

产蓝色素放线菌细胞化学组分及 16S rDNA 序列分析*

崔恒林 陆 玲** 陈一楠 常 青 戴传超

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘要: 对分离自南京土壤中的一株高产水溶性蓝色素的放线菌菌株 *Streptomyces* sp. 进行了细胞化学组分及 16S rDNA 序列分析。细胞化学组分分析结果表明待测菌株的细胞壁含 LL-DAP 及甘氨酸, 全细胞水解物含葡萄糖及核糖, 全细胞脂肪酸组分主要为 14~17 碳的脂肪酸, 其中 anteiso-15 和 iso-16 为主要组分, 应归入链霉菌属。基于 16S rDNA 序列的聚类结果表明所选菌株基本分成 9 个分支, 能够产生可溶性蓝色素的菌株聚成其中两个分支, 即以 *S. coelicolor* 为代表的分支和以 *S. cyaneus* 为代表的分支, 待测菌株与 *Streptomyces indigocolor* 的相似性为 99.4%, 属于 *S. cyaneus* 分支。

关键词: 链霉菌属, 天然蓝色素, 16S rDNA 序列, 系统发育树

中图分类号: Q 939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0025-05

* 江苏省科委应用基础资助项目 (No. BJ97123)

** 联系人

收稿日期: 2000-07-11, 修回日期: 2000-09-10

CELL CHEMICAL CHARACTERISTICS AND 16S rDNA SEQUENCE ANALYSIS OF A BLUE-PIGMENT-PRODUCING STRAIN

CUI Heng-Lin LU Ling CHEN Yi-Nan CHANG Qing DAI Chuan-Cao

(College of life sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract: An actinomycetes which produced soluble blue pigment was isolated from the soil sample in Nanjing, China. Based on its cell chemical characteristics and 16S rDNA sequence we found that its cell wall contained L-di-aminopimelic acid and glycine, the whole cell hydrolysates contained glucose and ribose, whole cell contained fatty acid from C14 to C17 with 12-methyltetradecanoic (anteiso-15) and 14-methylpentadecanoic acid (iso-16) as the major components. The results shown that, it belongs to the genus *Streptomyces*. Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences indicated that all strains were clustered into 9 branches. All strains that could produce blue pigment were clustered into 2 branches, they were *S. coelicolor*, *S. cyaneus*. The isolate closely related to *Streptomyces indigocolor* with a similarity of 99.4% fell into *S. cyaneus* branch.

Key words: *Streptomyces*, Natural blue pigment, 16S rDNA sequence, Phylogenetic tree

近年来, 无毒、无致畸变、稳定性强的微生物产天然色素的开发研究越来越受到人们的重视。与 β 胡萝卜素、红曲红等天然黄、红色素相比微生物产天然蓝色素的开发研究才刚刚起步^[1,2]。在蓝色素产生菌的找寻过程中, 放线菌又成为研究工作者们关注的焦点, 其中链霉菌属就包含有多种蓝色素的产生菌。链霉菌属中这些菌又分属于不同的簇(cluster)。本文主要对本实验室分离的一株蓝色素产生菌进行了细胞化学组分分析以及基于 16S rDNA 序列的系统学研究, 以期阐明其分类地位。同时希望通过分析菌株间的亲缘关系为进一步找寻及开发有价值的微生物产天然产物提供线索。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

蓝色素产生菌 *Streptomyces* sp. 分离自南京土壤。

菌株 *Streptomyces coelicolor* AS 4.863 为中国普通微生物菌种保藏中心保藏菌株。

菌株 *Streptomyces microflavus* ACCC40027 购自中国农业科学院土壤与肥料研究所。

1.2 细胞化学组分分析

1.2.1 细胞壁类型和全细胞糖类型的分析: 参照王平^[3]的 TLC 法。

1.2.2 全细胞脂肪酸的分析: 参照戴传超^[4]的方法制备脂肪酸甲酯, 脂肪酸甲酯样品分析的仪器条件参照文献 [4] (标准品 14:0 甲酯, 16:0 甲酯, 16:1 甲酯, 18:0 甲酯, 18:1 甲酯, 18:2 甲酯, 18:3 甲酯, 均购自 Sigma 公司)。

