

# 海洋放线菌 *Salinispora arenicola* CNS-205 腺苷化结构域基因 sare0357 的酶活测定

陆胜利<sup>1</sup>, 祁超<sup>2\*</sup>

(1. 安庆医药高等专科学校药理学系, 安徽安庆 246052; 2. 华中师范大学生命科学院, 湖北武汉 430079)

**摘要** [目的] 测定海洋放线菌 *S. arenicola* CNS-205 腺苷化结构域基因 sare0357 的酶活。[方法] 选取海洋放线菌 *Salinispora arenicola* CNS-205 NRPS A domain 基因 sare0357, 对其进行克隆表达和功能鉴定。[结果] 在以 Trp 为底物时测定 Sare0357 蛋白的酶动力学参数为:  $K_m = (0.04033 \pm 0.00367) \text{ mmol/L}$ ,  $V_{max} = (2.13505 \pm 0.02943) \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ ,  $k_{cat} = (14.2336 \pm 0.1962) \text{ min}$ ; Phe 为底物时:  $K_m = (0.02765 \pm 0.00151) \text{ mmol/L}$ ,  $V_{max} = (1.55806 \pm 0.0097) \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ ,  $k_{cat} = (10.3871 \pm 0.0646) \text{ min}$ 。[结论] 丰富洋放线菌 *Salinispora arenicola* CNS-205 NRPS 腺苷化结构域的底物特异性和密码子领域的研究, 为组合生物学和体外酶系合成 NRPs 提供依据。

**关键词** 海洋放线菌; 非核糖体多肽合成酶; 腺苷化结构域; 底物特异性; sare0357

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)33-11632-04

## Determination of Enzyme Activity of sare0357, a Gene of Adenylation Domain from Marine Actinomycete *S. arenicola* CNS-205

LU Sheng-li<sup>1</sup>, QI Chao<sup>2\*</sup> (1. Medical department, Anqing Medical College, Anqing, Anhui 246052; 2. Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Wuhan, Hubei 430079)

**Abstract** [Objective] The aim was to determine enzyme activity of sare0357, a gene of adenylation domain from marine actinomycete *S. arenicola* CNS-205. [Method] Marine actinomycetes *Salinispora arenicola* CNS-205 NRPS A domain gene sare0357 was selected, and the cloning expression and function identification were done. [Result] It was found that Sare0357 could recognize specifically and activate tryptophan (Try) and phenylalanine (Phe). The basic kinetic parameters of it for these two substrates were detected as  $K_m = (0.04033 \pm 0.00367)$  and  $(0.02765 \pm 0.00151) \text{ mmol/L}$ ,  $V_{max} = (2.13505 \pm 0.02943)$  and  $(1.55806 \pm 0.0097) \mu\text{mol}/\text{min}$  and  $k_{cat} = (14.2336 \pm 0.1962)$  and  $(10.3871 \pm 0.0646) \text{ min}$  for Try and Phe respectively. [Conclusion] The aim riched ocean actinomycetes *Salinispora arenicola* CNS-205 NRPS of adenosine structure domain research in the field of the substrate specificity and codes, and provided the basis for combination of biology and enzyme system *in vitro* synthetic NRPS.

**Key words** Marine actinomycete; Nonribosomal peptide synthetases; Adenylation domain

海洋放线菌能通过非核糖体多肽合成酶(NRPSs)合成一系列的具有药用价值的生物活性物质——非核糖体多肽(NRPs)。非核糖体多肽合成酶(NRPSs)由一系列的模块构成,其中的氨基酸腺苷化结构域(A domain)能特异性识别和激活氨基酸底物,在非核糖体多肽合成中起着关键性作用。

海洋放线菌 *Salinispora arenicola* CNS-205 基因组测序结果表明,在 5 786 361 bp 的环状染色体中分布有 10 个 NRPS 相关基因簇, sare0357 基因属于 10 个基因簇中的 SA nrps1 (sare0345-0367)<sup>[1-2]</sup>。sare0357 基因在 NCBI 上被假定为 NRPS 腺苷化结构域基因。笔者选取海洋放线菌 *Salinispora arenicola* CNS-205 NRPS A domain 基因 sare0357, 对其进行克隆表达和功能鉴定,能丰富洋放线菌 *Salinispora arenicola* CNS-205 NRPS 腺苷化结构域的底物特异性和密码子领域的研究,同时也可组合生物学和体外酶系合成 NRPs 提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与仪器

