

# 永兴岛白穗软珊瑚共附生放线菌筛选及部分活性次级代谢产物的鉴定

马亮<sup>1,2</sup>, 张文军<sup>1</sup>, 朱义广<sup>1</sup>, 吴正超<sup>1,2</sup>, Kumar Saurav<sup>1</sup>, 黄晖<sup>1</sup>, 张长生<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 海洋微生物研究中心, 广东省海洋药物重点实验室, 广州 510301

<sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:**【目的】从白穗软珊瑚中分离和鉴定共附生放线菌, 运用 PCR 技术对所分离的放线菌进行 I 型聚酮合酶 (PKS) 筛选, 研究其次级代谢产物。【方法】使用 11 种培养基对白穗软珊瑚共附生放线菌进行分离、鉴定, 构建 16S rRNA 基因系统发育进化树, 以基于 I 型 PKS 的 KS 基因设计的简并引物对所分离放线菌进行基因筛选, 对阳性菌株用 3 种培养基发酵检测, 对目标菌株进行放大规模发酵分离鉴定次级代谢产物。【结果】从白穗软珊瑚中分离到 20 株共附生放线菌, 包括链霉菌属 10 株、迪茨氏菌属 2 株和盐水孢菌属 8 株, 筛选获得 18 株 I 型 PKS 阳性菌株, 并从菌株 *Salinospora arenicola* SH04 中分离到化合物 rifamycin S 和 rifamycin W。【结论】首次从珊瑚共附生环境中分离得到海洋专属性稀有放线菌盐水孢菌属, 并以 I 型 PKS 基因筛选为指导, 分离鉴定了聚酮类化合物 rifamycins, 为研究软珊瑚共附生可培养放线菌的多样性和基于基因筛选指导分离次级代谢产物提供了可靠依据。

**关键词:** 白穗软珊瑚, 放线菌, 盐水孢菌属, I 型 PKS, 利福霉素

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** 文献编码: A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 10-1063-09

放线菌广泛分布于海洋环境中, 包括海水表面及深层、海底沉积物和海洋生物表层等。随着菌株纯培养技术的不断发展, 越来越多的未知放线菌种群已成功地从海洋环境中分离得到, 同时, 也从其代谢产物中获得了大量结构新颖的天然产物<sup>[1]</sup>。珊瑚被认为是海洋的“热带雨林”, 具有重要的生态学意义, 从中分离得到了聚酮类、萜类、生物碱类、甾体类等具有良好生物活性的天然产物<sup>[2]</sup>。珊瑚与周围的水环境及其共附生的藻类、微生物群体形成一

个生态系统<sup>[3]</sup>。微生物作为珊瑚生态系统不可分割的一部分, 对维持该生态系统的平衡起着极其重要的作用<sup>[4]</sup>。Harvell 等人推测珊瑚共附生微生物为其化学防御提供了武器<sup>[5]</sup>, 在保护珊瑚宿主抵御捕食者、抗病原微生物、克生与防附着等方面发挥着重要作用。所以珊瑚共附生放线菌作为微生物群落中的重要成员, 很有可能产生一些重要的次级代谢产物, 参与珊瑚的化学防御过程。研究珊瑚共附生放线菌能够揭示这些生物活性物质的真正来源, 为

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31125001); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-EW-G-12, KZCX2-YW-JC202); 中国科学院百人计划项目 (08SL111002)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-89023038; E-mail: czhang@scsio.ac.cn

**作者简介:** 马亮 (1987–), 男, 湖北宜昌人, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物天然产物及生物合成。E-mail: maliangyc@hotmail.com

**收稿日期:** 2013-03-20; **修回日期:** 2013-04-19

发现结构新颖的次级代谢产物奠定基础<sup>[6]</sup>,对新的海洋微生物药物的发现具有重要意义。然而,迄今为止,关于珊瑚共附生微生物的报道主要集中于其共附生真菌,而对其共附生放线菌菌种鉴定及次级代谢产物分离的报道相对较少<sup>[7-8]</sup>。

由于一些海洋来源的天然产物在常规培养条件下不能合成,或者作为混合物时活性比较低,所以导致传统的活性筛选方法对海洋来源的菌株和天然产物具有一定的局限性。近年来,随着越来越多的天然产物生物合成基因簇被报道,基于功能基因预测代谢产物的方法为天然产物的分离提供了一种强有力的工具<sup>[9]</sup>。基于聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS)、非核糖体肽合成酶 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS) 的生物合成基因对海洋放线菌的筛选已有报道<sup>[10]</sup>。I 型 PKS 大量存在于放线菌次级代谢途径中,负责合成具有广泛生物活性的聚酮类化合物<sup>[11]</sup>,包括许多临床药物,如红霉素、阿维菌素、杀念珠菌素和格尔德霉素等。I 型 PKS 至少包含 3 个功能模块:酮基合成酶结构域 (ketosynthase, KS)、酰基转移酶结构域 (acyl transferase, AT) 和酰基载体蛋白结构域 (acyl-carrier protein, ACP)。除此之外,有些 I 型 PKS 模块中还包含其他修饰性结构域,如酮基还原酶结构域 (ketoreductase, KR)、脱水酶结构域 (dehydratase, DH)、烯醇还原酶结构域 (enoylreductase, ER) 等。其中 KS 结构域的氨基酸序列最为保守,可以用作筛选标记,设计简并引物来筛选目的菌株。

