

文章编号: 1000-5862(2015)04-0430-05

# 蛇足石杉内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 中 III 型聚酮合酶的表达、纯化及生物信息学分析

彭思露<sup>1</sup> 杨慧林<sup>1 2</sup> 李尔汉<sup>1</sup> 王筱兰<sup>1</sup> 朱 筠<sup>1 2\*</sup>

(1. 江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室 江西 南昌 330022;

2. 江西科技师范大学生命科学学院 江西省有机功能分子重点实验室 江西 南昌 330013)

**摘要:** 竹红菌素是我国特有的一类萘醌类光敏色素,在开发新型抗肿瘤抗病毒药物、光敏活性农药及新型光电转换材料等方面应用前景广阔。聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)是合成竹红菌素的一种关键酶。通过全基因组测序及分析发现在 *Shiraia* sp. Slf14 中存在一个 III 型聚酮合酶基因。利用 RT-PCR 技术,以其总 RNA 为模板,扩增得到目的片段,并成功构建表达载体 pET-22b(+)-PKSIII,采用 Ni-NTA 亲和层析法纯化目的蛋白,在大肠杆菌 BL21(DE3) 中成功表达出了目的蛋白,SDS-PAGE 结果显示表达重组产物分子质量约为 43 kDa,与理论值一致,为 III 型聚酮合酶的催化活性研究提供理论依据。

**关键词:** 内生真菌;聚酮合酶;竹红菌素;基因克隆和表达

中图分类号: Q 979.85 文献标志码: A DOI: 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2015.04.19

## 0 引言

竹红菌素(Hypocrellins)是我国特有的一种萘醌类色素,属于聚酮化合物,作为新型的光敏剂可用于光动力疗法以抗肿瘤,此外还有抗菌消炎、抗病毒等活性<sup>[1-3]</sup>。聚酮化合物是由聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)催化合成,其合成过程与脂肪酸的合成类似:由低级羧酸通过连续的缩合反应合成,包括多酚类、多烯类、大环内酯类化合物;有抗生素、抗病毒、抗虫等活性,被广泛应用于医药与农业<sup>[4-5]</sup>。聚酮合酶根据来源可分为细菌聚酮合酶、真菌聚酮合酶和植物聚酮合酶 3 大类。通常根据其催化机制和结构分为 3 大类: I 型 PKS 也称为模块(modular)类,是拥有多个模块的多功能多肽,它以酶结构域的形式按顺序催化聚酮碳链的延伸,主要合成大环内酯类抗生素; II 型 PKS 也称为叠代(iterative)或芳香类,是一个多功能酶复合体,每个催化结构域是独立的蛋白,具有 2 个不同的酮缩合酶  $KS_{\alpha}$  和  $KS_{\beta}$ ,每一结构域在重复的反应步骤中被多次用来催化相同的反应; III 型 PKS 不同于前 2 种 PKS,它通过 ACP 活化酰基-CoA 的底物,直接作用于酰基-CoA 活化

的简单羧酸<sup>[6-40]</sup>。III 型 PKS 存在于植物、细菌、真菌中,能催化缩合大量的芳香族聚酮化合物,目前在真菌中研究较少<sup>[6-8]</sup>。

内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 为本实验室从江西蛇足石杉中筛选出的一株具有产竹红菌素能力的竹黄菌。有文献报道 PKS 为其代谢合成途径中的关键酶,为了提高竹红菌素的产量,研究此代谢合成途径中关键酶 PKS 具有重要意义,目前只有少量文献报道,还未充分阐明<sup>[11-15]</sup>。本实验室已经对 *Shiraia* sp. Slf14 进行全基因组测序,获得了 *Shiraia* sp. Slf14 基因组精细图(>98% 基因组序列信息),序列已提交至 NCBI 数据库(AXZN00000000.1)。通过比较基因组学分析,描绘了 *Shiraia* sp. Slf14 的竹红菌甲素的可能合成途径,并发现了其中的一个 III 型 PKS 基因。采用 RT-PCR 的方法获得了该基因序列,并进行体外表达,对于后续的相关基因功能鉴定和通过遗传改造等手段为进一步提高竹红菌素产量提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验材料 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21

收稿日期: 2015-03-24

基金项目: 国家自然科学基金(31460021)、江西省青年科学基金(20142BAB214008)、江西省教育厅基金(GJJ13211)和江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室开放基金(YRD201408)资助项目。

通信作者: 朱 筠(1971-),男,江西高安人,教授,博士,主要从事微生物资源与代谢工程研究。

(DE3)、内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14、表达质粒 pET-22b 均由本实验室保藏; T-vector pMD19( simple) 购自大连 TaKaRa 公司

1.1.2 培养基 LB 培养基(  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ) : 胰蛋白胨 10 酵母提取物 5 氯化钠 10 琼脂 15 pH 值为 7.0 , 121  $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 20 min.

