

# 连翘和水茄内生放线菌的多样性、活性及生物合成基因的 PCR 筛查

冯治翔<sup>1,3</sup> 栗敏<sup>3</sup> 刘洋<sup>3</sup> 林文翰<sup>2</sup> 褚以文<sup>1</sup> 田永强<sup>1,3\*</sup>

(1. 中国医药集团四川抗菌素工业研究所 四川 成都 610052)

(2. 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室 北京 100083)

(3. 四川大学化学工程学院 四川 成都 610065)

**摘要:** 从采自成都地区的中药植物连翘 *Forsythia suspensa* 和水茄 *Solanum torvum* 的根部分离到 14 株内生放线菌。活性筛选表明, 10 株菌的发酵粗提物具有不同程度的抗肿瘤活性, 占全部菌株的 71%; 3 株菌具有抗菌活性, 其中菌株 A263 具有较强的细胞毒活性和广谱抗菌活性。基于 16S rRNA 基因部分序列的相似性分析表明, 菌株 A275 属于克里贝拉菌属 *Kribbella*, 其余 13 株属于链霉菌属 *Streptomyces*。多种生物合成基因的筛查实验表明, 5 株菌同时具有 PKS-I、PKS-II、NRPS 型基因, 其中 A255 和 A263 还具有 3,5-AHBA 合酶基因, 但仅 A275 具有 *oxyB* 基因。结果可以推测, 链霉菌是这 2 种中药植物根部的优势内生放线菌, 生物合成基因的 PCR 筛查能极大地弥补传统活性筛选模型的不足, 内生放线菌具有产生丰富生物活性化合物的巨大潜力。

**关键词:** 内生放线菌, 分离, 活性, PCR 筛查

## Diversity, activity and PCR screening of biosynthesis genes of endophytic actinomycetes isolated from *Forsythia suspensa* and *Solanum torvum*

FENG Zhi-Xiang<sup>1,3</sup> LI Min<sup>3</sup> LIU Yang<sup>3</sup> LIN Wen-Han<sup>2</sup> CHU Yi-Wen<sup>1</sup>  
TIAN Yong-Qiang<sup>1,3\*</sup>

(1. Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu, Sichuan 610052, China)

(2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100083, China)

(3. School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

**Abstract:** 14 strains of endophytic actinomycetes were isolated from the roots of ethnomedical plants, *Forsythia suspensa* and *Forsythia suspensa*, collected in Chengdu. The results of antimicrobial and

基金项目: 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室开放基金项目(No. 20080214)

\* 通讯作者: Tel: 86-28-84216035; 信箱: yqtian@scu.edu.cn

收稿日期: 2010-11-09; 接受日期: 2011-02-14

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

anticancer activity assays of the fermentation crude extracts showed: 10 strains displayed inhibition to HepG2 cell line in varied degrees, accounting for 71% of total isolates; 3 strains exhibited antibacterial activity; and strain A263 showed acute cytotoxic activity and wide-spectrum of antibacterial activity. Based on similarity analysis of 16S rRNA gene partial sequences, strain A275 was indicated affiliate to genus *Kribbella*, and the remaining 13 strains were belong to genus *Streptomyces*. PCR screening of biosynthesis genes revealed 5 strains possess PKS-I, PKS-II, NRPS genes simultaneously, and strain A255, A263 possessed 3,5-AHBA synthetase gene additionally, while strain A275 was the only one found with *oxyB* gene. These results may deduce *Streptomyces* was the dominant actinomycetes in the roots of these ethnomedical plants. PCR screening of biosynthesis genes compensate the limitation of traditional screening model for bioactive substances tremendously. Endophytic actinomycetes were acknowledged with enormous potential of producing prolific bioactive compounds.

