

Streptomyces sahachiroi ATCC 33158 中 II 型聚酮合酶基因 sahA 的功能分析

李 华 鲁慧因 何 璟

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以酮基合酶基因 *KSa* 的简并性引物对 *Streptomyces sahachiroi* 基因组进行扩增, 发现除了已知的阿嗪霉素 B 生物合成基因簇以外, 还存在一个潜在的聚酮合酶(PKS)基因 *sahA*。对 *sahA* 编码的氨基酸序列进行同源性比对及进化树分析, 结果表明, *sahA* 属于 II 型聚酮合酶基因家族, 与合成孢子色素的基因亲缘关系较近。通过单交换中断 *sahA* 基因后, 链霉菌孢子的颜色由铅灰色变为白色, 而产孢时间、孢子的产量以及其抗紫外线的的能力都没有变化, 对抗生素阿嗪霉素 B 的产量也没有影响。初步证实这个潜在的 II 型聚酮合酶基因 *sahA* 很可能与 *S. sahachiroi* 孢子色素的生物合成有关。

关键词 *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158; II 型聚酮合酶; 孢子色素; 进化树分析; 单交换

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)02-0012-06

链霉菌可以产生丰富的次级代谢产物, 其中不乏很多具有重要实用价值的活性天然产物^[1]。直至今日, 人类已经从链霉菌中成功提取了数千种抗生素, 其中由非核糖体多肽合成酶合成的非核糖体多肽类化合物和由聚酮合酶合成的聚酮类化合物多样性最为丰富。聚酮化合物按结构可分为大环内酯类、聚醚类和芳香族类等。因有抗细菌、抗真菌、抗寄生虫、免疫抑制剂和抗肿瘤的生物学活性而具有很高的药用价值。在聚酮链的生物合成过程中, 聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)以类似于脂肪酸合成机制缩合酰基辅酶 A^[2]。目前已知的聚酮合酶依其结构和功能分为三类。I 型聚酮合酶是包含多结构域的模块式多功能酶, 每个结构域负责催化聚酮合成中的一步反应。而 II 型聚酮合酶是可重复使用的多功能酶, 其核心酶部分由酮基合成酶 α 亚基(KS α)、酮基合成酶 β 亚基(KS β)和酰基载体蛋白(ACP)构成, KS α 和 KS β 负责碳骨架的缩合, 同时 KS β 也决定碳链的长度, ACP 则负责在链延伸过程中锚定碳骨架。II 型聚酮合酶可负责合成多种有生物功能的芳香族化合物, 如具有抗癌作用的多柔比星、具有抗菌作用的四环素和放线紫红素等。除此

之外, 在某些链霉菌中, 孢子色素也是由 II 型聚酮合酶负责合成的^[3-4]。而 III 型 PKS 则是由一个单独的 β 酮酯酰合酶构成, 负责合成查尔酮类化合物^[5]。

挖掘新型的链霉菌天然产物是目前链霉菌代谢工程研究的热点。自从 1954 年日本科学家从 *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 的发酵产物中分离得到抗肿瘤药物阿嗪霉素 B 以来, 链霉菌 *S. sahachiroi* ATCC 33158 受到了广泛的关注。随着 *S. sahachiroi* ATCC 33158 中阿嗪霉素生物合成基因簇的发现, 学者们对 *S. sahachiroi* ATCC 33158 的发酵和遗传操作手段做了深入的研究, 使得 *S. sahachiroi* ATCC 33158 中新型次级代谢产物的发现和研究变得较为容易^[6-7]。在研究阿嗪霉素生物合成基因簇的过程中, 在其产生菌 *S. sahachiroi* ATCC 33158 的基因组中还发现了一个潜在的聚酮合酶基因 *sahA*。本研究对这个 II 型聚酮合酶基因的功能及它与阿嗪霉素的生物合成基因簇的相互关系进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1) 菌种和质粒。菌株 *S. sahachiroi* ATCC 33158

