

## 金核霉素生物合成途径的体内研究和关键代谢物鉴定

王 飞<sup>a</sup> 金文兵<sup>b</sup> 侯现锋<sup>b</sup> 唐功利<sup>\*,a,b</sup> 潘海学<sup>\*,a,b</sup><sup>(a)</sup> 国科大杭州高等研究院化学与材料科学学院 杭州 310024)<sup>(b)</sup> 中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

**摘要** 在前期获得金核霉素生物合成基因簇的基础上, 通过同框删除方法构建了全部基因敲除突变株, 确定了在金核霉素生物合成中发挥作用的关键基因. 通过突变株和野生型菌株发酵, 得到了两个关键的金核霉素类化合物. 根据体内基因敲除实验、突变株代谢物分析、关键化合物鉴定结果, 提出了金核霉素可能的生物合成途径.

**关键词** 核苷类抗生素; 生物合成; 金核霉素; 杀草菌素

*In vivo* Studies on the Biosynthetic Pathway of Aureonuclemycin and Identification of Key MetabolitesWang, Fei<sup>a</sup> Jin, Wenbing<sup>b</sup> Hou, Xianfeng<sup>b</sup> Tang, Gongli<sup>\*,a,b</sup> Pan, Haixue<sup>\*,a,b</sup><sup>(a)</sup> School of Chemistry and Materials Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024)<sup>(b)</sup> Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

**Abstract** On the basis of aureonuclemycin biosynthetic gene cluster obtained in the previous work, in-frame markerless deletion mutants of all genes were constructed, and the key genes that play a role in the biosynthesis of aureonuclemycin were identified. Two key aureonuclemycin-like compounds were successfully obtained from mutant and wild-type strains. According to the results of *in vivo* experiments, metabolite analysis and identification of key compounds, the possible biosynthetic pathway of aureonuclemycin was proposed.

**Keywords** nucleoside antibiotic; biosynthesis; aureonuclemycin; herbicidins

金核霉素(aureonuclemycin, ANM, **1**)是含有腺嘌呤和特殊十一碳糖骨架的核苷类抗生素, 由上海市农药研究所于 20 世纪 80 年代从金色链霉菌 SP-371 (*Streptomyces aureus suzhouensis* SP-371)的发酵液中分离得到, 对柑橘溃疡病、水稻白叶枯病等细菌性病害具有良好的防治效果<sup>[1]</sup>. 杀草菌素(herbicidins, **2~5**)是以金核霉素为核心骨架的一系列甲基化/酰基化衍生物, 先后从多种链霉菌中分离得到, 具有广泛的生物活性, 包括除草、抗菌和抗真菌活性等, 它们在 C-2'-OH、C-11'-OH 以及 C-8'-OH 处分别具有不同的甲基化和酰化模式(图 1)<sup>[2]</sup>.

金核霉素和杀草菌素因其良好的生物活性和独特结构受到化学合成和生物合成领域的共同关注. Liu 课题组<sup>[3]</sup>率先报道了 *Streptomyces* sp. L-9-10 中的杀草菌素

生物合成基因簇(*her*), 并通过同位素标记前体喂养等实验初步提出 herbicidin A 的生物合成途径. 本课题组<sup>[4]</sup>鉴定了金核霉素基因簇(*anm*)以及 *Streptomyces* sp. KIB-027 中的杀草菌素基因簇(*hbc*), 并与 Liu 课题组合作解析了杀草菌素的后修饰过程. 选择这类抗生素开展生物合成研究的重点在于解析其三环十一碳核心的组装, 借此揭示核苷类抗生素中 C—C 键形成的新机制. 最近, Liu 等<sup>[5]</sup>在这方面取得重要突破, 他们基于对杀草菌素的深入研究提出了全新的碳骨架生物合成机制. 本课题组基于对金核霉素基因簇的体内外研究, 获得若干有关核心骨架形成的新线索, 本文主要包括基因敲除和代谢物鉴定结果, 有助于对该类抗生素组装机制的后续研究.

\* Corresponding authors. E-mail: gltang@sioc.ac.cn; panhx@sioc.ac.cn

Received November 11, 2022; revised February 24, 2023; published online March 17, 2023.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32070065).

国家自然科学基金(No. 32070065)资助项目.

