

研究报告

产 PK 和 NRP 类抗生素苦豆子内生放线菌分子筛选及 抗生素类型鉴定

祁鹤兴^{1,2} 赵映珺¹ 李鹏³ 高媛¹ 徐全智¹ 顾沛雯^{1*}

(1. 宁夏大学农学院 宁夏 银川 750021)

(2. 中国农业大学植物病理学系 农业部植物病理学重点实验室 北京 100193)

(3. 宁夏大学 省部共建天然气转化国家重点实验室培育基地 宁夏 银川 750021)

摘要:【目的】从 19 株苦豆子内生拮抗放线菌中筛选 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因阳性菌株, 并对其产抗生素种类进行初步鉴定, 为苦豆子内生放线菌资源的合理开发和利用提供理论依据。

【方法】分别以 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因引物对 19 株拮抗菌株进行特异性扩增, 筛选阳性菌株; 以 7 种抗生素标准样品为对照, 采用 TLC 和 HPLC 法对阳性菌株所产抗生素类型进行鉴定。【结果】PKS I、PKS II 和 NRPS 基因阳性菌株率分别为 47.4%、10.5% 和 21.1%; 9 株内生放线菌发酵液中各有 1 个峰的洗脱时间与麦迪霉素的洗脱时间一致, 菌株 NDZKDS₆₉ 的发酵液中有 4 个峰的洗脱时间分别与麦迪霉素、乙酰螺旋霉素、替考拉宁和土霉素标准样品的洗脱时间一致。【结论】苦豆子内生放线菌中链霉菌属(*Streptomyces*)菌株是大环内脂类、芳香环类和非核糖体多肽类抗生素的丰富菌源; 分子指纹图谱和化学指纹图谱检测结果一致, 且建立的 TLC 和 HPLC 法检测抗生素的方法简便、快捷、灵敏、重复性良好。

关键词: 苦豆子内生放线菌, 聚酮合酶, 非核糖体多肽合成酶, 分子筛选, 高效液相色谱

Foundation item: Science-Technology Support Plan Project of Ningxia Hui Autonomous Region (No. NG2013); National Natural Science Foundation of China (No. 30960228)

***Corresponding author:** Fax: 86-951-7891081; E-mail: gupeiwen2013@126.com

Received: June 28, 2015; **Accepted:** October 13, 2015; **Published online** (www.cnki.net): November 10, 2015

基金项目: 宁夏回族自治区科技支撑计划项目(No. NG2013); 国家自然科学基金项目(No. 30960228)

***通讯作者:** Fax: 86-951-7891081; E-mail: gupeiwen2013@126.com

收稿日期: 2015-06-28; **接受日期:** 2015-10-13; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-11-10

Screening and identification of polyketide and non-ribosomal peptide antibiotics from endophytic actinomycetes of *Sophora alopecuroides* L.

QI He-Xing^{1,2} ZHAO Ying-Jun¹ LI Peng³ GAO Yuan¹ XU Quan-Zhi¹ GU Pei-Wen^{1*}

(1. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

(2. The Key Laboratory of Plant Pathology, Ministry of Agriculture and Department of Plant Pathology, China Agriculture University, Beijing 100193, China)

(3. Breeding Base of National Key Laboratory of Natural Gas Conversion, Province and Ministry Common Construction, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: [Objective] Screened positive strains which had PKS I, PKS II and NRPS genes from 19 endophytic antagonism actinomycetes strains of *Sophora alopecuroides* L. and preliminary identified types of antibiotics produced by them, which could also provide research methods and theory on rational development and use of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L. [Methods] Specific amplified 19 endophytic antagonism actinomycetes by primers of PKS I, PKS II and NRPS genes for screening positive strains. Then 7 kinds of antibiotics were used as contrast and preliminary identified antibiotics produced by positive strains which had PKS I, PKS II and NRPS genes by TLC and HPLC methods. [Results] The rates of positive strains of PKS I, PKS II and NRPS genes were 47.4%, 10.5% and 21.1% respectively. The fermentation broth of 9 endophytic actinomycetes had a peak respectively which had the same elution time with medemycin, the fermentation broth of strain NDZKDS₆₉ had four peaks which had the same elution time with medemycin, acetylspiramycin, teicoplanin and oxytetracycline respectively. [Conclusion] *Streptomyces* of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L. were rich sources of macrolide antibiotic, aromatic polyketide antibiotics and non ribosomal peptide antibiotics. The testing results of molecular fingerprinting and chemical fingerprint chromatography were consistent, and the methods of TLC and HPLC were founded in this paper were convenient, rapid, sensitive and had better repeatability.

Keywords: Endophytic actinomycetes of *Sophora alopecuroides* L., Polyketide synthase, Non-ribosomal peptide synthase, Molecular screening, High performance liquid chromatography

很多天然活性化合物的生物合成基因簇中存在聚酮合酶(Polyketide synthetase, PKS)和非核糖体多肽合成酶(Nonribosomal peptide synthetase, NRPS)^[1-2]。聚酮类化合物分为非芳香环聚酮类(即大环聚酮类)和芳香环聚酮类化合物,它们分别由I型聚酮合酶合成途径(PKS II)和II型聚酮合酶合成途径(PKS I)合成。以红霉素为代表的大环内酯类抗生素和以利福霉素为代表的安莎类抗生素都是由PKS I途径合成的;而以四环素为代表的四环类抗生素和以多柔比星、柔红霉素为代表的蒽环类抗生素均是由PKS II途径合成的^[3-4]。非核糖体多肽类(Non-ribosomal thiopeptide)抗生素是多肽类抗生素中的一个重要家族,目前临床上许多重要的药物都是含氨基酸的次级代谢产物,如抗耐药菌抗生素万

古霉素、达托霉素、替考拉宁等。这类化合物由非核糖体多肽合成酶催化合成,且NRPS编码基因具有同源性和许多保守区域,为基因筛选提供了分子基础^[5-6]。研究表明将分子指纹技术应用于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^[7]。

