

## 合成酮内酯类 3-脱氧-3-羰基-红霉内酯 B 糖多孢红霉菌 M 的构建

张部昌<sup>1,2</sup> 赵志虎<sup>1</sup> 王以光<sup>3</sup> 马清钧<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100850)

<sup>2</sup>(安徽大学生命科学学院,合肥 230039)

<sup>3</sup>(中国医学科学院医药生物技术研究所,北京 100050)

**摘 要** 大环内酯类抗生素基因工程是近年来研究的一个新领域,迄今已合成了 100 多种新的聚酮类化合物。以糖多孢红霉菌 A226 基因组 DNA 为模板,用重叠 PCR 方法扩增出去除 KR6 酶域 DNA 的约 3.2kb DNA 片段,克隆于 pWHM3 载体,构建了同源重组质粒 pWHM2201。PEG 介导原生质体转化法将 pWHM2201 转入糖多孢红霉菌 A226,并整合于染色体红霉素合成基因位点。整合体在 R3M 斜面上生长两代后,制备原生质体涂 R3M 平皿。利用 PCR 鉴定筛选出 8 株 KR6 敲除的突变体糖多孢红霉菌 M(1-8)。ZabsPec Fab 质谱鉴定,证实糖多孢红霉菌 M1 合成了 3-脱氧-3-羰基-红霉内酯 B,一种新的酮内酯类化合物。

**关键词** 糖多孢红霉菌,3-脱氧-3-羰基-红霉内酯 B,酮内酯类,原生质体转化,同源重组

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0198-06

红霉素及其衍生物是临床上具有广泛应用的一类抗生素,第一代红霉素易为酸降解及产生耐药性,已很少使用,通过化学修饰改造的第二代红霉素,如罗红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、地红霉素等可以克服红霉素酸降解的不足,目前在临床上正广泛地应用,但无法克服耐药性仍是其最大缺点<sup>[1]</sup>,现在正在推向市场上的第三代红霉素是以 Telithromycin<sup>[2~4]</sup> 为代表的酮内酯类,它也是使用化学修饰对红霉素结构进行了改造。酮内酯类抗生素结构上最大特点是在红霉素大环内酯的 C-3 位用羰基取代糖基。研究表明<sup>[4]</sup>,酮内酯类抗生素不仅可以使这一类抗生素结构稳定,而且对许多耐药菌具有活性。

大环内酯类抗生素基因工程是近年来兴起的一个新的研究领域,这很大程度上得益于对红霉素生物合成分子生物学的认识<sup>[5]</sup>:红霉素的生物合成可分为两个阶段,一是大环内酯环(6-dEB)的合成;二是对大环内酯环的结构修饰,包括糖基化、羟基化和甲基化。大环内酯环的生物合成由一个复合酶系——聚酮合成酶(Polyketide synthase,PKS)催化完成。PKS 由 3 条肽链(DEBS1、DEBS2 和 DEBS3)组成,每

条肽链包括两套相似而相对独立的多个酶域,每套酶域称为一个模块(Module,M)。每个模块中都有 3 个共同的酶域:酮酰合成酶(KS)、酰基转移酶(AT)和酰基载体蛋白(ACP),每个模块中还可能包括酮还原酶(KR)、脱水酶(DH)和烯酰还原酶(ER)修饰酶域。此外,在模块 1 的氨基端有一个由 AT 和 ACP 组成的负载域(LD),负责结合第一个小分子羧酸;在模块 6 的羟基端还有一个硫酯酶域(TE),负责将长链脂肪酸从 PKS 上水解下来,并与 PKS 其它部分共同将长链脂肪酸环化成大环内酯环。如同饱和脂肪酸合成一样,大环内酯环也是由简单的羧酸 1 个丙二酸和 6 个甲基丙二酸经缩合延伸而形成的,每个模块催化一次碳链的延伸和修饰。与饱和脂肪酸合成不同的是,由于每个模块中修饰酶域的组成不同,每次延伸所形成的酮基就可能为酮基、羟基或次甲基。不仅每条肽链和每个模块的功能独立,而且每个酶域的功能也相对独立。每个酶域的功能顺序与染色体上的基因顺序是相对应的。据此,可以在基因水平上通过增加或减少模块和酶域,以及用其它相似 PKS 中酶域替换来合成新的化合物。迄今

