

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20240053

网络首发日期: 2024-07-15; 网络首发地址: <http://link.cnki.net/urlid/12.1355.N.20240711.1635.001>

海洋草生链霉菌 BAS-28 次级代谢产物与生物合成途径的分析鉴定

刘竹青¹, 王俊潇², 徐飞², 罗学刚¹

(1. 天津科技大学生物工程学院, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457;

2. 浙江大学医学院药物生物技术研究所, 杭州 310000)

摘要: 选取 1 株南海来源的菌株, 通过形态学和分子生物学鉴定种属, 单菌株多化合物 (one strain many compounds, OSMAC) 策略激活沉默基因簇, 采用多种色谱分离技术分离化合物, 将波谱数据与文献比对, 确定化合物结构, 最后通过 antiSMASH 分析生物合成基因簇, 推导生物合成途径。16S rDNA 基因序列系统发育分析鉴定该菌为草生链霉菌 (*Streptomyces pratensis*), 从发酵粗提物中分离得到化合物 mirubactin B (1)、mirubactin C (2)、苯那斯汀 (3), 并成功找到编码化合物的基因簇。化合物 1 和 2 属于非核糖体肽 (non-ribosomal peptide synthase, NRPS) 铁载体, 在微生物生存和生长过程中发挥重要作用; 化合物 3 是一种聚 (ADP-核糖) 合成酶抑制剂, 其活性与多种疾病的发生机制有关。本研究对化合物 1—化合物 3 的生物合成途径进行分析, 为药物的研发提供重要参考依据。

关键词: 次级代谢产物; 链霉菌; OSMAC 策略; 生物合成基因簇

中图分类号: R914

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2025)04-0033-09

Secondary Metabolites and Underlying Biosynthetic Pathways of *Streptomyces pratensis* BAS-28 from Marine Sources

LIU Zhuqing¹, WANG Junxiao², XU Fei², LUO Xuegang¹

(1. College of Biotechnology, Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;

2. Institute of Pharmaceutical Biotechnology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China)

Abstract: In this study, a strain originating from the South China Sea was selected. Through morphological and molecular biology techniques, the species was first identified, and the strategy of one strain many compounds (OSMAC) was then employed to activate silent gene clusters. Various chromatographic separation techniques were further used to isolate compounds, and their structures were determined by comparing spectral data with literature. Finally, the biosynthetic gene clusters were analyzed using antiSMASH to deduce the biosynthetic pathways. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA gene sequence identified the strain as *Streptomyces pratensis*. Three monomeric compounds, namely mirubactin B (1), mirubactin C (2), and benadrostin (3) were isolated from the fermentation crude extract. The gene clusters encoding the synthesis of these compounds were successfully identified. Compounds 1 and 2 belong to non-ribosomal peptide synthase (NRPS) siderophores, playing an important role in the survival and growth of microorganisms. Compound 3 is an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, and its activity is related to the pathogenesis of various diseases. Through the analysis of the biosynthetic pathway processes of compounds 1 to 3, this study has provided important reference bases for drug development.

Key words: secondary metabolites; *Streptomyces*; OSMAC strategy; biosynthetic gene clusters

收稿日期: 2024-03-15; 修回日期: 2024-05-06

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2100600)

作者简介: 刘竹青 (1999—), 女, 山东德州人, 硕士研究生; 通信作者: 罗学刚, 教授, luoxuegang@tust.edu.cn

引文格式:

刘竹青, 王俊潇, 徐飞, 等. 海洋草生链霉菌 BAS-28 次级代谢产物与生物合成途径的分析鉴定[J]. 天津科技大学学报, 2025, 40(4): 33-41.

LIU Z Q, WANG J X, XU F, et al. Secondary metabolites and underlying biosynthetic pathways of *Streptomyces pratensis* BAS-28 from marine sources[J]. Journal of Tianjin university of science and technology, 2025, 40(4): 33-41.

自 20 世纪 20 年代青霉素被发现以来, 微生物次级代谢产物的开发对人类健康产生深远的影响^[1]。1981—2019 年由美国食品药品监督管理局审批上市^[2]的 1 881 种药物^[3]中, 微生物次级代谢产物作为先导化合物的有 916 种^[4]。放线菌是一种高 GC 含量的革兰氏阳性菌, 可产生丰富的次级代谢产物, 是抗生素等重要先导化合物的重要来源^[5]。链霉素、泰乐菌素、红霉素等都是从链霉菌^[6]中分离得到的次级代谢产物^[7], 这些抗生素^[8]已经广泛应用于医疗、化工、农业等领域, 为人类的生活提供了巨大便利^[9]。

随着基因组测序技术的不断进步^[10], 研究者发现菌株中的大部分基因簇都处于沉默状态, 致使一些次级代谢产物不表达或者产量很低^[11], 难以通过传统分离手段获得^[12]。因此, 科学家们开发出了单菌株多化合物(one strain many compounds, OSMAC)策略、异源表达^[13]、共培养等策略^[14], 激活沉默基因簇。其中, OSMAC 策略是一种简单、高效的生产多样化代谢产物的方法^[15], 通过改变培养参数, 如添加前体物质或酶抑制剂、pH、供氧量、改变培养基成分配比等方法诱导或者抑制生物合成途径或者信号转导通路, 进而激活沉默基因。Yan 等^[16]通过生物信息学分析发现, 球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)中具有编码异胡豆苷酶的基因, 在正常培养条件下却不表达; 通过 OSMAC 策略添加多种前体物质不断筛选发现, 添加 1-甲基色氨酸可激活该沉默基因的表达, 继而分离得到能够抑制乙酰胆碱酯酶活性的生物碱 chaetogline F, 该生物碱成为抗阿尔茨海默病药物的先导化合物。目前 OSMAC 策略已被广泛应用于微生物天然产物领域, 提高次级代谢产物结构的新颖性和多样性。此外, 近年来基因组挖掘技术已广泛应用于新化合物表征和代谢组学分析中, 根据基因组测序结果, 利用 antiSMASH^[17]、MiBiG 等分析工具^[18], 对单体化合物的生物合成途径进行解析^[19]。

