交沙霉素生物合成基因簇及那波链霉菌基因工程改造

张婉莹，张海霞，张正玉，杨松柏，谭 俊*，陈少欣*

（中国医药工业研究总院有限公司，上海医药工业研究院有限公司，先导物成药性研究全国重点实验室，上海 201203）

摘要：交沙霉素（**1**）是由那波链霉菌发酵产生的大环内酯类抗菌药，用于治疗呼吸道及尿路感染。目前，国内 **1** 原料药依赖进口，因此利用微生物发酵实现其工业化生产具有重要意义。该研究对 **1** 生产菌株那波链霉菌 J-2-40 进行了全基因组测序和蛋白功能分析，并推测了 **1** 的生物合成途径。结果显示，**1** 基因簇序列全长 73 893 bp，包含 38 个基因开放阅读框，具有典型的模块化Ⅰ型聚酮合酶的特征。**1** 的生物合成途径主要包括聚酮前体的合成、聚酮链的延伸、糖基侧链的组装和后期修饰等步骤。基于此，该研究通过基因改造过表达酰基转移酶基因（*orf* 9、*orf* 29）和乙酰辅酶 A 羧化酶基因（*accA2BE*），初步探索了 **1** 生产菌株的基因改造策略。最终成功构建了工程菌 JOS-ORF29 和 JOS-A2BE，与出发菌株相比，上述工程菌株的相对效价分别提高了 13%和 31%。

关键词：交沙霉素；抗菌药；那波链霉菌；生物合成基因簇；基因工程；基因改造

中图分类号：Q812；R978.1^{+}5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)04-0419-08

引用：张婉莹, 张海霞, 张正玉, 等. 交沙霉素生物合成基因簇及那波链霉菌基因工程改造[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(4): 419-426. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.04.007

Josamycin Biosynthetic Gene Cluster and Genetic Engineering Modification of *Streptomyces narbonensis*

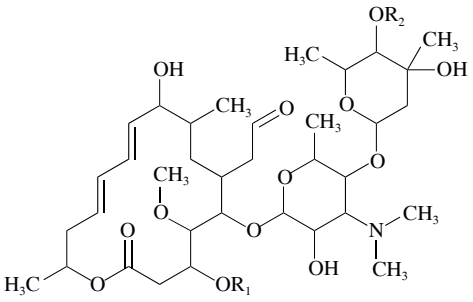
ZHANG Wanying, ZHANG Haixia, ZHANG Zhengyu, YANG Songbai, TAN Jun*, CHEN Shaoxin*

(*National Key Lab. of Lead Druggability Research, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., China State Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Josamycin (**1**) is a macrolide antibiotic primarily produced by *Streptomyces narbonensis* var. Josamyceticus (*S. narbonensis*) through fermentation. It is widely used to treat respiratory and urinary tract infections. Currently, the domestic supply of the active pharmaceutical ingredient of **1** relies on imports, making it of great significance to explore microbial fermentation for its industrial production. This study performed whole genome sequencing on *S. narbonensis* J-2-40, conducted functional annotation of its encoded proteins, analyzed and annotated its biosynthetic gene clusters, and speculated the biosynthetic pathway of **1**. The results showed that the total length of the **1** biosynthetic gene cluster sequence is 73 893 bp, containing 38 open reading frames. It exhibited the characteristics of modular type I polyketide synthase architecture. The biosynthetic pathway of **1** mainly included polyketide precursor synthesis, polyketide chain elongation, glycosyl side chain assembly, and post-assembly modifications. Based on this, genetic engineering modifications on the **1** producing strain *S. narbonensis* were investigated by overexpressing acyltransferase genes (*orf* 9, *orf* 29) and acetyl-CoA carboxylase gene (*accA2BE*). Finally, the engineered strains, JOS-ORF29 and JOS-A2BE were successfully constructed, achieving 13% and 31% increases in yield compared to the parental strain, respectively.

Key Words: josamycin; antibacterial drug; *Streptomyces narbonensis*; biosynthetic gene cluster; genetic engineering; genetic modification

交沙霉素（josamycin，**1**）是1种十六元环大环内酯类抗菌药，由那波链霉菌（*Streptomyces narbonensis* var. Josamyceticus）发酵产生，其结构与麦迪霉素（midecamycin，**2**）等[1]类似，区别在于C-3和C-4" 位的酰基取代基（图1）。



1: R_1=$COCH_3$; R_2=$COCH_2CH(CH_3)_2$
2: R_1=$COCH_2CH_3$; R_2=$COCH_2CH_3$

图1　1和2的化学结构

Fig.1　Chemical Structures of **1** and **2**

1的药理作用和临床应用与**2**、螺旋霉素相仿，在活细胞中具有双重生长抑制作用；其抗菌性能与红霉素近似，对支原体、革兰阳性菌和某些革兰阴性菌有效，可治疗呼吸道、泌尿系统感染[2]。相比于其他大环内酯类抗菌药，**1**无血液、肝、肾或其他毒性，且高剂量条件下的不良反应较小，不会抑制细胞色素P450酶活性[3]，可提高患者临床用药依从性。**1**的临床应用价值显著，但国内原料药目前仍依赖进口，因此提高发酵单位、实现国内工业化生产具有重要意义。

