

聚酮类化合物生物合成途径基因阳性菌株生物多样性研究

徐 平^{1, 2} 李文均^{1*} 高慧英² 徐丽华¹ 姜成林¹

(¹ 云南大学 云南省微生物所 教育部微生物资源开放研究重点实验室和云南省生物资源保护与利用重点实验室 昆明 650091)

(² 华北制药集团新药中心 石家庄 050015)

摘 要: 从中国云南省采集土样, 采用 GPY 培养基、淀粉-酪素琼脂培养基和甘油天门冬酰胺琼脂培养基分离得到了 876 株细菌放线菌菌株。经聚酮类化合物基因筛选得到 75 株 I 型和 II 型聚酮类化合物生物合成基因双阳性的菌株, 经抗菌活性、形态、生理等结果分析比较, 选取其中的 10 株进行了 16S rDNA 序列分析。在物种多样性方面, 分离到的菌分布至少有 7 个科, 8 个属。其中有链霉菌科的链霉菌属, 分枝杆菌科的分枝杆菌属, 链孢囊菌科的链孢囊菌属和野野村菌属, 诺卡氏菌科的诺卡氏菌属, 微球菌目的一新属、产碱杆菌科无色杆菌属和 β -亚纲中与紫色杆菌属紧邻的一革兰氏阴性菌新属。综合其表型、基因型特征, 初步确定其中 8 株为新物种。研究表明利用新的思路和程序从自然环境分离、鉴定未知菌是微生物资源开发利用的关键。

关键词: 聚酮类化合物, 基因筛选, 放线菌, 16S rDNA, 生物多样性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2005) 06-0821-07

放线菌广泛分布于自然环境, 是重要的资源微生物。自 20 世纪 40 年代至今发现的 12000 余种微生物来源的新活性物质中, 70% 以上是由放线菌产生的。其中链霉菌 (*Streptomyces*) 是微生物来源的新活性物质的最主要产生菌, 其产生的新活性物质的数量占微生物来源的新活性物质总数的 55% 以上^[1]。但随着已经发现的新化合物数量的增加, 从链霉菌中重复发现化合物的机率逐渐增加, 因而从已进行过深入研究的链霉菌中分离到新的有用的次级代谢产物的难度日益增加。自上世纪 60 年代后期从小单孢菌中发现临床上重要的氨基糖苷类抗生素——庆大霉素 (Gentamicin) 以来, 放线菌中除链霉菌以外的其它放线菌, 即稀有放线菌的分离、筛选一直是微生物来源的新活性物质筛选活动中微生物资源研究的热点^[2]。分子生态研究结果表明自然界中存在着大量确实存在的未知 (不能培养、未经鉴定) 微生物, 已知的微生物数量还不到微生物总数的 1%^[3]。研究开发 99% 以上的未知微生物是微生物资源开发利用的重要研究内容。

聚酮类化合物 (PKS) 是由聚酮类化合物生物合成途径合成的化合物的总称。已知聚酮类化合物分芳香环聚酮类化合物和非芳香环聚酮类化合物即大环聚酮类化合物两种。这两类化合物分别由 II 型聚

酮合酶合成途径 (PKS II) 和 I 型聚酮合酶合成途径 (PKS I) 合成。以雷帕霉素 ((Rapamycin)、FK506、阿维菌素 (Avermectin) 为代表的大环内酯类抗生素是由 PKS I 途径合成的。而以四环素 (Tetracycline) 为代表的四环类抗生素和以阿霉素 (Doxorubicin)、柔红霉素 (Daunorubicin) 为代表的蒽环类抗生素均是由 PKS II 途径合成的。由于生物合成途径中构件的改变及其组合方式的千变万化, 可形成的化合物的数量极其庞大。结构的多样性导致了生物活性的多样性。在至今上市的医药或农用抗生素结构中聚酮类化合物来源的比例居已知六大类天然产物结构的首位, 具有重要的商业价值^[4,5]。这些抗生素几乎都是由放线菌产生的。因此具有聚酮类化合物生物合成基因的新颖的放线菌的分离、筛选和鉴定是新药筛选领域函待探索的课题。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 微波炉 (TurBo microwave Oven DMR-604), EBA12R 高速冷冻离心机 (Hettich), Vortex Genie2 涡旋振荡器, TGL-16C 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), HW-8B 型超级微量恒温器 (上海浦江分析仪器厂), 电泳仪 Mupid-2 Mini Gel

