

放线菌与枯草芽孢杆菌的共培养及其对活性次生代谢产物的影响

黄兵^{1,2}, 刘宁², 黄英², 陈劲春¹

1 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

摘要: 为探讨共培养对放线菌产生活性次生代谢产物的影响, 结合抗菌活性测定及 HPLC-PDA 分析, 研究了 22 株放线菌的单培养及其与枯草芽孢杆菌的共培养发酵代谢产物的差异, 并选取抗菌活性较强的链霉菌 FXJ2.014 进一步研究其代谢产物。发现 FXJ2.014、FXJ1.296、AS 4.1252 三株菌与枯草芽孢杆菌共培养时产生其在相同条件下单培养时没有的物质, 其中链霉菌 FXJ2.014 单培养时主要产生醌霉素 A, 共培养时产物中增加了醌霉素结构类似物 FXJ2.014-HB。进一步的抗菌、抗肿瘤活性测定结果表明, 两者的生物活性有较显著的差异, 且 FXJ2.014-HB 对多种肿瘤细胞系的抑制活性普遍弱于高毒性的醌霉素 A, 为有潜力的细胞毒性较小的抗生素。共培养是一条很有希望的发掘放线菌活性次生代谢产物的新途径。

关键词: 放线菌, 枯草芽孢杆菌, 共培养, 链霉菌, 活性次生代谢产物, 醌霉素

Coculture of actinomycetes with *Bacillus subtilis* and its effect on the bioactive secondary metabolites

Bing Huang^{1,2}, Ning Liu², Ying Huang², and Jinchun Chen¹

1 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: To explore the effect of coculturing actinomycetes with *Bacillus subtilis* on the production of bioactive secondary metabolites, we studied the difference between fermentation products of monocultures and the corresponding cocultures of 22 actinomycetes by antimicrobial assay and HPLC-PDA analysis. We selected *Streptomyces* strain FXJ2.014 with high bioactivity for further analysis and found additional metabolites in fermentation extracts of cocultures of strains FXJ2.014, FXJ1.296 and AS 4.1252 respectively with *B. subtilis*. Quinomycin A was the main bioactive metabolite produced by the monoculture of strain FXJ2.014, while a new quinomycin-like component named FXJ2.014-HB was produced when strain FXJ2.014 was cocultured with *B. subtilis*. Further tests of antimicrobial and antitumor activities indicated that FXJ2.014-HB and Quinomycin A had significant differences in terms of bioactivity. Moreover, the inhibitory activity of FXJ2.014-HB to a variety of tumor cell lines was weaker than the highly toxic Quinomycin A, indicating its potential to be an antibiotic with low cell toxicity. In conclusion, coculture can be used as a promising approach to discover bioactive secondary metabolites from actinomycetes.

Received: March 17, 2009; **Accepted:** April 30, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30770002), Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-YW-G-013).

Corresponding author: Ying Huang. Tel/Fax: +86-10-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn

国家自然科学基金(No. 30770002), 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-YW-G-013)资助。

Keywords: actinomycetes, *Bacillus subtilis*, coculture, *Streptomyces*, bioactive secondary metabolites, quinomycin

放线菌是产生抗生素和其他生物活性物质的重要来源, 其中约 50% 的抗生素是由链霉菌产生的^[1]; 但随着大量放线菌次生代谢产物的重复发现^[2]及临床上病原微生物的耐药性日益严重^[3], 如何充分利用已有的放线菌资源, 采用新技术、新方法、新模式筛选新的活性次生代谢产物, 进而开发新的抗生素已成为微生物药物研发的重要方向。

抗生素的筛选方法直接影响新抗生素的筛选效率。以筛选海洋放线菌为代表的生态学途径筛选方法^[4], 以原生质体融合法、基因克隆法、遗传重组法、组合生物合成技术以及基因芯片基因组技术为代表的遗传学途径筛选方法^[5,6]的相继出现对新抗生素的发现起了推动作用。但这些抗生素筛选方法多以单一的纯菌种进行发酵培养, 而自然生态环境中的微生物往往处于多菌种共存的状态。因此, 研究两种或多种微生物的共培养对新生物活性物质的发现具有重要的生物学和药物学意义。Shimizu 等^[7]利用乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)与马克斯克鲁维酵母菌(*Kluyveromyces marxianus*)共培养生成乳酸菌素(Nisin)。Kurosawa 等^[8]利用链霉菌(*Streptomyces padanus*)与红球菌(*Rhodococcus fascians*)共培养发现了 2 种新的抗生素 Rhodostreptomycins A 与 B。可见, 共培养方法在筛选新抗生素的实践中具有应用潜力。

