

海洋微生物来源的天然产物开发研究进展*

陈菲菲^{1,2} 王勇^{2,3**} 王以光¹ 赫卫清^{1**}

(¹中国医学科学院/北京协和医学院, 医药生物技术研究所, 卫生部抗生素生物工程重点实验室 北京 100050)

(²中国医药集团四川抗菌素工业研究所 成都 610052)

(³中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所合成生物学重点实验室 上海 200032)

摘要 综述了近年来海洋微生物来源天然产物研究的新进展,总结了该类天然产物的开发策略.通过对样品采用不同的预处理方式、不同的分离培养基以及新的培养方法,讨论如何获得海洋来源的特有微生物和增加海洋来源微生物类群的多样性.阐述了在海洋微生物天然产物的开发过程中,采用宏基因组技术及基因组测序等手段,来发现难培养或不可培养微生物中的天然产物以及处于“沉默”状态的天然产物.最后介绍了异源生物合成、组合生物合成以及核糖体工程技术在海洋微生物天然产物开发和改造中的应用,并举例论述了海洋微生物天然产物的开发.图3 参54

关键词 海洋微生物; 宏基因组筛选; 基因组测序; 异源生物合成; 组合生物合成

CLC Q936 : Q178.53

Advance in Research and Development of Natural Products from Marine Microorganisms*

CHEN Feifei^{1,2}, WANG Yong^{2,3**}, WANG Yiguang¹ & HE Weiqing^{1**}

(¹Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, Ministry of Health, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

(²Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu 610052, China)

(³Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract Giving a general summary of the strategies for exploring natural products from marine microorganisms, this article reviews the advances in research and development of natural products derived from marine microorganisms. Different sample pre-treated protocols, isolation media and new cultivation methods are introduced in this article in order to obtain marine-specific microorganisms as well as increase the diversity of marine microorganisms. Metagenomics screening and genome sequencing based mining as new strategies, are addressed to discover natural products from difficult-cultivated or uncultivated microorganisms and ‘silent’ natural products, respectively. Finally, heterologous biosynthesis, combinatorial biosynthesis and ribosome engineering used for exploring marine natural products are illustrated, and detailed examples are presented to show the exploring of marine natural products. Fig 3, Ref 54

Keywords marine microorganisms; metagenomics screening; genome sequencing; heterologous biosynthesis; combinatorial biosynthesis

CLC Q936 : Q178.53

一直以来,微生物来源的天然产物在人类疾病的治疗过程中发挥着重要作用.近20 a来,随着传统抗生素的广泛使用,细菌的耐药性迅速增加,而从传统的土壤微生物中发现结构新颖的活性化合物却出现了明显的下降趋势.在探索具有生物活性天然产物新来源的过程中,海洋微生物引起了广泛的关注.海洋微生物主要包括生活在海水、海洋沉积物(海泥)及与海洋动植物共附生的微生物.由于其所处的高压、低温、缺氧等独特的生理环境,海洋微生物能够产生大量结构新颖并具良好活性的天然产物. Jensen等早在1994年就从生态学的角度分析了从海洋微生物中发现次级代谢产

物的策略,系统地阐述了海洋微生物次级代谢及次级代谢产物的生态学意义^[1].在过去10 a中,越来越多的海洋天然产物被发现和报道.仅2006年新发现的海洋天然产物就超过了2001~2005年的总和,2007年较2006年又增加了24%^[2],2008年较2007年则增加了11%^[3].尽管如此,在研究海洋微生物的过程中,人们依然面临着许多挑战,如:对海洋微生物仍缺乏一个准确的定义;海洋微生物的分布及多样性需要更深入的研究;可培养的海洋微生物仍集中在少数类群中,对于那些不可培养的微生物个体,很难直接从中获得相应的次级代谢产物等等.因此,本文从海洋微生物的培养、海洋微生物天然产物的发现、异源生物合成共附生或不可培养海洋微生物产物以及组合生物合成改造海洋微生物天然产物等几个方面研究的新进展来阐述更好地开发海洋微生物天然产物的可能性.

收稿日期: 2010-07-17 接受日期: 2010-08-03

*中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. IMBF20060202)

资助 Supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund of China (No. IMBF20060202)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: ywang15@gmail.com; heweiqing1977@yahoo.com.cn)

1 海洋微生物的分离和培养

1.1 样品的预处理

由于放线菌仍然是次级代谢产物的主要来源,目前大多数样品预处理集中在如何减少细菌和真菌的污染,从而能更多地分离到海洋放线菌方面。不同的预处理方法,对所分离的海洋放线菌多样性有着明显影响。选择性分离海洋放线菌的预处理方法包括:干法加热、在灭菌的海水中湿法加热、氯胺-T处理、1%~1.5%苯酚浸泡、75%乙醇洗涤和对样品进行不同物理方法的处理等^[4~5]。如方东升等在采集的样品中加入6%的蛋白胨和0.05%的十二烷基磺酸钠(SDS),并于50℃条件下处理10 min,可选择性地从样品中分离到较多的海洋小单孢菌^[6]。王海雁等首次将羧甲基纤维素钠(CMC)溶液应用于海洋沉积物样品的预处理,发现以质量浓度为2 g/L的CMC为分散剂时,不仅能较好地分散和悬浮样品中的放线菌孢子,而且能明显地增加稀有放线菌的数量^[7]。Bredholdt等对海洋沉积物中的微生物进行紫外(UV)辐射、超高频辐射(SHF)、极高频辐射(EHF)3种方式处理,结果发现UV辐射能够有效地分离*Nocardiopsis*、*Nocardia*和*Pseudonocardia* spp., SHF辐射可分离到较多的*Streptosporangium*和*Rhodococcus* spp.,而EHF则更适用于分离*Nocardiopsis*、*Nocardia*和*Streptosporangium* spp.^[8]。王宏梅等则提到:采用分散差速离心法(该法利用胆酸钠作为弱的表面活性剂,并使用了适度地超声处理),可使海泥更好地分散开,由此得到的可培养放线菌数量较传统稀释涂布法明显增多^[9]。而Jensen等采用了8种不同的预处理方法和12种不同的培养基分离关岛附近海泥中的可培养微生物,在分离到的983株形态不同的菌株中,58%的菌株对于海水具有依赖性^[10]。除获得大量*Salinospira* spp.外,他们还分离到链霉菌科中两个新进化分枝MAR2和MAR3的代表菌株及分属于*Thermomonosporaceae*的新菌株。此外,从土壤样品中选择性地获得某类放线菌的预处理方法,对于分离海洋放线菌也是值得借鉴的。如:Yamamura等采用蔗糖梯度离心法从土壤中选择性地分离到诺卡氏菌^[11]。他们观察到大部分诺卡氏菌的孢子出现在20%的蔗糖层中,游动放线菌的游动丝状孢子只能出现在10%的蔗糖层中,小单孢菌的孢子则出现在20%和30%的蔗糖层中,但数量较少。Suzuki等通过在80℃处理1 h的样品中加入2 mL 0.1%的脱脂牛奶(溶于10 mmol/L的咪唑代丙烷磺酸,pH 8.0)富集孢子,从21份样品中选择性地分离到鱼孢菌^[12]。

