

利玛原甲藻中聚酮合酶基因克隆与分析

汤敬谦¹, 李 挺³, 杨维东^{1,2,*}, 刘洁生^{1,2}, 李宏业¹

(1. 暨南大学生物工程学系, 广州 510632; 2. 水体富营养化与赤潮防治广东省高等学校重点实验室, 广州 510632;

3. 广东省微生物研究所, 广州 510070)

摘要:为探讨聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 基因与藻毒素合成的关系, 揭示 PKS 基因在赤潮毒素合成中的作用, 采用兼并引物, 通过 PCR 技术获得利玛原甲藻 (*Prorocentrum lima*) 可能存在的 I 型 PKS 基因; 并对所获得 PKS 基因的同源性进行了分析, 构建了基于 PKS 氨基酸序列的系统进化树; 采用 RT-PCR 技术分析了 PKS 基因在利玛原甲藻中的表达状况; 并通过多聚腺苷酸 RNA 的扩增、细菌的分离鉴定、限制性内切酶酶切、Southern blotting 等技术对 PKS 基因进行了分析。结果表明, 利玛原甲藻中 PKS 基因与海洋原甲藻聚为一支, 在利玛原甲藻中有显著表达; 以 Oligo (T) 引物进行 RT-PCR 扩增时, 可出现 18S rRNA 和 PKS 基因相应条带; 限制性内切酶酶切和 Southern blotting 结果显示, 该基因中存在明显的甲基化; 16S rRNA 基因序列分析显示, 从利玛原甲藻培养液中分离到的细菌与海洋放线菌假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*) 基因序列同源性达到 99%, 该菌株中并不存在 PKS 基因。结果显示, 所获得的 PKS 基因是利玛原甲藻聚酮合酶基因, 基因序列已提交 GenBank (EF521601); PKS 可能在腹泻性贝毒合成中起着关键作用。

关键词:利玛原甲藻; 聚酮合酶; 基因克隆; 分子杂交

文章编号: 1000-0933 (2009) 05-2383-08 中图分类号: Q178, Q945, Q781 文献标识码: A

Cloning and analysis of PKS gene from *Prorocentrum lima*

TANG Jing-Qian¹, LI Ting³, YANG Wei-Dong^{1,2,*}, LIU Jie-Sheng^{1,2}, LI Hong-Ye¹

1 Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 Guangdong Province's High Education Key Laboratory of Eutrophication and Red Tide Control, Guangzhou 510632, China

3 Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29 (5): 2383 ~ 2390.

Abstract: In order to provide information for the HAB toxin synthesis mechanism and explore the role of polyketide synthase in the synthesis of HABs toxins, potential polyketide synthase (PKS) gene in *Prorocentrum lima* was amplified by PCR using degenerate primers. The homology analysis of the PKS gene in related species was conducted and phylogenetic tree was constructed using software of DNASTar and DNAMAN. The expression of PKS in *P. lima* was determined using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Multiple approaches including amplification of polyadenylate RNA, resistance to methylation-sensitive restriction enzymes, Southern blotting, and isolation of bacteria from cultures were performed to eliminate the possibility of PKS in associate bacteria. Results showed that type I polyketide synthase may be present in *Prorocentrum lima*, which grouped strongly with *P. mican*. High level expression of PKS in *Prorocentrum lima* were observed. 18S rRNA and PKS gene were amplified successful by RT-PCR using Oligo (T). The analysis of 16S rRNA sequece showed 99% homology between bacteria from *P. lima* culture and marine actinomycete *Pseudonocardia*. However, PKS gene was not obtained by PCR and no expression of PKS was detected by RT-PCR in the bacteria. These results suggested that the PKS gene was *P. lima* originated but not bacteria. PKS might play an important role in the production of

基金项目:国家自然科学基金-广东省联合基金重点资助项目 (U0733006); 广东省自然科学基金资助项目 (031885); 广东省自然科学基金重点资助项目 (8251063201000001); 国家重点基础研究发展规划 973 资助项目 (2001CB409710);

收稿日期: 2008-00-00; 修订日期: 2009-03-11

致谢: 本文在实验技术和方法上得到华南师范大学生命科学学院李洪清教授和杨转英博士的大力支持, 特此感谢!

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tywd@jnu.edu.cn

diarrhetic shellfish poisoning toxins. The sequence of PKS has been accepted by GenBank (accession NO: EF521601).

