

学校编码: 10384
学号: 21720081152553

分类号__密级__
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

深海微生物来源 PKS/NRPS 合成基因 (簇)
的筛选及其初步功能分析

Screening and Preliminary Functional Analysis of Deep-sea
Microbial Originated PKS / NRPS Gene (Clusters)

邹颖钦

指导教师姓名: 肖湘 教授

专 业 名 称: 微生物学

论文提交日期: 2011 年 4 月 29 日

论文答辩时间: 2011 年 6 月 2 日

学位授予日期: 2011 年 月 日

答辩委员会主席: 陈亮 教授

评阅人: _____

2011 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（）课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）经费或实验室的资助，在（）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要.....	I
Abstract.....	III
前 言.....	1
1.1 深海环境与生物资源	1
1.2 海洋药物的发展及研究概况	3
1.3 微生物次级代谢产物生物合成基因簇的研究概况	6
1.3.1 主要次级代谢产物生物合成基因的种类.....	7
1.3.2 PKS/NRPS 生物合成基因簇筛选常用的方法技术.....	14
1.4 本文研究的目的是和意义	17
第一章 Fosmid 宏基因组文库 PKS/NRPS 生物合成基因簇筛选及功能分析.....	18
1 材料与实验方法	18
1.1 材料.....	18
1.1.1 Fosmid 宏基因组文库及菌株、细胞株来源.....	18
1.1.2 常用培养基.....	19
1.1.3 主要试剂及耗材.....	20
1.2 实验方法.....	23
1.2.1 宏基因组文库筛选.....	23
1.2.2 克隆子测序分析.....	29
1.2.3 生物活性检测.....	29
1.2.4 HPLC 指纹图谱分析	32
2 结果分析	32
2.1 宏基因组 PKS/NRPS 筛选结果分析	32
2.2 克隆子代谢产物活性检测结果.....	37
2.3 38-H6 HPLC 结果分析	39
3 小结	41
第二章 深海真菌 PKS/NRPS 筛选及功能分析.....	43
1 材料与方法	43
1.1 材料.....	43
1.1.1 菌种及细胞株来源.....	43
1.1.2 常用培养基.....	49
1.1.3 主要试剂及耗材.....	50
1.1.4 主要仪器.....	50
1.2 方法.....	51
1.2.1 菌株筛选.....	51
1.2.2 含 PKS/NRPS 生物合成基因簇的菌株 ITS 鉴定	52

1.2.3 含 PKS/NRPS 生物合成基因簇菌株的培养及测定样品的制备	53
1.2.4 含 PKS/NRPS 生物合成基因簇菌株的抗性实验	53
1.2.5 HPLC 指纹图谱分析	53
1.2.6 化合物的分离与鉴定	54
2 结果与分析	57
2.1 真菌 PKS/NRPS 筛选结果	57
2.2 含 PKS/NRPS 真菌的生物活性鉴定结果	58
2.2.1 抗茶叶病菌结果	58
2.2.2 细胞毒抗肿瘤活性检测结果	60
2.3 化合物分离	61
2.3.1 HPLC 分析真菌发酵粗提物	61
2.3.2 7-1、38 发酵粗提物分离	62
2.3.3 7-1、38 各化合物的细胞毒活性	67
2.3.4 7-1、38 化合物结构解析	68
3 小结	70
第三章 总结与展望	71
参 考 文 献	72
附 录	78

Contents

Chinese Abstract	I
English Abstract	III
Introduction	1
1.1 Deep-sea environment and biological resources	1
1.2 Marine medicine development and research situation	3
1.3 Microbial secondary metabolites synthetic biology gene clusters research overview	6
1.3.1 Major secondary metabolites biological synthetic genetic types.....	7
1.3.2 Commonly used methods of PKS/NRPS biosynthesis gene clusters screening	14
1.4 The purpose and significance of this paper	17
Chapter I: Screening and functional analysis of Fosmid metagenomic library's PKS / NRPS biosynthesis gene cluster	18
1 Materials and experimental methods	18
1.1 Materials	18
1.1.1 The sources of fosmid metagenomics library and strains、 cell lines... 18	
1.1.2 Common medium.....	19
1.1.3 Main reagent and consumables	200
1.2 Experimental methods	23
1.2.1 The metagenomics library screening	23
1.2.2 Sequencing analysis of the clone	29
1.2.3 Bioactive detection.....	29
1.2.4 HPLC Fingerprint analysis	32
2 Results' analysis	32
2.1 The metagenomics' PKS/NRPS screening results analysis	32
2.2 The detection results of the Clone's metabolites activity	37
2.3 38-H6 HPLC results' analysis	39