1.2 培养基的选择和设计

迄今为止,人们对海洋微生物的营养需求和代谢活动还知之甚少。通常情况下,海洋中的营养物质浓度较实验室条件下会低3个数量级左右。在低浓度的培养基上,大多数海洋微生物的生长相对缓慢。因此,选择和设计合适的培养基对于海洋微生物的分离往往有着重要意义,比如在培养基中加入特定的碳源、氮源可选择性地分离到较多的海洋放线菌^[9],在培养基中加入动植物组织的提取液可分离到较多的共附生海洋微生物^[13],而在培养基中加入小分子信号化合物则能增加可培养海洋微生物的数量^[14];另外,在培养基中不加或少加营养物质,并延长培养时间可分离到一些特有的海洋

微生物^[15]。我们曾使用了5种培养基从渤海海湾的沉积物中选择性分离海洋放线菌,发现甘油-精氨酸培养基及干酪素-可溶性淀粉培养基对海洋放线菌具有很好的分离效果,从这两种培养基上所分离到的海洋放线菌数量和类群明显多于其余3种培养基^[16]。Santavy等通过在培养基中加入海绵提取液,从加勒比海绵*Ceratoporella nicholsoni*中分离到与海水中迥然不同的微生物^[13];Jensen等在培养基中加入海砂和海泥的洗脱液,获得了高比例的(82%~91%)需海水才能生长的海洋特有放线菌^[10]。Bruns等通过在海洋微生物的分离培养基中添加10 mmol/L的环-磷酸腺苷(cAMP)、N-丁酰高丝氨酸内酯或含氧己酰-DL-高丝氨酸内酯,明显增加了可培养海洋微生物的数量。方东升等从煤粉维生素和甘露醇蛋白胨寡营养培养基中分离到较多的小单孢菌^[6]。Suzuki等从腐殖酸-维生素(HVA)培养基改良的HVG培养基中,选择性地分离到许多双孢放线菌^[17]。他们在HVG培养基中以胞外多糖代替普通的琼脂,并添加了2 mmol/L的CaCl₂。实验证明,此培养基能更有效地促进双孢放线菌孢子的萌发和气生菌丝的生长。另外,姜怡等人推荐了3种培养基——海藻糖-脯氨酸培养基、改良的脯氨酸培养基及改良的高氏二号培养基,这3种培养基中稀有放线菌的出菌率一般都会超过50%^[18]。田甜等人就海洋环境中难培养微生物的寡营养培养进行了综述^[19],对于分离获得此类海洋微生物有较好的启示作用。张秀明等则提到根据海洋微生物中一些独特的代谢途径,设计特殊的培养方法,能获得迄今未获得的纯培养菌,如在培养基中添加铵获得能氧化铵并在此过程中产生能量的海洋泉古菌门的古细菌^[20]。

值得注意的是,海洋微生物往往对海水中盐的组分和浓度有着不同程度的依赖性,因此,在设计培养基时,需要考虑海盐对海洋微生物生长的影响。如近年来发现的盐孢菌*Salinispora* spp.和海孢菌*Marinospora* spp.就只能在海水配制的培养基上生长。*Salinispora*是第一个被发现的海洋特有放线菌属^[15],现在已经证明这个属的放线菌广泛存在于热带、亚热带的海洋沉积物中,目前已发现这个属的3个种。Tsueng等最近就海水中的阳离子及离子强度对*Salinispora*的3个种*S. arenicola*、*S. tropica*和*S. pacifica*生长的影响进行了初步的研究,结果表明,二价镁离子与钙离子及特定的离子强度(8.29~15.2 mS/cm)对于*Salinispora* spp.的生长是必需的^[21]。*Marinospora*为放线菌门中的一个新属(即MAR2),由*Marinospora*中的代表菌株CNQ-140产生的新抗生素marinomycins A-D对耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐万古霉素的肠球菌(VREF)均具有较好的活性,对肿瘤细胞也表现出较强的毒性^[22]。Han等从阿穆尔斯基海湾中分离到*Microbacteriaceae*的一个新属,并将其命名为*Salinibacterium amurskyense* gen. nov. sp. nov.;这类菌株能耐受浓度高达10%的NaCl,不过NaCl对于其生长则并非必需,说明该菌株对海洋环境有良好的适应性^[23]。此外,Zhang等研究了5种培养基对5种海绵中可培养放线菌的分离效率,证明培养基对可培养微生物的数量有着显著的影响;其中,在无机盐成分最为丰富的M3培养基上分离到的菌群也具有多样性^[24]。

除考虑预处理和培养基的影响外, 培养基中特定选择性压力的加入, 也可显著影响所分离到的海洋微生物在类群上的差异性。如Abdelmohsen等在培养基中加入放线菌酮、制霉菌素及萘啶酸, 它们可抑制快速生长的真菌和革兰氏阴性菌, 由此可以分离生长相对缓慢的放线菌^[25]。Taoka等通过在培养基中添加吐温80和 KH_2PO_4 , 选择性地抑制酵母的生长, 从而分离到更多的海洋真菌*thraustochytrids*^[26]。Jesen等则在培养基中比较了加入制霉菌素、利福平、多粘菌素B和新生霉素等对所分离海洋微生物类群的影响, 发现在培养基中加入新生霉素能提高所分离到的海洋放线菌的数量及种类^[10]。