基金项目: 国家“973 项目” (2004CB719601) 国家自然科学基金 (30270004) 云南省自然科学基金 (2004 C0002Q)

* 通讯作者。Tel 86-871-6231202; Fax 86-871-5173878; E-mail: wjl@ynu.edu.cn, liact@hotmail.com

作者简介 徐 平 (1969 -), 男, 博士, 高级工程师, 主要从事微生物药物筛选工作。E-mail: xupingghy@yahoo.com.cn

收稿日期 2005-04-19, 修回日期 2005-06-29

Migration Trough (Cosmo Bio Co., Ltd, Advance Co., Ltd.). 溶菌酶, 蛋白酶 K, 20% SDS, 酚/氯仿 (V/V, 1/1), 3mol/L NaAc (pH 4.8), 异丙醇, 70% 乙醇, 1 × TE Buffer (pH 8.0)。PCR 所用引物由 TaKaRa 公司合成。PCR 仪是 PE-9600 型 PCR 仪。10 × Ex Taq buffer, dNTP Mix (各 2.5mmol/L), Ex Taq DNA polymerase (5U/μL), 均购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 培养基: GPY 培养基: 每升含葡萄糖 10g, 蛋白胨 5g, 酵母浸膏 5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, K_2HPO_4 1g, 琼脂 20g, pH 7.2 ~ 7.4。淀粉-酪素琼脂培养基: 每升含可溶性淀粉 10g, Casein 0.3g, KNO_3 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, K_2HPO_4 2g, CaCO_3 0.02g, FeSO_4 10mg, 琼脂 20g, pH 7.2 ~ 7.4。甘油-天门冬酰胺培养基 (ISP5): 每升含 L-天门冬酰胺 1g, 甘油 10g, K_2HPO_4 1g, 琼脂 20g, pH 7.2 ~ 7.4。

1.2 样品采集和菌株分离

从云南的西北、东北、东南、滇西、元阳、绿春等地采集 300 余份土样。样品经稀释涂布平板, 在 28℃ 培养 2 ~ 3 周, 根据菌落大小、形态、颜色等进行初步分离筛选并纯化。

1.3 I 型和 II 型聚酮类化合物生物合成途径基因阳性菌株的筛选

PKS I 和 PKS II 基因阳性菌株的筛选参照徐平等^[6,7]的方法进行。

1.4 菌株的初步鉴定

1.4.1 形态观察: 对放线菌分别用察氏琼脂培养基、酵母膏-麦芽膏琼脂培养基 (ISP2)、燕麦片琼脂培养基、甘油-天门冬酰胺琼脂 (ISP5)、改良的 Sauton's^[8] 琼脂培养基和改良的 Bennett's 琼脂培养基^[9] 于 28℃ 条件下进行埋片培养。培养 7、14、21 和 28d, 分别取出埋片, 先用光学显微镜观察形态, 并选择生长密度适宜的培养物进行电镜观察。对细菌则采用营养琼脂培养基、肉汁胨琼脂培养基和马铃薯琼脂培养基于 37℃ 条件下培养, 过夜观察。培养物颜色与 ISSC-NBS color charts (standard sample No. 2106) 色卡比较确定。

1.4.2 生理学特性研究: 生理生化特征的选择主要根据文献^[10]中相应属、种鉴定的有关内容进行。主要进行了唯一碳、氮源生长试验、酶的产生、明胶液化、牛奶胨化和凝固、纤维素分解、硫化氢产生和硝酸盐还原等试验。

1.4.3 全细胞壁氨基酸分析: 采用 Hasagawa 等^[11]的薄层层析法 (Thin layer chromatography, TLC) 进行

全细胞壁氨基酸分析。

1.5 16S rDNA PCR 扩增

1.5.1 菌体总 DNA 的提取: 参照徐平等^[12]的方法提取菌体总 DNA。

1.5.2 16S rDNA PCR 扩增: 正向引物 PA (对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 5' 端 8 ~ 27f 位核苷酸): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 反向引物 PB (对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 5' 端 1523 ~ 1504r 位核苷酸): 5'-TTAAGGATGGTGATGCCGCA-3'。

