

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(4):472-477; 4 April 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

基于活性和基因从海洋微生物中筛选烯二炔类抗生素

裴刚^{1,2#}, 代焕琴^{1#}, 任彪^{1,2}, 刘向阳¹, 张立新^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

(² 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:【目的】高质量的海洋微生物菌种库及其天然产物库是新药开发的重要来源。在本研究中我们通过筛选新的烯二炔类抗生素来对已经构建的海洋微生物天然产物库进行质量评价。【方法】首先我们根据烯二炔类抗生素能引起 DNA 断裂的活性构建了活性筛选模型, 并对我们的天然产物库进行筛选; 其次根据合成烯二炔核心结构的独特且保守的重复 I 型聚酮合成酶设计了引物, 通过 PCR 扩增的方法对海洋微生物库进行序列筛选。【结果】通过活性筛选从我们的海洋微生物天然产物库中获得一个阳性的发酵产物。对该阳性菌(LS481)的系统发育学分析表明该菌属于能产生烯二炔类化合物—Dynemicin 的 *Micromonospora chersina*, 对其发酵产物 TLC 分析证明该菌确实产生 Dynemicin 类化合物。通过基因筛选得到了 2 个具备合成烯二炔核心结构聚酮合成酶的菌株, 16S rRNA 基因分析显示其中一个很可能为灰色链霉菌(MS098), 另外一株菌则同 *Streptomyces vinaceus* NBRC 13425^T 和 *Streptomyces cirratus* NRRL B-3250^T 最相近。【结论】我们的活性筛选模型能够有效获得烯二炔类物质, 结合基因筛选能够进一步获得可能产生烯二炔物质的菌株。初筛结果也再一次验证了我们海洋微生物天然产物库的质量较好。

关键词: 烯二炔类抗生素; 高通量筛选; 重复 I 型聚酮合成酶

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0472-06

微生物次生代谢产物是药物的重要来源, 在抗感染和抗肿瘤领域超过 50% 的药物都来源于或者衍生自天然产物^[1]。所以构建一个高质量的微生物库及天然产物库是保证筛选成功的前提和关键, 而如何对构建的微生物库以及天然产物库进行质量评价则是摆在我们面前的重要问题^[2]。目前的质量评价方式主要是对代谢产物的多样性, 如分子量, 化学结构等的多样性, 以及代谢产物的丰度进行评估, 然而却无法反映活性化合物出现的几率, 因此对我们构建的海洋微生物天然产物库进行活性筛选可以反映我们天然产物库的质量。

烯二炔类(Enediyne)抗生素是微生物产生的,

也是迄今为止发现的抗肿瘤活性最高的天然化合物, 这个家族中的一些成员的活性比目前临床上经常使用的抗肿瘤抗生素-阿霉素还高 5000-8000 倍以上^[3]。烯二炔所有成员都拥有一个由双键偶联两个炔键构成的烯二炔核心结构, 根据核心结构大小不同, 分为两类: 九元环烯二炔类和十元环烯二炔类^[4]。烯二炔极强的活性主要依赖于其新颖的 DNA 损伤机制, 而这一机制损伤则是由烯二炔独特的分子结构决定的。

C-1027 和 Calicheamicin 合成基因簇的阐明揭示, 无论九元烯二炔还是十元烯二炔其核心结构都是由一个独特的重复 I 型聚酮合成酶(PKSE)合成

基金项目: 科技部国际科技合作项目(2007DFB31620); 国家“863 计划”(2007AA09Z443); 中国科学院方向性项目(KSCXZ-YW-G-013)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-62566511; E-Mail: Zhanglixin@im.ac.cn

作者简介: #对文章具有同等贡献。裴刚(1985-), 男, 河南信阳人, 硕士研究生; 代焕琴(1974-), 女, 博士, 主要从事天然产物化学以及高通量筛选

