

基于化学遗传学筛选产萘醌类化合物内生放线菌

李芳¹, 康前进, 姚晓玲, 李妍妍, 魏茂龙, 曹勇, 林双君, 白林泉, 马伟*, 邓子新

上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室分子微生物学研究室, 上海 200240

摘要: 【目的】为探究含具有抗肿瘤活性的美登素的滑桃 (*Trewia nudiflora*) 种子中内生放线菌的多样性, 以及从内生放线菌中寻找萘醌类化合物产生菌。【方法】利用放线菌富集筛选培养基对经消毒处理的滑桃种子进行内生菌分离, 根据菌落形态及 16S rRNA 基因序列分析进行菌种的分类鉴定。通过对所分离到的内生放线菌拮抗模式病原细菌 (金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌)、作物病原真菌 (小麦赤霉菌、水稻纹枯病致病菌等) 活性检测, 以及萘醌类化合物合成关键基因为探针定向筛选萘醌类化合物产生菌。【结果】从分离到的 100 余株滑桃种子内生菌中鉴定出 66 株以链霉菌为主的放线菌, 发现 *Streptomyces* sp. HTZ27 菌株含有目标基因, 经固体发酵、化合物分离纯化、鉴定后, 发现该菌发酵产物中有呋喃萘醌 I, 得率接近 5 mg/L。【意义】本研究采用的化学遗传学方法可有效提高筛选目标化合物产生菌的效率, 所筛选到 FNQ I 产生菌为深入研究呋喃萘醌类化合物生物合成与调控、抗肿瘤分子机理以及产业化应用等创建了有利条件。

关键词: 滑桃种子, 内生放线菌, 呋喃萘醌 I, 化学遗传学

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 04-0442-07

醌类化合物是一类在植物中广泛存在、种类丰富、具有消炎、抗细菌、真菌等多种生理活性的重要天然产物, 近年来研究发现紫草素、胡桃醌等萘醌类化合物通过抑制拓扑异构酶 I 的活性、抑制肿瘤血管的形成以及诱导细胞凋亡等方式对乳腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、骨髓癌等多种肿瘤有治疗效果^[1–4], 醌类化合物是目前抗肿瘤等新药研发研究的一个热点^[5]。但是, 醌类活性物质目前主要从植物中提取, 普遍存在原料有限、含量低以及提取工艺复杂等问题, 寻找适合于规模化生产的新来源成为当务之急。以链霉菌为代表的放线菌具有复杂多样、基因工程改造相对较容易、适于工业化生产等特点^[6]。而植物内生菌, 由于其独特的生活环境, 可能具有与宿主植物相似的代谢物^[7–8]。但是, 从数量众多的

内生菌中筛选目标化合物产生菌工作量仍十分巨大; 近年来兴起的化学遗传学研究, 依据目标化合物结构相关信息, 开展其生物合成途径、先导化合物筛选^[9], 可以大大提高相关研究的效率。

滑桃树 (*Trewia nudiflora*) 大型乔木, 属大戟科特里维木属, 该属仅有滑桃 1 种, 主要分布于印度、马来西亚以及我国云南、广西和广东等地^[10–11]。鉴于醌类化合物普遍存在于高等植物中^[1], 以及王浩鑫、杨显志等报道滑桃树茎等部位中有种类丰富的内生细菌、真菌^[11–12], 本研究拟采用化学遗传学方法, 即以萘醌类化合物生物合成途径关键基因为探针, 对分离自滑桃种子的内生放线菌进行高效筛选, 结合生物活性检测及化合物分离、纯化与鉴定, 以期获得萘醌类化合物的产生菌株, 为萘醌类化合物生物

基金项目: 转基因专项资助 (2009-ZX08009-056B, 2012ZX08011-002-004)

* 通信作者。Tel: +86-21-34206722; E-mail: wma@sjtu.edu.cn

作者简介: 李芳 (1987–), 山东人, 硕士研究生, 植物-微生物互作与分子微生物学研究。E-mail: zmc6363@163.com

收稿日期: 2011-09-20; 修回日期: 2011-12-25

合成与调控及生物活性分子机理等研究铺平道路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:滑桃种子采自中国科学院西双版纳热带植物园,分别于2010年8月、2010年11月采集。

