

Streptomyces sahachiroi ATCC 33158 中一个Ⅲ型聚酮合酶基因的克隆及功能分析

强慧玲 原海亮 何璟

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 从链霉菌 *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 基因组中克隆到 1 个聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 基因 *orf18*。生物信息及进化树分析表明它可能属于 *rppA* 类Ⅲ型 PKS 基因。通过 RT-PCR 证实了该基因在野生型 *S. sahachiroi* 中是可以进行转录表达的。HPLC 和 LC-MS 分析的结果表明 *orf18* 在 *S. lividans* 中异源表达时可产生 1,3,6,8-四羟基萘 (THN), 并且发现该基因也可以在革兰氏阴性菌 *Pseudomonas stutzeri* 中异源表达并产生明显的棕红色色素。证明 *orf18* 编码的蛋白属于 RppA 类Ⅲ型 PKS, 可催化 THN 的合成, 而产物 THN 在革兰氏阴性菌 *P. stutzeri* 中可进一步氧化及聚合形成棕红色色素。

关键词 链霉菌 ATCC 33158; Ⅲ型 PKS; RT-PCR; 异源表达; 1,3,6,8-四羟基萘

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-0013-08

目前已知的聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 可以分为三类。其中Ⅲ型 PKS 属于查尔酮合成酶, 是一种可重复使用的同源双亚基蛋白, 主要负责单环或双环芳香类聚酮化合物的生物合成^[1]。其合成的代谢产物在植物花色、抗紫外线伤害、防止病原菌侵入、昆虫危害及作为植物与环境互作信号分子方面行使着重要的生物学功能。此外, 该类化合物具有显著且多样的生物学活性, 在人体保健及疾病治疗如抗癌、保护心脑血管、治疗糖尿病等方面有着重要的应用价值^[2]。Ⅲ型 PKS 广泛存在于植物中, 之后在微生物中也有发现, 但是其合成的产物及生物学功能与植物中的Ⅲ型 PKS 迥然不同。

在链霉菌 (*Streptomyces sahachiroi*) 中发现并阐明了合成机制的Ⅲ型 PKS 主要有 4 种, 分别为 DpgA、Gcs、SrsA、RppA。DpgA 的产物作为前体可以参与糖肽类抗生素 vancomycin 和 teicoplanin 家族的合成过程中^[3-5]。Gcs 合成的产物可以抑制孢子的萌发^[6-7]。SrsA 合成的产物可能与细胞膜的合成有关^[8]。RppA 是从灰色链霉菌中发现的Ⅲ型

PKS, 也是最早发现的链霉菌Ⅲ型 PKS。RppA 以丙酰 CoA 为起始物, 催化 4 个碳链延伸反应后, 将五酮基化合物释放并环化成为 1,3,6,8-四羟基萘 (THN), THN 进一步被氧化形成淡黄毒素 (flaviolin), 然后可聚合成各种有色的化合物^[9-10]。

虽然在链霉菌中已经发现了不少 RppA 类Ⅲ型 PKS, 但是在这些Ⅲ型 PKS 的野生型链霉菌中, 通过现有的实验方法都没有检测到其对应的产物 THN 或者 flaviolin。推测其可能的原因在于: (1) 在有些链霉菌中 RppA 类Ⅲ型 PKS 是沉默的; (2) THN 合成后作为前体物质被用于其他的代谢途径^[11]。如, 在灰色链霉菌中可能用于合成与孢子色素相关的化合物^[9], 在红色糖多孢菌中被用于合成可扩散的红色色素及其他添加了糖基的化合物^[12], 在针孢链霉菌 *S. aculeolatus* 中被用于合成抗生素 napyradiomycin^[13]。

本研究从链霉菌 *S. sahachiroi* ATCC 33158 中克隆到的一个可能的Ⅲ型 PKS 基因 *orf18*, 通过 RT-PCR 及异源表达对该基因的功能进行初步研究。

收稿日期: 2012-07-28

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)

强慧玲, 硕士研究生, 研究方向: 微生物天然产物的生物合成。E-mail: qiang_huilin@126.com

通讯作者: 何璟, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物的生物合成。E-mail: hejingjj@yahoo.com

1 材料与方法

1.1 主要试剂

限制性内切酶购于 Fermentas 公司, KOD PCR 试剂盒、RNA 提取试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司, RNA 反转录试剂盒及 T4-DNA 连接酶购于 TOYOBO 公司。DNA maker 及 *rTaq* PCR 试剂盒购于东盛生物科技有限公司。DNA 凝胶回收试剂盒购于 AXYGEN 公司。其余试剂购于国药集团。

