



## 福林霉素生物合成基因簇的组装和异源表达

李兴<sup>1,2</sup>, 韩舒婷<sup>1,2</sup>, 马婧贤<sup>1,2</sup>, 陶美凤<sup>1,2</sup>, 康前进<sup>1,2\*</sup>, 白林泉<sup>1,2</sup>, 邓子新<sup>1,2</sup>

1 上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

2 上海交通大学代谢与发育国际联合合作实验室, 上海 200240

李兴, 韩舒婷, 马婧贤, 陶美凤, 康前进, 白林泉, 邓子新. 福林霉素生物合成基因簇的组装和异源表达. 微生物学报, 2022, 62(1): 291–304.

Li Xing, Han Shuting, Ma Jingxian, Tao Meifeng, Kang Qianjin, Bai Linqun, Deng Zixin. Assembly and heterologous expression of the pholipomycin biosynthetic gene cluster. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 291–304.

**摘要:**【目的】本研究旨在以来源于林可链霉菌 NRRL2936 中的 nosokomycin B<sub>2</sub> 的生物合成基因簇(*noso*-BGC)为基础, 组装获得完整的福林霉素生物合成基因簇(*pho*-BGC), 再利用异源表达策略, 激活 *pho*-BGC 的表达并通过底盘宿主的优选实现福林霉素发酵产量的提升。【方法】首先, 在林可霉素基因簇缺失突变株 JCK126 基因组中, 整合了福林霉素生物合成所缺失的 *moeA4*、*moeB4* 和 *moeC4* 3 个环合成基因(来源于加纳链霉菌 ATCC 14672), 通过对重组菌株 LX19 的发酵和提取物的检测确认了 *pho*-BGC 在林可链霉菌中的沉默表达。然后, 利用基因组装技术将 *moeA4*、*moeB4* 和 *moeC4* 3 个环合成基因与 *noso*-BGC 进行连接, 得到了含有完整 *pho*-BGC 的质粒 pJQK572。接着, 通过接合转移将质粒 pJQK572 分别导入 *Streptomyces coelicolor* M1152、*Streptomyces lividans* SBT18、*Streptomyces lividans* LJ1018 和 *Streptomyces coelicolor* M1446 宿主中获得不同的重组菌株 LX20、LX21、LX22 和 LX23。最后, 通过对不同重组菌株进行发酵并对提取物进行生物活性分析以及 UPLC-TOF MS 检测, 确定福林霉素在不同异源宿主中的合成情况, 并结合二级质谱分析(ESI-MS<sup>2</sup>)对其结构进行确定。【结果】*pho*-BGC 在天蓝色链霉菌 M1152 中成功实现了异源表达, 并在 4 拷贝天蓝色链霉菌 M1446 中发酵产量提高了约 20%。【结论】本研究

**基金项目:** 国家重点研发计划(2019YFA0905400); 国家自然科学基金(31770034, 21661140002, 31830104); 上海市自然科学基金(19ZR1475600)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0905400), by the National Natural Science Foundation of China (31770034, 21661140002, 31830104) and by the Shanghai Municipal Council of Science and Technology (19ZR1475600)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-34206119; E-mail: qjkang@sjtu.edu.cn

Received: 8 April 2021; Revised: 19 May 2021; Published online: 4 November 2021

通过系统的发酵检测确定了福林霉素生物合成基因簇在林可链霉菌中是沉默的；然后，在 nosokomycin B<sub>2</sub> 基因簇的基础上，构建了含有完整 *pho*-BGC 的质粒 pJQK572；获得了 *pho*-BGC 在不同宿主中的异源表达产物后，利用多种液相-质谱联用技术对发酵提取物进行检测，确定了 *pho*-BGC 在天蓝色链霉菌 M1152 中成功表达，接着通过多拷贝整合技术在菌株 LX23 中将福林霉素的产量提高了约 20%。完整 *pho*-BGC 的拼接和在菌株 LX20 & LX23 中的异源表达，为福林霉素生物合成机制的探索和高产优化奠定了基础。

**关键词：**林可链霉菌 NRRL2936；福林霉素；链霉菌宿主；异源表达；二级质谱分析

## Assembly and heterologous expression of the pholipomycin biosynthetic gene cluster

LI Xing<sup>1,2</sup>, HAN Shuting<sup>1,2</sup>, MA Jingxian<sup>1,2</sup>, TAO Meifeng<sup>1,2</sup>, KANG Qianjin<sup>1,2\*</sup>,  
BAI Linquan<sup>1,2</sup>, DENG Zixin<sup>1,2</sup>

1 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 Joint International Research Laboratory of Metabolic & Developmental Sciences, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract: [Objective]** To assemble a complete pholipomycin biosynthetic gene cluster (*pho*-BGC) based on the nosokomycin B<sub>2</sub> biosynthetic gene cluster (*noso*-BGC) derived from *Streptomyces lincolnensis* NRRL2936, and activate *pho*-BGC through heterologous expression for production increase of pholipomycin using the screening of the chassis hosts. **[Methods]** Firstly, three genes *moeA4*, *moeB4*, and *moeC4* were cloned from the genome of moenomycin producer *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14672 and introduced into lincomycin gene cluster deletion strain JCK126, which yielded the recombinant strain LX19. The fermentation extract detection of LX19 showed that *pho*-BGC was silent in *S. lincolnensis* NRRL2936. Subsequently, the gene cassette carrying *moeA4*, *moeB4*, and *moeC4* was inserted into *noso*-BGC by gene assembly, resulting in the plasmid pJQK572 containing the intact *pho*-BGC. Then, plasmid pJQK572 was introduced into *Streptomyces coelicolor* M1152, *S. lividans* SBT18, *S. lividans* LJ1018, and *S. coelicolor* M1446, which generated strains LX20, LX21, LX22, and LX23, respectively. Finally, the pholipomycin production ability of different recombinants was estimated by bioactivity analysis and UPLC-TOF MS of fermented extracts, and the chemical structure of pholipomycin was identified by ESI-MS<sup>2</sup>. **[Results]** The complete *pho*-BGC achieved heterogeneous expression in *S. coelicolor* M1152. Moreover, the yield of pholipomycin was increased by 20% in *S. coelicolor* M1446 (carrying four copies of the  $\Phi C31$ -*attB* sites). **[Conclusion]** This study determined that *pho*-BGC was silent in *S. lincolnensis* by systematic fermentation assay. Then, plasmid pJQK572 containing the complete *pho*-BGC was constructed based on *noso*-BGC. The liquid-mass spectrometry for the fermented extracts of different *pho*-BGC heterogeneous hosts determined that pholipomycin was successfully synthesized in *S. coelicolor* M1152. Moreover, the yield of pholipomycin in strain LX23 was increased by 20% through multi-copy integration of

*pho*-BGC. The successful construction and heterologous expression of *pho*-BGC laid a foundation for revealing the biosynthesis mechanism and increasing the yield of pholipomycin.