目前，**1**生产菌株的发酵工艺研究很少，也未见利用基因工程对菌种改造的报道。本研究根据**1**生产菌株那波链霉菌的全基因组测序结果，首次系统阐述并解析了**1**的生物合成基因簇和生物合成过程，并对**1**生产菌株进行初步的基因工程改造，为后续利用基因工程方法改造菌种、提高**1**的产量提供数据基础，具有较高的应用价值。

1　仪器与试药

LDZX-75L型立式高压蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂）；1260型高效液相色谱仪（美国Agilent公司）；TCT8型基因扩增仪（上海领成生物科技有限公司）；EPS-300型凝胶电泳仪、MINI Space 1000型凝胶成像仪均购于上海天能科技有限公司；NANO-200型超微量核酸分析仪（杭州奥盛仪器有限公司）；FE20型实验室pH计［梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司］。

1对照品（本实验室自制，纯度99.2%）；葡萄糖、麦芽浸粉、蛋白胨（上海源聚生物科技有限公司）；酵母提取物（英国Oxoid公司）；玉米淀粉（滨州金汇玉米开发有限公司）；黄豆饼粉（青岛科瑞培养基有限公司）；酵母粉YP600（安琪酵母粉股份有限公司）；棉籽饼粉（济宁双华工贸有限公司）；菜籽油（益海嘉里金龙鱼食品集团股份有限公司）；水解酪蛋白［西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司］；一步克隆试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；0.22 μm滤膜（浙江欧尔赛斯科技有限公司）；安普霉素［生工生物工程（上海）股份有限公司］；KOD FX DNA聚合酶（日本TOYOBO公司）；限制性内切酶（美国Thermo Fisher公司）；其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

本实验所用菌株、质粒与引物分别如表1、2所示。

2　方法与结果

2.1　培养基与溶液配制

平板培养基/($g·L^{-1}$)：葡萄糖2，酵母提取物2，麦芽浸粉5，琼脂粉20。

种子培养基/($g·L^{-1}$)：葡萄糖20，玉米淀粉20，黄豆饼粉20，酵母粉15，$MgSO_4·7H_2O$ 2，K_2HPO_4 1，$CaCO_3$ 3。使用1 mol/L氢氧化钠溶液调至pH 7.0～7.2。

发酵培养基/($g·L^{-1}$)：菜籽油80，棉籽饼粉30，玉米淀粉20，$MgSO_4·7H_2O$ 2，$MnSO_4$ 0.15，$CaCO_3$ 3。使用1 mol/L氢氧化钠溶液调至pH 7.0～7.2。

LB培养基/($g·L^{-1}$)：蛋白胨10，酵母提取物5，NaCl 10。

MS培养基/($g·L^{-1}$)：黄豆饼粉20，甘露醇20，

收稿日期：2025-10-29

基金项目：科技部国家重点研发计划——“绿色生物制造”项目（2021YFC2102100）、上海启明星培育（扬帆专项）项目（23YF1445800）

作者简介：张婉莹，硕士研究生，专业方向：微生物与生化药学。

通信作者：陈少欣，研究员，博士生导师，从事微生物药物的研究与开发。

谭　俊，副研究员，博士，从事微生物药物研究。

表 1 试验用菌株及质粒

Tab.1 Strains and Plasmids Used in This Study

菌株和质粒	特征	来源
那波链霉菌（*S. narbonensis* J-2-40，出发菌株）	**1** 高产突变株	本实验室保藏
大肠埃希菌（*Escherichia coli*, *E. coli*）DH5α	克隆与质粒构建	康为世纪生物科技股份有限公司
E. coli ET12567/pUZ8002	接合转移，Kan^r，Chl^r [1)]	本实验室保藏
JOS-ORF9	整合 *orf*9 的菌株	本研究自制
JOS-ORF29	整合 *orf*29 的菌株	本研究自制
JOS-A2BE	整合 1 个拷贝 *accA2BE* [2)] 的菌株	本研究自制
JOS-A2BE-2	整合 2 个拷贝 *accA2BE* 的菌株	本研究自制
pSET152	大肠埃希菌 - 链霉菌穿梭载体，包含链霉菌 φC31 整合位点（*attP*）、安普霉素抗性（Apr^r [3)]）和 PermE* 启动子	本实验室保藏
pSET152-*orf*29	整合 *orf*29 的 pSET152 质粒，Apr^r	本研究自制
pSET152-*orf*9	整合 *orf*9 的 pSET152 质粒，Apr^r	本研究自制
pSET-A2BE	在 pSET152 的 *Nde* Ⅰ/*Sgs* Ⅰ位点整合 *ACCase* 基因，Apr^r	本实验室保藏
PLCB1-A2BE	在 PkasO* 的控制下的 *ACCase* 基因，包含 2 个整合位点 ΦC31 和 ΦBT1，Apr^r	本实验室保藏

