

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(11):1402-1408; 4 November 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150119

棒状链霉菌中隐性羊毛硫肽 CLA 124 的半体外生物合成

张铮^{1,2}, 张丽^{1,2}, 张杰^{1,2}, 马宏初¹, 孙树涛¹, 钟瑾^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 北京 100101

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:【目的】利用半体外生物合成方法获得棒状链霉菌中的隐性羊毛硫肽, 为放线菌中羊毛硫肽资源的挖掘提供借鉴。【方法】利用 nisin 修饰系统, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中对隐性羊毛硫肽的核心肽进行体内修饰。修饰后产物经亲和层析和高效液相色谱 (HPLC) 纯化后, 体外酶切反应切除前导肽, 利用 MALDI-TOF MS 检测核心肽的脱水情况, 并结合二级质谱解析其成环结构。【结果】获得了新的羊毛硫肽 CLA 124, 其核心肽脱去了 4 分子水, 并形成 2 个硫醚键和一个二硫键。【结论】半体外生物合成方法可用于放线菌来源隐性羊毛硫肽的资源挖掘。

关键词: 隐性基因簇, 羊毛硫肽, 半体外合成, 脱水, 环化

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209(2015)11-1402-07

羊毛硫肽 (lanthipeptides) 是一类由核糖体合成并经过翻译后修饰而含有羊毛硫氨酸等特殊氨基酸的多肽^[1]。具有抑菌活性的羊毛硫肽被称为羊毛硫细菌素 (lantibiotics), 其抑菌谱较广, 特别是对一些耐药性菌株, 如 MRSA (methicillin resistant *S. aureus*), VRE (vancomycin insensitive *S. aureus*) 等^[2], 有较强的抑菌作用。羊毛硫细菌素因其独特的抑菌机制而不易产生抗药性, 有很大潜能用于抗感染治疗, 对其的发掘和利用已成为当前研究的热点^[3]。

根据修饰酶的不同, 可以将羊毛硫肽分为 4 大类, 其中 I 类是由脱水酶 LanB 和环化酶 LanC 共同完成修饰, II 类的修饰由双功能域的 LanM 执行, III 类和 IV 类的修饰则分别由三功能域的 LanKC 和 LanL 完成^[4]。

羊毛硫肽的生物合成是由一系列成簇排列的基

因完成的 (图 1-A)。以 I 类羊毛硫细菌素的典型代表 nisin 为例, nisin 的前肽 NisA 包含 57 个氨基酸 (AA), 由前导肽 (23 AA) 和核心肽 (34 AA) 组成。在前导肽的指导下^[5], 核心肽中的 Ser 经脱水酶 NisB 作用脱去水分子形成脱氢丙氨酸 (Dehydroalanine, Dha), Thr 经脱水酶 NisB 作用脱去水分子形成 β -甲基脱氢丙氨酸 (Dehydrobutyrine, Dhb)。Dha 经环化酶 NisC 的作用, 与核心肽内的 Cys 发生加成反应, 形成羊毛硫氨酸 (Lanthionine, Lan), Dhb 则和 Cys 加成, 形成甲基羊毛硫氨酸 (β -methylanthionine, MeLan)。修饰后的前肽由 ABC 转运蛋白 NisT 将其转运到周质空间, 接着肽酶 NisP 切除前导肽形成成熟的羊毛硫细菌素^[6]。

近年来, 在放线菌中发现了许多羊毛硫肽, 它们都具有优良或特殊的生物活性。例如, 小双胞菌 (*Microbispora corallina*) 中发现的 NAI-107 可以抑制

基金项目: 中国科学院知识创新重要方向项目 (KSCX2-EW-Q-14, KSCX2-EW-J-6)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