**Keywords:** Endophytic actinomycetes, Isolation, Activity, PCR screening

当前世界上几乎各种植物体内都发现了植物内生菌的存在, 这些微生物从植物的共生菌到病原菌, 都与植物发生着广泛而多样的相互作用。内生菌产生的丰富多样的活性代谢产物, 在农业和医药业中具有重要的开发应用潜力。尽管目前合成化学、合成生物学研究正受到越来越多的关注, 但是生物活性天然产物因其新颖性和尚未充分开发的巨大潜力, 以及对人类健康带来的巨大影响, 值得深入研究开发<sup>[1]</sup>。

大量研究表明, 植物内生放线菌具有丰富的生物多样性, 及产生多种生物活性物质的巨大潜力, 包括抗生素、抗肿瘤、抗感染物质、促植物生长因子、特殊活性的酶等<sup>[2]</sup>, 其中许多具有特殊结构或者新颖的生物活性<sup>[3]</sup>。此外, 有研究表明, 植物内生放线菌在与植物共生的同时, 有可能具有增强其抗病抗逆抗虫害的作用, 因此具有极大的生防意义<sup>[4]</sup>。

天然活性化合物的筛选分离和结构解析通常要投入大量时间和资金, 往往伴随着巨大的风险。同时由于许多微生物尚未能分离得到纯培养, 决定了需要采用新的活性筛选策略<sup>[5]</sup>。通过对微生物基因组的生物合成酶基因的筛选, 例如聚酮合成酶(PKS)、非核糖体多肽合酶(NRPS)、细胞色素 P450 等与活性化合物合成途径紧密相关的生物合酶的基因, 可以极大地减少候选菌株的筛选量, 而具有活性合酶基因报告的候选者则可能得知其产物结构类型, 便于进一步分离分析。研究表明<sup>[6]</sup>, 将分子指纹

技术应用于内生放线菌的分类和活性检测, 可以有效地提高筛选效率, 相比传统活性筛选方法具有极大优势。

为分离积累内生放线菌资源, 开发其活性代谢产物, 本文采集四川成都地区的连翘 *Forsythia suspense* 和水茄 *Solanum torvum* 的根部材料分离其内生放线菌, 分析了分离菌株的多样性, 发酵代谢产物的抗菌抗癌活性, 并通过 PCR 筛查了 5 类常见的生物合成关键酶基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集及内生菌分离:** 2008 年 4 月中旬, 于四川成都采集连翘 *Forsythia suspense* 和水茄 *Solanum torvum* 的根部材料。采集的样品经 1 d 左右的自然风干后进行内生放线菌的分离。

**1.1.2 培养基及主要试剂:** 分离培养基: 水-酵母-琼脂(TWYE), 水-酵母-琼脂改性(T改: 即 TWYE 培养基中添加: 核黄素 0.5 mg, 硫酸素 0.5 mg, 生物素 0.25 mg, 烟酸 0.5 mg, 泛酸钙 0.5 mg, 肌醇 0.5 mg, VB<sub>6</sub> 0.5 mg, 对氨基苯甲酸 0.5 mg)。分离培养基均添加放线菌酮 0.05%、萘啶酮酸 0.025%。纯化及鉴定培养基: 高氏一号(G1)、燕麦琼脂(ISP3)、燕麦琼脂(ISP2)。发酵培养基: 葡萄糖 10 g, 燕麦粉 20 g, 蛋白胨 10 g, 酵母粉 2 g, CaCO<sub>3</sub> 3 g, 水 1 000 mL。抗菌测试培养基: LB。

PCR 试剂购于北京天根生化科技有限公司, PCR 回收试剂盒购于上海生工生物工程技术有限公司, PCR 测序引物及基因克隆引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

**1.1.3 测试菌株、细胞株:** 抗菌活性测试菌株: 大肠杆菌 *Escherichia coli*、肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*、白色念珠菌 *Candida albicans*、黑曲霉 *Aspergillus niger* 和藤仓赤霉 *Gibberella fujikuroi* 来自四川抗菌素工业研究所(SIIA)微生物菌种资源中心(MRC)。

抗癌活性测试细胞株: 人肝癌细胞株 HepG2 细胞株。

## 1.2 内生放线菌的分离、纯化及排重

材料除尽泥土后, 预处理采用 75%乙醇擦拭并风干保存 1 d 左右。分离内生菌采用 Coombs 等<sup>[7]</sup>的表面消毒方法处理, 切好的组织块接种于 TWYE 和 T 改培养基表面, 使用最后一遍无菌水清洗液做涂布对照, 检测表面消毒效果。接种后于 28 °C 培养 3–5 周。

