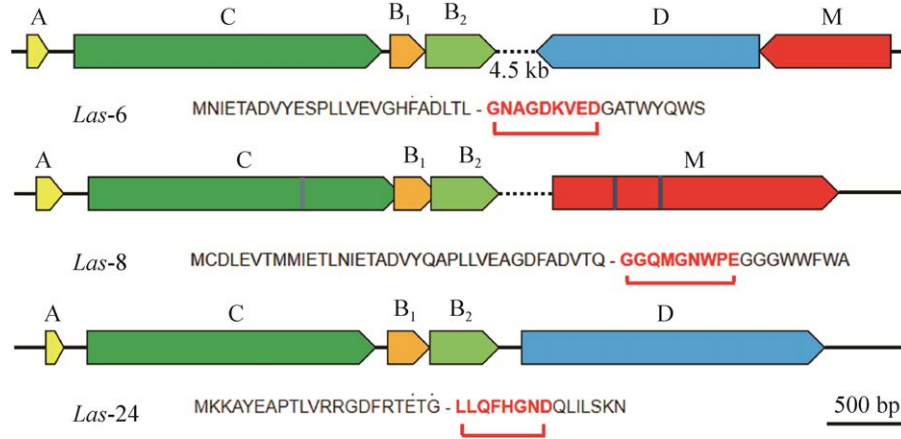


图 1 *las-6*、*las-8* 和 *las-24* 的预测生物合成基因簇示意图

Figure 1 A diagram of the predicted biosynthetic gene clusters for *las-6*, *las-8*, and *las-24*. A: precursor peptide; B₁, recognition domain; B₂: leader peptidase; C: lasso cyclase; D: transporter; M: putative additional modification enzyme; stripes in gene sections: stop codon. The precursor peptide sequences are provided below each cluster, with dash separating leader and core region and red colored letters emphasizing predicted lasso-forming residues.

对其基因簇构成进行分析显示在 *las-6* 和 *las-8* 两个生物合成基因簇中均有可能的额外后修饰酶存在(图 1)。Las-6M 为预测的甲基转移酶; Las-8M 为预测的 SAM 自由基酶, 具有结合铁硫簇的 CXXXCXXX 特征结构域, 在 pBLAST 中检索与此前报道中预测参与另一类 RiPP 的 darobactin^[16]的生物合成酶 DarE 具有一定相似性。而在 darobactin 七肽的结构中包含有 2 个色氨酸上的特殊修饰, 这一修饰被推测由 DarE 这个 SAM 自由基酶催化。因此, 由于 Las-8A 的核心序列也富含色氨酸残基, 所以 Las-8A 也可能会在后修饰酶的作用下, 形成有趣结构的同时被赋予特殊的生理活性。对 *Streptomyces* sp. J1002 分别在 ISP2、ATCC172 和 YEME 3 种培养基中进行固体发酵后, 通过对甲醇萃取产物进行 HPLC-MS 分析, 结果显示得到了 *las-24* 的产物, 其发生内酰胺环化的位点极可能是如预测所示的核心肽 1 位的 Leu 和 8 位的 Asp (图 2), 而另外 2 个簇的成熟或未修饰产物均未能检测到。这表明在现测试条件下, 这

2 个簇或存在基因沉默, 或存在表达产物的降解, 我们遂选取这 2 个套索肽基因簇进行无细胞反应的表征。

同时, 我们选取了此前报道的来源于 *S. sviveus* 的一种名为 sviveucin 的套索肽合成簇 *svi*^[17], sviveucin 具有抗革兰氏阳性菌的活性。有趣的是, 其环化修饰酶 SviC 在体外反应中展现了较大的底物泛杂性, 存在对嵌合前体肽库进行修饰的可能性, 具有开发成通用的套索肽修饰平台的潜力。而作为结构已知、合成路径较为清晰的套索肽产物, 对 sviveucin 的无细胞表达也能够帮助我们更好地理解并优化无细胞合成体系。

2.2 构建并优化链霉菌无细胞体系

经典的无细胞体系由细胞裂解液、转录翻译所需元件(通常由裂解液中包含, 可按需添加)、酶反应所需盐离子、原料核糖核酸 NTP 和氨基酸、能量物质以及其他辅助因子组成。为了达到适宜后续后修饰反应及 HPLC-MS 检测的肽浓度, 我们首先对链霉菌无细胞体系进行了构建和优化。

