

美达霉素产生菌中立体专一性酮基还原酶基因 *med-ORF12* 的表达

孙锐^{1,2}, 刘明^{1,2}, 宫彩霞^{1,2}, 王蔚^{1,2}, 曾爱兵³, 李爱英^{1,2*}

¹华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079

²华中师范大学农药与化学生物学教育部重点实验室, 武汉 430079

³温州医学院生命科学学院, 温州 325035

摘要:美达霉素是链霉菌产生的具有强抗肿瘤活性的芳香聚酮类抗生素,其吡喃环并内酯结构对于其抗癌活性非常重要。位于美达霉素生物合成基因簇中的基因 *med-ORF12* 编码立体专一性酮基还原酶,可能参与美达霉素的吡喃环并内酯结构中手性中心(C₃S)的形成,但在美达霉素产生菌中的功能和表达还未曾研究。

【目的和方法】为了研究 *med-ORF12* 在野生菌中的表达情况以及与美达霉素生物合成的关系,本文采用了原核表达、抗体制备、免疫杂交等技术方法对这个基因展开了体内表达研究。**【结果】**首先利用 pET 载体建立了 *med-ORF12* 的原核表达系统,在优化诱导表达条件的基础上获得了可溶性目的蛋白,制备了相应的多抗血清;然后利用多抗血清对美达霉素产生菌中的基因 *med-ORF12* 的表达情况进行了检测,表明在美达霉素产生菌中参与次生代谢的 *med-ORF12* 在稳定期大量表达,同时伴随美达霉素的大量积累。**【结论】**这些结果表明在美达霉素产生菌中,基因 *med-ORF12* 参与次生代谢,其表达与美达霉素生物合成有一定相关性。

关键词: 链霉菌, 次生代谢, 美达霉素, 立体专一性酮基还原酶

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0060-09

美达霉素 (medermycin) 又称乳醌霉素 (lactoquinomycin), 是由链霉菌产生的一种芳香聚酮类抗生素,其芳香聚酮母核通过稀有的 C-C 糖苷键连接了一个脱氧六碳糖胺^[1-2]。美达霉素具有强抗肿瘤活性,能有效抑制多种肿瘤细胞的发生、发展及迁移,是细胞信号传导途径中的重要组分丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt/PKB 的新型抑制剂^[3-4]。美达霉素的聚酮母核中除两个芳香环外,还有一个具有

立体特异性的吡喃环并内酯结构:此吡喃环 C-3 和 C-15 位置呈现相反的立体构象 [3*S*, 15*R*] (图 1-A)。美达霉素属于苯并异色烷醌 (benzoisochromanquinone, BIQ) 家族,同族化合物还包括榴菌素 (granaticin)、生物合成研究最深入的放线紫红素 (actinorhodin) 等 (图 1-A)。药理学研究表明在 BIQ 家族化合物中,含有 [3*S*, 15*R*] 的吡喃环并内酯结构的美达霉素、kalafungin、frenolicin B 等化合

基金项目:国家自然科学基金 (30770036, 31170050); 浙江省自然科学基金 (Y3110050); 中央高校基本科研业务费 (CCNU10A02011)

* 通信作者。Tel: +86-27-67862431; E-mail: ayli@mail.ccnu.edu.cn

作者简介: 孙锐 (1988-), 男, 湖北省黄石人, 目前为中国科学院上海巴斯德研究所硕士研究生, 主要从事微生物遗传学研究。E-mail: rui.sun.ips@gmail.com

收稿日期: 2011-06-29; **修回日期:** 2011-09-30

物都具有抗肿瘤活性;而吡喃环并内酯结构可通过烷化机制来抑制肿瘤细胞中丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt/PKB 的活性,说明这个结构对这类抗肿瘤抗生素的生物学活性是非常重要的^[3-4]。

目前关于美达霉素等 BIQ 化合物的吡喃环并内酯结构的生物合成研究不是很多。已有研究初步推断内酯结构可由 C-1 的羧基和 C-4 之间通过分子内环化而形成,有氧气参与催化,是否还有酶的参与一直没有确切结论^[5-6];而关于吡喃环手性结构的形成,日本学者在放线紫红素(图 1-A)的生物合成研究中有涉及:研究人员曾利用基因敲除和多基因共表达实验表明放线紫红素合成基因簇中的立体专一性的酮基还原酶基因 *actVI-ORF1* 参与 C-3 的手性中心的形成^[7]。在美达霉素基因簇中也存在与 *actVI-ORF1* 同源的基因 *med-ORF12*^[8], 本文作者已通过异源共表达和种间互补实验推断 *med-ORF12* 可能在美达霉素的 C-3 手性中心的生物合成中也起重要作用^[9],但目前还没有直接的遗传学证据来证明基因 *med-ORF12* 在美达霉素产生菌体内是否可以表达,是否确实参与美达霉素的生物合成;其表达与调控及酶学性质都有待研究。

