

# 不同生境放线菌的卤化酶基因分析及其对卤代产物筛选的意义

高鹏, 郝丽君, 朴玉华, 阮继生, 黄英\*

(中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要** 【目的】在基因水平上分析并比较陆地来源与海洋来源的放线菌产生卤化代谢产物的潜力。【方法】基于依赖黄素腺嘌呤二核苷酸的卤化酶基因筛选, 从经过表型去重复的 70 株陆地来源和 71 株海洋来源的放线菌中, 通过 PCR 筛选获得卤化酶基因片段, 并进行测序鉴定; 通过卤化酶氨基酸序列的系统发育分析, 比较不同来源放线菌的卤化酶序列, 以及海洋链霉菌和小单孢菌的卤化酶序列。另外, 对卤化酶阳性菌株进行了聚酮合酶和非核糖体多肽合成酶基因的检测。【结果】本研究中 36.6% 的海洋放线菌具有卤化酶基因, 其阳性率远高于本研究所涉及的陆地放线菌(14.3%); 其中海洋链霉菌的卤化酶基因阳性率高达 69.0%, 而海洋小单孢菌的卤化酶阳性率仅为 14.3%。86.1% 的卤化酶阳性菌株具有聚酮合酶和/或非核糖体多肽合成酶基因。本研究获得的海洋来源的卤化酶序列与已知的卤化酶序列存在明显差异, 在进化树上形成几个新的分支; 其中链霉菌间的卤化酶序列相似性较高, 而小单孢菌间的卤化酶序列差异较大。【结论】海洋来源的放线菌, 尤其是海洋链霉菌, 可作为未来获得新卤化活性物质的一类重要微生物资源。

**关键词:** 卤化酶; 基因筛选; 海洋放线菌; 陆地放线菌; 链霉菌; 小单孢菌

**中图分类号:** Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)10-1367-07

放线菌是生物活性物质、尤其是天然药物的重要来源<sup>[1]</sup>。面对日益严重的病原微生物耐药性, 以及天然药物筛选过程中大量的重复发现, 如何采用新技术、新资源、新模型筛选发现新的活性次生代谢产物, 已成为天然药物开发中亟待研究的重要课题<sup>[2]</sup>。

发现新骨架或新活性化合物需要探索特殊的生物资源。近年来大量研究表明, 植物内生菌是新型代谢产物的一个重要来源<sup>[3-4]</sup>, 如 2002 年 Strobel 等在肯尼亚蛇草中分离到的内生链霉菌中发现了新抗生素 munumbicins<sup>[5]</sup>。海洋微生物则是另一个尚未被充分挖掘的资源宝库<sup>[6-7]</sup>, 放线菌在海洋特殊环

境(高盐、高压、低温、低氧、低光照和寡营养)的选择压力下可能调整其次级代谢过程, 从而产生并积累具有特殊化学结构和生物活性的功能物质<sup>[8]</sup>。1998 年以来, 从海洋放线菌中发现的新药数量连年均超过了陆地放线菌来源的新药。其中以近年来德国和英国科学家合作从小单孢菌科的 *Verrucosipora* 菌株中发现的 abyssomicin C<sup>[9]</sup>, 以及加州大学克利普斯海洋研究所 Jensen 等人从小单孢菌科的 *Salinispora tropica* 中发现的 salinosporamide A<sup>[6]</sup>, 和从链霉菌科的“*Marinophilus*”菌株中发现的 marinomycins A 和 B<sup>[10]</sup>, 最引人注目。

在技术方面, 近年来, 基于结构相似的次生代谢

基金项目: 国家“863 计划”(2007AA09Z420)

\* 通信作者。Tel: +86-10-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn

作者简介: 高鹏(1982-), 男, 新疆乌鲁木齐人, 硕士研究生, 主要从事放线菌次生代谢产物合成基因相关研究。E-mail: pennybryant@126.com

收稿日期: 2009-04-10; 修回日期: 2009-05-07

产物的合成基因簇也有一定程度相似性的假设,基因筛选成为寻找新化合物的重要手段之一<sup>[11]</sup>。通过将特定基因作为筛选标记,可以在基因水平上评估相应菌株的活性物质产生能力,从而筛选到在初始条件下菌株低表达或不表达的活性物质;另一方面,通过对基因筛选所获得的次生代谢产物合成相关基因(簇)进行生物信息学分析,可以初步预测产物结构,在一定程度上避免化合物的重复发现。

