

链霉菌 GEMSM4(6)中聚酮合酶和非核糖体多肽合成酶基因的筛选及克隆

李娜 黄胜 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 链霉菌 GEMSM 4(6)的发酵产物具有抗革兰氏阳性菌和阴性菌的活性,同时还对酵母及丝状真菌尤其是植物病原菌,具有较强的抑制作用。本研究利用简并性引物对该链霉菌基因组中可能存在的聚酮合酶(PKS)和非核糖体多肽合成酶(NRPS)基因进行 PCR 扩增及序列分析,找到了 3 个 NRPS 及 15 个 PKS 基因的片段,其中 PKS 基因与 *Streptomyces violaceusniger* Tu 4113 的 PKS 基因序列同源性最高,达到 91%~99%;而 NRPS 基因与数据库中已知的 NRPS 基因序列同源性仅为 60%~62%。为克隆 NRPS 生物合成基因簇,构建了链霉菌 GEMSM 4(6)的基因组细菌人工染色体(BAC)文库,通过 PCR 筛选得到包含有这 3 个 NRPS 基因的克隆子,为后期的异源表达及基因组发掘分析提供基础。

关键词 链霉菌;聚酮合酶;非核糖体多肽合成酶;简并性引物;细菌人工染色体文库

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)04-0073-07

放线菌是次级代谢产物的主要来源,目前发现的所有来源于微生物的抗生素超过一半是放线菌产生的。更令人吃惊的是,这些抗生素有一大半是由链霉菌属所产生的^[1]。链霉菌可产生种类繁多的天然产物,具有丰富多样的化学结构和生物活性,成为科学家近几十年来研究的热点。随着研究的不断深入,越来越多的天然产物的生物合成基因被克隆及分析^[2-3]。根据对应的生物合成酶的特性,可以将这些作用效果多样、结构纷繁复杂的化合物分为聚酮类、非核糖体多肽类、核糖体合成的寡肽类和氨基糖苷类等几个主要的类群。而聚酮类和非核糖体多肽类是其中最大的两类化合物^[4]。聚酮化合物的合成是通过连续的低级羧酸如乙酸、丙二酸、丁酸等,在聚酮合酶(polyketide synthase,PKS)的作用下脱羧缩合而形成一定长度的聚酮链骨架,然后经过还原、环化、芳香化、糖基化等后修饰,最终形成结构和生物学活性千差万别的聚酮化合物^[5-6]。与常规的蛋白质合成途径不同,非核糖体多肽类化合物通常不是由核糖体合成,也不需要 mRNA 模板,而是由复杂的多酶聚合体系即非核糖体多肽合成酶(noribo-

somal peptide synthetase,NRPS)合成。其组成的单元也不局限于 20 种常见的 L-氨基酸,往往包含各种经过修饰的(甲基化、酰化、糖基化等)稀有氨基酸以及 D-氨基酸类型^[7-8]。

很多 I 型聚酮合酶基因簇和非核糖体多肽合成酶基因簇都比较大(>60 kb)。要想完整地克隆这些基因簇,目前主要有两大技术,Burke 等于 1987 年提出的酵母人工染色体(YAC)克隆技术及由 Shizuya 等^[9]于 1992 年建立的细菌人工染色体(BAC)克隆技术。虽然 YAC 系统克隆片段远大于 BAC 系统,但其存在嵌合体、不稳定、操作困难等缺点^[10-12]。笔者所在实验室构建的 BAC 载体 pMSB-BACs 综合了传统 BAC 载体稳定性好和链霉菌整合型载体的优势,可通过位点特异性整合将所携带的外源基因插入目标宿主染色体中稳定保存下来^[13]。

GEMSM 4(6)是从湖北省土壤中分离获得的 1 株链霉菌,菌落表面光滑、干燥,孢子呈灰色,在培养基上可产明显的棕黄色色素。它的发酵液对枯草芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌、大肠杆菌等革兰氏阳性菌

收稿日期:2014-06-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31270136);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)