收稿日期: 2009-10-20; **修回日期:** 2009-11-11

的^[5-7]。据此, Liu 等根据负责烯二炔核心结构的保守序列设计了兼并引物用来扩增 PKSE^[8]。Farnet 等运用基因组扫描的方法发现以前没有报道产生烯二炔的放线菌中具有合成烯二炔核心结构的 PKSE, 并通过优化发酵培养基最终从这些菌种得到烯二炔类物质^[9]。

尽管烯二炔类抗生素缺乏组织特异性并且具有很大的毒性, 但是临床上可以通过靶向给药以降低其毒性。如 Calicheamicin 同 CD33 抗体连接靶向治疗急性白血病。所以筛选新的高效的烯二炔类物质对于开发新的抗肿瘤药物是非常有意义的。微生物天然产物是药物的重要来源, 我们实验室已经构建了一个高质量的海洋微生物天然产物库, 并从中筛选到一些有潜力的化合物^[10-11]。在本实验中我们利用烯二炔类抗生素独特的活性构建了一个高通量的烯二炔活性筛选模型, 希望从我们的微生物天然产物库中得到新颖的烯二炔类物质; 并且我们又根据负责合成烯二炔核心结构的 PKSE 的保守序列设

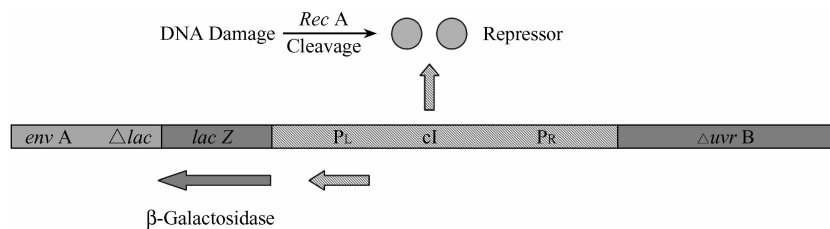


图1 大肠杆菌 BR513-80 的基因型

Fig. 1 The genotype of *Escherichia coli* BR513-80.

产烯二炔类抗生素的阳性菌马杜拉放线菌 *Actinomadura madurae* AS 4. 1224^T 和 *Actinomadura verrucosospora* AS 4. 1512^T 均为中国科学院微生物所菌种保藏中心赠送。阿维链霉菌 *Streptomyces avermitilis* 和天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 则为本实验室保藏。

1.1.2 培养基和溶液: ①大肠杆菌 *Escherichia coli* BR513-80 的生长培养基为 LBE 培养基, E-salt 及 Z-buffer 等配制均按照参考文献^[12]。②放线菌活化均采用通用的高氏一号培养基。③ M3 培养基: 每升含 10 g 玉米淀粉, 5 g 药煤, 1 g 碳酸钙, 0.05 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg NaI。

1.1.3 主要试剂和仪器: 分子生物学常用酶购自大连宝生物; 4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸 (4-Methylumbelliferyl β -D-glucuronide, MUG) 购自 AppliChem, 其为 β -半乳糖苷酶的底物, β -半乳糖苷酶将糖苷键断裂从而释放出荧光基团 MU, 通过检测荧光判断 β -半乳糖苷酶的活性^[13]; 酶标仪为

计引物, 以期用序列筛选的方法对我们的微生物菌种产烯二炔物质的潜力进行评估。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 活性筛选指示菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BR513-80。该菌含有溶源性 λ 噬菌体, 并且通过基因改造将 β -半乳糖苷酶放在 λ 噬菌体 pL 启动子的下游。溶源性 λ 噬菌体在正常情况下并不会裂解, 而是会随着大肠杆菌生长一起复制, 但是在某些特殊情况下如, 烯二炔类抗生素能引起大肠杆菌的 DNA 损伤, 引起 SOS 效应, 使溶源性 λ 噬菌体脱离溶源过程而进入裂解过程, 从而启动了 pL 启动子使得 β -半乳糖苷酶得以表达 (图 1)。通过添加该酶的底物, 检测颜色或者荧光变化就可以判断 β -半乳糖苷酶活性, 进而判断是否存在烯二炔类物质^[12]。