**Keywords:** *Streptomyces lincolnensis* NRRL2936; pholipomycin; *Streptomyces* host; heterologous expression; ESI-MS<sup>2</sup>

福林霉素 (pholipomycin) 又被称为磷脂霉素, 最早于青紫棒状链霉菌 (*Streptomyces lividoclavatus*) 的发酵产物中被发现<sup>[1]</sup>, 属于磷酸糖脂类化合物, 其化学结构中包含了 1 个磷酸甘油酸脂肪链和 5 个来源于半乳糖或葡萄糖的糖基单元 (图 1)。福林霉素可直接作用于细菌细胞壁上的肽聚糖糖基转移酶, 从而阻断细菌细胞壁的合成<sup>[2]</sup>, 表现出了优异的抗革兰氏阳性细菌的活性, 具有重要的开发前景<sup>[3]</sup>。但福林霉素产生菌株的产量一直较低, 限制了该化合物的药物开发进程, 因此, 寻找品质优良的产生菌资源或通过合成生物学研究方法提升其产量具有重要的研究意义。

随着抗生素高效创制时代的到来<sup>[4]</sup>, 对高活性新结构天然产物的发掘策略提出了更高的要求。通过克隆完整的天然产物生物合成基因

簇 (natural product biosynthetic gene clusters, NP-BGCs), 利用异源表达策略来激活沉默基因簇表达或提高低产化合物的产量, 已成为一种有效的手段<sup>[5]</sup>。现已有许多优良的链霉菌底盘宿主被成功构建, 并用于天然产物新结构化合物的发掘<sup>[6]</sup>。例如, 白色链霉菌、天蓝色链霉菌和变铅青链霉菌等菌株, 由于具有生长迅速和遗传操作简单等优点, 且能够提供高效生物合成所需的前体和辅酶因子, 已被成功地开发成 NP-BGCs 的异源表达宿主<sup>[5]</sup>。野生型的链霉菌异源宿主存在着众多的生物合成途径, 干扰了目标化合物的合成, 而且由于复杂的代谢背景为化合物的检测和纯化带来了困难。为了消除链霉菌内源次级代谢途径, 避免内源和异源途径之间的底物竞争, 以白色链霉菌为出发菌株, 通过删除白色链霉菌 J1074 染色体中 15 个

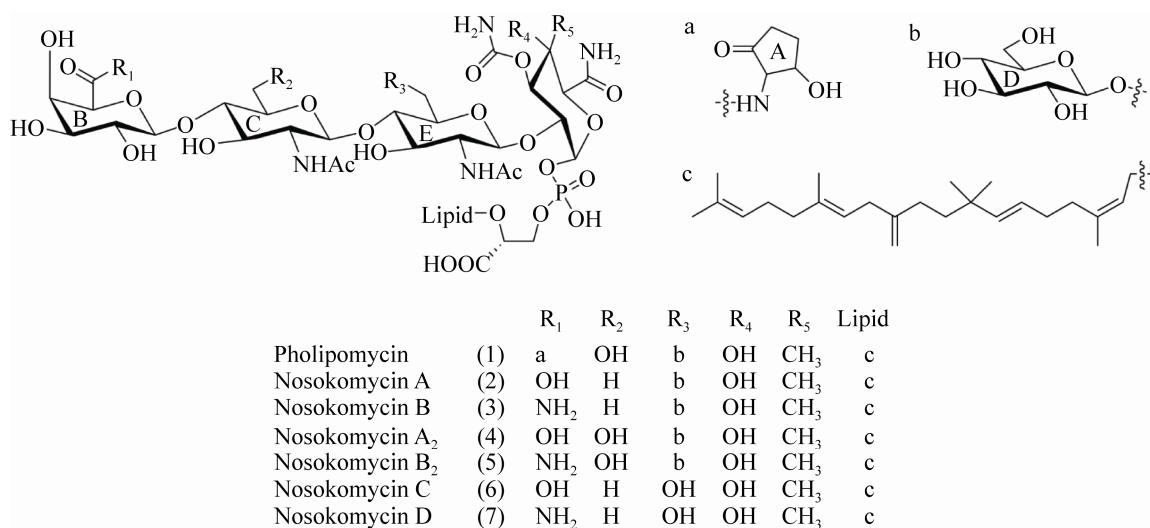


图 1 福林霉素和 nosokomycins 的化学结构式

Figure 1 The chemical structures of pholipomycin and nosokomycins.

编码次级代谢产物的生物合成基因簇所获得的白色链霉菌 Del14, 有效消除了内源性 NP-BGCs 对目标产物的影响, 使得大部分 NP-BGCs 的产物合成能力得到了提升<sup>[7]</sup>。在缺失主要生物合成基因簇的基础上, 增强菌株对 NP-BGCs 的兼容性以及提高目标生物合成基因簇的拷贝数也是宿主重要的改造策略, 例如: 在天蓝色链霉菌中通过删除菌株 M145 中 4 个主要的内源抗生素生物合成基因簇, 并在编码 RNA 聚合酶  $\beta$  亚基的 *rpoB* 中引入 C1298T 碱基突变, 构建了较为高效异源合成天然产物的天蓝色链霉菌 M1152 宿主<sup>[8]</sup>。同时, 通过在单拷贝的天蓝色链霉菌 M1146 基因组中引入另外 3 个人工的  $\Phi C31$ -*attB* 位点, 构建了基因簇四拷贝的菌株 M1446<sup>[9]</sup>, 通过提升 NP-BGCs 在宿主中的拷贝数, 大大促进了目标化合物的高产<sup>[9]</sup>。此外, 整合多重改造策略构建的链霉菌宿主对外源化合物的合成具有较高的普适性, 在变铅青链霉菌 SBT5 中整合 3 个全局调控基因和 2 个外排基因, 并删除一个负调控基因后, 得到的衍生菌株 LJ1018, 可以显著增加聚酮类和非核糖体肽类等次级代谢产物的合成产量<sup>[10]</sup>。链霉菌宿主的深度优化为 NP-BGCs 的异源表达提供了可靠的保障, 不同的 NP-BGCs 高效表达所需的转录调控因子均不一样, 选择合适的异源宿主是决定 NP-BGCs 异源表达成功的关键因素<sup>[5]</sup>。

本研究在林可链霉菌 NRRL2936 的染色体中发现了 nosokomycin B<sub>2</sub> 的生物合成基因簇 (*noso*-BGC), 通过对福林霉素生物合成缺失基因的补充和发酵条件的摸索, 确定了该基因簇为沉默表达的情况。为了实现福林霉素生物合成基因簇的异源激活与高产, 将来源于加纳链霉菌 ATCC 14672 的福林霉素 A 环合成基因与 *noso*-BGC 进行组装得到了完整的 *pho*-BGC。接下来采用多底盘宿主对 *pho*-BGC 进行异源表

达, 最终在天蓝色链霉菌 M1152 中实现了福林霉素的异源表达, 并通过在菌株 M1446 中 *pho*-BGC 多拷贝整合策略将福林霉素的产量提高了 20%。本文对福林霉素在林可链霉菌 NRRL2936 中的表达情况、完整福林霉素基因簇的组装、*pho*-BGC 的异源表达和基因簇多拷贝整合实现福林霉素发酵产量的提升进行了报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要生化试剂和仪器

甲醇、乙醇和异丙醇购自国药集团化学试剂股份有限公司; 乙腈购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 阿泊拉霉素、氨基青霉素、卡那霉素、茶啶酮酸和氯霉素, 购自西格玛奥德里奇贸易有限公司; DNA 连接酶和 Pfu 高保真 DNA 聚合酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 限制性核酸内切酶购自赛默飞世尔科技有限公司。恒温振荡摇床 ZQZY-70BS 为上海知楚仪器有限公司生产; 旋转蒸发仪 Rotavapor R-210 购自 BUCHI 公司; 生化培养箱 LRH-250A 购自韶关市泰宏医疗器械有限公司; 福林霉素的精确分子量在 Agilent & HPLC 1290-MS 6230 质谱仪上测定, 二级质谱数据在 Agilent & 1290 Infinity II/6545 QTOF LC/MS 上采集。

#### 1.1.2 培养基

大肠杆菌培养采用 LB (Luria-Bertani) 和 LA 培养基<sup>[10]</sup>。链霉菌发酵种子培养基采用 TSBY 液体培养基(g/L): 胰酪豆汤粉 30, 蔗糖 103, 酵母提取物 5, 调节 pH 值至 7.2–7.4, 121 °C 灭菌 20 min。链霉菌固体培养和孢子萌发采用黄豆饼粉浸汁琼脂培养基 SFM (g/L): 黄豆饼粉 20, 甘露醇 20, 琼脂 20, 调节 pH 值至 7.2–7.4, 121 °C 灭菌 20 min。链霉菌发酵培养基(R5 培养基) (g/L): 蔗糖 103, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