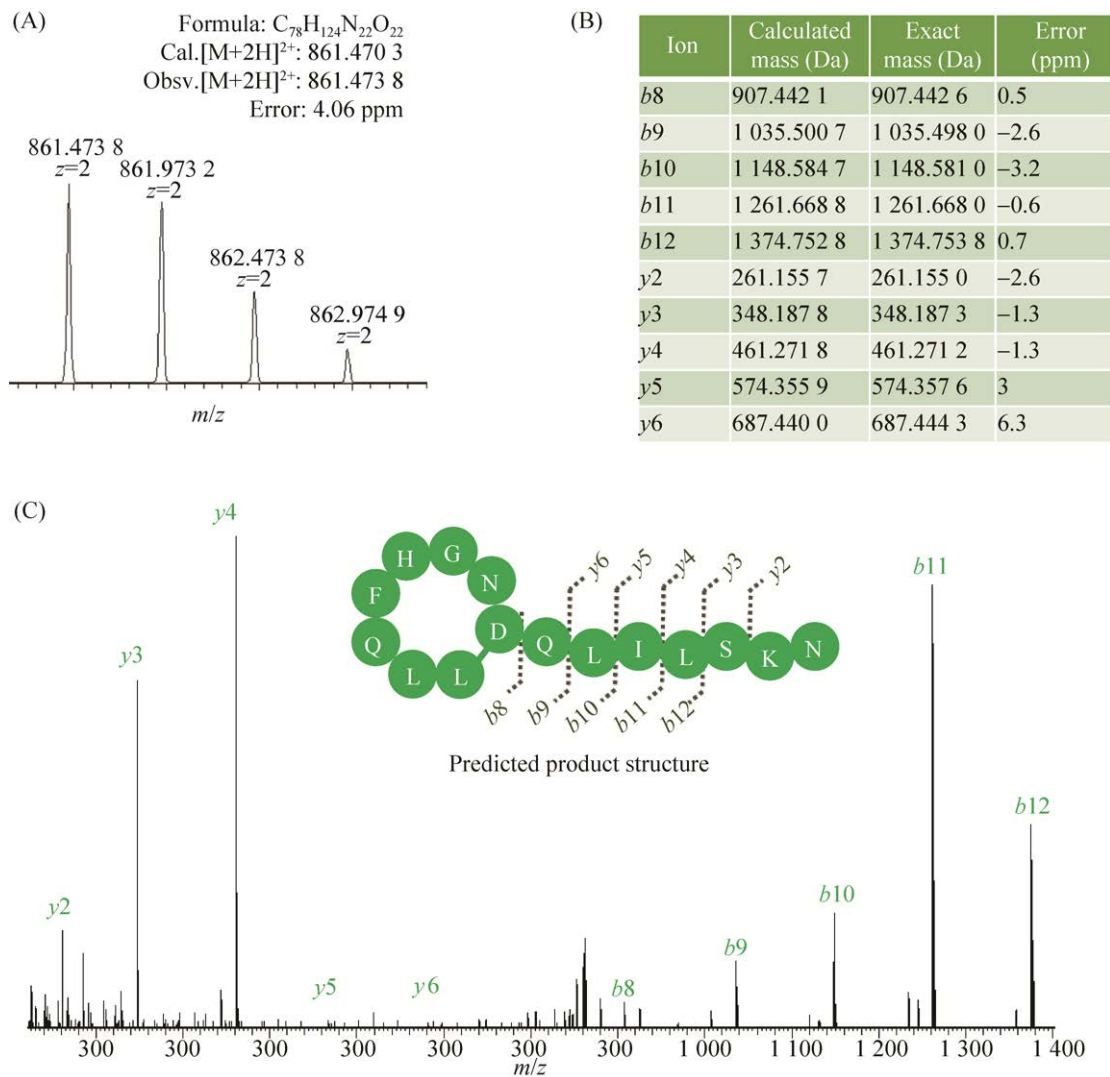


图 2 *las-24* 成熟产物质谱结果

Figure 2 Mass spectrum for the matured product of *las-24*. *Streptomyces* sp. J1002 was solid-fermented on YEME medium and ATCC172 medium for 10 days, and the modified product of *las-24* was detected in the methanol extracted fraction. A: MS^1 product signal; B: MS^2 ion signal comparison; C: the matching of the secondary fragments in the MS^2 spectrum and the preliminary prediction of the cyclic structure diagram based on the fragment information and the typical structure of the lasso peptide. Its topological structure needs to be further verified by means such as NMR.

首先,以密码子优化后的 eGFP 为报告基因,对链霉菌无细胞体系进行优化。最初,我们在菌株选择上采取了两种方案。第一种是工业菌株 *Streptomyces* sp. J1002, 其基因组中包含有 *las-6* 和 *las-8* 两个可能的套索肽生物合成基因簇以及经固体发酵验证的 *las-24* 生物合成基因簇。考虑

到其能成功表达 *las-24* 生物合成基因簇并得到成熟产物,我们认为其胞内体系对得到成熟的套索肽或许有帮助。但在基于 *Streptomyces* sp. J1002 的无细胞体系合成 eGFP 的探索中,结果显示即使进行多种条件的优化,荧光蛋白产量均在 $5 \mu\text{g/mL}$ 以下,不能满足需求(图 3A)。因此

我们转向了通用易得的模式菌株 *Streptomyces* sp. FR008 和 *S. lividans* TK24 进行无细胞合成体系的构建, 结果显示以 *S. lividans* TK24 表达效率最高(图 3A), 所以 *S. lividans* TK24 被选为后续使用的菌株。在制备方式上, 我们测定了均质机破壁和超声破壁两种方式, 后者在蛋白浓度上高于前者, 这与文献报道经超声破壁制备的无细胞体系能达到更高产量相符^[12], 因此随后的制备中均以超声破壁的方式进行裂解液制备。经 BCA 测定, 本实验中使用的 *S. lividans* TK24 裂解液浓度为 25.08 mg/mL。

