

链霉菌科一菌株 SIPI-297 的分类学研究

李晓虹 朱宝泉 龚炳永

(上海医药工业研究院 上海 200040)

摘要: 在筛选免疫抑制剂的过程中,从江苏无锡土壤中分离出一株好气、中温的放线菌 SIPI-297,革兰氏阳性,不抗酸。对小鼠脾淋巴细胞转化和小鼠白血病细胞有明显的抑制作用。该菌的主要特征为:在气丝上形成无分枝的生孢子气丝枝(轴丝),由大多数 5~7 个孢子形成的孢子链密集着生于无分枝的生孢子气丝枝两侧,且孢子链顶端卷曲。基丝不断裂。细胞壁 II 型,磷酸类脂 II 型。酰 MK-9(H₄)。DNA G+C 含量为 74 mol%。同以前所报道的相关菌属通过形态学、细胞化学、分子遗传学研究比较,发现均不同于所有已知菌属,与它们的 rDNA 相似性很低。建议成立新属新种。新属命名为拟链霉菌属 (*Streptomyopsis* gen. nov.)。代表种为白色拟链霉菌 (*Streptomyopsis albus* sp. nov.)。

关键词: 链霉菌科,拟链霉菌属,白色拟链霉菌

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-05-0324-04

TAXONOMIC STUDIES OF STREPTOMYCETACEAE STRAIN SIPI-297

LI Xiaohong ZHU Baoquan GONG Bingyong

(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040)

Abstract: During screening immunosuppressant, SIPI-297, a single aerobic mesophilic species of new genus belonging to the family Streptomycetaceae of the Actinomycetales, isolated from a soil sample in Jiangsu Province of China, is proposed. The new genus has been named *Streptomyopsis* gen. nov. The type strain of the genus is mainly characterized: spores chain is formed (mainly 5~7 spores) and closely borne on the main axis of sporogenous hyphae, forming axogamic spores chain and curveing on the top. Cell wall type II, the phospholipid pattern is of type PII; the major menaquinones are MK-9(H₄). G+C mol % is 74.0. The new genus has been named *Streptomyopsis* gen. nov. The type strain has been named *Streptomyopsis albus* sp. nov.

Key words: Streptomycetaceae, *Streptomyopsis*, *Streptomyopsis albus*

链霉菌科的种类最多,分布最广,经济价值较大。随着分子生物学的不断发展,它也是分类研究中难度最大的一科。目前链霉菌科分为 10 个属。菌株 SIPI-297,形态类似链霉菌科 (*Streptomycetaceae*) 中的链轮丝菌属 (*Streptovercillium*),我们通过对其形态、生理生化、化学、分子遗传学等多方面的分类研究及

与其它相关科属比较发现,该菌区别于任何已知属。本文报道 SIPI-297 菌株的鉴定结果。菌种 SIPI-297 的理化性质及结构分析正在进一步研究中。

收稿日期: 1998-09-10, 修回日期: 1999-01-06

1 材料与方法

1.1 菌种来源

菌株 SIPI-297, 1997 年分离自江苏无锡土壤中。

1.2 形态观察

在燕麦粉培养基上插片, 28℃ 培养 7d 以后, 用光学显微镜和电子显微镜观察并拍照。

1.3 培养特征及生理生化试验

在 14 种不同的培养基上, 28℃ 培养 7~14d, 观察并记录培养特征。生理生化采用 Gordon 和 Shirling 等人报道的方法进行。

1.4 细胞化学

全细胞水解液化学分析依照 Lechevalier^[1] 和 Hasegawa^[2] 的方法; 纯细胞壁化学组分分析依照 Lechevalier^[1] 的方法, 磷酸类脂的成分分析依照 Lechevalier 的方法^[1], 醌的提取、分析使用 Collins 和吴诚华等人^[3,4] 的方法, 进行高压液相分析。

1.5 DNA 中 G+C mol% 的测定

主要依照 Marmur 和 Doty 等人^[5] 的 T_m 值的测定方法。

1.6 Ribotyping-rDNA 限制性内切酶酶切片断长度类型分析 (rDNA-RFLP)

1.6.1 DNA 制备: 主要参考 Chater K.F 等人的方法^[6]。

1.6.2 探针 P64 的标记: 以 DIG (Digoxigenin, 俗称地高辛) 标记的质粒 pUC18r DNA 作为探针 (DIG-P64)^[7]

1.6.3 限制性酶切: DNA 用 BamH I 酶切, 反应总体积按酶制造商的规定配制成 20μL 混合液。DNA 片断用 Southern Blotting 方法从胶上转移至尼龙膜上。

1.6.4 杂交及显色: 以 DIG 标记探针, 进行预杂交。杂交及杂交体的免疫学检测参见 "DIG System Users guide for filter hybridization"^[8]。

