刺糖多孢菌菌种选育和遗传改造研究进展

李文杰，谢丽萍*
（中国医药工业研究总院上海医药工业研究院，上海 201203）

摘要：刺糖多孢菌是一种土壤放线菌，其次级代谢产物多杀菌素（**1**）是一种广谱大环内酯类生物杀虫剂，因其独特的杀虫机制和安全高效的性质而在世界范围内广泛使用。本研究简单介绍了 **1** 的分子合成途径及涉及的基因，综述了刺糖多孢菌的菌种选育和遗传改造方法的研究进展，包括传统选育、代谢调控和合成生物学方面的研究进展，为 **1** 的产业化研究提供参考。

关键词：多杀菌素；刺糖多孢菌；遗传改造；传统选育
中图分类号：R915　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)03-0306-09
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.03.004

Research Progress in Breeding and Genetic Manipulation of *Saccharopolyspora spinosa*

LI Wenjie, XIE Liping*
(*Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

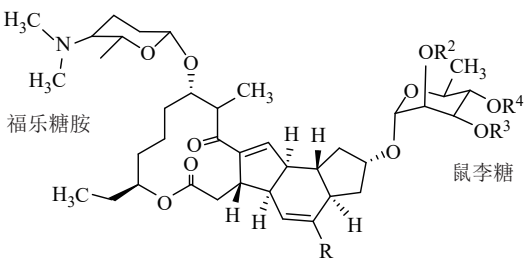
ABSTRACT: *Saccharopolyspora spinosa* is a member of soil actinomycetes family. The secondary metabolite spinosad(**1**) is a broad-spectrum macrolide biological insecticide, which has been widely used all over the world because of its unique insecticidal mechanism, safety and high efficiency. The molecular synthesis pathway of **1** and the genes involved are briefly introduced in this study, and the research progress of strain selection and genetic modification methods of *Saccharopolyspora spinosa* is reviewed, including the research progress of traditional breeding, metabolic regulation and synthetic biology, which can provide a reference for the industrialization research of **1**.

Key Words: spinosad; *Saccharopolyspora spinosa*; genetic manipulation; traditional breeding

多杀菌素（spinosad，**1**）是一种安全、绿色的大环内酯类生物杀虫剂，由刺糖多孢菌（*Saccharopolyspora spinosa*）产生，其活性成分主要由多杀菌素 A（占 85%～90%）和多杀菌素 D（占 10%～15%）组成[1]。**1** 主要由 1 个四核环和 2 个糖配基组成（结构见图 1），其中四核环是由 1 个 5,6,5（顺 - 反 - 反）三环系稠合而成，1 个 α,β- 不饱和酮和 1 个独立的双键嵌在四核环系中；2 个糖配基分别是鼠李糖（L-rhamnose）和福乐糖胺（D-forosamine）[2]。美国陶氏益农公司经过研发，上市了商品名为“菜喜”（Success）和“催杀”（Tracer）的杀虫剂，主要用于防止小菜蛾和棉铃虫。由于具有低毒、高效、杀虫谱广、降解快等优势，**1** 及其衍生物分别于 1999 年和 2008 年获得美国“总统绿色化学品挑战奖”。在多年的杀虫推广中发现，**1** 的杀虫谱十分广泛，包括双翅目、等翅目、膜翅目、鳞翅目、鞘翅目等昆虫，且 **1** 对鳞翅目和缨翅目类昆虫具有极强的选择性和活性[3]。**1** 对哺乳动物和鸟类的毒性较低，对水生动物具有轻微毒性，相较于传统化学杀虫剂安全性较好[4]。同时，有研究表明在针对哺乳动物的慢性毒性试验中，**1** 没有致畸性、致癌性、神经毒性或致突变性[5]。

对于刺糖多孢菌和 **1** 的研究在国外已有 30 余年，攻克了许多技术难题，而在我国尚在起步阶段。目前的研究主要集中在如何提高 **1** 产量和获得新型

收稿日期：2021-09-15
作者简介：李文杰（1997—），男，硕士研究生，专业方向：菌种选育的研究与开发。
通信作者：谢丽萍（1977—），女，研究员，从事微生物药物和基因工程研究。
E-mail：xieliping@sinopharm.com



多杀菌素 A：R=H，R^2=CH_3，R^3=CH_3，R^4=CH_3；
多杀菌素 D：R=CH_3，R^2=CH_3，R^3=CH_3，R^4=CH_3

图 1　1 的分子结构 [6]

Fig.1　Molecular Structures of **1**[6]

1 及其衍生物方面。本研究综述了通过传统选育、代谢工程定向改造和合成生物学方法对 **1** 进行菌种选育和遗传改造的研究进展，以期为改造刺糖多孢菌和 **1** 的产业化研究提供参考。