李娜,硕士研究生,研究方向:微生物天然产物的生物合成。E-mail: lina574359748@gmail.com

通信作者:何璟,博士,教授,研究方向:微生物天然产物的生物合成。E-mail: hejingji@mail.hzau.edu.cn

和阴性菌有很好的抗菌效果;同时对啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及多种植物病原真菌,如水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、卵菌(*Oomycetes*)、烟草赤星病原菌(*Alternaria alternata*)都有良好的拮抗作用。为了研究及开发该链霉菌的代谢产物,我们在分离鉴定发酵产物的同时对基因组中可能负责次级代谢产物生物合成的 PKS 和 NRPS 基因进行了筛选及克隆。

1 材料与方法

1.1 材料

1)菌种和质粒。链霉菌 GEMSM 4(6)由华中农业大学周啟教授馈赠;大肠杆菌 DH5 α 、DH10B 由笔者所在实验室收藏;质粒 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司;质粒 pMSBBACs 由笔者所在实验室收藏。

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 GEMSM 4(6)液体培养基为 TSB⁺培养基,固体培养基为 M10^[14]。

3)主要试剂。所用引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成;限制性内切酶购自 Fermentas 公司;T4 DNA 连接酶及 KOD DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司;DNA marker 及 rTaqDNA 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;其余试剂均购自国药集团。

1.2 链霉菌 GEMSM 4(6)基因组总 DNA 的提取

将链霉菌 GEMSM 4(6)的孢子悬液接种于 50 mL TSB⁺培养基中,加入 1.25 mL 20%甘氨酸,在 28℃摇床中 160 r/min 培养 72 h;收集菌丝体于 50 mL 无菌离心管中,悬浮于 4 mL 的 TE25S Buffer 中,加入 500 μ L 20 mg/mL 的溶菌酶,振荡打散,37℃温浴 2~3 h,每 30 min 翻转 1 次,直至悬液成乳状。加 2 mL 10% SDS,37℃温浴 30 min,每 5 min 翻转 1 次,直至悬液变澄清。加入 6 mL 苯酚-氯仿混合物振荡 30 s,6 500 r/min 离心 10 min,将上清液转入 15 mL 离心管,重复抽提直到蛋白质去除得比较干净。加入 6 mL 氯仿振荡 30 s,6 500 r/min 离心 10 min。将上清液转入 15 mL 离心管,加 700 μ L 3 mol/L 的乙酸钠和 5 mL 的异丙醇。轻轻旋转离心管,直到 DNA 析出,用枪头将丝状的 DNA 卷起,用 70%乙醇清洗后在空气中晾干。将晾干的 DNA 溶于 500 μ L TE, -20℃保存。

1.3 PKS 及 NRPS 基因的 PCR 克隆

以抽提的链霉菌 GEMSM 4(6)总 DNA 为模板,使用笔者所在实验室收藏的 4 对简并性引物, NR2F: 5'-AWCGAGKSGCCSGGGSMGAAGAA-3' 和 NR2R: 5'-TACACGTCCGGCACSACSGGCAARC-CNAARGG-3'^[15]、KSMA-F: 5'-TSGCSATGGAC-CCSCAGCAG-3' 和 KSMB-R: 5'-CCSGTSCCGTGS-GCCTCSAC-3'^[16]、KS α : 5'-AGCTCCATCAAGTC-SATGRTCGG-3' 和 KS β : 5'-CCGGTGTTSACSGCG-TAGAACCAGGCG-3'^[17] 及 KS2F: 5'-YGSYGC-SARTGCGACTTCG-3' 和 KS2R: 5'-CCGAYCATS-GACTTGATGGAGC-3'^[18] 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为 94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 52~62℃ 30 s, 94℃ 3 min, 72℃ 1 min, 72℃ 10 min, 30 个循环。将扩增得到的 4 个目的片段用凝胶回收试剂盒回收,回收之后与质粒 pMD19-T 用 T4 连接酶 4℃ 过夜连接,第 2 天转化至大肠杆菌 DH5 α 中。待菌落长出后,挑取单克隆摇菌,抽提质粒, Xba I 和 Hind III 双酶切验证;将正确的克隆子送到华大基因公司进行测序。