收稿日期: 2012-05-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800020, 30970059)、教育部留学回国人员科研启动基金项目([2009] 1590)、教育部新世纪人才支持计划项目(NCET-08-0779)和中央高校基本科研业务费专项(2009PY006)

李 华, 硕士研究生, 研究方向: 微生物天然产物的生物合成. E-mail: lh861218@163.com

通讯作者: 何 璟, 博士, 教授, 研究方向: 微生物来源活性天然产物的生物合成机制和链霉菌的代谢调控. E-mail: hejingji@yahoo.com

购自 American Type Culture Collection(ATCC);克隆宿主大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、接合转移供体菌大肠杆菌 S17-1 和质粒 pOJ260 由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室微生物次级代谢基因工程室收藏;指示菌枯草芽孢杆菌 168 由华中农业大学生命科学技术学院孙明教授馈赠。

2)培养基。大肠杆菌培养基为 LA 固体和 LB 液体培养基,链霉菌培养基为 TSB、YEME、modified ISP-4、PS5 等培养基,其配方见参考文献[8]。

3)主要试剂和仪器。所用抗生素购自 Sigma 公司,限制性内切酶购自 Fermentas 公司,T4DNA 连接酶和 KOD DNA 高保真聚合酶购自 TOYOBO 公司。DNA marker 和 r*Taq*DNA 聚合酶购自东盛生物科技有限公司。普通 DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGEN 公司。TSB 购自 B&D 公司。Southern 杂交试剂盒购自天根公司。其余药物购自国药集团。所用引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,测序反应由华大基因公司负责。其他菌株序列来源于 NCBI。用到的生物信息学软件为 DNASTAR、DNAMAN 和 BioEdit 等。HPLC 色谱柱: Dikma Technologies 公司的 Diamonsil C18(2) 5 U \times 2 504.6 mm;高效液相色谱仪:Waters 公司 e2695/2998;色谱纯试剂购自默克化工。

1.2 分子生物学操作

常用分子生物学方法同参考文献[9]和试剂说明书。地高辛标记 DNA 探针和 Southern 杂交参照产品说明书和文献。*sahA* 简并性扩增引物序列(5'-3') KS α : AGCTCCATCAAGTCSATGRTCGG, KS β : CCGGTGTTTACSGCGTAGAACCGGCG。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 10 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 90 s;68 $^{\circ}$ C 10 min;25 个循环。

链霉菌孢子的培养、观察、收取、计数、大肠杆菌与链霉菌属间接合转移(*S. sahachiroi* ATCC 33158 供体菌为大肠杆菌 S17-1)按照参考文献[8]提供的方法进行。

1.3 单交换菌株的构建

以 *sahA* 特异性引物扩增总 DNA 获得单交换臂约 800 bp,酶切后与处理好的自杀型载体 pOJ260 连接,获得单交换质粒 pMSBFAY1,转化到大肠杆菌 S17-1 中,得到接合转移的供体菌 S17-1/pMSB-FAY1,与受体菌 *S. sahachiroi* 的孢子进行接合转移,获得具有安普拉霉素抗性的单交换突变株

Δ *sahA*。提取野生型和 Δ *sahA* 的总 DNA,进行 *Pst* I 酶切,以单交换臂 DNA 片段为探针,通过 Southern 杂交验证其正确性。

1.4 链霉菌的孢子形态观察

取 PS5 平板上链霉菌的插片样品,每隔 12 h 于 100 \times 光学显微镜观察其产孢情况。

1.5 链霉菌产孢能力

将链霉菌孢子等量接种于 PS5 平板后,培养 6 d,棉签收取孢子悬液后,振荡、过滤、离心、收集溶于等量的 20%甘油,进行稀释涂板计数,3 个重复。

1.6 链霉菌抗紫外能力检测

将过滤收取的孢子,制备成 700/100 μ L 的悬液,取 15 mL 置于平皿中,距离 20 W 紫外灯 60 cm 照射 30 s 后涂板计数,3 个重复,计算其存活率。