**1.1.1 菌株、质粒。**稀有海洋放线菌 *Salinispora arenicola* CNS205 试验菌株为华中师范大学结构生物学实验室保存。

表达载体(pET28-a、pGEX-KG)、表达质粒和感受态细菌(*E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21)为安庆医药高等专科学校实验

室保存。

**1.1.2 主要试验仪器。**凝胶成像分析系统,美国 Bio-Rad 公司;高速冷冻离心机,核酸蛋白质分析仪,均为德国 Eppendorf 公司;荧光多功能酶标仪,美国 Bio-Tek 公司。

**1.1.3 蛋白的表达和纯化。**蛋白的表达和纯化见文献[3]。

**1.2 Sare0357 复性蛋白的酶活测定** 采用 2009 年 Thomas J. McQuade 等报道的孔雀石绿钼酸铵化学显色定磷法检测 Sare0357 梯度浓度透析复性的成功与否并同时测定 Sare 复性蛋白的酶活。

**1.2.1 Sare0357 复性蛋白底物特异性筛选。**选取 20 种常见氨基酸为底物,于 96 孔板中进行 Sare0357 复性蛋白底物特异性筛选,反应体系为 100  $\mu\text{l}$ (表 1),设定没有加入 Sare0357 复性蛋白的反应体系为对照组,通过比较不同氨基酸体系下 Sare0357 复性蛋白的相对活性,得出 Sare0357 复性蛋白的底物特异性。

表 1 100  $\mu\text{l}$  的反应体系组分

组分	试验组浓度	对照组浓度
氨基酸	0.5 mmol/L	0.5 mmol/L
甘油	10% (V/V)	10% (V/V)
Tris-HCl (pH 7.5)	50 mmol/L	50 mmol/L
DTT	1 mmol/L	1 mmol/L
MgCl <sub>2</sub>	10 mmol/L	10 mmol/L
Sare0357 复性蛋白	0.15 $\mu\text{mol/L}$	-
ATP	0.5 mmol/L	0.5 mmol/L
无机焦磷酸酶	0.4 U/ml	0.4 U/ml

**基金项目** 国家自然科学基金项目(20772040);教育部中央高校自主项目(CCNU14F01006)。

**作者简介** 陆胜利(1966-),男,安徽安庆人,讲师,从事无机与分析化学研究。\*通讯作者。

**收稿日期** 2014-10-15

反应体系的加入顺序依次为氨基酸、甘油、Tris-HCl (pH

7.5)、DTT、MgCl<sub>2</sub>、Sare0357 复性蛋白、无机焦磷酸酶、ATP。最后加入 ATP 时反应开始,25 °C 孵育 5 min 后加入孔雀石绿钼酸铵显色剂 100 μl 使反应终止。反应终止后将 96 孔板置于 30 °C 下 10 min 进行显色反应,反应产物在 620 nm 处有最大吸光值,通过酶标仪检测其 620 nm 处的吸光值。

**1.2.2 基本酶动力学参数的测定。**(1) PPi 标准曲线的测定。以 PPi 为底物,于 96 孔板中进行 PPi 标准曲线的测定(表 2),反应体系为 100 μl。

表 2 PPi 标准曲线的测定

组分	浓度	组分	浓度
PPi	10、20、40、60、80、100 mmol/L	DTT	1 mmol/L
甘油	10% (V/V)	MgCl <sub>2</sub>	10 mmol/L
Tris-HCl (pH 7.5)	50 mmol/L	无机焦磷酸酶	0.4 U/ml

反应体系的加入顺序依次为 PPi、甘油、Tris-HCl (pH 7.5)、DTT、MgCl<sub>2</sub>、无机焦磷酸酶。最后加入无机焦磷酸酶时反应开始,25 °C 孵育 2 min 后加入孔雀石绿钼酸铵显色剂 100 μl 使反应终止。反应终止后将 96 孔板置于 30 °C 下 10 min 进行显色反应,反应产物在 620 nm 处有最大吸光值,通过酶标仪检测其 620 nm 处的吸光值。