待大多数内生放线菌长出后, 挑取放线菌到 G1 平板划线纯化, 转接 ISP3 斜面活化培养。遇到放线菌被真菌或细菌污染较严重不易纯化的, 采用孢子悬液稀释涂布法涂布于 G1 或 ISP3 平板上, 同时培养基中添加放线菌酮 0.05%, 萘啶酮酸 0.025%。

纯化后的菌株, 采用 ISP2 和 ISP3 培养基观察培养特征, 结合显微镜观察和形态学鉴别方法, 排除大量可能重复的菌株。排重后的菌株编号为

A254–A263、A274–A277。

## 1.3 16S rRNA 基因部分序列的扩增与系统进化分析

采用 Hideyuki 等<sup>[8]</sup>的方法进行菌落 PCR 扩增 16S rRNA 基因部分序列, 使用的 2 对引物分别为 181F (5'-GTTTGATCCTGGCTCAGGAC-3')和 182R (5'-GGTGTTCCTCMHGATATCTG-3'), 178F (5'-G AACGCTGGCGGCGTGCT-3')和 179R (5'-GCGCA TTYCACCGCTACACC-3')。2 对引物分别匹配 16S rRNA 基因序列的 10–29 和 673–692、30–47 和 654–673 位核酸, 扩增测序有效片段约 610 bp。

将各菌株测得的 16S rRNA 基因部分序列提交 GenBank 注册, 注册序列号为: HQ000023–HQ000036。将各菌株的 16S rRNA 基因部分序列提交 NCBI 进行 BLAST 比对, 再与最相近的模式菌的 16S rRNA 基因序列放在一起做 Clustal W 序列比对, 使用 MEGA 4 分析构建 Neighbor-Joining (NJ) 系统发育树。

## 1.4 多种抗生素生物合成途径关键酶基因的 PCR 筛查

对各菌株进行 5 类抗生素合成关键酶基因的 PCR 扩增筛查, 其中对 PKS-I (正反引物分别基于聚酮合酶序列 KS, 甲基-丙二酰-CoA 转移酶序列)、NRPS (引物对基于腺苷酰化作用序列)基因分别使用引物对 K1F/M6R、A3F/A7R<sup>[9]</sup>; 对 PKS-II (引物分别基于 *actI*ORF1-*actI*ORF2,  $KS_{\alpha}$ - $KS_{\beta}$  基因对)、3,5-AHBA 合酶基因(*rifK*)、糖肽类抗生素合成相关基因(*oxyB*)分别使用引物对 ARO-PKS-F/ARO-PKS-R、ANSA-F/ANSA-R、Foxy/Roxy<sup>[10]</sup> 进行 PCR 扩增筛查。所用引物及其扩增片段如表 1 所示。

表 1 PCR 筛查所用引物及其匹配生物合成基因  
Table 1 Primers and relevant biosynthesis genes for PCR screening

引物对名称 Primers name	正向引物 Forward primer (5'→3')	反向引物 Reverse primer (5'→3')	基因 Gene	片段长度 Fragment length (bp)
K1F/M6R	TSAAGTCSAACATCGGBCA	CGCAGGTTSCSGTACCAGTA	PKS-I	1 200–1 400
A3F/A7R	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	SASGTCVCCSGTSCGGTAS	NRPS	700
ARO-PKS-F/ARO-PKS-R	GCGACGGGITTCCGGCGIITCCAG	CGITGTTIACIGCGTAGAACCCAGGCG	PKS-II	492–630
ANSA-F/ANSA-R	CC(C/G)GC(G/C)TTCAC(C/G)TTCATCTC	AI(G/C)(C/T)GGAICATIGCCATGTAG	ANSA	641
Foxy/Roxy	CTGGTCGGCAACTGATGGAC	CAGGTACCGGATCAGCTCGTC	<i>oxyB</i>	591

### 1.5 发酵及产物粗提取

从菌株斜面挖块接种到 50 mL 体系的发酵培养基摇瓶中, 28 °C、200 r/min 摇床培养 7 d。发酵液用 25 mL 正丁醇振荡抽提 30 min。4 000 r/min 离心 10 min。分层后移取上层抽提液, 使用旋转蒸发器浓缩, 转移至 2 mL EP 管中, 最后冷冻干燥即为粗提物, 称量并记录干品净重。

