

研究报告

糖丝菌属次级代谢潜能分析及代表菌株基因编辑体系建立

李栋^{1,2}, 范可强¹, 胡会涛^{1,2}, 潘国辉^{*1,2}

1 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学存济医学院, 北京 101408

李栋, 范可强, 胡会涛, 潘国辉. 糖丝菌属次级代谢潜能分析及代表菌株基因编辑体系建立[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2614-2629.

LI Dong, FAN Keqiang, HU Huitao, PAN Guohui. Secondary metabolism potential of *Saccharothrix* and establishment of gene editing systems in representative strains[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2614-2629.

摘要:【背景】稀有放线菌是发掘天然产物的“新矿藏”。糖丝菌(*Saccharothrix*)作为典型的稀有放线菌, 其天然产物生产潜能尚需进行系统分析和发掘。此外, 针对糖丝菌的基因编辑体系也鲜有报道。【目的】揭示糖丝菌属稀有放线菌合成不同结构类型天然产物的潜能, 并建立代表菌株的基因编辑体系, 推动新结构天然产物发现及相关生物合成研究。【方法】通过多位点序列分析(multi-locus sequence analysis, MLSA)方法评价已公布的 34 个糖丝菌基因组之间的相似度, 利用 antiSMASH 分析基因簇及其合成产物的结构信息, 并使用 BiG-SCAPE 对基因簇进行聚类分析。选择代表菌株澳大利亚糖丝菌(*Saccharothrix australiensis*) DSM 43800 和紫丁香糖丝菌(*Saccharothrix syringae*) NRRL B-16468, 以整合型载体和基因敲除载体为工具, 建立接合转移及基因编辑体系。【结果】对 34 个糖丝菌基因组的分析显示, 共发现了 1 348 个天然产物生物合成基因簇, 平均每个基因组含有约 40 个基因簇。其中, 合成聚酮、非核糖体肽、聚酮-非核糖体肽杂合产物, 以及核糖体合成和翻译后修饰肽类天然产物的基因簇丰度较高。这 1 348 个基因簇聚类成 852 个基因簇家族(gene cluster family, GCF), 进一步聚集成 130 个基因簇集团(gene cluster clan, GCC)。本研究建立并优化了适用于澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌的接合转移操作体系, 并建立了 2 个代表菌株的基因编辑体系, 获得了相应的突变菌株。【结论】糖丝菌作为稀有放线菌, 其基因组内富含天然产物生物合成基因簇, 展现出合成众多结构类型天然产物的强大潜能, 尤其是聚酮与聚肽类天然产物。我们成功实现了对糖丝菌基因组的精准编辑, 为深入研究基因簇及其合成的天然产物奠定了坚实的基础。

关键词: 糖丝菌; 次级代谢; 天然产物; 生物合成基因簇; 基因编辑

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2303100); 国家自然科学基金(32070067)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2303100) and the National Natural Science Foundation of China (32070067).

*Corresponding author. E-mail: panguohui@im.ac.cn

Received: 2024-01-19; Accepted: 2024-02-18; Published online: 2024-03-27

Secondary metabolism potential of *Saccharothrix* and establishment of gene editing systems in representative strains

LI Dong^{1,2}, FAN Keqiang¹, HU Huitao^{1,2}, PAN Guohui^{*1,2}

¹ State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China

Abstract: [Background] Rare actinomycetes represent a “new treasure trove” for discovering natural products. Studies remain to be carried out to explore the natural product-producing potential of *Saccharothrix* as typical rare actinomycetes. Furthermore, few studies reported gene editing systems specifically tailored for *Saccharothrix*. **[Objective]** This study aims to elucidate the potential of *Saccharothrix* in synthesizing natural products with diverse structures. Additionally, we seek to establish gene editing systems for representative strains, thereby fostering the discovery of novel natural compounds and advancing the research on related biosynthetic pathways. **[Methods]** Multi-locus sequence analysis (MLSA) was employed to assess the similarity among 34 publicly available *Saccharothrix* genomes. The tool antiSMASH was utilized to analyze the gene clusters and the structural information of associated products. Additionally, BiG-SCAPE was applied for clustering analysis of these gene clusters. The representative strains, *Saccharothrix australiensis* DSM 43800 and *S. syringae* NRRL B-16468, were selected, for which the conjugation transfer and gene editing systems were established via integrative vectors and gene knockout vectors. **[Results]** The analysis of the 34 *Saccharothrix* genomes revealed a total of 1 348 natural product biosynthetic gene clusters, with an average of approximately 40 clusters per genome. The gene clusters were abundant in the biosynthesis of polyketides, non-ribosomal peptides, hybrid products of polyketides and non-ribosomal peptides, as well as ribosomally synthesized and post-translational modified peptides. The 1 348 gene clusters were grouped into 852 gene cluster families (GCFs), which were further grouped into 130 gene cluster clans (GCCs). This study established and optimized a conjugation transfer system applicable to *S. australiensis* DSM 43800 and *S. syringae* NRRL B-16468. Additionally, gene editing systems were successfully established for the two representative strains, with the establishment of corresponding mutant strains. **[Conclusion]** As rare actinomycetes, *Saccharothrix* exhibit a rich array of natural product biosynthetic gene clusters, highlighting robust potential for synthesizing diverse natural compounds, particularly polyketides and polypeptides. Moreover, this study achieves precise editing of the *Saccharothrix* genome, laying a solid foundation for probing into the gene clusters and associated products.

Keywords: *Saccharothrix* sp.; secondary metabolism; natural products; biosynthetic gene clusters; gene editing

近年来, 抗生素在医疗和养殖领域的大量使用甚至滥用导致细菌耐药性不断发展, 甚至出现多重耐药菌株, 严重威胁医疗健康, 这就迫切需要发现新结构、新活性的药物^[1-3]。天然产物由于其化学结构的多样性和显著的生物学活性, 在药物发现的过程中占据重要地位。1981–2019 年批准上市的 1 881 个药物中, 约 46% 是天然产物及其类似物^[4]。放线菌是天然产物的重要来源, 从微生物中分离到的活性代谢产物中, 有 2/3 来自于放线菌, 其中约 76% 来自于链霉菌^[5]。然而近年来从链霉菌中发现新抗生素的效率有所下降, 越来越多的报道表明稀有放线菌是天然产物的“新矿藏”, 具备产生新结构活性产物的巨大潜能^[6-10]。

糖丝菌是典型的稀有放线菌, 隶属于放线菌门(*Actinomycetota*)放线菌纲(*Actinomycetes*)假诺卡氏菌目(*Pseudonocardiales*)假诺卡氏菌科(*Pseudonocardiaceae*)糖丝菌属(*Saccharothrix*)^[11]。该属已发现 25 个有效描述种、3 个亚种以及 106 个未分类的糖丝菌^[11-12]。模式种是 1984 年由 Labeda 等分离自澳大利亚土壤的澳大利亚糖丝菌(*Saccharothrix australiensis*)^[12]。据统计, 截至 2023 年 6 月, 从 28 株糖丝菌中共分离并鉴定了 138 种次级代谢物, 这些代谢产物具有不同程度的生物活性, 如具有抗肿瘤活性的 pluraflavin A、kinamycins、ammocidins A-B 等, 抗革兰氏阳性菌活性的 galacardins、mutactimycin, 抗真菌活性的 formamycin, 抗结核活性的 capreomycin, 除草剂 phosphonothrixin、coformycin 等^[13]。此外, 部分糖丝菌具有较强的生物防治能力, 如杨凌糖丝菌(*Saccharothrix yanglingensis*) Hhs.015 对苹果溃疡病有较好的防治效果^[14], *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 能够抑制棉花枯萎病的发生^[15]。

随着基因测序技术的发展, 大量微生物基因组数据被公布, 在此基础上发展起来的多种组学

技术与生物信息学分析的结合为天然产物的研究带来了新的生机, 进而可以更宏观地认识到微生物所蕴含的天然产物的分布、丰度和多样性^[16-17]。为了揭示糖丝菌属的天然产物合成潜能, 我们对目前已报道的糖丝菌属基因组数据进行了全面的分析, 发现糖丝菌属含有丰富的次级代谢产物生物合成基因簇, 尤其具有合成聚酮和聚肽类化合物的强大潜力。目前, 大部分糖丝菌来源化合物是直接分离自野生型菌株或基因簇异源表达菌株, 关于糖丝菌的基因编辑体系还鲜有报道。因此, 我们选择澳大利亚糖丝菌(*Saccharothrix australiensis*) DSM 43800 和紫丁香糖丝菌(*Saccharothrix syringae*) NRRL B-16468 作为代表菌株, 以整合型载体 pSET152 为工具, 建立并优化接合转移遗传操作系统; 之后以调控蛋白编码基因 *tetR* 为对象, 摸索合适的基因敲除策略, 建立代表菌株的基因编辑体系, 以期对其他糖丝菌的基因编辑体系建立提供参考意义, 并推动糖丝菌属天然产物的发掘研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