1.1.3 试剂 KOD DNA 聚合酶 ,RNAiso Plus ,T4 DNA 连接酶 ,反转录试剂盒 PrimeScript™ reagent Kit with gDNA Eraser ,QuickCut Nde I、BamH I、Not I , DNA Ladder Marker ,标准分子量蛋白 Marker ,pMD™ 19-T Vector Cloning Kit 购于 TaKaRa 公司; E. Z. N. A cycle-pure kit ,Plasmid Mini Kit I ,Gel Extraction Kit 购于美国 OMEGA 公司.

1.1.4 仪器 PCR 仪、凝胶成像仪( 美国 BIO-RAD) ;扫描型紫外可见分光光度计 UV-3900( 日本日立) ;超净工作台( 苏州进化设备有限公司) ;恒温培养箱、恒温培养振荡器( 上海智城) ;立式压力蒸气灭菌锅( 上海申安医疗器械厂) ;冷冻台式离心机( 德国 Heraeus) ;DYY-8C 电泳仪 DNA 水平电泳槽( 北京六一仪器厂)

1.2 方法

1.2.1 *Shiraia* sp. Slf14 总 RNA 的提取及 cDNA 的

合成 发酵培养后 ,培养基经过抽滤得到的菌体 ,用 DEPC 水洗涤 2 次 ,置  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  环境中冷冻后 ,液氮研磨 ,向研钵中加入与样品匀浆量匹配适量的 RNAiso Plus ,充分匀浆. 再按照 RNAiso Plus 说明书步骤提取 *Shiraia* sp. Slf14 的总 RNA 和除去可能存在的 DNA ,采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量 ,总 RNA 保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中. 以提取的总 RNA 为模板 ,利用 PrimeScript 反转录试剂盒 ,按其说明书操作流程 ,反转录合成总 cDNA.

1.2.2 III 型 PKS 基因克隆与测序 根据预测的 III 型 PKS 基因 ,采用 Primer 5 软件设计一对包含全长 III 型 PKS 基因的扩增引物 pksIII-NdeI-F 和 pksIII-BamHI-6His-R( 见表 1) ,以 cDNA 为模板扩增 III 型 PKS 基因片段 ,并引入 NdeI 与 BamHI 限制性酶切位点. 配制 50  $\mu\text{L}$  反应体系: 10  $\times$  Buffer 5. 0  $\mu\text{L}$  , dNTPs(  $2.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ) 4. 0  $\mu\text{L}$  ,引物( pksIII-NdeI-F 和 pksIII-BamHI-6His-R) 各 1. 5  $\mu\text{L}$  ,KOD-Plus-Neo 聚合酶 1  $\mu\text{L}$  ,cDNA 1  $\mu\text{L}$  ,补加  $\text{ddH}_2\text{O}$  至终体积 50  $\mu\text{L}$ ; PCR 反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s 68  $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s 30 个循环; 68  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min 4  $^{\circ}\text{C}$  保存. 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果.

表 1 所用引物序列

引物名称	引物序列
pksIII-NdeI-F	GGAATTCATATGTCCCACGTGGCTAACAC
pksIII-BamHI-6His-R	CGCGGATCCTTAGTGGTGGTGGTGGTGACCTGTTTCGTACAGTGTGCCAG

在紫外灯下切下带有目的条带胶块 ,利用 Gel Extraction Kit 对 PCR 产物进行提取纯化 ,1% 琼脂糖凝胶电泳检测纯化结果. 按照 pMD™ 19-T Vector Cloning Kit 说明书将纯化的 DNA 片段连接至载体 T-vector pMD19( simple) 上 ,转化感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$  ,通过氨苄抗性筛选 ,挑取阳性菌落进行 PCR 检测 ,从检测合格的重组菌株中提取质粒 ,送至 TaKaRa 公司测序.