植物内生放线菌广泛分布于植物不同的器官和组织中,由于营养物质充足,同时受到植物组织的保护,而不受恶劣的外部环境的影响,因此具有更稳定的生态环境,相对于土壤或者植物根际的放线菌更易发挥生物防治作用^[8]。植物内生放线菌能产生具有广泛生物学活性的多种次生代谢产物,包括抗生素、水解酶类、促生物质和一些尚未鉴定的抗菌蛋白等,这些物质在植物抵抗病原菌入侵、潜

伏、扩展蔓延过程中具有重要的应用潜能^[9]。Pullen 等^[10]从卫矛科植物分离的内生链霉菌产生的 Chloropyrrol 抗生素对多种耐药性细菌和分枝杆菌有抑制活性。Combs 等^[11]在蛇藤中分离到一株新的链霉菌 *Streptomyces* NRRL30562, 它能产生 4 种新的广谱抗生素 Munumbicins A、B、C 和 D, 这些抗生素对多种植物致病霉菌、细菌具有广泛的抑杀活性。

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)为我国北方荒漠、半荒漠地区重要的沙生药用植物,其功效主要有清热解毒、驱风燥湿、抗菌杀虫^[12]、抗肿瘤^[13]、免疫^[14]等,具有独特的民族药用历史,是研究沙生药用植物内生放线菌及其活性代谢产物的绝好材料^[15]。目前国内外对苦豆子的研究主要集中在对其活性成分的分析以及相关功能性产品的研发上面^[16-18]。2013 年,本研究室以 6 种植物病原真菌为靶标,采用皿内对峙培养法,对 126 株苦豆子内生放线菌进行了抗菌活性筛选,结果发现近 60%的内生放线菌具有抑菌活性^[19]。之后对 111 株苦豆子内生放线菌进行了形态学和分子生物学鉴定,发现 111 株内生放线菌分属于 9 个属,其中链霉菌属(*Streptomyces*)和拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)为优势属^[20]。为了进一步开发苦豆子内生放线菌的活性代谢产物,更好地利用苦豆子内生放线菌资源,本研究在前期研究的基础上,从本研究室保存的苦豆子内生放线菌中选择了 19 株抑菌高活性菌株作为试材,旨在利用苦豆子内生拮抗放线菌资源建立一套简便、快速、高效的抗生素产生菌分子筛选体系和抗生素色谱初步鉴定体系,为新菌源农用药物的分离和筛选提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种: 2010 年 6 月和 10 月,从宁夏白芨滩自然保护区采集的健康苦豆子中分离纯化内生放线菌,根据形态特征和 16S rRNA 基因序列分析对所测试的放线菌菌株进行归类。

1.1.2 培养基组成: 高氏 1 号培养基和发酵培养基的成分及配制参照文献[21]。

1.1.3 抗生素标准品: 麦迪霉素(Medecamycin, MDM)、乙酰螺旋霉素(Acetylspiramycin, AEM)、克拉霉素(Clarithromycin, CAM)、四环素(Tetracycline, TC)、土霉素(Oxytetracycline, OTC)、万古霉素(Vancomycin, VNM)、替考拉宁(Teicoplanin, TIL);麦迪霉素购自中国药品生物制品检定所,其它标准品均购自中国食品药品检定研究院;试验用水为屈臣氏蒸馏水。

1.1.4 引物: KSMA-F/KSMB-R: 5'-TAGCAATG GACCCACAGCAG-3'/5'-CCAGTACCGTGAGCCT CAAC-3'^[22]; PK II -KSF/PK II -KSR: 5'-ACCGGCT GCACSTCSGGSC-3'/5'-ACGTAGTCSAGGTGCG ASAC-3'^[23]; NRPS-A3/NRPS-A7R: 5'-GCSTACSY SATSTACACSTCSGG-3'/5'-SASGTCVCCSGTSC GGTAS-3'^[24], 由上海生工生物公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 苦豆子内生放线菌基因组 DNA 的提取: 放线菌 DNA 的提取参考姜淑梅等^[25]的改良酶法和 Lee 等的简单提取细菌 DNA 法^[26],并有所改进。取约 50 mg 菌体加入 500 μ L 含有溶菌酶的 1 \times TE 溶液(溶菌酶终浓度为 2 g/L),放入 37 $^{\circ}$ C 摇床 120 r/min 处理 1-2 h。加入 20% SDS 50 μ L 及蛋白酶 K (浓度为 20 mg/L) 5 μ L 振荡混匀 1 min,放入 55 $^{\circ}$ C 恒温金属浴中 30-60 min。加 500 μ L 苯酚:氯仿:异戊醇混合液(体积比为 25:24:1),振荡混匀,12 000 r/min 离心 10 min,上清液转管,重复抽提 3 次。然后加 500 μ L 异丙醇、80 μ L 3 mol/L 乙酸钠(pH 4.8-5.2)室温放置 10 min 以上。12 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,加 500 μ L 70%乙醇,轻摇洗涤 2 次,12 000 r/min 低温离心 5 min,弃乙醇。真空抽提干燥后加入 30 μ L 超纯水溶解 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 体外扩增 PKS I、PKS II、NRPS 基因片段: 反应体系(25 μ L): 2 \times PCR Mix 12.5 μ L; 引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L,; 模板 DNA (30 μ g/L) 1.0 μ L;

双蒸水补足至 25 μL , 做 3 个重复。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55–60 $^{\circ}\text{C}$ (依据引物的不同进行调整) 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。取 PCR 产物用 0.8% (质量体积比) 的琼脂糖电泳分析。

1.2.3 苦豆子内生放线菌阳性菌株发酵液的制备及其纯化: 无菌操作将 10^7 – 10^8 CFU/mL 的放线菌孢子悬液按 1% 的接种量接入 250 mL 发酵培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 7 d。

取 50 mL 放线菌发酵液置于离心管中, 8 000 r/min 离心 15 min, 将上清液和菌体分开放置; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存上清液, 取菌丝体加入 10 mL 80% 的丙酮浸取过夜, 8 000 r/min 冷冻离心 10 min, 取上清液真空浓缩除去丙酮后与之前离心冰箱保存的上清液合并, 加入等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 收集乙酸乙酯层在 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下使用旋转蒸发仪减压浓缩至 2–3 mL, 取出后分装 2 个 1.5 mL 离心管中, 移至气浴旋转蒸发仪内 50 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至干膏, 将所得干膏装入一个离心管内并加入 500 μL 甲醇使之溶解后用 0.45 μm 有机滤膜过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.4 抗生素标准品母液的配制: 准确称取 25 mg 抗生素标准品, 用甲醇配制成 5 g/L 的标准母液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 使用时以甲醇稀释至所需浓度, 并