1.3 16S rRNA 基因的序列分析

1.3.1 基因组 DNA 的提取: 参照姜成林等的方法^[5]提取基因组 DNA。

1.3.2 16S rDNA 的扩增: 用引物 primerA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 primerH (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') 扩增 16S rDNA。PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 5min, 95℃ 变性 40s, 68℃ 退火和延伸 2min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 8min。

1.3.3 16S rRNA 基因序列的测定: 以 primerA、primerH 和 primerM (5'-AAG GTT GCG CTC GTT G-3') 为测序引物, 用 310 型 ABI-PRISM 全自动测序仪测序。

1.3.4 基于 16S rDNA 的系统发育学分析: 从 GenBank 中调取链霉菌属 16 个簇 (cluster)

22 个模式菌株和类链霉菌属、异壁放线菌属、放线菌属的 3 个模式菌株的 16S rDNA 全序列用 Clustal X (1.8) 软件排序, 选择 *E. coli* 为外群, 用 MEGA 软件中的 Kimura 2-Parameter Distance 和 Neighbor-Joining 法构建系统进化树, 并计算各菌株的相似性百分比。

2 结果

2.1 细胞化学组分

2.1.1 细胞壁氨基酸和全细胞糖组分: 产蓝色素放线菌含 LL-DAP 和甘氨酸。全细胞水解液含葡萄糖和核糖。

2.1.2 全细胞脂肪酸组分: 见表 1。

表 1 蓝色素产生菌与天蓝色链霉菌、细黄链霉菌的全细胞脂肪酸相对百分含量

FA	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. microflavus</i>	<i>Streptomyces</i> sp.
iso-14:0	3.85	3.60	3.68
14:0	2.03	0	2.11
anteiso-15:0	18.21	61.97	23.23
15:0	4.67	0	5.82
iso-16:0	26.13	16.90	21.82
16:0	16.47	11.91	17.17
16:1	16.09	0	14.18
17:0	8.92	4.37	10.86
anteiso-17:0	3.62	1.25	1.15

2.2 16S rRNA 基因的扩增产物

见图 1。

2.3 16S rDNA 的序列

蓝色素产生菌的 16S rDNA 序列已向 Genbank 提交, 其登录号 (accession number) 为 AF 275257。

2.4 基于 16S rDNA 序列的聚类结果

见图 2。

3 讨论

3.1 细胞化学组分结果分析

产蓝色素菌株的细胞壁氨基酸组分含 LL-DAP 和甘氨酸, 细胞壁类型应为 I 型。全细胞水解液含葡萄糖和核糖, 糖类型应为 C 型。

表 1 的结果表明, 3 个菌株的全细胞各脂肪酸甲酯组分的保留时间均介于 2.7~6.6 min。而同时标定的脂肪酸甲酯标准品 14:0 甲酯, 16:0 甲酯, 16:1 甲酯, 18:0 甲酯, 18:1 甲酯, 18:2 甲酯, 18:3 甲酯的保留时间分别为 3.1, 4.9, 5.1, 7.7, 8.0, 8.7, 9.4 min。因此, 3 个样品中的脂肪酸组分应为 14~17 碳的脂肪酸, 与文献 [6, 7] 表明链霉菌全细胞脂肪酸主要为 14~17 碳的脂肪酸的结论一致。由于链霉菌全细胞脂肪酸主要组分为 anteiso-15 和 iso-16^[6,7]。对标准菌株 *Streptomyces coelicolor* AS 4.863, *Streptomyces microflavus* ACCC40027 全细胞各脂肪酸甲酯组分的比较分析可知, 保留时间为 3.7 min 的组分应为 anteiso-15, 保留时间为 4.5 min 的组分应为

