

可培养海绵共附生微生物的 PKS 基因筛选*

孟庆鹏 李志勇** 缪晓玲

(上海交通大学生命科学技术学院 海洋生物技术实验室 上海 200240)

摘要 利用 PCR 技术对 21 株分离自我国南海澳大利亚厚皮海绵的放线菌及 9 株分离自贪婪偃海绵的芽孢杆菌进行了聚酮合酶(PKS)基因筛选。从芽孢杆菌 C89 中获得了一条 669bp 片段, BLAST 比对结果表明该基因对应的氨基酸序列和枯草芽孢杆菌 I 型聚酮合成酶基因(PKS)KS 域的相似性达 96%。通过系统发育分析推测芽孢杆菌 C89 PKS 基因属于 trans-AT 型。首次证明了贪婪偃海绵共附生微生物中存在 PKS 基因, 这为海绵活性物质的微生物来源假说提供了证据, 同时也为可以产生聚酮类化合物的微生物筛选以及聚酮类化合物的发酵制备奠定了基础。

关键词 澳大利亚厚皮海绵, 贪婪偃海绵, 共附生微生物, 聚酮合成酶, PCR 扩增, 序列分析

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)03-0464-04

Polyketide Synthases Screening from Sponge-associated Culturable Microorganisms*

MENG Qing-Peng LI Zhi-Yong** MIAO Xiao-Ling

(Laboratory of Marine Biotechnology, School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract PKS gene was screened by PCR from thirty strains of sponge-associated bacteria including twenty-one actinomycetes isolated from *Craniella anstrialiensis* and nine bacillus isolated from *Dysidea avara* in the South China Sea. As a result, a 669 bp KS domain gene was successfully amplified from Bacillus C89. BLAST analysis showed that the KS domains were most closely related to the KS sequences of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 with 96% similarity. Phylogenetic analysis demonstrated the KS domain belong to trans-AT KS domains. This study demonstrated the existence of PKS gene in bacteria associated with sponge *Dysidea avara* for the first time, and provided proof for the hypothesis that sponge-associated bacteria are perhaps the true producers of many novel bioactive compounds in sponge. Meanwhile, this study lays a basis for the microbial screening for polyketide compounds production.

Key words *Dysidea avara*, *Craniella anstrialiensis*, Polyketide synthase, PCR amplification, Sequencing, Analysis

海绵蕴含着丰富的天然活性产物^[1], 这些化合物大多在陆地生物中从比较罕见, 具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、降血压、凝血和溶血等生物活性。近年来越来越多的研究表明海绵中的许多活性物质是由它的共附生微生物产生的^[2,3]。

聚酮类化合物是一组含有由碳、氧原子构成的大环结构的天然化合物, 是许多药物的先导化合物, 例如红霉素、四环素、两性霉素、利福霉素、洛伐他丁、阿霉素、FK506、雷帕霉素等。20 世纪末期, 国外学者已有开始对海绵及其共附生微生物的聚酮化合物进行研究。例如: Kobayashi 等人于 1997 年从海绵 *Callispongia truncata* 的丙酮浸出物中提取到

有细胞毒素的聚酮化合物^[4]。Abrell 等人从海绵 *Jasois cf. co-riacea* 分离到的曲霉菌培养液中发现一种新的聚酮化合物^[5]。2004 年后人们将目标转移到从海绵及其共附生微生物中克隆聚酮化合物合成基因(PKS)^[6-9]; 2006 年 Kim 等人从海绵 *Pseudoceratina clavata* 的宏基因组中成功克隆到 PKS 基因^[8]。最近, 针对海绵可培养的微生物 PKS 基因的筛选工作才刚刚开始, 仅有 Kim 等人的一篇即将发表的报道^[8]。

我们已经从 4 种南海海绵中分离筛选出近 200 株具有抗菌、生物酶活性的微生物^[10-12], 初步建成了一个海绵共附生微生物资源库。在此基础上, 本

* 国家 863 计划课题(No. 2004AA628060)

