

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (7) :770 - 777; 4 July 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.07.007

长松萝中一个聚酮合酶基因簇的克隆和鉴定

王毅¹, 周旭¹, 许宰铎², 王娟^{1*}

¹云南省林业科学院, 国家林业局重点开放性实验室, 云南珍稀濒危特森林植物繁育和保护重点实验室, 云南 昆明 650204

²韩国国立顺天大学韩国地衣研究所, 顺天 540742, 韩国

摘要: 【目的】探索药用地衣长松萝 (*Usnea longissima* Ach) 聚酮化合物的生物合成基因簇, 克隆聚酮合酶 (PKS) 基因并分析其功能。【方法】以长松萝地衣型真菌为材料, 通过巢氏 PCR 获得聚酮合酶基因片段和原位杂交筛选基因组文库获得聚酮合酶基因及相邻基因簇。并对获得聚酮合酶进行分子系统进化分析和基因表达分析。【结果】获得药用地衣长松萝中的编码聚酮合酶基因 *UIPKS5* 的全长序列以及相邻修饰基因 β -内酰胺酶和脱水酶。聚酮合酶 *UIPKS5* 含有酮体合成酶 (KS), 酰基转移酶 (AT), 产物模板 (PT) 以及酰基载体蛋白 (ACP) 结构域。分子系统进化分析显示 *UIPKS5* 属于非还原型聚酮合酶中第五组, 与蒽醌类化合物生物合成相关。通过半定量 RT-PCR 分析表明山梨醇 (10%) 和蔗糖 (2% 和 10%) 能够强烈诱导 *UIPKS5* 基因表达。【结论】聚酮合酶 (*UIPKS5*) 及相邻修饰基因 β -内酰胺酶和脱水酶与长松萝中蒽醌类化合物生物合成相关。

关键词: 地衣型真菌, 长松萝, 聚酮合酶, 半定量 PCR

中图分类号: Q814 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 07-0770-08

聚酮化合物 (polyketides) 是一类庞大的次级代谢家族, 拥有 7000 多种不同结构的化合物^[1], 目前, 超过 20 种聚酮类化合物已成为商业化的药物^[2]。聚酮化合物是通过聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 催化形成的, 其催化过程类似于脂肪酸合酶 (FAS) 催化的脂肪酸生物合成, 即通过酰基-CoA 活化的底物之间的重复脱羧缩合而合成^[3-4]。真菌聚酮合酶主要属于重复 I 型 PKS。它常包括酮体合成酶 (keto synthase, KS)、酰基转移酶 (acyltransferase, AT)、脱水酶 (dehydratase, DH)、甲基转移酶 (methyl transferase, MeT)、烯脂酰还原酶 (keto reductase, ER)、酮体还原酶 (enoyl reductase, KR)、

酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP) 和环化酶 (cyclase, CYC) 等结构域。真菌 I 型 PKS 根据其拥有的结构域不同可以分为非还原型 (non-reducing, NR-PKS), 部分还原型 (partially-reducing, PR-PKS) 和高度还原型 (highly-reducing PKS, HR-PKS)^[1, 5-6]。对于真菌非还原型 PKS, 李嫣然等根据产物模板结构域 (PT domain) 生物信息学分析结果将其分为 5 个组。产物模板结构域决定着聚酮化合物的链长和环化方式, 因此也决定了最终化合物的基本结构。5 组聚酮合酶的功能分别为: 第 1 组的聚酮合酶合成四酮体 (tetraketide) 骨架后, 通过 C2-C7 环化形成一个芳香环; 第 2 组的聚酮合酶合成五

基金项目: 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目 (2010CI016)

* 通信作者。Tel /Fax: +86 0871-65822842; E-mail: 22825818@qq.com

作者简介: 王毅 (1981 -), 男, 四川省广安市人, 博士, 助理研究员, 从事植物及真菌分子生物学研究。E-mail: dog_608@hotmail.com

收稿日期: 2013-09-27; 修回日期: 2014-01-15

酮体 (pentaketide) 后, 再通过 C2-C7 醇醛缩合和 TE 结构域的环化作用形成 2 个芳香环; 其余 3 个组都是合成长链的聚酮类化合物, 第 3 组的聚酮合酶通过 C2-C7 环化生产第 1 个芳香环; 第 4 组的聚酮合酶通过 C4-C9 或 C2-C11 生产芳香环; 第 5 组的聚酮合酶则通过 C6-C11 或 C4-C13 生产芳香环, 第 5 组的聚酮合酶通常合成蒽醌类化合物^[7]。对 PKS 基因座分析发现, 真菌中的 PKS 基因通常与 PKS 后修饰过程的编码基因、调节基因及抗性基因成簇存在^[5,8]。

