



# 石磺来源海洋链霉菌 *Streptomyces ardesiacus* SCSIO LO23 中 germicidin 类化合物的分离鉴定及其生物合成分析

吴巧灵<sup>1,2</sup>, 孙长利<sup>1,3</sup>, 周镇槟<sup>1,2</sup>, 乔伊君<sup>1</sup>, 苗宗余<sup>4</sup>, 蔡磊<sup>4</sup>, 鞠建华<sup>1,2,3\*</sup>

1 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东省海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301

2 中国科学院大学, 北京 100039

3 南方海洋科学与工程广东省实验室, 广东 广州 511458

4 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广东 广州 510663

吴巧灵, 孙长利, 周镇槟, 乔伊君, 苗宗余, 蔡磊, 鞠建华. 石磺来源海洋链霉菌 *Streptomyces ardesiacus* SCSIO LO23 中 germicidin 类化合物的分离鉴定及其生物合成分析. 微生物学报, 2022, 62(7): 2594–2609.

Wu Qiaoling, Sun Changli, Zhou Zhenbin, Qiao Yijun, Miao Zongyu, Cai Lei, Ju Jianhua. Isolation of germicidins and analysis of their biosynthetic pathways in *Streptomyces ardesiacus* SCSIO LO23, a marine-derived actinomycete from *Onchidium* sp.. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2594–2609.

**摘要:** 海洋共附生放线菌具有生产结构特殊和活性显著化合物的潜力。【目的】以海洋软体动物石磺 *Onchidium* sp. 来源共附生海洋链霉菌 *Streptomyces ardesiacus* SCSIO LO23 为研究对象, 分离并鉴定其次级代谢产物结构, 分析化合物的生物合成基因簇及其生物合成途径。【方法】采用多种培养基对该菌株进行发酵优化并放大发酵, 利用多种柱色谱方法分离得到 germicidin 类化合物, 并利用波谱学手段和 X-Ray 单晶衍射技术完成化合物的结构鉴定; 利用 Illumina HiSeq 对目标菌株进行全基因组测序, 结合 antiSMASH 和 BLAST 在线分析软件实现菌株中 germicidin 类化合物生物合成基因功能注释和生物合成途径分析, 并通过异源表达进一步确定其生物合成基因。【结果】从 AM3 培养基发酵产物中分离鉴定了 6 个吡喃酮类化合物 germicidin A (1)、germicidin B (2)、

**基金项目:** 国家自然科学基金(22037006, 22177117); 国家重点研发计划(2019YFC0312500); 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0406); 海南省重大科技计划(ZDKJ202018)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (22037006, 22177117), by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC0312500), by the Key Special Project for Introduced Talents Team of Southern Marine Science and Engineering Guangdong (GML2019ZD0406) and by the Hainan Province Key Science and Technology Project (ZDKJ202018)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-34066449; E-mail: [jjju@scsio.ac.cn](mailto:jjju@scsio.ac.cn)

Received: 21 October 2021; Revised: 28 December 2021; Published online: 12 March 2022

germicidin D (3)、germicidin H (4)、isogermicidin A (5)和 isogermicidin B (6), 其中化合物 2 和 6 对斑马鱼神经行为有显著兴奋作用。通过对 Illumina HiSeq 测序结果生物信息学分析, 结合异源表达, 验证了化合物生物合成的相关基因, 并结合文献对化合物 1–6 的生物合成途径进行了推导。

【结论】本研究阐明了菌株 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 来源 germicidin 类化合物的结构、生物活性和其生物合成基因, 夯实了该类化合物的研究基础。

关键词: germicidin; 生物合成; III型聚酮合酶; *Streptomyces ardesiacus*; 海洋共附生放线菌

## Isolation of germicidins and analysis of their biosynthetic pathways in *Streptomyces ardesiacus* SCSIO LO23, a marine-derived actinomycete from *Onchidium* sp.

WU Qiaoling<sup>1,2</sup>, SUN Changli<sup>1,3</sup>, ZHOU Zhenbin<sup>1,2</sup>, QIAO Yijun<sup>1</sup>, MIAO Zongyu<sup>4</sup>, CAI Lei<sup>4</sup>, JU Jianhua<sup>1,2,3\*</sup>

1 CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-Resources and Ecology, RNAM Center for Marine Microbiology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

3 Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory, Guangzhou 511458, Guangdong, China

4 Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, Guangdong, China

**Abstract:** Marine epiphytic actinomycetes are potential sources of natural bioactive products with unique structures. **[Objective]** To isolate and identify the secondary metabolites of *Streptomyces ardesiacus* SCSIO LO23 which was derived from marine *Onchidium* sp. (*Mollusca*), and analyze their biosynthetic gene clusters and biosynthetic pathways. **[Methods]** A variety of media were used to optimize the fermentation of the strain. Further large-scale fermentation and extraction were performed to yield the germicidins. The structures of the germicidins were characterized by spectroscopy and single-crystal X-Ray diffraction. The whole genome of the strain was sequenced by Illumina HiSeq. antiSMASH and BLAST were combined for gene function annotation and biosynthetic pathway analysis of germicidins in the strain. The biosynthetic gene was further verified by heterologous expression. **[Results]** Six germicidins were isolated and identified from the fermentation products of AM3 medium, which were germicidin A (1), germicidin B (2), germicidin D (3), germicidin H (4), isogermicidin A (5), and isogermicidin B (6). Compounds 2 and 6 showed excitatory effect on zebrafish neurobehavior at the concentration of 30  $\mu\text{mol/L}$ . The biosynthetic gene was verified by bioinformatic analysis and heterologous expression, and the biosynthetic pathways of compounds 1–6 were deduced. **[Conclusion]** The structures, bioactivity, and the biosynthetic genes of germicidins from *S. ardesiacus* SCSIO LO23 are clarified, which lays a solid foundation for the study of this type of compounds.

**Keywords:** germicidin; biosynthesis; type III polyketide synthase; *Streptomyces ardesiacus*; marine epiphytic actinomycetes

海洋是重要的天然产物宝库, 在过去几十年里, 科学家们从包括海绵、海鞘、海藻等动植物在内的海洋生物中分离出了一系列具有不同骨架结构类型的次级代谢产物, 这些化合物在抗肿瘤、抗炎、镇痛、免疫调节、抗过敏和抗病毒等方面显示出显著活性<sup>[1]</sup>。国外批准上市的 17 种海洋生物来源的药物分子中, 有 7 种最初是从海绵、海鞘、芋螺、海兔等海洋无脊椎动物中分离获得<sup>[2]</sup>。但随着微生物培养和基因组学等技术的发展, 越来越多的海洋生物共生菌逐渐被发现, 同时也有更加充足的证据表明, 微生物共生体可能是海洋生物活性次级代谢产物(TTX、ET-743、bryostatins 等)的实际生产者<sup>[3]</sup>。

海洋共附生微生物包括链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属(*Aspergillus*)及青霉属(*Penicillium*)真菌; 假单胞菌属(*Pseudomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、微球菌属(*Micrococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和别单胞菌属(*Alteromonas*)来源细菌, 以及链霉菌属(*Streptomyces*)和小单胞菌属(*Micromonospora*)来源放线菌等, 而它们的宿主包括藻类植物、腔肠动物、尾索动物、软体动物、甲壳动物、棘皮动物、节肢动物等<sup>[4]</sup>。海洋共附生微生物可产生多种活性物质, 这些化合物是药物的重要来源<sup>[5]</sup>。Sung 等<sup>[6]</sup>从海鞘来源放线菌 *Streptomyces* sp. PTY087I2 的代谢产物中分离获得 3 个能够抑制枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 的萘醌类衍生物 granaticin、granatomyacin D 以及 dihydrogranaticin B。Charan 等<sup>[7]</sup>从海鞘共附生小单胞菌中分离到对革兰氏阳性菌有抑制作用且抗肿瘤活性良好的二苯并二氮杂生物碱 diazepinomicin。Che 等<sup>[8]</sup>从海绵共附生放线菌 *Streptomyces* sp. CMN-62 中分离获得 3 个具有抗 H1N1 病毒和 NF- $\kappa$ B 信号通道

抑制活性的新生物碱类 anthranosides A–C。近期, 本实验室在对海洋共附生放线菌研究过程中, 获得了一系列不同骨架类型的活性化合物, 如从海鞘共附生放线菌 *Streptomyces pratensis* SCSIO LCY05 中分离到 3 个具有显著抑制藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)活性的 anthracimycin 类化合物<sup>[9]</sup>, 从海洋纵带滩栖螺共附生放线菌 *Streptomyces sampsonii* SCSIO 054 中分离到具有多种抗菌活性的新颖 julichrome 类化合物<sup>[10]</sup>, 从石磺共附生放线菌 *Streptomyces olivaceus* SCSIO LO13 中分离到 borrelidins 类化合物<sup>[11]</sup>, 并在此基础上, 通过体内外实验阐明了 julichrome 类化合物的生物合成过程<sup>[12]</sup>。

