

基于生物合成途径改造的一个三欣卡辛类似物的发现

漆丽华^a 张 媚^b 潘海学^b 陈晓东^{*,a} 唐功利^{*,b}^(a) 江西中医药大学药学院 南昌 330004^(b) 中国科学院上海有机化学研究所 生命有机化学国家重点实验室 上海 200032

摘要 三欣卡辛是一种来源于链霉菌的具有良好抗肿瘤活性的芳香聚酮类天然产物。我们通过对三欣卡辛的发酵和分离条件进行优化,显著地提高了其产量。通过对基因簇中一个酰基转移酶(Trx49)编码基因的敲除,改动了三欣卡辛的生物合成途径,获得了 C-4 位糖基上 O-乙酰基缺失的三欣卡辛类似物 **1**。体外细胞毒性测试考察糖基上的 O-乙酰基修饰缺失对三欣卡辛的影响,发现化合物 **1** 的生物活性比三欣卡辛 A 有所降低,但仍具有 IC₅₀ 为 4.86 nmol·L⁻¹ 的优异抗肿瘤细胞活性。

关键词 三欣卡辛; 生物合成; 天然产物; 酰基转移酶

Production of a Trioxacarcin Analogue by Engineering of Its Biosynthetic Pathway

Qi, Li-Hua^a Zhang, Mei^b Pan, Hai-Xue^b Chen, Xiao-Dong^{*,a} Tang, Gong-Li^{*,b}^(a) College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004^(b) State Key Laboratory of Bio-organic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032

Abstract Trioxacarcins, derived from streptomycetes, are aromatic polyketide natural products with antitumor activity. The production of trioxacarcins was improved significantly by optimizing the fermentation and purification processes. The biosynthetic pathway of trioxacarcins was changed by inactivating an acyltransferase (Trx49) gene in the trioxacarcin cluster, and an analogue compound **1** lacking the O-acetyl group of sugar on C-4 was obtained. The influence of the O-acetyl group on biological activity of trioxacarcins was investigated by *in vitro* cytotoxicity test. Compared with trioxacarcin A, the activity of compound **1** decreases to some extent but still persists an excellent anti-tumor activity level with IC₅₀ value of 4.86 nmol·L⁻¹.

Keywords trioxacarcin; biosynthesis; natural product; acyltransferase

三欣卡辛(trioxacarcins)是具有高度复杂结构的芳香聚酮天然产物(图 1),由日本科学家从波卓链霉菌 *Streptomyces bottropensis* NRRL 12051 中分离得到并阐明了其结构^[1,2]。2004 年,德国的 Maskey 等^[3]又在海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. isolate B8652 的发酵产物中发现了更多的三欣卡辛家族化合物。三欣卡辛与一般蒽环类抗生素柔红霉素、阿霉素等相比,具有罕见的结构特点:高度氧化的刚性多环骨架上连接的螺环氧单元;连续 4 个碳原子上包含的 3 个缩酮(半缩酮)基团;两个具有不同乙酰化后修饰的特殊脱氧糖基,其中 4 位 C 原子乙酰化的脱氧糖基在次级代谢产物中极为少见(图 1)。三欣

卡辛具有广泛的抗革兰氏阳性菌、抗疟及抗肿瘤活性^[1,3]。三欣卡辛 A 和 D 的抗疟活性与青蒿素(artemisinin)相当;三欣卡辛 A 对于大部分被测试的人肿瘤细胞系都具有非常高的抑制活性,其 IC₇₀ 值为次纳摩尔水平(0.3~1 nmol·L⁻¹)^[3]。这种显著的抗增殖活性来自于含氧三元环基团的 17 位碳原子与双链 DNA 鸟嘌呤的 7 位氮原子形成共价键,阻碍了 DNA 的复制等功能。而三欣卡辛 4 位与 13 位糖基分别位于 DNA 的小沟与大沟,通过糖基插入和氢键作用等起到定位分子的作用^[4]。

由于三欣卡辛具有上述复杂、新颖的分子结构,且

* E-mail: apple_chen_xd@163.com; gltang@sioc.ac.cn

Received March 13, 2014; revised March 24, 2014; published online April 2, 2014.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81202442).