地衣是由真菌和藻类或蓝细菌结合在一起而构成的共生复合体^[9-10]。地衣产物具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗辐射、抗氧化等独特的生物活性, 在天然产物药用开发领域具有广阔应用前景^[11-13]。然而, 由于地衣在自然界中生长缓慢, 因此对其次生代谢产物生物合成进行分析面临巨大困难, 同时也很难获得大量的次生代谢产物^[14], 更重要的是在人工培养条件下获得具有生物活性的地衣产物也是一个巨大的挑战。因此 Miao 等在 2001 年提出利用异源表达的方式获得地衣产物的设想^[15]。地衣次生代谢产物中大多数独特的化合物如缩酚酸, 缩酚酸环醚, 二苯骈呋喃都属于聚酮化合物^[16]。因此, 成功分离获得聚酮合酶基因是异源表达获得地衣产物的第一步。虽然目前已经从地衣或地衣型真菌中分离得到一些非还原型的聚酮合酶, 但是并没有分离得到非还原型第五组类型的聚酮合酶。

1 材料和方法

1.1 材料

长松萝 (*Usnea longissima*) 地衣型真菌由韩国地衣资源中心提供。地衣型真菌于 MYA (麦芽糖提取物 20 g, 酵母提取物 2 g, 琼脂 8 g, 用水定容至 1 L) 培养基上 15℃ 培养, 并定期转接。

1.2 KS 结构域扩增

收集长松萝地衣型真菌菌丝团, 采用植物提取试剂盒提取基因组 DNA。利用在线兼并引物设计软件 GeneFisher (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/>), 设计获得兼并引物 (KS3: 5'-GGNKCNTCBYAYMVRTCNATGAA-3'; KS5: 5'-GGR TGVGGNCCRATYTCVAYCCA-3'), 以长松萝地衣型真菌 DNA 为模板进行巢式 PCR 扩增, 将 PCR 产物

链接到克隆载体 pEASY-T3 上后, 筛选出含有插入片段的克隆, 并对插入片段进行测序。

1.3 基因组文库筛选

根据获得的 KS 结构域基因片段设计特异引物 (FKS3526: 5'-CGCAGAGTCTTAGTGCCCTA-3'; RKS3526: 5'-CACACCACAACCGTTCATAC-3'), 用 DIG-High Prime Labeling Mix 试剂盒制备带有 DIG 标记的探针。并用 CopyControl™ HTP Fosmid 文库构建试剂盒构建长松萝地衣型真菌基因组文库。将长松萝地衣型真菌基因组文库克隆转移并固定在尼龙膜上后, 利用 DIG 特异探针在 42℃ 杂交, 最后用 Digoxigenin 检测试剂盒检测杂交结果, 获得阳性克隆。

1.4 DNA 测序与分析

阳性克隆被送到测序公司 Genotech Co. Ltd (Seoul, South Korea) 测序。利用 FGENESH 软件^[17] 分析获得潜在的阅读框后, 用 BLAST 软件对其可能功能进行预测, 并用 CDD-Search/PRS-BLAST 软件对保守结构域进行分析。最后, 将获得的长松萝 PKS 与来自 GenBank 里的 31 条真菌非还原型聚酮合酶进行比对, 多序列的比对由 ClusterW 程序完成。并用 MEGA 4.0.2 软件的邻位相连算法 (Neighbor-joining) 1000 次自检举 (boot straping) 绘制出进化树图像。

1.5 长松萝地衣型真菌总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

将收获的地衣型真菌长松萝菌丝团分别接种在以 MYA 为基本培养基含有不同碳氮源添加物的培养基上。其中, 碳源包括: 肌糖, 甘露醇, 山梨醇, 蔗糖, 葡萄糖和果糖, 按照 2% 和 10% (W/V) 2 个不同浓度分别加入基本培养基 MYA 中。氮源包括: 谷氨酸, 天冬酰胺, 甘氨酸和丙氨酸, 按照 0.2% 和 1% (W/V) 两个不同浓度分别加入基本培养基 MYA 中。15℃ 培养 2 个月后, 收获菌丝团。

按照 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) 的说明书分别提取不同培养基上的长松萝地衣型真菌总 RNA, 并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量后, 将 RNA 保存在 -80℃ 超低温冰箱。cDNA 合成参照 Prime Script 1st Stand cDNA Synthesis 试剂盒 (宝生物工程有限公司, 大连) 的说明书操作, 并将 cDNA 保存在 -20℃ 冰箱。以特异引物 (FKS3526 和 RKS3526) 检测聚酮合酶 UIPKS5 基因表达情况。根

据基因表达实验结果,选择 UIPKS5 表达的 cDNA 为模板,以特异引物 (UIPKS5-F0: 5'-ATGCGCGGGA GCGAAATGA-3'; UIPKS5-R0: 5'-CTAGCTGTAAT ATTCTTCCA3-3') 扩增获得 UIPKS5 全长 cDNA。