PCR 扩增条件: 以热启动方式进行扩增, 95℃ 变性 5min 加 Taq 酶后 95℃ 变性 1min, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2.5min, 共 30 个循环; 最后再 72℃ 延伸 5min。

1.5.3 16S rDNA PCR 扩增产物的纯化及测序: 由 TaKaRa 公司协助完成。测序引物同李文均等^[13]的方法。

1.6 系统进化树的构建和分析

将所得到的序列用 BLAST 软件^[14]在 GenBank/EMBO/DBJ 等数据库中进行相似性搜索, 选取同源性比较高的典型菌株的 16S rDNA 序列作为参比对象, 以 BLAST 2n 软件^[15]进行 16S rDNA 序列的两两比对, 得到供试菌株与参比菌株间的序列相似性, 然后用 CLAST W 软件^[16]进行多重序列比对, 根据 Kimura-2 参数法^[17]计算进化距离, 采用邻接法 (Neighbor-Joining)^[18]构建系统进化树。

2 结果和讨论

2.1 菌种分离、筛选和表型特征分析

经纯化并淘汰重复菌株后, 从云南不同地区采集的 300 余份土样中共分离到 876 株菌。经 PKS I 和 PKS II 基因筛选, 得到 75 株 PKS I 和 PKS II 型基因双阳性的菌株^[6,7]。根据培养物抗菌活性、菌落形态、大小、颜色等特征, 选择 10 株菌进行了多相分类研究。表 1 为这 10 株供试菌的生理生化特性。

2.2 全细胞壁氨基酸分析和革兰氏染色特性研究

表 2 为供试菌的革兰氏染色特性。其中革兰氏阳性菌株 8 个, 革兰氏阴性菌株 2 个。

全细胞壁氨基酸分析的结果表明 (表 2), YIM 33361、YIM 33378、YIM 34827、YIM 33309、YIM 37251 和 YIM 37225 含有 meso-DAP, 菌株 YIM 001 和 YIM 31724 含有 L-DAP, 菌株 YIM 34793 含有 L-Lys, 而菌株 YIM 31775 在这个实验条件下没有发现已知的特征性氨基酸。

表 1 10 株供试菌的部分生理生化特性

Table 1 Some physiological and biochemical properties of the 10 tested strains

Isolates No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Growth at 4% NaCl	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Optimum growth temperature(℃)	28	28	37	37	28	37	28	28	28	28
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Milk peptonization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Milk coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch hydrolysis	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
Nitrate reduction	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S production	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Melanin production	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Growth in cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xanthine hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Hypoxanthine hydrolysis	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Carbon utilization(1%)										
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Sucrose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Meso-inositol	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Sodium citrate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sodium acetate	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1,2,……represent strains YIM001, YIM 31724, YIM 31775, YIM 33309, YIM 33361, YIM 33378, YIM 34793, YIM 34827, YIM 37225, and YIM 37251 respectively ; + :Positive ; - :Negative ; ± : Variable.

表 2 10 株菌的革兰氏染色、氨基酸组份及 16S rDNA 序列的 BLAST 分析结果

Table 2 The results of Gram stain, amino acid composition and BLAST analysis with 16S rDNA sequences of the 10 test strains

Strains No.	Gram stain	Amino-acids	Closest type strains	16S rDNA similarity/%	Genera
YIM 001	G+	L-DAP	<i>S. sampsonii</i> ATCC 25495 ^T	97.6	<i>Streptomyces</i>
YIM 31724	G+	L-DAP	<i>S. rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> JCM 4667 ^T	98.8	<i>Streptomyces</i>
YIM 31775	G-	unknown	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i> W1r3 ^T	95.5	unknown
YIM 33309	G+	meso-DAP	<i>Nonomuraea turkmeniae</i> DSM43926 ^T	98.1	<i>Nonomuraea</i>
YIM 33361	G+	meso-DAP	<i>Nocardia paucivorans</i> DSM 44386 ^T	96.9	<i>Nocardia</i>
YIM 33378	G+	meso-DAP	<i>Nocardia paucivorans</i> DSM 44386 ^T	97.9	<i>Nocardia</i>
YIM 34793	G-	L-Lys	<i>Achromobacter piechaudii</i> ATCC 43552 ^T	99.2	<i>Achromobacter</i>
YIM 34827	G+	meso-DAP	<i>Georgenia muralis</i> 1A-C ^T	96.0	unknown
YIM 37225	G+	meso-DAP	<i>Mycobacterium hodleri</i> DSM 44183 ^T	97.6	<i>Mycobacterium</i>
YIM 37251	G+	meso-DAP	<i>Streptosporangium amethystogenes</i> DSM 43197 ^T	98.9	<i>Streptosporangium</i>