在无细胞体系合成蛋白的反应条件上, 首先分别测试了无细胞体系常用的 24 °C 和链霉菌生长的最适温度 30 °C, 结果表明后者产量更高(图

3B); 同时考察反应体系体积: 常见的 20 μ L 体系和增加的 40 μ L 体系, 结果表明 40 μ L 反应体系有更好的效果(图 3B); 此外, 与通常对化学反应的理解不同, 持续的振荡对于反应没有太多的帮助(图 3B); 在文献报道进行无细胞反应的成分中, 链霉菌体系与大肠杆菌体系存在一定的差异, 实验结果显示, 与大肠杆菌体系相反, 链霉菌体系添加约 2% PEG₈₀₀₀ 能够提高蛋白的产量, 且蛋白表达在引入质粒开始的 3 h 以后就已经达到峰值, 此后信号降低很有可能与蛋白降解或聚集有关(图 3C)。基于以上实验信息, *S. lividans* TK24 无细胞反应的最优反应体系和条件得以确定, 即以 40 μ L 的体积, 反应体系包含 50 mmol/L 羟乙基哌嗪乙硫磺酸钾, 35 mmol/L

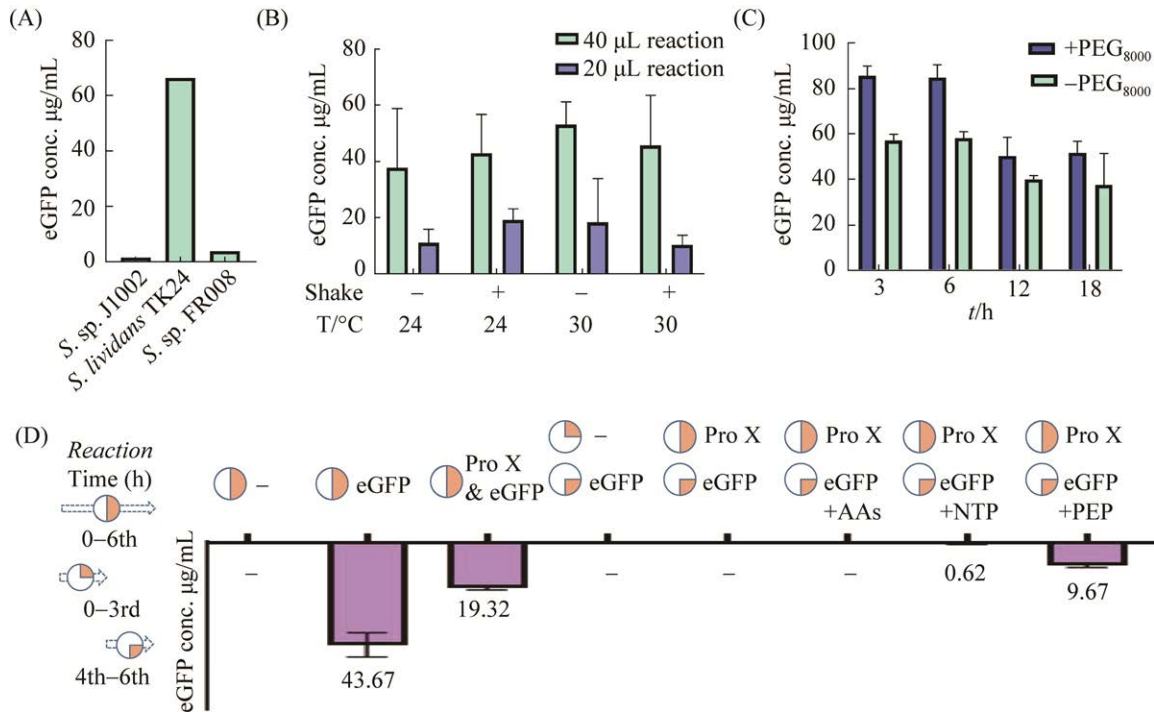


图 3 链霉菌无细胞体系的构建与优化

Figure 3 Construction and optimization of *Streptomyces* cell-free system. A: The titer of eGFP in different cell-free systems based on different *Streptomyces* strains. Lysate from *S. lividans* TK24 has the highest expression efficiency; B: The influence of reaction volume, temperature and shaking on protein expression; C: The influence of the addition of PEG₈₀₀₀ and reaction time on the reaction; D: Exploration of co-expression of multiple templates and time-limiting factor for the reaction.

乙酸铵, 70 mmol/L 乙酸钾, 1.25 mmol/L ATP, 0.85 mmol/L CTP, 0.85 mmol/L GTP, 0.85 mmol/L UTP, 25 mmol/L 烯醇式磷酸盐, 2 mmol/L 标准氨基酸溶液, 2% (W/V) PEG₈₀₀₀, 0.035 mg/mL 亚叶酸, 5 μg tRNA, 0.83 U 丙酮酸激酶, 3.5 μg 粗纯化 T7 RNA 聚合酶, 0.2 pmol 相应质粒; 在 30 °C 的培养箱中密闭静置 3 h 反应后, 荧光蛋白 eGFP 产量最高达 90 μg/mL。