澳大利亚糖丝菌 DSM 43800 (CGMCC 4.1355)、紫丁香糖丝菌 NRRL B-16468 (CGMCC 4.1716), 中国普通微生物菌种保藏管理中心; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) ET12567/pUZ8002, 质粒 pSET152-kasO* (pBS21003)^[18]、pKC1139^[19]、pBluescript KS(+)^[20]、pHZ1358^[21]及 pIJ778^[22]均为本实验室保藏。大肠杆菌 GB05-Red 由张友明教授团队惠赠^[23], 质粒 pCRISPomyces-2^[24]购自 Addgene 中国代理北京中源合聚生物科技有限公司。

实验中所用的引物见表 1, 由北京擎科生物科技股份有限公司完成。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	用途 Usage
1139aadA-tsr-F	ACTGATGTCATCAGCGGTGGAGTGCAATGTCATGAGGGAAGCGG	构建 pKC1139-ST 质粒 Construction of pKC1139-ST
aadA-R	TGATCGCCGAAGTAT	
tsr-F	ATCCACGAAGCTTCCCGACTGGCGAGCGGCATCTTA	
1139aadA-tsr-R	TCGCCAGTCGGAAGCTTCGTGGATCAAGGCGAATAC	
152vec-F	TGCCCCCTCCAACGTCATCTCGTTCTCCGCTCATGAGCTTATCGGT	构建 pSET152-AT-kasO 质粒 Construction of pSET152-AT-kasO
152vec-R	TGGCCGCGAGATTC	
bla-F	CTCTGGTACCCTCTAGTCAAGGCTCATGAGCGGAGAACGAGATG	
bla-R	TGATCCAGATATCCTGCAGGCTCGGCTTTTCGCCATTCGTATTG	
tsr-F1	GCCTTGACTAGAGGGTACCAGAGATTGAAAAAGGAAGAGTATGA	构建 pCRISPR-zdxTetR 质粒 Construction of pCRISPR-zdxTetR
tsr-R	GTATTC	
zdxTetR-20nt-F	GATCCACGAAGCTTCCCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT	
pCRISPRzdxTetR-Larm-F	AGA	
pCRISPRzdxTetR-Rarm-R	AATCTCATGGGAAGCTTCGTGGATCAAGGCGAATACTTCATATAT	构建 pKC1139-zdxTetR 质粒 Construction of pKC1139-zdxTetR
zdxTetR-Larm-R	GC	
zdxTetR-Rarm-F	CCGAGCCTGCAGGATATCTGGATCATCACTGACGAATCGAGGTC	
1139zdxTetR-Larm-F	ACGCCGAACAGCTCGCGCGGGAAG	
1139zdxTetR-Larm-R	AAACCTTCCCGCGCGAGCTGTTCCG	构建 pCRISPR-atTetR 质粒 Construction of pCRISPR-atTetR
1139zdxTetR-Rarm-F	TCGGTTGCCCGCGGCGGCTTTTATGGCCGACGATCTCCTCGTTG	
1139zdxTetR-Rarm-R	AG	
atTetR-20nt-F	GCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTAGCACCGACGTCTCGTCCCG	
atTetR-20nt-R	TGCGCGGACGACCATGTCGATGCTCGCCATCAGGT	构建 pCRISPR-atTetR 或 pKC1139-ST-atTetR 质粒 Construction of pCRISPR-atTetR or pKC1139-ST-atTetR
pCRISPRatTetR-Larm-F	GAGCATCGACATGGTCGTCCGCGCATTCCTGTACG	
pCRISPRatTetR-Rarm-R	CGACGGCCAGTGCCAAGCTTCAGGATCGCCTTGAGCAT	
1139atTetR-Larm-F	CATCGACATGGTGCTGCTCAACGCCACGCTC	
1139atTetR-Larm-R	TGAGCAGCACCATGTCGATGCTCGCCATCAGGT	构建 pCRISPR-atTetR 或 pKC1139-ST-atTetR 质粒 Construction of pCRISPR-atTetR or pKC1139-ST-atTetR
1139atTetR-Rarm-F	TATGACATGATTACGAATTCCTTGTCTTTCCGTGGTTGT	
1139atTetR-Rarm-R	ACGCACAGGTCGCGCATCGCGGTC	
atTetR-Larm-R	AAACGACCGCGATGCGCGACCTGT	
atTetR-Rarm-F	TCGGTTGCCCGCGGCGGCTTTTATGGACCCGCCAACGTCTACAT	构建 pCRISPR-atTetR 或 pKC1139-ST-atTetR 质粒 Construction of pCRISPR-atTetR or pKC1139-ST-atTetR
1139atTetR-Larm-F	GC	
1139atTetR-Larm-R	GCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTCGGTCTTCCAGCACTCGATG	
1139atTetR-Rarm-R	GC	
1139atTetR-Larm-F	CCGCCGTGACCAGGGTCTCGGTGACCGGGGGCTG	构建 pCRISPR-atTetR 或 pKC1139-ST-atTetR 质粒 Construction of pCRISPR-atTetR or pKC1139-ST-atTetR
1139atTetR-Larm-R	GTCACCGAGACCCTGGTCACGGCGGACGACTAGG	
1139atTetR-Rarm-F		
1139atTetR-Rarm-R		

(待续)

(续表 1)

引物名称 Primers name	序列 Sequence (5'→3')	用途 Usage
20nt-VF	CGAGCGGTGTGAACTTCTGTG	验证 pCRISPomyces-2 骨架敲除质粒 Verification of the knockout vector from pCRISPomyces-2 backbone
20nt-VR	CTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCG	
atTetR-VF	GGTCCGCGCCTCACGTATGC	验证澳大利亚糖丝菌 <i>tetR</i> 敲除菌株 Verification of $\Delta tetR$ mutant of <i>Saccharothrix australiensis</i>
atTetR-VR	CGCACCTGGCGGAGCGACTG	
zdxTetR-VR	CGGTATCTGCAAAACGACCT	验证紫丁香糖丝菌 <i>tetR</i> 敲除菌株 Verification of $\Delta tetR$ mutant of <i>Saccharothrix syringae</i>
zdxTetR-VF	CGTAAATCTCCGGACGAAC	

1.1.2 培养基

LB 培养基及 2×YT 培养基参照文献[25]配制, YEME 培养基及 MS 培养基参照文献[26]配制, ISP2 培养基、ISP3 培养基及 ISP4 培养基参照文献[27]配制。

1.1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶和 DNA 分子质量标准, NEB 公司; KOD One™ PCR Master Mix, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; DNA 回收试剂盒和质粒小提试剂盒, 北京博迈德基因技术有限公司; 抗生素, 上海源叶生物科技有限公司, 贮存浓度为: 氨苄青霉素 100 mg/mL, 安普霉素 100 mg/mL, 卡那霉素 50 mg/mL, 硫链丝菌素 25 mg/mL, 链霉素 50 mg/mL, 壮观霉素 50 mg/mL, 潮霉素 100 mg/mL。DNA 测序由北京擎科生物科技股份有限公司完成。恒温培养箱, 宁波江南仪器厂; 用于 DNA 定量的 NanoVue Plus, 柏楫有限公司; 基因扩增仪, 杭州柏恒科技有限公司; 凝胶成像仪, 上海天能科技有限公司。

1.2 产孢培养基测试

分别将澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌在 ISP2、ISP3、ISP4 和 MS 固体培养基上划线培养, 28 °C 培养 5–7 d, 观察每种固体培养基上