2 结果

2.1 KS 结构域的克隆

利用兼并引物 KS3 和 KS5 获得大约 700 bp 的扩增片段 (图 1), 将片段回收后连接到 pEASY-T3 载体上后, 选取 6 个克隆进行测序。对测序结果分析后, 发现其中克隆 KS3526 含有 KS 结构域基因片段。根据 KS3526 基因片段序列设计一对新的特异引物 (FKS3526 和 RKS3526)。将所得 740 bp 的 DNA 序列经 NCBI 中的 blastx 搜索, 结果显示该片段的编码产物与 *Talaromyces stipitatus* 的聚酮合酶 GenBank accession No. XP_002482968. 1) 的相应片段具有的 66% 的相似性。

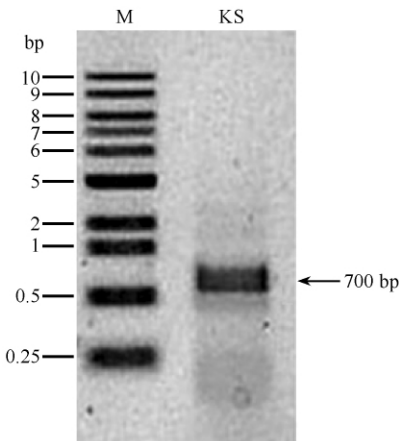


图 1. 利用兼并引物 KS3 和 KS5 扩增长松萝地衣型真菌聚酮合酶 KS 结构域基因片段

Figure 1. Amplified KS domain fragment of *U. longissima* with degenerate primers (KS3 and KS5). M: DNA marker; KS: PCR product.

2.2 结构域分析

利用带有 DIG 标记的特异探针筛选基因组文库, 如图所示: 蓝色点为阳性克隆, 将此克隆命名为 FoKS3526 (图 2)。将 FoKS3526 测序后, 利用 FGENESH 软件分析得到 4 个阅读框。利用 BLASTN 在线软件分析预测。

4 个基因为: 非还原型聚酮合酶 (UIPKS5), β -内酰胺酶, 脱水酶和一个保守蛋白 UIPKS5 全长



图 2 基因文库筛选结果

Figure 2. Colony hybridization of genome library of *U. longissima*.

5698 bp, 通过对比 DNA 和 cDNA 序列发现 UIPKS5 含有 4 个内含子 (从起始密码子开始依次为: 430 - 487, 788 - 840, 1946 - 2006, 4363 - 4431)。5 个外显子的拼接总长为 5463 bp, 可编码 1820 个氨基酸残基 (GenBank 登录号为 JX232187)。将 UIPKS5 氨基酸序列与 NCBI 蛋白数据库比对发现, UIPKS5 构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的聚酮合成酶 AptA (GenBank 登录号为 XP_657754. 1) 具有 70% 的相似性。AptA 被 Chiang 等研究者通过缺失突变确定其参与构巢曲霉中 monodictyphenone 和大黄素的生物合成^[18]。将 UIPKS5 与其它聚酮合酶对应的结构域分析发现 UIPKS5 含有 5 个结构域, 其活性位点保守残基分别为酮体合成酶结构域 (DTACSSSL), 酰基转移酶结构域 (IGHSLGE), 产物模板结构域 (GHSMNGCGVVTSS), 酰基载体蛋白结构域 (GIDSLMSLV) (图 3)。

2.3 分子系统进化分析

利用 MEGA 自带的 ClusterW 程序对 UIPKS5 和其他 31 条非还原型聚酮合酶的模板产物结构域进行多序列比对后, 利用邻位相连算法绘制出进化树图像。分析结果显示 UIPKS5 和构巢曲霉 AptA 及土曲霉聚 ACAS 等聚酮合酶形成独立分支, 即非还原型聚酮合酶第五组^[7]。(图 4) 在第 5 组中的聚酮合酶通过 C6-C11 或 C4-C13 生产芳香环, 通常合成蒽醌类化合物, 比如构巢曲霉 AptA 参与了 asperthecin 的生物合成^[18], 土曲霉 ACAS 参与了多个蒽醌类化合物的生物合成^[19]。

2.4 不同碳氮源添加物对 UIPKS5 基因表达影响

将长松萝地衣型真菌接种在不同碳氮源添加物

KS domain

```
TSTIP   CRAFGPGRINYPFKFAGPSYSIDTACSSGLAAIEVACQALWNGEVDTAVTGGVNVLTNPD
ATERR   CRAFGPGRINYPFKFWGPSYSIDTACSSSLATVEAACTSLWNGSTDTAVVGGVNVLTNSD
AFUMI   CRAFGPGRINYPFKLWGPSFSIDTACSSSLATIQAACALWNGDTDVAVAGGMNVLTNSD
PMARN   CRAFGPGRINYPFKFAGPSYSVDTACSSGLAAIQVACTSLLAGEVDTAVAGGVNLTNCD
ANIDU   CRAFGPGRINYPFKFSGPSFSCDTACSSSLATIQAACSLWNGDMDVAVAGGMNVLTNSD
USPKS5  CRAFGPGRINYPFKFSGPSFSCDTACSSSLATIQA-ACTSLWSGDTDT-VEGGMNILTNSD
***** ***. * ***** **.. ** . * * * * **.*.*** *
```