** 通讯作者 Tel: 021-34204036, E-mail: zyl@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2006-07-19, 修回日期: 2006-10-19

文对一些活性菌进行 PKS 基因筛选,目的在于为海绵活性物质微生物来源的假说提供分子水平上的证据,同时也期望为海绵共附生微生物基因资源的挖掘与利用提供基础。对于澳大利亚厚皮海绵和贪婪倔海绵的功能基因及聚酯化合物研究,目前国际上还未有报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 21 株放线菌,筛选自中国南海澳大利亚厚皮海绵,编号 D01 ~ D21^[10]。9 株芽孢杆菌,筛选自中国南海贪婪倔海绵,编号 C51、C77、C89、C93、C111、C114、C117、C123、C130^[11]。

1.1.2 试剂 TE 缓冲液^[12]、TAE 溶液、Taq 酶(购自上海晶美生物技术有限公司)、溶菌酶、dNTPs、蛋白酶 K、X-gal、IPTG、3S Spin DNA Agarose Gel Purification Kit 试剂盒、pUCm-T Vector 试剂盒、DH5 α 感受态细胞(购自上海申能博采生物科技有限公司)。

1.1.3 培养基 高氏一号培养基^[14]、牛肉膏蛋白胨培养基^[14]、LB 固体培养基^[14]及含 Amp 的 LB 固体培养基(Amp 终浓度为 20 μ g/mL)。其中高氏一号和牛肉膏蛋白胨培养基采用按布鲁杰兹配方配制的人工海水^[15]。

1.1.4 引物 筛选 PKS 基因的引物:上游引物 GB1: 5'-RTRGAYCCNCAGCAICG-3', 下游引物 GB2: 5'-VGTNCCNGTGCCRTG-3'^[9]。筛选阳性克隆的引物为 pUCm-T 载体引物,上游引物 T7: 5'-GCSATGGAYCCSCARCRCGSVT-3', 下游引物 M13: 5'-GCSATGGAYC-CSCARCRCGSVT-3'。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 DNA 提取方法采用经典的酚-氯仿抽提法,对于芽孢杆菌和放线菌略有不同。具体步骤如下。

芽孢杆菌 DNA 提取 取 1mL 菌液,加入 500 μ L TE 缓冲液,混匀,12000r/min,离心 5min。弃上清,加入 500 μ L TE 缓冲液,混匀,12000r/min,离心 5min。弃上清,加入 250 μ L TE 缓冲液,20 μ L 蛋白酶 K (20mg/mL)和 250 μ L 12% SDS,重悬,混匀,放入 55 $^{\circ}$ C 水浴 30min。加入 0.6mL TRIS 饱和酚,小心上下颠倒混匀,12000r/min,离心 10min。取上清液,加入等体积的酚-氯仿抽提液,颠倒混匀,12000r/min,离心

10min。取上清液,加入等体积的氯仿抽提液,颠倒混匀,12000r/min,离心 10min。取上清液,加入 0.1 倍体积的 5mol/L NaCl 溶液和 2.5 倍体积的异丙醇,颠倒混匀,过夜。12000r/min,离心 15min。小心倒去上清液,加入 1mL 75% 乙醇冲洗,12000r/min 离心 10min,弃去上清液。将 DNA 在真空干燥。将获得的 DNA 溶于 30 μ L 无菌超纯水中,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

放线菌 DNA 提取 直接从平板挑取 0.1g ~ 0.2g 菌丝体,500 μ L TE 缓冲液洗两次,加入 250 μ L 溶菌酶溶液,30 $^{\circ}$ C 水浴 30min。依次加入蛋白酶 K、SDS,55 $^{\circ}$ C 水浴,等体积有机试剂抽提,方法同上。

1.2.2 PCR 扩增 采用 25 μ L 反应体系:14.75 μ L ddH₂O, 2.5 μ L Taq Buffer(含 KCl,无 MgCl₂), 3.5 μ L MgCl₂, 2.0 μ L 2.5mmol/L dNTP, 引物 10 μ mol/L GB1 与 GB2 各 0.5 μ L; 0.25 μ L 5U/ μ L Taq 酶。94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C, 1min; 50 $^{\circ}$ C, 1min; 72 $^{\circ}$ C, 2min; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存; 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,电压为 90V。