以 PPi 浓度为横轴,酶标仪测得的 620 nm 处的吸光值为纵轴,即可绘制出 PPi 标准曲线。

(2) ATP 自水解曲线的测定。于 96 孔板中进行 ATP 自水解曲线的测定(表 3),反应体系为 100 μl。

表 3 ATP 自水解曲线的测定

组分	试验组浓度	对照组浓度
氨基酸	0.5 mmol/L	0.5 mmol/L
甘油	10% (V/V)	10% (V/V)
Tris-HCl (pH 7.5)	50 mmol/L	50 mmol/L
DTT	1 mmol/L	1 mmol/L
MgCl <sub>2</sub>	10 mmol/L	10 mmol/L
ATP	0.5 mmol/L	0.5 mmol/L
无机焦磷酸酶	0.4 U/ml	0.4 U/ml

反应体系的加入顺序依次为氨基酸、甘油、Tris-HCl (pH 7.5)、DTT、MgCl<sub>2</sub>、无机焦磷酸酶、ATP。最后加入 ATP 时反应开始,25 °C 分别孵育 2、4、6、8 min 后加入孔雀石绿钼酸铵显色剂 100 μl 使反应终止。反应终止后将 96 孔板置于 30 °C 下 10 min 进行显色反应,反应产物在 620 nm 处有最大吸光值,通过酶标仪检测其 620 nm 处的吸光值。

以反应体系孵育时间为横轴,酶标仪测得的 620 nm 处的吸光值为纵轴,即可绘制出 ATP 自水解曲线。

(3) 酶促反应初速度范围的测定。分别以苯丙氨酸(Phe)和色氨酸(Trp)为底物,于 96 孔板中进行酶促反应初速度范围的测定(表 4),反应体系为 100 μl。

反应体系的加入顺序依次为 Phe/Trp、甘油、Tris-HCl (pH 7.5)、DTT、MgCl<sub>2</sub>、不同浓度的 Sare0357 复性蛋白、无机焦磷酸酶、ATP。最后加入 ATP 时反应开始,25 °C 分别孵育

2、4、6、8 min 后加入孔雀石绿钼酸铵显色剂 100 μl 使反应终止。反应终止后将 96 孔板置于 30 °C 下 10 min 进行显色反应,反应产物在 620 nm 处有最大吸光值,通过酶标仪检测其 620 nm 处的吸光值。

表 4 酶促反应初速度范围的测定

组分	试验组浓度	组分	试验组浓度
Phe/Trp	0.5 mmol/L	MgCl <sub>2</sub>	10 mmol/L
甘油	10% (V/V)	Sare0357	0.100、0.125、0.150、0.200、 复性蛋白
Tris-HCl (pH 7.5)	50 mmol/L	ATP	0.250、0.300 μmol/L
DTT	1 mmol/L	无机焦磷酸酶	0.5 mmol/L 0.4 U/ml

对反应体系孵育时间和 PPi 的生成量作非线性回归分析,绘制时间-进程曲线,线性范围内,生成 PPi 量最大的酶浓度即为酶的最佳反应浓度。

对反应体系中酶浓度和 PPi 的生成速率作非线性回归分析,绘制酶浓度-PPi 生成速率曲线,线性范围内,最大 PPi 生成速率的孵育时间即为最适孵育时间。

(4) 目的蛋白基本酶动力学参数的确定。在(3)酶促反应初速度范围测定得到的酶促反应的最适酶浓度和最佳孵育时间条件下,分别以 Phe、Trp 为底物,于 96 孔板中进行目的蛋白基本酶动力学参数的测定(表 5),反应体系为 100 μl。

表 5 目的蛋白基本酶动力学参数的确定

组分	试验组浓度	组分	试验组浓度
Phe/Trp	0.1、0.2、0.3、 0.4、0.5 mmol/L	MgCl <sub>2</sub>	10 mmol/L
甘油	10% (V/V)	Sare0357 复性蛋白	0.15 μmol/L
Tris-HCl (pH 7.5)	50 mmol/L	ATP	0.5 mmol/L
DTT	1 mmol/L	无机焦磷酸酶	0.4 U/ml

反应体系的加入顺序依次为不同浓度的 Phe/Trp、甘油、Tris-HCl (pH 7.5)、DTT、MgCl<sub>2</sub>、Sare0357 复性蛋白、无机焦磷酸酶、ATP。最后加入 ATP 时反应开始,25 °C 分别孵育 2 min 后加入孔雀石绿钼酸铵显色剂 100 μl 使反应终止。反应终止后将 96 孔板置于 30 °C 下 10 min 进行显色反应,反应产物在 620 nm 处有最大吸光值,通过酶标仪检测其 620 nm 处的吸光值。