3 Summary	41
Chapter II: Deep-sea fungus' PKS/NRPS screening and functional analysis	43
1 Materials and experimental methods	43
1.1 Materials	43
1.1.1 The sources of strains and cell lines.....	43
1.1.2 Common medium.....	49
1.1.3 Main reagent and consumables	50
1.1.4 Main instrument	50
1.2 Methods	51
1.2.1 Strains' screening	51
1.2.2 ITS identification of strains with PKS/NRPS biosynthetic gene clusters...51	
1.2.3 Culture and prepare detection of the strains with PKS/NRPS biosynthetic gene clusters	53
1.2.4 Resistant experiments of the strains with PKS/NRPS biosynthetic gene clusters	53
1.2.5 HPLC Fingerprint analysis	53
1.2.6 Isolation and identification of compounds.....	54
2 Results and analysis	57
2.1 Fungus' PKS/NRPS screening results	57
2.2 The biological activity detect results of fungus with PKS/NRPS	58
2.2.1 Anti-teagerms results	58
2.2.2 Cytotoxic antitumor activity test results	60
2.3 Compounds' separation	61
2.3.1 HPLC Analysis fungal fermented crude extractings.....	61
2.3.2 7-1、38 fermented crude extractings' separation.....	61
2.3.3 7-1、38 compounds' cytotoxic activity	67
2.3.4 7-1、38 compounds' analysis.....	68
3 Summary	70

Chapter III: Summaries and Prospects71

References72

Appendix78

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

深海环境是一个具有高压、低温（部分区域如热液口为高温）、厌氧、极端 pH 等特点的极端环境，然而它却占地球表面积的 49%，被认为是目前地球上物种资源最丰富的地区。由于其生态环境的特殊性，决定了深海微生物具有一些特异的代谢途径和遗传背景，导致深海微生物次生代谢产物具有化学结构奇特、新颖，生物活性多样等特点。特殊结构天然产物，对发现药物先导化合物、研究药物作用新靶点、新机理等具有重要科学意义。

在这些具有药效作用的天然化合物中，聚酮化合物（PKs）和非核糖体多肽化合物（NRPs）占了很大一部分，我们的研究也是针对这两类化合物的。

目前，对 PKs、NRPS 的研究表明虽然聚酮化合物（PKs）和非核糖体多肽化合物（NRPs）结构千差万别，但其生物合成过程却极具规律性，而且 PKs、NRPS 这两种酶的氨基酸序列具有一定的保守性。这为聚酮类化合物和非核糖体肽合酶的基因筛选提供了基础。

本文从可培养和不可培养两种途径对深海环境微生物来源的 PKs/NRPS 合成基因簇进行筛选及其功能活性分析。可培养途径是通过深海沉积物样品分离获得的深海真菌，对其进行含 PKs/NRPS 基因簇的筛选，然后对筛选到的菌株进行活性检测，最后对其中细胞毒活性良好的菌株进行次生代谢产物的分离鉴定；不可培养则是通过对用深海沉积物构建的宏基因组 fosmid 文库，使用 PCR 方法进行含 PKs/NRPS 基因簇的克隆子筛选，并对筛选到的克隆子做测序分析和发酵产物活性分析等，期望为未来先导化合物分离及组合生物合成提供新的生物元件。

经过两轮 PCR 筛选后，在 6 个文库中筛选到一个含 PKs/NRPS 基因簇阳性克隆子，该基因簇序列初步推测为新的基因簇，但在克隆子里未得到表达，因而无抗菌活性和细胞毒活性；在可培养的深海真菌中发现多株含有 PKs/NRPS 基因簇的真菌，它们有不同程度的抗茶叶病菌活性及细胞毒活性，选取了 7-1 和 38 号菌株进行次级代谢物的化合物分离与鉴定，最后分离到并分析出了两个生物碱

类的化合物的结构，然而它们有何特性以及与 PKS/NRPS 基因簇有何关联还有待进一步研究。

实验结果表明要从宏基因组文库中筛选到一个含完整的 PKS/NRPS 基因组且能表达产生活性物质的克隆子，还有难度，效率还较低，技术不够成熟，宏基因组文库的 PKS/NRPS 基因簇筛选还有待进一步研究；但深海来源的真菌是可行的，它有助于提高药物筛选的效率。