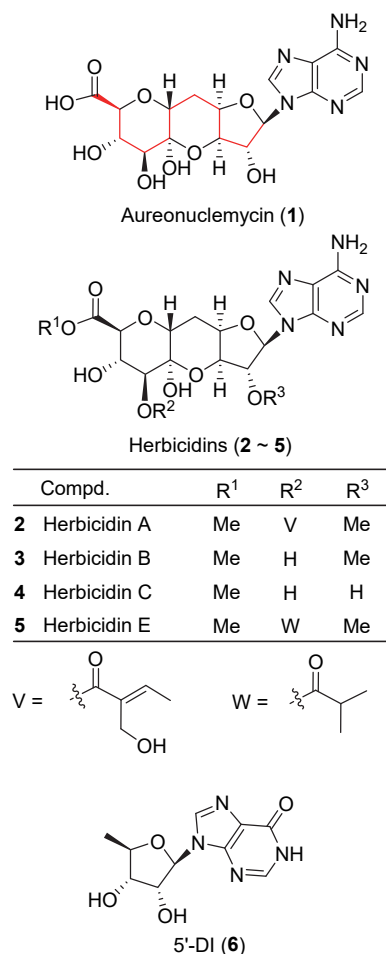


图1 金核霉素、杀草菌素及 5'-脱氧次黄嘌呤的化学结构  
Figure 1 Chemical structures of aureonuclemycin, herbicidins and 5'-DI

## 1 结果与讨论

### 1.1 基因敲除突变株的构建

金核霉素生物合成基因簇包含四个核心基因 *anmB/C/D/E*, 它们在杀草菌素基因簇中都存在同源基因(*hbcB/C/D/E* 和 *her4/5/7/6*), 分别编码一个 *S*-腺苷高半胱氨酸水解酶 AnmB, 两个 NAD 结合的氧化还原酶 AnmC/AnmD, 一个 B<sub>12</sub> 依赖的自由基 *S*-腺苷甲硫氨酸 (SAM)酶 AnmE(图 2A). 之前的异源表达实验显示, 将带有 *anmB~E* 整体导入变铅青链霉菌中, 能够产生金核霉素, 初步证实这四个基因总体上负责金核霉素和杀草菌素的骨架合成<sup>[4]</sup>, 但尚缺少每个基因的体内和体外功能证据. 我们首先在金色链霉菌中分别对 *anmB/C/D/E* 及相邻的 *anmA/F* 进行同框删除(in-frame deletion), 获得了基因敲除突变株:  $\Delta anmB$ 、 $\Delta anmC$ 、 $\Delta anmD$ 、 $\Delta anmE$  及  $\Delta anmA$ 、 $\Delta anmF$ .

突变株及野生型菌株(WT)发酵液的高效液相色谱(HPLC)对比分析显示, 敲除 *anmA*、*anmF* 对发酵产物没有影响, 表明在金核霉素生物合成中不发挥作用(图

2B). 而突变株  $\Delta anmB$ 、 $\Delta anmC$  和  $\Delta anmE$  则成功中断了金核霉素的产生, 也不再产生副产物 5'-脱氧次黄嘌呤核苷(图 1, 5'-DI, 6. 该产物在野生型中总是与金核霉素相伴产生), 并且在这三个突变株的 HPLC 分析中都没有发现明显的新峰(图 2B). 突变株  $\Delta anmD$  也不再产生金核霉素, 但仍然产生 5'-DI, 并且大量积累一个新的代谢产物 7(图 2B, 保留时间 11.7 min), LC-MS 分析显示其准分子离子峰  $m/z$  为 426.3  $[M+H]^+$ , 与金核霉素相同. 以上基因敲除结果表明, AnmB/C/D/E 在金核霉素的骨架合成中都发挥重要作用.

