

东海洋山港沿岸土壤、海水样本中 I 型 PKS 基因的初步筛选鉴定与功能分析

董晓毅 王梁华 孙铭娟 宗 英 焦豫良 焦炳华*

(中国人民解放军第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室 上海 200433)

摘 要: 为考察土壤和海水中的 I 型聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)基因的多样性和差异, 本研究自行设计了一套针对 PKS 基因中酮缩合酶(ketosynthase, KS)片段的简并引物, 使用 PCR 方法直接克隆东海洋山港沿岸土壤和海水 DNA 样本中的 KS 片段, 去除重复序列后, 共获得了 23 条不同的 KS 片段(长度为 630 bp~690 bp), 提交 GenBank 皆获登录号, 其中 19 条来自土壤(DQ640993、DQ640997、DQ641926、DQ641927、DQ673137~DQ673151), 4 条来自海水(DQ673151、EF554859~EF554861), 由核苷酸序列推断出的氨基酸序列保守, 与 GenBank 中已知 KS 基因片段的相似度在 45% 到 85% 之间, 种系发生分析表明, 其中 14 条 KS 片段(来源于海水的 KS 片段皆在其中)应来源于典型的 KS 群, 而剩余 9 条则来源于杂合的 PKS/NRPS(Non-ribosomal peptide synthetase, 非核糖体多肽合成酶)群。另外, 几条 KS 基因特征明显, 可用于进一步的研究。

关键词: 未获得培养微生物, 聚酮合酶, 酮缩合酶, 土壤, 海水

Screening, Identifying and Function Analysis of Polyketide Synthase I Domains from Soil and Seawater of Yangshan Harbor

DONG Xiao-Yi WANG Liang-Hua SUN Ming-Juan ZONG Ying
JIAO Yu-Liang JIAO Bing-Hua*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Basic Medical Science, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract: To directly access type polyketide synthases (PKS) gene diversity from soil and seawater, a set of degenerate oligonucleotide primers were designed to amplify the ketosynthase fragments (KSs) belong to the PKS genes from the soil and the seawater DNA samples obtained from the Yangshan Harbor (Shanghai, China). All the unique 23 fragments (ranged from 630 bp to 690 bp after cutting off the primer and vector sequences) obtained were belonging to the conserved KS domains in PKS genes. Among them 19 fragments were amplified from soil (DQ640993, DQ640997, DQ641926, DQ641927, and

基金项目: 国家“863 计划”(No. 2006AA09Z434); 国家自然科学基金(No. 30670043)资助

* 通讯作者: Tel: 021-25070303; ✉ jiaobh@uninet.com.cn

收稿日期: 2008-01-18; 接受日期: 2008-03-06

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

DQ673137~DQ673151) and 4 from the seawater (DQ673151 and EF554859~EF554861). The predicated amino acid sequences showed 45% to 85% identifies to the known KSs genes in the GenBank. Phylogenetic analysis showed that 14 of them belonged to the normal KS domains that catalyzed the condensation of the acyl groups and the other 9 KS fragments belonged to the hybrid PKS/NRPS groups. Several KS fragments were endowed with some distinct characters that could be used in the following studies.

Keywords: Uncultured microbes, Polyketide synthase, Ketosynthase, Soil, Sea water

从海洋生境中直接分离、克隆和表达有用的海洋微生物功能基因,是开发利用海洋生物资源的重要方向。其中,可合成红霉素、雷帕霉素和埃博霉素等具有医学、农业等应用价值的次级代谢产物的型聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)基因很适合作为宏基因组功能基因筛选目标^[1]。

国际通用的技术路线是直接提取某环境中的总DNA,构建环境宏基因组文库,使用杂交或PCR方法从中筛选含型PKS基因的阳性克隆,再测序得到目的基因序列。其中最典型的工作就是从土壤宏基因组文库中筛选型PKS基因^[2,3]。在海洋宏基因组研究领域,目前已经在可产生已知聚酮类化合物的海绵、总草苔虫等海洋无脊椎动物的共生微生物宏基因组文库中筛选到了一些型PKS基因^[4-7]。

本研究自行设计了一套针对型PKS基因中保守序列的简并引物,使用直接PCR方法,针对我国东海海域的沿岸土壤、海水、沉积物等不同生境中进行型PKS基因的筛选,并对所得到的基因片段进行了初步的鉴定和功能分析,为今后开发利用海洋宏基因组中微生物次级代谢产物的生物合成基因资源,最终开发海洋来源的生物活性药物打下工作基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体和主要试剂