本研究选取自然界中普遍存在、培养条件简单、易与其他微生物共存且遗传背景清楚的枯草芽孢杆菌^[9]作为共培养试验的供试菌株, 研究了 22 株不同来源的放线菌在相同条件下单培养及与枯草芽孢杆菌共培养时发酵液中代谢产物的差异, 并着重研究了链霉菌 FXJ2.014 与枯草芽孢杆菌的共培养及其对链霉菌产生活性次生代谢产物的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与培养基

供试菌株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* CGMCC 1.2428)以及测试菌株——大肠杆菌(*Escherichia coli* CGMCC 1.2385)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CGMCC 1.2386)、白色念珠菌(*Candidia albicans* CGMCC

2.538)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* CGMCC 1.2428)由中国普通微生物保藏中心(CGMCC)提供; 22 株放线菌(Actinomycetes)和耐药金黄色葡萄球菌(Multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* 1-1)、耐药大肠杆菌(Multi-drug resistant *Escherichia coli* 4-1)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae* 5-1)、耐药铜绿假单胞菌(Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* 6-1)、浅黄分枝杆菌(*Mycobacterium gilvum* 7-1)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera* C6706)由中国科学院微生物研究所放线菌系统学与资源研究组保藏提供; 人肺腺癌细胞 A549、人白血病细胞 HL-60、人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、人结肠癌细胞 HCT-116、人肝癌细胞 HepG2 由浙江海正药业技术中心提供。

菌种活化培养基、种子培养基、发酵培养基均为 GYM 培养基, 其组成为: 葡萄糖 4.0 g/L, 酵母提取物 4.0 g/L, 麦芽提取物 10.0 g/L, CaCO₃ 2.0 g/L, 活化培养基中含琼脂 15 g/L, pH 7.2。

1.1.2 主要仪器与试剂

大孔吸附树脂层析采用 Diaion 的 HP-20 大孔吸附树脂; 薄层层析采用青岛海洋化工厂的 TLC 高效薄层层析板(GF254); 硅胶柱层析采用青岛海洋化工厂的 100~200 目硅胶 G; 凝胶层析采用 Amersham 的 Sephadex LH-20; 发酵罐为 NBS 的 BIOFLO410 型发酵罐(20 L); 离心机为 Sorvall 的 RC 3B-Plus 型大容量离心机; 半制备型 HPLC 为岛津的 Prominence LC-20A 高压液相色谱仪; 分析色谱柱为 YMC-Pack ODS-A(150 cm×4.6 mm); 半制备柱为 YMC-Pack ODS-A(250 cm×10 mm); 液质联用质谱仪为 Thermo Finnigan 的 LCQ Deca XP plus; 色谱纯甲醇和乙腈为 Fisher Scientific 公司生产, 其他相关有机试剂均为 AR 级, 北京化学试剂公司生产。

1.2 方法

1.2.1 菌株的单培养与共培养

将选取的 22 株放线菌分别进行单培养以及与枯草芽孢杆菌的摇瓶共培养实验。种子液制备: 挑取平皿活化的放线菌琼脂块接种于适量的 GYM 培养基中, 于 28 °C、180 r/min 培养 2~3 d; 枯草芽孢杆菌的种子液制备为 37 °C 培养 12 h。单培养时, 将 10 mL 放线菌种子液接种于装有 100 mL GYM 培养基的 500 mL 摇瓶中, 28 °C、180 r/min 培养 6~7 d。共培养

时, 首先将 10 mL 放线菌种子液接种于装有 100 mL GYM 培养基的 500 mL 摇瓶中, 28°C、180 r/min 培养 3~4 d, 然后再将 1 mL 枯草芽孢杆菌种子液接入放线菌培养液中, 在相同条件下继续培养 3~4 d。

1.2.2 发酵产物的提取

将 22 株放线菌摇瓶单培养和共培养的发酵液滤除菌丝体后用等体积的乙酸乙酯反复萃取滤液 3 次, 取乙酸乙酯层减压浓缩至干燥后用 5 mL 甲醇重溶得提取物, 4°C 保存备用。

1.2.3 发酵产物的抗菌活性测定

将 22 株放线菌摇瓶单培养与共培养的发酵液及提取物分别进行抗菌活性测定, 测试菌株为大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌, 抗菌活性测定方法为琼脂平皿纸片扩散法^[10]。

1.2.4 发酵产物的 HPLC 分析

将 22 株放线菌的发酵液提取物进行 HPLC-PDA 分析检测, 流动相溶剂为甲醇、水, 比例视各菌株情况而定, 流速为 1 mL/min, 检测波长分别为 220 nm、254 nm 和 300 nm。比较各放线菌的单培养与共培养提取物的 HPLC 图谱, 分析共培养对放线菌代谢产物的影响。