1.2.3 阳性克隆筛选 PCR 产物经割胶纯化后,取 6.5 μ L 加入 1 μ L Ligation Buffer, 50ng(1.5 μ L)的 pUCm-T, 1 μ L T₄ DNA Ligase。在连接酶作用下,16h PCR 产物与载体连接成环。接着将连接反应产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。转化的菌体涂布于含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的平板上,37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12h ~ 16h,长出蓝色和白色菌落。挑取白色菌落,接种培养,用 Triton 溶液破壁,取 1 μ L 作为模板,以 T7、M13 载体引物作为引物 PCR 扩增,电泳分析,筛选出阳性克隆。

1.2.4 序列测定及同源性与系统发育树分析 将筛选出的阳性克隆送样到英骏生物技术有限公司进行序列测定(3730DNA 测序仪)。将得到的目标片段序列提交 GenBank 数据库,采用 Blast 程序进行序列的同源性分析,然后选择 GenBank 具有代表性的 KS domain 的氨基酸序列,利用软件 clustal x 进行比对,并使用软件 Mega 3.1 构建系统发育树。

2 结果

2.1 PKS 基因的 PCR 扩增

从 21 株放线菌和 9 株芽孢杆菌均成功提取到基因组 DNA,大小在 20kb 左右。以此 DNA 为模板,利用 PKS 片段扩增引物 GB1、GB2 进行 PCR 扩增,取

