

埃莎霉素 I 组分高含量、高产基因工程菌 WSJ-IA 及其原株的鉴定

戴剑澍¹ 林灵^{1,2} 武临专¹ 王以光^{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. 东北农业大学 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 【目的】利用调节基因 *acyB2* 激活异戊酰基转移酶(*ist*)基因表达的特点, 将 *ist* 与调节基因 *acyB2* 在异戊酰螺旋霉素(埃莎霉素) I 产生菌菌株中共表达, 获得埃莎霉素 I 单组分的高含量及高产菌株 WSJ-IA。对其及原始螺旋霉素产生菌菌株 *Streptomyces spiramyceticus* F21 进行了初步鉴定。【方法】从形态学、培养和生理生化特征、细胞壁化学组成、16S rRNA 基因序列、5 个看家基因(*atpD*、*gyrB*、*rpoB*、*recA* 和 *trpB*)蛋白分析和系统发育树构建等方面对该菌株及其原株进行了鉴定。【结果】两株菌在形态培养特征、生理生化特征、细胞壁化学组成、16S rRNA 基因序列和 5 个看家基因蛋白水平基本一致, 在系统发育树分析中同处在一个分支中。而在 16S rRNA 基因序列和 5 个看家基因蛋白水平在系统发育上它们均与已知相近菌株处于不同的分支上, 并且与不同基因的相近菌株各有不同, 其中无一报道产生螺旋霉素。【结论】*Streptomyces spiramyceticus* F21 可能是一个产生螺旋霉素的链霉菌新种, 16S rRNA 基因序列和 5 个看家基因蛋白序列分析可以作为埃莎霉素 I 基因工程菌生产过程中进行鉴别的分子标志。

关键词: 埃莎霉素(异戊酰螺旋霉素) I, *Streptomyces spiramyceticus* F21, 16S rRNA 基因, 多相分类

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA02Z230); 科技部“重大新药创制”科技重大专项(No. 2008ZX09101-047)

*通讯作者: Tel: 86-10-63038137; 信箱: wangyh456@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-09-19; 接受日期: 2011-11-12

Identification of engineered strain WSJ-IA with high proportion and high production of isovalerylspiramycin I and its original parent strain *Streptomyces spiramyceticus* F21

DAI Jian-Lu¹ LIN Ling^{1,2} WU Lin-Zhuan¹ WANG Yi-Guang^{1*}

(1. Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, Ministry of Health, Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS & PUMC, Beijing 100050, China)

(2. Northeast Agricultural University, College of Life Science, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] A *Streptomyces spiramyceticus* WSJ-IA strain (herein designated as an isomycin I producer) with high proportion and high production of isovalerylspiramycin I was obtained by cloning and expression of *acyB2* (Regulatory gene) and *ist* (Isovaleryltransferase gene) into an isovalerylspiramycin I producing strain. Taxonomic studies were carried out to define the engineered isomycin I producer and its original parent strain *Streptomyces spiramyceticus* F21. **[Methods]** 16S rRNA gene sequencing and five housekeeping genes (*atpD*、*gyrB*、*rpoB*、*recA* and *trpB*) coding proteins sequencing combining the traditional taxonomic studies, such as morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics were performed for both strains. **[Results]** The *Streptomyces spiramyceticus* WSJ-IA and *Streptomyces spiramyceticus* F21 share highly similar phenotypes and 16S rRNA gene sequences as well as in the phenogenetic analysis of the five housekeeping gene protein sequences. While their 16S rRNA gene sequences and the five housekeeping gene protein sequences phylogenetically were located in different clades comparing with all other strains so far described. And the closely related strains with each gene coding protein were also different, none of them was as spiramycin producer reported. **[Conclusion]** Our results suggested that *Streptomyces spiramyceticus* F21 was possible a new *Streptomyces* sp. of spiramycin producer. 16S rRNA gene sequence and five housekeeping genes (*atpD*、*gyrB*、*rpoB*、*recA* and *trpB*) coding proteins sequences could be served as genetic markers in identifying the engineered strain's stability in long term of the commercial production.

Keywords: Isomycin (Isovalerylspiramycin) I, *Streptomyces spiramyceticus* F21, 16S rRNA gene, Polyphasic taxonomy

埃莎霉素(异戊酰螺旋霉素) I 是一个利用基因工程技术创制的必特螺旋霉素(原名生技霉素)中单一组分的新抗生素。

必特螺旋霉素是通过将 *Streptomyces mycarofaciens* 中的异戊酰基转移酶基因(*ist*) 在螺旋霉素产生菌 *S. spiramyceticus* F21 中表达产生的一组新型抗生素^[1-2]; 和螺旋霉素相比其末端糖基的4"羟基被异戊酰基酯化^[3] (图 1), 其相应的也可以

分为3个组分, 其中组分 I 又称为埃莎霉素 I。

本实验室采用的螺旋霉素产生菌是由本所于1982年从甘肃永昌县土壤中分离得到的, 其形态及培养特征与国外报道的螺旋霉素产生菌 *S. ambofaciens* 相比, 有明显的不同; 与其他文献报道的近似种也不尽相同, 故命名为螺旋霉素链霉菌 *S. spiramyceticus* L799^[4]。螺旋霉素含有3个组分: 螺旋霉素 16元环上3位的羟基(组分 I)可以

