

## 一、项目名称

Red/ET 基因组编辑与微生物资源发掘

## 二、申报奖种

自然科学奖

## 三、推荐单位

山东大学

## 四、项目简介

基因组编辑是国际研究热点，基因组编辑技术已成为基因组功能研究、合成生物学等前沿学科的技术支撑。与国际相比，中国在此领域整体水平属于第二梯队，存在原创性成果低、技术靶向性低、耗时、成本高、通量低等普遍问题。微生物是天然产物的主要来源，但大量难培养微生物难以利用，活性天然产物的大片段生物合成基因簇的获取及编辑修饰存在极大困难。

本项目组二十年前就发现大肠杆菌噬菌体重组蛋白具有极高的同源重组活性，作为首创者以此开发了 Red/ET 基因组编辑技术；最早在 Nature Genetic 发表的文章已经被引用超过 1200 次；二十多年来，围绕这套系统的工作原理、技术开发和应用，项目组在 Nature 及子刊发表论文十篇（九十多篇相关 SCI 论文的累计引用次数上万），国际专利十余项，已在国际三十多家著名生物医药公司和数百家科研机构得到广泛应用，成为从微生物中挖掘天然产物的主流技术。

为了提高基因组编辑效率，解决微生物资源开发中的普遍问题（天然产物大基因簇难获取难操作）本项目组在前期首创的 Red/ET 基因组编辑技术基础上，优化建立更高效的 DNA 大片段直接克隆与编辑体系，并用于可进行肿瘤靶向治疗的天然产物的挖掘，获得系列原创性科学成果：

利用 Red/ET 的同源重组和反向筛选建立了“无缝定点突变”技术，适用于多拷贝质粒和单拷贝细菌人工染色体，实现了细菌源和哺乳动物源功能蛋白关键氨基酸的无缝替换；整合 Red/ET 重组酶介导的 DNA 直接克隆和修饰系统至同一

个大肠杆菌细胞中，对载体和转移元件进行标准化，建立了不同微生物源的天然产物生物合成基因簇的一步获取（3 天可完成）、异源表达以及原位激活的研究平台。

接下来，项目组利用优化的 Red/ET 技术体系解决了纳米磁小体（具备工业和医药应用价值）和抗肿瘤药物挖掘中存在的问题：完成磁小体基因簇的克隆、修饰和异源表达，解决了困扰磁小体生物合成领域三十多年的技术瓶颈（磁小体产生菌难培养难操作，基因簇大，常规技术难以获取）；并在安全性高的肿瘤靶向细菌中表达了一些重要的抗肿瘤活性药物基因簇。这些基因簇的获取和表达为进行肿瘤靶向治疗奠定基础；项目组针对天然产物大片段基因簇亟待挖掘和新型天然产物合成机制亟待阐释的问题，实现了抗肿瘤药物盐霉素的 106kb 基因簇克隆和表达、luminide 合成途径修饰和产量的提升以及大量天然产物沉默基因簇的激活；在国际上首次证明了细胞毒素 colibactin 的原药成熟机制，发现并分离鉴定了多个 colibactin 合成途径相关的代谢产物，为其化学结构发现以及致病机理研究打下坚实的基础。

以上工作在 Nature Protocols、Nucleic Acids Research、Nature Nanotechnology 等刊物发表后，引起广泛关注：Nature 上发表了主编撰写的 Research Highlights 文章，评价磁小体的研究是“向细菌生产磁小体迈出一大步”；Nature Nanotechnology 同期专评文章评价本项目“建立了合成磁小体的经济适用的方法”；数篇 Science、Nature Chemistry、Nature Chemical Biology 论文中作为重要例子引用了本项目组 colibactin 的生物合成机制的研究工作。

相关工作发表 SCI 论文 21 篇；8 篇代表性论文总影响因子 104，他引总数 207 次（SCI 检索）。项目组培养的一名博士生获得山东省研究生优先创新奖（一等奖，2016）。

## 五、主要完成人情况表

1、姓名：张友明                      排名：一                      技术职称：教授

工作单位：山东大学

完成单位：山东大学

对本项目技术创造性贡献：在重要科学发现 1、2 和 3 中均作出创造性贡献；是代表性论文 1、2、3、4、5、6、7、8 的共同通讯作者；作为 Red/ET 基因组编辑技术的首创人员之一，是本项目所有技术发明与科学发现的最大贡献者，承担了实验的整体设计、技术指导、监督执行等工作，保障了项目的顺利开展与完成。

曾获科技奖励情况：无

2、姓名：王海龙            排名：三            技术职称：教授

工作单位：山东大学

完成单位：山东大学

对本项目技术创造性贡献：在重要科学发现 1 中作出重要贡献；是代表性论文 1、5 的第一作者；致力于 Red/ET 微生物基因组编辑技术的深度开发，作为本项目实验的直接执行者，建立了生物合成途径高通量直接克隆、修饰和异源表达的技术平台，对大片段克隆载体和 DNA 修饰元件进行了标准化；开发了基于 Red/ET 重组和 CcdB 反向筛选 DNA 无缝定点突变新技术，为人类基因功能研究和微生物复杂生物合成途径的改造提供了有效方法。

曾获科技奖励情况：无

3、姓名：卞小莹            排名：四            技术职称：教授

工作单位：山东大学

完成单位：山东大学

对本项目技术创造性贡献：在“重要科学发现 3”中作出重要贡献；是代表性论文 3、6、8 的第一作者；致力于利用 Red/ET 技术进行微生物药物的深度开发，作为本项目实验的直接执行者，为该项目的完成做出重要贡献。

