

一株来源于海洋的抗肿瘤放线菌的分离鉴定

江红* 林如 张慧 谢阳

(福建省微生物研究所 福建省新药(微生物)筛选重点实验室 福建 福州 350007)

摘要: 从福建东海海滩土样品中分离到一株海洋放线菌 FIM02-523, 该菌株的发酵产物具有抗肿瘤活性。菌株 FIM02-523 在多数培养基上生长良好, 橙色-暗棕色, 无气生菌丝, 不产生可溶性色素。系统发育、化学分类特征、形态特征、生理生化特性等分析表明菌株 FIM02-523 是小单孢菌属(*Micromonospora*), 可能是模式菌种青铜小单孢菌(*Micromonospora chalcea*)的一个菌株。

关键词: 海洋放线菌, 小单孢菌属, 抗肿瘤活性, 系统发育

Isolation and Identification on One Marine Actinomycete Strain with Antitumor Activity

JIANG Hong* LIN Ru ZHANG Hui XIE Yang

(Fujian Provincial Key Laboratory of Screening for Novel Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou, Fujian 350007, China)

Abstract: One marine actinomycete strain FIM02-523 was isolated from marine soil in the East China Sea in Fujian Province. The fermentation broth of strain FIM02-523 exhibited potent antitumor activities. Strain FIM02-523 grew well on most media tested, the colonies were orange to dark brown but lacked aerial hyphae, no diffusible pigments were observed. Phylogenetic, chemotaxonomic, morphological analyses, physiological and biochemical characteristics demonstrated that strain FIM02-523 belong to the genus *Micromonospora*, may be a strain of the type species *Micromonospora chalcea*.

Keywords: Marine actinomycete, *Micromonospora*, Antitumor, Phylogenetic

微生物药物主要是由土壤微生物放线菌中的链霉菌产生的(约占总数的 45%)^[1]。但是近几年, 陆地微生物来源的新生物活性物质发现的速率明显减慢, 且从陆地微生物中重复分离已知化合物的几率在上升, 因此必须从不同于陆地的海洋等环境寻找新的菌源^[2]。海洋放线菌作为微生物药物新来源正日益被重视, 近年来已报道了一些来自海洋的放线菌新属、新种, 这些新属、新种均产生了新的结构新颖的生物活性次级代谢产物。2005 年报道的嗜盐产孢

菌(*Salinispora*)属放线菌生长依赖海水是小单孢菌科的一个新属, 目前已经确定了 3 个种热带嗜盐产孢菌(*Salinispora tropica*)、砂嗜盐产孢菌(*Salinispora arenicola*)^[3] 和太平洋嗜盐产孢菌(*Salinispora pacifica*)^[4], 该属菌株发酵粗提物具有广泛的生物活性^[5]。*Marinispora* 属也是专属海洋的链霉菌科的一个新属^[6], 该属菌株也产生了结构新颖的生物活性化合物。2004 年 Bister 等从日本海 289 米深的海底泥样中分离得到菌株 AB-18-032, 化学分类学及 16S

基金项目: 福建省自然科学基金计划资助项目(No. 2006J0079)

* 通讯作者: Tel: 86-591-83475544; E-mail: jianghong709@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-09-01; 接受日期: 2008-12-09

rRNA 基因序列分析表明菌株 AB-18-032 是稀有放线菌 *Verrucosipora* 属的一个新种, 该菌种产生多环聚酮类抗 MRSA 新抗生素 Abyssomicin C^[7]。

本实验室在筛选抗肿瘤抗生素过程中分离到一株海洋来源的放线菌菌株 FIM02-523, 从其发酵液中分离到脂肽类抗肿瘤抗生素 Rakicidins^[8]。2007 年国外报道该类化合物能特异性抑制乏氧肿瘤细胞的生长而日益引起人们的重视^[9]。本文报道该化合物产生菌 FIM02-523 的分离及其鉴定研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品: 土壤样品采集自中国东海(福建)。

1.1.2 培养基: 高氏琼脂培养基(%) : 可溶性淀粉 2, KNO₃ 0.1, K₂HPO₄·3H₂O 0.05, NaCl 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.05, CaCO₃ 0.1, 重铬酸钾 0.05, 多菌灵 0.1, 琼脂 1.5, 陈海水配制, pH 7.5(灭菌前)。