1.1.2 主要试剂和仪器:溶菌酶(Amresco)、蛋白酶K(Amresco)购自上海嘉适科学仪器有限公司;HS Taq Kit、Marker 购自上海东盛生物科技有限公司;PCR产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司。克隆载体:TaKaRa pMD18-T simple 购自上海皓嘉科技发展有限公司;

化合物分离采用Waters公司2690型HPLC进行,分离柱为Supelco公司的Ascentis C18, 5 μm , 25 cm \times 4.6 mm反相柱。化合物鉴定由上海交通大学分析测试中心分别采用Bruker公司Avance III 400 MHz质谱仪和Waters公司的ACQUITYTM UPLC & Q-TOF MS Premier核磁共振仪进行质谱与核磁分析。

1.1.3 引物:表1为本研究所用引物。由上海捷瑞生物工程有限公司和上海美吉生物医药科技有限公司合成。

表1 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of synthetic oligonucleotide primers

Primer	Sequence (5'→3')	Size / bp
16S rRNA Forward primer	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	21
16S rRNA Reverse primer	CTACGGCTACCTTGTACGA	20
FNQ 6 Forward primer-1	TCANCTACGTYTCGTGCACC	20
FNQ 6 Reverse primer-1	TGGAAGTGAAGCCGGTGT	19
FNQ 21 Forward primer-2	GTGCCACGACNCTTCGG	17
FNQ 21 Reverse primer-2	CACRGGGTWCGGTTTGTG	18

Note: 16S rRNA primer was designed according to actinomyces systematology^[13], FNQ 6 primer and FNQ 21 primer was designed according to gene *RppA3* (polyketide synthase Type III) and carboxymuconate cycloisomerase gene by using primer premier 5.0.

1.1.4 菌株:①生物活性检测菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* N315)、铜绿假单胞菌临床分离菌(*Pseudomonas. Aeruginosa*),由上海交通大学医学院姚玉峰教授惠赠;②枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),由本实验室保存;③小麦赤霉病致病菌(*Gibberellasaubinetii*)、水稻纹枯病致病菌(*Rhizoctoniasolani* Kühn)、串珠镰刀菌(*Fusarium*,

moniliforme Sheld)由上海交通大学许煜泉教授惠赠。

1.1.5 培养基:①模式病原细菌培养基:LB培养基^[14]。②作物病原真菌培养基:PDA培养基。③内生放线菌分离培养基:丙酸钠培养基、柠檬酸盐培养基^[6]、TWYE培养基^[15]、MS培养基^[16],每升培养基加入重铬酸钾50 mg、萘啶酮酸20 mg。

1.2 放线菌分离方法

挑选无虫蛀、病斑的滑桃果实去除外果皮与中果皮,消毒方法参照Zinniel等的方法^[16],用无菌工具去除种子内果皮,用无菌手术刀将种子切成(1-2) mm \times (1-2) mm的小块(每次制备2000块小切块(本次研究共进行了两次实验)),放置到不同的筛选培养基上,25℃暗培养4-6周。期间,每天观察平板上菌落的生长情况,挑选具有典型放线菌菌落形态与质地的菌落逐步纯化,并制备孢子悬液于-80℃长期保存。

1.3 生物活性检测

抗菌活性检测指示细菌用LB稀释成 $OD_{600} = 0.2$,每个9 cm LB培养皿均匀涂布100 μL ;抗真菌活性检测指示真菌刮取真菌孢子,制成孢子悬液,均匀涂布于PDA培养基上。用无菌打孔器从培养好的放线菌平板上挖取直径6 mm的菌块放置到已均匀涂布有指示菌的平板上,抗菌活性检测于30℃培养1-2 d;抗真菌检测于28℃培养3-5 d。

1.4 放线菌的菌种鉴定

内生放线菌基因组DNA模板的提取方法采用Tobias Kieser等的方法进行^[16]。16S rRNA基因扩增:95℃ 3 min预变性;95℃ 30 s, 55℃ 40 s, 72℃ 90 s, 30个循环;72℃ 10 min延伸。将扩增产物进行TA克隆得到阳性单菌落后进行测序。所获的16S rRNA基因序列经EzTaxon server 2.1 (<http://147.47.212.35:8080/>)原核微生物分类鉴定公共数据库分析,确定其种属分类。