本文报道了珊瑚样品中放线菌的分离鉴定, I 型 PKS 的基因筛选, 以及菌株 *Salinispora arenicola* SH04 次级代谢产物的分离和结构解析, 初步探讨了软珊瑚共附生可培养放线菌的多样性, 并从菌株 SH04 中成功分离到 2 个次级代谢产物 rifamycin S (1) 和 rifamycin W (2)。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 珊瑚:**白穗软珊瑚 *Nephthea* sp. (YX5), 采集自中国南海西沙群岛永兴岛附近海域。

**1.1.2 菌株及培养条件:**从白穗软珊瑚 *Nephthea* sp. 中分离得到的共附生放线菌, 用 ISP2 培养基或高氏 1 号培养基 28℃ 培养, 保藏于中国科学院南海

海洋研究所海洋微生物研究中心菌种保藏库。4 种指示菌:枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌由云南大学微生物研究所提供, LB 培养基 37℃ 培养。

**1.1.3 培养基:**(1)分离培养基<sup>[12-13]</sup>。M1:可溶性淀粉 10 g, 酵母抽提物 4 g, 胰蛋白胨 2 g; M2:天然寡营养海泥提取物 100 mL; M3:天然富营养海泥提取物 100 mL; M4:腐植酸钠 100 mg, 半乳糖 500 mg, 微量元素 10 mL; M5:甘露醇 500 mg, 胰蛋白胨 100 mg; M6:天然海水; M7:吐温 80 2 mL; M8:甘露醇 500 mg, 酵母抽提物 100 mg; M9:几丁质 2 g; M10:可溶性淀粉 2 g, KNO<sub>3</sub> 0.5 g, KCl 1.7 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g; M11:精氨酸 1 g, 甘油 12.5 mL, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, 微量元素 10 mL; 以上对应的培养基分别加入 2% 的琼脂粉和 3% 的海盐, 加水至 1 L, 调 pH 7.2-7.4, 使用前加入 nystatin 50 μg/mL, cyclohexamide 100 μg/mL。(2)发酵培养基。F1:可溶性淀粉 10 g, 酵母提取粉 4 g, 蛋白胨 2 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, 海盐 30 g, 加水至 1 L, pH 7.2。F2:黄豆粉 3 g, 酵母提取粉 3 g, 海藻糖 10 g, 脯氨酸 1 g, 牛肉膏 3 g, 甘油 6 mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g, 海盐 30 g, 加水至 1 L, pH 7.2。F3:甘油 5 g, 玉米粉 3 g, 黄豆粉 2 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, 海盐 30 g, 加水至 1 L, pH 7.2。(3)LB 培养基:胰蛋白胨 10 g, 酵母抽提物 5 g, NaCl 10 g, 加水至 1 L; (4)ISP2 培养基:酵母抽提物 4 g, 麦芽抽提物 10 g, 葡萄糖 4 g, 海盐 30 g, 加水至 1 L, pH 7.2; (5)高氏 1 号培养基:可溶性淀粉 20 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, 海盐 30 g, 加水至 1 L, pH 7.4-7.6。以上对应的固体培养基加入 2% 的琼脂粉。

**1.1.4 主要试剂和仪器:**DNA 聚合酶 *rTaq*, T4 连接酶等酶试剂为 TaKaRa 公司产品。溶菌酶和蛋白酶 K 等试剂购自上海生工生物工程公司。PCR 纯化试剂盒, DNA 胶回收试剂盒购自 Axygen 生物技术有限公司。PCR 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成, DNA 测序由上海 Invitrogen 公司完成。主要仪器包括, Eppendorf 5331 梯度 PCR 仪, Hitachi 公司的 L-2000 高效液相色谱并配备 DAD 检测器, 高效液相色谱柱为 Phenomenex C18 柱 (5 μm, 150 mm×4.6 mm), 核磁共振波谱<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-NMR 用 Bruker DRX2500 核磁共振仪 (500/

125 MHz)测定,以 TMS 为内标,CDCl<sub>3</sub> 或 CD<sub>3</sub>OD 作溶剂;质谱 ESI-MS, HRESI-MS 用 LCQ DECA XP 液质联用仪,以 CHCl<sub>3</sub> 或 CH<sub>3</sub>OH 作溶剂测定。正相用硅胶为 100 – 200 目和 300 – 400 目硅胶(中国烟台),凝胶为 Sephadex LH-20 (40 – 70 μm, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden),反相硅胶为 YMC \* GEL ODS-A (12 nm S-50 μm, Japan)。薄层层析用硅胶 G (silica gel GF254, 10 – 40 nm, 烟台)。

## 1.2 珊瑚样品处理及放线菌分离

切割珊瑚样品,用无菌海水清洗样品表面 3 次,清洗后的样品转移至研钵内,研为粉末,采用印章涂布法将干燥后的粉末涂布于装有放线菌分离培养基的平皿中,待长出单克隆后挑取划线培养。

## 1.3 放线菌基因组的提取和 16S rRNA 基因序列的扩增与鉴定

采用文献[14]报道的方法提取白穗软珊瑚共附生放线菌基因组 DNA,使用 16S rRNA 基因的引物 16S-PA (5'-CAGAGTTTGATCTGGCT-3') 和 16S-PB (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')<sup>[15]</sup>, 对其进行扩增。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物纯化后送上海 Invitrogen 公司测序,将获得的 DNA 序列在 GenBank 中用 Blast 程序进行比对,选取相似性较高且有效发表的菌株的序列,通过 Clustal X 软件对序列进行比对分析,用 MEGA 5.1 的 Neighbor-joining 法构建系统发育进化树。

