

产 Macrolactins 的海洋细菌 X-2 中 I 型 PKS 基因簇的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: Macrolactins 是近年来从 *Actinomadura* sp. 和 *Bacillus* sp. 等海洋来源的微生物中分离的一群 24 元大环内酯类化合物, 具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤等生物学活性。本室从东海海泥中分离到一株海洋细菌 X-2, 可产生多种 Macrolactins。本研究自行设计了一套针对 I 型聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)基因中酮缩合酶(ketosynthase, KS)片段的简并引物, 使用 PCR 方法直接克隆到了 X-2 基因组中的一段长约 645 bp 的 I 型 KS 基因片段, 提交 GenBank 获登录号 EF486351, 并以之为探针筛选 X-2 的 fosmid 基因组文库, 得到了 3 个阳性克隆, 测序获得的序列经同源性分析和功能预测, 初步证实获得了该菌中负责生物合成 Macrolactin 的部分 I 型 PKS 基因簇的功能序列。

关键词: Macrolactin, 聚酮合酶, 枯草芽孢杆菌

Screening, Identifying and Function Analysis of Polyketide Synthase I Cluster from the Environmental Strain X-2 Which Produce Macrolactins

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: Macrolactins are 24-membered macrolides produced by unidentified marine bacterium, *Actinomadura* sp. and *Bacillus* sp., which exhibit both antibacterial and antitumor activities in vitro. The environmental strain X-2 which was isolated from the sediment of the East China Sea produce Macrolatin A, B and O. In this study, a set of degenerate oligonucleotide primers, designed for amplification ketosynthase(KS) domains, had been employed to identify KS gene fragments of the X-2 DNA samples. One 645 bp KS fragment(GenBank accession no. EF486351)had been cloned and used as a probe to screen the genome DNA fosmid library of X-2. Three positive clones were selected and sequenced, Homologous analysis and the function prediction of the obtained PKS gene fragments suggested that macrolactin is the Polyketide Biosynthesis Product of the gene cluster obtained in the environmental strain X-2.

Keywords: Macrolactin, Polyketide synthase, *Bacillus* sp.

利用组合生物学手段对不同来源的次级代谢产物的生物合成基因进行重新设计和组合,产生大量具有新的药效的“非天然”药物是新药开发的新方向。但这些工作的前提条件是次级代谢产物生物合成基因(簇)的克隆与功能分析^[1]。

Macrolactins 是一类 24 员大环内酯类化合物,具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤等多种生物学活性,近年来又发现其可有效抑制鲨烯合酶的活性,提示其可作为胆固醇合成的抑制剂^[2]。目前 Macrolactins 已经有 18 个家族成员(Macrolactin A - R)^[3,4,6-8],主要来自海洋来源的 *Actinomadura* sp.和 *Bacillus* sp.,在陆地土壤中的 *Streptomyces* sp.中也有发现^[2]。

海洋细菌 X-2 是本实验室从我国东海海底沉积物中分离出的一株革兰氏阳性芽孢杆菌类菌株,该菌产生 3 种大环内酯类化合物,Macrolactin A、Macrolactin B 和 Macrolactin O,其中 Macrolactin O 为本实验室首先发现,A 和 O 的结构式如图 1 所示。

本研究以可产生 Macrolactins 的海洋细菌 X-2 为研究对象,通过简并引物 PCR 扩增方法,获得一段 KS 结构域的 DNA 片段做探针筛选文库,克隆并初步鉴定该细菌中为 Macrolactins 生物合成负责的型 PKS 基因簇。为进一步考察其生物合成基因功能,最终阐明 Macrolactins 的生物合成和调控机理打下基础。

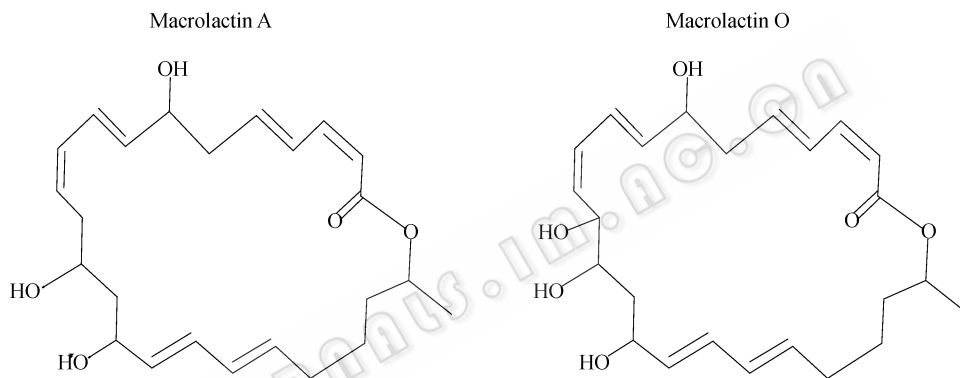


图 1 Macrolactin A 和 Macrolactin O 结构示意图
Fig. 1 The structure of Macrolactin A and Macrolactin O

