



# 卡伍尔氏链霉菌 NA4 的II型聚酮基因簇的靶向激活及其产物鉴定

刘晶莹<sup>1</sup>, 白岩<sup>2</sup>, 潘华奇<sup>2</sup>, 胡江春<sup>1,2\*</sup>

1 沈阳药科大学制药工程学院, 辽宁 沈阳 110016

2 中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016

刘晶莹, 白岩, 潘华奇, 胡江春. 卡伍尔氏链霉菌 NA4 的II型聚酮基因簇的靶向激活及其产物鉴定[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 3891-3904.

LIU Jingying, BAI Yan, PAN Huaqi, HU Jiangchun. Targeted activation and product identification of the type II polyketone gene cluster of *Streptomyces cavourensis* NA4[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 3891-3904.

**摘要:**【目的】以基因组信息为导向,定向激活海洋来源卡伍尔氏链霉菌(*Streptomyces cavourensis*) NA4 中沉默的II型聚酮类次级代谢产物生物合成基因簇,鉴定新产生的次级代谢产物的结构和抑菌活性。【方法】通过添加启动子和敲除负调控基因的方法激活实验室培养条件下沉默或低表达的生物合成基因簇,并完成目标化合物的分离与纯化,通过电喷雾质谱(electrospray ionization-mass spectrometry, ESI-MS)和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)数据分析鉴定目标化合物结构,对目标化合物进行抑菌活性鉴定,基于生物信息学信息推导化合物的生物合成途径。【结果】根据基因组生物信息学分析,从海洋来源链霉菌 *Streptomyces cavourensis* NA4 中选取一个编码 PKSII型次级代谢产物的生物合成基因簇开展研究,成功激活目标基因簇,从中分离到 1 个 PKSII 型化合物,推导了其生物合成途径并进行了抑菌活性鉴定。【结论】基因组导向下的天然产物挖掘,可以目标明确地分离产物,充分挖掘链霉菌编码次级代谢产物的潜力。

**关键词:** 链霉菌; 基因组挖掘; 次级代谢产物; 生物合成

资助项目: 国家自然科学基金(41776178); 辽宁省应用基础研究计划(2022JH2/101300185); 中国科学院青年创新促进会优秀会员项目(Y2022063)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41776178), the Liaoning Province Applied Basic Research Program Project (2022JH2/101300185), and the Outstanding Member Program of Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (Y2022063).

\*Corresponding author. E-mail: hujc@iae.ac.cn

Received: 2023-03-01; Accepted: 2023-05-08; Published online: 2023-05-10

# Targeted activation and product identification of the type II polyketone gene cluster of *Streptomyces cavourensis* NA4

LIU Jingying<sup>1</sup>, BAI Yan<sup>2</sup>, PAN Huaqi<sup>2</sup>, HU Jiangchun<sup>1,2\*</sup>

1 School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning, China

2 Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, Liaoning, China

**Abstract:** [Objective] To activate the silenced gene cluster for the biosynthesis of type II polyketides in *Streptomyces cavourensis* NA4 isolated from a marine environment, and identify the structure and antibacterial activity of the newly produced secondary metabolite. [Methods] The silenced or low-expressed biosynthetic gene cluster under laboratory culture conditions was activated by the addition of promoters and the knockout of negative regulator genes. The target compound was separated. The structure of the target compound was identified by electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). Furthermore, the antibacterial activity of the target compound was determined, and the biosynthetic pathway of the compound was deduced based on bioinformatics information. [Results] A biosynthetic gene cluster encoding type II polyketides was mined from the genome of *S. cavourensis* NA4 and successfully activated. A type II polyketide was separated from the expression products. The biosynthetic pathway of this compound was deduced and the antibacterial activity was determined. [Conclusion] Genome-oriented natural product mining can facilitate the separation of target products and fully tap the potential of *Streptomyces* in the production of secondary metabolites.

**Keywords:** *Streptomyces*; genome mining; secondary metabolites; biosynthesis

大部分的天然活性产物都来自于细菌,尤其是放线菌类<sup>[1]</sup>。海洋链霉菌因其高盐、高压、低温与低营养的生活环境,赋予了其特殊的代谢方式,增强了产生新型抗生素的潜力,成为发现新型次级代谢产物的重要来源<sup>[2]</sup>。随着基因组测序的发展,发现链霉菌拥有 20 多种生物合成基因簇(biosynthetic gene clusters, BGCs),然而只有很少的 BGCs 能够表达并检测到其次级代谢产物<sup>[3]</sup>。激活这些在常规条件下沉默或低表达的次级代谢产物 BGCs,发掘这些“隐性”次级代谢产物,是发现新型药用先导化合物的研究前沿和热点,如 Li 等<sup>[4]</sup>通过核糖体工程激活恰塔努加链霉菌(*Streptomyces chattanoogensis*) L10 中的隐

性基因簇,从中首次分离得到了葱塔恰霉素。Qian 等<sup>[5]</sup>通过异源表达链霉菌(*Streptomyces* sp.) Tü6314,分离鉴定了 6 种多酮类化合物,其中 4 种表现出良好的抗 HIV 活性。Huang 等<sup>[6]</sup>以深海链霉菌(*Streptomyces somaliensis*) SCSIO ZH66 的 *wbl* 调控基因为靶点,使链霉菌中的 *wblAso* 失活,构建  $\Delta wblAso$  突变体激活链霉菌中沉默的次级代谢产物合成基因簇,发现突变体的次级代谢产物产生显著变化,从中分离到  $\alpha$ -吡喃酮化合物 violapyrone B。Martínez 等<sup>[7]</sup>在 *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 中过表达了 LuxR 家族的 PAS 调节因子,从而激活了多烯大环内酯抗真菌药物和其他抗生素的生物合成。

此外, 克拉维酸、头孢菌素 C 和衣霉素复合物的产量分别增加了 10 倍、7 倍和 5 倍。

聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)是由许多多功能模块组成, 包括延伸模块, 加载模块等, 每个模块上有不同的结构域, 这些结构域负责控制聚酮类化合物的生物合成<sup>[8]</sup>。许多 II 型 PKS 基因簇的序列信息揭示了聚酮生物合成的一个标志: 在所有情况下, 都涉及到一组最小的迭代使用的酶, 每个酶都来自一个不同的基因。一般来说, 这种所谓的“最小 PKS”由 2 个酮合酶单位(KS<sub>α</sub> 和 KS<sub>β</sub>)和 1 个酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)组成, ACP 用来连接不断增长的聚酮链。除了少数例外, 编码这 3 种蛋白质的基因被分组在一起, 并表现出典型的 KS<sub>α</sub>/KS<sub>β</sub>/ACP 结构。其他 PKS 亚基, 包括酮还原酶、环化酶和芳香化酶, 定义了新生聚酮中间体的折叠模式。最后由加氧酶、糖基酶和甲基转移酶修饰。这些酶主要存在于细菌中, 并合成多种 II 型聚酮类化合物<sup>[9]</sup>。