综合应用不同的样品预处理方法、不同的培养基及特定的选择性化合物的作用, 各国学者从不同的海洋环境中陆续分离到许多新的海洋微生物。如Qu等从青岛即墨市海岸沉积物中分离到*Cohaesibacter*的一个新种^[27]; Pujalte等从地中海巴伦西亚海岸附近的海水中分离到 α -proteobacterium的一个新属^[28]。可以预见, 随着分离方法和培养方法的进一步改进, 越来越多的海洋微生物, 包括海水中的微生物、海洋沉积物中的微生物及与海洋动植物共附生的微生物将会得到分离, 海洋微生物丰富的多样性也将被不断地揭示。

1.3 新培养方法的开发

在分离海洋微生物的过程中, 开发培养方法、改善培养技术是获得海洋微生物新菌种的另一途径。对于难培养的海洋微生物, 如何为之提供最接近于生存环境的培养条件和恰当的检出手段是创新的难点。一些学者已在实验室条件下, 采用新的培养方法获得了许多此前未被发现的海洋微生物。如Kaeberlein等设计了模拟自然环境的“扩散箱”, 从潮间带海泥中分离到许多“不可培养”的微生物^[29]。其中, 纯培养物MSC1的16S rDNA与其最近的亲缘菌(*Lewinella persica*)同源性仅为93%。此外, 作者还证明用此方法分离到的许多微生物仅在其它微生物存在的情况下才形成菌落, 暗示这些微生物需要“同伴”的信号来刺激它们生长。因此, 从共生菌而非纯培养物中筛选生物活性物质可作为一种新的策略。Connon等采用高通量(HTC)寡营养培养海洋浮游生物细胞的方法, 成功分离到许多新的微生物菌株^[30]。这些先前“不可培养”的浮游生物主要分属于SAR11(α 亚类)、OM43(β 亚类)、SAR92(γ 亚类)和OM60/OM24(γ 亚类)4类。该方法的培养率较传统的平板培养法高出1.4~120倍。在他们首批分离到的143个微生物中, 仅4个能在对照的平板培养基上生长。冀世奇等还详细介绍了使用水油乳化法、膜乳化法、挤出法、微流体法等微包埋培养技术来分离培养海洋微生物^[31]。该技术是一种模拟海洋微生物原位生长环境的培养方式, 特别适于浮游微生物的培养。由此, 可对分离到的生长缓慢的菌株进行多样性及代谢产物的研究。

在尝试多种培养方法时, 一些高灵敏度的观察、检测技术是非常重要的。海洋微生物成活率被低估的一个原因就是传统检测方法的限制。大多数海洋细菌还未达到可见浊度时已经进入稳定期。因此, 成活率如以可被检测到的生长浓度而计算, 则可能受到限制, 真实的成活率往往要高于计算值。将荧光显微技术、流式细胞技术、细菌染色计数、双链核酸染色计数等方法应用于海洋微生物的检测中, 能提高可培养

海洋微生物的比例^[19]。

2 海洋微生物天然产物的发现

2.1 海洋微生物天然产物的筛选

在获得可培养的海洋微生物后, 如何从中筛选到有活性的海洋微生物天然产物, 才是研究工作的目标。传统的天然产物筛选的方法, 同样适用于海洋微生物来源的活性天然产物的筛选, 并已有诸多的成功报道。本文重点就海洋微生物天然产物筛选中的应用加以阐述。常用的筛选方法主要包括3类: 一是传统的活性筛选, 此方法以活性为基础, 根据活性追踪发酵液中的相应组分; 二是模型筛选, 这类筛选一般需建立针对特定靶标的筛选模型, 并对模型进行各种参数的评估后再进行筛选; 三是基因筛选, 基因筛选是根据微生物天然产物生物合成基因簇中一些酶的保守区域设计引物, 从微生物中特异性地筛选具有某类核心结构或后修饰基团的天然产物。需要说明的是这3种筛选方法并不是孤立的: 通过分析海洋微生物次级代谢产物中相关酶编码基因的同源性, 可预测经活性筛选或模型筛选得到的化合物的结构, 如以该酶的基因作为出发点, 最终还能挖掘到负责该化合物生物合成的基因簇; 而通过基因筛选得到的某类化合物, 最终也需要通过传统的活性检验或特定的模型评价这些天然产物作为先导化合物的潜力。无论以哪种筛选方法为主导, 在确定活性组分后, 经分离纯化、图谱解析, 最终可确定化合物的结构。

2.1.1 传统的活性筛选 传统的活性筛选, 即直接对菌株发酵液或提取物进行活性测试, 根据活性跟踪化合物进行筛选。较常见的活性筛选方法包括: 抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗寄生虫等。Abdelmohsen等对海绵分离的放线菌中的天然产物进行了抗细菌、抗真菌和抗寄生虫的活性筛选^[25]; Zheng等就海洋植物或动物表皮和肠道中共生的放线菌, 采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)对其中的天然产物进行了抗肿瘤活性分析^[32]。

2.1.2 模型筛选 模型筛选是一般基于药理学原理建立特定的模型, 并对模型进行有效的评估后, 进行针对性筛选, 此类筛选往往涉及到细胞水平甚至分子水平。如Sandberg等建立了一种在96孔板中高通量筛选抑制*Staphylococcus aureus*生物被膜形成的化合物的筛选模型^[33]。此模型以结晶紫染色为基础, 可特异性地筛选*S. aureus*生物被膜抑制剂, 而非杀菌化合物, 因此, 该法所筛选到的活性产物对于减少细菌的耐药性有较大的意义。Gao等建立了与动脉粥样硬化相关的ATP-结合盒转运蛋白A1(ABCA1)高通量筛选模型^[34], 此蛋白能够通过增加胆固醇和磷脂的泵入量而提高高密度脂蛋白的水平, 从而为预防动脉粥样硬化起到积极的作用。作者以构建的模型为基础, 从2 600个化合物中, 筛选到4个对ABCA1起正调节作用的化合物。Gao等以谷氨酸棒状杆菌为测试菌株, 建立了与之具有相似细胞壁结构的结核分枝杆菌细胞壁抑制剂高通量筛选模型^[35], 通过TLC分析谷氨酸棒状杆菌全细胞裂解物中分枝菌酸的种类及含量, 可以了解初筛中阳性化合物对分枝菌酸的抑制强度。韩小贤等在探索如何快速获取具有抗肿瘤活性的菌株时, 组合使用了海虾生物

致死法和tsFT 210细胞的流式细胞术筛选法分别进行初筛和复筛^[36], 该法与流式细胞术的单独筛选模式相比, 具有无漏筛、成本低、速度快和宜于进行大规模筛选等特点。