### 1.6 发酵粗提物的抗菌活性测试

采用滤纸片法, 将发酵产物粗提样品用 DMSO 溶解并配制成 100 g/L 使用液, 取适量加蒸馏水稀释至 100 mg/L 用于测试, 滤纸片上滴加量为 10  $\mu$ L。测量并记录抑菌圈直径  $\Phi$ ,  $\Phi \geq 10$  mm 则认为抑菌活性极强。

### 1.7 发酵粗提物的抗癌活性测试

抗癌活性测试采用 SRB 法<sup>[11]</sup>, 测试粗提物对 HepG2 细胞株的抑制活性即细胞毒活性。HepG2 细胞接种于 96 孔板, 培养过夜, 加入样品(T), 同时做不加样品对照(C)和加药前对照( $T_0$ )。加药前对照的细胞每孔加入 30  $\mu$ L 50% TCA 固定, 4 °C 放置 1 h 后, 弃去固定液, 用蒸馏水洗 5 次, 自然晾干备用, 加入样品和 不加样品对照的细胞继续培养 48 h 后再固定。所有固定好的细胞以 0.4% SRB 染液室温下染

色 20 min, 再用 1% 醋酸溶液洗去游离的染料, 空气干燥后按 200  $\mu$ L/孔加入 10 mmol/L Tris-base, 振荡溶解混匀后于 490 nm 测定 OD 值。根据 OD 值计算生长率, 如果  $T \geq T_0$ , 生长率 =  $(T - T_0) / (C - T_0) \times 100$ ; 如果  $T < T_0$ , 生长率 =  $(T - T_0) / T_0 \times 100$ 。根据生长率判断细胞毒活性强度, 当生长率数值低于 30, 则认为抗癌活性极强。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生放线菌的分离及表面消毒效果

在分离内生放线菌时, 对照平板上仅有个别长出细菌, 而无放线菌或真菌。同时, 应用该表面消毒流程处理分离得到的内生放线菌并接种于 ISP3 培养基上, 未见放线菌长出。可见该表面消毒程序能保证分离得到的放线菌为植物组织内生而非表生或附生。分离排重后的菌株编号、来源及类群见表 2。

实验采用 TWYE 和 T 改 2 种培养基, 分离得到的内生放线菌经过排重后共 14 株, 从连翘根部分离到 10 株, 编号 A254-A263; 水茄根部分离到 4 株, 编号 A274-A277。其中 13 株从 T 改培养基中能够分离到, 6 株从 TWYE 培养基中能够分离到, 可见 T 改培养基分离内生放线菌的效果优于 TWYE 培养基。

表 2 分离菌株的宿主植物及其类群  
Table 2 Host plants and genera of the isolated strains

菌株编号 Strain No.	序列注册号 Accession No.	分离培养基 Isolation medium	属别 Genera	宿主植物 Host plants
A254	HQ000024	TWYE、T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Forsythia suspensa</i>
A255	HQ000023	T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Forsythia suspensa</i>
A256	HQ000025	TWYE	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Forsythia suspensa</i>
A257	HQ000026	TWYE、T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Forsythia suspensa</i>
A258	HQ000027	TWYE、T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Forsythia suspensa</i>
A259	HQ000028	T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Forsythia suspensa</i>
A260	HQ000029	TWYE、T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Forsythia suspensa</i>
A261	HQ000030	T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Forsythia suspensa</i>
A262	HQ000031	T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Forsythia suspensa</i>
A263	HQ000032	TWYE、T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Forsythia suspensa</i>
A274	HQ000033	T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Solanum torvum</i>
A275	HQ000034	T 改	<i>Kribbella</i> sp.	<i>Solanum torvum</i>
A276	HQ000035	T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Solanum torvum</i>
A277	HQ000036	T 改	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Solanum torvum</i>