海洋链霉菌因生存在高压、低温、低氧等极端环境中, 从而具备耐盐、耐酸、耐高压等特性, 因此产生具有抗肿瘤、抗病毒活性以及细胞毒性的次级代谢产物。比如近年来从硝化链霉菌(*Streptomyces nitrosporeus*)中分离得到的 3-氯四氢喹诺酮类生物碱对水

泡性口炎病毒具有明显的抗病毒作用^[20]; Aria 等^[21]从海洋沉积物来源的链霉菌(*Streptomyces* sp. MS44)中分离得到的化合物尼博霉素(nybomycin)对牛结核分枝杆菌具有明显的抑制活性, 最低抑制浓度(MIC)为 1.0 μg/mL。目前我国已有多种海洋药物被批准上市, 比如多烯康、烟酸甘露醇、藻酸双酯钠等, 未来对源自海洋的活性化合物的需求将会日益增长^[22]。

本文对一株南海来源的菌株进行菌种鉴定及基因组测序, 结合 OSMAC 策略, 采用多种色谱方法, 从发酵提取物中分离获得化合物, 通过高分辨质谱(HRMS)、紫外吸收光谱、核磁共振(NMR)等分析方法, 对其结构进行鉴定。同时, 结合基因组信息及生物信息学技术, 对生物合成途径进行初步推导。

1 材料与方法

1.1 培养基

TSBY 液体培养基: 3% 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB), 1% 酵母浸粉, 去离子水 1 L。

MS 固体培养基: 2% 黄豆粉, 2% 甘露醇, 2% 琼脂粉, 自来水 1 L。

Glycerol-Arg(G-A)培养基: 甘油 6 mL, 精氨酸 1 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 去离子水 1 L。

VER 培养基: 葡萄糖 10.0 g, 可溶性淀粉 10.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 酵母浸粉 2.0 g, 甘油 10.0 g, 玉米浆 2.5 g, 碳酸钙 3.0 g, 海盐 3 g, 去离子水 1 L。

MS 液体培养基: 2% 甘露醇, 2% 黄豆粉, 碳酸钙 3 g, 去离子水 1 L。

放线菌 2[#]培养基: 可溶性淀粉 10.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 玉米淀粉 3.0 g, 酵母浸粉 10.0 g, 牛肉浸膏 1.0 g, 七水合硫酸镁 0.5 g, 碳酸钙 2.0 g, 去离子水 1 L; pH 7.0。

R4 培养基: 葡萄糖 5.0 g, 脯氨酸 1.5 g, 缬氨酸 1.18 g, 酵母浸粉 1.0 g, 酪蛋白氨基酸 0.05 g, 氯化镁 2.0 g, 硫酸钾 0.1 g, 1× 微量元素溶液(TES) 2.8 g, 去离子水 1 L。

M5 培养基: 果糖 40 g, 大豆蛋白胨 15.0 g, 酵母

浸粉 5.0 g, 碳酸钙 3.0 g, 去离子水 1 L; pH 7.0。

M7 培养基: 葡萄糖 40.0 g, 麦芽提取物 10.0 g, 阿维菌素 2.5 g, 去离子水 1 L; pH 7.0。

SAL 培养基: 可溶性淀粉 5.0 g, 蛋白胨 2.0 g, 酵母浸粉 4.0 g, 硫酸亚铁 0.04 g, 溴化钾 0.1 g, 碳酸钙 2.0 g, 去离子水 1 L。

2216E 培养基: 蛋白胨 5.0 g, 硅酸钠 0.004 g, 硼酸 0.022 g, 磷酸氢二钠 0.008 g, 氯化镁 5.98 g, 硫酸钠 3.24 g, 碳酸钠 0.16 g, 氯化铍 0.034 g, 氯化钙 1.8 g, 柠檬酸铁 0.1 g, 酵母浸粉 0.1 g, 氯化钾 0.05 g, 溴化钾 0.08 g, 氟化钠 0.002 4 g, 硝酸铵 0.001 6 g, 氯化钠 19.45 g, 去离子水 1 L。

1.2 试剂与仪器

乙腈 (MeCN), 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; MeCN, 色谱纯, 美国阿斯顿化学技术有限公司; 氘代试剂, 美国 CIL 公司。

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪, Thermo Fisher Scientific 公司; Phenomenex C18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、ODS 反相硅胶柱, 日本 YMC 公司; ZS-CR 型组合式振荡培养箱, 浙江华源仪器有限公司; MCB-1300V 型超净工作台, 中科美菱低温科技股份有限公司; ZenoTOF 7600 型液相色谱-质谱联用仪, 美国 SCIEX 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株种属的确定

菌株 BAS-28 是从南海地区红树林根际 10 cm 以下的土壤样品中分离纯化获得。从 -80 °C 冰箱保存的甘油管中取出菌株 BAS-28, 接种至 SFM 固体培养基, 30 °C 恒温倒置培养 3 ~ 5 d, 观察菌落形态和孢子状态。

基因组序列提取: 用无菌枪头挑取菌株 BAS-28 平板上的单菌落接种至含有 10 mL TSBY 液体培养基的摇瓶中, 30 °C、180 r/min 培养 48 ~ 72 h。离心收集菌丝体, 使用基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组。

聚合酶链式反应 (PCR): 将提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 上游引物序列为 TACGGTTACCTTGTTACGACTT, 下游引物序列为 AGAGTTTGATCMTGGCTCAG。PCR 扩增程序: 98 °C 预变性 45 s, 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 72 °C 后延伸 5 min。扩增产物送北京擎科生物科技股份有限公司杭州分公司测序, 所得序列在 NCBI-BLAST 上进行序列比对。采用邻接法 (neighbor-joining method) 通

过软件 MEGA 7.0^[23] 构建系统发育树。

1.3.2 OSMAC 策略激活沉默基因簇

为更高效率挖掘微生物次级代谢产物, 激活菌株中的沉默基因簇, 选用如图 1 所示的碳源、氮源等含量差异较大^[24]的 MS、放线菌 2[#]、R4、M5、M7、2216E、SAL、VER、G-A 9 种培养基进行发酵, 接种量 1%, 每种培养基分别接种 3 瓶作为平行实验, 另外每种培养基需要添加 1 瓶空白对照, 30 °C、180 r/min 发酵 7 d。