在前期试验中,为了获得 *med-ORF12* 参与美达霉素生物合成的直接的遗传学证据,本文作者先后采用了两种方案尝试进行 *med-ORF12* 的基因敲除:(1)构建了进行 *med-ORF12* 敲除的自杀质粒,但由于美达霉素产生菌对外源自杀质粒 DNA 的限制性导致自杀质粒一直未能导入到产生菌中去;(2)利用 PCR-Targeting 技术(Redirect™ 试剂盒)在美达霉素合成全基因簇中进行了目的基因的敲除(在大肠杆菌中进行),然后可将获得的突变基因簇进行异源表达(此方案已有类似报道^[10])。然而在酶切验证突变基因簇过程中发现,在敲掉目的基因的同时突变基因簇中产生了大片段缺失(李爱英,未发表)。

所以,在这里,我们使用 pET 载体建立了美达霉素生物合成基因 *med-ORF12* 的原核表达体系,成功纯化了目的蛋白并获得了 Med-ORF12 的多抗血清;并利用多抗血清对 *med-ORF12* 在美达霉素产生菌中的表达模式进行了初步研究。这些工作为进一步展开 Med-ORF12 相关酶学性质研究和探讨在美达霉素生物合成中的作用及表达调控机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和培养基:大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21 (DE3) 由本实验室保存,分别作为基因克隆和原核表达常用宿主细胞;*E. coli* BL21 (DE3) /pHSL82 为本实验中构建的原核表达菌株;质粒 pT7Blue 和 pET28a (+) 载体为 Novagen 公司产品,分别作为基因克隆和原核表达载体;pIK340 (含有美达霉素完整生物合成基因簇)以及美达霉素产生菌(链霉菌 AM7161)由日本武藏野大学市濂浩志教授馈赠^[8];美达霉素超量产生菌株 AM7161-LM98 是 AM7161 的衍生菌,为本实验室构建(刘明,未发表);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 YEME、R4 等培养基^[11]。

1.1.2 主要试剂:限制性内切酶、T4 连接酶、CIAP 去磷酸化酶、分子量蛋白预染及非预染 Marker 购自 Fermentas 公司;KOD-Plus DNA 聚合酶为 Toyobo 公司产品;1 kb DNA Marker、质粒 DNA 小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒为 Tiangen 公司产品;His GraviTrap 纯化柱为 GE 公司产品;PCR 引物合成和基因测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成;卡那霉素和 IPTG 购自 Sigma;多抗血清制备在中国科学院武汉病毒所完成。

1.2 *med-ORF12* 基因的克隆

1.2.1 引物:根据美达霉素生物合成基因簇中 *med-ORF12* 序列(在 GenBank 中序列号为 AB103463)设计上游引物 Med-12B: 5'-GGAAT TCCATATGAGCGGAACCG GCCGGCCACCGTGGC G-3', 下游引物 Med-12C: 5'-CCCAAGCTTCGACG CGCT CCCGGGCTCGGCTTC-3'。上下游引物前分别添加了 *Nde* I、*Hind* III 限制性酶切位点(酶切位点用下划线表示,翻译起始密码子用黑体表示)。

1.2.2 基因的扩增:以含有美达霉素生物合成基因簇的质粒 pIK340 为模板,以 Med-12B、Med-12C 为引物进行 PCR,扩增目的基因 *med-ORF12* (反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,66 $^{\circ}$ C 45 s,68 $^{\circ}$ C 90 s,25 个循环)。回收目的片段,进行 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切,克隆到 pT7Blue 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 。经蓝白斑筛选、质粒提取、酶切验证和测序后,正确质粒命名为 pHSL81。

1.3 *med*-ORF12 原核表达系统的建立

pHSL81 经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切,回收目的片段 *med*-ORF12,克隆在表达质粒载体 pET28a (+) 上,转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α ,提取重组质粒后进行酶切鉴定。将正确的重组质粒命名为 pHSL82,并导入大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中,获得的 *med*-ORF12 原核表达菌株命名为 BL21 (DE3) /pHSL82。

1.4 *med*-ORF12 的初步原核表达及诱导条件的优化

初步原核表达实验过程参见相关文献^[12]。设置梯度优化诱导剂的浓度、诱导温度及相应诱导时间:在培养至指数期细胞(吸光度 $OD_{600} = 0.6$) 中添加不同浓度 IPTG,并振荡培养 4 h (37 $^{\circ}$ C 和 220 r/min);或者在添加 0.1 mmol/L IPTG 后,分别在不同培养温度和不同培养时间下进行诱导。培养结束后收集菌体,在用 PBS 重悬的细胞中加苯甲基磺酰氟(PMSF)缓冲液至浓度 1 mmol/L;用 JY92-II 超声破碎机在冰浴中超声破碎细胞(工作 25 s,间歇 10 s,700 W,10 次),直接通过 SDS-PAGE 电泳检测总蛋白。

1.5 表达产物 Med-ORF12 存在形式的检测及验证

将诱导培养后的细胞进行超声波裂解,经 4 $^{\circ}$ C 9 246 \times g 离心 5 min,分离上清和沉淀,然后 SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白的存在形式(是以可溶还是包涵体形式存在)。