Key Words: *Prorocentrum lima*; polyketide synthases; clone

赤潮毒素不仅对全球渔业资源、生态环境及水产养殖造成不同程度的危害,而且严重威胁着人类的健康和生命安全,但同时又是发现新药物重要导向化合物及筛选、研制新药的重要来源。因此,阐明贝毒生物合成机制具有重要的理论和现实意义^[1]。赤潮毒素主要包括 6 种,其中腹泻性贝毒、神经性贝毒、西加鱼毒素和部分溶血毒素为大环内酯或聚酮类化合物。

目前认为,聚酮类化合物是由聚酮合酶(polyketide synthetase, PKS)催化完成的,同时 PKS 在大环内酯类化合物合成中发挥重要作用^[2,3]。聚酮合酶可通过催化前体物质进行反复的缩合反应,形成多种聚酮体,再经过甲基化、氧化还原、糖基化等修饰反应形成各种各样结构复杂的聚酮类化合物^[4]。

聚酮合酶可分为 3 类: I 型、II 型和 III 型^[5],目前报道最多、研究较为透彻的是 I 型 PKS,但多见于对聚酮类化合物化学合成途径的相关研究报道^[6,7],而基因水平上的研究还相当匮乏。PKS 基因与微藻毒素生成之间的关系如何?目前还很不清楚,所报道的微藻 PKS 基因序列非常有限,仅见海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)、环沟藻(*Gyrodinium* sp.)、点状念珠藻(*Nostoc punctiforme*)和伪枝藻(*Scytonema* sp.)等少数几种藻类。研究发现,在腹泻性贝毒产毒藻、大环内酯溶血毒素产毒藻和神经性贝毒产毒藻中均发现 PKS I 型基因^[8,9]。同时,在麻痹性贝毒产毒藻链状裸甲藻(*Gymnodinium catenatum*)和非产毒藻海洋原甲藻中也发现有 PKS I 型基因的存在^[10]。然而,许多聚酮类毒素产毒藻无法做到在无菌条件下进行培养,所以就产生了克隆所得到的 PKS 基因是来自于藻类还是源自共生细菌的疑问。早在 1991 年就有人提出,甲藻的多聚酮毒素是由于细菌存在而产生的^[11]。但是,到目前为止,还没有从甲藻中分离得到聚酮类毒素产毒细菌的相关报道。

利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*)为甲藻门(Pyrrophyta)。原甲藻属(*Prorocentrum*)。主要产生腹泻性贝毒,广泛分布于我国各大海域。本研究试图采用兼并引物,通过 PCR 技术获得利玛原甲藻 I 型 PKS 基因,通过多聚腺苷酸 RNA 的扩增、细菌的分离鉴定、限制性内切酶酶切、Southern blotting 等技术对 PKS 基因进行分析,明确其归属;分析、比较其同源性和表达情况,以期揭示 PKS 基因在赤潮毒素合成中的作用,阐明赤潮毒素生物合成机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*) CCMP2579 由美国 Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) 提供。

菌种 top-10 大肠杆菌(*Escherich coli*)取自 Invitrogen 公司的 TOPO TA Cloning Kit for Sequencing 试剂盒。

1.2 藻的培养

利玛原甲藻培养采用 f/2 培养基。培养液置于温度(21 ± 1)℃、光照强度 4000 lx、光暗比 12 h:12 h 的智能生物人工气候培养箱中培养。

1.3 DNA 提取与基因组 PKS 基因的扩增

取平台期藻细胞提取基因组 DNA, DNA 的提取采用 CTAB 提取法,具体操作按照 TaKaRa DNA 提取试剂盒 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 进行。

用于扩增 PKS 基因的兼并引物参考文献^[12],该兼并性引物是根据 PKS I 型 KS 保守区域设计而成的。上游引物为:GTGCCGGTNCRTGNGYYTC;下游引物为:GCGATGGAYCCNCARCARMG。18S rRNA 基因保守区域基因是真核生物共有的基因,故作为对照。引物参照文献^[13],上游引物为:GGTTGATCCTGCCAGTACTCATATGCCTG;下游引物为:GATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACC。

PCR 扩增反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 ~ 1.5 min,共 35 个

循环,最后于 72 ℃ 延伸 10 min。反应在 BIOER XP CYCLER 基因扩增仪上进行。2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,拍照。

1.4 PKS 基因的转化克隆与序列分析

采用 TIANgel Midi Purification Kit 试剂盒割胶回收 PCR 产物后,取 1 μ l 回收的 PCR 产物、1 μ l PMD18-T vector、5 μ l Ligation Mix,补充 3 μ l dH₂O,16℃ 连接过夜。取连接产物 10 μ l 转化到 100 μ l *E. coli* top10 感受态细胞。取 400 μ l 转化产物涂布于含 LB/AMP/X-GAL/IPTG 平板培养基的筛选平板上,37℃ 正面向上放置 30min 后倒置培养 12~16 h。挑取白色菌落,作菌落 PCR 鉴定。将筛选得到的阳性克隆,送上海生工进行测序。序列在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行 BLASTx(用核酸序列检索蛋白质序列数据库)比对。利用生物软件 DNASTar 和 DNAMAN 等绘制同源性图谱和系统进化图谱。