AT domain

```
TSTIP   PQDHAHSAVITQLALVCTEIALAKYWSSSLGKVPDVIHSLGEYAAMHIAGVVSASDTIFMVG
ATERR   PQDHAHSQVVTQLALVGTQIALAKYWMISLGVPRPEVVVHSLGEFAALHIAGVLSAGDTLFLVG
AFUMI   PRDHAHCPVITQLALVCTEIALAKYVWVSLGVTDPVVVHSLGEYAALHIAGVLSASDAIFLVG
PMARN   EESYRHSPTATQVALVCVEIALAKYVQSLGKVPDVIHSLGEYAALYVAGVLSASDAISMVG
ANIDU   EKDYAHSPPVVTQLALVSVIEIALAKYWISLGVKPNVAVVHSLGEYAALYVAGVLSASDALFLVG
USPKS5  QQDRAHTPVVTQLALVCTEIALAKYVWVSLGKVPDVIHSLGEYAALYVAGVLSASDTIYLVG
* . **.* ** . ***** ***** * * . *****. ** . ***. * * * . . **
```

PT domain

```
TSTIP   TTTVQQIIEENFNNGSAGTVIMQSDLMQADLLAAAHGHSNMKCGVVTSSIHADIAYTLGNY
ATERR   TSTVQKIVEESFPDGRAARVVMQSDLMQSDLLEAAYGHKMNCGVVTSSIHADVGFITLQGY
AFUMI   TSTVQQIIEEQYDGAAGSVVMQSDLMQPDFLAAAYGHKMNCRGVVTSSIHADIAFTLGEY
PMARN   TSTVQQIIEETFSETSSVVMRNLMEEDFKAAAYGHRMNDCGVVTSSIHADIAYTLCEY
ANIDU   TSTVQQIIEESFNNGSAGKVVVMQSDMMQPDFLDAAHGHKMNCGVVTSSIHGDIGFTLGGY
USPKS5  TSTVQQIIEENFQGSTGKVVVMQSDLMQPEFLAAANGHSNMNCGVVTSSIHADIAYTLGDY
* . ***. * * . . * . * * . * . ** ** * ***** * . ** *
```

ACP domain

```
TSTIP   EAGLDLSDMEDDASFAALGIDSLMSLVIAEKFKTELDIKVSGSLFLDYETIGDLREWLDE
ATERR   EAGMEVTDLQDDAIFANLGVDSLMSLVIAEKFREELGVVAVAGSLFLEYPTVGDLSWLE
AFUMI   EAGLGLSDLKDSASFSSLGIDSLMSLVISEKPRETLGVTVTGSLFLEYPTVGDLSWLE
PMARN   EGALELSDLPDDAIFANLGVDSLMSLVIAEKFRDQLGVTVNGSLFLEYPTVGDLSWLE
ANIDU   EAALELSDLTDDASFANLGVDSLMSLVIAEKFREELGVTVTGSLFLEYPTIGDLRSWLE
USPKS5  EAAIELVDLQDEASFGSLGIDSLMSLVIAEKFRDELGVTVGGSLFLEYPTLGDLSWLEE
* . . * . * * * ** *****. ***. * . * *****. * * . ***. ** *
```

图 3. UIPKS5 结构域活性位点分析

Figure 3. Alignment of *Usnea longissima* predicted polyketide synthase (UIPKS5) active regions with five closely related fungal PKSs. TSTIP: *Talaromyces stipitatus* PKS (XP_002482968.1), ATERR: *Aspergillus terreus* PKS (XP_001217072.1), AFUMI: *Aspergillus fumigatus* PKS4 (XP_751377.1), PMARN: *Penicillium marneffeii* PKS (XP_002144865.1) ANIDU: *Aspergillus nidulans* PKS (XP_657754.1). Amino acid residues conserved among all sequences are marked with an asterisk; variability between two amino acid residues is marked with a dot. Highlighted regions indicate the catalytic amino acid residue in the active site.

的 MYA 培养基上, 15°C 培养 2 个月后, 提取 RNA 后反转录成 cDNA, 以特异引物检测 UIPKS5 的表达情况, 同时以微管蛋白为阳性对照。RT-PCR 结果显示 UIPKS5 基因在基本 MYA 培养基上并不表达, 在 MYA 中添加有谷氨酸, 天冬酰胺, 甘氨酸, 丙氨酸, 肌糖, 甘露醇, 葡萄糖, 果糖的培养基上有微弱表达。浓度为 10% 山梨醇能够诱导 UIPKS5 强烈表达, 而浓度为 2% 和 10% 的蔗糖都能够诱导 UIPKS5 强烈表达(图 5)。

3 讨论

长松萝 (*U. longissima* Ach) 为地衣类松萝科 Usneaceae 松萝属植物。在亚洲, 欧洲和北美地区被长期作为当地的民族药使用^[21-22]。目前, 已经从长松萝中提出许多具有抗癌、抗炎症、抗菌等生物活性的化合物, 比如松萝酸 (Usnic acid), 拉马酸 (Ramalic acid), 巴尔巴地衣酸 (Barbat icacid)^[23-25]。如同其他地衣一样, 长松萝也是真菌

