

## 刺五加内生放线菌株 13-85 抗菌活性研究及菌种鉴定

王 卫<sup>1</sup>, 王 彬<sup>1</sup>, 徐红艳<sup>1</sup>, 邢朝斌<sup>2</sup>, 袁丽杰<sup>1\*</sup>

1. 华北理工大学基础医学院, 河北省慢性疾病重点实验室, 唐山市慢性病临床基础研究重点实验室, 河北 唐山 063000
2. 华北理工大学生命科学院, 河北 唐山 063000

**摘要:** 目的 研究刺五加内生放线菌株 13-85 抑菌活性及活性稳定性, 检测菌株活性物质合成相关功能基因, 对菌株进行鉴定。方法 采用平板纸片法测定菌株抑菌活性及发酵液稳定性; PCR 扩增其活性物质合成相关功能基因片段 (PKS I、PKS II、NRPS、Halo、CYP), 克隆并测序分析。通过菌株表型特征及分子特征对其鉴定。结果 菌株 13-85 发酵液具有广谱较强的抗病原菌活性, 抑菌活性较为稳定; 菌株基因组含有 PKS II、NRPS 基因。经比对, PKS II 片段与已知 *Streptomyces fradiae* PKS 序列 (登录号 AFO70128.1) 相似度为 89%, NRPS 片段与 *Streptomyces virginiae* NRPS 序列 (登录号 WP\_033225509.1) 相似度达 95%。菌株 13-85 与 *Streptomyces amrirsarensis* (登录号 GQ906975) 16 S rRNA 基因序列相似率高达 99.65%。结论 菌株 13-85 发酵液有较为广泛的抑菌活性且稳定性较好, 菌株含有 PKS II、NRPS 基因, 初步鉴定该放线菌为链霉菌属有效发表种 *Streptomyces amrirsarensis* 的一个菌株, 具进一步开发应用价值。

**关键词:** 刺五加; 内生放线菌; 抑菌活性; PKS II; NRPS; 鉴定

中图分类号: R282.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)02-0356-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.02.023

## Antimicrobial activity and identification of endophytic actinomycetes strain 13-85 isolated from *Acanthopanax senticosus*

WANG Wei<sup>1</sup>, WANG Bin<sup>1</sup>, XU Hong-yan<sup>1</sup>, XING Chao-bin<sup>2</sup>, YUAN Li-jie<sup>1</sup>

1. Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan Key Laboratory for Preclinical and Basic Research on Chronic Diseases, School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China
2. College of Life Science, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China

**Abstract: Objective** To studies the antimicrobial activity and stability of fermentation extracts produced by endophytic actinomycete strain 13-85 from *Acanthopanax senticosus*; Secondary metabolite biosynthesis genes were detected. Meanwhile, the strain was identified. **Methods** Paper disc diffusion method was used to test the antimicrobial activity and stability of strain 13-85, the biosynthesis genes (PKS I, PKS II, NRPS, Halo, and CYP) were obtained by PCR, and sequences were analyzed. The strain was identified by phenotypic characteristics and molecular characteristics. **Results** The fermentation broth of the strain showed broad-spectrum, strong activity, and stability against pathogenic microbes. The strain contains PKS II gene and NRPS gene. The PKS II sequence had 89% homology compared with *Streptomyces fradiae* PKS gene (Accession Number: AFO70128.1). The NRPS gene sequence had 95% homology with *S. virginiae* NRPS gene (Accession Number: WP\_033225509.1). The sequence of 16S rRNA of the strain had 99.85% homology with *S. amrirsarensis* (Accession Number: GQ906975). **Conclusion** Metabolites of the actinomycete strain 13-85 with broad-spectrum antibacterial activity and better stability, have a value for development and application. The strain 13-85 was identified as *Streptomyces amrirsarensis*, a valid species of genus *Streptomyces*.