EnVision Multilable Reader (PerkinElmer, USA); PCR 仪为 TaKaRa PCR Thermal Cycler。

1.2 海洋微生物天然产物库制备

首先将在 -80°C 甘油管中保藏的海洋微生物菌悬液在高氏天冬素培养基上活化, 待长出菌落后, 挑单菌落接入高氏一号液体培养基中, 28°C , 200 r/min 培养 2-4 d; 吸取 1 mL 上述种子液至 6 种不同的发酵培养基中, 28°C , 200 r/min 培养 7 d; 发酵完成后将发酵液倒入 50 mL 离心管中, 再加入 2 mL 的 HP20, 振摇 4 h 使之充分吸附, $6000 \times g$ 离心 5 min, 去除残余的液体; 然后冷冻干燥 24 h, 向干燥后的 HP20 和菌体中加入 6 mL 甲醇, 振摇 4 h, $6000 \times g$ 离心 5 min, 收集甲醇萃取液; 然后分别分装到 96 孔深孔板和浅孔板中, 挥干, 加入 DMSO 备用。

1.3 基于烯二炔类物质活性的高通量筛选模型

取 10 μL 冻存的 *E. coli* BR513-80 接入 5 mL LBE 培养基中, 200 r/min, 37°C 过夜培养。然后将过夜培养物用 LBE 培养基稀释至 $OD_{600} 0.05$, 继续

培养至 OD_{600} 为 0.1–0.15。在 96 孔板中每孔加入 2 μL 的待试样品,然后均加入 80 μL 上述培养物。将该 96 孔板放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 3 h。由于丝裂霉素 C 能引起双链 DNA 的交联,导致 SOS 效应,因而采用丝裂霉素为对照。在透明底黑色 96 孔板中加入 80 μL 的 Z-buffer,25 μL MUG(1 mg/mL) 以及 30 μL 上述 96 孔板中的培养物。室温下放置 15 min,最后加入 30 μL 的 1M 碳酸钠终止反应。然后用酶标仪测定 360 nm 波长激发下 460 nm 的荧光强度。

1.4 放线菌 DNA 提取以及系统发育学分析

放线菌的基因组 DNA 提取均按照 Pospiech 等^[14]的方法。提取好的基因组 DNA 检测 $OD_{260/280}$, 应保证其大于 1.8。

16S rRNA 基因扩增引物为 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')。PCR 反应体系采用的是 25 μL 的反应体系,其中包括每个引物均为 0.4 μL ,2.5 μL 10 \times buffer,2.5 μL 的 2.5 nmol/L dNTP,0.3 μL DNA 聚合酶及 0.3 μL DNA。PCR 程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,回收后连接至 T 载体,转化,测序。所得序列提交 GenBank 注册,获取序列号,然后用 CLUSTALX 进行多重序列比对,并运用 MEGA 4.0 采用邻位相连法构建系统发育树^[15-17]。系统发育树选用 Bootstrap 验证,重复次数为 1000。

1.5 合成烯二炔核心结构 PKSE 的 KS-AT 区引物设计

合成烯二炔核心结构的 PKSE 中的 KS,AT 区是最核心最保守的区域,所以我们针对 KS-AT 区设计引物。首先根据已知的合成烯二炔核心的 I 型聚酮合成酶的 KS-AT 区的氨基酸序列,如 MadE, EspE, SgcE, DynE 和 CalE8 等,用 ClustalX 软件对上面的序列进行比对确定保守区域(DLTHWLAL 和 VSHAFHSP,分别对应于 MadE 的第 90 位氨基酸和第 770 位氨基酸),然后针对这些区域根据密码子编码规则并考虑密码子偏爱性设计了如下简并引物,用于扩增烯二炔核心的 PKSE 的 KS-AT 区,PCR 扩增产物片段大约 2 kb。引物由北京赛百盛公司负责合成。PKSEF: 5'-GACCTSACSCACTGGCTSGCSCT-3'; PKSER: 5'-GTGGAASGCGTGSSGTACSGCSAG-3'。

