

基于皱皮软海绵宏基因组的 PKS 基因筛选的研究

张成升 李志勇* 缪晓玲

(上海交通大学生命科学技术学院海洋生物技术实验室 上海 200240)

摘 要 提取皱皮软海绵及其共附生微生物的宏基因组总 DNA,使用聚酮合酶(PKS)基因的酮酰合酶(KS)域引物 PCR 扩增 PKS 基因片段获得一条 671bp 的片段,以 pUCm-T vector 为载体将该基因片段克隆到大肠杆菌中,从阳性克隆中分离出 PKS 基因片段,测序推导出氨基酸序列。通过 BLAST 比对发现此氨基酸序列与红细菌目的 Rhodobacterales bacterium PKS 基因 KS 域的氨基酸序列有 96% 的同源性。通过基于氨基酸序列的系统发育分析,推测此筛选得到的 PKS 基因属于 trans-AT 型。本文首次证实了皱皮软海绵中存在细菌来源的 PKS 基因。

关键词: 皱皮软海绵; 宏基因组; 聚酮合酶基因; PCR 扩增; 序列分析

中图分类号: Q78, Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)03-0526-03

海绵属于多孔动物门,是最原始的低等多细胞海洋动物,全世界大约有 10000 到 15000 种左右,我国据称也有 5000 种左右。国外研究表明,海绵中存在许多结构新颖的活性物质,大多在陆地生物中从未发现过,而且很多物质具有广谱的抗菌、抗肿瘤、抗病毒、降血压、凝血和溶血等生物活性,是潜在的新药来源^[1-4]。但是绝大多数海绵活性物质的来源至今还是个谜,几乎全部的海绵活性物质还没有实现大规模制备,前者是后者主要限制性因素。目前开展海绵及其共附生微生物功能基因的研究代表了海洋生物技术的前沿热点,这方面的研究将有助于为解决海洋活性物质制备的瓶颈问题找到一条途径。

聚酮(polyketide)是一类结构多样且具备多种生物学活性的次生代谢产物,被广泛用作抗生素、免疫抑制剂、抗癌药^[5]。目前已有较多针对海绵及其共附生微生物中聚酮化合物的研究,例如:Abrell 等^[6]从印度尼西亚海绵中分离得到产生聚酮化合物的真菌,Bugni 等^[7]从斐济海绵中得到的细菌的发酵液中分离得到新结构的聚酮化合物。相对于从海绵中分离得到聚酮化合物,针对聚酮合酶基因的研究最近才刚刚开始^[8-10]。

目前,上海交通大学已经在海绵及其共生微生物的功能基因研究方面进行了一些探索性的工作,并已经得到了可喜的进展。我们于 2005 年成功构建了澳大利亚厚皮海绵的 Fosmid 宏基因组文库,并在此基础上进行了海绵抗菌肽功能基因筛选的研究^[11],这是国际上第一次尝试进行这项工作。迄今,国际上对于皱皮软海绵的聚酮类化合物和相关基因的研究还没有任何报道。本文从皱皮软海绵宏基因组总 DNA 出发,利用 PCR 技术对聚酮合酶基因进行筛选,希望为海绵活性物质来源提供分子证据,从而为从基因水平开发利用海绵资源,为解决海绵活性物质的制备提供可行途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 海绵样品:皱皮软海绵 *Halichondria rugosa* (Ridley &

Dendy),采集自我国海南三亚周边 20m 深海域。由中国科学院海洋研究所李锦和研究员鉴定。

1.1.2 试剂和仪器:Taq 聚合酶为晶美生物工程有限公司产品;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞、T4 DNA 连接酶、PCR Markers 均为上海申能博彩生物技术有限公司产品;T7、M13 引物对和 *gc1*、*gc2* 引物对由上海生工生物技术有限公司合成;其余试剂为国产分析纯试剂。HWS 24 型电热恒温水浴锅购自上海益恒实验仪器有限公司;EPS-300 系列电泳仪购自上海天能科技有限公司;复日 FR-980 型生物电泳图像分析系统购自上海复日科技有限公司;Biofuge primo R 型冷冻离心机和 HBPX220 型 PCR 仪均购自美国伯乐公司。