近期, 我们在对大亚湾海域采集到的海洋生物石磺共附生微生物的进一步研究过程中, 分离纯化得到放线菌 *S. ardesiacus* SCSIO LO23。在此基础上, 我们采用多种培养基对该菌株进行发酵优化, 进一步通过放大发酵和提取分离得到 6 个 germicidin 类化合物, 其结构通过 NMR、MS 等数据分析和 X-ray 单晶衍射确定(图 1)。在此基础上, 结合基因组测序、生物信息学分析结果和目标基因的异源表达, 确定了化合物生物合成相关基因, 并对该类化合物的生物合成途径进行了解析。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

菌株 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 分离自大亚湾海域来源石磺科软体动物石磺(*Onchidium* sp.), 该软体动物由中国科学院南海海洋研究所陈志云博士采集及鉴定。菌株用 25%甘油保种, 并保藏于中国科学院南海海洋研究所-80 °C 冰箱。

### 1.2 仪器与试剂

Bruker AVANCE 700/175 超导核磁共振波

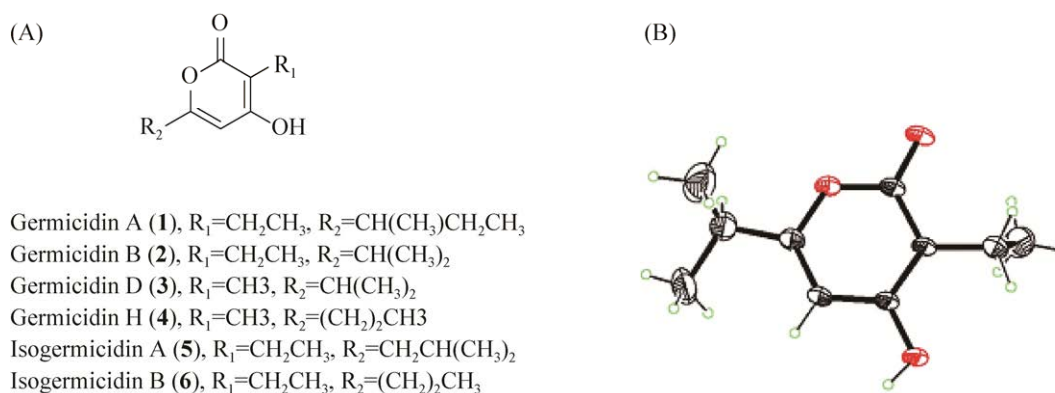


图 1 化合物 1–6 的化学结构式(A)和化合物 2 的单晶衍射结构(B)

Figure 1 The chemical structures of compounds 1–6 (A) and the ORTEP drawings of compound 2 (B).

谱仪(Bruker 公司); Bruker maXis 高分辨飞行时间质谱仪(Bruker 公司); XtaLABPro X-Ray 单晶衍射仪(理学 Rigaku); 高压液相色谱仪 Infinity 1260 (安捷伦公司); 中压制备色谱仪(天津博纳艾杰尔科技有限公司); Basic C<sub>18</sub> 半制备色谱柱(10×250 mm, 5 μm) (北京赛谱锐思科技有限公司); Laborota 4000 efficient 旋转蒸发器(Heidolph); MQD-B1NR 旻泉振荡培养箱(广州合众生物科技有限公司); Milli-QIntegral 纯水超纯水一体化智能系统 (Millipore); ABI Veriti 96 孔基因扩增仪(ABI, 赛默飞世尔公司); 自动视频跟踪系统(Videotrack)。

制备色谱级乙腈(北京百灵威科技有限公司); 甲醇、乙酸乙酯、石油醚等常规化学试剂均为分析纯(广州化学试剂厂); 细菌学蛋白胨、技术琼脂粉、麦芽提取粉(广东环凯微生物科技有限公司); 葡萄糖、氯化钠、硫酸镁等常规材料(广州化学试剂厂); 海盐(广东省盐业集团有限公司)。FastPfu 高保真酶购于北京全式金生物技术有限公司。Nde I、EcoR I、T4 连接酶等购于纽英伦生物技术(北京)有限公司。试剂盒购于 Omega 生物技术公司。引物由北京擎科生物科技有限公司合成。全基因组测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

### 1.3 培养基配方

#### 1.3.1 用于培养菌丝体和产孢的培养基

MS 培养基(g/L): 黄豆粉 20, 甘露醇 20, 琼脂 20, pH 7.2–7.4。

P2 培养基(g/L): 葡萄糖 4, 酵母提取粉 4, 麦芽提取粉 10, 海盐 30, 琼脂 20, pH 7.2–7.4。

用于抑菌活性测试(纸片法)的 LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取粉 5, 氯化钠 10, 琼脂 20, pH 7.2–7.4。

#### 1.3.2 用于培养基优化的液体培养基

AM3 培养基(g/L): 淀粉 15, 黄豆粉 5, 甘油 15, 细菌学蛋白胨 15, 海盐 30, 碳酸钙 5, pH 7.2–7.4。

RA 培养基(g/L): 葡萄糖 10, 淀粉 20, 麦芽提取粉 10, 海盐 30, 玉米粉 5, 麦芽糖 10, 碳酸钙 2, 微量元素 100 μL (氯化锌 40 mg/L, 六水氯化亚铁 200 mg/L, 二水氯化亚铜 10 mg/L, 硼酸钠 10 mg/L, 四水氧化钼 10 mg/L), pH 7.2–7.4。

AM2AB 培养基(g/L): 可溶性淀粉 5, 黄豆粉 5, 海盐 30, 葡萄糖 20, 七水硫酸镁 0.5, 碳酸钙 2, 酵母提取粉 2, 磷酸二氢钾 0.5, 细菌学蛋白胨 2, 氯化钠 4, pH 7.2–7.4。

P4 培养基(g/L): 淀粉 10, 细菌学蛋白胨 1,

酵母提取粉 5, 磷酸二氢钾 1, 七水硫酸镁 1, 氯化钠 1, 硫酸铵 2, 海盐 30, 碳酸钙 2, 微量元素 100  $\mu\text{L}$ , pH 7.2–7.4。

班纳特培养基(g/L): 土豆淀粉 30, 大豆粉 15, 酵母提取粉 2, 玉米浆 5, 氯化钠 3, 七水硫酸镁 0.5, 六水氯化钴 0.005, 碳酸钙 3, pH 7.2–7.4。

用于提取 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 基因组的 TSB 培养基(g/L): 胰蛋白胨大豆肉汤成品培养基 30, pH 7.2–7.4。

用于培养致病菌的 LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取粉 5, 氯化钠 10, pH 7.2–7.4。

#### 1.4 菌株 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 基因组的提取和全基因组扫描

参考 Kieser 等的方法<sup>[13]</sup>, 将菌株孢子接种至 TSB 液体培养基中, 培养 36 h 后离心收集菌体; TSE 缓冲液洗涤菌体 2 次后, 加入溶菌酶粉末, 消化细胞壁; 加入 480  $\mu\text{L}$  proteinase K (NEB, 终浓度为 0.4 mg/mL) 和 1.5 mL 20% 的 SDS, 55  $^{\circ}\text{C}$  水浴反应 4 h; 苯酚-氯仿抽提 3 次, 再加入纯氯仿抽提 2 次后, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和等体积的异丙醇充分混匀, 使 DNA 析出; 挑出 DNA 絮状物, 加入 1 mL 70% 的乙醇洗涤 3 次; 乙醇挥发后, 加入 2 mL 1 $\times$ TE 和 10  $\mu\text{L}$  10 mg/mL RNA 酶(终浓度为 0.05 mg/mL), 过夜溶解, 再在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min, 充分降解 RNA; 加入 8  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K (终浓度为 0.1 mg/mL) 和 2  $\mu\text{L}$  10% 的 SDS 溶液(终浓度为 0.025%), 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h; 再用酚氯仿、氯仿抽提, 合并上清液后, 加入 1/10 体积已预冷的 3 mol/L NaAc 混匀, 再加入 2 倍体积已预冷的无水乙醇, 挑出沉淀; 用 70% 乙醇清洗 3 次, 晾干后加适量的双蒸水, 溶解至呈均质状态, 测其浓度。

应用 HiSeq/Novaseq 平台和 Pacbio 平台构

建测序文库, 分析处理和评估测序数据, 使用软件 HGAP4 或者 Falcon (version 0.3) 进行三代测序数据组装, 使用软件 Pilon 对组装结果进一步校正, 得到最终的组装结果。使用软件 Prodigal (version 3.02, 原核) 对编码基因进行预测; 使用 BLAST (version 2.2.31+) 等比对软件与数据库进行比对, 从而对预测得到的编码基因的蛋白序列进行基因功能注释。