1.6 PCR 扩增负责合成烯二炔核心结构的聚酮合成酶 KS-AT 基因片段

扩增反应体系采用 25 μL ,体系中含有引物 0.4 μL ,12.5 μL 2 \times GC buffer I,2.5 μL 的 2.5 nmol/L dNTP,0.3 μL rTaq DNA 聚合酶以及 0.3 μL DNA。PCR 程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,5 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,每个循环降低 0.5 $^{\circ}\text{C}$,共 25 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,共 5 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。所得序列提交 GenBank 注册,获取序列号。

2 结果和讨论

2.1 基于活性模型的筛选结果

利用丝裂霉素 C 为阳性对照,对所建的高通量活性筛选模型的可靠性进行了考察,按照文献^[18]测得 Z' 因子和信噪比分别为 0.752(大于 0.5 接近 1) 和 14.485(大于 8),显示了该模型具有很好的一致性和可靠性。利用该筛选模型,对本室微生物天然产物库中的 8000 个粗提物进行了筛选,获得了一个阳性天然产物。该阳性产物为 LS481 在 M3 培养基中的发酵产物,其能够导致大肠杆菌 BR513-80 产生 SOS 效应,诱导 β -半乳糖苷酶的表达,在添加 β -半乳糖苷酶底物 MUG 后其荧光与 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丝裂霉素 C 所引起的荧光相当。并且由于较高浓度的丝裂霉素 C 能够杀死大肠杆菌 BR513-80,在这种情况下 β -半乳糖苷酶表达量比较少所以荧光强度比较低,而当浓度太低时不足以引起 SOS 效应荧光强度

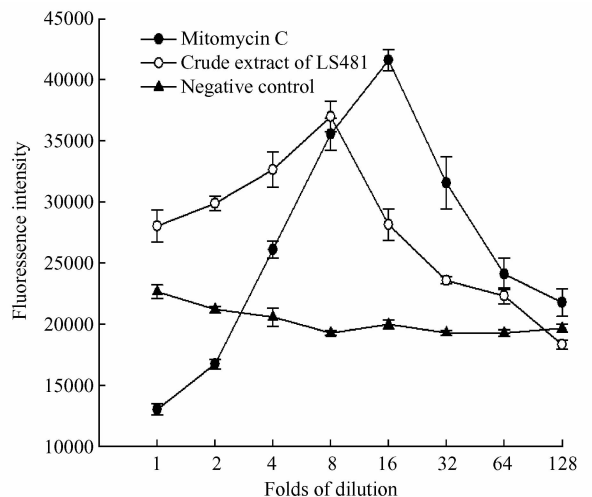


图2 LS481 同丝裂霉素 C 诱导大肠杆菌 BR513-80 产生荧光的比较

Fig. 2 The fluorescence induced by the crude extract of LS481 and Mitomycin C. The concentration of Mitomycin C which showed the highest fluorescence is 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

也相应较低。只有在一定范围内的丝裂霉素 C 不足以完全杀死指示菌,同时又能引发 SOS 效应时荧光强度才能达到最高。同样的,我们筛选得到的该活性产物也具有这种趋势,表明该产物具有同丝裂霉素 C 一样能导致大肠杆菌 BR513-80 产生 SOS 效应(图 2)。

进一步的 16S rRNA 基因分析显示 LS481 的 16S rRNA 基因同 *Micromonospora chersina* DSM 44151^T 有 99% 的相似度,构建的系统发育树显示 LS481 与 *Micromonospora chersina* DSM 44151^T 在同一个分支上,因此推测 LS481 很可能就是 *Micromonospora chersina*。据报道 *Micromonospora chersina* 能产生一系列十元环烯二炔类物质-Dynemicins。该阳性产物经 TLC 分离分析其中一个组分具有同 Dynemicin A 相似的 Rf 性质(以乙酸乙酯为展开剂其 Rf 值为 0.2 左右),并且呈蓝紫色,显色性质类似于 Dynemicin A,所以推测该阳性产物可能为十元环烯二炔类物质 Dynemicin A。