1.2 方法

1.2.1 放线菌分离: 称取湿海滩土样 3 g, 悬浮于 30 mL 0.05 mol/L pH 7.0 灭菌磷酸缓冲液, 混合均匀后, 加入 6%蛋白胨和 0.05%十二烷基硫酸钠(SDS), 于 50℃ 振荡 10 min 并用无菌生理盐水行 10 倍稀释至所需浓度。取稀释度为 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 的样品悬液各 1 mL 加至 20 mL 高氏琼脂培养基并倾入培养皿, 待琼脂凝固后, 倒置于 32℃ 培养箱培养 7 d~20 d。

1.2.2 形态培养特征和生理生化特性: 放线菌菌株的斜面培养物划线于高氏琼脂平板并斜插盖玻片于 32℃ 培养 5 d~20 d, 取出盖玻片用光学显微镜观察, 电子显微镜下观察孢子形态及外观, 培养特征采用国际链霉菌计划推荐的培养基进行培养特征描述^[10]。

1.2.3 细胞化学组分分析: 细胞壁化学组分分析采用王平的方法进行^[11]; 菌株磷酸类脂、枝菌酸和甲基萘醌的测定参照《放线菌研究及应用》^[12]; DNA 的 G+C mol%测定参照 De Ley^[13]等的 T_m 值方法。

1.2.4 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析: 菌株 DNA 酶解法提取, 得到的 DNA 样品储存于-20℃。上述 DNA 样品作为 DNA 模板进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增^[14]。PCR 产物送北京三博公司测序。16S rRNA 基因序列, 用 Blast 软件在 NCBI 进行序列比对搜索

相近菌株的序列, 系统进化分析用 Clustal X 软件^[15]进行比对, 生成的比对文件用 TREECON 软件^[16], 邻接法^[17]进行系统进化分析, 拓扑分析为 1000 次重复取样的结果。

2 结果与分析

2.1 放线菌分离及其抗肿瘤活性

从高氏琼脂分离平板上得到几十株放线菌, 在筛选抗肿瘤抗生素过程中发现菌株 FIM02-523 发酵液提取物具有抗肿瘤活性。经分离纯化得到的活性组分 3(FW02-523)与脂肽类化合物轻快菌素 B (Rakicidin B)同质^[18]。FW02-523 能够抑制肿瘤细胞生长, 对 K562 和 L929 肿瘤细胞株的半抑制浓度分别为 0.5 μg/mL 和 0.4 μg/mL。

2.2 菌株形态及培养特征

菌株 FIM02-523 在 ISP1、2、3、4、6 和高氏琼脂等培养基上生长良好, 在 ISP5 和 7 培养基上生长差, 均不产生可溶性色素。肉眼观察: 菌株 FIM02-523 无气生菌丝, 在高氏-天冬素琼脂平板上, 菌落圆形, 皱折突起成小山状, 边缘齐, 初期橙色, 成熟后褐黑色(孢子层); 在班氏琼脂平板上, 菌落圆形, 皱折突起, 边缘齐, 基丝橙色, 孢子层褐色, 油状, 发亮, 均无可溶性色素产生。

显微镜观察: 基内菌丝细长, 直或柔曲, 有分枝, 会断裂, 菌丝直径 0.3 μm, 单个孢子着生于基丝孢子梗上, 孢子有柄, 圆形或椭圆形, 孢子大小 (0.6~0.7) μm×(0.6~0.9) μm, 孢子外壁光滑(图 1)。

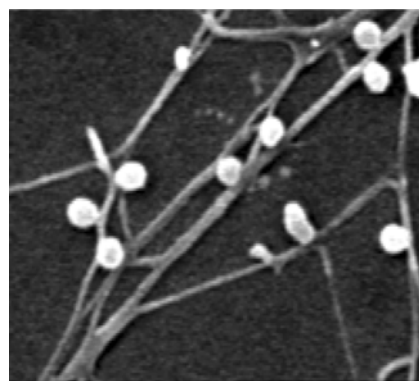


图 1 FIM02-523 的扫描电镜图(×10000 倍)

Fig. 1 Scanning electron micrograph of strain FIM02-523(10000×)