作者简介: 张铮 (1990 -), 男, 北京人, 硕士研究生, 主要从事生物工程研究。E-mail: 850804197@qq.com

收稿日期: 2015-03-19; **修回日期:** 2015-04-23

MRSA 和 VRE 等抗性菌株^[7]。除抑菌作用外,天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中发现的 SapB^[8]和唐德链霉菌(*Streptomyces tendae*)中发现的 SapT^[9],具有促进链霉菌发育分化等非抑菌功能。同时,放线菌中还存在着大量的隐性基因簇包括隐性羊毛硫肽基因簇资源,如何激活或获得其产物也是近年来的研究热点^[10]。通过基因组数据分析,我们发现棒状链霉菌 ATCC 27064 中含有一个新的 I 类羊毛硫肽的生物合成基因簇 *cla*(图 1-A)。然而,我们对其前体结构基因 *claA* 进行了转录分析,发现其并不转录,在该菌的发酵液中也未检测到其合成的羊毛硫肽(命名为 clavucin)。本实验室前期工作中建立的羊毛硫细菌素“半体外合成”方法,即通过“体内修饰,体外加工”,能够方便地在大肠杆菌中合成不同种类的羊毛硫肽^[11]。基于该原理,我们利用同类细菌素中研究背景清楚的 nisin 修饰系统,对前肽 ClaA 的核心肽部分进行修饰,以期从棒状链霉菌中获得新的羊毛硫肽产物,为从放线菌的隐性基因簇资源中获得新的羊毛硫肽提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养基:棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligerus*) ATCC27064 来自于中科院微生物所杨克迁研究员实验室。大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 菌株用于载体构建和蛋白表达宿主,载体 pETDuet-nisA-nisB 和 pACYCDuet-nisC 均为本实验室构建并保藏。*E. coli* 培养采用 LB 培养基,有需要时加入氨苄青霉素和氯霉素,终浓度分别为 100 μg/mL 和 10 μg/mL。

1.1.2 主要试剂和仪器:DNA 聚合酶 phusion 购于 Thermo 公司;DNA Marker 购于中科瑞泰生物科技有限公司;质粒提取、PCR 回收试剂均购于 AXYGEN 公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;测序由北京博尚生物技术有限公司完成;乙腈(色谱纯)购于 MREDA 科技有限公司;超纯水由 Millipore 纯水仪制备,三氟乙酸(TFA)购于 DIKMA 科技有限公司;N-乙基马来酰亚胺(N-Ethylmaleimide, NEM)购于国药集团化学试剂有限公司;二硫苏糖醇(DTT)购于 Amresco 有限责任公司;Glu-C 购于 Sigma 公司。PCR 基因扩增仪购买于卡尤迪生物科技(北京)有限公司;离心机购买于日本 TaKaRa 公司;高效液相色谱仪(HPLC)购买于岛津企业管理(中国)有限公司;4700 及 5800 蛋白质组分析器质谱仪购买于美国应用生物系统公司。

1.2 羊毛硫肽生物合成基因簇预测及分析

BAGEL3 (BActeriocin GEnome mining tool) 是细菌素及翻译后修饰肽的基因组挖掘工具。将棒状链霉菌 ATCC27064 的基因组序列,以 FASTA 格式导入 Bagel3 软件中进行数据库比对分析,找到疑似的羊毛硫肽的生物合成基因簇,并通过 BLAST 比对,初步确定基因簇中各基因的功能^[12]。

1.3 半体外合成羊毛硫肽

1.3.1 载体构建:如图 1-B 所示,按照 Chiu 等^[13]所述的方法(Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis, SLIM),设计引物(表 1),以 pETDuet-nisA-nisB 为模板,对 nisin 的核心肽进行突变,替换成 ClaA 的核心肽。因核心肽的氨基酸比较多,故分 3 步突变完成。构建得到 pETDuet-nisin leader peptide-*claA* core peptide-nisB。

表 1. 本实验所用到的 PCR 引物

Table 1. Primers used in this research

Primers	Sequences (5'→3')
1-L1	GAAGCGGATCGTCTCATTCGTATGACCAAAACAGGAGCTCTGATG
1-S2	TGGTGTATGCACCTGAATCTTTCTTCG
1-L2	GGTCATACGAATGAGACGATCCGCTTCTGCTGATGCACCTGAATC
1-S1	AAAACAGGAGCTCTGATGGGTTGTAAC
2-L1	GATGATGGCTGCGCGTGACCTGCACAGCAACTTGTCATTGT
2-S2	GGTCATACGAATGAGACGATCCGCTTC
2-L2	GCAGGTCACGCCGAGCCATCATCGGTCATACGAATGAGACG
2-S1	ACAGCAACTTGTCATTGTAGTATCAC
3-L1	GAAAGCGGTGCAGCACCACTGCCCGTAAAAGCTTGCGGCCGCAT
3-S2	GCAGGTCACGCCGAGCCATCATCGGT
3-L2	CGGGCAGGTGCTGCTGCACGCCGCTTTCGACGCTACGCCGAGCC
3-S1	TAAAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTA

1.3.2 蛋白表达纯化:将质粒 pETDuet-nisin leader peptide-claA core peptide-nisB 与质粒 pACYCDuet-nisC 共转化 *E. coli* BL21, 在大肠杆菌中同时表达融合肽与 NisB、NisC。 *E. coli* BL21 37 °C 摇瓶培养, 待 OD_{600} 达到 0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 18 °C、180 r/min 诱导 16 h。离心收集菌体, 重悬后超声破碎细胞, 上清过 Ni 柱纯化, 产物经过 SDS-PAGE 检测, 得到在体内经修饰后的融合肽前肽。体外加工是通过 Glu-C 蛋白酶, 在体外切除融合肽的前导肽。然后采用高效液相色谱仪 (HPLC, C18, 岛津) 分离纯化成熟肽, 产物经过梯度洗脱获得, 乙腈浓度范围为 30%–50%, 分离时间为 25 min。

1.4 NEM 修饰鉴定

N-乙酰马来酰亚胺 (NEM) 为专一性的巯基烷化剂, 它可以同半胱氨酸的自由巯基反应, 使分子量增加 125 Da, 用于检测成熟肽中硫醚键和二硫键的形成情况^[14]。将 HPLC 纯化后的成熟肽进行冷冻干燥, 用缓冲液 (50 mmol/L Na_2HPO_4 , 50 mmol/L Na_2SO_4 , pH7.4) 重悬并调节 pH 值至 7.0 左右, 加入终浓度为 10 mmol/L NEM, 在冰上反应 1 h。修饰后样品, 采用质谱检测其分子量变化。硫醚键和二硫键不能加成 NEM, 但二硫键可以被 DTT 等还原剂打开, 在 NEM 修饰反应中加入二硫苏糖醇 (DTT), 检测分子量变化, 可以验证二硫键的存在情况。

1.5 质谱鉴定

MALDI-TOF MS 分析由 4700 蛋白质组分析器

质谱仪完成。成熟肽分子脱去 1 分子水, 分子量减少 18 Da; 形成一个二硫键, 分子量减少 2 Da。通过分子量的变化, 可以推测核心肽部分的脱水 and 二硫键形成情况。

MALDI-TOF MS/MS 分析由 5800 蛋白质组分析器质谱仪, 通过手动上样的方法完成。成熟肽被高强度激光打断, 从而可以检测到各个断裂片段的分子量。Ser 脱水形成 Dha 或 Thr 脱水形成 Dhb, 分子量减少 18 Da。形成了硫醚键或二硫键的片段, 由于被化学键形成的环所保护, 不能被激光打断, 因此检测不到该区域肽段的分子量^[11]。

2 结果

2.1 新羊毛硫肽基因簇分析

利用 Bagel 软件在棒状链霉菌 ATCC 27064 基因组中挖掘羊毛硫肽, 发现了一个新的 I 类羊毛硫肽基因簇 *cla*。该基因簇主要含有结构基因 *claA*, 修饰基因 *claB*, *claC*, 但没有与 nisin 合成基因簇类似的转运切割基因 *nisT* 和 *nisP*, 以及免疫相关基因 *nisI* 等 (图 1-A)。前肽 ClaA 共含有 64 个氨基酸 (图 1-B), 根据 I 类羊毛硫肽的普遍特征, 推测其前导肽 (leader peptide) (下划线) 含 39 个氨基酸, 核心肽 (core peptide) 有 25 个氨基酸, 前导肽的切割位点为 PS (加粗表示)。核心肽有 25 个氨基酸, 含有可能发生脱水修饰的 4 个 Thr 和 2 个 Ser, 以及 4 个可以发生成环修饰的 Cys。