进一步, 为了验证该体系表达蛋白的潜力, 我们设计在 6 h 的反应时间内, 检测不同时间添加 2 种质粒(分别携带无荧光效应的蛋白 Pro X 和 eGFP 的基因)蛋白表达的情况, 以探索多模板共同表达及在反应 3 h 后蛋白表达达到峰值的限制因素(图 3D)。结果表明, 存在额外可表达的基因模板会影响 eGFP 的表达产量, 而在对已进行 3 h 蛋白 X 表达的体系中加入 eGFP 模板后, 仅在添加一反应当量能量物质磷酸烯醇式丙酮酸盐时, 可继续合成 eGFP (添加 NTP 中少量 ATP 也可作为能量物质, 因而也有少量荧光蛋白表达), 这说明反应过程能量物质消耗较快, 可能是重要的限制因素。且对比仅在 3 h 后引入 eGFP 模板却无明显荧光蛋白表达的对照组, 我们推测体系内可能还包含其他显著的耗能反应。

2.3 尝试利用无细胞体系进行套索肽前体肽的表达

在无细胞体系中进行前体肽的稳定表达, 是构建一套实用高效的套索肽挖掘平台的重要环节, 为这类天然产物的高通量建库筛选提供了新思路。因而, 在构建并优化链霉菌无细胞平台以后, 我们首先尝试以完整的 *svi* 核心生物合成基因(包含前体肽 *sviA* 和核心后修饰酶的 *SviCB* 的基因)进行表达并对前体肽进行检测。在引入质粒开始 3 h 和 16 h 分别取样(16 h 取样目的是给予翻译后修饰反应充足的时间), 在将反应液经

C₁₈ 柱对多肽产物进行富集后, HPLC-MS 结果显示仅在 3 h 的反应液中检测到了前体肽 *SviA* 的部分片段(图 4)。尽管这表明体系中包含有目标前体肽, 但是核心肽段信号完全缺失, 因而无法判断是否出现了修饰情况; 更重要的是, 随着时间的延长, 相应片段信号难以检测。我们推测, 体系内可能存在对短肽的水解机制; 同时, 可能是由于整个翻译框内包含多个蛋白, 对前体肽部分的转录翻译造成了竞争, 因而对接下来未知的套索肽 *Las-6* 和 *Las-8*, 我们考虑首先对其前体肽进行单独的表达。

在将 *Las-6A* 和 *Las-8A* 的基因克隆到 pJL1 载体上后, 我们尝试通过 2 个方法改善短肽水解的问题。一方面, 我们在反应体系中加入蛋白酶抑制剂, 但在 3 h 反应后体系有较多蛋白析出, 表现出严重的不耐受现象, 在反应结束后也未能检测到任何目的片段合成; 另一方面, 我们在前体肽的 N 端融合了约 11 kDa 的蛋白标签 SUMO 以尽可能减少水解的发生, 构建了 pJL1-SUMO-*Las-6A* 和 pJL1-SUMO-*Las-8A* 两个质粒用于后续的反应, 这一策略较好地稳定了前体肽 SUMO-*Las-6A*, 在 16 h 以后依旧能够检测到片段信号, 且足以覆盖核心区域(图 5), 这证明通过融合标签蛋白后, 前体肽的表达后更加稳定, 这将有利于后续的后修饰反应。

但是, SUMO-*Las-8A* 的表达无法被检测到, 其原因有待探究, 一个可能的解释是由于其本身表达的困难导致。由于其富含的甲硫氨酸和色氨酸, 丰度在蛋白中通常偏低, 且仅对应单一密码子, 所以对翻译造成了一定的困难。另外需要指出的是, 多肽碎片对整个融合前体肽序列覆盖度不高的情况, 可能是由于无细胞反应体系内本底蛋白浓度高, 背景干扰较强, 导致相对低丰度的

pJL1-SviACB cell-free expression

Histag-SviA sequence:

