

Brasilicardin A 生物合成相关二萜合酶的异源表达及产物鉴定

葛祥宇¹, 周广鑫¹, 熊娜¹, 卢姿含¹, 米苾雨¹, 朱枝祥¹, 刘 晓¹, 王晓晖¹,
王 娟^{1,2*}, 史社坡^{1*}

(1. 北京中医药大学, 中药现代研究中心, 北京 102488; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 从致病性放线菌 *Nocardia brasiliensis* IFM 0406 中得到的二萜糖苷 brasilicardin A, 因免疫抑制活性显著、毒性较低且作用机制独特而成为新型免疫抑制剂的候选分子。由于原菌株中产率低, 且结构复杂、化学合成困难, brasilicardin A 及其类似物的获得成为该类新型免疫抑制剂的研究热点。根据目前报道的 brasilicardin A 可能的生物合成途径, 通过生物信息学分析生物合成相关二萜合酶, 定向从致病菌株 *N. brasiliensis* IFM 0406 中扩增可能合成 brasilicardin A 骨架的基因 *bra1~5*, 在白色链霉菌 *Streptomyces albus* R1 中成功实现异源表达。通过液体发酵培养, 利用硅胶柱色谱及半制备液相色谱等方法进行化合物的分离纯化, 共分离到 6 个新 brasilicardins 化合物, 命名为 brasilicardin H~M。利用脂多糖 (LPS) 活化的小鼠原代巨噬细胞炎症模型对分离鉴定的 brasilicardins 进行了体外活性筛选, 结果显示, brasilicardin H~M 具有较强抑制巨噬细胞释放一氧化氮 (NO) 的作用, IC_{50} 分别为 28.24 ± 3.70 、 37.44 ± 2.00 、 39.85 ± 4.02 、 26.77 ± 4.40 、 65.25 ± 1.48 、 $15.24 \pm 2.72 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (阳性对照吡咯美辛 IC_{50} 为 $34.28 \pm 4.10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 表明 6 个化合物具有潜在的抗炎活性。本研究为 brasilicardin A 生物合成途径的彻底阐明提供了条件, 也为研究该类化合物的构效关系、药物研发等奠定了基础。

关键词: brasilicardin A; 二萜合酶; 异源表达; 免疫抑制活性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)07-2161-10

Heterologous expression and product identification of diterpene synthase involved in the biosynthesis of brasilicardin A

GE Xiang-yu¹, ZHOU Guang-xin¹, XIONG Na¹, LU Zi-han¹, MI Xin-yu¹, ZHU Zhi-xiang¹,
LIU Xiao¹, WANG Xiao-hui¹, WANG Juan^{1,2*}, SHI She-po^{1*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Brasilicardin A, a diterpene glycoside isolated from pathogenic actinomycete *Nocardia brasiliensis* IFM 0406, has become a novel immunosuppressant candidate due to its significant immunosuppressive activity, low toxicity and unique mechanism of action. However, brasilicardin A and its analogues have become a research hotspot to the development of this promising immunosuppressant because of the low-yield production in the natural pathogenic producer and the synthetically challenging skeleton. According to the reported biosynthetic pathway of brasilicardin A, the function of involved diterpene synthase was analyzed by bioinformatics. Then the genes *bra1-5* that synthesize the brasilicardin A skeleton were directionally amplified from the pathogenic strain

收稿日期: 2024-01-27; 修回日期: 2024-05-07.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81903495); 天然药物活性物质与功能国家重点实验室开放课题 (GTZK202203).

*通讯作者 Tel: 86-10-53911868, E-mail: wjwangjuan2012@163.com; shishepo@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0089

N. brasiliensis IFM 0406, and heterologous expression was achieved successfully in *Streptomyces albus* R1. The compounds were isolated and purified by using various column chromatographies including silica gel column chromatography and semi-preparative HPLC. Six new brasilicardins were established and named brasilicardin H–M. The activity of brasilicardins was screened using lipopolysaccharide (LPS)-activated mouse primary macrophage inflammation model. Brasilicardin H–M exhibited good inhibitory activity on nitric oxide (NO) release with IC_{50} values of 28.24 ± 3.70 , 37.44 ± 2.00 , 39.85 ± 4.02 , 26.77 ± 4.40 , 65.25 ± 1.48 and $15.24 \pm 2.72 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively (indomethacin as the positive control with IC_{50} value of $34.28 \pm 4.10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The results indicated that six compounds had potential anti-inflammatory activity. This study laid a foundation for the elucidation of the brasilicardin A biosynthetic pathway and evaluation of the structure-activity relationship as well as new drug developments.

Key words: brasilicardin A; diterpene synthase; heterologous expression; immunosuppressive activity

Brasilicardin A 是从致病性放线菌 *Nocardia brasiliensis* IFM 0406 中发现的具有显著免疫抑制作用的二萜类化合物, 其独特的作用机制开辟了免疫抑制剂研究新领域^[1,2]。但 brasilicardin A 的原始菌株的致病性和 brasilicardin A 合成的挑战性使得 brasilicardin A 及其类似物的高效获得还存在一定的瓶颈^[3,4]。二萜合酶 (diterpene synthases, DTSs) 是二萜类化合物结构合成的关键酶, 起到环化、结构多样性的作用。Brasilicardin A 完整的生物合成基因簇尚未阐明, 对已报道的 brasilicardin A 可能的生物合成途径相关基因进行生物信息学分析, brasilicardin A 生物合成途径相关基因簇由鲨烯环氧化酶 (*bra5*)、二萜环合酶 (*bra4*) 以及其他后修饰基因等在共 12 个基因 (*bra0~11*) 构成 (图 1)。其中 Bra4 能环合生成 brasilicardin A 的骨架, 经过系统进化分析发现 Bra4 属于非典型 II 型二萜合酶, 序列 GC 含量高, 其缺少典型二萜合酶的 DXDD 保守结构域但含有特异的 E/DSAE/N 结构域, 且利用以 epoxy-GGPP (geranylgeranyl pyrophosphate) 为底物而非传统的 GGPP, 是目前很罕见的一类细菌二萜合酶^[5], Bra4 独特的酶结构和催化机制可以合成特异的反式/顺式/反式三环二萜, 但 Bra4 的直接环化产物目前尚未解析, 其免疫抑制活性也并不明确。

异源表达宿主能弥补原始菌株生长环境苛刻且生长速率缓慢、分子生物学工具匮乏、产量低、菌株致病性等缺点^[6], 在活性天然产物产量的提高、生物合成基因簇的鉴定、新颖化合物的发现以及生物合成途径的改造实现结构的衍生化方面越来越受到科研工作者的重视^[7]。例如: 合成抗肿瘤药物的重要先导化合物星形孢菌素 (staurosporine) 在异源宿主 *Streptomyces albus* J1074 中产量提高 30 倍^[8]; 在 *Myxococcus xanthus* DK1622 宿主菌中异源表达了 vioprolide 生物合成基因簇并实现了 vioprolides 的高产^[9]; 在 *Streptomyces coelicolor* 中异源表达来自“沉默”的生物合成基因簇 *tar* 揭示了两种新