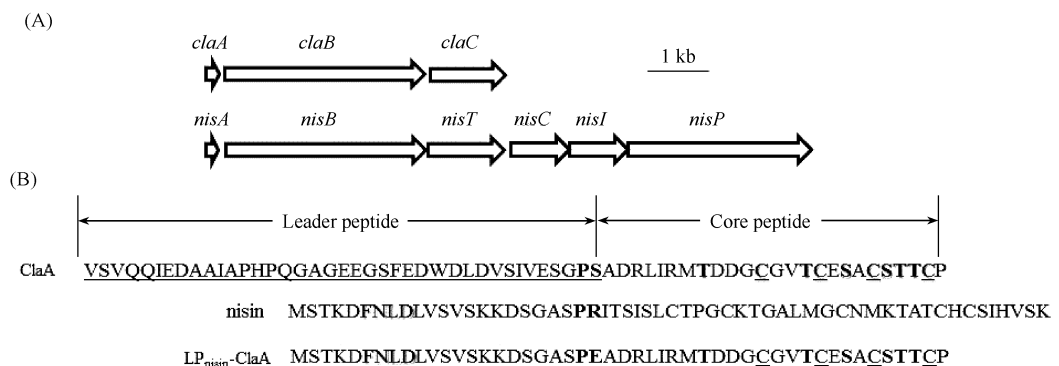


图 1. Clavuicin 的基因簇与 nisin 基因簇 (A) 的比较及 LPnisin-ClaA 融合肽示意图 (B)

Figure 1. The biosynthesis gene clusters of clavuicin and nisin (A) and the fusion peptide LPnisin-ClaA (B).

2.2 构建修饰 ClaA 核心肽的 nisin 修饰系统

迄今关于放线菌中修饰酶 LanB 和 LanC 修饰机制的报道较少, 研究难度较大。由于同类型细菌

素中乳酸菌来源的 nisin 的修饰酶背景已较清楚, 可考虑利用其修饰系统作为一个工具, 来修饰 ClaA, 产生具有新颖结构的化合物。因羊毛硫肽的修饰酶

一般特异性识别自身的前导肽^[5],故需换用 nisin 的前导肽。因此,在 *nisA* 基因序列基础上,通过 SLIM 方法,突变 NisA 核心肽成为 ClaA 的核心肽,构建 nisin 前导肽与 ClaA 核心肽结合的融合肽 LPnisin-ClaA。由于 *cla* 基因簇的 GC% 很高,且密码子不适

合大肠杆菌识别,故在构建时进行了密码子优化(表 2)。其中 nisin 的前导肽 N 端带有 His 标签以备后续纯化;为了便于切割,前导肽切割位点突变成 PE。融合肽 LPnisin-ClaA 同 NisB 和 NisC 在大肠杆菌内共表达,以获得修饰后的融合前肽。

表 2. 密码子优化表

Table 2. Optimization of the codons

Amino acids	A	D	R	I	T	E	S
Original bases	GCC	GAC	CGG	ATC	ACG	GAG	TCC
Designed bases	GCG	GAT	CGT	ATT	ACC	GAA	AGC

2.3 ClaA 核心肽的脱水修饰情况

修饰后的融合前肽 ClaAm,经 HPLC 纯化后(图 2-A)冷冻干燥。利用 Glu-C 切除前导肽,经过 HPLC 纯化后获得成熟肽(图 2-B),命名为 CLA 124。CLA 124 的分子量为 2531 Da(图 2-C),与原肽分子量相差 74 Da,推测发生了 4 分子脱水(-72 Da)和形成了一个二硫键(-2 Da)。

2.4 CLA 124 的成环修饰情况

以 bovicin HJ50 Δ ADR 为对照,质谱检测 NEM 修饰后其分子量变化情况表明,因其分子中只含有一个二硫键而无自由巯基^[15],无法加成 NEM,因此分子量无变化(图 3-A);经过 DTT 还原后的 bovicin HJ50 Δ ADR 二硫键打开,能够加成 2 个 NEM,分子量增加 250 Da(图 3-B);而 CLA 124 不能加成 NEM(图 3-C),说明其核心肽中的 4 个 Cys 都形成了化学键;而经过 DTT 还原后的 CLA 124,只加成 2 个 NEM,分子量增加了 2 个 125 Da(图 3-D),表明核心肽中 2 个 Cys 形成了 1 个二硫键而其余的 2 个 Cys 则与脱水氨基酸形成了 2 个硫醚键。