1.5 RNA 的提取与 RT-PCR

总 RNA 的提取采用 Qiagen 公司植物 RNA 提取试剂盒 RNeasy Plant Mini,具体步骤参照试剂盒说明书和参考文献^[14]。

cDNA 第一链的合成参考 TaKaRa 公司 RNA LA PCRTM Kit(AMV) Ver. 1.1 RT-PCR 试剂盒说明书。根据所得基因序列,设计特异性引物用于扩增 PKS 基因。上游引物为:AACCACGCCACAGCCTTCG,下游引物为:CGGACTCTTCGCTTTCACG,目的片段大小为 468 bp;18S rRNA 作为参照,采用 Oligo 引物和 Random 引物;实验中同时采用兼并性引物和特异性引物用来扩增 PKS 基因。PCR 反应体系和条件参照 TaKaRa 公司 RNA LA PCRTM Kit(AMV) Ver. 1.1 RT-PCR 试剂盒进行。

1.6 PKS 基因的分析与鉴定

采用多聚腺苷酸 RNA 扩增、限制性内切酶酶切和 Southern blotting 等技术对 PKS 基因进行分析,并对培养液中的细菌进行分离鉴定。

采用 TaKaRa 公司 RNA LA PCRTM Kit(AMV) Ver. 1.1 RT-PCR 试剂盒,分别用 Oligo 引物和 Random 引物合成 cDNA 第一链。以 cDNA 第一链做模板分别扩增 PKS 基因、18S rRNA 和 16S rRNA;用 TaKaRa 公司 Msp I 和 Hap II(两种酶均识别序列 CCGG)对利玛原甲藻基因组 DNA 进行酶切。酶切反应体系参照说明书,37℃ 酶切过夜;以地高辛标记的长度为 468bp 的 PKS 基因做探针,与 Msp I 或 Hap II 酶切后的基因组 DNA 进行杂交。杂交在 FYY-3 型分子杂交仪上进行,具体步骤参照文献^[15]。

1.7 培养液中细菌的分离、细菌基因组 DNA 的提取及 16S rRNA 的扩增

将利玛原甲藻藻液分别涂布于含有 f/2 培养基的 YG 培养基、不含 f/2 培养基的 YG 培养基以及琼脂培养基中,20℃ 培养两周。挑取单克隆菌落进行 3 次传代培养,以确保细菌为单一菌株。

细菌基因组 DNA 的提取参照 TIANGEN TIANamp Bacteria DNA Kit 说明书进行;16S rRNA 引物参考文献^[10]。上游引物为:GGAGAGTTTGATCMTGGCT;下游引物为:ACGGYTACCTTGTTACGACTT。PCR 扩增反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1~1.5min,共 35 个循环,最后于 72 ℃ 延伸 10 min。反应在 BIOER XP CYCLER 基因扩增仪上进行。2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,拍照。

PKS 基因的扩增条件同前。

2 结果与分析

2.1 利玛原甲藻中 PKS 基因的克隆

2.1.1 利玛原甲藻中 PKS 基因的克隆

图 1 为利玛原甲藻中 PKS 基因的 PCR 扩增结果。从图中可以看出,利玛原甲藻中扩增出大小在 700 bp 左右。但有一条约 500 bp 的条带,测序发现该条带不属于 PKS 基因,这与文献中的情况类似^[8]。

2.1.2 PKS 基因的序列比对及同源性分析

表 2 为利玛原甲藻 PKS 基因的 BLAST 结果。可以看出,利玛原甲藻 PKS 基因与海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)的 β -酮脂酰合酶基因同源性达 99%,与点状念珠藻(*Nostoc punctiforme* PCC 73102)的聚酮合酶及相关

蛋白同源性达 77% ;因此,可以确定本研究所获得的序列为 PKS 基因,序列已提交 GenBank,接收号为 EF521601。

图 2 为 DNAMAN 软件构建的 PKS 的系统进化树。从图中可以看出,利玛原甲藻和海洋原甲藻聚为一支,与点状念珠藻的同源性也较高。

2.1.3 PKS 基因在利玛原甲藻中的表达

提取总 RNA,反转录后使用特异性引物进行扩增,PCR 产物大小为 468 bp 左右(图 3),与预期产物大小一致,表明利玛原甲藻中 PKS 基因有显著表达。

2.2 PKS 基因的分析

2.2.1 多聚腺苷酸扩增结果分析

提取实验室培养利玛原甲藻总 RNA,进行多聚腺苷酸扩增,结果如图 4 所示。可以看出,用随机引物进行 RT-PCR 扩增时,18S rRNA、16S rRNA 和 PKS 基因均有目的条带出现,说明利玛原甲藻培养液中可能存在细菌。用 Oligo(T)引物进行 RT-PCR 扩增时,则无 16S rRNA 表达,而 18S rRNA 和 PKS 基因均有表达,提示 PKS 基因来源于利玛原甲藻,而非共生细菌。