型脂肽类抗生素 taromycin A2 和 B3^[10,11]; 在 *Aspergillus oryzae* 中异源表达隐秘基因簇 *cle*, 获得了二萜化合物 chevalone E 及其氧化类似物, 替换其中萜烯环化酶基因产生了 sartorypyrone D^[12]。抗癌药物前体吉马烯 A (germacrene A) 的生物合成路径在解脂耶氏酵母中重编程提高产量至 $39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[13]。文多灵 (vindoline) 和长春花碱 (catharanthine) 也在酵母中实现从头合成^[14]。目前多种异源表达宿主已凭借自身独特的优势在实现多种类型化合物的生物合成和新型活性分子的发现方面取得了巨大的成果。

因此利用基因簇中关键的二萜环合酶在其他同源微生物中外源合成 brasilicardins, 为解决目前 brasilicardin A 及类似物稀缺、化合物资源限制药物研发的瓶颈提供物质基础。考虑到 Bra4 直接环化产物不稳定难以检测到, 异源表达时加入后修饰基因 *bra3*, 同时基于链霉菌宿主有利于异源表达高 GC 含量的基因组 DNA 的优势, 本课题将合成 brasilicardin A 二萜母核基因 *bra1~5*^[5] 在链霉菌宿主 *Streptomyces albus* R1 中异源表达, 从其发酵产物中分离鉴定了 6 个新化合物 brasilicardin H~M, 活性检测结果显示 brasilicardin H~M 具有较强抑制脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠原代巨噬细胞释放一氧化氮 (NO) 的作用, 为后续阐明 brasilicardin A 的生物合成途径以及筛选活性显著的 brasilicardins 活性分子奠定了基础。

材料与方法

试剂 巴西诺卡菌 *N. brasiliensis* IFM 0406 基因组 DNA 购自千叶大学真菌医学研究中心; 硫酸阿布拉霉素 (apramycin sulfate, Apr)、卡那霉素 (kanamycin, Kana)、氯霉素 (chloramphenicol, Chl) 以及萘啶酮酸均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; DNA 连接酶和 Pfu 高保真 DNA 聚合酶购自北京全式金生物科技有限公司; 限制性内切酶购自北京宝日医生物科技有

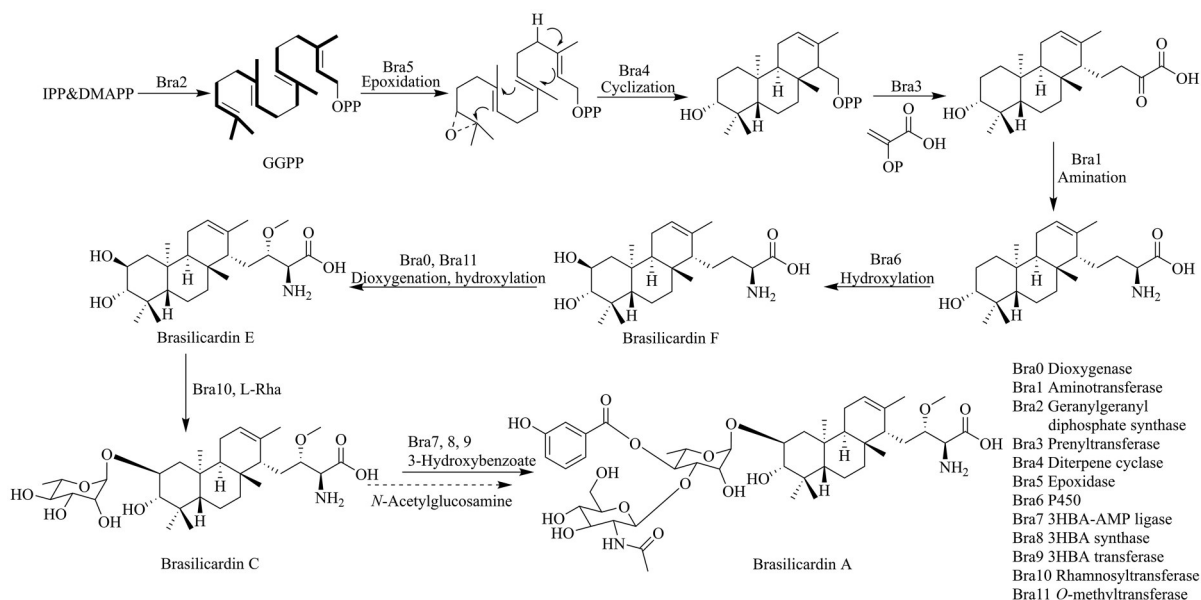


Figure 1 Proposed biosynthetic pathway of brasilicardin A

限公司; 乙酸乙酯、无水乙醇、甲醇等分析纯试剂购自西陇科学股份有限公司; 甲酸、乙酸采购自天津市大茂化学试剂厂。

仪器 R-210旋蒸仪购自瑞士BUCHI公司; UVP凝胶成像仪、凝胶电泳仪购自美国BioRad公司; NanoDrop 2000C分光光度计购自美国ThermoFisher Scientific公司; 化合物分析、精确分子量以及二级质谱数据采集采用高效液相离子阱飞行时间质谱分析系统 (UFLC SIL-20AC自动进样器, CTO-20AC柱温箱, SPD M20A紫外检测器, LC-20ADXR泵, IT-TOF-MS配备ESI离子源) 购自日本Shimadzu公司; 化合物的制备采用Waters 2998半制备型高效液相色谱仪以及SunFire™ C₁₈半制备柱 (150 mm×10 mm, 5 μm), 美国Waters公司; 化合物结构解析采用美国Varian 500M核磁共振仪。摇床购自北京京创泰宁伟业科技发展有限公司; 电转仪、梯度PCR仪、高速离心机购于德国Eppendorf公司; 恒温培养箱购自上海精宏实验设备有限公司。

实验动物 雄性无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级C57BL/6小鼠15只, 8周龄, 体重20~25 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 (许可证号: SCXK (京) 2019-0010), 饲养于北京中医药大学实验动物中心屏障环境, 室温20~24 °C, 相对湿度45%~65%。本研究方案通过北京中医药大学实验动物伦理委员会审核。

菌株、质粒和引物 本文所用菌株、质粒和引物见表1 (所用引物均由深圳华大基因股份有限公司合成)。

基因的克隆与整合型质粒的构建 以巴西诺卡菌 *N. brasiliensis* IFM 0406 基因组DNA为模板, Primer 1和Primer 2为引物, PCR扩增后可得到6 kb大小的含 *bral*~5 基因片段, 基因测序正确后, 利用 *Nde* I 和 *Xba* I 限制性核酸内切酶位点将该片段连接到整合型载体 pIB139 上, 得到含有 *bral*~5 基因的质粒 pGXY1。

Table 1 Strains, plasmids and primers used in this study (*E. coli*: *Escherichia coli*; *S. albus* R1: *Streptomyces albus* R1; Cm^r: Chloramphenicol; Km^r: Kanamycin; Apr^r: Apramycin sulfate)

Category name	Description	
Strains	<i>E. coli</i> DH5a	General cloning host
	<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002)	Cm ^r , Km ^r , donor strain for conjugation
	<i>S. albus</i> R1	Wild strain
Plasmids	GXY01	The <i>S. albus</i> R1 strain harboring plasmid pGXY1
	pIB139	Integrative plasmid, harboring a <i>PerME*</i> promoter, Apr ^r , OriT _{RK2} , φC31 int/attP
	pGXY1	<i>bral</i> ~5 gene under the control of promoter <i>PerME*</i> in plasmid pIB139
Primers (5'~3')	Primer 1	taggatccacatagATGGTGAATTCGGAGAATGGGTC
	Primer 2	cgcgcatcctctagaTCAGCACATCGCTCCTCGA
	Primer 3	ATGACCACCCGCACGATCGA
	Primer 4	GCCATCGTCGTCCTTCTGTC