以抗 His-标签的鼠抗为一抗(目的蛋白 Med-ORF12 的端部含有 His-标签),HRP 标记的羊抗鼠抗体为二抗,进行 Western blot 分析,以确认诱导表达产生的特异性蛋白带是否为含有 His-标签的目的蛋白带。

1.6 表达产物 Med-ORF12 的纯化

使用 GE 公司的 His GraviTrap 纯化柱,利用 IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) 法纯化目的蛋白(具体参照 GE 试剂盒使用手册)。SDS-PAGE 检测纯化效果,并对纯化的蛋白进行 Western blot 验证。

1.7 Med-ORF12 多抗血清的制备及其特异性鉴定

利用纯化的 Med-ORF12 免疫新西兰大白兔制备多抗血清的方法按照常规程序进行^[13]:使用的 Med-ORF12 蛋白浓度为 0.6 mg/mL (700 μ L),首次

免疫与完全弗氏佐剂混合,第二次免疫与不完全弗氏佐剂混合。以制备的多抗血清为一抗,HRP 标记的羊抗兔抗体为二抗,用间接 ELISA 法检测多抗血清的效价,并用 Western blot 检验制备的多抗血清的特异性。

1.8 链霉菌中美达霉素积累和 *med*-ORF12 表达的检测

链霉菌培养和发酵方法参见相关文献^[7-9,11]:种子培养物按照 1:10 转接到 200 mL 发酵培养基中,培养过程中定时取样,检测吸光度 (OD_{600}),制备生长曲线;离心分离发酵液和菌丝体沉淀,破碎菌丝体提取总蛋白(方法同大肠杆菌,菌丝体破碎参照文献^[11]),进行 SDS-PAGE 和 Western blot (多抗血清进行 1:1000 稀释)检测链霉菌中 *med*-ORF12 的表达。

2 结果

2.1 *med*-ORF12 表达质粒的构建和初步原核诱导表达

975 bp 的目的基因 *med*-ORF12 位于美达霉素生物合成基因簇中^[8]。经 PCR 扩增后首先连接到克隆载体 pT7Blue 上,测序验证后再进一步克隆到表达载体 pET28a (+) 上(先后获得的质粒为 pHSL81 和 pHSL82,图 1-B)。表达质粒 pHSL82 转入常用的原核表达宿主细胞大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中,建立了 *med*-ORF12 原核表达系统 (BL21 (DE3) /pHSL82)。

BL21 (DE3) /pHSL82 在 IPTG 诱导培养(温度为 37 $^{\circ}$ C)结束后,利用 SDS-PAGE 分析诱导表达后各组菌的总蛋白(图 2-A)。结果表明:与阴性对照相比较,分别经 0.1 - 0.8 mmol/L IPTG 诱导后,细胞在 35 - 45 kDa 之间都存在一条明显表达的特异性蛋白条带,初步推测已经表达出目的蛋白。对比不同 IPTG 浓度诱导结果,发现在 37 $^{\circ}$ C 条件下,0.1 - 0.8 mmol/L IPTG 浓度范围内,IPTG 的浓度对目的蛋白的诱导表达量影响差异不是非常显著,但低浓度下蛋白表达效果稍好一些,且低浓度 IPTG 对细胞毒性小,因此初步选定 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L。

利用抗 His-标签的特异性抗体对细胞的总蛋白进行 Western blot 检测。结果(图 2-B)表明在诱导后的细胞 BL21 (DE3) /pHSL82 总蛋白中,仅在 35 -

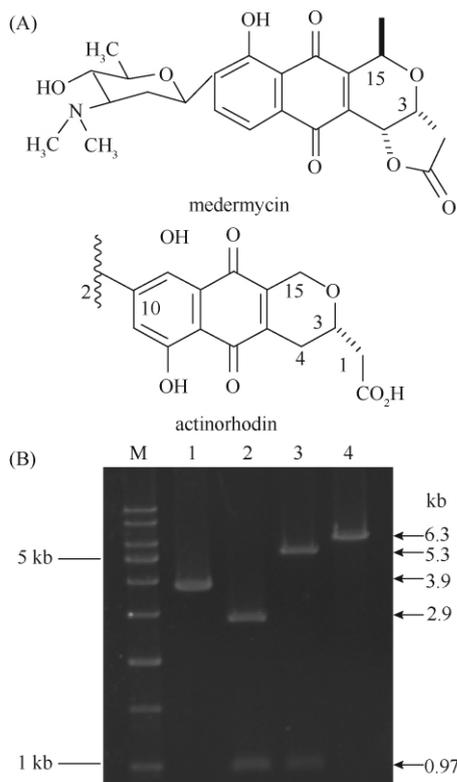


图1 BIQ化合物的结构及 *med-ORF12* 基因克隆和表达质粒的构建

Fig. 1 Structures of related BIQ compounds and construction of the expression plasmid. (A) The numbering given is based on the biosynthetic origin of these compounds; (B) Confirmation of cloning and expression plasmids by enzyme digestions. M: DNA marker; 1: pHSL81/*Hind* III; 2: pHSL81/(*Hind* III + *Nde* I); 3: pHSL82/(*Hind* III + *Nde* I); 4: pHSL82/*Hind* III.