1) 大肠杆菌 BL21(DE3), 本室传代保存。

2) 游动束丝放线菌(*Actinosynnema pretiosum*, 产生大环内酰胺抗生素 Ansamitocin)和 *Streptomyces avermitilis*(产生阿维菌素 Avermectin)的总DNA样品,由上海交通大学 Bio-X 生命科学研究中心白林泉老师馈赠。

3) 克隆载体 pMD-18T, 购自 TaKaRa 公司。

4) 氨苄青霉素、琼脂、琼脂糖、各种无机盐、有机溶剂和核酸分子量标记等常用生化试剂购自上海生工生物工程公司,相关试剂配制方法参见分子

克隆操作指南第三版。

5) 质粒抽提试剂盒、快速胶回收试剂盒等常用试剂盒购自北京博大泰克生物工程公司,实验操作方法按照厂家说明操作。

1.2 样品采集和处理方法

岸边土壤样本采集点位于上海洋山港码头东 1 km 处,采集深度为距地表 5 cm~20 cm,采集时间为 2005 年 12 月 25 日。海水样本采集自上海洋山港码头东 1 km 处,采集深度距海平面 1 m~3 m,采集量为 15 L,海水样品先使用 0.8 μ m 醋酸纤维素滤膜过滤后,再将滤出液用另一块 0.15 μ m 醋酸纤维素滤膜过滤,使用灭菌去离子水冲洗收集滤膜表面的样品。所有样品均收集在灭菌 Eppendorf 管中,置冰盒中运至实验室-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存,并在采样后 2 周内进行 DNA 提取。

土壤和海水过滤物总 DNA 的提取使用商品化试剂盒 PowerSoil DNA Isolation Kit(MO BIO 公司)。所获 DNA 直接用于 PCR。

1.3 简并引物设计和有效性验证

基于从 GenBank 中查找到的已知 PKS 基因的保守序列,使用网上 CODEHOP 简并引物设计服务^[8],结合 Primer Premier 5 和 DNAMAN 等生物学软件,并经人工调整后,设计出针对型PKS基因保守区域KS片段的简并引物一套:

其中正义引物针对 PQQR 模序,共 32 条,序列为:

5'-CGCTCCATGGAYCCSCARCA-3'

反义引物则针对 HGTGT 模序,共 24 条,序列为:

5'-GTSCCSGTSSCRTGSSHYTCSA-3'

(注:S: A, G; Y: C, T; R: A, G, C, T)

在含型PKS基因的游动束丝放线菌 *Actinosynnema pretiosum* 和链霉菌 *Streptomyces avermitilis* 上验证了其有效性,从两种放线菌的基因组DNA中均扩增出了长约 700 bp 的目的片段,将

其连接到 PMD-18 T 载体上测序, 测序结果经 Blastn 比对, 完全正确。

1.4 PCR 反应条件

为提高 PCR 克隆阳性率, PCR 实验使用正义引物与反义引物两两配对, 进行大批量组合 PCR 的策略。

50 μ L 反应体系组成: TaKaRa Ex Taq(5 U/ μ L) 0.25 μ L; 10 \times Ex Taq Buffer(Mg²⁺ plus)5 μ L; dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)4 μ L; 模板 DNA 1 μ L (0.1 μ g–1 μ g dsDNA); 正义引物(40 μ mol/L)0.25 μ L; 反义引物(40 μ mol/L)0.25 μ L, 加灭菌蒸馏水补足 50 μ L。

反应条件: 94 5 min; 94 1 min, 65 1 min, 72 1 min, 30 个循环; 72 10 min, 4 holding。

琼脂糖凝胶电泳, EB 显色, 紫外成像分析。

1.5 克隆、序列测定及分析

使用博大泰克的 PCR 产物纯化试剂盒, 将 PCR 反应的阳性条带割胶回收, 连接 PMD18-T 载体后, 转化 BL21 感受态细胞。将筛选得到的阳性克隆子送到上海英骏生物技术有限公司用 3730 测序仪进行序列测定。将得到的目标片段序列提交 GenBank 数据库, 获得序列登录号。

使用 DNAMAN 将获得的核苷酸序列转换为氨基酸序列, 登录 NCBI 官方网站, 使用 Blastp 程序进行氨基酸序列的同源性比对, 然后将 GenBank 上与获得的同源性最高的氨基酸序列下载到本地计算机上, 使用 ClustalX (version 1.83)进行同源比对, 去除过短及过长序列, 使用 BioEdit (version 7.01)软件进行手工纠错后, 导入 Mega (version 3.1)程序构建 NJ/MP/UPGMA 种系发生树。分支长度重复运算次数为 1000 次。