转录起始水平的调控在链霉菌的代谢适应中是最常见的, 其中最主要的参与者是能够结合 DNA 的蛋白质, 称为转录因子(transcription factors, tf), 能够抑制或激活某些基因的转录, 因而发挥着巨大的作用<sup>[10]</sup>。链霉菌中 MarR 家族蛋白主要功能包括控制抗生素的生物合成, 如来源于 *Streptomyces exfoliatus* UC5319 生物合成基因簇的 *penR* 基因被预测为编码 MarR 家族蛋白的转录调控因子, 负责调控倍半萜类抗生素 pentalenolactone 的生物合成。与野生型菌株相比, 敲除 *penR* 的突变株 *S. exfoliatus* Δ*penR* ZD27 的 pentalenolactones 生物合成基因和抗性基因的转录水平明显降低<sup>[11]</sup>。TetR 家族转录调控因子是一类重要的调节因子。大多数 TetR 家族调节剂作为抗生素生物合成的转录抑制剂<sup>[12]</sup>。一些 TetR 家族调控因子通过直接抑制基因簇激活

基因的转录来抑制抗生素的生物合成<sup>[13]</sup>。Lee 等<sup>[14]</sup>发现一个 TetR 家族转录调控基因(*SCO1712*)是一个全局性的抗生素调控基因。*Streptomyces coelicolor* 中 *SCO1712* 的敲除通过抑制下调因子 *wblA* 的表达而增加了抗生素的合成, 而且 *wblA* 的缺失突变进一步刺激了抗生素的产生, 这意味着 *SCO1712* 可能编码了一种新的抗生素下调调控因子。

链霉菌能够产生多种次级代谢产物包括聚酮类、内酰胺类、非核糖体肽类和萜烯类化合物<sup>[15]</sup>。本课题组前期对卡伍尔氏链霉菌(*Streptomyces cavourensis*) NA4 进行了全基因组测定, 发现其具有丰富的次级代谢产物 BGCs, 通过生物信息学分析定位了一个 II 型 PKS 类 BGCs cluster 18, 成功将其激活, 分离鉴定了一个 II 型聚酮类化合物, 对其生物合成过程进行了推导并进行了抑菌活性的检测。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌株和质粒

*Streptomyces cavourensis* NA4 和遗传操作过程中所使用的大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)和相关质粒均保存于中国科学院沈阳生态研究所农业微生物组<sup>[16]</sup>, 文中所使用的其他菌株和质粒及相关特性见表 1。

#### 1.1.2 引物

根据 cluster 18 合成基因簇的 *orf3605-3607* 负调控序列设计敲除引物, 引物长 58/59 bp, 其中引物 5 端 39 bp 与目的序列同源, 3 端 20 bp 或 19 bp 序列与 *ermEp\*-aadA* (*spe<sup>R</sup>*) 基因片段序列同源; 设计靶向 *orf3605-3607* 侧翼序列的基因敲除检测引物, 野生株 NA4 与突变株 PCR 产物长度分别为 1 600 bp 和 2 080 bp; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列见表 2。

表 1 试验菌株和质粒及相应特性

Table 1 Test strains, plasmids and corresponding characteristics

Strains/Plasmid	Characteristic
<i>Escherichia coli</i> BW25113	K12 derivative: $\Delta araBAD$ , $\Delta rhaBAD$
<i>E. coli</i> ET12567	( <i>dam-dcm-hsdM</i> -), Cm <sup>R</sup>
pIJ790	$\lambda$ -RED ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ), <i>Cat</i> , <i>araC</i> , <i>rep101</i> <sup>ts</sup>
pUZ8002	<i>tra</i> , <i>neo</i> , <i>RP4</i>
pC18-9F3	The PCR-targeted disruption cosmid ( <i>bla</i> , <i>neo</i> , <i>cos</i> , <i>Amp</i> <sup>R</sup> , <i>Kan</i> <sup>R</sup> )

表 2 NA4-C18-9F3-01 所用的基因敲除引物和检测引物

Table 2 The gene knockout primers and detection primers used by NA4-C18-9F3-01

Primer name	Nucleotide Sequence (5'→3')	Forward/Reverse
NA4_C18_orf3605-3607::Spe_ErmP_del	1 248 CCGCGGTACGGGCCGGTCCGGCCCGGGCCCGC F CGCCGTATTCCGGGGATCCGTCGACC TTCGGACCCTGCGGGCTTTTCTCCGTCTGGGG R TGCCACCATGGTTCGCCCGCTCTCCT	
NA4_C18_orf3605-3607::Spe_ErmP_tes	1 619 GGCAACAACGAGATCCAG F AGAGAGGGATGTCCACAC R	

### 1.1.3 培养基和抗生素

固体 LB 培养基(g/L): 酵母抽提物 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10, 蒸馏水 1 L, pH 7.0, 琼脂 20。SFM 固体培养基(g/L): 黄豆饼粉 20, 蒸 20 min, 甘露醇 20, 自来水 1 L, 琼脂条 20。TSB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 15, 大豆蛋白胨 5, 葡萄糖 2.5, NaCl 5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5, 自来水 1 L, pH 7.0。R5 培养基(g/L): 蔗糖 103, 葡萄糖 10, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10.12, 酵母提取物 5, 酪氨酸 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25, 七水合硫酸锌 0.000 1, 七水合硫酸亚铁 0.000 1, 四水合硫酸锰 0.000 1, 蒸馏水 1 L, pH 7.2–7.4。

氨苄青霉素(ampicillin, Amp): 100 mg/mL (无菌水溶)。氯霉素(chloramphenicol, Chl): 100 mg/mL (无水乙醇溶)。卡那霉素(kanamycin, Kan): 100 mg/mL (无菌水溶)。壮观霉素(spectinomycin, Spe): 100 mg/mL (无菌水溶)。甲氧苄氨嘧啶(trimethoprim, Tmp): 50 mg/mL (DMSO 溶)。

### 1.1.4 主要试剂与仪器设备

恒温摇床(DHZ-C, 太仓市实验仪器有限公司); 电泳仪(DYY-6C, 北京六一仪器厂); 制冰机(XUEKE, IMS-100); PCR 仪(Mastercycler gradient, Eppendorf); 电子分析天平(ALE-200, 上海湘仪天平仪器厂); 立式压力蒸汽灭菌锅(YXQ-LS-50S11, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 艾可浦超纯水机(ABY-1001-U, 重庆颐洋企业发展有限公司); 超级洁净工作台(BCN-1360B, 北京东联哈尔仪器制造有限公司); 高速冷冻离心机(3K15, Sigma 公司); 冷冻干燥机(FD-1D-50, 北京博医康实验仪器有限公司); 数控超声波清洗器(KQ3200DB, 昆山市超声仪器有限公司); 循环水式多用真空泵(SHB-III, 郑州长城科工贸有限公司); 低温冷却循环泵(DLSB, 郑州长城科工贸有限公司); 旋转蒸发仪(RE52-99, 上海亚荣生化仪器厂); 高效液相色谱仪(Ultimate-3000); 色谱甲醇(Thermo Fisher); 氘代试剂(剑桥 CIL); 核磁共振仪

(AvanceII600 MHz, Bruker)。

## 1.2 次级代谢产物生物合成基因簇的分析

基因组序列上传至 antiSMASH 网站(<https://smash.secondarymetabolites.org>)进行次级代谢产物 BGCs 的分析。并结合 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)软件对目标基因簇所涵盖的序列进行开放阅读框的预测以及对基因功能进行注释。