的菌落生长状况及产孢情况。

1.3 抗生素敏感性测试

收集澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌新鲜孢子, 分别涂布在安普霉素浓度为 0、50、100、200、350、500 µg/mL, 卡那霉素浓度为 0、5、10、20、50、100 µg/mL, 硫链丝菌素浓度为 0、5、10、50、100 µg/mL, 链霉素+壮观霉素浓度为 0+0、5+50、10+100、50+500 µg/mL 或潮霉素浓度为 0、50、100、200 µg/mL 的 ISP2 固体培养基上, 28 °C 培养 5–7 d; 观察不同浓度抗生素在固体平板上的菌落生长状况, 按抗生素浓度由低到高的顺序, 选择完全抑制菌落生长的最低抗生素浓度作为最小抑菌浓度。

1.4 质粒的构建

质粒 pSET152-AT-kasO 是 pSET152-kasO* 的衍生质粒, 将其中安普霉素抗性基因 *aac(3)IV* 替换为氨苄青霉素抗性基因 *bla* 以及硫链丝菌素抗性基因 *tsr*。以 pBluescript KS(+) 载体为模板, 以 *bla*-F/*bla*-R 为引物, 扩增氨苄青霉素抗性基因 (*bla*); 以 pHZ1358 载体为模板, 以 *tsr*-F1/*tsr*-R 为引物, 扩增硫链丝菌素抗性基因 (*tsr*); 以 pSET152-kasO* 为模板, 以 152vec-F/152vec-R 为引物, 反向扩增不包含 *aac(3)IV* 的

pSET152-kasO*载体骨架。PCR 反应体系(50 μ L): 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L, DNA 模板(50 mg/L) 4 μ L, DMSO 2.5 μ L, KOD One™ PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O 15.5 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 60 °C 5 s, 68 °C 30 s, 35 个循环; 68 °C 5 min。2 个抗性基因 *bla*、*tsr* 与载体骨架通过 Gibson 组装进行连接, 进而获得 pSET152-AT-kasO 质粒。

质粒 pKC1139-ST 是 pKC1139 衍生质粒, 将其中安普霉素抗性基因 *aac(3)IV* 替换为链霉素与壮观霉素抗性基因 *aadA*, 以及硫链丝菌素抗性基因 *tsr*。参照上述 PCR 反应体系, 以 pIJ778 质粒为模板, 以 1139aadA-*tsr*-F/aadA-R 为引物, 扩增链霉素与壮观霉素抗性基因(*aadA*); 以 pSET152-AT-kasO 质粒为模板, 以 *tsr*-F/1139aadA-*tsr*-R 为引物, 扩增硫链丝菌素抗性基因(*tsr*)。以等摩尔比的 *aadA* 和 *tsr* 为模板, 以 1139aadA-*tsr*-F/1139aadA-*tsr*-R 为引物, 通过 overlap PCR 扩增得到基因打靶元件 *aadA*-*tsr*。通过 PCR targeting 的方法, 对含有 pKC1139 质粒的 GB05-Red 菌株进行打靶, 替换 pKC1139 载体上安普霉素抗性基因 *aac(3)IV*, 得到 pKC1139-ST 质粒。

提取澳大利亚糖丝菌基因组^[26], 并以澳大利亚糖丝菌基因组 DNA 为模板, 参照上述 PCR 反应体系, 以 1139atTetR-Larm-F/atTetR-Larm-R 为引物扩增获得 2 481 bp 的左侧同源臂, 以 1139atTetR-Rarm-R/atTetR-Rarm-F 为引物扩增获得 1 884 bp 的右侧同源臂。同时使用 *EcoR* I 和 *Xba* I 内切酶对 pKC1139-ST 质粒进行双酶切。同源臂和载体骨架通过 Gibson 组装进行连接, 进而获得敲除质粒 pKC1139-ST-atTetR。使用类似的方法构建紫丁香糖丝菌敲除质粒 pKC1139-zdxTetR。

使用 *Bbs* I 将 pCRISPomyces-2 质粒酶切, 同时将 atTetR-20nt-F/atTetR-20nt-R 退火, 随后

利用 T4 连接酶将载体片段与退火片段连接, 进而获得 pCRISPR-atTetR-20nt 中间质粒。测序正确后使用 *Xba* I 进行酶切, 同时以澳大利亚糖丝菌基因组 DNA 为模板, 参照上述 PCR 反应体系, 以 pCRISPRatTetR-Larm-F/atTetR-Larm-R 为引物扩增获得 2 481 bp 的左侧同源臂, 以 pCRISPRatTetR-Rarm-R/atTetR-Rarm-F 为引物扩增获得 1 884 bp 的右侧同源臂。同源臂和载体骨架通过 Gibson 组装进行连接, 进而获得敲除质粒 pCRISPR-atTetR。使用类似的方法构建紫丁香糖丝菌敲除质粒 pCRISPR-zdxTetR。

1.5 接合转移条件

将含有 *oriT* 的质粒转化大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 感受态细胞涂布在含有相应浓度抗生素的固体 LB 培养基上, 37 °C 培养; 挑取单菌落接种到含有相应浓度抗生素的 4 mL 液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜; 取 1 mL 培养过夜的菌液接种在含有相应浓度抗生素的 10 mL LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至 *OD*₆₀₀ 为 0.4–0.6; 室温下 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用等体积液体 LB 培养基洗涤菌体 2 次, 用 500 μ L 液体 LB 培养基悬浮。

澳大利亚糖丝菌的接合转移使用孢子作为受体, 因此在洗涤大肠杆菌细胞的同时, 用 2×YT 培养基收集孢子, 分别以 40、45 或 50 °C 热激 10 min, 随后于 28 °C、100 r/min 摇床复苏 1 h; 将 500 μ L 大肠杆菌细胞与 500 μ L 糖丝菌孢子混合, 涂布在含有 MgCl₂:CaCl₂ 浓度 (mmol/L:mmol/L) 分别为 10:0、10:30、10:60、30:0、30:30 或 30:60 的固体 MS 培养基上, 28 °C 培养 8、12、16 h 后, 涂布终浓度为 25 μ g/mL 的萘啶酮酸和 5 μ g/mL 的硫链丝菌素, 28 °C 继续培养 7–10 d 获得接合子。

紫丁香糖丝菌的接合转移使用菌丝体作为受体, 首先将紫丁香糖丝菌接入 25 mL YEME

液体培养基中, 培养 2 d 后取 1 mL 接入含有 5 mmol/L MgCl_2 、0.1%甘氨酸的 50 mL YEME 中, 培养 36–48 h 后, 室温以 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌丝体, 使用 2×YT 培养基洗涤 2 遍后, 重悬至 10 mL。将 500 μL 大肠杆菌细胞与 500 μL 糖丝菌菌丝体混合, 涂布在含有 MgCl_2 : CaCl_2 浓度(mmol/L:mmol/L)分别为 10:0、10:30、10:60、30:0、30:30 或 30:60 的固体 MS 培养基上, 28 °C 培养 8、12 或 16 h 后, 涂布终浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 的萘啶酮酸和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的安普霉素, 28 °C 继续培养 7–10 d 获得接合子。

1.6 生物信息学分析方法

糖丝菌基因组数据下载自 NCBI Genome 数据库(截至 2023 年 11 月)。参考文献中报道的方法, 多位点序列分析(multi-locus sequence analysis, MLSA)共选择了 5 个基因, 包括 ATP 合酶 β 链(*atpD*)、DNA 旋转酶 β 亚基(*gyrB*)、重组酶 A (*recA*)、RNA 聚合酶 β 亚基(*rpoB*)、色氨酸合酶 β 亚基(*trpB*)等^[28–29], 使用天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)中相应基因序列为查询蛋白, 使用 BLASTp 在糖丝菌基因组中搜索同源蛋白, 使用其编码 DNA 序列进行分析。使用 MEGA 11 完成 DNA 序列的多重序列比对、Kimura 双参数距离计算以及进化树构建^[30], 使用 Interactive Tree Of Life (iTOL)网站进行进化树可视化^[31]。使用 antiSMASH 7.0.0 完成天然产物生物合成基因簇预测^[32], 所用命令行参数为: --asf --clusterhmm --tigrfam --cc-mibig --cb-knownclusters --cb-general --cb-subclusters --rre --tfbs --genefinding-tool prodigal。使用 BiG-SCAPE 完成基因簇的相似性比较^[33], 所用命令行参数为: --mix --no_classify --mibig, 默认 cutoff 为 0.3。所有结果使用 python 脚本完成统计分析, 使用 CytoScape 3.10.0 进行可视化^[34]。16S rRNA 基因序列的比较使用 EzBioCloud 数据库完成^[35]。