1.2.5 FXJ2.014 单培养及共培养的放大发酵

以链霉菌 FXJ2.014 为目标菌株、枯草芽孢杆菌为共培养的供试菌株进行 20 L 发酵罐放大培养。将 200 mL FXJ2.014 的种子液接种于装有 12 L GYM 培养基的发酵罐中, 28°C、200~300 r/min 培养 3 d, 再将 200 mL 枯草芽孢杆菌种子液接入发酵罐中, 在相同条件下共培养 4 d 后结束发酵。单培养放大发酵时不接入枯草芽孢杆菌, 在相同条件下直接培养 7 d 后结束发酵。

1.2.6 FXJ2.014 发酵产物的分离纯化

将发酵罐单培养与共培养的发酵液离心后去除菌丝体, 取上清液用 HP-20 大孔吸附树脂吸附、乙醇洗脱, 收集乙醇洗脱液减压浓缩至干燥后用去离子水定容到 500 mL, 然后用等体积的乙酸乙酯对其反复萃取 3 次、减压浓缩至干燥后得粗提物。对粗提物进行干法硅胶柱层析, 用甲醇:氯仿=1:10 洗脱, TLC 分析(甲醇:氯仿=1:10, 显色剂为 10%稀硫酸香草醛)。合并显色组分后进行 Sephadex LH-20 凝胶层析, 甲醇洗脱, TLC 分析, 再次合并显色组分后得提取物, 于 4°C 保存备用。

1.2.7 FXJ2.014 发酵产物的 HPLC 分析

将 FXJ2.014 单培养与共培养的提取物分别进行 HPLC 半制备, 流动相溶剂为甲醇:水=75:25, 流速为 1 mL/min, 检测波长分别为 203 nm、243 nm 和 323 nm。收集主要活性组分 FXJ2.014-3(单培养)与 FXJ2.014-HB(共培养)于 4°C 保存。

1.2.8 活性组分的抗菌活性与抗肿瘤活性测定

将 FXJ2.014-3 与 FXJ2.014-HB 分别进行抗菌与抗肿瘤活性测定: 抗菌活性测定方法为琼脂平皿纸片扩散法^[10], 对 FXJ2.014-3 与 FXJ2.014-HB 分别制备 10 µg/片、20 µg/片的滤纸片测定其抗菌活性; 抗肿瘤活性测定方法采用 WST-8 法^[11]。

2 结果

2.1 单培养与共培养发酵产物的抗菌活性初步分析

22 株放线菌单培养与共培养的发酵液抗菌活性测定结果表明, 其抗菌谱变化不大, 但单培养的抗菌活性普遍要强于共培养。提取物的抗菌活性测定结果表明, 大部分放线菌单培养与共培养的抗菌谱和抗菌活性无显著差异, 但少数放线菌则表现出明显差异。其中链霉菌 FXJ2.014 单培养的发酵液与提取物对枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的抑制作用明显强于共培养, 但对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用却与共培养无明显差异。这表明共培养对放线菌活性次生代谢产物产生了一定程度的影响。

2.2 单培养与共培养发酵产物的 HPLC 初步分析

进一步对 22 株放线菌单培养与共培养发酵液的提取物进行 HPLC-PDA 分析检测, 发现 FXJ2.014、FXJ1.296 和 AS 4.1252 三菌株共培养的 HPLC 图谱中出现了在相同条件下单培养的 HPLC 图谱中没有的新分离峰(图 1~3), 其中 FXJ2.014 共培养产生的新分离峰处的物质抗菌活性较显著, 其含量约占主活性组分的 1/4, 且共培养的主活性组分含量比单培养高。进一步表明共培养对放线菌活性次生代谢产物产生了一定的影响。

2.3 FXJ2.014 单培养与共培养发酵产物的活性组分分析

在 FXJ2.014 单培养的 HPLC 图谱中(图 1A), Rt = 5.9 min 处峰的化合物为单培养时的活性组分, 编号

为 FXJ2.014-3, 收集后经紫外光谱(UV)、质谱(ESI-MS)、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 分析后推定该化合物为醌霉素 A。

而在 FXJ2.014 与枯草芽孢杆菌共培养的 HPLC 图谱中(图 1B), 除 $R_t=5.9$ min 处的峰外, 在 $R_t = 7.8$ min 处出现一个新分离峰, 此峰对应的化合物系两菌共培养时才产生的另一活性组分, 编号为 FXJ2.014-HB。然而在 HPLC 制备时发现此峰在甲醇