10.12, 葡萄糖 10, Difco Casamino acids 0.1, 微量元素溶液 2, 酵母提取物 5, TES 粉末 5.73, 115 °C 灭菌 30 min, 固体培养基添加 1.5% 琼脂; 高温灭菌后向每升培养基中加入:  $\text{CoCl}_2$  1 mg,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.5%) 10 mL,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (5 mol/L) 4 mL, L-脯氨酸(20%) 15 mL, NaOH (1 mol/L) 7 mL。链霉菌发酵培养基(YMG 培养基) (g/L): 酵母提取物 4, 麦芽提取物 10, 葡萄糖 4, 调节 pH 值至 7.2, 115 °C 灭菌 30 min, 固体培养基添加 1.5% 琼脂。链霉菌发酵培养基(GYM 培养基) (g/L): 葡萄糖 4, 酵母提取物 4, 麦芽膏 10, 蛋白胨 1, NaCl 2, 调节 pH 值至 7.2, 115 °C 灭菌 30 min, 固体培养基添加 1.5% 琼脂。链霉菌发酵培养基(012 培养基) (g/L): 糊精 110, 可溶性淀粉 10, 酵母提取物 2.5, 黄豆饼粉 10,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.6,  $\text{CoCl}_2$  0.5 mg, 调节 pH 值至 7.2, 121 °C 灭菌 20 min, 固体培养基添加 1.5% 琼脂。

### 1.1.3 菌株和质粒

文中所用菌株和质粒见表 1。

### 1.1.4 引物

文中所用引物见表 2。

## 1.2 基因的克隆和整合型质粒的构建

以加纳链霉菌 ATCC14672 的基因组为模板, abc-F/abc-R 为引物, PCR 扩增后可得到 5 kb 大小的用于构建 pJQK571 的 *moeA4*、*moeB4* & *moeC4* 基因片段, 基因测序正确后, 将该片段经 *Xba* I 和 *Mun* I 酶切后连接到整合型载体 pSET152 的对应酶切位点上, 得到含有 *moeA4*、*moeB4* & *moeC4* 环合成基因的目的质粒 pJQK571。利用类似的办法, 再以 A4B4C4-F/A4B4C4-R 为引物, PCR 扩增后可得到用于构建杂合 *pho*-BGC 的 DNA 片段 *moeA4*、*moeB4* & *moeC4*。测序正确后, 将此片段经 *Bcu* I 和 *Bsp*T I 酶切后连接到载体 pJQK455, 得到含有杂合

*pho*-BGC 的目的质粒 pJQK572。

## 1.3 接合转移和阳性接合子的筛选

将用于接合转移的质粒 pJQK571 和 pJQK572 通过钙离子转化的方法导入大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 中<sup>[17]</sup>。然后, 通过大肠杆菌和链霉菌间的跨属接合转移, 将质粒导入相应的链霉菌宿主中, 15 h 后用 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  阿泊拉霉素及 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的萘啶酮酸覆盖, 待 SFM 平板在无菌超净台静置晾干后, 倒置培养 5 d 可以观察到接合子。将接合子再次接种到含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  阿泊拉霉素及 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的萘啶酮酸的新鲜 SFM 培养皿上进行再次验证, 倒置培养于 30 °C 恒温培养箱。3–5 d 后可观察到链霉菌菌丝体和孢子的生成, 取适量孢子提取基因组后用验证引物 PCR 扩增质粒载体上的基因及基因簇中的功能基因确保质粒成功整合到链霉菌宿主的染色体上, 得到相应突变株。

## 1.4 链霉菌的培养和保藏

制备新鲜的 SFM 固体培养基, 选取验证正确的链霉菌阳性接合子, 使用无菌棉棒将菌株 LX19、LX20、LX21、LX22 和 LX23 的孢子均匀涂布在培养基表面, 然后将其放置在 30 °C 恒温培养箱倒置培养 7 d, 即可观察到链霉菌孢子的产生。菌种保藏采用低温甘油保藏, 利用无菌棉棒从培养基表面轻轻刮取培养 7 d 的新鲜链霉菌孢子, 将刮取的孢子重悬于装有 20% 无菌甘油的菌种保藏管中, 振荡混匀后于 -30 °C 低温保藏。

## 1.5 链霉菌的发酵和样品制备

将得到的突变株与对照菌株在种子培养基 TSBY 中 30 °C、220 r/min 振荡培养 24 h 后, 按 1% 的比例均匀接种于固体发酵培养基, 于 30 °C 恒温培养箱倒置培养 7 d。发酵结束后, 每个样品称取 30 g, 用无菌手术刀将发酵培养物(包括琼脂块和菌丝体)切成体积约为 0.4  $\text{cm}^3$

表 1 本研究涉及的菌株和质粒及其特征和来源

Table 1 Strains and plasmids used in this study and their properties and sources

Strains and plasmids	Description	Sources or references
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH10B	<i>lacZ</i> , <i>recA</i> , $\Delta$ M15	Gibco BRL
<i>Escherichia coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>recE</i> , <i>dcm</i> <sup>-</sup> , <i>dam</i> <sup>-</sup> , <i>hsdS</i> , <i>Cm</i> <sup>r</sup> , <i>Tet</i> <sup>r</sup> , <i>Str</i> <sup>r</sup> , <i>Km</i> <sup>r</sup>	Paget et al. 1999 <sup>[11]</sup>
<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672	Wild-type producer for moenomycin A	Wallhausser KH et al. 1965 <sup>[12]</sup>
<i>Streptomyces lincolnensis</i> NRRL2936	Wild-type producer for nosokomycin B <sub>2</sub>	Meng S et al. 2017 <sup>[13]</sup>
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1152	Chassis strain used for heterologous expression of <i>pho</i> -BGC ( $\Delta$ <i>act</i> , $\Delta$ <i>red</i> , $\Delta$ <i>cpk</i> , $\Delta$ <i>cda</i> , <i>rpoB</i> [C1298T])	Gomez-Escribano JP et al. 2011 <sup>[8]</sup>
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1446	Chassis strain used for heterologous expression of <i>pho</i> -BGC (Strain M1446 carrying four artificial $\Phi$ C31- <i>attB</i> sites)	Li L et al. 2017 <sup>[9]</sup>
<i>Streptomyces lividans</i> SBT18	Chassis strain used for heterologous expression of <i>pho</i> -BGC (Strain SBT5:: <i>nusG</i> :: <i>mdfA</i> :: <i>ImrA</i> :: <i>afsRs</i> )	Zhao Z et al. 2016 <sup>[14]</sup>
<i>Streptomyces lividans</i> LJ1018	Chassis strain used for heterologous expression of <i>pho</i> -BGC (Strain LJ101:: <i>ImrA</i> <sub>co</sub> :: <i>mdfA</i> <sub>co</sub> :: <i>nusG</i> :: <i>afsR</i> <sub>cla</sub> :: <i>afsS</i> <sub>cla</sub> )	Peng Q et al. 2018 <sup>[10]</sup>
JCK126	Derivative of <i>S. lincolnensis</i> NRRL2936 with deletion of the lincomycin BGC	This work
LX19-control	JCK126 with the plasmid pSET152	This work
LX19	JCK126 with the plasmid pJQK571	This work
LX20	<i>S. coelicolor</i> M1152 with the plasmid pJQK572	This work
LX21	<i>S. lividans</i> SBT18 with the plasmid pJQK572	This work
LX22	<i>S. lividans</i> LJ1018 with the plasmid pJQK572	This work
LX23	<i>S. coelicolor</i> M1446 with the plasmid pJQK572	This work
LX20-control	<i>S. coelicolor</i> M1152 with the plasmid pSET152	This work
LX21-control	<i>S. lividans</i> SBT18 with the plasmid pSET152	This work
LX22-control	<i>S. lividans</i> LJ1018 with the plasmid pSET152	This work
LX23-control	<i>S. coelicolor</i> M1446 with the plasmid pSET152	This work
<i>Sarcina lutea</i> NCTC 2665	Indicator strain used for bioassay	This work
<i>Staphylococcus aureus</i> SG511	Indicator strain used for bioassay	This work
Plasmids		
pBluescript SK (+)	<i>ColE</i> , <i>lacZ</i> , <i>bla</i> , <i>oriF1</i>	Stratagene
pSET152	<i>attP</i> , <i>Int</i> , <i>oriT</i> , <i>aac(3)IV</i>	Bierman et al. 1992 <sup>[15]</sup>
pJTU2554	<i>oriT</i> , <i>attP</i> ( $\Phi$ C31), <i>aac(3)IV</i> , <i>cos</i>	Li L et al. 2008 <sup>[16]</sup>
pJQK455	Plasmid with <i>noso</i> -BGC	This work
pJQK571	Plasmid with <i>moeA4</i> , <i>moeB4</i> & <i>moeC4</i>	This work
pJQK572	Plasmid with <i>pho</i> -BGC	This work

