

研究报告

海绵共生萎缩芽孢杆菌 C89 PPTase *bap* 基因的异源表达

朱春苗 蒋群 张凤丽* 李志勇*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要:【背景】磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTase)催化非核糖体肽合成酶(NRPS)中肽酰载体蛋白(PCP)从无活性的脱辅基形态转化为有活性的全辅基形态,从而启动非核糖体肽类化合物的生物合成。【目的】鉴定贪婪海绵共生萎缩芽孢杆菌 C89 中 Sfp 型 PPTase Bap,验证 Bap 激活 NRPS 中 PCP 的能力。【方法】通过 BLAST 和氨基酸多序列比对鉴定萎缩芽孢杆菌 C89 中 Sfp 型 PPTase Bap。将 *bap* 基因在 *sfp* 基因突变株枯草芽孢杆菌 168 中异源表达,通过重组菌枯草芽孢杆菌 168-bap 的代谢物检测非核糖体肽类化合物 Surfactin。【结果】Bap 为 Sfp 型 PPTase,检测到重组菌枯草芽孢杆菌 168-bap 中 Surfactin 的产生。【结论】本研究为海洋萎缩芽孢杆菌中 NRPS 基因簇的异源表达奠定了基础。

关键词: 萎缩芽孢杆菌, 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 Bap, 异源表达

Heterologous expression of phosphopantetheinyl transferase gene *bap* from marine sponge-associated *Bacillus atrophaeus* C89

ZHU Chun-Miao JIANG Qun ZHANG Feng-Li* LI Zhi-Yong*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Background] Phosphopantetheinyl transferases (PPTases) are known to catalyze the transformation of peptidyl carrier proteins (PCPs) in nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) from inactive apo-form to active holo-form, so that initiating the synthesis of nonribosomal polypeptides. [Objective] To identify the Sfp-type PPTases Bap from the marine sponge *Dysidea avara* symbiont *Bacillus atrophaeus* C89 and to confirm the function of Bap in activating PCPs in NRPSs. [Methods] Sfp-type PPTase Bap from *B. atrophaeus* C89 was identified by BLAST and amino acid sequences alignment. The *bap* gene was heterologously expressed in the *sfp* gene mutant strain *Bacillus subtilis* 168. The nonribosomal polypeptide surfactin was detected from the

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31300104); Open Program of Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University (MMLKF16-09)

*Corresponding authors: ZHANG Feng-Li: Tel: 86-21-34205818; E-mail: zhangfengli@sjtu.edu.cn

LI Zhi-Yong: Tel: 86-21-34204036; E-mail: zyli@sjtu.edu.cn

Received: April 12, 2018; Accepted: May 25, 2018; Published online (www.cnki.net): June 28, 2018

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31300104); 微生物代谢国家重点实验室开放课题(MMLKF16-09)

*通信作者: 张凤丽: Tel: 86-21-34205818; E-mail: zhangfengli@sjtu.edu.cn

李志勇: Tel: 86-21-34204036; E-mail: zyli@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-12; 接受日期: 2018-05-25; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-28

metabolites of the recombinant strains *B. subtilis* 168-bap. **[Results]** Bap was identified to be Sfp-type PPTases, and the production of surfactin was detected in recombinant strains *B. subtilis* 168-bap. **[Conclusion]** Our findings provide basis for heterologous expression of NRPSs gene clusters from marine *B. atrophaeus*.

Keywords: *Bacillus atrophaeus*, PPTase Bap, Heterologous expression

海绵共生微生物能产生具有潜在药用价值的次级代谢产物, 包括非核糖体肽类化合物^[1-2]。为了解海绵共生微生物合成非核糖体肽类化合物的潜能, Pimentel-Elardo 等^[3]对海绵 *Aplysina aerophoba* 的宏基因组进行了研究, 发现其共生绿弯菌中有一个非核糖体肽合成酶(NRPS)基因簇, 并在该基因簇下游发现了一个磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTase)基因 *lubD*。肽酰载体蛋白(PCP)是 NRPS 的关键功能域, PPTase 催化磷酸泛酰巯基乙胺基从辅酶 A 转移到 PCP 活性丝氨酸的残基上, 将 PCP 由无活性的脱辅基形态(apo-)转化为有活性的全辅基形态(holo-)^[4-5]。PPTase 作为激活 NRPS 中 PCP 的活性开关, 在非核糖体肽类化合物的生物合成中起着不可或缺的作用^[5]。根据蛋白质结构, PPTase 分为 3 种类型^[4]: I 型为 AcpS 型, 约 120 个氨基酸, 含 P2 (GxD)、P3 [(F/W)(S/T/A)xKE(S/A)xxK]两个保守结构域^[6]; II 型为 Sfp 型, 约 240 个氨基酸, 含 P1 (PxxP)、P2 和 P3 三个保守结构域^[4-7]; III 型 PPTase 是融合在聚酮合酶(PKS)/脂肪酸合酶(FAS)上的一个结构域。一般而言, NRPS 的 PCP 由 Sfp 型 PPTase 催化^[7]。

萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)是重要的工业菌株^[8-9]。本实验室从中国南海贪婪海绵中分离到 *B. atrophaeus* C89, 该菌株产具有抗藻活性^[10]的非核糖体肽类化合物 Bacillamide C^[11]及其类似物 Neobacillamide A^[12], 我们推测 *B. atrophaeus* C89 中的 *nrps* 基因簇^[13]和一个 Sfp 型 PPTase 基因参与了 Bacillamides 的生物合成。Bacillamides 在自然条件下生物合成量低, 化学合成易造成环境污染, 因此 *nrps* 基因簇的异源表达是解决其生物合

成产量低和解析 Bacillamides 生物合成途径的重要手段。NRPS 的关键功能域 PCP 需要 Sfp 型 PPTase 催化完成翻译后修饰, 所以 *B. atrophaeus* C89 中 Sfp 型 PPTase 对 *B. atrophaeus* C89 中 Bacillamides 的生物合成途径研究意义重大。

Bacillus subtilis 168 是芽孢杆菌异源表达常用模式菌株, 该菌株中 Sfp 型 PPTase 基因 *sfp* 突变^[6], 不能催化 NRPS 中 PCP, 因此在 *B. subtilis* 168 中表达 NRPS 时需要引入能够催化该 NRPS 中 PCP 的 PPTase^[14]。Zobel 等^[15]将来源于真菌的一个 NRPS 与 Sfp 在 *B. subtilis* 168 中共表达, 获得了相应的活性化合物 Enniatin。Surfactin 是枯草芽孢杆菌合成的非核糖体肽类化合物^[7], 具有溶血活性^[16]。*B. subtilis* 168 有完整的 Surfactin 操纵元基因 *srfa*^[17], 但其 *sfp* 基因突变不能产生 Surfactin^[7]。因此在 *B. subtilis* 168 中表达 Sfp 型 PPTase 时, 可通过溶血测试检测 Surfactin 是否合成, 从而判断表达的 PPTase 能否激活 NRPS 中 PCP^[15]。刘丽霞等^[18]将 *B. subtilis* Nja-9 的 *sfp* 基因整合到 *B. subtilis* 168 的基因组中, 通过溶血测试筛选到产 Surfactin 的重组菌。因此, 在研究 *B. atrophaeus* C89 中 Sfp 型 PPTase 的功能时, 选择 *B. subtilis* 168 为异源宿主, 以 Surfactin 为指示剂, 通过检测重组菌是否合成 Surfactin, 验证该 PPTase 能否激活 NRPS 中 PCP。

本研究首先通过生物信息学分析找到 *B. atrophaeus* C89 中 Sfp 型 PPTase Bap, 然后将 *bap* 基因在 *B. subtilis* 168 中异源表达, 获得了产 Surfactin 的重组菌 *B. subtilis* 168-bap, 说明 Bap 在 *B. subtilis* 168 中成功表达, 并能激活 Surfactin 合成酶 NRPS 中所有的 PCP (图 1)。