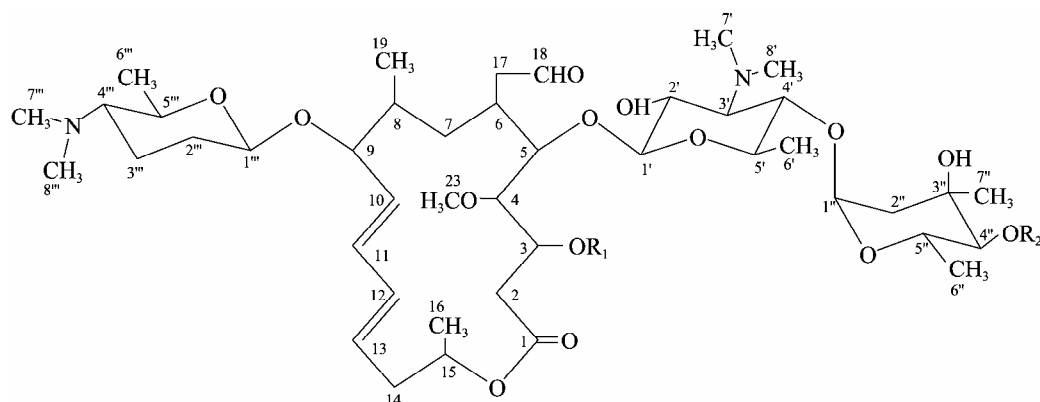


图 1 必特螺旋霉素结构

Fig. 1 Chemical structure of bitespiramycin

Note: $R_1=H$, Isovalerylspiramycin I; $R_1=COCH_3$, Isovalerylspiramycin II; $R_1=COCH_2CH_3$, Isovalerylspiramycin III; $R_2=COCH_2CH(CH_3)_2$.

被酰基化形成乙酰基(组分 II)或丙酰基(组分 III)。药效学实验结果表明必特螺旋霉素对革兰氏阳性菌有较强的活性, 尤其对肺炎链球菌、肺炎支原体、衣原体活性强, 对红霉素耐药菌(特别是产 β -内酰胺酶革兰氏阳性菌)、流感杆菌、军团菌、产气荚膜梭菌有抗菌活性; 与同类药没有完全交叉耐药性。它有较强的亲脂性, 口服吸收快, 组织渗透性强, 分布广, 体内维持时间长, 有较好的抗生素后效应^[5-6]。已完成的必特螺旋霉素三期临床试验研究结果显示其具有良好的疗效和安全性, 目前正在申报国家一类新药证书。

异戊酰螺旋霉素各单组分的抗菌活性与异戊酰螺旋霉素 I、II、III 三个组分的混合物没有显著差异(专利申请号: 201010119745.1、201010119758.9、201010119761.0)。为了简化生产工艺和质量控制标准以及便于创制注射液剂型, 本实验室此前利用基因敲除技术, 在必特螺旋霉素产生菌 WSJ-I 中, 通过阻断 3-O-酰基转移酶基因, 构建了只产生异戊酰螺旋霉素 I 组分的菌种 WSJ-2^[7-8]。但是, 该菌种发酵单位很低, 不利于进行规模化生产。本实验室随后利用耐热链霉菌调节基因 *acyB2* 激活 *carE* (*ist*) 基因表达的特点^[9], 将 *ist* 和连锁基因 *acyB2* 在 WSJ-2 菌株中共表达, 获得了必特螺旋霉素单组分-埃莎霉素 I

的高含量及高产菌株 WSJ-IA^[10]。其发酵单位比 WSJ-2 菌株提高 4.14 倍, 发酵液粗提取物中埃莎霉素 I 组分含量提高 1.7 倍。由于该菌种在今后开发为单组分有效新抗生素中具有明显的潜在能力, 同时, 由于当时历史条件下技术手段有限, 其出发菌株螺旋霉素产生菌 *S. spiramyceticus* F21 在系统发育中的地位也不清楚, 再加上从原始宿主菌到构建获得埃莎霉素 I 产生菌 WSJ-IA 的过程经过了多次基因工程及遗传操作, 包括航天育种^[11]和微波诱变^[12], 因此有必要利用近年来发展的 16S rRNA 基因及看家基因(*atpD*、*gyrB*、*rpoB*、*recA* 和 *trpB*)等多相性分子生物学技术^[13], 重新审视螺旋霉素链霉菌 F21 及 WSJ-IA 在分类中的地位及稳定性, 本研究对链霉菌基因工程菌株遗传操作及今后长期大规模生产中菌株分子标志鉴定的应用有重要的理论及实际意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源: 螺旋霉素链霉菌 *Streptomyces spiramyceticus* F21 本研究所保存(保藏号 CPCC 200513)。螺旋霉素链霉菌 *Streptomyces spiramyceticus* WSJ-IA 由本实验室构建。

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* 酶, TaKaRa; PCR mix 及 DNA Marker III, 广州东盛生物科技有限公司; PCR 扩增仪, Bio-Rad/Thermo Scientific; 凝胶成像仪 Alpha 2200, 安莱生命科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 形态特征: 将链霉菌菌种在高氏 1 号培养基上 28 °C 培养 14–21 d。用光学显微镜和扫描电镜观察菌丝及孢子的表面特征。

1.2.2 培养特征: 将链霉菌接种到察氏培养基、葡萄糖天冬素培养基、甘油天冬素培养基、无机盐淀粉培养基、酵母膏-麦芽汁培养基、燕麦粉培养基、高氏一号培养基、桑塔氏培养基等 8 种培养基上 28 °C 培养 14 d 观察其培养特征, 记录气丝、基丝、色素情况等。