表 2 本研究涉及的引物及其序列

Table 2 PCR primers used in this study and their sequences

Primers	Sequences (5'→3')
A4B4C4-F	TATACTAGTTCAGCCACCGCCGCGAAGCG ( <i>Bcu</i> I)
A4B4C4-R	AAACTTAAGTCAGAGAGCGGCCGGGGTCGC ( <i>Bsp</i> T I)
abc-F	TATTCTAGATCAGCCACCGCCGCGAAGCG ( <i>Xba</i> I)
abc-R	AAACAATTGTCAGAGAGCGGCCGGGGTCGC ( <i>Mun</i> I)
phoB4-F	GCCGCACCGTTGTGCCGTGC
phoB4-R	GGTTGTGGCGGTGCTGACCGTC
Apr-F	ATGTCATCAGCGGTGGAGTGCAAT
Apr-R	GCCTCTGGCGGATGCAGGAAG

大小的均匀琼脂块, 然后向其中加入等体积 (30 mL) 的甲醇, 搅拌混匀后超声处理 30 min, 获得福林霉素及其相关化合物的发酵萃取液。将所得上清液减压干燥后, 用 1 mL 甲醇将粗提物进行溶解, 经过 0.22  $\mu\text{m}$  一次性有机相滤膜过滤, 即可获得用于 UPLC-TOF MS 和 UPLC-QTOF MS/MS 分析的发酵样品。

### 1.6 UPLC-TOF MS 和 UPLC-QTOF MS/MS 检测

色谱柱为 Agilent SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (150×4.6 mm, 粒径为 5  $\mu\text{m}$ )。福林霉素洗脱条件: 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液、B 为 20% 乙腈和 80% 异丙醇混合液; 用于 UPLC-TOF MS 和 UPLC-QTOF MS/MS 检测的流速为 0.4 mL/min; 0–20 min, B 相 (体积比) 5%–60%; 20–25 min, B 相 (体积比) 60%–100%; 25–30 min, B 相 (体积比) 100%; 30–31 min, B 相 (体积比) 100%–5%; 31–37 min, B 相 (体积比) 5%。进样量: 20  $\mu\text{L}$ , 柱温: 37  $^{\circ}\text{C}$ , 电离源: 电喷雾离子源 (ESI), 干燥温度: 350  $^{\circ}\text{C}$ , 负离子模式。检测样品为 LX19、LX20、LX21、LX22 和 LX23 的发酵提取液。其中福林霉素二级质谱的数据在负离子模式下采集, 质谱扫描范围为 100–3 000 ( $m/z$ ), 碰撞池射频电压振幅 750 mV, 脉冲前等待时间 8  $\mu\text{s}$ , 二级碰撞能设置为 40 eV。

### 1.7 发酵产物的生物活性检测

生物活性培养皿的制备: 取 30  $\mu\text{L}$  冻存的藤黄八叠球菌和金黄色葡萄球菌分别接种于 5 mL 液体 LB 培养基中 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下培养  $OD_{600}$  至 0.6–0.8, 作为制备 4 种生物活性测试培养皿的种子液。然后将 30 mL 融化的 LA 固体培养基, 于超净工作台中冷却至 39–42  $^{\circ}\text{C}$  后加入 300  $\mu\text{L}$  活化好的种子液, 轻轻混匀后将混合液倒入平板中, 约 30 min 后培养基完全凝固, 即可完成生物活性测试培养皿的制备。生物活性测试采用“琼脂块”法<sup>[18]</sup>, 在生物活性测试培养基表面放置直径为 0.8 cm 的发酵 7 d 后的固体培养物, 将生物活性测定培养皿正置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中, 培养 24 h 后, 观察和测定不同发酵培养物抑菌圈的大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 林可链霉菌 NRRL2936 中磷酸酯类化合物生物合成基因簇的发掘及合成途径分析

通过 antiSMASH 分析, 在林可链霉菌 NRRL2936 基因组中发现了一个 24 kb 的糖磷酸酯类化合物的生物合成基因簇, 细致分析发现该基因簇为 nosokomycin B<sub>2</sub> 的生物合成基因簇, 命名为 *noso*-BGC (GenBank: CP016438.1)。其中包含了负责合成 nosokomycin B<sub>2</sub> 分子骨架的

12 个功能基因和 4 个负责化合物外排的转运蛋白基因 *nosoD5*、*nosoJ5*、*nosoX5* 和 *nosoP5* (图 2, 表 3)。

基于默诺霉素和 teichomycins 的生物合成途径<sup>[19-20]</sup>, 推测了在 nosokomycin B<sub>2</sub> 的生物合成途径中 NosoGT1、NosoGT2、NosoGT3、NosoGT4 和 NosoGT5 五个糖基转移酶负责合成基本的化学骨架, NosoO5 和 NosoN5 两个异戊二烯转移酶负责合成磷酸脂肪链(图 3)。基因 *nosoE5* 编码了核苷酸糖差向异构酶, 负责将

UDP-葡萄糖醛酸转变为 UDP-半乳糖醛酸, 为 nosokomycin B<sub>2</sub> 分子骨架提供了第一个糖基(图 3)。基因 *nosoH5* 和 *nosoF5* 负责编码氨基转移酶, 基因 *nosoM5* 和 *nosoK5* 分别编码氨基转移酶和甲基转移酶, 4 个基因负责了糖基骨架的末端修饰(图 3)。由以上 12 个功能基因合成的 nosokomycin B<sub>2</sub> 也是福林霉素生物合成的前体化合物, 在环合成酶 MoeA4、MoeB4 & MoeC4 的催化下可合成生物活性优良的抗生素福林霉素(图 3)。

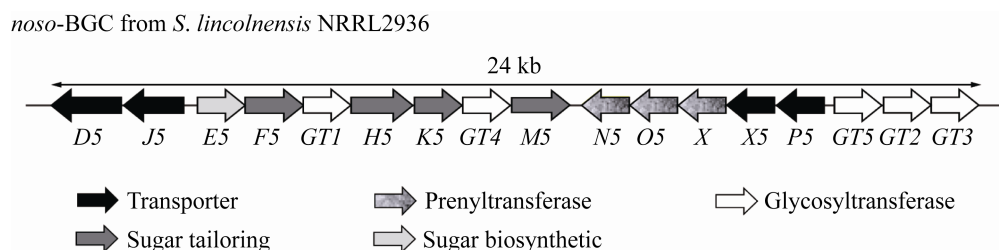


图 2 林可链霉菌 NRRL2936 中 nosokomycin B<sub>2</sub> 的生物合成基因簇

Figure 2 The biosynthetic gene cluster of nosokomycin B<sub>2</sub> in *S. lincolnensis* NRRL2936.

