DOI:10.12441/spyswjs.20240328003 [文章编号] 1673-1689(2025)11-0001-12

基于大片段克隆技术的活性天然产物研究进展

曾丹丹[1] 陈佳宇[2] 莫天录[1*]

(1. 上海理工大学健康科学与工程学院,上海 200093; 2. 华东理工大学食品科学与工程系生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237)

摘要: 活性天然产物具有多样的结构和活性,可作为小分子药物的主要来源。随着多重耐药菌和超级细菌的出现,迫切需要开发新型的活性天然产物。大片段克隆技术是近年来发现活性天然产物的重要手段,在获取活性天然产物生物合成基因簇方面展现出明显优势,结合高效的基因簇靶向筛选方法,显著加速了活性天然产物的发现。作者对各类活性天然产物进行了分类概述,随后对多种大片段克隆技术如人工染色体技术、Red/ET 重组系统、TAR 技术耦合 CRISPR-Cas9 系统进行了详细阐述,对不同类型技术的优缺点及应用范围进行了对比并展望了其未来前景,为活性天然产物的研发提供理论指导。

关键词: 大片段克隆技术;活性天然产物;生物合成基因簇;基因组靶向筛选

Advances in the Discovery of Active Natural Products by Large Fragment Cloning

ZENG Dandan[1] *CHEN Jiayu*[2] *MO Tianlu*[1*]

(1. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Active natural products have diverse structures and activities and can be a major source of small molecule drugs. Given the emergence of multi-drug resistant bacteria and superbacteria, there is an urgent need to develop new active natural products. Large fragment cloning has been an important tool for the discovery of active natural products in recent years, and it has demonstrated obvious advantages in obtaining the biosynthetic gene clusters of active natural products. This approach, combined with efficient cluster-targeted screening methods, has significantly accelerated the discovery of active natural products. This review summarizes a wide variety of active natural products. Furthermore, this paper elaborates on the principles and applications of several large fragment cloning technologies, including artificial chromosome technology, Red/ET recombination system, and TAR technology coupled with the CRISPR-Cas9 system. This paper compares the advantages, disadvantages, and application scopes of different technologies and envisions their future prospects, aiming to provide theoretical guidance for the research and development of active natural products.

Keywords: large fragment cloning technology; active natural product; biosynthetic gene cluster; genome-wide targeted screening

近年来,随着多重耐药菌株和超级细菌的出现,每年有超过 1 700 万人死于细菌性感染[1]。目前,市场上针对各种高危疾病的特效药物非常稀缺,由于许多高危疾病的发生机制尚未完全阐明,以及特效药物研发过程中存在的诸多困难,使得特效药物的研发面临着巨大的挑战。此外,临床

基金项目: 微生物代谢国家重点实验室-上海交通大学项目(MMLKF22-05);国家自然科学基金项目(32370092);国家“十四五”重点研发计划项目(2023YFF1103600)。

通信作者: 莫天录(1988—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事活性天然产物发现和生物活性研究。E-mail: motianlu@usst.edu.cn

收稿日期: 2024-03-28 **修回日期:** 2024-06-03

上用于抗感染和抗肿瘤的药物超过50%来源于活性天然产物及其衍生物，这也使得以活性天然产物为基础的药物研发成为研究热点[2-6]。生物合成基因簇（biosynthetic gene cluster，BGC）是一类包含数个到上百个功能基因的集合类型，共同参与一个或多个化合物的合成[7]。殷方荣等[8]通过对基因簇的原位激活或异源表达，实现了活性天然产物的定向发现，而从自然界中直接分离筛选菌种是开发新型化合物的途径。因此，微生物基因组信息资源提供了一种更快捷的方式——活性天然产物的基因组挖掘。近年来，随着生物技术和人工智能技术的蓬勃发展，新结构活性天然产物的发现速度显著加快，这为药物研发提供了更多的可能性。例如，通过基因编辑技术可以对活性天然产物进行基因改造，以获得具有更高药效的新化合物。此外，人工智能技术也有助于快速筛选和识别具有潜在药用价值的活性天然产物，从而加速药物的研发进程。因此，未来的药物研发将更加依赖于生物技术和人工智能技术的发展，以发现更多具有药用价值的新化合物[9-10]。作者主要探讨了各类大片段克隆技术（如细菌人工染色体技术、可转化人工染色体技术、DNA同源重组技术、Red/ET重组系统和CRISPR-Cas9系统偶联TAR技术）靶向筛选驱动活性天然产物创新发现的策略原理、应用及优缺点，旨在为活性天然产物的发现和生物合成研究提供技术保障。

1 活性天然产物概述

活性天然产物及其结构类似物在药物发现中发挥了重要作用[11]，是新药研发的重要物质基础，但随着活性天然产物和BGC的广泛发现，新化合物的发现速度却逐渐减缓，这对活性天然产物的发展造成了很大阻碍[12]。活性天然产物主要有萜类、生物碱、聚酮、非核糖体肽和核糖体肽。萜类化合物如“明星”化合物紫杉醇（paclitaxel）、青蒿素（artemisinin）和番茄红素（lycopene）等[13-16]，已被用作食品添加剂和芳香制剂。生物碱是一类含氮杂环化合物，主要源于植物[17]，可根据其来源、前体物质、合成路径和化学结构进行分类[17-18]。从苦参根中分离出的苦参碱（matrine），具有促进细胞凋亡、抑制细胞氧化应激等显著生物活性[19]。青霉素（penicillins）等代表性的聚酮类化合物在临床治疗中已被广泛用作抗生素[20]。常见的非核糖体肽（nonribosomal peptides，NRPs）达普霉素（daptomycin）[21]、万古霉素（vancomycin）[22]等对革兰氏阳性菌均有活性。NRPs类化合物常被用作抗菌剂、抗肿瘤药物、抗真菌药物等[23-25]。核糖体肽类活性天然产物（ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides，RiPPs）是在自然界中存在的一类具有生物活性的多肽化合物，主要来源于各种植物、真菌、细菌和海洋生物等。这些化合物具有多种生物活性，如抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗炎、免疫调节等，因此在药物开发和生物技术领域中具有广泛的应用前景，近年来备受关注[26-27]。例如：乳酸链球菌素nisin表现出优良的抗菌活性，其可以抑制细菌细胞壁的合成，也可与脂质II结合形成孔洞使内容物流出导致细菌死亡[28-29]；darobactin作为首个具有新骨架的抗革兰氏阴性菌的RiPPs能以高亲和力靶向结合细菌外膜BamA蛋白，抑制外膜蛋白的装配[30-34]。Mo等[35]和Hudson等[36]分离出RiPPs塞克肽（sactipeptides）家族的新分子huazacin（或thurincin Z），其对蜡样芽孢杆菌和单核细胞增生李斯特菌均有抗菌作用。