1.6 GenBank 序列登录号

获得的 23 个 KS 基因片段的 GenBank 序列登录号分别是: DQ640993、DQ640997、DQ641926、DQ641927、DQ673137~DQ673152、EF554859~EF554861。

2 实验结果与讨论

2.1 PCR 结果

土壤基因组 DNA 中 KS 片段的 PCR 结果见图 1。海水基因组 DNA 中 KS 片段的 PCR 结果见图 2。将 18 条 PCR 结果电泳的阳性条带克隆进 PMD18-T

载体后, 筛选出约 60 个阳性克隆, 测序后, 去掉重复序列, 最终获得 23 条新型 KS 基因片段, 19 条来自土壤 (DQ640993, DQ640997, DQ641926, DQ641927, DQ673137~DQ673151), 4 条来自海水 (EF554859~EF554861, DQ673151), 沉积物中未获得阳性克隆。

实验中发现: 在同一 PCR 产物条带中, 可能含有两个或更多的不同的序列。比如克隆 dz-ks-47-1 和 dz-ks-47-3 就来自于引物对 KSF4/KSR7 的同一条带。引物对 KSF4/KSR8 被我们称之为“超级引物”, 土壤样本中的 5 个克隆 dz-ks-A1、dz-ks-P1、dz-ks-48-1、dz-ks-48-2 和 dz-ks-48-3 以及海水样本中的 3 个克隆 01529-2, 0848-1 和 0848-2 都是由其扩增出来的, 该对引物甚至成功地从本实验室保藏的多个菌株中克隆到了若干新型的 KS 片段(另文报道)。

PCR 结果表明, 本研究使用的简单快速的简并引物 PCR 策略非常成功。从 PCR 的阳性率看, 在链霉菌含量丰富的土壤样本中, 克隆效率尤其高。研究结果证实了宏基因组中大量未知 PKS 基因的存在, 预示着大量的新型微生物次级代谢产物的存在。

2.2 扩增出的 KS 序列的特征

为获得进一步的信息, 对获得的 23 条 KS 基因片段的序列特征进行考察。23 条的 KS 基因片段的 GC 含量范围是 49%~73%, 平均 66.7%, 这与简并引物设计时考虑的 GC 含量偏好性有关。

近来已经有若干文献对 KS 结构域的活性模序 (motif) 与其功能的关系进行了研究^[9], 例如, 在 niddamycin 和 tylosin 相关生物合成基因簇中, KS 序列中的活性半胱氨酸被谷氨酰胺残基替代(称之为 KSQ 型 KS 结构域), 发挥脱羧基活性^[10]。在非核糖体多肽合成酶(NRPS)与聚酮合酶杂合基因簇中的 KS 结构域中, 在活性半胱氨酸的 N-末端方向的第 3 个氨基酸残基被谷氨酰胺替代, 它可利用氨基酸 moiety 作为生物合成的起始单位^[9]。

将本研究获得的 23 条 KS 基因片段转换成氨基酸序列后, 使用 ClustalX 软件同源性分析其氨基酸排列方式。结果见图 3。

在 23 个 KS 片段中, 有 9 个 KS 片段的氨基酸序列排布具有一定的特殊性, 即其半胱氨酸上游第 22 个氨基酸残基排布方式为独特的 N(DE)KD, 另

