

西藏米拉山草甸土壤 PKS 和 NRPS 基因多样性

罗坤^{1, 2}, 杜桂萍¹, 赵志祥^{1, 2}, 谢丙炎², 黎定军^{1, 3*}

(1.湖南农业大学 生物安全科学技术学院,湖南 长沙 410128 ;2.中国农业科学院 蔬菜花卉研究所,北京 100081 ;
3.湖南广播电视大学,湖南 长沙 410004)

摘要: 为了解西藏米拉山草甸土壤中的聚酮合成酶(PKS)基因和非核糖体多肽合成酶 (NRPS)基因多样性,采用直接提取土壤总 DNA,PCR 扩增 I 型 PKS 基因 KS 域和 NRPS 基因 A 域,并在 NCBI 进行 Blast 比对,分析其系统进化发育.得到 27 个 PKS 基因 KS 片段,经 NCBI 比对,主要来自蓝细菌(Cyanobacteria)、 α -和 γ -变形菌(Proteobacteria)和不能培养的微生物,得到 NRPS A 片段 32 个,主要属于变形菌门、蓝细菌门等.

关键词: 聚酮合成酶;非核糖体多肽合成酶;土壤;西藏米拉山草甸

中图分类号: Q781 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)05-0506-06

Phylogentic analysis of type I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes from Mila Mountain in Tibet plateau

LUO Kun^{1,2}, DU Gui-ping¹, ZHAO Zhi-xiang^{1,2}, XIE Bing-yan², LI Ding-jun^{1,3*}

(1.College of Bio-Safety Science and Technology, HNAU, Changsha, 410128, China; 2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China; 3. Hunan Radio and TV University, Changsha, 410004, China)

Abstract: The modular polyketide synthase(PKS) and nonribosomal peptide synthetase(NRPS) were found to be involved in natural product synthesis in many microorganisms. Study on their diversities in natural environment may provide important ecological insights besides opportunities for antibacterial drugs development. The phylogenetic analysis of amino acid(AA) sequences indicated that the identified ketosynthase(KS) domains were clustered with those from diverse bacterial groups, including Cyanobacteria, Proteobacteria and some uncultured symbiotic bacteria. The NRPS included Cyanobacteria and Proteobacteria. One new branch belonging to hybrid PKS/NRPS enzyme complexes and five independent clades were found on the phylogenetic tree. These results revealed the great diversity and novelty of both PKS and NRPS genes from Mila Mountain in Tibetan Plateau.

Key words: polyketide synthase; nonribosomal peptide synthetase; soil; meadows of Mila Mountain in Tibet

土壤是微生物最大的栖息地,据估计每克干土 10% 可以培养^[1]. 传统的培养单菌的方法筛选功能
中有 1 000~10 000 个微生物细胞,而其中仅 0.01% ~ 基因的容量已加到足够大,但是想获得新的代谢

收稿日期: 2010-03-10

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2009CB119000); 公益性行业(农业) 科研专项(3-25, nyhyzx07-050); 国家科技支撑计划(2006BAD07B03, 2006BAD08A08, 2006BAD17B08)

作者简介: 罗坤(1982—), 男, 湖南长沙人, 博士研究生, 从事土壤微生物生态、杀线虫基因克隆研究, luokun08@126.com; *通讯作者: dingjun64@yahoo.com

产物的几率还是很小^[2-4]。而用宏基因组的方法,可从大量不能培养的微生物中获得很多新颖的基因^[5-7]。在聚酮合成酶(PKS)和非核糖体多肽合成酶(NRPS)生物合成模式结构中替换成不同的域,可能会导致功能性复杂,它有可能合成新的聚酮类化合物和多肽^[8]。已有研究表明,一个典型的PKS基因的KS域负责缩合聚酮的各单元^[9],与PKS基因模块相类似,NRPS的A域从选择1个底物氨基酸到形成1个相对应的氨基酸^[10],KS域和A域在合成代谢产物途径中都起到了比较关键的作用。