活性天然产物的化学合成难度较大，且只能通过微生物绿色制造法获得。传统的制备策略是将宿主菌进行发酵，基于宿主菌的驯化去除不良性质，增加有益性状来获得高产高质菌种，并进行规模化发酵、分离和纯化代谢产物，借助质谱和核磁等多谱学手段对分离产物进行结构解析，从而达到发掘新型活性天然产物的目的。目前，新化合物发现的主策略是对微生物天然产物BGC进行构建与异源表达[37-38]。鉴于基因簇的大小常以几十至几百kb存在，因此首先需要获得细菌完整的基因组，随后利用分子生物学手段将基因组中的BGC靶向克隆，或将多个功能基因在酵母等宿主内组合表达，实现其BGC的重建。基因组大片段克隆技术作为生物合成的关键技术之一，对于构建高价值产物的工程菌株具有至关重要的作用[39]。众所周知，活性天然产物在药物、食品和化妆品行业中有广泛的应用，因此，对其进行针对性研究对于人类健康和经济发展均具有重要影响。通过基因组挖掘可以更准确地了解活性天然产物的基因组和遗传信息，从而有助于其合成、发现和优化。此外，借助基因组挖掘等方法，可以更进一步推动活性天然产物生物合成的研究。合成生物学是一门新兴的交叉

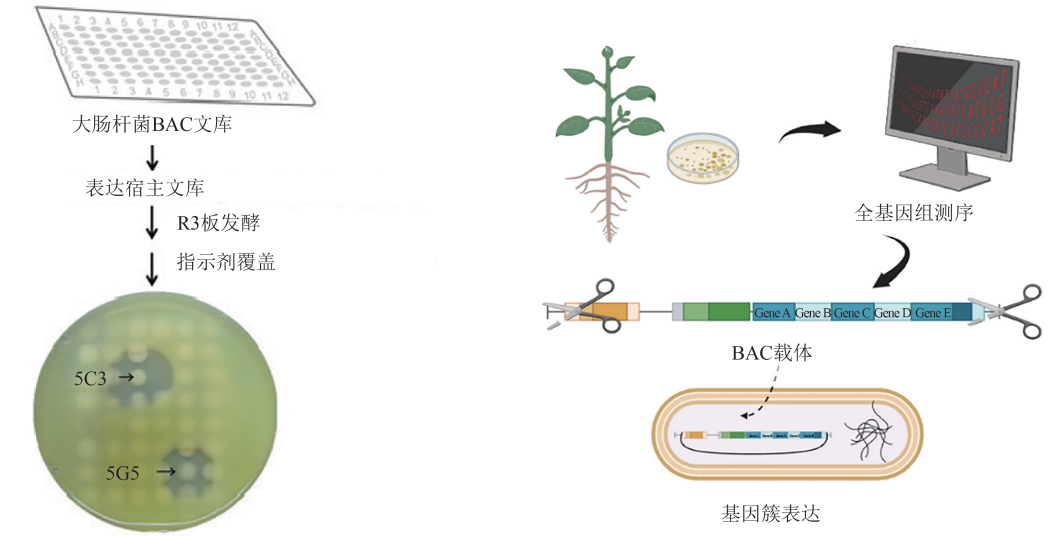
学科，它将生物技术和工程学知识相结合，旨在研究和利用生命系统的基本机制。对于活性天然产物生物合成的研究，合成生物学为分析和理解生物体中的重要化学反应提供了新的方法和技术。通过基因组挖掘等方法可以更好地理解这些化学反应的生物学基础，从而推动合成生物学的研究和发展。同时，合成生物学也为解决医学用药中活性天然产物不能满足作为先导物质需要的问题提供了新的思路和方法[40]。BGC的挖掘和异源表达是获得活性天然产物的基础，对其生物元件进行改造可获得成熟的活性天然产物[37]。

2 大片段克隆技术驱动活性天然产物的高效挖掘

2.1 人工染色体技术

细菌人工染色体技术（bacterial artificial chromosome，BAC）是由Shizuya等于1992年以大肠杆菌F质粒（F-plasmid）为基础构建而成的可用来克隆150 kb大小的DNA片段的细菌染色体克隆载体[41]，且最高可存储300 kb的碱基对[42]。BAC载体历经了两代的发展，其主要区别在于筛选标记不同。BAC成嵌合体的频率较低，且转化效率高[43]，常用于大片段基因组文库的构建和BGC功能基因的研究，在生物基因组的多种研究应用中发挥着不可或缺的作用。研究人员建立了一个从高质量BAC文库构建[44]到BAC测序、BAC末端测序[45]、BAC指纹制作、BAC物理图谱制作[46]再到全基因组测序的系统化的公共BAC资源平台，建立了基本的数据库和网络搜索工具，并对BAC载体进行了改进。改进的载体方便了BAC文库构建、插入片段检测、随机大片段DNA克隆以及完整插入片段在BAC之间的交换等。Takao等[47]利用BAC文库筛选了化合物Kinanthraquinone的BGC，并将其在变铅青链霉菌中进行异源表达，成功获得了该化合物。Liang等[48]通过将BAC文库和CRISPR/Cas12a技术相结合，开发了一种基于Cas12a的BGC快速构建方法，其在不同的宿主中能够捕获的最大长度为145 kb；将该技术应用于小单孢菌属中，可克隆一段长度为110 kb的聚酮合成酶BGC；然后将其导入白色链霉菌中进行表达，可获得一种新型的大环内酰类化合物Marinolactam A，该化合物具有良好的抗癌活性，对人结肠癌细胞的IC_{50}值为18.3 μg/mL。Xu等[49]开发了一种具有突破性的LEXAS平台技术，该技术通过使用表达效率更高、遗传背景更清晰的表达宿主，可以极大地扩充小分子化合物储备，增加药物先导物分子的数量，从而为筛选抗菌化合物提供了更多的可能性。通过该技术可以实现点对点的异源表达和抗菌活性筛选，从而快速有效地找到具有优良抗菌活性的小分子化合物；还可以高效地鉴定出疏螺体素（borrelidin）、链丝菌素（streptothricin）和新型羊毛硫肽化合物Lexapeptide等具有重要抗菌活性的小分子化合物见图1（a）。Park等[50]通过构建和筛选链霉菌的BAC文库，分离出约167 kb的线性多烯化合物I-NTF，在链霉菌Inha 501和变铅青链霉菌中表达后产量分别增加2.6倍和2.8倍，见图1（b）。Kudo等[51]克隆了211 kb大小片段的BAC文库，其中包含负责生物合成concanamycin的整个BGC，在阿维链霉菌SUKA32中进行了成功表达。总之，BAC染色体作为一种能够容纳大片段外源DNA的人工染色体系统，有望在活性天然产物发现中发挥重要作用。通过构建基因组文库、模拟合成途径、优化生产和合成方法，以及进行功能分析和优化等方法，BAC在加速活性天然产物的发现和应用方面具有重要作用。

酵母人工染色体（yeast artificial chromosome，YAC）中含有酵母细胞中必需的端粒、着丝点和复制起始序列，是细胞内具有遗传性质的物质，能够克隆长达400 kb的DNA片段载体[52]。酿酒酵母为全基因组测序的真核生物[53]，是分子生物学研究的理想宿主，其遗传信息背景清晰，分子操作体系逐步完善，常作为模式真核生物和食品安全菌株[54]。YAC可以使BGC中单个基因用于研究，以及将染色体大小的集群组装在一个统一基因和物理数据的单一图谱中。Luo等[55]通过使用DNA assembler的方法对灰色链霉菌的PKS-NRPS生物合成基因簇进行克隆，引入不同的启动子后随即转入酵母中，基因簇实现拼装并转至异源表达宿主变铅青链霉菌中，分离出新型大环内酰胺类化合物（图2）。Jung等[56]将扩增系统引入小型YAC中以实现重组酶的过量生产并提高YAC中基因的表达水平，YAC以木聚糖合成酶为基础的4个功能基因整合至酵母中，含有靶标的微型YAC易被扩增，且可增加拷贝数过表达YAC中特异性基因。该系统可同时方便多种酶协同发挥催化作用，且