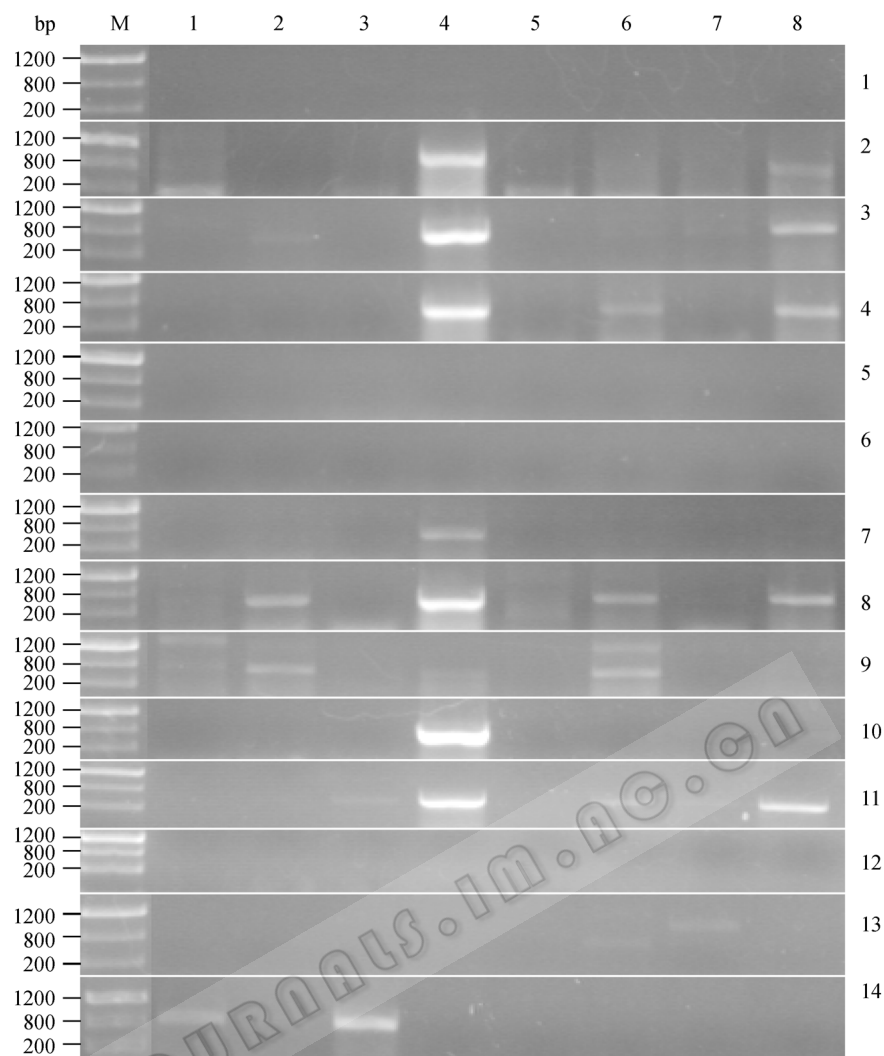


图 1 岸边土壤 PCR 扩增结果琼脂糖电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of 700 bp KS fragments amplification products from DNA of soil using different forward primer (KSF1-8) and the same reverse primer (KSR1-14)

泳道 1-8 代表使用正义引物 KSF1-KSF8 的 PCR 结果; 行 1-14 代表使用反义引物 1-14 的 PCR 结果

Lanes 1-8 represented the PCR products using primer KSF1-KSF8; Row 1-14 represented the PCR products using primer KSR1-KSR14

外, KS 序列中保守的 VDTACSSS 排布方式被 VQTACSTS 所替代, 这两个特征(图 3 中已用下划线标注)提示这 9 个 KS 序列可能来自 NRPS/PKS 杂合基因簇。剩余的 15 个 KS 序列则表现出了典型的型 PKS 中 KS 结构域的氨基酸排列方式, 即使用简单的羧酸单位作为底物。

将获得的 23 条 KS 片段的氨基酸序列提交 GenBank 进行 Blastp 比对, 结果提示这些氨基酸序列皆归属于 PKS I 基因簇酮缩合酶(KS)片段的氨基酸高度保守序列。Blast 得分大部分在 40~150 之间, 与 GenBank 中已有序列的相似度范围是 45%~85% 之间, 都属于全新的 KS 片段。相关比对结果参见表 1。

从 Blast 结果看, 大多数与 23 条 KS 序列同源性最高的基因簇都属于抗生素类药物生物合成基因簇。比如 dz-ks-811-1 序列就与 *Lyngbya majuscula* 的 JamP gene 同源性最高, 该基因属于一个长约 58 kb 的大基因簇, 为 jamaicamide A 的生物合成负责^[11]。jamaicamide A 的生物合成设计了约 30 多个独立步骤, 属于 NRPS/PKS 生物合成系统。这个结果提示克隆 dz-ks-811-1 的序列编码的 KS 结构域可能在某些新型抗生素的生物合成中扮演重要角色。类似情况也发生在克隆 dz-ks-814-2, dz-ks-811-3, 015-2 和 dz-ks-814-1 的 KS 序列上, 它们的氨基酸序列的特征提示其适合作为异源杂交探针用于后续研究中重组环境宏基因组文库中阳性克隆的筛选。