2.2.2 培养液中细菌的分离与 PKS 基因的扩增

图 5 为从利玛原甲藻培养液中分离到的细菌的形态图。从细菌形态上看,该菌株基质菌丝由直径 0.4 ~ 2.6μm 的无隔菌丝组成,形成一个坚实的黄色团块,嵌入培养基中。气生菌丝呈白色,较基质菌丝细,约 0.4 ~ 1.8μm,分支并且在末段菌丝顶端的后面产生一次缩缢。根据形态学特征可大致确定该菌株为放线菌。进一步分析该菌株 16S rRNA 基因序列,在 NCBI 上进行序列比对发现,该菌株与海洋放线菌假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)基因序列同源性达到 99%,可初步确定该菌株可能属于假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)的一株。

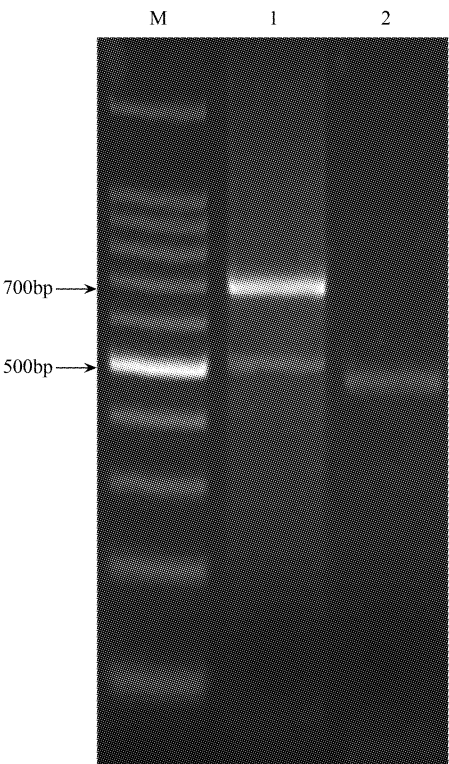


图 1 利玛原甲藻中 PKS 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 The results of polymerase chain reaction for PKS gene from *Prorocentrum lima*
M, Marker; Lane 1. Degenerate primer; Lane 2. specific primer

表 2 PKS 基因 BLAST 结果
Table 2 The result of PKS gene blasting

甲藻 Dinoflagellate	同源蛋白 Homologous protein	同源性(%) Homology	E 值 E value	接收号 Accession
利玛原甲藻 Prorocentrum lima	β-酮脂酰合酶 <i>Prorocentrum micans</i>	99	9e-125	ABI34078
	聚酮合酶和相关蛋白 <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	77	4e-72	ZP_00108796
	β-酮脂酰合酶 <i>Polyangium cellulosum</i>	72	5e-67	ABD17650
	I 型聚酮合酶 <i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	71	1e-65	ABF89696
	β-酮脂酰合酶 <i>Scytonema</i> sp. PCC 7110	71	2e-65	AAW55366
	β-酮脂酰合酶 <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	73	5e-65	ABM11841
	聚酮合酶 <i>Nostoc</i> sp. ATCC 53789	71	5e-65	AAW55377
	β-酮脂酰合酶 <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	71	2e-64	ABA24342