用 0.45 μm 有机微孔滤膜过滤, 作为样品溶液。

1.2.5 TLC 法检测条件: 以硅胶 G 和 0.3% CMC-Na 铺板, 自然干燥后放入 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱活化 30 min; 展开剂: 二氯甲烷-甲醇 11:1 (体积比); TLC 显色与检测: 薄层自然挥尽溶剂后, 采用碘蒸汽熏蒸法显色。

1.2.6 HPLC 法检测条件: HPLC 体系 1: 流动相: 0.1% 甲酸-甲醇 (7:3); 检测波长: 261 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL 。该体系用于分离和检测乙酰螺旋霉素、万古霉素和替考拉宁。

HPLC 体系 2: 流动相: 0.1% 磷酸(A)-乙腈(B); 梯度洗脱程序: 0–10 min (10%–40% B), 10–13 min (40%–95% B), 13–15 min (95% B), 15–20 min (10% B); 检测波长: 261 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL 。该体系用于分离和检测麦迪霉素、克拉霉素、四环素和土霉素。

2 结果与分析

2.1 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因阳性菌株筛选

对 19 株苦豆子抑菌高活性内生放线菌进行 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因扩增, 共有 11 株菌株扩增结果为阳性, 得到了约 700 bp 的目标条带(图 1), 与理论值相符。

19 株测试菌中有 17 株属于链霉菌属, 2 株属于拟诺卡氏菌属。由表 1 可知, 含有 PKS I 基因的

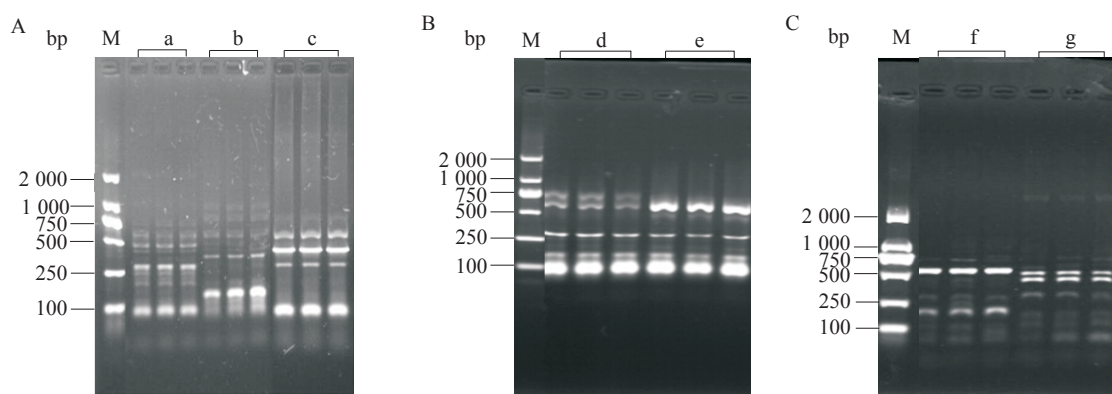


图 1 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因阳性菌株扩增图

Figure 1 Amplification figure of positive strains of PKS I, PKS II and NRPS genes

Note: A: Amplification figure of PKS I; B: Amplification figure of PKS II; C: Amplification figure of NRPS. M: DL2000 marker; a: NDZKDS₄₅; b: NDZKDS₄₆; c: HMJKDS₁₆; d: YWZKDS₃; e: NDZKDS₆₉; f: NDZKDS₄₅; g: NDZKDS₆₅.

表 1 苦豆子内生放线菌菌株鉴定及其抗生素合成基因筛选结果
Table 1 Identification and antibiotics synthesis genes screening of endophytic actinomycetes strains from *Sophora alopecuroides* L.

菌株 Strain	登录号 Accession No.	同源菌株 Closest type strain	一致性 Similarity (%)	PKS I	PKS II	NRPS
YWYKDS ₁₀	KP053722	<i>S. anulatus</i>	97.6	+	—	—
XKJKDS ₁₃	KJ128973	<i>S. lateritius</i>	98.2	+	—	—
XKJKDS ₁₅	KJ128979	<i>S. scabiei</i>	97.9	+	—	—
NDZKDS ₄₆	KJ506712	<i>S. werraensis</i>	98.5	+	—	—
BTJKDS ₂	KP053715	<i>S. lienomycini</i>	98.1	+	—	—
YWZKDS ₃	KP053721	<i>S. eurythermus</i>	99.1	+	+	—
NDZKDS ₄₅	KJ506726	<i>S. mutabilis</i>	98.7	+	—	+
HMJKDS ₁₆	KP053717	<i>S. paradoxus</i>	99.6	+	—	—
NDZKDS ₆₅	KP053718	<i>S. capillispiralis</i>	97.8	—	—	+
FJJKDS ₂₃	KJ128974	<i>S. violarus</i>	99.4	—	—	+
NDZKDS ₆₉	KP053719	<i>N. dassonvillei</i>	99.4	+	+	+
FJYKDS ₇	KJ506714	<i>S. plumbiresistens</i>	99.2	—	—	—
NDZKDS ₄₃	KP053716	<i>S. fulvissimus</i>	98.7	—	—	—
YWZKDS ₂	KJ506708	<i>S. olivaceus</i>	99.1	—	—	—
FJGKDS ₈	KJ506710	<i>S. werraensis</i>	98.8	—	—	—
YCZKDS ₄	KJ128982	<i>S. eurythermus</i>	97.6	—	—	—
YWZKDS ₄	KJ128982	<i>S. scabiei</i>	98.9	—	—	—
NDZKDS ₁	KP053720	<i>N. dassonvillei</i>	99.2	—	—	—
FJYKDS ₅	KJ506707	<i>S. fimicarius</i>	98.9	—	—	—

Note: +: Positive; —: Negative.