2.1.3 基因筛选 基因筛选是以某类化合物特定的骨架结构或后修饰基团为出发点, 根据生物合成途径中相应酶基因的保守序列设计引物, 进行筛选。基因筛选是生物信息学发展的必然产物, 这种筛选方法往往能够快速获得含预期结构的化合物。通过对PCR扩增出来的基因进行生物信息学分析, 不仅能推测化合物的类型, 还可从生物学角度对产生相同次级代谢产物的菌株进行排重。如Zhang等对从中国南海海绵分离得到的109个细菌中非核糖体肽的合成潜力进行了研究, 通过PCR扩增非核糖体肽合酶(NRPSs)腺苷化结构域(A domain)基因并进行测序, 推测其中15个菌株具有合成非核糖体多肽的潜力^[37]。Andreas等针对负责苯环或吡咯环卤化的黄素腺嘌呤二核苷酸(FADH₂)依赖的卤化酶保守区设计引物, 筛选到103个新的卤化酶; 对这些卤化酶基因进行系统地进化分析表明, 它们与负责大环内酯类、糖肽类、脂肽类、烯二炔类、氨基香豆素类和安莎类化合物卤化的卤化酶具有不同程度的同源性; 进一步通过HPLC-ESI-MS/MS对6个糖肽类卤化酶阳性菌株发酵产物进行分析, 表明它们均在相对分子质量为1 000~1 700范围内显示出含卤化合物同位素峰, 其二级质谱中也发现了特征性的糖碎裂峰^[38]。Gontang等对海洋沉积物中分离到的60个放线菌进行了酮合酶结构域(KS domain)和A domain的PCR筛选; 将扩增的基因片段进行克隆测序并在NCBI中进行比对, 结果表明某些菌株包含几套不同KS/NRPS, 根据同源性的不同可进一步预测每一套KS/NRPS所编码的产物与已知产物的异同^[39]。这样, 在全基因组信息未知的情况下, 可对菌株的次级代谢潜能作一个生物信息学的评估。裴刚等人则是结合了活性和基因筛选, 从海洋微生物中特异性地筛选到烯二炔类抗生素产生菌, 他们根据烯二炔类抗生素能够引起DNA断裂的特性, 巧妙地构建了活性筛选模型, 选择含溶源性λ-噬菌体的大肠杆菌作为指示菌, 通过检查颜色或荧光变化, 对天然产物库进行了筛选; 进一步根据烯二炔核心结构中独特且保守的I型PKS设计引物, 通过PCR扩增对海洋微生物库进行了基因筛选^[40]。

2.2 宏基因组技术在海洋微生物天然产物筛选中的应用

现已证明, 在目前实验条件下, 可培养微生物仅占微生物总量的0.1%~1%。为了从环境中获取新的天然产物而又不依赖于传统的培养方法, 独立于培养的宏基因组学就逐渐发展起来。宏基因组(Metagenomics)是指直接从环境中提取总的DNA(有的经过富集再提取DNA), 并对其遗传学和功能学的研究^[41]。宏基因组不依赖于微生物的分离与培养, 因而减少了由此带来的瓶颈问题。对宏基因组进行研究时, 一般先将DNA从样品中直接提取出来, 根据目的不同连接于特定的载体中, 如粘粒、福斯质粒和细菌人工染色体(BACs)等, 然后进行基因筛选或功能筛选^[42]。在对某类特定的化合物进行基因筛选时, 如由KS/NRPS简并引物筛选到的克隆数目较多, 可根据后修饰酶如甲基转移酶、糖基转移酶、P450羟化酶等保守区设计引物, 进行第二轮复筛, 由此减少文库中的阳性克隆数目。进一步根据限制性片段长度多

态性(RFLP)分析及Southern杂交, 可获得整个基因簇, 而后将基因进行组装并导入合适的异源宿主中进行表达^[43]。宏基因组作为分离培养海洋微生物之外的补充研究方法, 不仅可用于研究海洋微生物的多样性, 其包含的次级代谢相关的基因资源大大丰富了筛选的材料, 为获得新的活性化合物提供了另一途径。

Chu等从海水直接提取DNA, 以BAC为载体构建宏基因组文库, 通过在培养基中添加 $\phi=1\%$ 的三丁酸甘油酯和1%的阿拉伯胶, 成功地筛选到两个新的酯酶EstA和EstB^[44]。定点突变显示: EstA含有保守的催化位点S146-D222-H255, 并且在多种二价离子及高浓度NaCl存在情况下, 均有良好的活性, 显示了对环境的良好适应性; EstB含有一个不常见的催化三联体位点S-E-H, 对

-硝基苯酯有显著的活性, 同时在30%的甲醇、乙醇、二甲基甲酰胺和二甲基亚砷中仍能保持活性, 具有潜在的工业应用价值。Piel等从*Theonella swinhoei*海绵组织中提取DNA建立了包含约60 000个克隆的宏基因组文库, 并从文库中筛选到具有抗肿瘤活性的聚酮化合物onnamides和theopederins^[45]。对两个化合物的生物合成基因簇进行深入的研究发现, 其组织形式和基因特征均与原核生物高度相似, 进一步实验证明活性产物是由海绵共生的细菌合成。在国内, 李翔等人将宏基因组工程与海洋生物学有机结合, 从开发海洋微生物基因资源方面进行了简单的综述, 重点对宏基因组工程中克隆载体、表达宿主的开发, 外源大片段DNA的制备和宏基因组文库的高通量筛选进行了归纳和总结, 并提出了一个带有自动化特征的海洋微生物功能基因簇表达平台, 探讨了海洋微生物资源利用的新途径^[46]。

2.3 基因组测序在海洋微生物天然产物发现中的应用

通过基因组测序获得的大量生物学信息, 可以分析菌株的次级代谢潜能, 快速发现可能的天然产物生物合成基因簇。由于许多次级代谢产物均由组装成模块的多功能合酶PKS/NRPS所催化, 且往往与调节基因和抗性基因相连成簇, 因此通过对PKS/NRPS中结构域的分析, 可预测新聚酮和非核糖体多肽的大致化学结构。通过优化发酵条件或采用异源生物合成等方式, 最终促使“沉默”的基因簇得到表达, 从而获得新的天然产物。Udwary等测定了*Salinispora tropica* CNB-400中5 183 331 bp环状基因组序列, 经生物信息学分析, 找到了17个次级代谢生物合成基因簇, 这些基因簇的总长度大约518 Kb, 占基因组容量的10%左右^[47]。这是在已测序的微生物中, 次级代谢相关基因所占比例最大的菌株。而到目前为止, 从该菌株中分离得到的化合物仅有salinosporamides、sporolides、lymphostin和salinilactam。此外, 从这17个次级代谢相关的生物合成基因簇中, 分别发现了desferrioxamine、yersiniabactin和coelibactin相似的生物合成基因簇。需要说明的是, 基因组测序和化合物结构解析对化合物的鉴定是相辅相成的, 如在大环聚烯化合物salinilactam的发现过程中, 基因组测序获得的信息加快了该化合物结构的解析; 而结构的最终确定反过来也揭示了相关化合物生物合成基因簇的排列方式。*Salinispora arenicola* CNS-205的测序工作也已经展开, 这将