50 kDa之间显示出特异条带(对应的是表达量最大的蛋白条带),说明这是带有 His-标签的蛋白,而阴性对照样品在相应位置无此特征带。

2.2 *med-ORF12* 的存在形式的检测和诱导表达条件的优化

对在37°C 0.1 mmol/L IPTG 浓度诱导后得到的目的蛋白进行检测,发现目的蛋白几乎全部以包涵体的形式存在(如图 2-C,诱导后的细胞进行裂解后离心,可溶的上清液用 supernatant (S) 标示;离心后沉淀的包涵体用 precipitate (P) 标示,下同)。

接下来通过降低诱导温度,延长诱导时间来进行优化以提高可溶性蛋白的比例。结果表明30°C 诱导培养后目的蛋白大部分还是以包涵体的形式存在(图略),而20°C 诱导20 h后,在上清和沉淀中目的蛋白的量大致相等(图略);16°C 诱导表达结果(如图

2-D 所示)表明目的蛋白大部分以可溶形式存在,24 h 上清中的目的蛋白量达到最大。

根据以上诱导表达优化的结果,确定最优诱导表达条件为:16°C 下,0.1 mmol/L IPTG 诱导24 h。在此条件下,目的蛋白表达效果(可溶和包涵体两部分总和)与其它温度下差异不大,但以可溶性形式存在的目的蛋白表达量达到最高。

2.3 目的蛋白 Med-ORF12 的纯化及多抗血清的制备

接下来,利用 His GraviTrap 柱纯化目的蛋白,并进行 SDS-PAGE 以检测纯化效果(如图 3-A 所示)。结果表明得到了纯度约为 95% 的目的蛋白(6、7、8 泳道)。将纯化的蛋白利用抗 His-标签的抗体进行 Western blot 验证,确认了纯化的蛋白为目的蛋白(图略)。

将纯化的 Med-ORF12 免疫新西兰大白兔,从而获得了 Med-ORF12 的多抗血清。利用间接 ELISA 法测定了抗血清效价为 1:16000(图略)。

然后,利用 Western blot 检测抗血清的特异性(图 3-B),在抗血清 1:3000 稀释的情况下,抗血清特异性显示较好,能够专一显示目的带。

2.4 利用 Med-ORF12 的多抗血清检测美达霉素野生型产生菌中 *med-ORF12* 的表达和美达霉素的积累

为了解 *med-ORF12* 与美达霉素生物合成的关系,接下来利用制备的 Med-ORF12 的多抗血清对美达霉素产生菌(野生型链霉菌 AM7161)中 *med-ORF12* 的表达进行检测。

首先检测 AM7161 不同发酵时间的细胞密度(用吸光度 OD_{600} 表示)以及发酵液上清的颜色,发现链霉菌 AM7161 在培养 12 h 后就进入稳定期(如图 4-A),生长较一般链霉菌快^[1];且美达霉素(红褐色代表美达霉素的产生^[8]) 在细胞进入稳定期就开始积累,进入稳定期的后期(60 h 左右)积累量明显增多(图 4-A),说明是次级代谢产物。

利用上面获得的特异性多抗血清对链霉菌 AM7161 总蛋白进行 Western blot 检测(如图 4-B 所示)。结果表明:(1)制备的特异性多抗血清可以与链霉菌 AM7161 总蛋白中 35 - 45 kDa 之间的一条带杂交,进一步说明制备的多抗血清有较好的特异性;(2)同时说明基因 *med-ORF12* 在链霉菌 AM7161 中可以表达产生蛋白产物;(3)基因 *med-ORF12* 在链