2.2 基于烯二炔核心结构的聚酮合成酶 KS-AT 区的序列筛选

首先对我们设计好的引物进行了验证,以证明其专一性。结果表明产烯二炔类抗生素的阳性菌 *Actinomadura madurae* AS 4.1224^T 和 *Actinomadura verrucospora* AS 4.1512^T 均能扩增出 2 kb 大小的

片段,并且片段的测序结果同这两株菌的烯二炔核心结构的聚酮合成酶 KS-AT 区一致,而作为负对照的阿维链霉菌和天蓝色链霉菌 DNA 则未能扩增出任何片段(图 3),这证明设计的引物是特异的。

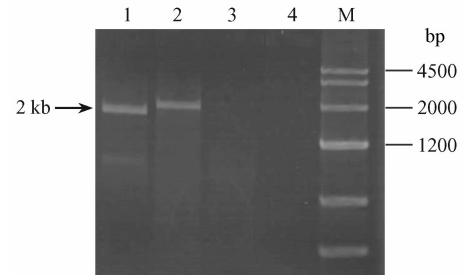


图 3 PCR 扩增验证引物的专一性

Fig. 3 Confirmation the specificity of the designed degenerate primers. 1. *Actinomadura madurae* AS 4.1224^T; 2. *Actinomadura verrucospora* AS 4.1512^T; 3. *Streptomyces avermitilis*; 4. *Streptomyces coelicolor*; M. DNA marker III.

然后以该引物为探针对 180 株放线菌进行了筛选,最终得到 2 个阳性菌株(MS098 和 LS2004)。对这些 2 kb 大小的片段进行了测序,测序结果表明,MS098 和 LS2004 的片段同多个已知的烯二炔核心结构的聚酮合成酶 KS-AT 区的相似度达到了 60% 以上(其序列号分别为 GU169074 和 GU169075)。进一步对这 2 个阳性菌株的 16S rRNA 基因系统发育学分析表明 MS098 的 16S rRNA 基因序列

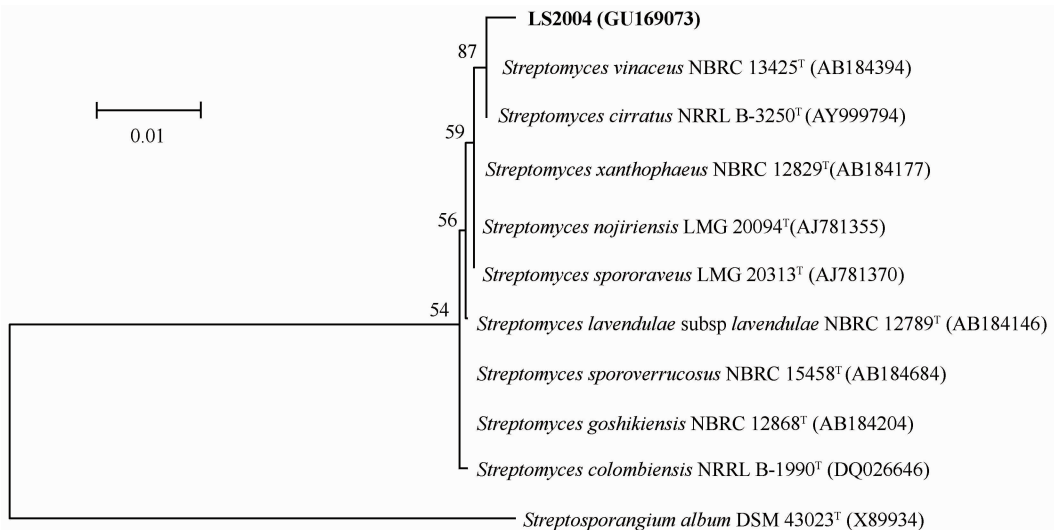


图 4 基于菌株 LS2004 及相邻链霉菌属典型菌株的 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树(选取了所有链霉菌属模式菌株的 16S rRNA 基因序列,以 *Streptosporangium album* DSM43023^T 为外群进行了比对,图中只显示最相近菌株)

Fig. 4 Neighbour-joining phylogenetic tree of strain LS2004 made by MEGA 4.0. Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) based on a neighbour-joining analysis of 1000 resampled datasets; only values > 50% are given. NCBI accession numbers are given in parentheses. All the relative strains of *Streptomyces* were chosen and *Streptosporangium album* DSM 43023^T was selected for the outgroup. The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position.

