

一株具有广谱抗菌活性炭样小单孢菌的全基因组序列测定

江云 黄运红 李非 龙中儿*

(江西师范大学 生命科学学院 江西 南昌 330022)

摘要:【目的】炭样小单孢菌 JXNU-1 是一株具有广谱抗菌活性的放线菌, 研究揭示该菌的基因组序列信息。【方法】采用高通量测序技术对炭样小单孢菌 JXNU-1 的基因组 DNA 测序, 利用 SOAPdenovo 软件组装, 人工 PCR 修补基因组部分缺口, 然后进行生物信息学分析。【结果】对炭样小单孢菌 JXNU-1 的全基因组序列进行了测定和注释, 得到基因组精细图, 相关序列已提交 GenBank, 获得登录号为 JXSN00000000。【结论】研究为揭示炭样小单孢菌 JXNU-1 抗生素产生机制及其抗菌机理提供了基础数据, 对进一步研发其抗生素具有重要的理论意义和巨大的应用价值。

关键词: 炭样小单孢菌, 全基因组测序, 生物合成基因簇, 抗菌活性

Whole genome sequencing of a *Micromonospora carbonacea* strain with broad-spectrum antimicrobial activity

JIANG Yun HUANG Yun-Hong LI Fei LONG Zhong-Er*

(College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China)

Abstract: [Objective] *Micromonospora carbonacea* JXNU-1 is an actinomycete with broad-spectrum antimicrobial activity. This study aims to reveal its genomic sequence information. [Methods] The genomic DNA from *M. carbonacea* JXNU-1 was sequenced by Sanger technology using Illumina MiSeq and Illumina HiSeq 2500 sequencers. The genome was assembled by using SOAPdenovo software; multiplex PCR was used to close the gaps, and the genome sequence information was analyzed by bioinformatics methods. [Results] The whole-genomic DNA of *M. carbonacea* JXNU-1 was sequenced and annotated, and a fine genome map of *M. carbonacea* JXNU-1 was completed. This Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession JXSN00000000. [Conclusion] This study provides the basis to explore biosynthesis of antimicrobials from *M. carbonacea* JXNU-1.

Keywords: *Micromonospora carbonacea*, Whole-genome sequencing, Biosynthetic gene cluster, Antimicrobial activity

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31160029, 31360018); 江西省自然科学基金项目(No. 20132BAB204007)

*通讯作者: Tel: 86-791-88120399; 信箱: longzhonger@163.com

收稿日期: 2015-02-03; 接受日期: 2015-04-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-04

炭样小单孢菌, 在分类学上属于放线杆菌纲, 放线菌目, 小单孢菌科, 小单孢菌属。根据《伯杰细菌鉴定手册》第 8 版^[1]记载, 炭样小单孢菌最初于 1964 年由 Luedemann 和 Brodsky 分离^[2]。研究发现, 炭样小单孢菌是抗生素等许多重要活性化合物的来源^[3-7], 因而受到学术界的广泛关注。

本实验室在前期研究中获得一株具有广谱抗菌活性的炭样小单孢菌 JXNU-1 (*Micromonospora carbonacea* JXNU-1)^[8], 其发酵产物对金黄色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、苏云金芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性细菌, 以及伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、铜绿假单孢菌等革兰氏阴性细菌都有很强的抗菌活性^[8-10]; 同时, 系统研究了该菌发酵产抗生素的工艺过程, 确定了该菌发酵产抗生素的影响因素及其作用规律, 建立了从该菌发酵液中分离纯化抗生素的方法^[11], 并从中获得了层析纯的单组分、粉末状抗生素产品。该抗生素经初步分析确定为一核苷类抗生素^[11-12], 与文献报道的炭样小单孢菌活性产物明显不同, 但其具体结构、产生机制和抗菌机理仍不清楚。为了深入探讨该菌产抗生素的机制及其抗菌机理, 本研究采用高通量测序技术对炭样小单孢菌 JXNU-1 进行全基因组测序, 并通过基因组分析, 为揭示其抗生素产生机制及其抗菌机理提供基础数据和理论依据, 对炭样小单孢菌抗生素的研发具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 炭样小单孢菌 JXNU-1 (*Micromonospora carbonacea* JXNU-1), 本实验室从土壤中分离得到^[8]。

1.1.2 培养基: 斜面菌种保藏培养基: 高氏 1 号培养基^[8](实验过程中所用试剂均为生化试剂或分析纯化学试剂, 下同); 培养提取 DNA 的菌丝培养基: ISP₂ 培养基^[13]。

1.2 炭样小单孢菌的培养与基因组 DNA 的提取
炭样小单孢菌 JXNU-1 经斜面培养基 28 °C 活

化培养 7 d 后, 以接种环取一环孢子接种于装有 50 mL ISP₂ 培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、200 r/min 培养 3-5 d, 无菌操作抽滤后获得干燥的菌体, 置于研钵中, 用液氮研磨裂解细胞壁, 采用优化 SDS 法^[14]提取基因组 DNA。

1.3 基因组测序、组装

基因组 DNA 提取后进行质量鉴定, 在浓度和纯度达到测序要求后进行全基因组测序。分别构建大小片段两个文库, 其中小片段约 500 bp 的 PCR-free 文库利用 Miseq 测序平台进行双末端测序, 测序策略 PE300, 测序深度>100×; 大片段约 5 000 bp 的文库, 利用 Hiseq 2500 测序平台进行双末端测序, 测序策略 PE125, 测序深度>100×。获得的原始测序数据经过预处理去除接头、引物及低质量数据后, 采用 SOAPdenovo 组装软件进行序列组装, 对不同参数下产生的基因组大片段序列进行 N50 及 N90 计算, 选择最大的 N50 及 N90 拼接结果作为测序数据的最终拼接结果。炭样小单孢菌全基因组测序工作由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

1.4 基因组组分析

获得全基因组数据之后, 应用相关软件对基因组进行结构分析, 包括编码基因预测, 重复序列预测, 非编码 RNA 的预测及基因岛预测等。研究采用 GeneMarkS 软件进行编码基因预测; 通过 RepeatMasker^[15]软件进行散在重复序列预测, TRF 搜寻串联重复序列; 通过与 rRNA 库比对找到 rRNA, 或采用在线预测工具 rRNAmmer1.2^[16]预测 rRNA, 通过 tRNAscan^[17]软件预测 tRNA 区域和二级结构, 通过 Rfam^[18]软件预测 sRNA; 使用 IslandPath-DIOMB 预测基因岛; 通过软件 PHAST 预测前噬菌体; 使用 CRISPRFinder 在线工具进行 CRISP 预测。