#### 1.5 菌株 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 的菌种鉴定

提取的基因组 DNA 电泳检测合格后, 利用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCC TGGCT-CAG-3')/1492R (5'-GCTTACCTTGTTA CGACTT-3') 和 *FastPfu* 高保真聚合酶对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增; 50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系: 16S rRNA 基因引物 27F/1492R 各 1  $\mu\text{L}$ , DMSO (二甲基亚砷) 2.5  $\mu\text{L}$ , Buffer 10  $\mu\text{L}$ , dNTPs 5  $\mu\text{L}$ , dd H<sub>2</sub>O 28.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , *FastPfu* 高保真聚合酶 1  $\mu\text{L}$ 。PCR 条件为: 98  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 57  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 32 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保温。PCR 产物由苏州金唯智生物科技有限公司回收纯化; 并采用 Sanger 测序法双向测序; 对测序结果进行双向拼接, BLAST 拼接结果, 并通过 MEGA 7.0.14 软件构建系统进化树。

#### 1.6 培养基优化及放大发酵

刮取约 1 cm<sup>2</sup> 菌株孢子, 分别接种于含 50 mL 不同液体培养基(AM3、P4、RA、AM2ab、班纳特)的 250 mL 三角瓶中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下摇床中培养 7 d, 丁酮萃取, 粗提物用 HPLC 分析。分析发现该菌株在 AM3 培养基中产物丰富。随后, 刮取约 1 cm<sup>2</sup> 菌株孢子, 接种于含有 50 mL AM3 培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的摇床中培养 2 d 作为种子液。随后将种子液接种至装有 200 mL AM3 培养基

的 1 000 mL 三角瓶中, 于 28 °C、200 r/min 条件下摇床培养 7 d。

### 1.7 化合物的提取与分离流程

*S. ardesiacus* SCSIO LO23 的 AM3 发酵液 (28 L) 以 3 900 r/min 的速度离心以分离菌体和菌液; 菌体用丙酮提取, 菌液用丁酮萃取, HPLC 检测两部分浸膏, 发现二者提取物类似, 故合并; 合并后的浸膏硅胶柱层析, 氯仿-甲醇溶剂 (100:0, 98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 0:100, *V/V*) 梯度洗脱得 Fr.A1–Fr.A11; HPLC 分析显示目标化合物集中在 Fr.A3 和 Fr.A4 部分, 合并 Fr.A3 和 Fr.A4, 硅胶柱层析, 石油醚-乙酸乙酯 (95:5, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 3:7, 1:9, *V/V*) 梯度洗脱, 将其分为 Fr.B1–Fr.B10; 合并 Fr.B2–Fr.B4, 中压 ODS 反相柱层析, MeCN-H<sub>2</sub>O (2:8–10:0, 0–120 min), 得 Fr.C1–Fr.C7; Fr. C2 HPLC 半制备柱层析, MeCN-H<sub>2</sub>O (0.4:9.6) 洗脱, 流速为 2.5 mL/min, 得化合物 3 ( $t_R=13.0$  min, 7.0 mg) 和化合物 4 ( $t_R=13.7$  min, 2.5 mg); Fr.C5 HPLC 半制备柱层析, MeCN-H<sub>2</sub>O (0.5:9.5, 0–20 min), 流速为 2.5 mL/min, 得到化合物 1 ( $t_R=11.2$  min, 10.0 mg)、化合物 2 ( $t_R=11.8$  min, 47.1 mg)、化合物 5 ( $t_R=14.5$  min, 10.9 mg)、化合物 6 ( $t_R=15.4$  min, 35.8 mg)。

### 1.8 化合物的抗菌活性测试

采用滤纸片法对化合物进行抗菌活性测试: 将冻存于 -80 °C 冰箱甘油管中的病原菌用 LB 液体培养基活化, 37 °C、200 r/min 条件下, 培养 8–12 h; 在 LB 平板背面画上数量合适的小方格, 标上正确的标签, 加入 100 μL 病原菌菌液, 用无菌涂布棒涂匀; 将无菌滤纸片分别贴在每个小方格的正中央。取 5 μL (10 μg) DMSO 溶解的化合物, 滴加至滤纸片正中央; 后将平板倒置放在 37 °C 培养箱培养 12–16 h, 观察抑菌圈。

### 1.9 化合物对斑马鱼神经行为影响的评价条件

实验用的斑马鱼为引种自国家斑马鱼资源中心的 AB 系, 饲养在 26.5 °C 恒温水浴和光/暗周期为 14/10 h 循环水养殖系统中, 质量控制参考国家标准 GB/T 39649-2020 《实验动物 实验鱼质量控制》<sup>[14]</sup> 进行。受精后 4 d (dpf), 用移液管将斑马鱼幼虫移植到 96 孔板。于 96 孔板中加入终浓度为 30 μmol/L 的化合物, 每个化合物重复 12 孔, 化合物用甲醇溶解, 以 0.184% 甲醇作为阴性对照, 以褪黑素 (melatonin, MT) 作为阳性对照。实验观测全程持续 48 h; 斑马鱼行为数据采集频率为每 5 min 一次, 使用自动视频跟踪系统 (Videotrack) 记录每分钟斑马鱼仔鱼的运动频率, 评价受试物对斑马鱼神经行为的影响。用于检测的 Videotrack 阈值参数为: 检测阈值, 40; burst, 25; freeze, 4; bin size, 60 s。实验开始和结束分别统计仔鱼死亡数量, 记录实验结束死亡孔编号, 数据处理时剔除相应孔。

### 1.10 化合物生物合成基因的异源表达

首先, 通过酶切位点分析, 选择 *Nde* I 和 *Eco*R I 进行酶切。选取基因 *gem* 前后 21 个碱基作为引物主体, 再加上保护碱基和酶切位点, 设计引物 *gem*-NE-F (5'-TTCCCATATGGTGCCCGCATACCTGTGCGCTC-3') 和 *gem*-NE-R (5'-ATATATGAATTCTTACAGCCACTCCCCTTCCAG-3'), 以菌株 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 的基因组为模板, FastPfu 高保真酶 50 μL 反应体系, 进行 PCR 扩增, Cycle-Pure kit 回收获得 *gem* 基因片段; *gem* 基因片段加上 A 尾后连接至 pGEM-Teasy 载体, 转化至 DH5a 感受态, 涂布于 LB+Amp 平板上, 将验证正确的菌落转接至液体培养基培养, 并将面板送擎科测序公司测序验证; 提取测序正确菌株的质粒, 用 *Nde*

I 和 *EcoR* I 进行酶切, 获得 *gem*-NE 片段; 并用 *Nde* I 和 *EcoR* I 对 pPWW50<sup>[15]</sup>和 pL646 (ATE)<sup>[16]</sup>质粒进行酶切, 获得 pPWW50-NE 片段和 pL646 (ATE)-NE 片段; 用 T4 连接酶分别连接 *gem*-NE 片段和 pPWW50-NE 片段、pL646 (ATE)-NE 片段; 将连接好的产物转化至 *E. coli* ET12567/pUZ8002 感受态, 分别与 *Streptomyces coelicolor* M1152、*Streptomyces coelicolor* M1154、*Streptomyces lividans* TK64、*Streptomyces lividans* SBT5、*Streptomyces lividans* SBT18 等异源表达宿主菌株进行接合转移, 对获得的接合子进行 PCR 验证, 验证正确的接合子用 AM3 培养基发酵验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 SCSIO LO23 的菌种鉴定

菌株 SCSIO LO23 生长初期(3 d)为淡黄色菌丝体(图 2A), 4 d 左右开始产孢, 孢子呈灰色

(图 2B)。将其 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 分析比对, 相似度最高的结果为 *Streptomyces ardesiacus*, 据此对该菌株命名为 *Streptomyces ardesiacus* SCSIO LO23, 通过 MEGA 7.0.14 软件采用 neighbor-joining 法构建系统进化树(图 3)。

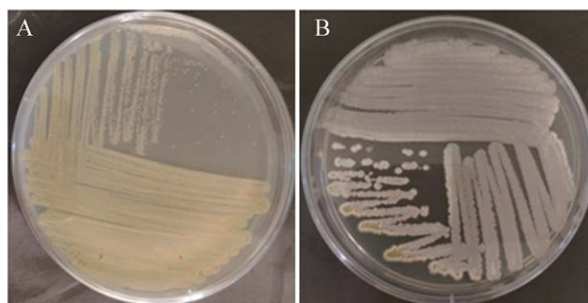


图 2 *Streptomyces ardesiacus* SCSIO LO23 在 ISP2 培养基上不同培养时期的菌株状态

Figure 2 The strain status of *Streptomyces ardesiacus* SCSIO LO23 in different culture periods on ISP2 medium. A: strain status on the third day after inoculation; B: strain status on the sixth day after inoculation.