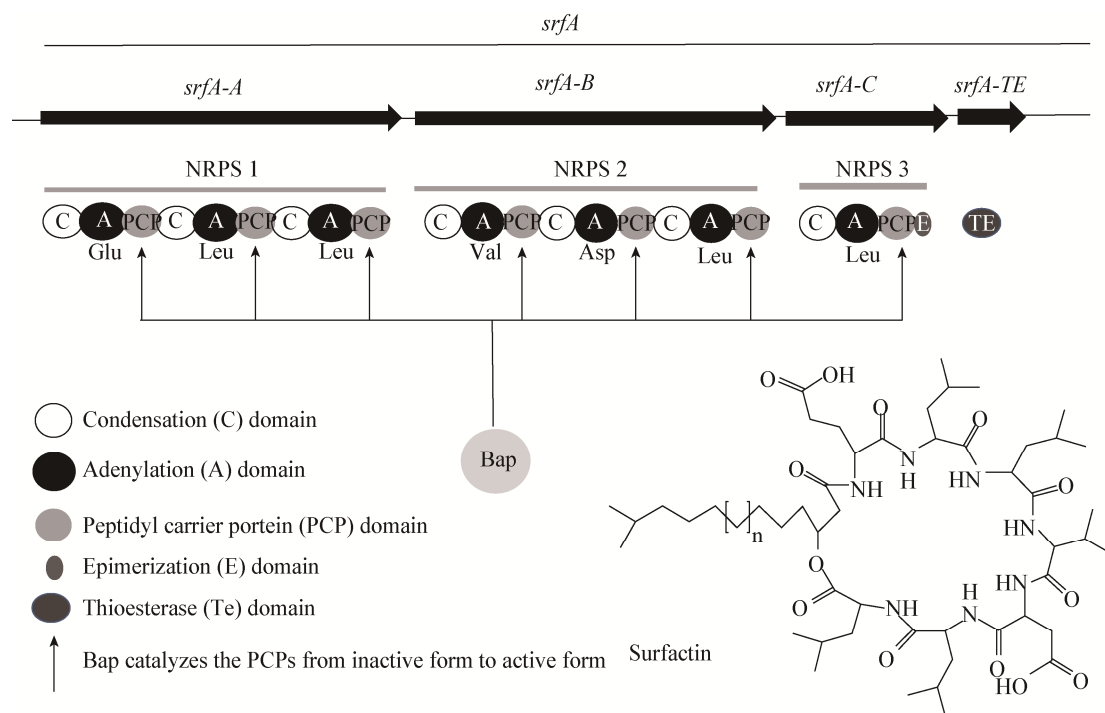


图 1 重组菌 *B. subtilis* 168-bap 中 Surfactin 的生物合成示意图

Figure 1 Schematic diagram of the surfactin biosynthesis of recombinant *B. subtilis* 168-bap

注: Surfactin 的编码基因 *srfA-ABC* 编码合成 3 个 NRPS, *srfA-TE* 编码合成 1 个硫酯酶, NRPS 中的 A 结构域识别氨基酸作为底物^[19], PPTase Bap 将辅因子 4'磷酸泛酰巯基乙胺基转移到每个 PCP 结构域上将其激活从而启动 Surfactin 的合成。

Note: The encoding genes *srfA-ABC* of surfactin encode three NRPSs and the gene *srfA-TE* encodes a thioesterase. Aminos are recognized by A domains of NRPSs as substrates^[19]. PPTase Bap introduces the 4'-Ppan to each PCP domain to activate them so that initiating the synthesis of surfactin.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

B. atrophaeus C89 由本实验室分离保存^[13]; *B. subtilis* 168 由本实验室保存; 枯草芽孢杆菌表达载体 pHT01 由上海科技大学黄娇芳老师惠赠; 克隆载体 pEASY-T1 Simple、克隆感受态细胞大肠杆菌 Trans1-T1 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 培养基

枯草芽孢杆菌和大肠杆菌培养用 LB (Luria-Bertani)培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 固体培养基中加入 1.5%琼脂粉。*B. atrophaeus* C89 培养用人工海水配制的 LB 培养基, 人工海水(g/L): 氯化钠 26.518, 氯化镁 2.447, 硫酸镁 3.305, 氯化钙 1.141, 氯化钾 0.725,

碳酸氢钠 0.202, 溴化钠 0.083, pH 7.0–7.2。枯草芽孢杆菌电转感受态细胞制备用培养基: 生长培养基 GM (g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 山梨醇 90.0, pH 7.2; 复苏培养基 RM (g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 山梨醇 90.0, 甘露醇 70.0; 电击缓冲液 ETM (g/L): 山梨醇 90.0, 甘露醇 92.5, 甘油 100 mL。溶血测试用血琼脂培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, 氯化钠 5.0, 脱纤维羊血 50 mL, 琼脂粉 15.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

氨苄青霉素、氯霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG), 生工生物工程(上海)股份有限公司; Surfactin 标准品, 西格玛奥德里奇贸易有限公司; 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒, 上海捷瑞生物工程有限公司; 高保真酶 KOD-Plus-Neo, 东洋纺

(上海)生物科技有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; 2×*EasyTaq* PCR Super Mix、质粒小提试剂盒、连接酶, 北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶, NEB (北京)有限公司; 甲醇、乙腈, 上海星可高纯溶剂有限公司。