1.4 BAC 文库的构建

参照文献[19]的方法用低熔点琼脂糖制备链霉菌 GEMSM 4(6)菌丝体的包埋块,将 6 块制备好的包埋块在无菌平皿中用无菌水浸泡 1 h,转移到平铺好的 2 层塑料手套上,用小刀将每个包埋块平切成两半,然后分别将每半块包埋块挑至 1.5 mL 离心管中,加入 10 μ L 10 $\times$ Bam HI Buffer, 40 μ L 无菌水以及不同量的 Bam HI 进行部分酶切。将离心管在冰上放置 30 min,然后在 37℃酶切 20 min 后,立即放入冰浴中,加入 1/10 体积的 0.5 mol/L EDTA 终止反应。选取最佳的部分酶切条件进行大量酶切,使得酶切后的 DNA 片段大小集中在 90~250 kb 之间。通过 PFGE 电泳分离不同大小的酶切片段,将包含有 90~250 kb DNA 片段的凝胶切割下来,然后重新包埋到 1.0%的琼脂糖凝胶中,通过 PFGE 进行第 2 次 DNA 片段的筛选。将第 2 次筛选后的凝胶块切割下来,装入透析袋中并加入适量 1 $\times$ TAE Buffer 进行电洗脱回收。第 1 次筛选的 PFGE 电泳条件为:1~50 s(交变时间)、19 h(电泳时间)、6 V/cm(电压)、120°(脉冲场角度)、14℃(温度);第 2 次筛选的 PFGE 电泳条件为:4 s、18~20 h、6 V/cm、120°、14℃。

1.5 BAC 文库的 PCR 筛选

根据基因片段 F1-1、F1-4、F1-10 分别设计特异性引物 Primer 1f:5'-GCGTTCTGGGAAGTGTGGAT-3' 和 Primer 1r:5'-CGATCTCGTCCGGTTCGATG-3'、Primer 2f:5'-TGGCACCTGCTCAGCGGATGGA-3' 和 Primer 2r: 5'-GGGCGGTGGTCGGTCGATGGTCTG-3'、Primer 3f:5'-GAAAGCACCACTACACCCA-3' 和 Primer 3r: 5'-GCACACGAGGTACATAGCGA-3' PCR 筛选链霉菌 GEMSM 4(6)基因组 BAC 文库。首先筛选混合库,根据筛选结果对应到一块 96 孔板的特定列,再筛选这特定的列,即可得到阳性克隆子。PCR 扩增条件为 94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,54~62 ℃ 30 s,94 ℃ 3 min,72 ℃ 1 min,72 ℃ 10 min,34 个循环。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA 的序列分析

以链霉菌 GEMSM 4(6)总 DNA 作为模板,利用 16S rDNA 简并性引物进行 PCR 扩增,获得约 700 bp 的条带(图 1)。回收并纯化扩增片段,进行测序分析,结果显示链霉菌 GEMSM 4(6)的 16S rDNA 与 *Streptomyces yogyakartensis* NBRC 100779 的同源性最高,达到 99%,表明这 2 个链霉菌的亲缘关系较近。

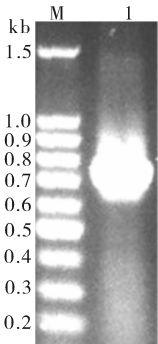
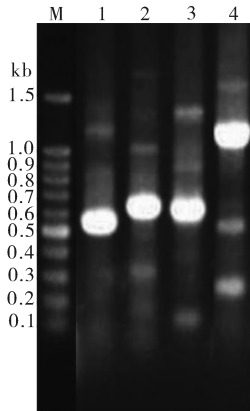


图 1 链霉菌 GEMSM 4(6) 16S rDNA 的 PCR 扩增
Fig.1 PCR amplification of *Streptomyces* sp. GEMSM 4(6) with 16S rDNA primers

2.2 利用简并性引物从链霉菌 GEMSM 4(6)基因组中扩增 PKS 和 NRPS 基因片段

利用 4 对简并性引物 KS2F/KS2R、KS α /KS β 、KSMA-F/KSMB-R 和 NR2F/NR2R 对链霉菌 GEMSM 4(6)基因组中可能存在的 PKS 和 NRPS 基因进行 PCR 扩增,获得了大小分别为 0.6、0.7、0.7和 1.1 kb 的片段,与预期目标条带的大小相符