1.7 生物活性检测

LB 中过夜培养枯草芽孢杆菌 168,取 0.2 mL 过夜培养物加入到 20 mL 含琼脂 1%的 LA 培养基中,将培养好的链霉菌的菌块放于其上,正置培养 6~8 h 观察。

1.8 阿霉素 B 的发酵、萃取和检测

将一定量的孢子接种于 GYM 平板(30 mL/板)30 $^{\circ}$ C 培养 10 d。平板切碎置于三角瓶中,加等体积的二氯甲烷萃取,将萃取液用无水硫酸钠除水后置于旋转蒸发仪中蒸干,加乙醚保存于 -20 $^{\circ}$ C。HPLC 检测之前溶解于 1 mL HPLC 色谱纯甲醇。检测流动相 A 相为水,B 相为 CH₃CN;0~10 min,80% A/20% B;10~35 min,从 80% A/20% B 到 20% A/80% B;35~37 min,20% A/80% B 到 80% A/20% B;37~40 min,80% A/20% B;流速 0.5 mL/min,检测波长 218 nm。

1.9 生物信息学分析

应用软件 DNASTAR 进行序列比对和引物设计,利用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行序列功能预测及分析,利用 bioedit 进行进化树分析。

2 结果与分析

2.1 *sahA* 的生物信息学分析

利用 II 型聚酮合酶中 KS 基因的简并性引物,对 *S. sahachiroi* 基因组 DNA 进行扩增得到基因 *sahA*(GenBank accession number JQ951948),测序后证实该基因与 II 型 PKS 中的 KS α 基因具有很高

的同源性。将其氨基酸序列与已知的 KS α 作进化树分析(图 1),发现负责孢子色素合成与抗生素合成的 KS α 是由同一祖先向不同方向发展进化形成,

而 *sahA* 在进化上位于负责孢子色素合成的 KS α 类群。因此推测这个潜在的 II 型聚酮合酶基因有可能参与了 *S. sahachiroi* 中孢子色素的合成。