收集 OSMAC 发酵获得的 BAS-28 发酵液, 15 000 r/min 离心 10 min, 沉淀部分舍弃, 上清液部分用 ODS 反相硅胶柱、MeCN-H₂O 体系进行初步分离纯化。取上清液 5 mL, 分别用 H₂O、50% MeCN、100% MeCN 进行梯度洗脱, 洗脱 3 ~ 5 个柱体积, H₂O 段和 100% MeCN 段舍弃。

将 50% MeCN 组分的洗脱液浓缩蒸干, 500 μL MeCN 复溶, 通过高效液相色谱法 (HPLC) 分析次级代谢产物是否被激活以及代谢产物的丰富度。

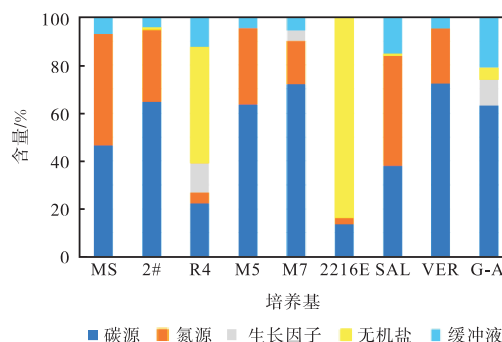


图 1 碳源和氮源组分差异较大的 9 种培养基

Fig. 1 Nine media with significant differences in carbon and nitrogen source components

1.3.3 菌株扩大培养及单体化合物的分离

将新鲜种子液接种至最适培养基中进行扩大培养, 30 °C、180 r/min 发酵 7 d, 共发酵 10 L。发酵液利用落地离心机进行离心, 5 000 r/min 离心 20 min, 菌丝体沉淀部分舍弃, 保留上清发酵液。通过柱层析分离手段如 ODS 反相硅胶柱、葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20)、HPLC 等方法分离得到单体化合物。

HPLC 条件: 流动相为 MeCN-H₂O, 色谱柱为 Phenomenex C18 柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 紫外吸收光谱波长为 210、260、320 nm。

利用理化性质及波谱学方法对得到的单体化合物进行结构解析。分离得到单体化合物 1 (2 mg)、化合物 2 (1.5 mg)、化合物 3 (2 mg)。

1.3.4 BAS-28 全基因组测序及生物合成途径组装

菌株 BAS-28 接种至 SFM 培养基上, 30 °C 培养 3 d; 无菌枪头挑取单菌落至 TSBY 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 48 ~ 72 h, 离心收集菌丝体, 放入 -80 °C 冰箱保存备用。冻存的菌体委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Illumina HiSeq 高通量测序, 利用 SPAdes v3.11.1 拼接软件对优化序列进行拼接。通过 Prodigal 2.6.2 软件进行细菌的基因预测, 主要包括基因数量、基因总长度、GC 含量、基因平均长度等。

菌株 BAS-28 的全基因组测序结果“fasta”文件上传至 antiSMASH 进行注释分析。

2 结果与分析

2.1 菌株种属鉴定及系统发育树分析

菌株 BAS-28 在 SFM 培养基上培养 3 ~ 5 d, 菌落颜色为淡绿色, 圆形、较小菌落, 表面凸起, 干燥不透明, 易挑起, 边缘不规则, 能够产生绿色色素。培养时间延长至 5 ~ 7 d, 气生菌丝体能够分化成孢子, 孢子呈椭圆形, 且产孢量丰富。菌落形态和孢子状态如

图 2 所示。经 16S rDNA 序列测定和 BLAST 比对, 菌株 BAS-28 (GenBank 登录号: PP217478) 隶属于链霉菌, 与草生链霉菌 (*Streptomyces pratensis*) CMU51-5 (GenBank 登录号: LC458850) 的同源性为 100%, 并在发育树中与 *S. pratensis* 聚为稳定的一簇(图 3)。结合菌株 BAS-28 形态学特征和 16S rDNA 测序结果比对, 初步鉴定菌株 BAS-28 为草生链霉菌 (*S. pratensis*)。

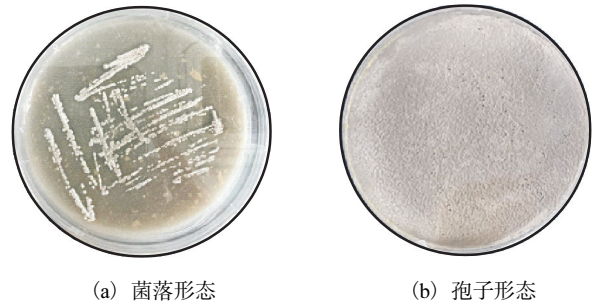


图 2 菌株 BAS-28 菌落形态特征
Fig. 2 Morphological characteristics of strain BAS-28

2.2 OSMAC 策略激活沉默基因簇

菌株 BAS-28 在 9 种发酵培养基中的代谢图谱如图 4 所示。

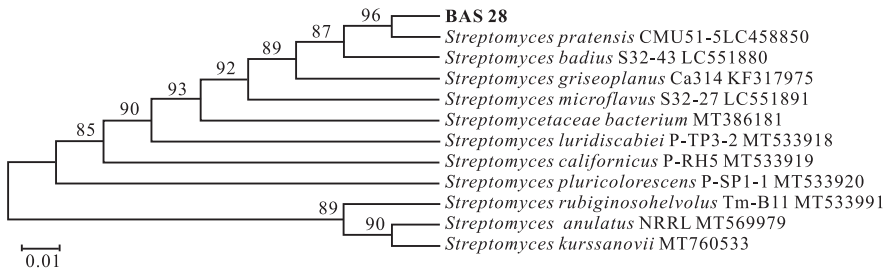


图 3 基于邻接法构建菌株 BAS-28 的 16S rDNA 基因序列系统发育树
Fig. 3 Neighbor-joining method phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence of strain BAS-28