1.5 基因组功能分析

对从基因组序列中预测出的基因进行功能注释, 即将基因的序列分别与 GO^[19](基因本体论)、

KEGG^[20](京都基因与基因组百科全书)、NR (非冗余蛋白数据库)、Swiss-Prot^[21]数据库和 COG^[22](直系同源簇)库进行 BLASTp 比对, 得到对应的功能注释信息。

1.6 基因组共线性分析

采用 ACT 软件^[23]进行 2 个完整基因组序列两两比对, 寻找差异区域并进一步分析以获得基因组之间的共线性关系。同时, 用 MUMmer 软件^[24]比较分析炭样小单孢菌 JXNU-1 和 *M. aurantiaca* ACC27029 之间的共线性关系, 并采用 Mummerplot 将结果可视化。

1.7 次级代谢产物合成基因簇分析

在 antiSMASH^[25-27]: antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell 中, 将次级代谢基因簇分为 24 类。最常见的次级代谢基因簇是 Non-ribosomal peptides synthase (NRPS) 及 Type I, II 和 III polyketides synthase (PKS)。利用 antiSMASH: 基因组信息发掘网站(<http://url.cn/IQXZe0>)对炭样小单孢菌 JXNU-1 全基因组数据进行次级代谢的产物合成基因簇分析。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

高质量的 DNA 样品是获得高质量测序结果的基础和前提。炭样小单孢菌 JXNU-1 基因组的提取结果如图 1 所示, 理化检测分析的结果见表 1。由此可见, 实验所提取的两份炭样小单孢菌基因组样品均符合基因组测序对样品浓度和质量的要求(浓度 > 30 μg/L), 实验选用样品 1 进行高通量测序。

2.2 基因组概况

通过构建插入片段大小不同的两个文库进行炭样小单孢菌 JXNU-1 基因组的测序, 最终测序产

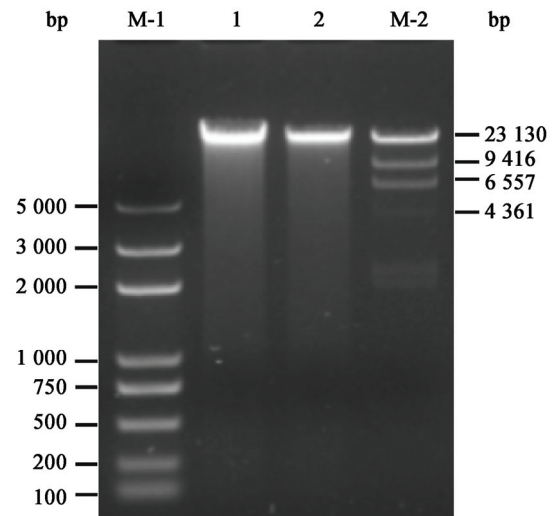


图 1 炭样小单孢菌 JXNU-1 的基因组 DNA 电泳图

Figure 1 Electrophoretogram of the genomic DNA from *M. carbonacea* JXNU-1

注: M-1: Tanks 2K plus; M-2: λDNA; 1 和 2: 样品。

Note: M-1: Tanks 2K plus; M-2: λDNA; 1 and 2: The genomic DNA samples.

出的总数据量为 3 487 Mb。对测序得到的原始数据进行过滤及统计, 初步处理得到 Clean data 为 2 393 Mb, 用基于 K-mer 统计的分析方法估算得到样品的基因组大小 7.39 Mb。使用 SOAPdenovo 软件对 Reads 进行组装, 组装结果及统计信息见表 2, 数据显示细菌基因组组装较好, 已经达到精细图标准。

使用 SOAPdenovo 软件对基因组测序产生的 Reads 序列进行拼接和组装获得 8 个 Scaffolds, 将 Scaffolds 内部的缺口区 N 序列断开, 即得到 14 个 Contig。断开的地方是因为重复序列或特殊结构域的存在造成的, 需要人工 PCR 进行修补。本文通过设计引物、PCR 扩增内洞和外洞并进行序列鉴定, 成功修补基因组内部缺口 5 个, 将 Contig 由 14 个

表 1 炭样小单孢菌 JXNU-1 基因组 DNA 样品质量分析
Table 1 The quality analysis of the genomic DNA samples from *M. carbonacea* JXNU-1

Number	Volume (μL)	Characteristics of morphology	Concentration (mg/L)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀
1	700	floc	134.0	1.650	-0.317
2	350	floc	114.4	1.471	-0.229

表 2 炭样小单孢菌 JXNU-1 基因组组装结果统计
Table 2 Statistics of assembly results in *M. carbonacea* JXNU-1 genome

MC.JXNU-1	Scaffold	Contig
Total number (>500 bp)	8	14
Total length (bp)	7 635 725	7 632 135
N50 length (bp)	4 044 255	1 112 663
N90 length (bp)	3 586 879	862 368
Max length (bp)	4 044 255	2 312 954
Min length (bp)	539	539
Sequence G+C%	73.85	73.85

注: 第二列统计的是长度大于 500 个碱基的 Scaffold 的信息, 第三列统计的是第二列对应的大于 500 个碱基的 Scaffold 在 N 处打断之后的 Contig。

Note: The second column indicates the information of scaffold with more than 500 bases. The third column indicates the information of contig obtained from Scaffold with more than 500 bases broken in the N place.