接合转移与接合子的筛选 首先将 *E. coli* ET12567/pUZ8002 制备电转感受态细胞, 将用于接合转移的质粒 pGXY1 通过电转化的方法导入 *E. coli* ET12567/pUZ8002 中, 筛选阳性克隆。将 *S. albus* R1 的甘油菌涂布在新鲜的 SFM 固体板^[15]上, 30 °C 培养箱倒置孵育 3 天以获得孢子, 将携带质粒 pGXY1 的 *E. coli* ET12567/pUZ8002 在 37 °C 恒温摇床以转速 180 r·min⁻¹ 振荡培养过夜, 次日按照 1% 的比例接种到 20 mL 含有 50 μg·mL⁻¹ Kana、25 μg·mL⁻¹ Chl 和 50 μg·mL⁻¹ Apr 的 LB (Luria-Bertani)^[16]液体培养基中, 37 °C 恒温摇床以转速 180 r·min⁻¹ 振荡培养至 OD₆₀₀ 值 0.2~0.6, 7 600 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集菌体, 用 20 mL 2×YT 培养基^[15]漂洗 2 次后, 重悬于 300 μL 2×YT 培养基中, 作为供体细胞; 用接种环刮取在 SFM 固体板上孵育的 *S. albus* R1 的孢子, 用 2×YT 培养基漂洗去掉菌丝后, 将孢子重悬于 200 μL 2×YT 培养基中, 50 °C 热激 10 min 后, 室温放置 10 min 使孢子萌发, 作为受体; 将供体细胞与受体细胞混合, 在含 CaCl₂ 和 MgCl₂ 的 ISP4 固体板^[17]上 30 °C 孵育 16~20 h 后用 50 μg·mL⁻¹ Apr 及 40 μg·mL⁻¹ 的萘啶酮酸覆盖, 待 ISP4 平板在无菌超净台静置晾干后, 倒置培养 5 天可以观察到接合子。将接合子再次接种到含 50 μg·mL⁻¹ 硫酸阿布拉霉素及 40 μg·mL⁻¹ 的萘啶酮酸的新鲜 SFM 培养皿上, 倒置培养于 30 °C 恒温培养箱。3~5 天后可观察到链霉菌菌丝体和孢子的生成, 取适量孢子加少量 DMSO 涡旋 2 min 后作为模板用 Primer 3 和 Primer 4 引物 PCR 扩增质粒载体上的基因, 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 *S. albus* R1/pGXY1, 命名为 GXY01。

链霉菌的培养与保藏 使用无菌接种环将菌株 GXY01 的孢子均匀涂布在 SFM 固体培养基表面, 将其放置在 30 °C 恒温培养箱倒置培养 5 天, 当观察到链霉菌的白色孢子时, 用无菌接种环从培养基表面轻轻刮取孢子, 重悬于装有 20% 无菌甘油的冻存管中, 振荡混匀后液氮速冻于 -80 °C 保藏。

链霉菌的发酵和样品制备 链霉菌宿主发酵采用 A 液体培养基^[18]。将所得突变株和相应的对照菌株接种于无菌的含有 50 μg·mL⁻¹ Apr 的 A 液体培养基中, 在 30 °C 恒温摇床以转速 180 r·min⁻¹ 振荡培养 1 天后得到发酵种子液。以 5% 比例将种子液均匀接种于无菌的含有 50 μg·mL⁻¹ Apr 的 A 液体培养基中, 在 30 °C 恒温摇床以转速 180 r·min⁻¹ 振荡培养 5 天后得到发酵液。发酵完成后, 4 500 r·min⁻¹ 离心 20 min 将菌体和菌液分离, 分别用乙酸乙酯萃取 3 次获得发酵产物萃取液, 减压浓缩后用 1 mL 甲醇溶解, 12 000 r·min⁻¹ 低温离心 15 min, 取上清用于 HPLC-IT-TOF 检测分析的发酵样品。

发酵产物的分离纯化 选取突变株 GXY01 为发酵菌株, 用无菌接种环将 GXY01 的孢子接种于无菌的含有 50 μg·mL⁻¹ Apr 的 50 mL A 液体培养基中, 于 30 °C 振荡培养 1 天获得种子液。配制 15 L A 液体培养基, 以 5% 比例将种子液均匀接种于无菌的含有 50 μg·mL⁻¹ Apr 的 A 液体培养基中, 在 30 °C 恒温摇床以转速 180 r·min⁻¹ 振荡培养 5 天后得到发酵液。发酵完成后, 4 500 r·min⁻¹ 离心 20 min 将菌体和菌液分离, 分别用乙酸乙酯萃取 3 次获得发酵产物萃取液, 减压浓缩后获得发酵粗产物 2 g。将所有粗产物上样于凝胶分离柱, 采用甲醇-0.1% 甲酸水等度洗脱, 共收集 12 瓶馏分, 编号依次为 Fr.1~Fr.12。Fr.8 (203.7 mg) 通过 prep-HPLC 制备 (乙腈-0.2% 乙酸水 60:40, 流速: 3 mL·min⁻¹), 得到馏分 Fr.8.1~Fr.8.4。Fr.8.2 (10.7 mg) 通过 prep-HPLC 制备 (甲醇-0.2% 乙酸水 70:30, 流速: 3 mL·min⁻¹), 得到化合物 brasilicardin L ($t_R = 25$ min, 3.1 mg) 和化合物 brasilicardin K ($t_R = 45$ min, 3.9 mg)。Fr.8.4 (107.7 mg) 通过 prep-HPLC 制备 (甲醇-0.2% 乙酸水 75:25, 流速: 3 mL·min⁻¹), 得到化合物 brasilicardin M ($t_R = 30$ min, 4.7 mg)。Fr.11 (658.7 mg) 通过 prep-HPLC 制备梯度洗脱 (A: 0.2% 乙酸水; B: 乙腈; 流速: 3 mL·min⁻¹), 梯度洗脱程序为 0~20 min 5%~95% B, 20~26 min 95% B, 26~26.10 min 95%~5% B, 26.10~31 min 5% B, 得到馏分 Fr.11.1~Fr.11.4。Fr.11.2 (225.3 mg) 通过 prep-HPLC 制备 (乙腈-0.2% 乙酸水 70:30, 流速: 3 mL·min⁻¹), 得到馏分 Fr.11.2.1~Fr.11.2.9。Fr.11.2.5 (14 mg) 通过 prep-HPLC 制备 (甲醇-0.2% 乙酸水 58:42, 流速: 3 mL·min⁻¹), 得到化合物 brasilicardin I ($t_R = 18$ min, 5.0 mg)。Fr.11.2.7 (8 mg) 通过 prep-HPLC 制备 (甲醇-0.2% 乙酸水 65:35, 流速: 3 mL·min⁻¹), 得到 brasilicardin H ($t_R = 19$ min, 4.8 mg)。Fr.11.2.9 (32 mg) 通过 prep-HPLC 制备 (甲醇-0.2% 乙酸水 65:35, 流速: 3 mL·min⁻¹), 得到化合物 brasilicardin J ($t_R = 28$ min, 14.0 mg)。