2.5 CLA 124 的结构鉴定

CLA 124 二级质谱分析结果表明(图 4-A), Thr8、Thr15、Ser18、Ser21 这 4 个氨基酸发生脱水修饰,而 Thr22 和 Thr23 则没有发生脱水修饰。肽段 12 到 15、16 到 18 和 19 到 25 没有检测到区域内的分子量,说明该区域存在硫醚键或二硫键。根据 Dha 或 Dhb 与 Cys 的位置关系,说明 Cys12 与 Dhb15 形成甲基羊毛硫氨酸,形成硫醚键;Cys16 与 Dha18 形成羊毛硫氨酸,形成硫醚键;Cys20 与 Cys24 形成二硫键。根据以上结论,得到了 CLA 124 的成环结构(图 4-B)。

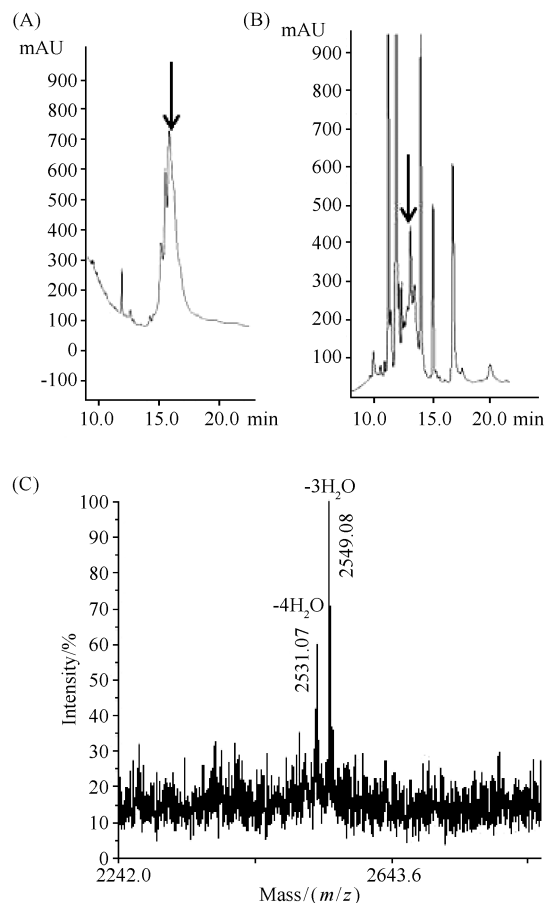


图 2. ClaA 前肽(A)与 CLA 124(B)的 HPLC 谱图及 CLA 124 质谱图(C)

Figure 2. HPLC spectra of modified LPnisin-ClaA (A) and CLA 124 (B), and MS spectrum of CLA 124 (C).