1.2.3 生理生化特征测定: 生理生化实验方法参照《放线菌分类及鉴定》^[14]。测定其碳源利用、牛奶反应、硝酸盐还原、酪氨酸酶、淀粉酶等生理生化特征。

1.2.4 细胞壁化学组成分析: 采用王平^[15]改进的快速薄层层析(TLC)方法进行全细胞水解液氨基

酸及糖型分析。

1.2.5 DNA 提取、PCR 扩增和测序: 菌株总 DNA 的提取采用微波法^[16]。PCR 扩增引物见表 1, 由北京赛百盛生物技术有限公司合成。采用 20 μL 反应体系。基因扩增程序: 96 °C 1 min; 96 °C 30 s, 50 °C–66 °C 30 s, 72 °C 1–1.5 min, 共 28 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经凝胶回收纯化后由北京中美泰和生物技术(北京)有限公司测序。

1.2.6 系统发育分析: 根据测序结果, 在 NCBI 上使用 BLAST 程序与 GenBank 数据库中已有序列进行同源性比较分析, 用 ClustalX 1.8 进行多序列比对后, 采用 MEGA 3.1 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

2 结果

2.1 形态特征

两株菌在高氏 1 号培养基上培养, 基内菌丝生长良好, 气生菌丝不丰富, 孢子丝柔曲、钩状或螺旋形。孢子柱形和椭圆形。其孢子丝的扫描电子显微镜观察结果如图 2 所示。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Oligonucleotide sequences used for PCR and sequencing

引物 Primers	引物序列 Oligonucleotide sequences (5'→3')*
16S rDNAF	GGTTACCTTGTACGACTT
16S rDNAR	GTCGCGCACTTCACCAAGGGCAAGGTGTTCAACACC
atpDPF	GTGAAGTCTGGCGACGTGGGTGTTCTGGGACAGGAA
atpDPR	GAGGTCGTGCTGACCGTGCTGCACGCGGGCGGCAAGTTCGC
gyrBPF	GTTGATGTGCTGGCCGTCGACGTCGGCGTCCGCCAT
gyrBPR	GAGCGCATGACCACCCAGGACGTCTGAGGC
rpoBPF	CCTCGTAGTTGTGACCCCTCCACGGCATGA
rpoBPR	CCGCRCTCGCACAGATTGAACGSCAATTC
recAPF	GCSAGGTCGGGGTTGTCCTTSAGGAAGTTGCG
recAPR	GCSAGGTCGGGGTTGTCCTTSAGGAAGTTGCG
trpBPF	GCGCGAGGACCTGAACCACACCGGCTCACACAAGATCAACA
trpBPR	TCGATGGCCGGGATGATGCCCTCGGTGCGCGACAGCAGGC

Note: *: R=A or G ; S=G or C.

2.2 培养特征

S. spiramyceticus F21 和 WSJ-IA 菌株在 8 种培养基上的培养特征见表 2。

两株菌在酵母膏-麦芽汁培养基、燕麦粉培养基、高氏一号培养基上生长最好, 葡萄糖天冬素培养基上生长适中, 察氏培养基、甘油天冬素培养基、无机盐淀粉培养基、桑塔氏培养基上生长

稍差; 它们在各培养基上均无可溶性色素产生; 在不同培养基上气生菌丝主要呈现白色和豆汁白; 基内菌丝则呈现出莲子白、豆汁黄、莲子黄等不同的颜色。

2.3 生理生化特征

两株菌生理生化特征的实验结果见表 3。两株菌牛奶酪化、淀粉水解、硝酸盐还原反应均为

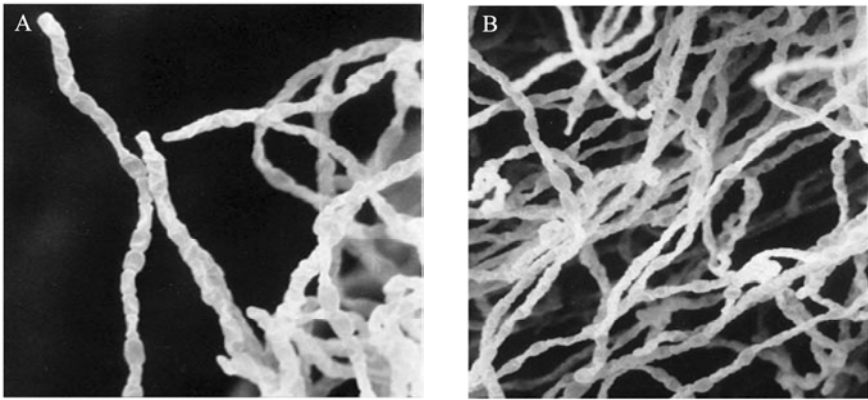


图 2 *S. spiramyceticus* F21 (A)和 WSJ-IA (B)孢子的扫描电镜图(×5 000)
Fig. 2 Scanning electron micrograph of the spores of the strain of *S. spiramyceticus* F21 (A) and WSJ-IA (B) grown on Gause's medium for 14 d at 28 °C (×5 000)

表 2 <i>S. spiramyceticus</i> F21 (A)和 WSJ-IA (B)菌株的培养特征						
Table 2 The culture characteristics of the strains <i>S. spiramyceticus</i> (A) and WSJ-IA (B) in different media						
培养基 Media	气生菌丝 Aerial mycelium		基内菌丝 Substrate mycelium		可溶性色素 Soluble pigment	
	A	B	A	B	A	B
察氏培养基 Czapek's medium	无气丝	极少, 白色	莲子白	莲子白	无	无
葡萄糖天冬素培养基 Glucose asparagine agar	极少, 豆汁白	极少, 豆汁白	豆汁黄	豆汁黄	无	无
甘油天冬素培养基 Glycerol asparagine agar (ISP5)	无气丝	无气丝	莲子黄	莲子黄	无	无
无机盐淀粉培养基 Mineral salt starch agar	无气丝	无气丝	浅土黄色	浅土黄色	无	无
酵母膏-麦芽汁培养基 Yeast extract-malt agar (ISP2)	白色	白色	土褐色	土褐色	无	无
燕麦粉培养基 Oat agar (ISP3)	白色	白色	象牙黄	象牙黄	无	无
高氏一号培养基 Gause's synthetic agar	白色	极少, 乳白色	浅土黄色	浅土黄色	无	无
桑塔氏培养基 Santa's agar	无气丝	无气丝	栗棕色	栗棕色	无	无