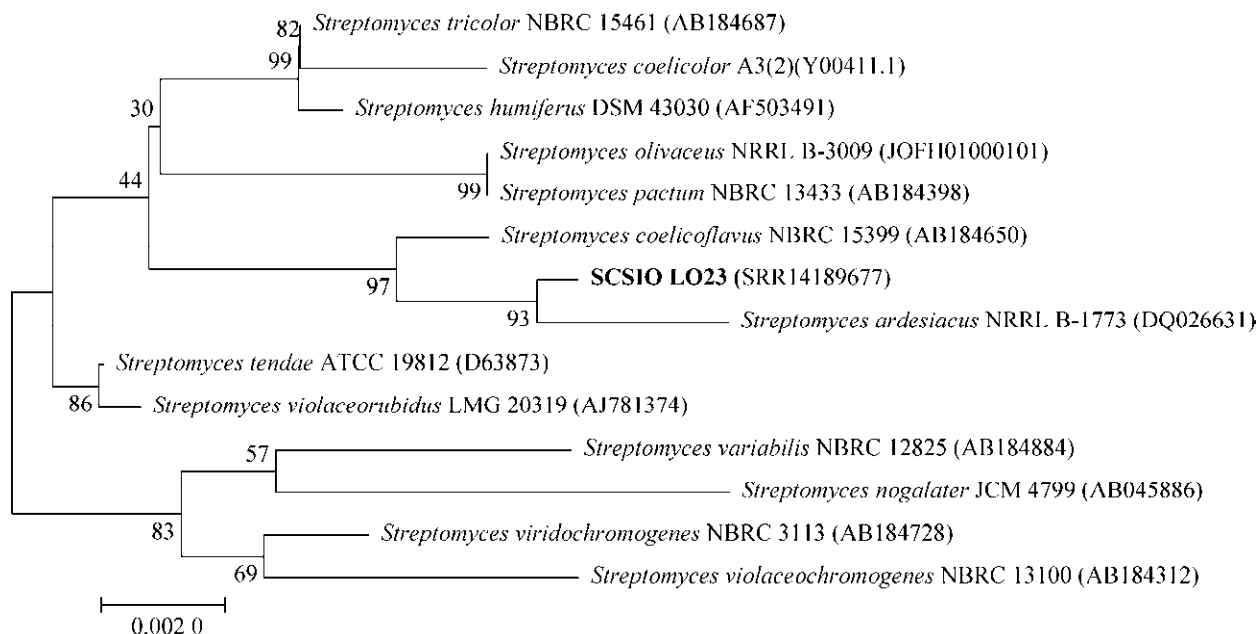


图 3 基于 16S rRNA 基因构建 *Streptomyces ardesiacus* SCSIO LO23 的系统进化树

Figure 3 Construction of the phylogenetic tree of *Streptomyces ardesiacus* SCSIO LO23 based on 16S rRNA gene. The sequence number in parentheses represents the sequence ID, the numbers represent the confidence, and the scale bar represents the base substitution rate.

## 2.2 化合物 1-6 的结构鉴定

结合  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、高分辨质谱以及 X-Ray 单晶衍射等数据鉴定化合物 1-6 的结构, 具体数据如下:

化合物 1 白色粉末。(+) HR-ESI-MS 呈现  $[\text{M}+\text{H}]^+$  峰 ( $m/z$  197.117 3, calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_3$  197.117 8), 结合核磁数据确定其分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3$ 。其核磁数据如下:  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.95 (s, 1H), 2.37 (q,  $J=7.4$  Hz, 2H), 2.44 (h,  $J=6.9$  Hz, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.52 (dp,  $J=14.5, 7.3$  Hz, 1H), 1.18 d,  $J=7.0$  Hz, 3H), 0.86 (t,  $J=7.5$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 168.7 (C, C-2), 168.4 (C, C-6), 167.7 (C, C-4), 105.2 (C, C-3), 100.4 (CH, C-5), 28.5 ( $\text{CH}_2$ , C-10), 18.3 ( $\text{CH}_3$ , C-12), 17.3 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 12.8 ( $\text{CH}_3$ , C-8), 11.9 ( $\text{CH}_3$ , C-11)。该数据与文献报道的数据一致<sup>[17]</sup>, 故化合物 1 鉴定为 germicidin A。

化合物 2 无色针晶。(+) HR-ESI-MS 呈现  $[\text{M}+\text{H}]^+$  峰 ( $m/z$  183.102 0, calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_3$  183.102 1), 结合  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 确定其分子式为  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$ 。其核磁数据如下:  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.97 (s, 1H), 2.44 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.75 (m, 2H), 0.97 (t,  $J=7.4$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 169.6 (C, C-2), 168.6 (C, C-4), 167.7 (C, C-6), 105.2 (C, C-3), 98.9 (CH, C-5), 33.6 (CH, C-9), 20.4 ( $\text{CH}_3$ , C-10, C-11), 17.3 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 12.8 ( $\text{CH}_3$ , C-8)。该数据与文献报道的化合物 germicidin B 数据一致<sup>[18]</sup>, 故化合物 2 鉴定为 germicidin B, X-单晶衍射结构如图 2 进一步验证了该化合物的结构。化合物 2 的单晶数据: 单斜晶系,  $\text{P}2_1/\text{c}$  空间群, 晶体大小为 0.1 mm×0.1 mm×0.1 mm; 晶胞参数:  $a=13.361\ 2(2)$  Å,  $b=16.633\ 8(4)$  Å,  $c=9.085\ 6(3)$  Å,  $\alpha=90.00^\circ$ ,  $\beta=95.340(2)$ ,  $\gamma=90.00^\circ$ , 其晶胞

体积为  $V=2\ 010.49(9)$  Å<sup>3</sup>,  $Z=8$ , 计算密度 1.201 g/cm<sup>3</sup>, Cu-K $\alpha$  辐射( $\lambda=1.541\ 84$  Å); 收集总衍射点 11 566, 独立衍射点为 3 991;  $R_1=0.121\ 7$ ,  $wR_2=0.399\ 4$ 。晶体数据保存在剑桥晶体数据中心, CCDC 编号为 2 077 103。

化合物 3 白色固体。(+) HR-ESI-MS 呈现  $[\text{M}+\text{H}]^+$  峰 ( $m/z$  169.086 5, calcd for  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_3$  169.086 5), 结合  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 确定其分子式为  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3$ 。其核磁数据如下:  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.79 (s, 1H), 2.72 (t,  $J=6.9$  Hz, 1H), 1.85 (s, 3H), 1.22 (d,  $J=6.9$  Hz, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 169.3 (C, C-6), 169.1 (C, C-2), 168.9 (C, C-4), 99.1 (C, C-3), 98.9 (CH, C-5), 33.6 (CH, C-7), 20.4 ( $\text{CH}_3$ , C-8, C-9), 8.3 ( $\text{CH}_3$ , C-10)。以上数据与文献报道的化合物 surugapyrone A 一致<sup>[19]</sup>。

化合物 4 白色粉末。(+) HR-ESI-MS 呈现  $[\text{M}+\text{H}]^+$  峰 ( $m/z$  169.086 5, calcd for  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_3$  169.086 5), 结合  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 确定其分子式为  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3$ 。其核磁数据如下:  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.97 (s, 1H), 2.44 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.75 (m, 2H), 0.97 (t,  $J=7.4$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 169.3 (C, C-1), 169.1 (C, C-4), 164.5 (C, C-6), 101.7 (CH, C-5), 98.6 (C, C-3), 36.1 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 21.2 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 13.6 ( $\text{CH}_3$ , C-9), 8.3 ( $\text{CH}_3$ , C-10)。以上数据与文献报道的 germicidin H 一致<sup>[20]</sup>。

化合物 5 白色固体。(+) HR-ESI-MS 呈现  $[\text{M}+\text{H}]^+$  峰 ( $m/z$  197.117 3, calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_3$  197.117 8), 结合  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 确定其分子式为  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3$ 。其核磁数据如下:  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.98 (s, 1H), 2.39 (q,  $J=7.4$  Hz, 2H), 2.28 (d,  $J=7.2$  Hz, 2H), 1.99 (m, 1H), 0.91 (d,  $J=6.7$  Hz, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 168.7 (C, C-2), 167.6 (C, C-6), 164.2



(C, C-4), 105.2 (C, C-3), 102.2 (CH, C-5), 43.4 (CH<sub>2</sub>, C-9), 28.1 (CH, C-10), 22.4 (CH<sub>3</sub>, C-11, C-12), 17.2 (CH<sub>2</sub>, C-7), 12.8 (CH<sub>3</sub>, C-8)。该化合物与文献报道的 isogermicidin A 一致<sup>[21]</sup>。