(图 2)。回收并纯化这 4 个 PCR 扩增片段,进行 TA 克隆,筛选正确的克隆子进行测序分析,结果发现在测序的 36 个克隆子中共获得 3 个 NRPS 及 15 个 PKS 基因的序列信息。其中 PKS 基因与 *Streptomyces violaceusniger* Tu 4113 的 PKS 基因序列同源性最高,达到 91%~99%,而 NRPS 基因与数据库中其他链霉菌的 NRPS 基因序列同源性仅为 60%~62% (表 1)。表明链霉菌 GEMSM 4(6)基因组中可能存在着多个 PKS 和 NRPS 生物合成基因簇,具有产生多种天然活性产物的潜力。



泳道 1~4 所用的引物分别为 KS2F/KS2R、KS α /KS β 、KSMA-F/KSMB-R 及 NR2F/NR2R;以 100 bp DNA marker 指示大小(条带 M)。Lane 1,2,3 and 4 respectively used degenerated primers of KS2F/KS2R, KS α /KS β , KSMA-F/KSMB-R and NR2F/NR2R; 100 bp DNA ladder (Lane M) was used as size standard.

图 2 PCR 扩增链霉菌 GEMSM 4(6)基因组中的 PKS 及 NRPS 基因

Fig.2 PCR amplification of PKS and NRPS genes from *Streptomyces* sp. GEMSM 4(6) genome

2.3 链霉菌 GEMSM 4(6)基因组 BAC 文库的构建

为了克隆这些 PKS 和 NRPS 生物合成基因簇,我们构建了链霉菌 GEMSM 4(6)基因组 BAC 文库,制备链霉菌 GEMSM 4(6)菌丝体的包埋块,进行 *Bam*HI 的部分酶切处理(图 3),选择合适的酶切体系,回收并纯化大小约为 100 kb 的酶切片段,与笔者所在实验室构建的可装载链霉菌大片段 DNA 的 BAC 载体 pMSBBACs 进行连接。转化自制的高效大肠杆菌感受态细胞 DH10B,共获得 BAC 克隆子 2 304 个。从中随机挑取 19 个 BAC 克隆子,抽提质粒 DNA,通过 *Bam*HI 酶切及琼脂糖凝胶电泳进行检测(图 4),发现 BAC 克隆子的插入片段大小均在 80~110 kb 之间,平均插入片段大小为 90 kb,可覆盖链霉菌基因组(约 8 Mb)25.9 倍。

表 1 PKS 及 NRPS 基因片段的测序结果分析
Table 1 Bioinformatics analysis of PKS and NRPS genes

引物 Primer	克隆 Clone	大小/bp Size	同源基因 Homologous genes	相似性/% Similarity
NR2F/NR2R	F1-1	1 023	NRPS [<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> M045]	61
	F1-4	1 099	NRPS [<i>Streptomyces griseus</i> ssp. <i>griseus</i> NBRC 13350]	62
	F1-10	1 190	NRPS [<i>Streptomyces hygroscopicus</i> ssp. <i>hygroscopicus</i>]	60
KSMA-F/ KSMB-R	F3-2	685	Beta-ketoacyl synthase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	94
	F3-4	684	Beta-ketoacyl synthase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	92
	F3-5	683	Polyketide synthase [<i>Streptomyces aureofaciens</i>]	76
	F3-7	685	Beta-ketoacyl synthase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	96
	F3-18	685	Beta-ketoacyl synthase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	93
KS α /KS β	F4-1	685	Beta-ketoacyl synthase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	94
	F4-2	674	Beta-ketoacyl synthase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	97
	F4-3	685	Beta-ketoacyl synthase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	99
	F4-5	688	Beta-ketoacyl synthase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	91
	F4-6	686	Beta-ketoacyl synthase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	95
	F4-7	683	Beta-ketoacyl synthase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	95
	F4-8	680	Beta-ketoacyl synthase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	78
	F4-9	685	Acyl transferase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	95
KS2F/KS2R	F10-3	627	Acyl transferase [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	96
	F10-6	639	Putative keto synthase alpha EncA [<i>Streptomyces maritimus</i>]	97