注：[1)]Kan^r 为卡那霉素抗性，Chl^r 为氯霉素抗性；[2)]*accA2BE* 为乙酰辅酶 A 羧化酶（acetyl-CoA carboxylase，ACCase）编码基因；[3)]Apr^r 为安普霉素抗性。

表 2 研究所用的引物信息 [1)]

Tab.2 Primers Used in This Study

引物名称	序列（5'→3'）
ORF9-F	CACAGAACCACTCCACAGGAGGACC**CATATG**GGATAC-CGCCGCCACTGTGTCAGCTATGCCT（*Nde* Ⅰ）
ORF9-R	TGATTACGAATTCGATATCGCGCGCGGCCGC**GGATCC**G-CGGGGTCGAACACCTTCCTCAACAGCTG（*Bam*H Ⅰ）
ORF29-F	TGCAGCCACAGAACCACTCCACAGGAGGACC**CATAT-G**ACTGTGTCATCTTCTCGTGTCCGCGTGATC（*Nde* Ⅰ）
ORF29-R	GATTACGAATTCGATATCGCGCGCGGCCGC**GGATCC**T-GAGAGCGGTCTGGTCTGCCACGCTCACGG（*Bam*H Ⅰ）

注：[1)] 加粗表示限制性内切酶结合位点，下划线表示与质粒载体同源部分。

琼脂 20。

PBS：由 50 mmol/L 的 K_2HPO_4 溶液与 50 mmol/L 的 KH_2PO_4 溶液混合，pH 值为 6.0。

2× 孢子萌发液 /（g·L^{-1}）：酵母提取物 10，水解酪蛋白 10，无水 $CaCl_2$ 1.1。

三羟甲基甲胺基乙磺酸［*N*-tris（hydroxymethyl）methyl-2-aminoethanesulfonic acid，TES］缓冲液：0.05 mol/L TES 溶液，pH 8.0。

以上培养基及溶液均需经高压蒸汽法灭菌（121 ℃，30 min）。

孢子悬液的制备：刮取菌株 J-2-40 的孢子，加入 TES 缓冲液，研磨、混匀。

安普霉素溶液（50 mg/mL）：称取安普霉素粉末 0.2 g，加入去离子水 4 mL 溶解，无菌过滤、分装，于 - 20 ℃保存。

2.2 1 的含量检测方法

取 **1** 的发酵液 200 μL，加入甲醇 800 μL 混匀，超声（200 W）振荡 30 min，离心（12 000×*g*）10 min，经 0.22 μm 滤膜过滤，所得续滤液用于 HPLC 检测。

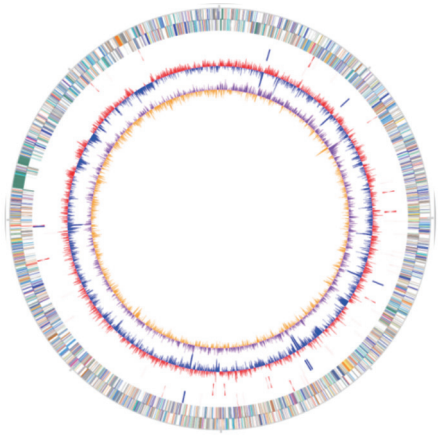
色谱条件：色谱柱 Hypersil ODS C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相 甲醇和 pH 3.0 的 0.02 mol/L KH_2PO_4 溶液（体积比 60 ∶ 40）；柱温 30 ℃；检测波长 232 nm；流速 1 mL/min；进样量 20 μL。

2.3 1 生产菌株的全基因组测序

收集菌株 J-2-40 的菌体并提取基因组，送至国家人类基因组南方研究中心测序，采用美国 PacBio 公司的三代测序技术和美国 Illumina 公司的二代测序技术相结合的方式，获得高质量的基因组序列。

对菌株 J-2-40 的全基因组测序，得到 1 条长度为 6 373 796 bp 的染色体序列，GC 含量为 72.7%。对该序列进行基因注释和 GC 偏好性分析，结果（图 2）显示其预测编码区长度为 5 575 338 bp，编码区 GC 含量为 73.0%，编码区长度占全基因组

的 87.5 %；全基因组共有 67 个转运 RNA（transfer RNA，tRNA）序列，21 个核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）序列；有 3 922 个蛋白具有明确的生物学功能，2 107 个蛋白注释到京都基因与基因组百科全书数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG），3 868 个蛋白注释到直系同源蛋白簇数据库（Clusters of Orthologous Groups，COG）。