菌株 BAS-28 在 M5、M7 培养基中发酵产生的次级代谢产物谱图相似, 说明有部分次级代谢产物被激活, 化合物出峰时间集中在 10 ~ 20 min。菌株 BAS-28 在 MS、放线菌 2[#]培养基中化合物出峰时间集中在 15 ~ 25 min, 次级代谢产物产量很低, MS 培养基中只有甘露醇和黄豆粉分别提供基础的碳源与氮源, 并无其他能够提供微量元素或者生长因子等促进代谢的组分。菌株 BAS-28 在 G-A、2216E、SAL、R4 培养基中发酵效果不理想, 几乎没有次级代谢产物被激活, 推测可能与这几种培养基的初始 pH 没有调至 7.0 有关。菌株 BAS-28 在 VER 培养基中次级代谢产物谱图更为丰富, 产生的 a、b、c、d 峰是其他培养基中没有产生的, 或者产量明显高于其他培养基,

这表明在 VER 培养基的培养条件下, 代谢产物被激活, 其丰富度明显提高。

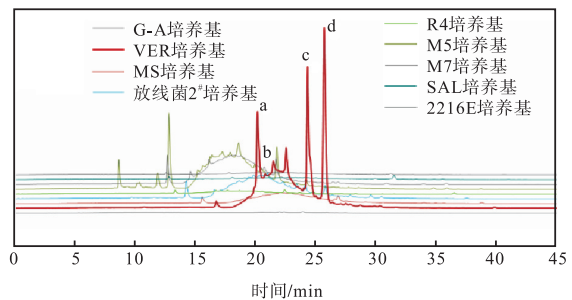


图 4 菌株 BAS-28 在 9 种发酵培养基中的代谢图谱
Fig. 4 Metabolic profiling of strain BAS-28 in nine fermentation media

与寡营养培养基 G-A、MS、M7、SAL 以及未添加海盐或者碳酸钙的培养基放线菌 2[#]、R4、M5、2216E 相比,VER 培养基中的碳源、氮源、生长因子、微量元素等含量丰富,培养基中添加了 10 g/L 的葡萄糖和可溶性淀粉,除了能够提供初级代谢过程所需的碳源、氮源,还参与氨基酸的合成。合成的氨基酸作为前体物质参与菌株 BAS-28 的次级代谢过程,产生次级代谢产物。玉米浆中含有多种矿物质元素,比如钙、镁、锌等,有助于菌株 BAS-28 的代谢活动。碳酸钙作为缓冲剂,能够有效中和发酵过程中产生的酸,使 pH 维持在适合菌体生长的范围。海盐中含有丰富的矿物质,模拟菌株 BAS-28 在海洋中的生存环境,提高菌株的生长和发酵效率。甘油能够维持 VER 培养基中的渗透压,减少发酵过程中水分的过度散失或吸收。因此,选用 VER 培养基作为菌株 BAS-28 扩大培养的培养基开展后续化合物分离工作。

2.3 化合物的分离提取

为了提高菌株 BAS-28 中小分子化合物的分离效果,上清液部分使用 ODS(C18)反相硅胶柱、MeCN-H₂O 体系进行梯度洗脱(H₂O、30% MeCN、50% MeCN、100% MeCN),共获得 4 个组分(Fr.1—Fr.4)。H₂O 段和 100% MeCN 段舍弃。Fr.2 经过 Sephadex LH-20(30% MeCN)洗脱,得到组分 Fr.2.1—Fr.2.8。

Fr.2.7 经过 HPLC 进一步分离,流动相具体梯度设置见表 1,流量为 1 mL/min,紫外检测波长为 210、260、320 nm,分离得到化合物 1(2 mg)。化合物 1 的分离流程如图 5 所示。

表 1 化合物 1 HPLC 流动相梯度

Tab. 1 Compound 1 HPLC mobile phase setup

梯度	时间/min	流动相 A(H ₂ O) 体积分数/%	流动相 B(MeCN) 体积分数/%
1	0.10	82.0	18.0
2	10.00	82.0	18.0
3	35.00	77.0	23.0
4	35.10	0.0	100.0
5	45.00	0.0	100.0
6	45.10	82.0	18.0
7	55.00	82.0	18.0

Fr.2.4 经过 HPLC 进一步分离,流动相具体梯度设置见表 2,流量为 1 mL/min,紫外检测波长为 210、260、320 nm,分离得到化合物 2(1.5 mg)。化合物 2 的分离流程如图 5 所示。

Fr.3 经过 Sephadex LH-20(50% MeCN)洗脱,得到 Fr.3.1—Fr.3.5。Fr.3.2 经过 HPLC 进一步分离,流

动相具体梯度设置见表 3,流量为 1 mL/min,紫外检测波长为 210、260、320 nm,得到化合物 3(2 mg)。化合物 3 的分离流程如图 5 所示。

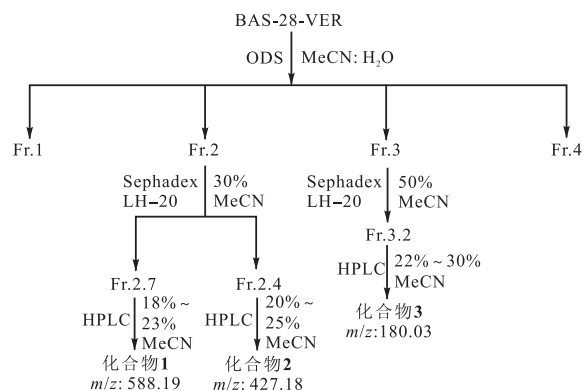


图 5 化合物 1—化合物 3 分离流程

Fig. 5 Separation process of compounds 1-3

表 2 化合物 2 HPLC 流动相梯度

Tab. 2 Compound 2 HPLC mobile phase setup

梯度	时间/min	流动相 A(H ₂ O) 体积分数/%	流动相 B(MeCN) 体积分数/%
1	0.10	80.0	20.0
2	10.00	80.0	20.0
3	35.00	75.0	25.0
4	35.10	0.0	100.0
5	45.00	0.0	100.0
6	45.10	80.0	20.0
7	55.00	80.0	20.0