西藏米拉山草甸土是青藏高原的典型土壤类型,笔者利用已知的PKS和NRPS基因的保守序列,合成简并引物并PCR扩增KS域和A域,以期了解米拉山草甸土壤微生物的次生代谢途径的多样性,为开发利用草甸微生物资源提供基因证据。

1 材料与方法

1.1 材料

土壤样品采自西藏自治区米拉山口附近生长茂盛的草甸的5个不同地点,采样深度为草甸根部以下10~20 cm,混匀后分装,-20℃冰箱保存。土壤pH值为5.2,有机质C 119.1 g/kg,全N 5.5 g/kg,有效N 85.7 mg/kg,全P 1.2 g/kg,有效P 10.9 mg/kg,全K 25.6 g/kg,有效K 93.7 mg/kg。

1.2 方法

1.2.1 土壤总DNA的提取

参照文献^[11]的直接法提取土壤DNA。

1.2.2 PCR扩增

采用PCR扩增PKS基因KS域(引物ksr:5'-CGCTCCATGGAYCCSCARCA-3';ksf:5'-CGCTCCATGGAYCCSCARCA-3')^[12]。反应条件:95℃ 5 min,94℃ 40 s,65℃ 30 s(每个循环降1℃),72℃ 1 min,7个循环;94℃ 40 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min,25个循环;72℃ 10 min,4℃ 保持。琼脂糖凝胶电泳,紫外成像分析。扩增NRPS基因的A域(引物A7R:5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3';A3F:5'-GCSTA CSYSATSTACACSTCSGG-3')^[13],反应条

件:95℃ 5 min;94℃ 40 s,59℃ 30 s,72℃ 1 min,30个循环;72℃ 10 min,4℃ 保持。琼脂糖凝胶电泳,紫外成像分析。

1.2.3 克隆

割胶回收纯化PCR产物后,在0.2 mL离心管中依次加入1 μL连接Buffer、50 ng(1 μL)的pUG-T,7 μL纯化的PCR产物和1 μL T₄ DNA连接酶,16℃下连接过夜。取连接产物转化到DH5a感受态细胞中,取100 mL转化产物涂在含AMP的LB平板上(蛋白胨10 g,酵母提取物5 g,NaCl 10 g,琼脂粉15~20 g,蒸馏水1 000 mL;Amp终质量浓度为100 μg/mL;pH 7.2~7.4,37℃正置培养1 h后,倒置培养12~16 h,挑取白色菌斑培养。挑取培养好的菌液体取1 μL作为模板,以载体通用引物T7、SP6进行PCR扩增检测,电泳分析,确定阳性克隆。

1.2.4 测序及序列分析

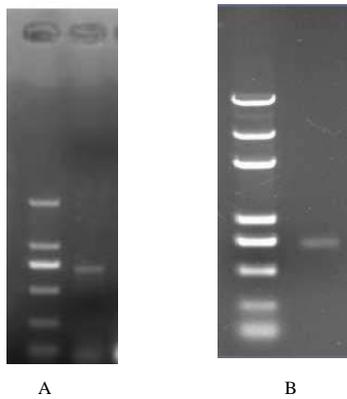
将筛选得到的KS域和A域阳性克隆子分别随机挑取60个,送若赛基因公司进行序列测定。将得到的目标片段序列提交到GenBank数据库,采用BLASTX程序进行序列的同源性分析,在GenBank上登录的具有代表性的一些KS域和A域的氨基酸序列,并使用软件Mega4构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增PKS基因KS域、序列分析及系统发育分析

采用降落PCR程序增加了扩增的特异性,又不失其保真性。扩增出来700 bp左右的片段,如图1-A所示。随机挑取420个克隆,用通用引物T7和SP6进行PCR检测,阳性克隆有395个。随机取40个进行测序,经过NCBI上的Blastx比对,得到28个新的PKS KS基因序列片段,序列登录号为GU945660~GU945687。经过序列比对,表明27个KS基因型可能分属于蓝细菌(Cyanobacteria), α -和 γ -变形菌(Proteobacteria)、蓝弯细菌(Chloroflexi)、拟杆菌(Bacteroidetes)、疣微菌(Verrucomicrobia)和放线菌(Actinobacteria),但还有些不能确定,如红树林土壤的未培养细菌。