该菌株 16S rRNA 和 PKS 基因的扩增结果如图 6。结果显示,该细菌基因组中可以扩增出 16S rRNA,说

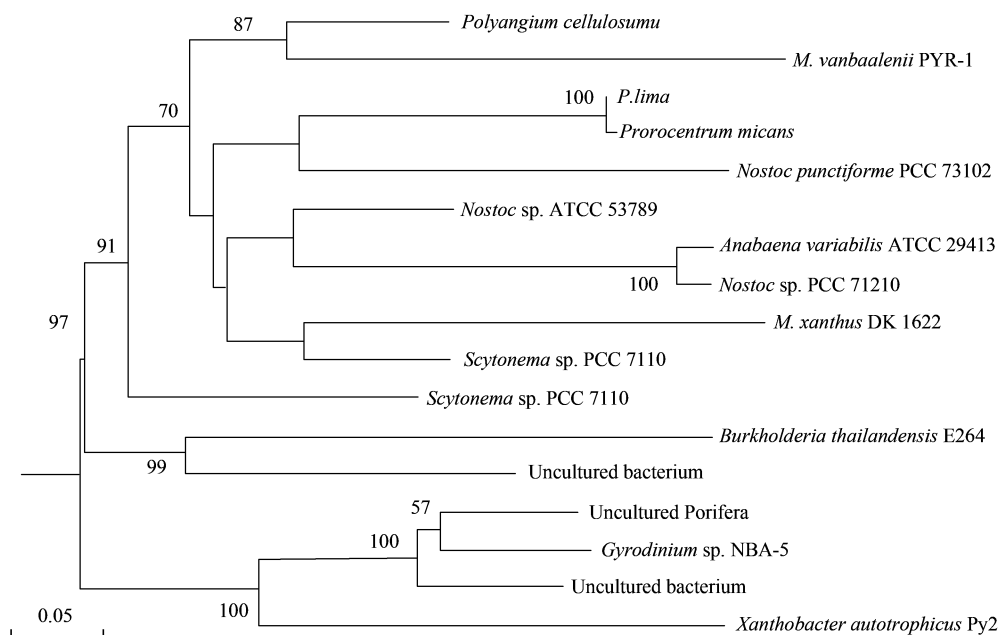


图2 利玛原甲藻与其他已知物种 PKS 的系统树

Fig. 2 Neighbour-joining tree based on amino acid sequences of *P. lima* and the other species. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap

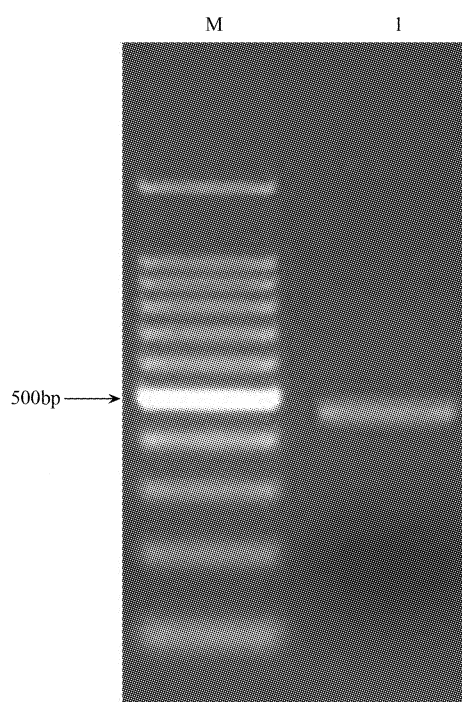


图3 利玛原甲藻中 PKS 基因的 RT-PCR 结果

Fig. 3 Result of RT-PCR of PKS gene from *P. lima*

M: Marker; 1: 特异性引物扩增的 PKS M; 100bp DNA ladder, Lane1; PKS gene with specific primer

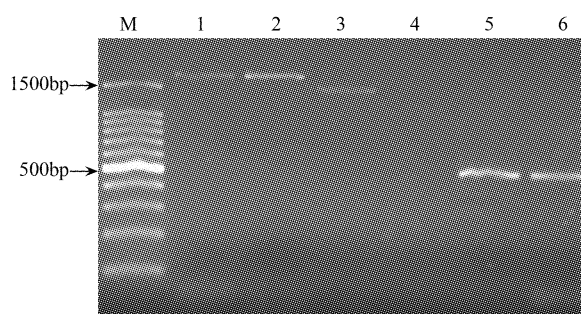


图4 不同反转录引物的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 4 Result of RT-PCR with different reverse transcriptase primers for 18S rRNA, 16S rRNA and PKS

M: Marker; 1: 18S rRNA (Random 引物); 2: 18S rRNA (Oligo(T) 引物); 3: 16S rRNA (Random 引物); 4: 16S rRNA (Oligo(T) 引物); 5: PKS (Random 引物); 6: PKS (Oligo(T) 引物) M: 100bp marker; Lane1: 18S rRNA for Random primer for the first-strand cDNA synthesis; Lane2: 18S rRNA for Oligo primer for the first-strand cDNA synthesis; Lane3: 16S rRNA for Random primer for the first-strand cDNA synthesis; Lane4: 16S rRNA for Oligo primer for the first-strand cDNA synthesis; Lane5: PKS for Random primer for the first-strand cDNA synthesis; Lane6: PKS for Oligo primer for the first-strand cDNA synthesis

