

随着微生物基因组序列信息的不断积累, 利用基因组挖掘技术发现新酶及新的生物合成基因簇, 进而发现新的天然产物, 已成为国内外研究的热点。本文对基因组挖掘研究进行了综述, 同时强调了影像质谱技术在基因组挖掘中的应用。

赵心清

基因组挖掘技术在海洋放线菌天然产物研究 开发中的应用及展望

陈亮宇 王玉梅 赵心清*

(大连理工大学 生命科学与技术学院 辽宁 大连 116023)

摘要: 利用微生物的基因组信息预测其合成特定天然产物的潜能, 进而进行新化合物分离纯化和结构鉴定的基因组挖掘技术, 已经成为国内外研究的热点, 并在多种细菌和真菌的天然产物发现中得到成功应用。本文综述了基因组挖掘技术的最新进展, 包括生物信息分析和结构预测、基因组指导的天然产物的发现、沉默基因的激活和异源表达技术等, 以及我国学者开发的转录组挖掘技术, 并重点综述了影像质谱技术在基因组挖掘中的应用。目前对海洋放线菌进行基因组挖掘的研究还比较少, 而基因组挖掘技术的发展, 将极大地促进对海洋放线菌天然产物的发现和鉴定。未来除了充分挖掘可培养微生物的基因组, 对未培养微生物宏基因组的挖掘将进一步深入。此外, 除了开发利用基因组中合成天然产物的结构基因和调节基因, 还应该充分开发利用其他不同的遗传元件, 包括不同转录活性和响应不同环境条件和信号的启动子, 以及具有调节作用的 RNA 等。

关键词: 海洋放线菌, 天然产物, 基因簇, 基因组挖掘, 影像质谱

Nature product discovery of marine actinobacteria by genome mining: strategies and prospects

CHEN Liang-Yu WANG Yu-Mei ZHAO Xin-Qing*

基金项目: 韩国 Next-Generation BioGreen 21295 项目(No. PJ0080932011)

*通讯作者: Tel: 86-411-84706319; 信箱: xqzhao@dlut.edu.cn

收稿日期: 2013-02-20; 接受日期: 2013-04-15

(School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: Genome mining of natural product biosynthesis employs genome sequences to predict the biosynthetic potential of the producer strains guiding the purification and structure elucidation of novel compounds, and has been successfully applied in natural product discovery in both bacterial and fungal systems. In this review, the latest advances of genome mining of marine actinobacteria have been summarized, with emphasis on bioinformatic tools for sequence analysis and prediction of chemical structures, strategies for isolation of targeted natural products under the guidance of genome sequence information, activation of silent gene clusters and heterologous expression, as well as transcriptome mining developed by domestic scholars. Genome mining based on imaging mass spectrometry (IMS) was addressed as well. Although genome mining of marine actinobacteria has not been fully explored, we believe that genome mining will greatly facilitate natural product research in the near future not only in culturable marine actinobacteria, but also in mining of metagenomes in yet unculturable actinobacteria. We also propose that genome mining is not restricted in the identification of new structural and regulatory genes, and it is also important to discover and utilize various other genetic elements, including promoters with different strengths and sequences that response to various environmental conditions and signals, as well as small regulator RNA molecules.

Keywords: Marine actinobacteria, Natural products, Gene cluster, Genome mining, Imaging mass spectrometry

海洋微生物是多种天然产物的重要来源。由于海洋环境的特殊性和深海取样的局限性,很多海洋来源的微生物及其天然产物至今仍未被人们广泛研究,正吸引越来越多的研究者^[1-3]。海洋放线菌是主要的活性天然产物生产菌,可产生具有抗细菌、抗真菌及免疫抑制活性等多种活性的物质^[4]。

传统的基于活性筛选的天然产物研究正遇到越来越多的挑战。由于在开始分离纯化前无法预测化合物结构的新颖性,活性追踪结果可能发现已经报道的化合物;此外,一些活性分析难以实现高通量筛选,或者由于活性化合物产量较低或根本不产生,导致没有足够的化合物可用于活性检测。另外,有些微生物在实验室环境下生长缓慢,或者在现有条件下无法培养。因此,迫切需要发展新的策略以充分开发海洋微生物的合成潜力。

随着分子生物学技术在天然产物研究中的广泛应用,利用生物合成基因信息研究天然产物的生物合成受到普遍重视。很多微生物合成天然产物的基因在基因组上聚集成簇存在,被称为基因簇(Gene cluster)。在基因组信息尚没有被广泛应用和研究之前,常使用基因筛选方法分析微生物合成某些天然产物潜能,即分析某生物合成关键酶的保守区域,并设计兼并引物,进而通过 PCR 扩增,寻找阳性菌株,并获得特异酶基因的序列,该序列可作为探针,筛选阳性菌株的基因组文库,从而找到化合物生物合成基因簇^[5-9]。利用这种基因筛选的方法,已经成功获得含有卤代酶修饰的天然卤代产物^[5],以及含有糖基化修饰的天然产物^[6,8]和含有环氧化酶的聚醚类天然产物^[9]等。但基因筛选方法存在的问题是:引物设计依赖现有的酶基因,限制了对新酶基因和新天然产物的发现;

需要与基因组文库相结合进行基因簇的分离和生物合成途径分析;目标酶基因可能只存在于有限种类的菌株中,限制了筛选效率等。

在基因筛选基础上,基因组扫描(Genome scanning)对基因组片段化后建立的基因组文库进行测序,发现天然产物生物合成基因簇,进而通过优化培养基等方法,成功发现了多种微生物天然产物^[10]。基因组扫描对全基因组序列进行测定和分析,可以看作基因组挖掘的早期工作。随着高通量基因组测序技术的发展和测序价格的降低,越来越多的基因组信息被获得和公开。根据在线基因组数据库 GOLD (Genomes OnLine Database)^[11] 2013年2月1日的更新信息,目前已经测序完成的基因组有4 126个,其中细菌的基因组有3 762个,链霉菌属的登录基因组有130个(<http://www.genomesonline.org>)。对已知模式菌种的基因组序列分析发现,微生物基因组中存在多达30个以上可能合成小分子化合物的基因簇,合成天然产物的能力远远超出人们的预期。很多海量的微生物基因组信息可以公开获得,而且由于微生物基因组较小,测序速度和测序价格更容易被接受,因此近年来基于微生物基因组信息的天然产物挖掘技术迅速发展起来。利用基因组序列信息进行微生物天然产物的快速发现和活性检测,已经成为国内外研究的热点^[12-20]。