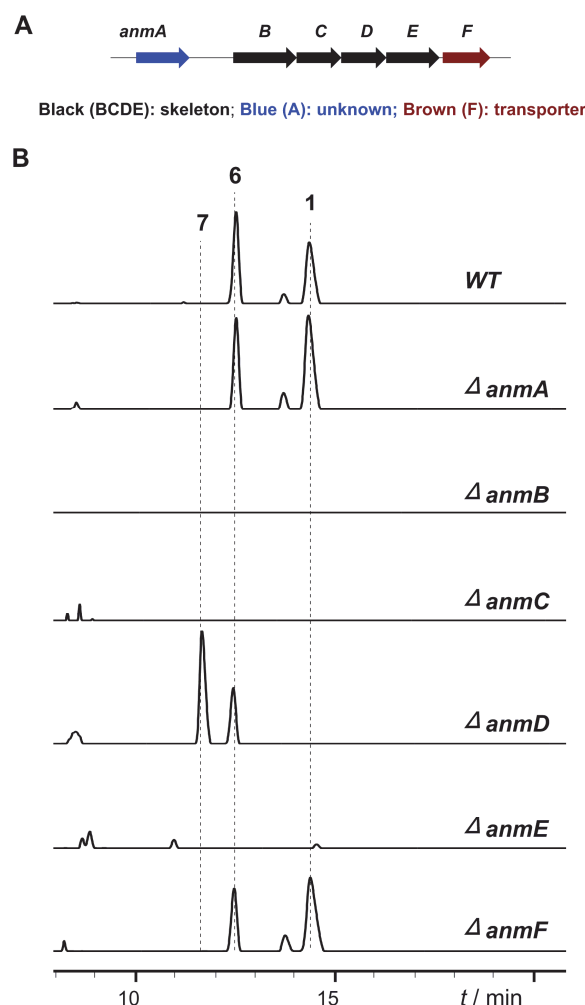


图2 (A)金核霉素生物合成基因簇, 以及(B)金色链霉菌 SP-371 野生型(WT)和各敲除突变株的发酵液 HPLC 图  
Figure 2 (A) Aureonuclemycin biosynthetic gene cluster and (B) HPLC analyses of fermentations with *Streptomyces aureus* SP-371 the wild type (WT) strain and the mutants

### 1.2 敲除突变株中化合物分析及分离鉴定

对突变株  $\Delta anmD$  进行大量发酵, 发酵液上清加入等体积甲醇去除沉淀, 旋蒸浓缩, 最终通过硅胶柱、C18 反向层析柱和半制备 HPLC 的方法分离得到约 10 mg 目

标化合物 **7**. 该化合物为白色粉末, 高分辨质谱 (HR-ESI- MS) 给出其准分子离子峰  $m/z$  426.1255  $[M+H]^+$ , 其分子式为  $C_{16}H_{19}N_5O_9$  (计算值 426.1256  $[M+H]^+$ ), 推测是金核霉素的同分异构体.

通过核磁共振波谱 ( $^1H$  NMR,  $^{13}C$  NMR 和 2D NMR) 解析了化合物 **7** 的化学结构. 对比化合物 **7** 和金核霉素的核磁碳谱数据, 两者高度相似, 同时,  $^1H$ - $^1H$ -COSY 谱图中可以观察到 H-1'-H-2'-H-3'-H-4'-H-5'-H-6' 的相关以及 H-8'-H-9'-H-10' 的相关, 这也与金核霉素的高碳糖骨架结构相吻合. 不过, 在化合物 **7** 的 NOESY 谱图中发现 H-6' 同时与 H-8' 和 H-9' 相关, 提示 H-6'、H-8' 和 H-9' 均位于最左侧六元环的同侧, 这与金核霉素中 H-8' 与 H-6' 和 H-9' 处于不同侧相反<sup>[1]</sup> (表 1, 图 3). 由此确认化合物 **7** 是金核霉素异构体, 其 C-8' 为 *R* 构型, 命名为 8'-表金核霉素 (8'-*epi*-ANM). 该化合物近期也从杀草菌素产生菌的 *her7* 敲除株 ( $\Delta her7$ ) 中分离得到<sup>[5]</sup>. 除了化合物 **7**, 在  $\Delta anmD$  发酵液的 LC-MS 分析中没有发现在  $\Delta her7$  中积累的其他产物, 如化合物 **8** (Scheme 1). 另外, 在 Liu 课题组<sup>[5]</sup>的工作中,  $\Delta her7$  仍然可以产生少量终产物, 推测缺失 Her7 不会中断杀草菌素的合成. 而在  $\Delta anmD$

发酵液中没有检测到终产物 **1** 的积累, 推测 AnmD 对于金核霉素形成不可缺少.