放线菌的大部分次生代谢产物是通过聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)和非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)途径形成主要结构模块,而活性产物更重要的一个特性—结构多样性,则是由一类称为后修饰酶的蛋白决定的<sup>[12]</sup>,其中包括卤化酶。卤化作为赋予次生代谢产物生物活性的一种重要修饰行为<sup>[13]</sup>,常常通过依赖黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH<sub>2</sub>)的卤化酶引入。已经发现的卤化物质有4000多种<sup>[14]</sup>,包括具有很高商业价值的氯霉素(chloramphenicol)、万古霉素

(vancomycin)和替考拉宁(teicoplanin)等。2007年,Stefan等人利用卤化酶基因筛选获得了103株卤化酶阳性的放线菌,并据此获得了一个新的糖肽类卤代化合物<sup>[15]</sup>。

本文基于依赖FADH<sub>2</sub>的卤化酶基因筛选技术,对70株陆地来源的放线菌(earth-origin actinomycetes)和71株海洋来源的放线菌(marine-origin actinomycetes)中的卤化酶序列进行了分析与比较,并进一步分析了海洋来源的链霉菌和小单孢菌中的卤化酶序列。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和培养基:**陆地来源的放线菌共70株,活化培养基参照文献<sup>[16]</sup>;海洋来源的放线菌共71株,活化培养基参照文献<sup>[17]</sup>。菌株均由本实验室分离,并经过表型去重复后保藏。菌株来源信息见表1。

表1 菌株来源信息

Table 1 Sources of strains used in this study

Strain category	Source	Number of representatives	Genus	Reference
Soil actinomycetes	Grasslands in Three River Source area (三江源头)	41	<i>Streptomyces</i>	[16]
Endophytic actinomycetes	Terrestrial medicinal plants	29	<i>Streptomyces</i>	[17]
Marine-origin actinomycetes	Mangrove sediments from Hainan Province (海南省)	34	<i>Micromonospora</i>	[18]
Marine-origin actinomycetes	Sea sediments from South China Sea (中国南海)(depth: 1182 meter)	29/8	<i>Streptomyces</i> / <i>Micromonospora</i>	This paper

**1.1.2 主要试剂和仪器:**卤化酶基因特异引物Halo-B4-FW/Halo-B7-RV及PKS/NRPS相关基因扩增引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;PCR扩增相关试剂和凝胶回收试剂盒购自北京博迈德科技发展公司;测序所用的pMD-18T载体购自宝生物工程(中国)有限公司。其余试剂均为国产或进口分析纯。PCR仪和凝胶成像仪分别为美国Bio-rad公司的PTC-200和Gel-Doc 2000。

### 1.2 基因组DNA的提取和PCR扩增

放线菌基因组DNA的提取参照文献<sup>[19]</sup>。用Stefen等人设计的卤化酶特异引物对基因组DNA进行PCR扩增检测<sup>[15]</sup>。对于卤化酶阳性的菌株,用Ayuso等人设计的特异引物PCR检测其PKS和NRPS相关基因<sup>[20-21]</sup>。PCR产物通过1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.3 卤化酶基因测序和序列分析

对卤化酶基因PCR产物进行回收并克隆测序。

测序反应由中国农业科学院作物科学研究所完成。将测得的卤化酶基因序列转换为氨基酸序列,在GenBank数据库中进行BLAST比对分析,并从数据库获取已知卤代产物的卤化酶氨基酸序列,用MEGA 4.0<sup>[22]</sup>软件中neighbour-joining(NJ)方法<sup>[23]</sup>构建系统发育树,含义值为50%,Bootstrap分析的重复次数为1000。所测卤化酶基因序列的GenBank注册号见表2、图1。

## 2 结果

### 2.1 卤化酶在陆地来源和海洋来源的放线菌中的分布

本研究70株陆地来源的放线菌中,10株检测到依赖FADH<sub>2</sub>的卤化酶基因,其中3株来源于土壤样品,7株来源于植物内生菌。71株海洋来源的放线菌中,26株检测到卤化酶基因,其中6株为小单孢菌,20株为链霉菌(表2)。