以反应体系 Phe/Trp 浓度为横轴,生成 PPi 的速率为纵轴,通过非线性回归分析,拟合米氏方程曲线并求得酶动力学参数( $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $k_{cat}$ )。

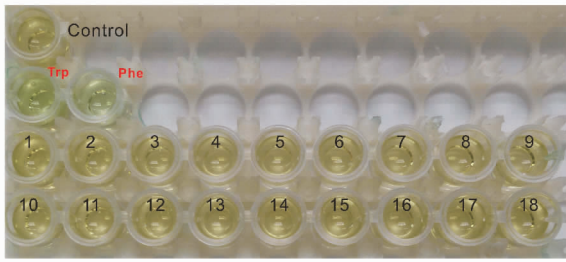
## 2 结果与分析

采用 Thomas J. McQuade 等新建的一种孔雀石绿钼酸铵化学显色定磷法进行高通量筛选和测定 A 结构域的酶活<sup>[4]</sup>。此法综合了酶偶联法(偶联无机焦磷酸酶)、化学显色法及光吸收法,能够快速准确地对 Sare0357 复性蛋白进行酶活测定。

通过高通量筛选的孔雀石绿钼酸铵化学显色定磷法,Sare0357 复性蛋白对 20 种常见氨基酸的活性见图 1。相较于其他 18 种氨基酸,以 Phe/Trp 为底物时,Sare0357 复性蛋

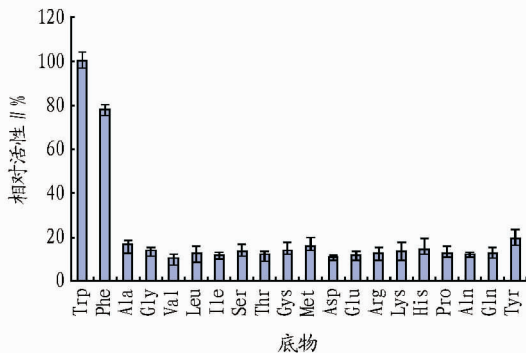
白酶促反应的显色结果较为明显,其中,又以 Trp 为底物时, Sare0357 复性蛋白酶促反应的显色结果最深,呈黄绿色。

通过酶标仪可测得以 20 种常见氨基酸为底物时,孔雀石绿钼酸铵化学显色定磷法显色后反应产物在 620 nm 处的吸光值,由此可得到 Sare0357 复性蛋白对 20 种常见氨基酸的相对活性的比较。图 2 与图 1 所示结果相符,相较于其他 18 种氨基酸,以 Phe/Trp 为底物时,显色后反应产物在 620 nm 处的吸光值较大, Sare0357 复性蛋白的相对活性较高;其中,又以 Trp 为底物时,显色后反应产物在 620 nm 处的吸光值最大, Sare0357 复性蛋白的相对活性最高。由此可得, 20 种常见氨基酸中, Phe/Trp 为 Sare0357 复性蛋白特异性识别底物。其中 Sare0357 复性蛋白识别 Trp 的底物特异性大于 Sare0357 复性蛋白识别 Phe 的底物特异性。



注: Control: 不含 Sare0357 变性蛋白的阴性对照组 (含 Trp) Trp、Phe; 1 ~ 9. Gly、Val、Leu、Ile、Ser、Thr、Cys、Met、Gln; 10 ~ 18. Asp、Glu、Arg、Lys、His、Pro、Asn、Tyr、Ala。

图 1 孔雀石绿钼酸铵化学显色定磷法筛选 Sare0357 复性蛋白的底物特异性



注: 将 Sare0357 复性蛋白对 Trp 的活性值记作 100%。

图 2 Sare0357 复性蛋白对 20 种常见氨基酸的相对活性

以 PPi 为底物, 于 96 孔板中进行 PPi 标准曲线的测定, 以未添加氨基酸、Sare0357 复性蛋白以及 ATP 的反应体系测定 PPi 标准曲线。25 °C 孵育 2 min 后加入孔雀石绿钼酸铵显色剂 100 μl 使反应终止。反应终止后将 96 孔板置于 30 °C 下 10 min 进行显色反应, 通过酶标仪检测反应产物在 620 nm 处的吸光值。以 PPi 浓度为横轴, 酶标仪测得的 620 nm 处的吸光值为纵轴, 即可绘制出 PPi 标准曲线, 结果见图 3。