内生放线菌菌株有 9 株,阳性率为 47.4%;含有 PKS II 基因的放线菌菌株为 2 株, 阳性率为 10.5%; 含有 NRPS 基因的放线菌菌株为 4 株, 阳性率为 21.1%。值得注意的是菌株 YWZKDS₃同时具有 PKS I 和 PKS II 基因, 菌株 NDZKDS₄₅同时具有 PKS I 和 NRPS 基因, 而菌株 NDZKDS₆₉则同时具有 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因, 这 3 株菌很可能产生 2 种或者 3 种类型的抗生素。11 株阳性菌中有 10 株属于链霉菌属, 只有 1 株属于拟诺卡氏菌属。

2.2 TLC 法检测苦豆子内生放线菌阳性菌株产生抗生素类型

以麦迪霉素(MDM)标准样品作为对照, 经 TLC 检测这 11 株阳性菌的次生代谢产物都很丰富(图 2)。MDM 的 *R_f* 值为 0.49, 菌株 NDZKDS₆₉、

YWZKDS₁₀、BTJKDS₂、XKJKDS₁₅ 和 HMJKDS₁₆ 的发酵液中都有 1 个斑点的 *R_f* 为 0.49, 而菌株 YWZKDS₃、NDZKDS₆₅、NDZKDS₄₆、NDZKDS₄₅ 中各有一个斑点的 *R_f* 值与 MED 的 *R_f* 值有 0.01 的误差。除此之外菌株 NDZKDS₆₅、NDZKDS₆₉、YWZKDS₁₀ 和 BTJKDS₂ 的发酵液中都有一个斑点的 *R_f* 为 0.52, 初步判断是一种成分未知的次生代谢产物。

2.3 HPLC 法检测苦豆子内生放线菌阳性菌株产生抗生素类型

2.3.1 0.1%甲酸-甲醇体系检测抗生素: 利用乙酰螺旋霉素(AEM)、万古霉素(VNM)和替考拉宁(TIL)标准样品作为对照对 11 株菌进行 HPLC 检测(图 3A), 3 种标准品的出峰顺序依次为 VNM、AEM、

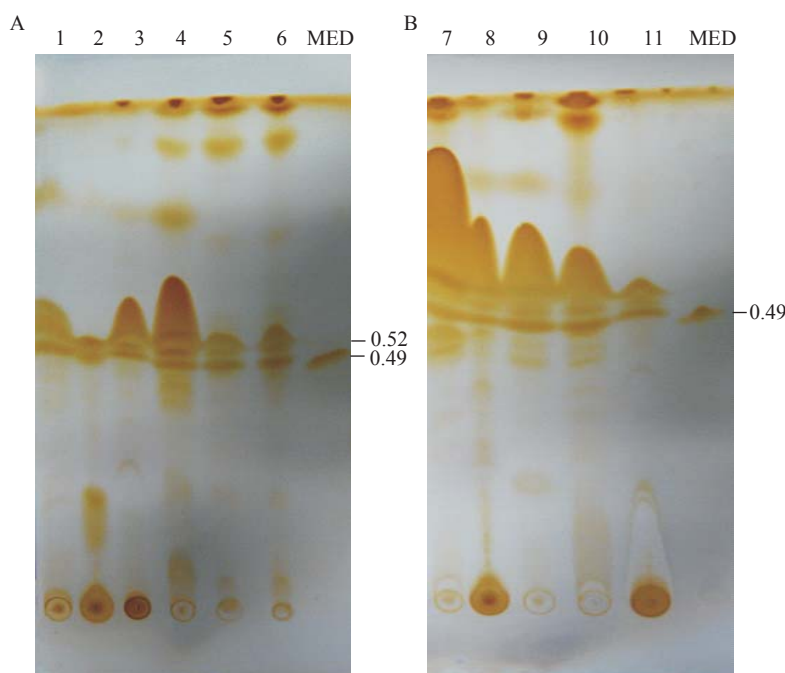


图 2 11 株苦豆子内生放线菌发酵液薄层色谱图

Figure 2 Thin-layer chromatogram of fermentation broth of 11 endophytic actinomycetes strains from *Sophora alopecuroides* L.

Note: 1: YWZKDS₃; 2: XKJKDS₁₃; 3: NDZKDS₆₅; 4: NDZKDS₆₉; 5: YWZKDS₁₀; 6: TJKDS₂; 7: XKJKDS₁₅; 8: NDZKDS₄₆; 9: NDZKDS₄₅; 10: FJ₅JKDS₂₃; 11: HMJKDS₁₆.

TIL。经 HPLC 检测菌株 NDZKDS₄₅ (图 3B)的发酵液中有 1 个峰的洗脱时间与 VNM 标准样品的洗脱时间一致,可初步判断这株菌可产生 VNM;菌株 YWZKDS₃ (图 3C)和 NDZKDS₄₆的发酵液中各有一个峰的洗脱时间与 AEM 标准样品的洗脱时间一致,可以初步判断这 2 株菌可产生 AEM;值得注意的是 NDZKDS₆₉ (图 3D)的发酵液中 2 个峰的洗脱时间分别与 AEM 和 TIL 标准样品的洗脱时间一致,由此可初步判断该菌株可同时产生这 2 种抗生素。除此之外,菌株 NDZKDS₄₅、YWZKDS₃ 和 NDZKDS₆₉ 的发酵液中都有一个峰的洗脱时间为 4.45 min (图 3 中 a 所示),初步判断是一种成分未知的次生代谢产物。

2.3.2 0.1%磷酸-乙腈体系检测抗生素: 利用麦迪霉素(MDM)、克拉霉素(CAM)、四环素(TC)、土霉素(OTC)标准样品作为对照对 11 株菌进行 HPLC 检测,4 种标准样品的出峰顺序依次为 OTC、TC、