为止,通过这种途径已经合成了 100 多种“非天然”的天然化合物<sup>[6~8]</sup>。

本文利用染色体同源重组方法,在糖多孢红霉菌染色体上敲除了红霉素合成基因中 KR6 区域,构建了糖多孢红霉菌 M(*Saccharopolyspora erythraea* M)。该菌株可合成自然界中从未发现的酮内酯类化合物-3-脱氧-3-羰基-红霉内酯 B,有望进一步用生物或/和化学方法修饰成为酮内酯类抗生素药物。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和质粒(见表 1)

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Source & characteristics
Strains	
<i>S. erythraea</i> A226	A gift from Prof. WANG Y G, producing erythromycin
<i>S. erythraea</i> Z1-Z18	This study
<i>E. coli</i> ET 12567	A gift from Prof. WANG Y G <sup>[9]</sup>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Kept in this laboratory <sup>[10]</sup>
<i>B. subtilis</i> PUB110	Kept in this laboratory, sensitive to erythromycin.
<i>S. erythraea</i> M1-M8	This study
Plasmids	
pWHM3(pCS5)	A gift from Prof. WANG Y G <sup>[11]</sup>
pUC-T	Purchased from BioDev-Tech, Scientific & Technical Co., Ltd, derived from pUC19
pUC2201	This study
pWHM2201	This study

### 1.2 培养基、缓冲液和试剂

LB 培养基按 Sambrook 方法<sup>[10]</sup>,TSB 培养基按 Hopwood 方法<sup>[12]</sup>,PEG3350-T 缓冲液和改进 P 缓冲液按 Yamamoto 方法<sup>[13]</sup>,R3M 培养基按 Summers 方法<sup>[14]</sup>。

硫链丝菌肽(Thiostrepton, Tsr) PEG3350 为 Sigma 公司产品,溶菌酶为 Fluka 公司产品,蛋白酶 K 为 AMRESCO 公司产品,PEG1000 为 MERCK-Schuchardt 公司产品,TSB 为 DIFCO 公司产品,限制酶,T4DNA 连接酶为 Biolab 公司产品,pfu DNA 聚合酶为上海生工公司产品,Taq DNA 聚合酶为 MBI 公司产品,长片段 DNA 聚合酶(Expand Long Template PCR System)为 Roche 公司产品,DNA Marker DL2 000 为大连宝生物公司产品,质粒纯化试剂盒和 PCR 纯化试剂盒为 Promega 公司产品。

### 1.3 实验方法

1.3.1 大肠杆菌的培养、质粒酶切、连接、转化等按 Sambrook 方法<sup>[10]</sup>;质粒提取、PCR 产物纯化按 Promega 产品说明书进行。

1.3.2 糖多孢红霉菌 A226 的培养和总 DNA 的提取按 Hopwood 方法<sup>[12]</sup>进行。

1.3.3 糖多孢红霉菌 A226 原生质体制备和转化:按 Yamamoto 方法<sup>[13]</sup>和 Summers 方法<sup>[14]</sup>进行。