化合物 **8** 在杀草菌素产生菌的 *her6* 敲除株中也有积累, *her6* 是 *anmE* 同源基因, 编码 B12 依赖的自由基 SAM 酶<sup>[5]</sup>. 进一步分析  $\Delta anmE$  发酵液的 LC-MS 图谱, 没有发现明显的可能是化合物 **8** 的提取离子峰. 意外地, 在  $\Delta anmE$  发酵液中发现 2 个微量组分 **A** 和 **B**, 其准分子离子峰  $m/z$  分别为 424.3 和 444.3  $[M+H]^+$ . 其中组分 **A** 的分子量与 Liu 等提出途径中的关键酶 Her4 催化产物 **9** 一致, 化合物 **9** 在杀草菌素体系中并未被检测到<sup>[5]</sup>, 推测其水合生成 C8' 偕二醇 **10**, 然后进一步自发重排形成化合物 **8**. 化合物 **10** 和 **8** 具有相同分子量 (442.1  $[M+H]^+$ ), 在  $\Delta anmE$  发酵产物中也未被检测到. 组分 **B** 的分子量比 **10** 大 2, 推测可能结构之一是 **10** 的还原产物, 如化合物 **11** (Scheme 1). 由于产量极低, 未能从  $\Delta anmE$  突变株中分离出这两个组分.

### 1.3 野生型菌株中化合物分析及分离鉴定

杀草菌素途径中的 C8' 偕二醇中间产物 **10** 及上述推测的还原产物 **11** 都未被分离鉴定<sup>[5]</sup>. 在对金核霉素发酵液的 LC-MS 分析中发现, 除了主要产物, 野生型菌株 SP371 还产生若干小组分化合物, 它们的可见光-紫外吸收光谱与金核霉素类似. 其中一个化合物 ( $m/z$  426.3,  $[M+H]^+$ ) 的出峰时间与 8'-表金核霉素 (**7**) 一致, 说明该 8'-异构体在金核霉素野生菌中也能少量生成. 另一化合物 **12** 的分子量 (442.3  $[M+H]^+$ ) 与 **10** 相同, 推测是中间体 **9** 的水合衍生物. 对金核霉素野生型菌株 SP371 进行大量发酵, 将 10 L 发酵液的离心上清液先后通过阴离子交换柱、硅胶柱和多次半制备 HPLC 方法, 分离得到约 4 mg 目标化合物 **12**.

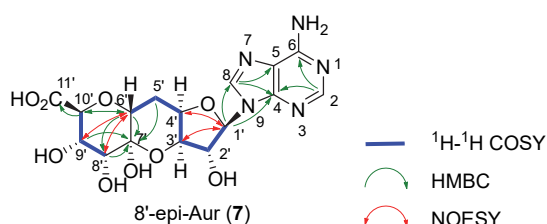
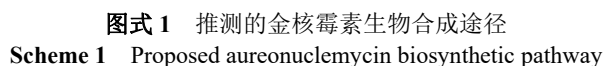


图 3 化合物 **7** 主要的 HMBC,  $^1H$ - $^1H$  COSY 和 NOESY 相关  
Figure 3 Selective key HMBC,  $^1H$ - $^1H$  COSY and NOESY correlations of compound **7**

表 1 化合物 **7** 的核磁共振图谱数据 (500/125 MHz,  $D_2O$ )  
Table 1 NMR spectroscopic data of compound **7** (500/125 MHz,  $D_2O$ )