1.2 菌株及质粒

S. sahachiroi ATCC 33158 购自 American Type Culture Collection (ATCC); 异源表达宿主 *S. lividans* ZX1 和 *Pseudomonas stutzeri*、克隆宿主大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 及质粒 pWHM4* 和 pJB861 由笔者所在实验室保藏。pGEM-T Easy 质粒购于 TaKaRa 公司。

1.3 培养基

大肠杆菌和 *P. stutzeri* 培养基为 LB 培养基。*S. lividans* 固体培养基为 2CM 培养基^[14], 其组分为: NaCl 1.0 g/L, K₂HPO₄ 1.0 g/L, 可溶性淀粉 10 g/L, 无机盐溶液 1 ml/L, MgSO₄ · 7H₂O 2.0 g/L, 蛋白胨 2.0 g/L, CaCO₃ 2.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/L, 琼脂 22.0 g/L, pH 7.2。无机盐溶液: FeSO₄ · 7H₂O 1.0 g/L, MgCl₂ · 6H₂O 1.0 g/L, ZnSO₄ · 7H₂O 1.0 g/L。原生质体再生培养基为 R5, 发酵培养基为 R2YE。链霉菌的液体培养基为 10.3% YEME 和 TSB。

1.4 *S. sahachiroi* RNA 的抽提及 RT-PCR

将 *S. sahachiroi* 在 TSB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 40 h 后, 抽提 RNA (参照北京百泰克生物技术有限公司高纯总 RNA 快速提取试剂盒)。然后利用 TOYBO 高效反转录试剂盒将提取好的 RNA 进行反转录, 得到 cDNA。引物 ORF18-RT-F (5'-CCG TCG CCG CCG CCG TGG TA-3') 和 ORF18-RT-R (5'-TTG CCG TGG TGG GAG AGG GTG TG-3') 用于检测 *orf18* 的转录, 扩增片段为 340 bp。引物 16S rDNA-RT-F (5'-GGG GTC AAC TCG GAG GAA G-3') 和 16S rDNA-RT-R (5'-AGC GAC TCC GAC TTC ATG G-3') 用于检测 16S rDNA 的转录, 扩增片段为 184 bp, 作为阳

性对照。PCR 条件为: 95 °C 5 min; 98 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.5 *orf18* 的 TA 克隆及异源表达质粒的构建

以链霉菌 *S. sahachiroi* ATCC 33158 总 DNA 为模板, 使用引物 ORF18-F (5'-AAA TCT AGA GGC GAC TCC GGA CAG CAG AAA C-3') 和 ORF18-R (5'-AAA GAA TTC GAG GGA GAA CAG GTG GTG GTC-3') 通过 PCR 扩增完整的 *orf18* 基因及其 RBS。PCR 产物 (约 1.3 kb) 连接到 pGEM-T Easy 载体上进行测序, 验证正确后, 再通过 *Xba* I 和 *Eco*R I 酶切从 pGEM-T Easy 载体上切下来, 克隆到载体 pWHM4* 的 *Xba* I 和 *Eco*R I 位点上, 构建得到异源表达质粒 pMSB-QHL4。

将从 pGEM-T Easy 载体上切下来的 1.3 kb 的 *Xba* I-*Eco*R I 片段, 先克隆到载体 pBluescript SK(+) 中, 然后通过 *Sac* I 和 *Eco*R I 双酶切, 回收 1.3 kb 的 *Sac* I-*Eco*R I 片段。与经过 *Sac* I 和 *Eco*R I 双酶切处理的载体 pJB861 连接后, 得到异源表达质粒 pMSB-QHL6。

1.6 链霉菌原生质体的制备及异源表达质粒的转化

将 50 μ L 变铅青链霉菌的孢子接到 50 mL 质量分数为 34% 蔗糖的 YEME 中, 同时添加 200 g/L 的 Glycine, 使其终质量浓度为 5 g/L, 29 °C 摇床培养 36 h。离心收集菌丝体, 用 10.3% 的蔗糖溶液清洗 3 遍。加入 10 mL P buffer 悬浮, 添加质量浓度为 20 mg/mL 的溶菌酶至终质量浓度为 1 mg/mL, 30 °C 温育 60 min 后, 用 10 mL 移液管吸吹 3 次, 继续温育 15 min; 再添加 10 mL P buffer, 吸吹 3 次, 继续温育 15 min。原生质体通过脱脂棉过滤, 之后离心收集, 用 P buffer 清洗 1 次, 适量 P buffer 悬浮。将 50 μ L 原生质体、3 μ L 质粒 DNA (pMSB-QHL4 和 pWHM4*) 和 200 μ L 25% PEG 1000 混合涂板。原生质体在再生平板 (R5) 上生长 17~18 h, 用终质量浓度为 25 μ g/mL 硫链丝菌素覆盖, 介质为无菌水。覆盖 2~3 d 后可观察到转化子。