2.3 生理生化特性

菌株 FIM02-523 生长于 20℃~40℃ (最适 32℃),

45℃ 以上不生长, pH 范围 6~9(最适 7.0), 能耐受 3% 的 NaCl。能够使牛奶凝固胨化, 水解淀粉, 还原硝酸盐, 不液化明胶, 不产生黑色素及硫化氢。能利用 D-葡萄糖、D-果糖、蔗糖、蜜二糖和纤维二糖, 不利用 D-木糖、松三糖和菊糖(表 1)。

表 1 FIM02-523 与最相似模式菌种青铜小单孢菌 *M. chalcea* DSM 43026^T 的生理生化特性比较
Table 1 Comparison of physiological characteristic between strain FIM02-523 and *M. chalcea* DSM 43026^T

生理生化特性 Physiological characteristics	FIM02-523	青铜小单孢菌 <i>M. chalcea</i> DSM 43026 ^T
牛奶凝固 Milk solidation	+	+
牛奶胨化 Milk peptonization	+	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	+
淀粉水解 Amylohydrolysis	+	+
黑色素产生 Melanin generation	-	-
硫化氢产生 H ₂ S generation	-	ND
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+/-
D-葡萄糖利用 D-Glucose utilization	+	+
D-果糖利用 D-Fructose utilization	+	+
D-木糖利用 D-Xylose utilization	-	+
蔗糖利用 Sucrose utilization	+	+
蜜二糖利用 Melibiose utilization	+	+
纤维二糖利用 Cellobiose utilization	+	+
松三糖利用 Melezitose utilization	-	ND
菊糖利用 Inulin utilization	-	ND

注：+：阳性；-：阴性；ND：未检测。
Note: +: Positive; -: Negative; ND: Not determined.

2.4 细胞化学组分分析

菌株 FIM02-523 细胞壁化学成分 II 型, 含内消旋 2, 6-二氨基庚二酸(*meso*-DAP)和甘氨酸; 糖 D 型, 含木糖和阿拉伯糖; 磷酸类脂 PII 型(含磷脂酰乙醇胺 PE、双磷脂酰甘油 DPG); 甲基萘醌主要是 MK10(H₂), 还有少量 MK9(H₄)和 MK9(H₆); DNA 的

G+C mol%值为 73.4%。

2.5 基于 16S rDNA 基因序列的系统发育分析

菌株 FIM02-523 的 16S rRNA 基因序列长 1389 bp, 在 DNA 数据库 GenBank 登录号为 DQ126264。将菌株 FIM02-523 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中相关菌株进行同源性比较, 结果表明它与已知种青铜小单孢菌(*Micromonospora chalcea* DSM 43026^T)的 16S rRNA 基因序列同源性高达 99.6%。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析也显示小单孢菌菌株 FIM 02-523 与 *Micromonospora chalcea* DSM 43026^T 同在一个进化分支(图 2)。

2.6 分类鉴定结果分析

通过形态特征、培养特征和细胞化学组分分析的研究结果, 同时根据《伯杰细菌鉴定手册》^[17]对小单孢菌属放线菌的描述, 可将放线菌 FIM02-523 归属于小单孢菌属。16S rRNA 基因序列分析表明, 放线菌 FIM02-523 与目前所报道的已知模式菌种青铜小单孢菌 *Micromonospora chalcea* DSM 43026^T 的同源性最高, 达到 99.6%; 同时, 生理生化特征分析表明, 除了明胶液化和 D-木糖利用特征不同之外, 放线菌 FIM02-523 的生理生化特征也与青铜小单孢菌种极其相似(表 1)。由于小单孢菌属内各种之间的 16S rRNA 基因序列相似性高, 均在 98.0%~99.9%之间, 两个亚种 *Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora* 和 *Micromonospora echinospora* subsp. *ferruginea* 之间的 16S rRNA 基因序列相似性甚至达到 99.6%^[19-22], 因此根据我们的实验结果, 只能认为菌株 FIM02-523 很可能是与其亲缘关系最近的青铜小单孢菌 *M. chalcea* DSM 43026^T 的一个菌株。它的分类学地位还有待于将该菌株与青铜小单孢菌 *M. chalcea* DSM 43026^T 做进一步的平行实验和两者之间的 DNA-DNA 同源杂交, 才能给予其准确的分类学地位。