底物饲喂 链霉菌宿主菌株 *S. albus* R1 接种于 5 mL A 液体培养基中, 同时设置空白对照组 (即 5 mL 无 *S. albus* R1 的 A 液体培养基) 在 30 °C 恒温摇床以转速 180 r·min⁻¹ 振荡培养 1 天后, 分别加入 5 μL 25 mmol·L⁻¹ 的化合物 brasilicardin H~M 作为底物饲喂到宿主菌 *S. albus* R1 中, 并同时加入 5 μL 25 mmol·L⁻¹ 的化合物 brasilicardin H~M 作为空白对照组。在 30 °C 恒温摇床以转速 180 r·min⁻¹ 振荡培养 5 天后得到发酵液。发酵完成后, 用乙酸乙酯萃取 3 次获得发酵产物萃取液, 减压浓缩后用 500 μL 甲醇溶解, 12 000 r·min⁻¹ 低温离心 15 min, 取上清用于 HPLC-IT-

TOF 检测分析的发酵样品。

色谱条件 产物检测条件采用 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 梯度洗脱采用溶剂 A (0.1% 甲酸水) 和溶剂 B (乙腈), 梯度洗脱程序为 0~2 min 5% B, 2~22 min 5%~95% B, 22~28 min 95% B, 28~28.10 min 95%~5% B, 28.10~33 min 5% B。进样量 20 μL, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C。底物饲喂检测条件采用 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 梯度洗脱采用溶剂 A (0.1% 甲酸水) 和溶剂 B (甲醇), 梯度洗脱程序为 0~5 min 50% B; 5~9 min 50%~70% B; 9~14 min 70% B; 14~24 min 70%~90% B; 24~25 min 90%~100% B; 25~30 min 100% B; 30~31 min 100%~50% B; 31~36 min 50% B。进样量 20 μL, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C。

质谱条件 离子源为电喷雾离子源 (electron spray ionization, ESI), 扫描模式为正、负离子同时扫描并自动触发多级质谱, MS¹ 的质量扫描范围 m/z 100~1 000, MS² 的质量扫描范围 m/z 50~800。喷雾室电压 4.5~3.5 kV; 雾化气 (N₂) 流速: 1.5 L·min⁻¹; 干燥气体压力 100 MPa; 检测电压 1.5 kV; CDL 温度 200 °C; 碰撞诱导解离 (CID) 能量为 70%。

ECD 计算 首先使用分子力场 MMFF94 进行构象搜索。然后, 在 Molclus (版本 1.9.9.4) 软件中基于 xtb 程序使用 GFN-xTB 方法进行结构优化。选择相对能量低于 5 kcal·mol⁻¹ 的构象通过 Gaussian 09 软件气相条件下在 B3LYP/6-31G (d) 水平进行进一步优化。溶剂化能通过自洽反应场 (SCRF) 使用 SMD 连续溶剂化模型在 M052X/6-31G (d) 水平下评估, 溶剂为甲醇。单点能在 M062X/def2-TZVP 水平下计算得到。最后, 得到每个结构的最低能量构象。然后选择玻尔兹曼系数大于 1% 的构象进行 ECD 计算。使用含时密度泛函理论 (TD-DFT) 在 Cam-B3LYP/6-311G (d,p) 水平下进行 ECD 计算。ECD 光谱由最低能量构象的玻尔兹曼加权生成。

生物活性检测 收集雄性 C57BL/6 小鼠原代巨噬细胞, 将细胞数稀释到每毫升 1.5×10⁶ 个, 接种 100 μL 到 96 孔板中, 每孔 1.5×10⁴ 个, 细胞培养箱孵育过夜。单体化合物配制成 25 mmol·L⁻¹ 浓度母液, 然后用培养基稀释后加入 96 孔培养板至终浓度为 100、20、4 μmol·L⁻¹, 培养箱孵育 15 min, 再加入 LPS 至终质量浓度为 1 μg·mL⁻¹, 继续孵育 24 h。从 96 孔板各孔中吸取 100 μL 上清至酶标板内, 每孔加入 50 μL Griess R1, 室温反应 5 min, 再加入 50 μL Griess R2, 室温反应 5 min, 540 nm 测定吸光度, 并计算各孔 NO 浓度和化合物对 NO 分泌的抑制率, 抑制率 > 50% 的计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。在上述 96 孔板中加入 10 μL CCK-8, 继续置于细胞培养箱内孵育 90 min 后测定 450 nm 吸光度, 并计算化合物对原代巨噬细胞生长的抑制率。

结果与分析

1 Brasilicardin A 生物合成基因簇中二萜母核基因 *bra1*~5 的异源表达

根据目前已知的 brasilicardin A 的生物合成途径可知, *N. brasiliensis* IFM 0406 基因组中 *bra1*~5 负责合成 brasilicardin A 母核。将其与 pIB139 载体连接后, 得到了含有基因 *bra1*~5 的质粒 pGXY1。通过接合转移的方法, 将质粒 pGXY1 导入白色链霉菌 *S. albus* R1 中, 将获得的接合子通过引物 Primer 3 和 Primer 4 进行 PCR 验证, 验证成功的接合子命名为 GXY01。利用 HPLC-IT-TOF 对重组菌株 GXY01 的发酵液进行检测。结果显示, 与对照菌株相比, 重组菌株中多出质荷比 m/z 378.299 9 [M+H]⁺、376.283 5 [M+H]⁺、377.269 1 [M-H]⁻、375.253 8 [M-H]⁻ 的准分子离子峰 (图 2)。经过分子式预测可能为二萜母核相关的化合物。

2 目标化合物的结构解析

从重组菌株 GXY01 发酵液中分离得到的化合物 brasilicardin H~M 均为二萜类化合物 (图 3、4), 分子结

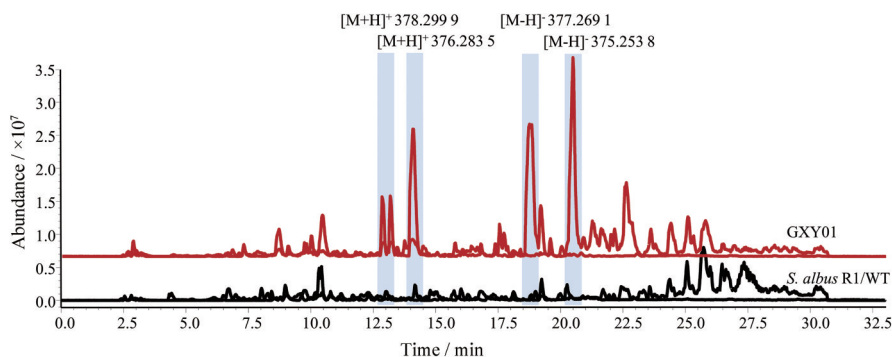


Figure 2 HPLC-IT-TOF analyses of heterologous expression strains (GXY01) and wild-type *S. albus* R1

构由罕见的反式/顺式/反式全氢菲母核和氨基酸部分组成。

化合物 **1** 为白色粉末, HR-ESI-MS 中给出准分子离子峰 $[M+H]^+$: m/z 378.299 9 (calcd. for 378.300 8), 提示分子式为 $C_{23}H_{39}NO_3$, 计算不饱和度为 5。

