

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54(6):703-712; 4 June 2014

ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.014

北极海洋链霉菌 604F 的卤化酶基因克隆及特征

陈瑞勤^{1,2}, 廖丽², 张晓华³, 陈波^{1,2*}

¹华东理工大学生物工程学院, 上海 200237

²中国极地研究中心, 国家海洋局极地科学重点实验室, 上海 200136

³中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003

摘要:【目的】本研究旨在克隆来自北极海洋、具有合成卤化物潜力的链霉菌 (*Streptomyces* sp.) 604F 中的一个卤化酶基因, 为后续克隆卤化物合成基因簇、分离鉴定卤化物提供指导。【方法】利用琼脂块法初步测试抗菌活性, 借助液相色谱-飞行时间串联质谱技术 (LC-Tof MS) 初步寻找 *Streptomyces* sp. 604F 发酵粗提液中的卤化物, 并以简并 PCR 扩增合成次级代谢产物的指示基因 (I 型、II 型聚酮合酶及非核糖体多肽合成酶编码基因); 根据依赖黄素腺嘌呤二核苷酸的卤化酶基因保守区设计的简并引物, 扩增基因片段并测序分析; 采用高效热不对称交错 PCR (hiTAIL-PCR) 技术扩增卤化酶基因全长。【结果】*Streptomyces* sp. 604F 具有较强的抗白色念珠菌活性, 其基因组同时含有编码 I 型聚酮合酶、II 型聚酮合酶和非核糖体多肽合成酶基因, 以及卤化酶基因; 通过染色体步移克隆该卤化酶基因全长, 共 1443 bp, 编码一个新的非色氨酸卤化酶, 在合成已知卤化物的卤化酶数据库中, 与其同源关系最近的为一类参与合成糖肽类次级代谢产物的卤化酶。【结论】*Streptomyces* sp. 604F 具有新的非色氨酸卤化酶, 且推测参与糖肽类化合物的卤化修饰, 为后续寻找目的卤化物提供了指导, 也为研究该合成基因簇奠定基础。

关键词: 卤化酶, 放线菌, 北极

中图分类号: Q814 文章编号: 0001-6209(2014)06-0703-10

卤化物是次级代谢产物中非常重要的一大类, 多数具有抗菌或抗癌等生物活性, 因此在医药和工农业生产领域中被广泛应用^[1-2], 例如万古霉素、氯霉素、蝴蝶霉素等。迄今已分离得到 4700 多种天然卤化物, 以氯化物和溴化物为主, 而天然氟化物与碘化物很少^[3-4]。天然卤化物合成途径中关键的修饰酶为卤化酶, 通过添加卤元素, 能极大增加产物的结构多样性和生物活性。目前卤化酶被划分为两大

类^[5-6]: (1) 需要分子氧参与且底物特异性高的卤化酶, 主要包括黄素腺嘌呤二核苷酸 (FADH₂)-依赖型卤化酶、非血红素 Fe^{II}/α-酮戊二酸-依赖型卤化酶、S-腺苷-L-甲硫氨酸 (SAM)-依赖型卤化酶; (2) 缺少底物特异性且需要 H₂O₂ 参与的卤过氧化物酶。其中, FADH₂-依赖型卤化酶为次级代谢卤化物生物合成途径中最主要的卤化酶^[7], 可催化两种形式的底物: 一种是游离态底物, 如来自致金色假单胞

基金项目: 国家“863 计划”(2012AA092105); 南北极环境综合考察与评估专项 (CHINARE01-06); 上海市自然科学基金项目 (13ZR1462700)

* 通信作者。Tel: +86-21-58711026; E-mail: chenbo@pric.gov.cn

作者简介: 陈瑞勤 (1989-), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 主要从事极地微生物功能基因及其克隆表达研究。E-mail: jsydcrq@126.com

收稿日期: 2013-09-30; 修回日期: 2013-12-30

菌(*Pseudomonas aureofaciens* ACN)的卤化酶 PrmA 可直接卤化游离的色氨酸^[8];另一种是需要结合到载体蛋白上进行活化的底物,如来自荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* Pf-5)的卤化酶 PltA,其底物吡咯-2-羧酸乙酯需要结合在载体蛋白上才能被卤化^[9]。因此根据底物种类也可进行分类,例如色氨酸特异性和非色氨酸特异性 FADH₂-依赖型卤化酶。

FADH₂-依赖型卤化酶基因具有序列保守性,因此基于简并引物进行 PCR 成为快速筛选卤化酶的有效方法,从卤化酶序列推导可能的卤化产物类型,有利于针对性地寻找有活性的天然化合物或新的化合物。例如 Hornung 等^[10]基于卤化酶基因对 550 株放线菌筛选得到 103 株阳性菌株,并针对目的菌株进行卤化物分离鉴定,验证了基于卤化酶基因推测可能卤化产物的可行性。本研究结合抗菌活性和相关基因的检测,针对北极海洋链霉菌 604F (*Streptomyces* sp. 604F)进行卤化酶基因的克隆,并基于该卤化酶与已知的卤化酶同源关系分析其新颖程度及可能的卤化产物类型。该研究为后续分离鉴定目的卤化物提供指导,并为确定该卤化酶性质及其催化机制提供前期积累,为进一步扩增目的卤化物合成基因簇提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Streptomyces* sp. 604F 分离自北冰洋的 Chukchi Cap (168°00.775'W, 78°00.359'N) 445 m 水深沉积物样品,采集于 2008 年第 3 次北极科学考察,由中国极地研究中心极地微生物学实验室保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器: 细菌基因组提取试剂盒购自 BioDev-Tech 公司,PCR 扩增相关试剂购自 TaKaRa 公司,凝胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程公司,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 购自北京博迈德科技发展公司,克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司。研究中所用引物均由上海生工生物工程公司合成。Mastercycler gradient PCR 仪与 Centrifuge 5417R (Eppendorf),电泳系统与凝胶成像系统 (BIO-RAD), ZHWY-200B 恒温培养箱与 ZHWY-211D 恒温摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司),SCIENTZ SDC-6 低温恒温槽(宁波新芝生物科技有限公司),旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器