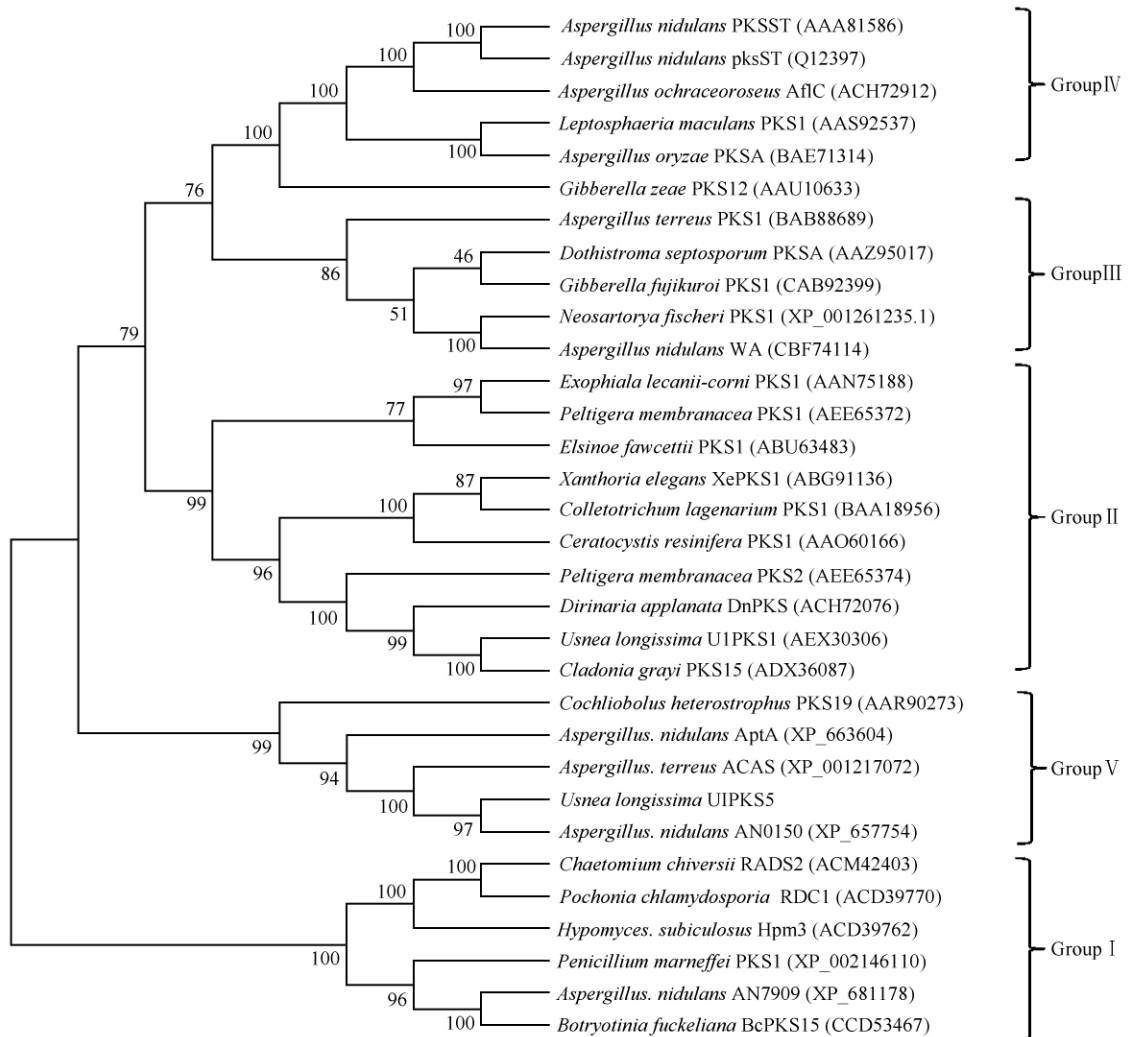


图 4. UIPKS5 与其他 31 条非还原型聚酮合酶分子系统进化分析

Figure 4. Phylogenetic analysis of UIPKS5 and other 31 non-reducing polyketide synthase. The alignment was done by using Clustal W and analyzed with the minimum evolution (ME) method embedded in the MEGA 4.0.2 program. A phylogenetic tree with 1000 bootstrap replicates was generated and the clade number is their bootstrap values. GenBank accession numbers of fungal PKS used in phylogenetic analysis were marked in brackets *Usnea longissima* UIPKS5 clade obtained is marked in bold.