## 1.4 I 型 PKS 基因片段的扩增和鉴定

利用文献报道的 I 型 PKS 聚酮类化合物 KS 基因的简并引物 PKS-I-K1F (5'-TSAAGTCSAACATC GGBCA-3') 和 PKS-I-M6R (5'-CGCAGGTTSCSGTAC CAGTA-3')<sup>[10]</sup>,从珊瑚共附生放线菌的基因组 DNA 中扩增出一个约 1.2 – 1.4 kb 的 DNA 片段。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,52℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物纯化后与 T-载体连接,进行序列测定,将获得的 DNA 序列通过 blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行比对分析。

## 1.5 I 型 PKS 阳性菌株的发酵筛选

将 I 型 PKS 阳性菌株接种至装有 3 种不同发酵培养基的三角瓶中 (50 mL/250 mL), 28℃,

200 r/min 振荡培养 7 d。以体积比 (V/V) 1:1 加入丁酮萃取、旋干、定量,取样进行 HPLC 分析,并用 4 种指示菌按照滤纸片扩散法检测抗菌活性<sup>[16]</sup>。

## 1.6 菌株 SH04 的大规模摇瓶发酵

将菌株 SH04 接种至 ISP2 固体培养基上,28℃ 培养 14 d,接种于发酵培养基 F1 中 (50 mL 培养基/250 mL 三角瓶),28℃,200 r/min 振荡培养 6 d 作为发酵培养的种子,将生长良好的种子以 10% (V/V) 的接种量接入 6 L 发酵培养基 F2 中 (400 mL 培养基/2000 mL 三角瓶),28℃,200 r/min 培养 5 d 后,加入 XAD-16 大孔树脂,24 h 后收集大孔树脂备用。

## 1.7 化合物的分离和提取

离心收集大孔树脂后,用丙酮洗脱,旋转蒸发回收丙酮,水相用丁酮萃取,旋转蒸发丁酮萃取液得到 4 g 粗浸膏。粗浸膏用 CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH 溶解拌样上硅胶柱 (100 – 200 目),CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH 梯度洗脱,收集馏份,结合 HPLC 分析,抑菌活性检测合并馏份为 Fr. 1 – Fr. 4, Fr. 3 上 Sephadex LH20 柱,CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH 洗脱收集馏份,结合 HPLC 分析,抑菌活性检测合并馏份,得馏份 Fr. 3-A-Fr. 3-H; Fr. 3-D 上中压液相柱,CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O 线性梯度洗脱得到化合物 1 (11 mg), Fr. 3-E 用高压液相制备,50% 的 CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 作为流动相洗脱,制备得到化合物 2 (6 mg)。

# 2 结果和分析

## 2.1 菌种鉴定

用 11 种培养基对采自中国南海西沙群岛永兴岛的白穗软珊瑚 *Nephthea* sp. (YX5) 共附生放线菌进行分离,得到了 20 株不同菌落形态的放线菌。对培养基的成分和分离获得的菌株进行统计分析 (表 1)。从寡营养培养基 M2、M6 中分离得到 6 株放线菌,分离效果优于另外 9 种培养基,这可能与海洋放线菌生存的寡营养环境有关;而 M2、M3 培养基加入了天然海泥提取物,使生长环境更加接近海洋环境,从中分离得到 6 株放线菌,比加入人工配制微量元素的 M4、M11 培养基具有更好的分离效果;从加入甘露醇的培养基 M5、M8 中只分离得到链霉菌属菌株,可能是由于甘露醇不易被迪茨氏菌属和盐水孢菌属菌株利用而导致其不能在该培养基上生长。

对 20 株放线菌进行 16S rRNA 基因序列鉴定,通过序列比对、相似性分析,将其分为 3 个亚目 3 个

科的 3 个属: 小单孢菌亚目 ( Suborder Micromonosporineae ) 小单孢菌科 ( Micromonosporaceae ) 的盐水孢菌属 ( *Salinispora* ) 8 株, 棒杆菌亚目 ( Suborder Corynebacterineae ) 迪茨氏菌科 ( Dietziaceae ) 的迪茨氏菌属 ( *Dietzia* ) 2 株, 链霉菌亚目 ( Suborder Streptomycineae ) 链霉菌科 ( Streptomycetaceae ) 的链霉菌属 ( *Streptomyces* ) 10 株。菌株 16S rRNA 基因的系统发育进化树如图 1 所示。其中盐水孢菌属是海洋专属稀有放线菌种类, 且次级代谢产物丰富, 这是首次报道从珊瑚共附生环境中分离获得; 迪茨氏菌属具有海水依赖特性, 但鲜有从珊瑚中分离该属菌的报道; 链霉菌属广泛存在于海洋环境中, 已被大量分离鉴定。

表 1. 11 种分离培养基分离得到的放线菌菌株概况

Table 1. Summary of isolated actinomycetal strains

from 11 selective media

Isolation media		Strain name			
M1	SH08	SH18			
M2	SH02	SH12	SH13	SH15	
M3	SH11	SH14			
M4	SH03				
M5	SH09				
M6	SH07	SH17			
M7	SH06				
M8	SH05				
M9	SH10				
M10	SH01	SH19	SH20		
M11	SH04	SH16			

2.2 I 型 PKS KS 基因筛选及阳性菌株发酵检测

用文献 [ 10 ] 报道的 KS 基因简并引物 PKS-I-K1F/M6R, 对 20 株放线菌基因组 DNA 进行筛选, 其中 18 株菌能够扩增出阳性条带, 证实了 I 型 PKS 基因广泛存在于放线菌基因组中。结合 16S rRNA 基因序列结果分析, 3 个属中除了迪茨氏菌属的 2 株放线菌 SH02、SH03 不含 I 型 PKS 基因, 其余 2 个属 18 株菌均能扩增出阳性条带, 可能合成聚酮类化合物。