3 讨论

多抗革兰氏阳性菌(Multi-resistant Gram-positive)逐年增多,导致现有抗生素的作用效率下

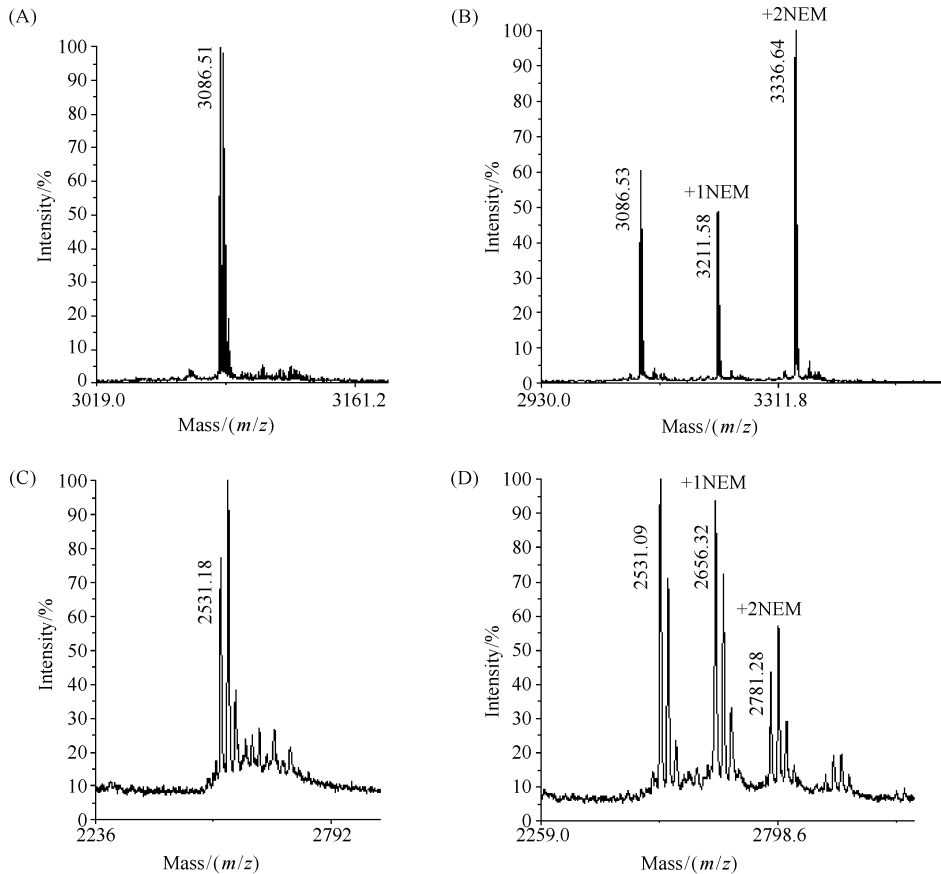


图 3. NEM 修饰检测 CLA 124 成键情况

Figure 3. NEM modification to detect the cyclization of CLA 124. The mass spectra of NEM-modified bovicinHJ50 Δ ADR (control) and CLA 124 with (B and D, respectively) and without (A and C, respectively) addition of DTT.

降。羊毛硫肽能有效抑制革兰氏阳性菌,且安全性高,广泛应用在食品领域,具有非常好的应用潜力。近年来,随着对已知羊毛硫肽研究的逐渐深入及微生物基因组数据的日益增长,从基因组资源中快速挖掘新羊毛硫肽成为热点^[16]。放线菌中的羊毛硫肽资源丰富,但其中很多羊毛硫肽基因簇是隐性不表达的^[10]。本文通过基因组数据分析,在棒状链霉菌 ATCC 27064 中定位了隐性羊毛硫肽生物合成基因簇。基于本实验室建立的半体外合成方法,我们用研究成熟的同类羊毛硫肽的修饰系统,对这个新羊毛硫肽的核心肽进行体外修饰及分析。这套方法无需原基因簇的转运加工基因和免疫基因等,合成系统构建方便,且大肠杆菌培养简单,遗传操作简便,具有较明显的优势,为发现并激活新的隐性羊毛硫肽提供了很好的技术平台。

我们目前的抑菌试验结果发现 CLA 124 并未

显示抑菌活性(结果未给出),推测一方面,CLA 124 可能不具抑菌活性而具有其他方面的生物活性。已报道的放线菌来源的羊毛硫肽除具备抑菌活性外,还有促进发育分化^[8-9]、免疫调节^[17]、镇痛^[18]等功能,CLA 124 作为半体外合成的新型羊毛硫肽衍生物,也有可能发挥其他相关功能,我们也将对其功能进行进一步的检测分析。另一方面,CLA 124 未显示抑菌活性也可能是核心肽修饰不完全的缘故。ClaA 核心肽共有 6 个可能的脱水位点,但在 misin 修饰系统的修饰酶 NisB 作用下,CLA 124 最多只脱去了 4 分子水,且成熟肽中同时存在脱 3 个水分子的峰(图 2-C)。这种不完全的脱水可能会影响后续的成环,从而导致 CLA 124 抑菌活性的降低或丧失。我们下一步工作考虑用 ClaA 自身的修饰系统进行修饰,验证脱水成环修饰情况,同时优化修饰酶的修饰反应条件,使之能够正确修饰而发挥生物活性。