表2 卤化酶阳性菌株信息

Table 2 Information of the halogenase gene-positive strains

Strain	Genus	Source	GenBank No.	PKS I	PKS II	NRPS	First BLAST hit of the halogenase (Identity/Positive)
xian13	<i>Streptomyces</i> sp.	Soil	FJ457055-56	-	-	-	<i>Nocardia farcinica</i> (78%/85%)
dCY39	<i>Streptomyces</i> sp.	Soil	FJ457057-58	-	+	+	<i>Streptomyces</i> sp. CB2312 (88%/96%)
EH5	<i>Streptomyces</i> sp.	Soil	FJ457059	+	+	+	<i>Streptomyces</i> sp. CB2023 (97%/98%)
B8	<i>Streptomyces</i> sp.	Plant	FJ457041	+	+	+	<i>Amycolatopsis orientalis</i> (67%/81%)
C2	<i>Streptomyces</i> sp.	Plant	FJ457042-43	+	+	-	<i>Streptomyces globisporus</i> (97%/98%)
D2	<i>Streptomyces</i> sp.	Plant	FJ457044-45	+	-	+	<i>Actinosynnema pretiosum</i> subsp. <i>Auranticum</i> (57%/66%)
D22	<i>Streptomyces</i> sp.	Plant	FJ457046-48	+	-	-	<i>Streptomyces globisporus</i> (99%/100%)
D43	<i>Streptomyces</i> sp.	Plant	FJ457049-50	-	-	-	<i>Streptomyces globisporus</i> (100%/100%)
E9	<i>Streptomyces</i> sp.	Plant	FJ457051-52	+	-	-	<i>Streptomyces globisporus</i> (98%/98%)
E36	<i>Streptomyces</i> sp.	Plant	FJ457054	+	-	-	<i>Streptomyces globisporus</i> (100%/100%)
RTII16	<i>Micromonospora</i> sp.	Mangrove sediment	FJ457063-64	-	+	+	<i>Streptomyces</i> sp. CB2023 (71%/85%)
RTIII8	<i>Micromonospora</i> sp.	Mangrove sediment	FJ457065-66	+	+	+	<i>Streptomyces</i> sp. CB2023 (71%/84%)
RTIII72	<i>Micromonospora</i> sp.	Mangrove sediment	FJ457067-68	-	+	-	<i>Streptomyces tendae</i> (69%/82%)
FXJ7.092	<i>Micromonospora</i> sp.	Marine sediment	FJ884225	-	-	-	<i>Streptomyces</i> sp. CB2312 (71%/83%)
FXJ7.097	<i>Micromonospora</i> sp.	Marine sediment	FJ884228	-	-	-	<i>Streptomyces aculeolatus</i> (53%/66%)
FXJ7.098	<i>Micromonospora</i> sp.	Marine sediment	FJ884229	-	-	-	<i>Streptomyces tendae</i> (69%/82%)
FXJ7.071	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884220	+	+	-	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (71%/83%)
FXJ7.074	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884221	+	+	+	<i>Streptomyces aculeolatus</i> (45%/60%)
FXJ7.075	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884222	+	+	+	<i>Streptomyces aculeolatus</i> (46%/60%)
FXJ7.076	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884240	+	+	+	<i>Streptomyces aculeolatus</i> (46%/60%)
FXJ7.077	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884223	+	+	+	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (71%/83%)
FXJ7.091	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884224	-	+	+	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (72%/83%)
FXJ7.095	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884226	+	+	+	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (70%/83%)
FXJ7.096	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884227	+	+	-	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (71%/83%)
FXJ7.102	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884230	+	+	-	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (71%/82%)
FXJ7.103	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884231	+	+	+	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (71%/82%)
FXJ7.109	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884232	+	+	+	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (71%/83%)
FXJ7.112	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884233	+	+	+	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (71%/83%)
FXJ7.113	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884234	+	+	+	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (71%/82%)
FXJ7.116	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884235	+	+	+	<i>Streptomyces aculeolatus</i> (46%/60%)
FXJ7.117	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884236	+	+	+	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (71%/82%)
FXJ7.119	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884237	+	-	+	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (70%/81%)
FXJ7.121	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884238	+	-	-	<i>Streptomyces aculeolatus</i> (45%/60%)
FXJ7.123	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884239	+	+	+	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (70%/82%)
FXJ7.129	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ884219	+	+	-	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (71%/82%)
FXJ7.023	<i>Streptomyces</i> sp.	Marine sediment	FJ457061-62	+	+	+	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> (70%/82%)