表 3 推测的 *noso* 生物合成基因簇编码蛋白的功能

Table 3 Proposed functions of proteins encoded by *noso*-BGC

Genes	aa	Proposed function	Similar protein	Identical aa/%
<i>nosoGT3</i>	485	Glycosyltransferase	ABJ90169.1	65
<i>nosoGT2</i>	272	Glycosyltransferase	ABJ90168.1	84
<i>nosoGT5</i>	371	Glycosyltransferase	ABJ90167.1	68
<i>nosoP5</i>	214	ABC transporter	EFE66080.1	79
<i>nosoX5</i>	226	ABC transporter	EFE66080.1	80
<i>nosoX</i>	361	Prenyltransferase	None	None
<i>nosoO5</i>	273	Prenyltransferase	WP_051868192.1	84
<i>nosoN5</i>	272	Prenyltransferase	ABJ90163.1	70
<i>nosoM5</i>	530	Carbamoyltransferase	WP_055605014.1	82
<i>nosoGT4</i>	423	Glycosyltransferase	ABJ90167.1	43
<i>nosoK5</i>	504	Radical SAM domain-containing protein	ABJ90160.1	90
<i>nosoH5</i>	502	Asparagine synthetase	WP_030051424.1	81
<i>nosoGT1</i>	402	Glycosyltransferase	WP_055608338.1	77
<i>nosoF5</i>	650	Asparagine synthetase	ABJ90157.1	73
<i>nosoE5</i>	340	UDP-glucose 4-epimerase	ABJ90156.1	69
<i>nosoJ5</i>	590	ABC transporter	ABJ90155.1	71
<i>nosoD5</i>	610	ABC transporter	ABJ90154.1	82



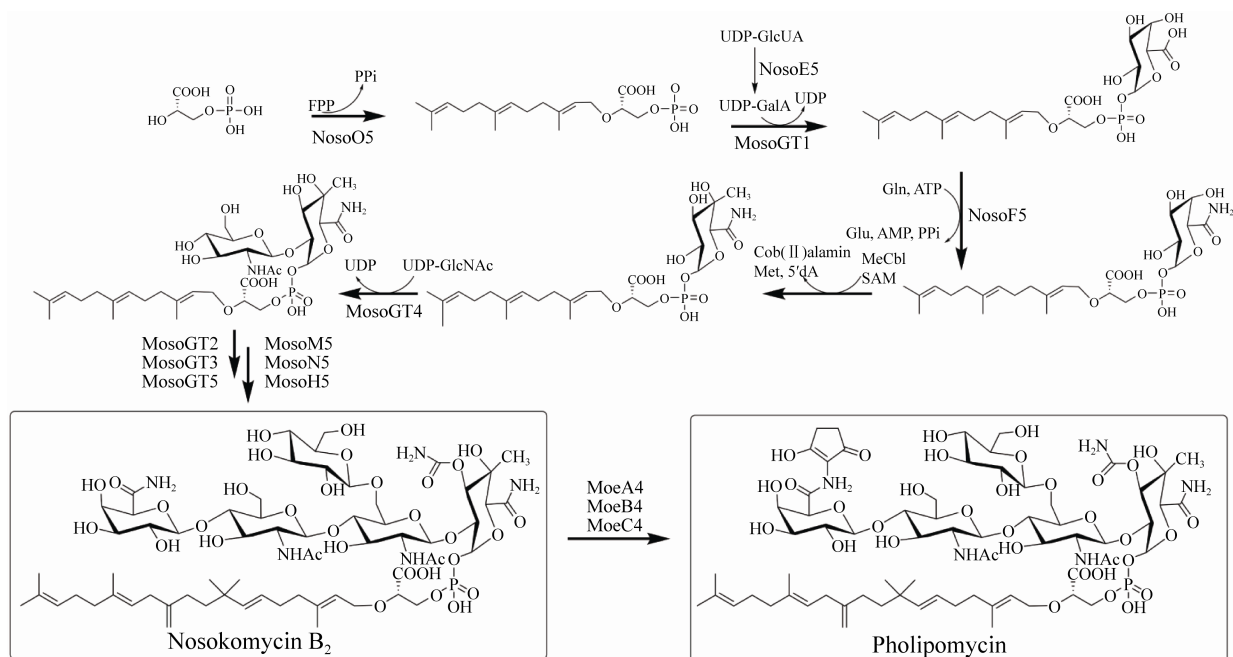


图3 Nosokomycin B<sub>2</sub>和福林霉素生物合成途径的推导

Figure 3 The proposed biosynthetic pathway of nosokomycin B<sub>2</sub> and pholipomycin.

## 2.2 林可链霉菌 NRRL2936 中福林霉素的生物合成分析

鉴于林可链霉菌 NRRL2936 只能合成福林霉素的前体 nosokomycin B<sub>2</sub>, 为了在林可链霉菌 NRRL2936 中获得完整的 *pho*-BGC, 从加纳链霉菌 ATCC14672 的基因组中, 克隆了 *moeA4*、*moeB4* & *moeC4* 基因片段, 与质粒 pSET152 进行连接后获得了整合型质粒 pJQK571。通过接合转移将质粒 pJQK571 导入林可霉素基因簇缺失突变株林可链霉菌 JCK126 中, 得到含有完整福林霉素 BGC 的菌株 LX19。同时, 将质粒 pSET152 导入林可链霉菌 JCK126 获得对照菌株 LX18。以 R5、YMG、GYM 和 012 四种不同的发酵培养基对菌株 JCK126、LX18 和 LX19 进行为期 7 d 的发酵, 将处理后的发酵提取液经 UPLC-TOF MS 检测, 菌株 JCK126、LX18 和 LX19 在 4 种培养基中都没有检测到福林霉素及其前体 nosokomycin B<sub>2</sub> 的产生。推测 *noso*-BGC 在菌株 NRRL2936 中可能为沉默生

物合成基因簇, 接下来尝试通过异源表达来激活 *noso*-BGC 的表达。

## 2.3 福林霉素完整生物合成基因簇的构建

在前期研究中, 我们已经从林可链霉菌 NRRL2936 的基因组文库中, 筛选得到了包含 24 kb *noso*-BGC 的 cosmid 载体 5B1, 将其重新命名为 pJQK455, 该基因组文库的构建质粒使用了 pJTU2554<sup>[16]</sup>, 含有阿泊拉霉素抗性筛选标记和 *int* 整合酶及 *attP* 整合位点基因盒。再以加纳链霉菌 ATCC14672 的基因组为模板, 将默诺霉素生物合成基因簇中的 *moeA4*、*moeB4* & *moeC4* 进行克隆, 再利用 *Bcu* I 和 *Bsp*T I 限制性核酸内切酶位点将其与 *noso*-BGC 进行拼接 (图 4A), 得到了一个含有杂合 *pho*-BGC 的质粒 pJQK572 (图 4A)。用 *Nco* I 限制性核酸内切酶对质粒 pJQK572 进行酶切验证, 得到预期的琼脂糖凝胶电泳条带, 确认为构建正确的质粒 (图 4B), 为接下来 *pho*-BGC 的异源表达做好了准备。