| No.               | $\delta_C$ | $\delta_H$ , Mult. ( <i>J</i> in Hz) | HSQC  | $^1H$ - $^1H$ COSY        | HMBC                    | NOESY                                 |
|-------------------|------------|--------------------------------------|-------|---------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| 2                 | 154.8      | 7.84, s                              | C-2   | —                         | C-4, C-6                | H-2'                                  |
| 4                 | 150.2      | —                                    | —     | —                         | —                       | —                                     |
| 5                 | 120.0      | —                                    | —     | —                         | —                       | —                                     |
| 6                 | 157.1      | —                                    | —     | —                         | —                       | —                                     |
| 8                 | 141.2      | 7.88, s                              | C-8   | —                         | C-4, C-5                | H-2', H-6', H-8'                      |
| 1'                | 92.4       | 5.79, s                              | C-1'  | H-2'                      | C-4, C-8, C-2', C-3'    | H-2', H-3', H-4'                      |
| 2'                | 82.1       | 4.53, s                              | C-2'  | H-1', H-3'                | C-1', C-3', C-4'        | H-1', H-3', H-6'                      |
| 3'                | 77.4       | 4.32, s                              | C-3'  | H-2', H-4'                | C-1', C-2', C-4'        | H-1', H-2', H-4', H-5' <sub>a,b</sub> |
| 4'                | 81.2       | 4.62, s                              | C-4'  | H-3', H-5' <sub>a,b</sub> | C-3', C-6'              | H-1', H-3', H-5' <sub>a,b</sub>       |
| 5' <sub>a,b</sub> | 27.1       | 2.22~2.34, m                         | C-5'  | H-4', H-6'                | C-3', C-4', C-6', C-7'  | H-3', H-4', H-6'                      |
| 6'                | 71.5       | 3.88, dd (4.8, 11.5)                 | C-6'  | H-5' <sub>a,b</sub>       | C-5', C-7', C-8', C-10' | H-8, H-8', H-9', H-5' <sub>a,b</sub>  |
| 7'                | 96.7       | —                                    | —     | —                         | —                       | —                                     |
| 8'                | 71.0       | 3.61, d (3.2)                        | C-8'  | H-9'                      | C-7'                    | H-6', H-9', H-8                       |
| 9'                | 73.9       | 4.55, s                              | C-9'  | H-8', H-10'               | C-7', C-8', C-10'       | H-6', H-8', H-10'                     |
| 10'               | 83.3       | 4.39, s                              | C-10' | H-9'                      | C-6', C-8', C-9', C-11' | H-9'                                  |
| 11'               | 177.6      | —                                    | —     | —                         | —                       | —                                     |



#### 1.4 金核霉素生物合成途径的推测

Chemical structure of compound **12** is shown, featuring a complex polycyclic system with a pyrazole ring. The structure is labeled with carbon and nitrogen atoms (1-11'). A legend indicates that blue lines represent  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY correlations and green curved arrows represent HMBC correlations.

5'-DI 都不再产生, 但是仍然积累少量的代谢物 **A** 和 **B**, 根据分子量推测它们可能是具有完整的十一碳糖骨架的中间代谢物. 这类十一碳糖代谢物在 Her6 (AnmE 同源蛋白) 的敲除实验中也发现并鉴定(化合物 **8**), 尽管它们在具体结构上存在差异. 由于 **8** 具有与金核霉素/杀草菌素相反的 C-3'构型, Liu 等<sup>[5]</sup>指出 Her6 发挥 C-3'异构的作用, 我们由此推测 AnmE 可能发挥与 Her6 相同的功能. 需要指出的是, 敲除株(包括 *ΔanmE* 和 *Δher6*)中积累的十一碳糖代谢物产量跟野生型的终产物相比有非常明显的下降. 上述体内研究结果表明, 金核霉素核心骨架的 C—C 键形成不依赖于 AnmE, 但由于敲除株的中间体积积累过低, 尚不能完全排除 AnmE 在骨架形成中发挥特殊作用.



表 2 12 的核磁共振图谱数据(500/125 MHz, D<sub>2</sub>O)  
Table 2 NMR spectroscopic data of 12 (500/125 MHz, D<sub>2</sub>O)