1 材料与方法

1.1 质粒及菌种

海洋芽孢杆菌 X-2、*E. coli* BL21 为本室保存;克隆测序载体 pMD18-T、工具酶等购自 TaKaRa 公司。

1.2 分子生物学相关试剂

宏基因组文库构建试剂盒 CopyControl™ Fosmid Library Production Kit(CCFOS110, EPICENTRE Technologies), 正电荷尼龙膜 Magnaprobe Nylon Membranes(HP0HY00010, OSMONICS Inc.), 地高辛杂交检测试剂盒 I(DIGD-110, Innogen), 其它试剂配制和常用试剂均购自上海生工, 分子生物学操作方法参考分子克隆第三版。

1.3 仪器设备

脉冲场电泳仪(Pharmacia Biotech), PCR 仪

(Perkin Elmer 2400), Shake 'n' Stack 杂交炉(Hybrid), LG-5 真空冷冻干燥机(上海市离心机械研究所), XW-80A 漩涡混合器(江苏海门麒麟医用仪器厂)。

1.4 海洋细菌 X-2 中 I 型 PKS 相关基因(簇)的克隆

1.4.1 基因组 DNA 抽提: 考虑到芽胞的存在, 细菌的裂解方法必须包括溶菌酶, 故使用基于酶法的华舜基因组 DNA 小量提取试剂盒提取海洋细菌 X-2 的基因组 DNA, 操作中保持动作轻柔以维持基因组 DNA 的完整性。

1.4.2 简并引物扩增 KS 片段: 使用简并引物扩增 X-2 的基因组中可能的型 PKS 的 KS 结构域的保守区域:

正义引物针对 PQQR 模序, 序列为: 5'-CGCTCCATGGAYCCSCARCA-3'; 反义引物则针对 HGTGT 模序, 序列为: 5'-GTSCCSGTSSCRT

GSSHYTCSA-3' (注 :S: A, G; Y: C, T; R: A, G, C, T)。获得的阳性条带经回收后将其连接到 PMD-18 T 载体上, 送样到上海英骏生物技术有限公司用 3730 测序仪进行序列测定。序列提交 GenBank。

1.4.3 基因组文库构建与转膜: 宏基因组 DNA 经过 20 cm 琼脂糖凝胶电泳过夜, 切取一侧胶条 EB 染色后紫外光下观察并标记; 切取 25 kb~50 kb 部分用 GELase enzyme 消化回收; 然后用 End-Repair Enzyme 将回收片段末端补平; 通过 Fast-Link DNA Ligation 反应将补平的片段连接于 Fosmid 载体上; 30 条件下将连接产物用 λ 噬菌体颗粒包裹; 包裹产物梯度稀释后侵染 EPI300-T1R Plating Strain (*E. coli*), 涂板培养、计克隆数, 计算出文库噬菌体的滴度。所用试剂及具体操作见 Fosmid 文库构建试剂盒说明书。

根据文库噬菌体滴度在直径 15 mm 的 LB 氯霉素平板上涂布约 100 个克隆, 37 培养 12 h, 4 放置 30 min; 取 13 mm 直径标记有方向的灭菌尼龙膜在空 LB 平板上预湿后小心覆盖于文库克隆平板上(避免气泡和拉动); 放置约 2 min, 在板上标记方向; 用镊子揭起膜, 菌落面朝上放置于变性液浸湿的 2 层滤纸之上放置 15 min, 取下置于滤纸上空气中干燥, 母板于 4 保存; 转移膜到中和液浸湿的 2 层滤纸之上放置 15 min, 取下置于滤纸上空气中干燥; 转移膜到 2×SSC 浸湿的滤纸上放置 10 min; 转移膜到 80 真空干燥箱中保温 2 h, 固定质粒 DNA; 用 0.01%蛋白酶 K 溶液浸润尼龙膜, 37 保温 1 h; 将膜的菌落面朝下覆盖于无菌水湿润的滤纸上, 用力按压后, 轻轻揭起以除去蛋白碎片, 如果仍有蛋白碎片, 重复该步骤。