振荡培养箱, 上海旻泉仪器有限公司; 电热恒温培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪, 沃特世公司。

1.2 方法

1.2.1 *B. atrophaeus* C89 中 PPTase 的生物信息学分析

检索 *B. atrophaeus* C89 基因组(JQ687535)^[13]中的 PPTase 序列, 利用 NCBI 对检索到的 PPTase 序列进行 BLAST。通过 DNAMAN 对 BLAST 结果显示为 Sfp 型 PPTase 的 Bap 序列与 2 个已知的 Sfp 型 PPTase 序列进行比对, 这两个编码蛋白分别为来源于真菌 *Evernia prunastri* 的 EppA (ALS87659.1)^[20]和来源于 *B. subtilis* 的 Sfp (BAA09125.1)^[7], 检测 Bap 是否含有 Sfp 型 PPTase 的 3 个保守结构域。

1.2.2 *bap* 基因的克隆和重组表达载体 pHT-bap 的构建

28 °C、180 r/min 培养过夜的 *B. atrophaeus* C89 菌液, 6 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取 *B. atrophaeus* C89 基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 根据 *bap* 基因(675 bp)设计引物进行 PCR 扩增: Fbap (5'-GCTCTAGAAATGAAGATCTATGGAATTTGTATGG-3')和 Rbap (5'-TCCCCCGGGCTATAGCAGCTCTTCATACATTTTC-3'), 下划线为酶切位点。PCR 反应体系(50 μL): 模板(100 ng/μL) 1 μL, KOD-Plus-Neo (1 U/μL) 1 μL, dNTPs (2 mmol/L) 5 μL, MgSO₄ (25 mmol/L) 3 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L)各 1.5 μL, 10×PCR buffer 5 μL, 添加无菌双蒸水至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 68 °C 30 s, 38 个循环; 72 °C 10 min。切胶回收目的片段, 连接到 pEASY-T1

Simple 载体上, 转化大肠杆菌 Trans1-T1。挑转化子送至上海美吉生物医药科技有限公司测序, 得到重组载体, 命名为 T1-bap。

重组载体 T1-bap 用 *Xba* I/*Xma* I 双酶切后回收连接到用同样的酶处理过的 pHT01 上, 转化大肠杆菌 Trans1-T1。挑转化子进行菌落 PCR 检测, 引物为 pHbapF (5'-ATTAAAGGAGGAAGGATCCTCTAG-3')和 pHbapR (5'-CCCGGGCTATAGCAGCTCTTCATAC-3')。PCR 反应体系(25 μL): 2×*EasyTaq* PCR Super Mix 12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 添加无菌双蒸水至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。提取阳性菌株质粒进行电泳检测, 重组质粒命名为 pHT-bap。

1.2.3 重组质粒 pHT-bap 电转化 *B. subtilis* 168

制备 *B. subtilis* 168 电转感受态细胞: 将 *B. subtilis* 168 在 LB 固体培养基上划线, 37 °C 培养过夜。挑单菌落于 5 mL LB 中, 37 °C、200 r/min 培养过夜。将获得的菌液以 1:16 的比例接种于 50 mL GM 中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.85–0.95, 冰浴 10 min。4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。用 40 mL 预冷的 ETM 洗涤菌体, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 去上清, ETM 洗涤 3 次, 将洗涤后的菌体重悬于 500 μL ETM 中, 每管分装 60 μL, -70 °C 保存。

电转实验中实验组为 pHT-bap 质粒, 对照组为 pHT01 质粒。向 60 μL *B. subtilis* 168 感受态细胞中加入 1–6 μL 质粒 DNA, 混匀, 转移至预冷的电转杯(1 mm Gap)中, 冰浴 5 min, 置于电转仪中, 电击条件: 2.0 kV, 25 μF, 200 Ω, 4.5–5.0 ms。电击结束后立即加入 1 mL RM, 37 °C、200 r/min 培养 3 h, 涂布于含氯霉素(终浓度 5 μg/mL)的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养过夜。提取质粒, 电泳检测阳性重组菌 *B. subtilis* 168-bap 和空载对照菌 *B. subtilis* 168/pHT01。

1.2.4 溶血测试检测重组菌 *B. subtilis* 168-bap 合成 Surfactin

挑取 15 个重组菌落 *B. subtilis* 168-bap 点接于

含诱导剂 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 和不含诱导剂的血琼脂抗性平板上, 37 °C 培养 48 h, 通过溶血圈检测重组菌能否合成 Surfactin。