1.7 *P. stutzeri* 电化学转化感受态的制备及电转化

将 *P. stutzeri* 菌种在没有添加抗生素的 LA 固体培养基上划线, 在 30 °C 倒置培养 16~20 h。挑取单菌落至 3 mL LB 液体培养基于 30 °C、220 r/min

摇床过夜培养。将过夜培养物以 1 : 100 (V/V) 转接至含 50 mL LB 液体培养基的摇瓶中, 30 °C、220 r/min 摇床培养至 $D_{600\text{ nm}} = 0.60 \sim 0.75$, 立即冰浴 20 min。4 °C 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用预冷过的 10% 的甘油洗涤菌体 3 次, 菌体浓缩 300 倍, 50 μL 分装并用于 1 次转化。将 50 ng (pMSB-QHL6 和 pJB861) 质粒加至感受态细胞中, 轻轻混匀, 转移至预冷的 1 mm 内径的电转杯中, 以 1.2 kV、200 Ω 、25 μF 的条件电击转化。电击后立即加入 1 mL 预冷的 LB 混匀后加至 1.5 mL EP 管, 以 30 °C、220 r/min 摇床培养 2 h, 然后涂布在卡那霉素的终质量浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LA 固体培养基上, 30 °C 倒置过夜培养, 最后挑选转化子抽质粒酶切验证。

1.8 orf18 在 *P. stutzeri* 中的诱导表达

将 *P. stutzeri*/pMSB-QHL6 与 *P. stutzeri*/pJB861 (空白对照) 过夜培养物按照 1 : 100 (V/V) 接种到新鲜的 LB 培养基中, 30 °C 摇床培养至 $D_{600\text{ nm}} = 0.4 \sim 0.6$ 时添加终浓度为 2 mmol/L 3-苯甲酸甲酯 (m-toluate) 后继续培养 8~12 h 后观察。

1.9 orf18 在 *S. lividans* 中的异源表达及产物检测

将菌株 *S. lividans* /pMSB-QHL4 与 *S. lividans* /pWHM4* (空白对照) 分别在 2CM 固体培养基上划单菌落, 30 °C 静置培养 6~8 d, 待其产孢。每个菌株挑取 3 个单菌落分别培养于 5 mL YEME 培养基中, 28 °C 180 r/min 培养 36~40 h。将每个菌株的 3 个平行单菌落培养物分别接入发酵培养基 R2YE 中, 每 50 mL 发酵培养基中接入 2.5 mL 种子培养液, 28 °C、180 r/min, 发酵 5 d。每个样品发酵体积均为 200 mL。发酵结束后, 将发酵液离心、过滤, 取上清, 用等体积的乙酸乙酯萃取。将萃取液旋蒸, 蒸干后溶于 1 mL 色谱纯甲醇溶液中, 过滤后备用。HPLC 检测波长为 330 nm, 流动相为水和乙腈, 流速为 0.5 mL/min, 洗脱条件如下: 0~30 min 乙腈 5%~40%, 30~40 min 乙腈 40%~90%, 40~43 min 乙腈 90%~95%, 43~50 min 乙腈 95%~5%。LC-MS 仪器为 Shimadzu LCMS-IT-TOF, LC 条洗脱件与 HPLC 条件相同, 流速为 0.2 mL/min。MS 条件: 离子化用 ESI, 正离子模式, 扫描范围 m/z 50~500。

2 结果与分析

2.1 orf18 的生物信息学分析

S. sahachiroi ATCC 33158 全基因组测序后, 通过初步的生物信息学分析 (图 1) 发现 1 个 ORF 与合成泛黄霉素前体的酶蛋白 RppA 有很高的同源性。将此基因命名为 *orf18* (GenBank accession number JQ823023)。进一步经生物信息学分析表明, *orf18* 的 G+C 含量为 68%, 编码的蛋白由 387 个氨基酸残基组成, 与灰色链霉菌中的 RppA 蛋白同源性为 60%。

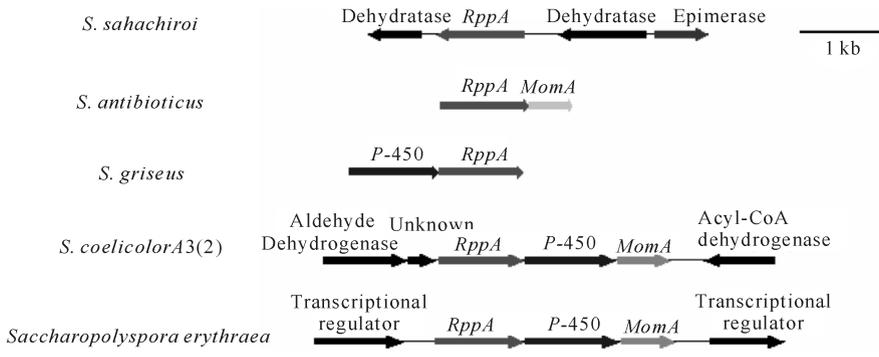
用 Clustalw 2 对 Orf18 进行进化树分析 (图 2)。结果表明, 与植物及其他微生物体内的 III 型 PKS 相比, Orf18 在进化上与链霉菌中的 RppA 类 III 型 PKS 比较接近。因此推测 Orf18 合成的初产物极有可能与 RppA 的一致, 即为 THN。