本文综述了基因组挖掘技术的最新进展,以及其在微生物天然产物研究中的应用,并展望了基因组挖掘技术在海洋放线菌天然产物研究中的应用前景。

1 基因组挖掘方法

基因组挖掘(Genome mining)是指通过分析基因组序列中特定酶及基因簇的保守区序列,进而预测酶的功能及基因簇编码产物的结构,

并指导新酶发现及新天然产物分离鉴定的过程。基因组挖掘的过程见图1,主要步骤首先为生物信息分析和结构预测,其次是根据预测的结构信息寻找化合物,如果化合物表达量较低或基因不表达,需要通过各种方法激活基因的表达,并寻找化合物,鉴定结构。

1.1 生物信息分析与结构预测

通过与多种数据库中已知酶的保守序列及空间结构等进行比较,可推测酶催化反应种类、底物特异性、以及多酶催化代谢途径终产物的特定官能团、极性、分子量、紫外吸收等信息,因此可指导对天然产物的分离和纯化。

基因功能及化合物的结构预测可以通过使用BLAST来实现,通过蛋白质的氨基酸序列相似性判断酶的可能功能。聚酮类化合物和非核糖体多肽类化合物由聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)和非核糖体多肽合成酶(Non-ribosomal peptide synthase, NRPS)两类模块化的巨型酶催化合成,人们在酶的底物识别、分子组装及产物释放等方面发现了一定规律,可用于进行化合物结构的预测,因此这两类化合物及聚酮类-非核糖体多肽杂合型化合物的研究较多,包括antiSMASH和NP_Searcher等^[21-22]。新开发的预测工具包括NRPSpredictor2和NRPSp等^[23-24],都可以用来预测非核糖体多肽类基因簇的产物,其他的聚酮类和非核糖体多肽类抗生素的预测软件见参考文献[18]。不同软件预测出的产物可能不同,而且由于酶功能的特异性和酶的空间结构与活性的关系等知识有限,化合物结构的预测不总是正确的^[12],因此准确的基因功能注释、化合物结构预测都需要开发更多先进的生物信息分析工具。

自从2000年非核糖体多肽类化合物Coelichelin通过基因组挖掘被发现后^[25],基因组挖掘研究在多种微生物中陆续展开。生二素

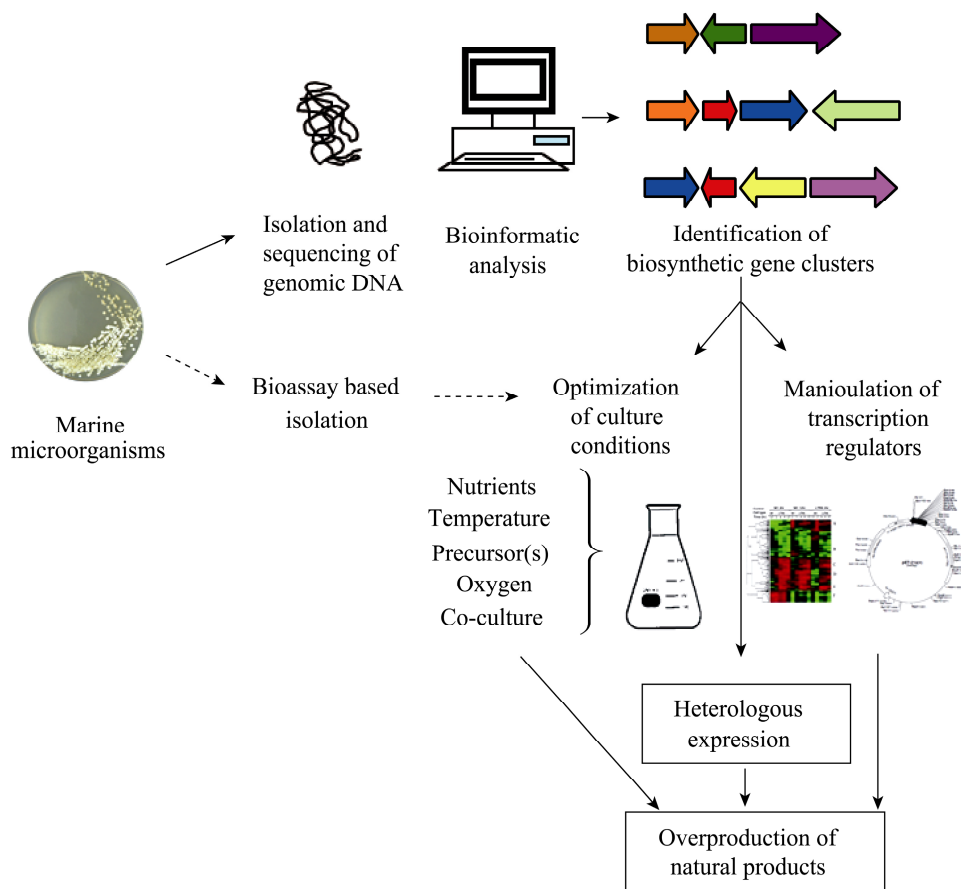


图 1 利用基因组挖掘发现新化合物的技术路线^[46]

Fig. 1 Scheme of novel compound discovery using genome mining^[46]

注: 虚线表示传统的以活性追踪为基础的天然产物研究流程.