和藻类的共生复合体。在野外,长松萝中除了有长松萝地衣型真菌和藻类,还有一些非地衣型真菌附着在长松萝地衣体上,比如地衣内生真菌^[26]。因此我们利用藻菌分离技术获得长松萝的地衣型真菌,并以长松萝地衣型真菌作为研究材料探讨长松萝聚酮类化合物的生物合成。

本文利用兼并引物扩增获得 KS 结构域基因片段,通过 DIG 标记后筛选基因组文库,从长松萝地衣型真菌中获得全长的聚酮合酶基因 UIPKS5 以及相邻基因 β -内酰胺酶和脱水酶。结构域分析显示 UIPKS5 含有酮体合成酶 (KS),酰基转移酶 (AT),产物模板

(PT) 以及酰基载体蛋白结构域 (ACP)。通过分子系统进化分析显示 UIPKS5 属于非还原型聚酮合酶中第五组。第五组的聚酮合酶与蒽醌类化合物合成相关^[7]。通过比较构巢曲霉中 Monodictyphenone 和 Asperthecin 生物合成基因簇和土曲霉中 Atrochryson 生物合成基因簇(图 6),我们发现 UIPKS5 与以上 3 种蒽醌类生物合成基因簇都拥有一个含有 KS-AT-PT-ACP 结构域的聚酮合酶基因和一个 β -内酰胺酶以及其他修饰基因。在类似的基因簇中,聚酮合酶负责合成聚酮前体,但由于此类聚酮合酶并没有类似于硫酯酶的结构域,因此聚酮前体产物由 β -内酰胺酶

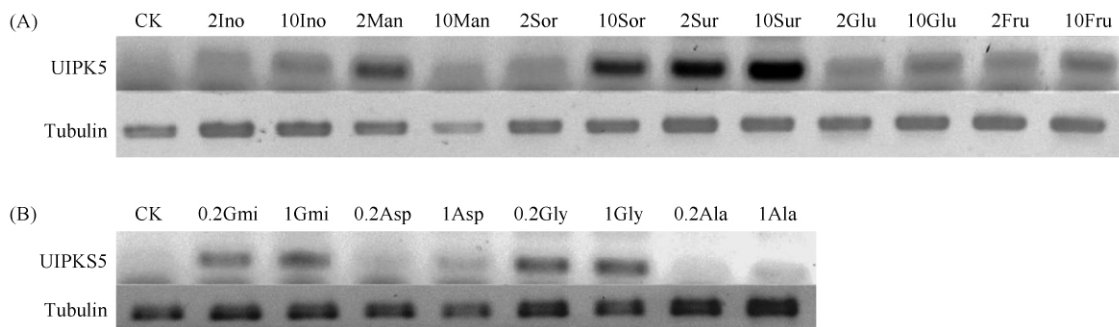


图 5. UIPKS5 在不同氮碳源添加物的培养基上基因表达情况

Figure 5. Gene expression of UIPKS5 with different carbon source and amino acid. A: different carbon source, CK: MYA basic medium, 2Ino: 2% inositol, 10Ino: 10% inositol, 2Man: 2% mannitol, 10Man: 10% mannitol, 2Sor: 2% sorbitol, 10Sor: 10% sorbitol, 2Sur: 2% sucrose, 10Sur: 10% sucrose, 2Glu: 2% glucose, 10Glu: 10% glucose, 2Fru: 2% fructose, 10Fru: 10% fructose; B: different amino acid, 0.2Gmi: 0.2% glutamine, 1Gmi: 1% glutamine, 0.2Asp: 0.2% asparagine, 1Asp: 1% asparagine, 0.2Gly: 0.2% glycine, 1Gly: 1% glycine, 0.2Ala: 0.2% alanine, 1Ala: 1% alanine.