1.2.3 III 型 PKS 基因的原核表达及产物纯化 采用限制性内切酶 *Nde* I 与 *Bam* HI 双酶切 1.2.2 节中的重组质粒 ,同时对表达载体 pET-22b( +) 进行双酶切 ,1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果. 切胶回收质粒与目的基因 ,利用 Gel Extraction Kit 对 PCR 产物进行纯化 ,电泳检测纯化结果. 利用 T4 DNA 连接酶于 4  $^{\circ}\text{C}$  对两纯化产物进行过夜连接 ,随后将连接产物转化 BL21( DE3) ,37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养 ,在氨苄抗性平板上筛选转化子. 从平板上挑取多个菌落进行全菌 PCR 检测 ,提取相应克隆子的重组质粒 ,并进

行 *Nde* I 与 *Bam* HI 双酶切鉴定.

将鉴定正确的阳性克隆子接种至 LB 液体培养基 ,于 37  $^{\circ}\text{C}$  、200 rpm 培养 2 h 左右 ,至  $OD_{600}$  超过 0. 7. 诱导前提前 10 min 改变培养温度至诱导温度 22  $^{\circ}\text{C}$ ; 加入 IPTG 至终浓度为  $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ,22  $^{\circ}\text{C}$  、200 rpm 培养过夜或 8 h. 诱导结束后 ,将发酵液均匀移至 50 mL 离心管中( 取 1 mL 菌液制成 100  $\mu\text{L}$  电泳样品 ,即诱导后破碎前总菌样) ; 4  $^{\circ}\text{C}$  、8 000 rpm 离心 5 min 弃上清. 每个离心管加入 20 mL 的 TE Buffer ,重悬菌体后上述条件离心 5 min 弃上清 ,重复洗涤 1 次. 然后将沉淀再离心 1 次 ,用移液器将残余液吸出 ,置 4  $^{\circ}\text{C}$  冻藏.

在沉菌中各加入 10 mL 的 Buffer A ,采用超声破碎仪破碎细胞 ,条件为: 20% 功率 ,3 s 工作 ,5 s 间歇 ,破碎 10 min. 破碎后取 100  $\mu\text{L}$  制作电泳样品; 破碎后 4  $^{\circ}\text{C}$  、10 000 rpm 离心 15 min ,取上清进行 SDS-PAGE 电泳检测. 采用 Ni-NTA 纯化柱进行重组蛋白纯化 ,12% 的 SDS-PAGE 电泳检测纯化结果.

## 2 结果与分析

### 2.1 III 型 PKS 基因的克隆

从发酵培养得到的 *Shiraia* sp. Slf14 菌体中提取总 RNA, 利用 RT-PCR 技术扩增得到 1.3 kb 大小

的片段(见图 1(a)), 与预测片段大小相符, 表明 *Shiraia* sp. Slf14 中 III 型 PKS 基因有显著表达, 图 1(b) 显示为随后的割胶回收纯化片段. 将纯化的目的片段克隆到 pMD19-T 中, 挑取阳性克隆提取质粒, 用 *Nde* I 与 *Bam* HI 双酶切, 可见约 1.3 kb 片段和 pMD19-T 质粒片段, 结果如图 2 所示.

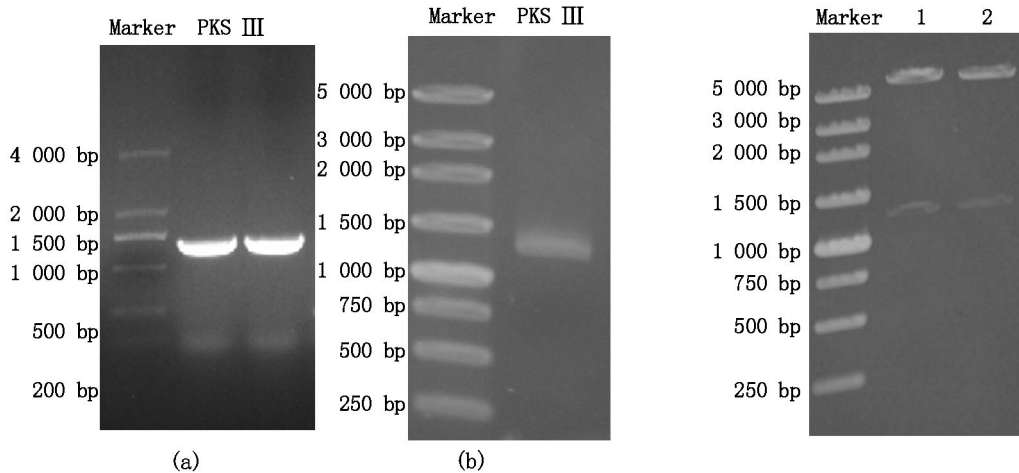


图 1 (a) pksIII-*Nde* I-F 和 pksIII-*Bam* HI-6His-R 为引物的 RT-PCR 产物; (b) RT-PCR 产物割胶回收纯化片段