表 3 化合物 3 HPLC 流动相梯度

Tab. 3 Compound 3 HPLC mobile phase setup

梯度	时间/min	流动相 A(H ₂ O) 体积分数/%	流动相 B(MeCN) 体积分数/%
1	0.10	78.0	22.0
2	10.00	78.0	22.0
3	30.00	70.0	30.0
4	30.10	0.0	100.0
5	40.00	0.0	100.0
6	40.10	78.0	22.0
7	50.00	78.0	22.0

2.4 单体化合物的结构鉴定

经过 ODS 反相柱层析、Sephadex LH-20、HPLC 分离得到化合物 1—化合物 3,通过 HRMS、紫外吸收光谱、NMR 及相关文献对单体化合物的结构进行解析,化合物 1—化合物 3 的全波长图谱如图 6—图 8 所示,结构如图 9 所示。

2.4.1 化合物 1 的结构鉴定

化合物 1 的紫外全波长图谱如图 6 所示,出峰时间为 21~22 min,在 210、250、310 nm 处有最佳吸收。

化合物 **1**: 淡黄色粉末, 高分辨电喷雾质谱 (HR-ESI-MS) 在 m/z 588.19 处存在 $[M+H]^+$ 峰, 提示该化合物的相对分子质量为 587, 分子式为 $C_{26}H_{29}N_5O_{11}$, 有 15 个不饱和度。微谱查询结果显示, 该化合物与 mirubactin B 的碳谱高度相似; 经 SciFinder 检索, 将化合物 **1** 与相关文献^[25]中 mirubactin B 的 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 数据进行比对, 发现化合物 **1** 的核磁数据与已知化合物 mirubactin B 的数据基本一致, 确定为同一化合物, mirubactin B (**1**) 的结构如图 9 所示。mirubactin B 属于非核糖体肽 (non-ribosomal peptide synthase, NRPS) 儿茶酚盐型铁载体, 是 mirubactin 类化合物的降解产物之一, 于 2021 年从 *Streptomyces* sp. CB02460 中分离得到, 并且已被证实能够与环境中的铁结合形成铁螯合物, 通过特定的受体蛋白转运进入细胞, 使微生物和植物能够获取生命活动所需的铁元素, 对维持生物体的铁稳态具有重要作用。

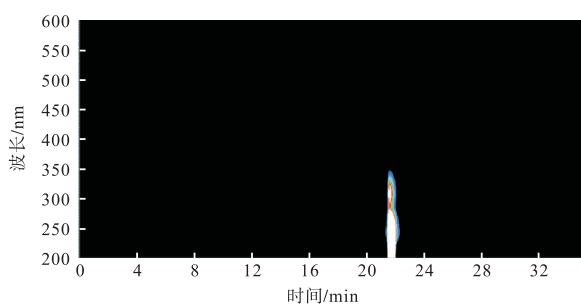


图 6 化合物 **1** 的紫外全波长图谱

Fig. 6 UV full wavelength spectrum of compound **1**

化合物 **1** 的核磁共振波谱数据如下: 1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ 7.18 (1H, m, H-4), 6.43 (1H, t, $J = 15.96$ Hz), 6.59 (1H, d, $J = 7.92$ Hz, H-6), 4.46 (1H, m, H-8), 1.98 (2H, m, H-9), 1.67 (2H, m, H-10), 3.37 (2H, m, H-11), 8.05 (1-NH, s), 8.09 (4-NH, s), 4.12 (1H, m, H-14), 1.53 (2H, m, 15-H), 1.86 (2H, m, 15'-H), 1.37 (2H, m, 16-H), 2.90 (2H, t, $J = 15.24$ Hz), 7.80 (1H, s, 18'-H), 8.22 (1-NH, d, $J = 3$ Hz), 6.97 (1H, m, 23-H), 7.35 (1H, m, 24-H), 7.01 (1H, m, 25-H); ^{13}C -NMR (150 MHz, D_2O) δ 114.8 (C-1), 148.9 (C-2), 144.5 (C-3), 123.2 (C-4), 119.5 (C-5), 119.3 (C-6), 170.0 (C-7), 54.4 (C-8), 27.9 (C-9), 25.0 (C-10), 40.3 (C-11), 158.6 (C-12), 170.2 (C-13), 54.2 (C-14), 27.5 (C-15), 22.6 (C-15'), 23.0 (C-16'), 50.0 (C-17), 46.8 (C-17'), 163.6 (C-18), 159.7 (C-18'), 177.7 (C-19), 114.8 (C-20), 142.7 (C-21), 143.4 (C-22), 125.9 (C-23), 116.3 (C-24),

125.2 (C-25), 172.7 (C-26)。

2.4.2 化合物 **2** 的结构鉴定

化合物 **2** 的紫外全波长图谱如图 7 所示, 出峰时间为 9 ~ 12 min, 在 210、245、310 nm 处有最佳吸收。

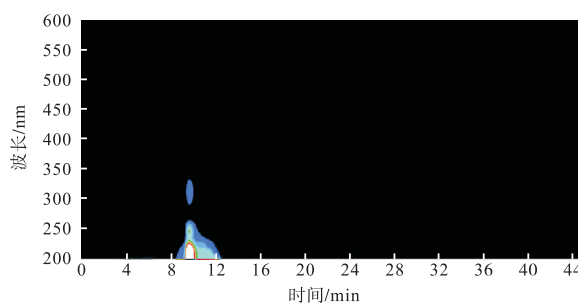


图 7 化合物 **2** 的紫外全波长图谱

Fig. 7 UV full wavelength spectrum of compound **2**

化合物 **2**: 白色粉末, HR-ESI-MS 在 m/z 427.18 处存在 $[M+H]^+$ 峰, 提示该化合物相对分子质量为 426, 分子式为 $C_{18}H_{26}N_4O_8$, 有 8 个不饱和度。微谱查询结果显示, 该化合物与 mirubactin C 的碳谱高度相似; 经 SciFinder 检索, 将化合物 **2** 与相关文献^[25]中 mirubactin C 的 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 数据进行比对, 发现化合物 **2** 的核磁数据与已知化合物 mirubactin C 数据基本一致, 确定为同一化合物, mirubactin C (**2**) 的结构如图 9 所示。与 mirubactin B 相同的是, mirubactin C 也是 mirubactin 类化合物的降解产物之一, 均属于 NRPS 儿茶酚盐型铁载体; 结构上与 mirubactin B 相差 1 个 2, 3-二羟基苯甲酸单元, 但同样具有铁螯合能力, 不过对于 mirubactin B、mirubactin C 铁螯合能力的差异需要进一步探究。