1.4.4 地高辛标记探针: 参见地高辛杂交检测试剂盒 I(DIGD-110, Innogent)说明书。PCR 标记体系 (25 μ L) : Dig-dUTP 标记混合物 2 μ L, GC Buffer I 12.5 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 模板 0.5 μ L, H₂O 9.5 μ L。PCR 标记反应条件: 94 3 min; 94 30 s, 65 45 s, 72 45 s, 35 个循环; 72 7 min。PCR 产物于 100 变性 5 min, 迅速放入冰浴冷却 5 min。

1.4.5 Southern blot: 制备好的膜放入杂交管, 加入 65 预热的 Hyb 高效杂交液 10 mL, 65 杂交炉中预杂交 1 h, 15 r/min; 倒掉预杂交液, 再加入 10 mL 杂交液和 5 μ L 变性探针, 65 杂交过夜,

15 r/min; 洗涤液进行严谨洗涤, 在洗涤缓冲液中浸润 1 min~5 min; 在 30 mL 阻断液中孵育 30 min; 在 10 mL 抗体液中孵育 30 min; 用 30 mL 洗涤液洗涤 2 次; 在 15 mL 检测缓冲液中平衡 2 min~5 min; 在避光条件下, 于 10 mL 新鲜制备的显色底物液中反应显色。具体操作见地高辛杂交检测试剂盒 I(Innogent)操作说明书。

1.4.6 阳性克隆测序: 阳性克隆中 Fosmid 质粒诱导为高拷贝后用质粒大抽试剂盒抽提质粒, 送 Invitrogen 公司用 3730 测序仪测序, 引物为 Fosmid 质粒的测序引物 pCC2FSP 和 pCC2RSP。

1.4.7 GenBank 序列号: EF486351。

2 结果与讨论

2.1 基因组 DNA 抽提结果

基因组长度在 25 kb 左右, 见图 2。

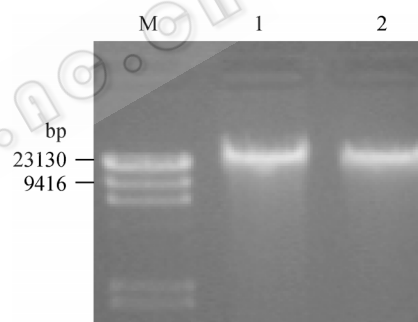


图 2 海洋细菌 X-2 基因组 DNA 电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of DNA extraction of marine bacteria X-2

M: Marker λ DNA/Hind III; 1, 2: 海洋细菌 X-2 基因组 DNA

M: Marker λ DNA/Hind III; 1, 2: DNA extraction of marine bacteria X-2

2.2 简并引物扩增 KS 片段

使用前面设计的简并引物扩增海洋细菌 X-2 DNA 样本。

结果见图 3。在超级引物对 KSF4/KSR8 的泳道中可以看到一条比较淡的条带, 胶回收后克隆到 PMD18-T 载体上测序。测序结果发现, 目的片段长度为 645 bp, 编码 215 个氨基酸, GenBank 序列号为 EF486351。

2.3 基因组文库构建与地高辛标记的阳性克隆筛选

按试剂盒说明构建海洋细菌 X-2 的 fosmid 基因组文库, 得到大约 100 个克隆。转膜后, 使用地高辛

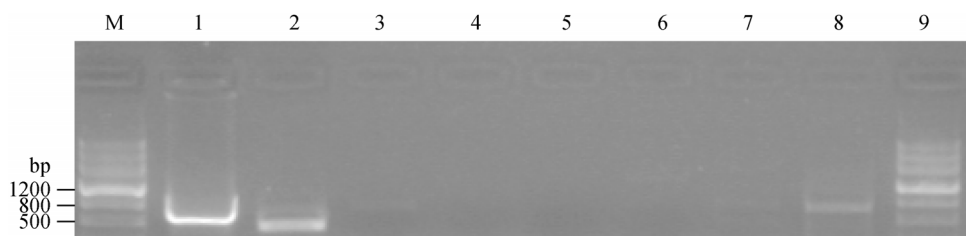


图 3 使用简并引物对扩增海洋细菌 X-2 DNA 样本

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of 700 bp KS fragments amplification products from X-2 genome DNA using different forward primer (KSF4, 8) and the same reverse primer (KSR8, 14)