1.5 基于16S rRNA序列的滑桃内生放线菌进化关系分析

参照Saitou等人^[17]的方法,采用MEGA4中的Neighbor-Joining法构建滑桃内生放线菌系统发生树,分析内生放线菌的进化关系。

1.6 基于PCR扩增的萘醌类化合物合成关键基因的检测

根据Yvonne Haagen^[18]报导的萘醌生物合成基

因簇中 *fnq6*、*fnq21* 等基因序列设计兼并引物以分离到的内生放线菌基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,筛查含有萘醌合成基因簇的菌株,扩增程序为: 95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。扩增产物经 TA 克隆后进行测序分析。

1.7 发酵及天然产物分离纯化

采用固体发酵的方式,保存菌种经活化后,接种到固体 MS 培养基上,28℃ 固体发酵 6 d 后,将菌体及培养基切碎后,用无水乙醇浸泡过夜,滤除固体物后,进行乙酸乙酯萃取,乙酸乙酯相经减压浓缩后溶于甲醇,以石油醚:乙酸乙酯 = 1:1 为流动相对样品进行正相硅胶柱分离,本工作共收集 61 个馏分(15 mL/馏分);对各馏分分别进行了 TLC 展开与碘

化铊钾显色检测,根据各馏分 TLC、生物活性等分析结果,选择相应馏分进一步进行 HPLC 纯化(流动相为甲醇:水 = 80:20 (V/V),流速为 2 mL/min)及生物活性检测确定候选化合物,再进行进一步的质谱与核磁分析^[19-20]等鉴定。

2 结果和分析

2.1 内生放线菌的多样性

通过形态观察等确定从滑桃种子中分到的 100 余株内生菌中有 73 株疑似放线菌,分子生物学鉴定其中有 66 株可确定为链霉菌。它们的分类进化关系如图 1 展示:测序分析的 66 株菌和目前已报道过