扩增 NPRS 的 A 域得到 700 bp 左右的片段，与预想相符合，如图 1-B 所示。



A PKS 基因 KS 域；B NPRS 基因 A 域。

图 1 PCR 扩增基因片段

Fig.1 PCR amplification partly gene (A, PKS KS gene; B, NRPS-A)

I 型聚酮合成酶(PKSs I)KS 结构域在系统发育树上表现为 2 个功能类群。一类KS区域是典型的利用酰基辅酶(acyl-CoA's)作为起始或延伸单位；另一类在系统发育树上形成独立的分支，这些序列主要包括混合或杂合型的PKS/NRPS系统，即同时包含PKS和NRPS的模块结构，它们通过缩合氨基酸将底物加载到相应的PKS延伸模块上^[12, 14]。混合或杂合型的PKS/NRPS系统具有“NDKD... VQTACSTS”的结构，在所得到的KS中，ksx8、ksx11、ksx15、ksx19、ksx22、ksx27、ksx33 等序列有近似的结构(如图 2 所示)。

	. NDKD..... VQTACSTS...
ZP_0119857	GNDKDYLATRVSYKLGRLGSPSVSVQTACSTSLTA
NP_948678	GTLNDFIATRVAYKLNKGPVAVSVQSACSTSLLA
AAG02357	HNDKDFLATTVSHKLGTLGSPYAVGSACSSSLVA
YP_631807	GNDKDFLATRVAYHFNLKGPALTVQTVGVSTSLVA
AAF26920	GNDKDYLATHVSYRLNLRGPSISVQTACSTSLVAV
ksx8	GNDKDHLVTHVSYKLNKGPVAVSVQTACSTSLVAV
ksx11	GNDKDFLCTRVSYKLDLRLGPSISVQTACSTSLVAV
ksx15	TNDKDHLCTQVSYRLNLRGPSIVVQITCSTSLVAV
ksx19	GNDKDFLSTRISYKLNKGPVAVSVQTACSTSLVAV
ksx22	GNDKDYLPVAVYKLGKGPALNVCTACSTSLVAV
ksx27	TNDKDHLCTQVSYRLNLRGPSIVVQITCSTSLVAV
ksx33	GNDKDFLATRISYALNLRGPSIGVQTACSTSLVAV

图 2 杂合 PKS/NRPS 氨基酸序列对比

Fig.2 AA sequence alignment of the patterns for identification of hybrid PKS/NRPS enzyme complexes

各个 KS 基因序列的系统发育树如图 3 所示。蓝细菌是包含聚酮合成酶(PKSs)基因簇并产生功能、品种多样的天然化合物的重要家族，其中 *Nostoc* sp.、*Oscillatoria* sp. 就发现有新的 PKS。在本研究中，ksx8、ksx11 与 *Nostoc* sp.相似性较高，相似性分别达 64%和 59%，具有 KS 结构域的蓝细菌在所取土样中占优势。

2.2 NRPS基因A域系统发育分析

随机抽取 40 个克隆测序，得到 32 个 NRPS A 域基因片段，序列登录号 GU945688~GU945704、GU983613~GU983628 经过 NCBI 上的 Blastx 比对，与近似序列的相似性仅 47%~67%，主要属于变形菌门(α -、 β -、 γ -、 δ -4 种都有)、蓝细菌门等(图 4)。

在A结构域底物结合活性位点周围有 8 个保守的核心序列^[15]：A1-A8(A1, LKAGxAYVPID；A2, LAYxxYTS GTTGxP KG；A3, FDxS；A4, NxYGPTE；A5, GELxLxGxGLARGYW；A6, YKTGDQ；A7, GRxDxQVKIRGx；A8, NGKIDR)。所有序列至少包括 1 个核心序列，仅有 nxz42 含有 A2、A3、A4 等保守序列。NRPS A 域基因的多样性表明，西藏米拉山草甸土壤微生物可能有多种代谢途径，并产生多重代谢产物。