厂 RE-2000),安捷伦 1290 液相色谱-G6224 飞行时间质谱联用仪。

1.1.3 培养基: (1) 2216E 培养基:蛋白胨 5 g,酵母粉 1 g,磷酸高铁 0.1 g,用过滤的北极海水定容至 1 L, pH 7.2-7.4。(2) 沙氏培养基:蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,用去离子水定容至 1 L, pH 5.6。(3) 发酵培养基:淀粉 10 g,蔗糖 10 g,黄豆粉 6 g, MgSO₄ 0.5 g,用过滤的北极海水定容至 1 L, pH 7.2。

1.2 *Streptomyces* sp. 604F 的分子鉴定

将纯化菌株接种于 2216E 液体培养基中,于 28℃、180 r/min 条件下培养 2-3 d。以细菌基因组提取试剂盒抽提 DNA 为模板,采用 16S rRNA 基因通用引物^[11] PCR 扩增,产物纯化后由上海美吉生物医药科技有限公司测序。将 16S rRNA 基因序列与 EzTaxon-e 数据库中的模式菌株序列比对,选择相似性高于 98% 的序列以邻接法构建系统发育树。

1.3 抗菌活性及相关指示基因检测

以金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* NICBP 26112)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* MIG1.22)、大肠杆菌 ATCC 8739、白色念珠菌 (*Candida albicans* ATCC 10231) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* CMCC (B) 10104) 作为抗菌活性检测指示菌。用琼脂块法^[12]对 *Streptomyces* sp. 604F 进行抗菌活性筛选。将该菌株接种于 2216E 平板上,28℃ 培养 1-2 d 至长出成熟的单菌落,用打孔器将单菌落移至含指示菌的平板上,于 25℃ 培养 4 d,每天观察记录抑菌圈情况。用 Hanrald^[13-14] 等人设计的 I 型聚酮合酶 (PKS I)、II 型聚酮合酶 (PKS II) 和非核糖体多肽合成酶 (NRPS) 基因特异引物,以 *Streptomyces* sp. 604F 基因组为模板进行 PCR,产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 *Streptomyces* sp. 604F 的卤化物液相色谱-飞行时间串联质谱 (LC-Tof MS) 检测

样品前处理:离心 2 L 发酵液,将收集的菌体置于超低温冰箱冷冻过夜,解冻后用甲醇、丙酮分别提取 2 次,每次加溶剂 100 mL,超声处理 30 min;合并提取液,真空浓缩、干燥,得胞内提取物,上清液为含盐胞外提取物。合并胞内外提取物,溶解于 100 mL 甲醇,取 1 mL 上清液,微孔滤膜过滤,作为 LC-Tof MS 待测样品,冰箱冷藏保存备用。

LC-Tof MS 条件:(1) 液相部分:分析柱 YMC

ODS-A 4.6 mm \square 50 mm, 进样量 5 μ L, 流速 0.5 mL/min; 流动相乙腈-水 (分别含 0.1% 三氟乙酸) 比例: 0 min 20% 乙腈, 2 min 20% 乙腈, 28 min 85% 乙腈, 29 min 95% 乙腈, 33 min 95% 乙腈; (2) 质谱部分: 正离子模式 ESI, 氮气温度 325 \square , 氮气流速 8.0 L/min, 喷雾器压力 30 psi。

1.5 *Streptomyces* sp. 604F 的卤化酶基因检测与克隆

用 Hornung 等^[10]设计的 FADH₂-依赖型卤化酶

简并引物 (表 1), 结合 Darren 等^[15]的降落 PCR 条件扩增卤化酶基因片段, 克隆到 pMD18-T 载体上进行测序。根据该卤化酶基因片段, 用 Primer 5.0 与 Oligo 7.0 软件设计 3 对嵌套的特异引物 (表 1), 结合随机引物^[16], 按照 Liu 等^[16]改进后的 hiTAIL-PCR 方法与 Zhou 等^[17]针对高 GC 含量的基因组 DNA 修饰的 TAIL-PCR 方法, 扩增已知序列的两端序列。TA 克隆目的片段并测序, 拼接得到该卤化酶基因全长。

表 1. 检测卤化酶基因的简并引物与扩增基因全长的特异引物

Table 1. Degenerated primers to amplify halogenase gene fragment and specific primers to amplify full gene sequence

primer	sequence (5'→3')	reference
degenerated primer		
Halo-B4-FW	TTCCSCGSTACCASATCGGSGAG	[10]
Halo-B7-RV	GSGGGATSWMCCAGWACCASCC	
specific primer		
USP1	CGCTCACGGACCACGACGCCCTT	this study
USP2	GAGGAGCATCTGGTCAACTTCAT	
USP3	TGCCGCCCGCTTCTTGACGAAC	
DSP1	GGTGCGCTTCGAGGACGAGAACGG	
DSP2	ACGATGGACTCCAGTCGCGCTACTCGGACTTCTCCAG	
DSP3	GACGCGGGCTGGTACTGTTACAT	
SF	GGAAATCCATATGCCCACTCCCGGCGA	
SR	CGGGATCCTCACACCGGCGGACTC	

2 结果和分析

2.1 *Streptomyces* sp. 604F 的基本特征

菌株 604F 在 2216E 平板上菌落呈乳白圆形、菌落周围光滑, 在 2216E 液体培养基中以桔黄色球状形态生长。PCR 扩增该菌株 16S rRNA 基因序列得到 1406 bp, 与 EzTaxon-e 数据库中模式菌株黄白链霉菌 (*Streptomyces albidoflavus* DSM 40455^T) 相似性最高 (99.43%), 且在同一个进化分支, 有较高的 Bootstrap (80%) 支持 (图 1), 故该菌株应归为链霉菌属, 暂定名为 *Streptomyces* sp. 604F, GenBank 登录号为 KJ017969。