## 1.3 重组质粒的构建

利用 PCR-targeting 技术构建重组质粒, 具体操作方法见参考文献[17]。本课题组前期筛选出包含 PKSII 型基因簇 cluster 18 的 pC18-9F3 粘粒<sup>[18]</sup>。以 *ermEp\*-aadA* (*spe<sup>R</sup>*) 为模板, NA4\_C18\_orf3605-3607::Spe\_ErmP\_del F/R 为引物, PCR 扩增回收得到含 Spe 抗性基因序列片段; 将包含 PKSII cluster 18 基因簇的粘粒 pC18-9F3 转化到感受态 *E. coli* BW25113/pIJ790 中; 然后用同样的方法将 *ermEp\*-aadA* (*spe<sup>R</sup>*) 片段转化到 *E. coli* BW25113/pIJ790/pC18-9F3 感受态细胞中; 在含终浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amp 和 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Spe 平板上筛选转化子, 提取质粒, 重组为含 Spe 抗性片段的载体, 命名为 pNA4-C18-9F3-01, 其中 *orf3605-3607* 负调控基因被 Spe 抗性基因替换; 将 pNA4-C18-9F3-01 转化到 *E. coli* ET12567/pUZ8002 感受态细胞中, 从而得到供体菌 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pNA4-C18-9F3-01。

## 1.4 重组菌株的构建

利用接合转移技术构建重组菌株, 具体操作方法见参考文献[19], 并做少量改良。将重组载体 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pNA4-C18-9F3-01 接种于 5 mL LB 液体培养基中, 200 r/min、37 °C 培养过夜, 按 2% 接种量接种于含 50 mL LB 液体培养基的三角瓶中进行放大培养, 200 r/min、37 °C 培养 3–4 h 后离心收集菌体, 用 LB 液体

培养基清洗掉多余抗生素, 将其重悬于 1 mL LB 液体培养基中, 作为后续进行接合转移操作的供体菌; 制备菌株 NA4 孢子悬液, 将 NA4 孢子弄散后, 用 TSB 培养基清洗菌体 2–3 次, 重悬于 1 mL TSB 液体培养基后, 50 °C 热激 10 min, 冷却至室温后, 28 °C 180 r/min 振荡培养 3 h, 作为结合转移的受体菌; 取供体菌和受体菌各 500  $\mu\text{L}$  混合均匀后涂布于 SFM (添加 20 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ ) 固体培养基上。在培养箱中 28 °C 培养 16 h 后, 用 1 mL 含 2.5 mg Spe 和 1 mg 的甲氧苄胺嘧啶 (trimethoprim, TMP) 的无菌水充分覆盖, 吹干, 28 °C 培养 4 d。

## 1.5 重组菌株的 PCR 验证

蘸取少量大肠杆菌单克隆菌体置于 PCR 管中备用, 用棉签刮取野生株 NA4 及 NA4-C18-9F3-01 突变株少量孢子, 用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], 参照试剂盒说明书提取基因组 DNA 备用。以上样品利用 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳进行验证。PCR 体系: 上下游引物 (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ ; 模板 1  $\mu\text{L}$ ; *rTaq* 酶 0.15  $\mu\text{L}$ ; dNTPs (2.5 mmol/L) 1.5  $\mu\text{L}$ ; DMSO 1  $\mu\text{L}$ ; 10 $\times$ buffer 1.5  $\mu\text{L}$ ; ddH<sub>2</sub>O 补齐至 15  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 第 1 阶段 (1 个循环), 95 °C 5 min; 第 2 阶段 (35 个循环), 94 °C 30 s, 60 °C 40 s, 72 °C 2 min; 第 3 阶段 (1 个循环), 72 °C 10 min。

## 1.6 重组菌株次级代谢产物的发酵检测

利用 SFM 培养基平板活化菌株 NA4-C18-9F3-01 和野生株 NA4, 28 °C 恒温培养 72 h, 用镊子取 1 mL 灭菌枪头, 用枪头尾部在平板菌株生长浓密的地方挖块接种于装有 50 mL 灭菌的最适培养基的锥形瓶 (锥形瓶体积 250 mL) 中, 设置 3 个平行试验, 28 °C、180 r/min 振荡培养 3 d。发酵液 8 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液倒回原瓶中, 每瓶加入 2 g HP20 大孔吸

附树脂, 28 °C、180 r/min 恒温振荡 2 h, 收集树脂, 并用蒸馏水清洗 3 遍, 吸干水分后转移到小瓶中, 甲醇过夜浸泡提取。通过高效液相色谱-二级线性阵列检测器法(high performance liquid chromatography with diode array detector, HPLC-DAD)分析发酵液粗提物。同时设置培养基以及处理方法完全相同的野生株 NA4 粗提物作为对照组, 使用相同的色谱条件进行分析。HPLC-DAD 检测条件: 色谱柱: YMC-Pack ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 0.5% 三氟乙酸水溶液(A)-甲醇(B); 梯度洗脱, 程序如下: 0–30 min、10%–100% B; 30–35 min、100% B; 35–40 min、100%–10% B; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 35 °C。

### 1.7 重组菌株次级代谢产物的放大发酵

SFM 培养基(添加终浓度 50 μg/mL Spe 和 50 μg/mL Tmp)平板活化菌株 NA4-C18-9F3-01, 28 °C 恒温培养 72 h, 同样采用挖块接种法将菌株接种于装有 50 mL R5 培养基的锥形瓶(锥形瓶体积 250 mL)中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 3 d, 作为放大发酵的种子液, 将种子液转接到含有 1 L R5 培养基的锥形瓶(锥形瓶体积为 3 L)中进行放大培养, 28 °C、180 r/min 恒温振荡培养 7 d, 发酵总体积为 71 L。发酵液离心(4 000 r/min, 20 min)后将上清液倒回原瓶中, 每瓶加入 40 g HP20 大孔吸附树脂, 室温、180 r/min 振荡 2 h 后抽滤掉发酵液, 再用蒸馏水清洗 3 遍。待水抽干后将树脂倒入烧杯中, 甲醇过夜提取, 旋转蒸发仪减压浓缩后得到粗提物 15.6 g。

### 1.8 重组菌株发酵产物分离与结构鉴定

采用 HPLC-DAD 导向的分离, 首先使用采用快速硅胶柱色谱法分离, 将粗提物用 15 g 硅胶(500–600 目)拌样, 150 g 硅胶装柱, 按照二氯甲烷: 甲醇分别为 100:0、100:2、100:5、100:10、100:20、100:30、100:40、100:50 和 0:100 (体积

比)梯度洗脱, 根据 HPLC 分析结果合并得到馏分 Fr.1–Fr.5。通过 HPLC-DAD 定位目标化合物所在馏分 Fr.2, 将馏分 Fr.2 经 Sephadex LH-20 分离, 用甲醇等度洗脱, 得到馏分 Fr.2.1–Fr.2.5, 馏分 Fr.2.2 经半制备高效液相制备, 用甲醇/水(45:55, 流速 2.0 mL/min)等度洗脱, 得到化合物(9.5 mg), 将分离得到的化合物通过 NMR 进行结构鉴定。

### 1.9 化合物抑菌活性测试

指示菌包括 2 株革兰氏阴性菌: 大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*) ATCC8739、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*) ATCC19874; 1 株革兰氏阳性菌: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC10231; 1 株真菌: 白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC10231。采用微量肉汤稀释法<sup>[20]</sup>测定目标化合物的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), 具体步骤如下: 分别取 1.024 mg 供试品溶解于 100 μL DMSO 中, 充分混合均匀后, 吸取混合好的 50 μL 样品溶液到另一只装有 50 μL DMSO 的离心管中, 重复此操作, 从而得到系列浓度减半的样品溶液(10.24、5.12、2.56、1.28、0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02 和 0.01 mg/mL)。系列浓度供试品溶液的终浓度分别为 512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 和 0.5 μg/mL。将活化好的细菌指示菌, 用 TSB 培养基配成浓度变为 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> CFU/mL 的菌悬液, 同样的操作, 白色念珠菌用沙氏培养基进行稀释。在 96 孔板上每孔加入 5 μL 不同浓度的供试品溶液和 95 μL 菌液, 每个浓度梯度做 3 个平行, 阴性对照分别为含菌培养基和不含菌培养基, 阳性对照为氯霉素(抗细菌活性)和制霉菌素(抗白色念珠菌活性)。混匀后置于 37 °C 静置培养 12 h 或 24 h, 将肉眼可观察到的无细菌生长的最低供试品浓度作为 MIC, 每个试验重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 链霉菌 *Streptomyces cavourensis* NA4 中 PKS-II cluster 18 基因簇分析