Note: Dotted lines indicate the traditional natural product discovery pipeline using activity-based screening.

链霉菌 *S. ambofaciens* 的基因组挖掘发现了具有抗肿瘤活性的大环内酯类抗生素 Stambomycin, 该基因簇长达 150 kb。由于该基因簇在实验条件下不表达, 研究者通过过量表达 LuxR 家族调节蛋白实现了基因簇的激活。同时也发现, 生物信息分析预测的结构不准确, Stambomycin 生物合成存在新的分子机制, 如 Hexyl/Hepylmalonyl-CoA 延伸单位的添加机制, 聚酮链羟基化机制等^[26]。

磷酸糖脂类抗生素 Moenomycin 含有非常复杂的糖侧链, 利用基因组文库筛选没有获得完整的基因簇, 通过基因组序列分析发现, 合

成该抗生素的所有基因分为两部分存在于染色体上, 两部分距离远达 1 Mb, 这解释了之前利用保守序列设计引物虽然找到了 3 个相关的生物合成基因, 但其两侧没有找到其他相关的基因。同时发现, 合成该抗生素的核苷糖和类异戊二烯都来自初级代谢, 因此 Moenomycin 基因簇远远小于其他类似的含 4 个糖亚单位的抗生素生物合成基因簇。Moenomycin 基因簇的发现表明, 传统的文库筛选可能无法解决某些基因簇分散于染色体不同位置的问题, 而基因组序列分析可快速获得完整基因簇的信息^[27]。

其他通过基因组挖掘发现的链霉菌天然产

物包括 Holomycin、Pyridomycin、Chaxamycins A-D 等^[17-19], 但目前海洋放线菌基因组挖掘的例子还不多。第一个通过基因组挖掘鉴定的海洋放线菌来源的化合物是从 *Salinispora tropica* 来的多烯大环内酰胺化合物 Salinilactam A^[28]。该化合物基因簇长约 80 kb, 根据多烯类化合物特有的紫外吸收图谱分离得到了 Salinilactam A, 该化合物结构的发现也促进了基因组序列中 PKS 基因重复序列的正确组装。在后续的研究中, 在菌株 *S. pacifica* 基因组中找到了类似 Salinosporamide A 的削短的生物合成基因簇, 但其中缺少卤化前体的生物合成基因, 根据这个信息, 研究者找到了含有 Salinosporamide A 类似紫外吸收的新化合物 Slinosporamide K, 并证明了这个化合物的确缺少 C-2 位的卤代^[29]。挪威学者对一株海洋诺卡氏菌进行了基因组测序, 分离了含硫多肽类抗生素 TP-1161 的基因簇, 并尝试了该基因簇在天蓝链霉菌中的异源表达, 但没有成功^[30]。由于一些海洋放线菌需要特殊营养条件(如高盐度等)才能生长, 为后续天然产物的发酵生产带来困难, 因此研究在其他宿主中表达海洋放线菌天然产物基因簇具有重要意义。

值得指出的是, 由于一些化合物可能对温度、光敏感等, 或者可溶性低、表达量少, 此外还可能在发酵很早期产生(如 Thailandamide A^[31]), 通过基因组挖掘预测其可能结构和性质后, 可很好地指导后续的分选纯化, 有助于发现传统手段无法发现的化合物。图 2 为通过基因组挖掘发现的放线菌来源天然产物。

1.2 寻找基因簇表达产物的方法

由于生物信息分析很难百分之百准确地预测化合物的结构, 最终的产物结构鉴定也需要基因簇的表达。获得可能的合成产物的信息后, 如果感兴趣的基因或基因簇处于表达状态, 可

通过优化培养条件获得产物, 也可以利用基因组同位素(Genomisotope)方法, 使用稳定同位素喂饲检测标记的分子来确定化合物^[32]。但很多基因簇往往表达活性很低, 甚至不表达, 通过操作转录调节基因等手段可激活生物合成基因的表达^[12-13]。目标产物则可以通过对突变体的比较代谢物分析(Comparative metabolic profiling)追踪。此外, 在遗传背景清晰、遗传操作容易的模式菌种中进行异源表达(Heterologous expression), 也是最近研究较多的有效手段。

1.2.1 培养条件优化: 有些代谢物的合成需要特殊的营养条件或只在特定胁迫环境下产生, 这些化合物合成的激活需要模仿特殊的营养、环境和生物条件, 如特殊的碳氮源、高温、紫外线照射、渗透胁迫, 或者和其他生物菌株共培养等。如链霉菌 *S. venezuelae* 生产 Jadomycin B 需要高温热击诱导, 链霉素等多种抗生素的合成需要小分子信号分子 A-factor 等^[33]。海洋放线菌的生长可能需要一定的盐度、较高的 pH 等, 例如本实验室分离的一些海洋放线菌可以在高达 pH 为 11 的培养基中生长, 在优化培养条件的时候需要海洋放线菌的这些特殊培养条件。

1.2.2 操纵调节基因: 过表达转录激活基因是最常用的激活手段。生二素链霉菌 *S. ambofaciens* 中 Stambomycin 的发现是通过过量表达 LuxR 家族调节蛋白实现的, 虽然 Stambomycin 生物合成基因簇中含有双组分系统基因也是可能的调节基因, 但同样将这两个基因置于强启动子调节下整合入生产菌染色体, 没有发现可激活 Stambomycin 的合成, 表明 LuxR 家族调节蛋白表达的沉默是调节的关键。数据库搜索表明, LuxR 家族调节蛋白基因广泛存在于多种链霉菌抗生素生物合成基因簇中, 表明其他沉默基因的表达也可以通过类似的策略实现^[26]。