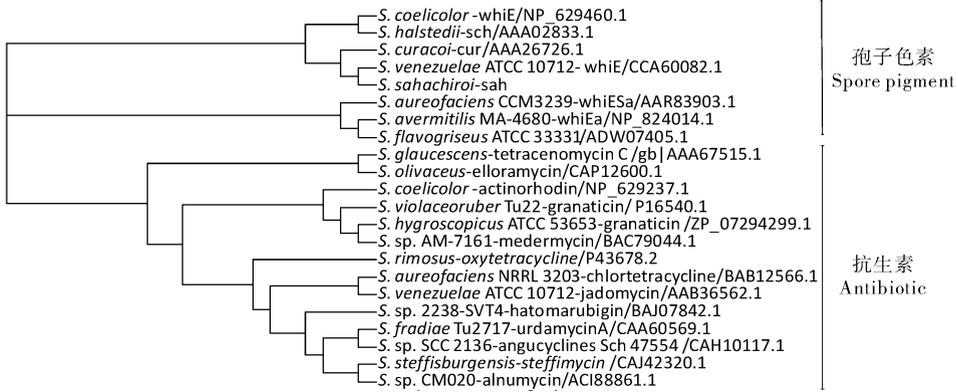


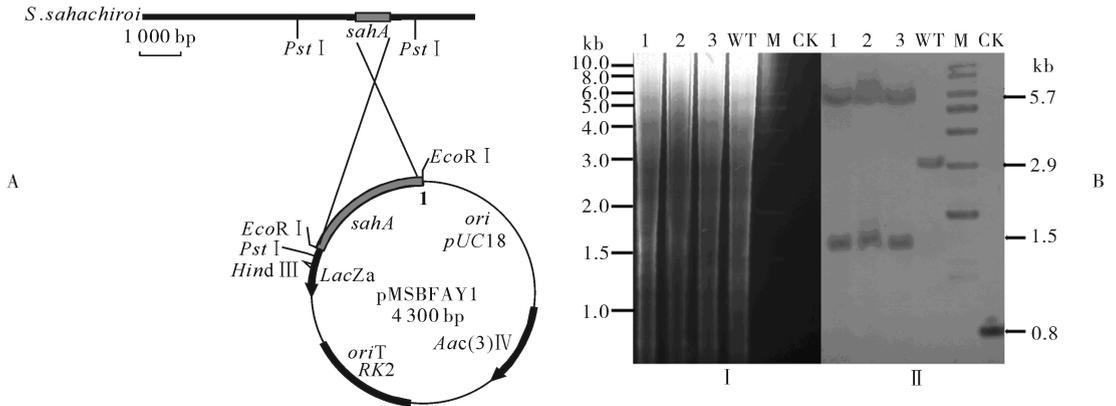
图 1 部分 II 型 PKS-KS α 氨基酸序列同源性进化树分析

Fig. 1 The phylogenetic tree of amino acid sequence of type II PKS

2.2 构建单交换突变菌株 $\Delta sahA$

为了进一步证实该基因的功能,构建了质粒 pMSBFAY1,通过接合转移将其导入 *S. sahachiroi*

中,经过同源交换获得了 *sahA* 的单交换中断突变菌株 $\Delta sahA$,如图 2-A。通过 Southern 杂交对所获得的突变菌株进行验证(图 2-B)。



A:通过单交换获得基因中断突变菌株 $\Delta sahA$; B: $\Delta sahA$ 的 Southern 杂交验证; II 是胶 I 转膜后所得尼龙膜,以地高辛标记的 0.8 kb 大小的 DNA 片段(*EcoR* I 酶切 pMSBFAY1 回收得到)为探针显色后图片。全部总 DNA 样品以 *Pst* I 酶切。由于质粒 pMSBFAY1 是以 0.8 kb 的同源区中断基因组中的 *sahA*,野生型阳性带为 2.9 kb(条带 WT),而单交换株的阳性带为 5.7 kb 和 1.5 kb(条带 1~3)。以 1 kb DNA marker 指示大小(条带 M)。严谨度洗脱:室温,2 \times SSC,2 \times 5 min。A:Schematic representation of the integration of plasmid pMSBFAY1 in the chromosome of *S. sahachiroi* by single crossover to obtain the gene disruption mutant strain $\Delta sahA$; B:Confirmation of the gene disruption mutant $\Delta sahA$ by Southern hybridization. II is the color-developed nylon membrane of Southern transfer of the gel I using dig-dUTP-labeled 0.8 kb DNA fragment recovered from the *EcoR* I. Digestion of pMSBFAY1 (lane CK) as the probes. The genome DNA samples were all digested with *Pst* I. The positive band of 2.9 kb DNA fragment should be shown in wild type strain (lane WT) while two positive bands of 5.7 kb and 1.5 kb DNA fragments should be shown in the gene disruption strains (lane 1-3) because the plasmid pMSBFAY1 was integrated into *sahA* gene region of genome by homologous recombination of 0.8 kb fragment. 1 kb DNA ladder was used as size standard (lane M). Washing stringency: room temperature, 2 \times SSC, 2 \times 5 min.