利用琼脂块法检测抑菌活性, 发现 *Streptomyces* sp. 604F 对白色念珠菌具有较强的抑制作用, 随着培养时间 (24 - 72 h) 的延长, 抑菌圈逐渐变大 (抑制圈直径由 13 mm 扩大至 17 mm), 到后期 (72 - 96 h), 抑菌圈大小趋于稳定 (抑制圈直径保持 17 mm), 说明抑菌活性物质由逐渐积累到趋于饱和。经 PCR 检测, *Streptomyces* sp. 604F 同时具有 PKS I、

PKS II 及 NRPS 基因 (图 2), PCR 产物大小依次约为 750 bp、650 bp 和 1000 bp, 与预期一致。

根据 LC-ToF MS 高分辨质谱分析结果 (图 3), 在小量发酵的 *Streptomyces* sp. 604F 总提取物色谱峰中, 保留时间 t_R 为 15.8 - 16.1 min、16.1 - 16.6 min 的组分正离子模式 ESI 的准分子离子峰非常接近, 分别出现在 m/z 367.1368、367.1324 ($[M + H]^+$, $C_{20}H_{20}ClN_4O^+$ 计算值 367.1326), 推出该两段组分的分子式均可能为 $C_{20}H_{19}ClN_4O$, 其中含有氯元素; 另外, 保留时间 t_R 为 19.4 - 20.0 min 的组分正离子模式 ESI 的准分子离子峰出现在 m/z 225.1481 ($[M + H]^+$, $C_8H_{22}ClN_4O^+$ 计算值 225.1482), 推出可能的分子式为 $C_8H_{21}ClN_4O$, 也显示含有氯元素。

2.2 *Streptomyces* sp. 604F 的卤化酶基因克隆及序列分析

由于从 *Streptomyces* sp. 604F 发酵液粗提物中能检测到卤化物, 于是利用针对 FADH₂-依赖型卤化酶的简并引物 Halo-B4-FW/Halo-B7-RV 检测是否含有卤化酶基因。从 *Streptomyces* sp. 604F 基因组扩增出 530 bp 的片段, 与 *Streptomyces* sp. L131 的卤

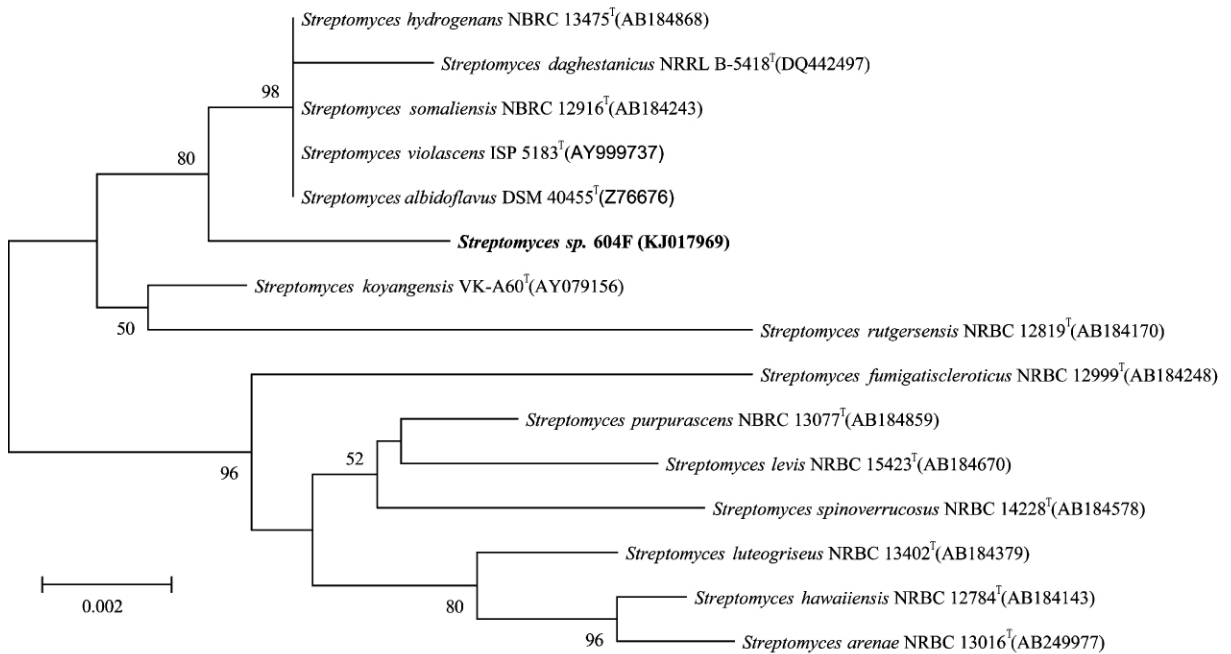


图 1. 根据 16S rRNA 基因序列构建 *Streptomyces sp. 604F* 的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene of *Streptomyces sp. 604F* and closely related type strains. Accession numbers of the type strains are given in parentheses. Numbers on nodes correspond to bootstrap values above 50%. Scale represents a 0.2% difference in sequence. The strain from this study is in boldface.

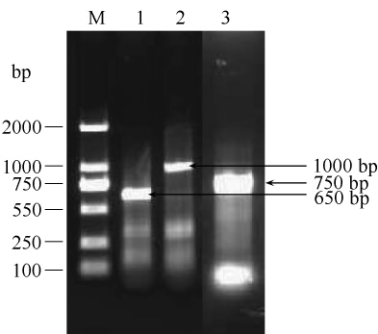


图 2. *Streptomyces sp. 604F* 的 PKS I、PKS II 及 NRPS 电泳检测图

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PKS I, PKS II and NRPS amplicons from *Streptomyces sp. 604F*. M, DL2000 DNA Marker; lane 1, PKS II; lane 2, NRPS; lane 3, PKS I.