国家自然科学基金(No. 81202442)资助项目。

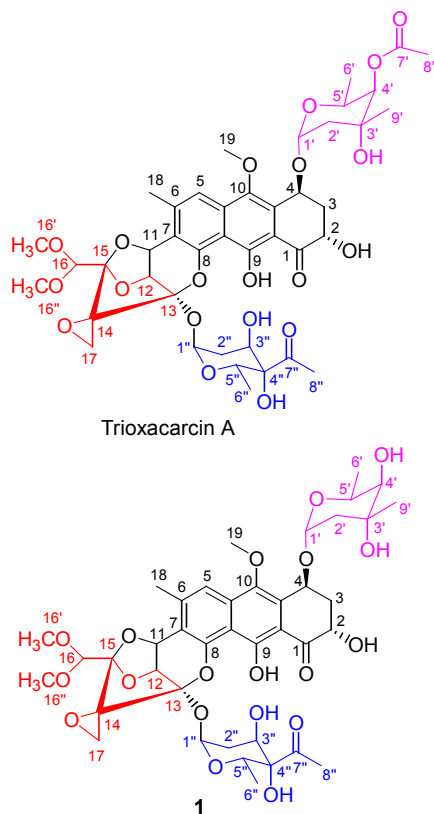


图1 三欣卡辛 A 与化合物 1 的结构

Figure 1 Structures of trioxacarcin A and compound 1

该家族化合物或类似物具备很大的成药潜力, 因此如何得到足够多和足够量的三欣卡辛结构类似物的显得非常关键. Myers 等^[5]于 2011 年报道了对该类化合物的汇聚式全合成路线, 得到其脱糖基的聚酮骨架, 最近该小组^[6]又发表了完整的三欣卡辛 A 及结构类似物的全合成工作, 合成过程共 11 步, 收率约 1.5%. 这些全合成方法对于获得具有不同结构修饰的三欣卡辛类似物提供了帮助, 然而由于较低的合成效率以及前体供给的限制, 不利于高效获得大量类似物. 另一方面, 三欣卡辛类天然产物具有复杂的化学结构, 一些结构改变会导致化学合成难度的增大, 例如对特殊脱氧糖基的结构进行改造, 会改变糖基上的自由羟基数量, 在糖基与配体连接时会形成干扰. 因此, 我们试图从三欣卡辛 A 的生物合成研究出发, 通过对其产生菌中三欣卡辛 A 的天然合成途径的阐明以及关键步骤的改变, 高效获得三欣卡辛类似物.

本文报道了一种通过对波卓链霉菌 *S. bottropensis* NRRL 12051 中的合成途径的改造, 高效得到三欣卡辛类似物的方法. 首先通过对发酵和分离方法的综合优化, 极大地提高了原始产生菌中主产物三欣卡辛 A 的产量; 然后敲除其生物合成途径中一个酰基转移酶 (Trx49) 编码基因, 并对突变株中新产生的化合物 1 进行

分离纯化. 结构解析结果表明化合物 1 是三欣卡辛 A 的 C-4 位糖基上 *O*-乙酰基缺失的类似物(图 1). 体外细胞毒性试验表明, 化合物 1 的抗肿瘤细胞活性低于三欣卡辛 A. 本文结果证实了我们对于酰基转移酶 Trx49 体内功能的推测, 并且获得了三欣卡辛 A 糖基改造的类似物, 为此类天然产物类似物提供了新的获取途径.

1 结果与讨论

1.1 三欣卡辛的发酵与分离策略优化

在三欣卡辛产生菌 *S. bottropensis* NRRL 12051 中, 文献报道三欣卡辛 A 的产量只有不到 2 mg/L, 且分离步骤较多. 而以微生物为宿主大量获得天然产物的类似物, 一个前提是野生型菌株中天然产物要有较高的产量. 因此我们对原有培养基进行了优化, 关键技术是尝试在发酵时加入大孔吸附树脂 HP20. 考察了 HP20 的加入时间点(图 2)和加入量对产量的影响. 最终确定, 在发酵第一天加入 HP20 树脂 25 g/L, 发酵五天后经过简单柱层析分离, 最终得到三欣卡辛 A 纯品的产量约 200 mg/L.