2 结果

2.1 形态特征

该菌株基丝和气丝发育良好。基丝直径 0.4~1.2μm, 分枝, 不断裂, 在气丝上产生无分枝

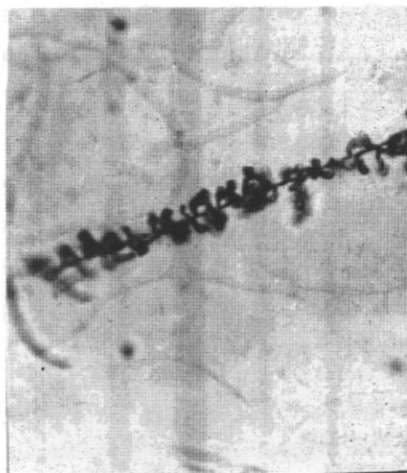


图1 菌株SIPI-297气丝和孢子丝(×1000)

的生孢子气丝枝, 直径 0.5~1.0μm, 5~7 个孢子链, 密集着生于轴丝两侧 (图1), 顶端圈卷, 孢子圆至椭圆形, 直径 0.7~0.9×1.0~1.1μm。表面有明显的疣状突起 (图2)。

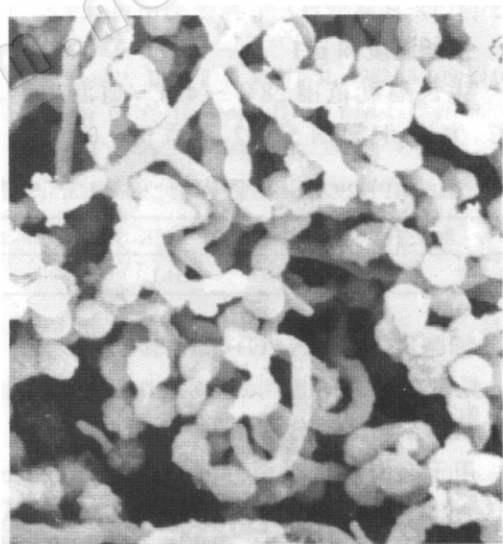


图2 菌株SIPI-297孢子表面扫描电镜照片(×8000)

2.2 培养特征

采用国际链霉菌计划和常规用的分类鉴定方法, 见表 1。

2.3 生理生化特征

牛奶凝固且胨化; 还原硝酸盐; 明胶不液化; 淀粉不水解; 纤维素上不生长。

2.4 碳源利用

利用甘油、L-鼠李糖、乳糖、麦芽糖、肌醇、

表1 SIPI-297菌株的培养特征

培养基	生长情况	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素
甘油天门冬素琼脂	差	乳白,薄层	乳白	无
葡萄糖天门冬素琼脂	一般	白	象牙黄	无
燕麦粉琼脂	好	蚌肉白	莲子白	无
营养琼脂	好	白	浅棕黄	无
察氏琼脂	一般,光秃	乳白	白	无
克氏1号琼脂	一般,光秃	莲子白	豆汁黄	无
马铃薯琼脂	一般,光秃	白	象牙黄	无
苹果酸钙琼脂	一般,极薄粉层	豆汁黄	深肉色	无
葡萄糖酵母膏琼脂	一般,皮革状	白	浅黄褐	无
贝蔡特琼脂	一般	荔肉白	玳瑁黄	无
高氏合成1号琼脂	好	白	浅象牙黄	无
酪氨酸琼脂	一般,光秃	浅棕	凋叶棕	鲑鱼红
伊莫松琼脂	好,皮革状	白	软木黄	无
马铃薯块	好	蚌肉白	无	浅褐

注:颜色色别依照《链霉菌鉴定手册》,北京:科学出版社,1975

D-山梨醇、D-甘露醇、D-木糖、D-果糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖;不利用山梨糖、蔗糖、D-核糖、棉子糖、D-甘露糖;D-半乳糖利用可疑。

2.5 生长温度和 pH

生长温度范围 28℃ ~ 48℃, 适温 28℃ ~ 37℃, 生长 pH 范围 5~12, 最适 pH7.0。

表2 菌株SIPI-297的细胞化学组分及G+Cmol%值

菌种	胞壁类型	糖型	磷酸类脂	醌型MK	DNA	G+Cmol%
SIPI-297	II	C	II	9(II ₄)		74.0

2.6 细胞化学和 DNA+G+Cmol% 分析结果

见表2。

2.7 rDNA 相似性分析结果

用于杂交的代表菌种分别为 *Streptomyces*

griseus AS4.139, *Streptovorticillium rubrovermicillatus* AS4.473 及 SIPI-297。经 BamHI 酶切, 采用 Southern 杂交方法与探针 DIG-P64 杂交相似值见表3。

表3 菌种SIPI-297rDNA ribotyping相似值

菌种	相似值(%)		
	AS4.139	AS 4.473	SIPI-297
AS 4.139	100		
AS 4.473	16	100	
SIPI-297	0	10	100