降到 9 个。将组装后的炭样小单孢菌 JXNU-1 基因组序列用 Sequin 软件生成 NCBI.sqn 格式文件, 提交到 NCBI 的 GenBank, 得到登录号 JXSN00000000。

炭样小单孢菌 JXNU-1 基因组圈图如图 2 所示。目前, 公布的完成全基因组测序的小单胞菌有 6 株, 本文选择了其中的 4 株, 即海洋小单胞菌(*M. sp.* ATCC39149)、桔橙小单孢菌(*M. aurantiaca* ATCC27029)、球状小单孢菌(*M. globosa* ASM71758v1)和乔科里亚小单孢菌(*M. chokoriensis* ASM71855v1)的全基因组(相关数据从 NCBI 获得), 并将其与炭样小单孢菌 JXNU-1 基因组的基本特性进行比较, 结果如表 3 所示, 它们均符合小单胞菌基因组的基本特征。

2.3 基因组组分

炭样小单孢菌 JXNU-1 基因组测序、组装后, 用相关软件对基因组结构进行了分析, 结果如下:

(1) 采用 GeneMarkS 软件进行编码基因预测, 结果共预测得到 6 444 个基因, 所有基因的总长度为 6.76 Mb, 平均长度为 1 048 bp, 这些基因的 G+C 含量平均为 74.2%, 基因的碱基长度占基因组含量

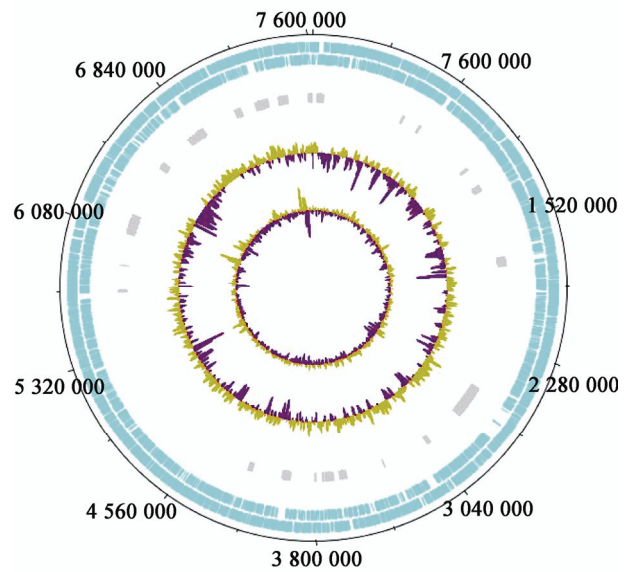


图 2 炭样小单孢菌 JXNU-1 基因组圈图

Figure 2 Circular graph of *M. carbonacea* JXNU-1 genome

注: 基因组圈图采用 DNAPlotter 软件制作。从外向里的 6 圈依次为: 最外圈为基因组的刻度, 大小为 bp; 第 2 圈为正链上预测的 ORF; 第 3 圈为负链上预测的 ORF; 第 4 圈为正负链上所有 Cluster 的集合; 第 5 圈为 G+C 百分含量, 绿色代表大于平均值, 红色代表小于平均值; 第 6 圈为 GC 偏好(GC skew)。

Note: The circular graph was drawn on line by DNAPlotter software. 6 circles from outside to inside: 1st circle, scale (bp); 2nd circle, predicted ORFs from the sense DNA strand; 3rd circle, predicted ORFs from the antisense DNA strand; 4th circle, predicted ORFs from the sense and antisense DNA strands; 5th circle, GC content profile, green color was above average, red color was below average; 6th circle, GC skew.

的百分比为 88.47%; (2) 通过 RepeatMasker 软件进行散在重复序列预测, 预测到 27 个散在重复序列区域, 总长度为 2 731 bp, 平均长度为 104 bp, 占基因组的 0.035 8%; 通过 TRF (Tandem repeat finder) 软件预测出组装结果中存在的串联重复序列 4 100 个, 总长度为 196 933 bp, 占基因组 2.579 1%; (3) 通过与 rRNA 库进行 BLAST 比对, 找到 6 套 rRNA; 通过 tRNAscan 软件在基因组序列的组装结果中预测出 tRNA 区域和 tRNA 的二级结构, 共获得 51 个 tRNA; 通过 Rfam 软件在基因组序列的组装结果中预测得到 23 个 sRNA; (4) 使用软件 IslandPath-DIOMB 共预测基因岛 16 个, 总长为 206 068 bp; (5) 通过软件 PHAST 预测前噬菌体 prophage, 未预

表3 小单胞菌基因组基本特征比较分析
Table 3 General features of several sequenced *Micromonosporas* chromosomes

Features	<i>Micromonospora carbonacea</i> JXNU-1	<i>M. sp.</i> ATCC39149	<i>M. aurantiaca</i> ATCC27029	<i>M. globosa</i> ASM71758v1	<i>M. chokoriensis</i> ASM71855v1
Length (bp)	7 635 725	6 503 026	7 025 559	7 127 351	6 965 445
Contig (number)	9	339	1	88	62
G+C Content (%)	73.9	72.3	72.8	71.3	70.7
CDS (No.)	6 444	5 461	6 222	6 101	6 145
Average CDS size (bp)	1 048	932.28	1 013	986.8	978.9
Coding (%)	88.5	78.3	89.7	84.5	86.4
tRNA (number)	51	51	52	50	50
GenBank No.	JXSX00000000	ACES00000000.1	NC_014391	JNZR00000000.1	JOAN00000000.1

测到前噬菌体序列; (6) 使用 CRISPRFinder 在线工具(<http://crispr.u-psud.fr/>)预测基因组中 CRISPR 序列为 22 个, 其中可信 CRISPR 为 13 个。

2.4 基因组功能注释

2.4.1 GO 数据库注释: GO 的全称是 Gene Ontology, 是基因本体学分析数据库。通过 GO 数据库注释, 炭样小单胞菌 JXNU-1 基因组中 3 442 个预测出来的基因被归类到 37 个主要的功能分组中, 具体如图 3 所示。

2.4.2 KEGG 数据库注释: 京都基因和基因组百科全书数据库(KEGG)是目前公认的基因通路注释系统。经过对比, 炭样小单胞菌 JXNU-1 基因组上有 2 809 个基因得到 KEGG 数据库的注释, 图 4 是按照 KEGG 二级分类统计后获得的柱状图, 共得到 179 个代谢图, 图 5 是对比到基因最多的嘌呤代谢途径。

2.4.3 COG 数据库注释: COG, 全称是 Cluster of Orthologous Groups of Proteins, 由 NCBI 创建并维护的蛋白质数据库。根据基因组测序推测出的蛋白序列与 COG 数据库中已有的蛋白质数据信息, 利用 BLAST 进行比对, 炭样小单胞菌 JXNU-1 基因组中的 6 444 个编码基因中, 有 2 264 个基因在 COG 数据中得到具有显著意义的功能分类注释(图 6), 其中有 1 288 个基因被发现参与物质代谢, 有 495 个基