1.2.5 重组菌 *B. subtilis* 168-bap 发酵产物提取及 UPLC-Q/TOF MS 检测

将产生溶血圈的重组菌 *B. subtilis* 168-bap 与对照 *B. subtilis* 168/pHT01 接种于 5 mL LB 抗性培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜。将该菌液以 1:100 比例接种于 300 mL LB 中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.8, 加入终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导目的蛋白表达, 继续培养 36 h, 酸沉淀法^[21]提取发酵产物中的脂肽化合物, 将得到的脂肽化合物和 Surfactin 标准品溶液(1 mg/mL)经 0.22 μ m 有机滤膜过滤, 进行 UPLC-Q/TOF MS 检测。

色谱柱为 BEH C18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), 柱温 50 °C。Surfactin 标准品进样量为 0.2 μ L, 其他样品进样量为 3 μ L。流动相 A: 超纯水, 含 0.1% 甲酸; 流动相 B: 甲醇:乙腈:异丙醇=2:2:1, 含 0.1% 甲酸。梯度洗脱条件为: 0–0.5 min 75% B, 0.5–7.0 min 75%–95% B, 7–9 min 95%–100% B, 流速 0.35 mL/min。质谱离子扫描模式为正离子模式。

2 结果与分析

2.1 *B. atrophaeus* C89 中 PPTase 的生物信息学分析

通过 *B. atrophaeus* C89 全基因组扫描发现, *B. atrophaeus* C89 中有 2 个 PPTase 序列。BLAST 结果显示, 其中长度为 224 个氨基酸的 PPTase 序列为 Sfp 型 PPTase, 将该基因命名为 *bap* (*B. atrophaeus* C89 PPTase, 序列已提交至 GenBank, 登录号为 MH095983), 编码蛋白 Bap。氨基酸多序列比对结果显示, Bap 含有 Sfp 型 PPTase 所特有的 P1 (PYAP)、P2 (GAD) 和 P3 (WSMKESFIK) 3 个保守结构域(图 2)。

2.2 溶血测试检测重组菌 *B. subtilis* 168-bap 能否合成 Surfactin

获得的重组菌 *B. subtilis* 168-bap 在含诱导剂 IPTG 和不含诱导剂的血琼脂平板上培养过夜后, 均长出菌落。继续培养至 48 h, 含诱导剂的平板上产生溶血圈(图 3A), 无诱导剂的平板上不产生溶血圈(图 3B), 说明含 Bap 的重组菌合成了溶血活性化合物 Surfactin。

Bap	EKREKCGREFYHEBDAHRTLLGDMVRSVISEEYGVNKEDIDFFTQEYG..	74
Sfp	EKREKCGREFYHKEDAHRTLLGDMVRSVISRQYQLDKSDIRFSTQEYG..	74
EppA	GERAKVLRFRPSDAKLSLGSNLKRAHATDCRVPWSEAVISEGPNKKP	100
Consensus	r k rfy da l l i	
P1		
Bap	..KPYAFAPFDIDFNLSHSG...RWVTCADAEPTCADTEKMKPIS....	115
Sfp	..KPCIPDLPAHFNLSHSG...RWVTCAFDSQPTCIDIEKTKPIS....	115
EppA	CYKPLAEGSESLFENVSHSGSLVALVGPGQSVNLGVDTVRMNWEKDYAT	150
Consensus	kp p fn sh g v c g di	
P2		
BapLDIAKREFSETEYRDLLSTHKDEQ.....ISYFYHL	146
SfpLEIAKREFSKTEYSLLAKDKDEQ.....TDYFYHL	146
EppA	VMKNGFEAWANLYEMVESDHEIKDIAEFVPPARGTQQDEIRAKLRHEATH	200
Consensus	i fs e d fy	
P3		
Bap	WSMKESFIKQAGKGLSLPLDSFSVRLRQDGRVSVELPENHKPCFIKTYDI	196
Sfp	WSMKESFIKQGRORLIASA.....	165
EppA	WCLKBAYVMTGEALLASWLKDLFRNVQVPLPASQMHASGQVGDDWGQT	250
Consensus	w ke k l	
Bap	DPDYKMAVCAAHSRFPESVVMKMYEELL.....	224
Sfp	165
EppA	CGGVEIWFYGKRVVDVNLEIQAFREDYMIATASSVGMGLSPFKQLDVER	300
Consensus		

图 2 *B. atrophaeus* C89 中 Bap 的序列比对

Figure 2 Sequence alignment of Bap from *B. atrophaeus* C89

注: Sfp (BAA09125.1): 来源于 *B. subtilis*; EppA (ALS87659.1): 来源于 *E. prunastri*; P1、P2、P3 表示 Sfp 型 PPTase 所特有的 3 个保守结构域。

Note: Sfp (BAA09125.1): From *B. subtilis*; EppA (ALS87659.1): From *E. prunastri*; P1, P2, P3 represent the 3 conserved regions of Sfp-type PPTases.