### 1.3.4 pWHM2201 质粒的构建:

(1)PCR 引物的设计:为敲除红霉素合成基因中 KR6 酶域,在其两侧各扩增一个片段,相当于文献[15]序列中 5937bp ~ 7743bp 和 8275bp ~ 9593bp (GenBank Accession No. X56107)。为了两片段间进行重叠 PCR 扩增,片段 1 的反向引物和片段 2 的正向引物均包括片段 1 的 3'-端和片段 2 的 5'-端的各 23bp 或其互补序列,这样经重叠 PCR 扩增的 DNA 片段中 KR 酶域仅保留了 4 个氨基酸(Pro-Ala-Gly-Pro)在重叠引物中将原序列 AT 换成 CC 是便于酶切鉴定(*Apa* I),原 Met 也随之变为 Pro。为了克隆的方便,在片段 1 的 5'-端连上 *Eco*RI 和 *Bgl* II 酶切位点,在片段 2 的 3'-端连上 *Hind* III 和 *Pst* I 酶切位点(引物中斜体部分),同时各随机连上 3 个保护性碱基。将片段 2 反向引物中 A 用 G 替代以避免基因中 *Eco*R I 酶切位点。重叠 PCR 引物为:

片段 1:

正向 5'-TAC GAATTC AGATCT CATGCGGCTCTGGAGTCCGC AGTGGACG;

反向 5'-CTCAGAGTCGCCGGTGGCCGGCCCGGCTCCCA GCTCGACTCG;

片段 2:

正向 5'-CGAGTCGAGCTGGGAGCCGGCGGGCCCGGCCACCGG CGACCTCGAG;

反向 5'-TTC AAGCTT CTGCAG TCATGAGTTCCTCCGCCAG CCAG。

先用 PCR 分别扩增出片段 1 和片段 2,再以片段 1 和片段 2 为模板,片段 1 正向引物和片段 2 反向引物为引物,合成无 KR6 的基因片段,整个 DNA 片段长约 3.2kb。

(2)PCR 扩增条件:以总 DNA 模板 5 $\mu$ L,DMSO 5 $\mu$ L,4 $\times$ 2.5mmol/L dNTP 5 $\mu$ L,10 $\times$  pfu DNA 聚合酶缓冲液 5 $\mu$ L,水 10 $\mu$ L,2.5 $\mu$ mol/L 引物 2 $\times$ 10 $\mu$ L,pfu DNA 聚合酶 1 $\mu$ L 加样,95 $^{\circ}$ C 5min (94 $^{\circ}$ C 1min,65 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min) $\times$ 30,72 $^{\circ}$ C 7min 进行片段 1 和片段 2 的扩增。

以片段 1 和 2 模板各 2.5 $\mu$ L,4 $\times$ 2.5mmol/L dNTP 5 $\mu$ L,长片段 DNA 合成酶缓冲液 5 $\mu$ L,水 10 $\mu$ L,2.5 $\mu$ mol/L 引物(片段 1 正向和片段 2 反向)2 $\times$ 10 $\mu$ L,长片段 DNA 合成酶 0.75 $\mu$ L 加样,95 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 1min,65 $^{\circ}$ C 1min,68 $^{\circ}$ C 5min) $\times$ 30,68 $^{\circ}$ C 7min。

进行扩增。

(3) pUC2201 克隆:重叠 PCR 扩增出所需 DNA 片段后,按博大公司产品说明书与 pUC-T 载体相连,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。

(4) pWHM2201 的构建:将 pUC2201 中外源 DNA 片段用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后连于 pWHM3 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点,并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,获得 pWHM2201 质粒。将从大肠杆菌 DH5 $\alpha$  抽提出来的 pWHM2201 质粒转化大肠杆菌 ET12567 菌株,以制备无甲基化修饰质粒,用于糖多孢红霉菌的原生质体转化。

**1.3.5 染色体整合和染色体二次重组的 PCR 鉴定:**根据 *tsr* 基因序列<sup>[12]</sup>设计鉴定引物为:

正向 5'-CCTGAATTC ATGACTGAGTTGGACACCATCGCA;

反向 5'-TCTAAGCTT GGAAACGTTGAGAGACTCGGTCTG。

正向引物为文献 355bp ~ 378bp,反向引物为文献 1081 ~ 1104bp,两端分别加上 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点(斜体)及保护碱基,扩增出来的 DNA 片段长度 768bp。

根据红霉素合成基因序列<sup>[15]</sup>,在 KR6 酶域两侧选择 PCR 引物为:

正向 5'-AACGCTTCCCGCGGCACG(位于文献序列 7080bp ~ 7099bp);