化酶部分片段相似性最高,为 99%。采用 hiTAIL-PCR 分别从该片段两端染色体步移得到 3210 bp (图 4),包括一个完整的卤化酶基因 (*fdh604*) 及其侧翼序列。*fdh604* 全长为 1443 bp,GenBank 登录号为 KF597548。

经 Blast 比对, *fdh604* 与 *Streptomyces sp. FXJ7.023* 的卤化酶相似性最高,为 88%;*fdh604* 的上游是一段 568 bp 非编码序列,与 *Streptomyces sp.*

FXJ7.023 的非编码序列相似性为 85%,该非编码序列的上游为编码半胱氨酸合酶的 816 bp 部分序列,与 *Streptomyces sp. FXJ7.023* 中半胱氨酸合酶的相似性为 93%;*fdh604* 的下游有一段编码保守假定蛋白的 845 bp 序列,与 *Streptomyces sp. FXJ7.023* 的假定蛋白相似性为 89%。这 4 段已知序列可能属于某个活性卤化物生物合成基因簇,为推测 FDH604 的作用底物提供了一定的实验依据。

基于 *fdh604* 编码的氨基酸序列 (FDH604) 与已完成卤化产物鉴定的卤化酶构建系统发育树 (图 5),发现 FDH604 和参与合成糖肽类化合物的卤化酶聚成一簇,而且 Bootstrap 支持值高达 100%,提示 FDH604 可能参与类似化合物的合成。而其他类型卤化物,包括聚酮-类萜杂合类、烯二炔类、大环内酯类以及吡咯类等,其对应的卤化酶并没有在进化树上呈现明显的分类聚集。

尽管多个糖肽类化合物的生物合成基因簇已发表,但其卤化酶催化特征以及结构均尚未见报道。鉴于 FDH604 与糖肽类化合物的卤化酶都属于非色氨酸 FADH₂-依赖型卤化酶,而这种卤化酶中只对 CmlS^[18] 和 CndH^[19] 的序列与晶体结构特征进行了

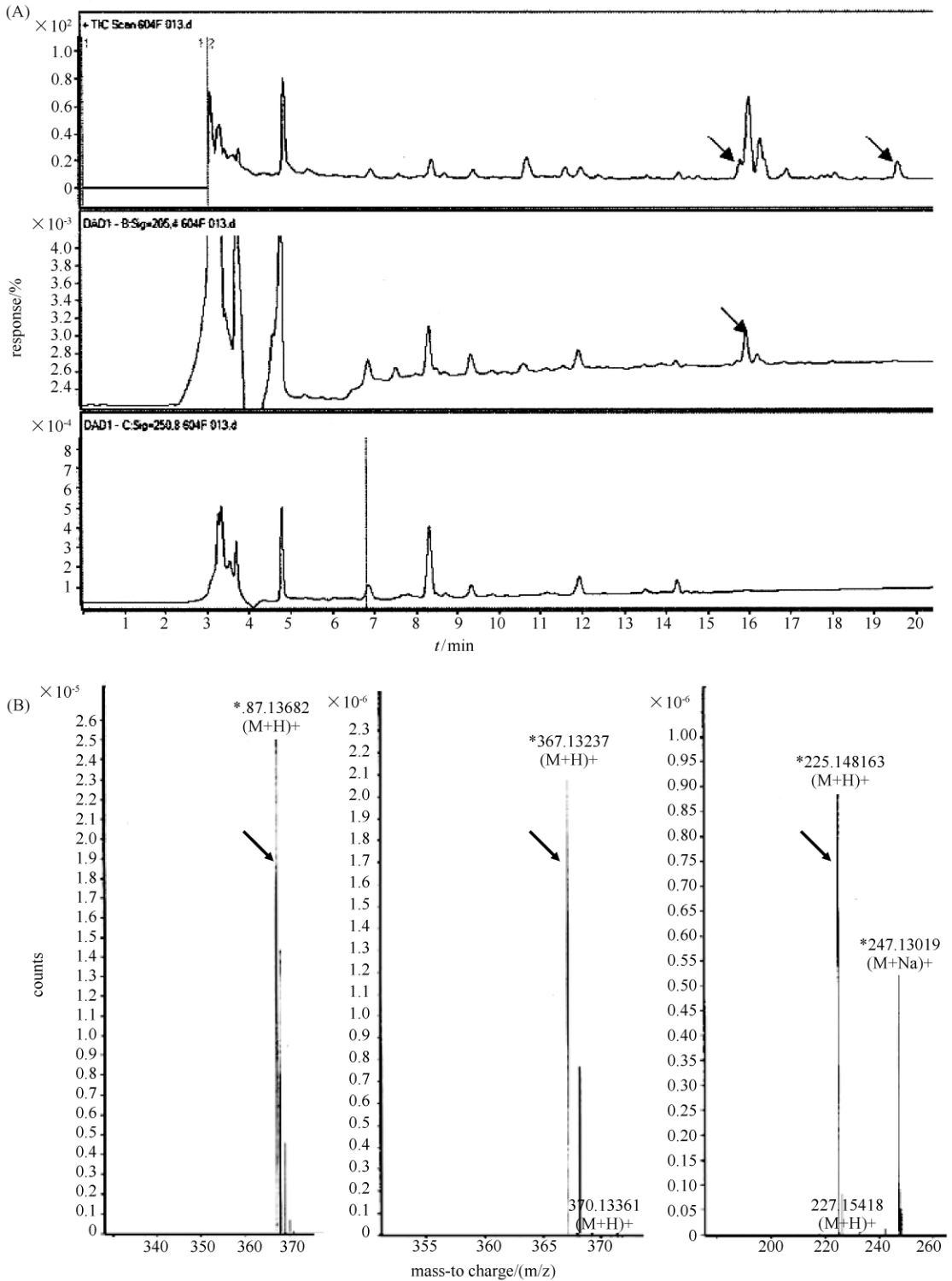


图 3. *Streptomyces* sp. 604F 的卤化物 LC-Tof MS 图谱

Figure 3. A: Liquid chromatography (LC) spectrum of extracts from *Streptomyces* sp. 604F fermentation, showing halometabolites in three graphs (black arrow); B: Time-of-flight mass spectrometry (Tof MS) spectrum of halometabolites separated by LC from *Streptomyces* sp. 604F (black arrow).