(a) Lexa peptide的发现　　(b) 基于土壤放线菌的基因挖掘方案

图 1　基于 BAC 文库的基因挖掘方案

Fig. 1　Gene mining strategy based on BAC library

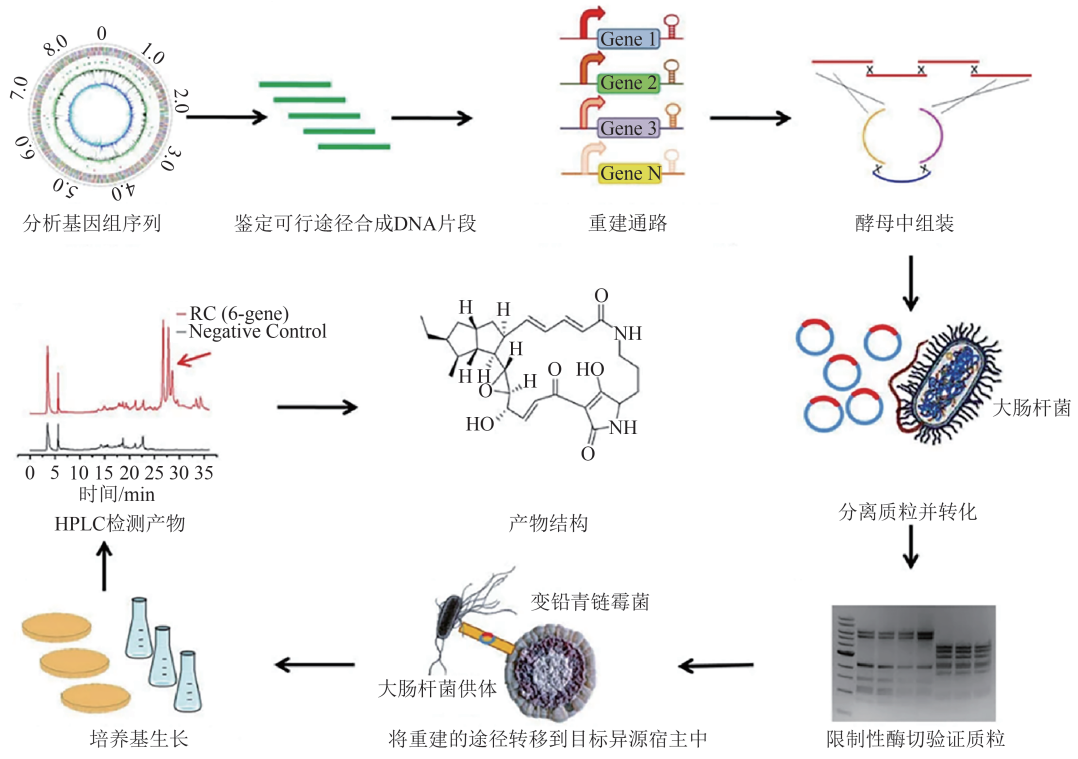


图 2　DNA assembler 基因工程方法克隆表达 PKS-NRPS 的 BGC 流程图

Fig. 2　Flowchart of DNA assembler genetic engineering for cloning the BGC expressing PKS-NRPS

可将小的 YAC 转至工业菌株中并进行诱变选育。Naesby 等[57]将 YAC 在酵母中进行表达，成功表达了不同来源的类黄酮类化合物，并解析了类黄酮类物质的生物合成过程，以及关注关键合成酶的功能。尽管 YAC 在化合物的 BGC 和功能基因的研究方面已取得一定的研究基础，但该技术还存在一些挑战，如转化效率低、稳定性差等问题。总的来说，YAC 具有广泛的应用前景，尤其在基因组研究、基因治疗和药物发现等领域。

PAC 结合了 BAC 和 P1 噬菌体，能克隆 100~300 kb 的外源 DNA 片段[58]。通过将重组 DNA 注入表达 Cre 重组酶的大肠杆菌中，使其发生环化，

可实现对基因组的精确编辑和调控。在这个过程中，重组酶Cre会将载体上的2个loxP位点之间的DNA片段切开，从而使其能与含有另一个loxP位点的DNA片段进行重组，形成一个环状结构。这种环化过程不仅可以精确地在需要的位点进行基因编辑，还可以通过控制Cre重组酶的表达来实现对基因表达的调控。PAC文库在克隆微生物天然产物BGC方面得到了广泛应用[59]。Tu等[60]选取海洋链霉菌SCSIO 5802中蕴含的新型化合物neoabyssomicin和abyssomicin，构建了PAC基因组文库以进行筛选，在远青链霉菌M1 152中通过PCR和异源表达策略获得了目标化合物。Libis等[61]通过克隆大型文库中菌株基因组捕获大量BGC，并使用目标序列共现网络分析（co-occurrence network analysis of targeted sequences，CONKAT-seq）测序通道高效定位携带完整BGC的克隆（图3），获得了3种化合物，证明了该方法具有系统分析菌株库中所含的隐性BGC的潜力。