明提取的细菌 DNA 质量并不存在问题;但是未能扩增出相应大小的 PKS 基因片段,表明该菌株中可能并不存在 PKS 基因。

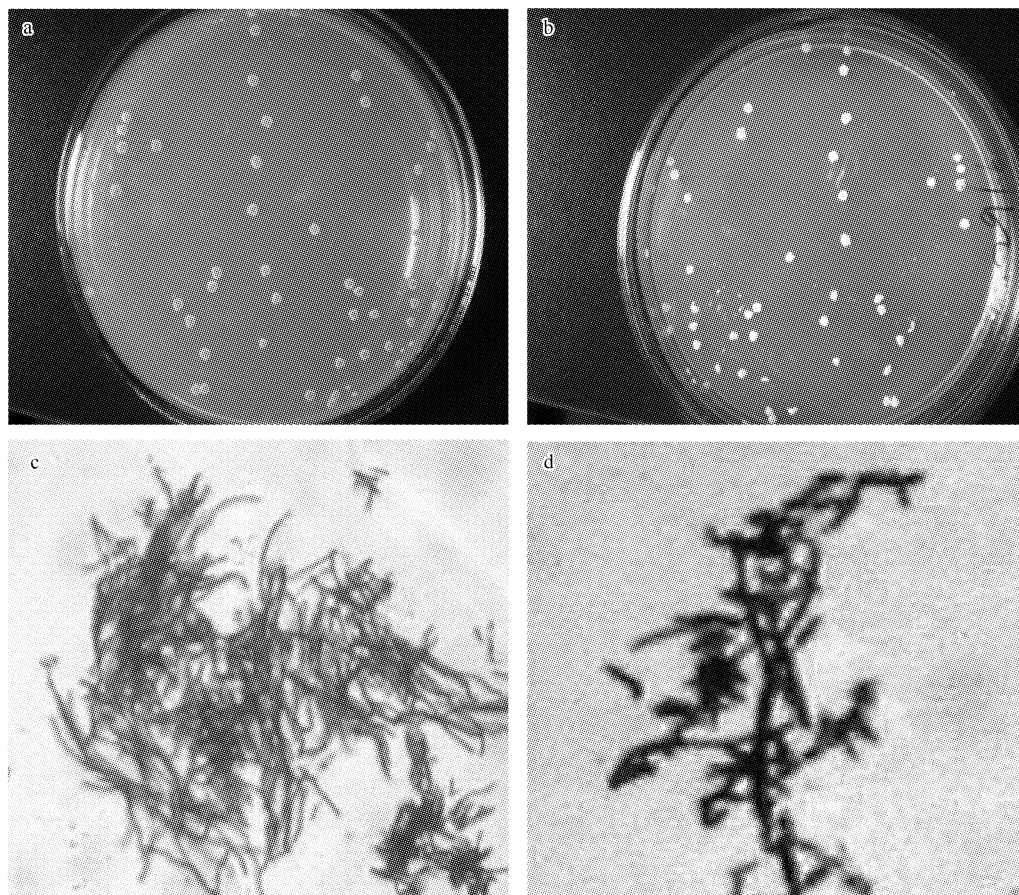


图5 细菌形态

Fig. 5 Morphous of the bacteria

(a) 基质菌丝 matrix hypha; (b) 气生菌丝 aerial hypha; (c) 显微镜下基质菌丝 matrix hypha under the electron microscope; (d) 显微镜下气生菌丝 aerial hypha under the electron microscope

2.3 限制性酶切和 Southern blotting 检测结果

限制性酶切和 Southern blotting 结果如图 7(a, b) 所示。从图 7a 可以看出,虽然 Msp I 和 Hap II 均能有效酶切从实验室培养的利玛原甲藻中提取的基因组 DNA,但不受甲基化影响的内切酶 Msp I 酶切效果明显强于受甲基化影响的内切酶 Hap II,说明基因组 DNA 存在严重的 CG 甲基化。Southern 杂交检测结果(图 7b)显示,Msp I 酶切基因组 DNA 与探针杂交出现一条约 500bp 条带,内切酶 Hap II 酶切基因组 DNA 则出现两条带,大小分别约 590bp 和 500 bp。根据探针序列,第 1、2 泳道还应出现一条大小为 90 bp 的带。由于杂交信号太弱,未能观察到相应条带出现。第 2 泳道 590 bp 条带的出现说明 Hap II 受到甲基化影响,没能将 PKS 基因完全酶切,提示 PKS 基因也存在一定程度的 CG 甲基化。与此相应,细菌基因组 DNA 则未杂交出相应条带(第 3 泳道)。这些结果进一步表明,PKS 基因来自利玛原甲藻,而非共生细菌。

3 讨论

在目前已知的 4000 多种现存的和化石甲藻中,大约发现有 25 种甲藻能够产生 45 种不同的多聚酮类或大环内酯类化合物。但迄今为止,并未鉴定出任何基因或酶类与甲藻或其他藻类产生的多聚酮化合物的生物合成相关。而从其化合物复杂的化学结构上推断,参与此类化合物合成的可能为 I 型 PKS。Snyder^[9] 等利用根据 I 型 PKS 的 β -ketosynthase 区域的编码基因设计的兼并引物,通过 PCR 和 RT-PCR,对 9 株甲藻进行 PKS 基因的分析,发现有 7 株的扩增产物与 I 型 PKS 具有同源性,包括利玛原甲藻、短凯伦藻(*Karenia brevis*)、*P. hoffmanianum*、*Amphidinium operculatum* 和 *Symbiodinium*。Kubota 等^[10] 发现,13 种前沟藻(*Amphidinium*) 中有 5