化合物 **2** 的核磁共振波谱数据如下: 1H -NMR (600 MHz, D_2O) δ 7.80 (1H, s, H-4), 7.75 (1H, s, H-4'), 6.73 (1H, t, $J = 15.48$ Hz, H-5), 7.14 (1H, d, $J = 7.74$ Hz, H-6), 6.95 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-6'), 1.77 (2H, m, H-9), 1.66 (2H, m, H-10), 3.06 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-11), 8.27 (1-NH, s), 4.46 (1H, m, H-13), 1.41 (2H, m, H-14), 1.45 (2H, m, H-14'), 1.86 (2H, m, H-15), 4.08 (2H, m, H-16), 8.09 (1H, s, H-17); ^{13}C -NMR (150 MHz, D_2O) δ 116.9 (C-1), 146.6 (C-2), 144.5 (C-3), 119.8 (C-4), 119.6 (C-5), 119.5 (C-6), 169.9 (C-7), 53.3 (C-8), 28.8 (C-9), 24.9 (C-10), 38.9 (C-11), 172.6 (C-12), 54.6 (C-13), 54.9 (C-13'), 27.8 (C-14), 28.3 (C-14'), 22.8 (C-15), 23.1 (C-15'), 50.0 (C-16), 46.1 (C-16'), 159.5 (C-17), 164.1

(C-17), 172.6(C-18)。

2.4.3 化合物3的结构鉴定

化合物3的紫外全波长图谱如图8所示,出峰时间为12~13 min,在210、245、310 nm处有最佳吸收。

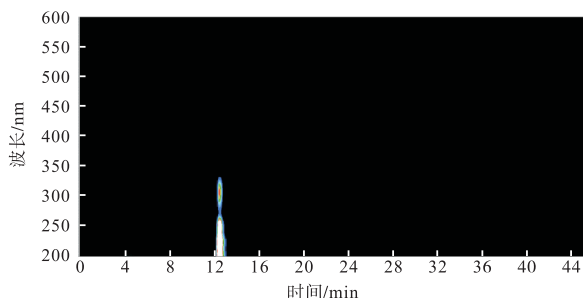


图8 化合物3的紫外全波长图谱

Fig. 8 UV full wavelength spectrum of compound 3

化合物3:白色粉末,HR-ESI-MS在 m/z 180.03处出现 $[M+H]^+$ 峰,提示该化合物相对分子质量为179,分子式为 $C_8H_5NO_4$,有7个不饱和度。 1H -NMR显示,化合物3有3个芳环氢信号H-5($\delta = 7.34$, d, $J = 7.5$ Hz)、H-6($\delta = 7.17$, d, $J = 7.62$ Hz)、H-7($\delta = 7.22$, d, $J = 7.5$ Hz),结合紫外吸收,推测化合物3含有三取代的苯环。微谱查询结果显示,该化合物与苯那斯汀(Benadrostin)的碳谱高度相似,经SciFinder检索,将化合物3与相关文献^[26]中苯那斯汀的 1H -NMR、 ^{13}C -NMR数据进行比对,发现化合物3的核磁数据与已知化合物苯那斯汀数据基本一致,确定为同一化合物,苯那斯汀(3)的结构如图9所示。

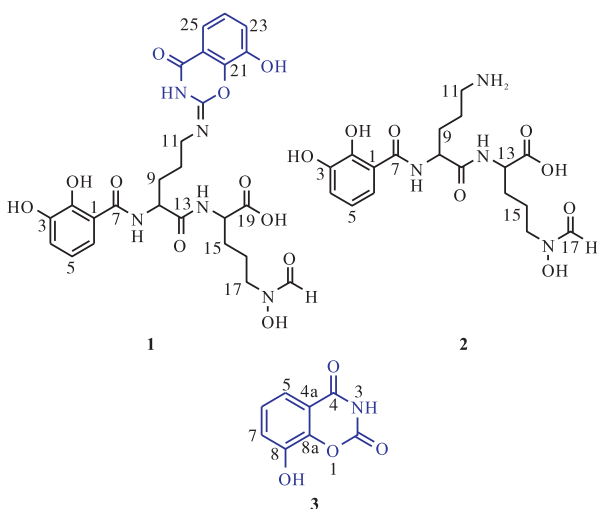


图9 化合物1—化合物3的化学结构

Fig. 9 Chemical structure of compounds 1-3

苯那斯汀(3)属于聚(ADP-核糖)合成酶抑制剂,该抑制剂与系统性红斑狼疮、重症肌无力和糖尿

病的发病机制有关联,但具体机理目前并未见研究报道。该化合物自1988年被首次报道为新骨架类型的化合物之后,再无深入研究;考虑到该化合物的相对分子质量较小,只有179,因此推测苯那斯汀(3)可能是某种化合物的中间体。

化合物3的核磁共振波谱数据如下: 1H -NMR (600 MHz, DMSO) δ 7.17(1H, d, $J = 7.6$, H-6), 7.22(1H, d, $J = 7.5$, H-7), 7.34(1H, d, $J = 7.5$, H-5); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO) δ 147.7(C-2), 162.1(C-4), 116.1(C-4a), 116.7(C-5), 125.4(C-6), 122.4(C-7), 145.5(C-8), 143.0(C-8a)。

2.5 antiSMASH预测结果及合成途径推导

菌株BAS-28的全基因组测序结果显示,基因组全长7.54 Mbp, 8个rRNA, 基因平均长度为982 bp, 84个tRNA, GC含量为72%。经antiSMASH预测分析,其基因组序列结果见表4。