## 2.2 分离菌株发酵产物粗提物的抗菌活性及抗癌活性

对分离菌株的发酵产物粗提物的抗菌活性及抗癌活性检测结果如表 3 所示。其中 A263 的发酵产物具有极强的细胞毒活性和广谱抗菌活性, A277 具有较强的广谱抗菌活性, A276 具有极强的抗癌活性, 但所有菌株均未检测到针对大肠杆菌、烟曲霉、白色念珠菌、黑曲霉及藤仓赤霉的抗菌活性。除菌株 A257、A261、A275 外, 其余 11 株均检测到不同程度的抗癌活性或抗菌活性, 占总数的 78.6%。

## 2.3 分离菌株的多样性分析

经分离纯化及排重后得到了 14 株内生放线菌, 对其进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及测序。通过 NCBI 序列相似性比对, 发现菌株 A275 属于克里贝拉菌属 *Kribella*, 其余 13 株属于链霉菌属 *Streptomyces*。本次分离实验显示, 链霉菌是这 2 种

药用植物根部组织中的优势放线菌。

图 1 是利用 MEGA4 软件基于 16S rRNA 基因部分序列(约 610 bp)构建的 N-J 系统发育树。

## 2.4 生物合成关键酶基因的 PCR 筛选分析

对 14 株内生放线菌做了 5 类生物合成的关键酶基因的 PCR 筛查, 包括 I 型聚酮合成酶(PKS-I), 非核糖体多肽合成酶(NRPS), II 型聚酮合成酶(PKS-II), 安莎类抗生素关键酶 3,5-AHBA 合成酶基因 *rifK*, 糖肽类抗生素合成关键酶 P450 单加氧酶基因 *oxyB*。各菌株的抗生素合酶基因 PCR 筛查结果如表 4 所示, 电泳凝胶成像结果见图 2。结果显示, 菌株 A255 和 A263 具有 4 种合酶基因, 菌株 A256、A258 和 A276 同时具有 PKS-I、NRPS、PKS-II 等 3 种合酶基因, 但只有菌株 A275 具有 *oxyB* 基因。NRPS 和 PKS-II 基因出现频率最高, 分别存在于 12 株和 13 株菌中。

表 3 分离菌株代谢产物的抗菌活性及抗癌活性  
Table 3 Antimicrobial and anti-tumor activities of metabolites from isolates

菌株编号 Strain No.	肝癌细胞株 HepG2	肺炎克雷伯氏菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
A254	+	-	-	-	-	-
A255	+	-	-	-	-	-
A256	++	-	-	-	-	-
A257	-	-	-	-	-	-
A258	+	-	-	-	-	-
A259	++	-	-	-	-	-
A260	++	-	-	-	-	+++++
A261	-	-	-	-	-	-
A262	+	-	-	-	-	-
A263	+++++	++	+++	-	-	++++
A274	++++	-	-	-	-	-
A275	-	-	-	-	-	-
A276	+++++	-	-	-	-	-
A277	-	++++	-	-	+++	-