种含有 PKS 基因,其余 8 种均未分离出前沟藻内酯,提示 PKS 基因可能与前沟藻内酯毒素(amphidinolide H)的合成有关。前沟藻内酯毒素主要来自于前沟甲藻属,是典型的大环内酯类化合物。

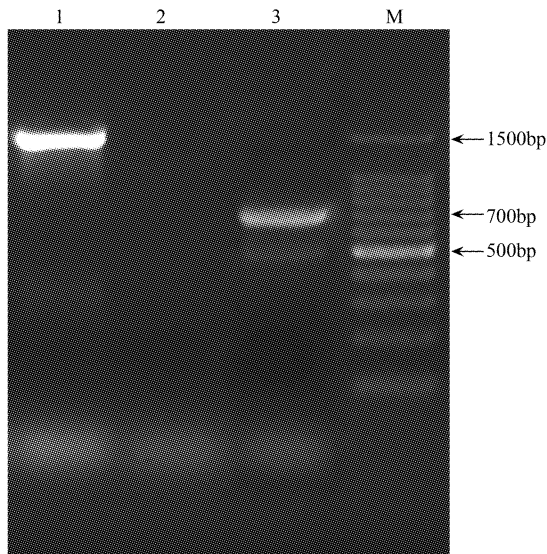


图6 细菌中 PKS 基因的扩增结果

Fig. 6 The results of polymerase chain reaction for PKS gene from the bacteria isolated from culture

1: 16S rRNA; 2: 细菌基因组 PKS; 3: 利玛原甲藻基因组 PKS; M. Marker Lane 1: 16S rRNA; Lane 2: PKS gene from bacteria; Lane 3: PKS gene from *P. lima*; M. 100bp ladder

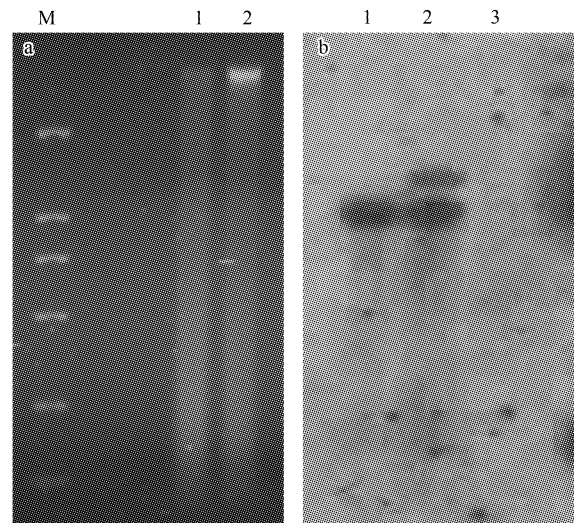


图7 限制性酶切和 Southern blotting 结果

Fig. 7 Results of restriction enzymes digestion and Southern blotting (a) 限制性内切酶酶切结果; (b) PKS 基因 Southern blotting 分析; M. Marker 1. Msp I; 2. Hap II; 3. 细菌基因组 (a) Results of restriction enzymes digestion; (b) Southern blotting; M: 2000 bp ladder; Lane 1: Msp I; Lane 2: Hap II; Lane 3: Total DNA of bacteria

意外的是,能够产生石房蛤毒素(brevetoxins, STX)的链状裸甲藻(*Gymnodinium catenatum*)也能够扩增出 PKS 基因^[9],并且 PCR 结果发现藻类培养基中能够扩增出 16S rRNA 基因,这就使研究者产生了 PKS 基因的存在是由于细菌存在的怀疑。

由于原核生物 mRNA 不具有 Poly(A)尾,而大多数真核生物 mRNA 具有 Poly(A)尾,所以在研究中,可以用 Oligo(T)为引物合成 cDNA 第一链,然后进行 PCR 反应,以鉴定预期目的基因源自真核生物还是原核生物。很多真核生物含有在特定位点(CG 和 CNG)甲基化的 DNA 甲基化酶,可以使上述序列中胞嘧啶 C⁵位上甲基化,而在原核生物细菌中绝大多数含有两种甲基化酶,即 dam 甲基化酶和 dcm 甲基化酶。利用甲基化部位的不同,就可以选择相应的限制性内切酶对基因组 DNA 进行酶切。有些限制性内切酶(如 Msp I 和 Hap II)可以识别相同的酶切位点,但是由于来源的不同使得两种酶对甲基化的敏感性不同。受甲基化影响的内切酶(Hap II)即便能够识别相应位点,也几乎无法切割被甲基化的部分,进而就通过 Southern blotting 技术鉴定基因中是否存在 CG 甲基化。Snyder 等通过这些分析技术证明从短凯伦藻中克隆获得的 PKS 基因源于短凯伦藻,而非其共生细菌^[10]。