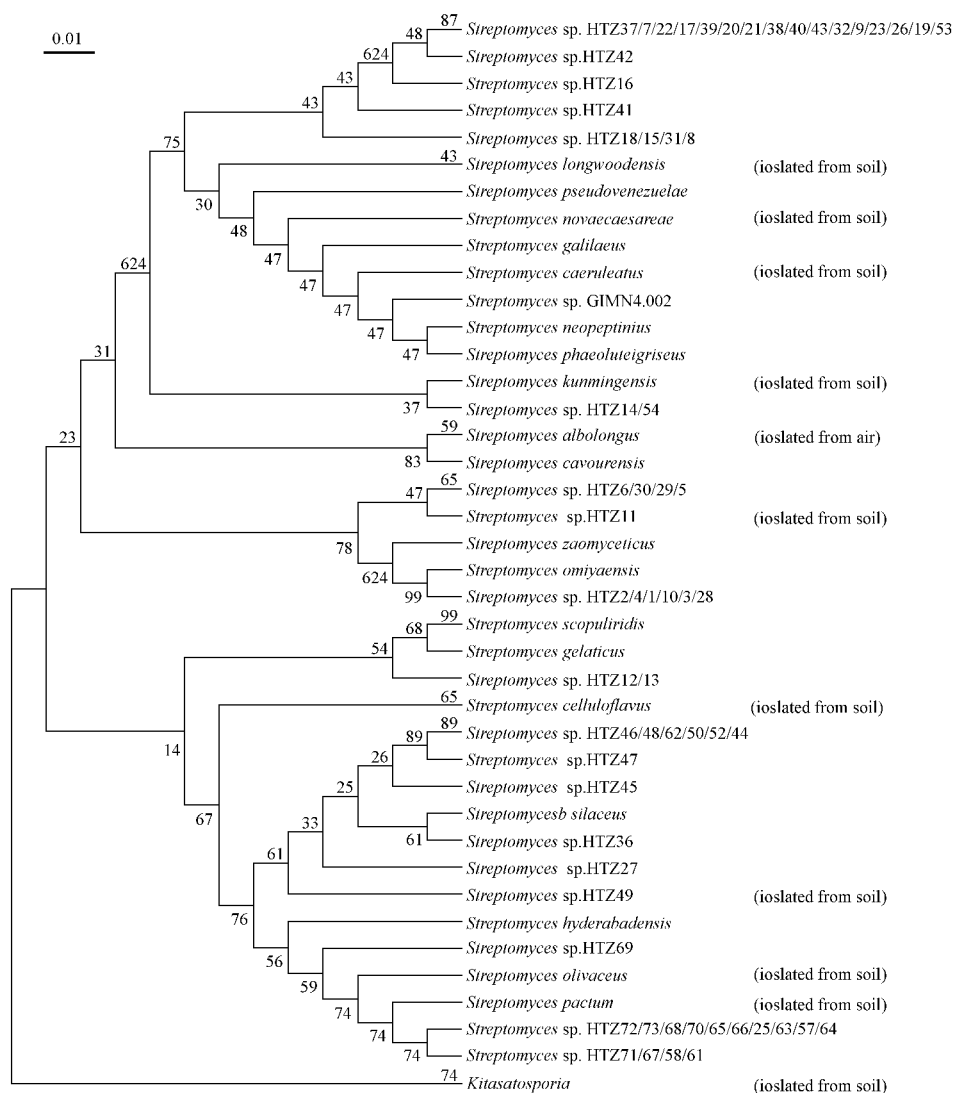


图 1 基于 16S rRNA 基因序列分析构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree showing the relationship among reference strains and experimental strains based on 16S rRNA gene sequence. Bar: 1% sequence divergence. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on N-J analysis of 1000 resampled data sets.

的链霉菌相似度高达 97% (及以上),可以判定其中未发现新的菌种,且所分离到的菌株多数与土壤源的链霉菌相似度极高。

表 2 滑桃种子内生放线菌菌抗菌活性统计

Table 2 Statistics of antimicrobial activity of endophyte actinomycetes isolated from *Trewia nudiflora* seeds

Genus	A	B	C	D	E	F
Streptomyces (66 strains)	27	35	40	28	12	10
Bacillus (2 strains)	1	-	2	1	1	1
unknown* (5 strains)	-	-	-	1	1	-

* Cloning of the 16S rRNA gene of these five strains were failed. A. *Staphylococcus aureus* Rosenbach. N315; B. *Pseudomonas. Aeruginosa*; C. *Bacillus subtilis* 800; D. *Rhizoctonia solani* Kühn; E. *Fusarium. moniliforme* Sheld; F. *Gibberella saubinetii*.

2.3 萘醌化合物合成相关基因的检测

对分离到的 66 株内生放线菌筛选可能的萘醌类化合物产生菌株。结果基于 FNQ6 的引物可以以 18 株内生菌基因组 DNA 为模板扩增出特异性条带,而 FNQ21 基因的引物只能以 *S. sp.* HTZ27 号菌株的基因组 DNA 为模板扩增出特异条带,具体 PCR 产物的电泳结果见图 2。

2.4 化合物鉴定

根据内生放线菌对细菌及真菌的拮抗活性与萘醌生物合成基因筛选结果,选定了 *S. sp.* HTZ27 及 *S. sp.* HTZ42 进行了固体发酵,*S. sp.* HTZ27 的固体发酵结果较为理想,产物的抗菌活性仍较明显,TLC

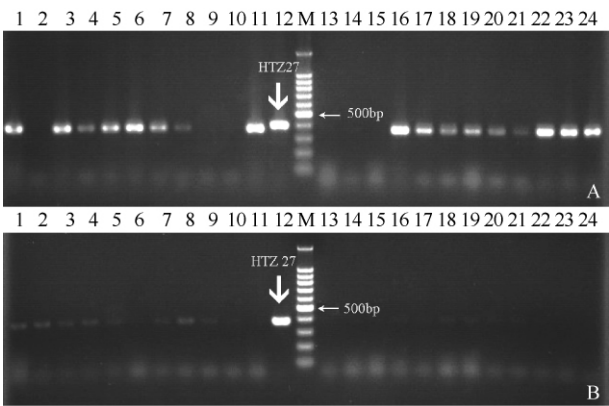


图 2 内生菌萘醌生物合成关键基因 (FNQ6、FNQ21) PCR 检测

Fig. 2 Screening for endophyte with Furanonaphthoquinone biosynthesis key genes (FNQ6, FNQ21) by PCR. A: PCR products with FNQ6 primer; B: PCR products with FNQ21 primer; M 1 to 12: the genomic DNA of *S. sp.* HTZ16 -*S. sp.* HTZ27 used as PCR template respectively; M13 - 24: genomic DNA of *S. sp.* HTZ28 -*S. sp.* HTZ39 used as PCR template respectively; Marker: 100 bp plus DNA Marker.