2 结果与分析

2.1 糖丝菌属次级代谢潜能分析

从 NCBI Genome 数据库中共下载得到 34 个糖丝菌属细菌基因组(截止到 2023 年 11 月)。首先使用 MLSA^[28–29]计算这些基因组之间的相似度, 以天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)及阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*) MA-4680 为外群。其中 6 个糖丝菌基因组未能提取到所有 5 个基因的编码序列, 其组装状态主要为 contig 状态, 我们认为可能是由于这几个基因组的测序及组装效果较差所致。

剩余 28 个糖丝菌基因组的分析结果如图 1。除少数属于同一物种的不同基因组之间距离很小外, 大部分糖丝菌基因组之间的 Kimura 双参数距离为 0.02–0.10, 表明这些已测序的糖丝菌基因组具有一定的普遍性和代表性。我们注意到有 2 株糖丝菌的基因组与其他糖丝菌的相似度较低, 提取其 16S rRNA 基因序列, 在 EzBioCloud 数据库中搜索与其高度相似的序列^[35]。其中 *Saccharothrix* sp. ST-888 菌株基因组的测序质量较差, 只有 16S rRNA 基因的片段序列, 搜索结果显示相似性最高的几条同源序列主要来源于北里孢菌属(*Kitasatospora*), 序列相似性>99%); *Saccharothrix* sp. AJ9571 菌株基因组为拼接完整的序列, 其中 2 个不同序列的 16S rRNA 基因序列的搜索结果显示, 相似性最高的同源序列均来源于 *Amycolatopsis magusensis* KT2025 (序列相似性>99%)。这些结果提示我们, 这 2 株细菌可能不属于糖丝菌属, 或者具有比较边缘的进化地位。

使用 antiSMASH 在所有 34 个糖丝菌基因组中共找到 1 348 个基因簇, 平均每个基因组中含有约 40 个基因簇。我们将 antiSMASH 预测的产物类型分成九大类型进行统计, 结果显示其中非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide

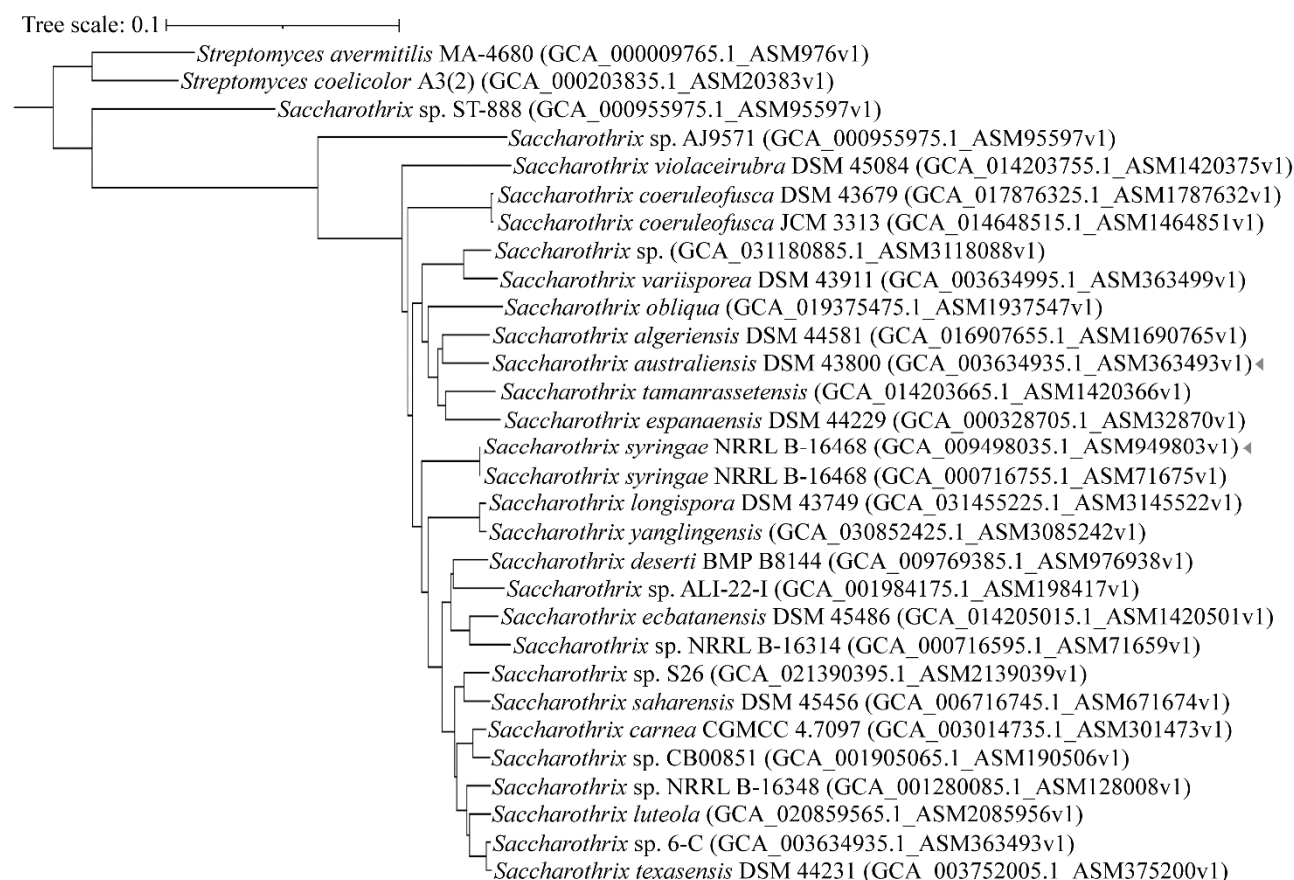


图 1 28 个糖丝菌基因组的多位点序列分析(MLSA)结果 括号内序号为基因组在 NCBI genome 数据库中的登录号；分支长度代表 Kimura 双参数距离，标尺显示每个基因组的 Kimura 双参数距离为 0.1

Figure 1 Multi-locus sequence analysis results of 28 *Saccharothrix* genomes. The genome assembly number in NCBI genome database are shown in parentheses. Branch length represented the Kimura distance. The scale bar indicates the Kimura distance of each genome is 0.1.

synthetase, NRPS)、核糖体合成和翻译后修饰肽(ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide, RiPP)及 I 型聚酮合酶(polyketide synthase I, PKS I)类生物合成基因簇的丰度较高,平均每个基因组中含有 6 个以上;而 II 型聚酮合酶与多糖类的基因簇丰度较低,平均每个基因组中含有不到 1 个(图 2A)。

图 2B 显示了在这 34 个糖丝菌基因组中各种类型的天然产物合成基因簇的分布情况。结果显示大部分糖丝菌中含有天然产物合成基因簇的数量为 23–47 个,其中不同类型基因簇的

分布也基本相当,均是以 PKS、NRPS (包括杂合基因簇)以及 RiPP 的丰度较高。四个糖丝菌基因组中天然产物合成基因簇的数目明显更多,其中含有显著增加的 NRPS 以及 I 型 PKS 类基因簇。这 4 个糖丝菌基因组的组装状态均为 contig 状态,估计是相对较差的组装状态导致了这两类模块式天然产物合成基因簇被分割在不同 contig 上,导致高估了这两类基因簇的数目。

使用 BiG-SCAPE 将这 1 348 个基因簇聚集成 852 个基因簇家族(gene cluster family, GCF) (相似性阈值为 0.7),进一步聚集成 130 个基因

簇集团(gene cluster clan, GCC) (相似性阈值为0.3)。在这 852 个基因簇家族中, 15 个家族包含 MIBiG 数据库中的已知基因簇(共 46 个已知基因簇), 648 个家族仅包含一个基因簇(图 2C)。其中 6 个基因簇家族中分别包含了已在糖丝菌中发现的天然产物生物合成基因簇: 包括 II 型 PKS 类基因簇(saccharothrixin, pentangumycin)、NRPS

类基因簇(thiolutin, saccharochelin, capreomycin)以及杂合 PKS/NRPS 基因簇(nocamycin)。此外, 我们发现 3 个基因簇家族中包含另外几个尚未在糖丝菌中报道过的 NRPS 类天然产物的生物合成基因簇, 如 mirubactin、omnipeptin 以及 nocardicin, 这表明糖丝菌属可能也具有合成此类天然产物的生物合成能力。