反向 5'-GTCCAGGTAGGACCGGACCC(位于文献序列 8830bp ~ 8849bp)。

KR6 未去除的扩增片段长度为 1 770bp, KR6 去除的 DNA 扩增片段长度为 1 239bp,这样 PCR 方法很容易鉴定 KR6 酶域是否去除。

**1.3.6 发酵液的生物活性测定:**过夜培养的枯草杆菌 PUB110 涂布 LB 平皿,放上灭菌滤纸片,在滤纸上加 10 $\mu$ L 培养 72h 的糖多孢红霉菌或突变菌发酵液,放 37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养 7h 以上。

**1.3.7 发酵液中红霉素及其衍生物的提取:**50mL TSB 发酵液的离心上清液用氨水调 pH 至 9.0 ~ 9.5,乙酸乙酯萃取,水浴浓缩。

**1.3.8 发酵液中 3-脱氧-3-羧基-红霉内酯 B 的质谱鉴定:**按上述方法提取的糖多孢红霉菌 M1 发酵液用 ZabsPec 质谱仪检测。

## 2 结果和分析

### 2.1 pUC2201 外源基因的克隆和序列鉴定

以糖多孢红霉菌 A226 基因组 DNA 为模板,用 PCR 先扩增出红霉素合成基因 *ery* KR6 两侧 DNA 片段,两片段间有 46bp 重叠。再用重叠 PCR 扩增出全

长约 3.2kb 产物。克隆到 pUC-T 载体后进行部分序列分析,结果表明一个测序反应完成的 500 多个碱基与文献 *ery* 序列<sup>[15]</sup>完全一致。

### 2.2 pWHM2201 质粒构建

pWHM3 质粒<sup>[11]</sup>为穿梭型质粒,在糖多孢红霉菌中不能稳定存在,故可将其作为同源重组型质粒。用 *EcoR* I 和 *Hind* III 将 pUC2201 外源基因切下后,连于 pWHM3 质粒相应位点,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  获得了用于同源重组的质粒 pWHM2201。为避免宿主对外源基因的限制性作用,将 pWHM2201 转化大肠杆菌 ET12567,得到了无甲基化修饰的 pWHM2201 质粒。

### 2.3 pWHM2201 质粒转化和染色体同源重组

将糖多孢红霉菌 A226 制成原生质体,用 pWHM2201 质粒转化,在含 30 $\mu$ g/mL *Tsr* 的 R3M 固体培养基上进行筛选。因 pWHM2201 质粒在糖多孢红霉菌中不能复制,只有整合到染色体上才能赋予菌体 *Tsr* 抗性。从转化平皿的转化子中挑 130 个菌落涂含 *Tsr* 的 R3M 斜面,有 18 个菌落可在 *Tsr* 斜面上正常生长。接种其中 4 个斜面进行液体培养提取总 DNA,以 *tsr* 引物进行 PCR 扩增,琼脂糖电泳结果显示,PCR 产物位于 750bp 和 1000bp 中间(如图 1),与预期大小一致,表明 pWHM2201 质粒已整合到染色体上。

按文献方法<sup>[12]</sup>提取转化体中质粒,凝胶电泳时未见质粒条带,以提取液为模板进行 PCR 扩增,也未见 PCR 条带。进一步说明转化体中质粒已整合到染色体上,而不是在菌体中游离存在。