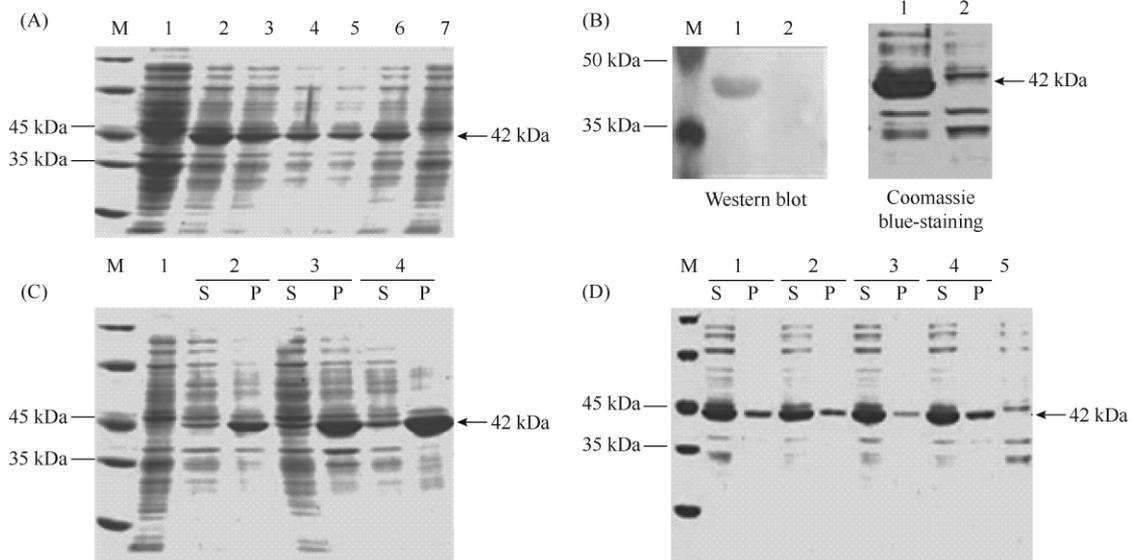


图2 Med-ORF12 的诱导表达和验证

Fig. 2 Induced expression and western blot of Med-ORF12. (A) 1-6: Total cell proteins of *E. coli* BL21 (DE3) /pHSL82 after induction by IPTG at the concentrations of 0 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L and 0.8 mmol/L for 4 h at 37°C respectively; 7: Total cell proteins of *E. coli* BL21 (DE3) as negative control; M: Protein marker; (B) M: Protein marker; 1: Total cell proteins of BL21 (DE3) /pHSL82 after induction; 2: Total cell proteins of negative control BL21 (DE3) /pET28a(+); (C) M: Protein marker; 1: Total cell proteins of negative control (BL21 /pET28a(+)); 2-4: Supernatant (S) and precipitate (P) of BL21 (DE3) /pHSL82 after induction for 4 h, 8 h and 12 h respectively at 37°C; (D) M: Protein marker; 1-4: Supernatant (S) and precipitate (P) of BL21 (DE3) /pHSL82 after induction at 16°C for 16 h, 20 h, 24 h and 30 h respectively; 5: Total cell proteins of negative control BL21 /pET28a(+).

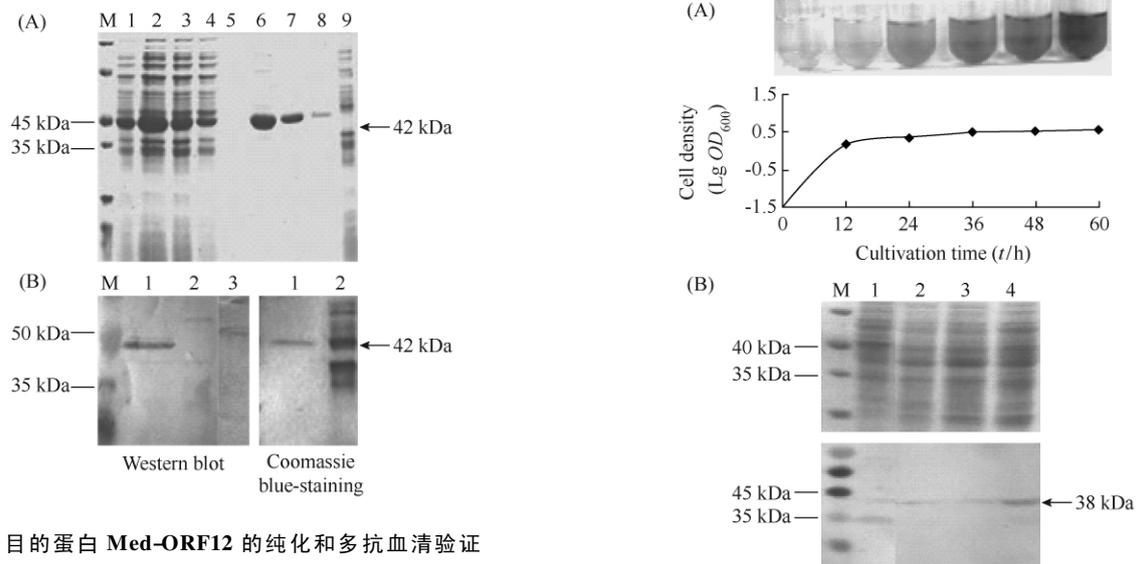


图3 目的蛋白 Med-ORF12 的纯化和多抗血清验证

Fig. 3 Purification of Med-ORF12 and confirmation of the resultant polyclonal antiserum. (A) M: Protein marker; 1-2: Unpurified samples; 3: Flow-through sample after loading; 4-5: Flow-through samples after first and last washing respectively; 6-8: Flow-through samples after first, second and third elution respectively; 9: Total cell proteins of negative control BL21 (DE3) /pET28a(+); (B) M: Protein marker; 1: Purified target protein Med-ORF12; 2: Total cell proteins of negative control (BL21 (DE3) /pET28a(+)); 3: Rabbit serum before immunization as negative control.

图4 美达霉素野生型产生菌培养过程中 Med-ORF12 的表达和美达霉素的积累

Fig. 4 Accumulation of medermycin and expression of Med-ORF12 during cultivation of the wild type medermycin-producing strain. (A) Cell growth at different cultivation time (below) and color change of pigmentation indicating medermycin accumulation in AM7161 (upper); (B) Western blot of med-ORF12 expression at different cultivation time. 1-4: 12 h, 36 h, 48 h and 60 h respectively.