MDM、CAM (图 4A)。经 HPLC 检测待测的 11 株菌中除菌株 NDZKDS₆₅ 和 FJ₅JKDS₂₃ 外其余 9 株菌的发酵液中都有一个峰的洗脱时间与 MDM 标准样品的洗脱时间一致,可以初步判断这 9 株菌都能产生 MDM。除此之外菌株 YWZKDS₃ (图 4B)的发酵液中还有两个峰的洗脱时间分别与 TC 标准样品和 CAM 标准样品的洗脱时间一致,初步判断该菌株可同时产生 MDM、TC 和 CAM;菌株 NDZKDS₆₉ (图 4C)的发酵液中还有一个峰的洗脱时间与 OTC 标准样品的洗脱时间一致,由此可以初步判断该菌株可同时产生 MDM 和 OTC;菌株 BTJKDS₂ (图 4D)的发酵液中有一个峰的洗脱时间与 CAM 标准样品的洗脱时间一致,可以初步判断该菌株可同时产生 MDM 和 CAM。除此之外菌株 YWZKDS₃、NDZKDS₆₉ 和 BTJKDS₂ 的发酵液中都有 2 个峰的洗脱时间分别为 14.25 min 和 15.10 min (图 4 中 b 和 c 所示),初步判断是两种成分未知的次生代谢产物。

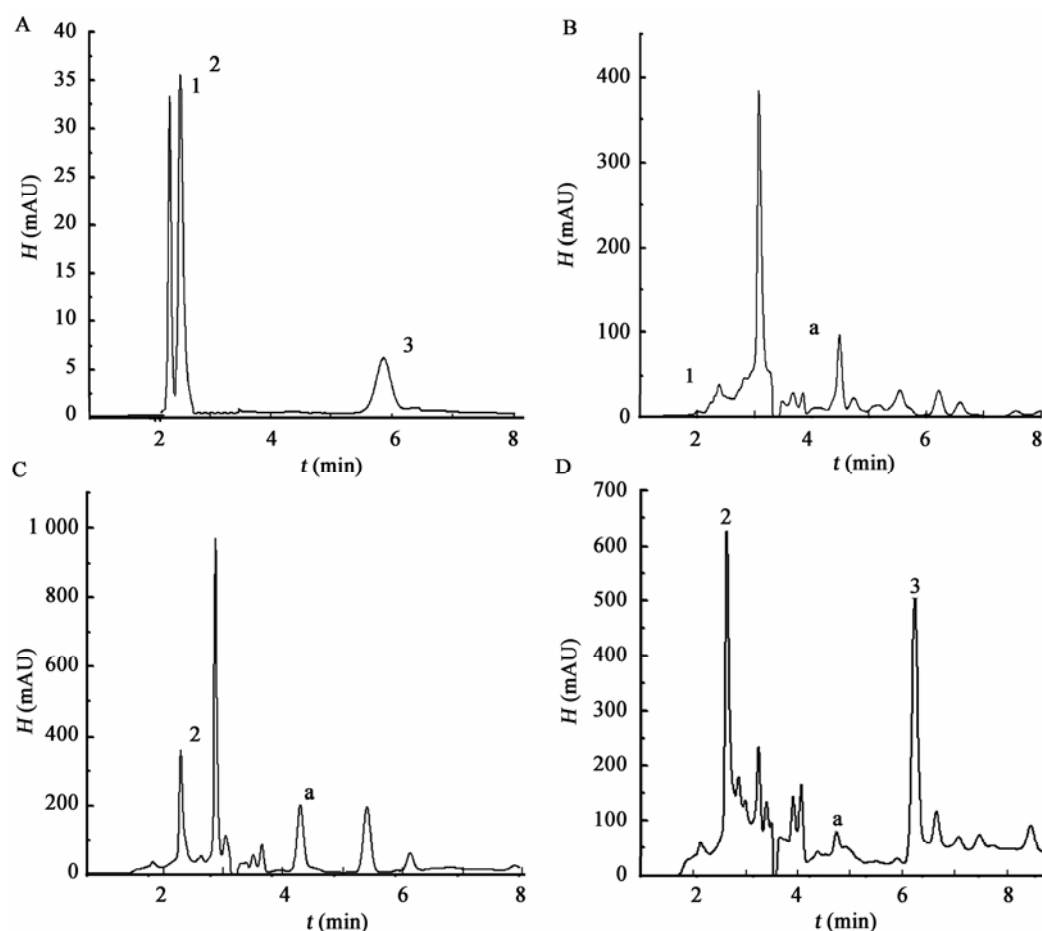


图3 3种抗生素标准样与3株苦豆子内生放线菌发酵液的HPLC图

Figure 3 HPLC chromatograms of 3 antibiotic standards and fermentation broth of 3 endophytic actinomycetes strains from *Sophora alopecuroides* L.

注：A：3种抗生素标准品；B：NDZKDS₄₅；C：YWZKDS₃；D：NDZKDS₆₉。1：万古霉素；2：乙酰螺旋霉素；3：替考拉宁。a：成分未知次生代谢产物。

Note: A: 3 Antibiotic standards; B: NDZKDS₄₅; C: YWZKDS₃; D: NDZKDS₆₉. 1: Vancomycin; 2: Acetylspiramycin; 3: Teicoplanin. a: Unknown component secondary metabolite.

3 讨论

本研究对 19 株苦豆子内生拮抗放线菌进行了 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因的筛选。得到阳性菌株 11 株，其中链霉菌属(*Streptomyces*) 10 株，拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*) 1 株。PKS I、PKS II 和 NRPS 基因菌株阳性率分别为 47.4%、10.5% 和 21.1%，总的阳性率为 57.9%。

放线菌中的链霉菌属(*Streptomyces*)是大环聚酮类化合物和芳香环聚酮类化合物的最丰富的菌

源^[4,27]，本研究中 11 株阳性菌中有 90.9% 的菌株都属于链霉菌属(*Streptomyces*)，这与文献报道相符。本研究中拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)菌株较少，只有 2 株，但是阳性菌株 NDZKDS₆₉ 同时具有 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因，表明拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)也可产生大环内脂类、芳香环类和非核糖体多肽类抗生素。在前期研究中^[19]菌株 YWZKDS₄ 具有广谱抗菌活性，但本研究发现该菌株不含 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因，而放线菌产生的抗菌次生代谢产物还有吩嗪类^[28-29]、卤化