卤化酶基因分布分析初步表明,本研究陆地来源的放线菌中,卤化酶基因阳性率为14.3%;其中土壤放线菌中,卤化酶基因阳性率仅为7.3%,低于一些文献报道<sup>[15]</sup>,而在植物内生菌中,卤化酶基因阳性率达24.1%。本研究海洋来源的放线菌中,卤化酶基因阳性率为36.6%;其中小单孢菌的卤化酶基因阳性率仅为14.3%,接近于本研究陆地来源的

放线菌,而海洋链霉菌的卤化酶基因阳性率达69.0%,远高于其它来源的放线菌。

## 2.2 卤化酶基因阳性菌株的 PKS 和 NRPS 相关基因分析

为进一步证明卤化酶基因阳性菌株具有合成卤代产物的潜力,对本研究获得的卤化酶阳性菌株分别进行了 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因的检测,结果

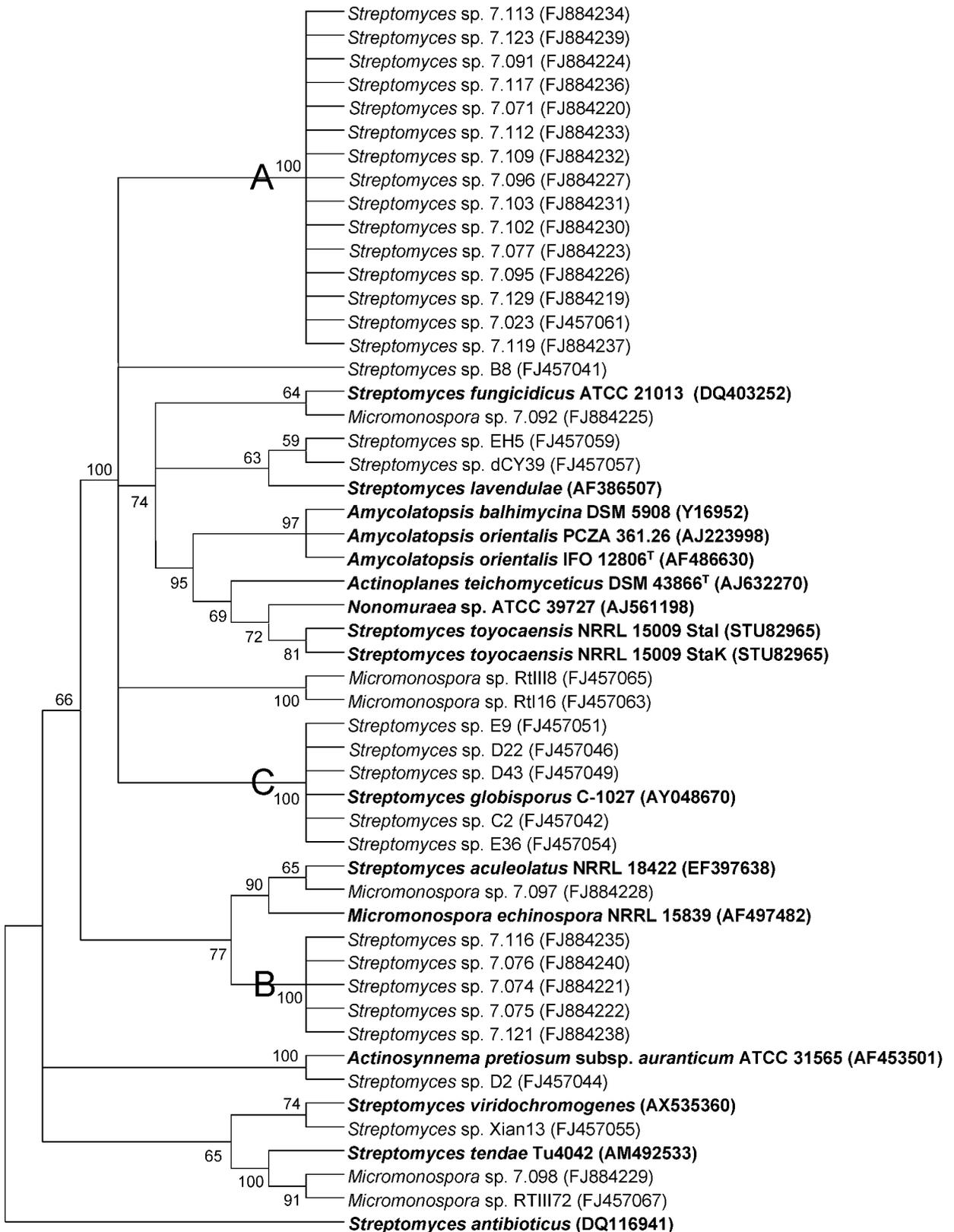


图 1 依据实验菌株(白体)与已知卤化物产生菌(黑体)的卤化酶基因氨基酸序列构建的系统发育树

Fig. 1 Neighbor-joining tree based on halogenase amino acid sequences of isolates (normal) and known halometabolite-producing strains (bold), the cut-off value for condensed tree is 50%. Numbers in parentheses represent the GenBank sequence accession numbers. Percentage bootstrap values based on 1000 resampled datasets are shown at the nodes; only values above 50% are given.