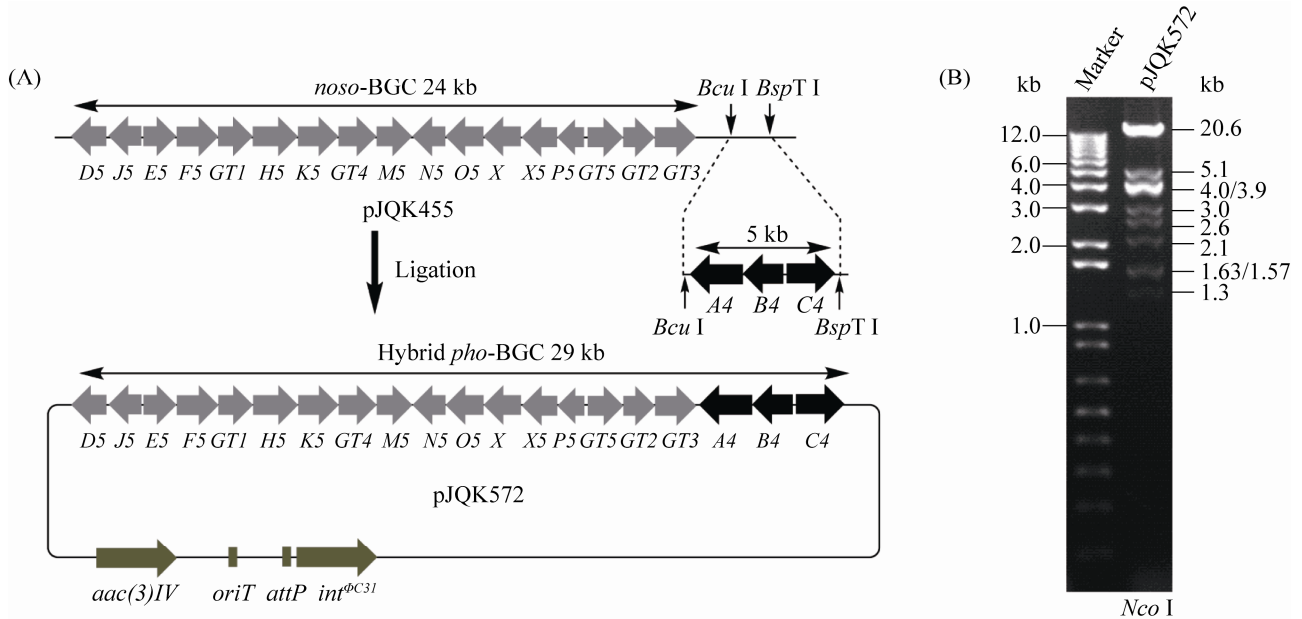


图 4 杂合福林霉素生物合成基因簇的构建示意图(A)及 pJQK572 的酶切验证结果(B)

Figure 4 Diagrammatic sketch of the hybrid pholipomycin biosynthetic gene cluster assembly (A) and verification of pJQK572 by *Nco* I restriction enzyme (B).

#### 2.4 福林霉素生物合成基因簇的异源表达分析

通过接合转移的方法,将质粒 pJQK572 分别导入天蓝色链霉菌 M1152、变铅青链霉菌 SBT18 和变铅青链霉菌 LJ1018 中,获得的接合子,分别通过引物 *pho*B4-F/*pho*B4-R 和 *Apr*-F/*Apr*-R 进行 PCR 验证,预期扩增的目的条带分别为 1 371 bp 和 761 bp (图 5A),验证成功的接合子,分别命名为 LX20 (*S. coelicolor* M1152::pJQK572)、LX21 (*S. lividans* SBT18::pJQK572) 和 LX22 (*S. lividans* LJ1018::pJQK572)。

将菌株 LX20、LX21 和 LX22 在 R5 固体培养基上进行发酵,发酵 7 d 后,采用“琼脂块”法,对以上 3 种菌株进行生物活性测试,将藤黄八叠球菌 NCTC2665 (*S. lutea* NCTC2665) 和金黄色葡萄球菌 SG511 (*S. aureus* SG511) 作为生物活性检测指示菌,考察福林霉素的产生情况(在 3 种异源宿主中导入 pSET152 作为对照

菌株,分别为 LX20-control、LX21-control 和 LX22-control)。在生物活性测试固体培养皿表面放置直径为 0.8 cm 的发酵 7 d 后的圆柱状固体培养物,37 °C 正置培养 24 h 后的活性测定结果显示,LX20 的发酵产物对藤黄八叠球菌 NCTC 2665 和金黄色葡萄球菌 SG511 有明显的抑制作用(图 5B),说明了 *pho*-BGC 可能在天蓝色链霉菌 M1152 中实现了表达。

为了进一步确定活性成分为福林霉素,接下来通过 UPLC-ESI-MS 分析在菌株 M1152 的发酵提取物,成功检测到了福林霉素的存在 (pholipomycin [M-H]<sup>-</sup>=1 596.649 0) (图 5C),同时在负离子模式下采集了福林霉素的二级质谱数据<sup>[19]</sup> (图 6)。根据 Metlin 数据库分析结果和文献调研<sup>[21]</sup>,母离子福林霉素(*m/z*=1 596.643 4 [M-H]<sup>-</sup>) 3-PG 的 C-2-羟基连接的特殊脂肪链易发生断裂生成 *m/z*=1 240.362 0 ([M-H]<sup>-</sup>) 的子离子(图 6);长脂肪链末端的双键发生断裂失去 3 个 C 原子

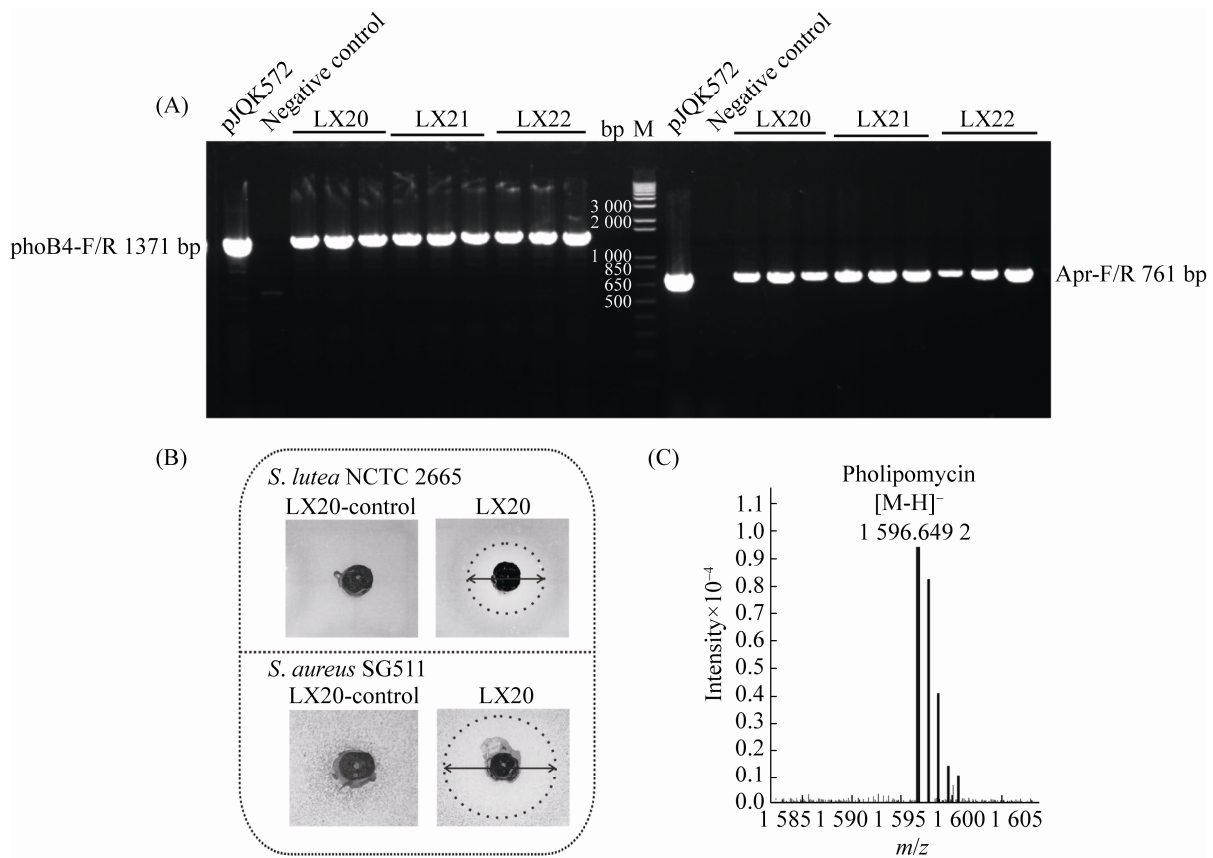


图5 福林霉素生物合成基因簇异源表达菌株的PCR验证结果(A)及菌株LX20发酵产物的生物活性测试结果(B)和菌株LX20中福林霉素的UPLC-ESI-MS检测结果(C)

Figure 5 The PCR validation results of *pho*-BGC heterologous expression strains (A) and bioactivity estimation of LX20 (B) and the result of UPLC-ESI-MS analysis of pholipomycin in LX20 (C).