表 3 *S. spiramyceticus* F21 (A)和 WSJ-IA (B)菌株的生理生化特征
Table 3 Physiological and biochemical characteristic of the strain *S. spiramyceticus* F21 (A) and WSJ-IA (B)

试验项目 Test item	结果 Result		试验项目 Test item	结果 Result	
	A	B		A	B
葡萄糖 Glucose	+	+	水杨苷 Salicin	+	+
甘露糖 Mannose	+	+	苦杏仁苷 Amygdalin	-	-
甘露醇 Mannitol	-	-	卫矛醇 Galactitol	-	-
乳 糖 Lactose	-	-	赤藓醇 Erythritol	-	-
半乳糖 Galactose	+	+	肌 醇 Inositol	-	-
山梨糖 Sorbose	-	-	甘 油 Glycerol	+	+
山梨醇 Sorbitol	-	-	淀 粉 Starch	+	+
麦芽糖 Maltose	-	+	糖 原 Glycogen	+	+
蔗 糖 Sucrose	-	-	葡萄糖酸钠 Sodium gluconate	+	+
蜜二糖 Melibiose	-	-	苹果酸钠 Sodium malate	+	+
松三糖 Melezitose	-	-	琥珀酸钠 Sodium succinate	+	+
鼠李糖 Rhamnose	-	-	丙二酸钠 Sodium malonate	W	W
棉籽糖 Raffinose	-	-	酒石酸钠 Sodium tartrate	-	-
海藻糖 Trehalose	+	+	明胶液化 Gelatin liquefaction	-	-
果 糖 Fructose	-	-	牛奶胨化 Milk peptonization	+	+
木 糖 Xylose	-	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+
核 糖 Ribose	-	-	酪氨酸酶 Tyrosinase	-	-
菊 糖 Inulin	-	-	淀粉酶 Amylase	+	+

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应; W: 弱.

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction; W: Weak.

阳性; 明胶液化及酪氨酸酶反应为阴性; 能利用葡萄糖、甘露糖、半乳糖、麦芽糖、海藻糖、水杨苷、甘油、淀粉、糖原、葡萄糖酸钠、苹果酸钠、琥珀酸钠、丙二酸钠、酒石酸钠等; 不能利用甘露醇、乳糖、山梨糖、蔗糖、蜜二糖、松三糖、鼠李糖、棉籽糖、果糖、木糖、核糖、菊糖、苦杏仁苷、卫矛醇、赤藓醇、肌醇等。 *S. spiramyceticus* F21 除不能利用麦芽糖以外, 其它生理生化特征与 WSJ-IA 一致。

2.4 细胞壁化学成分分析

对两株菌的全细胞糖型和细胞壁氨基酸组分分析结果表明, 细胞水解液中均检测到葡萄糖, 未检测到特征性糖, 糖型 C; 细胞壁氨基酸中均含有甘氨酸和 LL-二氨基庚二酸(LL-DAP), 符合链霉菌的化学分类细胞壁 I 型特性。

2.5 16S rRNA 基因序列分析及其系统进化树的建立

S. spiramyceticus F21 和 WSJ-IA 的 16S rRNA 基因序列全长分别为 1 453 bp 和 1 394 bp, GenBank 收录号分别为 JN671903 和 JN671904。用 ClustalX

软件结合 MEGA 软件采用 Neighbor-Joining 法构建以 16S rRNA 全序列为基础的系统发育树, 用 1 000 次抽样计算 Bootstrap analysis 值, 构建系统发育树如图 3 所示。BLAST 分析显示 *S. spiramyceticus* F21 和 WSJ-IA 的 16S rRNA 基因序列相似度达到 99.9%, 在系统进化树上处于同一分支; 与它们最相近的菌株有 *S. chryseus*、*S. helveticus*、*S. agglomeratus*、*S. flavidovirens*、*S. albidochromogenes*, 其中与 *S. spiramyceticus* F21 的同源性均为 99.2%, 而与 WSJ-IA 菌株的同源性分别为 99.7%、99.3%、99.4%、99.4% 和 99.4%。

2.6 基于看家基因部分序列的系统发育研究

利用黄英等^[13]设计的引物对 *S. spiramyceticus* F21 和 WSJ-I 的 5 个看家基因(*atpD*、*gyrB*、*rpoB*、*recA*、*trpB*)进行了分析。 *atpD* 编码膜蛋白 ATP 合成酶 β 亚基, *gyrB* 基因编码 DNA 促旋酶(DNA gyrase)的 B 亚基, *rpoB* 编码 RNA 聚合酶 β 亚基, *recA* 编码 RecA 蛋白, *trpB* 基因编码色氨酸合成酶。5 个看家基因序列分析长度及两株菌的同源性汇总在表 4 中。