1　1 产生菌刺糖多孢菌的传统选育

菌种的传统选育历史悠久并且至今仍是获取新型抗菌药和高产菌种的重要方法，特别是在菌种遗传信息和合成路径尚未明确时能够发挥重要作用。传统育种方法包括自然选育、物理诱变（紫外辐照、放射性 ^{60}Co 射线辐照等）、化学诱变［亚硝基胍（nitrosoguanidine，NTG）、硫酸二乙酯等］。扶教龙等通过紫外和 NTG 诱变，结合抗性诱变对刺糖多孢菌进行诱变育种，最终获得一株 **1** 产量 78.26 mg/L 的菌株，较出发菌株提高了 45.71％ [7]。抗菌药的筛选是基于耐药性发展起来的一种筛选方法，具有操作简单、不需要特殊设备等优势。王海霞通过 2 种途径向刺糖多孢菌中引入 4 种抗性基因，途径一为通过抗性平板逐级引入［标记为非 GYM（glucose yeast-extract maltose）组］，途径二为将分离的抗性突变株经过纯培养后再引入下一种抗性（标记为 GYM 组），结果显示非 GYM 组较容易引入抗性性状，来自非 GYM 组的高产突变菌株具有链霉素和庆大霉素双重抗性，**1** 的发酵水平较出发菌株提高了 23.87％，达到 127.49 mg/L [8]。虽然最终刺糖多孢菌只产生双重抗性，但证实了组合抗菌药筛选高产 **1** 产生菌的可行性。

随着科学技术的发展，越来越多的新选育技术和方法被投入使用。基因组重排（genome shuffling）育种方法是在经典基因重排基础上发展起来的一种定向菌种改良技术，如今是使菌株向理想表型进化的最有效方法之一。JIN 等使用来自紫外辐照和 NTG 诱变的刺糖多孢菌进行了四轮基因组重排，成功分离出产量为 547 mg/L 的高产菌株 [9]。基因组重排技术能够在菌株代谢途径、基因表达调控机制等不完全清晰的情况下，有效融合不同来源的优良性状、快速富集优良性状、显著改善菌株的生产性能。由于基因组重排采用多轮递推的方式，在目的菌株体内可累积多个优良性状从而提升产量，这是其他菌株改良手段无法做到的。原生质体融合有时可以突破种属间的限制，如鲍玉杰通过原生质体融合了阿维链霉菌和刺糖多孢菌，经过三轮递推之后，GS-4、GS-1 菌株的阿维菌素产量提高了 107.8％，GSD-1 菌株的 **1** 产量比出发菌株提高了 24.4％，达到 398.54 mg/L [10]。阿维链霉菌和刺糖多孢菌的原生质体融合属于目间融合，融合概率极低，因此可以考虑选择同属间菌种进行原生质体融合，这样无论在培养基选择还是在原生质体再生时间上都可保持一致，免去筛选菌种等麻烦。如红色糖多孢菌和刺糖多孢菌同为糖多孢菌属，且聚酮合酶（polyketide synthase，PKS）途径相似，拥有相同的合成底物丙酸，因此易卓等将不产红霉素的红色糖多孢菌与刺糖多孢菌进行原生质体融合，得到了一株产量为 453.4 mg/L 的融合菌株，为同属之间的融合菌株构建提供了重要参考 [11]。

常压室温等离子体（atmospheric room temperature plasma，ARTP）源是近几年新发展的一种等离子体源，能够在常压下产生激发态的氦原子、氧原子、氮原子等具有活性的等离子体射流。王欣荣等对刺糖多孢菌首轮使用甲基磺酸乙酯（EMS）诱变，第二轮使用链霉素抗性育种，第三轮使用 ARTP 诱变，结果显示突变菌株 ESA-611 的发酵水平提高了 671.8％，达到 1 061.4 μg/ml [12]。ARTP 富含的活性粒子能够对微生物的遗传物质造成损伤，诱发细胞启动遗传修复机制，丰富了突变种类。在上述案例中，研究人员发现 *spnK* 基因发生了碱基

G 突变为碱基 A 的情况，使甲基化酶上的门冬氨酸突变为门冬酰胺，该酶因电负性变化而失活，因而突变菌株 ESA-598 的 R3 部位不能甲基化，主要代谢产物从多杀菌素 A 和 D 变为多杀菌素 J[12]。

核糖体工程是一种利用物理、化学、生物学等手段，将特定类型突变引入微生物核糖体蛋白中，从而获得具有优良生产性能突变株的新方法[13]。在操作中，通常是将不同抗菌药添加在菌体生长的培养基中获得相关的抗性突变。乔长晟等对刺糖多孢菌进行 ARTP 诱变，选取了 3 个不同致死率的辐照时间以增加抗性筛选几率，结果显示突变菌株同时具有利福平、红霉素、链霉素和磺胺胍多重抗性，发酵单位最高可达 1 516.93 mg/L，较出发菌株 QYLZ88912 提高了 148.37%[14]。这是首次将核糖体工程和 ARTP 诱变技术结合，用于提高刺糖多孢菌的产量，效果也十分显著。由于核糖体是细胞合成蛋白质的“加工厂”，可在转录和翻译水平上影响细胞次级代谢产物的产量，因此核糖体工程在改善菌株代谢途径、提高产酶能力、激活沉默基因等方面具有广阔的应用前景。