对 18 株 I 型 PKS KS 阳性菌株选用 3 种不同的发酵培养基进行发酵筛选, 通过对其代谢产物的 HPLC 检测及活性分析, 发现菌株 *Salinispora arenicola*SH04 的代谢产物较为丰富, 且对枯草芽孢杆菌 ( *Bacillus subtilis*ATCC 6633 )、苏云金芽孢杆菌 ( *Bacillus thuringiensis*SCSIOBT01 )、金黄色葡萄球菌 ( *Staphylococcus aureus*ATCC29213 ) 和大肠杆菌

( *Escherichia coli*ATCC25922 ) 都有抑制活性, 其中对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑菌作用较强。菌株 SH04 发酵产物的 HPLC 检测及其抑菌活性结果如图 2 所示。

对菌株 *S. arenicola*SH04 的 KS 序列 ( GenBank 编号: KC751532 ) Blast 分析, 发现其编码的多肽链与 I 型 PKS 的酮基合成酶 ( KS ) 高度同源, 其中与 rifamycin PKS 的序列具有 72% 的相似性, 可能生产 rifamycins 类化合物。

2.3 菌株 SH04 中化合物的分离和结构解析

对菌株 *S. arenicola*SH04 进行 6 L 放大规模摇瓶发酵后, 经有机溶剂萃取和各种色谱柱分离, 获得具有抗菌活性的化合物 1 和 2。通过 ESI-MS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 等的光谱分析及与参考文献相比较, 确定化合物 1 ( rifamycin S ) 和 2 ( rifamycin W ) 的结构 ( 图 3 )。

**Rifamycin S ( 1 ):** 黄色粉末, ( ESI-MS ) *m/z* 696.5 [ *M* + *H* ]<sup>+</sup>, 694.5 [ *M* - *H* ]<sup>-</sup>, 提示其分子量为 695。结合 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 分析, 推测其分子式为 C<sub>37</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>12</sub>。 <sup>1</sup>H-NMR ( CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz ) δ: 7.82 ( 1H, s, H-3 ), 6.32 ( 1H, dd, *J* = 9.5, 15.5 Hz, H-18 ), 6.25 ( 1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-17 ), 6.21 ( 1H, d, *J* = 12.5 Hz, H-29 ), 5.94 ( 1H, dd, *J* = 7.0, 15.5 Hz H-19 ), 5.06 ( 1H, dd, *J* = 7.5, 12.5 Hz, H-28 ), 4.62 ( 1H, d, *J* = 10.5 Hz, H-25 ), 3.55 ( 1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-21 ), 3.36 ( 1H, dd, *J* = 2.5, 7.5 Hz, H-27 ), 3.10 ( 1H, s, H-37 ), 2.98 ( 1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-23 ), 2.37 ( 1H, s, H-14 ), 2.34 ( 1H, m, H-20 ), 2.04 ( 3H, s, H-36 ), 2.02 ( 3H, s, H-30 ), 1.96 ( 1H, m, H-26 ), 1.77 ( 1H, m, H-22 ), 1.71 ( 1H, s, H-13 ), 1.51 ( 1H, m, H-24 ), 1.00 ( 3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-32 ), 0.83 ( 3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-31 ), 0.65 ( 3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-33 ), 0.19 ( 3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-19 )。 8.38 ( 1H, s, NH )。 <sup>13</sup>C-NMR ( CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz ) δ: 184.8 ( C, C-1 ), 139.1 ( C, C-2 ), 117.3 ( CH, C-3 ), 182.3 ( C, C-4 ), 110.7 ( C, C-5 ), 172.5 ( C, C-6 ), 115.5 ( C, C-7 ), 166.9 ( C, C-8 ), 110.9 ( C, C-9 ), 130.5 ( C, C-10 ), 191.8 ( C, C-11 ), 108.5 ( C, C-12 ), 22.3 ( CH<sub>3</sub>, C-13 ), 7.5 ( CH<sub>3</sub>, C-14 ), 169.6 ( C, C-15 ), 131.0 ( C, C-16 ), 133.8 ( CH, C-17 ), 124.1 ( CH, C-18 ), 142.2 ( CH, C-