### 2.4 pWHM2201 质粒在染色体上整合位点的确定

红霉素合成基因 *ery* 在染色体上成簇存在,而且 PKS 基因(*eryA*)与部分糖合成酶基因(*eryC* II, *eryC* III, *eryB* II, *eryG*)共同转录<sup>[5]</sup>。若 pWHM2201 质粒整合到红霉素合成基因位点 KR6 两侧,将会破坏上述糖基因的共同转录。红霉素的抑菌活性与其上的糖基密切相关,只有大环内酯环连接糖基才具有生物活性。为了确认 pWHM2201 质粒已整合到染色体上红霉素合成基因 *ery* 位点,选取在含 *Tsr* R3M 斜面上生长正常的一株菌株(*S. erythraea* Z1),接种含 30 $\mu$ g/mL *Tsr* 的 5mL TSB 摇管,同时接种糖多孢红霉菌 A226 于无 *Tsr* 的 TSB 摇管作对照。30 $^{\circ}$ C 培养 72h 后,加 10 $\mu$ L 发酵液在涂有枯草杆菌 PUB110LB 平皿的滤纸片上。对枯草杆菌 PUB110 抑制试验结果为 Z1 转化体已不再抑制枯草杆菌的生长(图 2),说明 pWHM2201 质粒确已整合到红霉素生物合成基

因位点。

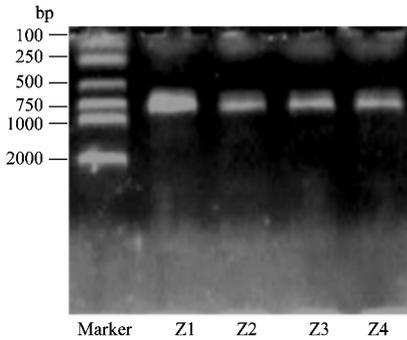


图 1 整合体 Z1-Z4 的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR identification of integrants Z1-Z4

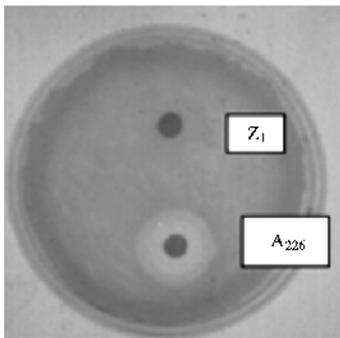


图 2 Z1 发酵液对枯草杆菌的抑制试验

Fig.2 Inhibition test of *B. subtilis* by fermentation fluid of Z1

## 2.5 糖多孢红霉菌 M (*S. erythraea* M) 的筛选

染色体上的质粒不稳定,在无选择压力时会自动经染色体二次重组而脱落,其中大部分恢复质粒整合前状态,少部分进行了染色体替换。将整合体糖多孢红霉菌 Z1 在无抗生素 R3M 斜面上连续传两代后,制得的原生质体涂无抗性 R3M 平皿。从平皿中挑取 172 个单菌落,各连续涂含  $T_{sr}$  的 R3M 斜面和无  $T_{sr}$  的 R3M 斜面。有 88 个菌落仅在无抗生素的 R3M 斜面上生长,其中只有 8 个斜面(*S. erythraea* M1-M8)所接种的摇管发酵液无抑制枯草杆菌的活性。接种 4 株(M1-M4)进行液体培养提取总 DNA,以去除 KR6 鉴定引物进行 PCR 扩增。4 株总 DNA 为模板的 PCR 产物均约 1.2k(如图 3)表明失去抑菌活性的菌株染色体上 KR6 酶域已被敲除,至此获得了目的基因工程菌株——糖多孢红霉菌 M(M1-M8)。

## 2.6 糖多孢红霉菌 M1 发酵产物的鉴定

将糖多孢红霉菌 M1 的 50mL 发酵液用乙酸乙酯萃取,水浴浓缩后用 ZabsPec Fab 质谱仪检测。M1 的发酵产物可能有以下几种情况(1)因 KR6 去除而使整个 PKS 没有活性,检测不出目的产物(2)敲