**Key words:** *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms (Goka); endophytic actinomycetes; antimicrobial activity; PKSII; NRPS; identification

目前全球范围随着耐药菌株的不断出现, 寻找新的菌株、新的抗菌活性物质迫在眉睫。如今人们所使用的抗生素绝大部分是放线菌和真菌产生的天

然产物及其衍生物<sup>[1]</sup>, 由于从土壤环境中分离筛选产生新天然活性物质的放线菌日益困难, 人们逐渐把目光投向之前较少研究的微生物特殊栖息环境如

收稿日期: 2016-09-13

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (C2014209137)

作者简介: 王 卫 (1992—), 女, 硕士研究生, 主要从事放线菌分离、鉴定以及活性研究。E-mail: weixiaoweio@126.com

\*通信作者 袁丽杰 (1970—), 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事放线菌分离、鉴定以及活性研究。E-mail: yuanlijie1970@163.com

植物内部<sup>[2]</sup>，以期寻找可产生新活性物质的放线菌资源。

植物内生放线菌(endophytic actinobacteria)是指那些其生活史的一定或全部阶段生活于健康植物组织内部，而不使宿主植物表现出明显感染症状的放线菌<sup>[3]</sup>。其广泛分布于植物的根、茎、叶、花、果实、种子中。按照“内共生理论”，内生菌可能产生与其宿主相同或相似的代谢产物<sup>[4]</sup>。因此，从药用植物中分离放线菌资源，并从中分离具有与药用植物相类似作用的天然活性物质，用其来代替药用植物，不仅可以减少药用植物资源的过度开发，而且为新药的研发提供了新的途径。研究表明，从药用植物内部筛选得到的放线菌产生的活性物质具有多种生物活性，据 Hasegawa 等<sup>[5]</sup>报道从龟背竹属植物分离得到的内生放线菌产生了新的抗生素，且具有良好的抗菌活性；李桂玲<sup>[6]</sup>从三尖杉等植物中分离到能产生抗肿瘤物质的内生真菌；蔡爱群等<sup>[7]</sup>分析了水稻内生放线菌具有的纤维素酶、木聚糖酶和果胶酶活性，植物内生菌在新药物筛选上显示出广阔的应用前景。

刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms (Goka) 来源于五加科 (Araliaceae) 五加属 *Acanthopanax* (Decne. & Planch.) Miq.，是我国北方地道药材，具有抗菌、抗肿瘤等多种作用<sup>[8-9]</sup>，按照“内共生理论”推测刺五加内生放线菌也可能产生具有类似活性的代谢产物。为此，本课题组深入挖掘了刺五加内生放线菌资源，在菌株抑菌活性初筛后，发现了具有较好抑菌活性的菌株 13-85。

本实验对该菌株发酵液的抑菌活性及稳定性进行评价；检测活性物质合成相关功能基因并对菌株进行分类鉴定，旨在为该菌株的后续研究及开发奠定基础，进一步丰富放线菌次级代谢产物合成相关基因数据库，为刺五加内生放线菌资源的开发利用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 菌株

供试放线菌：内生放线菌 13-85 分离自野生刺五加植株根部。25%甘油管置于-80 °C 冰箱保藏。

供试检定菌：金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn 1872、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula 1920、大肠埃希菌 *Escherichia coli* (Migula) Castellani et

Chalmers、草分枝杆菌 *Mycobacterium phei* Lehmann & Neumann、耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium smegmatis* Lehmann & Neumann、白色念珠菌 *Candida albicans* (C. P. Robin) Berkhout、大肠埃希菌耐药菌株 *E. coli* ATCC35218、金黄色葡萄球菌耐药菌株 (MRSA12-1、MRSA ATCC43300) 由中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究解云英副研究员、孙承航研究员提供。

### 1.2 培养基

发酵培养基：可溶性淀粉 20.0 g、葡萄糖 5.0 g、蛋白胨 5.0 g、酵母膏 5.0 g、牛肉膏 5.0 g、黄豆饼粉 10.0 g、玉米浆 4.0 g、CaCO<sub>3</sub> 4.0 g、CoCl<sub>2</sub> (0.02%) 1.0 mL、去离子水 1 000 mL (pH 7.2)，121 °C 高压灭菌 30 min。