1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) 谱图中给出一个烯氢信号: δ_H 5.26 (1H, m, H-12); 一个连氮次甲基氢信号: δ_H 3.07 (1H, t, $J = 5.9$ Hz, H-17); 一个连氧次甲基氢信号: δ_H 2.97 (1H, m, H-3) 以及五个甲基氢信号: δ_H 1.61 (3H, s, H-23)、0.97 (3H, s, H-21)、0.90 (3H, s, H-22)、0.86 (3H, s, H-20)、0.77 (3H, s, H-19)。

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) 谱图中给出 23 个碳信号, 包括一个羧基碳信号: δ_C 169.9 (C-18); 一组双键碳信号: δ_C 137.0 (C-13)、121.8 (C-12); 一个连氧碳信号: δ_C 77.1 (C-3); 一个连氮碳信号: δ_C 54.9 (C-17); 五个甲基碳信号: δ_C 28.4 (C-20)、27.0 (C-21)、22.9 (C-22)、22.9 (C-23)、16.0 (C-19)。综合 1H NMR、 ^{13}C NMR 数据 (表 2) 推测化合物 **1** 存在一个二萜母核。

通过 2D NMR 实验进一步确定了化合物 **1** 的结构。HMBC 谱图中, H-1 与 C-3/C-5 相关; H-2 与 C-4/C-10 相关; H-6 与 C-8/C-10 相关; H-7 与 C-5/C-9 相关; H-9 与 C-5/C-14 相关; H-11 与 C-8/C-13 相关; H-12 与 C-9/C-14 相关; H-14 与 C-16 相关; H-15 与 C-8 相关; H-17 与

C-15 相关; H₃-19/H₃-20 与 C-3/C-5 相关; H₃-21 与 C-1/C-9 相关; H₃-22 与 C-7/C-14 相关; H₃-23 与 C-12/C-14 相关 (图 3), 确定了化合物 **1** 的平面结构。

根据 brasilicardins 生物合成途径分析可知该类型化合物的二萜母核构型十分保守, 同时对比 brasilicardin E^[4] 的核磁数据, 发现化合物 **1** 相比 brasilicardin E 在 2 位少一个羟基, 16 位少一个甲氧基, 结合 ROESY 谱图中 H-3 与 H-5 相关, H₃-20/H₃-22 与 H-6a 相关, H-7a 与 H-14 和 H-5 相关、H-9 与 H-15a 相关。以上结果表明, H-11b 和 H₃-19 为 α 取向, H-3、H-5、H-6a、H-14 和 H₃-20 为 β 取向。因此化合物 **1** 的绝对构型为 3*R*, 5*S*, 8*S*, 9*S*, 10*S*, 14*S*, 17*S*, 命名为 brasilicardin H。

化合物 **2** 为白色粉末, HR-ESI-MS 中给出准分子离子峰 $[M+H]^+$: m/z 378.300 2 (calcd. for 378.300 8), 提示分子式为 $C_{23}H_{39}NO_3$, 计算不饱和度为 5。比较二者的 NMR 数据 (表 2) 发现化合物 **2** 的数据与 **1** 十分相似, 两者区别在化合物 **2** 中 1 位至 5 位的碳谱数据向高场位移, 提示其可能为 **1** 的差向异构体。ROESY 谱图中给出 H-3 与 H₃-21 相关信号, 表明 H-3 为 α 取向。综上所述, 确定化合物 **2** 的 3 位绝对构型为 *S* 构型, 其他部分结构与化合物 **1** 一致, 命名为 brasilicardin I。

化合物 **3** 为白色粉末, HR-ESI-MS 中给出准分子离子峰 $[M+H]^+$: m/z 376.283 5 (calcd. for 376.285 2), 提

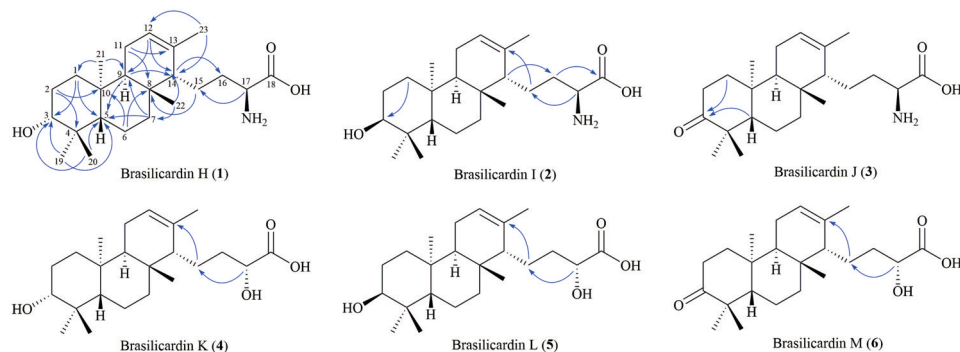


Figure 3 Chemical structures and key HMBC correlations of brasilicardin H-M (1-6)

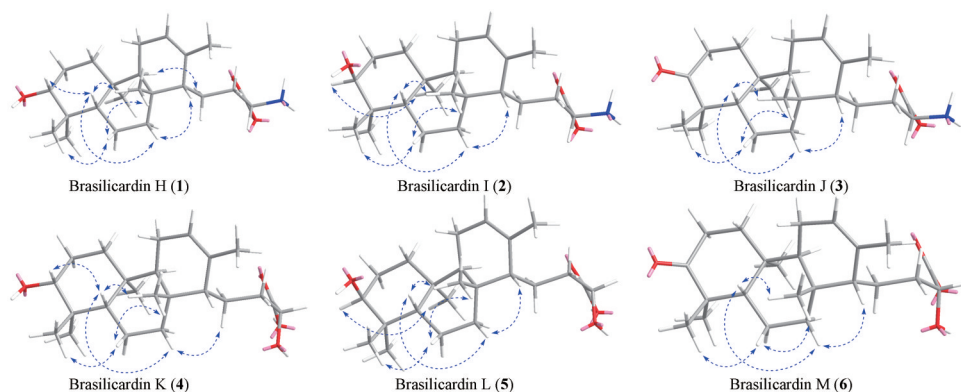


Figure 4 Key ROESY relations of brasilicardin H-M (1-6)

示分子式为 $C_{23}H_{37}NO_3$, 计算不饱和度为6。综合 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据 (表2) 发现化合物**3**的数据与**1**十分相似, 两者区别仅在**1**的3位氢信号消失, 碳信号向低场位移 (δ_c 218.0), 推测3-OH在**3**中被氧化为羰基。HMBC谱图中给出了H-1/H-5与羰基碳C-3存在相关, 进一步证明了以上推断。通过详细的HMBC与HSQC信号分析 (图3) 确定化合物**3**的其他部分结构与**1**一致。此外, 化合物**3**的实验ECD曲线与计算出的模型分子**3a** (17*S*) 的ECD光谱曲线吻合较好 (图5A)。确定化合物**3**的结构与**3a**一致, 即化合物**3**在17位绝对构型与化合物**1**、**2**均为*S*构型。综上所述化合物**3**被命名为 brasilicardin J。