3 菌种鉴定

3.1 与近似分类单位的比较

菌株 SIPI-297 与相似菌属的比较见表4。

表4 拟链霉菌属与放线菌目中有关属的比较

属名	形态特征			胞壁磷酸		醌	枝菌酸	G+Cmol%
	气丝	菌丝断裂	孢囊有无	类型	类脂			
拟链霉菌属(<i>Streptomyces</i>)	+	-	-	II	PII	MK-9(H ₄)	-	74
类链霉菌属(<i>Streptomyces</i>)	+	-	-	II	PIV	MK-9(H _{4.8.4})	-	69-71
游动放线菌属(<i>Actinoplanes</i>)	-	-	+	II	PII	MK-9(H ₄)	-	71-73
异壁放线菌属(<i>Actinobolus</i>)	+	+	-	II	PI	MK-9(H ₄)	-	69.5
小单孢菌属(<i>Micromonospora</i>)	-	-	-	II	PII	MK-9(H ₄)	-	71-73
小瓶菌属(<i>Ampullariella</i>)	-	-	-	II	PII	MK-9(H ₄), 10(H ₄)	-	71-73
指孢囊菌属(<i>Dactylosporangium</i>)	-	-	+	II	PII	MK-9(H _{4.6.8})	-	71-73
链霉菌属(<i>Streptomyces</i>)	+	-	-	I	PII	MK-9(H _{4.6.8})	-	69-78
链轮丝菌属(<i>Streptovorticillium</i>)	+	-	-	I	PII	MK-9(H _{4.6.8})	-	69-74
短小多孢菌属(<i>Parvopolyspora</i>)	+	-	-	III	PII	未做	未做	未做

3.2 菌种鉴定

菌株 SIPI-297 为好气中温菌,气丝丝发育良好,在气丝上产生无分枝的孢子气丝枝,即无分枝的轴丝,且孢子链密集着生于轴丝两侧,故从形态上看象链霉菌科中的链轮丝菌属。但菌株 SIPI-297 胞壁 II 型,即胞壁组分含 meso-DAP 和甘氨酸,而且孢子着生及排列方式明显不同于链轮丝菌属。由表 4 可看出菌株 SIPI-297 和胞壁 II 型的放线菌各属比较发现,一般胞壁 II 型的放线菌各属大部分无气丝,基丝都形成孢囊,除了小单孢菌属基丝上有单个孢子。和张国伟^[9]发表的新属类链霉菌属相比较,胞壁都为 II 型,但形态又有很大差别。类链霉菌形成非轮生的长孢子链,而 SIPI-297 菌株气丝形成轴生的孢子链。又和刘兴荔^[10]发表的新属短小多孢菌属相比,虽然形态及培养特征类似,但胞壁组分不同,短小多孢菌属胞壁组分只含 meso-DAP,无甘氨酸,胞壁 III 型;SIPI-297 胞壁 II 型。Ribotyping DNA 相似性分析结果如表 3 所示,SIPI-297 与链霉菌科中有关菌属的代表菌属有低的 (0%~16%) rDNA Ribotype 相似值,说明它们在分子遗传学上不属于同一属。因此,SIPI-297 菌株不能归入任何一放线菌属中。建议成立新属。定名为拟链霉菌属 *Streptomycopsis* gen nov. 并把 SIPI-297 菌株作为该属的代表种,定名为白色拟链霉菌 *Strptomycopsis albus* sp. nov. 该分类单位的系统进化分析有待进行。

典型菌株保藏在上海医药工业研究院新药室菌库中。保藏号为 SIPI-297。

致谢 该论文的完成得到中国科学院微生物所刘志恒教授、张亚美老师及全体放线组同仁的大力帮助,在此表示感谢。波兰科学院免疫研究所微生物室 Dr. Jola 提供 pUC18rDNA,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Lechevalier M P, Dietz A, Thayer D W. Society for Industrial Microbiology, Special Publication N. 6. Arlington, VA. 1980, 227~284.
- [2] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. J Gen Appl Microbiol, 1983, 29:319~322.
- [3] Collins M D. Isoprenoid quinone analyses in classification and identification. In: Goodfellow M *et al* ed. Chemical methods in Bacterial Systematics. London: Academic Press, 1985, 267~287.
- [4] 吴诚华, 陆小涛, 秦敏. 微生物学通报, 1989, 16(3): 176~178.
- [5] Marmur J, Doty P. J Mol Biol, 1962, 5:109~118.
- [6] Chater K F, Hopwood D A, Kieser T *et al*. Curr Topics microb Immunol, 1982,96:69~95.
- [7] Zakrzewska-Czerwinska J, Mordarski M, Goodfellow. M. J. Gen. Microbiol, 1988, 134:2807~2813.
- [8] Boehringer Mannheim. DIG system user's Guide for filter hybridization. Germany: Biochemica, 1992.
- [9] 张国伟, 邢桂香, 阎逊初. 微生物学报, 1984, 24(3): 189~194.
- [10] 刘兴荔, 连云鹏. 微生物学报, 1986, 26(1): 7~10.