霉菌细胞刚进入稳定期就有微弱表达,但48 h以前表达量变化不是很大;到60 h时 *Med-ORF12* 表达量明显增多,表明基因 *med-ORF12* 属于生长后期表达的基因。

2.5 利用 *Med-ORF12* 的多抗血清检测美达霉素超量产生菌中 *med-ORF12* 的表达

为了进一步了解 *med-ORF12* 与美达霉素生物合成的关系,我们利用 *Med-ORF12* 的多抗血清对一株美达霉素超量产生菌 (AM7161-LM98) 中的 *med-ORF12* 的表达进行了检测。

AM7161-LM98 是野生菌 AM7161 的衍生菌株,是

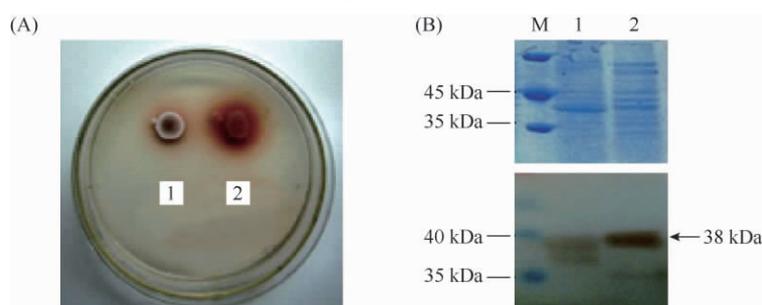


图5 美达霉素超量产生菌中 *Med-ORF12* 的检测

Fig. 5 Detection of *Med-ORF12* expression in the medermycin-overproducing strain. (A) Comparison of pigmentation color indicating medermycin accumulation in AM7161 (1) and AM7161-LM98 (2); (B) Western blot of *med-ORF12* expression in AM7161 (1) and AM7161-LM98 (2), M: protein marker.

结合图4和图5的结果,可以初步判断,*Med-ORF12* 表达量的变化与美达霉素积累量(发酵液颜色)的变化相一致,说明二者之间存在一定相关性,这为进一步确证 *Med-ORF12* 参与美达霉素生物合成的研究打下基础。

3 讨论

目前已有许多肿瘤化疗药物(如光辉霉素、阿克拉霉素等)用于临床,但这些常用药物作用的靶标多是DNA,而美达霉素则是对多种肿瘤细胞的信号传导起阻断作用,而且抗肿瘤效果显著,所以有望作为一种新颖的抗肿瘤药物得到开发^[3-4]。

对美达霉素生物合成过程进行分子水平上的研究,对于利用代谢工程进行新药研发会有潜在的价值和意义。本文作者已经在美达霉素后期结构修饰方面展开了一些研究工作,比如其糖基化修饰机制的揭示(李爱英,未发表)以及C-3位手性中心的形成等^[9]。

在AM7161中导入并超量表达一个正效调控基因(*med-ORF10*),从而导致美达霉素的产量明显增加(如图5-A菌落的红褐色^[8])(刘明,未发表),且预期这个调控基因是通过调控*med-ORF12*的表达来控制美达霉素的合成(对此我们已有相关遗传学证据)(李爱英,未发表),二者都位于美达霉素基因簇中。液体培养AM7161和AM7161-LM98至24 h,提取细胞总蛋白,进行Western blot检测(图5-B)。如我们预期,在菌株AM7161-LM98中目的基因*med-ORF12*的表达量比野生菌AM7161中明显提高。

美达霉素与同族化合物放线紫红素的聚酮母核相似(图1-A),首例杂合抗生素mederhodin就是通过将二者合成相关基因进行组合表达得到的,并由此诞生了“组合生物合成”的概念^[14]。与美达霉素不同的是,放线紫红素是以两个完全相同的聚酮母核(C-1均为羧基)在C-10位置以C-C相连(见图1),仅具有弱的抗菌活性^[15],未见有抗肿瘤活性的报道(放线紫红素的C-1羧基可以与C-4发生分子内酯化,但内酯化的 γ -放线紫红素是否有抗肿瘤活性还未有报道)。而有报道称虽然另一个BIQ家族化合物Deoxyfrenolicin的C-1端为羧基,也具有一定的抗肿瘤活性,但推测抗肿瘤活性还是与其内酯化形式(室温下体外发生C-1和C-4间内酯化)有关^[3-4]。在已研究的BIQ家族化合物中,抗肿瘤效果最好的是美达霉素,其结构中具有稀有的C-糖基化修饰、氧化基团、手性的吡喃环内酯等,这些结构对其抗肿瘤效果可能都有贡献,目前已有数据揭示美达霉素的吡喃环并内酯结构对阻断肿瘤细胞的信号传导是非常关键的^[3-4]。

美达霉素生物合成基因簇中的 *med-ORF12* 预期是美达霉素生物合成后期修饰中的一个关键酶,可能参与美达霉素手性吡喃环的形成:聚酮母核形成过程中,*Med-ORF12* 将无手性的二环中间体的 C-3 的酮基进行还原,形成具有手性结构的中间体。这种推测在同族化合物生物合成研究中已获得一些试验数据的支持^[7,16-17],也在美达霉素生物合成研究中得到 *Med-ORF12* 参与吡喃环 C-3 手性形成的一些间接证据^[9]。然而,由于菌株和基因自身问题,导致目前还无法通过基因敲除来获得关于美达霉素吡喃环并内酯形成的遗传学证据。