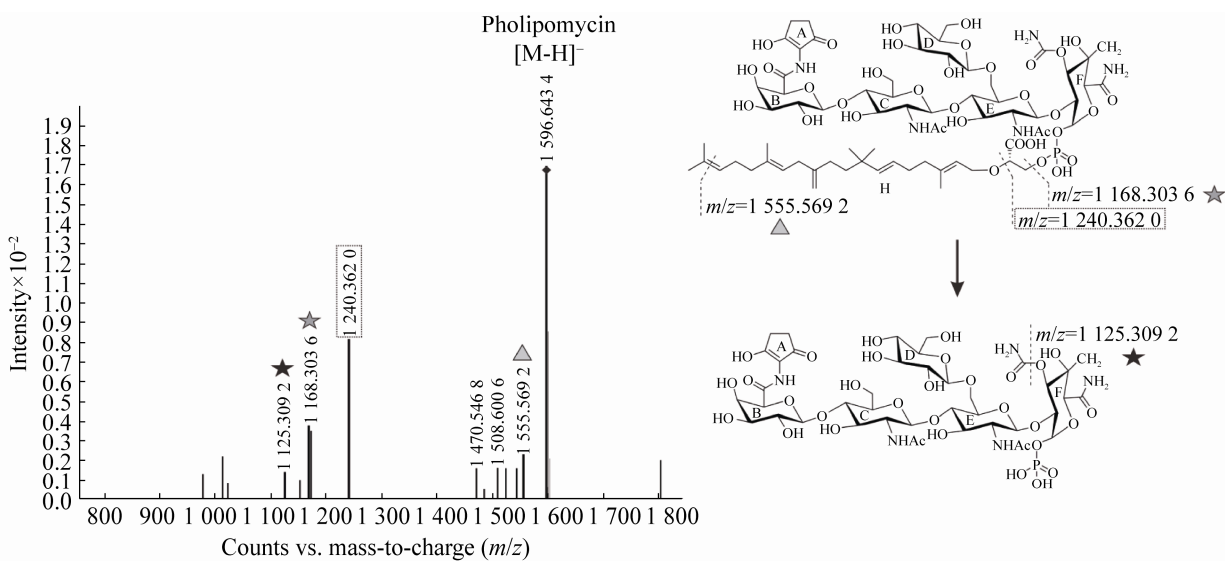


图6 菌株LX20发酵产物中福林霉素的二级质谱检测结果

Figure 6 MS/MS spectra of pholipomycin in LX20.

基团生成  $m/z=1\ 555.569\ 2$  ( $[M-H]^-$ ) 的子离子(图 6); 3-PG 的 C-1-羟基连接的羧酸基团极易发生断裂生成  $m/z=1\ 168.303\ 6$  ( $[M-H]^-$ ) 的子离子(图 6); 烯脲酰胺 F 环 C-3 位的酰胺基团 C-O 键发生断裂进一步生成  $m/z=1\ 125.309\ 2$  ( $[M-H]^-$ ) 的子离子(图 6)。基于发酵产物中福林霉素二级质谱碎片峰检测结果, 进一步确认了菌株 LX20 中福林霉素的结构。

## 2.5 福林霉素生物合成基因簇在 4 拷贝天蓝色链霉菌 M1446 中的异源表达

天蓝色链霉菌 M1152 中只含有 1 个整合位点, 基因簇只能以单拷贝的形式整合。为了进一步提高福林霉素的产量, 通过接合转移的方法将质粒 pJQK572 导入 4 拷贝的天蓝色链霉菌 M1446<sup>[9]</sup>, 得到菌株 LX23。

验证正确后, 将菌株 LX20 (*S. coelicolor* M1152::pJQK572) 和 LX23 在 R5 固体培养基中发酵培养 7 d, 在以金黄色葡萄球菌为指示菌, 利用“琼脂块”法进行检测的抑菌活性实验中, 菌株 LX23 发酵产物的抑菌圈半径增加约 15%

(图 7A), 表明了福林霉素的产量有所提升。然后, 发酵产物用等量的甲醇进行提取后进行 UPLC-ESI-MS 检测。质谱分析发现, 在菌株 LX20 和 LX23 中均成功检测到了福林霉素的产生, 通过对比两者 ESI-EIC (pholipomycin  $[M-H]^-$ =1 596.649 0) 的峰面积(图 7A), 确定了福林霉素在菌株 LX23 中的异源合成产量相比于菌株 LX20 提高了约 20%(图 7B)。以上结果表明 *pho*-BGC 在异源宿主中的多拷贝整合, 促进了福林霉素的产量提高。

## 3 讨论与结论

微生物天然产物在医学上广泛用于治疗传染病、癌症、高胆固醇和同种异体移植排斥反应等一系列疾病, 寻找新颖结构或者提升重要微生物药物的发酵产量一直备受关注<sup>[22]</sup>。在链霉菌天然产物的挖掘中, 利用异源表达来激活沉默基因簇已成为一种日渐成熟的策略<sup>[5]</sup>。本研究在获得 *noso*-BGC 后, 通过基因组装技术与来源于加纳链霉菌 ATCC14672 的 *moeA4*、

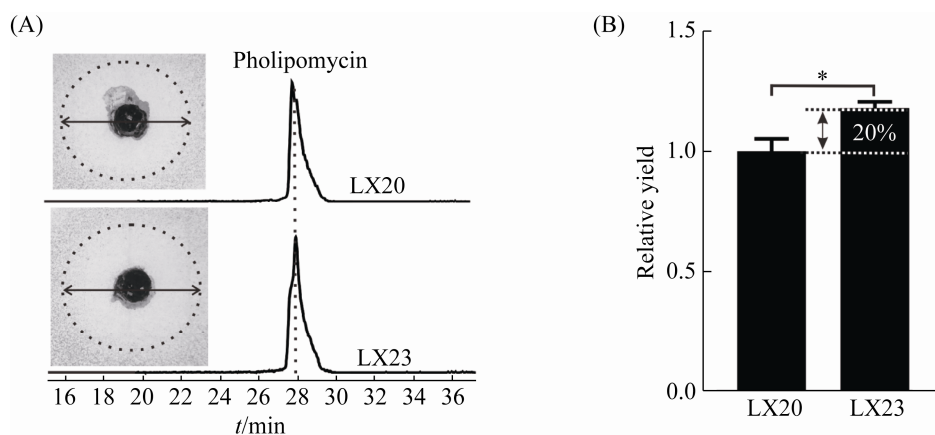


图 7 菌株 LX20 和 LX23 发酵产物中福林霉素的 UPLC-ESI-MS 分析结果及抗金黄色葡萄球菌 SG511 的生物活性检测结果(A)和 LX20 和 LX23 发酵产物中福林霉素的相对产量分析(B)

Figure 7 The results of UPLC-ESI-MS analysis of pholipomycin in strains LX20 & LX23 and bioactivity estimation of strains LX20 & LX23 against *S. aureus* SG511. ESI-EIC peaks of pholipomycin in LX20 & LX23 (A) and the relative yield of pholipomycin in LX20 & LX23 (B). \*:  $P<0.05$ , graphs depict means $\pm$ SD.