检测化合物种类较丰富,因此后续的化合物分离及鉴定工作主要集中在 *S. sp.* HTZ27 上开展。通过活性追踪、正相硅胶柱分离以及 HPLC 分离纯化,对初步获得的候选化合物利用质谱及 NMR 进行了分析与鉴定,发现其中的一个化合物为萘醌类化合物,其 MS 谱图见图 3,NMR 结果见表 3。

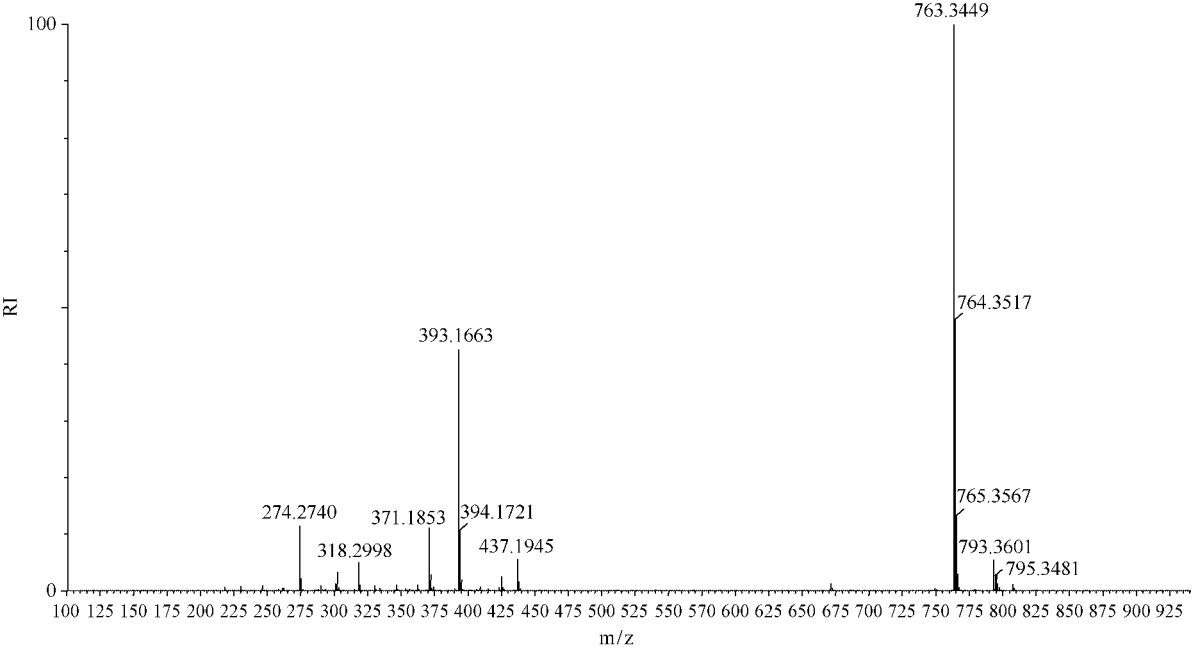


图 3 所分离化合物的质谱图

Fig.3 the Mass spectra of candidate compound.

表3 所分离化合物 NMR 分析结果

Table 3 NMR data of the candidate compound

Atom	δ H	δ c	Atom	δ H	δ c
2	4.86 q, J = 6.5	88.1 d	10	1.76 m 1.98 m	37.7 t
3	/	46.9 s	11	1.81 m 2.02 m	23.7 t
3a	/	128.0 s	12	5.32 m	123.8 d
4		161.2 s	13	/	132.0 s
4a		109.5 s	14	1.53 s	17.6 q
5		184.2 s	15	1.64 s	25.7 q
6		134.1 s	2-Me	1.44 d, J = 6.5	15.4 q
7		157.0 s	3-Me	1.27 s	19.6 q
8		181.4 s	6-Me	2.08 s	9.4 q
8a		133.2 s	7-OMe	3.98 s	60.7 q
9	7.30 s	109.4 d	4-OH	7.26 s	/
9a		157.5 s			

Data were recorded in CDCl_3 , J in Hz, 1 H at 400 MHz, ^{13}C at 100 MHz.