研究结果为深海微生物活性产物的筛选及应用提供了基础数据。

关键词： PKS; NRPS; PCR

Abstract

Deep-sea environment is a high-pressure, low temperature (some areas is high-temperature such as hydrothermal vents), anaerobic, extreme pH and other characteristics of extreme environments, yet it accounts for 49% of Earth's surface, is considered as the richest species on earth region. Because of its environment specificity, deep-sea microbes have some specific metabolic pathways and genetic background, their secondary metabolites have peculiar, novel chemical structures, and diverse characteristics. Special structure of natural products have important scientific significance on lead compounds discovery and drug study of new targets, new mechanism.

Polyketide compounds and non-ribosomal peptide compounds accounted for a large part of natural compounds with the pharmacodynamic effects. Our research is for these two kinds of compounds.

Currently, PKS, NRPS research shows that although the polyketide compounds and non-ribosomal peptide compounds vary widely, but its biosynthesis is very regular. And PKS, NRPS these two kinds of amino acid sequence of enzymes has certain conservative. This provides the basis for screening of polyketide compounds and non-ribosomal peptide synthase genes.

This paper from the culturable and unculturable two ways to study deep-sea environmental microbial sources of PKS/NRPS synthetic gene clusters and their products bioactivity. Culturable way is through separating fungi from the deep-sea sediment samples, to screen the strains which contain PKS/NRPS gene clusters with PCR methods, and then detect the activity of the strains which we have screened, and finally separate and identify secondary metabolites which produced by the strains that have good cytotoxic activity; Unculturable way is through using the metagenomic fosmid libraries which constructed by the deep-sea sediment samples, to screen the clones which contain PKS / NRPS gene clusters with PCR methods, and then do

sesquence analysis and activity analysis of fermentation products for the clones which we have screened.Expect for the future separation of lead compounds and combinatorial biosynthesis to provide new biological components.

After two rounds of PCR screening, in the six libraries we screened a containing PKS / NRPS gene cluster of positive clone, initially speculated that the gene cluster is a new gene cluster.However,there have not been expressed in the clone, so have not antibacterial activityand cytotoxic activity; in the cultivation of deep sea fungi we found many strains which contain PKS/NRPS gen clusters, they have different levels of anti-teagerms activity and cytotoxic activity,we selecte 7-1 and 38 strains to separate and identify secondary compounds, and finally isolate and analyze two alkaloids compounds'structures, however, what features they have and how they relate with the PKS / NRPS gene clusters needed to be further studied.

The results show that want to screen a clone which contain a complete PKS / NRPS gene cluster and can express to produce active substances from the metagenomic library, still have difficulty, efficiency is relatively low, technology is not mature enough,screening PKS / NRPS gene clusters with metagenomic library needed to further study; but deep fungal sources is feasible, it helps to improve the efficiency of drug discovery.

The result provide basis data for deep-sea microbial activity compounds' selection and application .

Key words:PKS;NRPS; PCR

前 言

1.1 深海环境与生物资源

众所周知，地球也被称为水球，那是因为地球上海洋的面积约 362,000,000 平方公里 (140,000,000 平方里)，占地球表面积近 71%。海洋中含有十三亿五千多万立方千米的水，约占地球上总水量的 97%。在太空中，地球是唯一呈蓝色的行星。

水是地球最大的特点，是地球上生命发育的基本条件，97% 的水都集中在海洋里，海洋面积为 $3.61 \times 10^8 \text{km}^2$ ，占地球表面积的 70.8%。海洋的中间部分称为洋，约占海洋总面积的 89%，它的深度大，一般在二、三千米以上，海水的温度、盐度、颜色等不受大陆影响，有独立的潮汐和洋流系统。海洋的边缘部分称为海，深度较浅，一般在二、三千米之内，约占海洋总面积的 11%。海没有独立的潮汐和海流系统，水温因受大陆影响而有显著的季节变化，盐度受附近大陆河流和气候的影响也较明显，水色以黄绿色较多，透明度小。而国际上对深海的定义是 1000 米及以上水深。全球海洋一般被分为数个大洋和面积较小的海。四个主要的大洋为太平洋、大西洋和印度洋、北冰洋，大部分以陆地和海底地形线为界。大洋是海洋的主体部分，一般远离大陆，面积广阔，约占海洋总面积的 90.3%；深度大，一般大于 2000m；海洋要素如盐度、温度等不受大陆影响，盐度平均为 35‰，且年变化小；具有独立的潮汐系统和强大的洋流系统。