产物经 1.0% 琼脂糖电泳分析发现仅从芽孢杆菌 C89 中克隆出与预期值 690bp 十分相近的 DNA 片段 (图 1)。

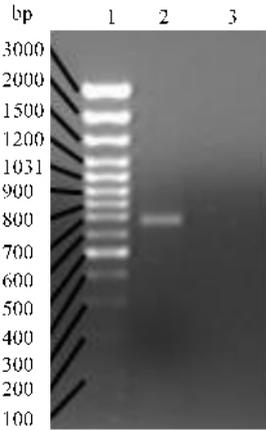


图 1 PCR 产物凝胶电泳

1 DNA marker 2 PCR 产物 3 阴性对照

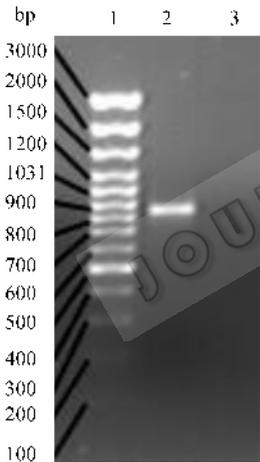


图 2 阳性克隆鉴定

1 DNA marker, 2 PCR 产物, 3 阴性对照

2.2 阳性克隆的 PCR 检验与序列分析

对芽孢杆菌 C89 的 PCR 产物进行连接、转化。以白斑的质粒 DNA 为模板,利用载体引物 M13、T7 进行 PCR 扩增,凝胶电泳分析显示有一条 830bp 左右且较为明亮的条带(图 2)。去除载体上 157bp 左右的序列,所连片断长度恰好 670bp 左右,证明来自 C89 的目的片段已经连入载体 pUCm-T 并成功转入大肠杆菌。经过测序得到 669bp 的核苷酸序列如下 GenBank No. FFS13145:

```

1 TGGATCCACA GCAGCGAATA TTTTACAGG AAGGCTATAA
41 AGCATTTGAG GATGCCGGAT ATAACGCCCA A ACATTAAT
81 GATAAAAAGT GCGGAGTCTA TCTGGGTATC ATGAGCAATG
121 AATACGGGAT GATGCTGAATC AGCATCAGGC CAGAGCAAG
161 CGCCACGGGG AACAGTTTTG CTATAGCGGC AGCACGTATT
201 CCGTATTATC TTAATTTAAA AGGCCCTGCC ATTCTATCG
241 ATACGGCTTG TTCTTCCTCA TTAGTCGGGA CCCATTGGC
281 CCGTCAAGCT CTATTAATAA AAGAAATTGA TATGGCGTTG
321 GTTGGCGGAG TGAGCTTATA CCTCACTCCG GAATCATACA
361 TCAGCATGTG TGGAGCCGGG ATGTTATCGC CGGATGACA
401 ATGCAAAGCG TTTGATAATA GCGCAAATGG TTTCTACCC
441 GGCGAAGGTG CAGGAGCGTT AGTCCTAAAG CGACTCAAAG
481 ACGCAGAAGC AGCTAATGAT CATATATATG GAGTCATTAT
521 CGGTTCAAGG ATTAATCAGG ACGGAAAAAC GAATGGAATT
561 ACAGCGCCGA GTGCAAAAAG CCAAATGGAC TTAGAACGTG
601 ACATATATGA A AAATATGAT ATACACCTG AGAGCATCAG
641 TTATGTAGAA ATGCACGGCA CAGGAACTA

```

2.3 BLAST 比对和系统发育分析

根据核苷酸序列推导其翻译的氨基酸序列为:
MDPQQRIFLQEGYKAFEDAGYNAQTLNDKKCGVYLG
MSNEYGMLLNQHQARASATGNSFAIAAARIPYYLNLKG
PAIPIDTACSSSLVGLHARQALLNKEIDMALVGGVSLY
LTPESYISMCEAGMLSPDGQCKAFDINSANGFVPEGAG
ALVLKRLKDAEAANDHIYGVHSGINQDGKTNGITAP
SAKSQMDLERDIYEKYDIHPESISYVEMHGTGT

将从芽孢杆菌 C89 中筛选到的基因对应的氨基酸序列定名 C89-KS,经 BLAST 比对发现与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168)的 PKS 基因 KS 域的氨基酸序列 CAB13602 同源性的 96%。与芽孢杆菌属的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens* FZB42)的 KS 域的氨基酸序列 CAG23958 的同源性为 93%。作为革兰氏阳性菌的代表菌株 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 的全基因组序列于 1997 年测定完毕,这种微生物的活性物质的合成调控往往对应着相当长的操纵子,比如 PKS 区域大小有 78.5 kb,占了全部基因组序列的 2%。因为芽孢杆菌 C89 与枯草芽孢杆菌 KS 域氨基酸序列相似性达 96% 推测两者 PKS 基因的结构可能极为相似。菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 采自于植物根围,它一方面可以促进植物生长,一方面帮助植物抵御病原的侵袭。2006 年 Alexandra Koumoutsi 等人从该菌株中克隆到了新的 PKS 基因,并发现其参与了 surfactin、fengycin 等抗病原生物活性物质的合成。

氨基酸序列构建的系统发育树如图3。图3中C89-KS是芽孢杆菌C89的KS domain氨基酸序列, CAB13602、CAG23958是经BLAST比对与C89-KS相似的两个序列。该图显示C89与8个PKS基因KS域的氨基酸序列(CAB13602、CAG23958、OnnB、LnmJ、PksP、PksN、DszA、PedH)的系统发育关系非常近,都

属于trans-AT型的KS域,所以推断C89的PKS基因也是trans-AT型。其中与C89-KS关系比较近的OnnB,来自海绵*Theonella swinhoei*不可培养的共生菌^[7]。根据图3,C89-KS与来自放线菌、蓝细菌KS域的氨基酸序列也有比较近的关系。