2.3 系统发育分析

在 PKS 基因筛选的基础上我们根据培养物抗菌活性、菌落形态、大小、颜色等特征选择 10 株菌进行了 16S rDNA 序列测定和系统进化分析。根据供

试菌株的 16S rDNA 序列在 GenBank 等数据库中进
行相似性搜索,选定其中同源性较高的相关菌株构
建了系统进化树(图 1,A-F)。

从系统进化树状图可以看出,这 10 株供试菌

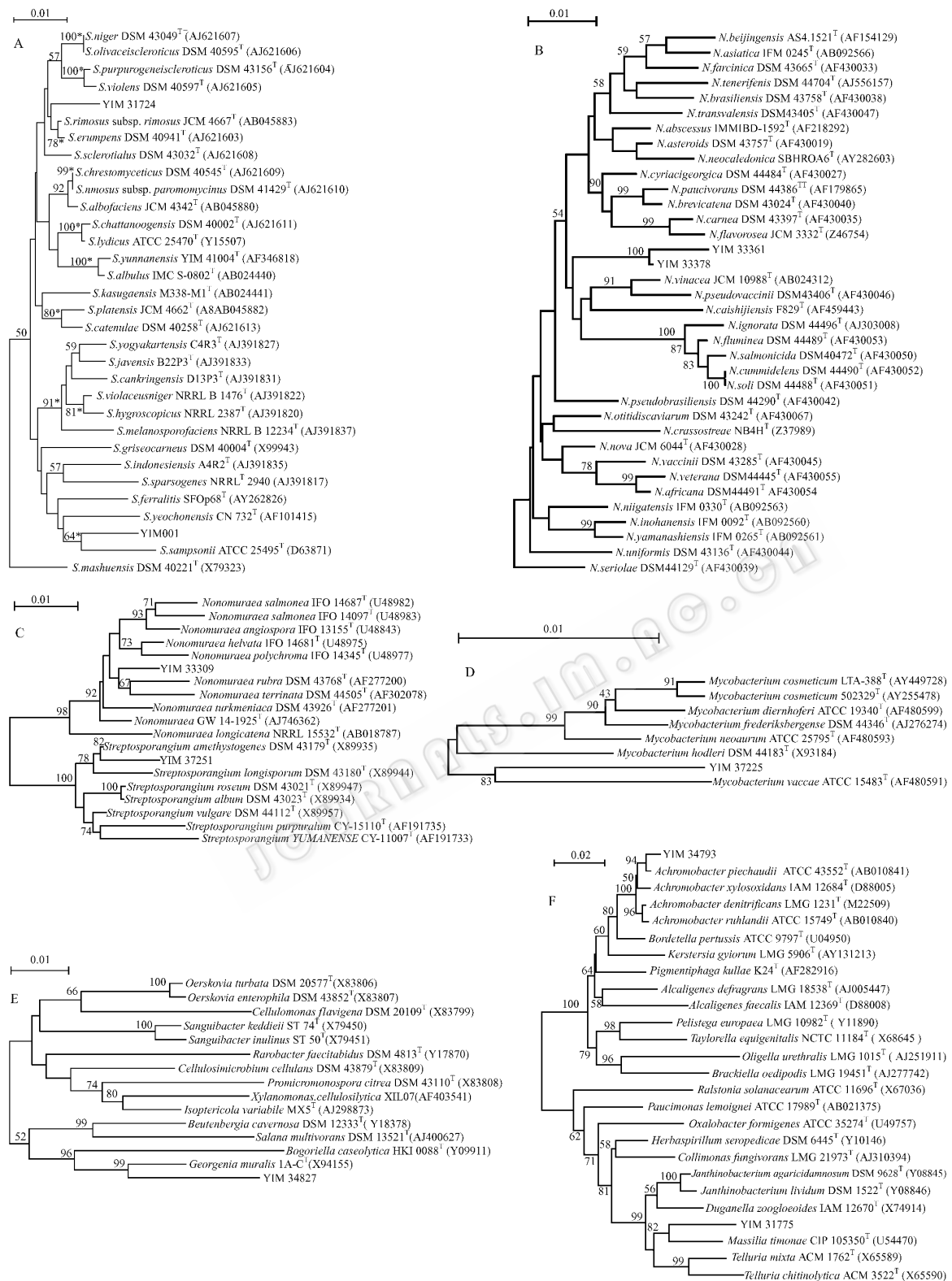


图 1 对聚酮类化合物生物合成途径基因阳性菌株及其从 GenBank 等数据库中调集的该属同源性最高相关菌种 16S rDNA 序列构建的系统发育树状关系图

Fig.1 Phylogenetic tree showing the relationships among some type I & II polyketide synthesis gene positive strains and relative species and other taxa downloaded from GenBank based on 16S rDNA sequences

Numbers on branch nodes are bootstrap values (1000 resamplings). A ~ E represents strains YIM 001 and YIM 31724 (A), YIM 33361 and YIM 33378 (B), YIM 33309 and YIM 37251 (C), YIM 37225 (D), YIM 34827 (E), YIM 31775 and YIM 34793 (F), respectively.

分属于 7 个科, 8 个属。其中菌株 YIM 001, YIM 31724 属于链霉菌科 (*Streptomycetaceae*) 的链霉菌属 (*Streptomyces*)。从 16S rDNA 序列相似性分析结果看, YIM 001 与其最近邻的链霉菌属的典型种桑氏链霉菌 (*S. sampsonii* ATCC 25495^T) 间的同源性为 97.6%。综合对其所做的包括形态、生理学特性、细胞化学组分、基因组 DNA (G + C) mol% 含量测定和 DNA-DNA 同源性分析等在内的多相分类的结果, YIM 001 属于链霉菌属的一新种, 我们将其命名为河北链霉菌 (*Streptomyces hebeiensis* sp. nov.) (其分类鉴定的结果已另文发表^[9])。