## 2 方法

### 2.1 发酵液制备

菌株 13-85 接种于 ISP2 培养基上 28 °C 活化 7 d 后，转接至三角烧瓶中（发酵培养基装液量为三角烧瓶体积的 1/5）28 °C、180 r/min 振荡培养 4 d。发酵产物经 12 000 r/min 离心 10 min，取上清备用。

### 2.2 抑菌谱测定

**2.2.1 检定菌制备** 将检定菌接种于营养琼脂培养基斜面置于 37 °C 恒温箱（白色念珠菌置于 28 °C、耻垢分枝杆菌置于 35 °C）培养 1 d，待生长良好后用 25% 甘油吹打制成菌悬液备用。

**2.2.2 抑菌活性测定** 采用平板纸片法<sup>[10]</sup>，对供试放线菌进行抑菌谱测定。将检定菌菌悬液用生理盐水分别对各指示菌菌液进行梯度稀释，稀释至浓度约为  $1 \times 10^8$  cfu/mL，取上述各种菌悬液 0.1 mL 于无菌平皿中，然后倒入已冷却至 55 °C 的高压灭菌后的培养基 15 mL，充分混匀在适当位置贴上已灭菌的滤纸片 ( $\Phi=5$  mm)，然后分别吸取发酵液 30  $\mu$ L 置于滤纸片上，同时以发酵纯培养基作阴性对照。将不同带菌平板置 37 °C 恒温箱（白色念珠菌置于 28 °C、耻垢分枝杆菌置于 35 °C）培养 18~24 h。平行试验重复 3 次，十字交叉法测量抑菌圈直径。

### 2.3 发酵液稳定性研究

以抑菌谱测定结果为参照，以发酵液原液为对照，分别测定发酵液在不同光照、温度及酸碱条件下活性组分的稳定性。①将发酵液在室温光照条件下放置 24、48、72、96 h；②将发酵液于 40、60、80 °C 分别处理 2 h，冷却至室温；③将发酵液分别

调 pH 值至 2、4、6、8、10, 4 °C 放置 8 h 后再回调到原始 pH 值, 分别测定抑菌圈。各处理重复 3 次。

#### 2.4 菌株 13-85 总 DNA 提取

采用 Chelex-100 法<sup>[11]</sup>提取基因组 DNA, 作为功能基因检测及 16 S rRNA 序列扩增模板, 置于 -20 °C 保存备用。

#### 2.5 功能基因序列扩增及克隆

**2.5.1 功能基因检测** 次级代谢产物合成的相关功能基因片段的扩增引物参照文献报道 (PKS I<sup>[12]</sup>、PKS II<sup>[13]</sup>、NRPS<sup>[14]</sup>、Halo<sup>[15]</sup>、CYP<sup>[16]</sup>), 扩增产物 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳电压为 110 V, 时间 30 min。

**2.5.2 阳性功能基因克隆测序及分析** 将 PCR 产物电泳选择阳性功能基因片段切胶回收, 与 pGM-T 载体连接, 再进行质粒转化, 将转化的感受态细菌涂布在含有相应氨基苄抗生素的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 16 h 后挑取单克隆, 37 °C 摇菌 3 h 后进行菌液 PCR 鉴定, 选择阳性克隆提取质粒后送至上海英潍捷基生物技术公司进行测序。

登录 NCBI 官网 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>), 使用 VecScreen 程序去除测序中载体序列; 使用 DNAMAN8.0 软件将目的核酸序列转换为氨基酸序列; 最后利用 BLASTp 程序进行氨基酸序列同源性比对。

#### 2.6 菌株鉴定

**2.6.1 形态学观察** 采用 ISP2 培养基于 28 °C 条件下进行埋片培养<sup>[16]</sup>, 培养 7、14 d 分别取出埋片, 用光学显微镜观察基内菌丝、气生菌丝的形态特征, 扫描电镜观察孢子丝及孢子形态特征。

**2.6.2 培养特征** 参照国际链霉菌计划<sup>[17]</sup>选用培养基 ISP2、ISP3、ISP4、ISP5、ISP7、察氏琼脂、马铃薯浸汁琼脂、营养琼脂接种, 28 °C 培养 7、14、21、28 d 后分别观察记录基内菌丝、气生菌丝的生长情况及可溶性色素。