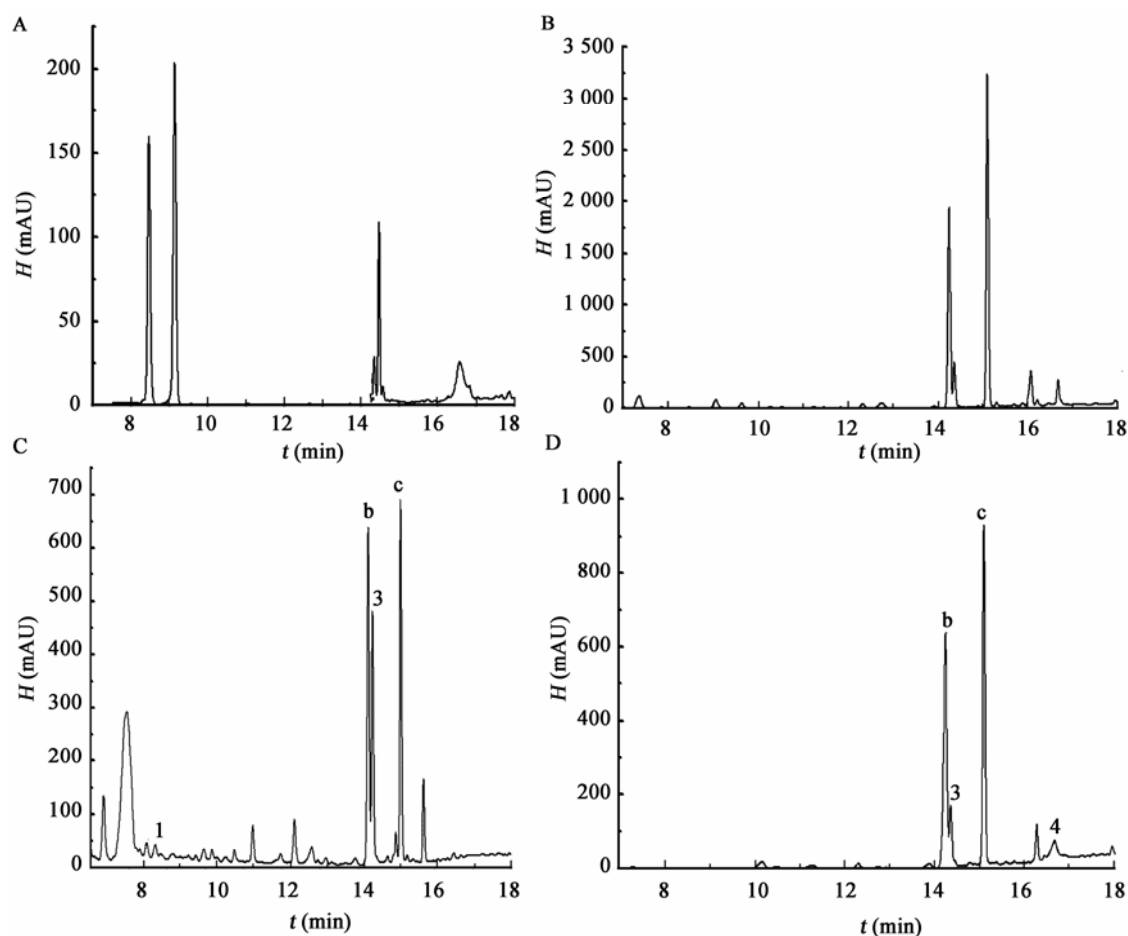


图4 4种抗生素标准样与3株苦豆子内生放线菌发酵液的HPLC检测色谱图

Figure 4 HPLC chromatograms of 4 antibiotic standards and fermentation broth of 3 endophytic actinomycetes strains from *Sophora alopecuroides* L.

注: A: 4种抗生素标准品; B: YWZKDS₃; C: NDZKDS₆₉; D: BTJKDS₂. 1: 土霉素; 2: 四环素; 3: 麦迪霉素; 4: 克拉霉素. b和c: 成分未知次生代谢产物.

Note: A: 4 Antibiotic standards; B: YWZKDS₃; C: NDZKDS₆₉; D: BTJKDS₂. 1: Oxytetracycline; 2: Tetracycline; 3: Medemycin; 4: Clarithromycin. b and c: Unknown component secondary metabolite.

物^[30]、萜环类、安莎类、寡糖类、核苷类和糖肽类等^[31-33]。所以菌株 YWZKDS₄很可能含有这些次生代谢产物中的某一个或者几个合成基因,有待于进行进一步的研究和探索。

宁夏白芨滩自然保护区属于典型的荒漠类型自然保护区,气候干旱少雨,蒸发量大,土壤类型以灰钙土和风沙土为主,自然植被以沙生植物为主,植被稀疏,单一。苦豆子作为一种典型的沙生植物,其干旱的天然生境使得其体内的环境并不适于微生物生存。本研究筛选得到的产抗生素菌株大

多属于链霉菌属(*Streptomyces*)中的白孢类群和烬灰类群,这些类群可能在苦豆子等沙生植物的抗逆性中发挥重要的作用。

在 TLC 展开剂的选择过程中,曾试用过石油醚-乙酸乙酯-甲醇(3:1:0.5, 体积比)展开剂,但苦豆子内生放线菌发酵液成分较为丰富和复杂,在该条件下不能得到很好的分离。之后选用二氯甲烷-甲醇展开剂,在经过不断的调试后最后确定当二氯甲烷-甲醇比例为 11:1 时展开效果最好。

本研究所选用的 7 种抗生素中,麦迪霉素、乙

酰螺旋霉素和克拉霉素属于大环内酯类抗生素(由 PKS I 合成途径合成), 四环素和土霉素属于芳香环类抗生素(由 PKS II 合成途径合成), 万古霉素和替考拉宁(TIL)属于非核糖体多肽类抗生素(由 NRPS 合成途径合成)。由于这 7 种抗生素; 化学性质不同, 很难在一个 HPLC 体系中得到很好的区分和测定, 因此我们采用了 0.1%甲酸-甲醇和 0.1%磷酸-乙腈两个体系来检测这 7 种抗生素; 并且磷酸-乙腈体系采用了梯度洗脱的方法, 在使用 0.1%甲酸-甲醇体系时出峰时间一致的乙酰螺旋霉素和万古霉素在该体系下得到了较好的区分和检测。2013 年葛云芝等^[34]对四环素、土霉素和金霉素进行 HPLC 测定时也使用了梯度洗脱程序, 得到了较好的区分和检测结果。