图 2 *Nde* I 与 *Bam* HI 双酶切结果

### 2.2 III 型 PKS 理化性质的分析

通过一些生物信息学软件预测了 III 型 PKS 的 2 级结构(见图 3) 及 3 维结构, 分析了该酶的疏水性(见图 4) 相关预测结果为后续进一步研究奠定

基础. 2 级结构分析表明, 有较丰富的  $\alpha$  螺旋与  $\beta$  折叠结构, 其中  $\alpha$  螺旋较集中在 3' 端, 而  $\beta$  折叠结构分散于序列中部. 疏水性分析结果显示, III 型 PKS 为亲水性.

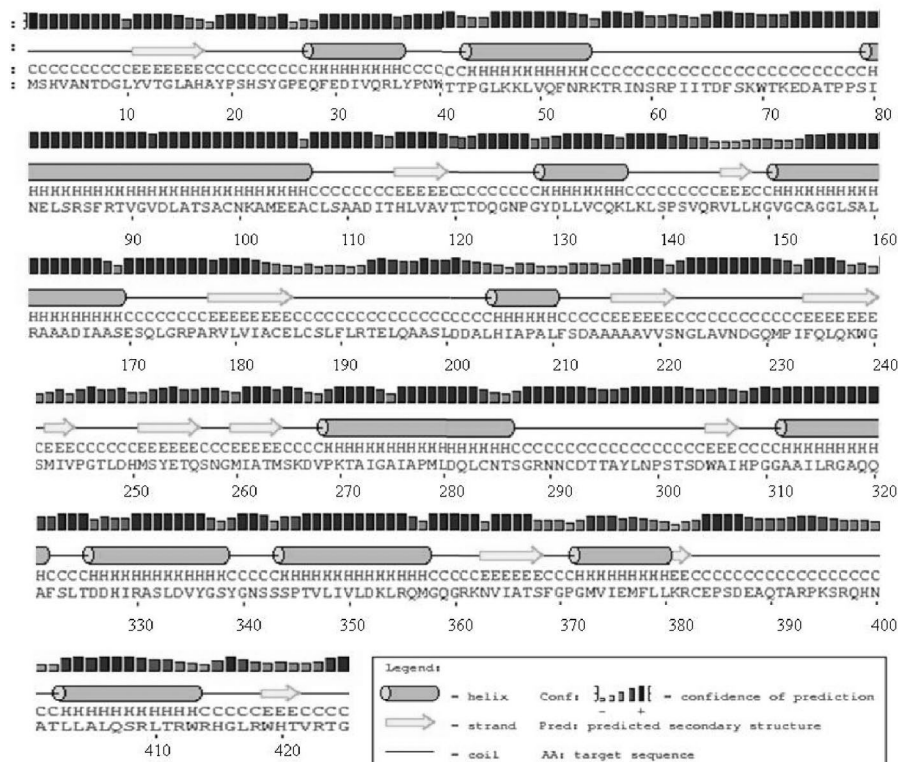


图 3 III 型 PKS 二级结构

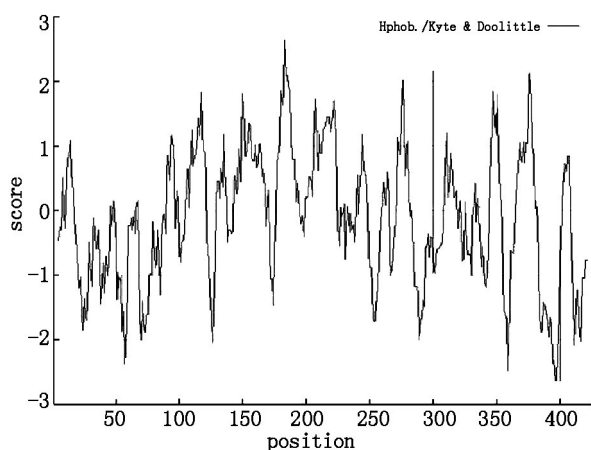


图4 III型PKS的亲/疏水性分析

### 2.3 III型PKS基因的原核表达

采用上述引物进行PCR扩增时,分别在III型PKS基因起始密码部位引入 *Nde* I 酶切位点,终止密码后引入 *Bam* HI 酶切位点. 纯化的扩增产物经 *Nde* I 与 *Bam* HI 双酶切、回收后,与经过同样双酶切的表达载体 pET-22b(+) 进行连接,即构建重组质粒 pET-22b(+) -PKSIII,图5表示构建过程.