菌株 YIM 31724 与其最近邻的链霉菌属的典型种龟裂链霉菌龟裂亚种 (*S. rimosus* subsp. *rimosus* JCM 4667^T) 间的同源性为 98.8%。根据我们对其所做的多相分类的结果, YIM 31724 也应是链霉菌属的一新种, 我们将其命名为大理链霉菌 (*Streptomyces daliensis* sp. nov.) (其分类鉴定的结果将另文发表)。已知链霉菌是普通土壤环境中的优势菌, 也是生物活性化合物的主要产生菌。经过几十年的研究, 链霉菌属的有效发表种已有近 500 种, 因此重复发现链霉菌已知种的概率越来越高。但链霉菌来源的新生理活性物质仍不断被发现, 新的特殊链霉菌的分离、鉴定和新生物活性物质筛选依然是微生物来源新药筛选工作的重要课题^[20]。我们基于基因筛选选择的两株链霉菌经多相分类鉴定是链霉菌属的两新种, 表明利用新的思路 and 程序从自然环境分离、鉴定新的特殊链霉菌是微生物资源开发利用的关键。

菌株 YIM 37225 属分枝杆菌科 (*Mycobacteriaceae*) 的分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)。从 16S rDNA 序列相似性分析结果看, YIM 37225 与最近邻的分枝杆菌属的典型种霍氏分枝杆菌 (*Mycobacterium hodleri* DSM 44183^T) 的同源性为 97.9%。形态、生理学特性、细胞化学组分、基因组 DNA (G + C) mol% 含量的测定结果表明该菌与分枝杆菌属的典型特征相符, 应归为分枝杆菌属, 但其分类地位需要通过近缘的分枝杆菌属典型种的 DNA-DNA 杂交才能最后确定。YIM 33361 和 YIM 33378 属于诺卡氏菌科 (*Nocardiaceae*) 的诺卡氏菌属 (*Nocardia*)。从 16S rDNA 序列相似性分析结果看, YIM 33361 与其最近邻的诺卡氏菌属的典型种少食诺卡氏菌 (*N. paucivorans* DSM 44386^T) 间的同源性为 96.9%, 低于 97% 的鉴定标准。根据我们对其所做的包括形态、生理学特性、细胞化学组分、基因组 DNA (G + C) mol% 含量测定等多相分类结果也支持 YIM 33361