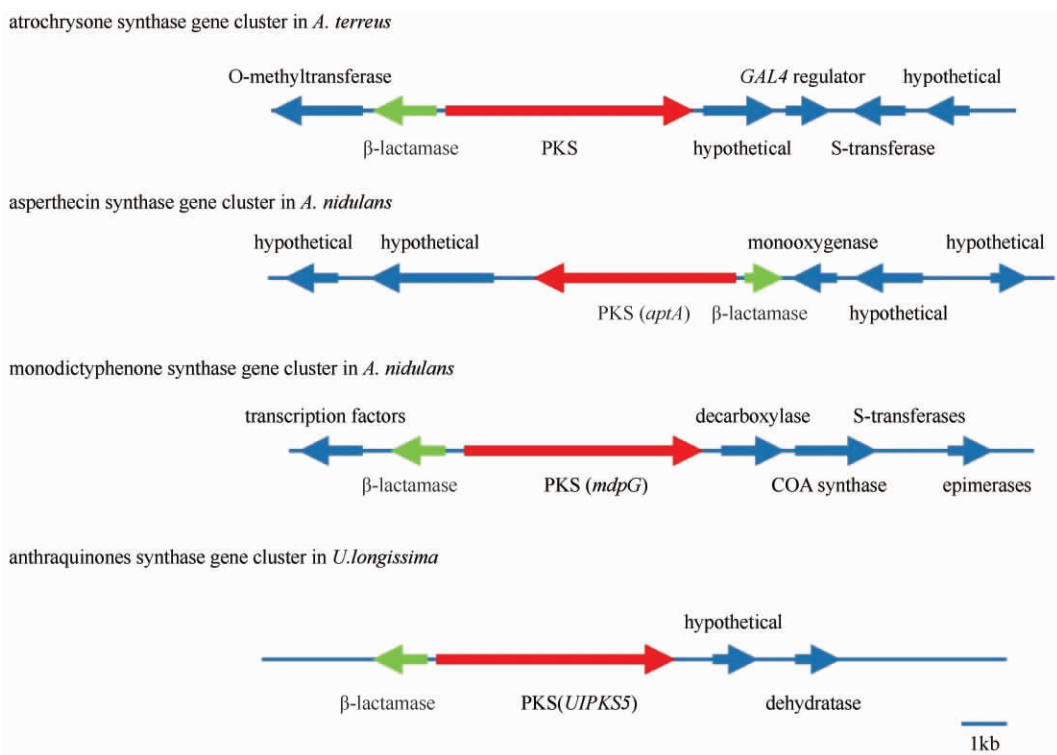


图 6. UIPKS5 基因簇与已知真菌蒽醌类化合物生物合成基因簇比较

Figure 6. UIPKS5 gene cluster was compared with known anthraquinone biosynthesis gene cluster in fungi.

从聚酮合酶上卸载下来^[20]。

由于之前文献报道,渗透压和不同碳氮添加物会影响地衣型真菌的聚酮类次生代谢物的产生^[27-28]。因此我们利用 RT-PCR 检测 UIPKS5 在不同碳氮源添加物培养基上表达情况,实验结果显示 UIPKS5 在 MYA 并不表达,在大多数添加物中都处于微弱表达的情况,只有在添加山梨醇(10%)和蔗糖(2%和10%)的培养基上能够大量表达。这

说明 UIPKS5 的表达受到培养基成分的影响。传统的地衣化学分析显示蒽醌类化合物并不是长松萝的主要产物,因此直到 2009 年,冯洁等才第一次从 9 kg 的干燥长松萝粗粉中提取得到与大黄素类似的蒽醌化合物长松萝酮(10 mg)^[29]。结合 UIPKS5 表达实验结果,说明大多数情况长松萝地衣型真菌中蒽醌类生物合成基因处于弱表达或者沉默的状态。

本实验从长松萝地衣型真菌中获得全长的聚酮

合酶基因 *UIPKS5* 以及相邻基因, 同时利用 RT-PCR 检测 *UIPKS5* 在不同碳氮源添加物的培养基上表达情况, 为进一步探讨长松萝萜醌类物质生物合成奠定基础, 同时也为异源表达地衣产物提供必要材料。

参考文献

- [1] Cox RA. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007, 5 (13): 2010-2026.
- [2] Weissman, KJ, Leadlay PF. Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (12): 925-936.
- [3] Sun Y, Deng Z. Polyketides and combinatorial biosynthetic approaches. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2006, 31 (1): 6-18. (in Chinese)
孙宇辉, 邓子新. 聚酮化合物及其组合生物合成. 中国抗生素杂志, 2006, 31 (1): 6-18.
- [4] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7 (2): 285-295.
- [5] Xu Y, Wei K. Advance in fungal polyketide synthases gene. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27 (2): 1-5. (in Chinese)
许杨, 魏康霞. 真菌聚酮合酶基因的研究进展. 食品与生物技术学报, 2008, 27 (2): 1-5.
- [6] Kroken S, Glass NL, Taylor JW, Yoder OC, Turgeon BG. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (26): 15670-15675.
- [7] Li YR, Xu W, Tang Y. Classification, prediction, and verification of the regioselectivity of fungal polyketide synthase product template domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (30): 22764-22773.
- [8] Hoffmeister D, Keller NP. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports*, 2007, 24 (2): 393-416.
- [9] Honegger R. Cytological aspects of the mycobiont-photobiont relationship in lichens. *Lichenologist*, 1984, 16 (2): 111-127.
- [10] Chen J. Understanding and thinking of concept and definition of "Lichen". *Chinese Biodiversity*, 1994, 2 (4): 228-230. (in Chinese)
陈健斌. 地衣二元性及其概念的双重理解与思考. 生物多样性, 1994, 2 (4): 228-230.
- [11] Stojanovic G, Stojanovic I, Smelcerovic A. Lichen depsidones as potential novel pharmacologically active compounds. *Organic Chemistry*, 2012, 9 (2): 178-184.
- [12] Zambare VP, Christopher LP. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*, 2012, 50 (6): 778-798.
- [13] Fang M, Wang Q, Hu Z. Advances in studies on chemical constituents from lichen and their pharmacological effects. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2011, 42 (12): 2571-2576. (in Chinese)
房敏峰, 王启林, 胡正海. 地衣化学成分和药理作用研究进展. 中草药, 2011, 42 (12): 2571-2576.
- [14] Balaji P, Hariharan GN. In vitro antimicrobial activity of *Parmotrema praesorediosum* thallus extracts. *Research Journal of Botany*, 2007, 2 (1): 54-59.
- [15] Miao V, Coëffet-LeGal MF, Brown D, Sinnemann S, Donaldson G, Davies J. Genetic approaches to harvesting lichen products. *Trends in Biotechnology*, 2001, 19 (9): 349-355.
- [16] Stocker-Wörgötter E. Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports*, 2008, 25 (1): 188-200.
- [17] Salamov AA, Solovyev VV. Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA. *Genome Research*, 2000, 10 (4): 516-522.
- [18] Chiang YM, Szewczyk E, Davidson AD, Entwistle R, Keller NP, Wang CCC, Oakley BR. Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 76 (7): 2067-2074.
- [19] Szewczyk E, Chiang YM, Oakley CE, Davidson AD, Wang CCC, Oakley BR. Identification and characterization of the asperthecin gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (24): 7607-76012.
- [20] Awakawa T, Yokota K, Funa N, Doi F, Mori N, Watanabe H, Horinouchi S. Physically discrete β -lactamase-type thioesterase catalyzes product release in atrochryson synthesis by iterative type I polyketide synthase. *Chemistry & Biology*, 2009, 16 (6): 613-623.
- [21] Lans C, Turner N, Khan T, Brauer G, Boepple W. Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2007, 3 (11): doi: 10.1186/1746-4269-3-11.
- [22] 魏江春. 中国药用地衣. 北京: 科学出版社, 1982.
- [23] Su Y, Wang H, Ma Y, Li R, Gyokusen K, Muta S.