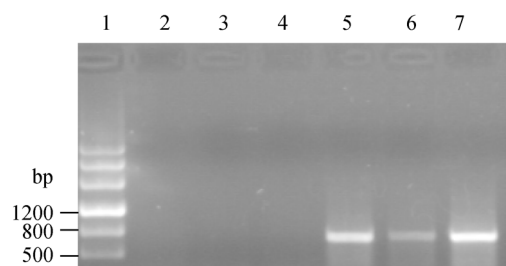


图2 海水与沉积物 DNA 样本 PCR 扩增结果琼脂糖电泳图(使用 KSF4/KSR8)

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of KS fragments amplification products from DNA of seawater and sediments using primer pair KSF4/KSR8

1: Tiangen DNA marker (0.5 μg); 2,3: 沉积物样本 PCR 扩增结果; 4,5: 海水总 DNA 样本 PCR 扩增结果(不能通过 0.8 μm 醋酸纤维素膜的); 6,7: 海水总 DNA 样本 PCR 扩增结果(能通过 0.8 μm 膜, 但不能通过 0.15 μm 膜的)

1: Tiangen DNA marker (0.5 μg); 2,3: PCR products of DNA extracted from the sediments; 4,5: PCR products of DNA extracted from seawater (contents that can not pass through 0.8 μm cellulose acetate membrane); 6,7: PCR products of DNA extracted from seawater(contents that pass through 0.8 μm membrane but can not pass through 0.15 μm membrane)