对 11 株阳性菌次生代谢产物进行 TLC 和 HPLC 检测时发现 9 株菌产生的抗生素种类很丰富。经初步检测 9 株菌都能产生麦迪霉素, 而菌株 YWZKDS₃ 发酵液中含有麦迪霉素、乙酰螺旋霉素、克拉霉素和四环素这 4 种抗生素成分, 菌株 NDZKDS₆₉ 发酵液中含有麦迪霉素、乙酰螺旋霉素、土霉素和替考拉宁这 4 种抗生素成分, 这与分子指纹图谱筛选结果一致。在进行 TLC 检测时我们也以乙酰螺旋霉素标准样品作为对照, 对 11 株阳性菌的次生代谢产物进行了检测, 结果发现乙酰螺旋霉素的 R_f 值为 0.29, 而菌株 YWZKDS₃ 和 NDZKDS₄₆ 的发酵液中都有一个模糊斑点的 R_f 为 0.29, 这一结论在使用 HPLC 进行检测时也得到了进一步验证。

大环内酯类、芳香环类和非核糖体多肽类抗生素的合成途径不同。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, 可形成的化合物数量极其庞大, 而结构的多样性导致了生物活性的多样性^[35-36]。苦豆子作为一种沙生药用植物, 其内生放线菌在和宿主共同进化的过程中及生物合成途径中很可能产生新的构件及其组合方式, 进而产生新的生物活性物质。本研究通过分子指纹图谱和化学指纹图谱的初步鉴定表明苦豆子内生放线菌次生代谢产物很丰富, 未来将这些有用产物开发应用于

生物防治领域, 可能会取得很好的效果, 这都有待于进行进一步的研究和探索。

参考文献

- [1] Liu BH, Cao YY, Yan JF, et al. Gene cluster of polyketide synthase for polyketides and drug screening[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(4): 30-33 (in Chinese)
刘炳辉, 曹远银, 闫建芳, 等. 聚酮类化合物生物合成基因簇与药物筛选[J]. 生物技术通报, 2008(4): 30-33
- [2] Fang J, Zhu P, Yan XJ. C-terminal thioesterase of nonribosomal peptide synthetases in peptide cyclization[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 29(7): 612-618 (in Chinese)
方剑, 朱鹏, 严小军. 非核糖体肽合成酶的末端硫酯酶与多肽环化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(7): 612-618
- [3] Xu P, Li WJ, Gao HY, et al. Study on biodiversity of type I & II polyketide synthesis genes positive microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(6): 821-827 (in Chinese)
徐平, 李文均, 高慧英, 等. 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[J]. 微生物学报, 2005, 45(6): 821-827
- [4] Xu P, Li WJ, Gao HY, et al. Molecular screening and distribution of aromatic polyketide antibiotics producers from Actinomycetes[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2005, 30(3): 134-137 (in Chinese)
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[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(3): 134-137
- [5] Chen LJ, Zhao W, Lin R, et al. NRPS gene screening of marine Actinomycetes[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2012, 24(9): 240-243 (in Chinese)
陈路劫, 赵薇, 林如, 等. 海洋放线菌 NRPS 基因的筛选[J]. 海峡药学, 2012, 24(9): 240-243
- [6] Zhu P, Zheng L, Lin J, et al. Screening and characterization of marine bacteria with antibacterial and cytotoxic activities, and existence of PKS I and NRPS genes in bioactive strains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(2): 228-234 (in Chinese)
朱鹏, 郑立, 林晶, 等. 抗菌和细胞毒性海洋细菌的筛选及其次生代谢基因证据[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 228-234
- [7] 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 Microbiology Ecology, 2005, 54(3): 401-415
- [8] Whitesides SK, Spotts RA. Frequency, distribution, and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees[J]. Phytopathology, 1991, 81(4): 453-457
- [9] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 491-502
- [10] Pullen C, Schmitz P, Meurer K, et al. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae[J]. Planta, 2002, 216(1): 162-167
- [11] Combs JT, Franco CMM, Loria RD. Complete sequencing and analysis of pEN2701, a novel 13-kb plasmid from an endophytic *Streptomyces* sp.[J]. Plasmid, 2003, 49(1): 86-92
- [12] Zhang WM, Zhang YM, Zhang T, et al. Studies on antibacterial and anti-inflammation effect of alkaloid of *Sophora alopecuroides* L.[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26(10): 82-85 (in Chinese)
张为民, 张彦明, 张涛, 等. 苦豆子生物碱抑菌抗炎作用研究[J]. 动物医学进展, 2005, 26(10): 82-85