因与信息存储及传递相关, 有 394 个基因与细胞过程及信号传递相关, 但仍然有 475 个基因功能未知, 部分基因相关功能多样。

2.4.4 NR 数据库和 Swiss-Prot 数据库注释: NR 全称为 Non-Redundant Protein Database, 是一个非冗余的蛋白质数据库, 其特点在于内容比较全面, 但可靠性有待提高。经过比对, 炭样小单胞菌 JXNU-1 基因组中有 6 030 个基因在 NR 数据库上得到注释。

Swiss-Prot, 是经过注释的蛋白质序列数据库, 其特点是可靠性较高。炭样小单胞菌 JXNU-1 基因组中有 1 855 个基因的蛋白序列功能在该数据库中得到有意义的注释。

2.5 基因组共线性分析

由 NCBI 上数据分析发现, 炭样小单胞菌 JXNU-1 与 *M. aurantiaca* ACC27029 的同源性较高, 用 ACT 软件对这两株小单胞菌的全基因组进行比对, 结果见图 7 所示。由图 7 可以看出, 2 株小单胞菌基因组之间的共线性较好, 基因组存在翻转、易位等基因组重排事件。进一步应用 MUMmer 软件分析炭样小单胞菌 JXNU-1 和 *M. aurantiaca* ACC27029 之间的共线性关系, 两基因基因组线性结构比较见图 8。由图 8 可知, 炭样小单胞菌 JXNU-1 和 *M. aurantiaca* ACC27029 基因组之间除存在翻转、易位等序列外, 还有 1 个极大的倒位区域。