2.2 RT-PCR 检测 *S. sahachiroi* 中 *orf18* 的转录

到目前为止, 在包含 RppA 类 III 型 PKS 的野生型链霉菌菌株中均未检测到 THN 或者 flaviolin。同样, 我们对野生型 *S. sahachiroi* 的发酵产物进行了 HPLC 和 LC-MS 分析, 也未发现 THN 及其类似物。为了探究 *orf18* 是否为沉默基因, 进行了 RT-PCR (图 3)。以 16S rDNA 为内参, 在液体培养 40 h 后, 在 *S. sahachiroi* 菌丝体细胞中可以明显检测到 *orf18* 的转录产物, 表明 *orf18* 进行了转录表达, 可能具有生物学功能。

2.3 orf18 的克隆及异源表达质粒的构建

首先, 从 *S. sahachiroi* ATCC 33158 的基因组中通过 PCR 扩增得到完整的 *orf18* 基因及其上游的核糖体结合位点 (RBS), 连接到 pGEM-T Easy 载体上进行了测序验证。然后分别克隆到载体 pWHM4* 和 pJB861 中, 得到质粒 pMSB-QHL4 和 pMSB-QHL6 (图 4) 用于异源表达。pWHM4* 为大肠杆菌-链霉菌穿梭载体, 在链霉菌中以高拷贝质粒形式存在。组成型启动子 *PermE* 位于多克隆位点上游, 可以在链霉菌中启动克隆基因的表达。pJB861 为广宿主范围的载体, 可以在很多革兰氏阴性菌中以质粒形式存在, 包含有诱导型启动子 *P_m*, 在诱导物 (m-toluate) 存在时可启动克隆基因的表达。



P-450: P450 氧化酶基因 P450 oxygenase gene; momA: 单加氧酶基因 Monooxygenase gene.

图 1 不同来源的 *rppA* 类 III 型 PKS 基因在基因组中的位置

Fig. 1 Genetic organization of *rppA* loci in *Streptomyces*

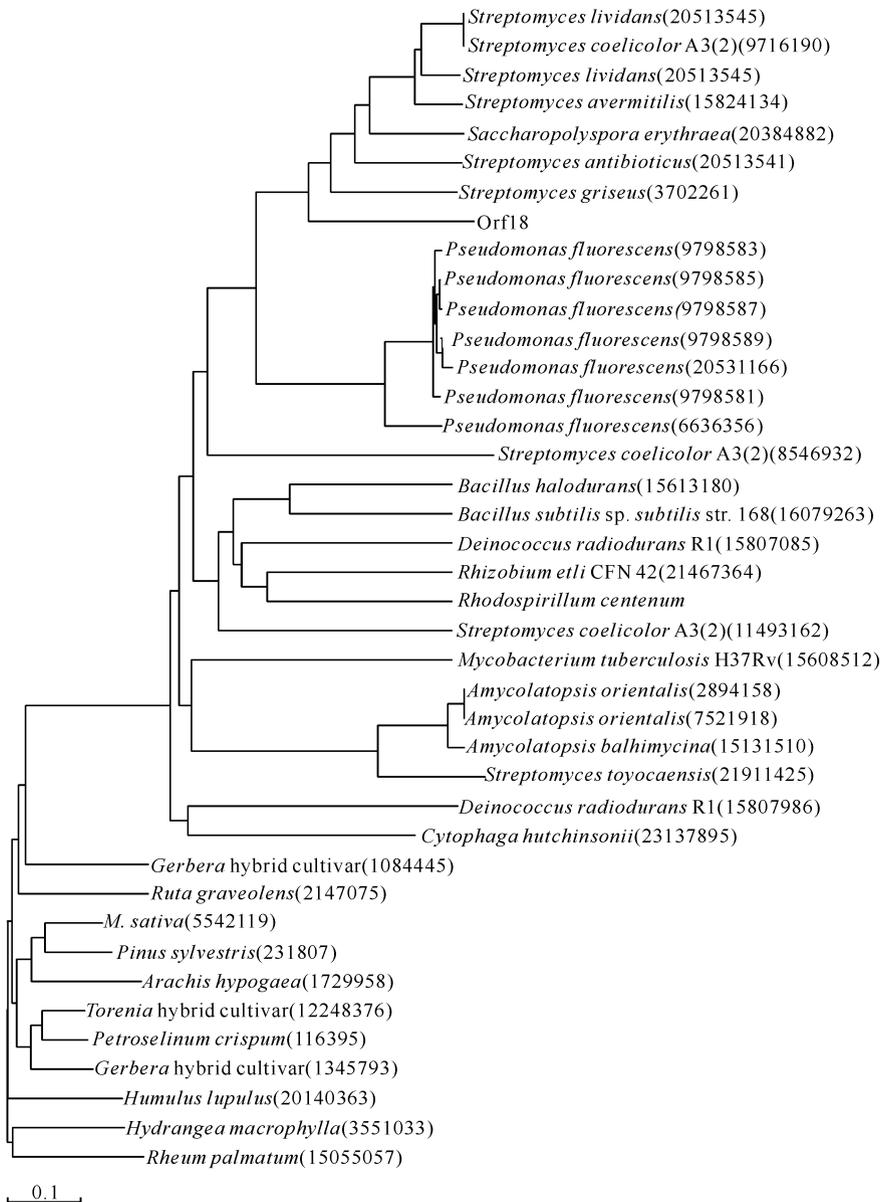
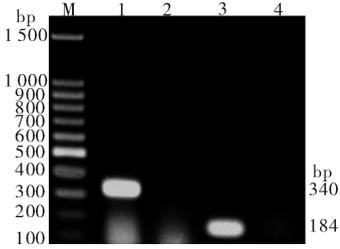