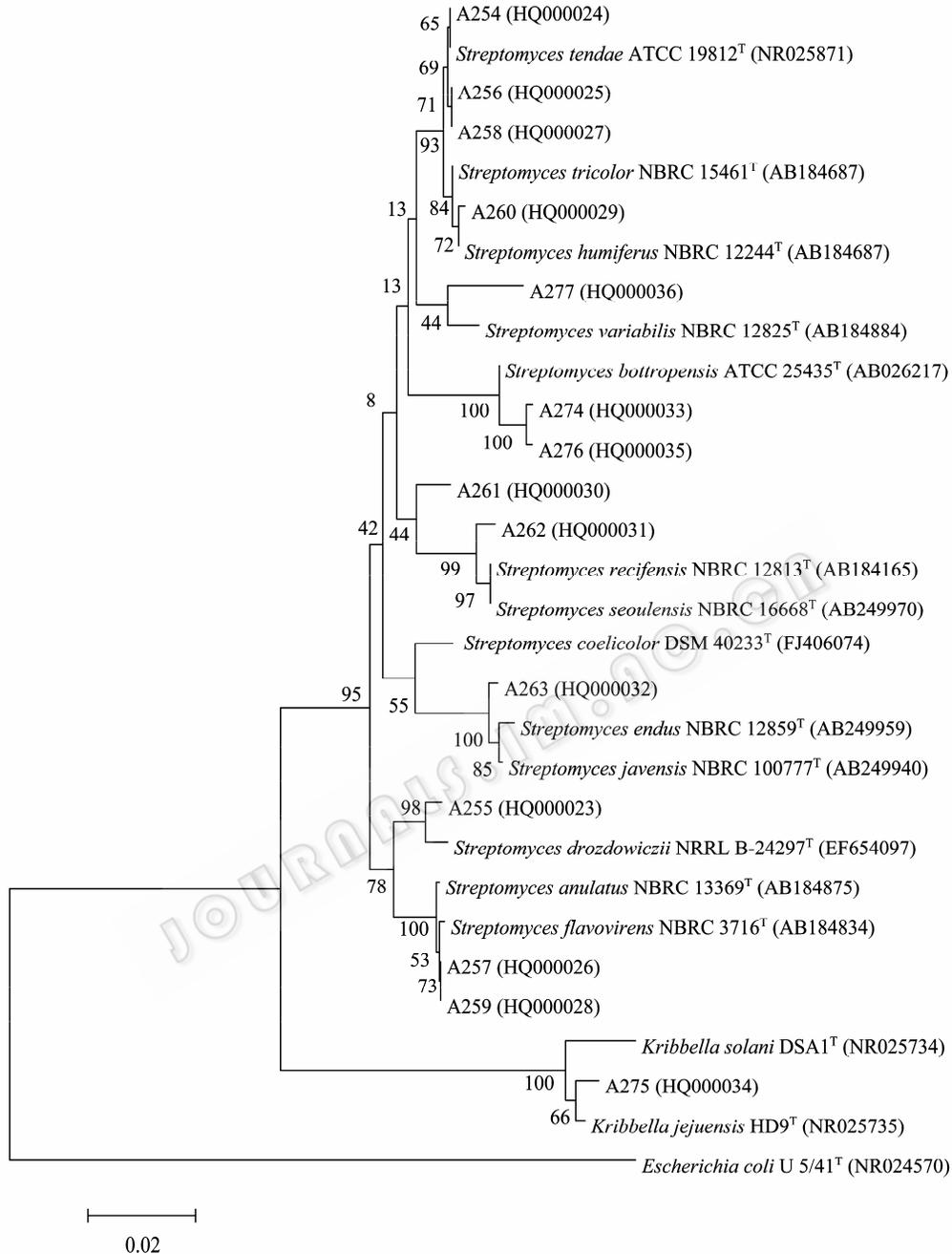


图 1 基于分离菌株 16S rRNA 基因部分序列构建的 N-J 系统进化树

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene partial sequences of isolates

注: 括号内序号为其序列 GenBank 登录号. 节点处的 Bootstrap 值(%)表示对 1000 次随机构建的 N-J 进化树评估得到的相似多数百分比; 标尺数值表示单位长度线段代表的序列差异度为 0.02, 即每个碱基位有 2% 替换率.

Note: Numbers in parentheses represented the sequences accession No. in GenBank. The numbers at the nodes indicated the bootstrap values (%) represented the similar majority percentage based on 1000 repeated data sets of neighbour-joining analyses. The scale bar indicated sequence divergence was 0.02 per unit bar, which represented 2% substitutions per nucleotide position.

表 4 分离菌株的生物合成基因的 PCR 筛查  
Table 4 PCR screening of biosynthesis genes of the isolates

菌株编号 Strain No.	PKS-I	NRPS	PKS-II	ANSA	<i>oxyB</i>
A254	-	+	+	-	-
A255	+	+	+	+	-
A256	+	+	+	-	-
A257	-	+	+	-	-
A258	+	+	+	-	-
A259	-	+	+	-	-
A260	-	+	+	+	-
A261	-	+	+	-	-
A262	-	-	+	-	-
A263	+	+	+	+	-
A274	+	-	+	+	-
A275	-	+	-	-	+
A276	+	+	+	-	-
A277	-	+	+	-	-