图 2 单交换 $\Delta sahA$ 的构建

Fig. 2 Obtain the gene disruption mutant strain $\Delta sahA$

2.3 单交换突变菌株 $\Delta sahA$ 的表型观察

将野生型菌株 *S. sahachiroi* 和突变菌株 $\Delta sahA$ 接种于产孢培养基,每 12 h 观察 1 次,比较 2 种菌株的基质菌丝、气生菌丝、孢子丝以及孢子的生长发育状态。发现 $\Delta sahA$ 的孢子颜色为白色,而野生型为铅灰色(图 3),两者形成基质菌丝、气生菌丝、孢子丝的时期基本相同。插片法动态显微观察 *S. sahachiroi* 和 $\Delta sahA$ 的孢子形态和产孢时间,发

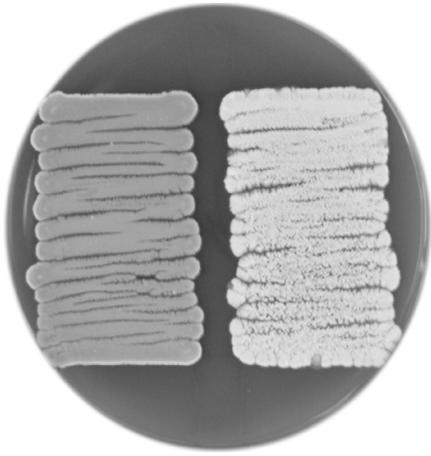


图 3 基因中断突变菌株 $\Delta sahA$ 的表型观察

Fig. 3 Phenotype of $\Delta sahA$ and wild type *S. sahachiroi*

现二者在产孢时间和孢子形态上均无明显区别。孢子计数实验也证实两者在孢子产量上没有明显的区别。基因 *sahA* 的中断导致了孢子颜色的明显变化,表明该基因确实与孢子色素的合成相关。

为了研究 *sahA* 参与合成的孢子色素是否具有抗紫外线的能力,对 *S. sahachiroi* 和 $\Delta sahA$ 的孢子悬液进行紫外线致死试验,结果如表 1。从平行重复的 9 组数据中可以看出缺失了色素的突变菌株与野生型在相同条件的紫外线照射下,存活率没有明显的区别,表明 *sahA* 参与合成的孢子色素没有抗紫外线的功能。

2.4 单交换突变菌株 $\Delta sahA$ 中抗生素产量的分析

据报道当阿维链霉菌中的孢子色素合成基因中断后,阿维菌素的产量明显升高^[10]。这是因为聚酮类的孢子色素与聚酮类抗生素在生物合成过程中可能会竞争底物,当中断其中之一,则另一合成途径的产物量会明显提高。*S. sahachiroi* 所产生阿霉素 B 是聚酮类及非核糖体多肽类杂合型的抗肿瘤抗生素^[6]。为了研究孢子色素的合成途径与阿霉素 B 的生物合成是否存在相互影响,对单交换突变菌株 $\Delta sahA$ 中阿霉素 B 的产量进行了分析。

表 1 *S. sahachiroi* 和 $\Delta sahA$ 的孢子经紫外线照射后的存活率

Table 1 The ability of UV resistant of *S. sahachiroi* and $\Delta sahA$

%

菌株 Strain	存活率 Survival rate								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>S. sahachiroi</i>	41.90	65.30	64.70	35.70	55.70	33.70	56.60	56.10	32.20
$\Delta sahA$	51.40	57.60	63.70	42.70	69.50	35.60	57.90	44.10	43.00