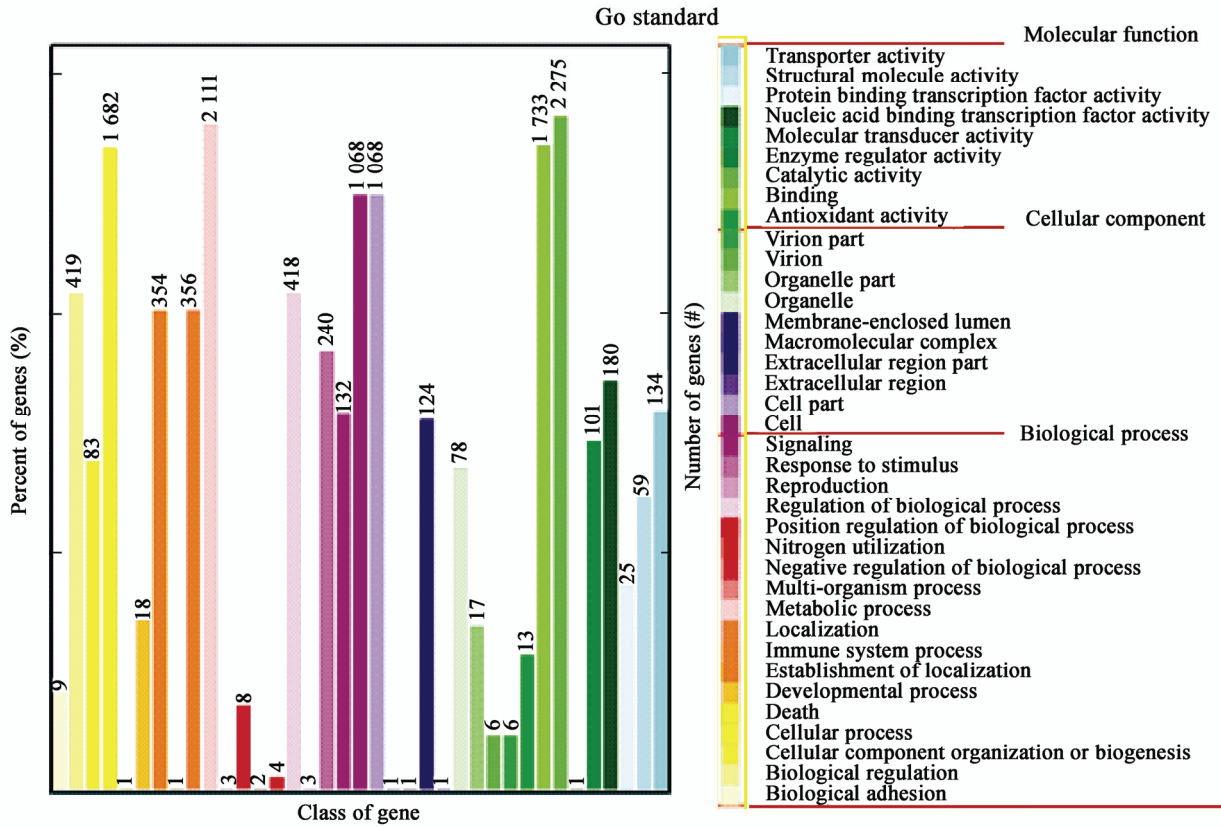


图3 GO功能分类图

Figure 3 GO functional classification map

KEGG pathway classification

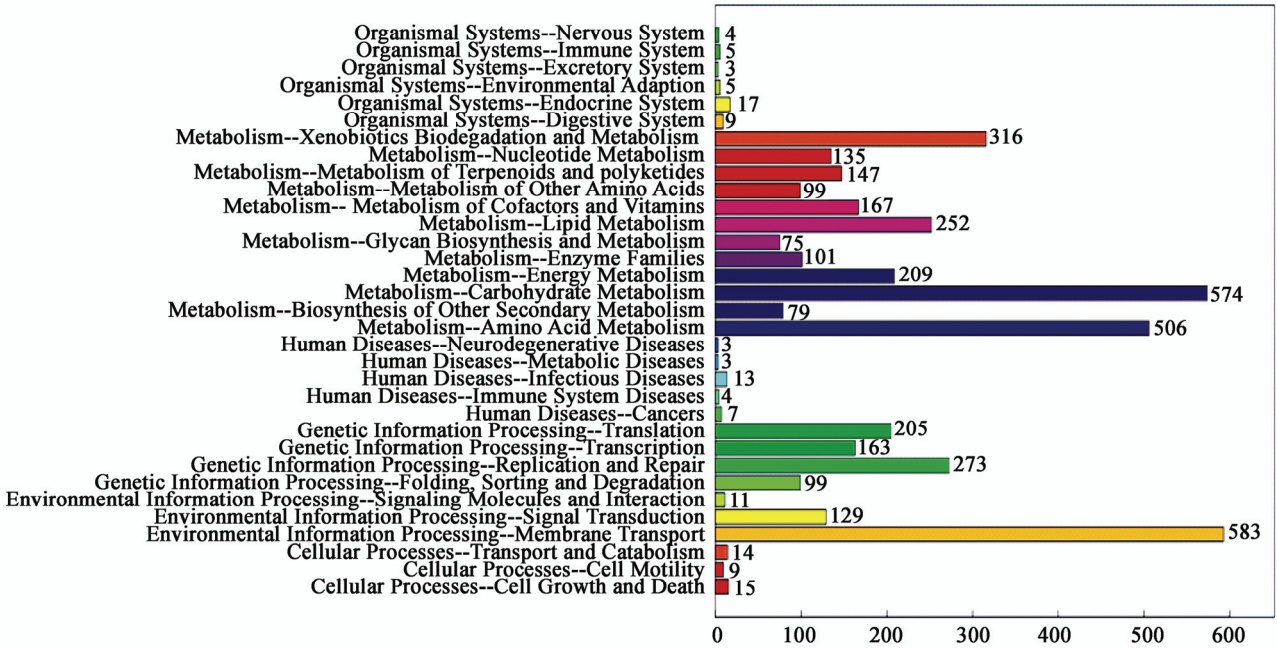
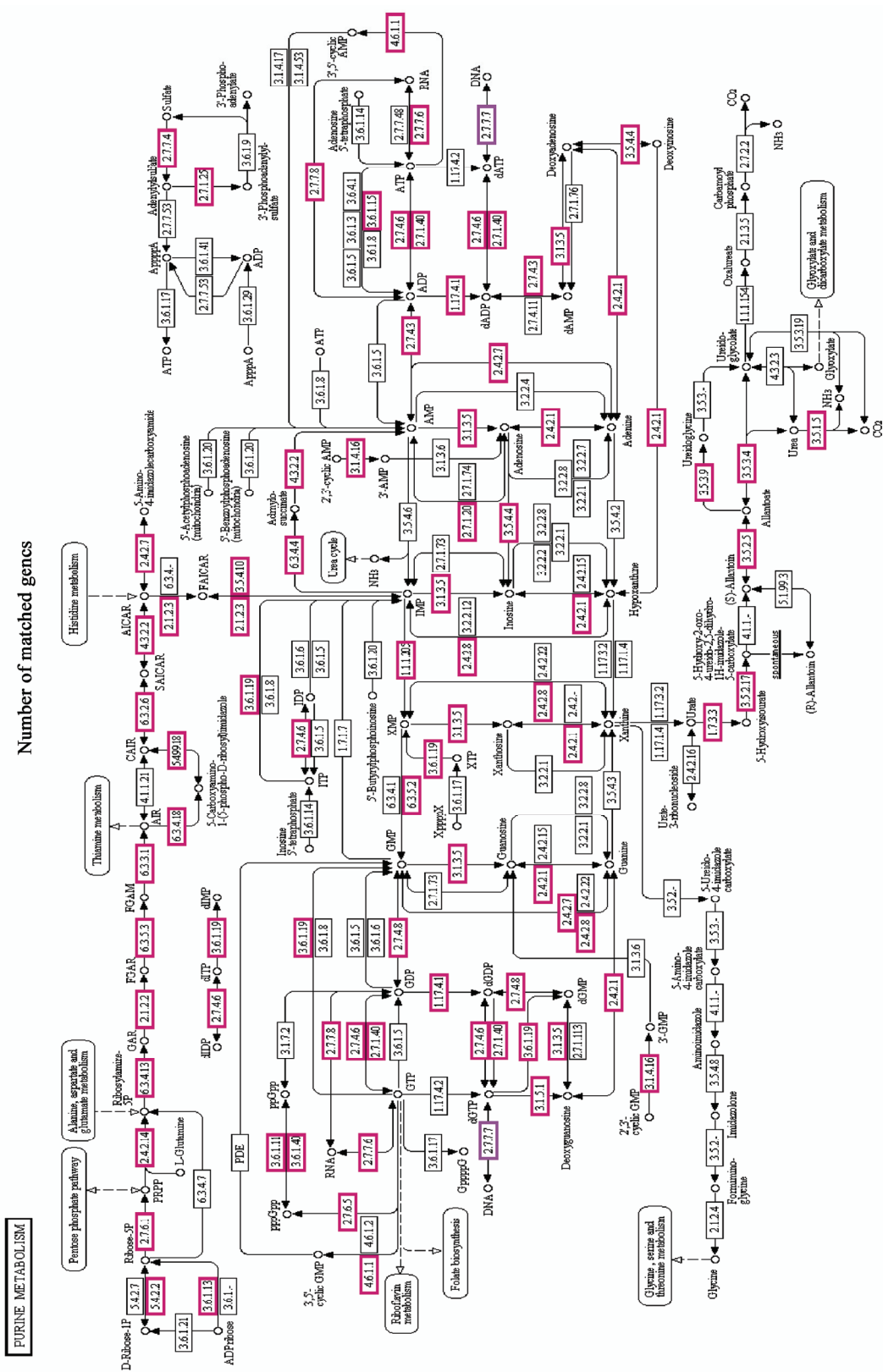


图4 KEGG代谢通路分类图

Figure 4 Classification map of KEGG pathway



00020, S1001
(c) Kunitada Laboratory

图 5 基因对比 KEGG 嘌呤代谢途径情况(对比上基因被红色框标出)
Figure 5 The genes in KEGG purine metabolism pathway (red box marked)