1.2 原材料的处理

用无菌手术刀切取海绵内部及外部组织少许,装入加有适量无菌无钙镁人工海水(CMFSW:31.6g NaCl,0.75g KCl,1.0g MgSO₄,2.4g Tris-HCl,20mmol/L EDTA,H₂O 1L,pH 7.0)的 5mL 离心管中,用大口径枪头稍加搅动,并适当吹打;用无菌钝头镊子撕成 1mm³ 的小块,于 CMFSW 中悬浮,用大口径枪头吹打数分钟,10000r/min,1min,去上清;加入适量无菌 CMFSW,用大口径枪头吹打重新悬浮,10000r/min,1min,去上清,加入适量无菌 CMFSW,用大口径枪头吹打重新悬浮,1000r/min 离心 2min,将上层细胞悬液转移至另一无菌 5mL 离心管中,使用血细胞计数法对海绵细胞及共附生微生物细胞共同进行细胞计数。

1.3 海绵宏基因组 DNA 的提取^[12]

具体操作方法参见文献^[12]。

1.4 PCR 扩增

基因组 DNA 在 25 μ L 反应体系中加入 2.5 μ L Taq Buffer (含 KCl,无 MgCl₂),3.5 μ L MgCl₂,2.0 μ L 2.5mmol/L dNTP,引物 10 μ mol/L *gc1*(5'-GCSATGGAYCCSCARCRCGSVT-3')与 *gc2*(5'-GTSCCGTSCCRTGSSCYTCSAC-3')各 0.5 μ L,14.75 μ L ddH₂O;0.25 μ L 5U/ μ L Taq 聚合酶。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 1min,63 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

基金项目:国家 863 计划(2004AA628060)

* 通讯作者。Tel 86-21-34204036 E-mail:zyli@sju.edu.cn

作者简介:张成升(1982-)男,浙江嘉兴人,研究方向为海洋功能基因。E-mail:Jack_chang@sju.edu.cn

收稿日期:2006-07-05 接受日期:2006-08-16 修回日期:2006-12-28

1.5 克隆与阳性克隆鉴定

割胶回收纯化 PCR 产物后,在 0.5mL 离心管中依次加入 1 μ L 连接 Buffer,50ng(1.5 μ L)的 pUCm-T,6.5 μ L 纯化的 PCR 产物和 1 μ L T4 DNA 连接酶,16 $^{\circ}$ C 下连接过夜。取连接产物 2 μ L 转化到 DH5 α 感受态细胞中,取 100 μ L 转化产物涂在含 AMP 的 LB 平板上(胰蛋白胨 10g,酵母提取物 5g,NaCl 10g,琼脂粉 15~20g,蒸馏水 1000mL;Amp 终浓度为 100 μ g/mL,pH 7.2~7.4),37 $^{\circ}$ C 正置培养 1h 后,倒置培养 12~16h,挑取白色菌斑培养。挑取培养好的菌加入 20 μ L TRlton 中破壁,取 1 μ L 作为模板,以 T7(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')、M13(5'-AACAGCTATGACCATG-3')载体引物进行 PCR 扩增,电泳分析,确定阳性克隆。

1.6 序列测定及分析

将筛选得到的阳性克隆子送样到上海英骏生物技术有限公司用 3730 测序仪进行序列测定。将得到的目标片段序列提交 GenBank 数据库,采用 BLAST 程序进行序列的同源性分析,然后选择了 GenBank 上登录的具有代表性的一些 KS domain 的氨基酸序列,用软件 ClustalX1.81 与目标片段序列进行完全比对,并使用软件 Mega 3.1.exe 构建系统发育树。

2 结果和讨论

2.1 基于 PCR 的 PKS 基因筛选与序列分析

试验得到的宏基因组 DNA 大小在 20kb 以上,以此为模板进行 PCR 扩增得到大小约 671bp 左右的片段,与引物的预期产物大小很相近。挑取白斑到 20 μ L TRlton 破壁得到重组质粒 DNA,经 PCR 扩增,凝胶电泳,显示一条明亮的条带(828bp 左右),去除载体上的序列(157bp 左右)后,与预期片段长度(671bp)相符合,表明目的基因已经克隆于载体 pUCm-T 并成功转入大肠杆菌。将目的序列进行测序,去除载体上的序列得到 671bp 的核苷酸序列。将得到的 PKS 基因序列定名 PH1,并通过 GenBank 申请获得序列号 EF392721。

2.2 BLAST 比对和系统发育树的分析

根据核苷酸序列翻译得到的氨基酸序列如下:
 AMDPQQRLLQVVWEAMEDARLDASKLAGKRVG VYVGASSMDH
 GSVLGRDPSLVDSYLMTGNTLSLVANRISHGFDLRGSPFVVDTACS
 SSVIAMDQARQALS RGDITAI VAGV NLLSPSSFFVGFSAARMLSP
 GLCQSFSDKADGYVRAEGCVAMVLQNSSDIPATAKARVVDSETN
 ADGYTMNVALPAEEGQYELLSRLYDRQSISSPDDLSFVEGHGTG。