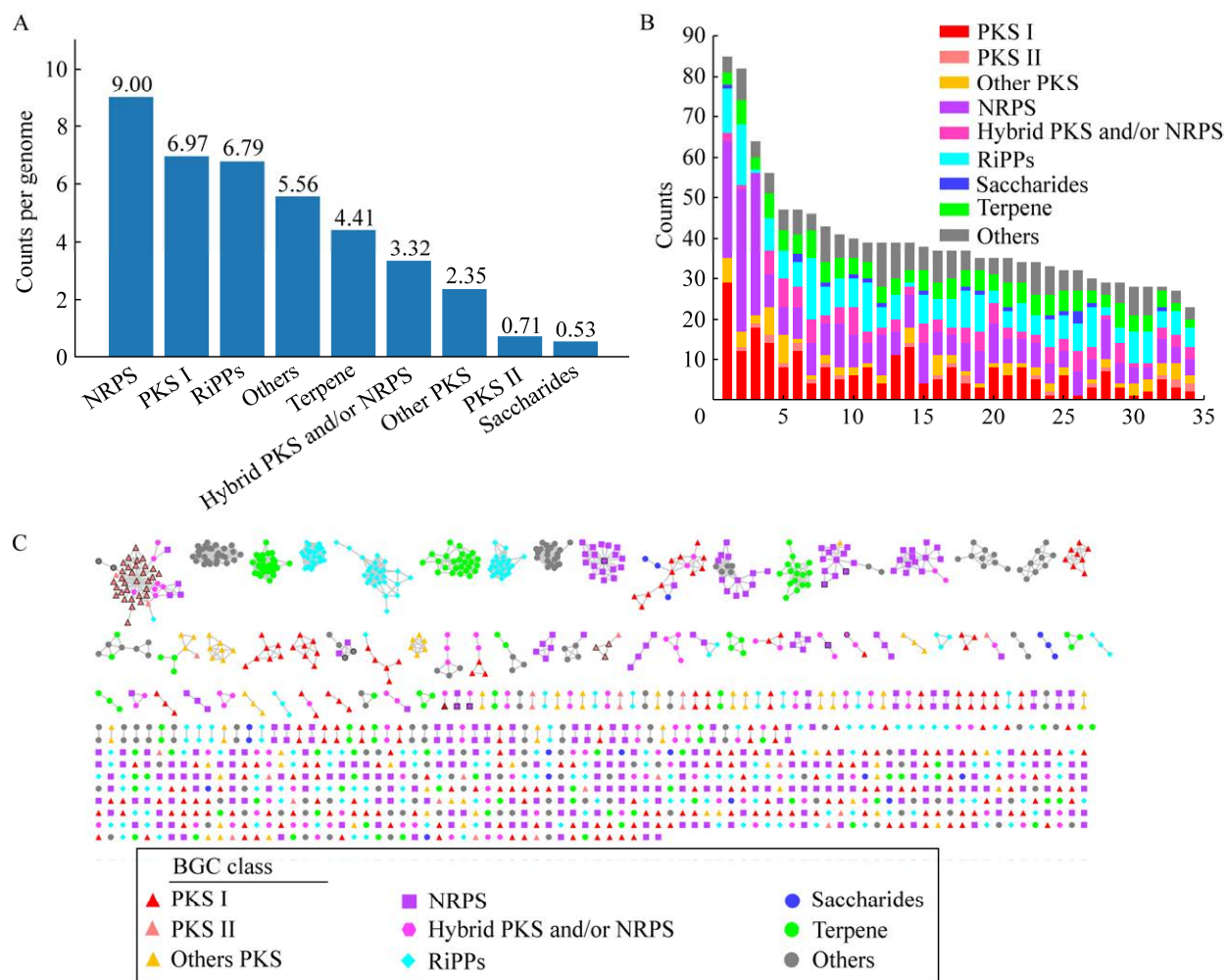


图 2 糖丝菌基因组中天然产物生物合成基因簇的分布 A: 平均每个基因组中各种类型天然产物合成基因簇的分类统计结果. B: 各个基因组中各种类型天然产物合成基因簇的分类统计结果. C: BiG-SCAPE 聚类结果. 带黑色边框的符号表示来源于 MIBiG 数据库的已知生物合成基因簇

Figure 2 The distribution and clustering of biosynthetic gene clusters from 34 *Saccharothrix* genomes. A: Average numbers of different type of biosynthetic gene clusters. B: Numbers of different type of biosynthetic gene clusters in each genome. C: BiG-SCAPE clustering of 1 348 clusters together with similar clusters from MIBiG database. Symbols with black border means clusters from MIBiG database.

2.2 澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌产孢培养基的确定

基于基因簇的丰富度、多样性、新颖性以及菌株的可获得性,我们选取了澳大利亚糖丝菌(*Saccharothrix australiensis*) DSM 43800 和紫丁香糖丝菌(*Saccharothrix syringae*) NRRL B-16468 作为代表。antiSMASH 分析结果显示,澳大利亚糖丝菌含有 34 个天然产物合成基因簇,其中以 NRPS、I 型 PKS 及 RiPP 类基因簇较多;紫丁香糖丝菌含有 47 个天然产物合成基因簇,其中除了 NRPS、I 型 PKS 及 RiPP 类基因簇较多以外,还含有较为丰富的其他 PKS 以及 NRPS/PKS 杂合类基因簇。

糖丝菌与链霉菌同属于放线菌纲,推测也能使用链霉菌常用的属间接合转移将工具质粒导入糖丝菌中。而接合转移通常使用孢子进行实验,为收集大量孢子,采用 ISP2、ISP3、ISP4 和 MS 固体培养基对澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌进行培养。结果显示,2 种糖丝菌在 ISP2 培养基上产孢情况最佳,因此选择 ISP2 培养基作为澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌的产孢培养基。

2.3 各菌株抗生素敏感性测试结果

为了确定澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌遗传操作所需要的筛选标记,对 2 种糖丝菌进行了多种抗生素的敏感性测试。结果如表 2 所示,澳大利亚糖丝菌对卡那霉素和硫链丝菌素敏感,对安普霉素较为敏感,对潮霉素和链霉素+壮观霉素不敏感。紫丁香糖丝菌对 5 种抗生素/抗生素组合都较为敏感。因此,选择硫链丝菌素和安普霉素作为澳大利亚糖丝菌中和紫丁香糖丝菌的筛选标记。

2.4 澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌遗传操作体系建立

为了摸索澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌的最适接合转移条件,以整合型载体

pSET152-AT-kasO 或 pSET152-kasO*分别作为属间穿梭质粒,分别测试不同 Mg^{2+} : Ca^{2+} 浓度、热激温度、供体菌受体菌比例、涂抗时间对接合转移效率的影响。

对于澳大利亚糖丝菌,当初始孢子浓度为 2.6×10^9 CFU/mL 时,结果显示,除 Ca^{2+} 浓度为 0 的组合外,其余 Mg^{2+} : Ca^{2+} 组合的接合效率相近,约为 1.00×10^{-8} (表 3)。热激温度对接合转移效率影响不大(表 3);在探究涂抗时间时发现,8 h 涂抗产生接合子较少,因此最适涂抗时间在 12–16 h (表 3)。综合接合转移单因素的最优条件后,对供体菌与受体菌的比例进行探究。结果表明,当 Mg^{2+} : Ca^{2+} 浓度为 10 mmol/L:30 mmol/L,热激温度为 45 °C,涂抗时间为 16 h,大肠杆菌生长到 $OD_{600}=0.6$ 时,使用 2.6×10^9 CFU/mL 的孢子浓度可以得到 51 个接合子,使用 2.6×10^8 CFU/mL 的孢子浓度可以得到 9 个接合子,使用更低孢子浓度时接合转移平板上无菌落生长(表 3),因此,澳大利亚糖丝菌接合转移至少使用 10^8 CFU/mL 的孢子浓度才能得到接合子。

由于使用紫丁香糖丝菌孢子进行接合转移时多次尝试均未成功,因此选择菌丝体作为接合转移受体。紫丁香糖丝菌接合转移效率很高,约为 10^{-3} ,所以将大肠杆菌与紫丁香糖丝菌菌丝体混合后稀释 100 倍涂板。与澳大利亚糖丝菌类似,紫丁香糖丝菌的最适接合转移条件为 Mg^{2+} : Ca^{2+} 浓度为 10 mmol/L:30 mmol/L,涂抗时间为 12–16 h,至少使用 10^4 CFU/mL 细胞浓度才能得到接合子(表 3)。