3 讨论

PKS和NRPS基因簇中KS/A结构域活性位点的分析及系统发育树的构建，为了解环境样品中次级代谢产物相关基因多样性提供了有效的方式。本研究中，采用简并引物和降落PCR方法，有效扩增出环境样品中的PKS KS基因和NRPS A 基因。在构建PKS和NRPS基因文库的基础上，随机抽取部分克隆测序，得到27个的PKS KS基因序列和16条NRPS A基因序列，从比对结果来看，与NCBI的GeneBank里的序列相似性不高，非常具有代表性。芦晓飞等^[11]对西藏米拉山土壤细菌、古菌多样性的试验，证实西藏米拉山草甸土壤微生物具有丰富的多样性，PKS和NRPS基因的多样性表明，西藏米拉山草甸土壤微生物在代谢水平上也有丰富的类型。

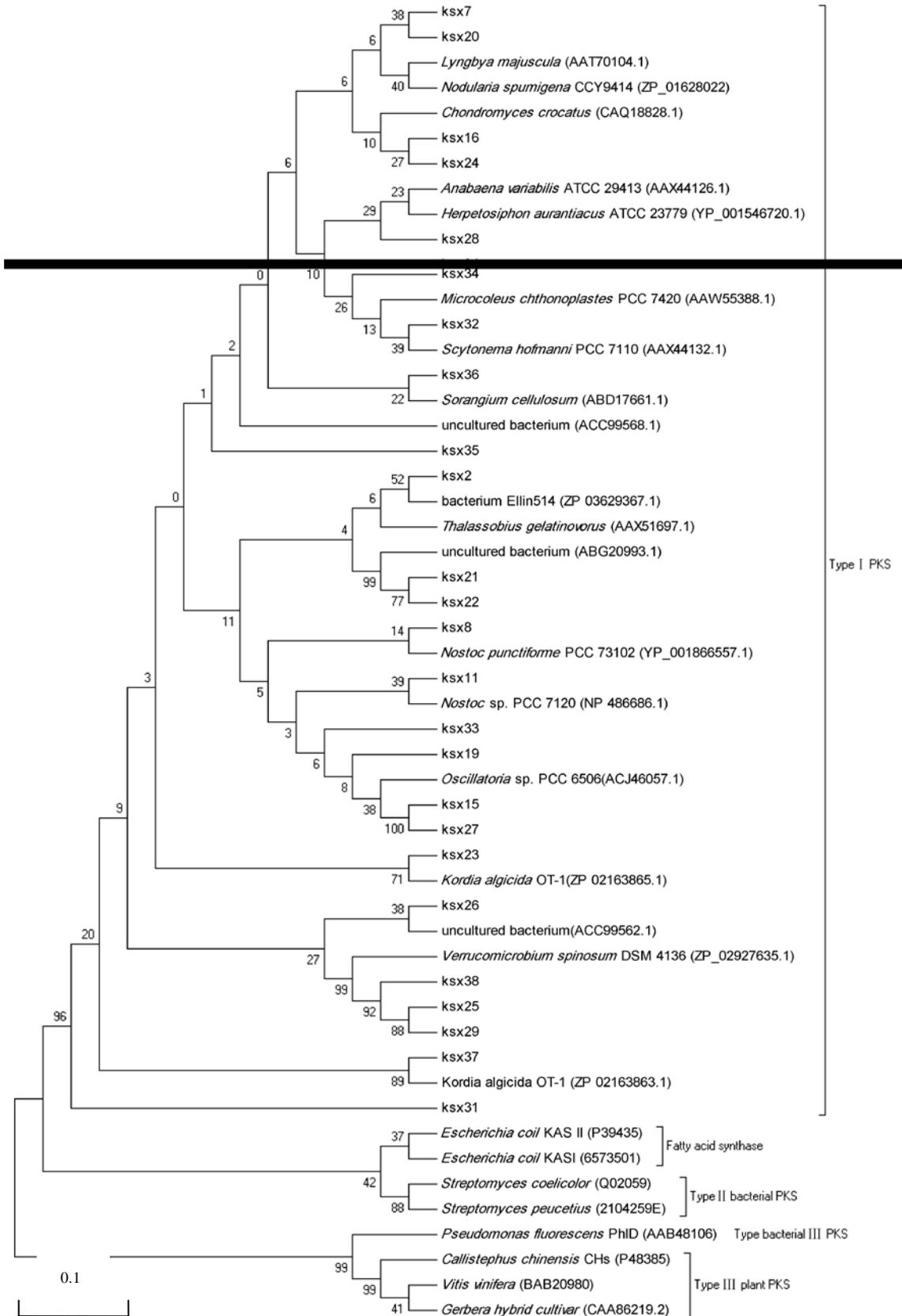


图 3 土壤总DNA PKS基因克隆文库系统进化发育树

Fig.3 Phylogenetic analysis of biosynthetic ketosynthase regions with respect to a diverse range of ketosynthase domains