于 96 孔板中进行 ATP 自水解曲线的测定, 以未添加 Sare0357 复性蛋白的反应体系测 ATP 自水解曲线。25 °C 分别孵育 2、4、6、8 min 后加入孔雀石绿钼酸铵显色剂 100 μl 使反应终止。反应终止后将 96 孔板置于 30 °C 下 10 min 进行

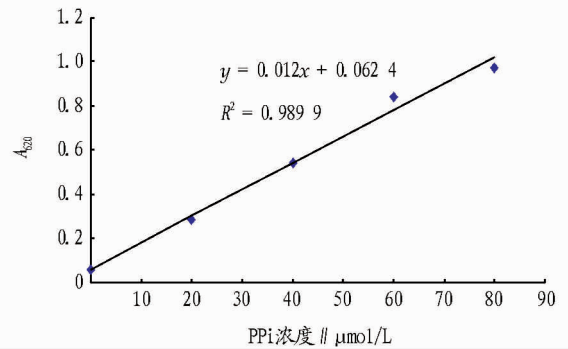


图 3 PPi 标准曲线

显色反应, 通过酶标仪检测反应产物在 620 nm 处的吸光值。以反应体系孵育时间为横轴, 酶标仪测得 620 nm 处的吸光值为纵轴, 即可绘制出 ATP 自水解曲线, 结果见图 4。

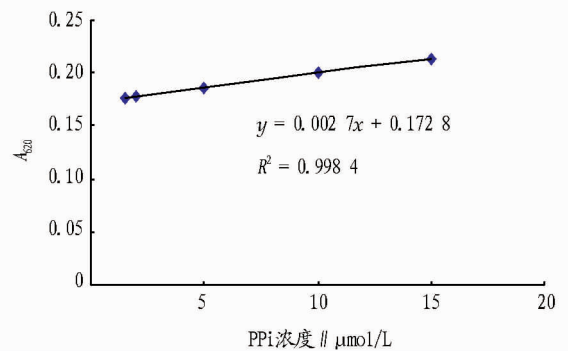


图 4 ATP 自水解曲线

分别以苯丙氨酸 (Phe) 和色氨酸 (Trp) 为底物, 于 96 孔板中进行酶促反应初速度范围的测定, 向 100 μl 的反应体系中依次加入 Phe/Trp (0.5 mmol/L)、10% 甘油 (V/V)、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、DTT (1 mmol/L)、MgCl<sub>2</sub> (10 mmol/L)、不同浓度的 Sare0357 复性蛋白 (0.100、0.125、0.150、0.200、0.250、0.300 μmol/L)、无机焦磷酸酶 (0.4 U/ml)、ATP (0.5 mmol/L)。25 °C 分别孵育 2、4、6、8 min 后加入孔雀石绿钼酸铵显色剂 100 μl 使反应终止。反应终止后将 96 孔板置于 30 °C 下 10 min 进行显色反应, 反应产物在 620 nm 处有最大吸光值, 通过酶标仪检测其 620 nm 处的吸光值。