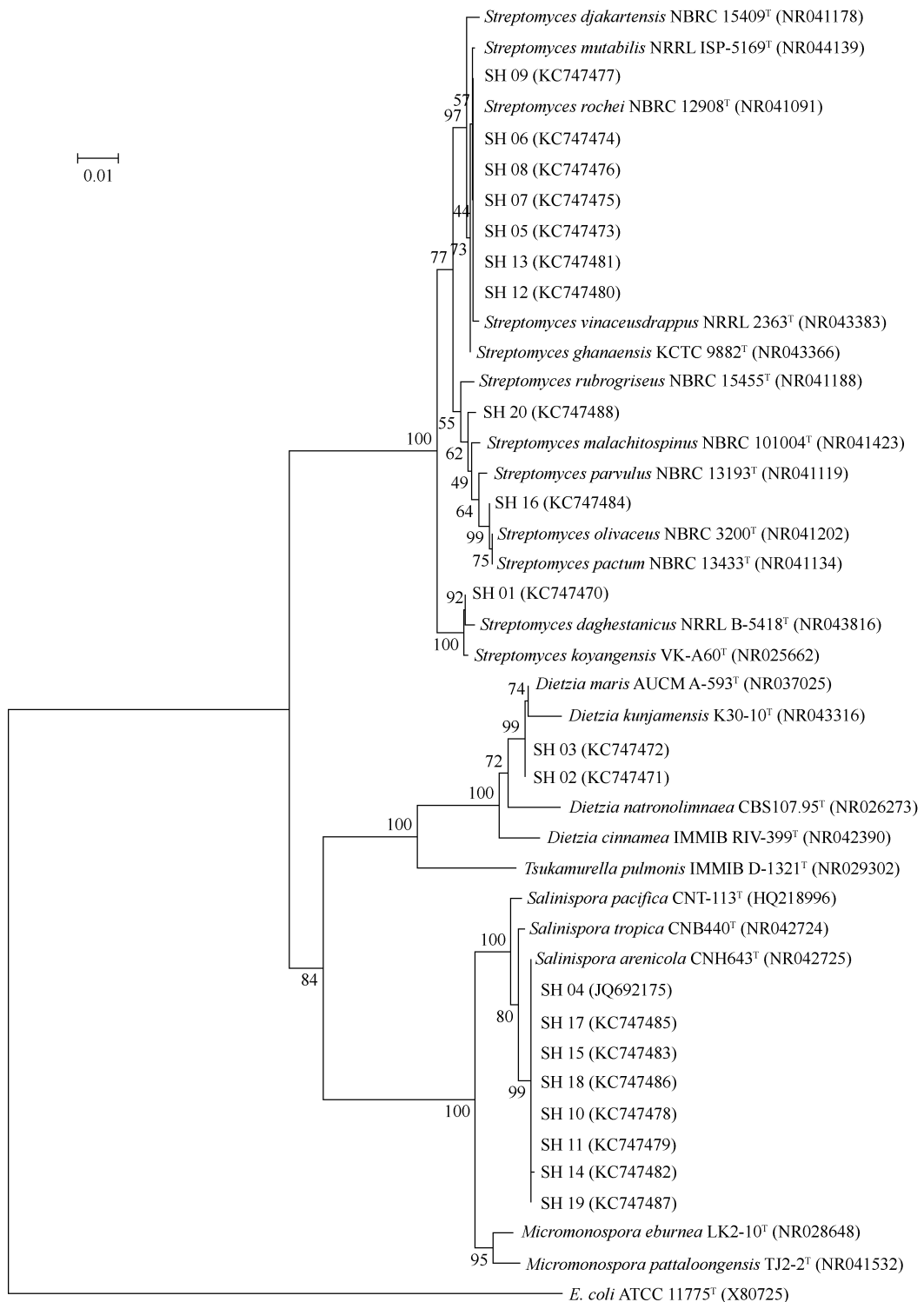


图 1. 基于 16S rRNA 基因序列构建的 20 株白穗软珊瑚共附生放线菌与相近种之间的系统发育树

Figure 1. Neighbor-joining phylogenetic tree constructed on the basis of almost-complete 16S rRNA gene sequences, showing the relationships among the isolated actinobacteria from the tissue of soft coral *Nephthea* sp. (YX5) and their closely related type strains.

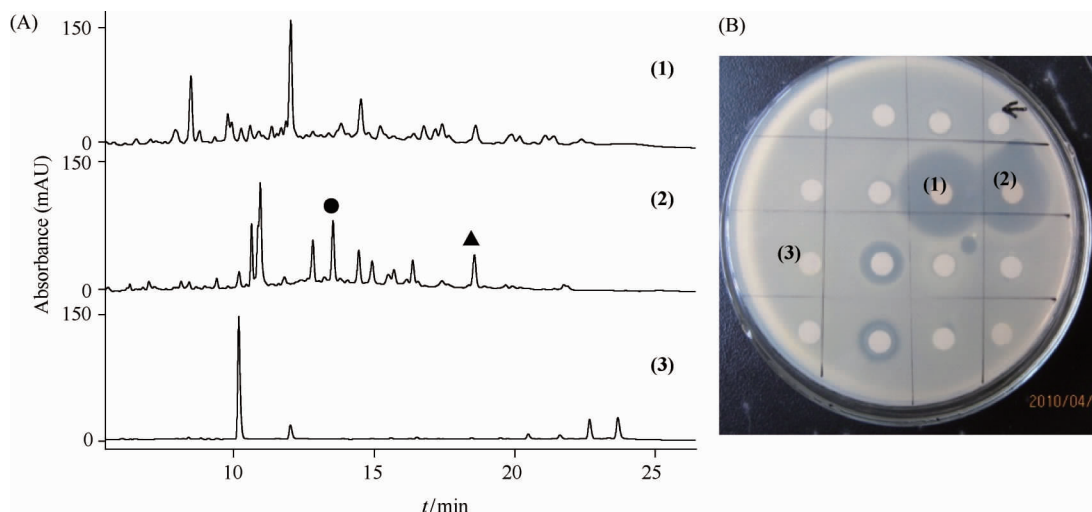


图 2. 菌株 SH04 发酵粗样的 HPLC 检测分析 (A) 及对金黄色葡萄球菌抑菌活性结果 (B)

Figure 2. HPLC analysis of fermentation extracts (A) and activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 of fermentation extracts (B) of the strain SH04. rifamycin S (▲), rifamycin W (●); Antibacterial Extracts are from F1 medium (1), F2 medium (2), and F3 medium (3).