**2.6.3 生理生化特征** 检测 pH 值、盐浓度和温度耐受性、唯一碳源、氮源利用、明胶液化、牛奶凝固与胨化、纤维素水解、硝酸盐还原、H<sub>2</sub>S 的产生、淀粉水解、尿素的利用、氧化酶的产生等指标, 利用北京陆桥微生物生化微量鉴定管获得唯一碳源及酶特性指标。实验方法参照《放线菌系统学—原理方法及实践》<sup>[18]</sup>和《链霉菌鉴定手册》<sup>[19]</sup>。

**2.6.4 16 S rRNA 序列测定及分析** 16 S rRNA 序

列扩增引物: PA 为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-AG-3'; PB 为 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 反应总体积 50 μL。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 1 min, 54 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。产物测序由上海英潍捷基生物技术公司完成。依据测序结果, 在 EzTaxon database 核酸数据库中进行菌株 16 S rRNA 基因序列比对。选取相似性较高菌株序列, 用 ClustalX 和 MEGA 4.0 软件包采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 进行聚类分析系统进化树构建, 拓扑结构分析采用 1 000 次重复取样。

### 3 结果与分析

#### 3.1 菌株 13-85 抑菌活性

菌株 13-85 发酵液对 10 种检定菌均有一定的抑菌活性, 对耻垢分枝杆菌的抑菌圈直径高达 (25.3 ± 0.6) mm, 除对铜绿假单胞菌抑菌效果较差外, 其余菌株抑菌圈直径均大于 13 mm (表 1)。

表 1 菌株 13-85 发酵液抑菌活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Antibacterial activity of fermentation broth of strain 13-85 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

测试菌株	抑菌圈直径/mm
金黄色葡萄球菌	14.5 ± 0.5
MRSA 12-1	13.1 ± 0.4
MRSACTT43300	14.3 ± 0.2
枯草芽孢杆菌	17.9 ± 0.3
草分枝杆菌	16.8 ± 0.2
大肠埃希菌	18.5 ± 0.3
大肠埃希菌 ATCC35218	19.3 ± 0.2
铜绿假单胞菌	10.5 ± 0.3
耻垢分枝杆菌	25.3 ± 0.6
白色念珠菌	16.9 ± 0.2

#### 3.2 放线菌 13-85 菌株发酵液稳定性

检定菌中选择耐药菌株 (*E. coli* ATCC35218、MRSA12-1、MRSA43300)、真菌白色念珠菌 *Candida albicans* (C. P. Robin) Berkhout、分枝杆菌草分枝杆菌 *Mycobacterium phlei* Lehmann & Neumann 以及抑菌效果较弱的铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula 作为稳定性测定的指示菌。

**3.2.1 光照稳定性** 将菌株发酵液放置在室温条件下光照处理 24~48 h, 发酵液抑菌活性基本没有变化; 处理 48 h 后发酵液对铜绿假单胞菌和草分枝杆菌抑制作用明显下降 (图 1-A); 72 h 时对

大肠杆菌耐药菌株 (*E. coli* ATCC35218) 抑菌活性略微降低; 说明菌株发酵液在室温光照条件下较为稳定。

**3.2.2 温度条件稳定性** 发酵液在 4~20 °C 抑菌活性稳定, 30 °C 以后, 随着温度的升高抑菌活性出现小幅降低, 70 °C 后抑制活性明显下降, 对耐药大肠杆菌 *E. coli* ATCC35218 抑菌圈从 20 °C 的 18.33 mm 降至 11.00 mm, 对铜绿假单胞菌抑制作用消失