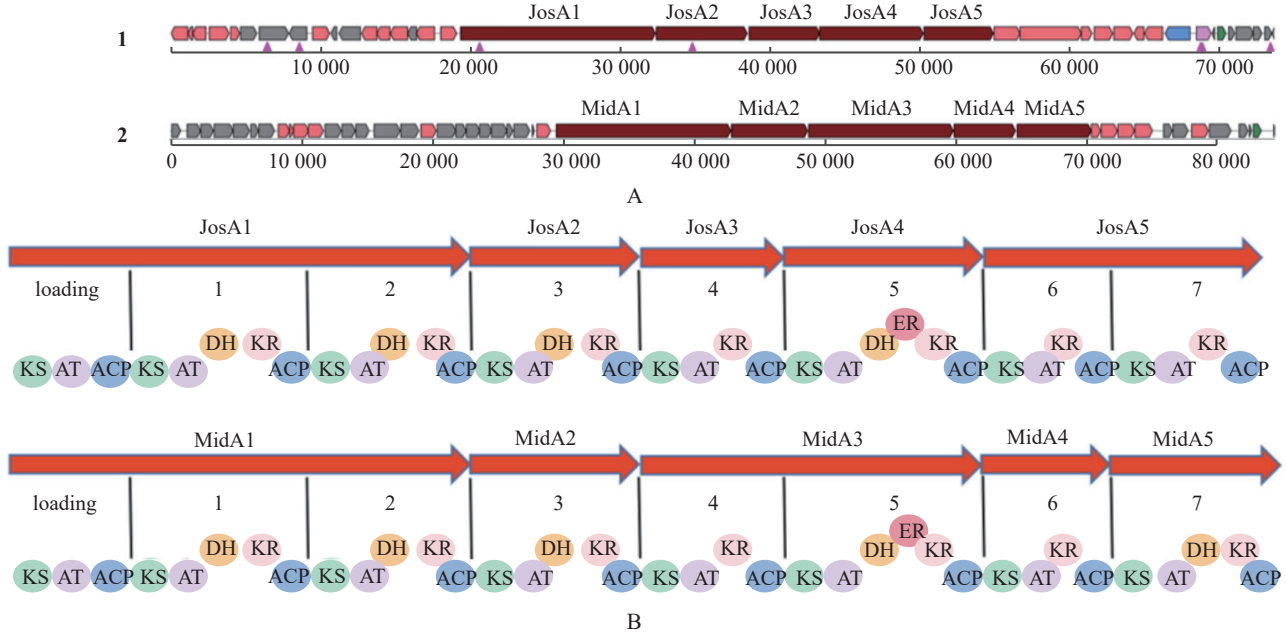
注：从外到内依次表示 COG 功能、tRNA 和 rRNA、GC 含量、GC 偏好性。

图 2　J-2-40 的基因注释和 GC 偏好性分析

Fig.2　Gene Annotation and GC Skew Analysis of J-2-40

2.4　1 生物基因合成簇推测与分析

因为 **1** 与 **2** 的结构类似，利用 NCBI 数据库中 **2** 的基因组信息，结合 **2** 生物合成基因的研究，通过 antiSMASH 6.1 软件分析 **1** 全基因组序列，确定基因组中的 **1** 生物合成基因簇，并利用 BLAST（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）分析基因簇中每个基因的功能[4]（表 3）。基因序列对比分析（图 3A）显示，**1** 与 **2** 的生物合成基因簇序列具有 37%的相似性。两者的聚酮合酶（polyketide synthase，PKS）都包括 8 个模块，均具有模块化Ⅰ型 PKS 的特征（即由模块化的单个结构域组成多功能蛋白质），各模块协同作用，以线性方式从酰基辅酶 A 底物组装为复杂的聚酮[5-6]。两者 PKS 模块上结构域的排列顺序十分相似（图 3B），且 **1** 基因组中可定位到与 **2** 相似的后修饰酶基因。**1** 基因簇序列全长 73 893 bp，包含 38 个基因开放阅读框（open reading frame，ORF），与聚酮链延伸及修饰相关的 ORF 有 8 个（*orf* 1 ～



A—**1** 与 **2** 生物合成基因簇的组织结构（■—核心生物合成基因；■—额外生物合成基因；■—转运相关基因；■—调控基因；■—抗性基因；■—其他基因）；B—**1** 与 **2** 的 PKS 结构域组织与模块排列（KS—酮酯酰合酶；AT—酰基转移酶；ACP—酰基载体蛋白；DH—脱水酶；KR—酮还原酶；ER—烯酰还原酶）。