多功能等离子体诱变系统（multifunctional plasma mutagenesis system，MPMS）是新一代微生物诱变平台。MPMS 利用高压交变电场作用使空气介质形成等离子体，其中含有的氮正离子（N^+）、原子态氧（O）、羟自由基（OH）等活性成分使微生物细胞壁（膜）破损，继而造成 DNA 和蛋白质等生物大分子受损，同时激发细胞自身修复机制，产生随机性突变。王海霞等采用 MPMS 结合 4 种抗菌药（链霉素、利福平、氯霉素和庆大霉素）抗性筛选 **1** 高产菌株，获 1 株产量提高 26.68%的突变菌株，最高产量达到 116.09 mg/L[15]。

随着国家航天技术的不断进步，航天育种也逐渐投入使用，太空的强辐射、微重力等复杂环境往往会对菌株造成多重影响。陈继红等对搭载“实践八号”育种卫星进行航天育种后返回地面的刺糖多孢菌进行筛选和发酵，得到产量分别较出发菌株提高了 288%和 151%的高产菌株[16]。搭载神舟八号进行航天育种后返回地面的突变菌株最高产量达到 354 μg/ml[17]。外太空环境复杂、辐射强烈，微生物的致死率较高，负突变率占较大的比重，但存活下来的菌株也因此具有更强的生存能力，获得高产菌株的概率也往往更高。

2　1 产生菌的遗传改造

2.1　1 的合成途径及相关基因

通过近 30 年的研究，**1** 的生物合成途径已基本被阐明，具体见图 2。WALDRON 等探明了 **1** 生物合成的 23 个基因，它们成簇排列在长约 74 kb 的基因簇里，其中 5 个基因（*spnA* ～ *spnE*）通过 PKS 途径合成大环内酯结构的基本骨架，4 个基因（*spnF*、*spnJ*、*spnL*、*spnM*）将大环内酯修饰成糖苷配基，鼠李糖的合成和装配由 *gtt*、*gdh*、*epi*、*kre* 和 *spnG* 编码的蛋白完成，*spnH*、*spnL* 和 *spnK* 编码的蛋白负责将鼠李糖甲基化，*spnO*、*spnN*、*spnQ*、*spnR*、*spnS* 和 *spnP* 编码的蛋白负责合成和装配福乐糖胺[18—19]。*gtt* 编码的核苷二磷酸（nucleoside 5'-diphosphate，NDP）- 葡萄糖合成酶将葡萄糖 -1- 磷酸活化生成 NDP-D- 葡萄糖（NDP-D-glucoase），然后在 gdh 编码的葡萄糖脱氢酶的作用下催化核苷二磷酸葡萄糖生成 NDP-4- 酮 -6- 脱氧 -D- 葡萄糖，这是合成鼠李糖和福乐糖胺的共同前体。随后，epi 编码的 3'5'- 表异构酶和 kre 编码的酮还原酶将 NDP-4- 酮 -6- 脱氧 -D- 葡萄糖催化合成鼠李糖。这 4 个基因（*gtt*、*gdh*、*epi*、*kre*）均不在 **1** 的生物合成基因簇上，而分散存在于刺糖多孢菌的不同染色体基因组中。福乐糖胺则经由 *spnO*、*spnN*、*spnQ*、*spnR*、*spnS* 编码的蛋白将 NDP-4- 酮 -6- 脱氧 -D- 葡萄糖催化成 NDP- 二甲基福乐糖胺，然后由福乐糖胺转移酶将 NDP- 二甲基福乐糖胺转移至大环内酯骨架上，形成具有活性的 **1**[20]。

2.2　刺糖多孢菌的代谢调控

在细胞代谢调控中，增加表达限速步骤相关酶的基因拷贝数以解除限速步骤可提高终产物的产量。HUANG 等在分析刺糖多孢菌野生型和高产菌株的生物合成基因簇的表达变化及差异时发现，高产菌株中 PKS 的合成与表达远高于野生型，同时，编码连接鼠李糖与拟糖苷配体（AGL）的鼠李糖转