图 2 Orf18 的进化树分析 (Clustalw 2)

Fig. 2 Phylogenetic analysis of Orf18 by Clustalw 2



1. 以 16S rDNA 为模板, ORF18-RT-F 和 ORF18-RT-R 为引物进行 PCR 扩增后的产物; 2. 以 RNA 为模板, ORF18-RT-F 和 ORF18-RT-R 为引物进行 PCR 扩增后的产物; 3. 以 16S rDNA 为模板, 16S rDNA-RT-F 和 16S rDNA-RT-R 为引物进行 PCR 扩增后的产物; 4. 以 RNA 为模板, 16S rDNA-RT-F 和 16S rDNA-RT-R 为引物进行 PCR 扩增后的产物。Lane 1: with ORF18-RT-F and ORF18-RT-R primers and 16S rDNA (Lane 3: with 16S rDNA-RT-F and 16S rDNA-RT-R primers as the positive control) by PCR. RNA sample was also used as template (as the negative control) for PCR with ORF18-RT-F and ORF18-RT-R primers (Lane 2) and 16S rDNA-RT-F and 16S rDNA-RT-R primers (Lane 4). M: 100 bp DNA ladder.

图 3 RT-PCR 检测 *orf18* 转录的胶图

Fig. 3 Electrophoresis analysis of RT-PCR results for transcriptional detection of *orf18*

2.4 *orf18* 在 *S.lividans* 中的异源表达

为进行体外试验, 多次尝试在大肠杆菌中表达及纯化 Orf18, 但都未取得成功, 可能是由于密码子的偏好性造成蛋白表达受阻。为此, 又尝试了在亲缘关系较近的模式链霉菌 *S. lividans* 中进行 *orf18* 的异源表达。将表达质粒 pMSB-QHL4 和空载体 pWHM4* 通过原生质体转化分别导入 *S. lividans* ZX1 后, 进行发酵检测, 未观察到发酵液和菌体有明显的颜色变化。进一步的 HPLC 分析发现与空载体的转化子相比, *S. lividan*/pMSB-QHL4 的样品中在 24.0 min 时出现了一个新的吸收峰(图 5)。LC-MS 分析发现在正离子加氢模式下 24.0 min 时的吸收峰所对应的 *m/z* 为 193. 0489(而对照菌株 *S. lividans*/ pWHM4* 中未检测到该质荷比), 与文献[9]中 THN 对应的 *m/z* 一致。HPLC 和 LC-MS 分析的结果表明, *orf18* 在 *S. lividans* 中异源表达时可催化合成 THN, 从而证明了 *orf18* 编码的蛋白属于 RppA 类 III 型 PKS。