图 3　1 和 2 生物合成基因簇的比较

Fig.3　Comparison of the Biosynthetic Gene Clusters of **1** and **2**

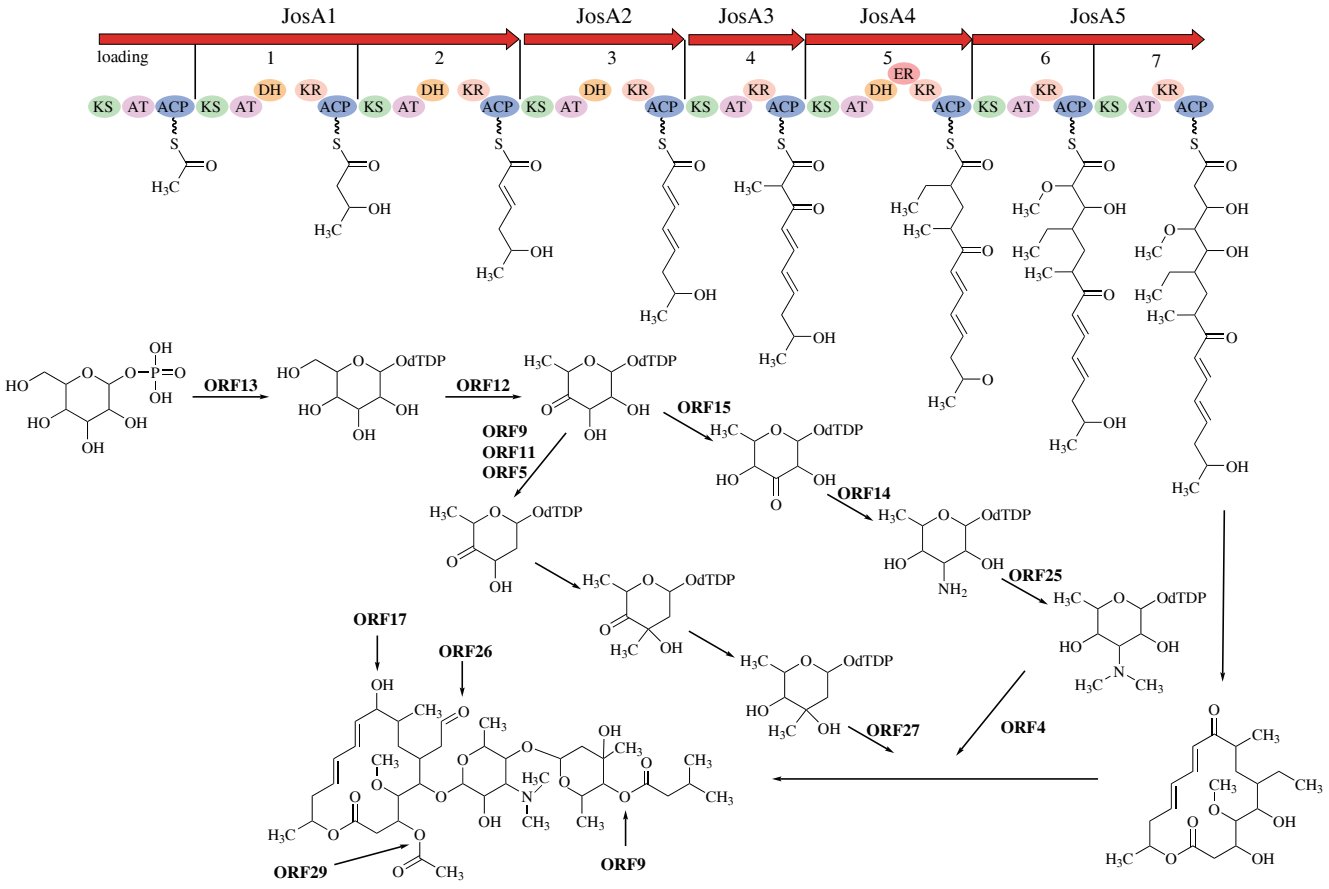
表 3 各 ORF 的预测功能

Tab.3 Inferred Functions of Each ORF

基因	高度同源蛋白	编号	同源性 /%	功能
orf 1	酰基辅酶 A 脱氢酶家族蛋白	WP_087930360.1	99.66	脱氢酶
orf 2	酰基载体蛋白质	WP_087925803.1	99.08	酰基载体蛋白
orf 3	3- 羟酰基辅酶 A 脱氢酶家族蛋白	WP_087930359.1	99.26	脱氢酶
orf 4	糖基转移酶	WP_095582800.1	94.74	糖基转移酶
orf 5	胸苷二磷酸 -4- 脱氢鼠李糖 3,5- 戊糖家族蛋白	WP_087925801.1	100	核苷二磷酸 - 己糖 -3,5- 差向异构酶
orf 6	假定蛋白	WP_159395262.1	100	转醛酶
orf 7	GAF 结构域蛋白	WP_087925799.1	100	转录调控蛋白
orf 8	转录调控蛋白	ARZ67326.1	100	转录调控蛋白
orf 9	麦迪霉素 4"-*O*- 丙酰转移酶	ARZ67325.1	100	4"-*O*- 丙酰转移酶
orf 10	SgcJ/EcaC 家族氧化还原酶	WP_087930358.1	99.28	假定蛋白 SSCG_02762
orf 11	核苷二磷酸 - 己糖 -2,3- 脱水酶	WP_087925796.1	100	核苷二磷酸 - 己糖脱水酶
orf 12	胸苷二磷酸 - 葡萄糖 -4,6- 脱水酶	WP_087925795.1	100	胸苷二磷酸 - 葡萄糖 -4,6- 脱水酶
orf 13	葡萄糖 -1- 磷酸胸苷转移酶 RfbA	WP_087930357.1	100	核苷二磷酸葡萄糖合酶
orf 14	DegT/DnrJ/EryC1/StrS 转氨酶	WP_087925794.1	99.27	核苷二磷酸 - 己糖转氨酶
orf 15	核苷二磷酸 - 己糖异构酶	ARZ67319.1	98.49	核苷二磷酸 - 己糖异构酶
orf 16	细胞色素 P450 酶	WP_087925793.1	100	细胞 P450 羟化酶
orf 17	NAD 依赖性差向异构酶	WP_087925792.1	98.58	还原酶
orf 18	PKS	ARZ67316.1	99	PKS 模块 1、2
orf 19	模块化 PKS	BBM96640.1	84.8	Ⅰ型模块化 PKS
orf 20	PKS 模块 4、5	ARZ67313.1	99.12	PKS 模块 4、5
orf 21	PKS 模块 4、5	ARZ67313.1	99.78	PKS 模块 4、5
orf 22	Ⅰ型 PKS	WP_087925787.1	99.23	PKS 模块 6
orf 23	Ⅰ型 PKS	WP_087925786.1	98.95	PKS 模块 7
orf 24	Ⅰ型 PKS	WP_087925786.1	99.27	PKS 模块 7
orf 25	核苷二磷酸 - 氨基己糖 -*N*- 二甲基转移酶	BBM96636.1	92.83	NDP- 氨基己糖 -*N*- 二甲基转移酶