M: Tiangen DNA marker (0.5 μ g); 1: 阳性对照; 2: KSF8/ KSR8; 3-4: KSF8/ KSR14; 5-6: KSF4/ KSR14; 6-8: KSF4/ KSR8; 9: Tiangen DNA marker (0.5 μ g)
M: Tiangen DNA marker (0.5 μ g); 1: Positive control; 2: KSF8/ KSR8; 3-4: KSF8/ KSR14; 5-6: KSF4/ KSR14; 7-8: KSF4/ KSR8; 9:Tiangen DNA marker (0.5 μ g)

标记的 KS 片段作为探针筛选阳性克隆, 得到 3 个阳性克隆 *pks-m1*、*pks-m2* 和 *pks-m3*。阳性克隆中 Fosmid 质粒诱导为高拷贝后用质粒大抽试剂盒抽提质粒, 送 Invitrogen 公司测序。

2.4 序列测定与功能分析

2.4.1 序列比对与种系发生分析: 从 *pks-m2* 获得了两段连续的基因簇片段, 长度分别为 876 bp(AT 段) 和 1692 bp(ACP-ACP-KS 段), 使用 NCBI 提供的 Blastn 服务与 GenBank 进行比对, 发现其分别与与 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 的 *pks2A* 和 *pks2B* 两个基因簇的相似度最高^[3], 可达 98%和 97%。推断该序列与 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 的 *pks2* 基因簇高度同源。这两段序列在 *pks2* 基因簇中的位置如图 4 所示。

在同源性分析中, PubMed 提供了由该序列推

导出的氨基酸序列的种系发生树(Fast Minimum Evolution 方法), 见图 5。从发生树中可以看出, 克隆到的 AT 片段属于 Trans-AT 类, 与合成 Bryostatin 和 pedrin 等具抗肿瘤活性的化合物的生物合成基因簇中的 AT 结构域相似度最高^[9,10]。

2.4.2 所获序列功能分析与 Macrolatins 生物合成机制预测: 由于所获阳性克隆的序列与 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 的 *pks2* 基因簇高度同源。我们据此推断本研究中克隆自 macrolactin 产生菌 X-2 中的 *pks* 基因簇与 FZB42 的 *pks2* 的基因簇组成也高度类似。

在 *pks2* 的基因簇与 macrolactin 的关系未获证实以前, 我们根据已掌握的资料对 Macrolactins 的生物合成基因簇的构成作出预测^[11], Macrolactins 合成基因簇应由 11 个模块构成的大型基因簇, 而 *pks2*

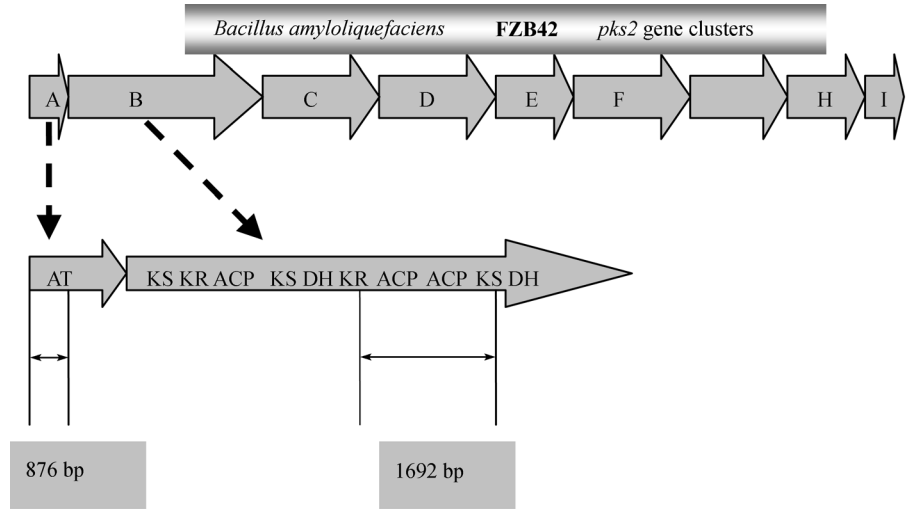


图 4 所获序列在 *pks2* 基因簇上的对应位置

Fig. 4 The location of the DNA fragments isolated from the marine bacteria X-2 compared with the *pks2* gene cluster