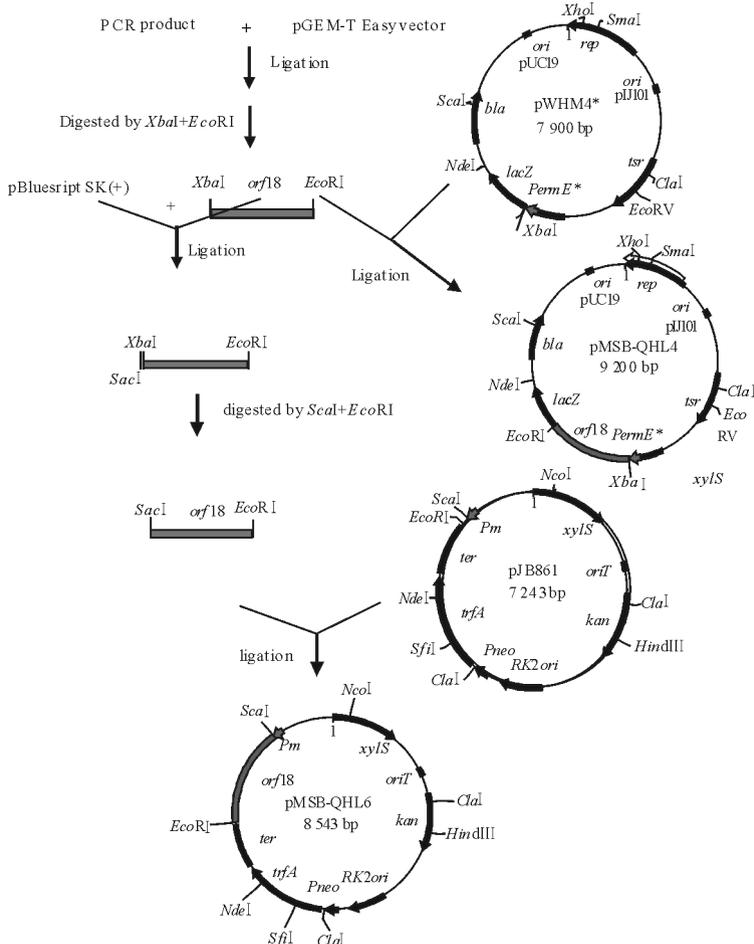


图 4 异源表达质粒 pMSB-QHL4 和 pMSB-QHL6 的构建流程图

Fig. 4 Construction of pMSB-QHL4 and pMSB-QHL6 for heterologous expression of *orf18*

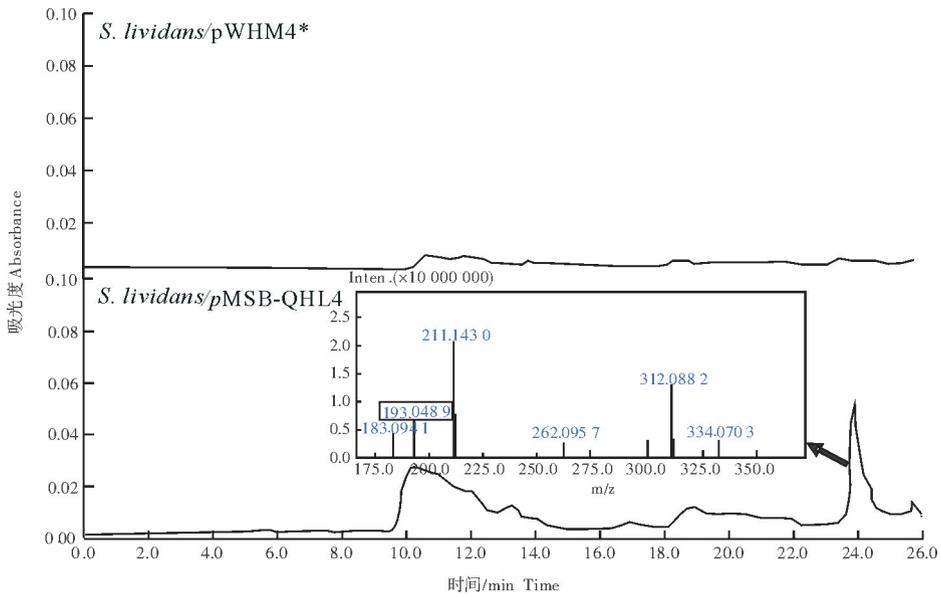


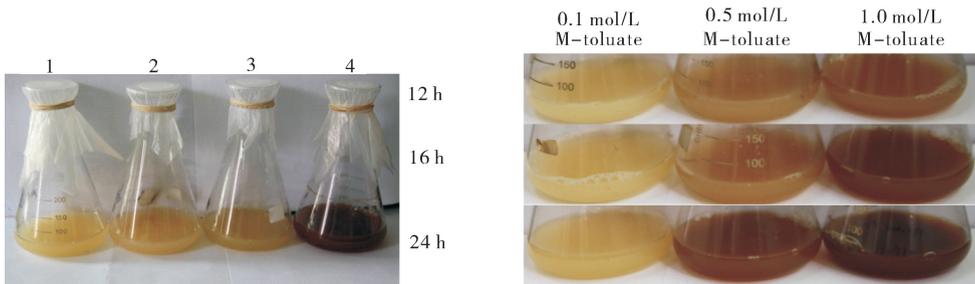
图 5 *orf18* 在 *S. lividans* 中进行异源表达的 HPLC 及 LC-MS 分析