GSSHHHHHHSSGLVPRGSHMTSTDELYE**APELIEIGDYAELTR**CVWGGDCTDFLGCCTAWICV

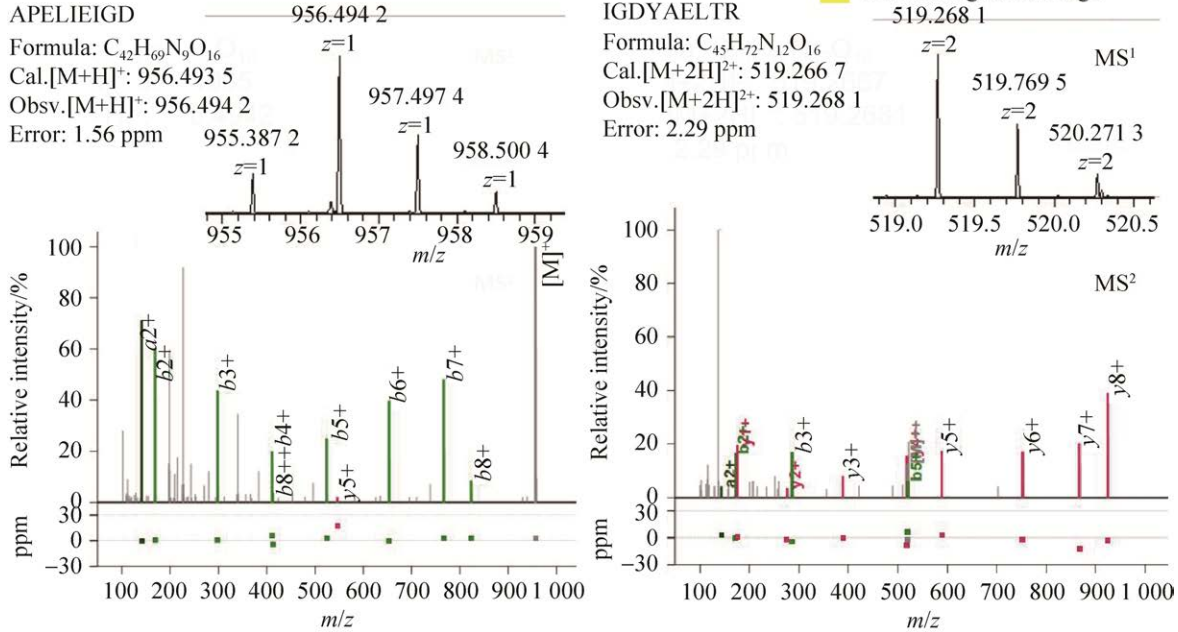


图 4 经链霉菌无细胞平台表达 pJL1-SviACB 质粒 3 h 后，检测到前体肽 SviA 片段信号谱图及二级质谱碎片归属^[18]

Figure 4 The mass spectrum of the precursor peptide SviA fragments detected by 3 h expression of pJL1-SviACB plasmid in the *Streptomyces* cell-free platform^[18]. The upper sequence is the N-terminal SviA protein sequence with His-tag. The yellow part is the signal coverage of the peptide, with red font shows the core area.

目标多肽碎片不易检出;但通过与空白组的谱图进行搜索比对,可以证实这些碎片是由无细胞反应转录翻译得到,从而证明融合前体肽的成功表达。综上,通过添加 SUMO 标签的方式,成功在构建的链霉菌无细胞平台中,合成了目的 *las-6* 基因簇中的前体肽,为接下来进行后修饰反应奠定了基础。

2.4 尝试利用无细胞体系构建高效的套索肽挖掘和改造平台

在实现了套索肽前体肽在链霉菌无细胞平台中的表达后,我们将重点放在通过不同方式实现前体肽的后修饰上。在现报道的相关成果

中^[7,9],研究人员多采取异源表达纯化的方式获得后修饰酶,再将其添加用于合成前体肽的无细胞体系中。这一做法对于了解后修饰酶功能及定量研究修饰效率有较大优势,但是对于挖掘崭新的天然产物而言较为繁琐;且对套索肽类产物的生物合成研究中提到利用传统大肠杆菌异源表达无法纯化出具有活性的后修饰酶的情况^[19-20]。因而,为了发挥链霉菌无细胞平台对套索肽表达的优势,我们首先尝试在同一链霉菌无细胞体系中进行前体肽 A 和核心后修饰酶 CB 的表达和反应,以实现一锅合成成熟套索肽。