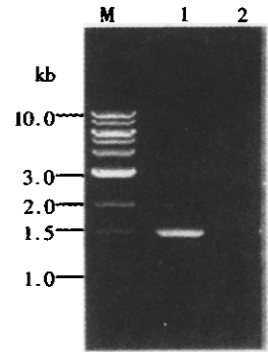


图 1 蓝色素产生菌 16S rDNA PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳 M 1kb DNA ladder, 1 蓝色素产生菌 16S rDNA 的 PCR 产物电泳带, 2 缺模板 DNA 的对照

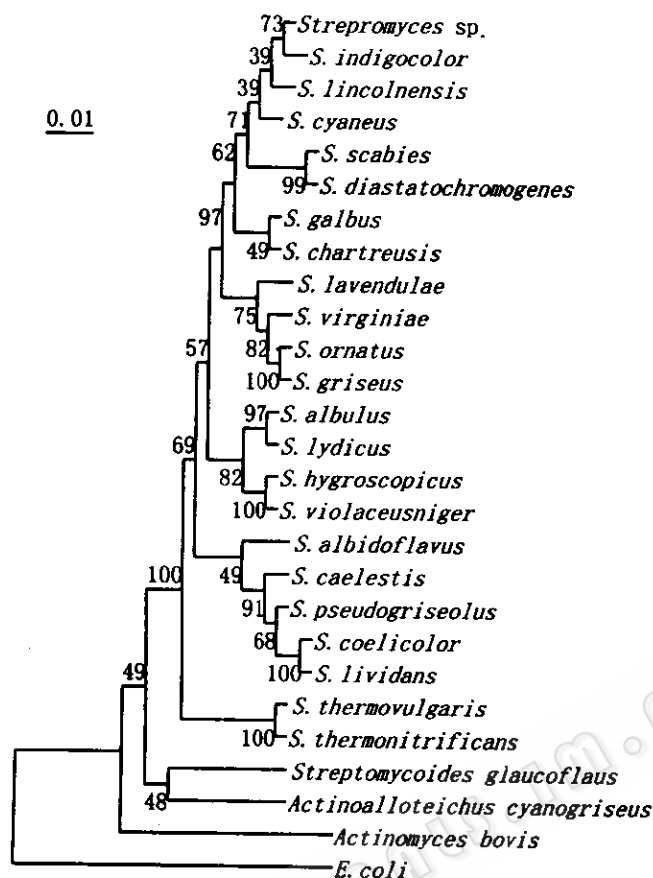


图 2 16S rDNA 全序列分析聚类结果

iso-16。而蓝色素产生菌与两标准菌株的全细胞脂肪酸组分比较一致。因此蓝色素产生菌全细胞脂肪酸主要为 14~17 碳的脂肪酸, 主要组分为 anteiso-15 和 iso-16。结合 3.1.1 中的结果, 蓝色素产生菌可归入链霉菌属 (*Streptomyces*)。

3.2 蓝色素产生菌与各标准菌株 16S rDNA 基因序列的相似性分析

蓝色素产生菌 (*Streptomyces* sp.) 与各菌株的 16S rDNA 序列的相似性为 85.5%~99.4%。其中, 与类链霉菌属 (*Streptomycoideis*)、异壁放线菌属 (*Actinobolus*)、放线菌属 (*Actinomyces*) 的 3 个模式菌株的 16S rDNA 全序列的相似性分别为 90.0%、89.7%、85.5%, 与链霉菌属 (*Streptomyces*) 的 22 个模式菌株的 16S rDNA 全序列的相似性为 95.6%

~99.4%。蓝色素产生菌 (*Streptomyces* sp.) 与同属中同样能产生可溶性蓝色素的菌株: *S. coelicolor*、*S. lividans*、*S. caelestis*、*S. indigocolor*、*S. cyaneus* 的相似性为 96.5%、96.5%、96.3%、99.4%、98.8%。

3.3 基于 16S rDNA 序列的聚类结果分析

图 2 给出了以 16S rDNA 序列为基础的聚类图, 由图 2 可以看出, 所选链霉菌属 (*Streptomyces*) 的 22 个种基本聚成 7 个主要的分支; 类链霉菌属 (*Streptomycoideis*) 与异壁放线菌属 (*Actinobolus*) 的两个菌株聚成一支, 放线菌属 (*Actinomyces*) 的一个菌株独自构成一支。