大洋表层阳光可以穿透，浮游植物可在那里进行光合作用，成为透光带。透光层的下方是大洋区最主要的部分，那里光线微弱或因无光而不能进行光合作用。却能依靠地球内源能量支持，在深海黑暗和高温的环境下，通过化合作用生产有机质的“黑暗食物链”这就是深海环境以及生物圈的特点。

海洋是生命之源，人类物质资源的天然宝库。而目前已知的海洋生物有 21 万种，预计实际的数量则在这个数字的 10 倍以上，即 210 万种。海水中溶存的元素近 80 种，约有 17 种是陆地上稀缺的。海洋生物的数量占地球生物种群数量的 80%以上，海洋生物是指海洋里的各种生物，包括海洋动物、海洋植物、微

生物及病毒等。它们不仅是人类食物的重要来源，还是重要的医药原料和工业原料。海洋作为人类物质资源的天然宝库^[1]，可以预想它在以后起到的作用：

①未来的粮仓

有关专家乐观地指出，海洋粮仓的潜力是很大的。目前，产量最高的陆地农作物每公顷的年产量折合成蛋白质计算，只有 0.71 吨。而科学试验同样面积的海水饲养产量最高可达 27.8 吨，具有商业竞争能力的产量也有 16.7 吨。海洋调查表明，在 1000 米以下的深海水中，硅、磷等含量十分丰富，只是它们浮不到温暖的表面层。海洋学家们设想利用回升流的原理和温差发电原理，设计将海洋饲养场和海水温差发电站联合在一起，可将热带和亚热带海域表面层和深海的水温差来发电，在那些光照强烈的海区，用人工方法把深海海水抽到表面层，而后在那儿培植海藻，再用海藻饲养贝类，并把加工后的贝类饲养龙虾。令人惊喜的是这一系列小量试验都取得了成功。由此可见海洋成为人类未来的粮仓，是可行的。

②矿物资源的聚宝盆

海洋是矿物资源的聚宝盆。经过 20 世纪 70 年代“国际 10 年海洋勘探阶段”，人类进一步加深了对海洋矿物资源的种类、分布和储量的认识。海底热液矿藏、海底石油、深海锰结核和海底砂矿一起，将成为 21 世纪海底四大矿种。

③21 世纪的药库

美国一位海洋问题专家形象地说：“海洋生物犹如一个可提供有关健康问题解决办法的咨询中心。”据有关医学专家预测，人类将在 21 世纪制服癌症。那么，人类靠的是何种灵丹妙药？近年来，科学家们研究后发现，海洋将成为 21 世纪的药库。例如：海龙、海马、石决明、珍珠粉、龙涎香、鹧鸪菜、羊栖菜、昆布等，很早便是中国的名贵药材。海参、牡蛎、海藻、珊瑚礁、鲨鱼等正成为抗肿瘤药物热门研究物种。当前，海洋生物药物已在提取蛋白质及氨基酸、维生素、麻醉剂、抗菌素等方面都取得了相当不错的进展^[2-3]。

海洋是我们药物开发的极佳资源。在海洋复杂而恶劣的生态环境中，为了生存和发展，经过长期的进化，产生了与陆地生物不同的代谢系统和体内防御体系，存在大量的化学结构新颖、生物活性特异、陆地生物无法比拟的海洋生物活性物质，因而吸引了众多科学家从海洋天然产物中寻求治疗药物。目前药物失去作用的速度与科学家发现新药的速度差不多，因此，拓宽寻找新药的途径迫在眉睫，

而海洋是人类赖以生存与发展的资源宝库，人类社会正在以全新的姿态向海洋进军，国际海洋竞争日趋激烈。新的可供开发利用的海洋资源不断发现，为解决困扰人类生存和可持续发展的资源与环境两大问题展现了新的曙光。