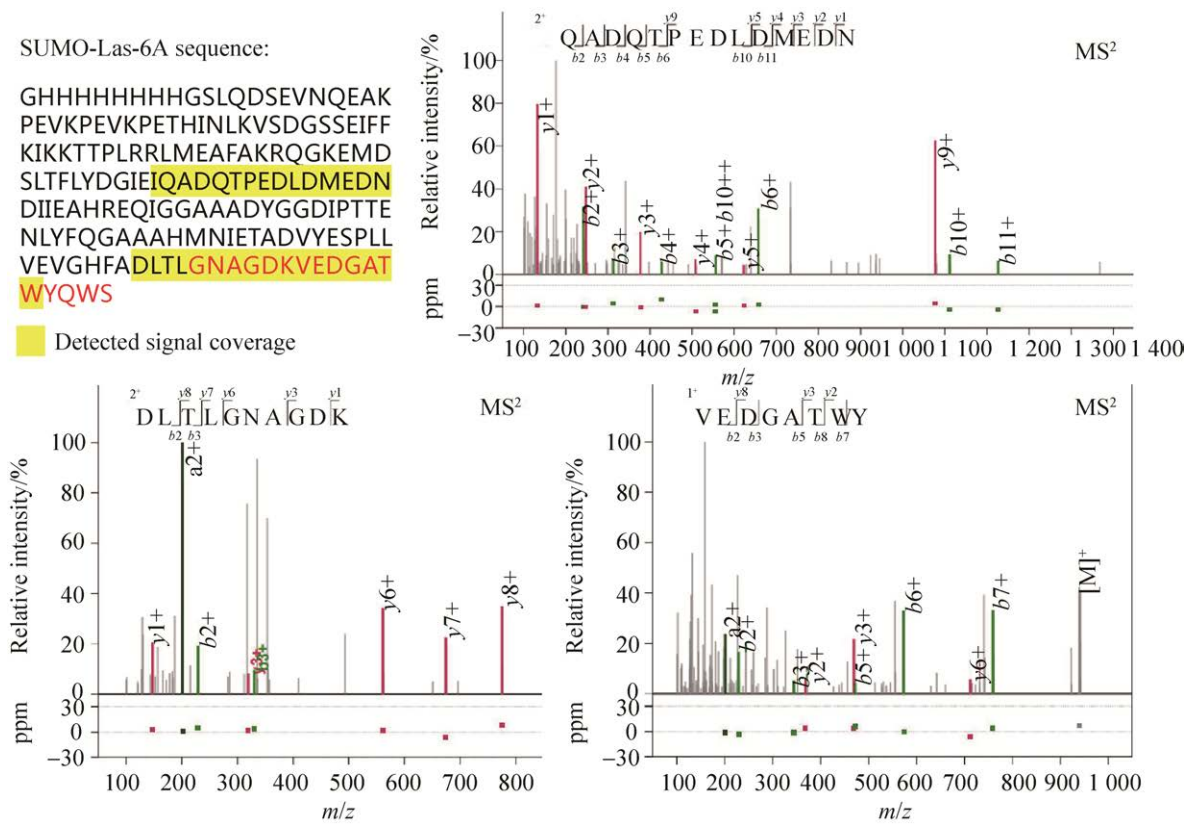


图 5 经链霉菌无细胞平台表达 pJL1-SUMO-Las-6A 质粒 16 h 后，检测到前体肽片段信号谱图及二级质谱碎片归属

Figure 5 The mass spectrum of the precursor peptide fragments detected by 16 h expression of pJL1-SUMO-Las-6A plasmid in the *Streptomyces* cell-free platform. The upper sequence is the Las-6A protein fused with N-terminal SUMO-tag, in which the yellow part is the detected signal coverage of the peptide, and the red font shows the core peptide.

鉴于此前成功表达了 SUMO-Las-6A，我们从 *Streptomyces* sp. J1002 的基因组中通过 PCR 扩增获得了 Las-6CB 的基因，并整合到 pJL1 载体上。将 pJL1-Las-6CB 质粒和 pJL1-Las-6A 质粒以摩尔比 1:1, 1:3 和 3:1 引入反应体系，反应 16 h 后检测未发现成熟的套索肽信号；考虑到从基因到蛋白的转录翻译和套索肽合成中后修饰酶对前体肽的修饰可能存在先后顺序，随后尝试将 pJL1-Las-6CB 先进行无细胞体系表达，再在同一反应液中加入 pJL1-Las-6A 的模板并补充能量物质，遗憾的是依旧没能检测到修饰发生。相似地，对已知 svi 合成基因簇

的一锅法反应也未能检测到成熟产物。这些结果使我们怀疑所选取的 las-6 和 svi 的后修饰酶在我们的无细胞体系中表达存在困难。在后修饰酶浓度较低的情况下，前体肽面临被后修饰酶和蛋白/肽水解酶相互竞争的情况，被混乱切割后的前体肽或将失去参与识别的引导肽段，因而难以达到可检测到的转化率。为了使体系内有充足的后修饰酶，我们尝试对其进行异源表达。

我们构建了携带位点整合元件的质粒 pSET152-Las-6CB 和 pSET152-Las-SviCB，通过接合转移将片段整合进 *S. lividans* TK24 菌株的

基因组中, 得到 TK24-Las-6CB、TK24-SviCB 菌株(图 6A)。待菌株经两级放大并发酵 5 d, 通过反转录 PCR 进行了转录分析, 结果显示相关基因均有高转录(图 6B), 但对裂解液进行针对 His-tag 的 Western blotting 实验未在相应位置检测到荧光响应(图 6C), 且尝试将可能含预表达后修饰酶的 *S. lividans* TK24 重组链霉菌制备裂解液做无细胞反应也未能得到成熟前体肽。到此, 我们推测两个后修饰酶均未能在 *S. lividans* TK24 中进行很

好地表达, 且原因极可能与蛋白翻译过程有关。

在此情况下, 出于对未知生物合成基因簇 *las-6* 和 *las-8* 的好奇, 我们最终尝试脱离无细胞平台直接进行常规的异源表达。在构建 pSET152-Las-6ACB 和 pSET152-Las-8ACB 并将目标片段分别整合进 *S. lividans* TK24 基因组后, 对重组链霉菌进行 17 d 的固体发酵。遗憾的是, 经甲醇萃取和 C₁₈ 富集后, 发酵产物中也并未检测到相关产物。以上结果说明, 尽管 *S. lividans*