根据 MS 与 NMR 的分析结果确定该化合物为呋喃萘醌 I (FNQ I), 结构见图 4。

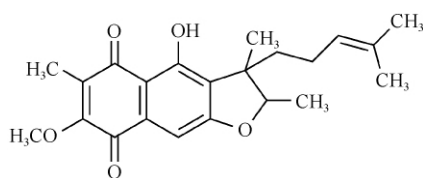


图4 所分离化合物的结构

Fig. 4 the chemical structure of the isolated compound.

3 讨论

本研究发现,采用放线菌富集分离培养基,来自约 200 粒滑桃种子的近 4000 个外植体中,共分离到 66 株链霉菌,另有 5 株待进一步确定,由此可见,生长于云南西双版纳州植物园滑桃树的种子中存在相当丰富的内生菌。16S rRNA 基因序列聚类分析结果(见图 1)表明滑桃种子中内生链霉菌的大多数与分离自土壤链霉菌相似,少数与分离自空气的链霉菌相近,此结果与朱文勇等研究结果一致^[6],支持高等植物内生菌起源于土壤微生物的观点。此外,分离到内生菌中有五株的菌落形态与放线菌非常相似,但始终无法用细菌 16S rRNA 通用引物进行特异扩增,推测这几株菌很可能是稀有放线菌或其他种类的微生物,深入研究正在进行中。

植物中生物活性物质究竟是由植物独立合成,

还是由内生菌产生或是由植物(如本研究中的滑桃)与内生菌(放线菌)协同合成的^[21-23]长期存在争议。文献报导^[11]与本研究均表明滑桃种子中存在种类繁多的内生菌,分离到的内生菌多数具有明显的抗真菌和抗细菌等活性(详见表 2),同时,滑桃种子含丰富抗细菌、抗真菌以及含抗肿瘤活性物质^[12,24-25],这两个同时并存的现象,似乎支持植物生物活性物质由内生菌或至少由内生菌与植物协同合成的观点。同时,滑桃种子中内生菌菌落结构在滑桃种子发育、成熟过程中是一成不变还是动态变化的?内生菌纯培养鉴定法不可能获得完整的内生菌菌落结构相关信息,尤其是难获得各种内生菌的丰度信息,因此,宏基因组等研究技术的应用以及解决从大量植物细胞中分离少量细菌等技术难题的解决,将是全面、客观地了解滑桃等高等植物内生菌菌落结构在植物不同发育、生理状态下的动态变化规律的关键,相关研究对探究植物内生菌的起源、演化以及相关资源的开发、利用具有重要意义^[26-28],同时也有助于解答植物生物活性物质合成的生源问题。

地球生物圈中微生物是一个非常巨大的资源宝库,但是,一般野生菌的目标化合物产量很低,即便筛选特定植物内生菌,工作量仍十分巨大。根据目标化合物化学结构及生物合成相关基因信息,针对生物合成途径中的关键基因设计兼并引物进行高通量筛选,是寻找目标化合物产生菌的一条高效途径^[9]。本工作根据 Yvonne Haagen 等人 2006 年报道的 FNQI 生物合成基因簇相关信息^[18],针对 III 型聚酮合酶(RppA, FNQ6)、羧基粘康酸环式异构酶(FNQ21)等关键基因的保守区段设计兼并引物,结果 FNQ6 引物可对 18 株菌基因组 DNA 扩增出特异条带,而 FNQ21 引物仅能对 *Streptomyces*. sp. HTZ27 的基因组 DNA 扩增出条带,这与 FNQ6 基因编码的酶催化的反应产物是多种生物合成途径的前体,而 FNQ21 基因编码的酶位于(呋喃)萘醌类化合物合成途径下游是相符合的。经 5L 固体培养基发酵、化合物分离纯化和鉴定,共得到 FNQ I 24.8mg(得率接近 5mg/L),比文献报导的 *S. cinnamonensis* 的产量高数倍。本工作说明,采用化学遗传学方法可大大提高筛选目标化合物产生菌的效率。