所以在本文中,作者就对基因 *med-ORF12* 进行了原核表达及抗体制备,对美达霉素野生型产生菌株中此基因的表达进行免疫检测,发现 *Med-ORF12* 的大量表达是发生在稳定期的后期,与美达霉素的生物合成水平呈现出一致性;同时利用这些多抗血清检测了在美达霉素超量产生菌中 *Med-ORF12* 的表达,也发现 *Med-ORF12* 表达量提高与美达霉素产量提高呈现一致性。这些数据与推论相吻合:美达霉素是次级代谢产物,*Med-ORF12* 作为关键酶之一参与美达霉素生物合成后期修饰过程^[8]。另外,大肠杆菌中带标签的目的蛋白和链霉菌中不带标签的目的蛋白的分子量在 SDS-PAGE 检测时都比预期值(分别为 39 kDa 和 35 kDa)稍大一点,此现象以前多有报道,可能与蛋白本身氨基酸编码或修饰有关^[18]。

本文使用的美达霉素超量产生菌与野生菌不同之处在于前者细胞中正调控基因(*med-ORF10*)在高拷贝自主复制质粒上并受控于高效链霉菌启动子(PerME*),前期实验已经检测到这个调控基因发生了超量表达(刘明,未发表)。根据已有的数据推测这个调控基因是通过控制 *Med-ORF12* 的表达水平来调控美达霉素的产量^[8,9,19],在 *med-ORF10* 的基因敲除和超表达菌中都检测到 *med-ORF12* 转录水平的改变(刘明,未发表)。本文检测了这个菌株中 *Med-ORF12* 翻译水平,发现确实也存在 *Med-ORF12* 表达上调的现象(关于 *Med-ORF12* 与 *med-ORF10* 调控关系的更为详细的研究数据将另文报道),进一步支持了 *Med-ORF12* 参与美达霉素生物合成的推论^[8]。

本文在美达霉素产生菌中检测了 *Med-ORF12* 的表达及与美达霉素积累之间的关系,接下来,我们拟对 *Med-ORF12* 进行体外酶活性研究以及基因敲除实验,进一步验证其功能和机制。

参考文献

- [1] Tanka N, Okabe T, Isono F, Kashiwaqi M, Nomoto K, Takahashi M, Shi M, Shimazu A, Nishimura T. Lactoquinomycin, a novel anticancer antibiotic. I. Taxonomy, isolation, and biological activity. *Journal of Antibiotics*, 1985, 38(10):1327-1332.
- [2] Takano S, Hasuda K, Ito A, Koide Y, Ishii F. A new antibiotic, medermycin. *Journal of Antibiotics*, 1976, 29(7):765-768.
- [3] Toral-Barza L, Zhang W, Huang X, McDonald LA, Salaski EJ, Barbieri LR, Ding W, Krishnamurthy G, Hu Y, Lucas J, Berman VS, Cai P, Levin JI, Mansour TS, Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K. Discovery of lactoquinomycin and related pyranonaphthoquinones as potent and allosteric inhibitors of AKT/PKB: mechanistic involvement of AKT catalytic activation loop cysteines. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007, 6(11):3028-3038.
- [4] Salaski EJ, Krishnamurthy G, Ding WD, Yu K, Insaf SS, Eid C, Shim J, Levin JI, Tabei K, Toral-Barza L, Zhang WG, McDonald LA, Honores E, Hanna C, Yamashita A, Johnson B, Li Z, Laakso L, Powell D, Mansour TS. Pyranonaphthoquinone lactones: a new class of AKT selective kinase inhibitors alkylates a regulatory loop cysteine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 52(8):2181-2184.
- [5] Itoh T, Taguchi T, Kimberley MR, Booker-Milburn KI, Stephenson GR, Ebizuka Y, Ichinose K. Actinorhodin biosynthesis: structural requirements for post-PKS tailoring intermediates revealed by functional analysis of ActVI-ORF1 reductase. *Biochemistry*, 2007, 46(27):8181-8188.
- [6] Ichinose K, Taguchi T, Ebizuka Y, Hopwood DA. Biosynthetic gene clusters of benzoisochromanone antibiotics in identification of genes involved in post-PKS tailoring steps. *Actinomycetologica*, 1998, 12(2):99-109.