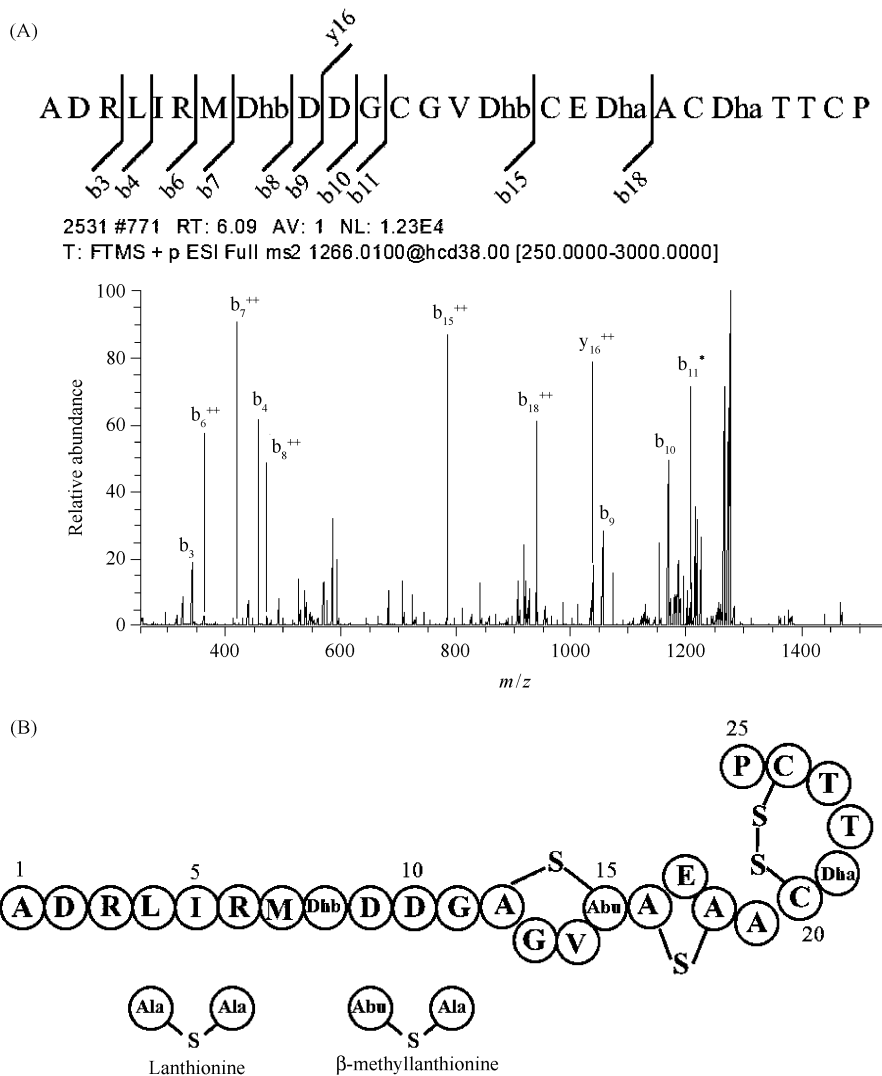


图 4. 二级质谱检测 CLA 124 (A) 及其结构 (B)

Figure 4. Fragmentation analysis (A) and structure (B) of CLA 124.

致谢:感谢中国科学院微生物研究所杨克迁研究员对放线菌相关技术和材料的支持,感谢中国科学院微生物研究所罗元明博士和王前博士在 MALDI-TOF MS 及 MALDI-TOF MS/MS 分析上的帮助。

参考文献

- [1] Chatterjee C, Paul M, Xie LL, van der Donk WA. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews*, 2005, 105(2): 633-684.
- [2] Piper C, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Discovery of medically significant lantibiotics. *Current Drug Discovery Technologies*, 2009, 6(1): 1-18.
- [3] Willey JM, van der Donk WA. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61: 477-501.
- [4] Knerr PJ, van der Donk WA. Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annual Review of Biochemistry*, 2012, 81: 479-505.
- [5] Khusainov R, Moll GN, Kuipers OP. Identification of distinct nisin leader peptide regions that determine interactions with the modification enzymes NisB and NisC. *FEBS Open Bio*, 2013, 3: 237-242.
- [6] Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll GN, Kuipers OP. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(3): 455-476.
- [7] Jabés D, Brunati C, Candiani G, Riva S, Romanó G, Donadio S. Efficacy of the new lantibiotic NAI-107 in experimental infections induced by multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(4): 1671-1676.