见表2。在36株卤化酶阳性菌株中,PKS I、PKS II和NRPS基因的发生率分别为75.0%、69.4%和58.3%,其中31株(86.1%)具有聚酮合酶和/或非核糖体多肽合成酶基因,预示着这些菌株有产生相关卤化次生代谢产物的潜力。

### 2.3 卤化酶氨基酸序列的系统发育分析

将本研究获得的卤化酶基因氨基酸序列与数据库中合成已知卤代产物的卤化酶氨基酸序列构建了系统发育树(图1)。结果表明,本研究获得的多个卤化酶序列和已知卤代产物的卤化酶序列有明显差异,形成了多个与已知卤化酶序列距离较远的新分支。陆地来源的放线菌中,3株土壤放线菌的卤化酶序列与已知序列差异不显著;其中*Streptomyces* sp. EH5和*Streptomyces* sp. dCY39与2007年文献报道的卤化酶相似性较高<sup>[15]</sup>。7株植物内生放线菌中,有5株的卤化酶序列相似性较高,紧密地聚为一个分支(分支C),且相似于*Streptomyces globisporus* C-1027的卤化酶序列;内生放线菌*Streptomyces* sp. B8与已知卤化酶序列有明显差异。

海洋来源的放线菌中,20株海洋链霉菌的卤化酶序列明显区别于已知序列,聚类在两个新的大分支里(分支A、B),但各分支内的菌株间序列相似性较高,6株海洋小单孢菌之间的卤化酶序列相似性较低,分散在进化树的不同位置,其中2株菌(R1118和R1116)形成一个独特的新分支。综上所述,本研究的海洋链霉菌的卤化酶序列普遍不同于已知的卤化酶序列,由于卤化酶具有底物特异性,推断其很可能催化合成新的卤代产物。

## 3 讨论

通过对70株陆地来源的放线菌和71株海洋来源的放线菌进行卤化酶基因的筛选鉴定与分析,本研究获得了一系列新的依赖于FADH<sub>2</sub>的卤化酶序列,并发现不同来源的放线菌中卤化酶基因的发生率和新颖程度都存在较大差异。三江源土壤链霉菌的卤化酶阳性率明显低于报道<sup>[15]</sup>,可能与其土壤性质有关;相比之下,本研究中植物内生放线菌的卤化酶基因阳性率较高,且个别菌株的卤化酶序列明显区别于已知序列,说明植物内生放线菌可以作为筛选卤代产物的有效菌种资源。