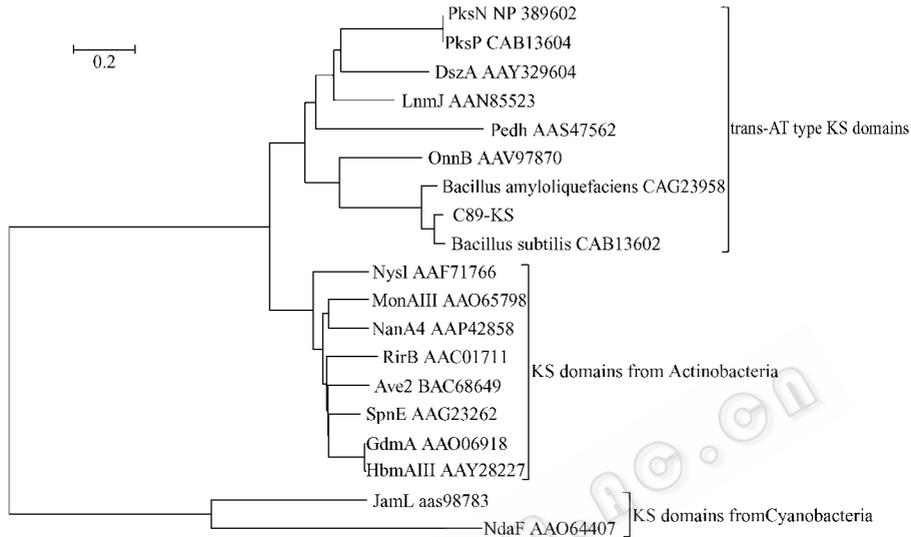


图3 基于氨基酸序列构建的系统发育树

Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points supported by bootstrap.

Bootstrap analysis was based on 500 replicates. Scale indicates 20% sequence divergence.

3 结论

从我国南海贪婪偃海绵中分离的芽孢杆菌C89中扩增得到一条669bp PKS基因片段,通过BLAST比对和系统发育分析,推断出其类型属于trans-AT型,与枯草芽孢杆菌I型聚酮合成酶基因(PKS)KS域的相似性达96%。本文首次证明了贪婪偃海绵可分离培养的共附生细菌中存在PKS基因。一定程度上,不仅为海绵活性物质微生物来源假说提供了分子证据,同时也为产生聚酮类化合物的微生物筛选以及聚酮类化合物的发酵制备奠定了基础。

参考文献

- [1] Zhang W, Zhang X, Cao X, et al. J Biotechnol, 2003, **100**: 161 ~ 168.
- [2] Bewley C A, Holland N D, Faulkner D J. Experientia, 1996, **52**: 716 ~ 722.
- [3] Ishibashi K J. Chem Rev, 1993, **93**: 1753 ~ 1769.
- [4] Kobayashi M, Higuchi K, Murakami N, et al. Tetrahedron Letters, 1997, **38**: 2859 ~ 2862.
- [5] Abrell L M, Borgeson B, Crews P, et al. Tetrahedron Letters, 1996,

37: 8983 ~ 8984.

- [6] Schirmer A, Gadkari R, Reeves C D, et al. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **8**: 4840 ~ 4849.
- [7] Piel J, Hui D, Wen G, et al. PNAS, 2004, **101**: 16222 ~ 16227.
- [8] Kim T K, Garson M J and John A. Environmental Microbiology, 2005, **7**: 509 ~ 518.
- [9] Kim T K, John A. Furst. Environmental Microbiology, 2006, **8**: 1460 ~ 1470.
- [10] Li Z Y and Liu Y. Letters in Applied Microbiology, 2006, **43**: 410 ~ 416.
- [11] 沈颖,李志勇,蒋群,等.微生物学通报,2005, **32**(4): 15 ~ 19.
- [12] 黄艳琴,李志勇,蒋群,等.微生物学通报,2005, **32**(4): 5 ~ 10.
- [13] 奥斯伯F,金斯顿R E,塞德曼J G,等.精编分子生物学实验指南.北京:科学出版社,1999, pp. 696 ~ 720.
- [14] 沈萍,范秀容,李广武,等.微生物学实验.北京:高等教育出版社,2001, pp. 214 ~ 221.
- [15] 湛江水产学院.海洋饵料生物培养.北京:农业出版社,1989, pp. 210 ~ 211.
- [16] Chen X H, Vater J, Piel J, et al. J Bacteriol, 2006, **188**: 4024 ~