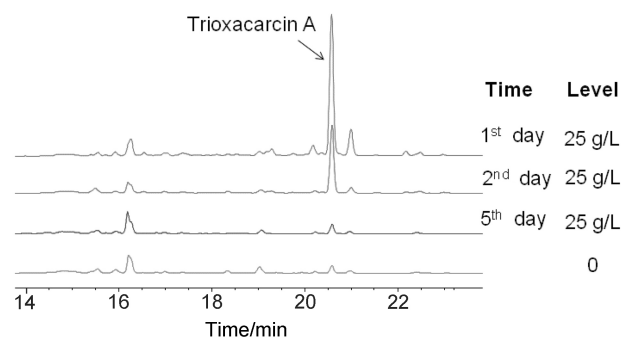


图2 添加 HP20 树脂对三欣卡辛发酵产量的影响

Figure 2 Effects of HP20 resin on the trioxacarcin production

1.2 *trx49* 敲除突变株的构建及发酵结果分析

在我们得到的三欣卡辛生物合成基因簇中, 根据生物信息学发现, 基因 *trx49* 编码的蛋白与酰基转移酶同源(Azi15, *S. sahachiroi*; 50%/62%). 通过对三欣卡辛 A 分子结构的分析, 我们推测该酰基转移酶与 C-4 位糖基的 *O*-乙酰基形成相关. 为了进一步研究其具体的功能, 我们采用 PCR-targeting 和同源重组的方法敲除了 *trx49* 基因, 经 PCR 验证基因型正确的突变株命名为 ZM-1(图 3A).

采用优化后的条件, 将突变株 ZM-1 与野生型(WT)菌株同时发酵. 发酵粗提液的 HPLC 结果显示, ZM-1 不再产生三欣卡辛 A, 而在保留时间 17.9 min 出现了新的化合物 1, 且产量与 WT 中的三欣卡辛 A 相当(图 3B). LC-MS 分析表明该化合物 *m/z*: 857.5 [M+Na]⁺, 与推测的脱乙酰基的三欣卡辛 A 分子量一致(见辅助材料).

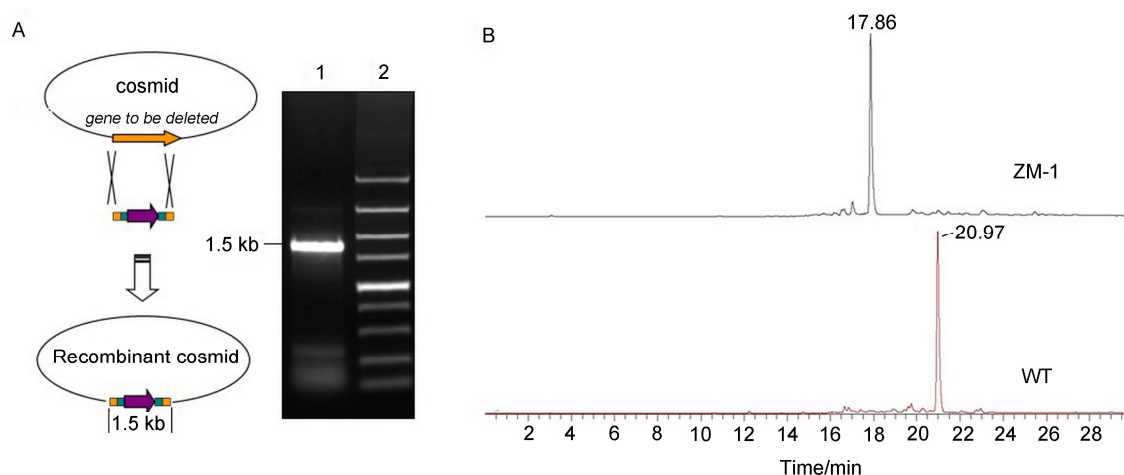


图3 (A)突变株构建及突变株 PCR 验证, (B)野生型(WT)和突变株(ZM-1)的发酵产物 HPLC 分析

Figure 3 (A) Construction and verification of mutant strain, (B) HPLC analysis of fermentation extraction of wild type and mutant strain ZM-1

1.3 化合物 1 的分离及表征

为了确定化合物 **1** 的结构, 我们对该突变株进行了大量发酵, 经过多次硅胶柱层析、凝胶柱分离等手段, 最终仅从 1 L 发酵液中就分离纯化到 80 mg 化合物 **1**. 这也说明我们对培养基的优化和发酵条件的摸索是很有意义的, 节省了发酵培养基和后处理时间, 可以快速的拿到较多的纯化化合物 **1**.