有助于人们了解海洋放线菌的次级代谢能力及阐述其与海洋环境相适应的生理特性。随着基因组测序技术的提高和成本的降低,越来越多的海洋微生物中次级代谢生物合成基因簇及其相关的新产物将会陆续被发现。

3 异源生物合成共附生或不可培养的海洋微生物天然产物

近年来,许多学者在海洋动植物中陆续发现了大量有药用价值的天然产物,进一步研究发现许多化合物是由其共生或附生的海洋微生物负责合成的。然而,共附生海洋微生物在实验室条件下通常难以培养,因而限制了其产生的活性天然产物的研究及应用。通过克隆活性产物的生物合成基因簇,并将其导入异源宿主进行表达而获得目的产物不失为一种良策。异源生物合成的关键在于选择合适的宿主和开发相应的载体。菌株中的GC%含量、密码子偏好性及宿主中是否含有表达产物所需的起始前体均是选择宿主时应考虑的。选择与原始菌株在遗传学上具有相似性的宿主,可在最大程度上提供原始的细胞环境。此外,开发相应的遗传工具对于成功实现次级代谢产物的异源生物合成也具有重要意义。所选择的载体需要有一定的容量,连接需表达的基因簇后,具有较好的稳定性,不会出现基因的丢失或重排等问题,并同时便于进行遗传操作^[42]。

Liu等从海洋被囊动物*Aplidium lenticulum*的共生菌中分离到一个主产物为灰紫红菌素A的链霉菌*Streptomyces* sp. JP95^[48]。灰紫红菌素A是一个含高度氧化的螺酮缩醇结构的芳香聚酮化合物,是端粒酶和逆转录酶的强抑制剂。初步研究发现其生物合成基因簇中有11个开放阅读框负责芳香聚酮环的氧化修饰,最终形成环氧螺酮缩醇骨架。作者通过在*Streptomyces lividans* ZX1中异源表达该化合物的生物合成基因簇,绕过了*Streptomyces* sp. JP95对外源DNA的“限制性”,最终检测到灰紫红菌素A和其它3个类似物。异源表达的成功为下一步利用组合生物合成创制有相似骨架的“非天然”产物打下了良好的基础。此外,鉴于II型PKS生物合成基因簇一般不超过40 kb, Andreas等在异源宿主*Streptomyces albus* J1074中表达包含不同卤化酶和II型PKS生物合成基因的质粒,研究获得新的含卤化合物的可能性,最终获得了一个相对分子质量为549的含卤新化合物CBS 40^[38]。由于海洋环境中存在大量的卤离子,海洋天然产物中含卤化合物的比例较陆地含卤天然产物高出许多;此外,卤化酶家族中FADH₂依赖型卤化酶特异性催化苯环或吡咯环的卤化,而芳香聚酮化合物多由II型PKS催化。因此,异源表达含卤化酶的II型PKS生物合成基因簇可能获得新的含卤天然产物。

到目前为止,实现异源生物合成的大多是一些结构较为简单的次级代谢产物,对于一些复杂的PKS和NRPS衍生的化合物来说,除基因在异源宿主中有兼容性问题外,抗性基因的表达对于宿主的生存是必须的。尽管许多抗性基因存在于生物合成基因簇中,但越来越多的事实表明,抗性是由多个因素决定的,而某些抗性基因与该产物的生物合成基因簇相距甚远^[43],这是在进行异源表达时应注意的问题。随着越来越多的难培养或不可培养海洋微生物天然产物生物合成

基因簇的克隆,同时伴随着宿主和载体的开发,更多的海洋微生物天然产物将会陆续实现异源生物合成。

4 组合生物合成改造海洋微生物天然产物

组合生物合成是指以微生物为“细胞工厂”,通过对天然产物代谢途径的遗传改造来获得新型复杂化合物的过程。组合生物合成包含两个范畴:一是对原菌株进行遗传改造,通过对天然产物生物合成基因簇中相关基因进行缺失、置换或插入,由此获得重组菌株,产生所需要的天然产物及其结构类似物;二是将不同来源的天然产物生物合成基因进行重组,构建新的代谢途径。相比之下,采用化学合成的方法很难获得这些复杂的天然产物结构类似物,因而组合生物合成可作为一种发现和发展新药的新途径,结合微生物大规模发酵,还可实现有药用价值的结构类似物的工业化。近年来,随着越来越多的海洋天然产物生物合成基因簇的克隆和合成机制的阐明,使得有可能将这些宝贵的基因资源纳入到组合生物合成的基因资源库中,由此扩大组合生物合成的应用范围,有利于开发更多具有药用价值的化合物。