Fig. 5 HPLC and LC-MS analyses of heterologous expression of *orf18* in *S. lividans*

2.5 *orf18* 在 *P. stutzeri* 中的异源表达

据文献[10]报道有些 RppA 类 III 型 PKS 在超量表达时,合成的 THN 可能进一步氧化及聚合形成红色色素物质。随着蛋白表达量的增大,色素物质的含量会随之增加,发酵液的颜色会变得越来越深,有作为报告基因的潜力。所克隆的 *orf18* 虽然可以在 *S. lividans* 中异源表达合成 THN,但并未观察到色素物质的产生。推测可能是由于 THN 含量较低或者是宿主内缺乏相应的氧化和聚合机制。为了检测 *orf18* 的应用潜力,通过电转化将表达质

粒 pMSB-QHL6 和空载体 pJB861 分别导入到异源宿主 *P. stutzeri*。发现经过诱导表达后的菌株 *P. stutzeri*/pMSB-QHL6 可以产生明显的棕红色色素(图 6),并且颜色随着诱导物的增加及培养时间的增长而不断加深,而未诱导的菌株及含有空载体的菌株都没有色素的产生。表明这个从革兰氏阳性菌中克隆得到的基因 *orf18* 可以在革兰氏阴性菌 *P. stutzeri* 中表达,产生棕红色色素,可以作为报告基因在 *P. stutzeri* 中加以应用。



1: *P. stutzeri*/pJB861 未添加诱导剂的发酵液; 2: *P. stutzeri*/pJB861 添加诱导剂后的发酵液; 3: *P. stutzeri*/pMSB-QHL6 未添加诱导剂的发酵液; 4: *P. stutzeri*/pMSB-QHL6 添加诱导剂后的发酵液; 1: *P. stutzeri*/pJB861 without inducer; 2: *P. stutzeri*/pJB861 with inducer; 3: *P. stutzeri*/pMSB-QHL6 without inducer; 4: *P. stutzeri*/pMSB-QHL6 with inducer.

图 6 *orf18* 在 *P. stutzeri* 中的异源表达

Fig. 6 Phenotype of heterologous expression of *orf18* in *P. stutzeri*

3 讨论

本研究在 *S. sahachiroi* ATCC 33158 中发现了一个 III 型 PKS 基因 *orf18*,其编码蛋白与灰色链霉

菌中 RppA 有 60% 同源性。Orf18 具有 III 型 PKS 所特有的保守 CHS-like 功能区域(Cys₂₂₁、Phe₂₇₂、His₃₆₆、Asn₃₈₇),这 4 个保守位点负责底物的脱羧及聚酮链的延伸^[15]。另有文献报道保守位点 Tyr₃₁₂

与起始底物的选择有关,当 Try₃₁₂ 发生突变后, RppA 不再能够以 malonyl-CoA 为起始单位,但是仍然将其用作延伸单位。由此可推断在 RppA 的活性口袋中,起始底物和延伸底物具有相互独立的不同绑定位点^[16]。Orf18 也具有这个保守位点,由此推测 Orf18 利用的起始底物应该也是 malonyl-CoA。一些已报道的 RppA 类 III 型 PKS 基因周围经常会伴有 1 个 P450 氧化酶基因以及 1 个单加氧酶基因(*momA*),可能促进 THN 的氧化形成 flaviolin 及其聚合物^[10]。在 *orf18* 周围并没有发现相关的类似基因,与其相邻的是 2 个脱水酶和 1 个异构酶。相反在 *orf18* 下游 8 086 bp 处有一些 I 型 PKS 基因,这一分析结果不禁让人猜想,Orf18 是否催化合成一个中间体,参与某些天然产物的生物合成。此外,与灰色链霉菌中沉默的 *rppA* 基因不同,通过 RT-PCR 证实 *orf18* 在野生型 *S. sahachiroi* 中是可以进行转录表达的,但是在野生型菌株的发酵产物中却并没有检测到 THN 及其氧化产物 flaviolin。推测 Orf18 的合成产物 THN 可能是某一代谢途径的中间产物,在野生型菌株中 Orf18 合成的 THN 都进入了下一步的代谢过程,没有形成积累,所以达不到检测的水平。为了探究 *orf18* 所参与的合成途径,本研究构建了 *orf18* 的中断菌株,但是目前为止还未发现突变株与野生型在表型及代谢水平上的差异。

本研究虽然在模式菌株 *S. lividans* (革兰氏阳性菌)中成功地进行了 *orf18* 的异源表达得到产物 THN,但并未检测到其氧化产物 flaviolin,这可能与 THN 的产量较低及细胞内氧化还原环境相关。同时,在 *P. stutzeri* (革兰氏阴性菌)中进行了 *orf18* 的异源表达,得到棕红色色素,并且发酵液的颜色与 Orf18 的表达量呈正相关。这一结果表明 *orf18* 可以作为报告基因,用以监测 *P. stutzeri* 中 PKS 基因的表达变化情况;或将目标基因与 *orf18* 进行共表达,通过颜色变化来初步指示目标基因的表达^[17-18]。

参 考 文 献

[1] SHEN B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003,7(2):285-295.