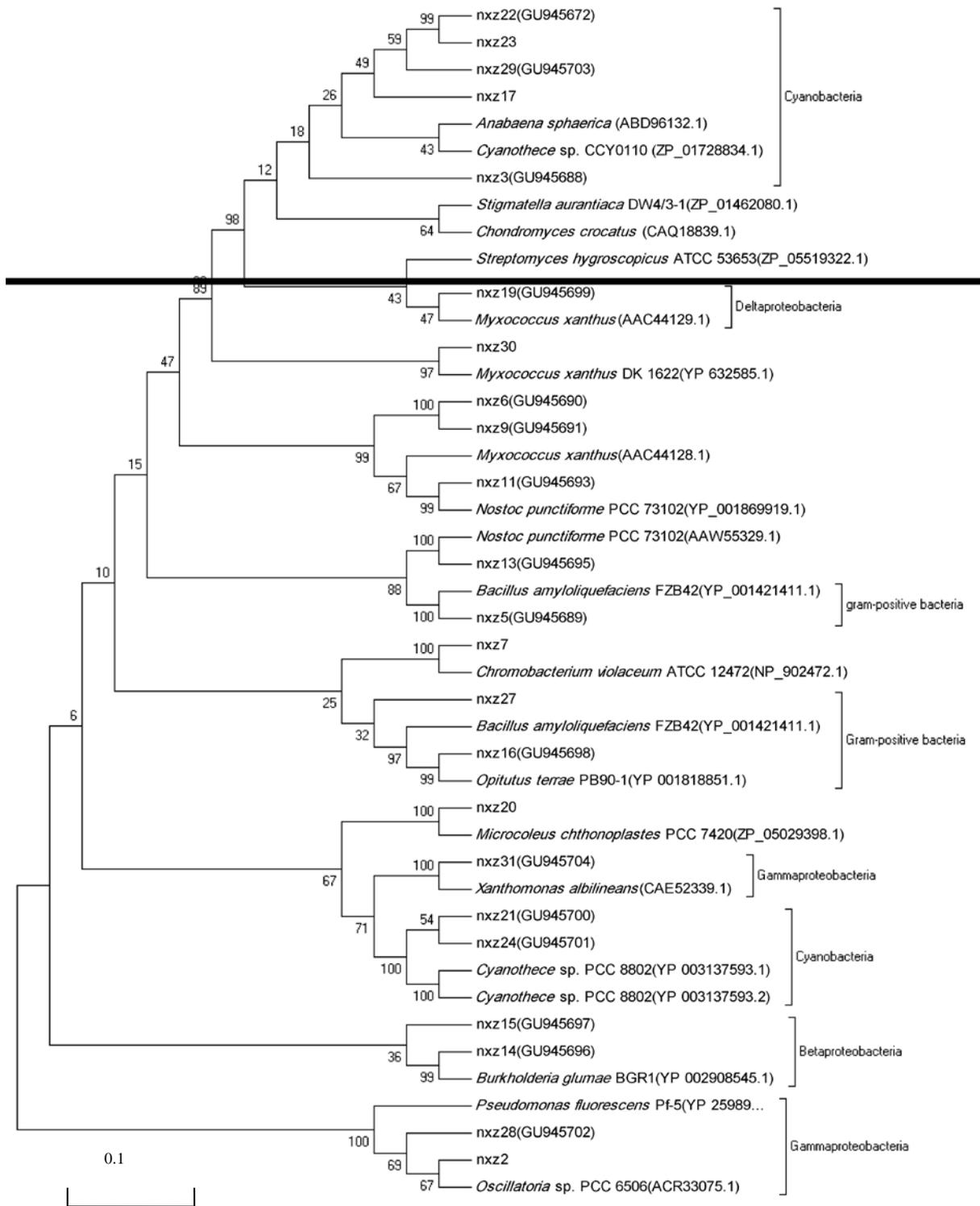


图 4 土壤总DNA NRPS基因克隆文库系统进化发育树

Fig.4 Phylogenetic analysis of biosynthetic ketosynthase regions with respect to a diverse range of NRPS gene A domains

随着测序能力的增强,获得PKS和NRPS的基因序列的方式越来越多.全基因组扩增策略(Whole genome amplification, WGA)为环境微生物提供很

全面的基因信息,这样就很容易得到PKS和NRPS基因^[16].构建宏基因组文库策略也是获得PKS基因和NRPS基因整个基因簇的方法^[3].本研究发现青藏

高原米拉山草甸土壤的丰富的PKS KS基因和NRPS A域基因,并且与已知序列同源性较低.

参考文献:

- [1] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143-169.
- [2] 刘炳辉, 曹远银, 闫建芳, 等. 聚酮类化合物生物合成基因簇与药物筛选[J]. *生物技术通报*, 2008, 4(1): 30-33.
- [3] 杨建, 洪葵. 宏基因组文库技术获得聚酮化合物[J]. *遗传*, 2006, 28(10): 1330-1336.
- [4] Watve M G, Tickoo R, Jog M M, et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* [J]. *Arch Microbiol*, 2001, 176(5): 386-390.
- [5] Gillespie D E, Brady S F, Bettermann A D, et al. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4301-4306.
- [6] Courtois S, Cappellano C M, Ball M, et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 49-55.
- [7] Beja O, Suzuki M T, Koonin E, et al. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage[J]. *Environmental Microbiol*, 2000, 2(5): 516-529.
- [8] Cane D E, Walsh C T. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases[J]. *Chem Biol*, 1999, 6(12): 319-325.