2.5 澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌基因编辑体系的建立

在上述最优接合转移条件下,分别以澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌基因组中的一个调控基因 *tetR* (WP_121007313.1 和 QFZ21451.1) 为对象,使用 2 种基因敲除质粒(pKC1139 和

表 2 两株糖丝菌的最小抑菌浓度

Table 2 The minimum inhibitory concentration of the two *Saccharothrix* strains

抗生素 Antibiotic	澳大利亚糖丝菌 <i>Saccharothrix australiensis</i>	紫丁香糖丝菌 <i>Saccharothrix syringae</i>
安普霉素 Apramycin (μg/mL)	200	100
卡那霉素 Kanamycin (μg/mL)	5	10
潮霉素 Hygromycin (μg/mL)	>200	50
硫链丝菌素 Thiostreptomycin (μg/mL)	5	5
链霉素+壮观霉素 Streptomycin+Spectinomycin (μg/mL)	>50+500	5+50

表 3 两株糖丝菌的接合转移效率

Table 3 Conjugation efficiency of the two *Saccharothrix* strains

测试条件 Experimental conditions	澳大利亚糖丝菌 <i>S. australiensis</i>		紫丁香糖丝菌 <i>S. syringae</i>	
	接合子个数 Number of conjugants	接合转移效率 Conjugation efficiency	接合子个数 Number of conjugants	接合转移效率 Conjugation efficiency
Mg ²⁺ :Ca ²⁺				
10 mmol/L:0 mmol/L	0	0	42	2.63×10 ⁻⁴
10 mmol/L:30 mmol/L	51	1.96×10 ⁻⁸	533	3.33×10 ⁻³
10 mmol/L:60 mmol/L	44	1.69×10 ⁻⁸	584	3.42×10 ⁻³
30 mmol/L:0 mmol/L	1	3.85×10 ⁻¹⁰	89	5.56×10 ⁻⁴
30 mmol/L:30 mmol/L	25	9.62×10 ⁻⁹	507	3.17×10 ⁻³
30 mmol/L:60 mmol/L	34	1.31×10 ⁻⁸	591	3.69×10 ⁻³
热激温度 Heat shock temperature (°C) ^a				
40	41	1.58×10 ⁻⁸	NA	NA
45	51	1.96×10 ⁻⁸	NA	NA
50	44	1.69×10 ⁻⁸	NA	NA
涂抗时间 Antibiotics overlaid time (h) ^b				
8	18	6.90×10 ⁻⁹	46	2.88×10 ⁻⁴
12	41	1.58×10 ⁻⁸	533	3.33×10 ⁻³
16	51	1.96×10 ⁻⁸	577	3.61×10 ⁻³
受体菌计数 Number of recipients (CFU/mL)				
2.6×10 ⁹	51	1.96×10 ⁻⁸	NA	NA
2.6×10 ⁸	9	3.46×10 ⁻⁹	NA	NA
2.6×10 ⁷	0	0	NA	NA
1.6×10 ⁵	NA	NA	533	3.33×10 ⁻³
1.6×10 ⁴	NA	NA	8	5.00×10 ⁻⁵
1.6×10 ³	NA	NA	0	0

NA: 不适用; ^a: 测试热激温度时, Mg²⁺:Ca²⁺浓度为 10 mmol/L:30 mmol/L, 其他条件参照 1.5; ^b: 测试涂抗时间时, Mg²⁺:Ca²⁺浓度为 10 mmol/L:30 mmol/L, 其他条件参照 1.5

NA: Not applicable; ^a: When the heat shock temperature was tested, the concentration of Mg²⁺:Ca²⁺ was 10 mmol/L:30 mmol/L, and other conditions were referred to 1.5; ^b: When the time of antibiotics overlaid tested, the concentration of Mg²⁺:Ca²⁺ was 10 mmol/L:30 mmol/L, and other conditions were referred to 1.5.

pCRISPomyces-2)测试 2 种糖丝菌的基因编辑能力。结果显示, 澳大利亚糖丝菌中无法导入 pCRISPR-atTetR (无菌落生长), 但可以成功导入 pKC1139-ST-atTetR, 得到具有硫链丝菌素抗性的接合子。松弛培养 3 代后, 挑选对硫链丝菌素敏感的菌株进行 PCR 验证, 从中筛选获得突变株 $\Delta tetR$ 。结果如图 3 所示, 澳大利亚糖丝菌野生型菌株的 PCR 产物应为 757 bp, $\Delta tetR$ 对应的 PCR 产物应为 463 bp (图 3B)。对于紫丁香糖丝菌, 导入 pCRISPR-zdxTetR 和 pKC1139-zdxTetR 均能得到具有安普霉素抗性的接合子。导入 pKC1139-zdxTetR 的接合子松弛培养 3 代后, 可以挑选到对安普霉素敏感的菌株, 进一步通过 PCR 验证获得相应的突变株 $\Delta tetR$ 。如图 3C 所示, 野生型菌株的 PCR 产物应为 736 bp, $\Delta tetR$ 对应的 PCR 产物应为 337 bp。导入 pCRISPR-zdxTetR 的接合子松弛培养 5 代后, 从中挑选到 8 个对安普霉素敏感的菌株。经 PCR 验证(图 3E), 这 8 个菌株均为突变株 $\Delta tetR$ (Cas9), 阳性率为 100%。如图 3E 所示, 野生型菌株的 PCR 产物应为 736 bp, $\Delta tetR$ (Cas9) 对应的 PCR 产物应为 250 bp。因此, 我们成功建立了澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌的基因编辑系统。这 2 个菌株均能使用 pKC1139 质粒进行基因敲除。此外, 紫丁香糖丝菌也能使用 pCRISPomyces-2 质粒进行敲除。

3 讨论与结论

放线菌是天然产物的重要生产源, 能够产生众多抗生素和其他生物活性物质。其中, 稀有放线菌由于在以往的标准实验室操作流程中较少被分离获得而得名, 此前对这类放线菌的研究相对较少。但近年来越来越多的研究表明, 这些稀有放线菌表现出了丰富的生物多样性, 以及相当大的生物合成和化学多样性^[6-8]。目前

从稀有放线菌中获得了许多应用于临床的新药, 如地中海拟无枝酸菌(*Amycolatopsis mediterranei*)产生的利福霉素(rifamycins)、东方拟无枝酸菌(*Amycolatopsis orientalis*)产生的万古霉素(vancomycin)、游动放线动孢菌属(*Actinoplanes teichomyceticus*)产生的替考拉宁(teicoplanin)、指孢囊菌属(*Dactylosporangium aurantiacum*)产生的非达霉素(fidaxomicin)等^[8,10]。从稀有放线菌中分离获得的新结构天然产物的数量也连年呈现上升态势, 因而受到广泛关注^[8-9]。在本研究工作中, 我们选择稀有放线菌的重要类群糖丝菌作为研究对象, 系统分析其合成新颖天然产物的潜力。我们使用 antiSMASH 和 BiG-SCAPE 等分析工具对 34 个糖丝菌基因组进行分析, 从中发现了 1 348 个基因簇, 聚类成 852 个基因簇家族, 其中 15 个基因簇家族包含 MIBiG 数据库中已知天然产物生物合成基因簇, 表明绝大部分基因簇家族(约 98%)可能合成新结构的天然产物。在此基础上, 我们对不同结构类型的天然产物生物合成基因簇进行了分类统计, 发现糖丝菌基因组中富含聚酮、非核糖体肽以及核糖体合成和翻译后修饰肽类天然产物的生物合成基因簇, 这与已从糖丝菌中发现的天然产物类型基本相符^[13]。另外, Wei 等^[13]通过分析 25 个高质量糖丝菌基因组信息, 发现 975 个生物合成基因簇; 这些基因簇可以归类为 527 个基因簇家族, 其中约 82.2%的基因簇家族中的化合物是有待发掘的新化合物; 文章的分析结果也显示, 糖丝菌中含有较为丰富的 I 型 PKS 和 NRPS 类天然产物生物合成基因簇。由于我们分析的糖丝菌基因组数目相对较多, 因此发现了数量更多的基因簇及基因簇家族。这进一步表明糖丝菌属微生物具有合成数量众多、结构多样天然产物的强大潜能, 尤其是聚酮类与聚肽类天然产物。