- [8] Kodani S, Hudson ME, Durrant MC, Buttner MJ, Nodwell JR, Willey JM. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(31): 11448-11453.
- [9] Kodani S, Lodato MA, Durrant MC, Picart F, Willey JM. SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*, 2005, 58(5): 1368-1380.
- [10] Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu GQ, Tan HR. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2013, 77(1): 112-143.
- [11] Wang J, Zhang L, Teng KL, Sun ST, Sun ZZ, Zhong J. Cerecidins, novel lantibiotics from *Bacillus cereus* with potent antimicrobial activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(8): 2633-2643.
- [12] van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, Kok J, Kuipers OP. BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(W1): W448-W453.
- [13] Chiu J, March PE, Lee R, Tillett D. Site-directed, ligase-independent mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(21): e174.
- [14] Phelps KK, Walker RA. NEM tubulin inhibits microtubule minus end assembly by a reversible capping mechanism. *Biochemistry*, 2000, 39(14): 3877-3885.
- [15] Lin YH, Teng KL, Huan LD, Zhong J. Dissection of the bridging pattern of bovicin HJ50, a lantibiotic containing a characteristic disulfide bridge. *Microbiological Research*, 2011, 166(3): 146-154.
- [16] Sandiford SK. Perspectives on lantibiotic discovery-where have we failed and what improvements are required? *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2015, 10(4): 315-320.
- [17] Hosoda K, Ohya M, Kohno T, Maeda T, Endo S, Wakamatsu K. Structure determination of an immunopotentiator peptide, cinnamycin, complexed with lysophosphatidylethanolamine by ¹H-NMR. *The Journal of Biochemistry*, 1996, 119(2): 226-230.
- [18] Iorio M, Sasso O, Maffioli SI, Bertorelli R, Monciardini P, Sosio M, Bonezzi F, Summa M, Brunati C, Bordoni R, Corti G, Tarozzo G, Piomelli D, Reggiani A, Donadio S. A glycosylated, labionin-containing lanthipeptide with marked antinociceptive activity. *ACS Chemical Biology*, 2014, 9(2): 398-404.

Semi-*in vitro* biosynthesis of cryptic lanthipeptide CLA 124 from *Streptomyces clavuligerus*

Zheng Zhang^{1,2}, Li Zhang^{1,2}, Jie Zhang^{1,2}, Hongchu Ma¹, Shutao Sun¹, Jin Zhong^{1*}

¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [**Objective**] To obtain the cryptic lanthipeptide from *Streptomyces clavuligerus* by semi-*in vitro* biosynthesis that is a novel method for mining lanthipeptides resource from *Streptomyces*. [**Methods**] The core peptide of cryptic lanthipeptide was modified in *E. coli* by nisin modification system, and purified by affinity chromatography and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). After the leader peptide was removed, the core peptide was obtained and its dehydration and cyclic structure were analyzed by MALDI-TOF MS and tandem MS. [**Results**] A novel lanthipeptide named CLA 124 with 4-fold dehydration 2 thioether bridges and one disulfide bridge was produced. [**Conclusion**] Cryptic lanthipeptides from *Streptomyces* could be produced by semi-*in vitro* biosynthesis.

Keywords: cryptic gene cluster, lanthipeptides, semi-*in vitro* biosynthesis, dehydration, cyclization

(本文责编: 李磊, 王晋芳)

Supported by the Project of Knowledge Innovation of Chinese Academy of Sciences (KSCX2-EW-Q-14, KSCX2-EW-J-6)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807401; E-mail: zhongj@im.ac.cn

Received: 19 March 2015/Revised: 23 April 2015