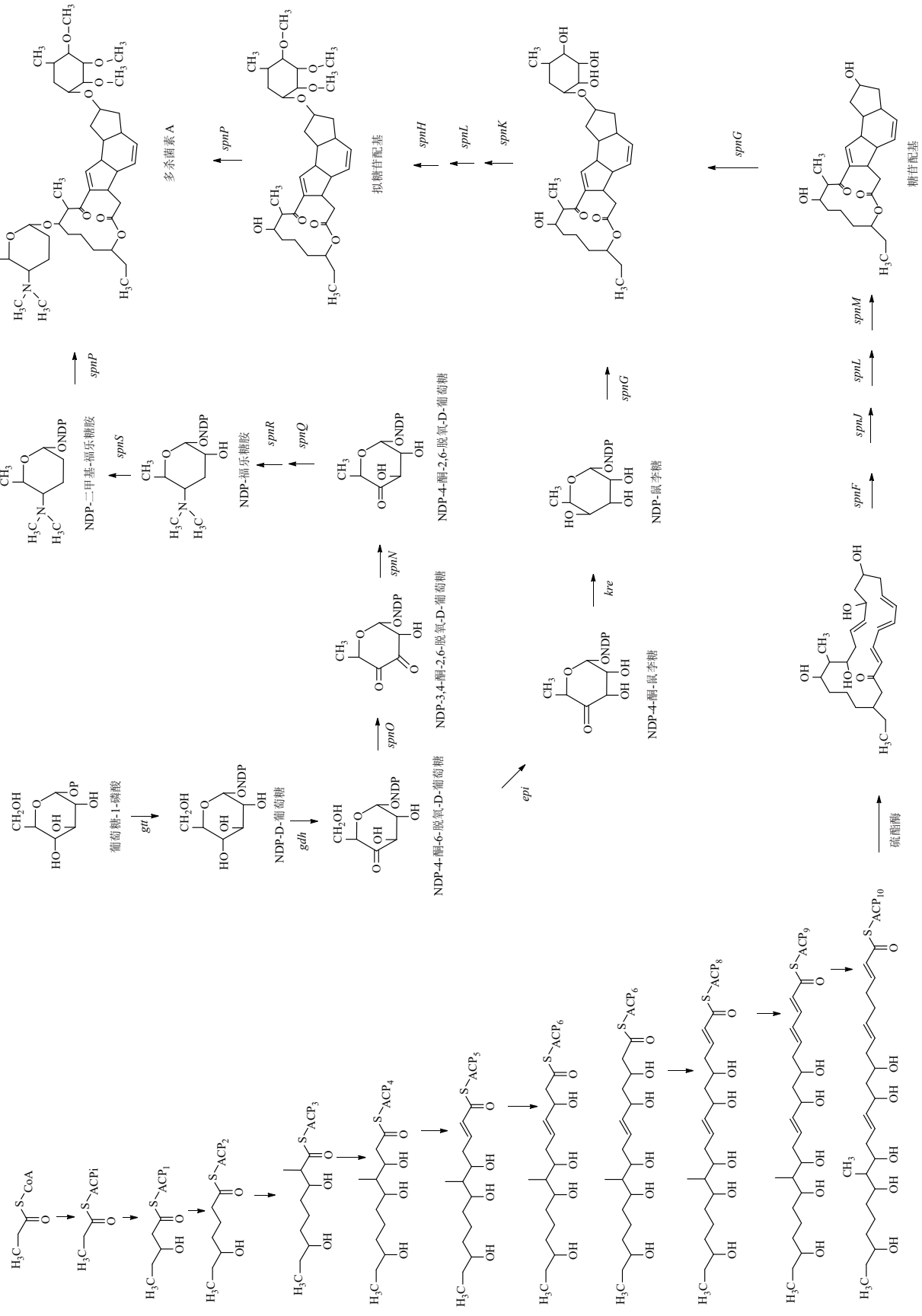


图 2　1 的生物合成途径 [19]

Fig.2　Biosynthetic Pathway of **1** [19]

移酶基因 *spnG* 在刺糖多孢菌生长前期大量表达，而在后期逐渐减少，也限制了 **1** 的合成[21]。PAN 等认为刺糖多孢菌的细胞壁中鼠李糖的合成分流了 **1** 中糖配基合成前体 NDP-4- 酮 -6- 脱氧 -D- 葡萄糖；他们还发现刺糖多孢菌中 *gdh* 编码的 4,6- 脱水酶的活性远低于肠炎沙门菌和大肠埃希菌中的同源蛋白。因此，为了增加分支点 NDP-4- 酮 -6- 脱氧 -D- 葡萄糖的供应，将一组由 1 个 PermE* 启动子直接控制的 *gtt* 和 *gdh* 基因整合到刺糖多孢菌染色体中进行同源重组，此举显著改善了从葡萄糖 -1- 磷酸到 NDP-4- 酮 -6- 脱氧 -D- 葡萄糖的生物转化，重组菌株 SIPI-M2039 的 **1** 产量也提高了 3 倍[22]。MADDURI 等倍增了 *gtt*、*gdh* 和 *kre* 基因，整合到野生菌株中，最终重组子的产量提高了 3 倍，这同样是通过增加 NDP-4- 酮 -6- 脱氧 -D- 葡萄糖的供应而提高 **1** 的产量；但有趣的是，单独增加这 3 个基因中任意一个的拷贝数并不会影响 **1** 的生物合成[23]。TANG 等通过 Red/ET 重组直接克隆技术过表达 **1** 中的生物合成基因，重组菌株的 **1** 产量达到 388 mg/L[24]。采用实时定量聚合酶链式反应（PCR）分析 3 个选定的基因（*spnH*、*spnI* 和 *spnK*）也证实了这些基因过表达对 **1** 的合成产生了积极影响。上述研究表明扩增 **1** 的生物合成相关基因可显著提高 **1** 产量，但是合成 **1** 的基因簇庞大，涉及基因众多，如果在上游或者下游的一段路径发生代谢流不平衡，同样会导致合成速度被限制。