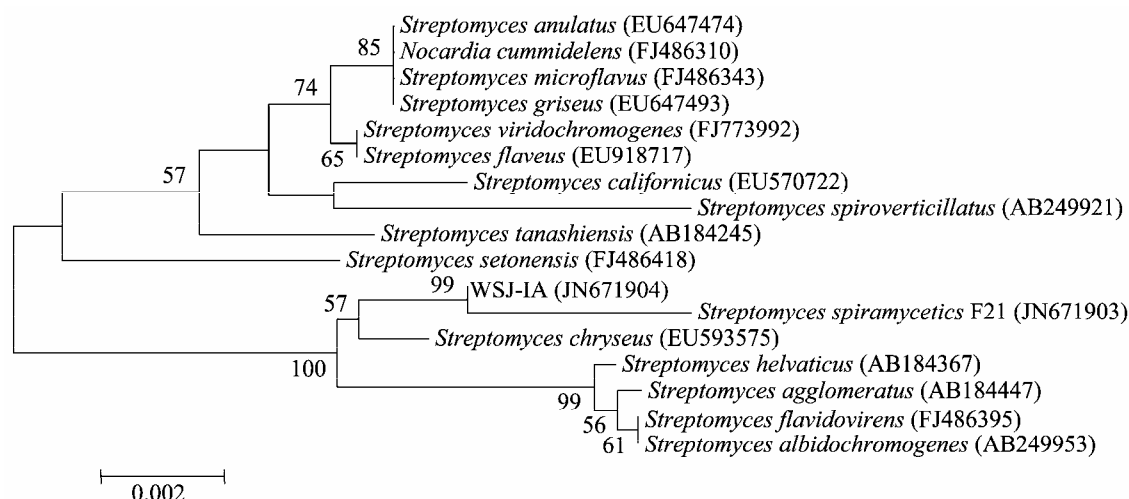


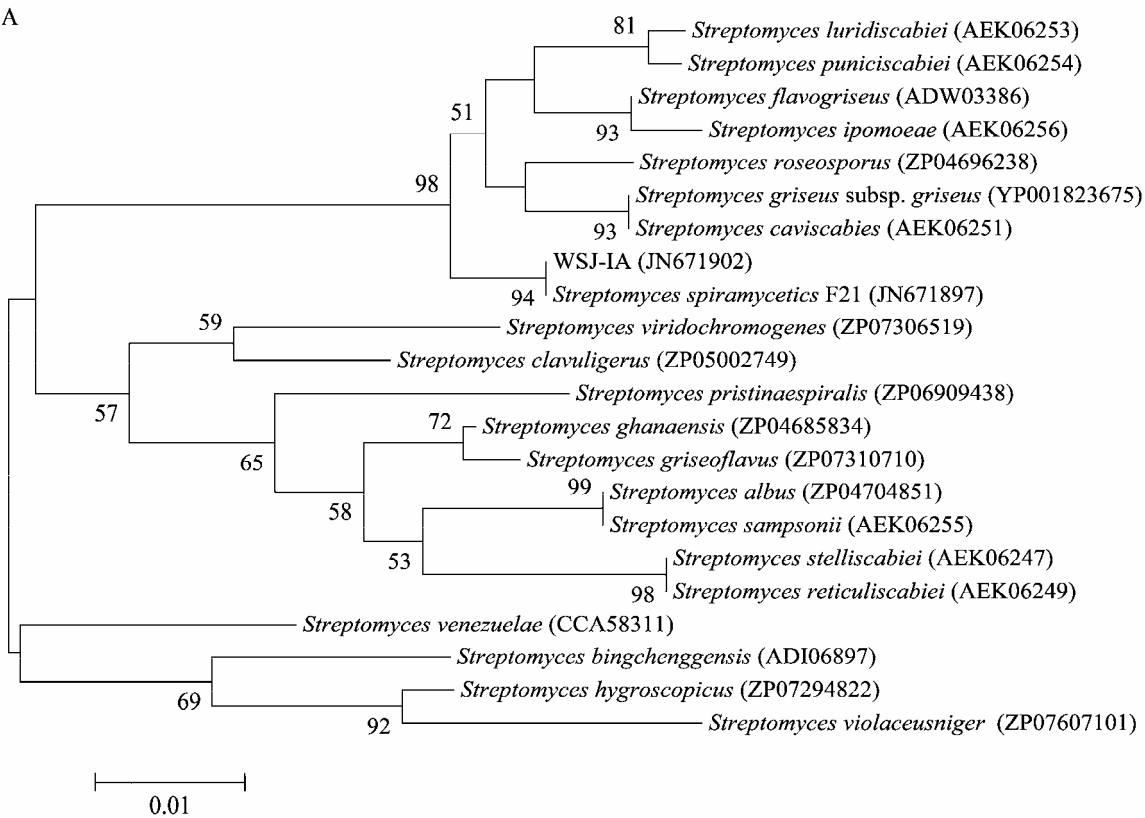
图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 *S. spiramyceticus* F21 和 WSJ-IA 的系统发育树