| No.               | $\delta_c$ | $\delta_H$ , Mult. (J in Hz) | HSQC  | <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY | HMBC                    |
|-------------------|------------|------------------------------|-------|-------------------------------------|-------------------------|
| 2                 | 144.6      | 8.40, s                      | C-2   | —                                   | C-4, C-6                |
| 4                 | 148.1      | —                            | —     | —                                   | —                       |
| 5                 | 118.1      | —                            | —     | —                                   | —                       |
| 6                 | 149.9      | —                            | —     | —                                   | —                       |
| 8                 | 143.7      | 8.75, s                      | C-8   | —                                   | C-4, C-5                |
| 1'                | 90.1       | 6.15, d (9.5)                | C-1'  | H-2'                                | C-4, C-8, C-2'          |
| 2'                | 80.2       | 4.65, s                      | C-2'  | H-1', H-3'                          | C-3', C-4'              |
| 3'                | 75.4       | 4.38, s                      | C-3'  | H-2', H-4'                          | C-1', C-4'              |
| 4'                | 78.7       | 4.67~4.69, m                 | C-4'  | H-3', H-5'                          | C-6'                    |
| 5' <sub>a,b</sub> | 24.8       | 2.33~2.21, m                 | C-5'  | H-4', H-6'                          | C-3', C-4', C-6', C-7'  |
| 6'                | 66.7       | 4.39, dd (5.2, 11.8)         | C-6'  | H-5' <sub>a,b</sub>                 | C-5', C-10'             |
| 7'                | 93.8       | —                            | —     | —                                   | —                       |
| 8'                | 90.9       | —                            | —     | —                                   | —                       |
| 9'                | 74.0       | 4.29, d (1.4)                | C-9'  | H-10'                               | C-7', C-8'              |
| 10'               | 77.7       | 4.56, d (1.4)                | C-10' | H-9'                                | C-6', C-8', C-9', C-11' |
| 11'               | 172.4      | —                            | —     | —                                   | —                       |

从氧化还原酶 AnmD 编码基因的敲除株中分离鉴定了 8'-表金核霉素(7), 推测 AnmD 在金核霉素生物合成的最后一步发挥关键作用, 负责 *S* 构型 C-8'的形成. 对发酵产物的 LC-MS 分析发现野生型也能产生少量 8'-表金核霉素, 另外野生型和  $\Delta anmD$  都积累另一个小组分 12: C-8'偕二醇金核霉素类似物. C-8'偕二醇化合物在杀草菌素途径中被认为是关键的中间产物, 但未被直接鉴定, 对 12 的分离鉴定为该推测提供了一个直接证据. 用大肠杆菌表达的 AnmD 蛋白以化合物 7 为底物测试, 并没有检测到金核霉素产生, 底物也未被消耗, 推测化合物 7 只是支路产物(数据未展示). C-8'偕二醇化合物的存在提示, AnmD 的直接底物可能是偕二醇脱水形成的 C-8'羰基中间体, 氧化还原酶 AnmD 负责将 8'羰基还原, 生成 *S* 构型 C-8'-羟基. 而在缺少 AnmD 存在时, 8'羰基在细胞环境中可以被还原为 *R* 构型 C-8'-羟基, 产生支路产物 7.

敲除 AnmB 和 AnmC 的编码基因都完全中断金核霉素产生, 并且未检测到任何中间产物积累, 推测它们与金核霉素早期核心骨架的形成相关. 另外, 在体外酶活测试中, 发现 *S*-腺苷-*L*-高半胱氨酸(SAH)水解酶 AnmB 能够催化三磷酸腺苷(ATP)形成两种 4',5'-脱氢-5'-脱氧腺苷, 作为金核霉素腺苷部分的供体. 由于该部分结果与杀草菌素中同源酶 Her4 的实验结果一致<sup>[5]</sup>, 在此不再赘述. 由此, 结合文献报道及上述结果, 提出了可能的金核霉素的生物合成途径, 如 Scheme 1 所示.

## 2 结论

完成了全部金核霉素生物合成基因的同框敲除实验, 成功分离鉴定了两个关键化合物 7 和 12, 根据代谢

物分析结果推测了金核霉素的生物合成途径. 本工作通过金核霉素产生菌的体内研究, 为杀草菌素/金核霉素家族独特的生物合成机制提供了进一步的证据, 对后续酶催化机制研究等具有重要参考价值.

## 3 实验部分

### 3.1 仪器与试剂

Eppendorf Mastercycler 聚合酶链式反应(PCR)扩增仪, BioRad Syngene 凝胶成像系统, Agilent 1260 高效液相色谱仪, Thermo Scientific LCQ Fleet Ion Trap 质谱仪, Bruker AVANCE DRX-500 核磁共振仪, Diamonsil C18 分析色谱柱, 5  $\mu$ m 250 mm $\times$ 4.6 mm, YMC-Pack ODS-AQ 半制备柱, 5  $\mu$ m, C18 column, 10 mm $\times$ 250 mm. 生物试剂购自 New England Biolab、Thermo 和 Takara 公司, 引物合成和 DNA 测序由苏州金唯智公司完成, 国产化试剂购自上海国药集团有限公司, 进口化学试剂购自 Sigma-Aldrich 公司. 链霉菌 *Streptomyces aureus* 由华东理工大学陶黎明教授提供, 其它大肠杆菌和质粒由本实验室保存.