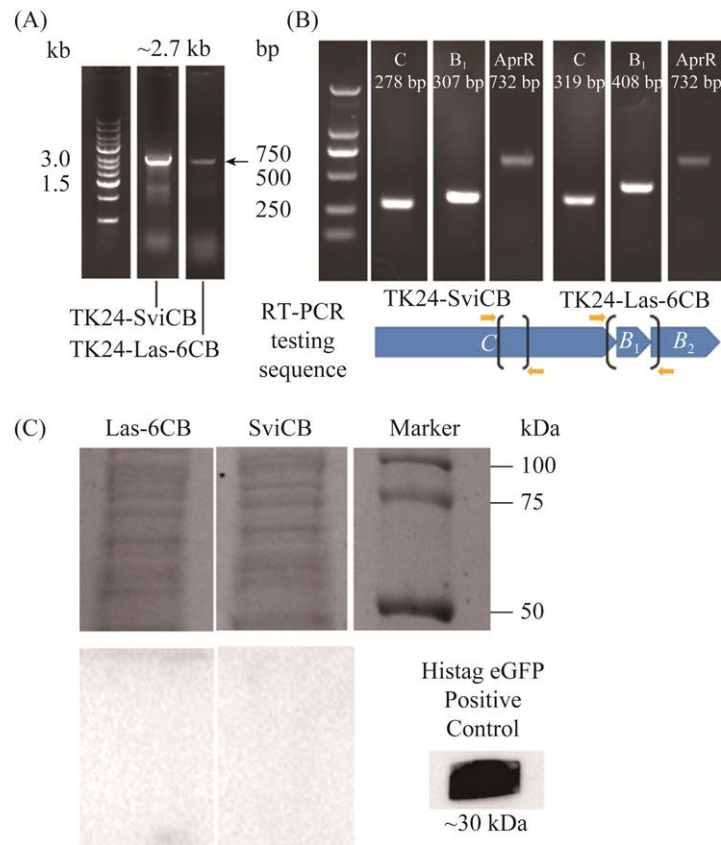


图 6 在 *S. lividans* TK24 尝试预表达 Las-6CB 酶及 SviCB 酶

Figure 6 Expression of Las-6CB and SviCB in *S. lividans* TK24. A: gel electrophoresis verified that the full-length Las-6CB and SviCB (both approximately 2.7 kb in length) have been integrated into the genome of heterologous host; B: RT-PCR analysis on Las-6CB and SviCB transcription on the 5th day of fermentation. In comparison to *Apr* resistance gene, Las-6CB and SviCB genes have higher transcription level. A diagram of the two selected testing sequence is shown below, as one located in the middle of enzyme C (denoted as C) and the other covering the entire enzyme B₁ (denoted as B₁). The corresponding lengths have been marked; C: post-translational modification enzymes undetected in TK24-Las-6CB and TK24-SviCB 5-day fermentation cell lysate. The upper, SDS-PAGE result of total protein loading; the lower, Western blotting result.

TK24 对荧光蛋白表达与其他链霉菌相比有较大优势,但在表达完整套索肽合成簇上仍存在未知的障碍。

3 讨论

套索肽在放线菌中的高丰度以及其后修饰酶在大肠杆菌系统中时常表现出的不稳定性,使得基于链霉菌的无细胞合成平台有机会成为挖掘未知套索肽基因簇的高效手段。本研究从头构建了基于 *S. lividans* TK24 的无细胞平台,通过对菌株、裂解方式、反应温度、体积、时间、反应液成分等多个因素的优化,将蛋白产量逐步提升至约 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此后,利用这一平台,我们成功表达了已知的 *svi* 合成基因簇的前体肽 SviA,并通过融合 SUMO 蛋白标签成功稳定表达了 *las-6* 的前体肽。尽管该系统对后修饰酶的表达仍存在困难,推测该困难与翻译过程有关,但这并不妨碍将链霉菌无细胞体系用于未知的套索肽基因簇上进行前体肽的表达,后续可通过补充纯化蛋白的方式,以满足更广泛的挖掘需求,进一步丰富这一类型无细胞合成平台的功能。

在 Mitchell 组的报道中^[7],他们将已知的几个套索肽的整个核心基因簇在大肠杆菌无细胞平台中进行了成功的尝试。适用这一策略的 3 个簇分别是 burhizin (*Burkholderia rhizoxinica*), capistrain (*Burkholderia thailandensis*) 和 cellulassin (*Thermobifida cellulositytica*),三者均在大肠杆菌中成功进行过异源表达。而在我们的研究中,即使来源于 *S. sviveus* 的 sviveucin 曾在模式链霉菌 *S. coelicolor* M1146 中成功异源表达,且 *las-6* 和 *las-8* 均来源于一个极可能成功表达另一套索肽基因簇 *las-24* 的链霉菌 *Streptomyces* sp. J1002 中,但我们仍未能能在 *S. lividans* TK24 中成功异源表达这些核心基因簇,同时无细胞体

系中也仅能检测到未修饰的前体肽。这提醒我们,简单地将生物合成基因簇搬进无细胞体系中也并不是一个广泛适用的策略;更值得关注的是,相比大肠杆菌的通用性,链霉菌种类丰富,在跨亚种表达的时候可能仍存在某种未知障碍,导致在表达荧光蛋白优化中表现突出的 *S. lividans* TK24 未能完整表达出来源于其他链霉菌的天然产物。

总的来说,在前期对链霉菌无细胞反应体系进行优化的过程中,我们发现对于反应效率最重要的影响因素是菌株本身的表达差异。但随后我们遇到后修饰酶的表达困难,一定程度上也提醒我们,在模仿大肠杆菌平台,利用荧光蛋白产率作为标准来优化链霉菌无细胞平台的时候,需要考虑链霉菌更大的多样性,即菌株对不同的蛋白可能有截然不同的表达倾向。特别是作为本研究中进行对比的 3 种链霉菌,其对于荧光蛋白的表达有着显著的差异;然而 3 个菌株生长速率都较快,在制备裂解液时均收集的是处于对数期的菌体,其翻译元件理论上均是处于较高活性水平。考虑到无细胞反应中基因的转录过程是使用引入的 T7 RNA 聚合酶来参与完成,因而可能是从 mRNA 到蛋白质的翻译过程存在较大的菌株差异,包括密码子的偏好性问题等。综上,我们认为应该不断地拓展链霉菌无细胞平台中可供使用的菌株种类,以更好地提高这一系统的适用性。我们相信并期待,本研所得到的经验能够为以后类似的研究提供一定的帮助。

参考文献

- [1] Montalbán-López M, Scott TA, Ramesh S, Rahman IR, Van Heel AJ, Viel JH, Bandarian V, Dittmann E, Genilloud O, Goto Y, Grande Burgos MJ, Hill C, Kim S, Koehnke J, Latham JA, Link AJ, Martínez B, Nair SK, Van Der Donk WA. New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering. *Natural Product Reports*, 2021, 38(1): 130–239.