化合物 **1** 为黄色固体. 易溶于二氯甲烷、氯仿和甲醇, 微溶于水; 最大紫外吸收波长(甲醇中)为 270 和 396 nm; ESI-MS 显示加钠峰 m/z : 857.5 $[M + Na]^+$, HR-ESI-MS m/z : 857.2835 $[M + Na]^+$, 从而得到化合物 **1** 的分子式为 $C_{40}H_{50}O_{19}$. 通过 1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, DEPT, HSQC, HMBC 等波谱数据确定了化合物 **1** 的化学结构. Compound **1** 中, H-4' 的化学位移值是 δ 3.20, 然而, trioxacarcin A 的 H-4' 化学位移值是 δ 4.75, 支持 compound **1** 的 HO-4' 上没有酰基取代(甲基、亚甲基或次甲基上羟基的酰化, 通常使其质子的化学位移值低场位移 δ 1~2, 即酯化效应)

通过与野生型产物 trioxacarcin A 的分子量相比, 化合物 **1** 分子量少了 42, 这很有可能是少一个乙酰基单元. 化合物 **1** 与 trioxacarcin A 的 NMR 数据相比较(表 1), 结果表明: 根据两者的 ^{13}C NMR 对比发现, 明显少了两个碳, 7' 的羰基碳和 8' 的甲基碳信号缺失, 且整体 C-4 糖上的 1H NMR 信号都有部分的改变(1'、2'、4' 的 1H NMR 分别向高场移动, 6' 向低场移动), 其中化合物 **1** 的 H-4' 的化学位移值从 trioxacarcin A 的 δ 4.75 移到 δ 3.20, 支持化合物 **1** 的 HO-4' 上没有酰基取代. 其它位置的碳信号及质子信号均未发生大的变化. 从 1H NMR 谱图来看, 8' 碳上的甲基质子信号也明显缺失, 因此结合碳谱和氢

谱既可以初步判断确实化合物 **1** 少了一个乙酰基, 而且是 C-4 糖边链上的乙酰基. 同时我们也通过二维谱图进行了进一步的确证, 证实了不存在 7' 的羰基碳和 8' 的甲基质子的相关信号(辅助材料).

综合以上信息表明, 化合物 **1** 为三欣卡辛 A 的 O-4' 位去乙酰基产物, 该化合物在另一株海洋来源的微生物中曾经被分离得到(trioxacarcin D), 但是产量极低(8 mg/50 L)^[3], 而在 *S. bottropensis* NRRL 12051 野生型菌株中不产该化合物. 实验结果证实, 酰基转移酶基因的敲除, 中断了三欣卡辛分子中 C-4 位糖基上乙酰化的形成. 突变株 ZM-1 中化合物 **1** 的产量与野生型中三欣卡辛 A 相当, 且没有更多副产物出现, 我们推测并没有其他合成步骤受到糖基乙酰化缺失的影响, 酰基转移酶在三欣卡辛的合成途径中可能处于下游的位置.

1.4 化合物 1 的体外细胞毒性测试

自然界存在多种多样的糖基化修饰化合物, 这些糖基的存在对于天然产物的在细胞内发挥其活性是非常重要的^[7], 化合物 **1** 与三欣卡辛 A 不同的地方也在于 C-4 位糖基发生了变化. 据报道, 乙酰单元对于化合物的细胞毒性也有很大的影响, 尤其乙酰基上的羰基可提供额外的氢键来稳定与 DNA 的结合^[8]. 基于此, 我们进行了化合物 **1** 的体外细胞毒性实验, 将 Jurkat 细胞株(属急性 T 细胞白血病细胞系)作为本次细胞活性的测试菌株, 与化合物 trioxacarcin A 相对照来检测其生物活性. 结果显示, 化合物 **1** 的生物活性比 trioxacarcin A 有所降低, 体外细胞毒性降低了一个数量级(图 4), 说明糖基上的 O-乙酰基修饰对于这类芳香聚酮化合物的生物活性有较大影响. 鉴于化合物 **1** 仍然具有很高的抗肿瘤活性, 其 IC_{50} 值大大低于临床使用的阿霉素等萘环类抗生素