### 3 讨论

生物多样性越丰富的地区, 其内生放线菌的类型也会更加丰富, 而具有独特药用价值的民间药用植物则往往能产生更为多样的生物活性产物<sup>[1]</sup>。不同地区的植物, 其内生放线菌的多样性、抗菌谱都可能具有很大差异, 可能偏好于抗真菌或者抗细菌, 此外往往来自药用植物的内生放线菌, 比来自非药用植物的要更具抗菌活性<sup>[12]</sup>。本实验选用的植物采集地为四川成都市内地区, 可能由于城市内生物多样性较为单一, 加之分离用的植物样本量较少、分离方法的限制等因素, 因此分离出的放线菌数量和类群都不多。植物连翘为常用传统中药植物(《中华人民共和国药典》), 其主要药效为抗细菌作用, 可抑制伤寒杆菌、大肠杆菌、痢疾杆菌、葡萄球菌等, 中药用于清热解毒。植物水茄为地方中草药(《广西药植名录》), 隶属民族植物药的范畴, 有小毒, 含多种皂苷、甾醇、生物碱, 其药材具有活血散瘀止痛的功效。抗菌抗癌活性实验显示, 连翘中分离的菌株主要具有抗细菌活性, 与宿主植物的药理活性相一致, 而水茄中分离的具有抗癌活性的菌株, 细胞毒活性较强, 这可能与水茄自身具有一定毒性有关。研究表明<sup>[4]</sup>, 植物内生放线菌与宿主植物往往存

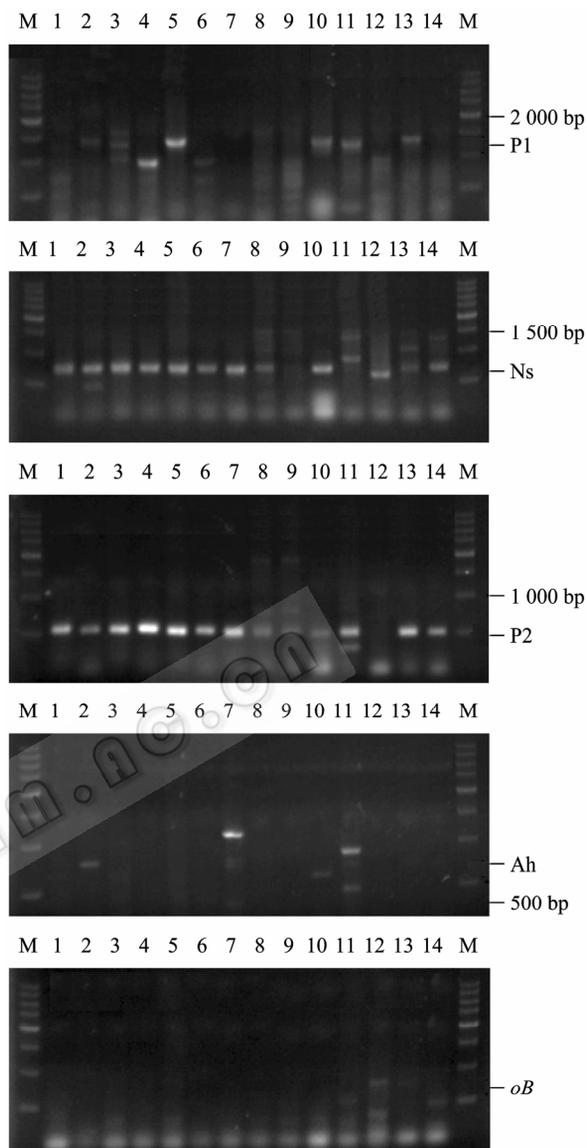


图 2 分离菌株生物合成基因的 PCR 筛查电泳成像

Fig. 2 Electrophoresis imaging of PCR screening for biosynthesis genes of isolated strains

注: M: Marker; 1-10: A254-A263; 11-14: A274-A277; P1: PKS-I; Ns: NRPS; P2: PKS-II; Ah: 3,5-AHBA 合酶基因 *rifK*; *oB*: *oxyB*.

Note: M: Marker; 1-10: A254-A263; 11-14: A274-A277; P1: PKS-I; Ns: NRPS gene; P2: PKS-II; Ah: 3,5-AHBA sythatase gene *rifK*; *oB*: *oxyB*.