(图 1-B)。因此, 在分离提纯发酵液中活性物质时, 温度控制在 4~30 °C 效果最佳。

**3.2.3 酸碱稳定性** 菌株 13~85 原始发酵液 pH 为 7.5, 当发酵液 pH 值为 2~10 时, 对供试耐药菌株及草分枝杆菌抑制作用无显著变化, 但当 pH 小于 4 和大于 8 时, 对铜绿假单胞菌抑制活性明显下降至消失。因此, 将 pH 值控制在 4~8 对于发酵液中活性物质分离纯化最有利 (图 1-C)。

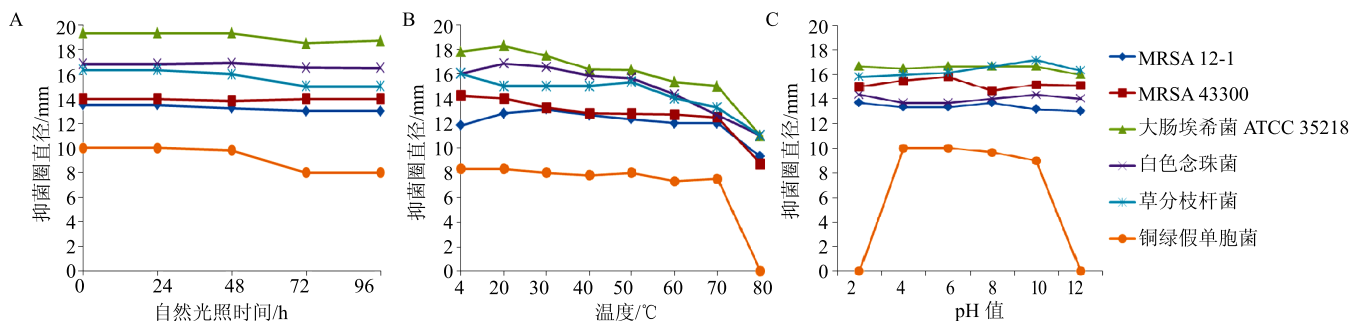


图 1 菌株 13-85 发酵液在不同条件下抑菌活性变化

Fig. 1 Stability of fermentation broths of 13-85 under different conditions

### 3.3 菌株 13-85 功能基因

菌株 13-85 功能基因 PCR 扩增结果见图 2, 分别得到 PKS II 基因及 NRPS 基因扩增产物。克隆测序得到 PKS II 基因长度为 613 bp, 编码 203 个氨基酸, 经 BLASTp 比对与 Genbank 数据库中费氏链霉菌 *Streptomyces fradiae* 聚酮合酶 (PKS) 部分结构域同源性为 89%; 非核糖体肽合成酶 (NRPS) 基因序列长度为 712 bp, 编码 236 个氨基酸, 经 BLASTp 比对与 Genbank 数据库中 *Streptomyces virginiae* 的 NRPS 同源性高达 95%, 表明所克隆核苷酸序列是 PKSII 和 NRPS 结构域基因序列。

### 3.4 菌株 13-85 分类鉴定

**3.4.1 菌株 13-85 形态特征** 菌株 13-85 在 ISP2 培养基生长良好 (图 3), 菌落坚实致密, 菌落表面干

燥有褶皱, 气生菌丝丰富呈灰白色。孢子链长, 孢子成圆柱状, 表面向内凹陷 (图 4)。

**3.4.2 菌株 13-85 培养特征** 菌株 13-85 在 ISP2、ISP3、ISP4、ISP7 以及马铃薯浸汁琼脂中生长良好, 基内菌丝丰富, 通常呈乳白色至黄色或棕黄色。在多数培养基上出现大量白色或灰白色气生菌丝, 如 ISP2、ISP3 和葡萄糖-天冬酰胺琼脂培养基, 在部分供试培养基上可以产生可溶性色素。在不同培养基

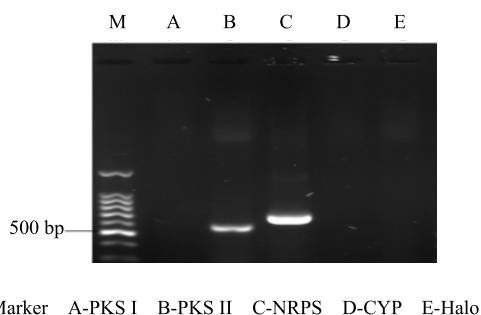


图 2 菌株 13-85 功能基因电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of strain 13-85 functional genes