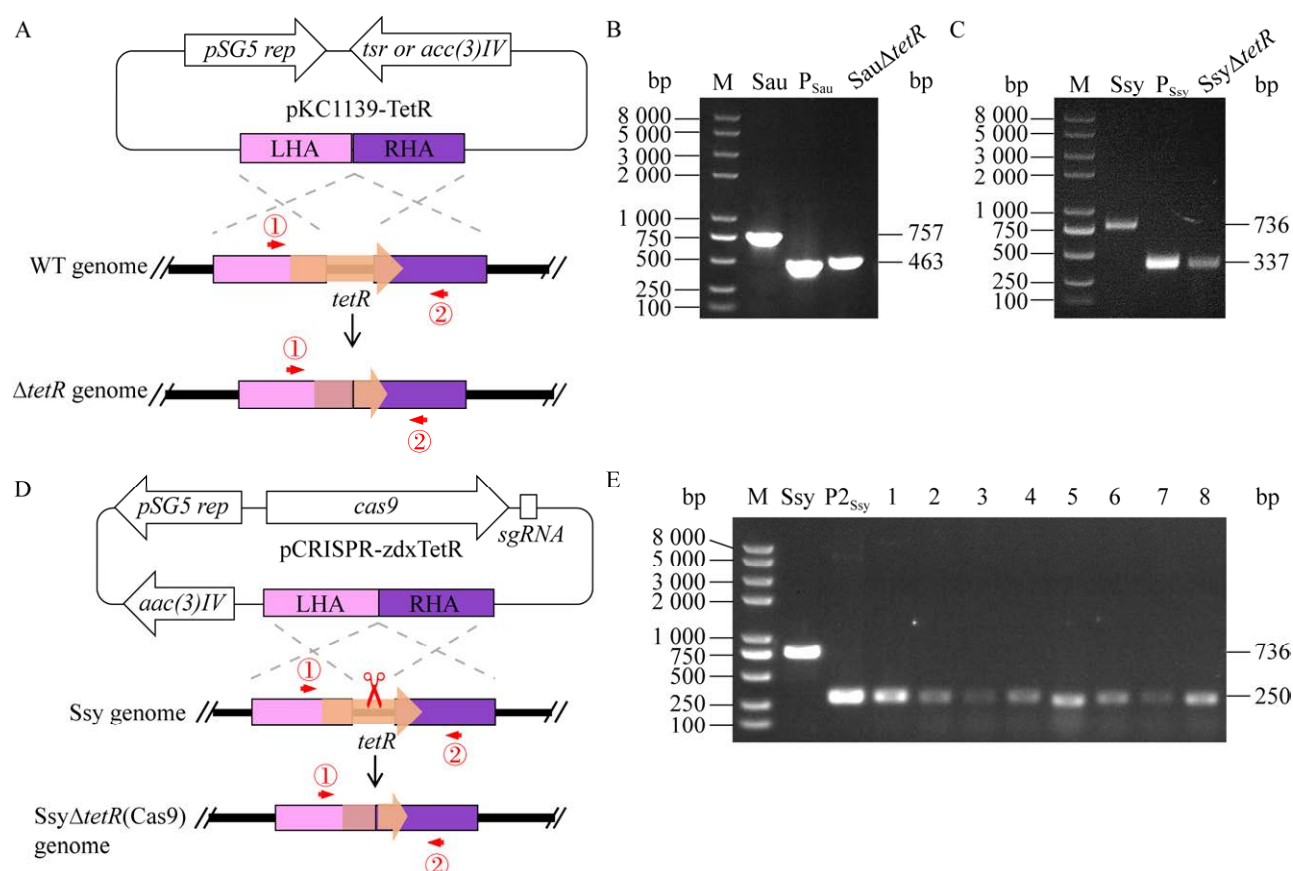


图 3 两株糖丝菌 $\Delta tetR$ 突变株的构建和验证 A: pKC1139 骨架质粒敲除 *tetR* 的示意图. B: 澳大利亚糖丝菌 $\Delta tetR$ 的 PCR 验证. C: 紫丁香糖丝菌 $\Delta tetR$ 的 PCR 验证. D: pCRISPR-zdxTetR 质粒敲除紫丁香糖丝菌 *tetR* 的示意图. E: 紫丁香糖丝菌 $\Delta tetR(Cas9)$ 的 PCR 验证. LHA: 左侧同源臂; RHA: 右侧同源臂; M: DNA marker; Sau: 澳大利亚糖丝菌野生型菌株; P_{Sau}: pKC1139-ST-atTetR; Sau $\Delta tetR$: 澳大利亚糖丝菌 $\Delta tetR$; Ssy: 紫丁香糖丝菌野生型菌株; P_{Ssy}: pKC1139-zdxTetR; Ssy $\Delta tetR$: 紫丁香糖丝菌 $\Delta tetR$; P_{2Ssy}: pCRISPR-zdxTetR; 1-8: Ssy $\Delta tetR(Cas9)$, 用 pCRISPR-zdxTetR 敲除的紫丁香糖丝菌 $\Delta tetR$

Figure 3 Construction and verification of $\Delta tetR$ mutants derived from the two *Saccharothrix* strains. A: Illustration for knockout of *tetR* with the pKC1139-derived plasmid. B: Verification of $\Delta tetR$ mutant of *Saccharothrix australiensis* by PCR. C: Verification of the $\Delta tetR$ mutant of *Saccharothrix syringae*. D: Illustration for knockout of *tetR* with the plasmid pCRISPR-zdxTetR. E: Verification of $\Delta tetR(Cas9)$ mutants of *Saccharothrix syringae* by PCR. LHA: Left homologous arm; RHA: Right homologous arm; M: DNA marker; Sau: Wild-type strain of *Saccharothrix australiensis*; P_{Sau}: pKC1139-ST-atTetR plasmid; Sau $\Delta tetR$: $\Delta tetR$ mutant of *Saccharothrix australiensis*; Ssy: Wild-type strain of *Saccharothrix syringae*; P_{Ssy}: pKC1139-zdxTetR plasmid; Ssy $\Delta tetR$: $\Delta tetR$ mutant of *Saccharothrix syringae*; P_{2Ssy}: pCRISPR-zdxTetR plasmid; 1-8: Ssy $\Delta tetR(Cas9)$, $\Delta tetR$ mutants of *Saccharothrix syringae* obtained by using pCRISPR-zdxTetR.

为了挖掘这些天然产物并实现对其生物合成途径及代谢调控的理性改造, 需要稳定的遗传操作与基因编辑体系。通过接合转移的方式,

可以实现链霉菌的遗传操作, 这一系统目前发展较为成熟。然而同属于放线菌纲的糖丝菌却鲜有遗传操作体系的报道。在已公布的 134 株

糖丝菌中, 仅有 3 株糖丝菌报道可以实现基因编辑: 西班牙糖丝菌(*Saccharothrix espanaensis*) DSM 44229、紫丁香糖丝菌(*Saccharothrix syringae*) NRRL B-16468 和 *Saccharothrix* sp. D09^[36-38]。为了建立糖丝菌的遗传操作系统, 本研究选取了 2 个代表菌株澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌, 其中澳大利亚糖丝菌是糖丝菌属的模式菌株。参考链霉菌-大肠杆菌属间接转移方法, 本研究分别探究了不同 Mg^{2+} : Ca^{2+} 浓度、热激温度、供体菌与受体菌的比例和涂抗时间对接合转移效率的影响。其中 Ca^{2+} 的添加以及供体菌与受体菌的比例对接合转移效率影响较大, 添加 Ca^{2+} 能显著提高 2 种糖丝菌的接合转移效率(10–100 倍)。对于澳大利亚糖丝菌, 只有达到 10^8 CFU/mL 孢子浓度才会有接合子的生长。而紫丁香糖丝菌只有达到 10^4 CFU/mL 的细胞浓度时才会有接合子的生长。同时, 本研究中采用 2 种质粒载体进行基因敲除, 其中 pKC1139 和 pCRISPomyces-2 均能对紫丁香糖丝菌进行基因敲除; 由于 pCRISPomyces-2 质粒无法导入澳大利亚糖丝菌, 因此澳大利亚糖丝菌只能使用 pKC1139 质粒进行基因敲除。