敲除转录抑制蛋白同样可达到激活某些化

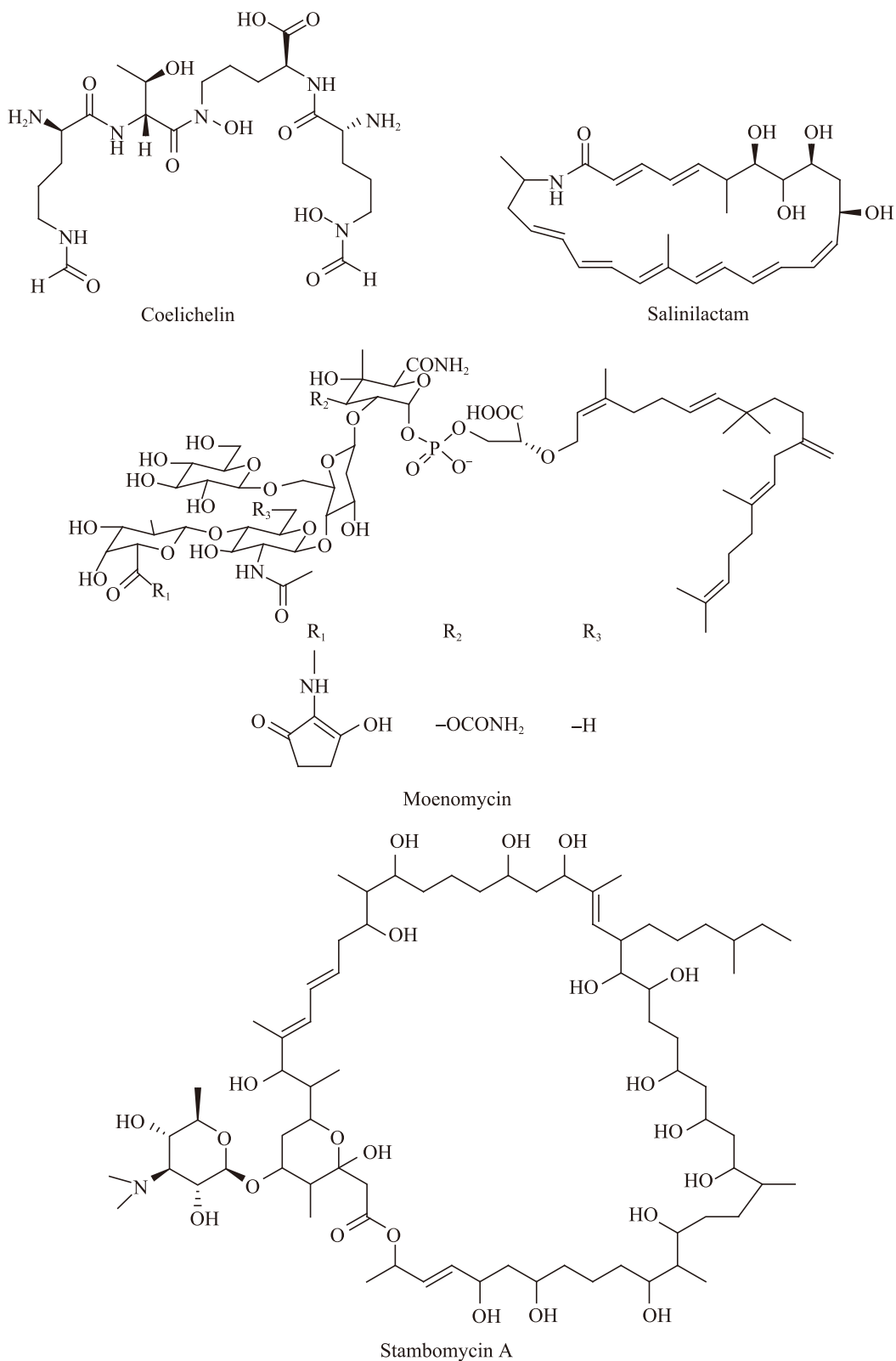


图 2 利用基因组挖掘发现的放线菌来源的部分抗生素^[25-28]
 Fig. 2 Selected actinobacteria-derived antibiotics discovered by genome mining^[25-28]

合物表达的目的。如生二素链霉菌 *S. ambifaciens* 中存在醌那霉素(Kinamycin)家族抗生素生物合成基因簇。敲除 TetR 家族转录抑制蛋白 AlpW 编码基因可导致醌那霉素类抗生素的合成^[34]。

1.2.3 异源表达: 异源表达是获得活性天然产物基因簇产物的有效手段。某些海洋微生物生长缓慢, 或者无法在现有技术条件下得到纯培养物, 有的菌种发酵条件苛刻(如需要高盐才能生长等), 有的微生物遗传操作方法不完善或效率很低等。其生物合成基因簇产物可通过异源表达方法得到挖掘。例如, 吩嗪类化合物具有抗菌、抗肿瘤和抗疟等多种活性。唐德链霉菌 *S. tendae* 含有吩嗪化合物生物合成基因簇, 但无法检测到该化合物的产生。Saleh 等将该基因簇在天蓝链霉菌 *S. coelicolor* M512 中进行表达, 通过在关键基因前加入红霉素抗性基因强启动子, 成功分离到了吩嗪化合物^[35]。

目前放线菌基因簇异源表达常用的宿主菌为大肠杆菌、天蓝链霉菌和白色链霉菌等^[36], 存在的问题是, 同样的基因簇在不同宿主中表达量往往不同, 在不同菌种中的表达效率相差可能很大, 而且宿主的选择目前尚无规律可循, 缺乏定向选择合适宿主的方法。此外, 由于一些抗生素基因簇可长达 100 kb, 大片段的遗传操作也相对困难。开发更多的放线菌基因簇异源表达宿主, 探讨不同宿主表达不同抗生素效率的分子机理, 对异源表达宿主和异源表达载体的优化, 有助于提高天然产物基因簇的表达效率。