*moeB4* & *moeC4* 进行克隆与组装, 得到了完整的杂合 *pho*-BGC。不同的异源宿主具有不同的转录和代谢调控机制, 不太可能有一个统一的宿主来满足天然产物从发现到生产的所有需求, 因此选择合适的外源宿主才能保证 NP-BGCs 异源表达的成功<sup>[23]</sup>。以变铅青链霉菌和天蓝色链霉菌为 *pho*-BGC 的宿主进行异源表达, 成功在天蓝色链霉菌 M1152 的发酵产物中检测到了福林霉素的产生。推测天蓝色链霉菌对 *pho*-BGC 具有较好的兼容性, 能够支持功能基因的转录和翻译后修饰。

迄今为止, 关于天蓝色链霉菌的宿主高产改造策略层出不穷, 以单拷贝天蓝色链霉菌 1146 为出发菌株, 通过 *attB* 多位点特异性基因组工程(MSGE)构建了四拷贝的目标基因簇染色体整合修饰菌株 M1446, 通过此策略改造的多拷贝天蓝色链霉菌实现了氯霉素和抗肿瘤化合物 YM-216391 生产力的显著提高<sup>[9]</sup>。此外, 在菌株 M1446 中 *attB* 位点离散分布在基因组染色体上, 防止了目标基因簇的大片段重组<sup>[24]</sup>, 并且目标基因簇的重组质粒拷贝数对整合效率无影响<sup>[9]</sup>。为了进一步提升福林霉素异源表达产量, 我们将 *pho*-BGC 导入天蓝色链霉菌 M1446 中, 通过 R5 培养基固体发酵实现了福林霉素产量的提高, 最终福林霉素在四拷贝菌株 M1446 中的产量相比于单拷贝菌株 M1152 提高了约 20%。此外, 我们注意到, 携带多拷贝 *pho*-BGC 的菌株 M1446 在固体发酵平板上的生长较慢, 可能是由于福林霉素产量提高为宿主带来了较大的生理负担。

福林霉素可以阻断革兰氏阳性细菌细胞壁合成过程中肽聚糖单体的交联, 作用于肽聚糖糖基转移酶高度保守的氨基酸基序 EDxxFxxHxG、GxSTxTQQ 和 RKxxE<sup>[25]</sup>, 该物质与其他磷酸脂类化合物使用的数十年间, 未见病原菌对此

类化合物有明显耐药的报道<sup>[25]</sup>, 显示了重要的研究价值。本研究通过异源表达策略, 成功地在天蓝色链霉菌宿主中获得了福林霉素的合成, 为后续针对该化合物的生物合成和代谢工程优化研究奠定了较好的基础。此外, NP-BGCs 在外源宿主中的多拷贝整合是一个提高目标化合物异源表达产量的有效方法, 为促进更多新结构天然产物基因簇的表达提供了借鉴。

## 参考文献

- [1] Torikata A, Yoshikawa H, Katayama T, Arai M, Nakahara M, Kitano N. Pholipomycin, a new member of phosphoglycolipid antibiotics. III. Biological properties. *The Journal of Antibiotics*, 1977, 30(12): 1060–1063.
- [2] Sauvage E, Terrak M. Glycosyltransferases and transpeptidases/penicillin-binding proteins: valuable targets for new antibacterials. *Antibiotics*, 2016, 5(1): 12.
- [3] Yu JY, Cheng HJ, Wu HR, Wu WS, Lu JW, Cheng TJ, Wu YT, Fang JM. Structure-based design of bacterial transglycosylase inhibitors incorporating biphenyl, amine linker and 2-alkoxy-3-phosphorylpropanoate moieties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 150: 729–741.
- [4] Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, 2016, 529(7586): 336–343.
- [5] Huo LJ, Hug JJ, Fu CZ, Bian XY, Zhang YM, Müller R. Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways. *Natural Product Reports*, 2019, 36(10): 1412–1436.
- [6] Liu R, Deng ZX, Liu TG. *Streptomyces* species: ideal chassis for natural product discovery and overproduction. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 74–84.
- [7] Myronovskiy M, Rosenkränzer B, Nadmid S, Pujic P, Normand P, Luzhetskyy A. Generation of a cluster-free *Streptomyces albus* chassis strains for improved heterologous expression of secondary metabolite clusters. *Metabolic Engineering*, 2018, 49: 316–324.
- [8] Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(2): 207–215.



- [9] Li L, Zheng GS, Chen J, Ge M, Jiang WH, Lu YH. Multiplexed site-specific genome engineering for overproducing bioactive secondary metabolites in actinomycetes. *Metabolic Engineering*, 2017, 40: 80–92.
- [10] Peng QY, Gao GX, Lü J, Long QS, Chen XF, Zhang F, Xu M, Liu K, Wang YM, Deng ZX, Li ZY, Tao MF. Engineered *Streptomyces lividans* strains for optimal identification and expression of cryptic biosynthetic gene clusters. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3042.
- [11] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 204–211.
- [12] Wallhausser KH, Neseemann G, Prave P, Steigler A. Moenomycin, a new antibiotic. I. Fermentation and isolation. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*, 1965, 5(1): 734–736.
- [13] Meng ST, Wu H, Wang L, Zhang BC, Bai LQ. Enhancement of antibiotic productions by engineered nitrate utilization in actinomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(13): 5341–5352.
- [14] Zhao ZL, Shi T, Xu M, Brock NL, Zhao YL, Wang YM, Deng ZX, Pang XH, Tao MF. Hybrubins: bipyrrole tetramic acids obtained by crosstalk between a truncated undecylprodigiosin pathway and heterologous tetramic acid biosynthetic genes. *Organic Letters*, 2016, 18(3): 572–575.
- [15] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Nagaraja Rao R, Schoner BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.. *Gene*, 1992, 116(1): 43–49.
- [16] Li L, Xu ZN, Xu XY, Wu J, Zhang Y, He XY, Zabriskie TM, Deng ZX. The mildiomycin biosynthesis: initial steps for sequential generation of 5-hydroxymethylcytidine, 5'-monophosphate and 5-hydroxymethylcytosine in *Streptoverticillium rimofaciens* ZJU5119. *ChemBioChem*, 2008, 9(8): 1286–1294.
- [17] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical *Streptomyces* genetics. Colney: *John Innes Foundation*, 2000: 125–158.
- [18] Lü J, Long QS, Zhao ZL, Chen L, He WJ, Hong JL, Liu K, Wang YM, Pang XH, Deng ZX, Tao MF. Engineering the erythromycin-producing strain *Saccharopolyspora erythraea* HOE107 for the heterologous production of polyketide antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 593217.
- [19] Ostash B, Doud EH, Lin C, Ostash I, Perlstein DL, Fuse S, Wolpert M, Kahne D, Walker S. Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway. *Biochemistry*, 2009, 48(37): 8830–8841.
- [20] Horbal L, Ostash B, Luzhetskyy A, Walker S, Kalinowski J, Fedorenko V. A gene cluster for the biosynthesis of moenomycin family antibiotics in the genome of teicoplanin producer *Actinoplanes teichomyceticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(17): 7629–7638.
- [21] Eichhorn P, Aga DS. Characterization of moenomycin antibiotics from medicated chicken feed by ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19(15): 2179–2186.
- [22] Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 2009, 62(1): 5–16.
- [23] Myronovskiy M, Luzhetskyy A. Heterologous production of small molecules in the optimized *Streptomyces* hosts. *Natural Product Reports*, 2019, 36(9): 1281–1294.
- [24] Li L, Liu XC, Jiang WH, Lu YH. Recent advances in synthetic biology approaches to optimize production of bioactive natural products in actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2467.
- [25] Ostash B, Walker S. Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, and biological activity. *Natural Product Reports*, 2010, 27(11): 1594–1617.

(本文责编 李磊)