如将salinosporamide A生物合成中的卤化酶基因*sal L*阻断以后,在*sal L*阻断变株中加入合成的5'-fluoro-5'-deoxyadenosine (5'-FDA),可以得到新的氟取代salinosporamide衍生物^[49]。对参与salinosporamide A合成的底物L-3-cyclohex-2'-enylalanine (CHA)生物合成途径中双氢预苯酸进行脱羧脱水催化的*sal X*基因进行阻断后,所有salinosporamides衍生物的合成均被阻断,仅检测到antiprotealide。在*sal X*阻断变株中加入非蛋白环己烷和环戊烷氨基酸,结果得到了预期的产物salinosporamide X1 (NPI-2056,已由半合成实现)和新的salinosporamide X2^[50](图1)。对蓝藻共生菌*Prochloron didemni*合成的cyanobactins环肽类化合物进行研究发现,这些化合物的前体是核糖体合成的前多肽原(PatE),前多肽原随后裂解成两个分别带8个氨基酸残基的前肽。有趣的是,29个同源性较高的patE扩增子中均发现存在两个高度变异的前肽编码区;而其它区域几乎是完全一致的。正是这两个前肽编码区的高度特异,导致了不同环肽化合物的形成^[51]。受此启示,Donia等构建了一个新的*patEdm*基因,在这个基因中,*patE2*所编码的ulithiacyclamide区域被完全替换为人工构建的另一多肽,将此新的“前肽盒”引入到*PatE2*所在的位置,并在大肠杆菌中进行表达,最终获得了新的具有抗凝血功能的环肽,并将其命名为eptidemnamide^[52](图2)。这也是第一个将海洋天然产物生物合成基因簇克隆到大肠杆菌中进行异源表达及组合生物合成的例子。由此,通过改变*patE*基因的编码区,就可得到类似的环肽类化合物库。另外,将海洋链霉菌*Streptomyces maritimus*中负责起始单元苯甲酰-CoA生物合成的苯甲酰:CoA连接酶基因(*encN*)导入红霉素产生菌*Saccharopolyspora erythraea*中(红霉素生物合成的PKS被截短为DEBS1-TE,且模块中的AT结构域置换为*Sorangium cellulosum*中对应的AT结构域),结果所产生的5-苯取代三酮内酯产量较原来提高了3倍。同时,EncN还能转化*p*-氟苯甲

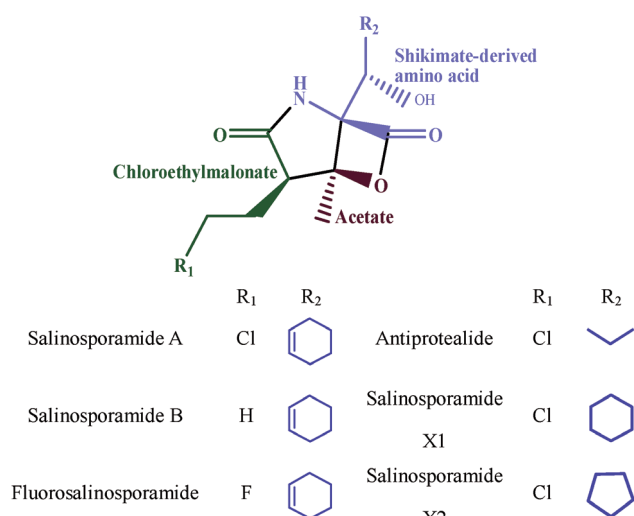


图1 Salinosporamides及其类似物的化学结构
Fig. 1 Structures of salinosporamides and its analogues

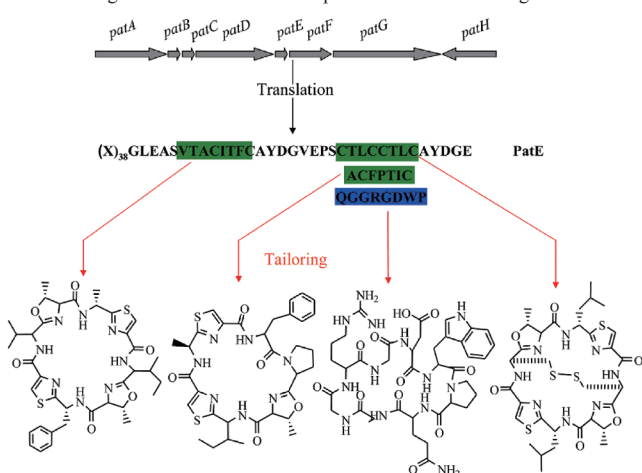


图2 共生菌 *Prochloron* spp. 的 *pat* 基因编码不同结构的多肽^[52]
Fig. 2 Diversity of peptides encoded by the *pat* genes from symbiotic bacteria *Prochloron* spp.^[52]

patE 基因被翻译为相应的蛋白后, 裂解为两个短的前肽 (颜色标记区)。前肽经进一步加尾修饰, 形成两个独立的环肽。绿色区域表示天然前肽, 蓝色区域为人工构建的前肽, 其终产物为 eptidemnamide。After gene translation, the protein of *patE* is cleaved to release two short propeptides (colored regions). Further tailoring gives rise to two individual macrocyclic natural products per *patE* gene. The propeptides sequence in green are "natural" while sequence in blue is an artificial modification that resulted in the biosynthesis of eptidemnamide。酸形成相应的 *p*-氟苯甲酰-CoA, 该底物能被“杂合”的 PKS (sor-ery) 所识别, 形成新的氟取代苯基三酮内酯类似物。进一步将 *Streptomyces maritimus* 中编码 *L*-苯丙氨酸氨裂解酶基因 *encP* 与“杂合”PKS 基因共表达后, 在不加入苯甲酸的情况下, 也产生了 5-苯取代三酮内酯^[53] (图3)。

5 展望

目前, 海洋微生物天然产物的生物医学价值正受到热烈的关注。世界各地针对海洋微生物的多样性及生态学意义、海洋微生物的可培养性及海洋微生物天然产物的开发展开了广泛的研究。除前文所述的方法, 一些较新的技术还应用于对已知菌种的二次开发, 如国内于志斌等报道运用核糖

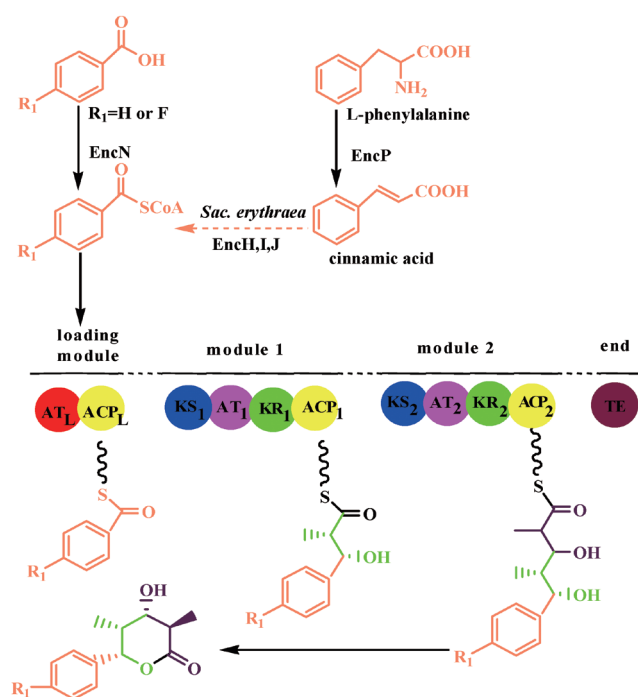


图3 糖多孢红霉菌中杂合三酮合酶 sor-ery 起始前体苯甲酰辅酶A的替换供应途径^[53]