有学者曾认为海洋环境分离到的放线菌也存在于陆地环境中或来源于陆地,因此海洋放线菌的次生代谢产物的新颖性受到怀疑<sup>[24]</sup>。2006年发现的

盐孢菌属(*Salinispora*)是第一个海洋专一性的放线菌属<sup>[25]</sup>,对海洋放线菌的研究具有里程碑式的意义。近年来,从海洋放线菌中陆续发现的salinosporamide A等一系列新的活性化合物也证明海洋是一个非常具有潜力的资源宝库<sup>[6,9-10]</sup>。对于卤化代谢产物,尽管目前发现的卤代产物多为陆地来源,如万古霉素、氯霉素等,但海洋是最大的生物有机卤素来源<sup>[14]</sup>,加之海洋环境中特殊的选择压力<sup>[8]</sup>,使得人们有理由推测从海洋来源的微生物中更容易分离到新的卤代产物。

本研究通过在基因水平上分析比较陆地来源和海洋来源的放线菌产生卤化代谢产物的潜力,发现所涉及的海洋来源的放线菌的卤化酶基因阳性率明显高于陆地来源,其中88.5%的海洋卤化酶阳性菌株具有聚酮合酶和/或非核糖体多肽合成酶基因。进化分析进一步表明本研究中海洋放线菌的卤化酶大多在氨基酸序列上与已知卤化酶明显不同,预示着其产生新的卤代产物的潜力。本研究首次从基因水平上为推论—从海洋放线菌中更容易分离到新的卤代化合物,提供了证据。

另一方面,本研究中海洋链霉菌的卤化酶基因阳性率明显高于海洋小单孢菌,并且(1)海洋来源的链霉菌中卤化酶发生率非常高,但其卤化酶相似性也较高,这可能说明,作为优势放线菌的链霉菌在海洋中更易发生基因横向转移,我们推测其可能产生结构相似的代谢产物,有待进一步的实验证明;(2)3株来自深海海泥的小单孢菌含有明显不同的卤化酶序列,但均不含聚酮合酶或非核糖体多肽合成酶基因,这可能意味着特殊环境中稀有放线菌的产抗能力部分丢失,或者可能存在与常规途径截然不同的次生代谢合成系统。

近十几年的研究结果表明,海洋环境中存在着巨大的放线菌资源宝库<sup>[6-10,26]</sup>。海洋放线菌在所处环境和代谢途径上与陆地放线菌有很大不同,人类在陆地资源开发陷入瓶颈之际,应更多地关注新生境、新资源给天然药物开发带来的活力。

致谢 感谢广东省微生物研究所朱红惠研究员提供海泥样品。

## 参考文献

- [1] Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics* (Tokyo), 2005, 58(1): 1-26.

- [ 2 ] Newman DJ, Cragg, GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. *Journal of Natural Products*, 2003, 66(7): 1022 – 1037.
- [ 3 ] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(2): 257 – 268.
- [ 4 ] Strobel G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(3): 240 – 244.
- [ 5 ] Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*, 2002, 148: 2675 – 2685.
- [ 6 ] Fenical W, Jensen PR. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2(12): 666 – 673.
- [ 7 ] Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, et al. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 5005 – 5011.
- [ 8 ] Lam KS. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(3): 245 – 251.
- [ 9 ] Bister B, Bischoff D, Strobele M, et al. Abyssomicin C-A polycyclic antibiotic from a marine *Verrucospora* strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angewandte Chemie*, 2004, 43(19): 2574 – 2576.
- [ 10 ] Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, et al. Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus “*Marinispora*”. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(50): 16410 – 16410.
- [ 11 ] Challis GL. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology*, 2008, 154: 1555 – 1569.
- [ 12 ] Rix U, Fischer C, Remsing LL, et al. Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports*, 2002, 19(5): 542 – 580.
- [ 13 ] Neumann CS, Fujimori DG, Walsh CT. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(2): 99 – 109.
- [ 14 ] Gribble GW. Natural organohalogens: a new frontier for medicinal agents. *Journal of Chemical Education*, 2004, 81(10): 1441 – 1449.
- [ 15 ] Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski A, et al. A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources. *Chembiochem*, 2007, 8(7): 757 – 766.
- [ 16 ] 马腾, 王雪薇, 阮继生等. 三江源地区不同退化程度草地的土壤放线菌区系. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2008, 35(12): 1879 – 1883.
- [ 17 ] 古强. 西双版纳药用植物内生放线菌的多样性及分类研究.“中国科学院微生物研究所”+“学位论文”. 2006.
- [ 18 ] Qiu DH, Ruan JS, Huang Y. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17): 5593 – 5597.
- [ 19 ] Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, et al. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. Norwich: John Innes Foundation, 1985.
- [ 20 ] Metsä-Ketela M, Salo V, Halo L, et al. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 180(1): 1 – 6.
- [ 21 ] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1): 10 – 24.
- [ 22 ] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596 – 1599.
- [ 23 ] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406 – 425.
- [ 24 ] Goodfellow M, Haynes JA. Actinomycetes in marine sediments//Ortiz-Ortiz L, Bojalil LF, Yakoleff V. Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes. New York: Academic Press Inc. 1984: 453 – 472.
- [ 25 ] Maldonado LA, Fenical W, Jensen PR, et al. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 1759 – 1766.
- [ 26 ] Prieto-Davo A, Fenical W, Jensen PR. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquatic Microbial Ecology*, 2008, 52(1): 1 – 11.