曾获科技奖励情况：无

4、姓名：符军            排名：二            技术职称：教授

工作单位：山东大学

完成单位：山东大学

对本项目技术创造性贡献：在重要科学发现 1、2 和 3 中均作出贡献；在 8 项代表性论文中，是其中第 1、4、5、7 的共同通讯作者。

曾获科技奖励情况：无

5、姓名：李爱英            排名：五            技术职称： 副教授

工作单位：山东大学

完成单位：山东大学

对本项目技术创造性贡献：在重要科学发现 1 中均作出贡献；在 8 项代表性论文中，是其中第 1 的共同作者。

曾获科技奖励情况：无

## 六、代表性论文专著目录（第一作者#；通讯作者\*）

1. Wang, Hailong (王海龙)<sup>#</sup>; Li, Zhen<sup>#</sup>; Jia, Ruonan; Hou, Yu; Yin, Jia; Bian, Xiaoying(卞小莹) ; Li, Aiyong (李爱英) ; Müller, Rolf; Stewart, A. Francis<sup>\*</sup>; Fu, Jun<sup>\*</sup> (符军) ; Zhang, Youming<sup>\*</sup> (张友明) . RecET direct cloning and Red  $\alpha$   $\beta$  recombineering of biosynthetic gene clusters, large operons or single genes for heterologous expression. **Nature Protocols**. 2016;11 (7):1175-1190 (影响因子: 15.3; SCI 他引次数: 14; 他引总次数: 24; 国内完成)

2. Kolinko, Isabel<sup>#</sup>; Lohsse, Anna; Borg, Sarah; Raschdorf, Oliver; Jogler, Christian; Tu, Qiang; Posfai, Mihaly; Tompa, Eva; Pitzko, Jurgen M. ; Brachmann, Andreas; Wanner, Gerhard; Müller, Rolf; Zhang, Youming<sup>\*</sup> (张友明) ; Schüler, Dirk<sup>\*</sup>. Biosynthesis of magnetic nanostructures in a foreign organism by transfer of bacterial magnetosome gene clusters. **Nature Nanotechnology**. 2014;9(3):193-197 (影响因子: 45.8; SCI

他引次数：65；他引总次数：73；大部分国内完成)

3. Bian, Xiaoying<sup>#</sup> (卞小莹) ; Plaza, Alberto; Zhang, Youming\* (张友明) ; Müller, Rolf\*. Two more pieces of the colibactin genotoxin puzzle from *Escherichia coli* show incorporation of an unusual 1-aminocyclopropanecarboxylic acid moiety. **Chemical Science**. 2015;6 (5): 3154-3160 (影响因子: 8.8; SCI 他引次数: 28; 他引总次数: 19; 大部分国内完成)

4. Yin, Jia<sup>#</sup>; Zhu, Hongbo; Xia, Liqu; Ding, Xuezhi; Hoffmann, Thomas; Hoffmann, Michael; Bian, Xiaoying (卞小莹) ; Müller, Rolf; Fu, Jun\* (符军) ; Stewart, A. Francis\*; Zhang, Youming\* (张友明). A new recombineering system for *Photobacterium* and *Xenorhabdus*. **Nucleic Acids Research**. 2014;43 (6):e36 (影响因子: 10.2; SCI 他引次数: 12; 他引总次数: 17; 国内完成)

5. Wang, Hailong<sup>#</sup> (王海龙) ; Bian, Xiaoying (卞小莹) ; Xia, Liqu; Ding, Xuezhi; Müller, Rolf; Zhang, Youmin\* (张友明) ; Fu, Jun\* (符军) ; Stewart, A. Francis\*. Improved seamless mutagenesis by recombineering using *ccdB* for counterselection. **Nucleic Acids Research**. 2014;42 (5):e37 (影响因子: 10.2; SCI 他引次数: 24; 他引总次数: 38; 大部分国内完成)

6. Bian, Xiaoying<sup>#</sup> (卞小莹) ; Fu, Jun (符军) ; Plaza, Alberto; Herrmann, Jennifer; Pistorius, Dominik; Stewart, A. Francis); Zhang, Youming\* (张友明) ; Müller, Rolf\*. In vivo evidence for a prodrug activation mechanism during colibactin maturation. **ChembioChem**. 2013;14(10):1194-1197 ((影响因子: 2.7; SCI 他引次数: 48; 他引总次数: 57; 大部分国内完成)

7. Yin, Jia<sup>#</sup> (尹佳) ; Hoffmann, Michael; Bian, Xiaoying; Tu, Qiang; Yan, Fu; Xia, Liqu; Ding, Xuezhi; Stewart, A. Francis; Mueller, Rolf\*;

Fu, Jun\*; Zhang, Youming\*. Direct cloning and heterologous expression of the salinomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces albus* DSM41398 in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Scientific Reports**. 2015;5:15081. (影响因子: 4.6; SCI 他引次数: 11; 他引总次数: 20; 国内完成)

8. Bian, Xiaoying<sup>#</sup> (卞小莹); Plaza, Alberto; Yan, Fu; Zhang, Youming\*(张友明); Müller, Rolf\*. Rational and efficient site-directed mutagenesis of adenylation domain alters relative yields of luminide derivatives in vivo. **Biotechnology and Bioengineering**. 2015; 112(7):1343-1353 (影响因子: 4.2; SCI 他引次数: 5; 他引总次数: 7; 大部分国内完成)