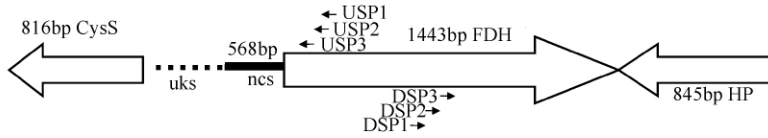


图 4. hiTAIL-PCR 扩增 *fdh604* 及侧翼部分基因序列示意图

Figure 4. Scheme showing amplification of *fdh604* full sequence and its flanking sequences via hiTAIL-PCR. USP1-3 and DSP1-3 are primers for hiTAIL-PCR; CysS, cystein synthase; uks, unknown sequence; ncs, non-coding sequence; FDH, flavin-dependent halogenase; HP, hypothetical protein.

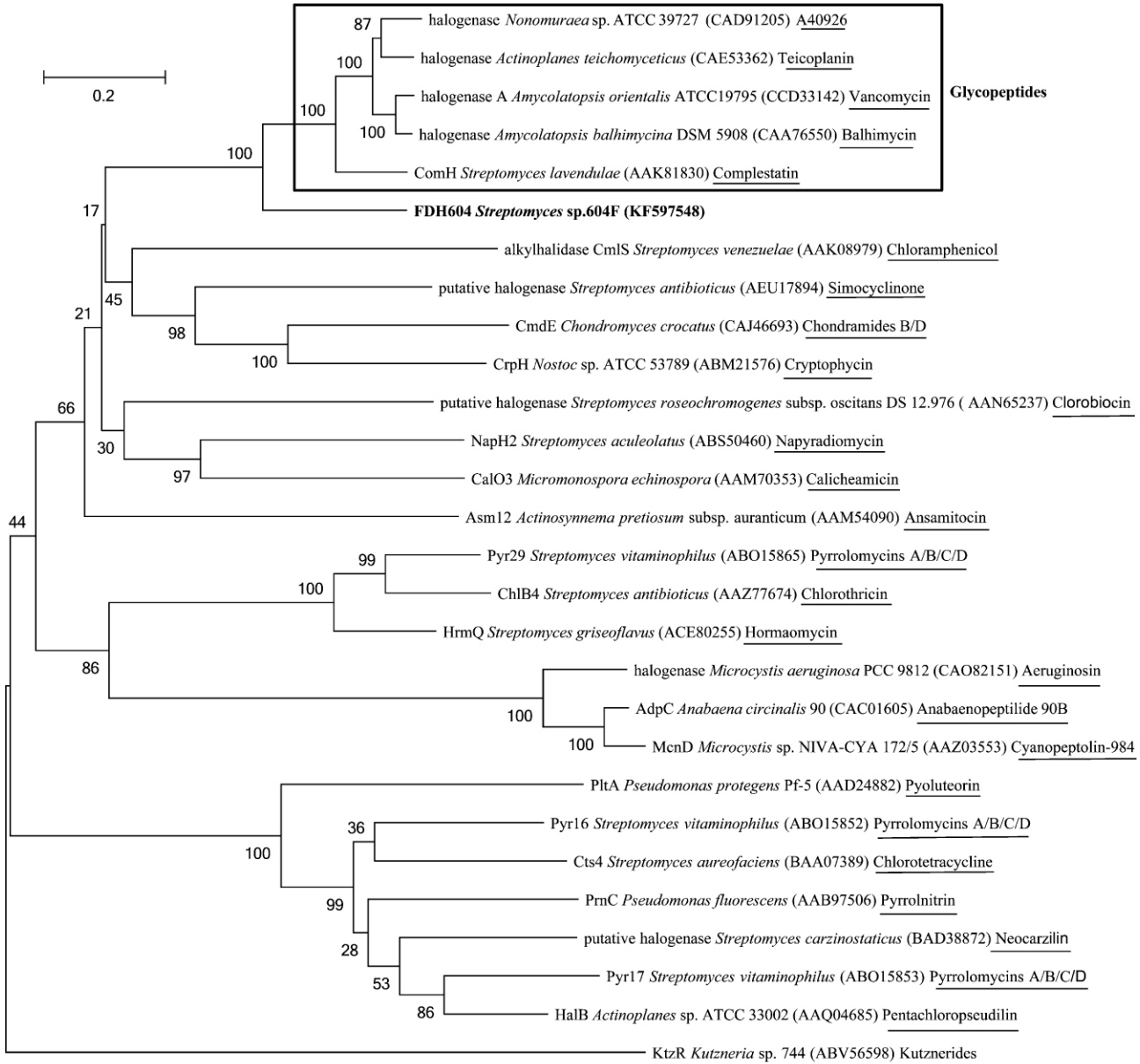


图 5. FDH604 与参与合成代表性活性化合物的卤化酶氨基酸序列系统发育树

Figure 5. Neighbor-joining tree based on amino acid sequences showing phylogenetic relationship between FDH604 and published halogenases involved in synthesizing underlined halometabolites. GenBank accession numbers are given in parentheses. FDH604 (in boldface) shows high homology with halogenases involved in glycopeptides biosynthesis (in black box). Numbers on nodes correspond to bootstrap values. Scale represents a 20% difference in sequence.