(GU169072) 同 *Streptomyces griseus* NBRC 13350 的 16S rRNA 基因序列 100% 相似, 推测 MS098 很可能就是灰色链霉菌。Ohnishi 等通过对灰色链霉菌全基因组测序证明其基因组确实含有烯二炔合成基因簇^[19], MS098 扩增出的片段同灰色链霉菌的烯二炔核心聚酮合成酶相似度高达 97%。LS2004 的 16S rRNA 基因序列 (GU169073) 分析表明, LS2004 同该属的 *Streptomyces vinaceus* NBRC 13425^T 和 *Streptomyces cirratus* NRRL B-3250^T 最相近(图 4)。

目前已经发现的大概 17 种烯二炔类抗生素, 有 15 种为放线菌产生^[20]。由此可见, 放线菌能产生一些结构独特, 活性很强的化合物, 是新药开发的重要源泉。而海洋由于其独特的生境孕育了一些独特的放线菌, 其在新药开发中的重要作用越来越受到重视。一个很好的例子就是, 2000 年后新发现的烯二炔类抗生素都是来源于海洋放线菌或者海洋无脊椎动物^[20]。我们根据烯二炔类抗生素独特的生物活性, 构建了一个高通量的活性筛选模型, 从我们的海洋微生物天然产物库中筛选到一个阳性产物, 推测其为十元环烯二炔物质 Dynemicin A。并且产生该阳性产物的菌株 LS481 只在 M3 发酵培养基中有活性, 其它 5 种发酵培养基都不能使其产生烯二炔类物质, 推测可能是由于 M3 培养基中碘离子的加入激活了烯二炔基因簇的表达。

另外通过序列筛选我们得到了 2 个阳性菌株, 这些菌株扩增出的片段同已知的合成烯二炔核心结构的重复 I 型聚酮合成酶具有很高的相似度。系统发育分析证明其中 MS098 是灰色链霉菌, 而另外的这株菌则同该属的 *Streptomyces vinaceus* NBRC 13425^T 和 *Streptomyces cirratus* NRRL B-3250^T 最相近, 这是首次报道其具有产生烯二炔的基因簇。初步应用 10 种培养基对这株菌进行发酵, 活性检测表明并没有产生烯二炔类物质, 下一步计划用更多的培养基进行发酵, 刺激其产生烯二炔类物质。

通过我们的高通量活性筛选模型结合序列筛选能够有效筛选烯二炔类物质并对我们的微生物菌种产烯二炔物质的潜力进行评估。同时活性和序列筛选结果再次表明我们构建的海洋微生物天然产物库和微生物菌种库能产生结构独特的化合物, 天然产物多样性好, 质量可靠。

参考文献

[1] Zhang L. Nature products: Drug discovery and therapeutics medicines. 1st ed. New York: Human Press, 2005.