表4 菌株BAS-28的次级代谢产物生物合成基因簇

Tab. 4 Biosynthesis gene clusters of secondary metabolites of strain BAS-28

序号	类型	位点	最相似的已知基因簇	相似度
1	NRPS	119 442—177 865	coelichelin	100%
2	NRPS-metallophore	221 876—285 399	coelichelin	100%
3	terpene	375 162—396 169	carbapenem MM4 550	10%
4	melanin	130 335—140 865	melanin	100%
5	terpene	162 281—234 796	spore pigment	83%
6	NRPS	242 125—292 513	thiocoraline	10%
7	PKS	9 974—50 933	clethramycin	12%
8	butyrolactone	250 457—261 389	lactonamycin	5%
9	T2PKS	2 225—96 892	tripartilactam	100%
10	T1PKS	65 064—114 519	10-epi-HSAF	100%
11	ectoine	97 317—107 715	ectoine	100%
12	NI-siderophore	91 470—124 054	kinamycin	19%
13	terpene	95 637—117 700	leinamycin	2%
14	T1PKS	23 363—80 358	anthracimycin	20%
15	terpene	48 601—69 635	steffimycin	19%
16	T2PKS	1—47 008	hedamycin	15%
17	NRPS	53 623—97 193	skyllamycin D	5%
18	RiPPs	45 045—56 355	—	—
19	lanthipeptide-class-III	58 092—89 095	—	—
20	NRPS	8 047—65 636	mirubactin	64%
21	T2PKS	32 087—72 676	auricin	41%
22	PKS/NRPS	1—55 394	caboxamycin	88%
23	terpene	13 922—40 518	hopene	69%
24	terpene	13 016—37 333	isorenieratene	100%

注:—表示未检出。

菌株BAS-28含有24个潜在的生物合成基因簇,主要包括聚酮类(PKS)、铁载体(siderophore)、NRPS、萜类(terpene)等已知基因簇;同时,也有部分

未知同源基因簇的序列,属于核糖体合成和翻译后修饰肽(RiPPs)类化合物。该相似度分析结果说明,菌株 BAS-28 还是具有一定编码其他新颖结构化合物的潜力。

根据化合物 1—化合物 3 的结构类型并结合相关文献报道^[27],确定该类化合物通过 NRPS 组装线装配完成。根据上述信息,定位到 20 号基因簇,该基因簇被注释为 NRPS 类别编码 mirubactin 化合物,基因序列相似度为 64%(图 10),将该基因簇定义为 Stre 基因簇。基因簇全长 57 590 nt,主要包括 2 个 NRPS 基因 [Stre A(9 966 nt)、Stre B(1 206 nt)]、NAD 依赖性脱水酶(NAD-dependent dehydratase)、调节基因(regulatory genes)、ABC 转运蛋白(ABC transporters)、其他生物合成基因(additional biosynthetic genes)、脱氢酶(dehydrogenases)以及其他未被注释的基因(other unannotated genes)。

根据预测的生物合成基因簇,对化合物 1—化合物 3 的生物合成途径推导如图 11 所示。该基因簇包含 2 个 NRPS 基因,共 3 个模块。其中,Stre B 作为起始模块,可负责起始模块 2,3-二羟基苯甲酸和侧链模块 2-甲酰基-6-羟基苯基氨基甲酸酯的上载,而 Stre A 含有 2 个延伸模块,分别负责 D-鸟氨酸和 N5-羟基-N5-甲酰基-D-鸟氨酸的上载以及 mirubactin 酰胺键骨架的形成。Stre B 首先识别起始模块 2,3-二羟基苯甲酸,随后在 Stre A 模块 1 的 C 结构域作用下与 D-鸟氨酸形成酰胺键,生成的二肽骨架在 Stre A 模块 2 的 C 结构域作用下与 N5-羟基-N5-甲酰基-D-鸟氨酸进一步缩合,形成三肽骨架。侧链模块的合成推测,Stre B 识别并上载 2-甲酰基-6-羟基苯基氨基甲酸酯,氨基自身环化形成侧链模块,最终通过一步脱水反应产生碳氮双键,完成侧链的上载。