经 BLAST 比对发现此序列与美国 Rockville 医学中心发

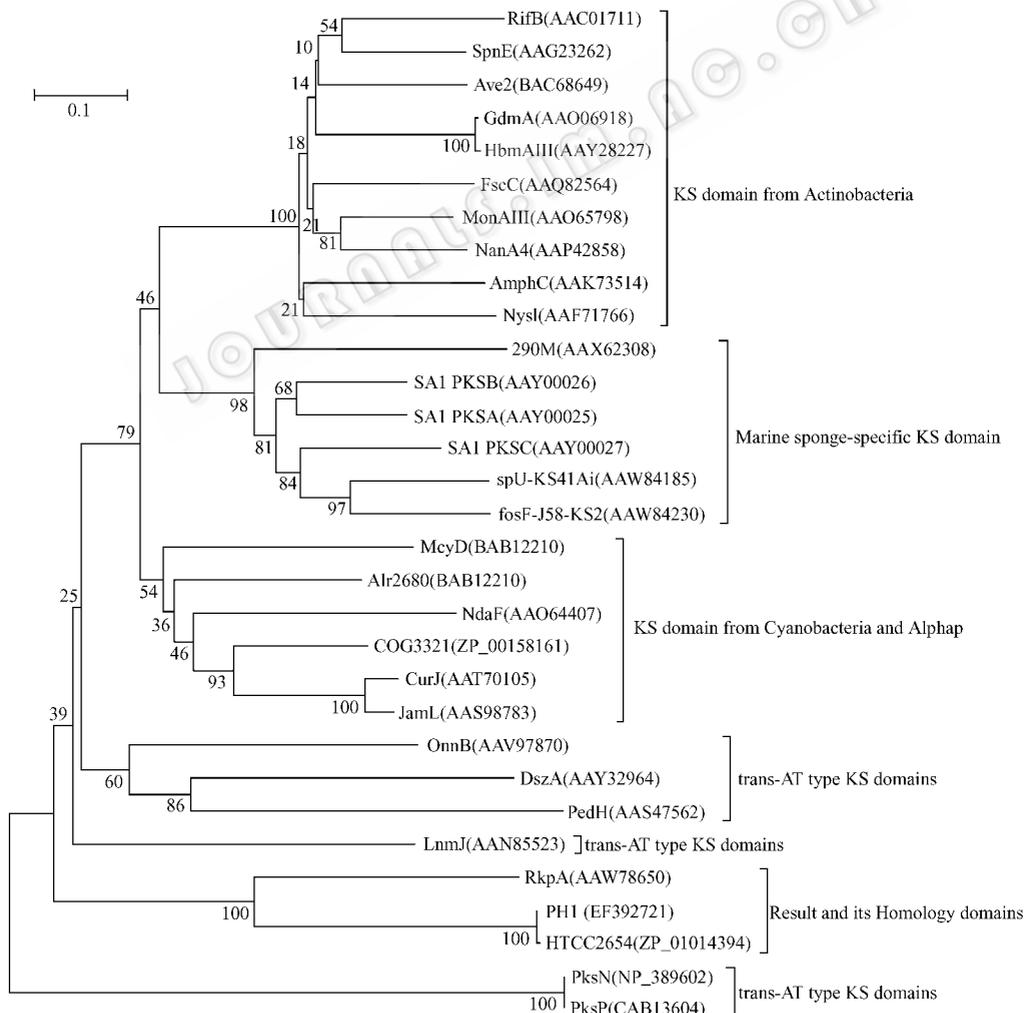


图 1 基于氨基酸序列的系统发育树

Fig.1 Neighbour-joining tree based on amino acid sequences. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bootstrap analysis was based on 500 replicates. Scale indicates 10% sequence divergence.

现的红细菌属的 *Rhodobacteriales bacterium* (ZP-01014394) PKS 基因 KS 域的氨基酸序列有 96% 的同源性。

选择 GenBank 上具有代表性的一些 KS domain 的氨基酸序列构建的系统发育树如图 1, 发现 *Halichondria* KS 与红细菌目的 *Rhodobacteriales bacterium* PKS 基因 KS 域的氨基酸序列的系统发育关系最近, 其次为蓝细菌, 再是从海绵 *Discodermia dissoluta* 中筛选得到的 PKS 基因 KS 域的氨基酸序列(SA1 PKSA, SA1 PKSB, SA1 PKSC, spU-KS41Ai 和 fosF-J58-KS2) 和放线菌。由于皱皮软海绵从我国南海海域采集而来, 而海绵 *Discodermia dissoluta* 来自于加勒比海, 两者采集海域以及海绵种类的差异使得它们共附生微生物群落基因组中的 PKS 基因也存在着比较大的差异, 从而说明不同海域海绵共附生微生物的差异性以及海洋微生物的多样性。从图 1 看到, PH1(EF392721)所处的系统发育树分支处于属于 trans-AT 型的 S 域的氨基酸序列之间, 所以推断皱皮软海绵中的 PKS 基因是 trans-AT 型的。