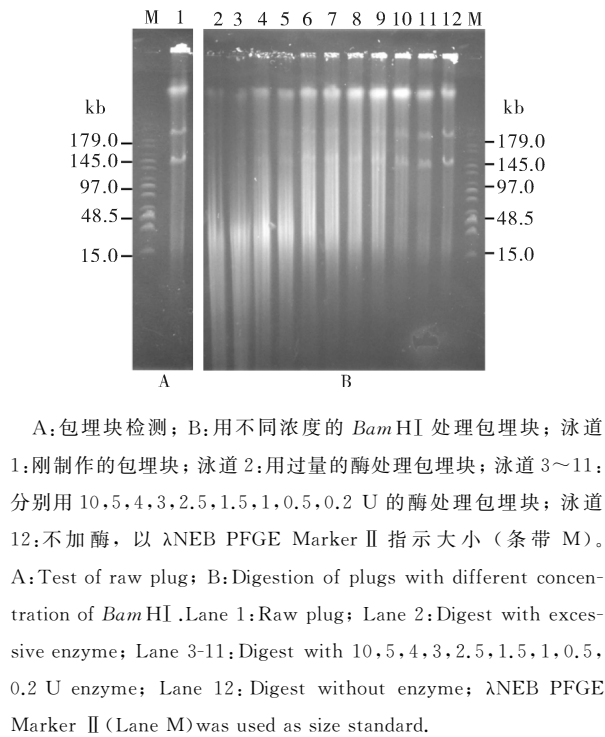


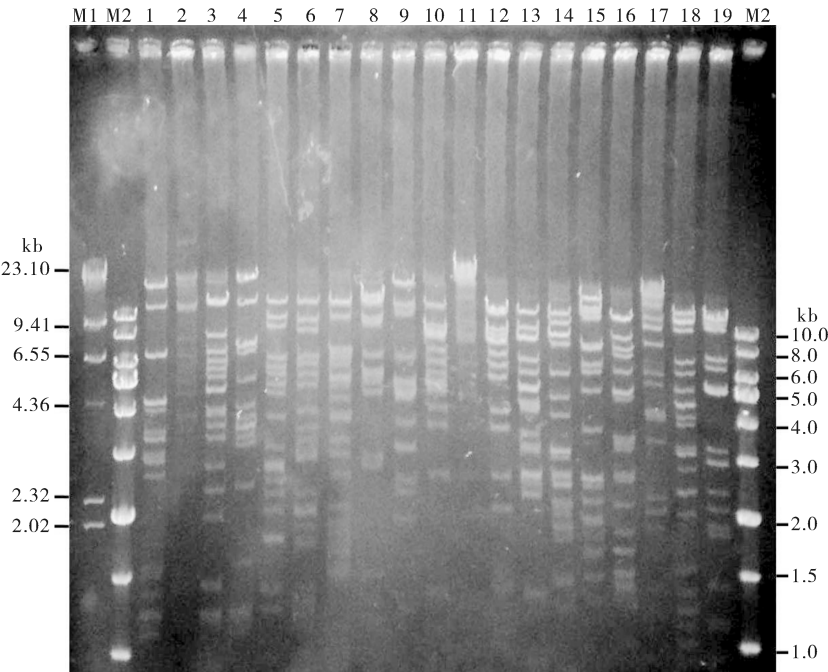
图 3 包埋块脉冲电泳检测
Fig.3 Pulsed field gel electrophoresis
(PFGE) results of plugs

2.4 链霉菌 GEMSM 4(6)基因组 BAC 文库的筛选
从链霉菌 GEMSM 4(6)基因组中克隆得到的 3

个 NRPS 基因与数据库中已知的 NRPS 基因序列同源性仅为 60%~62%,推测它们极有可能来源于新的 NRPS 生物合成基因簇。为了完整地克隆到这些 NRPS 基因簇,我们根据 3 个 NRPS 基因的序列设计了相应的特异性引物,通过 PCR 对链霉菌 GEMSM 4(6)基因组 BAC 文库进行了筛选,分别得到 20、21 和 18 个阳性克隆子(表 2)。*Bam*HI 酶切图谱分析(图 5)的结果显示每组阳性克隆之间存在着较大范围的重叠区域。筛选出来的 3 组阳性克隆子之间没有重复,暗示着 3 个 NRPS 基因分别属于不同的天然产物生物合成基因簇,位于染色体的不同位置。