挑取几个重组菌 pET-22b(+) -PKSIII,按照上述表达步骤表达III型PKS目的蛋白,SDS-PAGE结果如图6所示. 由图6可见,在大约43 kDa处有蛋白条带,采用 Ni-NTA 亲和层析法纯化获得较纯的目的蛋白.

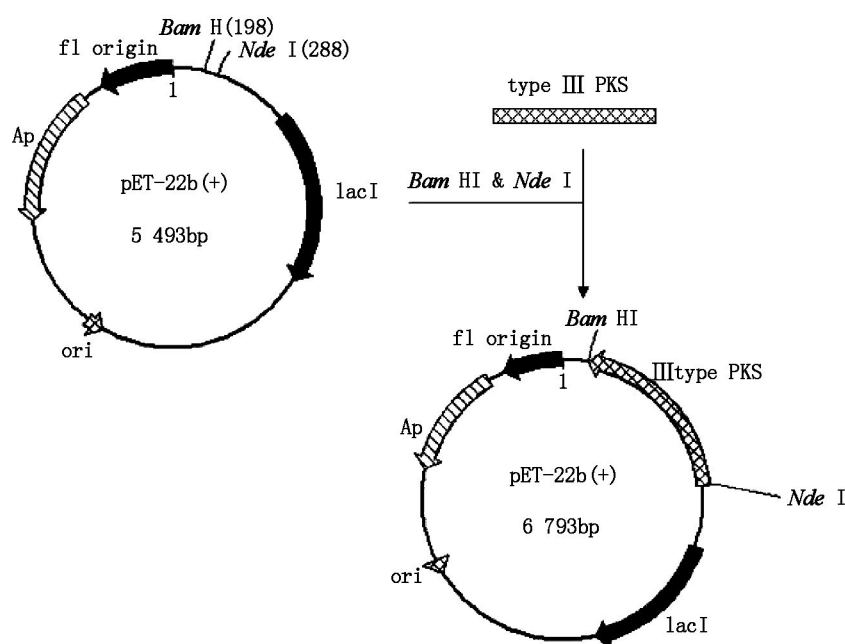


图5 重组质粒 pET-22b(+) -PKSIII 的构建

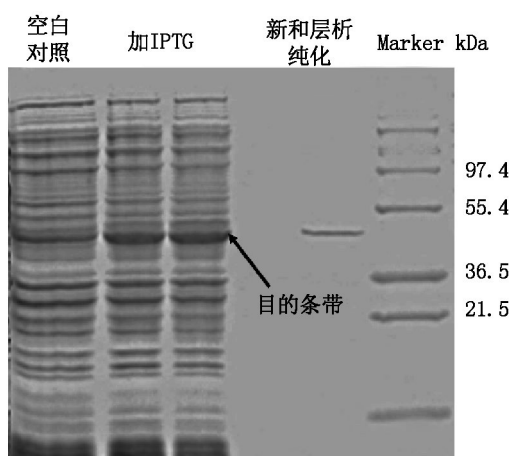


图6 SDS-PAGE 电泳图

### 3 讨论

竹红菌素作为新型的光敏化合物有抗肿瘤、抑菌杀虫等作用,应用前景广泛;但是作为次级代谢产物,天然产生的竹红菌素产量过低,因此研究该色素的合成途径可为将来的工业化生产奠定基础. 本研究采用本实验室分离得到的蛇足石杉内生真菌 *Shiraia* sp. Slf14 作为研究对象,已经对其进行全基因组测序,经过生物信息学分析推测出该菌体内参与竹红菌素合成的一个关键酶基因,即III型PKS. 该基因通过体外原核表达及纯化,已经成功表达了蛋白质. 目前,极少有报道从植物内生真菌中表达出III型聚酮合酶,被克隆和鉴定的一般为植物III型

PKS<sup>[7-9]</sup>. 因此,可以此为基础,继续探究该酶的作用机制,寻找切入点以提高竹红菌素的胞外产量.