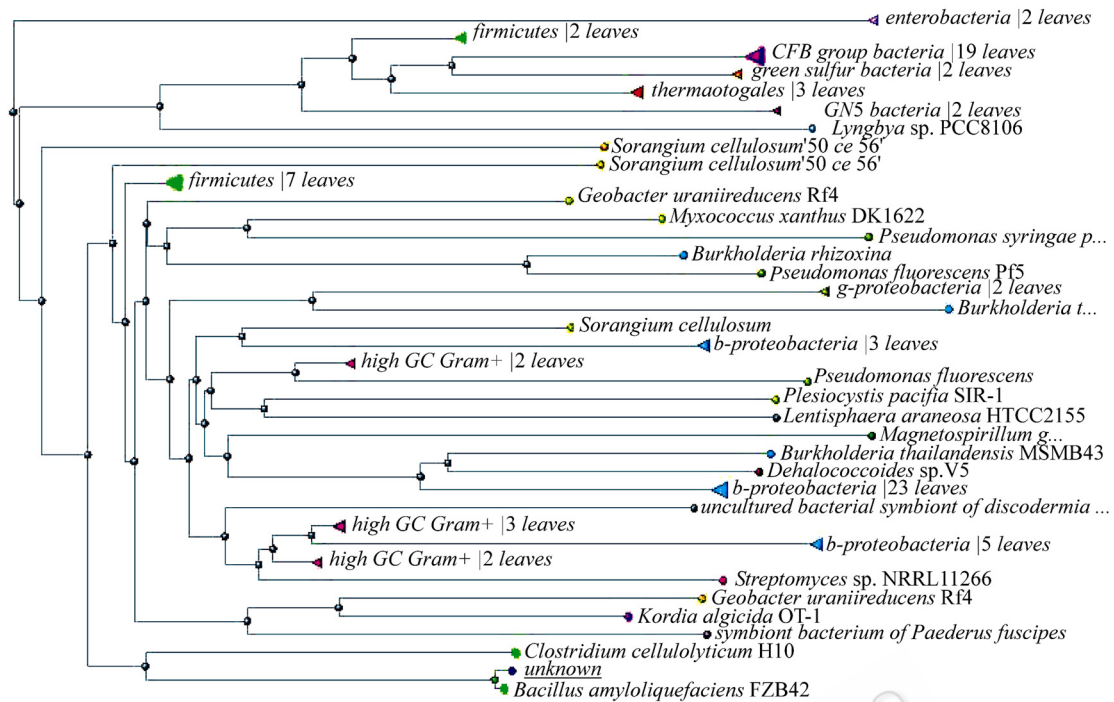


图 5 NCBI 提供的种系发生树(Fast Minimum Evolution 方法)

Fig. 5 Phylogenetic tree of the AT fragment isolated from the marine bacteria X-2 using the BLAST pairwise alignments programs of NCBI (Fast Minimum Evolution method)

的基因簇也可分成 11 个功能模块。二者的主要区别在于 *pks2* 基因簇属于 Trans-AT 型的 型 PKS 基因簇, 其各功能模块中均不含有 AT 结构域, 而是在基因簇上游拥有一个公用的 AT 结构域(Malonyl-CoA-ACP transacylase/FMN-dependent oxidoreductase)。即与合成 Bryostatin 和 pedrin 等具抗肿瘤活性的化合物的生物合成基因簇中的 trans—

AT 型结构域类似。这与我们实验结果相一致。结果见表 1, 可以看出, 二者功能模块的数目和组成非常相似。只有几个结构域的区别(用灰色背景字体显示)。

2007 年 9 月, Kathrin Schneider 等证实 macrolactin 确实是 *pks2* 基因簇的生物合成产物^[5], 与本研究结论一致。

表 1 推断的 Macrolactins 生物合成基因簇与 *pks2* 基因簇组成比较

Table 1 Comparison of predicted Macrolactins PKS gene cluster and the *pks2* gene cluster