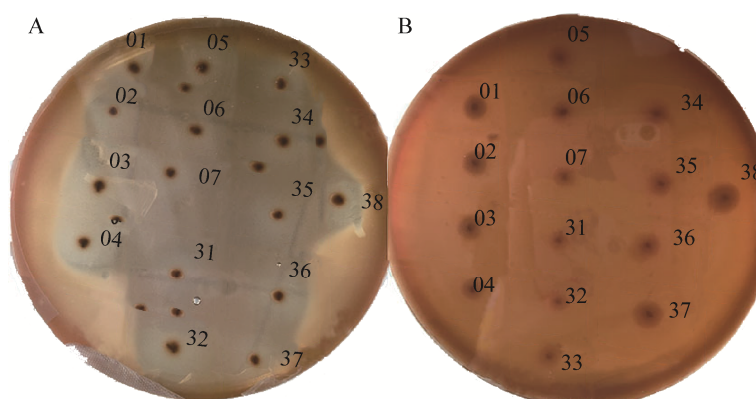


图3 重组菌 *B. subtilis* 168-*bap* 溶血测试

Figure 3 Haematolysis test of recombinant *B. subtilis* 168-*bap*

注: A: 培养基中有诱导剂 IPTG; B: 培养基中无诱导剂.

Note: A: Addition of IPTG to the medium; B: No IPTG in the medium.

2.3 重组菌 *B. subtilis* 168-*bap* 发酵产物提取物 UPLC-Q/TOF MS 检测

MS 测定重组菌 *B. subtilis* 168-*bap* 和 *B. subtilis* 168/pHT01 发酵产物中脂肽化合物的分子量, 并与 Surfactin 标准品的分子量(图 4)对比。结果显示, Surfactin 标准品在保留时间 5.23 min 有一个质谱峰(图 4A), 其对应的 m/z 值($M+H^+$)为 1 036.69 (图 4B)。 *B. subtilis* 168-*bap* 的脂肽化合物在 5.23 min 有对照菌 *B. subtilis* 168/pHT01 没有的质谱峰(图 5A、B), 且其 m/z 值($M+H^+$)为 1 036.69 (图 5C), 说明 *B. subtilis* 168-*bap* 合成了 Surfactin。

3 讨论与结论

PPTase 是非核糖体肽类化合物生物合成途径中重要的调控因子。本研究鉴定了中国南海贪婪

偻海绵共生 *B. atrophaeus* C89 中 Sfp 型 PPTase Bap, 同时构建的重组菌 *B. subtilis* 168-*bap* 能够合成非核糖体肽类化合物 Surfactin, 证实 *B. atrophaeus* C89 的 Sfp 型 PPTase 能在 *B. subtilis* 168 中异源表达, 并能催化宿主中 NRPS 的 PCP 从无活性的脱辅基形态转化为有活性的全辅基形态, 从而启动非核糖体肽类化合物的生物合成。一般认为产 Surfactin 的枯草芽孢杆菌都有 *sfp* 基因^[15], Hsieh 等^[22]甚至以 *sfp* 基因为靶点筛选产 Surfactin 的枯草芽孢杆菌。 *B. subtilis* 168-*bap* 成功合成 Surfactin, 一方面说明 *bap* 基因可以回补 *sfp* 基因的功能, 能够激活 NRPS 的 PCP, 另一方面说明 *B. subtilis* 168-*bap* 具有表达海洋萎缩芽孢杆菌中 NRPS 基因簇的潜能。