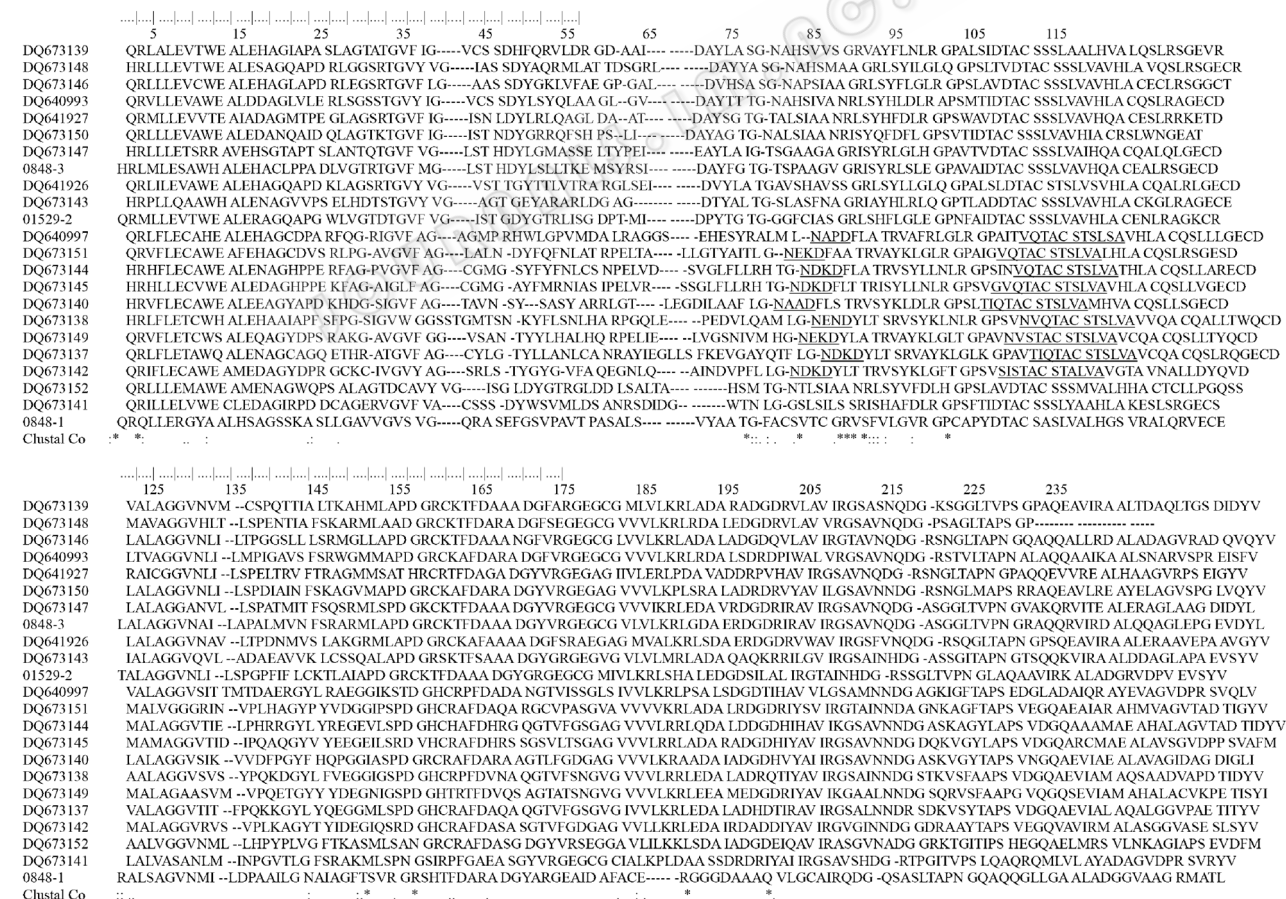


图3 预期的氨基酸序列试用 ClustalX 软件同源性分析结果

Fig. 3 ClustalX alignment of predicted amino acid sequences of soil and seawater PKS I gene fragments

注: *, 完全相同; :, 高度相似; ., 低相似度

Note: *, Identity; :, Strong similarity; ., Weak similarity

2.3 种系发生分析

Cyanobacteria, Proteobacteria 和 Actinobacteria 一直因其具有产生大量次级代谢产物(包括聚酮类化合物)的能力而闻名。曾经有大量的 PKS 基因簇从这些细菌中被鉴定和研究^[1,12]。

研究中, 共有 22 个 KS 基因片段(DQ673148 因序列较短被排除)及其在 GenBank 中同源性最高的 1~2 个序列(排除重复序列后, 共选取了 42 个)共 64 个 KS 片段被用于构建系统进化树。克隆 dz-ks-48-3 由于序列不完整而被排除。进化树及构树所用序列见图 4。

从图中可以看出: 树中 22 个新 KS 序列可能分别起源于 Cyanobacteria, Proteobacteria 和 Actinobacteria。树中序列可分为两个大群, 细菌型 PKS 群和 NRPS/PKS 杂合基因簇群。在细菌型 PKS 群中, 6 个 KS 片段(DQ640993, DQ641926, DQ641927, DQ673146, DQ673150 和 01529-2)可能起源于

表 1 所获 KS 片段与 GenBank 中氨基酸序列同源性状况
Table 1 KS fragments obtained in present study and their identities in the GenBank

原始名称 Name	GenBank 序列号 GenBank accession number	核苷酸-氨基酸序列长度 Length of the nr-aa fragments	相似度 Identifies	与实验中所获片段相似度最高的已知 KS 片段所属菌株 The known KSs genes in the GenBank showed the highest identifies to the amino acid sequences obtained in this study
dz-KS-1	DQ640993	645-215	63%	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413
GKS-2	DQ640997	669-223	53%	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120
A1	DQ641926	654-218	64%	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102
P1	DQ641927	645-215	66%	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413
810-3	DQ673137	678-226	61%	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413
881	DQ673138	672-224	85%	uncultured bacterium (Ginolhac,A.soil),
882	DQ673139	648-216	61%	<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501
811-1	DQ673140	654-218	61%	JamP (<i>Lyngbya majuscula</i>)
811-3	DQ673141	690-230	48%	NdaF (<i>Nodularia spumigena</i>)
814-1	DQ673142	657-218	51%	BarE (<i>Lyngbya majuscula</i>)
814-2	DQ673143	639-213	65%	soraphen polyketide synthase A (<i>Polyangium cellulosum</i>)
47-1#	DQ673144	663-221	76%	<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622
47-3#	DQ673145	663-221	66%	<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622
48-1#	DQ673146	648-216	63%	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413
48-2#	DQ673147	651-217	86%	<i>Mycobacterium</i> sp. JLS
48-3#	DQ673148	581-193	66%	<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501
49-3#	DQ673149	660-220	58%	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413
28-2#	DQ673150	645-215	67%	<i>Anabaena</i> sp. WH 0404
211-1	DQ673151	660-220	58%	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102
015-2	DQ673152	648-216	75%	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718
01529-2	EF554859	648-216	64%	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120
0848-1	EF554860	630-210	45%	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413
0848-3	EF554861	651-217	76%	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1

cyanobacteria KS 基因簇; 3 个 KS 片段(DQ673139, DQ673143, 0848-1)可推断其来自 Delta-proteobacteria KS 基因簇; 2 个 KS 片段 (DQ673141, DQ673152) 来自 Beta-proteobacteria KS 基因簇; 剩余 2 个 KS (DQ673141, DQ673152) 片段来自 actinobacteria 基因簇。所有来自海水的 KS 片段都属于细菌型 PKS 群。