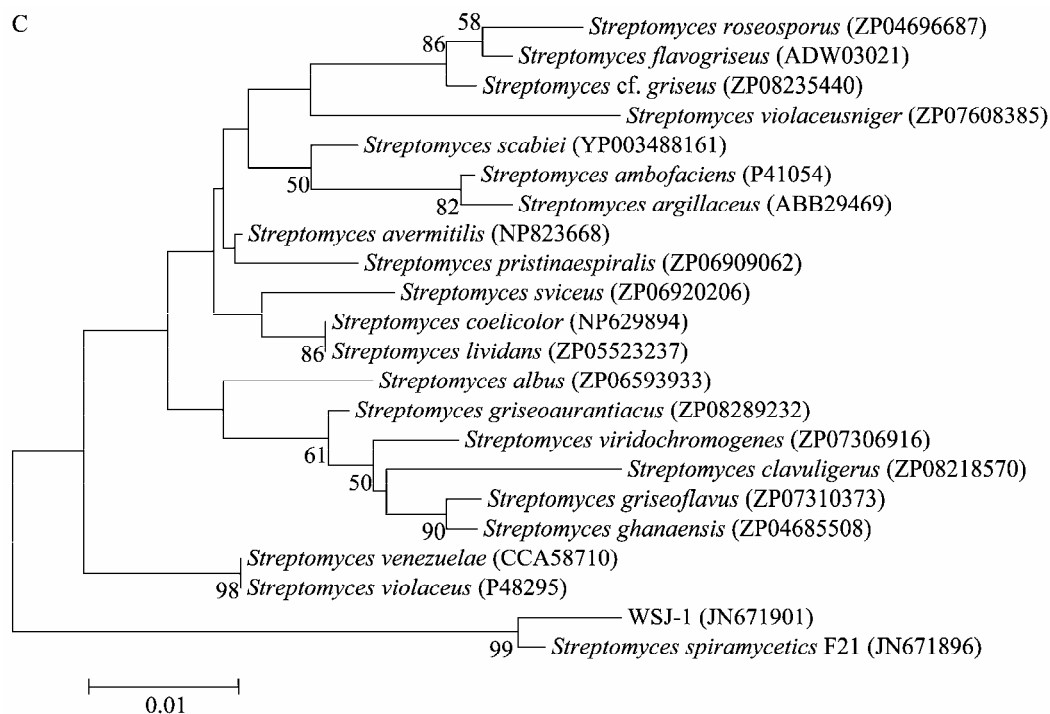
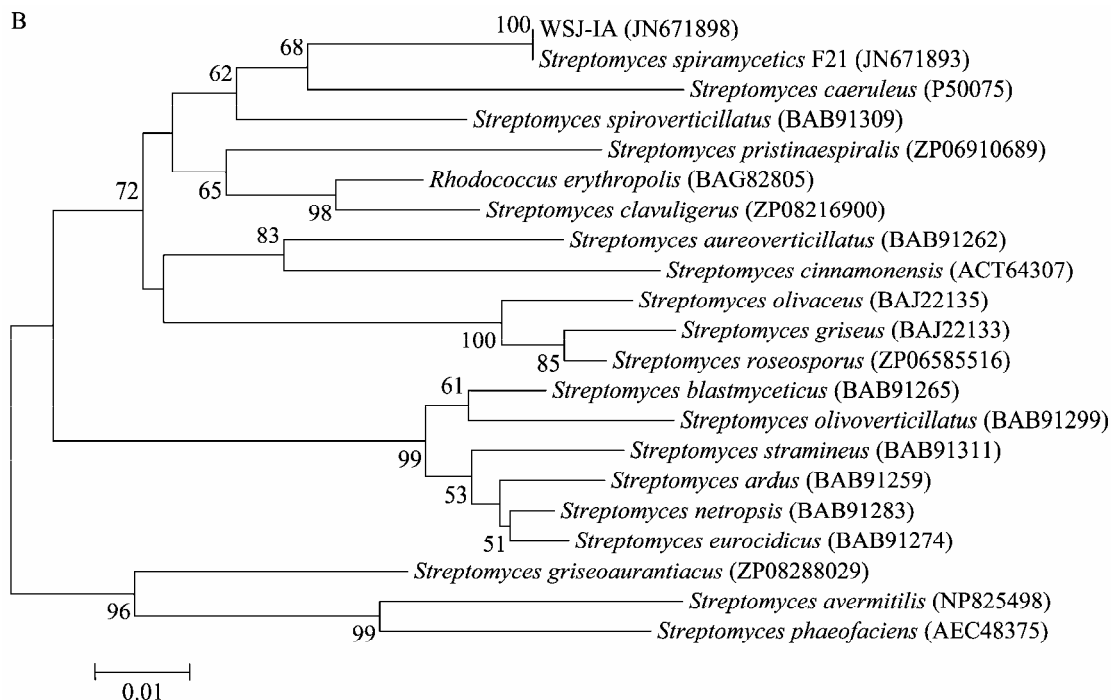
Fig. 3 Phylogenetic tree based on the polygenetic analysis of 16S rRNA gene sequences showing the position of strains *S. spiramyceticus* F21 and WSJ-IA

Note: The tree was evaluated by bootstrap analysis of the neighbor-joining method based on 1 000 resamplings, only values above 50% are shown. The numbers in parentheses are accession numbers of 16S rRNA gene sequences in GenBank. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position.

5 个看家基因在蛋白水平与已知菌序列经 BLASTp 分析, 选取数据库蛋白序列同源性较高的菌株, 用 ClustalX 软件结合 MEGA 软件采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 用 Bootstrap analysis 方法评估系统发育树, 如图 4 所示。抽样 1 000 次得到相应的置信值标于系统发育树的分支点上。测序结果显示, 菌株 *S. spiramyceticus* F21 和 WSJ-IA 的 *atpD* 基因编码蛋白序列与 *S. caviscabies*、*S. griseus* subsp. *griseus*、*S. roseosporus*、*S. flavogriseus*、

基因 Gene	序列长度 Sequence length (bp)		同源性 Identity (%)
	<i>S. spiramyceticus</i> F21	WSJ-IA	<i>S. spiramyceticus</i> F21/WSJ-IA
<i>atpD</i>	600	680	99.8
<i>gyrB</i>	1 173	1 177	100
<i>rpoB</i>	871	870	99.7
<i>recA</i>	854	701	99.6
<i>trpB</i>	700	611	100