3 结论与讨论

菌株 FIM02-523 是从中国东海(福建)海滩土样品中分离到的产生抗肿瘤化合物 RakicidinB 的放线菌。它的 16S rRNA 基因序列与已知种青铜小单孢菌 *M. chalcea* DSM 43026^T 具有高度同源性; 除了明胶液化和 D-木糖利用特征不同之外, 其生理生化特征与它极其相似。但是只能认为菌株 FIM02-523 很可能是与其亲缘关系最近的青铜小单孢菌 *M. chalcea* DSM 43026^T 的一个菌株。它的准确分类

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

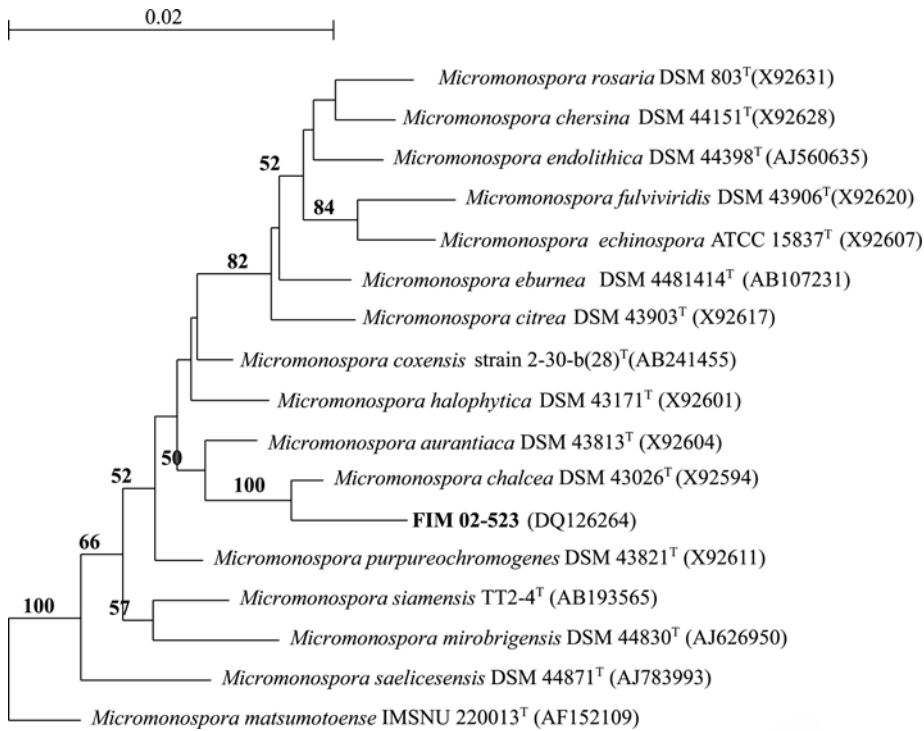


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic neighbour-joining tree based on the 16S rRNA gene sequences of strain FIM02-523 and other *Micromonospora* species

Note: Bootstrap values of above 50% are shown on the nodes; The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position.

学地位还有待于与青铜小单孢菌 DNA-DNA 同源杂交的结果。

已经报道的 Rakicidins 产生菌 *Micromonospora* sp. NO.R385-2 是 1995 年 McBrien 等从印度陆地土壤分离到的, 菌种未详细描述^[23], 无法与之进行比较。本实验室在进行放线菌产生的活性次级代谢产物筛选过程中发现还有 5 株放线菌也能产生 RakicidinB。分析了这 5 株放线菌的 16S rRNA 基因

序列, 发现 3 株菌的最相似模式菌种均为青铜小单孢菌, 但这 3 株菌分别来自山东、江苏和湖南的土壤; 还有两株来自福建不同采集地的菌种分别与橙黄小单孢菌 *Micromonospora aurantiaca* DSM 43813^T、柠檬小单孢菌 *Micromonospora citrea* DSM 43903^T 最相似(表 2)。上述结果表明 RakicidinB 产生菌地域分布广, 至少 3 个种的小单孢菌均能产生该化合物。