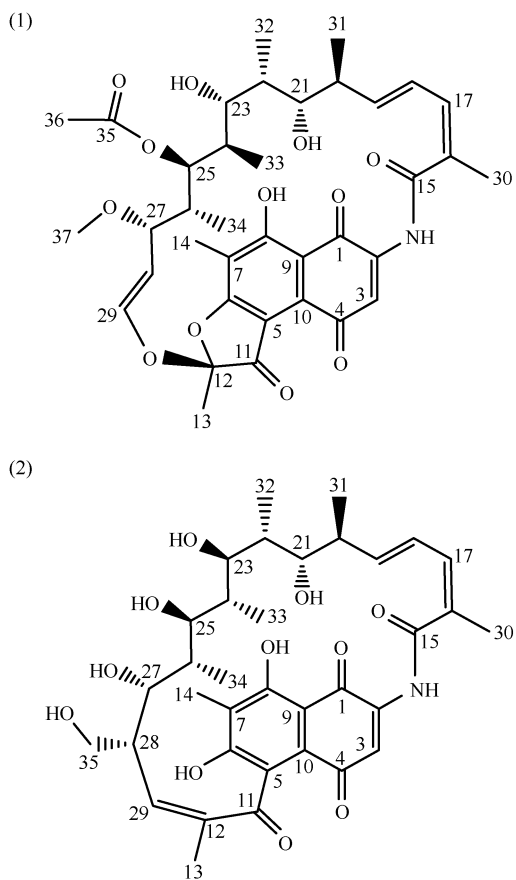


图 3. 化合物 1 和 2 的化学结构

Figure 3. Chemical structure of rifamycin S (1) and rifamycin W (2).

19), 38.9 (CH, C-20), 73.5 (CH, C-21), 32.7 (CH, C-22), 77.5 (CH, C-23), 37.5 (CH, C-24), 73.6 (CH, C-25), 37.3 (CH, C-26), 81.5 (CH, C-27), 115.6 (CH, C-28), 144.8 (CH, C-29), 20.1 (CH<sub>3</sub>, C-30), 16.9 (CH<sub>3</sub>, C-31), 11.4 (CH<sub>3</sub>, C-32), 8.8 (CH<sub>3</sub>, C-33), 11.7 (CH<sub>3</sub>, C-34), 173.2 (C, C-35), 21.1 (CH<sub>3</sub>, C-36), 56.9 (CH<sub>3</sub>, C-37)。其理化性质与波谱性质与已知化合物 rifamycin S 数据一致<sup>[17]</sup>。

**Rifamycin W (2):** 黄色粉末, (ESI-MS)  $m/z$  656.1 [M + H]<sup>+</sup>, 654.4 [M - H]<sup>-</sup>, 提示其分子量为 655。结合 <sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 分析, 推测其分子式为 C<sub>35</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>11</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 7.61 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, dd,  $J$  = 10.5, 16.0 Hz, H-18), 6.39 (1H, dd,  $J$  = 1.0, 10.0 Hz, H-29), 6.26 (1H, d,  $J$  = 1.0, 10.0 Hz, H-17), 6.08 (1H, dd,  $J$  = 7.2, 16.0 Hz, H-19), 4.42 (1H, s, H-27), 4.03 (1H, m, H-35), 3.58 (1H, dd,  $J$  = 10.5, 8.5 Hz, H-25), 3.49 (1H, dd,  $J$  = 2.0, 10.0 Hz, H-21), 3.42 (1H, dd,  $J$  = 10.5, 6.5 Hz, H-23), 2.64 (1H, m, H-28), 2.35 (1H, m, H-20), 2.21 (3H, s, H-14), 2.10 (3H, s, H-13), 2.09 (3H, d,  $J$  = 1.0 Hz, H-30), 1.87 (1H, m, H-22), 1.81 (1H, m, H-24), 1.42 (1H, m, H-26), 1.07 (3H, d,  $J$  = 7.0 Hz, H-32), 0.93 (3H, d,  $J$  = 7.0 Hz, H-33), 0.73 (3H, d,  $J$  = 6.5 Hz, H-31), 0.43

(3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-34).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 184.3 (C, C-1), 142.3 (C, C-2), 118.6 (CH, C-3), 186.6 (C, C-4), 128.9 (C, C-5), 163.9 (C, C-6), 119.3 (C, C-7), 161.3 (C, C-8), 108.4 (C, C-9), 129.9 (C, C-10), 200.5 (C, C-11), 140.9 (C, C-12), 12.6 ( $\text{CH}_3$ , C-13), 8.6 ( $\text{CH}_3$ , C-14), 172.2 (C, C-15), 132.1 (C, C-16), 135.2 (CH, C-17), 126.2 (CH, C-18), 141.1 (CH, C-19), 39.2 (CH, C-20), 74.8 (CH, C-21), 34.4 (CH, C-22), 79.0 (CH, C-23), 37.9 (CH, C-24), 71.2 (CH, C-25), 44.1 (CH, C-26), 68.9 (CH, C-27), 49.5 (CH, C-28), 141.5 (CH, C-29), 20.2 ( $\text{CH}_3$ , C-30), 11.7 ( $\text{CH}_3$ , C-31), 11.2 ( $\text{CH}_3$ , C-32), 8.9 ( $\text{CH}_3$ , C-33), 18.0 ( $\text{CH}_3$ , C-34), 64.3 ( $\text{CH}_2$ , C-35). 其理化性质与波谱性质与已知化合物 rifamycin W 数据一致<sup>[18]</sup>。

### 3 讨论

从中国南海西沙群岛永兴岛附近海域采集的白穗软珊瑚 *Nephthea* sp. (YX5) 中分离到 20 株放线菌, 通过 16S rRNA 基因序列鉴定将其分为 3 个属, 链霉菌属、迪茨氏菌属、盐水孢菌属。其中盐水孢菌属 (*Salinispora*) 被称为海洋“土著”放线菌, 为海洋专属性稀有放线菌种类, 迄今为止只发表了 *S. arenicola*、*S. pacifica* 和 *S. tropica* 3 个种<sup>[19]</sup>。本研究首次报道从珊瑚共附生环境中分离得到了该属菌株, 为今后分离培养同属菌株提供了借鉴。Fenical 课题组于 1991 年首次从 Bahamas 海域沉积泥中分离得到该属菌株 *Salinispora arenicola*, 其次级代谢产物非常丰富, 具有很强的抗菌、抗肿瘤活性。目前已从盐水孢菌属菌株中获得了 salinosporamide、sporolide、cyanosporaside、saliniketal 等化合物<sup>[20]</sup>, 其中 salinosporamide A 因具有良好的选择性抗肿瘤活性和蛋白酶抑制剂活性, 已进入临床研究阶段。