另外 9 个 KS 基因片段与来自 NRPS/PKS 杂合基因簇的序列同属一群, 这个实验结果与前面的氨基酸序列特征分析的结果一致。

研究中没有观察到来源于土壤的 KS 片段和来源于海水的 KS 片段在系统进化方面的差异, 这可能与 KS 片段在不同种属的细菌中间频繁的水平基因转移有关。

虽然该进化树的某些分支的 bootstrap 值比较低, 但是采用 NJ 法, 最小进化法和 UPGMA 计算出的系统进化树都显示出了基本一致的结果, 这从另一方

面加强了该进化树的可信度。

3 结论

综上所述, 本研究从不同生境中获得了 23 条型 PKS 基因的 KS 序列片段, 其中土壤来源的 19 个, 海水来源的 4 个, 长度从 630 bp 到 690 bp 不等。其 GenBank 序列号为: DQ640993、DQ640997、DQ641926、DQ641927、DQ673137~DQ673152, EF554859-EF554861。将其与已知的 PKS 酮缩合酶基因片段进行 Blast 比对, 所获得的 23 条的核苷酸序列 Blast 得分大部分在 40~150 之间, 与 GenBank 中已有序列同源性很低, 提示其来源于新物种; 而所推断的氨基酸序列保守, Blast 比对直接提示其归属于 PKS 的 KS 片段, 负责聚酮类化合物生物合成过程中的酮缩合反应。用 CLUSTAL X 和 PHYLIP 软件对所获序列与 GenBank 中已知功能的 KS 片段进行分子进化分析和功能比对, 结果发现