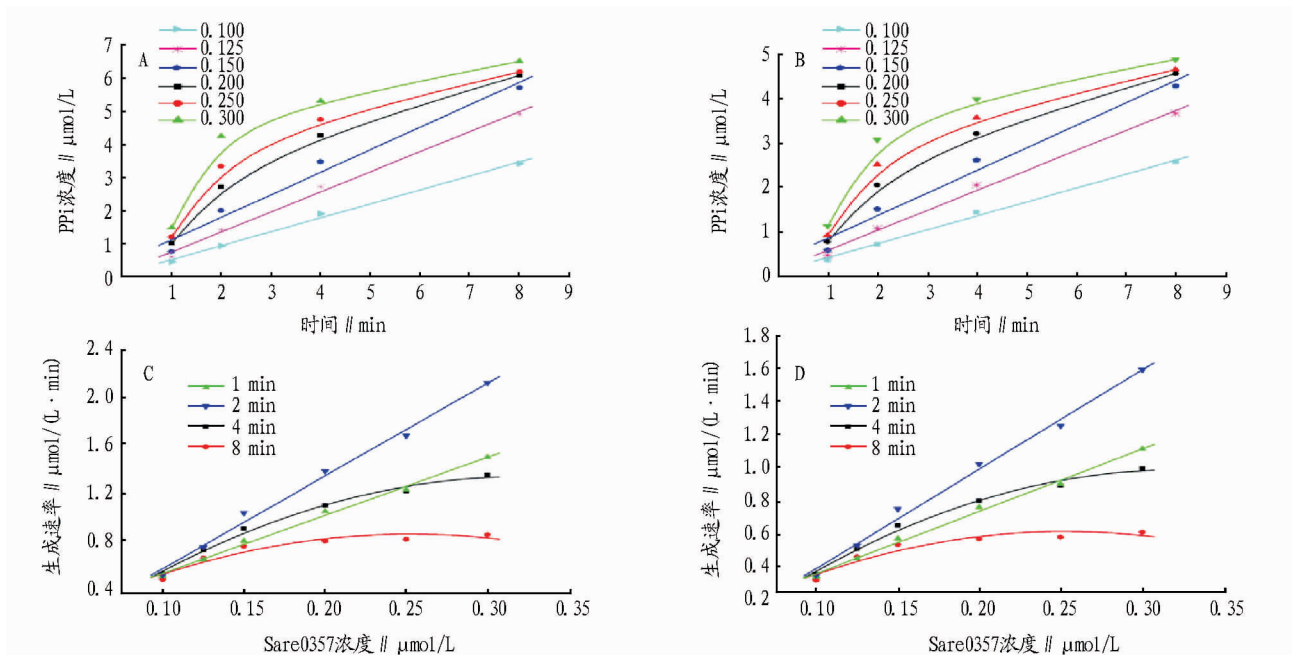
对孵育时间和 PPi 的生成量作非线性回归分析, 绘制时间-进程曲线, 结果见图 5。由图 5 A 可知, 以 Trp 为底物, 仅当 Sare0357 复性蛋白 ≤ 0.15 μmol/L 时, 生成 PPi 的量与孵育时间呈线性递增关系, 且在 Sare0357 复性蛋白浓度为 0.15 μmol/L 时达到最大反应产物生成速率, 由此可知, Trp 为底物时, 酶促反应的最适酶浓度, 即反应体系中 Sare0357 复性蛋白最适浓度为 0.15 μmol/L。同时根据图 5 C 可知, 以 Phe 为底物, 仅当 Sare0357 复性蛋白 ≤ 0.15 μmol/L 时, 生成 PPi 的量与孵育时间呈线性递增关系, 且在 Sare0357 复性蛋白浓度为 0.15 μmol/L 时达到最大反应产物生成速率, 由此可知, 以 Phe 为底物时, 酶促反应的最适酶浓度, 即反应体系中 Sare0357 复性蛋白最适浓度为 0.15 μmol/L。

对 Sare0357 复性蛋白浓度和 PPi 的生成速率作非线性

回归分析,绘制酶浓度-生成速率曲线,结果见图5。由图5B可知,Trp为底物时,只有将孵育时间控制在2 min以内,PPi产物生成速率与酶浓度才能保持线性递增关系,且孵育2 min可达到最大产物生成速率。所以,Trp为底物时,酶促反应的最佳孵育时间为2 min。由图5D可知,Phe为底物时,

只有将孵育时间控制在2 min以内,不同酶浓度下的PPi产物生成速率与酶浓度才能保持线性递增关系,且孵育2 min可达到最大产物生成速率。所以,Phe为底物时,酶促反应的最佳孵育时间为2 min。

综上可知,无论是Trp还是Phe为底物,酶促反应的最



注:A、C. 时间进程曲线,以PPi生成量对孵育时间作线性拟合(A为Trp底物下的时间进程曲线,C为Phe底物下的时间进程曲线)。B、D. 酶浓度曲线,以PPi生成速率对Sare0357复性蛋白浓度作线性拟合(B为Trp底物下的时间进程曲线,D为Phe底物下的酶浓度曲线)。