使用在线分析软件 antiSMASH 6.0 预测菌株 *Streptomyces cavourensis* NA4 C18 基因簇可

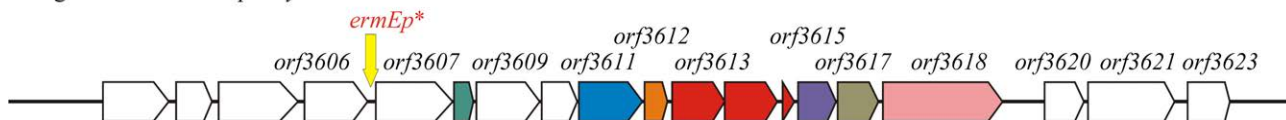
能合成 PKS-II 类化合物, 功能预测(表 3)显示 cluster 18 包含重要的聚酮类生物合成基因 *orf3613–3615*, 命名为最小 PKS (同 *Streptomyces fradiae* Tü2717 的 Urdamycin 基因簇上的 *urdA–C*), 如图 1 所示, 从 N 端到 C 端编码的结构域分别为酮基合成酶( $KS_{\alpha}$ )、链长因子( $KS_{\beta}$ )、酰基载体蛋白

表 3 C18 基因簇的功能注释

Table 3 Functional annotation of the C18 gene cluster

Orf	Amino acid	Closest protein similarity identity	Identity (%)	References
<i>orf3603</i>	445	Cation: proton antiporter ( <i>Streptomyces</i> sp. S9)	83.60	MBO7936740.1
<i>orf3604</i>	219	Hemerythrin domain-containing protein ( <i>Streptomyces</i> sp. MBT57)	94.93	MBK3583118.1
<i>orf3605</i>	490	DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit ( <i>Streptomyces</i> sp. WAC04770)	98.57	RST22046.1
<i>orf3606</i>	311	DNA-binding MarR family transcriptional regulator ( <i>Streptomyces cavourensis</i> )	99.68	TQO31775.1
<i>orf3607</i>	570	Tryptophan 7-halogenase ( <i>Streptomyces cavourensis</i> )	99.12	MBH0243964.1
<i>orf3608</i>	193	Flavin reductase ( <i>Streptomyces</i> sp. KAI-26)	98.77	NUV90467.1
<i>orf3609</i>	582	ATP-grasp domain-containing protein ( <i>Streptomyces halstedii</i> )	87.33	NEA16392.1
<i>orf3610</i>	329	Pd2U ( <i>Streptomyces</i> sp. WP 4669)	67.50	AAO65359.1
<i>orf3611</i>	488	FAD-dependent monooxygenase ( <i>Streptomyces</i> sp. MBT57)	95.68	MBK3583861.1
<i>orf3612</i>	109	JadI cyclase-like protein ( <i>Streptomyces</i> sp. WP 4669)	85.19	AAO65361.1
<i>orf3613</i>	423	Beta-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase family protein ( <i>Streptomyces</i> sp.)	90.74	MBW8792434.1
<i>orf3614</i>	407	Ketosynthase chain-length factor ( <i>Streptomyces microflavus</i> )	90.45	NEB65571.1
<i>orf3615</i>	102	Acyl carrier protein ( <i>Streptomyces</i> sp. SID4944)	98.04	MYR40324.1
<i>orf3616</i>	261	3-oxoacyl-ACP reductase FabG ( <i>Streptomyces</i> sp.)	87.36	MBW8792437.1
<i>orf3617</i>	315	Aromatase/cyclase ( <i>Streptomyces</i> sp.)	83.23	MBW8792438.1
<i>orf3618</i>	854	SDR family NAD(P)-dependent oxidoreductase ( <i>Streptomyces cavourensis</i> )	99.77	AXI73011.1
<i>orf3619</i>	503	MFS transporter ( <i>Streptomyces</i> sp. A1136)	66.38	THA51728.1
<i>orf3620</i>	304	4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily protein ( <i>Streptomyces cavourensis</i> )	99.01	MBH0245621.1
<i>orf3621</i>	538	Acyl-CoA carboxylase subunit beta ( <i>Streptomyces cavourensis</i> )	99.81	ATZ00070.1
<i>orf3622</i>	76	Acyl-CoA carboxylase subunit epsilon ( <i>Streptomyces</i> sp. SID4944)	96.15	MYR38874.1
<i>orf3623</i>	304	Alpha/Beta fold hydrolase ( <i>Streptomyces cavourensis</i> )	100.00	MBH0246978.1

C18 gene cluster of *Streptomyces cavourensis* NA4



Urdamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* Tü2717



图 1 C18 基因簇与 Urdamycin 生物合成基因簇的对比图

Figure 1 Comparison of C18 gene cluster and Urdamycin biosynthesis gene cluster. The arrow indicates the insertion position of the promoter.

(ACP), 负责着基本单位的合成及链的延长, 其在许多芳香族聚酮生物合成基因簇中是非常典型的。*orf3616* 编码的酶(同 Urdamycin 基因簇上的 *urdD*)与典型的酮还原酶(KRs)具有高度的序列同源性(82%–87%的同源性), 参与了新生聚酮链的折叠和环化。*orf3617* (同 Urdamycin 基因簇上的 *urdL*)与催化第一环闭合和芳构化的双功能环化酶/脱氢酶(芳香化酶)同源。除此之外, C18 基因簇还有与 Urdamycin 基因簇上相似的 FAD 依赖性单加氧酶基因 *orf3611* (同 Urdamycin 基因簇上的 *urdE*)、氧化还原酶 *orf3618* (同 Urdamycin 基因簇上的 *urdM*)、黄素还原酶 *orf3608* (同 Urdamycin 基因簇上的 *urdO*)。与之不同的是, C18 基因簇还存在卤化酶(*orf3607*)、乙烯基转移酶(*orf3620*)、酰基辅酶 A 羧化酶(*orf3621*)和

水解酶(*orf3623*)等基因, 提示由 C18 基因簇合成的化合物相较于 Urdamycin 会发生某些位点的修饰与剪切; C18 基因簇中还存在编码 MarR 家族转录抑制因子的调控基因 *orf3606*。采用敲除负调控基因 *orf3606*, 同时在 *orf3605*–*3607* 间添加红霉素启动子的方法, 激活沉默的 C18 基因簇, 充分挖掘其编码新型 PKS-II 类化合物的潜力。

## 2.2 突变株 NA4-C18-9F3-01 的构建与鉴定

NA4-C18-9F3-01 突变株的构建示意图如图 2, 当使用检测引物 NA4\_C18\_orf3605-3607::Spe\_ErmP\_tesF/R 进行 PCR 电泳验证时, 野生株 NA4 有一条 1 600 bp 的条带, 而目标重组载体和 NA4-C18-9F3-01 突变株条带为 2 080 bp。采用 PCR-targeting 技术将 Spe 抗性基因替换质粒