3 讨论

从皱皮软海绵宏基因组 DNA 中扩增得到了一条 671bp PKS 基因片段。通过 BLAST 比对和系统发育树分析, 基因对应的氨基酸序列与红细菌目的 *Rhodobacteriales bacterium* PKS 基因 KS 域的氨基酸序列有 96% 的同源性和较近的系统发育关系。本文首次证明了皱皮软海绵共附生微生物来源的 PKS 基因, 为海绵活性物质微生物来源学说提供了有力的证据, 也为今后从基因水平利用海绵尚不可分离培养的微生物资源提供了基础。

参 考 文 献

[1] 王 磊, 方玉春, 刘红兵, 等. 海绵共附生微生物活性次级代谢产物的研究进展. 中国海洋药物, 2005, 24(6): 52-56.

[2] 刘 丽, 胡江春, 王书锦. 海绵微生物活性物质的研究进展. 天然产物研究与开发, 2004, 16(5): 477-481.

[3] 黄孝春, 郭跃伟. 海绵药物的研究进展: 化学和生物活性. 中国天然药物, 2005, 3(1): 1-9.

[4] 曾名勇, 崔海英, 李八方. 海洋生物活性肽及其生物活性研究进展. 中国海洋药物, 2005, 24(1): 46-51.

[5] 陶美凤, 胡志浩, 周秀芬, 等. 一个巨大的多烯抗生素基因簇中聚酮合酶 (PKS) 基因单位在大肠杆菌中的双重诱导超量表达. 遗传学报, 1999, 26(6): 721-730.

[6] Abrell LM, Bethel B, Phillip C. A new polyketide, secocurvularin, from the salt water culture of a sponge derived fungus. *Tetrahedron Letters*, 1996, 37(50): 8983-8984.

[7] Bugni TS, Berman VS, Greenstein M, et al. Brocaenols A-C: Novel polyketides from a marine derived *Penicillium brocae*. *J Org Chem*, 2003, 68(5): 2014-2017.

[8] Schirmer A, Gadkri R, Reeves CD, et al. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(8): 4840-4849.

[9] Piel J, Hui DQ, Fusetani N, et al. Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(9): 921-927.

[10] Kim TK, Garson MJ, Fuerst JA. Marine actinomycetes related to the 'Salinospora' group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(4): 509-518.

[11] 吴 杰, 李志勇, 张戌升. 海绵宏基因组文库构建及抗菌肽功能基因的初步筛选. 生物技术通报, 2006, 3: 95-98, 103.

[12] 李志勇, 吴 杰. 大片段海绵宏基因组 DNA 快速提取方法. 中国发明专利, 申请号: 200610024278.8.

PKS gene screening based on metagenome of *Halichondria rugosa*

ZHANG Xu-sheng, LI Zhi-yong*, MIAO Xiao-ling

(Marine Biotechnology laboratory, School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Metagenome DNA was extracted from *Halichondria rugosa* which was collected from South China Sea and kept in -4°C . PKS gene fragment was amplified using PCR with KS domain primers in PKS gene. A DNA fragment about 671bp in length was obtained by PCR. The PCR product was measured by agarose gel electrophoresis. Then the product was recovered from gel and cloned into pUCm-T vector. After that vectors were transformed into competent cells (DH5 α). PKS gene fragment in positive clones was sequenced. Consequently, the corresponding amino acid sequence was deduced based on nucleotide sequence. BLAST analysis showed that the homology of this amino acid sequence with that deduced from KS domain of PKS gene in *Rhodobacteriales bacterium* was up to 96%. Phylogenetic analysis indicated that the obtained PKS gene belongs to trans-AT KS domains. Meanwhile the result demonstrated the diversity and differences of microorganisms associated with and around sponge in different sea area. It is the first time to find bacterial PKS gene in sponge *Halichondria rugosa* which provide powerful proof to the microbial origin hypothesis of sponge active compounds. At the same time, this study lay basis for the utilization of uncultured microorganisms associated with sponge from the aspect of genes.

Keywords: *Halichondria rugosa*; metagenome; polyketide synthase gene; PCR amplification; phylogenetic analysis