## Analysis of the halogenase gene in actinomycetes from different habitats and its implications for halometabolite discovery

Peng Gao, Lijun Xi, Yuhua Piao, Jisheng Ruan, Ying Huang\*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract [ Objective ]** To compare the halometabolite producing capability between actinomycetes of earth origin and marine origin, based on genetic screening of the 1,5-dihydroflavin adenine dinucleotide (FADH<sub>2</sub>-dependent) halogenase gene. **[ Methods ]** We used 141 actinomycete isolates that were dereplicated by phenotype, 70 of earth origin and 71 of marine origin, and obtained halogenase gene fragments from them by PCR screening. We then sequenced the PCR products and analyzed corresponding amino acid sequences phylogenetically. We made further comparison of the halogenase sequences between actinomycetes of different origins, and between marine-origin streptomycetes and marine-origin *Micromonospora* isolates. In addition, we detected polyketide synthase (PKS) and non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) genes by PCR in the halogenase gene-positive isolates. **[ Results ]** We observed higher occurrence of the halogenase gene in marine-origin actinomycetes (36.6%) than in earth-origin actinomycetes (14.3%), and in marine-origin streptomycetes (69.0%) than in marine-origin *Micromonospora* isolates (14.3%). Most (86.1%) of the halogenase gene-positive isolates contained PKS and/or NRPS genes. Moreover, the halogenase sequences of marine-origin isolates differed largely from the known ones, and clustered into a couple of distinct clades in the phylogenetic tree. In addition, we found greater diversity of the halogenase genes in marine-origin *Micromonospora* isolates than in marine-origin streptomycetes. **[ Conclusion ]** Based on the results of this study, we propose that actinomycetes, especially streptomycetes, from marine habitat could serve as a good source for new bioactive halometabolite discovery in the future.

**Keywords:** halogenase; genetic screening; marine-origin actinomycetes; earth-origin actinomycetes; streptomycetes; *Micromonospora*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA09Z420)

\* Corresponding authors. Tel: +86-10-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn;

Received: 10 April 2009/Revised: 7 May 2009

### 《微生物学报》答作者问——关于审稿

问:我想知道我的稿件的处理状态,如何查询?

答:您可以登录网上查稿区,输入您的用户名、密码,即可查询到审稿状态,如果不是太明白远程中获取的信息,您也可以通过 e-mail 询问,请注意务必要提示稿件编号,编辑部会在收到您的来信的 1 个工作日内及时给予回复。

问:我想尽早得到审稿结果,或者提前发表,有没有好的办法能使审稿老师快点。比如我们增加审稿费等方法?

答:如上述所言,我们已经告知了本刊处理稿件的程序和大致时间进度。

- (1) 在作者向我刊投稿之前,应详细了解我刊的规定。审稿人评审一篇文章,并给出谨慎的评审意见是需要一定时间的。所以,作者在投稿之前应该留出足够多的时间给编辑部,以便于进行评审。我们的承诺是在 2 个月之内给予答复,5~7 个月之内刊出。
- (2) 如要求提前发表,请在投稿的同时提出书面报告,说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性,经过我刊编委会讨论并通过后,可予提前刊出,无需另加任何费用。