表 2 从 BAC 文库中筛选得到的阳性克隆

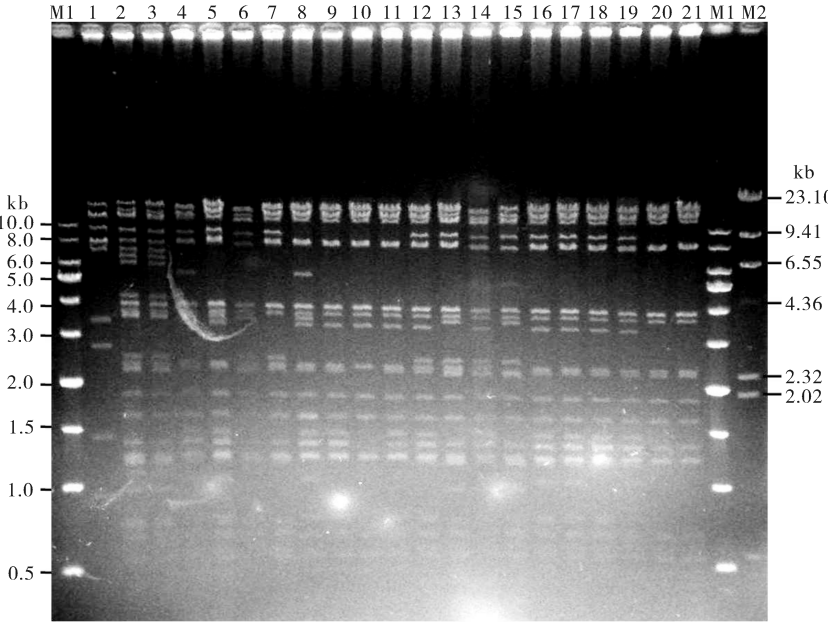
Table 2 Positive clones selected out from the BAC library	
引物 Primers	阳性克隆 Positive clones
Primer 1f/ Primer 1r	1D10, 1F9, 1G3, 1H8, 4F2, 7B8, 8A8, 8H3, 10A7, 11B10, 12C6, 12D7, 12D11, 12F3, 13A1, 13H2, 16B9, 18H10, 20F7, 21E10
Primer 2f/ Primer 2r	2F3, 3H8, 5H3, 6A9, 7C8, 10E1, 11B9, 11H8, 15F9, 15H10, 16C8, 17E7, 18A11, 18H3, 19H11, 20D10, 20G3, 22A3, 22G7, 23B4, 23E7
Primer 3f/ Primer 3r	1E11, 3G2, 3C2, 4C8, 5D5, 7H1, 9A4, 10B12, 10G12, 11F8, 12D4, 13A10, 14G12, 16G3, 18G12, 19C11, 22G11, 24G11



泳道 1~19:从链霉菌 4(6)基因组细菌人工染色体文库中随机挑选的 19 个 BAC 质粒用 *Bam*HI 酶切检测大小;以 λ DNA/*Hind*III marker 及 1 kb DNA marker 指示大小(条带 M1、M2)。Lane 1-19:BAC plasmids randomly selected out from the *Streptomyces* sp. GEMSM 4(6) genomic BAC library; λ DNA/*Hind*III (Lane M1) and 1 kb DNA ladder(Lane M2) were used as size standards.

图 4 BAC 质粒 *Bam*HI 酶切琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.4 Agarose gel of BAC plasmids digested with *Bam*HI



泳道 1~21:用 Primer 2f/2r PCR 筛选到的 21 个阳性 BAC 质粒,以 1 kb DNA marker 及 λ DNA/*Hind*III marker 指示大小(条带 M1、M2)。Lane 1-21:The 21 positive BAC plasmids selected out by PCR with Primer 2f/2r.1 kb DNA ladder(Lane M1) and λ DNA/*Hind*III (Lane M2) were used as size standards.