化合物 **6** 白色固体。(+) HR-ESI-MS 呈现 [M+H]<sup>+</sup>峰 ( $m/z$  183.101 6, calcd for C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub> 183.102 1), 结合 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 确定其分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>。其核磁数据如下: <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_{\text{H}}$ : 5.98 (s, 1 H), 2.44 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H), 2.39 (q,  $J=7.4$  Hz, 2H), 1.67 (m,  $J=7.4$  Hz, 2H), 1.03 (t,  $J=7.4$  Hz, 3H) 0.97 (t,  $J=7.4$  Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$

c: 168.7 (C, C-2), 167.8 (C, C-6), 164.8 (C, C-4), 105.1 (C, C-3), 101.3 (CH, C-5), 36.2 (CH<sub>2</sub>, C-9), 21.3 (CH<sub>2</sub>, C-10), 17.2 (CH<sub>2</sub>, C-7), 13.6 (CH<sub>3</sub>, C-11), 12.8 (CH<sub>3</sub>, C-8)。以上数据与文献报道的 isogermicidin B 一致<sup>[22]</sup>。

### 2.3 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 中化合物 1–6 生物合成基因簇的定位与分析

将 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 的全基因组序列上传至 antiSMASH 网站进行分析, 其全基因组总长为 8 309 129 bp, 一共含有 27 个生物合成基因簇(表 1)。其中, 基因簇 4 编码 III 型聚酮类化合物, 该基因簇位于染色体 DNA

表 1 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 中基因簇分布情况

Table 1 Distribution of gene clusters in *S. ardesiacus* SCSIO LO23

orf	From	To	Type	Similar cluster	Similarity/%
1	78 157	132 435	Heterocyst glycolipid synthase-like PKS		
2	445 085	466 212	Indole cluster	5-isoprenylindole-3-carboxylate $\beta$ -D-glycosyl ester	28
3	515 851	536 059	Terpene	Carotenoid	18
4	<b>668 224</b>	<b>708 430</b>	<b>Type III PKS</b>	<b>Germicidin</b>	<b>100</b>
5	933 061	974 185	Type III PKS	Herboxidiene	8
6	1 672 228	1 682 626	Ectoine cluster	Ectoine	100
7	2 622 463	2 633 056	Melanin cluster	Melanin	60
8	2 716 720	2 727 612	Siderophore cluster	Desferrioxamine B/Desferrioxamine E	83
9	4 973 687	4 993 664	RRE-element containing cluster	Thiotetroamide	11
10	5 124 486	5 144 216	Terpene	Albaflavenone	100
11	5 202 392	5 274 928	Type II PKS	Spore pigment	66
12	5 387 082	5 398 047	Butyrolactone cluster		
13	5 834 698	5 846 021	Siderophore cluster		
14	5 917 636	5 964 553	Type I PKS (Polyketide synthase)/NRPS-like fragment	Undecylprodigiosin	100
15	6 037 920	6 064 373	Lanthipeptide cluster		
16	6 158 492	6 182 997	Terpene	Isorenieratene	100
17	6 331 057	6 404 870	Non-ribosomal peptide synthetase cluster/bacteriocin or other unspecified ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide product (RiPP) cluster/terpene	Ashimides	100
18	6 471 200	6 498 966	Betalactone containing protease inhibitor	Hormaomycin/hormaomycin A1/hormaomycin A2/hormaomycin A3/hormaomycin A4/hormaomycin A5/hormaomycin A6	13
19	6 588 903	6 602 166	Siderophore cluster		
20	7 116 701	7 139 469	Class III lanthipeptide clusters like labyrinthopeptin	Sap B	100
21	7 204 945	7 230 742	Terpene	Hopene	100
22	7 281 314	7 301 739	Phenazine cluster		
23	7 342 747	7 444 829	Non-ribosomal peptide synthetase cluster	Coelibactin	90
24	7 448 333	7 473 859	Terpene	Isorenieratene	100
25	7 809 085	7 819 300	Ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product (RiPP) cluster	Informatipeptin	42
26	8 065 712	8 116 799	Non-ribosomal peptide synthetase cluster	Coelichelin	100
27	8 189 672	8 211 557	Thioamide RiPPs as found in JOBFO1000011	BE-14106	7

668 224–708 430 bp 位置, 大小为 40.2 kb。基因簇中 III 型聚酮合酶编码基因 *orf* 644 (我们将其命名为 *gem*) 与文献报道的 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 中 *germicidin* 生物合成酶 SCO7221 (*Gcs*) 基因 (核酸序列: NC\_003888.3)<sup>[21,23]</sup> 相似度为 91.327%。因此, 我们推测在 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 中, 基因 *gem* (*orf* 644) 编码的蛋白负责 *germicidin* 类化合物的合成。为了进一步证实我们的推测, 我们通过 MEGA 7.0.14 软件采用 neighbor-joining 法构建 *gem* 编码蛋白的系统进化树(图 4)。

#### 2.4 基因 *gem* 的异源表达验证

为了进一步确定基因 *gem* 的功能, 我们将其克隆出来后加 A 尾再连 T 载体, 测序正确后提质粒, 再用 *Nde* I 和 *Eco*R I 进行酶切, 获得 *gem*-NE 片段分别与载体 pPWW50-NE 片段和 pPL646(ATE)-NE 片段进行连接, 再将连接产物转化至 *E. coli* ET12567/pUZ8002 感受态; 分别与 *S. coelicolor* M1152、*S. coelicolor* M1154、*S. lividans* TK64、*S. lividans* SBT5、*S. lividans* SBT18 等异源表达宿主菌株进行接合转移。对获得的接合子进行 PCR 验证和发酵, HPLC 检

测发现 *S. lividans* TK64 和 *S. lividans* SBT18 异源表达宿主菌发酵提取物中可以检测到与 *germicidin* 类化合物紫外吸收和保留时间一致的吸收峰(图 5), 且通过 LC-MS 分析(图 6)发现其分子量与本次分离得到的 *germicidin* 类化合物一致, 从而进一步证明基因 *gem* 是 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 中负责 *germicidin* 类化合物的生物合成的重要基因。

#### 2.5 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 中化合物 1–6 生物合成途径分析

结合文献及异源表达的结果<sup>[18,21,23]</sup>, 我们推测 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 中化合物 1–6 的生物合成由菌株脂肪酸合酶和基因 *gem* 编码的 III 型聚酮合酶负责, 脂肪酸合酶为 *germicidin* 结构中饱和脂肪侧链合成提供前体化合物。通过全基因组测序数据的分析, 发现 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 基因组中初级代谢相关的部分脂肪合酶基因(表 2), 负责 *germicidin* 类化合物饱和脂肪碳链的合成。化合物的合成在 *gem* 编码的 type III 聚酮合酶催化下进行: 酰基载体蛋白 AcpP<sub>sa</sub> 在 AcpS<sub>sa</sub> 催化下从不含磷酸泛酰巯基乙醇胺臂的 apo 形式活化为 holo 形式,

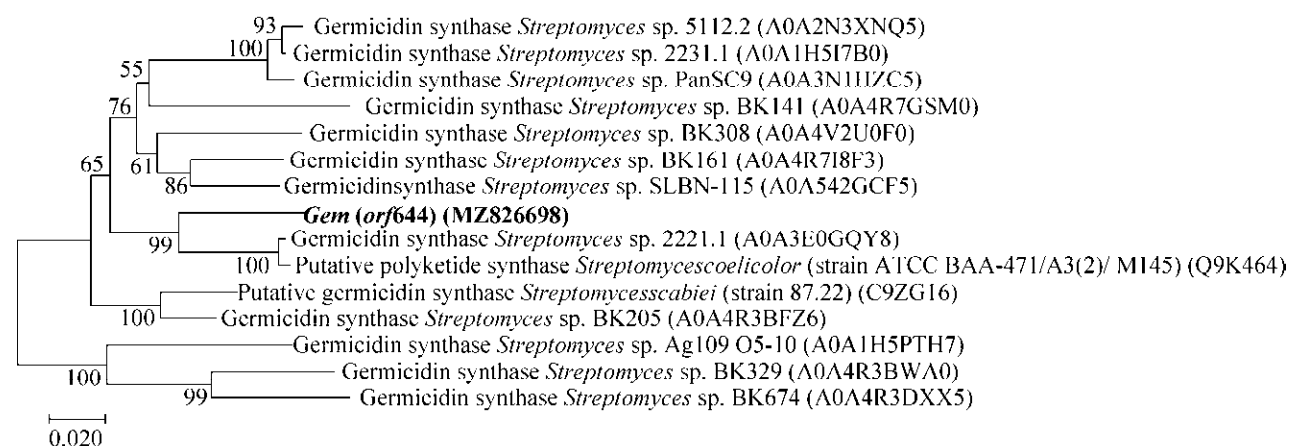


图 4 *gem* 编码蛋白的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of protein encoded by *gem* gene. The sequence number in parentheses represents the sequence ID, the numbers represent the confidence, and the scale bar represents the base substitution rate.