- [7] Ichinose K, Surti C, Taguchi T, Malpartida F, Booker-Milburn KI, Stephenson GR, Ebizuka Y, Hopwood DA. Proof that the ActVI genetic region of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) is involved in stereospecific pyran ring formation in the biosynthesis of actinorhodin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1999, 9 (3): 395-400.
- [8] Ichinose K, Ozawa M, Itou K, Kunieda K, Ebizuka Y. Cloning, sequencing and heterologous expression of the medermycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* sp. AM-7161: towards comparative analysis of the benzoisochromanquinone gene clusters. *Microbiology*, 2003, 149 (7): 1633-1645.
- [9] Li A, Itoh T, Taguchi T, Xiang T, Ebizuka Y, Ichinose K. Functional studies on a ketoreductase gene from *Streptomyces* sp. AM-7161 to control the stereochemistry in medermycin biosynthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, 13 (24): 6856-6863.
- [10] Yunt Z, Reinhardt K, Li A, Engeser M, Dahse HM, Gütschow M, Bruhn T, Bringmann G, Piel J. Cleavage of four carbon-carbon bonds during biosynthesis of the griseorhodin a spiroketal pharmacophore. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131 (6): 2297-2305.
- [11] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: The John Innes Foundation, 2000.
- [12] Hu Y, Zhang G, Li A, Chen J, Ma L. Cloning and enzymatic characterization of a xylanase gene from a soil-derived metagenomic library with an efficient approach. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2008, 80: 823-830.
- [13] 林霖, 李国超, 李中华, 徐葵, 田高飞, 李静, 刘艳玲. O-GlcNAcase 抗原片的选择、优化表达和多克隆抗体的制备. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2011, 27 (8), 1183-1190.
- [14] Hopwood DA, Malpartida F, Kieser HM, Ikeda H, Duncan J, Fujii I, Rudd BA, Floss HG, Omura S. Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. *Nature*, 1985, 314 (6012): 642-644.
- [15] Wright F, Hopwood D. Actinorhodin is a chromosomally-determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of General Microbiology*, 1976, 96: 289-297.
- [16] Oja T, Palmu K, Lehmussola H, Leppäranta O, Hännikäinen K, Niemi J, Mäntsälä P, Metsä-Ketelä M. Characterization of the alnumycin gene cluster reveals unusual gene products for pyran ring formation and dioxan biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 2008, 15: 1046-1057.
- [17] Taguchi T, Kunieda K, Takeda-Shitaka M, Takaya D, Kawano N, Kimberley MR, Booker-Milburn KI, Stephenson GR, Umeyama H, Ebizuka Y, Ichinose K. Remarkably different structures and reaction mechanisms of ketoreductases for the opposite stereochemical control in the biosynthesis of BIQ antibiotics. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2004, 12 (22): 5917-5927.
- [18] 唐威华, 张景六, 王宗阳. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因. *植物生理学报 (Plant Physiology Journal)*, 2000, 26 (1): 64-68.
- [19] Taguchi T, Okamoto S, Lezhava A, Li A, Ochi K, Ebizuka Y, Ichinose K. Possible involvement of ActVI-ORFA in transcriptional regulation of *actVI* tailoring-step genes for actinorhodin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 269: 234-239.

Expression detection of *med*-ORF12 encoding a stereochemical ketoreductase possibly involved in medermycin biosynthesis

Rui Sun^{1,2}, Ming Liu^{1,2}, Caixia Gong^{1,2}, Wei Wang^{1,2}, Aibing Zeng³, Aiyong Li^{1,2*}

¹ College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

² Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

³ School of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

Abstract: Medermycin, an aromatic polyketide antibiotic produced by streptomyces, possesses a stereochemical-pyran-ring lactone critical for its strong anticancer activity. The *med*-ORF12 located in the biosynthetic gene cluster of medermycin encodes a stereochemical ketoreductase. Based on many indirect data, we proposed it to be involved in the enantioselective reduction at C-3 in the formation of the pyran ring of medermycin. The direct genetic evidence about the function of *med*-ORF12 in the medermycin-producing strain has yet to be obtained. Enzymatic features, expression and regulation pattern of *Med*-ORF12 in the medermycin-producer still remain obscure. **[Objective and Methods]** The present study aimed to investigate the expression profiles of *med*-ORF12 and relationship between *Med*-ORF12 and medermycin accumulation in medermycin-producers using prokaryotic expression, protein purification, polyclonal antiserum preparation, western blot. **[Results]** First, we established a prokaryotic expression system of *med*-ORF12 using a pET vector and optimized the induction conditions to accumulate the soluble *Med*-ORF12. Subsequently, we acquired the polyclonal antiserum against *Med*-ORF12 by immunizing the New Zealand rabbit with the purified protein. Finally, we detected the expression pattern of *med*-ORF12 in the medermycin producers with the obtained polyclonal antiserum, and found that *med*-ORF12 could express with a fairly high amount during the late stationary phase of the medermycin-producers, consistent with the accumulation of medermycin as a secondary metabolite. **[Conclusion]** These data indicated that *Med*-ORF12 expressing efficiently in the secondary metabolism could be involved in the biosynthesis of medermycin in the medermycin-producers.

Keywords: streptomycete, secondary metabolism, medermycin, stereochemical ketoreductase

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770036, 31170050), by the Natural Science Foundation of Zhejiang (Y3110050) and by the Fundamental Research Funds For the Central University (CCNU10A02011)

* Corresponding author. Tel: +86-27-67862431; E-mail: ayli@mail.ccnu.edu.cn

Received: 29 June 2011/Revised: 30 September 2011