图 5 阳性 BAC 质粒 *Bam*HI 酶切图谱分析

Fig.5 Agarose gel of positive BAC DNA digested with *Bam*HI

3 讨 论

本研究利用简并性引物从链霉菌 GEMSM 4(6)基因组中克隆到多个 NRPS 和 PKS 基因,其中 NRPS 基因与已知的 NRPS 基因序列同源性较低,因而我们将后期研究的重心放在了 NRPS 基因所在的天然产物生物合成基因簇上。链霉菌来源的天然产物的生物合成基因簇往往都比较大,目前已经克隆到的完整的 PKS 和 NRPS 基因簇绝大多数都在 30~100 kb 的范围内^[20],超过了传统 cosmid 载体的承载范围,因此,我们选择能够承载大片段 DNA 的 BAC 载体系统来构建链霉菌 GEMSM 4(6)的基因组文库。利用 NRPS 基因的特异性引物对 BAC 文库进行 PCR 筛选,获得了预期的阳性克隆子。酶切图谱分析证实这些阳性克隆子的重叠情况非常好,从而进一步证明了我们所构建的 BAC 文库具有较高的质量。

随着基因组学的兴起和迅速发展,很多微生物的基因组都已经被测序。在对众多链霉菌的基因组进行序列分析时,发现链霉菌基因组中往往包含十几个甚至几十个天然产物的生物合成基因簇^[21]。在模式菌株天蓝色链霉菌中除了放线紫红素和十二烷基菌红素以外,还有 19 个次级代谢产物的生物合成基因簇,而在阿维菌素的产生菌除虫链霉菌的基因组中则包含有 25 个次级代谢产物的生物合成酶体系^[22-24]。这些链霉菌的基因组中发现的天然产物生物合成基因簇的数目,远远超过从这些微生物中已经分离到的化合物种类。亦即有为数不少的天然产物生物合成基因在现有实验室的培养和发酵条件下是沉默的,只有在某些特殊的条件下才会被活化并表达出相应的天然产物,或者是由于产量较小而在传统研究中被忽略。因此,这些生物合成基因又被称为“隐形生物合成基因簇(cryptic gene cluster)”,其对应的天然产物称为“隐形天然产物”^[25]。采用分子生物学的方法,如次级代谢产物基因簇的异源表达、插入强启动子活化沉默基因簇及通过表达特异性的调控因子等方法,往往能够激发这些处于休眠状态或沉默状态的基因系统,从而诱导隐形天然产物的产生^[26-28]。通过初步分析,我们发现从链霉菌 GEMSM 4(6)基因组中克隆到的 3 个 NRPS 基因就有可能分别属于不同的天然产物生物合成基因簇。它们有的可能参与了发酵液中活性天然产物的生物合成,有的可能还处于沉默状态。这些

NRPS 和 PKS 基因的表达情况及其与代谢产物的对应关系还有待于进一步异源表达及基因敲除实验的结果。

参 考 文 献

- [1] BERDY J. Bioactive microbial metabolites[J]. *Antibiot J*, 2005, 58:1-26.
- [2] 李华, 鲁慧因, 何璟. *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 中 II 型聚酮合酶基因 *sahA* 的功能分析[J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(2):12-17.
- [3] 强慧玲, 原海亮, 何璟. *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 中一个 III 型聚酮合酶基因的克隆及功能分析[J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(6):13-20.
- [4] WALSH C T, O'CONNOR S E. Polyketide-nonribosomal peptide epothilone antitumor agents: the Epo A, B, C subunits[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30:448-455.
- [5] HOPWOOD D A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases[J]. *Chem Rev*, 1997, 97:2465-2497.
- [6] HOPWOOD D A. Cracking the polyketide code[J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(2):166-169.
- [7] WALSH C T. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility[J]. *Science*, 2004, 303:1805-1810.
- [8] SHAW-REID C A, KELLEHER N L, LOSEY H C, et al. Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization[J]. *Chem Biol*, 1999, 6(6):385-400.
- [9] SHIZUYA H, BIRREN B, KIM U J, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(18):8794.
- [10] ANDERSON C. Genome shortcut leads to problems[J]. *Science*, 1993, 259(5102):1684-1687.
- [11] ZHANG H B, WING R A. Physical mapping of the rice genome with BACs[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 35(1):115-127.
- [12] 王晓虹, 金黎明. 细菌人工染色体文库的构建及应用[J]. *生物技术通讯*, 2005, 16(6):668-671.
- [13] 黄胜, 李娜, 何璟. 适用于链霉菌大片段基因组 DNA 克隆和异源表达的细菌人工染色体(BAC)载体的构建及应用[J]. *微生物学报*, 2012, 52(1):30-37.
- [14] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. *Practical Streptomyces genetics*[M]. UK: John Innes Foundation, 2000.
- [15] LI L, DENG W, SONG J, et al. Characterization of the saframycin A gene cluster from *Streptomyces lavendulae* NRRL 11002 revealing a nonribosomal peptide synthetase system for assembling the unusual tetrapeptidyl skeleton in an iterative manner[J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(1):251-263.
- [16] IZUMIKAWA M, MURATA M, TACHIBANA K, et al. Cloning of modular type I polyketide synthase genes from salino-