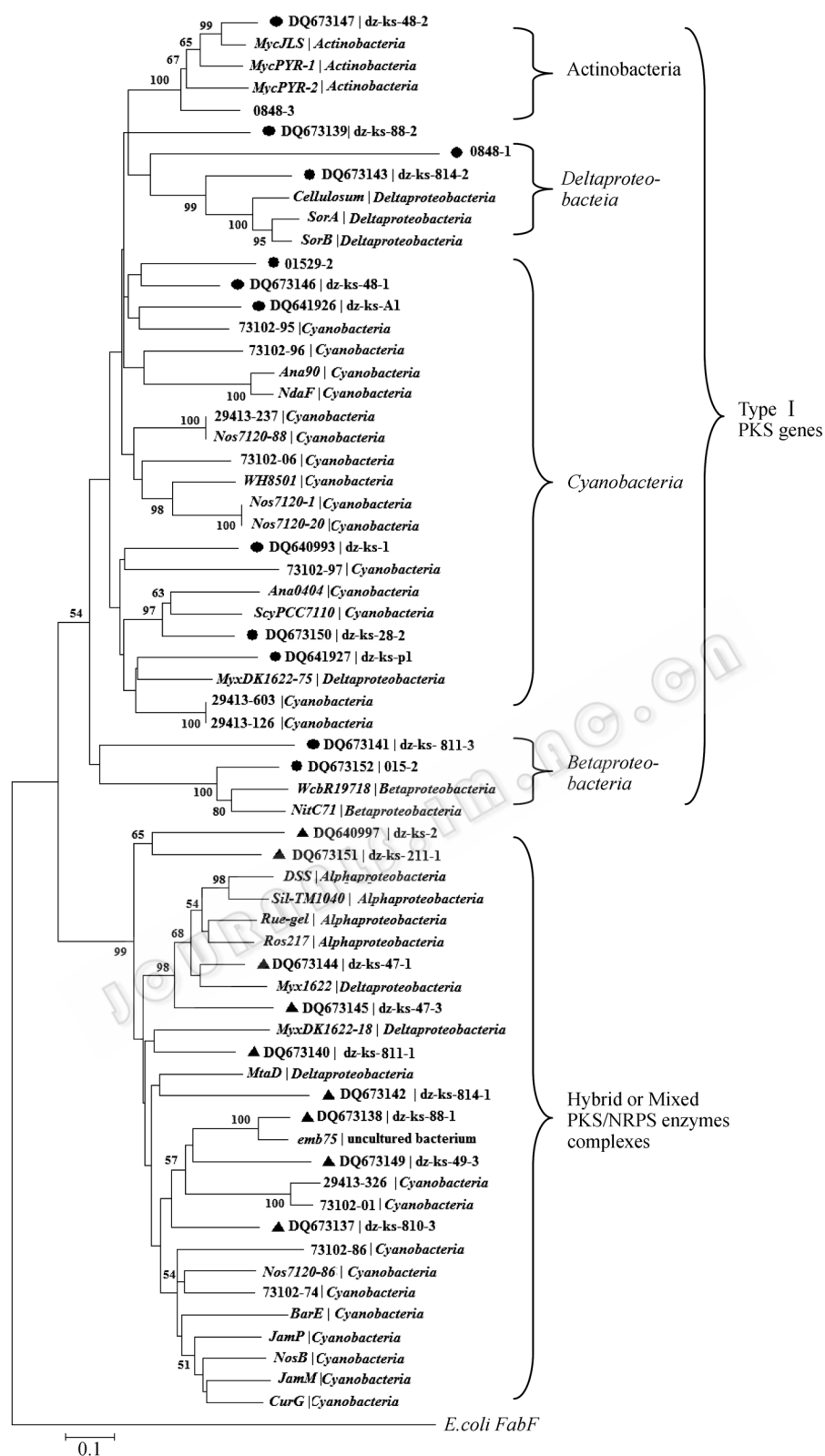


图 4 土壤与海水来源的 22 条 KS 片段及其同源相似度最高的序列构建的种系发生树
 Fig. 4 Phylogenetic analysis of the KS fragments amplified by PCR from soil and seawater DNA and the closest sequences derived from the NCBI

注: NJ 法, *E. coli FabF* 做外群, 只显示 $\geq 50\%$ 的 bootstrap 值; ▲: 来自于 PKS/NRPS 的 KS 片段; ●: 典型的 型 KS 片段
 Note: The reconstruction was computed for all 64 KSs amino acid sequences by the distance method (NJ, Posson correction distance model) with interior branch length supports 1000 replicates. *E. coli FabF* was used as outgroup. Only bootstrap value $\geq 50\%$ are shown (▲: KS fragments that belong to Hybrid or Mixed PKS/NRPS enzymes complexes; ●: KS fragments that belong to the Type ketosynthase)

DQ640997、DQ673137、DQ673138、DQ673140、DQ673142、DQ673144、DQ673145、DQ673149 和 DQ673151 核心保守序列为 VQTACSTS, 结合其上游的 N(DE)KD 序列排布方式, 提示这些 KS 片段可能来源于 PKS/NRPS 杂和基因簇, 参与杂和的聚酮/非核糖体多肽类化合物的合成。使用 Mega 软件构建的系统进化树同样支持了上述结论。

虽然随着现代生物技术的发展, 细菌培养技术将不断提高, 可培养的微生物必然会越来越多, 但可以肯定的是, 环境微生物的大多数仍将处于“未获得培养”状态。本研究发展的不依赖培养的微生物功能基因分离鉴定方法, 有助于我们加深对“未知的大多数”的了解。

参 考 文 献

- [1] Staunton J, Weissman KJ. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep*, 2001, **18**: 380–416.
- [2] Courtois S, Cappellano C, Ball M, *et al*. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for natural products drug discovery. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 49–55.
- [3] Cowan D, Meyer Q, Stafford W, *et al*. Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends Biotechnol*, 2005, **23**: 321–329.
- [4] Lim GE, Haygood MG. "Candidatus Endobugula glebosa," a specific bacterial symbiont of the marine bryozoan *Bugula simplex*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 4921–4929.
- [5] Lopanik NB, Targett NM, Lindquist N. Isolation of two polyketide synthase gene fragments from the uncultured microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**: 7941–7944.
- [6] Piel J, Hui D, Wen G, *et al*. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 16222–16227.
- [7] Schirmer A, Gadkari R, Reeves CD, *et al*. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissolute*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 4840–4849.
- [8] Timothy MR, Jorja GH, Steven H. CODEHOP: Consensus~Degenerate hybrid oligonucleotide primer, PCR primer design. *Nucl Acids Res*, 2003, **31**: 3763–3766.
- [9] Moffitt MC, Neilan BA. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *J Mol Evol*, 2003, **56**: 446–457.
- [10] Bisang C, Long PF, Cortes J, *et al*. A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature*, 1999, **401**: 502–505.
- [11] Edwards DJ, Gerwick WH. Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**: 11432–11433.
- [12] Finn RD, Jones CG. The evolution of secondary metabolism—a unifying model. *Mol Microbiol*, 2000, **37**: 989–994.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: $t(h)$ (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(和%除外), 例如: $20\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$, 不能写成 $20 \times 0.3\text{ cm}$; $3 \sim 5$ 不可写成 $3\sim 5$; $3\%\sim 6\%$ 不可写成 $3\sim 6\%$ 等。