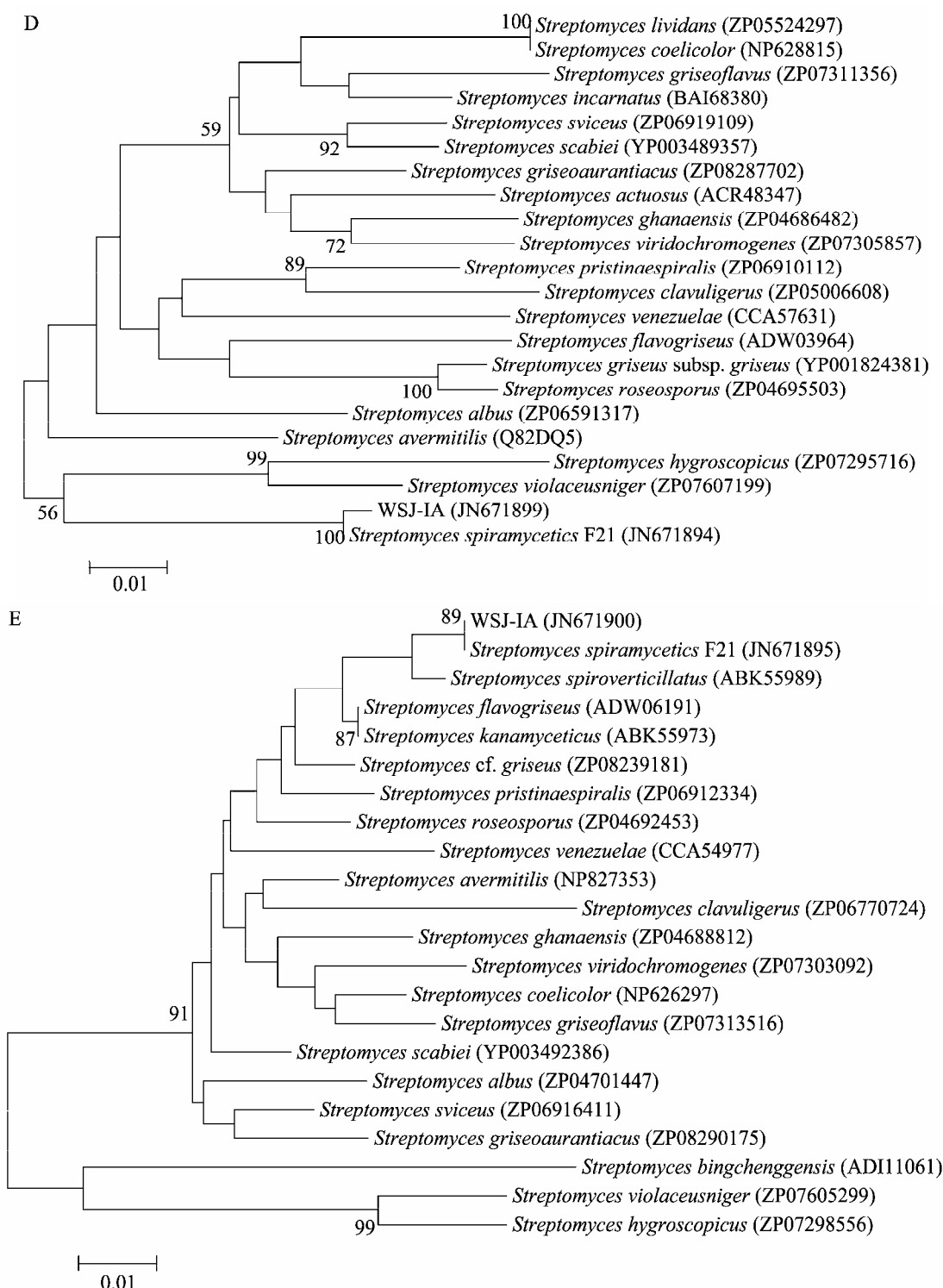


图 4 基于看家基因编码蛋白序列构建的菌株 *S. spiramyceticus* F21 和 WSJ-IA 的系统发育树
 Fig. 4 Phylogenetic tree based on the pologenetic analysis of housekeeping genes protein sequences showing the position of strains *S. spiramyceticus* F21 and WSJ-IA

Note: The tree was evaluated by bootstrap analysis of the neighbor-joining method based on 1 000 resamplings, only values above 50% are shown. The numbers in parentheses are accession numbers of housekeeping genes protein sequences in GenBank. The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position. A: *atpD*; B: *gyrB*; C: *rpoB*; D: *recA*; E: *trpB*.

S. luridiscabiei 的同源性均为 98.0% 和 98.2%; *gyrB* 基因编码的蛋白序列与 *S. spiroverticillatus*、*S. caeruleus* 的同源性均为 93.8% 和 91.1%; *rpoB* 基因编码的蛋白序列与 *S. violaceusniger* 的同源性分别为 92.7% 和 92.1%, 与 *S. hygroscopicus* 的同源性分别为 91.0% 和 90.3%; *recA* 基因编码的蛋白序列与 *S. venezuelae*、*S. violaceus* 的同源性分别为 96.1% 和 95.6%; 两株菌 *trpB* 基因编码的蛋白序列与 *S. spiroverticillatus* 的同源性均为 98.9%。