表 2 RakicidinB 产生菌的来源及最相似模式菌种

Table 1 The source and the closest type strain of Rakicidin B producing strains

菌种 Isolates	最相似模式菌种(相似性%) The closest type strain (Similarity %)	来源 Source
FIM02-523	青铜小单孢菌 <i>M. chalcea</i> (99.6)	福建东海海滩土 Marine soil in the East China Sea, Fujian province
FIM04-331	青铜小单孢菌 <i>M. chalcea</i> (99.6)	山东黄海滩土 Marine soil in Yellow Sea, Shandong province
FIM04-345	青铜小单孢菌 <i>M. chalcea</i> (99.7)	江苏湖底土 Lake soil in Jiangsu province
FIM05-127	柠檬小单孢菌 <i>M. citrea</i> (99.6)	湖南森林土 Forest soil in Hunan province
FIM99-359	橙黄小单孢菌 <i>M. aurantiaca</i> (99.0)	福建福州鼓山土 Soil in Mount Gu, Fuzhou, Fujian province

参 考 文 献

- [1] Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*, 2005, **58**(1): 1–26.
- [2] Bull AT, Stach JEM. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in Microbiology*, 2007, **15**(11): 491–499.
- [3] Maldonado LA, Fenical W, Jensen PR, *et al.* *Salinispora* gen. nov., sp. nov., *S. arenicola* sp. nov., and *S. tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**(9): 1759–1766.
- [4] Oh DC, Williams PG, Kauffman CA, *et al.* Cyanosporasides A and B, chloro- and cyano-cyclopenta [α] indene glycosides from the marine actinomycete "*Salinispora pacifica*". *Org Lett*, 2006, **8**(6): 1021–1024.
- [5] Tracy JM, Paul RJ, Christopher AK, *et al.* Widespread and persistent population of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(10): 5005–5011.
- [6] Jensen PR, Mincer TJ, Williams PG, *et al.* Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005, **87**(1): 43–48.
- [7] Riedlinger J, Reicke A, Zaehner H, *et al.* Biosynthetic capacities of actinomycetes: Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *J Antibiot*, 2004, **57**(4): 271–279.
- [8] 江 红, 林 如, 郑 卫, 等. 海洋青铜小单孢菌 FIM02-523 产生的脂肽类化合物 FW523 的分离鉴别和生物学活性. *中国抗生素杂志*, 2006, **31**(5): 267–270.
- [9] Yamazaki Y, Kunimoto S, Ikeda D. Rakicidin A: A hypoxia-selective cytotoxin. *Biol Pharm Bull*, 2007, **30**(2): 261–265.
- [10] Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a new hierarchic classification system *Actinobacteria* classes nov. *Int J Sys Bacteriol*, 1997, **47**(4): 479–491.
- [11] 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. *微生物学通报*, 1986, **13**(5): 228–231.
- [12] 阮继生, 刘志恒, 梁丽糯, 等. 放线菌研究及应用. 北京: 科学出版社, 1990, pp.96–138.
- [13] De LJ, Cattoir H, Reynaerts A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem*, 1970, **12**(1): 133–142.
- [14] Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequence. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, **45**(2): 240–245.
- [15] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(24): 4876–4882.
- [16] Yves VP, Rupert DW. TREECON for windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the microsoft windows environment. *Comp Appl Biol Sci*, 1994, **10**(5): 569–570.
- [17] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**(4): 406–425.
- [18] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984, pp.1185–1198.
- [19] Koch C, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E. Intra-generic relationships of the actinomycete genus *Micromonospora*. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, **46**(2): 383–387.
- [20] Zhao H, Kassama Y, Young M, *et al.* Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of Fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 6619–6627.
- [21] Thawai C, Tanasupawat S, Itoh T, *et al.* *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. *Int J System Evol Microbiol*, 2005, **55**(1): 417–422.
- [22] Maldonado LA, Stach JEM, Ward AC *et al.* Characterisation of *Micromonosporae* from aquatic environments using molecular taxonomic methods. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2008, **94**(2): 289–298.
- [23] McBrien KD, Berry RL, Lowe SE *et al.* Rakicidins, new cytotoxic lipopeptides from *Micromonospora* sp. fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot*, 1995, **48**(12): 1446–1452.