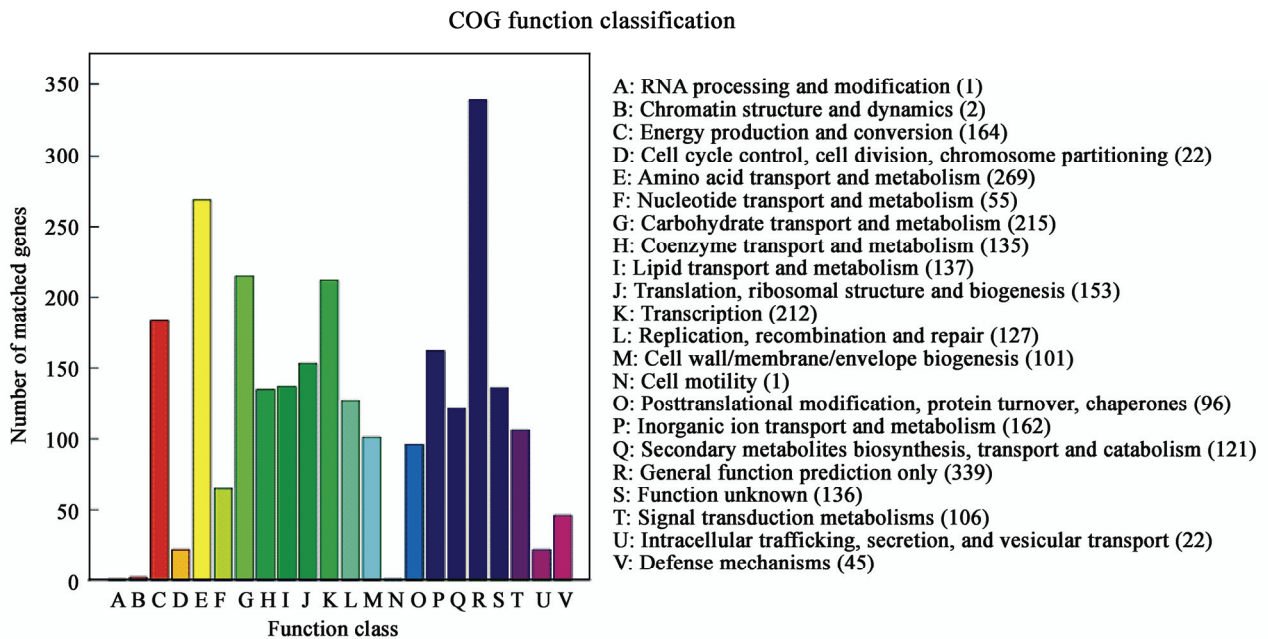


图 6 COG 功能分类图
Figure 6 COG functional classification map

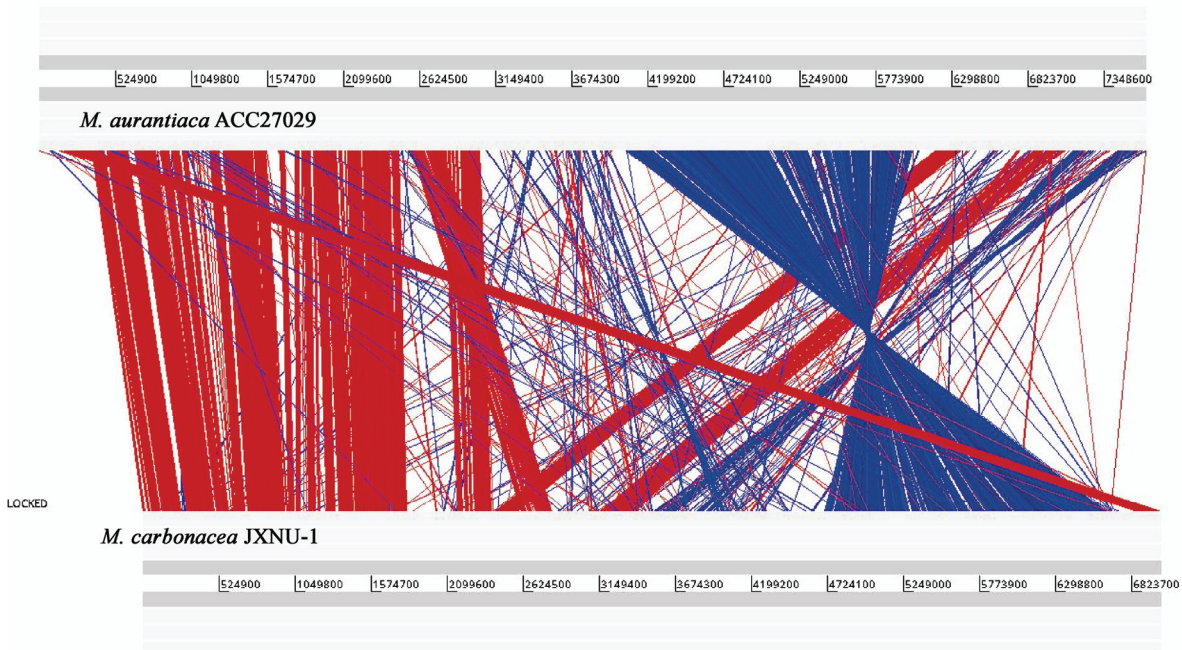


图 7 炭样小单孢菌 JXNU-1 与 *M. aurantiaca* ACC27029 基因组的共线性分析
Figure 7 Synteny analysis of *M. carbonacea* JXNU-1 and *M. aurantiaca* ACC27029

注: 红色线条: 对齐区域正向匹配; 蓝色线条: 对齐区域反向匹配。

Note: Red lines indicate that the aligned regions have the same orientation, whereas blue lines indicate that the aligned regions are inversely oriented.