有研究报道 FNQ I 的同系物具有抗菌^[29]、抗病毒性^[30]及对肿瘤细胞的显著选择性细胞毒性,可

抑制肿瘤细胞分裂并诱导其凋亡^[31],但由于该类化合物一直没有解决来源的问题,限制了其生物合成、调控以及抗肿瘤分子机理等研究工作开展。本工作筛选到的 FNQ I 野生高产菌株为呋喃萘醌类化合物的生物合成、生物活性分子机理以及产业化应用等研究创造了有利条件。

致谢 (1) 中国科学院西双版纳热带植物园张石宝、付学维、李庆军等老师在野外实验工作中给予了大力的帮助与支持。(2) 本研究中核磁及质谱分析工作由上海交通大学分析测试中心承担。(3) 本工作研究及论文写作过程中得到上海交通大学微生物代谢国家重点实验室的多位老师提供了许多建设性意见及帮助。一并表示衷心感谢。

参考文献

- [1] 王增涛,金光洙.天然来源萘醌类化合物抗肿瘤活性研究进展. 中草药 (*Chinese Traditional and Herbal Drugs*), 2008, 39(9): 2-6.
- [2] Plyta ZF, Li T, Papageorgiou VP, Mellidis AS, Assimpoulou AN, Pitsinos EN, Couladouros EA. Inhibition of topoisomerase I by naphthoquinone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1998, 8(23): 3385-3390.
- [3] Fujii N, Yamashita Y, Arima Y, Nagashima M, Nakano H. Induction of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by the plant naphthoquinones plumbagin and shikonin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992, 36(12): 25-89.
- [4] 管鹏健,徐德锋,李绍顺.萘醌类化合物抗肿瘤活性研究进展. 中国药物化学杂志 (*Chinese Journal of Medicinal Chemistry*), 2004, 14(4): 249-256.
- [5] Asche C. Antitumour quinones. *Medicinal Chemistry*, 2005, 5(5): 449-467.
- [6] 朱文勇,李洁,赵国振,秦盛,赵立兴,徐丽华.喜树内生放线菌多样性及抗菌活性评价. 微生物学通报 (*Microbiology China*), 2010, 37(2): 211-216.
- [7] 李强,刘军,周东坡,朱婧.植物内生菌的开发与研究进展. 生物技术通报 (*Biotechnology Bulletin*), 2006, 3: 33-37.
- [8] Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 2001, 18: 448-459.
- [9] Cong Feng, Cheung Atwood K, Huang SM. Chemical genetics-based target identification in drug discovery. *Pharmacology and Toxicology*, 2012, 52:57-78
- [10] 李炳钧,王春,许秀坤,乐秀芳,沈祖铭,陆丽娟,韩家娴,许承辉,杨蔚怡.滑桃树种子的美登素类成分. 云南植物研究 (*Acta Botanica Yunnanica*), 1991, 13(04): 1-3.
- [11] 王浩鑫,焦军影,曾英,沈月毛.滑桃树不同器官伴生细菌多样性的分子特征. 云南植物研究 (*Acta Botanica Yunnanica*), 2006, 28(3): 289-294.
- [12] 杨显志.滑桃树内生真菌多样性及产抗癌成分菌株的研究. 云南大学的硕士学位论文, 2002.
- [13] 徐丽华,李文均,刘志恒,姜成林.放线菌系统学. 北京:科学出版社, 2007: 1-471.
- [14] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南,黄培堂等译. 第三版. 北京:科学出版社, 2005:1-1949.
- [15] Coombs JT, Franco CMM. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and environmental microbiology*, 2003, 69(9): 5603-5608.
- [16] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical streptomyces genetics. UK: The John Innes Foundation Norwich, UK. CSHL press. 2000: 1-663.
- [17] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406-425.
- [18] Yvonne Haagen, Kerstin Glück, Katja Fay, Bernd Kammerer, Bertolt Gust, Lutz Heide. A gene cluster for prenylated naphthoquinone and prenylated phenazine biosynthesis in *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042. *Chembiochem*, 2006, 7(12): 2016-2027.
- [19] 谭天伟.天然产物分离新技术. 化工进展 (*Chemical Industry and Engineering Progre*), 2003, 22(007): 665-668.
- [20] 徐怀德.天然产物提取工艺学. 北京:中国轻工业出版社, 2006, 1-439.
- [21] 曹艳茹,姜怡,陈义光,唐蜀昆,秦盛,赵国振,徐丽华,武陵山放线菌多样性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(007): 952-958.
- [22] Conn VM, Franco CMM. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Applied and environmental microbiology*, 2004, 70(3): 1787-1794.
- [23] Zinniel DK, Lambrecht Patricia A, Harris NB, Feng Zhengyu, Kuczmarski Daniel, Higley Phyllis, Ishimaru Carol A, Arunakumari Alahari, Barletta Raul G, Vidaver Anne M. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and environmental microbiology*, 2002, 68(5): 2198-2208.
- [24] Li Guohong, Zhao Peiji, Shen Yuemao, Zhang KeQin. Antibacterial Activities of Neolignans Isolated from the Seed Endotheliums of *Trewia nudiflora*. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(9): 1122-1127.