- [9] Schwarzer D, Marahiel M A. Multimodular biocatalysts for natural product assembly[J]. *Naturwissenschaften*, 2001, 88(3): 93-101.
- [10] Stachelhaus T, Mootz H D, Marahiel M A. The specificity conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases[J]. *Chem Biol*, 1999, 6(8): 493-505.
- [11] 芦晓飞, 赵志祥, 谢丙炎, 等. 西藏米拉山高寒草甸土壤微生物 DNA 提取及宏基因组 Fosmid 文库构建 [J]. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(6): 824-829.
- [12] Ginolhac A, Jarrin C, Gillet B, et al. Phylogenetic analysis of polyketide synthase domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones[J]. *APPI Environ Microbiol*, 2004, 70(9): 5522-5527.
- [13] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in Actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups[J]. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1): 10-24.
- [14] Moffitt M C, Neilan B A. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations[J]. *J Mol Evol*, 2003, 56(4): 446-457.
- [15] Stachelhaus T, Mootz H D, Marahiel M A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases[J]. *Chem Biol*, 1999, 6(8): 493-505.
- [16] Alexander Siegl, Ute Hentschel. PKS and NRPS gene clusters from microbial symbiont cells of marine sponges by whole genome amplification[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 2(4): 1-5.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平