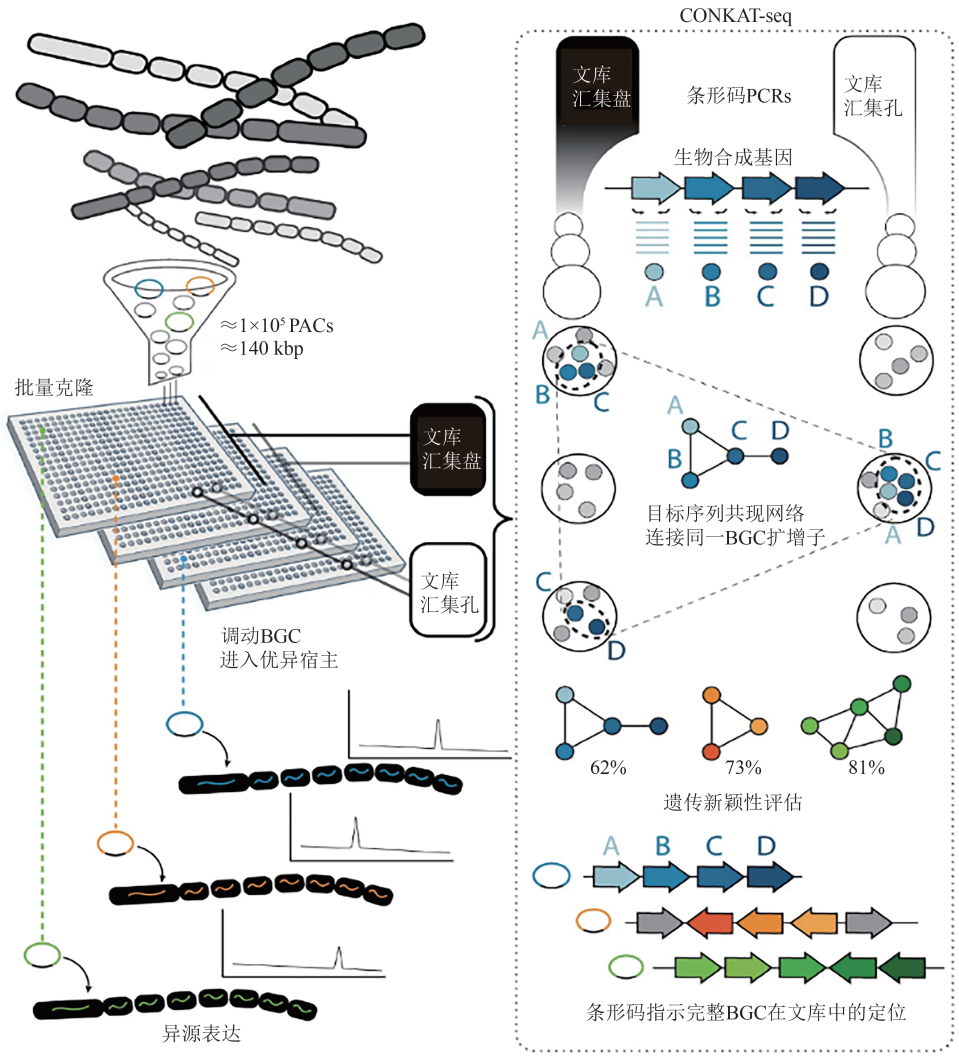


图3　生物合成基因簇的多重捕获、鉴定和调动的一般策略

Fig. 3　General strategy for multiplexed capture, identification, and mobilization of biosynthetic gene clusters

此外，可转化人工染色体技术（transformation-competent artificial chromosome，TAC）和人类人工染色体（human artificial chromosome，HAC）也是活性天然产物BGC克隆常用的人工染色体。TAC可以将外源基因片段插入染色体中，并稳定遗传给子代。该技术可将特定基因或基因组整合到染色体中，研究BGC中相关基因的功能并解析化合物的生物合成路径[62-63]。这种技术为筛选TAC文库和克隆化合物的BGC提供了便利。TAC可用于设计和构建含有活性天然产物生物合成途径的

人工染色体，通过将相关基因序列整合到染色体中，可实现对活性天然产物生物合成途径的调控和优化，提高目标物产量，并优化菌种工程辅助系统，为大规模活性天然产物的生产提供了新可能。HAC是一种染色体仿生学工具，质地类似于人类染色体，由着丝粒、端粒和复制起点组成。HAC已被广泛应用于各行各业中，尤其是在基因治疗中，通过改造或构建获得的多种类型HAC可以携带大片段基因组DNA，建立转基因动物模型，从而实现基因治疗的目标[64]。HAC是一种重要的分析工具，可用于研究染色体上基因的分布和具有预测基因的功能。HAC在设计和构建转移载体底盘方面有着巨大的潜力，其能容纳更大量的DNA片段[52，64-65]。与YAC、BAC不同，HAC是一个完全独立的染色体，与现有遗传物质的分离不会产生插入突变体，这使得HAC具有稳定性和准确性，从而优于其他方法。目前，HAC已成为研究人类染色体结构的有用工具，并且成为大片段基因和基因位点表达的重要载体[64，66-67]。不同克隆载体的性质比较见表1。

表1 不同克隆载体的性质比较

Table 1 Comparison of the properties of different cloning vectors

克隆载体	克隆片段/kb	宿主	稳定性	优点	缺点	参考文献
BAC	100~300	大肠杆菌	稳定	易于操作、易于转化、基因控制质粒复制、不易发生体内重排	程序复杂、耗时、假阳性	[47，68]
TAC	100~300	大肠杆菌	稳定	快速定位克隆、稳定性高、直接转化植物	技术复杂、转化效率低	[40]
YAC	100~2 000	酵母	不稳定	不易发生外源基因丢失现象、容忍性高	易出现嵌合体、部分克隆子不稳定、在转代培养中易发生缺失和重排、难与酵母染色体区分开、容易发生染色体机械切割	[56-57]
PAC	100~300	大肠杆菌	稳定	含有抗性基因、便于筛选，以单拷贝的形式存在、稳定性高	操作较难、效率低	[59]
HAC	＞100	—	稳定	稳定地包含超大的基因组片段，不会产生插入突变体	片段重复	[66，69]

2.2 Red/ET重组系统

1998年，Zhang等[70]发现了位于大肠杆菌Rac原噬菌体上的操纵子Rec E/Rec T编码的蛋白质能够高效地介导体内同源重组的发生，这一发现为研究细菌同源重组机制提供了新的视角。随后，Muyrers等[71]在大肠杆菌λ噬菌体中发现与此相似的效应蛋白质对Red α/Red β，进一步验证了Rec E/Rec T蛋白的同源重组促进功能。Zhang等[72]将这2个体系合并命名为Red/ET重组工程（Red/ET recombineering）。该技术首先需构建包含靶序列的DNA片段，主要通过PCR扩增获得，将靶序列与载体连接可快速地对任意DNA分子进行插入、敲除、突变等操作[73-74]。Red/ET重组技术具有高效、准确和快速等特点，且可用于不同细菌的基因组中，在功能基因研究、基因表达调控及基因治疗等领域具有广泛的应用潜力[75]。Li等[76]基于3个Rac噬菌体RecET操作子，开发了一种针对伯克霍尔德菌和植物伯克氏菌的重组工程系统。通过在沉默BGC的主要生物合成基因上游插入启动子，激活了这些BGC，从而证明了这一重组系统的应用，并鉴定出3种新的脂肽（图4）。周海波等[77]利用Red/ET重组系统从纤维堆囊菌So0157-2基因组DNA中克隆了1个包含NRPS和PKS结构域的基因簇*BGC18*，将其转移至伯克氏菌DSM 7029中进行异源表达。通过液质联用分离纯化进一步确定了3个环二肽化合物。Liu等[78]构建了一种携带枯草芽孢杆菌同源序列的特异性克隆载体，通过Red/ET重组直接克隆活性天然产物BGC并在枯草芽孢杆菌中进行表达，建立了一种简单快速的克隆策略。Song等[79]为了利用组合生物合成的潜力生产具有改变聚酮碳骨架或糖片段甲基化的化合物，开发了一种结合Redαβ介导的线性环状同源重组方法RedEx。该方法可在大型多模块聚酮BGC中高效地无缝插入和删除DNA。Red/ET重组系统可用于对活性天然产物结构的改造和优化，通过合成生物学技术，可以对靶基因进