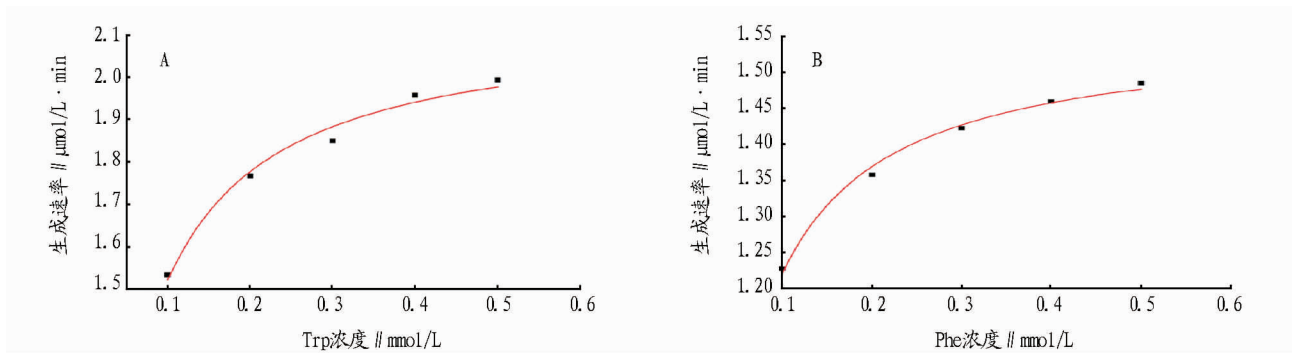
图5 最佳孵育时间和最适酶浓度的确定

适酶浓度为0.15 μmol/L,最佳孵育时间为2 min。

在酶促反应最适酶浓度和最佳孵育时间条件下,分别以Phe、Trp为底物,测定不同丙氨酸浓度进行酶促反应时PPi的生成速率。

以反应体系Phe/Trp浓度为横轴,生成PPi的速率为纵轴,通过非线性回归分析,拟合米氏方程曲线(图6),并求得

酶动力学参数( $K_m$ 、 $V_{max}$ 、 $k_{cat}$ )。Sare0357复性蛋白对Trp的酶动力学参数为: $K_m = (0.04033 \pm 0.00367)$  mmol/L,  $V_{max} = (2.13505 \pm 0.02943)$  μmol/(L·min),  $K_{cat} = (14.2336 \pm 0.1962)$  min; Sare0357复性蛋白对Phe的酶动力学参数为: $K_m = (0.02765 \pm 0.00151)$  mmol/L,  $V_{max} = (1.55806 \pm 0.0097)$  μmol/(L·min),  $K_{cat} = (10.3871 \pm 0.0646)$  min。



注:A. Trp为底物时,Sare0357复性蛋白酶动力学参数的测定;B. Phe为底物时,Sare0357复性蛋白酶动力学参数的测定。

图6 Sare0357复性蛋白酶动力学参数的测定

### 3 讨论

该研究对Sare0357复性蛋白酶活测定结果显示Sare0357复性蛋白具有Trp和Phe底物特异性,能识别并活化Trp和Phe参与NRP的合成,是Trp和Phe特异性的NRPS腺苷化结构域蛋白。而生物信息学预测结果显示,

Sare0357蛋白氨基酸序列标签为DARSVSQMTK,无相应预测底物,与试验结果不符。实际上,基于一直以来对A domain的大量研究工作,尽管利用生物信息学可以较准确地预测A domain底物特异性的预测,但纵观近年海洋放线菌NRPS

(下转第11668页)

**1.3.2.3 接种外植体。**接种前的准备工作同“1.3.1.3”项,在超净工作台上,每个浓度的培养基接种 5 瓶,每瓶接种 5 个嫩茎小块,接种后标明接种时间。每个浓度重复 3 次。

## 2 结果与分析

**2.1 5 种基本培养基对断血流愈伤组织诱导的影响** 从接种 3 周后不同基本培养基对断血流愈伤组织诱导的影响(表 2)可以看出,MS 培养基中原球茎出现率显著高于 N6 和 B5 培养基等,MS、N6、B5、RM 培养基均能够诱导断血流原球茎外植体,但 Miller 基本培养基不能诱导断血流外植体的出现。由此可见,适合断血流愈伤组织诱导的基本培养基为 MS。

表 2 5 种基本培养基对断血流愈伤组织诱导的影响

基本培养基种类	接种的外植体平均数/个	诱导出原球茎外植体平均数//个	污染的外植体平均数//个	原球茎的平均出现率//%
MS	25	13	12	52a
N6	25	5	20	20b
B5	25	2	23	8c
RM	25	1	24	4d
Miller	25	0	25	0

**2.2 不同浓度的 6-BA 及 NAA 对断血流愈伤组织诱导的影响** 从接种 3 周后不同浓度的 6-BA 及 NAA 对断血流原球茎形成的结果(表 3)可以看出,不同浓度的 6-BA 及 NAA 对断血流形成原球茎的效果不同,培养基(1)和(2)上培养出的原球茎健壮度较好,且原球率的出现率较高,但比较而言培养基(1)诱导效果显著好于培养基(2);培养基(3)和(4)上培养出原球茎数量少,且健壮度差。