为诺卡氏菌属的新种, 因其对多种测试的抗生素均表现为抗性, 定名为多抗诺卡氏菌 (*Nocardia polyresistens* sp. nov.)。YIM 33378 与其最近邻的诺卡氏菌属的典型种少食诺卡氏菌 (*N. paucivorans* DSM 44386^T) 间的同源性为 97.9%。YIM 33378 与 YIM 33361 的 16S rDNA 序列相似性最高, 为 98.9%, 但两者的基因组 DNA-DNA 杂交的相似性为 49%, 远低于 70% 的新种鉴定标准, 应为诺卡氏菌属的新种。我们对其所做的包括形态、生理学特性、细胞化学组分、基因组 DNA (G + C) mol% 含量测定等多相分类结果也支持 YIM 33378 为诺卡氏菌属的新种, 定名为大理诺卡氏菌 (*Nocardia daliensis* sp. nov.)。已知分枝杆菌、诺卡氏菌多为病原菌, 至今尚无这类菌产生生理活性物质的报道。我们的工作不仅表明了分枝杆菌、诺卡氏菌物种的多样性, 而且表明这类菌也具有产生聚酮类化合物的潜力, 为微生物资源学研究拓展了菌源。

YIM 37251 属于链孢囊菌科 (*Streptosporangiaceae*) 的链孢囊菌属 (*Streptosporangium*)。从 16S rDNA 序列相似性分析结果看, YIM37251 与其最近邻的链孢囊菌属的典型种产紫晶链孢囊菌 (*Streptosporangium amethystogenes* DSM 43197^T) 间的同源性为 98.9%。形态、生理学特性、细胞化学组分和基因组 DNA (G + C) mol% 含量测定结果表明, 该菌与链孢囊菌属的典型特征相符, 应归为链孢囊菌属, 但其分类地位需通过与近缘的链孢囊菌属典型种的 DNA-DNA 杂交才能最后确定。而 YIM 33309 则属于链孢囊菌科 (*Streptosporangiaceae*) 的野野村菌属 (*Nonomuraea*)。16S rDNA 序列相似性分析结果表明 YIM33309 与其最近邻的野野村菌属的典型种土库曼野野村菌 (*Nonomuraea turkmeniace* DSM43926^T) 间的同源性为 98.1%。形态、生理学特性、细胞化学组分、基因组 DNA (G + C) mol% 含量测定的结果表明该菌与野野村菌属的典型特征相符, 应归为野野村菌属, 其分类地位还需要通过与近缘的野野村菌属的相关典型种的 DNA-DNA 杂交才能最后确定。

YIM 34827 属于微球菌亚目。从 16S rDNA 序列相似性分析结果看, YIM 34827 与其最近邻乔氏菌属 (*Georgenia*) 的相似性只有 96%, 而与其近邻纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*) 的相似性只有 93.7%。从系统进化树的自举值可看出, YIM 34827 在乔氏菌属和纤维单胞菌属间形成稳定的单独分支, 表明 YIM 34827 应与乔氏菌属和纤维单胞菌属并列, 独立成一个新属。另外从 16S rDNA 序列的特征性核

苷酸看, YIM 34827 与其最近邻乔氏菌属间有两处不同, 而与微球菌亚目 (*Micrococcineae*) 的其它属间至少有 6 个差异, 表明不能将 YIM 34827 归入微球菌亚目已知的属。根据我们对其所做的多相分类研究结果, 我们拟将此株菌定为微球菌亚目的一个新属(名称待定)。