表 1 三欣卡辛 A 和化合物 1 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 数据比较^a
 Table 1 Comparison of the ^1H NMR and ^{13}C NMR data of trioxacarcin A and compound 1

Position	Trioxacarcin A		Compound 1	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		202.99		202.97
2	4.78~4.84 (m, 1H)	68.00	4.80 (dd, $J=12.7, 5.4$ Hz, 1H)	67.97
3	2.78~2.84 (m, 1H) 2.23 (dt, $J=13.2, 2.2$ Hz, 1H)	36.71	2.82 dd, $J=13.7, 5.4$ Hz, 1H) 2.24 (td, $J=13.2, 2.7$ Hz, 1H)	36.62
4	5.38 (d, $J=4.0$ Hz, 1H)	67.55	5.39 (t, $J=5.39$ Hz, 1H)	67.60
10a		126.67		126.72
5	7.51 (s, 1H)	117.04	7.51 (s, 1H)	116.94
6		142.96		142.86
7		114.93		114.83
8		151.84		151.75
8a		114.86		114.76
9		163.24		163.13
9a		107.50		107.45
10		144.90		144.79
10a		135.53		135.45
11	5.25 (d, $J=4.0$ Hz, 1H)	69.25	5.25 (d, $J=4.2$ Hz, 1H)	70.09
12	5.37 (d, $J=4.0$ Hz, 1H)	71.50	5.37 (d, $J=3.9$ Hz, 1H)	71.43
13		101.63		101.56
14		68.38		68.30
15		104.75		104.67
16	4.77 (s, 1H)	99.79	4.77 (s, 1H)	99.71
16'	3.50 (s, 3H)	56.90	3.50 (s, 3H)	56.80
16''	3.63 (s, 3H)	56.28	3.63 (s, 3H)	56.18
17	2.99 (d, $J=5.9$ Hz, 1H) 2.92 (d, $J=5.5$ Hz, 1H)	48.25	2.99 (d, $J=5.6$ Hz, 1H) 2.91 (d, $J=5.6$ Hz, 1H)	48.18
18	2.62 (s, 3H)	20.45	2.62 (s, 3H)	20.37
19	3.85 (s, 3H)	62.80	3.85 (s, 3H)	62.73
1'	5.39~5.42 (m, 1H)	98.07	5.32 (s, 1H)	98.13
2'	1.63 (d, $J=14.7$ Hz, 1H) 1.97 (d, $J=14.7$ Hz, 1H)	36.71	1.57 (d, $J=14.9$ Hz, 1H) 1.98 (dd, $J=4.2, 14.9$ Hz, 1H)	35.91
3'		68.86		69.18
4'	4.75 (s, 1H)	74.47	3.20 (s, 1H)	74.42
5'	4.53 (q, $J=6.6$ Hz, 1H)	62.97	4.53 (q, $J=7.3$ Hz, 1H)	63.63
6'	1.24 (d, $J=6.6$ Hz, 3H)	16.93	1.37 (d, $J=6.6$ Hz, 3H)	16.88
7'		170.41		—
8'	2.14 (s, 3H)	20.96	—	—
9'	1.07 (s, 3H)	25.76	1.21 (s, 3H)	26.07
1''	5.86 (d, $J=2.6$ Hz, 1H)	94.93	5.86 (d, $J=2.4$ Hz, 1H)	94.85
2''	2.45 (dt, $J=14.3, 3.3$ Hz, 1H) 2.09~2.12 (m, 1H)	31.61	2.45 (dt, $J=14.9, 5.7$ Hz, 1H) 2.10~2.14 (dm, $J=4.4$ Hz, 1H)	31.54
3''	3.60~3.63 (m, 1H)	70.27	3.64~3.68 (m, 1H)	70.20
4''		79.63		79.56
5''	5.02 (q, $J=6.8$ Hz, 1H)	63.89	5.03 (q, $J=6.4$ Hz, 1H)	63.81
6''	1.10 (d, $J=6.2$ Hz, 3H)	14.59	1.10 (d, $J=6.4$ Hz, 3H)	14.52
7''		210.44		210.36
8''	2.50 (s, 3H)	27.87	2.49 (s, 3H)	27.79

^a 数据中未显示活泼质子的化学位移, 所用溶剂为 CDCl_3 .