1.2 海洋药物的发展及研究概况

海洋生物资源是一个十分巨大的有待深入开发的生物资源，环境的多样性决定了生物的多样性，同时也决定了化合物的多样性。发掘新的海洋生物资源已成为海洋药物研究的一个重要发展趋势。利用海洋生物资源进行药物开发的系统科学研究大约始于六十年代，在“向海洋要药”的口号下，国外展开了大量的生物学、化学、药理学、毒理学等多学科的研究，并进行了广泛的生物活性筛选。在此期间，美、日等国建立了一批高水平的研究机构。但由于样品采集、保存困难，分离和生物实验技术繁杂，至七十年代末期，研究开发出现低谷，成效不大。八十年代后期，在美国和日本对岩沙海葵毒素 (Palytoxin)^[4]和西加毒素(Ciguatoxin)^[5-7]研究取得重大成功后，海洋生物活性物质的研究再现高潮，并逐步转入一个平衡成熟的发展时期。

我国的海洋天然产物研究起始于上世纪七十年代，至今已有近四十年的历史。曾陇梅等学者对我国南海的珊瑚类动物进行了较系统的化学成分研究，1985年发现具有双十四元环的新型四萜。上世纪九十年代以后，海洋天然产物的研究获得了迅猛发展，对我国海洋中的海绵、珊瑚、棘皮类动物、草苔虫、海藻及海洋微生物进行了广泛的研究。迄今已研究的海洋生物估计约有 500 多种，申请获得的发明专利约 50 余件，并有多种海洋药物获得新药证书或进入临床研究。

目前，海洋药物研究的主要集中在以下 6 个领域：

1 抗菌抗病毒类药物的研究

海洋是新种属微生物的生存繁衍地，从众多的新种属微生物中，可培养出一系列高效的抗菌药物，如来源于多种链霉菌的 Teleocidin B 即为一种强抗菌药物^[8]。特别是与海洋动植物共生的微生物是一种丰富的抗菌资源，日本学者发现约 27%的海洋微生物具有抗菌活性。抗病毒活性物质主要发现在海绵、珊瑚、海鞘、海藻等海洋生物中。

2 抗肿瘤、抗癌类药物的研究

海洋抗肿瘤药物的开发是肿瘤药物开发的重要组成部分。从海洋来源抗肿瘤药物的作用机制一般为：(1)调节蛋白激酶(PKC)合成；(2)抑制蛋白质合成；(3)干扰肿瘤细胞有丝分裂和微管聚合而直接杀伤肿瘤细胞；(4)增强机体自动防御体系，诱导白细胞介素 2(IL-2)、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(INF)等分泌；(5)抑制肿瘤新生血管形成^[9]。目前，科学家已经分离得到大量具有抗肿瘤活性的化合物，其中一些具有较高活性的化合物已进入临床研究，这些化合物为抗肿瘤药物设计提供了宝贵的分子模型，为海洋抗肿瘤药物的研究开发提供了重要的先导化合物库。

海洋抗癌药物研究在海洋药物研究中一直起着主导作用，科学家预言，最有前途的抗癌药物将来自海洋。现已发现海洋生物提取物中至少有 10%具有抗肿瘤活性。美国每年有 1500 个海洋产物被分离出来，1%具有抗癌活性。目前至少已有 10 个以上海洋抗癌药物进入临床或临床前研究阶段。扩大海洋生物的活性筛选，继续寻找高效的抗癌化合物，直接用于临床或作为先导物进行结构改造，开发新的高效低毒的抗癌成分，将成为海洋抗癌药物研究的发展趋势。

3 作用于心脑血管系统类药物的研究

多数海洋毒素具有独特的化学结构。由于许多高毒素的毒性是以对生物神经系统或心血管系统的高特异性作用为基础，因此，这些毒素及其作用机制是发现新神经系统或心血管系统药物的重要导向化合物和线索，也可作为寻找新农药的基。目前已研究出多种药物可有效预防和治疗心脑血管疾病，如高度不饱和脂肪酸，具有抑制血栓形成和扩张血管的作用，现已有多种制剂用于临床；河豚毒素有强心作用^[10-11]，而且有很强的降压作用，具有较好的抗心率失常作用。此外，还有藻酸酯钠类、螺旋藻类，后者对于高血脂和动脉粥样硬化有良好的预防和辅助治疗作用。

4 消炎镇痛类药物的研究

从海洋天然产物中分离的最引人注目的活性成分是 Manoalide，它是磷酸酯酶 A2 抑制剂^[12-13]，在上世纪 80 年代中期它已被作为一个典型的抗炎剂在临床试用。还有例如：甲壳胺(Chifosan)，它以甲壳胺作为主要成分研制的创伤愈合海绵治疗干槽症，疗效显著。创伤愈合海绵与创面接触后，在创面酶的作用下，与

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库