除调控代谢途径以外，增加前体供应和删除竞争途径也是增加 PKS 通量和提高聚酮产量的有效方法。许多研究都表明添加外源性脂肪酸可增加聚酮化合物的产量[25—26]。HUANG 等研究了添加不同外源性脂肪酸对 **1** 产量的影响，其中添加山茶油（520.07 mg/L）和草莓籽油（511.64 mg/L）组的 **1** 效价明显高于空白对照（285.76 mg/L）和大豆油（398.11 mg/L）组；为了进一步提高 β 氧化相关基因的表达，HUANG 等引入来自天蓝色链霉菌的 *fadD1* 和 *fadE* 基因，利用整合载体导入刺糖多孢菌，在相同时间内，基因工程菌消耗了更多的外源性脂肪酸，并产生了更多的 **1**（784.72 mg/L）[27]。XUE 等则以刺糖多孢菌为例，从脂肪酸的代谢途径解释了为什么添加外源性脂肪酸可以增加 **1** 产量[28]：合成 **1** 的前体通常是乙酰辅酶 A、丙酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A 和甲基丙二酰辅酶 A 等，当外源性脂肪酸存在时，β 氧化相关基因（*fadA*、*fadD*、*fadE* 等）转录水平上调，用于分解长链脂肪酸为各种前体；而合成脂肪酸的相关基因（*fabI*、*fabG*）下调，用于合成脂肪酸长链的中间体被用于合成细胞脂类物质，因而更多的前体进入了 **1** 合成途径，促进了 **1** 产量的增加。

1 生物合成基因簇之外的基因也会影响 **1** 的合成。*bld* 基因是链霉菌中研究较为透彻的全局性调控因子，对天蓝色链霉菌的生长和代谢有重要的影响，其基因家族成员包括 *bldA*、*bldD*、*bldH*、*bldN*、*bldK* 等。蔡妹等将 *bldD* 基因置于 PermE* 启动子的控制下，构建重组载体 pUC-*spn*-PermE*-*bldD*，通过接合转移将其导入刺糖多孢菌中，通过摇瓶发酵发现，重组菌株的孢子生长受到明显抑制，**1** 产量较原始菌株提高了 1.35 倍[29]。由 *frr* 编码的核糖体循环因子（ribosome recycling factor，RRF）在细胞内负责将翻译终止后的复合体进行解体，为新一轮蛋白质的合成做准备，在核糖体循环中起到重要作用。刘红雪在刺糖多孢菌内构建了过表达载体 pUC-*spn*-PermE-*frr*，重组菌株的菌丝体长且分支较多，**1** 产量提高了 300%[30]。*manB* 编码的磷酸甘露酶可将磷酸 -6- 甘露糖转化成磷酸 -1- 甘露糖，其在细胞代谢中具有重要的作用。刘红雪等构建了阻断型载体 pOJ60-*manB* 并导入受体菌中，**1** 产量相比野生型提高了 180%，并且缩短了菌株孢子的萌发周期[31]。

LIU 等通过对比枯草芽孢杆菌和刺糖多孢菌序列，发现二者关于表达Ⅰ类脱乙酰酶的基因 *acuC* 的相似性为 38%；通过敲除和过表达此基因，发现其对刺糖多孢菌的菌丝分化、产孢和形态具有显著影响；通过蛋白质组学分析发现 *acuC* 的过表达产生了 4 种与亲本菌株不同的差异蛋白（*infB*、*paaZ*、*serA* 和 *acuA*），这些蛋白与三磷酸鸟苷的水解、*L*- 丝氨酸的合成、乙酰化酶 / 去乙酰化酶翻译后修饰

有关；在刺糖多孢菌中过表达 *acuC* 后，菌体中的乙酰辅酶 A 含量显著增加，并且乙酰化 Acs 蛋白的活化促进了乙酸盐的产生，进一步影响了乙酰辅酶 A 的生物合成，为 **1** 的生物合成提供了前体，因此多杀菌素 A 和 D 的产量达到 105.02 和 20.63 mg/L，分别为亲本菌株的 1.82 和 1.63 倍，且杀虫活性明显增强 [32]。这项研究初步鉴定了 *acuC* 在刺糖多孢菌中的功能，初步解释了其乙酰化代谢机制和 **1** 产量增加的原因。

综上所述，刺糖多孢菌的代谢网络复杂，改动其中任一基因往往都会牵一发而动全身。随着刺糖多孢菌全基因组测序结果的公布以及基因组尺度代谢模型（genome-scale-metabolic-model，GSMM，系一种系统生物学工具，被广泛用于改良菌种 [33]，其代谢调控和预测潜在调控因子的功能在生产菌改良中可发挥重要的作用）理论和技术的提出，关于刺糖多孢菌代谢组学和蛋白质组学的研究越来越多，对其代谢网络和代谢通路的研究将更加精细和完善，从而为 **1** 的生产带来更大进步。例如，WANG 等用 GSMM 构建刺糖多孢菌代谢网络，该模型由 1 577 个反应、1 726 个代谢物和 733 个人工提炼的酶组成，揭示了 **1** 合成代谢网络的一角，并预测转氨酶是潜在的可调控对象，过表达 *pntAB* 基因可使 **1** 产量略微提高，达到 37.9 mg/L [34]。