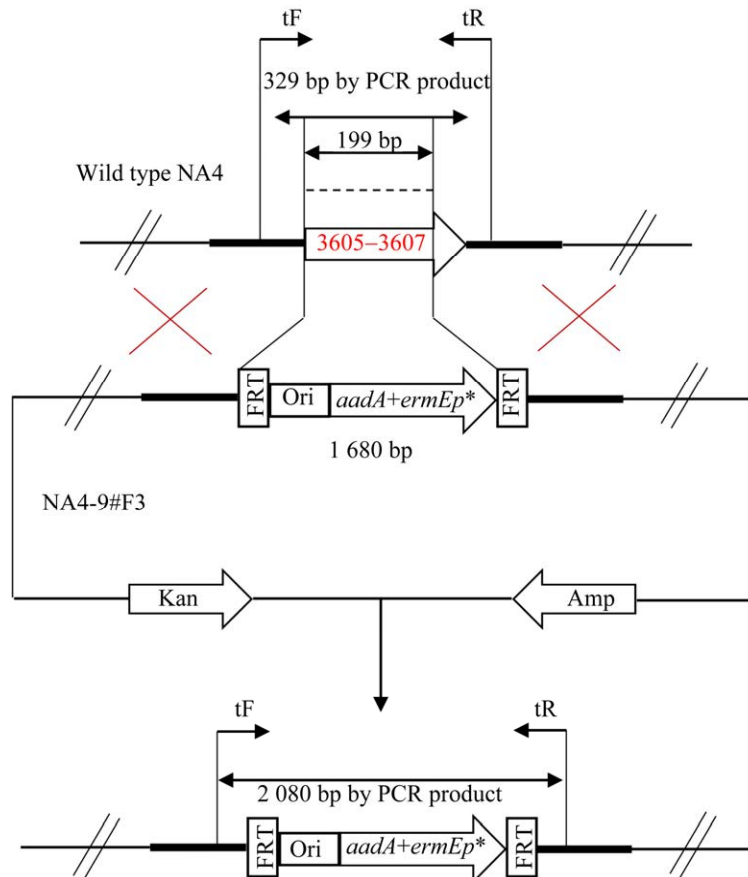


图 2 NA4-C18-9F3-01 突变株的构建示意图

Figure 2 Construction of NA4-C18-9F3-01 mutant.



pC18-9F3 中的 *orf3605-3607* 负调控基因; 菌落 PCR 鉴定结果显示获得目标阳性重组载体(图 3A)。然后提取 pNA4-C18-9F3-01 阳性重组子,

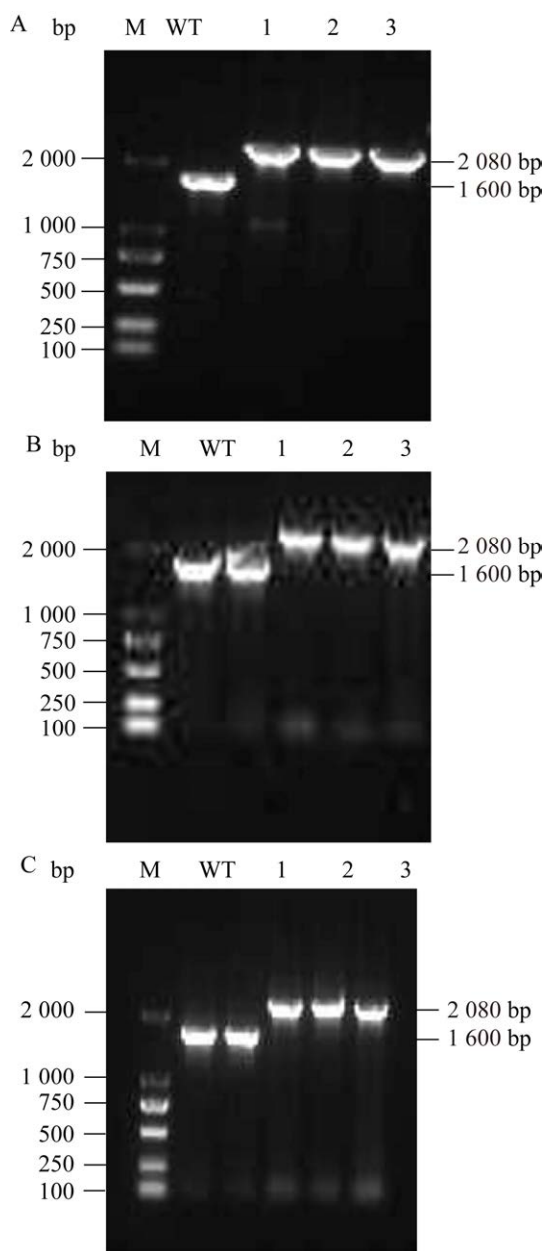


图3 重组载体及 NA4-C18-9F3-01 突变株电泳检测图  
Figure 3 Gel electrophoresis analyses of the recombinant cosmid and NA4-C18-9F3-01 mutant. A: Recombinant plasmids were obtained by PCR-targeting. B: Recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002. C: NA4-C18-9F3-01 mutant. 1, 2, 3: Recombinant plasmids/mutant; WT: Wild stain NA4; M: DNA marker (DL2000).

成功转化至 *E. coli* ET12567/pUZ8002 中, 得到 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pNA4-C18-9F3-01 供体菌(图 3B)。最后将该供体菌与受体菌卡伍尔氏链霉菌 NA4 接合转移成功的阳性接合子进行 PCR 鉴定, 以野生株 NA4 为对照, 结果显示 NA4-C18-9F3-01 突变株构建成功(图 3C)。

### 2.3 突变株 NA4-C18-9F3-01 的发酵检测

使用相同的色谱条件分析野生株 NA4 以及突变株。HPLC-DAD 结果(图 4)显示在 R5 培养基上, 突变株的次级代谢产物在 Rt 18.45 min、Rt 18.465 min 和 Rt 20.45 min 产生了野生株明显没有的色谱峰。结合紫外吸收以及本课题组其他突变株分离经验, 认为 Rt 18.45 min 的化合物的紫外吸收接近 II 型聚酮类化合物的紫外吸收特点(图 5), 且与本课题组其他突变株产生的化合物明显不同, 为特异性激活产物, 故对其进行导向式分离。

### 2.4 目标化合物的结构鉴定

目标化合物为无色针晶(甲醇)。结构如图 6 所示。 $[\alpha]_D^{20}$ -39.3 (c1, MeOH)。分析目标化合物的  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  和 HMBC 核磁数据(表 4)发现结构中存在 3 个芳香次甲基氢质子信号  $\delta_{\text{H}}$  7.66 (1H, s)、7.46 (1H, dd,  $J=7.6, 1.0$  Hz)和 7.26 (1H, dd,  $J=8.3, 1.0$  Hz), 推测存在三取代苯环; 1 个烯氢质子信号  $\delta_{\text{H}}$  5.84 (1H, m); 3 个连杂原子质子信号  $\delta_{\text{H}}$  5.62(1H, m)、 $\delta_{\text{H}}$  4.74 (1H, s)、 $\delta_{\text{H}}$  4.39 (1H, d,  $J=0.9$  Hz); 1 个甲基质子信号  $\delta_{\text{H}}$  1.92 (3H, s)。 $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)中共 19 个碳信号, 其中 8 个芳香或烯烃碳信号  $\delta_{\text{C}}$  161.0、158.9、135.4、135.1、124.7、122.8、120.3 和 117.8; 3 个羰基碳信号  $\delta_{\text{C}}$  200.7、197.2 和 196.6; 1 个甲基碳信号  $\delta_{\text{C}}$  24.1。化合物  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 以及 HMBC 主要链接如图 7 所示。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 谱结果显示 H-5/H-6/H-6a、H-9/H-10/H-11 相关。HMBC 显示 H-5 与 C-4 存在相关, H-6a 与 C-5 存在相关, H-12a 与 C-6a 存在相关, H-12b 与 C-12a 存在相关。测得 CD 值如图 8 所示。以上数据与文献[21]基本一致, 因此鉴定该化合物为 Urdamycin J。