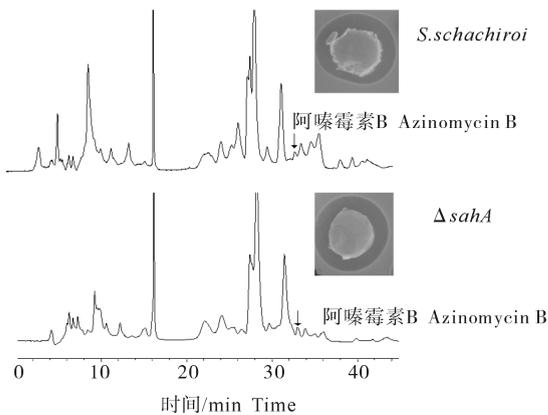


图 4 *S. sahachiroi* 和 $\Delta sahA$ 中阿霉素 B 的产量检测

Fig. 4 The production of azinomycin B in *S. sahachiroi* and $\Delta sahA$

由于 *S. sahachiroi* 对枯草芽孢杆菌 168 的抑菌活性主要来源于它所产生的阿霉素 B,首先对 *S. sahachiroi* 和 $\Delta sahA$ 进行了生物活性检测(图 4)。与野生型相比,中断突变菌株 $\Delta sahA$ 的抑菌活性没有明显变化。进一步的 HPLC 分析证实阿霉素 B 的产量在野生型菌株和突变菌株中无明显区别,说明孢子色素合成的中断对 *S. sahachiroi* 中阿霉素 B 的产量无明显影响。

3 讨论

链霉菌可以产生多种色素,如黑色素、孢子色素、放线紫红素等。这些色素除具有特殊抗紫外线、抗菌的生物学功能外,还有一定的实用性。具有抗紫外线、抗辐射等功能的色素被用于化妆品行业,具

有生物活性的色素被开发应用于医药行业,具有漂亮颜色且安全的色素可用做食品添加剂^[11-13]。

链霉菌中第一个被发现的孢子色素是天蓝色链霉菌的孢子色素,它合成于气生菌丝分化成孢子丝的过程中,是由 II 型聚酮合酶基因簇 *whiE* 负责合成的 II 型聚酮类化合物^[3,14]。通过 Southern 杂交的方法检测到与 *whiE* 同源的孢子色素合成基因簇约存在于一半的链霉菌菌株中^[4,15-17]。除了通过 II 型聚酮合酶途径合成孢子色素外,链霉菌也可以利用其他途径合成孢子色素,如灰色链霉菌中孢子色素是由 III 型聚酮合酶负责合成的^[18]。

本研究通过生物信息学和单交换中断试验证明了从 *S. sahachiroi* 中克隆到的 II 型 PKS 基因 *sahA* 参与了链霉菌孢子色素的合成。对单交换突变株的研究表明,中断孢子色素合成途径对孢子的形成和分化没有明显的影响,说明该孢子色素合成基因不是链霉菌孢子分化发育过程中的必需基因。紫外线致死试验证明这种孢子色素对链霉菌的抗紫外线能力没有作用。同时,试验证实中断孢子色素合成途径对阿霉素 B 的产量没有造成影响,两条次级代谢途径之间没有相互影响,可能原因是阿霉素 B 合成基因簇与孢子色素合成基因簇表达上的时空差异。那么链霉菌中这种广泛存在的 II 型聚酮类孢子色素到底具有什么样的生物学功能? 这一问题的解答还有赖于进一步的深入研究。

不同的链霉菌菌株的孢子颜色往往不同,是链霉菌分类的重要依据^[19]。如天蓝色链霉菌和变铅青链霉菌的孢子呈灰色,而 *S. halstedii* 的孢子呈绿色^[17],推测这些颜色差异来自于孢子色素结构上的不同,这也预示着它们的合成基因簇存在着差异。因此,克隆新的链霉菌孢子色素合成基因簇对探究不同链霉菌孢子颜色之间差异的原因有着重要的意义,同时也有利于从化学结构入手分析和解决孢子色素提取的困难。