3 1 的合成生物学研究

近年来，合成生物学快速发展，使异源合成微生物的次级代谢产物成为一种新的方法。刺糖多孢菌在生长发育过程中，普遍存在生长缓慢、产孢子时间较长、对培养基的利用效率低和遗传操作困难等问题，对试验研究和工厂生产均提出了较大挑战。ZHAO 等将包含完整的 **1** 合成基因簇以及接合转移和位点特异性整合所需元件的细菌人工染色体（bacterial artificial chromosome，BAC）载体引入链霉菌宿主中，并通过控制表达强启动子 PermE，分别使天蓝色链霉菌和变铅青链霉菌的 **1** 产量达到 1、1.5 μg/ml [35]。HUANG 等以红色糖多孢菌为宿主菌，用 **1** 合成基因簇替换红霉素的 PKS 途径，构建了 4 个横跨刺糖多孢菌基因簇的质粒，分别转入宿主菌中进行同源重组，结果表明工程菌在优化代谢途径后 **1** 最终产量为 830 mg/L [36]。虽然复杂的聚酮化合物可成功地进行异源表达，但产量往往较低，无法达到产业化级别。PKS 基因簇的弱表达可能是 **1** 产量低的主要原因，同时鼠李糖的合成基因在发酵后期的表达不足也是影响 **1** 产量的关键因素。目前 **1** 的异源合成研究仍处于起步状态，无论是合适底盘细胞的选择，还是代谢流的精细调控都需要更深入的研究。

4 发展与展望

随着科学技术的进步，绿色、可持续发展成为时代的主流，用安全、绿色的生物农药取代大量使用的高毒化学农药慢慢成为共识。目前刺糖多孢菌的生物合成、作用机制仍需更深入的研究。此外，随着 **1** 的广泛使用，昆虫逐渐出现耐药性，开发新型 **1** 也是迫在眉睫的难题。

1 的杀虫机制目前尚不完全清楚，其杀虫机制与目前任何一种杀虫剂都不相同。尹显慧等通过对小菜蛾进行低剂量 **1** 继代处理，发现随着处理世代的增加，小菜蛾对 **1** 的敏感性下降，具体表现为实时定量 PCR 结果显示第十代 nAChRα 亚基 mRNA 的相对表达量下降了 32.04%，说明在世代处理后小菜蛾的 nAChRα 亚基被明显抑制，进而确认 nAChRα 亚基是 **1** 的作用靶点 [37]。此外，WATSON 的电生理研究还发现 **1** 能对美洲蜚蠊的 γ- 氨基丁酸受体产生抑制作用，此种抑制作用与已发现的阿维菌素的作用位点不同 [38]。未来可通过进一步研究来揭示 **1** 的作用机制，不仅可针对性地提高杀虫活性、开发新型杀虫剂，还可以预防因不合理使用而导致的昆虫交叉耐药性。

从进化论的角度来看，昆虫对农药产生耐药性是必然的，**1** 也不例外。除了合理用药减缓耐药性的产生之外，新型 **1** 的开发也应提上日程。从 **1** 的结构来看，福乐糖胺和鼠李糖是 2 个必要的活性配基，在这 2 个糖配基上存在众多的修饰位点。本课题组曾在产柔红霉素的 SIPI-1482 中导入重组质粒 pYG816，其功能是使 *dnmV* 基因（负责将氨基糖 4' 位酮基还原成羟基）插入失活，并同时导入来自除

虫链霉菌的 *aveBIV* 基因（催化形成相反构型的 C-4 酮基还原酶），最终基因工程菌只生产表柔红霉素，不生产柔红霉素[39]。因此，未来可尝试在刺糖多孢菌中进行糖配基构型的改变，如改变鼠李糖的手性异构体或改变侧链上的取代基团等，以此产生新 **1** 类化合物。

在 **1** 的异源表达上，选择具有优良生产能力的底盘细胞非常关键。大肠埃希菌是研究较透彻的模式菌株，已有研究将红霉素的 PKS 途径整套克隆至大肠埃希菌中，其代谢所需的酶能在大肠埃希菌中正确折叠和高表达，产量也与原始菌株相差无几[40]。本课题组已成功在大肠埃希菌中表达鲨烯、β- 胡萝卜素和紫杉醇等，并能够精密调控基因工程菌的代谢元件，确保上下游的代谢平衡[41—42]。如果能够将 **1** 生物合成途径中的相关基因克隆至大肠埃希菌中进行成功表达，可以克服刺糖多孢菌生长缓慢的难题，极大缩短 **1** 的生产周期。

刺糖多孢菌是公认最难操作的放线菌。因其具有严格限制性修饰系统，对外源 DNA 有强烈的限制修饰作用，所以遗传操作的效率问题一直制约着刺糖多孢菌的遗传改造。通过接合转移导入外源基因是最常见的方法，然而即使经过优化，刺糖多孢菌的结合效率仍仅为 2.3×10^{-7}[43]。提高微生物宿主基因的编辑效率有助于加快认识微生物的代谢途径和构建次级代谢产物生产平台。近年来，更加高效的基因操作手段，如 CRISPR/Cas9 已经在多个微生物体中得到了应用[44—45]。如果能在刺糖多孢菌体内建立 CRISPR/Cas9 系统将有助于提高其遗传操作效率，加快得到性能优良的基因工程菌的进程。

参考文献：

[1] MERTZ F P, YAO R C. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1990, **40**(1): 34-39.