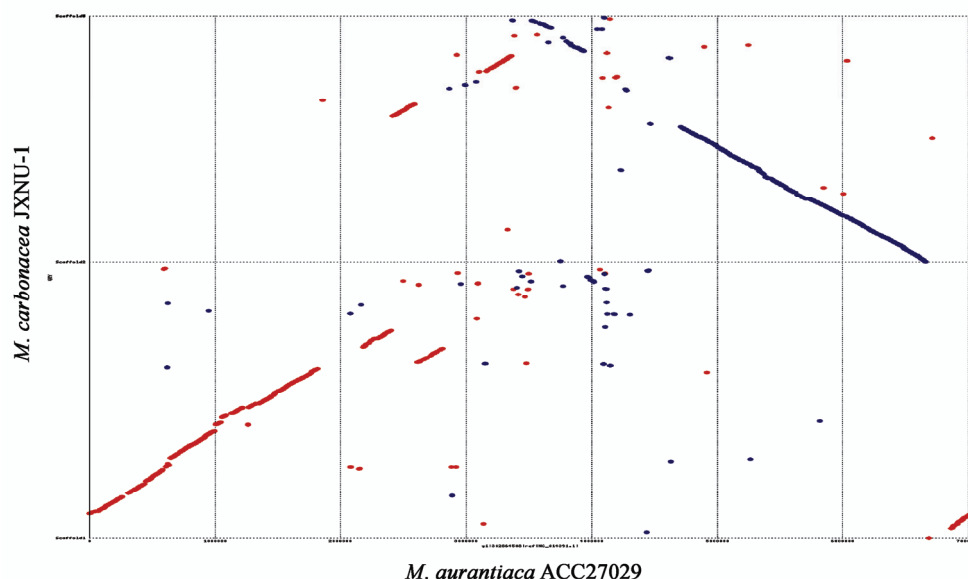


图 8 炭样小单孢菌 JXNU-1 与 *M. aurantiaca* ACC27029 基因组线性结构比较

Figure 8 Dot plots representing comparisons of *M. carbonacea* JXNU-1 and *M. aurantiaca* ACC27029

注: X 轴代表 *M. aurantiaca* ACC27029 的基因组; Y 轴代表炭样小单孢菌 *M. carbonacea* JXNU-1 的基因组. 图中红色点表示正向匹配, 蓝色点表示反向匹配, 坐标轴单位: Mb.

Note: X axis represents *M. aurantiaca* ACC27029 genome; Y axis is *M. carbonacea* JXNU-1 genome. Forward matches colored red and reverse matches colored green. Axes units: Mb.

2.6 次级代谢产物合成基因簇分析

次级代谢产物的合成往往由多个基因共同编码, 且这些基因通常在基因组中成簇存在。通过使用 antiSMASH: antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell 基因组信息发掘网站分析发现, 炭样小单孢菌 JXNU-1 中存在一些次级代谢产物相关的编码基因, 且这些基因形成 26 个基因簇(表 4), 其中包括 NRPS 基因簇 5 个, PKS 基因簇 7 个, NRPS-PKS hybrid 基因簇 3 个, Terpene 基因簇 4 个, 其他基因簇 7 个。

3 结论

本研究通过构建插入片段大小为 500 bp 和 5 000 bp 的两个文库, 分别利用 Miseq 和 HiSeq 2500 高通量测序平台对炭样小单孢菌 JXNU-1 进

行了基因组测序, 总计获得 2 393 Mb 序列数据。利用 SOAP denovo 软件进行基因组序列拼接、人工 PCR 缺口修补, 获得炭样小单孢菌基因组序列的精细图谱(8 个 Scaffolds, 9 个 Contig), 基因组大小为 7 635 725 bp, G+C 含量为 73.85%。通过生物信息学软件分析发现, 该菌基因组编码 6 444 个 CDS, 同时含有 6 个 rRNA 和 51 个 tRNA 基因。利用 GO、KEGG 和 COG 等公共数据库, 对基因功能进行了注释, 使用 antiSMASH 网站在线分析到炭样小单孢菌 JXNU-1 全基因组中含有次级代谢产物合成基因簇 26 个, 其中 NRPS 基因簇 5 个, PKS 基因簇 7 个及 NRPS-PKS hybrid 基因簇 3 个, Terpene 基因簇 4 个, 其他基因簇 7 个。将该菌株基因组序列提交 GenBank, 获得登录号为 JX SX00000000。

表 4 炭样小单孢菌 JXNU-1 次级代谢产物合成基因簇预测
Table 4 Gene clusters involved in biosynthesis of secondary metabolites in *M. carbonacea* JXNU-1

基因簇名 Cluster name	重叠群 Contig No.	位置 Position (nt)	基因数 Genes	基因簇类型* Gene cluster type	匹配相似基因簇 Most similar known cluster
Cluster 1	Contig 1	17 043–75 938	50	Nrps	Asukamycin biosynthetic gene cluster
Cluster 2	Contig 1	578 515–599 474	24	Terpene	Sioxanthin biosynthetic gene cluster
Cluster 3	Contig 1	697 067–718 791	21	Terpene	Phosphonoglycans biosynthetic gene cluster
Cluster 4	Contig 1	1 099 704–1 122 136	18	Lantipeptide	–
Cluster 5	Contig 1	1 230 973–1 278 355	37	Nrps	–
Cluster 6	Contig 1	1 708 030–1 773 370	41	Nrps	Scabichelin biosynthetic gene cluster
Cluster 7	Contig 1	2 562 209–2 782 763	65	T1pks	Macbecin biosynthetic gene cluster
Cluster 8	Contig 1	3 019 988–3 057 544	37	Oligosaccharide	Kijanamicin biosynthetic gene cluster
Cluster 9	Contig 1	3 348 223–3 360 235	13	Bacteriocin	–
Cluster 10	Contig 1	3 598 165–3 651 122	38	T1pks	Azinomycin B biosynthetic gene cluster
Cluster 11	Contig 1	3 680 652–3 743 249	53	Nrps-siderophore	Desferrioxamine B biosynthetic gene cluster
Cluster 12	Contig 1	3 737 914–3 761 447	17	Lantipeptide	SapB biosynthetic gene cluster
Cluster 13	Contig 1	3 787 353–3 808 633	20	Amglyccycl	Validamycin biosynthetic gene cluster
Cluster 14	Contig 1	3 950 520–4 015 682	36	T1pks	–
Cluster 15	Contig 2	152 055–193 113	42	T3pks	Alkyl-O-Dihydrogeranyl-Methoxyhydroquinones biosynthetic gene cluster
Cluster 16	Contig 3	530 912–552 690	21	Terpene	–
Cluster 17	Contig 3	703 136–714 290	13	Bacteriocin	Lymphostin biosynthetic gene cluster
Cluster 18	Contig 3	905 828–1 039 731	75	T1pks-oligosaccharide	Tetrocarcin A biosynthetic gene cluster
Cluster 19	Contig 3	1 361 300–1 415 468	34	Nrps-t1pks	Bactobolin biosynthetic gene cluster
Cluster 20	Contig 3	1 613 666–1 686 702	58	Nrps	C-1027 biosynthetic gene cluster
Cluster 21	Contig 3	1 677 349–1 745 542	57	Nrps-lantipeptide-t1pks	Bleomycin biosynthetic gene cluster
Cluster 22	Contig 3	1 965 524–2 008 577	38	T2pks	Lysolipin biosynthetic gene cluster
Cluster 23	Contig 3	2 095 654–2 191 305	73	Nrps-t1pks	Leinamycin biosynthetic gene cluster
Cluster 24	Contig 3	2 245 656–2 292 288	40	T1pks	Sporolide biosynthetic gene cluster
Cluster 25	Contig 3	2 289 929–2 311 119	23	Terpene	–
Cluster 26	Contig 3	2 434 461–2 471 959	21	Nrps	Gentamicin biosynthetic gene cluster

注: T1pks: I型聚酮合酶; T2pks: II型聚酮合酶; T3pks: III型聚酮合酶; Nrps: 非核糖体肽。

Note: T1pks: Type I polyketides; T2pks: Type II polyketides; T3pks: Type III polyketides; Nrps: Nonribosomal peptides.