- [25] Kang Qianjing, Zhao Peiji, He Hongping, Shen Yuemao. Cardenolides and cardiac aglycone from the stem bark of *Trewia nudiflora*. *Helvetica chimica acta*, 2005, 88(10): 2781-2787.
- [26] 王浩鑫, 滑桃树内生菌宏基因组文库的构建与 maytansinoids 生物合成基因簇的筛选. 中国科学院昆明植物研究所的博士学位论文 2007.
- [27] 焦军影, 植物相关微生物的富集方法及其多样性的分子特征. 中国科学院昆明植物研究所的硕士学位论文 2005.
- [28] Zhao Peiji, Zhao Na, Shen Yuemao. Identification of chemical constituents of the seed crusts from *Trewia nudiflora* L. *Chinese Journal Of Medicinal Chemistry*, 2004, 14(5): 287-290.
- [29] Nagata K, Hirai KI, Koyama J, Wada Y, Tamura T. Antimicrobial activity of novel furanonaphthoquinone analogs. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(3): 700-702.
- [30] Tsutomu Takegami, Eriko Simamura, Kei-Ichi Hirai, Junko Koyama. Inhibitory effect of furanonaphthoquinone derivatives on the replication of Japanese encephalitis virus. *Antiviral research*, 1998, 37(1): 37-45.
- [31] Hirai KI, Koyama J, Pan J, Simamura E, Shimada H, Yamori T, Sato S, Tagahara K, Tsuruo T. Furanonaphthoquinone analogs possessing preferential antitumor activity compared to normal cells. *Cancer detection and prevention*, 1999, 23(6): 539-50.

Chemical-genetics based screening for furanonaphthoquinone producing endophytic actinomycetes from seeds of *Trewia nudiflora*

Fang Li^{*}, Qianjin Kang, Xiaoling Yao, Yanyan Li, Maolong Wei, Yong Cao, Shuangjun Lin, Linqun Bai, Wei Ma^{*}, Zixin Deng

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, College of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] The seeds of *Trewia nudiflora* containing maytansine (an anticancer agent), was investigated to explore the endophytic actinomycetes diversity and screen for naphthoquinones producing strain. [Methods] The seeds of *Trewia nudiflora* were sliced and plated on different selective media after surface sterilization. Clones that looked like actinomycetes were selected, and classified according to the 16S rRNA sequences. Isolated strains were screened for furanonaphthoquinone biosynthesis gene by PCR, and tested for antibacterial and antifungal activity using *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Rhizoctonia solani* and *Gibberella fujikuroi*. LC-MS and NMR were used to determine the structure of candidate compounds. [Results] More than 100 endophytic bacteria were isolated. Among them 66 were streptomycetes. FNQ6 (polyketide synthase Type III) and FNQ21 (carboxymuconate cycloisomerase) were only detected in *Streptomyces* sp. HTZ 27. We got 5 mg pure furanonaphthoquinone (FNQI) from 1 liter *Streptomyces* sp. HTZ 27 agar fermentation medium. [Conclusion] The use of chemical-genetics method increased the efficiency of screening for target compound producing bacteria.

Keywords: seeds of *Trewia nudiflora*, endophytic actinomycetes, furanonaphthoquinone I (FNQ I), chemical genetics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Transgene Program (2009-ZX08009-056B, 2012ZX08011-002-004)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-21-34206722; E-mail: wma@sjtu.edu.cn

Received: 20 September 2011 / Revised: 25 December 2011