orf 26	P450 来源的糖基转移酶激活剂	WP_087925784.1	98.28	糖基转移酶辅助蛋白
orf 27	激活剂依赖性家族糖基转移酶	WP_087925783.1	99.76	糖基转移酶
orf 28	Ⅰ类 SAM 依赖性甲基转移酶	WP_087925782.1	99.55	*O*- 甲基转移酶
orf 29	酰基转移酶	WP_087925781.1	99.75	3-*O*- 酰基转移酶
orf 30	ABC-F 型核糖体保护蛋白 Car(A)	WP_087925780.1	99.46	卡波霉素抗性蛋白
orf 31	23S rRNA 甲基转移酶	WP_087925779.1	99.68	23S rRNA 甲基转移酶
orf 32	假定蛋白 SMD11_1642	ARZ67303.1	100	预测蛋白
orf 33	TetR/AcrR 家族转录调节因子	WP_087925777.1	100	TetR 家族转录调节因子
orf 34	细胞分裂蛋白 SepF	WP_087925776.1	99.25	假定蛋白
orf 35	生物素转运蛋白 BioY	WP_087925775.1	99.74	假定蛋白
orf 36	核苷酸焦磷酸水解酶	WP_095581527.1	87.9	含 MazG 核苷酸焦磷酸水解酶结构域的蛋白质
orf 37	假定蛋白	WP_087925774.1	100	假定蛋白
orf 38	假定蛋白 SCAB_23231	WP_087925773.1	100	假定蛋白

3、9、16、17、28、29)，与糖基合成相关的 ORF 有 8 个 (*orf* 5、6、11 ～ 13、15、31、36)，与糖基转移相关的 ORF 有 5 个 (*orf* 4、14、25 ～ 27)，与抗性相关的 ORF 有 1 个 (*orf* 30)，与调控可能相关的 ORF 有 3 个 (*orf* 7、8、33)，未知功能基因有 6 个 (*orf* 10、32、34、35、37、38)。

根据蛋白功能推测 **1** 生物合成的主要步骤，主要包括聚酮前体物质合成、聚酮链延伸、糖基侧链组装以及后期修饰反应 (图 4)。首先是丙二酰辅酶 A、甲基丙二酰辅酶 A、乙基丙二酰辅酶 A 和甲氧



KS—酮酯酰合酶；AT—酰基转移酶；ACP—酰基载体蛋白；DH—脱水酶；KR—酮还原酶；ER—烯酰还原酶。

图 4　1 的生物合成途径

Fig.4　The Biosynthetic Pathway of **1**

基丙二酰辅酶 A 等聚酮前体物质的合成；然后各前体物质经过 PKS 催化逐步合成聚酮链，聚酮链经环化形成大环内酯的基本骨架；再通过添加核苷二磷酸活化葡萄糖，经过脱氧、还原、甲基化等反应合成糖基侧链；最后通过各种修饰反应，包括酰化、甲基化、氧化、还原、特异性糖加成等得到 **1**。

2.5　过表达酰基转移酶基因对 **1** 产量的影响

1 的生物合成后修饰步骤涉及 2 个酰基转移酶，将异戊酰基转移至碳霉糖 C-4" 位的 *orf* 9，以及将丙酰基转移至内酯环 C-3 位的 *orf* 29。鉴于二者功能明确，且在修饰过程中的潜在关键作用，本研究优先选择过表达其编码基因（*orf* 9、*orf* 29），以探究基因过表达对 **1** 生物合成的影响。