化合物**4**为白色粉末, HR-ESI-MS中给出准分子离子峰 $[M-H]^-$: m/z 377.269 1 (calcd. for 377.269 2), 提示分子式为 $C_{23}H_{38}O_4$, 计算不饱和度为5。综合 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据 (表3) 发现化合物**4**的数据与**1**十分相似, 两者区别仅在**4**中17位的氢、碳信号向低场位移 (δ_H 3.73, δ_C 70.8), 推断17-OH代替了**1**中的17-NH₂。HMBC谱图中给出了H-17与C-15相关, H-15与C-13相关, 进一步证明了以上推断。通过计算与实验ECD曲线对比确定化合物**6**的17位绝对构型为*R*构型, 结合详细的核磁数据分析 (图3) 确定化合物**4**的17位绝对构型与**6**一致, 确定**4**的17位绝对构型为*R*构型。通过详细的HMBC与HSQC信号分析 (图3) 确定化合物**4**的其他部分结构与**1**一致。故化合物**4**被鉴定为 brasilicardin K。

化合物**5**为白色粉末, HR-ESI-MS中给出准分子离子峰 $[M-H]^-$: m/z 377.269 2 (calcd. for 377.269 2), 提示分子式为 $C_{23}H_{38}O_4$, 计算不饱和度为5。比较二者的NMR数据 (表3) 发现化合物**5**的数据与**4**十分相似, 两者区别在化合物**5**中1位至5位的碳谱数据向高场

位移, 提示其可能为**4**的差向异构体。ROESY谱图中给出H-3与H₃-21相关信号, 表明H-3为 α 取向, 确定**5**的3位绝对构型为*S*构型, 其他部分结构与**4**一致。故化合物**5**被鉴定为 brasilicardin L。

化合物**6**为白色粉末, HR-ESI-MS中给出准分子离子峰 $[M-H]^-$: m/z 375.253 8 (calcd. for 375.253 5), 提示分子式为 $C_{23}H_{36}O_4$, 计算不饱和度为6。综合 1H NMR, ^{13}C NMR 数据 (表3) 发现化合物**6**的数据与**4**十分相似, 两者区别仅在**6**的3位氢信号消失, 碳信号向低场位移 (δ_c 218.1), 推测3-OH在**6**中被氧化为羰基。HMBC谱图中给出了H-1/H-5与羰基碳C-3存在相关, 进一步证明了以上推断。通过详细的HMBC与HSQC信号分析 (图3) 确定化合物**6**的其他部分结构与**4**一致。化合物**6**的实验ECD曲线与模型分子**6b** (17*R*) 的计算ECD曲线吻合较好 (图5B)。确定化合物**6**的结构与**6b**一致, 即化合物**6**的17位绝对构型为*R*构型。故化合物**6**被鉴定为 brasilicardin M。

3 活性检测

对上述6个化合物进行活性筛选, 结果显示, brasilicardin H~M具有较强抑制LPS诱导的小鼠原代巨噬细胞释放NO的作用, IC₅₀分别为 28.24 ± 3.70 、 37.44 ± 2.00 、 39.85 ± 4.02 、 26.77 ± 4.40 、 65.25 ± 1.48 、 $15.24 \pm 2.72 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (阳性对照吲哚美辛 IC₅₀ 为 $34.28 \pm 4.10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 表明6个化合物均具有潜在的抗炎活性。

4 生物合成途径

将 *bral*~*5* 在链霉菌宿主 *S. albus* R1 中异源表达, 不仅得到 brasilicardin H, 还分离得到了其他5个新颖的类似物 brasilicardin I~M。根据 brasilicardin I~M 的结构特点, 推测这5个化合物可能是由宿主 *S. albus* R1 中的内源性短链脱氢酶 (short chain dehydrogenase) 介

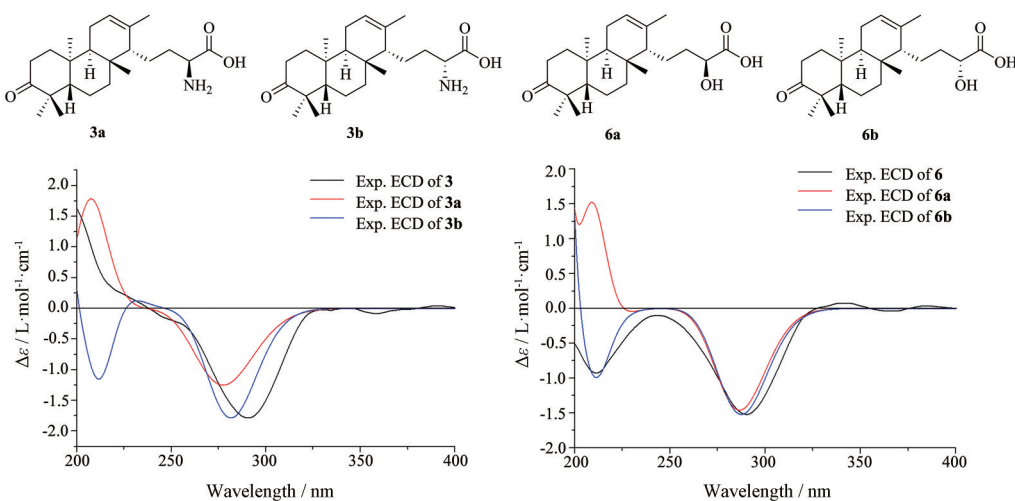


Figure 5 Calculated and experimental ECD spectra of compound **3** (A) and compound **6** (B)

Table 2 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR data of compounds **1–3** in $\text{DMSO-}d_6$

No.	1		2		3	
	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	1.30, m	34.6	a 1.78, m b 0.96, m	29.2	a 1.92, m b 1.46, m	33.1
2	1.46, m	27.9	a 1.80, m b 1.40, m	25.9	a 2.65, ddd (15.6, 9.0, 5.5) b 2.27, ddd (15.6, 9.0, 5.5)	33.7
3	2.97, m	77.1	3.19, m	73.7		218.0
4		39.3		37.9		46.5
5	1.41, m	43.0	1.92, m	36.1	1.90, m	47.8
6	a 1.58, m b 1.49, m	17.5	a 1.49, m b 1.41, m	17.3	a 1.43, m b 1.33, m	19.6
7	a 1.77, m b 1.17, m	29.8	a 1.76, m b 1.15, m	29.6	a 1.93, m b 1.22, m	34.4
8		36.5		36.5		35.9
9	1.26, m	45.6	1.25, m	46.0	1.41, m	41.2
10		35.1		35.0		35.3
11	a 1.81, m b 1.75, m	25.2	a 1.84, m b 1.79, m	25.3	1.86, m 1.83, m	23.6
12	5.26, m	121.8	5.27, m	122.0	5.18, m	119.0
13		137.0		136.9		137.6
14	1.14, m	55.3	1.14, m	55.4	1.13, t (4.0)	54.6
15	a 1.46, m b 1.28, m	26.5	a 1.46, m b 1.29, m	26.4	a 1.56, m b 1.21, m	28.9
16	a 1.73, m b 1.68, m	32.7	a 1.75, m b 1.68, m	32.7	a 1.85, m b 1.70, m	33.6
17	3.07, t (5.9)	54.9	3.08, t (5.9)	54.9	3.08, t (5.9)	54.8
18		169.9		169.9		169.6
19	0.77, s	16.0	0.84, s	22.3	0.96, s	20.0
20	0.86, s	28.4	0.8, s	28.5	0.99, s	27.8
21	0.97, s	27.0	0.99, s	27.1	0.83, s	23.8
22	0.90, s	22.9	0.92, s	22.7	0.95, s	26.3
23	1.61, s	22.9	1.61, s	22.9	1.63, d (1.7)	23.4