行编辑，并解析化合物的生物合成途径，研究其构效关系，有助于研究目标化合物的活性、产量、稳定性及其应用，为药物中先导化合物的开发提供理论指导。

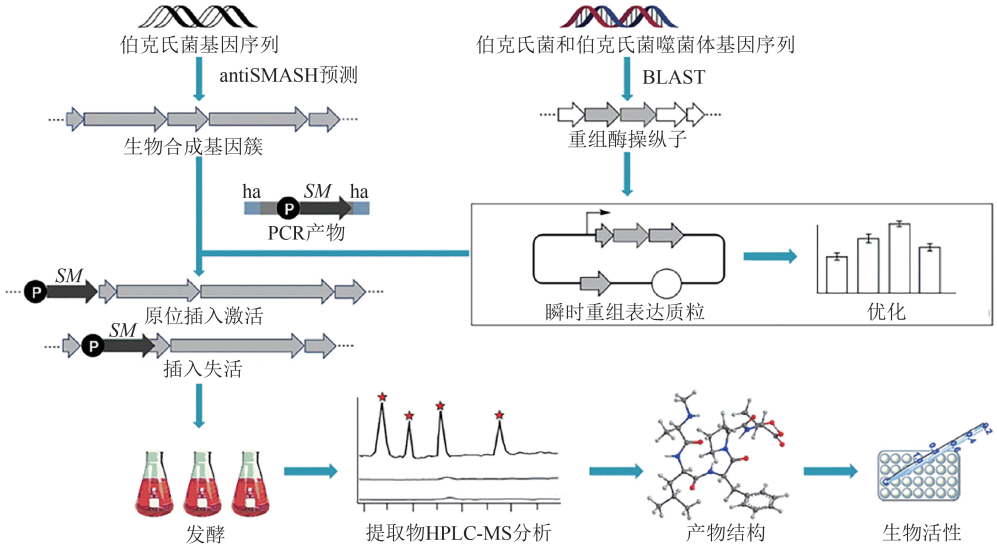


图 4　基于 Red/ET 重组系统的工作示意图及其在激活隐性 BGC 中的应用

Fig. 4　Schematic representation of the working of an efficient recombination system and its application in the activation of cryptic BGC

2.3　转化偶联技术

转化偶联技术（transformation associated recombination，TAR）是一种高效的基因组工程技术，用于大片段 DNA 的克隆和操作，其原理是基于同源序列的 DNA 片段在酵母细胞内自由末端的高效构建[80-81]。细菌 DNA 重组机制被用来在转化过程中将外源 DNA 片段精准地插入宿主细胞的染色体中。首先，设计和构建含有外源 DNA 片段的 TAR 质粒，质粒中包含宿主细胞染色体的同源片段，以促进同源重组的发生。这种技术可从复杂的基因组中选择性地分离目标 DNA，操作简单且周期短。TAR 是一种新颖的大片段 DNA 克隆技术，与传统的大片段基因克隆技术相比，TAR 技术能够选择性地分离长达 300 kb 的 DNA 片段，且无需构建基因组文库，这一突破大大提高了大片段基因克隆的效率。不仅如此，TAR 技术还可以通过催化反应，从细菌基因组中分离特定基因或基因簇，这种独特的功能使得 TAR 技术在基因组学研究中具有广泛的应用前景[40, 82]。Zhang 等[83]开发了基于 TAR 的遗传平台用于克隆大型活性天然产物 BGC。总结了 TAR 克隆 BGC 的方案，详细介绍了选择 TAR 质粒、设计特异性 TAR 载体、进行酵母转化以及在不同宿主菌株中异源表达 BGC 的过程。Wu 等[84]通过 TAR 技术从金黄色链霉菌基因组 DNA 中捕获了四环素类抗生素去甲金霉素（6-demethylchlortetracycline，6-DCT）BGC。构建了随机 DNA 文库，将 PCR 质粒整合到金黄色葡萄球菌中过表达，产量可提高 34%。Kouprina 等[81]将 TAR 克隆技术用于基因组中没有或很少有自主复制序列的基因簇，其可以捕获高达 300 kb 的 BGC。用 CRISPR-Cas9 预处理微生物 DNA，在靶序列附近双链发生断裂，可大大提高区域阳性菌落的产量。Kouprina 等[82]构建了一个包含 YAC 和 BAC 新的 TAR 载体，可以将 TAR 克隆的 DNA 从酵母中直接转移到细菌细胞中（图 5）。Kim 等[85]将 BGC 在体外进行 CRISPR/Cas9 拆卸并与基于 TAR 的 DNA 组装相结合，这种方法简单、经济高效且可扩展，能同时生成重构基因簇的组合文库，无需了解沉默基因的转录层次结构。TAR 技术具有高效、精确和可重复性的特点，并且适用于多种细胞类型和复杂基因组，可以应用于研究基因功能、基因调控以及构建人工合成途径等领域。TAR 技术的应用有助于更好地理解基因组的结构和功能，并为遗传工程和合成生物学领域的研究提供有力支持。大片段 DNA 克隆技术的性质比较见表 2。

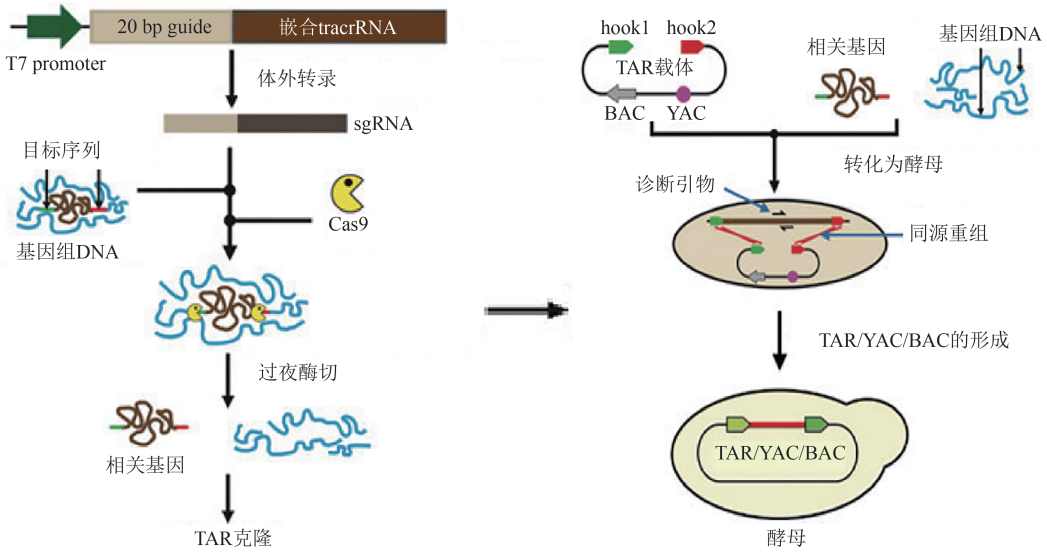


图 5　大片段基因克隆技术优化策略操作示意图

Fig. 5　Workflow of the optimized strategy for large fragment cloning

表 2　大片段 DNA 克隆技术的性质比较

Table 2　Comparison of the properties of large DNA cloning technologies

技术名称	稳定性	优点	缺点	应用领域	参考文献
人工染色体	稳定	效率高、基因稳定性高	限制性剪切、DNA 分子连接	基因克隆、基因组学	[50，56，64]
Red/ET	稳定	不受位点和大小的限制、效率高、同源序列短	操作复杂、有效片段比例不高	组装基因簇、基因簇克隆	[78-79]
TAR	稳定	无酶组装、直接分离 BGC	载体自连接和共转化效率低、DNA 纯化产物产率低	基因修饰、基因调控	[81，86-87]