[2] JIANYA S, JINLIANG S. The biosynthesis of spinosad [J]. *J Chin Biotechnol*, 2003, **23**(5): 55-59.

[3] MUSSER F R, SHELTON A M. The influence of post-exposure temperature on the toxicity of insecticides to *Ostrinia nubilalis* (*Lepidoptera: Crambidae*) [J]. *Pest Manag Sci*, 2005, **61**(5): 508-510.

[4] HOLT K M, OPIT G P, NECHOLS J R, *et al*. Testing for non-target effects of spinosad on two spotted spider mites and their predator *Phytoseiulus persimilis* under greenhouse conditions [J]. *Exp Appl Acarol*, 2006, **38**(2): 141-149.

[5] CLEVELAND C B, MAYES M A, CRYER S A. An ecological risk assessment for spinosad use on cotton [J]. *Pest Manag Sci*, 2002, **58**(1): 70-84.

[6] KIRST H A, MICHEL K H, MYNDERASE J S, *et al*. Discovery, isolation, and structure elucidation of a family of structurally unique, fermentation-derived tetracyclic macrolides [J]. *ACS Symp Ser*, 1992, (504): 214-215.

[7] 扶教龙, 徐敏强, 张　松, 等. 多杀菌素产生菌复合诱变选育及发酵培养基优化[J]. 中国抗生素杂志, 2018, **43**(7): 824-830.

[8] 王海霞, 陈　园, 王　超, 等. 组合抗生素抗性选育多杀菌素高产菌株[J]. 粮油食品科技, 2017, **25**(4): 70-75.

[9] JIN Z H, XU B, LIN S Z, *et al*. Enhanced production of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* by genome shuffling [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, **159**(3): 655-663.

[10] 鲍玉杰. 阿维链霉菌与刺糖多孢菌基因组重排筛选高效低毒杀虫剂产生菌的初探[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2010.

[11] 易　卓, 夏立秋, 丁学知, 等. 通过两种糖多孢菌属菌株原生质体融合提高多杀菌素产量研究[J]. 中国抗生素杂志, 2019, **44**(10): 1148-1155.

[12] 王欣荣, 张爱雪, 唐智超, 等. 产多杀菌素刺糖多孢菌的诱变选育[J]. 中国抗生素杂志, 2020, **45**(9): 873-877.

[13] OCHI K. From microbial differentiation to ribosome engineering [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, **71**(6): 1373-1386.

[14] 乔长晟, 赵　男, 石漫漫, 等. 基于核糖体工程理论的常压室温等离子体诱变筛选多杀菌素高产菌[J]. 中国生物工程杂志, 2014, **34**(1): 71-78.

[15] 王海霞, 陈　园, 王　超, 等. MPMS诱变结合抗生素抗性选育多杀菌素高产菌株[J]. 粮油食品科技, 2017, **25**(3): 82-86.

[16] 陈继红, 张利平, 郭立格, 等. 多杀菌素产生菌株航天育种效果研究[J]. 安徽农业科学, 2008, **36**(12): 4951-4952.

[17] 郭伟群. 多杀菌素高产菌株的选育及发酵过程多参数、多尺度优化[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2016.

[18] WALDRON C, MADDURI K, CRAWFORD K, *et al*.

A cluster of genes for the biosynthesis of spinosyns, novel macrolide insect control agents produced by *Saccharopolyspora spinosa*［J］. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, **78**(3): 385-390.

［19］ WALDRON C, MATSUSHIMA P, ROSTECK P R, *et al*. Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*［J］. *Chem Biol*, 2001, **8**(5): 487-499.

［20］ HONG L, ZHAO Z B, LIU H W. Characterization of *spnQ* from the spinosyn biosynthetic pathway of *Saccharopolyspora spinosa*: mechanistic and evolutionary implications for C-3 deoxygenation in deoxysugar biosynthesis［J］. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**(44): 14262-14263.

［21］ HUANG Y, ZHAO C, YANG B L, *et al*. Expression analysis of spinosad biosynthetic gene cluster (spn) in hyperproducing and wild-type *Saccharopolyspora spinosa* strains during fermentation［J］. *J Agric Biotechnol*, 2014, **22**(11): 1337-1346.

［22］ PAN H X, LI J A, HE N J, *et al*. Improvement of spinosad production by overexpression of gtt and gdh controlled by promoter PermE* in *Saccharopolyspora spinosa* SIPI-A2090［J］. *Biotechnol Lett*, 2011, **33**(4): 733-739.