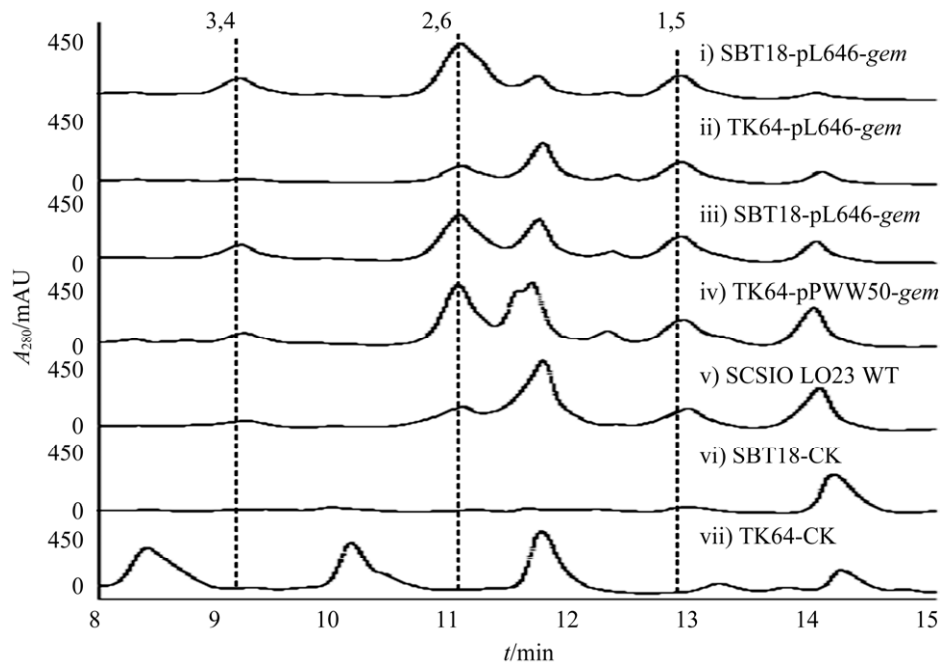


图 5 *gem* 在 *S. lividans* TK64 和 *S. lividans* SBT18 中异源表达的发酵结果分析

Figure 5 Fermentation results of heterologous expression of *gem* in *S. lividans* TK64 and *S. lividans* SBT18. i): fermentation result obtained by ligating gene *gem* with pL646(ATE) vector, and then conjugating and transferring with *S. lividans* SBT18. ii): fermentation result obtained by ligating gene *gem* with pL646(ATE) vector, and then conjugating and transferring with *S. lividans* TK64. iii): fermentation result obtained by ligating gene *gem* with pPWW50 vector, and then conjugating and transferring with *S. lividans* SBT18. iv): fermentation result obtained by ligating gene *gem* with pPWW50 vector, and then conjugating and transferring with *S. lividans* TK64. v): fermentation results of *S. ardesiacus* SCSIO LO23 wild-type strain. vi): fermentation results of *S. lividans* SBT18 blank strain. vii): fermentation results of *S. lividans* TK64 blank strain.

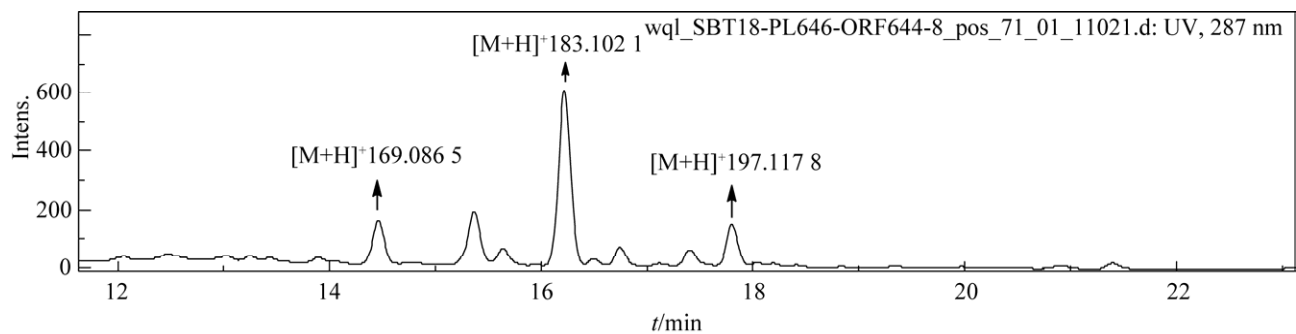


图 6 SBT18-PL646(ATE)-*gem* 的 LC-MS 结果分析

Figure 6 Analysis of LC-MS results of SBT18-PL646(ATE)-*gem*.

FabD<sub>sa</sub> 利用丙二酰辅酶 A 将 holo-ACP 转化为丙二酰 ACP, FabH<sub>sa</sub> 随后催化不同的辅酶 A(如 2-甲基丁基辅酶 A、3-甲基丁基辅酶 A、

异丁基辅酶 A 和丁基辅酶 A 等)与丙二酰 ACP 缩合生成相应的  $\beta$ -酮酰 ACP 作为起始单元, 而利用特殊的含有支链的 methylmalonyl-CoA

或 ethylmalonyl-CoA 作为延伸单元。随后, 在 *gem* 编码的 III 型聚酮合酶催化下通过克萊森缩合反应环化形成 germicidin 类化合物 (图 7)。

## 2.6 化合物 1-6 的抑菌活性测试

采用滤纸片法, 选取 7 株革兰氏阳性病原菌[金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Sau 1862)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、粪链球菌(*Enterococcus faecalis* ATCC 29212)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)]和 7 株革兰氏阴性菌[多耐药大肠杆菌(*Escherichia coli*)、大肠杆菌(*E. coli* ATCC 25922)、肺炎克雷伯(*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883)、多耐铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* pae 1873, MRPA)、溶藻弧菌(*Vibrio*

*alginoliticus* XSBZ14)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii* ADR-2)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606)]对化合物 1-6 进行抑菌活性测试, 发现在本次测试浓度(10  $\mu\text{g}$ /片)下, 化合物 1-6 对以上病原菌均无抑制活性。

## 2.7 化合物对斑马鱼神经行为影响测试

选取 germicidin A (1)、germicidin B (2)、isogermicidin B (6)用甲醇溶解后测试化合物在 30  $\mu\text{mol/L}$  浓度下对斑马鱼神经行为的影响。阳性对照药(褪黑素, melatonin, MT)属于吲哚杂环类化合物, 其化学名是 N-乙酰基-5 甲氧基色胺, 其合成后, 储存在松果体内, 由交感神经兴奋支配脑松果体细胞分泌释放, 其分泌具有明显的昼夜节律, 白天分泌受抑制, 晚上则活跃<sup>[24]</sup>。结果显示 germicidin A (1)在实验浓度下, 对斑马鱼神经行为无影响, 而 germicidin B (2)和 isogermicidin B (6)对斑马鱼神经行为有显著的兴奋作用(图 8)。

表 2 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 中部分脂肪酸合酶的相关基因注释

Table 2 The partial fatty acid synthases gene in *S. ardesiacus* SCSIO LO23

Name	From	To	Presumed gene function	Homologous protein	Sequence ID	Similarity/%
<i>acpP</i> <sub>sa1</sub>	2 269 739	2 269 987	Fatty acid biosynthetic process	Acyl carrier protein [ <i>Streptomyces diastaticus</i> ]	WP_102930822.1	100.00
<i>acpP</i> <sub>sa2</sub>	5 932 021	5 932 266	Fatty acid biosynthetic process	Acyl carrier protein [ <i>S. diastaticus</i> ]	WP_102931542.1	100.00
<i>acpP</i> <sub>sa3</sub>	8 018 488	8 018 766	Fatty acid biosynthetic process	Acyl carrier protein [ <i>Streptomyces</i> sp. CCM_MD2014]	WP_061440638.1	92.39
<i>acpS</i> <sub>sa</sub>	4 644 016	4 644 387	Holo-acyl-carrier protein synthase	Holo-ACP synthase [ <i>Streptomyces diastaticus</i> ]	WP_102929651.1	100.00
<i>fabD</i> <sub>sa</sub>	2 267 662	2 268 588	Transferase activity	ACP S-malonyltransferase [ <i>S. diastaticus</i> ]	WP_102930824.1	99.03
<i>fabH</i> <sub>sa1</sub>	2 268 605	2 269 636	Catalytic activity	Ketoacyl-ACP synthase III [ <i>Streptomyces coelicoflavus</i> ]	WP_108986866.1	99.42
<i>fabH</i> <sub>sa2</sub>	5 932 654	5 933 646	Catalytic activity	Ketoacyl-ACP synthase III [ <i>S. diastaticus</i> ]	WP_102931543.1	99.70
<i>fabH</i> <sub>sa3</sub>	6 967 640	6 968 590	Catalytic activity	Ketoacyl-ACP synthase III [ <i>S. diastaticus</i> ]	WP_102929664.1	100.00