YIM 31775 和 YIM 34793 是革兰氏阴性菌。从 16S rDNA 序列相似性分析结果看, YIM 31775 与 β -亚纲中的紫色杆菌属 (*Janthinobacterium*) 紧邻, 与伞有害紫色杆菌 (*Janthinobacterium agaricidamnosum* W1r3^T) 的相似性只有 95.5%, 而与“草酸杆菌科” (*Oxalobacteraceae*) 的其它属的相似性均低于 95%。另外在细胞形态、鞭毛着生方式、细胞脂肪酸组成和对碳源的资化性上, YIM 31775 均与“草酸杆菌科”的各属间有明显差别。根据我们对其所做的多相分类研究结果, 我们将这株菌定为“草酸杆菌科”的一个新属——纳西杆菌属 (*Naxibacter*), 其典型种为耐碱纳西杆菌 (*Naxibacter alkalitolerans* YIM 31775^T) (其分类鉴定的结果已另文发表^[21])。YIM 34793 属于产碱杆菌科 (*Alcaligenaceae*) 的无色杆菌属 (*Achromobacter*)。从 16S rDNA 序列相似性分析结果看, YIM34793 与其最近邻的无色杆菌属的典型种皮氏无色杆菌 (*Achromobacter piechaudii* ATCC 43552^T) 间的同源性为 99.2%。形态、生理学特性、细胞化学组分、基因组 DNA (G + C) mol% 含量测定的结果表明该菌与无色杆菌属的典型特征相符, 应归为无色杆菌属, 但其分类地位需要通过与近缘的无色杆菌属相关典型种的 DNA-DNA 杂交才能最后确定。本研究所用的分菌方法很难分到革兰氏阴性菌, 因此只有较为特殊的革兰氏阴性菌才能被分离到, 我们研究的两个革兰氏阴性菌就发现了一个新属, 证明了我们选择菌种思路的正确。已知革兰氏阴性菌多产生多肽类抗生素, 很少有产生聚酮类生理活性物质的报道。我们的工作不仅表明了革兰氏阴性菌物种的多样性, 而且表明这类菌也具有产生聚酮类化合物的潜力, 为微生物资源学研究拓展了另一个新的菌源。

我们从云南各地采集了一系列的土壤样品, 设计尽可能多的培养基进行细菌、放线菌的分离和聚酮类化合物生物合成途径基因筛选, 并对其生物多样性进行了初步研究。上述结果表明我国的云南省多样的生态环境孕育了大量的未知微生物, 如何从普通环境中分离、发现和鉴定未知微生物并将其资源化是微生物资源学工作者亟待研究的重要课题。

国外普遍采用纯培养技术和分子生物学、化学分析手段相结合的综合分析方法^[22]。我们根据国内研究的实际情况, 避开使用昂贵的大型实验装备, 利用实验室建立的快速、高效的放线菌基因组 DNA 提取技术^[12]和聚酮类化合物生物合成途径基因快速筛选技术^[6, 7], 将新物种的挖掘和新药筛选有机地结合起来, 为菌种、基因和化合物之间关系的探索开辟了一条新的途径。我们鉴定的 10 个菌株分别属于 7 个科, 8 个属, 其中发现新属两个, 新种 6 个。这种新物种发现的概率是比较高的, 表明我们所建立、使用的研究体系的有效性。多样的新的微生物菌种资源是进行有效新药筛选的前提和基础, 目前这批聚酮类化合物生物合成途径基因阳性菌株正在进行发酵产物新生理活性物质评价研究。

参 考 文 献

- [1] 山田晴宇. 放线菌学分野最近的话题. 生物工学会志, 1998, 76: 58 - 81.
- [2] Omura S. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J Indust Microbiol*, 1992, 10: 135 - 156.
- [3] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143 - 169.
- [4] 陈代杰. 微生物药学. 华东理工大学出版社, 1999, 14.
- [5] William R S. *Biotechnology of Antibiotics*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997.
- [6] 徐平, 李文均, 张永光, 等. 产生大环聚酮类天然产物放线菌的分子筛选研究. 中国抗生素杂志, 2003, 28(6): 321 - 325.
- [7] 徐平, 李文均, 高慧英, 等. 产生芳香环聚酮类天然产物放线菌的分子筛选研究. 中国抗生素杂志, 2005, 30(3): 134 - 138.
- [8] Gordon R E. Some criteria for the recognition of *Nocardia madurae* (Vincent) Blanchard. *J Gen Microbiol*, 1966, 45: 355 - 364.
- [9] Goodfellow M. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J Gen Microbiol*, 1971, 69: 33 - 80.
- [10] O'Brien M, Colwell R. Characterization tests appropriate for numerical taxonomy studies. In: Colwell R R, Grigorova R. ed. *Current Methods for Classification and Identification of Microorganisms*. London: Academic Press, 1987, 69 - 104.
- [11] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, 29: 319 - 322.
- [12] 徐平, 李文均, 姜成林, 等. 微波炉法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82 - 84.
- [13] 李文均, 徐丽华, 姜成林, 等. 新疆青海中度嗜盐放线菌生物多样性初步研究. 微生物学报, 2004, 44(1): 1 - 7.
- [14] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped Blast and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 3389 - 3402.