- [13] Zhou FS, Mu Q. Chemical constituents and pharmacological activities of *Sophora alopecuroides* L.[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2006, 25(4): 1-3 (in Chinese)
周福生, 穆青. 野生植物苦豆子的化学成分和主要药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(4): 1-3
- [14] Li L, Zhang WX, Zhang SL. Research progress of immunoregulatory effect and mechanism of action of alkaloids from *Sophora alopecuroides* L.[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(4): F7-F8 (in Chinese)
李莉, 张文学, 张顺利. 苦豆子生物碱的免疫调节作用及其作用机制研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(4): 附7-附8
- [15] Gu PW, Hao L, Xu R, et al. Diversity analysis of endophytic actinomycetes isolated from *Sophora alopecuroides* L. of Lingwu Baijitan National Nature Reserve in Ningxia[J]. Journal of Ningxia University (Natural Science Edition), 2011, 32(4): 380-385 (in Chinese)
顾沛雯, 郝丽, 徐润, 等. 宁夏灵武白芨滩国家级自然保护区苦豆子内生放线菌区系分析[J]. 宁夏大学学报: 自然科学版, 2011, 32(4): 380-385
- [16] Shi W, Chen ZG. Development and utilize of *Sophora alopecuroides* L.[J]. Prataculture and Animal Husbandry, 2007(1): 57-59 (in Chinese)
史伟, 陈治国. 苦豆子的开发与利用[J]. 草业与畜牧, 2007(1): 57-59
- [17] Li YY, Feng JT, Zhang X, et al. Advance in research of chemical ingredients from *Sophora alopecuroides* L. and its bioactivities[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2005, 14(2): 133-136 (in Chinese)
李艳艳, 冯俊涛, 张兴, 等. 苦豆子化学成分及其生物活性研究进展[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 133-136
- [18] Mou XL, Wang WB, Ba H, et al. A review on the progress in the chemical compounds and pharmacology of *Sophora alopecuroides* L.[J]. Journal of Xinjiang Normal University (Natural Sciences Edition), 2005, 24(1): 45-50 (in Chinese)
牟新利, 王武宝, 巴杭, 等. 中药苦豆子化学成分及生理活性的研究进展[J]. 新疆师范大学学报: 自然科学版, 2005, 24(1): 45-50
- [19] Qi HX, Hu MJ, Wang L, et al. Screening and identification of antagonistic endophytic actinomycetes isolated from *Sophora alopecuroides* L.[J]. Northern Horticulture, 2014(8): 86-91 (in Chinese)
祁鹤兴, 胡美娟, 王丽, 等. 苦豆子内生拮抗放线菌的筛选及活性菌株鉴定[J]. 北方园艺, 2014(8): 86-91
- [20] Qi HX, Zhou XC, Hu MJ, et al. Diversity and distribution of endophytic actinomycetes strains in *Sophora alopecuroides* L. from Baijitan Nature Reserve of Ningxia[J]. Microbiology China, 2015, 42(6): 990-1000 (in Chinese)
祁鹤兴, 周星辰, 胡美娟, 等. 宁夏白芨滩自然保护区苦豆子内生放线菌多样性及其分布[J]. 微生物学通报, 2015, 42(6): 990-1000
- [21] Hu MJ. Endophytic actinomycete resources from *Sophora alopecuroides* L. and its evaluation of biocontrol effect[D]. Yinchuan: Doctoral Dissertation of Ningxia University, 2013: (in Chinese)
胡美娟. 苦豆子内生放线菌资源及其生防作用评价[D]. 银川: 宁夏大学博士学位论文, 2013
- [22] Ding R. Characterization of lipopeptide Pelgipeptins produced by *Paenibacillus elgii* B69 and the biosynthetic gene cluster[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2011 (in Chinese)
丁锐. 类芽孢杆菌 B69 中脂肽类化合物 Pelgipeptins 的分离鉴定及相关基因簇分析[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2011
- [23] Savic M, Vasiljevic B. Targeting polyketide synthase gene pool within actinomycetes: new degenerate primers[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33(6): 423-430
- [24] Gontang EA, Gaudêncio SP, Fenical W, et al. Sequence-base analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(8): 2487-2499
- [25] Jiang SM, Zhang L, Dai SK, et al. A quick and efficient method for genomic DNA extraction from Actinobacteria[J]. Biotechnology, 2007, 17(1): 39-41 (in Chinese)
姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 等. 一种简单、有效的适用于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 39-41
- [26] Lee SB, Tayler JW. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores[A]// Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. PCR Protocols. A Guide to Methods and Application[M]. San Diego, California: Academic Press, 1990: 282-287
- [27] Xu P, Li WJ, Zhang YG, et al. Molecular screening and distribution of polyketide antibiotics producers from Actinomycetes[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2003, 28(6): 321-324 (in Chinese)
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[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(6): 321-324
- [28] Huang XH, Li S, Tan ZJ, et al. Progress of study on endophytic Actinomycetes in plant[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(1): 42-46 (in Chinese)
黄晓辉, 李珊, 谭周进, 等. 植物内生放线菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(1): 42-46
- [29] Qu L, Liu HZ, Hu HB, et al. The biosynthesis of natural phenazine[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2010, 35(3): 168-174 (in Chinese)
屈丽, 刘宏志, 胡洪波, 等. 天然吩嗪化合物的生物合成[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(3): 168-174
- [30] Faulkner DJ. Marine natural products[J]. Natural Product Reports, 2002, 19(6): 1-49
- [31] Li ZQ, Jia YH, Yang DS. Diversity of antibiotics from rare Actinomycetes[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2013, 30(12): 1375-1384 (in Chinese)
李子强, 贾云宏, 杨殿深. 稀有放线菌产生抗菌药物的多样性[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(12): 1375-1384
- [32] Tian XP, Zhang S, Li WJ. Advance in marine actinobacterial research-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 161-169 (in Chinese)
田新朋, 张偲, 李文均. 海洋放线菌研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 161-169
- [33] Tian SZ, Liu K, Xu LH, et al. Advances in bioresources and secondary metabolites of halophilic actinobacteria[J]. Microbiology China, 2014, 41(9): 1882-1890 (in Chinese)
田守征, 刘凯, 徐丽华, 等. 嗜盐放线菌资源及次生代谢产物研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(9): 1882-1890
- [34] Ge YZ, Yu XB, Zhou GH, et al. Simultaneous determination of 3 tetracycline residues in chicken tissues by high-performance liquid chromatography[J]. Food Science, 2013, 34(10): 180-183 (in Chinese)
葛云芝, 于小波, 周光宏, 等. 高效液相色谱法同时测定鸡肉中3种四环素类抗生素残留[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 180-183
- [35] Chen LJ, Zhao W, Lian YY. Advances in polyketide synthases and drug screening[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2012, 37(9): 655-661 (in Chinese)
陈路劫, 赵薇, 连云阳. 聚酮合酶与药物筛选的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(9): 655-661
- [36] Feng JF, Zhou RC, Guo XT, et al. Polyketide and its application[J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2011(3): 24-26 (in Chinese)
冯健飞, 周日成, 郭兴庭, 等. 聚酮类化合物及其应用[J]. 现代农业科技, 2011(3): 24-26