参 考 文 献

- MONAGHAN R L, TKACZ J S. Bioactive microbial products: focus upon mechanism of action[J]. Annual Reviews in Microbiology, 1990, 44(1): 271-331.
- HOPWOOD D A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases[J]. Chemical Reviews, 1997, 97(7): 2465-2498.
- CHATER K F. A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*[J]. J Gen Microbiol, 1972, 72(1): 9-28.
- BLANCO G, BRIAN P, PEREDA A, et al. Hybridization and DNA sequence analyses suggest an early evolutionary divergence of related biosynthetic gene sets encoding polyketide antibiotics and spore pigments in *Streptomyces* spp. [J]. Gene, 1993, 130(1): 107-116.
- UEDA K, KIM K M, BEPPU T, et al. Overexpression of a gene cluster encoding a chalcone synthase-like protein confers reddish brown pigment production in *Streptomyces griseus*[J]. Journal of Antibiotics, 1995, 48(7): 638-646.
- DING W, DENG W, TANG M, et al. Biosynthesis of 3-methoxy-5-methyl naphthoic acid and its incorporation into the antitumor antibiotic azinomycin B[J]. Mol Bio Syst, 2010, 6(6): 1071-1081.
- KELLY G T, SHARMA V, WATANABE C M H. An improved method for culturing *Streptomyces sahachiroi*: biosynthetic origin of the enol fragment of azinomycin B[J]. Bioorganic Chemistry, 2008, 36(1): 4-15.
- HOPWOOD D, KIESER T, BIBB M, et al. Practical *Streptomyces* genetics[M]. UK: The John Innes Foundation, 2000.
- SAMBROOK J F E, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 朱娟娟, 陶美凤. 阿维链霉菌孢子色素生物合成对阿维菌素产量的影响[J]. 生物工程学报, 2008, 24(10): 1702-1713.
- DURRELL L. The composition and structure of walls of dark fungus spores[J]. Mycopathologia, 1964, 23(4): 339-345.
- DASTAGER S, LI W J, DAYANAND A, et al. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*[J]. African Journal of Biotechnology, 2006, 5(8): 1131-1134.
- VENIL C K, LAKSHMANAPERUMALSAMY P. An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin[J]. Electronic Journal of Biology, 2009, 5(3): 49-61.
- KELEMEN G H, BRIAN P, FLARDH K, et al. Developmental regulation of transcription of *whiE*, a locus specifying the polyketide spore pigment in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) [J]. J Bacteriol, 1998, 180(9): 2515-2521.
- BERGH S, UHLEN M. Analysis of a polyketide synthesis-encoding gene cluster of *Streptomyces curacoi*[J]. Gene, 1992, 117(1): 131-136.
- NOVAKOVA R, BISTAKOVA J, KORMANEC J. Characterization of the polyketide spore pigment cluster *whiESa* in *Streptomyces aureofaciens* CCM3239[J]. Archives of Microbiology, 2004, 182(5): 388-395.
- BLANCO G, PEREDA A, BRIAN P, et al. A hydroxylase-like gene product contributes to synthesis of a polyketide spore pigment in *Streptomyces halstedii* [J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(24): 8043-8048.
- FUNA N, OHNISHI Y, FUJII I, et al. A new pathway for

polyketide synthesis in microorganisms[J]. Nature, 1999, 400 (6747): 897-899.

coelicolor A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics[J]. Mol Microbiol, 1990, 4(10): 1679-1691.

[19] DAVIS N K, CHATER K F. Spore colour in *Streptomyces*

Functional analysis of a type II polyketide synthase gene *sahA* in *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158

LI Hua LU Hui-nan HE Jing

College of Life Science and Technology/State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract A putative polyketide synthase (PKS) gene *sahA* was found in the *Streptomyces sahachiroi* genome by PCR using degenerated primers for the ketosynthase alpha(*KS α*) gene. The phylogenetic tree and blast analysis revealed that *sahA* was belonged to the type II PKS gene family and closely related with the subgroup of spore-pigment biosynthetic PKS genes. Once *sahA* was disrupted by single crossover, the spores color of *Streptomyces* turned into white from leaden but the time of spore-forming, quantity of sporulation, UV-resistant ability of spores and azinomycin B production had no change. It demonstrated that the putative type II PKS gene *sahA* might be involved in the biosynthesis of *S. sahachiroi* spore-pigment.

Key words *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158; type II polyketide synthase; spore-pigment; phylogenetic tree analysis; single crossover

(责任编辑:张志钰)