其他寻找基因簇产物的方法还包括敲除关键生物合成基因, 并比较代谢物的产生, 寻找缺失的化合物, 从而确定基因簇产物^[12], 但前提是基因簇在生产菌中是处于表达状态的。对于沉默的基因簇, 也可利用其他激活的手段, 例如核糖体工程技术利用自发产生的抗生素抗性突变

体激活沉默基因或提高次生代谢物基因的表达, 已经在多种放线菌中得到成功应用^[37-38]。然而, 核糖体工程的缺点是随机性强、工作量较大, 而且受到微生物自身抗性的局限性。随着对抗生素生物合成调节机制的深入认识, 未来将开发更多的定向激活手段。

1.3 转录组挖掘技术

基因组挖掘技术是对所有可能的基因簇的产物进行分析, 但不能确定这些产物在什么条件下能够产生。转录组挖掘技术通过在不同培养基上细胞的转录组分析, 确定在某种培养基和某个时间点基因簇的转录情况, 为发现化合物提供更直接的信息。如在对 *S. flaveolus* DSM 9954 的研究中, 研究者将产物最多的 V 培养基中各种代谢物产生最多的时间, 第 4 天的 mRNA 样品进行反转录, 将所得到的 cDNA 使用各种简并引物进行筛选, 发现了 Sanglifehrins 的生物合成基因, 同时也发现了新的聚酮合酶和非核糖体多肽基因。利用简并引物进行基因筛选没有发现这些新基因, 显示了转录组挖掘富集了所发现的新的聚酮合酶和非核糖体多肽基因, 表明转录组挖掘的第一个优点是可有助于发现特定条件下表达的基因。同时, 通过对这些新基因的敲除, 并与野生型比较, 找到了安莎霉素家族类的 Mycotrienin 类抗生素, 并进一步找到了其生物合成基因簇, 显示了转录组挖掘的第二个优点是有助于发现具有转录活性的与未知天然产物相关的生物合成途径^[39]。转录组挖掘与基因组挖掘相结合, 有助于对沉默的基因簇进行激活的相关分析, 为利用基因组挖掘发现天然产物提供了新的有力工具。

2 影像质谱技术在基因组挖掘中的应用

质谱不仅可提供分子量信息, 也可以对样

品表面不同位置进行质谱分析,从而利用得到的数据,构建一个特殊的空间维度。每种离子的强度值可以在样品区域被突出出来,通过代表每种离子的颜色的强弱来表现,以形成一幅影像,称为影像质谱(Imaging mass spectrometry, IMS)。这种影像不仅能显示离子的空间分布,还能显示离子的相对强度。以此为基础进行的质谱分析,可揭示化合物生产的空间和时间信息,因此近年来成为研究天然产物的有力工具^[40]。影像质谱技术的优越性在于可研究微生物相互作用过程中产生的天然产物,因为某些产物只在不同微生物共培养时产生,而在单独培养时不产生。近两年来,影像质谱也成为基因组挖掘的重要技术。

2.1 影像质谱方法原理

影像质谱的工作流程总共有三个主要步骤^[40]。

第一步是样品准备。MALDI (Matrix assisted laser desorption ionization)使用胶体涂层或有机基质以支持分析物的离子化与解析,而其他技术,包括 SIMS (Secondary ion mass spectrometry)和 DESI (Desorption electrospray ionization),需要很少或没有样品准备步骤。

第二步是数据获取。准备好的样品平台被移入一个定义好的几何形状中,质谱的离子化探头(Ionizer probe)可离子化感兴趣的区域以得到用来产生图像的数据。当离子从样品表面溢出进入质谱,质谱分析仪(离子阱, TOF, ICR, ORBI)和检测器记录下分析物的质荷比(m/z)。依据样品中的物质浓度,离子有不同相对分布。

第三步是数据分析。数据分析和质谱可视化软件包括免费软件 MITICS 和 BioMap, 以及质谱仪器制造商的软件如 Bruker 的 FlexImaging 和 Thermo Scientific 的 ImageQuest。通常,质谱被记录为 x 轴显示 m/z , y 轴显示相对离子强度。然而影像质谱中,一种感兴趣的离子被以一种

特殊颜色图像放置于被测样品照片顶层的方式展现,一个离子在质谱中强度越强,在 2D 图像中的颜色也就越强。

较常使用的 MALDI 技术在微生物样品上应用的流程举例如图 3 所示,需要在预制的载体平板上加上培养基进行微生物培养,加上基质离子化样品表面以后,再以离子探头进行数据的捕获;根据基因组挖掘等获得的信息进行分析后,选取感兴趣的质谱峰进行标注,使用软件调出数据重建 2D 离子浓度分布图。

2.2 影像质谱在基因组挖掘中的应用

影像质谱技术对于已知菌株间利用天然产物进行相互作用的机制研究有着快捷便利化及可视化的作用。如使用共培养 *Bacillus subtilis* 3610 和天蓝链霉菌 *S. coelicolor* A3(2)这两株研究较多的菌株,运用 MALDI 技术对两个菌株对峙生长中不同时期进行监测,发现在存在 Bacillaene (两者共培养时 *B. subtilis* 才产生的杂合聚酮-非核糖体多肽)时, *S. coelicolor* 无法产生 Prodiginines,而当敲除 Bacillaene 合成基因簇后再共培养,Prodiginines 即可被诱导产生。同时, *B. subtilis* 产生的 Surfactin 通过 MALDI 表明被扩散在整个培养界面中,而且结合敲除实验,被证实能够抑制 SapB (菌丝及孢子形成所需羊毛硫氨酸桥接多肽)以及 CDA (被诱导生产的抗革兰氏阳性菌抗生素)的产生。通过这种研究微生物间的利用天然产物的相互交流,证明了微生物产生的天然产物不但能杀死或改变微生物的生理形态,还能够沉默临近群落的防御机制^[41]。这个例子还说明,可以使用影像质谱挖掘微生物相互作用时才产生的化合物,对抗菌化合物的研究开发尤其适用。