Table 3 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR data of compounds **4–6** in $\text{DMSO-}d_6$

No.	4		5		6	
	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1	1.31, m	34.6	1.79, m 0.96, m	29.1	1.91, m 1.47, m	33.2
2	1.46, m	27.9	1.80, m 1.40, m	25.8	2.64, m 2.27, m	33.8
3	2.97, dd (10.7, 5.0)	77.2	3.19, m	73.7		218.1
4		39.3		37.9		46.6
5	1.41, m	43.0	1.92, dd (1.8, 7.6)	36.1	1.90, m	47.8
6	1.58, m 1.50, m	17.5	1.50, m 1.45, m	17.3	1.46, m 1.31, m	19.6
7	1.72, m 1.20, m	29.9	1.70, m 1.20, m	29.6	1.90, m 1.27, m	34.5
8		36.5		36.6		36.0
9	1.26, m	45.7	1.25, dd (12.4, 4.8)	46.1	1.39, dd (11.1, 6.1)	41.4
10		35.1		35.0		35.3
11	1.81, m 1.75, m	25.2	1.87, m 1.78, m	25.3	1.87, m	23.7
12	5.25, d (4.9)	121.7	5.27, m	122.0	5.18, m	119.0
13		137.2		137.0		137.8
14	1.18, m	55.0	1.18, m	55.0	1.18, m	54.4
15	1.49, m 1.27, m	26.1	1.47, m 1.26, m	25.8	1.59, m 1.18, m	28.3
16	1.70, m 1.51, m	35.9	1.70, m 1.56, m	35.6	1.72, m 1.67, m	36.7
17	3.73, s	70.8	3.85, dd (6.7, 4.7)	70.2	3.87, t (5.4)	70.2
18		176.3		175.7		175.9
19	0.76, s	16.0	0.84, s	22.3	0.96, s	20.0
20	0.85, s	28.4	0.8, s	28.5	0.99, s	27.8
21	0.96, s	27.1	0.98, s	27.1	0.83, s	23.9
22	0.9, s	22.9	0.92, s	22.7	0.95, s	26.3
23	1.59, s	22.8	1.60, d (1.8)	22.7	1.61, s	23.3

导的3位羟基的构型翻转^[19]。因此,本文分别考察了宿主 *S. albus* R1 对 brasiliardin I~M 的转化情况,通过对转化产物的 LC-MS 分析 (图 6A~F),证实了上述推测。在野生型 *S. albus* R1 转化体系中, brasiliardin H (**1**) 可以转化成 brasiliardin J (**3**) (图 6A), brasiliardin J (**3**) 能转化成 brasiliardin I (**2**) (图 6B), 而 brasiliardin I (**2**) 还能再转化成 brasiliardin J (**3**) (图 6C)。同样,野

生型 *S. albus* R1 能将 brasiliardin K (**4**) 转化成 brasiliardin M (**6**) (图 6D), brasiliardin M (**6**) 能转化成 brasiliardin L (**5**) (图 6E), 同时也能将 brasiliardin L (**5**) 再转化成 brasiliardin M (**6**) (图 6F)。因此,推测 brasiliardin H~M 的生成途径如图 6G 所示,其中化合物 brasiliardin K (**4**) 中的 C16 羰基转化为羟基的生成机制同样也有可能是宿主内源酶的作用。

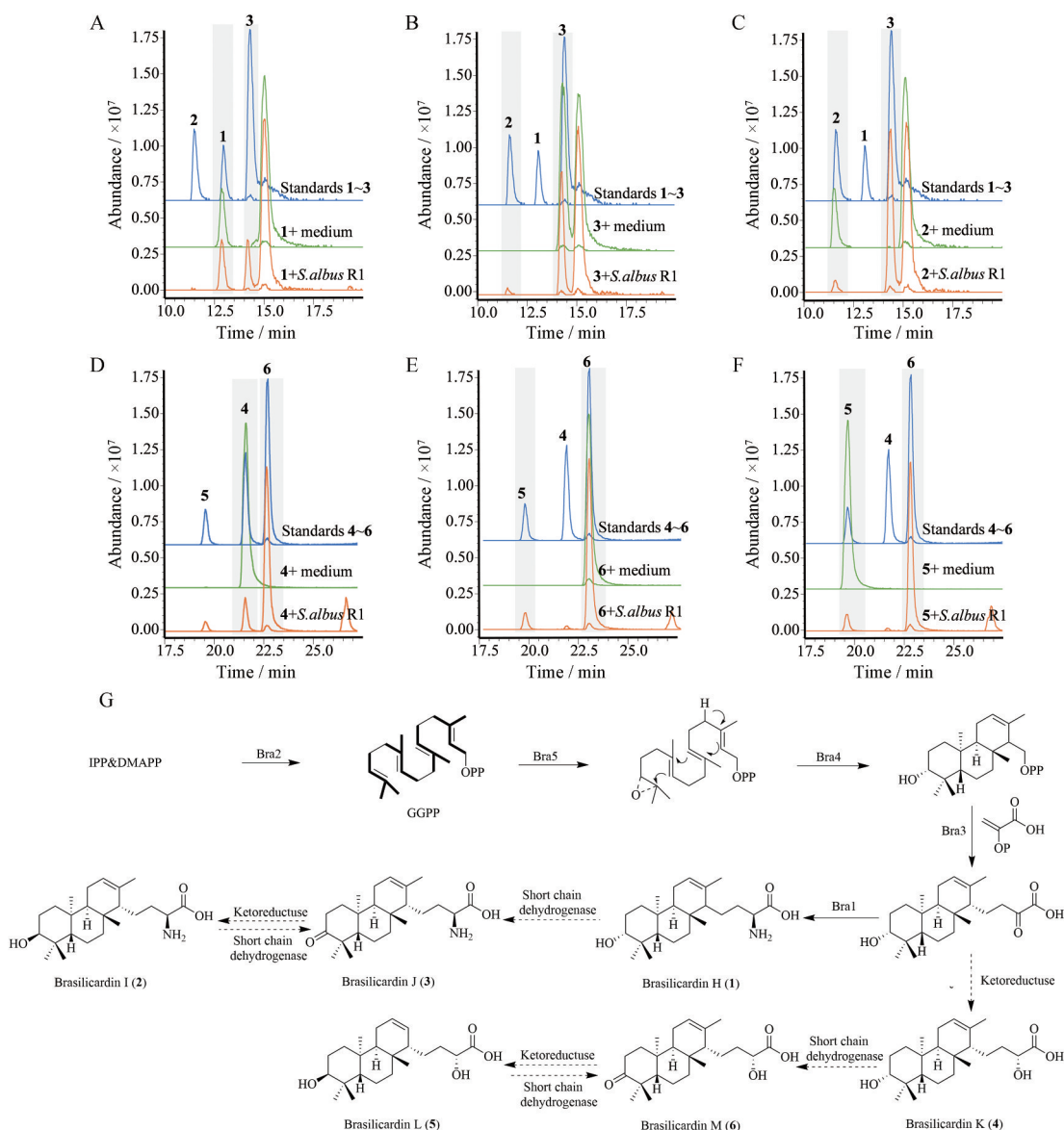


Figure 6 Extracted ion chromatograms for the bio-transformed products 1–6 correspondingly named as brasilicardin H–M (A–F) via *Streptomyces albus* R1. The plausible biosynthetic pathway of brasilicardin H–M (G)