图 10 Stre 基因簇负责化合物 1—化合物 3 的组装

Fig. 10 Stre gene cluster responsible for the assembly of compounds 1-3

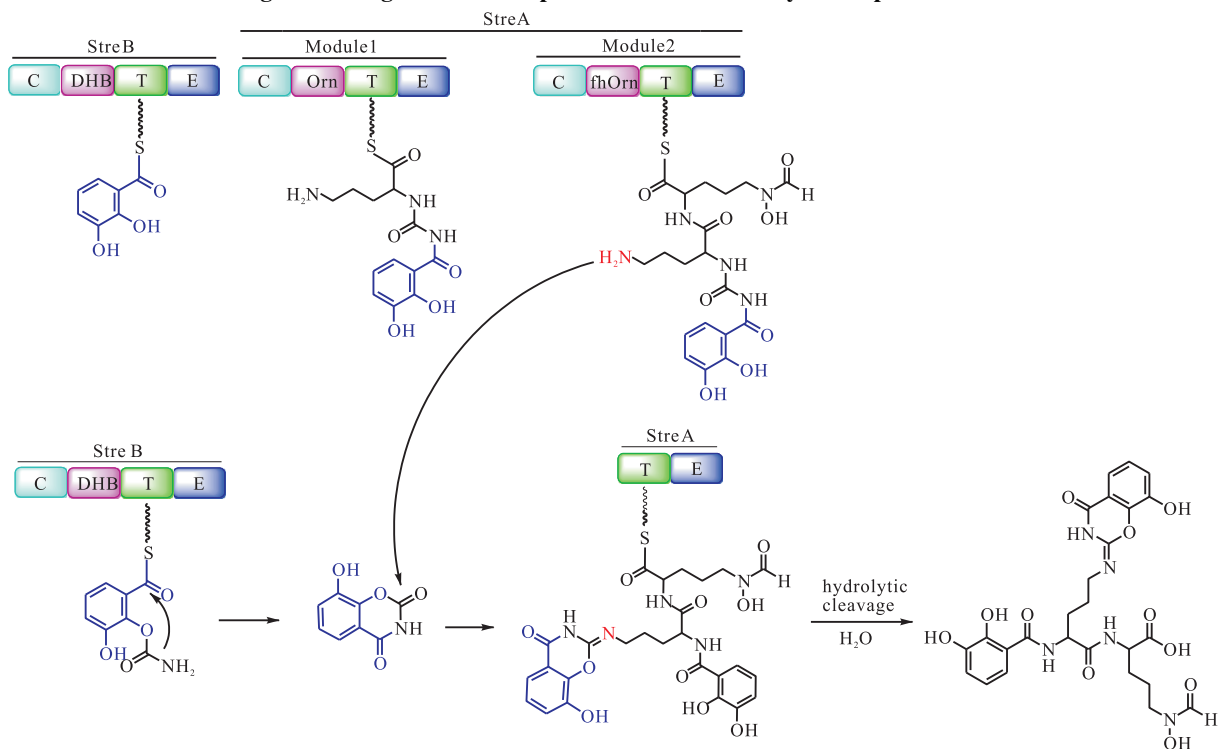


图 11 Stre 组装的生物合成途径

Fig. 11 Proposed biosynthetic pathway for Stre assembly

3 结论

本研究以海洋来源的链霉菌 BAS-28 作为出发

菌株,通过 OSMAC 策略激活沉默基因簇,对次级代谢产物进行研究,成功从中分离得到 3 个具有潜在应用价值的单体化合物。其中, mirubactin B(1) 和

mirubactin C (2) 是从草生链霉菌中分离得到的 NRPS 铁载体,能够为维持生命活动所需的铁元素提供必要帮助,维持生物体内的铁稳态。苯那斯汀 (3) 作为一种合成酶抑制剂,其活性与多种疾病的发生机制相关。目前,能产生铁载体的海洋微生物已被视为宝贵资源,并成为新药研发的热点。对化合物 1—化合物 3 的生物合成途径进行推导,可以为后续 NRPS 类化合物的具体机制及深入研究提供重要参考。

参考文献:

- [1] LIU R, DENG Z, LIU T. *Streptomyces* species: ideal chassis for natural product discovery and overproduction [J]. *Metabolic engineering*, 2018, 50: 74–84.
- [2] KATZ L, BALTZ R H. Natural product discovery: past, present, and future [J]. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 2016, 43 (2/3): 155–176.
- [3] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 [J]. *Journal of natural products*, 2020, 83 (3): 770–803.
- [4] GENILLOUD O. Natural products discovery and potential for new antibiotics [J]. *Current opinion in microbiology*, 2019, 51: 81–87.
- [5] CHOPRA B, DHINGRA A K. Natural products: a lead for drug discovery and development [J]. *Phytotherapy research*, 2021, 35 (9): 4660–4702.
- [6] BLASKOVICH M A T. Antibiotics special issue: challenges and opportunities in antibiotic discovery and development [J]. *ACS Infectious diseases*, 2020, 6 (6): 1286–1288.
- [7] SILVER H K, KEMPE C H. Mechanism of the development of resistance to streptomycin [J]. *The American journal of medicine*, 1947, 2 (6): 660–661.
- [8] SCHWARZ S, KEHRENBERG C, DOUBLET B, et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol [J]. *FEMS Microbiology reviews*, 2004, 28 (5): 519–542.
- [9] YING L, TANG D. Recent advances in the medicinal chemistry of novel erythromycin-derivatized antibiotics [J]. *Current topics in medicinal chemistry*, 2010, 10 (14): 1441–1469.
- [10] KENSHOLE E, HERISSE M, MICHAEL M, et al. Natural product discovery through microbial genome mining [J]. *Current opinion in chemical biology*, 2021, 60: 47–54.
- [11] MAO D, OKADA B K, WU Y, et al. Recent advances in activating silent biosynthetic gene clusters in bacteria [J]. *Current opinion in microbiology*, 2018, 45: 156–163.
- [12] AMERUOSO A, VILLEGAS KCAM M C, COHEN K P, et al. Activating natural product synthesis using CRISPR interference and activation systems in *Streptomyces* [J]. *Nucleic acids research*, 2022, 50 (13): 7751–7760.
- [13] REEN F, ROMANO S, DOBSON A, et al. The sound of silence: activating silent biosynthetic gene clusters in marine microorganisms [J]. *Marine drugs*, 2015, 13 (8): 4754–4783.
- [14] LIU Z, ZHAO Y, HUANG C, et al. Recent advances in silent gene cluster activation in *Streptomyces* [J]. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2021, 9: 632230.
- [15] BARAL B, AKHGARI A, METSÄ-KETELÄ M. Activation of microbial secondary metabolic pathways: avenues and challenges [J]. *Synthetic and systems biotechnology*, 2018, 3 (3): 163–178.
- [16] YAN W, GE H M, WANG G, et al. Pictet-Spengler reaction-based biosynthetic machinery in fungi [J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2014, 111 (51): 18138–18143.
- [17] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN H E, et al. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation [J]. *Nucleic acids research*, 2023, 51 (W1): 46–50.
- [18] JOSE P A, MAHARSHI A, JHA B. Actinobacteria in natural products research: progress and prospects [J]. *Microbiological research*, 2021, 246: 126708.
- [19] MISHRA B B, TIWARI V K. Natural products: an evolving role in future drug discovery [J]. *European journal of medicinal chemistry*, 2011, 46 (10): 4769–4807.
- [20] LEE J G, YOO I D, KIM W G. Differential antiviral activity of benzastatin C and its dechlorinated derivative from *Streptomyces nitrosporeus* [J]. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2007, 30 (4): 795–797.
- [21] ARAI M, KAMIYA K, PRUKSAKORN P, et al. Anti-dormant mycobacterial activity and target analysis of nybomycin produced by a marine-derived *Streptomyces* sp. [J]. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2015, 23 (13): 3534–3541.
- [22] 代影, 杨帆, 林厚文. 极地放线菌次级代谢产物及药理活性研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2023, (下转第 58 页)