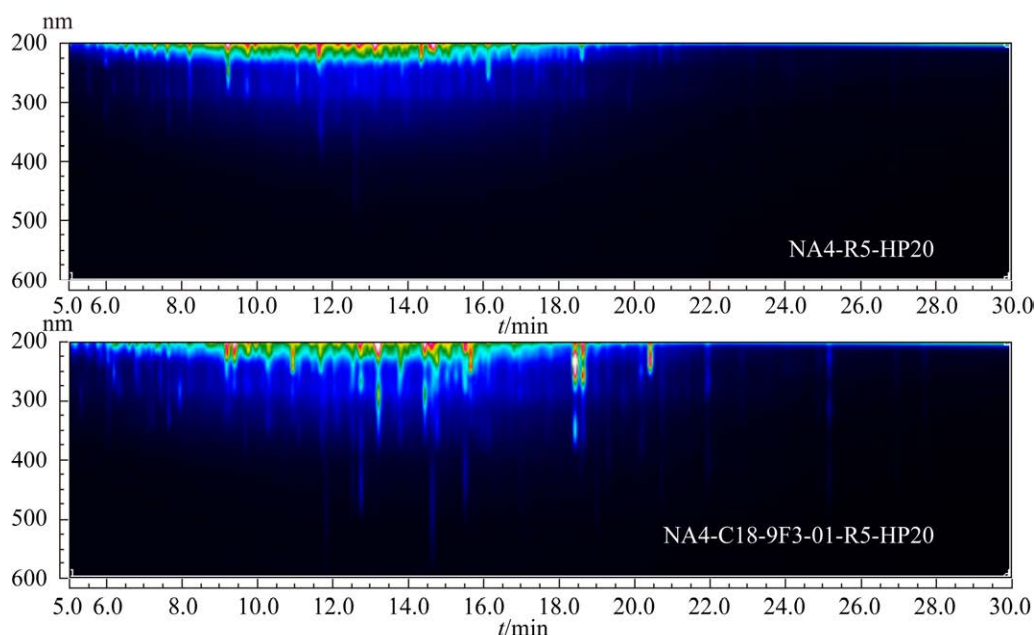


图 4 野生株与突变株发酵检测对比 HPLC-DAD 图

Figure 4 HPLC-DAD diagram for comparison of fermentation detection of wild and mutant strains.

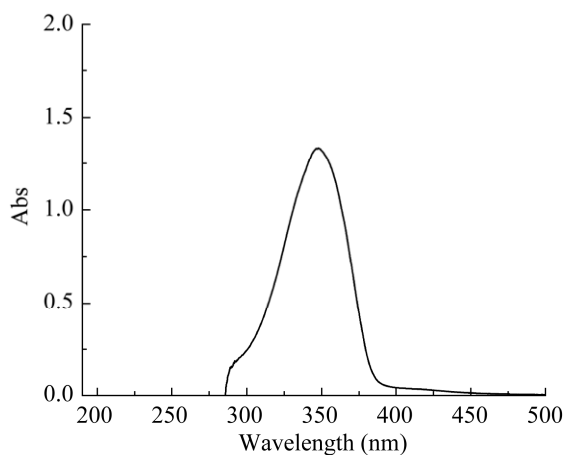


图 5 Rt 18.45 min 化合物的紫外吸收

Figure 5 Rt 18.45 min UV absorption of compounds.

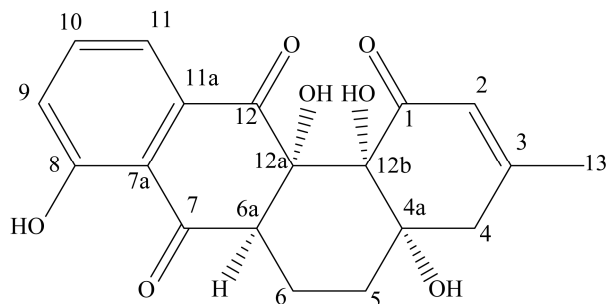


图 6 目标化合物的结构

Figure 6 Structure of the target compound.

表 4 DMSO- $d_6$  中目标化合物的  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 光谱数据

Table 4  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data of compound in DMSO- $d_6$

No.	$^{13}\text{C}$ NMR ( $\delta$ in ppm)	$^1\text{H}$ NMR ( $\delta$ in ppm, $J$ in Hz)	HMBC correlations
1	200.7, C		
2	124.7, CH	5.84, m	4, 13
3	161.0, C		
4	42.4, CH <sub>2</sub>	3.23, d, (18.2) 2.09, d, (18.2)	2, 3 2, 3, 4a, 12b, 13
4a	73.9, C	OH: 4.39, d, (0.9)	4, 4a, 12b
5	31.4, CH <sub>2</sub>	1.86, s 1.43, dd, (9.5, 3.1)	1, 4, 4a 4, 4a, 6a, 12b
6	17.6, CH <sub>2</sub>	1.87, s 2.35, m	1, 4, 4a 4a, 6a, 12a
6a	51.8, CH	3.27, s	1, 5, 12a, 12b
7	197.2, C		
7a	120.3, C		
8	158.9, C	OH: 11.79, s	7a, 8, 9
9	122.8, CH	7.26, dd, (8.3, 1.0)	7a, 8, 11
10	135.2, CH	7.66, t, (7.9)	8, 11a
11	117.8, CH	7.46, dd, (7.6, 1.0)	7a, 9, 12
11a	135.4, C		
12	196.6, C		
12a	82.4, C	OH: 5.62, s	6a, 12, 12a, 12b,
12b	79.3, C	OH: 4.74, s	4a, 7, 12a,
13	24.1, CH <sub>3</sub>	1.92, s	2, 3, 4

$\delta$ : Hemical shift;  $J$ : Coupling constant; s,m,t,d,dd: Peak shape.

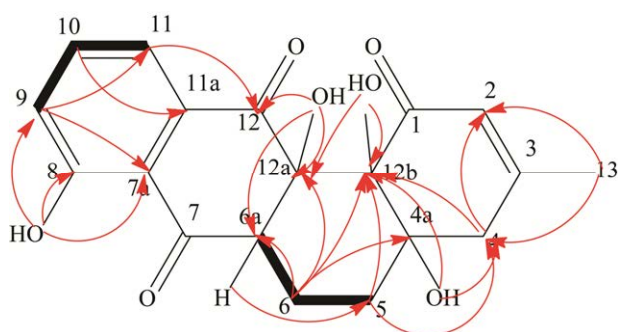


图 7 目标化合物中关键的 COSY 和 HMBC 相关  
Figure 7 Selected 2D NMR correlations for compound.