FDH604	MSPSPDAASAESFDVIVVGGGPGAGSSAATFVAMQGHRVLLLEKESFPRHQIGESLLPSTV	60
CndH	MSTR-----PEVFDLIVIGGGPGGSTLASFVAMRGHRVLLLEREAFPRHQIGESLLPATV	55
CmlS	-----MTRSKVAIIGGGPAGSVAGLTLHKLGHDTVYERSAFPYRVRGESLLPGTM	51
	. : :****. ** . : ** * : * : . : **** : : ***** * :	
FDH604	HGICALLGVDEELHAAGFVKKRGGTFRWGSSTEPWSFDLSEKFAGTPSFAYQVERMKF	120
CndH	HGICAMLGLTDEMKRAGFPIKRGGTFRWGKEPEPWTFGFRHP--DDPYGFAYQVERARF	113
CmlS	S-ILNRLGLQEIKIDAQNYVKKPSATFLWGQDQAPWTFSAAPKVPVWFDHAVQVKREEF	110
	* ** : : : . . : * . . ** ** . ** : * : * . . * ** : * . *	
FDH604	DQMLLDNARRKGVVVRERCSVRDVEENGRVSGVRFEDENGAAREASSRFVVDASGNQSR	180
CndH	DDMLLRNSERKGVDRERHEVIDVLFEGERAAGVRYRNTGVELMAHARFIVDASGNRTR	173
CmlS	DKLLLDEARSRGITVHEETPVTVDVLSDPDRVLTVR-RGGESVTVESDFVIDAGSGGP	169
	* : ** : : . : * : * : * ** . . : . * . : * : ** : * .	
FDH604	LYGRVGGRRRYSDFQNALYGYFEGGKRPAPNSGNITCVAFDAGWFWYIPLSDTLTSV	240
CndH	VSQAVG-ERVYSRFFQNALYGYFENGKRLPAPRQGNLSAAFQDQWFWYIPLSDTLTSV	232
CmlS	ISRKLG-VRQYDEFYRNFVWSYFKLKDPFEGDLKGTYSITFEDGWVWMIPIKDDLYSV	228
	: : * * * . * : : * : : ** : . . . * . . : * : * * * * . * * **	
FDH604	GAVVRK-ECADLIRGDRDKALAAMIADCPLVEGYLSEAKRVTSGPYGEVVRKIDYSYLS	299
CndH	GAVVSR-EAAEAIKDGHEAALLRYIDRCPIIKEYLAPATRVTTGDYGEIRIRKIDYSYCN	291
CmlS	GLVDRSKSAEVREQADAFYSSTLAKCAKAMDILGGAEQVD----EVRIVGDWSYDTE	283
	* ** : : * : . . : : * . * * : * * : * : * : * : * : * .	
FDH604	NFWSPGLTLVGDAVGFIDPLFSSGVHMATFSALLAARSVNSVLRGDLSEEECFEAYATRY	359
CndH	SFWKNGMALVGDAAACFVDPVFSGGVHLATYSALLVARAINTCLAGEMSEQRCFEEFERRY	351
CmlS	VFSADRFFLCGDAACFTDPLFSQGVHLASQSAVSAAAAIDRITRHGDEKDAVHAWYNRTY	343
	* : * * * . * * * : * * * : * * : * * : . . : : * . : *	
FDH604	RREYQTFHDFLVSYDVT--RDEQQYFDDARRVTRDSSP--GAGAFAGLVGGASDDT--	413
CndH	RREYGNFYQFLVAFYDMN--QDTSYFWSARKIINTEER--ANEAFVRLIAGRSNLDEPV	407
CmlS	REAYEQYHQFLASFYTFASFTEPDSEFWRKRRI TESDDRLTRKKWFESLAGNPEDPSG	403
	* . * : : * * : * * . : : * * * : : . . . : : * . * *	
FDH604	--ALTSDSYRDQR-----KDLRSRQS-----RDIHW	437
CndH	FQSVAKDFFTEREGFAGWFGGLVTSMAKGDGGGLMVGEGATDATESTGFAPENFMQGFTR	467
CmlS	TVASFRDRASTMIAIGRHQRPELSDDFSEAELNPARVRWISDLTKRLNSITRFKWTGGKA	463
	: * * : .	
FDH604	EGHRIQMQAAGF-EADDDVPAVEGG-----LTI AQDGMHWAK-SQESA	478
CndH	EITELQHLAMFGEDRGPEPLWGG-----LVPSRDGLAWAVESGEDA	510
CmlS	VLKQHYRVEPIGRLEQREVLANGEGLDMAQYPMDEARQIFQDLAEFEFGYKTLVKRLG	523
	. : * . . * . . : : : : . .	
FDH604	AV-----	480
CndH	AG-----	512
CmlS	AVGRQELSTQIVVRLMEAGLLTGYDAQGEKVFVQGRHLHFGGVGVEYEV	571
	*	

图 6. FDH604 与非色氨酸卤化酶 CmlS、CndH 的序列比对

Figure 6. Multiple alignment of FDH604 and non-tryptophan halogenases CmlS (GenBank No. AAK08979; 30% sequence identity) and CndH (GenBank No. CAQ43074; 47% sequence identity). Highly conserved regions are underlined, including domains GGGxxG and GWxWxIP.

Highly conserved residues catalyzing halogenation, i. e., Glu (E), Lys (K), and Asp (D) are in black box.