对 20 株共附生放线菌菌株中的 I 型 PKS KS 基因进行筛选, 得到 18 株阳性菌株, 这表明 I 型 PKS 基因广泛存在于放线菌基因组中。但通过发酵检测, 只有菌株 SH04 能够产生具有较好抗菌活性的 I 型 PKS 类化合物 rifamycins, 其余 17 株菌通过常规检测手段未能发现相关化合物, 这可能是由于部分 PKS 基因簇在所采用的发酵条件下处于沉默状态。研究表明, 放线菌中确实存在许多沉默基因簇, 在常

规培养条件下表达量低甚至完全不表达, 只有在合适的培养条件下, 才能增强或启动表达, 合成相应的化合物<sup>[21]</sup>。目前, 我们正在通过优化发酵条件, 加入代谢前体物质, 抗生素诱导等方法, 促使阳性菌株合成相应的化合物。

利福霉素 (rifamycins) 属于安莎霉素类抗生素, 能特异性抑制细菌 RNA 聚合酶, 具有抗病毒、抗肿瘤、抗真菌感染等活性, 广泛应用于结核病的治疗。1959 年 Sensi 等首次从地中海链霉菌 (*Streptomyces mediterranei*) 的代谢产物中分离获得 rifamycin B, 1962 年人工合成的衍生物利福霉素 SV 就已应用于临床<sup>[22]</sup>。我们从白穗软珊瑚共附生放线菌 *S. arenicola* SH04 代谢产物中分离得到具有较好抗菌活性的利福霉素类化合物, 为研究珊瑚共附生放线菌参与珊瑚的化学防御、珊瑚天然活性物质的真正来源提供了参考。

基于生物合成基因来筛选分离放线菌的研究方法, 已经越来越多的应用于海洋放线菌天然次级代谢产物研究<sup>[23]</sup>。选择合适的探针对分离到的放线菌基因组 DNA 进行快速筛选, 将菌株的分离鉴定和化合物筛选有机地结合起来, 为研究菌株、基因和代谢产物搭建了一座桥梁。这种高效、简便的研究体系不但可以预测海洋放线菌代谢产物的类型, 对其代谢产物的分离和结构鉴定也具有指导意义。本课题组在放线菌代谢工程及生物合成方面具有扎实的基础<sup>[24-25]</sup>, 为后续研究珊瑚共附生放线菌的沉默 PKS 基因簇的表达提供了有力的保障。

**致谢** 感谢中国科学院南海海洋研究所刘静老师对珊瑚共附生放线菌分离的指导, 中国科学院南海海洋研究所刘玉娟、游志庆和青岛农业大学生命科学学院莫旭华博士对放线菌种属分析提供的帮助, 以及中国科学院南海海洋研究所分析测试中心在化合物鉴定方面提供的帮助。

### 参考文献

- [1] Tian X, Zhang S, Li W. Advance in Marine Actinobacterial research - A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(02): 161-169. (in Chinese)  
田新朋, 张偲, 李文均. 海洋放线菌研究进展. 微生物学报, 2011, 51(02): 161-169.
- [2] Sarma NS, Krishna MS, Pasha SG, Rao TSP, Venkateswarlu Y, Parameswaran PS. Marine Metabolites: The Sterols of Soft Coral. *Chemical Reviews*, 2009, 109