- [2] Cheung-Lee WL, Link AJ. Genome mining for lasso peptides: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2019, 46(9/10): 1371–1379.
- [3] Kodani S, Unno K. How to harness biosynthetic gene clusters of lasso peptides. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(9/10): 703–714.
- [4] Park D, Swayambhu G, Lyga T, Pfeifer BA. Complex natural product production methods and options. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2021, 6(1): 1–11.
- [5] Liu R, Yu DC, Deng ZX, Liu TG. Harnessing *in vitro* platforms for natural product research: *in vitro* driven rational engineering and mining (iDREAM). *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 69: 1–9.
- [6] Jiang N, Ma LJ, Lu Y. Cell-free synthetic biology in the new era of enzyme engineering. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2020, 28(11): 2810–2816.
- [7] Si YY, Kretsch AM, Daigh LM, Burk MJ, Mitchell DA. Cell-free biosynthesis to evaluate lasso peptide formation and enzyme-substrate tolerance. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(15): 5917–5927.
- [8] DiCaprio AJ, Firouzbakht A, Hudson GA, Mitchell DA. Enzymatic reconstitution and biosynthetic investigation of the lasso peptide fusilassin. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(1): 290–297.
- [9] Liu R, Zhang YC, Zhai GQ, Fu S, Xia Y, Hu B, Cai X, Zhang Y, Li Y, Deng ZX, Liu TG. A cell-free platform based on nisin biosynthesis for discovering novel lanthipeptides and guiding their overproduction *in vivo*. *Advanced Science: Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany*, 2020, 7(17): 2001616.
- [10] Tietz JI, Schwalen CJ, Patel PS, Maxson T, Blair PM, Tai HC, Zakai UI, Mitchell DA. A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(5): 470–478.
- [11] Li J, Wang H, Kwon YC, Jewett MC. Establishing a high yielding *Streptomyces*-based cell-free protein synthesis system. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(6): 1343–1353.
- [12] Li J, Wang H, Jewett MC. Expanding the palette of *Streptomyces*-based cell-free protein synthesis systems with enhanced yields. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 130: 29–33.
- [13] Xu HL, Liu WQ, Li J. Translation related factors improve the productivity of a *Streptomyces*-based cell-free protein synthesis system. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(5): 1221–1224.
- [14] Moore SJ, Lai HE, Needham H, Polizzi KM, Freemont PS. *Streptomyces venezuelae* TX-TL—a next generation cell-free synthetic biology tool. *Biotechnology Journal*, 2017, 12(4): 2017 Apr; 12(4).
- [15] Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH. antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W237–W243.
- [16] Imai Y, Meyer KJ, Iinishi A, Favre-Godal Q, Green R, Manuse S, Caboni M, Mori M, Niles S, Ghiglieri M, Honrao C, Ma X, Guo JJ, Makriyannis A, Linares-Otaya L, Böhringer N, Wuisan ZG, Kaur H, Wu R, Mateus A, Typas A, Savitski MM, Espinoza JL, O'Rourke A, Nelson KE, Hiller S, Nojima N, Schäberle TF, D'Onofrio A, Lewis K. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature*, 2019, 576(7787): 459–464.
- [17] Li YY, Ducasse R, Zirah S, Blond A, Goulard C, Lescop E, Giraud C, Hartke A, Guittet E, Pernodet JL, Rebuffat S. Characterization of svicuecin from *Streptomyces* provides insight into enzyme exchangeability and disulfide bond formation in lasso peptides. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(11): 2641–2649.
- [18] Chi H, Liu C, Yang H, Zeng WF, Wu L, Zhou WJ, Wang RM, Niu XN, Ding YH, Zhang Y, Wang ZW, Chen ZL, Sun RX, Liu T, Tan GM, Dong MQ, Xu P, Zhang PH, He SM. Comprehensive identification of peptides in tandem mass spectra using an efficient open search engine. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(11): 1059–1061.
- [19] Zong CH, Cheung-Lee WL, Elashal HE, Raj M, Link AJ. Albusnodin: an acetylated lasso peptide from *Streptomyces albus*. *Chemical Communications: Cambridge, England*, 2018, 54(11): 1339–1342.
- [20] Mevaere J, Goulard C, Schneider O, Sekurova ON, Ma H, Zirah S, Afonso C, Rebuffat S, Zotchev SB, Li Y. An orthogonal system for heterologous expression of actinobacterial lasso peptides in *Streptomyces* hosts. *Scientific Reports*, 2018, 8: 8232.

(本文责编 李磊)