Fig. 3 Alternative routes for supply of benzoyl-CoA to the sor-ery hybrid triketide synthase in *Saccharopolyspora erythraea*^[53]
KS=酮合成酶, AT=酰基转移酶, KR=酮还原酶, ACP=酰基载体蛋白, TE=硫酯酶。负载模块中的AT结构域来自负责 soraphen 生物合成的 PKS
KS=ketosynthase, AT=acyltransferase, KR=ketoreductase, ACP=acyl carrier protein, TE=thioesterase. The AT domain of loading module is derived from soraphen PKS

体工程技术 (即运用抗生素抗性筛选获得核糖体功能发生改变的突变株) 对无活性产物的海洋微生物菌株进行二次开发利用, 通过对无活性的海洋来源放线菌 B3054 进行链霉素抗性筛选, 获得了一株具有抗肿瘤活性的链霉素抗性突变株 SY-1, 并从该突变株的发酵物中分离得到了 4 个活性化合物^[54]。与此同时, 世界各国纷纷建立了海洋微生物菌种保存中心 (Marine Microbial Culture Collection, MMCC), 我国第一个海洋微生物菌种保藏管理中心也于 2006 年 8 月通过验收^[9]。随着对海洋微生物资源的开发, 对海洋天然产物生物合成基因簇的挖掘和随之进行的相关酶催化机制研究的进一步深入, 将会有越来越多的新菌株和新产物被发现, 海洋微生物也将成为药用天然产物的一个重要来源。

References

- Jesen PR, Fenical W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annu Rev Microbiol*, 1994, **48**: 559~584
- Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2009, **26**: 170~244
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2010, **27**: 165~237
- Pisano MA, Sommer MJ, Lopez MM. Application of pretreatments for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Appl*

- Microbiol Biotechnol*, 1986, **25** (3): 285~288
- 5 Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao HG, Zhuang L, Lin HP, Yu HP, Li J, Yao XS, Goodfellow M, Ruan JS. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar Drugs*, 2009, **7** (1): 24~44
- 6 Fang DS (方东升), Jiang H (江红), Xie Y (谢阳), Xiao ZG (肖征恭), Chen XM (陈晓明), Zheng W (郑卫), Cheng YR (程元荣). 海洋小单孢菌分离和生物活性物质的筛选. Proceedings of the 8th Conference on Marine Biotechnology & Drugs, Dalian, China, 2006. 526~529
- 7 Wang HY (王海雁), Liu J (刘健), Zhao SJ (赵淑江). Isolation of marine actinomycetes strains from sediments in Nanji Island offshore. *Mar Sci* (海洋科学), 2010, **34** (1): 48~51
- 8 Harald B, Olga AG, Kerstin E, Fjærvik E, Larissa PT, Sergey BZ. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity. *Environ Microbiol*, 2007, **9** (11): 2756~2764
- 9 Wang HM (王宏梅), Zhao XQ (赵心清). Progress in the bio-diversity studies of culturable marine actinobacteria. *Microbiology* (微生物学通报), 2007, **34** (5): 996~1000
- 10 Jensen PR, Gontang E, Mafnas C, Mincer TJ, Fenical W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ Microbiol*, 2005, **7** (7): 1039~1048
- 11 Yamamura H, Hayakawa M, Iimura Y. Application of sucrose-gradient centrifugation for selective isolation of *Nocardia* spp. from soil. *J Appl Microbiol*, 2003, **95** (4): 677~685
- 12 Suzuki Si, Okuda T, Komatsubara S. Selective isolation and distribution of sporichthya strains in soil. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (5): 1930~1935
- 13 Santavy DL, Colwell RR. Comparison of bacterial communities associated with the Caribbean sclerosponge *Ceratoporella nicholsoni* and ambient seawater. *Mar Ecol Progr Ser*, 1990, **67** (1): 73~82
- 14 Bruns A, Cypionka H, Overmann J. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (8): 3978~3987
- 15 Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (10): 5005~5011
- 16 Lin L (林灵), Tan Y (谭亿), Chen FF (陈菲菲), Zhou HX (周红霞), Wang YG (王以光), He WQ (赫卫清), Wang Y (王勇). Diversity of culturable actinomycetes in sea deposit of Tiger Beach at Bohai Bay, Dalian, China. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2011, **51** (2): 262~269
- 17 Suzuki Si, Takahashi K, Okuda T, Komatsubara S. Selective isolation of actinobispora on gellan gum plates. *Can J Microbiol*, 1998, **44** (1): 1~5
- 18 Jiang Y (姜怡), Duan SY (段淑蓉), Tang SK (唐蜀昆), Chen HH (陈华红), Li WJ (李文均), Xu LH (徐丽华). 稀有放线菌分离方法. *Microbiology* (微生物学通报), 2006, **33** (1): 181~183
- 19 Tian T (田甜), Li DM (李冬梅), Dai SK (戴世鲲), Yin KD (殷克东), Sun HM (孙慧敏), Li X (李翔). Culture methods of the oligotrophic marine microbes. *Microbiology* (微生物学通报), 2009, **36** (7): 1031~1039
- 20 Zhang XM (张秀明), Zhang XH (张晓华). New culture approaches of marine microorganisms. *Mar Sci* (海洋科学), 2009, **33** (6): 99~104
- 21 Tsueng G, Lam KS. A preliminary investigation on the growth requirement for monovalent cations, divalent cations and medium ionic strength of marine actinomycete *Salinispora*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **86** (5): 1525~1534
- 22 Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "*Marinispora*". *J Am Chem Soc*, 2006, **128** (50): 16410~16410
- 23 Han SK, Nedashkovskaya OI, Mikhailov VV, Kim SB, Bae KS. *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae from the marine environment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**: 2061~2066
- 24 Zhang H, Zhang W, Jin Y, Jin M, Yu X. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2008, **93** (3): 241~248
- 25 Abdelmohsen UR, Pimentel-Elardo SM, Hanora A, Radwan M, Abou-El-Ela SH, Ahmed S, Hentschel U. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. *Marine Drugs*, 2010, **8** (3): 399~412
- 26 Taoka Y, Nagano N, Okita Y, Izumida H, Sugimoto S, Hayashi M. Effect of addition of Tween 80 and potassium dihydrogenphosphate to basal medium on the isolation of marine eukaryotes, thraustochytrids. *J Biosci Bioeng*, 2008, **105** (5): 562~565
- 27 Qu LY, Lai QL, Zhu FL, Hong XG, Sun XQ, Shao ZZ. *Cohaesibacter marisflavi* sp. nov., a marine bacterium isolated from sediment of a seashore pond for sea cucumber culture. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010, doi: ijs.0.021972-0
- 28 Pujalte MJ, Macián MC, Arahal DR, Ludwig W, Schleifer KH, Garay E. *Nereida ignava* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic marine alpha-proteobacterium that is closely related to uncultured Prionitis (alga) gall symbionts. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**: 631~636
- 29 Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 2002, **296** (5570): 1127~1129
- 30 Cannon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (8): 3878~3885
- 31 Ji SQ (冀世奇), Liu CG (刘晨光), Zhang XH (张晓华). The progress and applications of microencapsulation and cultivation of marine microorganisms. *Period Ocean Univ Chin* (中国海洋大学学报), 2010, **40** (4): 53~59
- 32 Zheng Z, Zeng W, Huang Y, Yang Z, Li J, Cai H, Su W. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **188** (1): 87~91
- 33 Sandberg M, Määttänen A, Peltonen J, Vuorela PM, Fallarero A.

- Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus aureus* biofilms: An approach to screening of natural antimicrobial compounds. *Int J Antimicrob Ag*, 2008, **32** (3): 233~240
- 34 Gao J, Xu Y, Yang Y, Yang Y, Zheng Z, Jiang W, Hong B, Yan X, Si S. Identification of upregulators of human ATP-binding cassette transporter A1 via high-throughput screening of a synthetic and natural compound library. *J Biomol Screen*, 2008, **13** (7): 648~656
- 35 Gao P, Guan Y, Song D, Xiao C. A cell-based screening system for detection of inhibitors toward mycobacterial cell wall core. *J Antibiot*, 2009, **62**: 315~318
- 36 Han XX (韩小贤), Cui CB (崔承彬), Liu HB (刘红兵), Zhu TJ (朱天骄), Gu QQ (顾谦群), Li D (李冬), Wen JN (温江妮). Screening of marine-derived microbial strains by combination of bioassays using brine shrimp and mammalian cancer cell. *Period Ocean Univ Chin* (中国海洋大学学报), 2005, **35** (1): 38~42
- 37 Zhang W, Li Z, Miao X, Zhang F. The screening of antimicrobial bacteria with diverse novel nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes from South China Sea sponges. *Mar Biotechnol*, 2009, **11** (3): 346~355
- 38 Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski A, Schneider K, Welzel K, Wohler SE, Holzenkämpfer M, Nicholson GJ, Bechthold A, Süßmuth RD, Vente A, Pelzer S. A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources. *ChemBioChem*, 2007, **8** (7): 757~766
- 39 Gontang EA, Gaudêncio SP, Fenical W, Jensen PR. Sequence-based analysis of secondary metabolite biosynthesis in marine actinobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2010, **76** (8): 2487~2499
- 40 Pei G (裴刚), Dai HQ (代焕琴), Ren B (任彪), Liu XY (刘向阳), Zhang LX (张立新). Exploiting bioactive enediynes from marine microbe based on activity and gene screening. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2010, **50** (4): 472~477
- 41 Jagtar S, Arvind B, Neha S, Amit J, Niti B, Sukhdeep S, Vandana B, Navneet B. Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnol J*, 2009, **4** (4): 480~494
- 42 Daniel R. The metagenomics of soil. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3** (6): 470~478
- 43 Fortman JL, Sherman DH. Utilizing the power of microbial genetics to bridge the gap between the promise and the application of marine natural products. *ChemBioChem*, 2005, **6** (6): 960~978
- 44 Chu X, He H, Guo C, Sun B. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **80** (4): 615~625
- 45 Piel J, Hui D, Wen G, Butzke D, Platzer M, Fusetani N, Matsunaga S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *PNAS*, 2004, **101** (46): 16222~16227
- 46 Li X (李翔), Qin L (秦岭), Dai SK (戴世鲲), Jiang SM (姜淑梅), Liu ZH (刘志恒). Marine microbial metagenomics: Progress and prospect. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2007, **47** (3): 548~553
- 47 Udvarý DW, Zeigler L, Asolkar RN, Singan V, Lapidus A, Fenical W, Jensen PR, Moore BS. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *PNAS*, 2007, **104** (25): 10376~10381
- 48 Li A, Piel J. A gene cluster from a marine streptomyces encoding the biosynthesis of the aromatic spiroketal polyketide griseorhodin A. *Chem & Biol*, 2002, **9** (9): 1017~1026
- 49 Eustáquio AS, Moore BS. Mutasynthesis of fluorosalinosporamide, a potent and reversible inhibitor of the proteasome. *Angew Chem Int Ed in Engl*, 2008, **47** (21): 3936~3938
- 50 McGlinchey RP, Nett M, Eustáquio AS, Asolkar RN, Fenical W, Moore BS. Engineered biosynthesis of antiprotealide and other unnatural salinosporamide proteasome inhibitors. *J Am Chem Soc*, 2008, **130** (25): 7822~7823
- 51 Piel J. Combinatorial biosynthesis in symbiotic bacteria. *Nat Chem Biol*, 2006, **2** (12): 661~662
- 52 Donia MS, Hathaway BJ, Sudek S, Haygood MG, Rosovitz MJ, Ravel J, Schmidt EW. Natural combinatorial peptide libraries in cyanobacterial symbionts of marine ascidians. *Nat Chem Biol*, 2006, **2** (12): 729~735
- 53 José GB, Xiang LK, Hong H, Moore BS, Leadlay PF. Engineered biosynthesis of phenyl-substituted polyketides. *ChemBiochem*, 2004, **5** (8): 1129~1131
- 54 Yu ZB (于志斌), Zhu TJ (朱天骄), Cui CB (崔承彬), Gu QQ (顾谦群), Liu HB (刘红兵), Fang YC (方玉春), Zhu WM (朱伟明). A practical approach for exploiting useless microbial strains from marine environment by ribosome-engineering technology. *Chin High Technol Lett* (高技术通讯), 2006, **16** (11): 1190~1194