综上所述, 本研究分析发现糖丝菌属稀有放线菌具有合成数量众多、结构多样天然产物的强大潜能。此外, 本研究建立了 2 个代表性菌株澳大利亚糖丝菌和紫丁香糖丝菌的基因编辑体系, 为其他糖丝菌基因编辑体系的建立提供指导, 并将推动未来糖丝菌属天然产物的发掘研究。

REFERENCES

- [1] KIM L. The science of antibiotic discovery[J]. Cell, 2020, 181(1): 29-45.
- [2] BROWN ED, WRIGHT GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era[J]. Nature, 2016, 529: 336-343.
- [3] TACCONELLI E, CARRARA E, SAVOLDI A, HARBARTH S, MENDELSON M, MONNET DL, PULCINI C, KAHLMEIER G, KLUYTMANS J, CARMELI Y, OUELLETTE M, OUTTERSON K, PATEL J, CAVALERI M, COX EM, HOUCHEMS CR, GRAYSON ML, HANSEN P, SINGH N, THEURETZBACHER U, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2018, 18(3): 318-327.
- [4] NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. Journal of Natural Products, 2020, 83(3): 770-803.
- [5] BÉRDY J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading[J]. The Journal of Antibiotics, 2012, 65(8): 385-395.
- [6] TIWARI K, GUPTA RK. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2012, 32(2): 108-132.
- [7] AL-FADHLI AA, THREADGILL MD, MOHAMMED F, SIBLEY P, AL-ARIQI W, PARVEEN I. Macrolides from rare actinomycetes: structures and bioactivities[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2022, 59(2): 106523.
- [8] PARRA J, BEATON A, SEIPKE RF, WILKINSON B, HUTCHINGS MI, DUNCAN KR. Antibiotics from rare actinomycetes, beyond the genus *Streptomyces*[J]. Current Opinion in Microbiology, 2023, 76: 102385.
- [9] 张举成, 杨雪琼, 周皓, 杨亚滨, 丁中涛. 2006–2018 年稀有放线菌中的新天然产物[J]. 有机化学, 2019, 39(4): 982-1012.
- [10] ZHANG JC, YANG XQ, ZHOU H, YANG YB, DING ZT. New natural products of rare *Actinomycetes* from 2006 to 2018[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2019, 39(4): 982-1012 (in Chinese).
- [11] DING T, YANG LJ, ZHANG WD, SHEN YH. The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity[J]. RSC Advances, 2019, 9(38): 21964-21988.
- [12] SCHOCH CL, CIUFO S, DOMRACHEV M, HOTTON CL, KANNAN S, KHOVANSKAYA R, LEIPE D, MCVEIGH R, O'NEILL K, ROBERTSE B, SHARMA S, SOUSSOV V, SULLIVAN JP, SUN L, TURNER S, KARSCH-MIZRACHI I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools[J]. Database, 2020, 2020: baaa062.
- [13] LABEDA DP, TESTA RT, LECHEVALIER MP, LECHEVALIER HA. *Saccharothrix*: a new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiosis*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1984, 34(4): 426-431.

- [13] WEI B, LUO X, ZHOU ZY, HU GG, LI L, LIN HW, WANG H. Discovering the secondary metabolic potential of *Saccharothrix*[J]. Biotechnology Advances, 2024, 70: 108295.
- [14] LI ZP, GAO XN, KANG ZS, HUANG LL, FAN DY, YAN X, KANG ZS. *Saccharothrix yanglingensis* strain Hhs.015 is a promising biocontrol agent on apple Valsa canker[J]. Plant Disease, 2016, 100(2): 510-514.
- [15] ASIF R, SIDDIQUE MH, HAYAT S, RASUL I, NADEEM H, FAISAL M, WASEEM M, ZAKKI SA, ZITOUNI A, MUZAMMIL S. Efficacy of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 to suppress *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* induced wilt disease in cotton[J]. PeerJ, 2023, 11: e14754.
- [16] 张凡忠, 相长君, 张骊驊. 进化与大数据导向生物信息学在天然产物研究中的发展及应用[J]. 合成生物学, 2023, 4(4): 629-650.
- ZHANG FZ, XIANG CJ, ZHANG LH. Advances and applications of evolutionary analysis and big-data guided bioinformatics in natural product research[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(4): 629-650 (in Chinese).
- [17] 杨谦, 程伯涛, 汤志军, 刘文. 基因组挖掘在天然产物发现中的应用和前景[J]. 合成生物学, 2021, 2(5): 697-715.
- YANG Q, CHENG BT, TANG ZJ, LIU W. Applications and prospects of genome mining in the discovery of natural products[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(5): 697-715 (in Chinese).
- [18] PAN GH, XU ZR, GUO ZK, HINDRA, MA M, YANG D, ZHOU H, GANSEMANS Y, ZHU XC, HUANG Y, ZHAO LX, JIANG Y, CHENG JH, van NIEUWERBURGH F, SUH JW, DUAN YW, SHEN B. Discovery of the leinamycin family of natural products by mining actinobacterial genomes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(52): E11131-E11140.
- [19] BIERMAN M, LOGAN R, O'BRIEN K, SENO ET, RAO RN, SCHONER BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.[J]. Gene, 1992, 116(1): 43-49.
- [20] ALTING-MEES MA, SHORT JM. pBluescript II: gene mapping vectors[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(22): 9494.
- [21] SUN YH, HE XY, LIANG JD, ZHOU XF, DENG ZX. Analysis of functions in plasmid pHZ1358 influencing its genetic and structural stability in *Streptomyces lividans* 1326[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(2): 303-310.
- [22] GUST B, CHALLIS GL, FOWLER K, KIESER T, CHATER KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(4): 1541-1546.
- [23] FU J, BIAN XY, HU S, WANG HL, HUANG F, SEIBERT PM, PLAZA A, XIA LQ, MÜLLER R, STEWART AF, ZHANG YM. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30: 440-446.
- [24] COBB RE, WANG YJ, ZHAO HM. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(6): 723-728.
- [25] SAMBROOK J, RUSSELL DW. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [26] KIESER T, BIBB MJ, BUTTNER MJ, CHATER KF, HOPWOOD DA. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. Norwich: the John Innes Foundation, 2000.
- [27] SHIRLING EB, GOTTLIEB D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340.
- [28] LABEDA DP, DUNLAP CA, RONG XY, HUANG Y, DOROGHAZI JR, JU KS, METCALF WW. Phylogenetic relationships in the family *Streptomycetaceae* using multi-locus sequence analysis[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017, 110(4): 563-583.
- [29] RONG XY, HUANG Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35(1): 7-18.
- [30] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA 11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [31] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [32] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN HE, REITZ ZL, BIERMANN F, ALANJARY M, FETTER A, TERLOUW BR, METCALF WW, HELFRICH EJN, van WEZEL GP,

- MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): W46-W50.
- [33] NAVARRO-MUÑOZ JC, SELEM-MOJICA N, MULLOWNEY MW, KAUTSAR SA, TRYON JH, PARKINSON EI, de LOS SANTOS ELC, YEONG M, CRUZ-MORALES P, ABUBUCKER S, ROETERS A, LOKHORST W, FERNANDEZ-GUERRA A, CAPPELINI LTD, GOERING AW, THOMSON RJ, METCALF WW, KELLEHER NL, BARONA-GOMEZ F, MEDEMA MH. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16: 60-68.
- [34] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, BALIGA NS, WANG JT, RAMAGE D, AMIN N, SCHWIKOWSKI B, IDEKER T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [35] YOON SH, HA SM, KWON S, LIM J, KIM Y, SEO H, CHUN J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [36] ZHAO JF, MO TL, LI XH, DING W, ZHANG Q. Dissection of the glycosylation in the biosynthesis of the heptadecaglycoside antibiotic saccharomicin A[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2021, 86(16): 11117-11124.
- [37] MO XH, SHI CR, GUI C, ZHANG YJ, JU JH, WANG QJ. Identification of nocamycin biosynthetic gene cluster from *Saccharothrix syringae* NRRL B-16468 and generation of new nocamycin derivatives by manipulating gene cluster[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 100.
- [38] SHEN QY, DAI GZ, LI AY, LIU Y, ZHONG GN, LI XJ, REN XM, SUI HY, FU J, JIAO NZ, ZHANG YM, BIAN XY, ZHOU HB. Genome-guided discovery of highly oxygenated aromatic polyketides, saccharothrixins D-M, from the rare marine actinomycete *Saccharothrix* sp. D09[J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(11): 2875-2884.