- [2] 边疆, 宋福行, 张立新. 构建高质量微生物天然产物库研究策略. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(8):1132-1137.
- [3] Zhen YS, Ming XY, Yu B, et al. A new macromolecular antitumor antibiotic, C-1027. III. Antitumor activity. *The Journal of antibiotics*, 1989, 42(8):1294-1298.
- [4] Gredicak M, Jeric I. Eneidyne compounds - new promises in anticancer therapy. *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 2007, 57(2):133-150.
- [5] Liu W, Christenson SD, Standage S, et al. Biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic C-1027. *Science*, 2002, 297(5584):1170-1173.
- [6] Ahlert J, Shepard E, Lomovskaya N, et al. The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. *Science*, 2002, 297(5584):1173-1176.
- [7] 刘文. 烯二炔类抗肿瘤抗生素的生物合成研究进展. *世界科技研究与发展 (World Science-Technology R&D)*, 2005, 27(3):24-31.
- [8] Liu W, Ahlert J, Gao Q, et al. Rapid PCR amplification of minimal enediyne polyketide synthase cassettes leads to a predictive familial classification model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(21):11959-11963.
- [9] Zazopoulos E, Huang K, Staffa A, et al. A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nature biotechnology*, 2003, 21(2):187-190.
- [10] Zhang L, An R, Wang J, et al. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Current opinion in microbiology*, 2005, 8(3):276-281.
- [11] Zhang L, Yan K, Zhang Y, et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(11):4606-4611.
- [12] Bartus HR, Mirabelli CK, Auerbach JI, et al. Improved genetically modified *Escherichia coli* strain for prescreening antineoplastic agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1984, 25(5):622-625.
- [13] Vidal-Aroca F, Giannattasio M, Brunelli E, et al. One-step high-throughput assay for quantitative detection of beta-galactosidase activity in intact gram-negative bacteria, yeast, and mammalian cells. *BioTechniques*, 2006, 40(4):433-434, 436, 438 passim.
- [14] Pospiech A, Neumann B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet*, 1995, 11(6):217-218.

- [15] 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.
- [16] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 1994, 22(22):4673-4680.
- [17] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 1987, 4(4):406-425.
- [18] Zhang J-H, Chung TDY, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*, 1999, 4(2):67-73.
- [19] Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, et al. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of bacteriology*, 2008, 190(11):4050-4060.
- [20] Van Lanen SG, Shen B. Biosynthesis of enediyne antitumor antibiotics. *Current topics in medicinal chemistry*, 2008, 8(6):448-459.

Exploiting bioactive Eneidiynes from marine microbe based on activity and gene screening

Gang Pei^{1, 2#}, Huanqin Dai^{1#}, Biao Ren^{1, 2}, Xiangyang Liu¹, Lixin Zhang^{1*}

(¹Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(²Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [**Objective**] A high quality library of marine microbes and their associated natural products is critical for successful drug discovery. In this research a method to assess the quality of our marine microbial natural product library through screening for novel enediyne-like compounds from this library was set up. [**Methods**] A high throughput screening assay based on the unique DNA-damage activity of enediyne-like compounds has been constructed and our marine microbial natural product library was screened. Because the polyketide synthase responsible for the biosynthesis of enediyne core is a conserved iterative type I polyketide synthase, a sequence-based screening method was built to get the strains that harbored enediyne biosynthesis gene clusters. [**Results**] Through activity-based screening, a positive hit from our marine natural product library was acquired. 16S rRNA analysis has revealed that this strain-LS481 was 99% similar to *Micromonospora chersina* DSM 44151^T that could produce enediyne compound-Dynemicins. The crude extract of LS481 showed similar characteristics with Dynemicin A. In addition, two strains, MS098 and LS2004, were acquired through sequence-based screening. The 16S rRNA of MS098 was 100% the same as *Streptomyces griseus* NBRC 13350, and LS2004 was most close to *Streptomyces vinaceus* NBRC 13425^T and *Streptomyces cirratus* NRRL B-3250^T. [**Conclusion**] We can successfully isolate enediyne compounds through the activity-based screening and assess the potential of producing enediyne compounds through sequence-based screening.

Keywords: Eneidiyne; High throughput screening; Iterative type I polyketide synthase

(本文责编:王晋芳)

Supported by the International Science and Technology Cooperation Programs of China(2007DFB31620), the National Programs for High Technology Research and Development of China(2007AA09Z443) and the Chinese Academy of Sciences Innovation Projects (KSCXZ-YW-G-013)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-62566511; E-Mail: Zhanglixin@im.ac.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 20 October 2009/ Revised: 11 November 2009