用引物 ORF9-F/ORF9-R 和 ORF29-F/ORF29-R 从 J-2-40 的基因组上扩增出 *orf* 9、*orf* 29 2 个基因片段。其中 *orf* 9 片段长度为 1 134 bp，*orf* 29 片段长度为 1 212 bp。用 *Nde* Ⅰ/*Bam*H Ⅰ双酶切 pSET152 质粒，根据一步克隆试剂盒说明书，以同源重组法，将 pSET152 骨架片段分别与基因 *orf* 9、*orf* 29 片段连接，构建质粒 pSET152-*orf* 9 和 pSET152-*orf* 29，并转化至 *E. coli* DH5α 中扩增。将质粒送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，验证正确后，将构建完成的质粒分别转化至 *E. coli* ET12567/pUZ8002 中，并利用接合转移法导入至菌株 J-2-40 中，构建菌株 JOS-ORF9 和 JOS-ORF29。

链霉菌接合转移的详细操作参考文献[7]，简要步骤如下。

E. coli ET12567/pUZ8002（供体菌）处理：将携带所需质粒的供体菌（光密度值 OD_{600} 约为 0.6），用 LB 培养基洗涤并重悬。

那波链霉菌 J-2-40（受体菌）处理：取菌株的孢子悬液 500 μL，于 50 ℃热激 10 min，冷却至室温，加入 2× 孢子萌发液 500 μL，37 ℃振荡培养 2 h，离心（12 000×*g*）后用 LB 培养基重悬。

供受体处理：取上述 *E. coli* ET12567/pUZ8002 的菌悬液与 J-2-40 的萌发孢子液各 500 μL，混匀，涂布于 MS 平板培养基上，于 28 ℃培养 18 ～ 22 h，向 MS 平板培养基上均匀覆盖含 1.5 mg/mL 安普霉素的无菌水溶液，于 28 ℃培养 4 ～ 5 d。

挑取工程菌株 JOS-ORF9 和 JOS-ORF29 各 3 株单克隆菌落，于 28 ℃、280 r/min 条件发酵培养 7 d，按“**2.2**”项下方法测定发酵液中 **1** 的含量。结果（图 5）显示，与菌株 J-2-40 相比，过表达 *orf* 29 的菌株 JOS-ORF29 相对效价提高了 13.1%，而过表达 *orf* 9 的菌株 JOS-ORF9 相对效价降低了 36.3%。次级代谢产物的生物合成受到多种因素的复杂调控，尽管 *orf* 9、*orf* 29 均被注释为酰基转移酶基因，但可能 *orf* 29 的表达水平较低，通过基因的过表达有助于提升酰基产物的产量，而出发菌株中 *orf* 9 自身表达水平较高，过表达反而可能破坏了菌株代谢平衡，不利于菌株合成 **1**。

2.6 过表达乙酰辅酶 A 羧化酶基因对 1 产量的影响

丙二酰辅酶 A 是 **1** 聚酮骨架合成的重要前体之一。编码乙酰辅酶 A 羧化酶亚基的 3 个基因（*accA2*、*accB* 和 *accE*）负责将两分子乙酰辅酶 A 转化为丙二酰辅酶 A[8]。基于此，本研究通过过表达基因 *accA2BE*，探究增加 **1** 前体供应对产量的影响。

将实验室保藏的质粒 pSET-A2BE、PLCB1-A2BE 通过“**2.5**”项下的接合转移法导入菌株 J-2-40 中，得到菌株 JOS-A2BE 和 JOS-A2BE-2，并各挑取 3 株单菌，按“**2.5**”项下方法进行发酵验证，测定发酵液中 **1** 的含量。结果（图 6）显示，与菌株 J-2-40 相比，菌株 JOS-A2BE 的相对效价提高了 31.2%；而整合 2 个拷贝数的 *accA2BE* 得到的菌株 JOS-A2BE-2 相对效价降低了 63.9%。这表明，适度的 *accA2BE* 基因过表达有助于促进菌株合成 **1**，提高发酵效价；但随着基因拷贝数量的增加，反而会使代谢压力增大，最终导致产量减少。

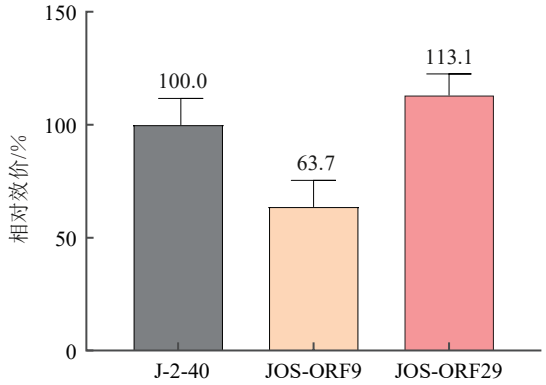


图 5 过表达酰基转移酶基因对 1 产量的影响（*n*=3）

Fig.5 The Effect of Overexpression of Acyltransferase Genes on the Production of **1** (*n*=3)