推断的 Macrolactin 生物合成基因簇模块组成 Construction of the predicted Macrolactins PKS gene cluster	<i>pks2</i> 基因簇模块 Construction of the <i>pks2</i> cluster	<i>pks2</i> 基因簇 ORF 组成 ORF of the <i>pks2</i> cluster
M1 : KS-ATmal-KR-ACP	1 KS KR ACP	pks2A : ATMal/FMNdependent oxidoreductase
M2 : KS-ATmal-DH-ER-KR-ACP	2 KS DH KR ACP ACP	pks2B : KS, KR, ACP,KS, DH,KR, ACP, ACP, KS, DH
M3 : KS-ATmal-DH-KR-ACP	3 KS DH KR ACP	pks2C: KR, ACP, KS, DH
M4 : KS-ATmal-DH-KR-ACP	4 KS DH KR ACP	pks2D: KR, ACP, KS, KR,ACP, KS
M5 : KS-ATmal-KR-ACP	5 KS KR ACP	pks2E: <u>DH</u> , KR, ACP, KS, KR,ACP, KS
M6 : KS-ATmet-KR-ACP	6 KS <u>DH</u> KR ACP	pks2F: DH, ACP, ACP, KR, KS
M7 : KS-ATmet-DH-KR-ACP	7 KS KR ACP	pks2G: KR, ACP, KS, KR,ACP, KS
M8 : KS-ATmet-DH-KR-ACP	8 KS DH ACP ACP KR	pks2H: DH, ACP, ACP, KR, TE
M9 : KS-ATmet-KR-ACP	9 KS KR ACP	pks2I : PBP-related-lactamase
M10 : KS-ATmet-DH-KR-ACP	10 KS KR ACP	
M11 : KS-ATmet-DH-KR-ACP	11 KS DH ACP ACP KR TE	

Note : KS: Ketosynthase domain; AT: Acyltransferase domain; ACP: Acyl carrier protein domain; KR: Ketoacyl reductase domain; DH: Hydroxyacyl dehydratase domain; ER: Enoyl reductase domain; Atmal: Malonyl-specific acyltransferase domain; Atmet: Methylmalonyl-specific acyltransferase domain

可以初步断定, 本研究中获得与 *pk2* 基本相同的基因簇正是我们寻找的与 Macrolactins 生物合成相关的型 PKS 基因簇。

由于本研究所获得的 trans-AT 序列的特殊性, 下一步实验将集中考察 trans-AT 的功能, 但经典的方法是通过 AT 结构域的互换(Domain Swapping)后观察杂合 I 型 PKS(Hybrid type I polyketide synthases)催化产物的变化来研究某个 AT 的底物特异性, 或者通过构建复杂的杂合 PKS 文库来研究 AT 结构域的功能。但是这些方法显然十分复杂^[5]。

目前本实验室正通过对该 AT 结构域克隆和异源表达, 获得有功能的单体结构域, 体外研究其对底物结合特异性, 以期从体外实验的角度分析该结构域的功能。

对 Macrolactins 生物合成基因簇的研究目前才刚刚开始, 本研究取得的一些结果都属于初步结果, 但其意义却十分重大, 我们的工作为最终阐明 macrolactin 的生物合成机制和调节机理打下了一定的实验基础。

参 考 文 献

- [1] Menzella HG, Reid R, Carney JR. *et al.* Combinatorial polyketide biosynthesis by *de novo* design and rearrangement of modular polyketide synthase genes. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(9): 1171–1176.
- [2] Choi SW, Bai DH, Yu JH. Characteristics of the squalene synthase inhibitors produced by a *Streptomyces* species isolated from soils. *Can J Microbiol*, 2003, **49**(11): 663–668.
- [3] Chen, XH, Vater J, Piel J, *et al.* Structural and functional characterization of the three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J Bacteriol*, 2006, **188**(11): 4024–4036.
- [4] Gustafson K, Roman M, Fenical W. The macrolactins, a novel class of antiviral and cyto-toxic macrolides from a deep sea marine bacterium. *J Am Chem Soc*, 1989, **111**(19): 7519–7524.
- [5] Schneider K, Chen XH, Vater J, *et al.* Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the *pk2* cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Nat Prod*, 2007, **70**(9): 1417–1423.
- [6] Zheng CJ, Lee S, Lee CH, *et al.* Macrolactins O~R, glycosylated 24-membered lactones from *Bacillus* sp. AH159~1. *J Nat Prod*, 2007, **70**(10): 1632–1635.
- [7] Nagao T, Adachi K, Sakai M. Novel macrolactins as antibiotic lactones from a marine bacterium. *J Antibiot Tokyo*, 2001, **54**(4): 333–339.
- [8] Yoo JS, Zheng CJ, Lee S. Macrolactin N, a new peptide deformylase inhibitor produced by *Bacillus subtilis*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **16**(18): 4889–4892.
- [9] Piel J. A polyketide synthase~peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(22): 14002–14007.
- [10] 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**(8): 4840–4849.
- [11] Zotchev SB, Stepanchikova AV, Sergeyko AP. Rational design of macrolides by virtual screening of combinatorial libraries generated through in silico manipulation of polyketide synthases. *J Med Chem*, 2006, **49**(9): 2077–2087.