- Bacteriostasis of *Usnea longissima* extracts of Tibet. *Journal of Northwest Forestry University*, 2006, 21 (5) : 154-155. (in Chinese)
- 苏印泉, 王海宏, 马养民, 李荣钦, 玉泉幸一郎, 牟田信次. 西藏长松萝浸提物抑菌作用研究. 西北林学院学报, 2006, 21 (5) : 154-155.
- [24] Odabasoglu F, Ahmet CHS, Aslan A, Yasin B, Mesut H, Cavit K. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 103 (1) : 59-65.
- [25] Bayir Y, Odabasoglu CA, Aslan A, Suleyman H, Halici M, Kazaz C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, 2006, 13 (8) : 584-590.
- [26] Li WC, Zhou J, Guo SY, Guo LD. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity*, 2007, 25 (5) : 69-80.
- [27] Hamada N. Effects of osmotic culture conditions on isolated lichen mycobionts. *The Bryologist*, 1993, 96 (4) : 569-572.
- [28] Valarmathi R, Hariharan GN, Venkataraman G, Parida A. Characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from lichen *Dirinaria applanata*. *Phytochemistry*, 2009, 70 (6) : 721-729.
- [29] Feng J, Yang X. New dibenzofuran and anthraquinone from *Usnea longissima*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 34 (7) : 852-853. (in Chinese)
- 冯洁, 杨秀伟. 长松萝中新发现的二苯呋喃和蒽醌. 中国中药杂志, 2009, 34 (7) : 852-853.

Isolation and characterization of a polyketide synthase gene cluster from *Usnea longissima*

Yi Wang¹, Xu Zhou¹, Jae-Seoun Hur², Juan Wang^{1*}

¹Conservation of Rare, Endangered & Endemic Forest Plants, Public Key Laboratory of the State Forestry Administration; Yunnan Provincial Key Laboratory of Cultivation and Exploitation of Forest Plants; Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, Yunnan Province, China

²Korean Lichen Research Institute, Suncheon National University, Suncheon 540742, Republic of Korea

Abstract: [Objective] To isolate polyketide synthase (PKS) gene from medicinal *Usnea longissima* lichen forming fungi, and identify the function of obtained PKS. [Methods] We used *Usnea longissima* lichen forming fungi to isolate PKS gene by nested PCR using degenerate primers and screening a Fosmid genomic library. MEGA 4.0.2 program was used for phylogenetic analysis and RT-PCR was used to detect gene expression. [Results] We obtained a gene cluster including non-reducing PKS (UIPKS5), putative β -lactamase and putative dehydratase from *Usnea longissima* lichen forming fungi. UIPKS5 contained ketosynthase (KS), acyl transferase (AT), product template (PT) and acyl carrier protein (ACP) domain. Phylogenetic analysis shows that UIPKS5 belonged to non-reducing PKS group V, which involved anthraquinone biosynthesis. RT-PCR analyses reveal that the expression of UIPKS5 was up-regulated by sucrose (2% and 10%) and sorbitol (10%). [Conclusion] PKS (UIPKS5), putative β -lactamase and putative dehydratase were related with anthraquinone biosynthesis in *U. longissima*.

Keywords: lichen forming fungi, *Usnea longissima*, polyketide synthase, RT-PCR

(本文责编: 张晓丽)