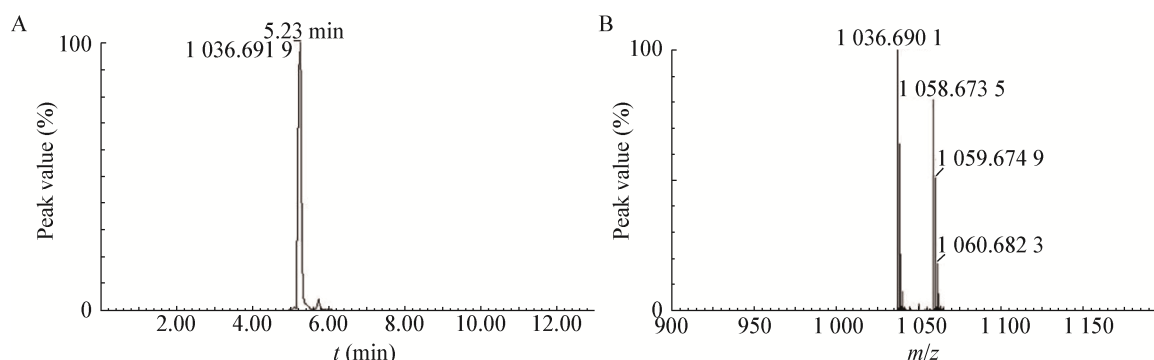


图4 Surfactin 标准品的 MS 检测结果

Figure 4 MS analysis of standard surfactin

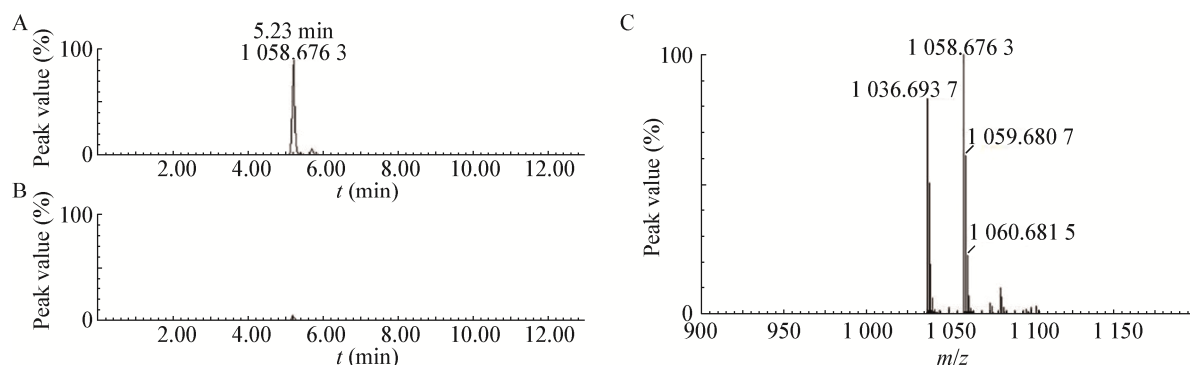


图5 重组菌脂肽化合物的MS检测结果

Figure 5 MS analysis of lipopeptide compounds from the recombinant strains

注：A、C： *B. subtilis* 168-bap 脂肽化合物的MS检测结果；B： *B. subtilis* 168/pHT01 脂肽化合物的MS检测结果。

Note: A, C: MS analysis of lipopeptide compounds from *B. subtilis* 168-bap; B: MS analysis of lipopeptide compounds from *B. subtilis* 168/pHT01.

萎缩芽孢杆菌是一种顽固细菌，难以利用常规分子生物学手段实现外源DNA的遗传转化^[23]，因此难以直接在萎缩芽孢杆菌上进行遗传操作研究其活性化合物的生物合成途径。异源表达是研究萎缩芽孢杆菌中基因的重要手段^[24]。枯草芽孢杆菌被认为是一种安全的微生物，该菌遗传背景清晰，遗传操作较为成熟，是很好的异源宿主^[15]，因此萎缩芽孢杆菌NRPS基因簇异源表达可考虑以枯草芽孢杆菌为异源宿主。本研究构建的重组菌 *B. subtilis* 168-bap 来源于芽孢杆菌异源表达常用模式菌株 *B. subtilis* 168，含有连接了 *B. atrophaeus* C89 Sfp 型 PPTase 基因 *bap* 的重组表达载体 pHT-bap，并能表达具有 Sfp 型 PPTase 生物活性的 Bap。因此，可考虑以 *B. subtilis* 168-bap 为宿主表达海洋萎缩芽孢杆菌的NRPS基因簇并对其进行遗传操作。本研究为海洋萎缩芽孢杆菌NRPS生物合成基因簇的异源表达奠定了基础。