### 3.2 构建基因敲除突变株

以 pKC1139 为载体构建包含左右臂的同框敲除质粒, 同框敲除质粒经过接合转移导入链霉菌中, 经过筛选、聚合酶链式反应(PCR)验证得到最终双敲除突变株, 具体操作详见文献[6]. 各突变株对应的同框敲除质粒名称及引物如下.

$\Delta anmA$ : 敲除质粒 pANMA; 左臂引物 AL1: TAAGAATTTCGAGGTAATGGTCGACCG, 左臂引物 AL2: TAAGGTACCTGTCTGCCCCGAGGGGCG, 右臂

引物 AR1: TAAGGTACCACGGCGGACGTGGTCGGC, 右臂引物 AR2: TAAAAGCTTTTGTGCGCCCTTGTCAGG; 验证引物 A-yz1: GTTGCTATGCCTTGGGCACTC, 验证引物 A-yz2: CGGCTACACCACCCGTTGA.

*ΔanmB*: 敲除质粒 pANMB; 左臂引物 BL1: TAAAAGCTTCAAGGATGTCCAGGAGC, 左臂引物 BL2: TAAGGTACCGTGGCCGCTGATCACGG, 右臂引物 BR1: TAAGGTACCTCCCTGAACCTCTACACC, 右臂引物 BR2: TAAGAATTCTCGTTGTGATCACGGCG; 验证引物 B-yz1: TCCAGATCCGCTCCACCG, 验证引物 B-yz2: GTAGTACGCGTCGAACAG.

*ΔanmC*: 敲除质粒 pANMC; 左臂引物 CL1: AAGCTTATCCGTCACCCAATCACGAC, 左臂引物 CL2: GGATCCCAGCAGGCGGTGGTGCAGTT, 右臂引物 CR1: GGATCCGACTCCCCATGGACAAC, 右臂引物 CR2: GAATTCAGGTCAAGCAGGTCGTAG; 验证引物 C-yz1: CTGGTACCGCCAAGCACC, 验证引物 C-yz2: TATCAGAGCGGTCTGAGCAG.

*ΔanmD*: 敲除质粒 pANMD; 左臂引物 DL1: TAAAAGCTTTCAACATGGCGCGCTCCG, 左臂引物 DL2: TAAGGTACCGACGTCCGTCGCCTCGC, 右臂引物 DR1: TAAGGTACCTTCTGTGACGCGGTCTGCC, 右臂引物 DR2: TAAGAATTCTCGCGCTGACCATGTGCG; 验证引物 D-yz1: GCATCAGTGCCCTGGCGG, 验证引物 D-yz2: AGCTCGCGCA GCG TGGCC.

*ΔanmE*: 敲除质粒 pANME; 左臂引物 EL1: TTTAAGCTTGGCGTCGTCCACGAGGAC, 左臂引物 EL2: TTTGGTACCGCTCAGCGGTAGCTCGGC, 右臂引物 ER1: TTTGGTACCGCGCCGACGACATGGGCC, 右臂引物 ER2: TTTTCTAGACCGGTGCGCGCACAGTCC; 验证引物 E-yz1: ACGTCGTCGTCTGGGACC, 验证引物 E-yz2: GAGAGGAACACGACCACG.

*ΔanmF*: 敲除质粒 pANMF; 左臂引物 FL1: GAATTCGGCTCGTGGAAAGTCCCCTTG, 左臂引物 FL2: GGTACCGAGCCGGTTGACGAGCGTG, 右臂引物 FR1: GGTACCGCGGTCTCGGGATACGCAC, 右臂引物 FR2: AAGCTTGTCACTCGCTCGTGCTGGAG; 验证引物 F-yz1: GAGCTCAGCACCGGTACCTCGTAG, 验证引物 F-yz2: TCTAGACGTACGTCGTCGCGCCGTCGG.