对影像质谱的灵活利用还可以被用来研究化合物的代谢合成机制。利用金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和表皮葡萄球菌 *S. epi-*

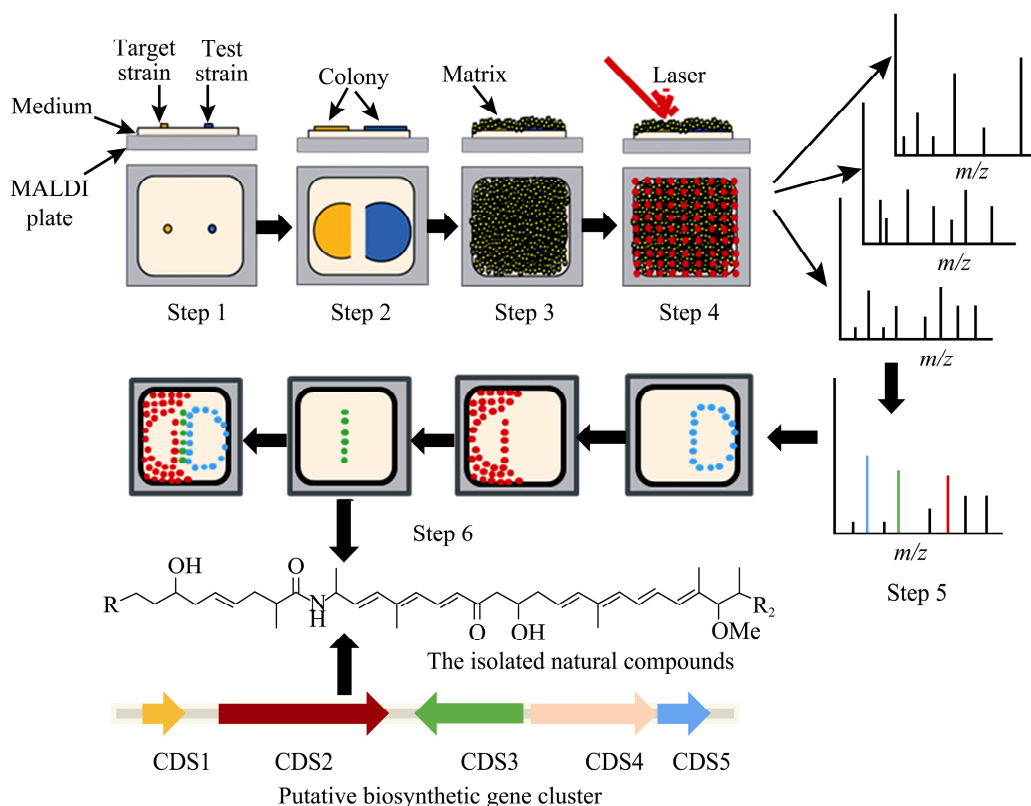


图3 利用影像质谱技术研究开发微生物天然产物

Fig. 3 Discovery of microbial natural products using Imaging Mass Spectrometry (IMS) technology

注: 步骤 1: 在 MALDI 的载体平板上加上固体培养基, 接种目标菌株与测试菌株; 步骤 2: 两个菌株培养后, 形成对峙菌落; 步骤 3: 在表面均匀铺上基质; 步骤 4: 使用激光或类似离子化探头得到飞行离子; 步骤 5: 将得到的质谱信息进行筛选, 得到感兴趣的离子峰; 步骤 6: 将离子峰按照浓度分布制成可视化 2D 图; 最后将感兴趣物质分离纯化, 并与基因组信息进行比对。

Note: Step 1: Place medium on the MALDI support plate, and inoculate the target strain and the test strain; Step 2: Culture the two strains to form colonies; Step 3: Overlay the matrix on the surface equally; Step 4: Using laser or other kinds of ionizer probes to obtain flying ions; Step 5: Screen the obtained MS information to target the interesting ion peaks; Step 6: Transform the ion peak information to 2D map based on the concentration distribution; Isolate the interesting compounds and match the genome information.

dermidis 与链霉菌菌株 *S. roseosporus* NRRL 15998 共培养, 使用 MALDI 技术对不同时期的代谢物的产生及分布进行了监测, 发现其产生的抗生素达托霉素在 48 h 时才产生, 而在 36 h 时发现了达托霉素产生的前体物质, 从而弥补了达托霉素合成途径的空白^[42]。因此, 影像质谱还可用于研究生物合成不同阶段中间产物的产生。在此研究中使用了基于质谱的基因组挖掘

技术^[43], 称为天然产物多肽基因组 (Natural product peptidogenomics, NPP), 即利用 MALDI-TOF 质谱分析菌种或提取物寻找未知分子量 (1 500–5 000 Da 为研究较少的范围), 并通过凝胶层析富集找到的多肽, 通过 MSⁿ 分析 NPP 序列标签, 并在基因组中寻找相对应的基因。利用这种方法, 在已经全基因组测序后的菌株 *S. hygroscopicus* ATCC 53653 中找到了共计

14 个新的肽类化合物, 并通过基因组挖掘比对, 找到了与之配对的核糖体或非核糖体多肽合成基因序列。

影像质谱技术由于其快速而可视化, 可以被便捷地应用于微生物相互作用机制和基因组指导的天然产物的分离鉴定, 以及代谢机制分析, 甚至是未知微生物的相关信息。该技术对庞大的基因组信息量下的复杂代谢产物的研究分析起到了极大的推动作用。