讨论

Bra4是目前发现的罕见的非典型二萜合酶,但其重组蛋白难获得且催化底物难合成, Bra4的功能尚未解析。而尝试在菌株中特异敲除 *bra3* 后,也未检测到 Bra4的环化产物及任何的 brasilicardins。因此本研究选择通过在链霉菌底盘宿主 *S. albus* R1 中异源表达包括萜类环合酶基因 *bra4* 在内的形成 brasilicardin A 二萜母核的基因 *bra1~5*, 分离鉴定了 brasilicardin A 生物合成途径中具有反式/顺式/反式全氢菲母核和氨基酸部分在内的骨架化合物 brasilicardin H, 补充目前 brasilicardin A 的生物合成途径的同时也为后续 brasilicardin A 的生物合成途径的阐明奠定了基础; 而底盘宿主内源基因的修饰产生许多衍生物的报道已有很多,

这极大地增大了化合物的多样性, 在本研究中由于链霉菌底盘宿主 *S. albus* R1 中内源基因对 brasilicardin H 的结构修饰, 分离鉴定出 5 个新 brasilicardins 化合物 brasilicardin I~M。

在 brasilicardin H~M 母核的基础上, 后续还可以利用积累的后修饰功能的系列催化元件库, 如引入糖基转移酶、羟化酶、氧甲基转移酶、异戊烯基转移酶以及氧化酶等其他修饰基因元件, 通过组合合成进一步增加 brasilicardins 的多样性用于药理活性筛选。另一方面, 由于目前异源表达后化合物的产率较小, 后续将通过优化培养基、增加生物合成前体的供应^[20]、删除宿主基因组中可缺失的基因簇^[21,22]等多种方式进一步提高 brasilicardin H~M 的产量。

从 brasilicardin A 显著的免疫抑制活性发现以来, 如何高效获得 brasilicardin A 及发现更多其类似物一直是研究热点, 本研究旨在补充了 brasilicardin A 生物合成途径中的中间体同时也发现多个 brasilicardins 化合物, 但药理活性远远低于 brasilicardin A, 说明 brasilicardin A 母核上的其他基团十分重要, 在后续研究中将基于目前研究成果阐明 brasilicardin A 的生物途径中后续相关基因; 也将基于目前分离到的化合物, 筛选各种来源的基因以期通过组合合成的方式获得多个 brasilicardins 化合物, 丰富 brasilicardins 这类化合物。

作者贡献: 葛祥宇负责基因 *bral*~5 的克隆和异源表达、化合物的分离纯化以及论文初稿的撰写; 周广鑫负责化合物 brasilicardin H~M 谱图整理; 熊娜和米芯雨负责异源表达菌株 GXY01 的发酵与发酵液的萃取; 卢姿含负责化合物 brasilicardin H~M 的活性检测; 朱枝祥、刘晓和王晓晖提供实验指导以及论文修改; 王娟和史社坡负责实验方案设计、实验技术指导、论文撰写及修改。

利益冲突: 所有作者均声明研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Komaki H, Nemoto A, Tanaka Y, et al. Brasilicardin A, a new terpenoid antibiotic from pathogenic *Nocardia brasiliensis*: fermentation, isolation and biological activity [J]. *J Antibiot*, 1999, 52: 13-19.
- [2] Usui T, Nagumo Y, Watanabe A, et al. Brasilicardin A, a natural immunosuppressant, targets amino acid transport system L [J]. *Chem Biol*, 2006, 13: 1153-1160.
- [3] Anada M, Hanari T, Kakita K, et al. Total synthesis of brasilicardins A and C [J]. *Org Lett*, 2017, 19: 5581-5584.
- [4] Botas A, Eitel M, Schwarz PN, et al. Genetic engineering in combination with semi-synthesis leads to a new route for gram-scale production of the immunosuppressive natural product brasilicardin A [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 13536-13541.
- [5] Hayashi Y, Matsuura N, Toshima H, et al. Cloning of the gene cluster responsible for the biosynthesis of brasilicardin A, a unique diterpenoid [J]. *J Antibiot*, 2008, 61: 164-174.
- [6] Park D, Swayambhu G, Pfeifer BA. Heterologous biosynthesis as a platform for producing new generation natural products [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 66: 123-130.
- [7] Huo LJ, Hug JJ, Fu CZ, et al. Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways [J]. *Nat Prod Rep*, 2019, 36: 1412-1436.
- [8] Zhang ZY, Yang SB, Li ZX, et al. High-titer production of staurosporine by heterologous expression and process optimization [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, 107: 5701-5714.
- [9] Yan F, Auerbach D, Chai Y, et al. Biosynthesis and heterologous production of vioprolides: rational biosynthetic engineering and unprecedented 4-methylazetidinecarboxylic acid formation [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 8754-8759.
- [10] Yamanaka K, Reynolds KA, Kersten RD, et al. Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 1957-1962.
- [11] Reynolds KA, Luhavaya H, Li J, et al. Isolation and structure elucidation of lipopeptide antibiotic taromycin B from the activated taromycin biosynthetic gene cluster [J]. *J Antibiot*, 2018, 71: 333-338.
- [12] Wang WG, Du LQ, Sheng SL, et al. Genome mining for fungal polyketide-diterpenoid hybrids: discovery of key terpene cyclases and multifunctional P450s for structural diversification [J]. *Org Chem Front*, 2019, 6: 571-578.
- [13] Liu Q, Zhang G, Su LQ, et al. Reprogramming the metabolism of oleaginous yeast for sustainably biosynthesizing the anticarcinogen precursor germacrene A [J]. *Green Chem*, 2023, 25: 7988-7997.
- [14] Zhang J, Hansen LG, Gudich O, et al. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine [J]. *Nature*, 2022, 609: 341-347.
- [15] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical *Streptomyces* Genetics [M]. Norwich: John Innes Foundation, 2000: 409-414.
- [16] Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth [J]. *J Bacteriol*, 2007, 189: 8746-8749.
- [17] Hu YL, Zhang Q, Liu SH, et al. Building *Streptomyces albus* as a chassis for synthesis of bacterial terpenoids [J]. *Chem Sci*, 2023, 14: 3661-3667.
- [18] Abbas M, Elshahawi SI, Wang XC, et al. Puromycins B-E, naturally occurring amino-nucleosides produced by the Himalayan isolate *Streptomyces* sp. PU-14G [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81: 2560-2566.
- [19] You Z, Omura S, Ikeda H, et al. Pentalenolactone biosynthesis: molecular cloning and assignment of biochemical function to PtlF, a short-chain dehydrogenase from *Streptomyces avermitilis*, and identification of a new biosynthetic intermediate [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 459: 233-240.
- [20] Yin SL, Li ZL, Wang XF, et al. Heterologous expression of oxy-tetracycline biosynthetic gene cluster in *Streptomyces venezuelae* WVR2006 to improve production level and to alter fermentation process [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 10563-10572.
- [21] Myronovskyi M, Rosenkränzer B, Nadmid S, et al. Generation of a cluster-free *Streptomyces albus* chassis strains for improved heterologous expression of secondary metabolite clusters [J]. *Metab Eng*, 2018, 49: 316-324.
- [22] Novakova R, Núñez LE, Homerova D, et al. Increased heterologous production of the antitumoral polyketide mithramycin A by engineered *Streptomyces lividans* TK24 strains [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 857-869.