(上接第 11635 页)

腺苷化结构域底物特异性研究,不难发现 A 结构域预测底物与实际激活氨基酸底物并不匹配的报道。如 SCHULTZ 等<sup>[2]</sup>对 *cymA* (*S. arenicola* CNS-205 Cyclomarin 生物合成基因簇基因)采取生物信息学手段进行底物特异性分析,预测结果表明 *cymA* 的 7 个腺苷化结构域中有 6 个无匹配底物,而试验结果表明这 6 个预测结果表明没有匹配底物的腺苷化结构域基因表达产物均有相对应的特异性底物识别<sup>[2]</sup>。

实际上,现有的 MALDONADO 等<sup>[5]</sup>、STACHELHAUS 等<sup>[6]</sup>建立的 A domain 底物特异性密码子数据库的试验数据几乎全部来源于陆生菌属。而海、陆两地放线菌在生理学和种系发育上显著差异可能造成了海洋放线菌 A domain 底物特异性预测的不准确性。由此可见,海洋放线菌作为一个全新的系统,需要建立其独特的 A domain 底物特异性“密码子”数据库。目前对于海洋放线菌 NRPS 腺苷化结构域的研究积累还不够,需要大量的试验数据来建立海洋放线菌 NRPS A domain 底物特异性密码子数据库,并在此数据库基

表 3 6 种不同浓度培养基对断血流愈伤组织诱导的影响

培养基编号	接种的外植体平均数/个	诱导出原球茎外植体平均数//个	污染的外植体平均数//个	原球茎的平均出现率//%
1	25	13	12	52a
2	25	6	19	24b
3	25	1	24	4c
4	25	0	25	0
5	25	0	25	0
6	25	0	25	0

## 3 结论

断血流的组织培养研究在我国目前没有报道。该试验在总结前人研究成果<sup>[5-6]</sup>的基础上,研究了不同基本培养基和不同浓度的激素对断血流组培的影响。试验结果表明,培养基(1)即 MS 培养基中 NAA 0.1 mg/L、6-BA 1.0 mg/L,在断血流组培中作用最好。该组培最好的培养基诱导愈伤组织原球茎出现率为 52%,较低,是生长素浓度的影响还是其他因素的影响,还需要进一步的研究。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典 2005 年版. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:228-229.
- [2] 马亚红,郭瑞清,韩丽峰. 断血流颗粒对药物流产出血的影响[J]. 中国生育健康杂志,2006,16(3):170-172.
- [3] 李素红,温兰英,张云,等. 断血流片治疗功能性子宫出血 49 例[J]. 河南医药信息,2002,10(19):45.
- [4] 杨明英. 断血流颗粒预防上环术后月经过多 100 例[J]. 医药论坛杂志,2004,25(1):36-38.
- [5] 朱秀峰,杨兰钦,张妙霞,等. 唇形科若干香料植物组织培养[C]//陈振光. 第二届全国植物组织培养、脱毒快繁及工厂化生产学术研讨会论文集. 北京:中国农业科学技术出版社,2004.
- [6] 赵银河. 铁皮石斛愈伤组织诱导研究[J]. 种子,2012,31(12):21-23.

础上开发、建立更为准确可靠的海洋放线菌 NRPS A domain 底物特异性生物信息学预测方法。

## 参考文献

- [1] PENN K, JENKINS C, NETT M, et al. Genomic islands link secondary metabolism to functional adaptation in marine Actinobacteria[J]. ISME J, 2009, 3(10):1193-1203.
- [2] SCHULTZ A W, OH D C, CARNEY J R, et al. Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin[J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(13):4507-4516.
- [3] 陆胜利, 祁超. 海洋放线菌对 *S. arenicola* CNS-205 腺苷化结构域基因的克隆、表达和纯化[J]. 华中师范大学学报:自然科学版, 已接受.
- [4] MCQUADE T J, SHALLOP A D, SHEORAN A, et al. A nonradioactive high-throughput assay for screening and characterization of adenylation domains for nonribosomal peptide combinatorial biosynthesis[J]. Anal Biochem, 2009, 386(2):244-250.
- [5] MALDONADO L A, FENICAL W, JENSEN P R, et al. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(5):1759-1766.
- [6] STACHELHAUS T, MOOTZ H D, MARAHIEL M A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases[J]. Chem Biol, 1999, 6(8):493-505.