3 讨论

rRNA 基因是原核生物的看法基因, 其中 16S rRNA 基因约 1 500 bp, 大小适中, 采用通用引物经 PCR 扩增测序, 序列的差异可区别不同菌属, 因而被广泛应用于细菌的分类与鉴定上, 近年来链霉菌 16S rRNA 基因序列大量被公布, 极大地促进了链霉菌分子分类学工作, 但是由于 16S rRNA 基因的进化速度太慢, 导致难于区分近缘种或者不能分辨它们的进化关系, 链霉菌属种间 16S rRNA 基因序列的相似性太高, 使之只适合属或属以上水平的鉴定。为弥补 16S rRNA 基因分析的缺点, 人们开始尝试使用其他不同的看法基因进行原核生物的系统发育分析^[13,17-19]。

atpD 编码膜蛋白 ATP 合成酶 β 亚基; *gyrB* 编码 DNA 促旋酶(DNA gyrase) 的 B 亚基; *rpoB* 编码 RNA 聚合酶 β 亚基, 在转录中负责 RNA 合成; *recA* 编码的 RecA 蛋白广泛存在于各类生物中, 具有多种生物学功能, 包括参与同源 DNA 的遗传重组、激活 DNA 损伤的 SOS 修复以及诱导蛋白质抑制物的自发裂解; *trpB* 基因编码色氨酸合成酶, 这些基因编码的酶参与链霉菌初级代谢, 其基因位点在天蓝色链霉菌染色体中相距甚远, 从理论上讲没有基因连锁而发生基因交换的可

能性, 在进化中比较保守。因此采用看法基因的系统发育研究可以更有利于链霉菌属中种间的区分。

本研究通过菌种形态培养特征以及 16S rRNA 基因和看法基因(*atpD*、*gyrB*、*rpoB*、*recA* 和 *trpB*) 等多相性分子生物学技术分析, 表明 *S. spiramyceticus* F21 和由其衍生的基因工程埃莎霉素 I 产生菌 *S. spiramyceticus* WSJ-IA 在形态培养特征、生理生化特征、细胞壁化学组成、16S rRNA 基因序列和 5 个看法基因蛋白水平基本一致, 在系统发育树分析中同处在一个分支上, 说明由宿主菌到基因工程的遗传操作没有造成这些看法基因的改变, 因此这 6 个基因可以在今后大规模生产中作为基因工程菌的分子标志进行鉴定。

本研究同时表明 *S. spiramyceticus* F21 在 16S rRNA 基因和 5 个看法基因(*atpD*、*gyrB*、*rpoB*、*recA* 和 *trpB*) 在系统发育上均与已知相近菌株处于不同的分支上, 而且与不同基因相近菌株各有不同, 并且没有一个报道是产生螺旋霉素的菌种, 说明其极可能为一个产生螺旋霉素的链霉菌新种。

参 考 文 献

- [1] Shang GD, Dai JL, Wang YG. Construction and physiological studies on a stable bioengineered strain of Shengjimycin[J]. The Journal of Antibiotics, 2001, 54(1): 66-73.
- [2] 王以光, 金莲舫, 金文藻, 等. 麦迪霉素 4"-酰化酶基因的克隆及在螺旋霉素产生菌中的表达[J]. 生物工程学报, 1992, 8(1): 1-14.
- [3] Sun CH, Jiang W, Huang J, et al. Shengjimycins: a group of hybrid antibiotics, 4"-acylsipramycins[J]. Actinomycetologica, 1999, 13(2): 120-125.
- [4] 于其伟. 一株产生螺旋霉素的链霉菌新种[J]. 微生物学报, 1982, 22(1): 13-16.

- [5] 余兰香, 刘京芳, 徐晓雯, 等. 生技霉素药效学研究[J]. 四川生理科学杂志, 1998, 20(3): 30.
- [6] 孙丽文, 朱锦桃, 林赴田. 生技霉素药代动力学性能研究[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(6): 694-698.
- [7] Ma CY, Zhou HX, Li JY, et al. Construction of 4"-isovalerylspiramycin-I-producing strain by in-frame partial deletion of 3-O-acyltransferase gene in *Streptomyces spiramyceticus* WSJ-1, the bitespiramycin producer[J]. Current Microbiology, 2011, 62(1): 16-20.
- [8] Li JY, Ma CY, Wang HY, et al. On-line identification of 4"-isovalerylspiramycin I in the genetic engineered strain of *S. spiramyceticus* F21 by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(8): 1419-1424.
- [9] Arisawa A, Kawamura N, Tsunekawa H, et al. Cloning and nucleotide sequences of two genes involved in the 4"-O-acylation of macrolide antibiotics from *Streptomyces thermotolerans*[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1993, 57(12): 2020-2025.
- [10] 王以光, 武临专, 姜洋, 等. 一株异戊酰螺旋霉素 I 组分高含量、高产量基因工程菌[P]. 专利申请号: 201010237595. 4.
- [11] 王红远, 周红霞, 戴剑滢, 等. 必特霉素基因工程菌航天育种的研究[J]. 药物生物技术, 2007, 14(1): 10-13.
- [12] 戴剑滢, 李瑞芬, 武临专, 等. 新一代必特螺旋霉素基因工程菌的微波诱变[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(7): 406-410.
- [13] Guo YP, Zheng W, Rong XY, et al. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(1): 149-159.
- [14] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 268-1048.
- [15] 王平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法[J]. 微生物学通报, 1986, 13(5): 228-231.
- [16] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组DNA[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-84.
- [17] Egan S, Wiener P, Kallifidas D. Phylogeny of *Streptomyces* species and evidence for horizontal transfer of entire and partial antibiotic gene clusters[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2001, 79(2): 127-133.
- [18] Hatano K, Nishii T, Kasai H. Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly *Streptoverticillium*) species by using phenotypes, DNA-DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Katoh and Arai 1957) corrig., sp. nov., nom. rev. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(5): 1519-1529.
- [19] Kim BJ, Kim CJ, Chun J, et al. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(2): 593-598.