($\mu\text{mol/L}$ 级), 因此可以作为抗肿瘤先导分子开展其他结构衍生和体内外活性等研究.

2 结论

有机合成化学经过百年的发展已经取得令人瞩目

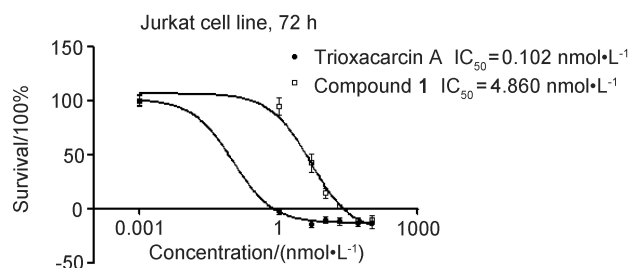


图4 三欣卡辛 A 和化合物 1 的体外细胞毒性

Figure 4 *In vitro* cytotoxicity of trioxacarcin A and compound 1

的成就, 化学家们已经能够合成几乎所有类型的天然产物, 其中也包括一些含复杂结构和特殊基团的化合物. 复杂天然产物的全合成对于创造自然界神奇化学结构、应用新化学反应等方面意义重大, 然而由于自身的局限难以满足大量生产的需求. 而从自然界提取到的关键前体出发的化学半合成方法, 在一些天然产物药物的工业化生产中得到广泛应用, 例如紫杉醇的大量制备. 近些年来, 随着生物合成研究的发展, 各种天然产物骨架的合成途径、特定结构单元的合成机制等逐渐被阐明, 人们有机会采用生物合成的手段, 利用高效的天然产物合成宿主, 完全替代化学手段实现天然产物类似物的大量获得^[9,10]. 我们在对三欣卡辛的生物合成研究中, 一方面致力于解析其生物合成机制, 另一方面也致力于高效获得大量的三欣卡辛类似物, 为这类具有很高抗肿瘤活性的化合物的药物研发提供候选分子. 本文综合采用生产菌株发酵优化、酰基转移酶途径缺失、化合物鉴定、体外活性测试等手段, 建立了在该产生菌中高效获得三欣卡辛类似物的方法, 考察了糖基上的乙酰化修饰对抗肿瘤活性的影响. 此外, 通过基因敲除验证了酰基转移酶的催化功能, 也为生物催化或生物转化方法获得临床蒽环类药物的糖基乙酰化修饰提供了机会, 有助于这一重要抗肿瘤化合物家族的结构改进.

3 实验部分

3.1 实验材料

3.1.1 仪器与试剂

Eppendorf Mastercycler PCR 扩增仪; Syngene 凝胶成像系统; LCQ Fleet Ion Trap 质谱仪; Diamonsil C18 5 μ 250 mm $\times$ 4.6 mm 色谱柱; 安捷伦 1260 高效液相色谱仪; Bruker DPX-400 型超导核磁共振仪等. DNA maker, DNA 聚合酶, 限制性内切酶等购自 Takara 公司, DNA 胶回收与质粒抽提试剂盒购自 Generay 公司, 核苷酸引物由铂尚生物技术有限公司合成, HP-20 购自日本三菱化学, DNA 测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成, 所用进口化学试剂购自 Sigma-Aldrich 公司, 国产化学试

剂购自上海国药集团有限公司.

3.1.2 质粒、菌株材料及培养基

黏粒 cZM-05-09-3 由本实验室构建. 常规大肠杆菌: *E. Coli* DH5 α , *E. Coli* BW25114, *E. coli* S17-1, 产三欣卡辛的野生型菌株 *S. bottropensis* NRRL 12051 均由本实验室保存.