图 3 菌株 13-85 在 ISP2 培养基上的生长状况  
Fig. 3 Cultural of strain 13-85 on ISP2 media

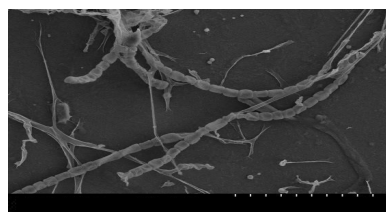


图 4 扫描电子显微镜观察菌株 13-85 孢子丝  
Fig. 4 Spore hyphae of strain 13-85 on ISP2 medium scanned by SEM

上的生长情况见表 2。

**3.4.3 生理生化特征** 菌株 13-85 在 pH 值 6.0~8.5 条件下均可生长, 最适 pH 为 7.5~8.0; 生长温度范围为 15~45 °C, 28 °C 生长状态最好; 菌株 13-85 在 NaCl 为 0~3% 培养基上生长; 菌株能够使牛奶凝固, 过氧化氢酶阳性, 不产生脲酶、氧化酶、H<sub>2</sub>S; 能够以葡萄糖、果糖、肌醇、乳糖等为碳源生长; 所测试氮源中能够利用酪蛋白、L-谷氨酸、L-甲硫氨酸、L-丙氨酸、DL-丙氨酸等 (表 3)。

**3.4.4 16 S rRNA 序列测定结果与进化树构建** 测得

菌株 13-85 16 S rRNA 序列全长 1 440 bp, 在 EzTaxon database 核酸数据库比对, 发现菌株 13-85 与链霉菌属 *Streptomyces* 菌株高度相关, 是链霉菌属的成员。选取比对后相似性较高的菌株, 经 MEGA4.0 分析构建的统进化树 (图 5), 菌株 13-85 与该属的典型菌株 *Streptomyces amritsarensis* 2A<sup>T</sup> 以极高的基因序列相似性 (99.65%) 聚于一个系统进化分支上, 结合形态特征、生理生化特征及系统发育树分类鉴定结果, 初步将菌株 13-85 鉴定为链霉菌属有效发表种 *Streptomyces amritsarensis* Sharma<sup>[20]</sup> 的 1 个菌株。

表 2 菌株 13-85 的培养特征

Table 2 Cultural characteristics of strain 13-85 on different media

培养基	基内菌丝	气生菌丝	可溶性色素	生长情况
ISP2	黄棕色	灰白色	无	好
ISP3	浅灰色	浅灰色	淡黄色	好
ISP4	乳白色	白色	无	好
ISP5	浅黄色	无	无	差
ISP7	黄棕色	白色	淡黄色	好
察氏琼脂	乳白色	无	无	差
葡萄糖-天门冬酰氨琼脂	乳白色	灰白色	无	好
马铃薯浸汁琼脂	棕色	灰白色	无	好
营养琼脂	浅黄色	无	无	差

表 3 菌株 13-85 生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain 13-85

碳源	效果	氮源	效果	酶活性	效果
阿拉伯糖	-	甘氨酸	+	牛奶凝固与胨化	+
果糖	+	酪素	+	明胶液化	-
甘露醇	-	L-谷氨酸	+	硝酸盐还原	-
甘露糖	-	L-甲硫氨酸	-	淀粉水解	-
棉子糖	-	L-丙氨酸	+	产生 H <sub>2</sub> S	-
肌醇	+	次黄嘌呤	-	纤维素水解	-
乳糖	+	DL-丙氨酸	+	过氧化氢酶	+
卫矛醇	-	L-酪氨酸	+	氧化酶	-
纤维二糖	+	DL-天冬氨酸	+	脲酶	-
半乳糖	+	L-组氨酸	+		
蔗糖	+	L-苏氨酸	+		
麦芽糖	+	L-丝氨酸	+		
核糖	-	L-半胱氨酸	-		
甘油	+	鸟嘌呤	+		
鼠李糖	+	色氨酸	+		
山梨醇	-	L-赖氨酸	+		
木糖	+	L-苯丙氨酸	+		