3　展望

近年来，随着大规模微生物基因组测序技术与生物信息学的发展，病原菌致病机理研究、极端微生物耐受机制研究、不可培养细菌相关研究、微生物时空等多组学研究、微生物代谢产物的研究取得了突破性进展。大片段生物合成基因簇（BGC）克隆技术已在自然界活性天然产物的研究领域得到了广泛应用，其不仅能够有效地克隆和表达产生菌中未知的相关功能基因，还可通过对其进行筛选，实现对其功能和机制的深入解析。另外，该技术也能有效地将这些功能基因在异源宿主中进行重构，从而为药物发现提供丰富的资源保障。细菌人工染色体技术（BAC）成嵌合体的频率较低，而且转化效率高，但 BAC 技术作为传统的大片段克隆技术由于受限于酶切位点，实际应用范围较窄；TAC 技术虽可以直接转化植物，但需要更大的载体片段携带 BGC；Red/ET 重组系统可以不受限于大片段 PCR 扩增和酶切位点的局限性，但其操作复杂、合成效率不理想；mCRISTAR 技术无需特定的酶切位点，但其中 TAR 技术克隆的 DNA 片段大小有限且共转化效率较低。大片段克隆技术涉及处理大量的基因组 DNA 和大片段 DNA，这增加了操作步骤和技术难度，对于高度复杂的基因组，可能需使用更复杂的策略和多个克隆步骤，增加了试验的复杂性和耗时性。

BGC 广泛地存在于细菌的基因组中，其结构和功能对于代谢产物的合成和调控具有关键作用，其中从结构基因而言，BGC 为多个相邻基因组成的集合；从功能而言，一个 BGC 通常负责生物合成一类代谢通路；但 BGC 的序列模式通常为基因基数多，个体差异显著，多序列比对很难发掘同类型的 BGC。因此，随着新型技术和社会科学的共同发展，除了传统的实验室试验，还可以通过先进的计算技术、更好的数据存储设备、复杂的自然语言处理技术和基于机器学习的能力，有助于活性天然产物研究，使得研究人员拥有强大的新工具，并将这些新工具运用到研究中，从而更好地理解和研究[88-90]。活性天然产物在药物开发中一直扮演着重

要的角色，不同领域的研究人员都在使用各种方法利用活性天然产物的结构特征，用于实现不同的目的，例如生物学、医学和工程学等领域的药物开发和研究。通过对活性天然产物结构进行改造，可以得到具有不同药理活性的化合物，从而为药物开发提供新的思路和方法。此外，活性天然产物中还存在许多具有生物活性的化合物，这些化合物可以作为药物开发的重要原料，用于治疗各种疾病。因此，活性天然产物在药物开发中具有重要的地位和应用价值。综上，虽然基于不同大片段克隆技术已在多种活性天然产物BGC的克隆研究中取得了成功，然而由于不同方法在适用范围和研究目标等方面存在差异，在针对具体问题时需要根据实际情况选择合适的方法。在未来的研究中，可继续深入探索和研究此类难题，并开发出更加高效、精准的新型大片段克隆技术，以获取更高活性的天然产物或者挖掘出从未被发现的具有活性的天然产物，从而为人类的健康和生活带来更多的福祉。

参考文献

[1] COOK M A，WRIGHT G D. The past，present，and future of antibiotics[J]. Science Translational Medicine，2022，14(657)：eabo7793.

[2] ATANASOV A G，ZOTCHEV S B，DIRSCH V M，et al. Natural products in drug discovery：advances and opportunities[J]. Nature Reviews Drug Discovery，2021，20(3)：200-216.

[3] KADJO A E，EUSTÁQUIO A S. Bacterial natural product discovery by heterologous expression [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology，2023，50(1)：kuad044.

[4] KWON M J，STEINIGER C，CAIRNS T C，et al. Beyond the biosynthetic gene cluster paradigm：genome-wide coexpression networks connect clustered and unclustered transcription factors to secondary metabolic pathways[J]. Microbiology Spectrum，2021，9(2)：e0089821.

[5] NEWMAN D J，CRAGG G M. 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.

[6] 夏金涛，吴婉琴，朱松松，等. 保健食品中新型双醋酚汀衍生物的发现、合成与鉴定[J]. 食品与机械，2024，40(2)：21-27.
XIA J T，WU W Q，ZHU S S，et al. Discovery，preparation and identification of a new type of oxyphenisatine di(acetate) analogue in dietary supplement[J]. Food & Machinery，2024，40(2)：21-27.(in Chinese)

[7] MARTINET L，NAÔMÉ A，DEFLANDRE B，et al. A single biosynthetic gene cluster is responsible for the production of bagremycin antibiotics and ferroverdin iron chelators[J]. mBio，2019，10(4)：e01230-19.

[8] 殷方荣，翟李欣，田乔鹏，等. 贝莱斯芽孢杆菌角蛋白酶的克隆表达、纯化及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(6)：57-66.
YIN F R，ZHAI L X，TIAN Q P，et al. Gene cloning，expression，purification，and enzymatic properties study of keratinase from *Bacillus velezensis* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(6)：57-66.(in Chinese)

[9] GUPTA R，SRIVASTAVA D，SAHU M，et al. Artificial intelligence to deep learning：machine intelligence approach for drug discovery [J]. Molecular Diversity，2021，25(3)：1315-1360.

[10] 王南凯，龚劲松，史劲松，等. 营养化学品的生物制造研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(8)：1-9.
WANG N K，GONG J S，SHI J S，et al. Research advances in biomanufacturing of nutritional chemicals [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(8)：1-9.(in Chinese)

[11] BEUTLER J A. Natural products as a foundation for drug discovery [J]. Current Protocols in Pharmacology，2009，Chapter 9：Unit 9.11.

[12] EKIERT H M，SZOPA A. Biological activities of natural products[J]. Molecules，2020，25(23)：5769.

[13] GAO X，GAO F，LIU D，et al. Engineering the methylerythritol phosphate pathway in cyanobacteria for photosynthetic isoprene production from CO_2[J]. Energy & Environmental Science，2016，9(4)：1400-1411.

[14] LI M J，HOU F F，WU T，et al. Recent advances of metabolic engineering strategies in natural isoprenoid production using cell factories [J]. Natural Product Reports，2020，37(1)：80-99.

[15] BERGMAN M E，DAVIS B，PHILLIPS M A. Medically useful plant terpenoids：biosynthesis，occurrence，and mechanism of action[J]. Molecules，2019，24(21)：3961.

[16] RUDOLF J D，ALSUP T A，XU B F，et al. Bacterial terpenome [J]. Natural Product Reports，2021，38(5)：905-980.

[17] OLOFINSAN K，ABRAHAMSE H，GEORGE B P. Therapeutic role of alkaloids and alkaloid derivatives in cancer management[J]. Molecules，2023，28(14)：5578.

[18] BHAMBHANI S，KONDHARE K R，GIRI A P. Diversity in chemical structures and biological properties of plant alkaloids[J]. Molecules，2021，26(11)：3374.

[19] LIU C Y，YANG S S，WANG K L，et al. Alkaloids from traditional Chinese medicine against hepatocellular carcinoma[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy，2019，120：109543.