［23］ MADDURI K, WALDRON C, MERLO D J. Rhamnose biosynthesis pathway supplies precursors for primary and secondary metabolism in *Saccharopolyspora spinose*［J］. *J Bacteriol*, 2001, **183**(19): 5632-5638.

［24］ TANG Y, XIA L Q, DING X Z, *et al*. Duplication of partial spinosyn biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora spinosa* enhances spinosyn production［J］. *FEMS Microbiol Lett*, 2011, **325**(1): 22-29.

［25］ LI C, HAZZARD C, FLOROVA G, *et al*. High titer production of tetracenomycins by heterologous expression of the pathway in a *Streptomyces cinnamonensis* industrial monensin producer strain［J］. *Metab Eng*, 2009, **11**(6): 319-327.

［26］ MO S J, BAN Y H, PARK J W, *et al*. Enhanced FK506 production in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 by engineering the supply of methylmalonyl-CoA precursor［J］. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, **36**(12): 1473-1482.

［27］ HUANG Y, ZHANG X, ZHAO C, *et al*. Improvement of spinosad production upon utilization of oils and manipulation of β-oxidation in a high-producing *Saccharopolyspora spinosa* strain［J］. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2018, **28**(2): 53-64.

［28］ XUE C Y, ZHANG X M, YU Z R, *et al*. Up-regulated spinosad pathway coupling with the increased concentration of acetyl-CoA and malonyl-CoA contributed to the increase of spinosad in the presence of exogenous fatty acid［J］. *Biochem Eng J*, 2013, **81**: 47-53.

［29］ 蔡 妹, 刘红雪, 杨 琦, 等. 刺糖多孢菌*bldD*基因过表达对多杀菌素合成及其孢子形成的影响[J]. 中国生物防治学报, 2015, **31**(4): 553-560.

［30］ 刘红雪. 多杀菌素高产菌株的构建及其调控基因的功能研究[D]. 长沙: 湖南师范大学硕士学位论文, 2016.

［31］ 刘红雪, 蔡 妹, 张由恒, 等. 磷酸甘露酶基因的阻断对刺糖多孢菌的形态及其多杀菌素合成的影响[J]. 中国生物防治学报, 2017, **33**(1): 134-141.

［32］ LIU Z D, XIAO J, TANG J L, *et al*. Effects of *acuC* on the growth development and spinosad biosynthesis of *Saccharopolyspora spinosa*［J］. *Microb Cell Fact*, 2021, **20**(1): 141.

［33］ BROCHADO A R, MATOS C, MØLLER B L, *et al*. Improved vanillin production in Baker's yeast through in *silico* design［J］. *Microb Cell Fact*, 2010, **9**(1): 1-15.

［34］ WANG X Y, ZHANG C B, WANG M L, *et al*. Genome-scale metabolic network reconstruction of *Saccharopolyspora spinosa* for spinosad production improvement［J］. *Microb Cell Fact*, 2014, **13**(1): 41.

［35］ ZHAO C, HUANG Y, GUO C, *et al*. Heterologous expression of spinosyn biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* species is dependent on the expression of rhamnose biosynthesis genes［J］. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2017, **27**(3): 190-198.

［36］ HUANG J, YU Z, LI M H, *et al*. High level of spinosad production in the heterologous host *Saccharopolyspora erythraea*［J］. *Appl Environ Microbiol*, 2016, **82**(18): 5603-5611.

［37］ 尹显慧, 吴青君, 张友军, 等. 低剂量多杀菌素继代处理对小菜蛾*nAChR*基因表达的影响[J]. 昆虫学报, 2016, **59**(11): 1182-1188.

［38］ WATSON G B. Actions of insecticidal spinosyns on γ-aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons［J］. *Pestic Biochem Physiol*, 2001, **71**(1): 20-28.

［39］ 尚　珂．柔红霉素产生菌*dnmV*基因阻断突变和功能替换研究［D］．上海: 上海医药工业研究院博士学位论文, 2006．

［40］ PFEIFER B A, ADMIRAAL S J, GRAMAJO H, *et al*．Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E*．*coli*［J］．*Science*, 2001, **291**(5509): 1790-1792．

［41］ LIU H Y, HAN S, XIE L P, *et al*．Overexpression of key enzymes of the 2-*C*-methyl-*D*-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway for improving squalene production in *Escherichia coli*［J］．*Afr J Biotechnol*, 2017, **16**(50): 2307-2316．

［42］ 刘乐山, 刘海元, 谢丽萍, 等．MEP代谢通路组合优化提高β-胡萝卜素产量(英文)［J］．中国医药工业杂志, 2018, **49**(7): 917-926．

［43］ XUE C Y, DUAN Y J, ZHAO F L, *et al*．Stepwise increase of spinosad production in *Saccharopolyspora spinosa* by metabolic engineering［J］．*Biochem Eng J*, 2013, **72**: 90-95．

［44］ COBB R E, WANG Y, ZHAO H．High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system［J］．*ACS Synth Biol*, 2015, **4**(6): 723-728．

［45］ TONG Y J, PEP C, ZHANG L X, *et al*．CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes［J］．*ACS Synth Biol*, 2015, **4**(9): 1020-1029．