除 KR6 的 PKS 仍有活性,但所有大环内酯环后修饰酶对新产物不识别,产物为 3-脱氧-3-羰基-6-脱氧-红霉内酯 B(3-deoxy-3-oxo-6-dEB, DODEB)(3)敲除 KR6 的 PKS 有活性,且只有菌体中 C-6 羟化酶可利用新产物,使终产物为 3-脱氧-3-羰基-红霉内酯 B(3-deoxy-3-oxo-EB, DOEB)(4)敲除 KR6 的 PKS 有活性,且菌体中 C-6 羟化酶和 C-5 糖基转移酶都可利用新底物,使终产物为 3-脱氧-3-羰基-5-红霉糖胺-红霉内酯 B(3-deoxy-3-oxo-5-desosamine-EB, DODEB)。质谱图中仅检测到了 3-脱氧-3-羰基-红霉内酯 B(3-deoxy-3-oxo-EB, DOEB)的质谱峰(如图 4):383.0m/z 为[DOEB-H<sub>2</sub>O]H<sup>+</sup>,401.0m/z 为[DOEB]H<sup>+</sup>,423.0m/z 为[DOEB]Na<sup>+</sup>,439.0m/z 为[DOEB]K<sup>+</sup>。说明在菌体中 C-6 羟化酶可利用新产物,其它酶可能不起作用,或者是合成的产物太少,在混合物中还检测不出。

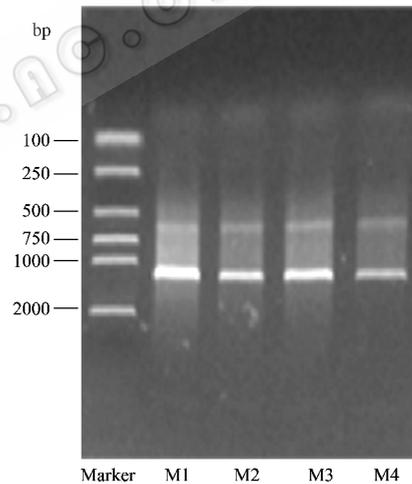


图 3 重组体 M1-M4 的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of recombinants M1-M4

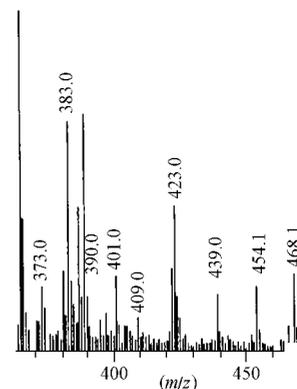


图 4 M1 提取液质谱图

Fig.4 Mass Spectrometry of extract of M1  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

## 2.7 3-脱氧-3-羰基-红霉素生物合成途径

红霉素的生物合成途径已较为清晰<sup>[5]</sup>,参考红

霉素生物合成途径,推测 3-脱氧-3-羰基-红霉素 B 生物合成途径如下:

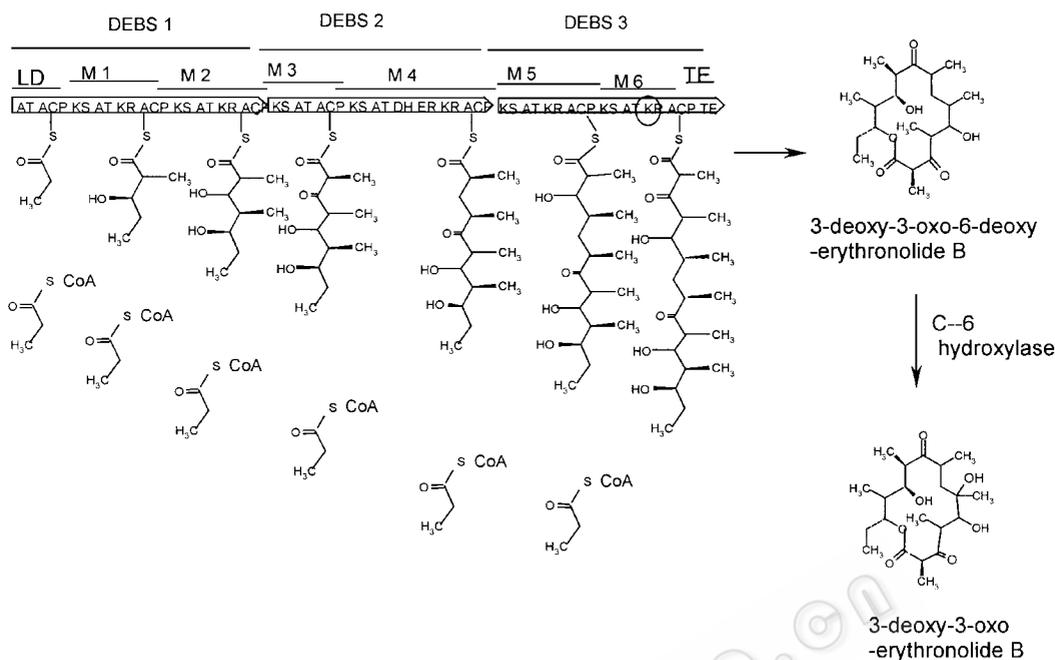


图 5 3-脱氧-3-羰基-红霉素 B 的生物合成途径

Fig. 5 Biosynthetic pathway for 3-deoxy-3-oxo-erythronolide B

## 3 讨 论

红霉素结构改造有两条途径,一是用异源表达系统,既有大肠杆菌系统<sup>[6]</sup>,又有链霉菌系统<sup>[7]</sup>。它们的共同特点是基因操作容易,但需加反应前体和没有后修饰酶;二是在红霉素生产菌中直接进行基因改造<sup>[18]</sup>,虽然可以克服上述缺点,但质粒转化困难,筛选周期也较长。此前已有报道<sup>[6,7]</sup>利用基因工程方法合成 3-脱氧-3-羰基-6-脱氧-红霉素 B (3-deoxy-3-oxo-6-dEB),但均是利用链霉菌异源表达系统,宿主菌中没有对内酯环进行进一步修饰的酶。本研究在红霉素生产菌中对红霉素基因进行改造,不仅合成了 3-脱氧-3-羰基-6-脱氧-红霉素 B (中间体),而且菌体内的羟化酶对其 C-6 位进一步氧化修饰,合成了自然界中从未发现的新的酮内酯类化合物 3-脱氧-3-羰基-红霉素 B。

3-脱氧-3-羰基-红霉素 B 与红霉素 B 一样,因缺乏糖基而没有生物活性,但是在糖多孢红霉菌或链霉菌<sup>[19,20]</sup>中可进行糖基转移酶的基因替换,而获得具有生物活性的抗生素,因此只要选择合适的糖基转移酶基因,就可以合成具有生物活性的酮内酯类抗生素。我们实验室这一方面的研究正在进行中。

致 谢 在试验过程中得到了刘传暄老师、于秀琴老师、尚广东博士、李天伯博士、张经余硕士和朱晨雁硕士的帮助,在撰写本文时石成华老师给予了指导,在此一并感谢!

## REFERENCES (参考文献)

- [1] WANG X H (王晓晖), XU X D (许先栋). Latest progress in structure changing and anti-bacterial activity of macrolide antibiotics in erythromycin class. *World Notes on Antibiotics* (国外医药抗生素分册) 2000 21(1): 1~2, 17
- [2] Bush Kand Macielag M. New approaches in the treatment of bacterial infections. *Current Opinion in Chemical Biology* 2000 4: 433~439
- [3] ZHANG J M (张建民). Ketolide antibiotics-third generation macrolide antibiotics. *World Notes on Antibiotics* (国外医药抗生素分册), 2000 21(1): 3~12, 21
- [4] CHEN Z J (陈章景), WANG M Q (王明贵). Ketolide antibiotics-tetralithromycin. *World Notes on Antibiotics* (国外医药抗生素分册), 2000 21(4): 182~186
- [5] ZHANG B (张部昌), ZHAO Z H (赵志虎), MA Q J (马清钧). Molecular biology on erythromycin biosynthesis. *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯) 2001 12(2): 151~160
- [6] Xue Q, Ashley G, Hutchinson C R *et al.* A multiplasmid approach to preparing large libraries of polyketides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999 96(21): 11740~11745

- modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,1999 **96** :1846 ~ 1851
- [ 8 ] Katz L ,McDaniel R. Novel macrolides through genetic engineering. *Med Res Rev* ,1999 **19** ( 6 ) 543 ~ 548
- [ 9 ] MacNeil D J ,Gewain K M ,Ruby C L *et al* . Analysis of *Streptomyces avermilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* ,1992 **111** 61 ~ 68
- [ 10 ] Sambrook J ,Frisch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* . 2<sup>nd</sup> ed ,New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989
- [ 11 ] Vara J ,Lewandowska-Skarbek M ,Wang Y G *et al* . Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* ( *Streptomyces erythreus* ). *J Bacteriol* ,1989 **171** ( 11 ) 5872 ~ 5881
- [ 12 ] Hopwood D A ,Bibb M J ,Chater K F *et al* . *Genetic Manipulation of Streptomyces : A Laboratory Manual* . England :The John Innes Foundation ,1985
- [ 13 ] Yamamoto H ,Maurer K H , Hutchinson C R. Transformation of streptomyces erythraeus. *J Antibiotics* ,1986 **39** ( 9 ) ,1304 ~ 1313
- [ 14 ] Summers R G ,Donadio S ,Staver M J *et al* . Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. *Microbiol* ,1997 **143** ( 10 ) 3251 ~ 3262
- [ 15 ] Cortes J ,Haydock S F ,Roberts G A *et al* . An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* ,1990 **348** ( 6297 ) :176 ~ 178
- [ 16 ] Pfeifer B A ,Admiraal S J ,Gramajo H *et al* . Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science* , 2001 **291** :1790 ~ 1792
- [ 17 ] Kao C M ,Katz L ,Khosla C. Engineered biosynthesis of a complete macrolactone in a heterologous host. *Science* ,1994 **265** ( 5171 ) :509 ~ 512
- [ 18 ] Donadio S ,Staver M J ,McAlpine J B *et al* . Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* ,1991 **252** ( 5006 ) 675 ~ 679
- [ 19 ] Gaisser S ,Reather J ,Wirtz G *et al* . A defined system for hybrid macrolide biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol Microbiol* , 2000 **36** ( 2 ) 391 ~ 401
- [ 20 ] Tang L ,McDaniel R. Construction of desosamine containing polyketide libraries using a glycosyltransferase with broad substrate specificity. *Chem Biol* 2001 **8** ( 6 ) 547 ~ 555

## Construction of *Saccharopolyspora erythraea* M Synthesizing a Novel Ketolide 3-deoxy-3-oxo-erythronolide B

ZHANG Bu-Chang<sup>1,2</sup> ZHAO Zhi-Hu<sup>1</sup> WANG Yi-Guang<sup>3</sup> MA Qing-Jun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>( Beijing Institute of Biotechnology ,Beijing 100850 ,China )

<sup>2</sup>( School of Life Sciences ,Anhui University ,Hefei 230039 ,China )

<sup>3</sup>( Institute of Medicinal Biotechnology ,CAMS ,Beijing 100050 ,China )

**Abstract** Genetic engineering on macrolide antibiotics was a new field in recent years and more than 100 novel polyketides had been produced until then. Using genomic DNA of *S. erythraea* A226 as a template about 3.2kb DNA fragment without KR6 domain was amplified by overlapping PCR technique and cloned into pWHM3 carrier ,which resulted in the construction of homologous recombinant plasmid pWHM2201. Plasmid pWHM2201 was introduced into protoplasts of *S. erythraea* A226 by PEG-mediated transformation and integrated into the gene locus for erythromycin biosynthesis. After integrants grew for two generations on R3M media without Tsr ,they were protoplasted and grown on R3M plates. By PCR identification 8 mutants without KR6 domain were selected out and named *S. erythraea* M ( 1-8 ). With the identification of mass spectrometry ,it was proved that *S. erythraea* M1 synthesized a novel ketolide compound 3-deoxy-3-oxo-erythronolide B.

**Key words** *Saccharopolyspora erythraea* , 3-deoxy-3-oxo-erythronolide B , ketolide , protoplast transformation , homologous recombination