## 2.5 化合物 Urdamycin J 的生物合成途径推导

基于基因重组的结果和已报道 Urdamycin 生物合成机制研究, 推测卡伍尔氏链霉菌 NA4 中分离得到的 Urdamycins J 生物合成途径如图 9 所

示, 以 1 个乙酰辅酶 A 和 9 个丙二酰辅酶 A 为原料, 最小 PKSs (*orf3613-3615*) 编码合成了聚酮链 1。酮基合成酶 *orf3616* 选择性地在 C-9 位

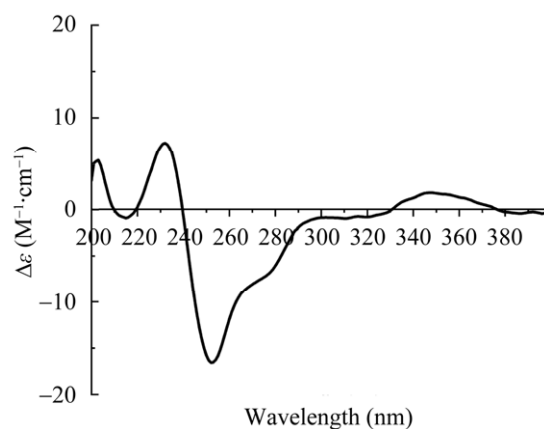


图 8 目标化合物的 CD 光谱(CH<sub>3</sub>OH)  
Figure 8 CD spectra of compounds in CH<sub>3</sub>OH.

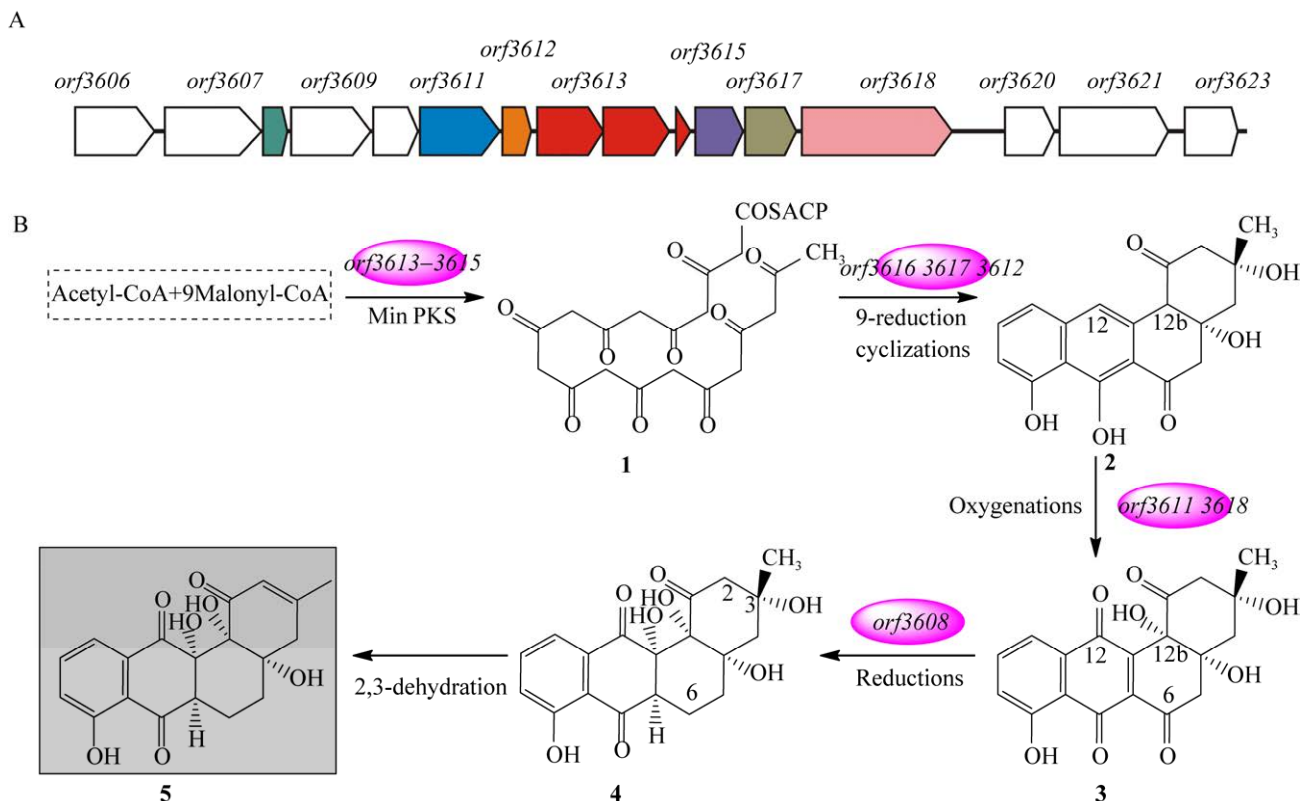


图 9 生物合成途径预测

Figure 9 Putative biosynthetic pathway. A: Synthetic biological gene cluster of compound. B: Biosynthetic pathway of compound Urdamycin J.

点还原主干<sup>[21]</sup>。orf3617 (与 urdL 具有很高的同源性, 可能催化相同的环化反应)负责第 1 环的闭合与芳构化<sup>[22]</sup>, orf3612 (同 urdF)参与第 3 环、第 4 环的环化<sup>[23]</sup>, 最终合成 2。2 经氧化转化为 3, BGC 编码了一种推测为 FAD 依赖性单加氧酶基因 orf3611 (同 urdE), 作为基因簇中的第二个加氧酶基因, 参与了 12 位的氧化作用<sup>[22]</sup>。orf3618 (同 urdM)编码一种具有 c 端还原酶结构域和 n 端黄素依赖加氧酶结构域的双功能酶, 该结构域负责生物合成途径中的 12b-羟基化<sup>[24]</sup>。3 在黄素还原酶 orf3608 (同 urdO)作用下通过 6-还原, 5,6-脱水转化为 4<sup>[22]</sup>。最后 4 经过 2,3-脱

水, 最终形成了目标化合物 Urdamycins J。

## 2.6 化合物抑菌活性试验

测定目标化合物的最小抑菌浓度(MIC), 结果显示目标化合物对 2 株革兰氏阴性菌大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC8739 和丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*) ATCC19874 以及真菌白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC10231 无明显抑制作用, 对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC10231 有明显的抑制活性, MIC 值为 16  $\mu\text{g/mL}$ , 比对照氯霉素(MIC 值 4  $\mu\text{g/mL}$ )的活性低。活性结果如表 5 所示。

表 5 目标化合物抑菌活性结果汇总表

Table 5 Summary of antibacterial activity results of target compounds

Compounds	<i>Escherichia coli</i> (MIC) ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>Pseudomonas syringae</i> (MIC) ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>Candida albicans</i> (MIC) ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>Staphylococcus aureus</i> (MIC) ( $\mu\text{g/mL}$ )
Compound	>512	>512	>512	16
Control	4	4	8	4

## 3 结论与讨论

利用生物信息学进行分析, 发现链霉菌基因组中含有多个次级代谢产物 BGCs, 在实验室培养条件下, 多数沉默或者低表达, 处于隐性未激活状态<sup>[25]</sup>, 为了充分挖掘链霉菌次级代谢产物的编码能力, 科研人员研究了多种次级代谢产物 BGCs 激活策略, 包括培养条件的优化、启动子工程、核糖体工程、调控基因的控制和异源表达等, 来激活隐性的次级代谢产物 BGCs, 从而获得结构新颖有活性的天然产物<sup>[26]</sup>。