LB 培养基(100 mL): 蛋白胨 1.0 g, 酵母提取物 0.5 g, NaCl 1.0 g, pH 7.0; 固体培养基加入琼脂 2.0 g. TSB 培养基(100mL): 胰大豆胨 3 g, SYG 发酵培养基(100 mL): Soluble starch 6 g, glucose 1 g, Yeast extract 1 g; NaCl 0.3 mg, CuSO₄·5H₂O 7 mg, FeSO₄·7H₂O 1 mg, MnCl₂·4H₂O 0.8 mg, ZnSO₄·7H₂O 0.2 mg, CoCl₂·7H₂O 0.0006 mg, MgSO₄·7H₂O 100 mg, KH₂PO₄ 100 mg, (NH₄)₂SO₄ 100 mg. IWL-4 培养基(100 mL): 可溶性淀粉 1 g, K₂HPO₄ 0.1 g, MgSO₄ 0.1 g, NaCl 0.1 g, (NH₄)₂SO₄ 0.2 g, CaCO₃ 0.2 g, FeSO₄ 0.0001 g, MnCl₂·6H₂O 0.0001 g, ZnSO₄ 0.0001 g, 酵母提取物 0.05 g, 蛋白胨 0.1 g, 琼脂 2 g, pH 7.2. ISP-3 培养基(100 mL): 燕麦片 2 g, 微量元素浓度同 IWL-4, 琼脂 2 g, pH 7.2. MS 培养基(100 mL): Soy flour 2 g, Mannitol 2 g, 琼脂 2 g. 抗生素根据需要添加: 萘啶酮酸(NA, 50 μ g/mL), 阿泊拉霉素(Am, 50 μ g/mL), 硫链丝菌素(Tsr, 50 μ g/mL), 氨苄(Amp, 50 μ g/mL), 氯霉素(Cm, 50 μ g/mL).

3.2 PCR-targeting 技术构建突变株

PCR-targeting 片段制备: 在 49 基因中, 设计左右引物分别为: Tg-ks49-f: AGGTACAAGGCGTACGAG ATCTCGCCGAGCCGCAC CATGATTCCGGGG ATC-CGTCGACC 和 Tg-ks49-R: CTACGCCTC CAACGC-GCCG AGTTGGTCA CTCGCATGCGATG TAGGCT-GGAGC TGCTTC, 以试剂盒质粒为模板(含 Am 抗性基因), 进行 PCR 反应. PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分离分析, 与预期大小符合的条带, Kit 回收, 溶于 50 μ L 无酶双蒸水. PCR 程序: 循环 1: 94 $^{\circ}$ C; 2 min, 1 轮; 循环 2: 94 $^{\circ}$ C, 45 s; 50 $^{\circ}$ C, 45 s; 72 $^{\circ}$ C, 90 s; 10 轮; 循环 3: 94 $^{\circ}$ C, 45 s; 55 $^{\circ}$ C, 45 s; 72 $^{\circ}$ C, 90 s; 15 轮; 循环 4: 72 $^{\circ}$ C, 5 min; 1 轮. 电转化: 将正确的 PCR 片段电转化入含有待敲除基因的黏粒中, 获得阳性克隆后, 挑取单克隆, PCR 鉴定正确的克隆, 所用引物为 Yz-49-f: GCACAC-GACGAGGTAGTG 和 Yz-49-r: ATCAACACGGTGC-CGACG. 正确的基因型会扩增出 1.5 kb 大小的条带, 将获得的正确黏粒转入 *E. Coli* S17-1 中, 作为接合转移的供体菌. 基因缺失株的获得: 通过属间接合转移的方法将正确的黏粒转入野生型链霉菌 *S. bottropensis* NRRL 12051 中, 通过萘啶酮酸和阿泊拉霉素抗性筛选正确的接合子, 通过松弛传代培养, 隔代取 5 μ L 松弛的菌液涂

布在带有 Am 抗性的 MS 平板上, 挑取一定数量的单克隆进行 PCR 验证, 如果只能扩增出 1.5 kb 大小的条带即可认为筛选到正确的双交换突变株, 经过五轮松弛后最后获得突变株 ZM-1.