- [15] Tatusova T A, Madden T L. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **174** :247 - 250.
- [16] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W :improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** :4673 - 4680.
- [17] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotides sequences. *J Mol Evol*, 1980, **16** :111 - 120.
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method :a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4** :406 - 425.
- [19] Xu P, Li W, Jiang C, *et al.* *Streptomyces hebeiensis* sp.nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, **54** :727 - 731.
- [20] Muramatsu Y, Ohnuki T, Miyazawa Ishii M, *et al.* A-503083 A, B, E and F, novel inhibitors of bacterial translocase I, produced by *Streptomyces* sp. SANK 62799. *J Antibiot*, 2004, **57** :639 - 646.
- [21] Xu P, Li W, Tang S, *et al.* *Naxibacter alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Oxalobacteraceae isolated from China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55** :1149 - 1153.
- [22] Oren A. Diversity of halophilic microorganisms : Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Indust Microbiol & Biotech*, 2002, **28** :56 - 63.

Study on biodiversity of type I & II polyketide synthesis genes positive microorganisms

XU Ping^{1,2} LI Wen-jun^{1*} GAO Hui-ying² XU Li-hua¹ JIANG Cheng-lin¹

(¹ Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology and Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China)

(² New Drug Research & Development, North China Pharmaceutical Corp., Shijiazhuang 050015, China)

Abstract: Some soil samples were collected from different places in Yunnan Provinces, China. 876 bacteria or actinomycete strains were isolated using Glucose-Peptone-Yeast extract agar, Starch-Casein agar and Glycerol-Asparagine agar with these soil samples, of which about 100 strains belong to genus *Streptomyces* and the others belong to rare actinomycetes or bacteria. With polyketide synthesis gene screening, 75 strains were picked up as type I & II polyketide synthesis gene positive strains. Then 10 strains were chosen for 16S rDNA amplification and systematic analysis based on comparing results with their anti-bacteria activity, morphology, and physiological characteristics analysis. They were classified to be at least 7 families and 8 genera, such as genus *Streptomyces* of the family *Streptomycetaceae*, two genera *Streptosporangium* and *Nonomuraea* of the family *Streptosporangiaceae*, genus *Mycobacterium* of the family *Mycobacteriaceae*, genus *Nocardia* of the family *Nocardiaceae*, genus *Achromobacter* of the family, another two strains belong to the suborder *Micrococcineae* and the family *Oxalobacteraceae*, respectively. Eight of them were classified into six potential novel species and two new genera with polyphasic taxonomic methods. The results showed that designing new strategies for isolation and identification of microorganisms from natural environments was the key step to exploit microbial resources.

Key words: Polyketide synthesis product, Molecular Screening, *Actinomycetes*, Biodiversity

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719601); National Natural Science Foundation of China (30270004); Yunnan Provincial Natural Science Foundation (2004 C0002Q)

* Corresponding author. Tel 86-871-5033790; Fax 86-871-5173878; E-mail: wjli@ynu.edu.cn, liaact@hotmail.com

Received date 04-19-2005

2006 年《微生物学报》将试行开通‘稿件远程处理系统’

2006 年起,《微生物学报》将采用‘稿件远程处理系统’,全面试行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站 <http://www.im.ac.cn/journals> 进入“稿件远程处理系统”进行投稿和查询。在开始运行时,不通畅的情况可能会时有发生,敬请大家谅解!在使用编辑软件的同时,本刊编辑部还将采用现行的操作方式,以确保与作者和专家沟通顺利。

欢迎向《微生物学报》投送优质稿件! 欢迎提出宝贵意见!