在聚类图上, 蓝色素产生菌 (*Streptomyces* sp.) 与 *S. indigocolor* 聚在一起, 并与 *S. lincolnensis*、*S. cyaneus* 聚成上述 7 个主要分支的一支。

同属中能产生可溶性蓝色素的另一类菌株 *S. coelicolor*、*S. lividans*、*S. caelestis* 与 *S. pseudogriseolus*、*S. albidoflavus* 聚成一支。同属中不产生可溶性蓝色素的其它菌株 *S. scabies* 与 *S. diastatochromogenes* 聚成一支, *S. galbus* 与 *S. chartreusis* 聚成一支, *S. lavendulae*、*S. virginiae*、*S. ornatus*、*S. griseus* 聚成一支, *S. albulus*、*S. lydicus*、*S. hygroscopicus*、*S. violaceusniger* 聚成一支, *S. thermovulgaris*、*S. thermonitrificans* 聚成一支。

在聚类图上能够产生蓝色素的菌株主要有两支,一支以 *S. cyaneus*、*S. indigocolor* 为代表,另一支以 *S. coelicolor*、*S. lividans*、*S. caelestis* 为代表。值得注意的是 *S. coelicolor* 与 *S. lividans* 在聚类图上靠得最近且相似性达 99.5%,它们在进化树上聚到一起的置信度为 100。PETER KAMPFER 等^[10]曾通过基于小型生理试验的数值分类将 *S. coelicolor*、*S. lividans* 分别归入不同的簇 (cluster)。另外, S. T. Williams^[8]等将 *S. caelestis* 与 *S. indigocolor*、*S. cyaneus* 共同归入以 *S. cyaneus* 为代表的簇 (cluster)。就本文所研究的蓝色素产生菌 (*Streptomyces* sp.) 而言,虽然它与 *S. indigocolor* 在聚类图上聚在一起且相似性达 99.4%,但其形态、生理生化特征及抗菌活性等^[2]方面与文献 [9] 记录的 *S. indigocolor* 存在较大差异。因此在种及种以下水平的分析研究中基于 16S rDNA 序列的聚类分析结果并不能与以形态、生理生化特征为分类指标的数值分类结果保持完全一致。但同时从聚类图中可以看出,所选链霉菌属 22 个菌株中能够产生蓝色素的菌株以一定的置信度聚成两个主要的分支,说明它们的亲缘关系是比较近的。因此通过对 16S rDNA 序列的比较分析仍可以初步确定未知种与同属的或不同属的种之间的亲缘关系。这将对在亲缘关系较近的簇 (cluster)、种间找寻能产生有价值的天然产物的过程中发挥较大的作用。

致谢 中国科学院微生物研究所刘志恒研究员对本工作提出了较好的建议,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 赵东红, 陆 玲, 秦怀兰. 食品与发酵工业, 1998, 24 (5): 21~24.
- [2] 孙延涛, 陆 玲, 崔恒林, 等. 微生物学杂志, 2000, 20 (1): 49~51.
- [3] 王 平. 微生物学通报, 1986, 13 (5): 228~231.
- [4] 戴传超, 袁 生, 刘吉华, 等. 菌物系统, 2000, 19 (2): 261~267.
- [5] 姜成林, 徐丽华, 许宗雄. 放线菌分类学. 昆明: 云南大学出版社, 1995, 36~37.
- [6] Saddler G S, Odonnell A G, Goodfellow M, et al. Journal of General Microbiology, 1987, 133: 1137~1147.
- [7] Williams S T, Sharpe M E, Holt J G. Bergey's manual of Systematic Bacteriology, 1989, 4: 2452~2492.
- [8] Williams S T, Goodfellow M, Alderson G, et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. Journal of General Microbiology, 1983, 129: 1743~1813.
- [9] 阎逊初编著. 放线菌的分类和鉴定, 北京: 科学出版社, 1992, 659, 1301.
- [10] Kampfer P, Kroppenstedt R M, Dott W. Journal of General Microbiology, 1991, 137: 1831~1891.