“+” - 阳性 “-” - 阴性

“+” - positive “-” - negative

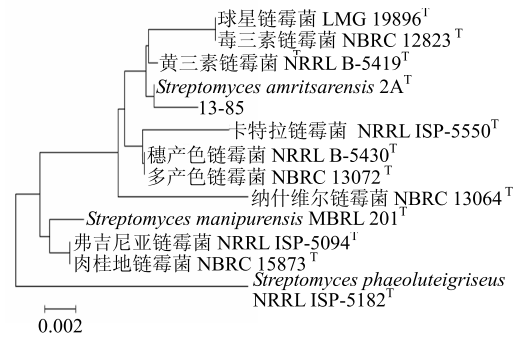


图 5 菌株 13-85 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain 13-85 based on 16 S rRNA complete sequences

#### 4 讨论

目前临床应用的抗生素主要来源于链霉菌属。链霉菌属代谢产物除抗生素外, 还包括有肿瘤抑制剂、酶抑制剂、木聚糖酶和磷脂酶等<sup>[21]</sup>。由于链霉菌是重要的天然活性产物或药物先导化合物的产生菌, 其研究开发倍受重视。本研究通过形态特征、培养特征、生理生化及 16 S rRNA 系统分析方法对刺五加内生放线菌菌株 13-85 进行菌株鉴定, 菌株 13-85 属于链霉菌属有效发表种 *Streptomyces amritsarensis* 的 1 个菌株, 目前该菌株尚未有在刺

五加药材中分离到的报道。菌株 *Streptomyces amritsarensis* 2A<sup>T</sup> 分离自土壤样本, 发酵液中分离得到相对分子质量 878.5 的脂肽类抗菌活性物质, 具有广谱抗菌活性且该物质在 70 °C(1 h)及 pH 5.0~9.0 条件下活性稳定<sup>[22]</sup>。本实验结果显示刺五加内生放线菌株 13-85 发酵液抗菌谱广, 对大多检定菌均具有较好且稳定的抗菌活性。功能基因检测结果表明菌株 13-85 同时具有 PKS II 及 NRPS 基因, 与其 PKS 基因序列同源性较高的菌株已有抗菌及多种活性化合物的报道, 如同源性 89% 费氏链霉菌 *Streptomyces fradiae* 可产生新霉素 (neomycin)。新霉素是糖苷类抗生素, 临床上主要用于治疗胃肠及呼吸道感染。还有研究发现新霉素具有巨大的抗 HIV 潜力<sup>[23]</sup>。同源性为 88% 的利迪链霉菌 *Streptomyces lydicus* 产生的利迪链菌素 (streptolydigin) 具有良好的抗肿瘤、抗 HIV 蛋白酶活性, 该化合物还是一个重要的 RNA 聚合酶抑制剂<sup>[24]</sup>。与 NRPS 基因序列同源性为 95% 的维吉尼亚链霉菌 *Streptomyces virginiae*<sup>[25]</sup> 可产生寡霉素 (oligomycin)<sup>[26]</sup>, 据报道寡霉素具有强烈的抗肿瘤、抗真菌、呼吸抑制作用及杀虫等生物学活性。由此可见, 该菌株有产生新霉素、利迪霉素、寡霉素等活性物质或相似物质的巨大潜质。而且, 该菌株有编码产生聚酮类和多肽类次级代谢产物的基因基础, 还有可能通过不同杂合形式的 NRPS-PKS 介导合成更为复杂的次级代谢产物<sup>[27]</sup>。因此, 菌株 13-85 是一株具有较高研究开发价值和潜力的刺五加内生放线菌株。另外, 对菌株的基本生理生化特点及活性产物的稳定性进行了系统研究, 该系列结果也将为菌株扩大发酵及多种次级代谢产物的分离纯化打下基础, 为深入挖掘稳定性良好的活性成分提供优良菌源。