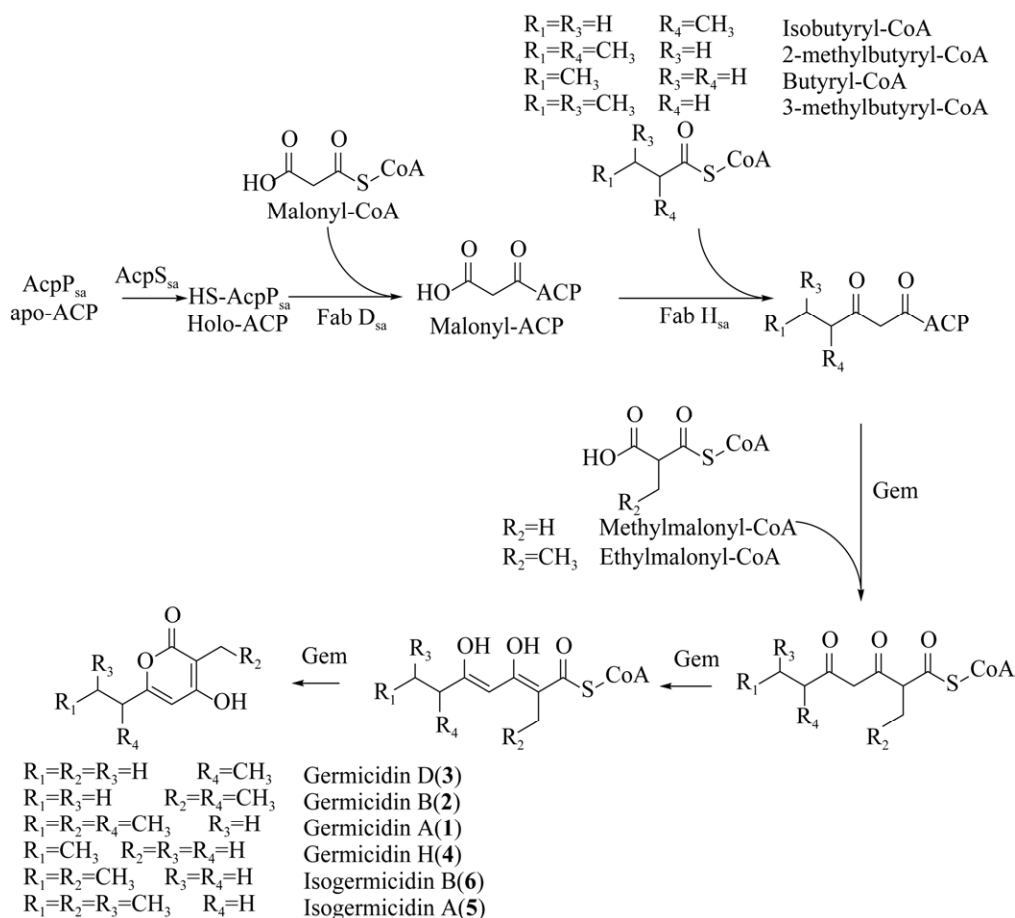


图 7 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 中化合物 1–6 的生物合成途径

Figure 7 Proposed biosynthetic pathway of compounds 1–6 in *S. ardesiacus* SCSIO LO23.

### 3 讨论与结论

Germicidin 类化合物来源于细菌、真菌和植物等，属于  $\alpha$ -吡喃酮家族的一员。 $\alpha$ -吡喃酮是一种六元环不饱和酯，在细菌、植物、昆虫等生物中均有分布，具有烯烴和芳香化合物的性质，可作为关键的生物合成中间体，合成包括信息素(pheromones)在内的许多重要化合物，并参与如生物防御等许多不同类型的生物反应过程，具有广泛的生物活性<sup>[25–27]</sup>。Germicidin A 是第一个已知的链霉菌属中孢子萌发的自调节抑制剂，其通过与细胞膜上的  $Ca^{2+}$ -ATPase 相互作用使酶失活，从而影响孢子和菌丝的呼吸作

用，具有抑制自身萌发和菌丝生长的作用<sup>[17,28]</sup>，其中 germicidin A 在低浓度下可逆地抑制自身孢子的萌发，而在高浓度时可抑制  $Na^+/K^+$  激活的腺苷-磷酸酶(ATPase)的活性，从而延缓芥蓝的萌发过程<sup>[17]</sup>。Germicidin B 和 isogermicidin A 对己糖激酶 II(hexokinase II)具有显著的抑制活性， $IC_{50}$  分别为 7.11 mmol/L 和 8.45 mmol/L，从而抑制癌细胞的增殖，这为癌症的治疗提供了一个有吸引力的研究方向<sup>[22]</sup>。此外，germicidin D (surugapyrone A) 具有较强的 DPPH 自由基清除活性，可作为一种新的 DPPH 自由基清除剂<sup>[19]</sup>。

本研究结合培养基优化，从海洋共附生放

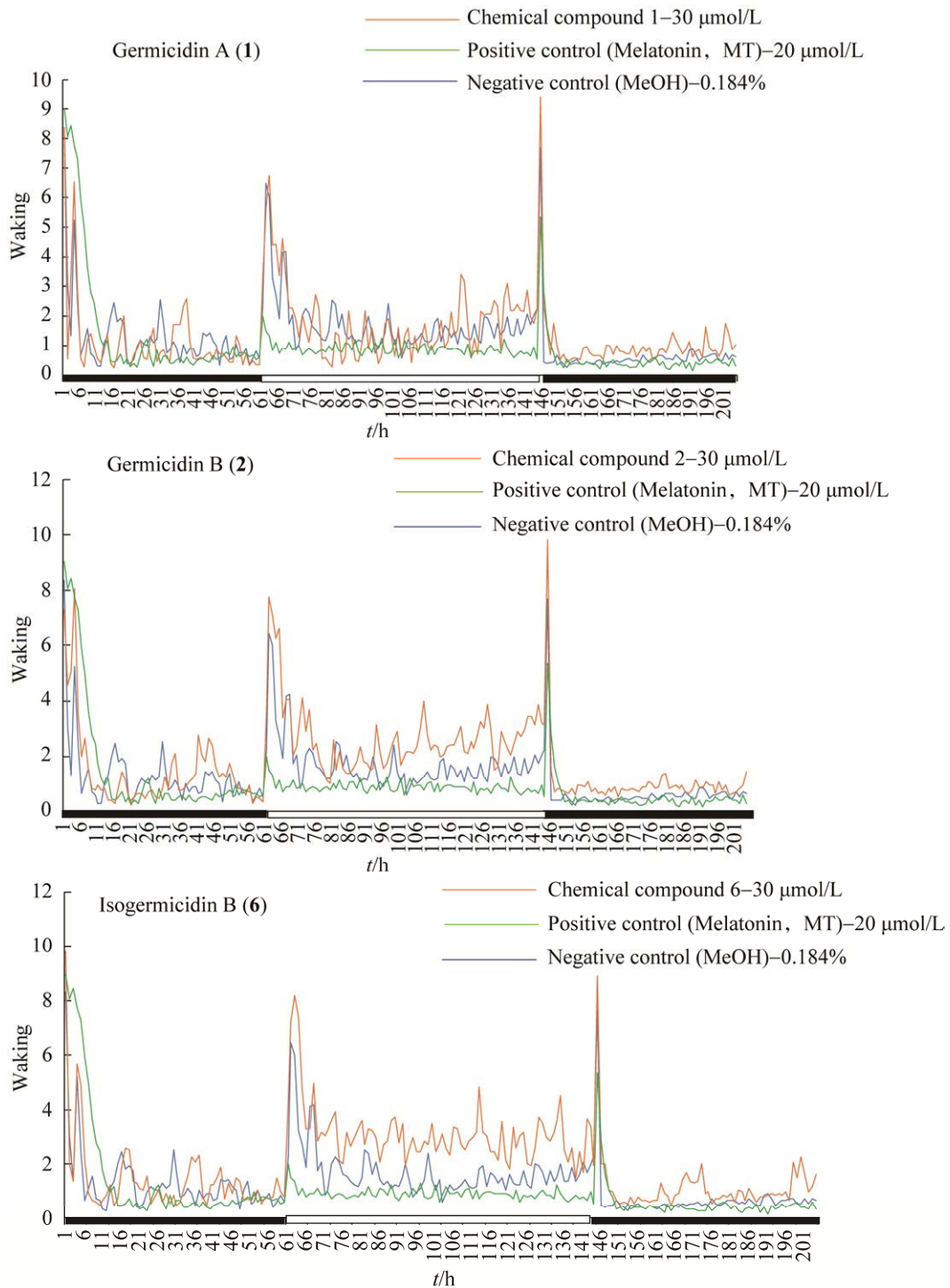


图 8 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 中化合物对斑马鱼神经行为的影响

Figure 8 Effects of compounds on zebrafish neurobehavior in *S. ardesiacus* SCSIO LO23. The blue line is the experimental data of methanol, the orange line is the experimental data of the compound, and the green line is the experimental data of the positive control; white and black color block represent the light & darkness respectively.