致谢：感谢上海科技大学黄娇芳老师惠赠 pHT01 载体。

REFERENCES

- [1] Faulkner DJ. Marine natural products[J]. Natural Product Reports, 2001, 18(1): 1-49
- [2] Sipkema D, Osinga R, Schatton W, et al. Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cell, or synthesis?[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 90(2): 201-222
- [3] Pimentel-Elardo SM, Grozdanov L, Proksch S, et al. Diversity of nonribosomal peptide synthetase genes in the microbial metagenomes of marine sponges[J]. Marine Drugs, 2012, 10(6): 1192-1202
- [4] Beld J, Sonnenschein EC, Vickery CR, et al. The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life[J]. Natural Product Reports, 2014, 31(1): 61-108
- [5] Yao LD, Wang YY, Fan WM, et al. Substrate specificity of phosphopantetheinyl transferases to carrier proteins in *Streptomyces*[J]. Microbiology China, 2014, 41(6): 1188-1194 (in Chinese)
- [6] Lambalot RH, Gehring AM, Flugel RS, et al. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases[J]. Chemistry & Biology, 1996, 3(11): 923-936
- [7] Quadri LEN, Weinreb PH, Lei M, et al. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases[J]. Biochemistry, 1998, 37(6): 1585-1595
- [8] Sella SRBR, Vandenbergh LPS, Soccol CR. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications - a review[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2015, 35(4): 533-545
- [9] Mwita L, Chan WY, Pretorius T, et al. Gene expression regulation in the plant growth promoting *Bacillus atrophaeus* UCMB-5137 stimulated by maize root exudates[J]. Gene, 2016, 590(1): 18-28
- [10] Jeong SY, Ishida K, Ito Y, et al. Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*[J]. Tetrahedron Letters, 2003, 44(43): 8005-8007
- [11] Yuwen L, Zhang FL, Chen QH, et al. The role of aromatic L-amino acid decarboxylase in bacillamide C biosynthesis by *Bacillus atrophaeus* C89[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 1753
- [12] Yu LL, Li ZY, Peng CS, et al. Neobacillamide A, a novel thiazole-containing alkaloid from the marine bacterium *Bacillus*

- vallismortis* C89, associated with South China Sea Sponge *Dysidea avara*[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2009, 92(3): 607-612
- [13] Liu F, Sun W, Su F, et al. Draft genome sequence of the sponge-associated strain *Bacillus atrophaeus* C89, a potential producer of marine drugs[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(16): 4454
- [14] Tsuge K, Matsui K, Itaya M. Production of the non-ribosomal peptide plipastatin in *Bacillus subtilis* regulated by three relevant gene blocks assembled in a single movable DNA segment[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 129(4): 592-603
- [15] Zobel S, Kumpfmüller J, Süßmuth RD, et al. *Bacillus subtilis* as heterologous host for the secretory production of the non-ribosomal cyclodepsipeptide enniatin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 681-691
- [16] Cosmina P, Rodriguez F, Ferra F, et al. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Molecular Microbiology*, 1993, 8(5): 821-831
- [17] Bernheimer AW, Avigad LS. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1970, 61(3): 361-369
- [18] Liu LX, Gao L, Bie XM, et al. Reconstruction of *Bacillus subtilis* 168 to produce surfactin[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(6): 97-102 (in Chinese)
刘丽霞, 高玲, 别小妹, 等. *Bacillus subtilis* 168 菌株产 surfactin 改造[J]. *南京农业大学学报*, 2014, 37(6): 97-102
- [19] Eppelmann K, Stachelhaus T, Marahiel MA. Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(30): 9718-9726
- [20] Schimming O, Schmitt I, Bode HB. Identification of the Sfp-Type PPTase EppA from the lichenized fungus *Evernia prunastri*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0145624
- [21] Wang S, Gao SF, Gao XW, et al. Fermentation optimization in lipopeptide productivity of *Bacillus subtilis* G1[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2007, 23(4): 342-347 (in Chinese)
王帅, 高圣凤, 高学文, 等. 枯草芽孢杆菌脂肽类抗生素发酵和提取条件[J]. *中国生物防治学报*, 2007, 23(4): 342-347
- [22] Hsieh FC, Li MC, Lin TC, et al. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR[J]. *Current Microbiology*, 2004, 49(3): 186-191
- [23] Aune TEV, Achmann FL. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(5): 1301-1313
- [24] Saini M, Bindal S, Gupta R. Heterologous expression of γ -glutamyl transpeptidase from *Bacillus atrophaeus* GS-16 and its application in the synthesis of γ -D-glutamyl-L-tryptophan, a known immunomodulatory peptide[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 99: 67-76

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连年获得“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2018 年每册定价 80 元, 全年 960 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413