#### 4 参考文献

- [1] 张俭,马岚. 竹红菌素研究的进展 [J]. 云南大学学报: 自然科学版 2003 25: 184-188.
- [2] Deng Hong, Xie Jie, Zhao Jingquan. Drug-delivery and multifunction possibilities of hypocrellin photosensitizers [J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences 2015, 8(1): 1-13.
- [3] Jiang Yuan, Albert Wingnan Leung, Wang Xinna, et al. Effect of photodynamic therapy with hypocrellin B on apoptosis, adhesion and migration of cancer cells [J]. International Journal of Radiation Biology 2014, 90(7): 575-579.
- [4] 孙宇辉,邓子新. 聚酮化合物及其组合生物合成 [J]. 中国抗生素杂志 2006 31(1): 6-18.
- [5] 陈路劫,赵薇,连云阳. 聚酮合酶与药物筛选的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志 2012 37(9): 655-661.
- [6] 严少华,郭亮. 真菌聚酮合酶分类进展及其应用 [J]. 江西科学 2006 24(2): 170-172.
- [7] Li Jingni, Luo Yunzi, Lee Jung-Kul, et al. Cloning and characterization of a type III polyketide synthase from *Aspergillus niger* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2011(21): 6085-6089.
- [8] 许杨,魏康霞. 真菌聚酮合酶基因的研究进展 [J]. 食品与生物技术学报 2008 27(2): 1-5.
- [9] 张萍,陈国神. 植物 III 型聚酮合酶的研究进展 [J]. 中草药 2008 39(2): 309-313.
- [10] 生书晶,赵树进. 植物 III 型聚酮合酶的分子机制与应用前景 [J]. 生物工程学报 2005 25(11): 1601-1607.
- [11] 吕鹤书,柳春梅,路平,等. 植物类型 III 聚酮合酶超家族晶体结构与功能 [J]. 生物工程学报 2012 28(1): 1-14.
- [12] 马兰青,师光禄,叶和春,等. 植物类型 III 聚酮合酶超家族基因结构、功能及代谢产物 [J]. 生物工程学报, 2010 26(11): 1482-1492.
- [13] 黎小军,谢莲萍,刘建宏,等. 产脂肪酶菌株的筛选、鉴定与产酶条件优化 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2014 38(1): 14-18.
- [14] 幸鹏,刘玉琳,喻海琼,等. 粉尘螨过敏原脂肪酶的表达、纯化及生物信息学分析 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2015 39(1): 101-105.
- [15] Frank Gross, Nora Luniak, Olena Perlova, et al. Bacterial type III polyketide synthases: phylogenetic analysis and potential for the production of novel secondary metabolites by heterologous expression in pseudomonads [J]. Arch Microbiol 2006 185(1): 28-38.
- [16] 常魁敏,邓华祥,管政兵,等. 竹黄菌中一个聚酮合酶基因的初步研究 [J]. 生物技术 2014 24(5): 1-4.

### The Prokaryotic Expression, Purification and Bioinformatics of Type III Polyketide Synthase from *Shiraia* sp. Slf14, Which Is an Endophytic Fungus of *Huperzia serrata*

PENG Silu<sup>1</sup>, YANG Huilin<sup>1,2</sup>, LI Erhan<sup>1</sup>, WANG Xiaolan<sup>1</sup>, ZHU Du<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Lab of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China;

2. Jiangxi Science & Technology Normal University, Jiangxi Key Laboratory of Bioprocess, Nanchang Jiangxi 330013, China)

**Abstract:** The hypocrellins are a unique class of perylenequinones characterized by a pentacyclic conjugated chromophore giving rise to photoactivity. One type III PKS gene was obtained from *Shiraia* sp. Slf14, which is the key synthase in the product process of the hypocrellin. The total RNA as the template to amplify the type III PKS fragment was used and then was cloned into pMD<sup>TM</sup>19-T vector. After identify, type III PKS gene was ligated into pET-22b(+) to obtain recombinant expressing vector pET-22b(+) -PKSIII. The expression vector into *Escherichia coli* BL21(DE3) and cultured positive colonies of *E. coli* in liquid LB medium were introduced. Then the objective protein were obtained and isolated for purification using a Ni-NTA affinity chromatography. It can lay the foundation for the catalytic activity of type III polyketide synthase.

**Key words:** endophytic fungus; polyketide synthase; hypocrellin; cloning and expression

(责任编辑: 刘显亮)