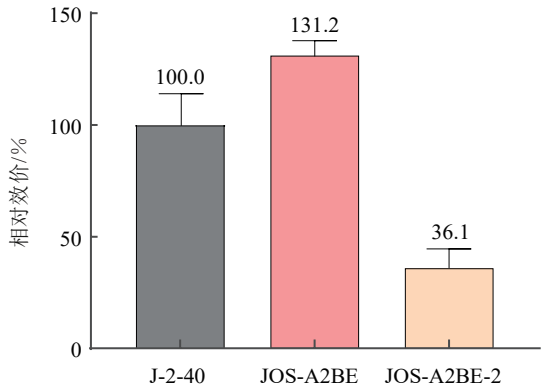


图 6 过表达乙酰辅酶 A 羧化酶基因对 1 产量的影响（*n*=3）

Fig.6 The Effect of Overexpression of Acetyl CoA Carboxylase Gene on the Production of **1** (*n*=3)

3 讨论

本研究运用 PacBio 公司的三代与 Illumina 公司的二代测序相结合的方法，对 **1** 生产菌株 J-2-40 进行全基因组测序，获得 1 条长度为 6 373 796 bp 的染色体。通过 BLAST 分析，对各基因进行功能注释，结合与 **2** 的基因簇进行比对分析，推测 **1** 的生物合成途径。此外，本研究进一步考察了酰基转移酶基因 *orf* 9、*orf* 29 及不同拷贝数 *accA2BE* 过表达对 **1** 产量的影响。结果显示，整合 1 个拷贝数的 *accA2BE* 使 **1** 相对效价提高了 31.2%，*orf* 29 的过表达仅提高了 13.1%，而 *orf* 9 过表达则导致相对效价

降低了 36.3%。

解析 **1** 的生物合成基因簇，可在基因水平深入理解其生物合成途径，从而挖掘可改造的靶点基因，选择性地对菌株进行分子改造，实现更加精确的高产菌种的选育。**1** 生物合成过程涉及多种酶。本研究仅初步探索了该基因簇中酰基转移酶基因、乙酰辅酶 A 羧化酶编码基因的过表达对 **1** 产量的影响。后续将深入探究基因簇内其他基因的功能，以全面解析和优化 **1** 的生物合成途径。例如，通过转录调控因子、组合过表达编码关键酶的基因、敲除编码负调控蛋白的基因[9]等来提高 **1** 产量；也可参照 **2** 及其他大环内酯类药物的改造策略，深入研究 **1** 基因簇中的特定功能基因（如酮基还原酶基因乃至整个生物合成基因簇），进行基因异源表达、全基因组重排等[10]。未来，利用合成生物学与代谢工程的技术手段，通过重构 PKS 及后修饰过程，有望为生物合成具有更高药用价值的新型大环内酯提供开辟新路径。

参考文献：

[1] 林　茹. 大环内酯类抗生素麦迪霉素糖基化失活机制的研究[D]. 北京: 北京协和医学院硕士学位论文, 2021.

[2] ARSIC B, BARBER J, ČIKOŠ A, *et al*. 16-Membered macrolide antibiotics: a review [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, **51**(3): 283-298.

[3] NARITOMI Y, TERAMURA Y, TERASHITA S, *et al*. Utility of microtiter plate assays for human cytochrome P450 inhibition studies in drug discovery: application of simple method for detecting quasi-irreversible and irreversible inhibitors [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2004, **19**(1): 55-61.

[4] CONG L, PIEPERSBERG W. Cloning and characterization of genes encoded in dTDP-D-mycaminose biosynthetic pathway from a midecamycin-producing strain, *Streptomyces mycarofaciens* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai), 2007, **39**(3): 187-193.

[5] SOOHOO A M, COGAN D P, BRODSKY K L, *et al*. Structure and mechanisms of assembly-line polyketide synthases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2024, **93**(1): 471-498.

[6] 张华茜, 刘　伟, 杜春梅. 聚酮合酶的催化机制及聚酮类化合物的组合生物合成[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2023, **39**(3): 400-412.

[7] 刘倩倩, 余志拓, 吴远杰, 等. 产子囊霉素吸水链霉菌遗传操作系统的优化及调控基因的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(12): 1603-1608.

[8] CHOI J W, Da SILVA N A. Improving polyketide and fatty acid synthesis by engineering of the yeast acetyl-CoA carboxylase [J]. *J Biotechnol*, 2014, **10**(187): 56-59.

[9] 郝天怡, 赫卫清. 大环内酯类抗生素代谢工程的研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, **37**(5): 1737-1747.

[10] 朱　岩, 宋欣怡, 黄小池, 等. 基因组重排选育麦迪霉素高产菌株[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, **28**(10): 830-834.