在多种层面的相互作用, 例如促进生长、抵御病害、增强抗逆性、酶互作或基因交换等。可以推测, 内生放线菌往往具有产生与宿主药用植物相似活性物质的能力, 甚至可能某些药用植物的药效就是其内生放线菌产生的。

抗癌活性实验显示, 71%的分离株具有细胞毒活性, 其中菌株 A263 和 A276 抗癌活性极强, 具有进一步分析开发活性化合物的价值。对分离菌株的生物合成关键酶基因的 PCR 筛查表明, 内生放线菌具有产生多种化合物的潜力。其中非核糖体多肽合酶(NRPS)和 II 型聚酮合酶(PKS-II)基因的出现频率最高, 这与选用引物同目的基因的匹配特性有关。此外, NRPS 多与放线菌色素合成相关<sup>[9]</sup>, 而多数分离株能产生各种色素, 因此所得 NRPS 阳性报告可能多数指向色素合成功能。安莎类抗生素 3,5-AHBA 合酶基因 *rifK* 和糖肽类抗生素合酶相关基因 *oxyB* 的阳性报告率最低, 与其引物的专一性较强有关, 同时说明这两类阳性报告菌株产生相应抗生素的可能性比较大。试验中, 菌株 A275 未显示任何抗菌抗癌活性, 但却是筛到具有 *oxyB* 基因的唯一一株内生放线菌, 并且根据 16S rRNA 基因部分序列分析归属为稀有放线菌克里贝拉菌 *Kribbella*, 推测其可能产生具有特殊生物活性的物质, 可以进一步选择其他活性筛选模型检测。结果表明, 对生物合成基因的 PCR 筛选可以有效地辅助传统活性筛选策略, 提高筛选效率, 揭示可能的活性产物的类型, 以弥补传统活性筛选方法的筛选模型局限性。

植物内生菌是一个尚未充分开发的领域, 从中发现新的抗菌活性物质具有概率较高、毒性较低等特点。研究表明<sup>[2,13]</sup>, 植物内生菌具有产生抗真菌、抗细菌、抗感染、抗肿瘤等多种抗生素及其他生物活性物质的能力, 也具有产生与宿主植物相同结构化合物的能力。生境复杂或特殊的植物, 其内生放线菌中往往存在大量新种<sup>[2,12]</sup>, 因而也可能相应产生具有新颖活性或新结构的化合物。由此可见, 进一步开发植物内生放线菌, 寻找新结构新活性化合物, 以应对生物防治、生物治理、细菌耐药性等难题具有极其重大的意义。

**致谢:** 本研究受到成都地奥集团药物研究所提供抗肿瘤活性筛选的协助, 在此表示感谢! 同时感谢中国医药集团四川抗菌素工业研究所微生物菌种资源中心提供的细菌、真菌测试菌。

## 参考文献

- [1] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms[J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(2): 257-268.
- [2] Qin S, Xing K, Jiang JH, et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 89(3): 457-473.
- [3] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67(4): 491-502.
- [4] Hasegawa S, Meguro A, Shimizu M, et al. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants[J]. *Actinomycetologica*, 2006, 20(2): 72-81.
- [5] Schirmer A, Gadkari R, Reeves CD, et al. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissolute*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(8): 4840-4849.
- [6] González I, Ayuso-Sacido A, Anderson A, et al. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 54(3): 401-415.
- [7] Coombs JT, Franco CMM. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(9): 5603-5608.
- [8] Muramatsu H, Shahab N, Tsurumi Y, et al. A comparative study of Malaysian and Japanese actinomycetes using a simple identification method based on partial 16S rDNA sequence[J]. *Actinomycetol*, 2003, 17(2): 33-43.
- [9] 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[J]. *Microbiol Ecol*, 2005, 49(1): 10-24.
- [10] Wood SA, Kirby BM, Goodwin CM, et al. PCR screening reveals unexpected antibiotic biosynthetic potential in *Amycolatopsis* sp. strain UM16[J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 102(1): 245-253.
- [11] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(13): 1107-1112.
- [12] Zhao K, Penttinen P, Guan TW, et al. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China[J]. *Curr Microbiol*, 2011, 62(1): 182-190.
- [13] Igarashi Y. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes[J]. *Actinomycetologica*, 2004, 18(2): 63-66.