本课题组对大连地区不同海域的海洋放线菌进行了研究^[44], 分离自星海湾深度 10 m 左右的海泥样品中的星海链霉菌鉴定为海洋放线菌新种^[45], 并对星海放线菌 S187 和硫磺链霉菌 L180 进行了基因组序列测定和分析^[46-47]。我们最近对星海链霉菌和其他几株海洋链霉菌进行了影像质谱研究, 结合基因组信息分析, 发现了海洋链霉菌中可能产生多烯类化合物的菌株(未发表结果)。对星海链霉菌的基因组分析结果表明, 一个糖肽类化合物的基因簇与具有抗补体活性的化合物具有较高的相似性, 因此对星海链霉菌发酵液的抗补体活性进行了测定, 发现了星海链霉菌可产生多种具有抗补体活性的物质, 其对经典途径和旁路途径都具有良好的抑制作用(未发表结果)。具有抗补体活性的物质由于其对自身免疫及炎症等疾病治疗中的作用, 日益引起国内外学者的重视^[48-50], 我国复旦大学药学院在植物多糖抗补体活性物质研究中取得了很多成果^[50], 但微生物来源的小分子抗补体活性物质在国内目前还没有相关的研究报告。我们的初步研究结果表明, 基因组挖掘可有助于研究开发海洋链霉菌具有多种新颖活性的天然产物。

3 展望

基因组挖掘将在海洋放线菌天然产物研究

中发挥越来越巨大的作用。未来努力的方向包括开发更强大的生物信息分析软件, 建立完备的化合物结构信息库, 便于化合物结构的预测, 以及对除了聚酮类和非核糖体抗生素类抗生素以外其他种类天然产物的结构预测, 以及对稀有放线菌特有生物合成基因的挖掘。

目前的基因组挖掘研究多注重生物合成基因和调节基因, 但对基因间隔区和启动子序列挖掘较少。而目前放线菌基因表达元件中启动子的种类较少, 只有红霉素抗性基因启动子被普遍使用, 缺少不同活性的启动子^[51], 以及响应不同环境条件和不同化学物理信号的诱导型启动子的研究。由于天然产物生物合成途径的调控需要不同酶基因的协调控制, 而不是各个基因最强表达是最佳的, 对海洋放线菌中启动子元件的挖掘, 将促进放线菌合成生物学的发展, 提供更多的元件构建高效生物合成途径。

非编码小 RNA 是具有调节作用的 RNA 分子, 在模式菌种天蓝链霉菌中发现了在不同生长阶段持续表达的小 RNA 和只在特定发育时期表达的 RNA, 并发现这些小 RNA 可调节形态分化、抗生素合成及胞外琼脂酶基因 *dagA* 的表达等^[52-53], 但目前对其他放线菌的小 RNA 研究还很少, 对这些具有调节作用的小 RNA 进行挖掘, 将为抗生素生物合成的合成生物学研究提供更多的遗传调控元件。

由于绝大多数微生物是不可培养的, 单细胞基因组技术有助于研究特定环境下微生物群体中不可培养的微生物, 或者含量较少的微生物的基因组挖掘^[54]。对海洋共附生微生物和海泥宏基因组的研究, 已经发现了很多有价值的酶和生物合成基因^[55]。可以预见, 海洋放线菌的基因组挖掘将能够充分开发海洋放线菌的生物合成潜能, 发现更多的活性产物用于医疗、农药、环境保护等领域。

参 考 文 献

- [1] Gulder TA, Moore BS. Chasing the treasures of the sea-bacterial marine natural products[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12(3): 252–260.
- [2] Lane AL, Moore BS. A sea of biosynthesis: marine natural products meet the molecular age[J]. *Natural Product Reports*, 2011, 28(2): 411–428.
- [3] Imhoff JF, Labes A, Wiese J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(5): 468–482.
- [4] Zotchev SB. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 158(4): 168–175.
- [5] Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski A, et al. A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources[J]. *ChemBioChem*, 2007, 8(7): 757–766.
- [6] Chen F, Lin L, Wang L, et al. Distribution of dTDP-glucose-4,6-dehydratase gene and diversity of potential glycosylated natural products in marine sediment-derived bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(4): 1347–1359.
- [7] Bayer K, Scheuermayer M, Fieseler L, et al. Genomic mining for novel FADH₂-dependent halogenases in marine sponge-associated microbial consortia[J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(1): 63–72.
- [8] Luzhetskyy A, Weiss H, Charge A, et al. A strategy for cloning glycosyltransferase genes involved in natural product biosynthesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(6): 1367–1375.
- [9] Wang H, Liu N, Xi L, et al. Genetic screening strategy for rapid access to polyether ionophore producers and products in actinomycetes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10): 3433–3442.
- [10] Zazopoulos E, Huang K, Staffa A, et al. A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(2): 187–190.
- [11] Pagani I, Liolios K, Jansson J. The Genomes OnLine Database (GOLD) v.4: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(1): 571–579.
- [12] Challis GL. Genome mining for novel natural product discovery[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51(9): 2618–2628.
- [13] Zerikly M, Challis GL. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining[J]. *ChemBioChem*, 2009, 10(4): 625–633.
- [14] McAlpine JB. Advances in the understanding and use of the genomic base of microbial secondary metabolite biosynthesis for the discovery of new natural products[J]. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(3): 566–572.
- [15] Zhao XQ. Genome-based studies of marine microorganisms to maximize the diversity of natural products discovery for medical treatments[J]. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: Article ID 384572.
- [16] Nett M, Ikeda H, Moore BS. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes[J]. *Natural Product Reports*, 2009, 26(11): 1362–1384.
- [17] Winter JM, Behnken S, Hertweck C. Genomics-inspired discovery of natural products[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, 15(1): 22–31.
- [18] Nikolouli K, Mossialos D. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(8): 1393–1403.
- [19] Scheffler RJ, Colmer S, Tynan H, et al. Antimicrobials, drug discovery, and genome mining[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(3): 969–978.
- [20] 何庆, 李青连, 王丽非, 等. 基于微生物基因组的新型天然产物发现策略[J]. *国际药学研究杂志*, 2012, 39(1): 1–7.
- [21] Li MH, Ung PM, Zaikowski J, et al. Automated genome mining for natural products[J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10: 185.
- [22] Medema MH, Blin K, Cimermanic P, et al. An-

- tiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(2): 339–346.
- [23] Röttig M, Medema MH, Blin K, et al. NRPSpredictor2 — a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(2): 362–367.
- [24] Prieto C, García-Estrada C, Lorenzana D, et al. NRPSp: non-ribosomal peptide synthase substrate predictor[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(3): 426–427.
- [25] Challis GL, Ravel J. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 187(2): 111–114.
- [26] Laureti L, Song L, Huang S, et al. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(15): 6258–6263.
- [27] Ostash B, Saghatelian A, Walker S. A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A[J]. *Chemistry and Biology*, 2007, 14(3): 257–267.
- [28] Udvary DW, Zeigler L, Asolkar RN, et al. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(25): 10376–10381.
- [29] Eustáquio AS, Nam SJ, Penn K, et al. The Discovery of salinosporamide K from the marine bacterium “*Salinispora pacifica*” by genome mining gives insight into pathway evolution[J]. *ChemBioChem*, 2011, 12(1): 61–64.
- [30] Engelhardt K, Degnes KF, Zotchev SB. Isolation and characterization of the gene cluster for biosynthesis of the thiopeptide antibiotic TP-1161[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(21): 7093–101.
- [31] Nguyen T, Ishida K, Jenke-Kodama H, et al. Exploiting the mosaic structure of transacyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(2): 225–233.
- [32] Gross H, Stockwell VO, Henkels MD, et al. The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters[J]. *Chemistry and Biology*, 2007, 14(1): 53–63.
- [33] Scherlach K, Hertweck C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms[J]. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2009, 7(9): 1753–1760.
- [34] Bunet R, Song L, Mendes MV, et al. Characterization and manipulation of the pathway-specific late regulator AlpW reveals *Streptomyces ambofaciens* as a new producer of Kinamycins[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(5): 1142–1153.
- [35] Saleh O, Bonitz T, Flinspach K, et al. Activation of a silent phenazine biosynthetic gene cluster reveals a novel natural product and a new resistance mechanism against phenazines[J]. *Medicinal Chemistry Communications*, 2012, 3(8): 1009–1019.
- [36] Zhang H, Boghigian BA, Armando J, et al. Methods and options for the heterologous production of complex natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2011, 28(1): 125–151.
- [37] Ochi K, Hosaka T. New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(1): 87–98.
- [38] Liu Z, Zhao XQ, Bai FW. Production of xylanase by an alkaline-tolerant marine-derived *Streptomyces viridochromogenes* strain and improvement by ribosome engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, DOI: 10.1007/s00253-012-4290-y.
- [39] Qu X, Lei C, Liu W. Transcriptome mining of active biosynthetic pathways and their associated products in *Streptomyces flaveolus*[J]. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 2011, 50(41): 9651–9654.
- [40] Esquenazi E, Yang YL, Watrous J, et al. Imaging mass spectrometry of natural products[J]. *Natural*

- Product Reports, 2009, 26(12): 1521–1534.
- [41] Yang YL, Xu Y, Dorrestein PC. Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry[J]. Nature Chemistry and Biology, 2009, 5(12): 885–887.
- [42] Liu WT, Kersten RD, Yang YL, et al. Imaging mass spectrometry and genome mining via short sequence tagging identified the anti-infective agent arylomycin in *Streptomyces roseosporus*[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(45): 18010–1813.
- [43] Kersten RD, Yang YL, Xu Y, et al. A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics[J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7(11): 794–802.
- [44] Zhao XQ, Jiao WC, Jiang B, et al. Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: Investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides[J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2009, 25(5): 859–866.
- [45] Zhao XQ, Li WJ, Jiao WC, et al. *Streptomyces xinghaiensis* sp. nov., a new marine actinomycete derived from a marine sediment sample[J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2009, 59(11): 2870–2874.
- [46] Zhao XQ, Yang TH. Draft genome sequence of the marine derived actinomycete *Streptomyces xinghaiensis* NRRL B24674T[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(19): 5543.
- [47] Zhao XQ, Geng X, Chen C, et al. Draft genome sequence of the marine actinomycete *Streptomyces sulphureus* L180, isolated from marine sediment[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(16): 4482.
- [48] Qu H, Ricklin D, Lambris JD. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors[J]. Molecular Immunology, 2009, 47(2/3): 185–195.
- [49] Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2010, 9(1): 43–56.
- [50] Zhu H, Di H, Zhang Y, et al. A protein-bound polysaccharide from the stem bark of *Eucommia ulmoides* and its anti-complementary effect[J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(11): 1319–1324.
- [51] Wang W, Li X, Wang J, et al. An engineered strong promoter for streptomycetes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(14): 4484–4492.
- [52] Vockenhuber MP, Sharma CM, Statt MG, et al. Deep sequencing-based identification of small non-coding RNAs in *Streptomyces coelicolor*[J]. RNA Biology, 2011, 8(3): 468–477.
- [53] Vockenhuber MP, Suess B. *Streptomyces coelicolor* sRNA scr5239 inhibits agarase expression by direct base pairing to the dagA coding region[J]. Microbiology, 2011, 158(2): 424–435.
- [54] Grindberg RV, Ishoey T, Brinza D, et al. Single cell genome amplification accelerates identification of the apratoxin biosynthetic pathway from a complex microbial assemblage[J]. PLoS One, 2011, 6(4): 18565.
- [55] Sahl G, Matsunaga S, Piel J. Metagenome mining reveals polytheonamides as posttranslationally modified ribosomal peptides[J]. Science, 2012, 338(6105): 387–390.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名，造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱，这大大影响了本刊在国际上的传播，也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论，以及主办单位批准，本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”，缩写为“Microbiol. China”，请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。