[20] ARAYA-HERMOSILLA E，PARLANTI P，GEMMI M，et al. Functionalized aliphatic polyketones with germicide activity[J]. RSC Advances，2022，12(54)：35358-35366.
[21] HUANG H W. DAPTOMYCIN，its membrane-active mechanism *vs.* that of other antimicrobial peptides[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes，2020，1862(10)：183395.
[22] MÜHLBERG E，UMSTÄTTER F，KLEIST C，et al. Renaissance of vancomycin：approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology，2020，66(1)：11-16.
[23] SÜSSMUTH R D，MAINZ A. Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects[J]. Angewandte Chemie (International Ed)，2017，56(14)：3770-3821.
[24] ZHANG L W，WANG C，CHEN K，et al. Engineering the biosynthesis of fungal nonribosomal peptides[J]. Natural Product Reports，2023，40(1)：62-88.
[25] NIQUILLE D L，FOLGER I B，BASLER S，et al. Biosynthetic functionalization of nonribosomal peptides[J]. Journal of the American Chemical Society，2021，143(7)：2736-2740.
[26] ONGPIPATTANAKUL C，DESORMEAUX E K，DICAPRIO A，et al. Mechanism of action of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides[J]. Chemical Reviews，2022，122(18)：14722-14814.
[27] DO T，JAMES LINK A. Protein engineering in ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs)[J]. Biochemistry，2023，62(2)：201-209.
[28] ZHONG G N，WANG Z J，YAN F，et al. Recent advances in discovery，bioengineering，and bioactivity-evaluation of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides[J]. ACS Bio & Med Chem Au，2022，3(1)：1-31.
[29] ARNISON P G，BIBB M J，BIERBAUM G，et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products：overview and recommendations for a universal nomenclature[J]. Natural Product Reports，2013，30(1)：108-160.
[30] KAUR H，JAKOB R P，MARZINEK J K，et al. The antibiotic darobactin mimics a *β*-strand to inhibit outer membrane insertase[J]. Nature，2021，593：125-129.
[31] IMAI Y，MEYER K J，IINISHI A，et al. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens[J]. Nature，2019，576(7787)：459-464.
[32] NESIC M，RYFFEL D B，MATURANO J，et al. Total synthesis of darobactin A[J]. Journal of the American Chemical Society，2022，144(31)：14026-14030.
[33] BÖHRINGER N，GREEN R，LIU Y，et al. Mutasynthetic production and antimicrobial characterization of darobactin analogs[J]. Microbiology Spectrum，2021，9(3)：e0153521.
[34] GUO S J，WANG S，MA S Z，et al. Radical SAM-dependent ether crosslink in daropeptide biosynthesis[J]. Nature Communications，2022，13(1)：2361.
[35] MO T L，JI X J，YUAN W，et al. Thuricin Z：a narrow-spectrum sactibiotic that targets the cell membrane[J]. Angewandte Chemie (International Ed)，2019，58(52)：18793-18797.
[36] HUDSON G A，BURKHART B J，DICAPRIO A J，et al. Bioinformatic mapping of radical *S*-adenosylmethionine-dependent ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides identifies new Cα，Cβ，and Cγ-linked thioether-containing peptides[J]. Journal of the American Chemical Society，2019，141(20)：8228-8238.
[37] HUO L J，HUG J J，FU C Z，et al. Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways[J]. Natural Product Reports，2019，36(10)：1412-1436.
[38] HAO T T，XIE Z J，WANG M，et al. An anaerobic bacterium host system for heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters[J]. Nature Communications，2019，10(1)：3665.
[39] 曾哲，任晓丹，杨晟. 基于基因组编辑技术的大片段克隆新策略[J]. 生物工程学报，2016，32(4)：401-408.
ZENG Z，REN X D，YANG S. New methods for cloning large gene clusters based on CRISPR/cas9[J]. Chinese Journal of Biotechnology，2016，32(4)：401-408.(in Chinese)
[40] 高花花，胡娟，刘玲丽. 基因簇大片段克隆技术研究进展及挑战[J]. 微生物学通报，2023，50(1)：351-367.
GAO H H，HU J，LIU L L. Research progress and challenges in cloning large gene clusters[J]. Microbiology China，2023，50(1)：351-367.(in Chinese)
[41] SJÖBERG G，GUEVARA-MARTÍNEZ M，VAN MARIS A J A，et al. Metabolic engineering applications of the Escherichia coli bacterial artificial chromosome[J]. Journal of Biotechnology，2019，305：43-50.
[42] YOSHIKAWA T，MISU M，KUROSU T，et al. Markerless bacterial artificial chromosome manipulation method by red proteins of phage λ mediated homologous recombination utilizing fluorescent proteins for both positive and counter selection[J]. Heliyon，2023，9(8)：e18983.
[43] 虞旭昶，吴辉，李雷. 文库构建与基因簇靶向筛选驱动的微生物天然产物高效发现[J]. 合成生物学，2024，5(3)：492-506.
YU X C，WU H，LI L. Library construction and targeted BGC screening for more efficient discovery of microbial natural products[J]. Synthetic Biology Journal，2024，5(3)：492-506.(in Chinese)
[44] LUO M Z，WING R A. An improved method for plant

BAC library construction[J]. Methods in Molecular Biology, 2003, 236: 3-20.

[45] WEI X L, XU Z C, WANG G X, et al. pBACode: a random-barcode-based high-throughput approach for BAC paired-end sequencing and physical clone mapping[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(7): e52.

[46] XU W, LIANG M J, YANG X, et al. Genomic resources of broomcorn millet: demonstration and application of a high-throughput BAC mapping pipeline [J]. BMC Genomic Data, 2021, 22(1): 46.

[47] TAKAO R S, SAKAI K, KOSHINO H, et al. Identification of the kinanthraquinone biosynthetic gene cluster by expression of an atypical response regulator[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2021, 85 (3): 714-721.

[48] LIANG M D, LIU L S, XU F, et al. Activating cryptic biosynthetic gene cluster through a CRISPR-Cas12a-mediated direct cloning approach[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(6): 3581-3592.

[49] XU M, ZHANG F, CHENG Z, et al. Functional genome mining reveals a class V lanthipeptide containing a *D*-amino acid introduced by an F420H2-dependent reductase[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(41): 18029-18035.

[50] PARK H S, PARK J H, KIM H J, et al. BAC cloning and heterologous expression of a giant biosynthetic gene cluster encoding antifungal neotetrafibricin in *Streptomyces rubrisoli*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 964765.

[51] KUDO K, NISHIMURA T, IZUMIKAWA M, et al. Capability of a large bacterial artificial chromosome clone harboring multiple biosynthetic gene clusters for the production of diverse compounds[J]. The Journal of Antibiotics, 2024, 77(5): 288-298.

[52] LARIN MONACO Z, MORALLI D. Progress in artificial chromosome technology [J]. Biochemical Society Transactions, 2006, 34(Pt 2): 324-327.

[53] 陈碧燕,文李. 酿酒酵母全基因组学及其应用研究进展[J]. 食品与机械,2020,36(11):223-227,232.
CHEN B Y, WEN L. Progress in Saccharomyces cerevisiae genome research and relative application[J]. Food & Machinery, 2020, 36(11): 223-227, 232.(in Chinese)

[54] 刘甜甜,徐显皓,孔晓,等. 酿酒酵母代谢调控合成功能营养品:进展与挑战[J]. 食品与生物技术学报,2022, 41(8):10-21.
LIU T T, XU X H, KONG X, et al. Metabolic regulation and synthesis of functional nutrients in saccharomyces cerevisiae: progress and challenges[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(8): 10-21.(in Chinese)

[55] LUO Y Z, HUANG H, LIANG J, et al. Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster [J]. Nature Communications, 2013, 4: 2894.

[56] JUNG H M, KIM Y H. Simultaneous overexpression of integrated genes by copy number amplification of a mini-yeast artificial chromosome[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 28(5): 821-825.