3.3 化合物的发酵、分离及结构鉴定

3.3.1 突变株的发酵、分离

分别接种野生型和突变株 ZM-1 的孢子 20 μL 到 50 mL 发酵培养基 TSB (250 mL 摇瓶) 中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 培养至呈对数生长期(36 h), 接种 2.5 mL 至 50 mL 发酵培养基 SYG 中, 再加入灭过菌的大孔树脂 HP20 1.25 g, 在 30 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 条件下培养 5 d. 离心收集沉淀, 用丙酮分两次浸泡, 并超声 10 min, 离心去沉淀后, 旋转蒸发仪旋去上清中丙酮, 水相用乙酸乙酯萃取三到五次, 有机相用饱和食盐水洗两次后旋去乙酸乙酯, 用少量甲醇溶解. 取 20 μL 稀释到 1 mL 甲醇中做 HPLC 分析. 取 1 L 突变株发酵液, 通过丙酮浸泡, 乙酸乙酯萃取等粗处理后, 最终通过硅胶柱分离纯化, 凝胶柱进一步纯化, 共获得约为 80 mg 的化合物 **1** 纯品.

3.3.2 化合物的鉴定

HPLC 分析: 将突变株的发酵提取液与野生型菌株的发酵提取液分别用 HPLC 检测, 通过对比检测结果确定突变株是否产生新的化合物. HPLC 条件: A 相为水 (含 0.1% 甲酸), B 相为乙腈 (含 0.1% 甲酸), 流速 1 mL/min, 检测波长 271 nm. 洗脱梯度如下: 0~5 min, 10% B; 5~25 min, 10%~90% B; 25~27 min, 90% B; 27~30 min, 90%~10% B. 液相色谱-质谱连用(LC-MS)与核磁共振(NMR)分析: LC-MS 采用与 HPLC 检测相同的条件; 对于纯化得到的化合物 **1**, 进行高分辨质谱和 NMR 分析, 得到化合物完整的结构信息.

3.4 化合物的体外细胞毒性测试

按照 MTT 法操作. 将 Jurkat 细胞 800 r/min 离心 2

min, 弃上清, 用培养基稀释成细胞悬液, 调整浓度至 1×10^5 个/mL, 50 μL /well 接种于 96 孔平底透明板中, 将待测小分子按不同浓度配制到培养基中, 后加入到相应的孔中(50 μL /well), 作用 48 h, 加入 20 μL /well 的 MTT (5 mg/mL in PBS)作用 4 h 后, 加入 80 μL /well 三联剂 (10% w/v SDS+5% *i*-BuOH+0.01 mol/L HCl), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 12 h 以上待紫色结晶完全溶解. 用酶标仪测定 OD (Optical Density)值(检测波长 550 nm, 参考波长 650 nm). 空白组为不加细胞只加培养基, 对照组为加入与化合物同体积的 DMSO, 计算细胞存活率=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值).

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **1** 的核磁图谱及质谱. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Tomita, F.; Tamaoki, T.; Morimoto, M. *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 1519
- [2] Tamaoki, T.; Shirahata, K.; Iida, T.; Tomita, F. *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 1525
- [3] Maskey, R. P.; Helmke, E.; Kayser, O.; Fiebig, H. H.; Maier, A.; Busche, A.; Laatsch, H. *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 771
- [4] Pfoh, R.; Laatsch, H.; Sheldrick, G. M. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 3508
- [5] Švenda, J.; Hill, N.; Myers, A. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 6709
- [6] Magauer, T.; Smaltz, D. J.; Myers, A. G. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 886.
- [7] Thibodeaux, C. J.; Melançon, C. E.; Liu, H. W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2008**, *120*, 9960
- [8] García, B.; González-Sabín, J.; Menéndez, N.; Braña, A. F.; Núñez, L. E.; Moris, F.; Salas, J. A.; Méndez, C. *Microb. Biotechnol.* **2011**, *4*, 226
- [9] Ro, D. K.; Paradise, E. M.; Ouellet, M.; Fisher, K. J.; Newman, K. L.; Ndungu, J. M.; Ho, K. A.; Eachus, R. A.; Ham, T. S.; Kirby, J.; Chang, M. C.; Withers, S. T.; Shiba, Y.; Sarpong, R.; Keasling, J. D. *Nature* **2006**, *440*, 940
- [10] Xie, X.; Wong, W. W.; Tang, Y. *Metab. Eng.* **2007**, *9*, 379

(Cheng, F.)