同时, 野生刺五加属于我国濒危药用植物, 本研究筛选得到的菌株, 所产生的次级代谢产物与宿主植物部分药效相似, 可为刺五加生长缓慢、资源紧缺等引起的药源匮乏和生态破坏问题提供新出路, 对濒危植物资源的保护具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] 饶以群, 洪文荣. 从放线菌发现抗生素的振兴 [J]. 国外医药: 抗生素分册, 2010(6): 261-265.
- [2] 郑有坤, 刘凯, 熊子君, 等. 药用植物内生放线菌多样性及天然活性物质研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2089-2099.
- [3] 罗红丽, 林显钊, 张利敏, 等. 百部内生放线菌的分离、分类及次级代谢潜力 [J]. 微生物学报, 2012(3): 389-395.
- [4] 陈萌. 药用植物川楝内生放线菌的分离及鉴定 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- [5] Hasegawa S, Meguro A, Shimizu M, et al. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. [J]. *Actinomycetologica*, 2006, 20: 72-81.
- [6] 李桂玲. 植物内生真菌抗真菌抗肿瘤活性的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2001.
- [7] 蔡爱群, 田新莉, 周世宁. 水稻内生放线菌降解酶活性的分析 [J]. 韶关学院学报, 2007(3): 107-109.
- [8] 董梅, 李廷利. 刺五加化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2011, 39(3): 98-100.
- [9] 涂正伟, 周渭渭, 单淇, 等. 刺五加的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213-216.
- [10] 方羽生, 杨卫华, 张洪玲, 等. 放线菌对 4 种病原真菌的拮抗作用初探 [J]. 广东农业科学, 2001(5): 39-41.
- [11] Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequence [J]. *Int J Syst Bact*, 1995, 45(2): 240-245.
- [12] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups [J]. *Microbial Ecol*, 2005, 49(1): 10-24.
- [13] Ketela M M, Virpi S, Halo L, et al. An efficient approach for screening minimal PKS genes from streptomyces [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 180(1): 1-6.
- [14] Hwang Y B, Lee M Y, Perk H J, et al. Isolation of putative polyene-producing actinomycetes strains via PCR-based genome screening for polyene-specific hydroxylase genes [J]. *Proc Biochem*, 2007, 42(1): 102-107.
- [15] 朱天骄. 南极放线菌药用资源的调查及次级代谢产物研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [16] 张纪忠, 黄静娟. 微生物分类学 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [17] Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, 16(3): 313-340.
- [18] 徐丽华, 李文均. 放线菌系统学——原理、方法及实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [19] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1975.
- [20] Sharma D, Mayilraj S, Manhas R K. *Streptomyces amritsarensis* sp. nov., exhibiting broad-spectrum antimicrobial activity. [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*

- 2014, 105(5): 943-949.
- [21] Dharmaraj S. Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010, 26(12): 2123-2139.
- [22] Sharma D, Mayilraj S, Manhas R K. Purification and characterization of a novel lipopeptide from *Streptomyces amritsarensis* sp. nov. active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *AMB Express*, 2014, 28(4): 50.
- [23] 滕 慧, 张亚雄. 新霉素研究进展 [J]. 三峡大学学报: 自然科学版, 2008(2): 95-98.
- [24] 周雍进. 利迪链霉菌初级代谢关键基因的克隆与功能分析 [D]. 天津: 天津大学, 2008.
- [25] Zhang Y, Han M Z, Zhu S L. Studies on the function and catalytic mechanism of O-methyl transferases SviOMT02, SviOMT03 and SviOMT06 from *Streptomyces virginiae* IBL14. [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2015, 6: 73-74.
- [26] 林秀萍, 刘永宏, 李季伦. 寡霉素的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2012(9): 662-665.
- [27] 陈瑞勤, 廖 丽, 张晓华, 等. 北极海洋链霉菌 604F 的卤化酶基因克隆及特征 [J]. 微生物学报, 2014(6): 703-712.