- mycin producing strain of *Streptomyces albus* [J]. Bioorg Med Chem, 2003, 11(16): 3401-3405.
- [17] WENDT-PIENKOWSKI E, HUANG Y, ZHANG J, et al. Cloning, sequencing, analysis, and heterologous expression of the fredericamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces griseus* [J]. J Am Chem Soc, 2005, 127(47): 16442-16452.
- [18] LI A, PIEL J. A gene cluster from a marine *Streptomyces* encoding the biosynthesis of the aromatic spiroketal polyketide griseorhodin A [J]. Chem Biol, 2002, 9(9): 1017-1026.
- [19] LUO M Z, WING R A. An improved method for plant BAC library construction [J]. Methods Mol Biol, 2003, 236: 3-20.
- [20] DU L, LOU L. PKS and NRPS release mechanisms [J]. Nat Prod Rep, 2010, 27(2): 255-278.
- [21] CHALLIS G L. Genome mining for novel natural product discovery [J]. J Med Chem, 2008, 51: 2618-2628.
- [22] SONG J Y, JEONG H, YU D S, et al. Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites [J]. J Bacteriol, 2010, 192(23): 6317-6318.
- [23] BENTLEY S D, CHATER K F, CERDEÑO-TARRAGA A M, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. Nature, 2002, 417: 141-147.
- [24] IKEDA H, ISHIKAWA J, HANAMOTO A, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21: 526-531.
- [25] ZAZOPOULOS E, HUANG K, STAFFA A, et al. A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21: 187-190.
- [26] 周俊, 何璟. *Streptomyces sahachiroi* ATCC 33158 中启动子 PaziU1 的克隆及表达 [J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(5): 26-31.
- [27] 白亭丽, 俞燕飞, 徐钟, 等. 变铅青链霉菌高效异源表达宿主 SBT5 的构建 [J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(1): 1-6.
- [28] 郑华亮, 白亭丽, 陶美凤. 大肠杆菌乙酰-CoA 羧化酶基因异源表达对变铅青链霉菌次级代谢的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(4): 12-18.

Screening and cloning of genes of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase from *Streptomyces* sp. GEMSM 4(6)

LI Na HUANG Sheng HE Jing

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

Abstract The fermentation products of *Streptomyces* sp. GEMSM 4(6) have a distinct activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeast and filamentous fungi, especially phytopathogens. Three nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes and fifteen polyketide synthase (PKS) genes were amplified from the genome of this streptomycete with PCR using degenerated primers. Bioinformatics analysis revealed that the PKS genes had highest homology (91%-99% identity) with that in *Streptomyces violaceusniger* Tu 4113, while the NRPS genes only had homology of 60%-62% with known NRPS genes in database. To clone these novel NRPS biosynthetic gene clusters, a genomic bacterial artificial chromosome (BAC) library was constructed and screened by PCR. It will provide a good foundation for heterologous expression and genome mining in the future.

Key words *Streptomyces* sp.; polyketide synthase; nonribosomal peptide synthetase; degenerated primer; bacterial artificial chromosome library

(责任编辑:张志钰)