[2] AUSTIN M B, NOEL J P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases[J]. *Nat Prod Rep*, 2003, 20(1):79-110.

[3] POOTOOLAL J, THOMAS M G, MARSHALL C G, et al. Assembling the glycopeptide antibiotic scaffold; the biosynthesis of from *Streptomyces toyocaensis* NRRL15009[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002,99(13):8962.

[4] LI T L, CHORоба O W, HONG H, et al. Biosynthesis of the vancomycin group of antibiotics; characterisation of a type III polyketide synthase in the pathway to (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine electronic supplementary information (ESI) available; electrospray mass spectrum of DhpaS[J]. *Chem Commun*, 2001,20:2156-2157.

[5] CHEN H, TSENG C C, HUBBARD B K, et al. Glycopeptide antibiotic biosynthesis; enzymatic assembly of the dedicated amino acid monomer (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001,98(26):14901.

[6] SONG L, BARONA-GOMEZ F, CORRE C, et al. Type III polyketide synthase β -ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining[J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(46):14754-14755.

[7] AOKI Y, MATSUMOTO D, KAWAIDE H, et al. Physiological role of germicidins in spore germination and hyphal elongation in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) [J]. *J Antibiot*, 2011, 64(9):607-611.

[8] FUNABASHI M, FUNA N, HORINOUCHE S. Phenolic lipids synthesized by type III polyketide synthase confer penicillin resistance on *Streptomyces griseus* [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(20):13983-13991.

[9] FUNA N, OHNISHI Y, FUJII I, et al. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms[J]. *Nature*, 1999, 400(6747):897-899.

[10] FUNA N, FUNABASHI M, YOSHIMURA E, et al. A novel quinone-forming monooxygenase family involved in modification of aromatic polyketides[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(15):14514-14523.

[11] GHIMIRE G P, OH T J, LIOU K, et al. Identification of a cryptic type III polyketide synthase (1, 3, 6, 8-tetrahydroxynaphthalene synthase) from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952[J]. *Mol Cells*, 2008, 26(4):362.

[12] CORTES J, VELASCO J, FOSTER G, et al. Identification and cloning of a type III polyketide synthase required for diffusible pigment biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 44(5):1213-1224.

[13] WINTER J M, MOFFITT M C, ZAZOPOULOS E, et al. Molecular basis for chloronium-mediated meroterpenoid cyclization [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(22):16362-16368.

[14] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. Practical streptomyces genetics [M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000.

[15] FERRET J, JEZ J M, BOWMAN M E, et al. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide bio-

- synthesis[J]. *Nat Struct Biol*, 1999, 6:775-784.
- [16] FUNA N, OHNISHI Y, EBIZUKA Y, et al. Alteration of reaction and substrate specificity of a bacterial type III polyketide synthase by site-directed mutagenesis[J]. *Biochem J*, 2002, 367:781.
- [17] MAGDEVSKA V, GABER R, GORANOVIC D, et al. Robust reporter system based on chalcone synthase *rppA* gene from *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 83(2):111-119.
- [18] GROSS F, LUNIAK N, PERLOVA O, et al. Bacterial type III polyketide synthases: phylogenetic analysis and potential for the production of novel secondary metabolites by heterologous expression in pseudomonads[J]. *Arch Microbiol*, 2006, 185(1):28-38.

Cloning and functional analyses of a putative type III polyketide synthase gene from *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158

QIANG Hui-ling YUAN Hai-liang HE Jing

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China

Abstract A putative type III polyketide synthase (PKS) gene *orf18* found in genome sequence of *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 was cloned and analyzed functionally. Bioinformatics and phylogenetic analyses revealed that *orf18* was highly homologous to *rppA*-like type III PKS gene. RT-PCR result demonstrated that *orf18* can be transcribed into mRNA in wild-type *S. sahachiroi*. HPLC and LC-MS analyses verified that Orf18 catalyzes the 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN) biosynthesis by heterologously expressing in *S. lividans*. Moreover, brownish red pigments could be produced by heterologous expression of *orf18* in Gram-negative bacteria *Pseudomonas stutzeri*. Experimental results demonstrated that Orf18 belongs to the RppA-like type III PKS family and catalyzes THN formation, which could be further oxidized and then polymerized to produce red pigments.

Key words *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158; type III polyketide synthase (PKS); reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR); heterologous expression; 1, 3, 6, 8-tetrahydroxynaphthalene (THN)

(责任编辑:张志钰)