线菌 *S. ardesiacus* SCSIO LO23 的发酵产物中分离得到 6 个 germicidin 类化合物, 其中 germicidin B (2) 和 isogermicidin B (6) 在 30  $\mu\text{mol/L}$  浓度下对斑马鱼神经行为有显著的兴奋作用。通过全基因组测序和生物信息学工具对其进行分析, 以及通过异源表达验证发现, 基因 *gem* 是菌株中 germicidin 类化合物主要的生物合成基因, 结合文献推导了化合物 1–6 的生物合成途径。本研究夯实了 germicidin 类化合物的研究基础, 为该类化合物的后续深入研究提供了可持续利用的菌种资源, 并为次级代谢产物的基因挖掘提供了新的目标菌株。

## 参考文献

- [1] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2020, 37(2): 175–223.
- [2] 王成, 张国建, 刘文典, 杨新雨, 朱妮, 申静敏, 王志成, 刘杨, 程珊, 于广利, 管华诗. 海洋药物研究开发进展. *中国海洋药物*, 2019, 38(6): 35–69.  
Wang C, Zhang GJ, Liu WD, Yang XY, Zhu N, Shen JM, Wang ZC, Liu Y, Cheng S, Yu GL, Guan HS. Recent progress in research and development of marine drugs. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2019, 38(6): 35–69. (in Chinese)
- [3] Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports*, 2004, 21(4): 519–538.
- [4] 缪莉, 郑忠辉, 苏文金. 共附生海洋微生物活性物质的研究进展. *海洋通报*, 2002, 21(3): 62–68.  
Miao L, Zheng ZH, Su WJ. Research development of bioactive substance of symbiotic and epibiotic marine microorganisms. *Marine Science Bulletin*, 2002, 21(3): 62–68. (in Chinese)
- [5] Holmström C, Kjelleberg S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 30(4): 285–293.
- [6] Sung AA, Gromek SM, Balunas MJ. Upregulation and identification of antibiotic activity of a marine-derived *Streptomyces* sp. via co-cultures with human pathogens. *Marine Drugs*, 2017, 15(8): 250.
- [7] Charan RD, Schlingmann G, Janso J, Bernan V, Feng XD, Carter GT. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp.. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(8): 1431–1433.
- [8] Che Q, Qiao L, Han XN, Liu YK, Wang W, Gu QQ, Zhu TJ, Li DH. Anthranosides A–C, anthranilate derivatives from a sponge-derived *Streptomyces* sp. CMN-62. *Organic Letters*, 2018, 20(17): 5466–5469.
- [9] 凌春耀, 黄洪波, 高程海, 秦湘静, 鞠建华, 易湘茜. 海鞘来源放线菌 *Streptomyces pratensis* scsio LCY05 中 anthracimycin 类化合物及其抗菌活性研究. *中国海洋药物*, 2020, 39(3): 7–14.  
Ling CY, Huang HB, Gao CH, Qin XJ, Ju JH, Yi XX. Antibacterial anthracimycins from *Streptomyces pratensis* SCSIO LCY05 isolated from ascidian. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2020, 39(3): 7–14. (in Chinese)
- [10] Dong YL, Ding WJ, Sun CL, Ji XQ, Ling CY, Zhou ZB, Chen ZY, Chen XH, Ju JH. Julichrome monomers from marine gastropod mollusk-associated *Streptomyces* and stereochemical revision of julichromes Q<sub>3,5</sub> and Q<sub>3,3</sub>. *Chemistry & Biodiversity*, 2020, 17(4): e2000057.
- [11] Zhou ZB, Wu QL, Xie Q, Ling CY, Zhang H, Sun CL, Ju JH. New borrelidins from *Onchidium* sp. associated *Streptomyces olivaceus* SCSIO LO13. *Chemistry & Biodiversity*, 2020, 17(1): e1900560.
- [12] Ji XQ, Dong YL, Ling CY, Zhou ZB, Li QL, Ju JH. Elucidation of the tailoring steps in julichrome biosynthesis by marine gastropod mollusk-associated *Streptomyces sampsonii* SCSIO 054. *Organic Letters*, 2020, 22(17): 6927–6931.
- [13] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical *Streptomyces* genetics[M]. Colney: The John Innes Foundation. Norwich, UK. 2000: 125–127.
- [14] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 实验鱼质量控制: GB/T 39649—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- [15] Doumith M, Weingarten P, Wehmeier UF, Salah-Bey K, Benhamou B, Capdevila C, Michel JM, Piepersberg W, Raynal MC. Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 2000, 264(4): 477–485.
- [16] Hong B, Phornphisutthimas S, Tilley E, Baumberg S, McDowall KJ. Streptomycin production by *Streptomyces griseus* can be modulated by a mechanism not associated with change in the adpA component of the A-factor cascade. *Biotechnology*

- Letters*, 2007, 29(1): 57–64.
- [17] Petersen F, Zähler H, Metzger JW, Freund S, Hummel RP. Germicidin, an autoregulative germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551. *The Journal of Antibiotics*, 1993, 46(7): 1126–1138.
- [18] Chemler JA, Buchholz TJ, Geders TW, Akey DL, Rath CM, Chlipala GE, Smith JL, Sherman DH. Biochemical and structural characterization of germicidin synthase: analysis of a type III polyketide synthase that employs acyl-ACP as a starter unit donor. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(17): 7359–7366.
- [19] Sugiyama Y, Oya A, Kudo T, Hirota A. Surugapyrone A from *Streptomyces coelicoflavus* strain USF-6280 as a new DPPH radical-scavenger. *The Journal of Antibiotics*, 2010, 63(7): 365–369.
- [20] Ma M, Rateb ME, Yang D, Rudolf JD, Zhu X, Huang Y, Zhao LX, Jiang Y, Duan Y, Shen B. Germicidins H–J from *Streptomyces* sp. CB00361. *The Journal of Antibiotics*, 2017, 70(2): 200–203.
- [21] Song LJ, Barona-Gomez F, Corre C, Xiang LK, Udway DW, Austin MB, Noel JP, Moore BS, Challis GL. Type III polyketide synthase beta-ketoacyl-ACP starter unit and ethylmalonyl-CoA extender unit selectivity discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(46): 14754–14755.
- [22] Zhang XM, Peng AH, Xie WD, Wang M, Zheng D, Feng MK. Hexokinase II inhibitory effect of secondary metabolites derived from a *Streptomyces* sp. associated with mud dauber wasp. *Chemistry & Biodiversity*, 2020, 17(7): e2000140.
- [23] Grünschow S, Buchholz TJ, Seufert W, Dordick JS, Sherman DH. Substrate profile analysis and ACP-mediated acyl transfer in *Streptomyces coelicolor* type III polyketide synthases. *ChemBioChem*, 2007, 8(8): 863–868.
- [24] Hardeland R, Poeggeler B, Srinivasan V, Trakht I, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonergic drugs in clinical practice. *Arzneimittel-Forschung*, 2008, 58(1): 1–10.
- [25] McGlacken GP, Fairlamb IJS. 2-pyrone natural products and mimetics: isolation, characterization and biological activity. *ChemInform*, 2005, 36(39): <https://doi.org/10.1002/chin.200539233>.
- [26] Bacardit R, Moreno-Mañas M. Synthesis of  $\delta$ -lactonic pheromones of *Xylocopa hirsutissima* and *Vespa orientalis* and an allomone of some ants of genus *Camponotus*. *Journal of Chemical Ecology*, 1983, 9(6): 703–714.
- [27] Wilkes S, Glasl H. Isolation, characterization, and systematic significance of 2-pyrone-4, 6-dicarboxylic acid in *Rosaceae*. *Phytochemistry*, 2001, 58(3): 441–449.
- [28] Aoki Y, Matsumoto D, Kawaide H, Natsume M. Physiological role of germicidins in spore germination and hyphal elongation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The Journal of Antibiotics*, 2011, 64(9): 607–611.

(本文责编 李磊)