本研究采用敲除负调控基因 MarR 的同时添加红霉素启动子的策略, 成功将菌株 *Streptomyces cavourensis* NA4 中一个编码 PKS-II 生物合成基因簇激活, 并顺利分离到 1 个芳香类聚酮化合物, 研究发现其具有良好的抑菌和抗癌

活性<sup>[21]</sup>, 表明以基因组为导向的天然产物挖掘可以加速链霉菌中活性新化合物的发现, 同时该菌株中启动子过表达体系的建立为其他海洋微生物来源的“隐性”次级代谢产物的生物合成基因簇的激活提供参考思路和技术支持。

本研究中激活的 PKS-II 生物合成基因簇包括 II 型聚酮类化合物合成所必需的最小 PKS 合成单元以及酮基合成酶、环化酶、加氧酶等, 目标化合物为特异性激活 cluster 18 所产生的 Urdamycins 类化合物, 与已报道的 Urdamycins A 等其他类乌达霉素相比, 缺少了一个糖基部分, 推测可能与其生物合成基因簇中缺少编码糖基转移酶的 urdGT2 有关<sup>[24]</sup>。激活结果显示可能启动子只激活了基因簇中关键结构基因如最小 PKS 等, 一些新颖的后修饰基因(orf3607、orf3620、orf3621 和 orf3623)没有激活, 这给以后的研究提供了思路。

## 参考文献

- [1] BÉRDY J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2012, 65(8): 385-395.
- [2] DHARMARAJ S. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(12): 2123-2139.
- [3] ZHU H, SANDIFORD SK, van WEZEL GP. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(2): 371-386.
- [4] LI ZY, BU QT, WANG J, LIU Y, CHEN XN, MAO XM, LI YQ. Activation of anthrachamycin biosynthesis in *Streptomyces chattanoogensis* L10 by site-directed mutagenesis of *rpoB*[J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2019, 20(12): 983-994.
- [5] QIAN ZY, BRUHN T, D'AGOSTINO PM, HERRMANN A, HASLBECK M, ANTAL N, FIEDLER HP, BRACK-WERNER R, GULDER TAM. Discovery of the streptoketides by direct cloning and rapid heterologous expression of a cryptic PKS II gene cluster from *Streptomyces* sp. Tü 6314[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2020, 85(2): 664-673.
- [6] HUANG HM, HOU LK, LI HY, QIU YH, JU JH, LI WL. Activation of a plasmid-situated type III PKS gene cluster by deletion of a *wbl* gene in deep-sea-derived *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 116.
- [7] MARTÍNEZ BY, SANTOS AJ, RODRÍGUEZ GA, BARREALES EG, TORMO JR, TRUMAN AW, REYES F, APARICIO JF, LIRAS P. Activation of secondary metabolite gene clusters in *Streptomyces clavuligerus* by the PimM regulator of *Streptomyces natalensis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 580.
- [8] KHOSLA C, KAPUR S, CANE DE. Revisiting the modularity of modular polyketide synthases[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, 13(2): 135-143.
- [9] WANG J, ZHANG RH, CHEN X, SUN XX, YAN YJ, SHEN XL, YUAN QP. Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 110.
- [10] ROMERO RA, ROBLEDO CI, SÁNCHEZ S. An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2015, 1849(8): 1017-1039.
- [11] ZHU DQ, WANG YP, ZHANG MM, IKEDA H, DENG ZX, CANE DE. Product-mediated regulation of pentalenolactone biosynthesis in *Streptomyces* species by the MarR/SlyA family activators PenR and PntR[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(6): 1255-1266.
- [12] RAMOS JL, MARTÍNEZ-BUENO M, MOLINA-HENARES AJ, TERÁN W, WATANABE K, ZHANG XD, GALLEGOS MT, BRENNAN R, TOBES R. The TetR family of transcriptional repressors[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(2): 326-356.
- [13] WEI J, HE L, NIU G. Regulation of antibiotic biosynthesis in actinomycetes: perspectives and challenges[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018, 3(4): 229-235.
- [14] LEE HN, HUANG JQ, IM JH, KIM SH, NOH JH, COHEN SN, KIM ES. Putative TetR family transcriptional regulator SCO1712 encodes an antibiotic downregulator in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(9): 3039-3043.
- [15] HWANG KS, KIM HU, CHARUSANTI P, PALSSON BO, LEE SY. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(2): 255-268.
- [16] PAN HQ, YU SY, WANG N, HAU HM, HU JC, WANG SJ. Bafilomycins B1 and C1, the potential agents against plant pathogenic fungi from the *Streptomyces cavourensis* NA4 of deep-sea sediment[C]//Summary of Papers at the 9th National Conference on Marine Biotechnology and Innovative Drugs. 2014: 67.
- [17] 李军, 朱清华, 张云, 马俊英, 田新朋, 李文均, 张长生, 鞠建华. 深海放线菌 *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652 遗传操作系统的建立[J]. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(2): 105-111.
- LI J, ZHU QH, ZHANG Y, MA JY, TIAN XP, LI WJ, ZHANG CS, JU JH. Development of a genetic system of deep sea marine actinomycete *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2012, 37(2): 105-111 (in Chinese).
- [18] 张盈. 基于基因组序列分析挖掘卡伍尔氏链霉菌 NA4 次级代谢产物的研究[D]. 北京: 中国科学院大学硕士学位论文, 2017.
- ZHANG Y. Study on mining secondary metabolites of *Streptomyces cavourensis* NA4 based on genome sequence analysis[D]. Beijing: Master's Thesis of

- University of Chinese Academy of Sciences, 2017 (in Chinese).
- [19] PARANTHAMAN S, DHARMALINGAM K. Intergeneric conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. strain C5: chromosomal integration and expression of recombinant plasmids carrying the *chiC* gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 84-91.
- [20] RUAN XC, DENG XL, TAN ML, YU CB, ZHANG MS, SUN Y, JIANG NH. *In vitro* antibiofilm activity of resveratrol against avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(1): 249.
- [21] KÜNZEL E, FAUST B, OELKERS C, WEISSBACH U, BEARDEN DW, WEITNAUER G, WESTRICH L, BECHTHOLD A, ROHR J. Inactivation of the *urdGT2* gene, which encodes a glycosyltransferase responsible for the C-glycosyltransfer of activated d-olivose, leads to formation of the novel urdamycins I, J, and K[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(48): 11058-11062.
- [22] FAUST B, HOFFMEISTER D, WEITNAUER G, WESTRICH L, HAAG S, SCHNEIDER P, DECKER H, KÜNZEL E, ROHR J, BECHTHOLD A. Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in *Streptomyces fradiae* Tü2717[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2000, 146 (Pt 1): 147-154.
- [23] DECKER H, HAAG S. Cloning and characterization of a polyketide synthase gene from *Streptomyces fradiae* Tü2717, which carries the genes for biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A and a gene probably involved in its oxygenation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(21): 6126-6136.
- [24] RIX U, REMSING LL, HOFFMEISTER D, BECHTHOLD A, ROHR J. Urdamycin L: a novel metabolic shunt product that provides evidence for the role of the *urdM* gene in the urdamycin A biosynthetic pathway of *Streptomyces fradiae* Tü 2717[J]. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2003, 4(1): 109-111.
- [25] NETT M, IKEDA H, MOORE BS. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes[J]. *Natural Product Reports*, 2009, 26(11): 1362-1384.
- [26] CHOI SS, KIM HJ, LEE HS, KIM P, KIM ES. Genome mining of rare actinomycetes and cryptic pathway awakening[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(8): 1184-1193.