[57] NAESBY M, NIELSEN S V, NIELSEN C A, et al. Yeast artificial chromosomes employed for random assembly of biosynthetic pathways and production of diverse compounds in Saccharomyces cerevisiae[J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8: 45.

[58] AMEMIYA C T, AMORES A, OTA T, et al. Generation of a P1 artificial chromosome library of the Southern pufferfish [J]. Gene, 2001, 272(1/2): 283-289.

[59] CUSTODIO A B, ALCANTARA E P. Identification of polyketide synthase gene clusters in a phage P1-derived artificial chromosome library of a Philippine strain of *Streptomyces* sp. PCS3-D2[J]. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 2019,27(2):56-63.

[60] TU J J, LI S T, CHEN J, et al. Characterization and heterologous expression of the neoabyssomicin/abyssomicin biosynthetic gene cluster from Streptomyces koyangensis SCSIO 5802[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 28.

[61] LIBIS V, MACINTYRE L W, MEHMOOD R, et al. Multiplexed mobilization and expression of biosynthetic gene clusters [J]. Nature Communications, 2022, 13 (1): 5256.

[62] LIU Y G, LIU H M, CHEN L T, et al. Development of new transformation-competent artificial chromosome vectors and rice genomic libraries for efficient gene cloning[J]. Gene, 2002, 282(1/2): 247-255.

[63] XU Y Y, ZHOU Y L, SONG L L, et al. Construction and characterization of the transformation-competent artificial chromosome (TAC) libraries of Leymus multicaulis [J]. Science in China Series C, Life Sciences, 2008, 51(7): 604-613.

[64] MORALLI D, MONACO Z L. Gene expressing human artificial chromosome vectors: advantages and challenges for gene therapy[J]. Experimental Cell Research, 2020, 390(1): 111931.

[65] SINENKO S A, PONOMARTSEV S V, TOMILIN A N. Human artificial chromosomes for pluripotent stem cell-based tissue replacement therapy[J]. Experimental Cell Research, 2020, 389(1): 111882.

[66] LOGSDON G A, GAMBOGI C W, LISKOVYKH M A, et al. Human artificial chromosomes that bypass centromeric DNA[J]. Cell, 2019, 178(3): 624-639.

[67] MOLINA O, KOUPRINA N, MASUMOTO H, et al.

Using human artificial chromosomes to study centromere assembly and function[J]. Chromosoma, 2017, 126(5): 559-575.

[68] NARAYANAN K, CHEN Q W. Bacterial artificial chromosome mutagenesis using recombineering [J]. BioMed Research International, 2011, 2011(1): 971296.

[69] GAMBOGI C W, BIRCHAK G J, MER E, et al. Efficient formation of single-copy human artificial chromosomes[J]. Science, 2024, 383(6689): 1344-1349.

[70] ZHANG Y M, BUCHHOLZ F, MUYRERS J P P, et al. A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli[J]. Nature Genetics, 1998, 20: 123-128.

[71] MUYRERS J P P, ZHANG Y M, STEWART A F. echniques: recombinogenic engineering-new options for cloning and manipulating DNA [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001, 26: 325-331.

[72] ZHANG Y M, MUYRERS J P P, RIENTJES J, et al. Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in Escherichia coli and mouse ES cells[J]. BMC Molecular Biology, 2003, 4(1): 1.

[73] WANG H L, LI Z, JIA R N, et al. RecET direct cloning and Redαβ recombineering of biosynthetic gene clusters, large operons or single genes for heterologous expression [J]. Nature Protocols, 2016, 11(7): 1175-1190.

[74] WAN J Y, MA N, YUAN H. Recent advances in the direct cloning of large natural product biosynthetic gene clusters[J]. Engineering Microbiology, 2023, 3(3): 100085.

[75] 郑文韬, 张友明, 卞小莹. Red/ET 同源重组技术及其在微生物基因组挖掘中的应用进展[J]. 微生物学报, 2017, 57(11): 1735-1746.
ZHENG W T, ZHANG Y M, BIAN X Y. Advances in Red/ET recombineering and its application for microbial genome mining[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(11): 1735-1746.(in Chinese)

[76] LI R J, SHI H B, ZHAO X Y, et al. Development and application of an efficient recombineering system for Burkholderia glumae and Burkholderia plantarii [J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(4): 1809-1826.

[77] 周海波, 申琪瑶, 陈汉娜, 等. 利用异源表达挖掘纤维堆囊菌 So0157-2 的新型天然产物[J]. 合成生物学, 2021, 2(5): 837-849.
ZHOU H B, SHEN Q Y, CHEN H N, et al. Genome mining for novel natural products in *Sorangium cellulosum* So0157-2 by heterologous expression [J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(5): 837-849.(in Chinese)

[78] LIU Q S, SHEN Q Y, BIAN X Y, et al. Simple and rapid direct cloning and heterologous expression of natural product biosynthetic gene cluster in Bacillus subtilis *via* Red/ET recombineering [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 34623.

[79] SONG C Y, LUAN J, LI R J, et al. RedEx: a method for seamless DNA insertion and deletion in large multimodular polyketide synthase gene clusters [J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(22): e130.

[80] KOUPRINA N, NOSKOV V N, KORIABINE M, et al. Exploring transformation-associated recombination cloning for selective isolation of genomic regions [J]. Methods in Molecular Biology, 2004, 255: 69-89.

[81] KOUPRINA N, NOSKOV V N, LARIONOV V. Selective isolation of large segments from individual microbial genomes and environmental DNA samples using transformation-associated recombination cloning in yeast[J]. Nature Protocols, 2020, 15(3): 734-749.

[82] KOUPRINA N, KIM J H, LARIONOV V. Highly selective, CRISPR/Cas9-mediated isolation of genes and genomic loci from complex genomes by TAR cloning in yeast[J]. Current Protocols, 2021, 1(8): e207.

[83] ZHANG J J, YAMANAKA K, TANG X Y, et al. Direct cloning and heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters by transformation-associated recombination [J]. Methods in Enzymology, 2019, 621: 87-110.

[84] WU N X, HUANG H, MIN T L, et al. TAR cloning and integrated overexpression of 6-demethylchlortetracycline biosynthetic gene cluster in Streptomyces aureofaciens [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2017, 49: 1129-1134.

[85] KIM S H, LU W L, AHMADI M K, et al. Atolypenes, tricyclic bacterial sesterterpenes discovered using a multiplexed *in vitro* Cas9-TAR gene cluster refactoring approach[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(1): 109-118.

[86] SANDER J D, KEITH JOUNG J. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(4): 347-355.

[87] KANG H S, CHARLOP-POWERS Z, BRADY S F. Multiplexed CRISPR/Cas9- and TAR-mediated promoter engineering of natural product biosynthetic gene clusters in yeast[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(9): 1002-1010.

[88] MULLOWNEY M W, DUNCAN K R, ELSAYED S S, et al. Artificial intelligence for natural product drug discovery[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2023, 22(11): 895-916.

[89] SAHAYASHEELA V J, LANKADASARI M B, DAN V M, et al. Artificial intelligence in microbial natural product drug discovery: current and emerging role[J]. Natural Product Reports, 2022, 39(12): 2215-2230.

[90] ARORA S, CHETTRI S, PERCHA V, et al. Artifical intelligence: a virtual chemist for natural product drug discovery [J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2024, 42(7): 3826-3835.