### 3.3 野生型和突变株的发酵和检测

首先将 SP-371 或各突变株孢子涂布于平板培养基(每 1 L 培养基含黄豆饼粉 20 g、*D*-Mannitol 20 g、琼脂 20 g, 使用前加入氯化镁溶液至终浓度 10 mmol/L), 28 °C 恒温箱培养 3 d, 然后接种 1 cm<sup>2</sup> 大小带菌琼脂块

于 100 mL 发酵培养基中, 28 °C, 250 r/min 摇床培养 4 d. 将发酵液转移到离心管中, 3800 r/min 离心 15 min, 弃去菌丝沉淀. 取 1 mL 上清液经 12000 r/min 离心后, 供 HPLC 和 LC-MS 检测. HPLC 条件: A 相为水[含 0.1%(体积分数)甲酸], B 相为乙腈[含 0.1%(体积分数)甲酸], 流速 1 mL/min, 检测波长 260 nm, 洗脱梯度 0~6 min, 4% B; 6~8 min, 4%~20% B; 8~15 min, 20% B; 15~20 min, 20%~80% B; 20~22 min, 80% B; 22~25 min, 80%~7% B. LC-MS 采用与 HPLC 相同的液相条件.

### 3.4 化合物的分离提取和鉴定

化合物 **7** 的分离: 在 2 L *ΔanmD* 发酵液上清中加入等体积甲醇, 离心除去沉淀, 旋蒸浓缩至半体积, 重复上述操作若干次以除去大量杂质, 最终得到浓缩液约 50 mL. 通过硅胶柱(100~200 目)、C18 反向层析柱进行初步纯化, 再用半制备进行多次纯化, 半制备分离条件: H<sub>2</sub>O [含 0.1% (体积分数)三氟乙酸(TFA)] 和 CH<sub>3</sub>OH 作为半制备的 A 和 B 相, 程序为(30 min): *t*=0~5 min, 2% B; *t*=20 min, 40% B; *t*=25 min, 40% B; *t*=28 min, 2% B; *t*=30 min, 2% B, 流速 2.5 mL/min, 检测波长 260 nm. 化合物 **12** 的分离: 对野生型菌株进行大量发酵, 将 10 L 发酵液的上清液先后通过阴离子交换柱(201×4 型)、硅胶柱(100~200 目)初步纯化, 再用多次半制备纯化, 半制备分离条件同上. 对于纯化得到的目标化合物, 通过 NMR 分析鉴定结构.

**辅助材料(Supporting Information)** 化合物 **7** 和 **12** 的 LC-MS, HR-ESI-MS 和 NMR 图谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

## References

- [1] Dai, X.; Li, G.; Wu, Z.; Lu, D.; Wang, H.; Li, Z.; Zhou, L.; Chen, X.; Chen, W. *CN* 87100250, 1988.
- [2] (a) Terahara, A.; Haneishi, T.; Arai, M.; Hata, T.; Kuwano, H.; Tamura, C. *J. Antibiot.* **1982**, 35, 1711.  
(b) Takiguchi, Y.; Yoshikawa, H.; Terahara, A.; Torikata, A.; Terao, M. *J. Antibiot.* **1979**, 32, 862.  
(c) Takiguchi, Y.; Yoshikawa, H.; Terahara, A.; Torikata, A.; Terao, M. *J. Antibiot.* **1979**, 32, 857.  
(d) Haneishi, T.; Terahara, A.; Kayamori, H.; Yabe, J.; Arai, M. *J. Antibiot.* **1976**, 29, 870.  
(e) Arai, M.; Haneishi, T.; Kitahara, N.; Enokita, R.; Kawakubo, K. *I. J. Antibiot.* **1976**, 29, 863.
- [3] Lin, G. M.; Romo, A. J.; Liem, P. H.; Chen, Z.; Liu, H. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 16450.
- [4] Pan, H. X.; Chen, Z.; Zeng, T.; Jin, W. B.; Geng, Y.; Lin, G. M.; Zhao, J.; Li, W. T.; Xiong, Z.; Huang, S. X.; Zhai, X.; Liu, H. W.; Tang, G. L. *Org. Lett.* **2019**, 21, 1374.
- [5] Chen, Z.; Sato, S.; Geng, Y.; Zhang, J.; Liu, H. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, 144, 15653.
- [6] Ji, Z. Y.; Nie, Q. Y.; Yin, Y.; Zhang, M.; Pan, H. X.; Hou, X. F.; Tang, G. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, 58, 18046.

(Cheng, F.)