深入研究。将 FDH604 序列与这两个卤化酶序列比对分析(图 6),发现它们的 N-端序列相似性较高, C-端序列存在明显差异。在 N-端序列中, FDH604 除了含有 FADH₂-依赖型卤化酶的两个保守基序 (GGGxxG 与 GWxWxIP) 外,也包含在 CmlS 和 CndH 中为卤化活性位点的保守残基 K81,和作为广义酸参与催化的保守残基 E53,以及共价结合辅助因子

FAD 的 8 α 碳原子的高度保守残基 D293^[18-19]。

3 讨论

从生物合成途径来看,海洋放线菌产生的次生代谢产物主要是聚酮类化合物和非核糖体肽类化合物,分别由羧酸和氨基酸单体连续缩合而成,是复杂

天然药物中的两大重要家族,其合成机制是通过 PKS 和 NRPS 这两类酶系统介导的。已有报道以 PKS I、PKS II 及 NRPS 作为指示基因可快速分析微生物产次生代谢产物的潜力,如 Christiansen 等^[20]根据肽合成酶的氨酰腺苷酸化结构域的保守区设计简并引物进行 PCR 筛选,从 146 株待筛菌株中获得 109 株具有产蓝藻肽潜力的阳性菌株。本研究中 *Streptomyces* sp. 604F 同时具有 PKS I、PKS II 及 NRPS 基因,表明该菌株有编码产生聚酮类和多肽类次级代谢产物的基因基础,并可能通过不同杂合形式的 NRPS-PKS 介导合成更为复杂的次级代谢产物。另外,该菌株具有较强的抗白色念珠菌能力,进一步表明其作为分离活性次级代谢产物具有良好的前景。

通过 PKS 和 NRPS 生物途径合成的化合物往往需要经过后期修饰酶的结构修饰,如环化、卤化、糖基化等,才能最终形成有生物活性的化合物。且鉴于海洋微生物是活性卤化物的重要来源^[7],本研究通过 LC-Tof MS 技术初步检测 *Streptomyces* sp. 604F 的发酵粗提液中含有多个卤化物,表明该菌株具有产卤化物的能力,以及拥有编码卤化酶的基因。通过克隆和分析卤化酶基因,能建立起基因与卤化物之间的对应关系,并协助克隆整个生物合成基因簇。

从系统发育树分析,FDH604 与参与合成糖肽类化合物^[21-22]的卤化酶近缘,与其中的 Complestatin 合成卤化酶 ComH 序列相似性最高,为 58%。由于催化产生同类卤化物的卤化酶往往具有序列上的相似性,例如参与合成糖肽类卤化物 Balhimycin^[23]、万古霉素^[22]等的卤化酶彼此具有较高相似性(95%)。因此,推测 FDH604 可能催化产生糖肽类化合物。但在 LC-Tof MS 初步分离得到的卤化物中,没有找到糖肽类化合物,可能原因如下:一方面此次分离鉴定为初步探索,很多化合物还有待继续分离鉴定,另一方面由于基因表达沉默、培养条件及产物提取分离方案的不同等因素,可能会导致从同一菌株分离到的天然产物种类不同,因此并没有得到推导的糖肽类化合物。这正好说明在分离鉴定化合物时,如果基于卤化酶能推测化合物的信息,将增加产物分离提取和鉴定的目的性和导向性。

另外,卤化酶具有底物特异性,卤化酶序列相似性越高,则其各自作用的底物结构越相似^[10]。ComH^[21]氯化对羟基苯甘氨酸,该氨基酸参与构成

Complestatin 的六肽骨架,由此推测 FDH604 卤化的底物可能与对羟基苯甘氨酸结构类似。FDH604 和糖肽类化合物的卤化酶均属于非色氨酸 FADH₂-依赖型卤化酶,这种卤化酶需要底物结合在特定的载体蛋白上,才能识别并卤化底物。例如糖肽类化合物 Balhimycin 的卤化酶 BhaA 并不能催化游离的底物 β -羟基酪氨酸,该底物必须结合到载体蛋白(位于 NRPS 中的硫醇化结构域)上活化后其苯酚环上的 C 原子才能被 BhaA 卤化,且卤化反应发生在 OxyA/B/C 催化的环化反应之前^[23]。因此,克隆得到 FDH604 后,并不能直接针对推导的底物进行催化活性测试,需要解析整个生物合成基因簇。

从生物合成基因簇分析,糖肽类化合物的生物合成基因簇排布具有一定的保守性,其卤化酶基因上下游一般紧接 P450 单加氧酶基因和糖基转移酶基因^[22],然而 *fdh604* 的上下游序列并不编码 P450 单加氧酶和糖基转移酶,而与 *Streptomyces* sp. FXJ7.023 的已测序片段(基因登录号 JX306680)十分相似。因此,FDH604 和 *Streptomyces* sp. FXJ7.023 的卤化酶参与合成的卤化物可能类似,且推测属于新的糖肽类化合物,但在后者尚未见报道相应的卤化物。对此,我们将分离鉴定相应的产物。

根据 *Streptomyces* sp. 604F 的卤化酶基因克隆与分析,表明 FDH604 具有一定的新颖性,且推测出该菌株具有产新的糖肽类化合物的潜力,值得进一步克隆生物合成基因簇、分离鉴定目的卤化物,并增加抗菌和抗肿瘤活性分析。该研究也表明基于基因的快速分析,不仅能有效分析菌株产活性产物的潜力,而且对分离鉴定产物具有导向作用。

致谢:感谢中国水产科学院东海水产研究所樊成奇研究员提供菌株 604F 的卤化物 LC-Tof MS 检测信息。

参考文献

- [1] Smith DR, Grischow S, Goss RJ. Scope and potential of halogenases in biosynthetic applications. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17(2): 276-283.
- [2] Gribble GW. Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A comprehensive update. Berlin: Springer Verlag GmbH, 2010: 349-376.
- [3] Anderson JL, Chapman SK. Molecular mechanisms of enzyme-catalysed halogenation. *Molecular Biosystems*,