本研究采用兼并引物扩增获得 PKS 基因,同源性分析结果显示,该基因与海洋原甲藻聚为一支,与点状念珠藻同源性也很高。多聚腺苷酸 RNA 的扩增、基因组 DNA 限制性内切酶酶切和 Southern blotting 等实验表明,该基因来自利玛原甲藻,而非共生细菌。进一步的表达分析显示,利玛原甲藻中 PKS 基因有显著表达,说明 PKS 可能是腹泻性贝毒合成所必需的。

不少学者认为,腹泻性贝毒是由藻细胞内共生细菌生成的,同时已有不少从利玛原甲藻中分离得到海洋细菌的报道^[16,17]。但 Zhou 等^[18]对利玛原甲藻超微结构研究显示,这种共生细菌可能并不存在。腹泻性贝毒在无菌、有菌环境下均可由 *Prorocentrum* 产生,细菌可能并不参与腹泻性贝毒的生物合成^[19]。本研究结果显示,利玛原甲藻培养液中确实存在共生细菌,所分离细菌与海绵中分离得到的海洋放线菌假诺卡氏菌^[20,21]同

源性达到 99%, 但所分离菌株中并不存在 PKS 基因。由于聚酮类化合物是由聚酮合酶催化完成的, 而利玛原甲藻中确实存在 PKS 基因并有显著表达。因此, 可以认为腹泻性贝毒是由利玛原甲藻产生的, 细菌在其中可能扮演某种作用, 进一步研究尚需进行。

References:

- [1] Plumley F G. Marine algal toxins: Biochemistry, genetics and molecular biology. *Limnol Oceanogr*, 1997, 42(5, part 2): 1252—1264.
- [2] Hopwood D A, Sherman D H. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual Review Genetics*, 1990, 24: 37—62.
- [3] Katz L, Donadio S. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annual Reviews in Microbiology*, 1993, 47: 875—912.
- [4] Zhu F, Qiao J J. Progress in substrate specificity of polyketide synthase. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2006, 31(11): 641—645.
- [5] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7: 285—295.
- [6] Moore B S. Biosynthesis of marine natural products: microorganisms and macroalgae. *Natural Product Reports*, 1999, 16: 653—674.
- [7] Pfeifer B A, Khosla C. Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65: 106—118.
- [8] Snyder R V, Gibbs P D L, Palacios A, *et al.* Polyketide synthase genes from marine dinoflagellates. *Marine Biotechnology*, 2003, 5: 1—12.
- [9] Snyder R V, Guerrero M A, Sinigalliano C D, *et al.* Localization of polyketide synthase encoding genes to the toxic dinoflagellate *Karenia brevis*. *Phytochemistry*, 2005, 66: 1767—1780.
- [10] Kubota T, Iinuma Y, Kobayashi J. Cloning of polyketide synthase genes from amphidinolide-producing dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29(7): 1314—1318.
- [11] Rausch de Traubenberg C, Lassus P. Dinoflagellate toxicity: are marine bacteria involved. Evidence from the literature. *Marine Microbial Food Webs*. 1991, 5: 205—226.
- [12] Moffitt M C, Neilan B A. On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 196(2): 207—214.
- [13] Rowan R, Powers D A. Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89: 3639—3643.
- [14] Gehrig H H, Winter K, Cushman J, *et al.* An improved RNA isolation method for Succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, 18: 369—376.
- [15] Dong Y M. Promoter trapping and T-DNA tagging in rice (*Oryza Sativa* L.). The dissertation for master's degree from South China Normal University, 2007.
- [16] Lafay B, Ruimy R, Rauschde T C, *et al.* *Roseobacter algicola* sp. nov, a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(2): 290—296.
- [17] Traubenberg C R, Geraud M L, Soyer M O, *et al.* The toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and its associated bacteria. *European Journal of Protistology*, 1995, 31(3): 318—326.
- [18] Zhou J, Fritz L. Ultrastructure of two toxic marine dinoflagellates, *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum maculosum*. *Phycologia*, 1993, 32(6): 444—450.
- [19] Quilliam M A. Phycotoxins. *Journal of AOAC International*, 1999, 82(3): 73—81.
- [20] Zhang H T, Jin Y, Yu X J, *et al.* 16S rDNA-RFLP analysis of actinomycetes associated with marine sponge *Hymeniacidon perleue*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(6): 828—831.
- [21] Zhang H T, Lee Y K, Zhang W, *et al.* Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleue*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, 90: 159—169.

参考文献:

- [4] 朱峰, 乔建军. 聚酮合酶底物专一性的研究进展. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(11): 641—645.
- [15] 董玉梅. 水稻启动子捕获及 T-DNA 标签技术的研究. 华南师范大学硕士论文, 2007.
- [20] 张海涛, 靳艳, 虞星炬, 等. 16S rDNA-RFLP 分析繁茂膜海绵可培养放线菌的多样性. *微生物学通报*, 2005, 45(6): 828—831.