参 考 文 献

- [1] Buchanan RE, Gibbons NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 8th Edition. Beijing: Science Press, 1984: 1186-1198 (in Chinese)
布坎南 RE, 吉本斯 NE. *伯杰细菌鉴定手册*[M]. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984: 1186-1198
- [2] Luedemann GM, Brodsky BC. *Micromonospora carbonacea* sp. n., an everninomicin-producing organism[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1964, 10: 47-52
- [3] Weinstein MJ, Luedemann GM, Oden EM, et al. Everninomicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora carbonacea*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1964, 10: 24-32
- [4] Cheng YR, Huang W. The bioactivator from *Micromonospora* spp.[J]. *World Notes on Antibiotics*, 1998, 19(6): 407-418,442 (in Chinese)
程元荣, 黄威. 小单孢菌产生的生物活性物质[J]. 国外医

- 药-抗生素分册, 1998, 19(6): 407-418,442
- [5] Cheng YR, Zheng W. *Micromonospora* spp. and their secondary bioactive metabolites[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2006, 31(6): 321-327 (in Chinese)
程元荣, 郑卫. 小单孢菌及其产生的次级生物活性代谢产物[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(6): 321-327
- [6] Cheng ZT, Zhuang H, Huang XG, et al. Studies on everminomicin B from *Micromonospora* spp.[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2006, 18(5): 184-186 (in Chinese)
程振泰, 庄鸿, 黄喜桂, 等. 小单孢菌产生的扁枝衣霉素 B 的研究[J]. 海峡药学, 2006, 18(5): 184-186
- [7] Jiang H, Cheng YR, Zheng W. Daidzein and Genistein produced by a marine *Micromonospora carbonacea* FIM02-635[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2007, 26(1): 8-12 (in Chinese)
江红, 程元荣, 郑卫. 海洋碳样小单孢菌产生的大豆黄素和染料木素[J]. 中国海洋药物, 2007, 26(1): 8-12
- [8] Long ZE, Zhu YJ, Huang YH, et al. Isolation and identification of a strain of *Micromonospora* with broad-spectrum antimicrobial activity[J]. Microbiology China, 2008, 35(3): 378-383 (in Chinese)
龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 等. 一株具有广谱抗菌活性小单孢菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 378-383
- [9] Dai F, Huang YH, Ning X, et al. Antibacterial activities of antibiotics produced by *Micromonospora carbonacea* to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Agrochemicals, 2011, 50(4): 302-304 (in Chinese)
戴菲, 黄运红, 宁茜, 等. 炭样小单孢菌抗生素对水稻白叶枯病菌的抑菌作用[J]. 农药, 2011, 50(4): 302-304
- [10] Peng WM, Huang YH, Li J, et al. Studies on the antimicrobial activity and its mechanism of an antibiotic, from *Micromonospora carbonacea* JXNU-1, against gram-negative bacteria *in Vitro*[J]. Journal of Jiangxi Normal University (Natural Sciences Edition), 2013, 37(2): 162-165 (in Chinese)
彭伟梦, 黄运红, 李瑾, 等. 炭样小单孢菌 JXNU-1 抗生素对 G⁻ 的体外抗菌作用及其机理的初步研究[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2013, 37(2): 162-165
- [11] Long ZE, Zhu YJ, Huang YH, et al. Isolation and purification of antibiotic from the fermentation broth of *Micromonospora carbonacea* JXNU-1 and its physical-chemical properties[J]. Microbiology China, 2008, 35(9): 1450-1454 (in Chinese)
龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 等. 炭样小单孢菌 JXNU-1 广谱抗生素产物的分离及其理化性质[J]. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1450-1454
- [12] Zhu YJ, Long ZE, Huang YH, et al. Studies on fermentation technology for a strain of rare Actinomycete producing antibiotics[J]. Chemistry & Bioengineering, 2006, 23(12): 39-42 (in Chinese)
朱跃进, 龙中儿, 黄运红, 等. 一株稀有放线菌发酵产抗生素的工艺研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(12): 39-42
- [13] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340
- [14] Feng F, Liang JL, Su LT, et al. Comparison of different methods in DNA extraction of *Staphylococcus aureus*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2010, 37(10): 153-155 (in Chinese)
冯飞, 梁景龙, 苏丽婷, 等. 不同方法对金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取效果的比较[J]. 广东农业科学, 2010, 37(10): 153-155
- [15] Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(2): 573-580
- [16] Lagesen K, Hallin P, Rodland EA, et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(9): 3100-3108
- [17] Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(5): 955-964
- [18] Gardner PP, Daub J, Tate JG, et al. Rfam: updates to the RNA families database[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(Database issue): D136-D140
- [19] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 25-29
- [20] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, et al. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(Database issue): D277-D280
- [21] Magrane M, Consortium U. UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data[J]. Database, 2011, 2011: bar009
- [22] Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, et al. The COG database: an updated version includes eukaryotes[J]. BMC Bioinformatics, 2003, 4: 41
- [23] Carer TJ, Rutherford KM, Berriman M, et al. ACT: the artemis comparison tool[J]. Bioinformatics, 2005, 21(16): 3422-3423
- [24] Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, et al. Versatile and open software for comparing large genomes[J]. Genome Biology, 2004, 5(2): R12
- [25] Blin K, Medema MH, Kazempour D, et al. antiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(Web Server issue): W204-W212
- [26] Medema MH, Blin K, Cimermancic P, et al. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(Web Server issue): W339-W346
- [27] Medema MH, Breitling R, Bovenberg R, et al. Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(2): 131-137