- (6): 2803-2828.
- [3] Olson JB, Kellogg CA. Microbial ecology of corals, sponges, and algae in mesophotic coral environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 73(1): 17-30.
- [4] Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(5): 355-362.
- [5] Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epstein PR, Grimes DJ, Hofmann EE, Lipp EK, Osterhaus AD, Overstreet RM, Porter JW, Smith GW, Vasta GR. Emerging marine diseases—climate links and anthropogenic factors. *Science*, 1999, 285(5433): 1505-1510.
- [6] Jensen PR, Mincer TJ, Williams PG, Fenical W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, 87(1): 43-48.
- [7] Wen L, Wei Q, Cai J, Chen G, Zhang S. Advances in studies on bioactive secondary metabolites from gorgonian and microbial symbionts. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2012, 37(9): 641-654. (in Chinese)
- 温露, 韦啟球, 蔡隽妮, 陈钢, 张世倡. 柳珊瑚及其共生微生物活性代谢产物的研究进展. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(9): 641-654.
- [8] Xu J, Xu J. Advances on biosynthetic gene clusters of natural product from marine symbiotic microbe—A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(7): 975-979. (in Chinese)
- 许静, 徐俊. 海洋共附生微生物天然产物生物合成基因研究进展. *微生物学报*, 2008, 48(7): 975-979.
- [9] Gontang EA, Gaudêncio SP, Fenical W, Jensen PR. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine Actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2487-2499.
- [10] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in Actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1): 10-24.
- [11] Sattely ES, Fischbach MA, Walsh CT. Total biosynthesis; in vitro reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways. *Natural Product Reports*, 2008, 25(4): 757-793.
- [12] Jensen PR, Gontang E, Mafnas C, Mincer TJ, Fenical W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(7): 1039-1048.
- [13] Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. Widespread and persistent populations of a major new marine Actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 5005-5011.
- [14] Xiao Y, Li S, Ma L, Zhang G, Ju J, Zhang C. Genetic manipulation system for tiacumicin producer *Dactylosporangium aurantiacum* NRRL 18085. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(8): 1014-1022. (in Chinese)
- 肖毅, 李苏梅, 马亮, 张改云, 鞠建华, 张长生. 台勾霉素生产菌指抱囊菌 NRRL 18085 遗传操作体系的建立. *微生物学报*, 2010, 50(8): 1014-1022.
- [15] He J, Zhang D, Xu Y, Zhang X, Tang S, Xu L, Li W. Diversity and bioactivities of culturable marine actinobacteria isolated from mangrove sediment in Indian Ocean. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(10): 1195-1202. (in Chinese)
- 何洁, 张道锋, 徐盈, 张晓梅, 唐蜀昆, 徐丽华, 李文均. 印度洋红树林沉积物可培养海洋放线菌多样性及其活性. *微生物学报*, 2012, 52(10): 1195-1202.
- [16] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [17] Huang H, Wu X, Yi S, Zhou Z, Zhu J, Fang Z, Yue J, Bao S. Rifamycin S and its geometric isomer produced by a newly found actinomycete, *Micromonospora rifamycinica*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009, 95(2): 143-148.
- [18] Martinelli E, Gallo GG, Antonini P, White RJ. Structure of rifamycin W: A novel ansamycin from a mutant of *Nocardia mediterranei*. *Tetrahedron*, 1974, 30(17): 3087-3091.
- [19] Freel KC, Nam S-J, Fenical W, Jensen PR. Evolution of secondary metabolite genes in three closely related marine Actinomycete species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(20): 7261-7270.
- [20] Jensen PR, Williams PG, Oh D-C, Zeigler L, Fenical W. Species-specific secondary metabolite production in marine Actinomycetes of the genus *salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(4): 1146-1152.
- [21] Craney A, Ozimok C, Pimentel-Elardo Sheila M, Capretta A, Nodwell Justin R. Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(8): 1020-1027.
- [22] Sensi P, Margalith P, Timbal M. Rifamycin, a new antibiotic: preliminary report. *Farmaco Ed Science*, 1959, 14(2): 146-147.



- [23] Sun W, Peng C, Zhao Y, Li Z. Functional Gene-Guided Discovery of Type II Polyketides from Culturable Actinomycetes Associated with Soft Coral *Scleronephthya* sp. . *PLoS One*, 2012, 7(8): 42847.
- [24] Li H, Zhang Q, Li S, Zhu Y, Zhang G, Zhang H, Tian X, Zhang S, Ju J, Zhang C. Identification and Characterization of Xiamycin A and Oxiamycin Gene Cluster Reveals an Oxidative Cyclization Strategy Tailoring Indolosesquiterpene Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(21): 8996-9005.
- [25] Xiao Y, Li S, Niu S, Ma L, Zhang G, Zhang H, Zhang G, Ju J, Zhang C. Characterization of Tiacumicin B Biosynthetic Gene Cluster Affording Diversified Tiacumicin Analogues and Revealing a Tailoring Dihydrogenase. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 133(4): 1092-1105.

## Isolation of Actinobacteria with antibiotic activity associated with Soft Coral *Nephthea* sp.

Liang Ma<sup>1,2</sup>, Wenjun Zhang<sup>1</sup>, Yiguang Zhu<sup>1</sup>, Zhengchao Wu<sup>1,2</sup>, Kumar Saurav<sup>1</sup>, Hui Hang<sup>1</sup>, Changsheng Zhang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resource and Ecology, RNAM Center for Marine Microbiology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

<sup>2</sup> University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [ **Objective** ] The present study aims to isolate and identify actinobacteria associated with the soft coral *Nephthea* sp. , and to isolate natural products from these actinobacteria under the guidance of PCR screening for polyketides synthase (PKS) genes. [ **Methods** ] Eleven selective media were used to isolate actinobacteria associated with the soft coral *Nephthea* sp. collected from Yongxin Island. The isolated actinobacteria were classified on the basis of phylogenetic tree analysis of their 16S rRNA genes. Degenerated primers targeted on conserved KS (ketoacyl-synthase) domain of type I PKS genes were used to screen for potential isolates. The positive isolates were cultured in three different media to check their producing profiles. One bioactive strain that is rich in metabolites was subjected to larger scale fermentation for isolating bioactive natural products. [ **Results** ] A total of 20 strains were isolated from *Nephthea* sp. , and were categorized into 3 genera including *Streptomyces*, *Dietzia* and *Salinospora*, among which 18 strains were positive in screening with type I PKS genes. Two bioactive compounds rifamycin S and rifamycin W were isolated and identified from *Salinospora arenicola* SH04. [ **Conclusion** ] This is the first report of isolating indigenous marine actinobacteria *Salinospora* from the soft coral *Nephthea* sp. It provides an example of isolating bioactive secondary metabolites from cultivable actinobacteria associated with *Nephthea* sp. by PCR screening.

**Keywords:** Soft Coral *Nephthea* sp. , Actinobacteria, *Salinospora*, type I PKS, rifamycins

( 本文责编: 张晓丽 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31125001), by the Chinese Academy of Sciences for Key Topics in Innovation Engineering (KSCX2-EW-G-12, KZCX2-YW-JC202) and by the '100 Talents Project' of Chinese Academy of Sciences (08SL111002)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-89023038; E-mail: czhang@scsio.ac.cn

Received: 20 March 2013/Revised: 19 April 2013