- 2006, 2(8): 350-357.
- [4] Vetter W. Marine halogenated natural products of environmental relevance. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, 188: 1-57.
- [5] Fujimori DG, Walsh CT. What's new in enzymatic halogenations. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007, 11(5): 553-560.
- [6] Neumann CS, Fujimori DG, Walsh CT. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. *Chemistry Biology*, 2008, 15(2): 99-109.
- [7] Van Pée KH, Patallo EP. Flavin-dependent halogenase involved in secondary metabolism in bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70(6): 631-641.
- [8] Burd' VN, van Pée KH. Tryptophan 7-halogenase from *Pseudomonas aureofaciens* ACN strain: gene cloning and sequencing and the enzyme expression. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, 30(4): 353-357.
- [9] Dorrestein PC, Yeh E, Garneau-Tsodikova S, Kelleher NL, Walsh CT. Dichlorination of pyrrolyl-S-carrier protein by FADH₂-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2005, 102(39): 13843-13848.
- [10] Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski A, Schneider K, Welzel K, Wohler SE, Holzenkämpfer M, Nicholson GJ, Bechthold A, Süssmuth RD, Vente A, Pelzer S. A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources. *Chembiochem*, 2007, 8(7): 757-766.
- [11] Yan Z, Wang B, Su W, Bi C, Qian D, Li H. Establishment of assay to detect bacterial 16S rRNA genes with multiplex semi-nested PCR method. *Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis*, 2001, 37(1): 22-24. (in Chinese).
- 闫志勇, 王斌, 苏维奇, 毕春霞, 钱冬萌, 李慧. 多重半套式 PCR 检测细菌 16S rRNA 基因方法的建立. 青岛大学医学院学报, 2001, 37(1): 22-24.
- [12] 祖若夫, 胡宝龙, 周德庆. 微生物实验教程, 上海: 复旦大学出版社, 1993: 292.
- [13] 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 group. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1): 10-24.
- [14] Bredholdt H, Galatenko OA, Engelhardt K, Fjærvik E, Terekhova LP, Zotchev SB. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(11): 2756-2764.
- [15] Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 2008, 3(9): 1452-1456.
- [16] Liu YG, Chen YL. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *Biotechniques*, 2007, 43(5): 649-654.
- [17] Zhou JP, Huang HQ, Meng K, Shi PJ, Wang YR, Luo HY, Yang PL, Bai YG, Yao B. Cloning of a new xylanase gene from *Streptomyces* sp. TN119 using a modified thermal asymmetric interlaced-PCR specific for GC-rich genes and biochemical characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(5): 1277-1292.
- [18] Podzelinska K, Latimer R, Bhattacharya A, Vining LC, Zechel DL, Jia Z. Chloramphenicol biosynthesis: the structure of CmlS, a flavin-dependent halogenase showing a covalent flavin-aspartate bond. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 397(1): 316-331.
- [19] Buedenbender S, Rachid S, Müller R, Schulz GE. Structure and action of the myxobacterial chondrochloren halogenase CndH: a new variant of FAD-dependent halogenases. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 385(2): 520-530.
- [20] Christiansen G, Dittmann E, Via Ordorika L, Rippka R, Herdman M, Börner T. Nonribosomal peptide synthetase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC. *Archives of Microbiology*, 2001, 176(6): 452-458.
- [21] Chiu HT, Hubbard BK, Shah AN, Eide J, Fredenburg RA, Walsh CT, Khosla C. Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2001, 98(15): 8548-8553.
- [22] Wohlleben W, Stegmann E, Süssmuth RD. Molecular genetic approaches to analyze glycopeptide biosynthesis. *Methods in Enzymology*, 2009, 458: 459-486.
- [23] Puk O, Bischoff D, Kittel C, Peizer S, Weist S, Stegmann E, Süssmuth RD, Wohlleben W. Biosynthesis of chloro-beta-hydroxytyrosine, a nonproteinogenic amino acid of the peptidic backbone of glycopeptide antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(18): 6093-6100.

Cloning and analysis of a halogenase gene of *Streptomyces* sp. 604F from the Arctic Ocean

Ruiqin Chen^{1,2}, Li Liao², Xiaohua Zhang³, Bo Chen^{1,2*}

¹College of Bioengineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

²SOA Key Laboratory for Polar Science, Polar Research Institute of China, Shanghai 200136, China

³ College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Abstract: [**Objective**] To clone a halogenase gene from halometabolite-producing *Streptomyces* sp. 604F to facilitate identification of potential halometabolites and its biosynthetic gene cluster. [**Methods**] We used agar block method to detect the antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. 604F. We further amplified the conserved regions of type I polyketide synthase (PKS I), type II polyketide synthase (PKS II) and nonribosomal peptide synthetase (NRPS) encoding genes by degenerative PCR. We detected halometabolites in fermentation extracts of *Streptomyces* sp. 604F analyzed by liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-Tof MS). Next, we amplified halogenase gene fragment from *Streptomyces* sp. 604F by using degenerative primers targeting reduced flavin adenine dinucleotide (FADH₂) -dependent halogenase genes. Finally, we cloned the full halogenase gene and its flanking sequences through high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR (hiTAIL-PCR). [**Results**] *Streptomyces* sp. 604F showed promising antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 10231, and its genome contained genes encoding PKS I, PKS II, NRPS and a halogenase with 1443 bp. The halogenase is a new non-tryptophan halogenase, and most closely related to halogenases catalyzing the chlorination of glycopeptides. [**Conclusion**] *Streptomyces* sp. 604F possessed a new non-tryptophan halogenase, which may be involved in halogenation of glycopeptide-like metabolites. The cloning and analysis of this halogenase have provided guidance for searching target halometabolites, and laid the foundation for obtaining the biosynthetic gene cluster.

Keywords: halogenase, actinomycetes, Arctic

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA092105), by the Special Foundation for Comprehensive Survey of the Polar Environment (CHINARE01-06) and by the Natural Science Foundation of Shanghai (13ZR1462700)

* Corresponding author. Tel: +86-21-58711026; E-mail: chenbo@pric.gov.cn

Received: 30 September 2013 / Revised: 30 December 2013