/水、乙腈/水流动相体系中保留时间均极不稳定, 无法与杂质实现基线分离, 仅得到含杂质的粗品。不同条件的 HPLC 分析表明, 此粗品含少量的 2 种杂质, 且极性与主成分相近, 无法与主成分彻底分离。进一步的紫外光谱(UV)与质谱(ESI-MS)分析表明, FXJ2.014-HB 主成分的紫外光谱与 FXJ2.014-3 相近; 且其分子量与醌霉素 A 相同(1100 D), 初步推测 FXJ2.014-HB 主成分为醌霉素的结 构类似物。数据

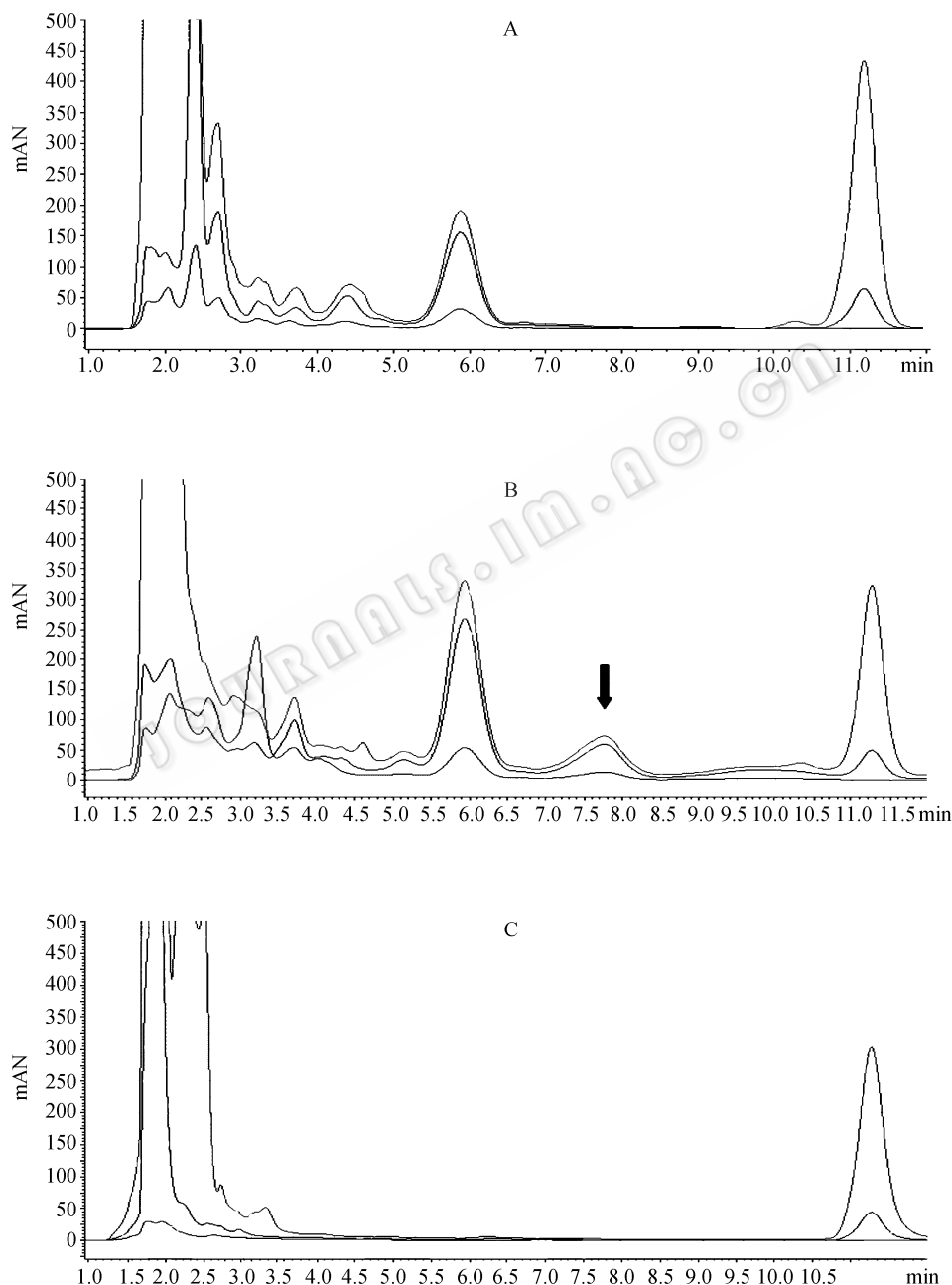


图 1 FXJ2.014 与 *B. subtilis* 单培养及共培养发酵产物的 HPLC 分析

Fig. 1 HPLC analysis of fermentation extracts of FXJ2.014, *B. subtilis* and their coculture. (A) FXJ2.014. (B) Coculture of FXJ2.014 and *B. subtilis*. (C) *B. subtilis*. The arrow indicates the new peak.

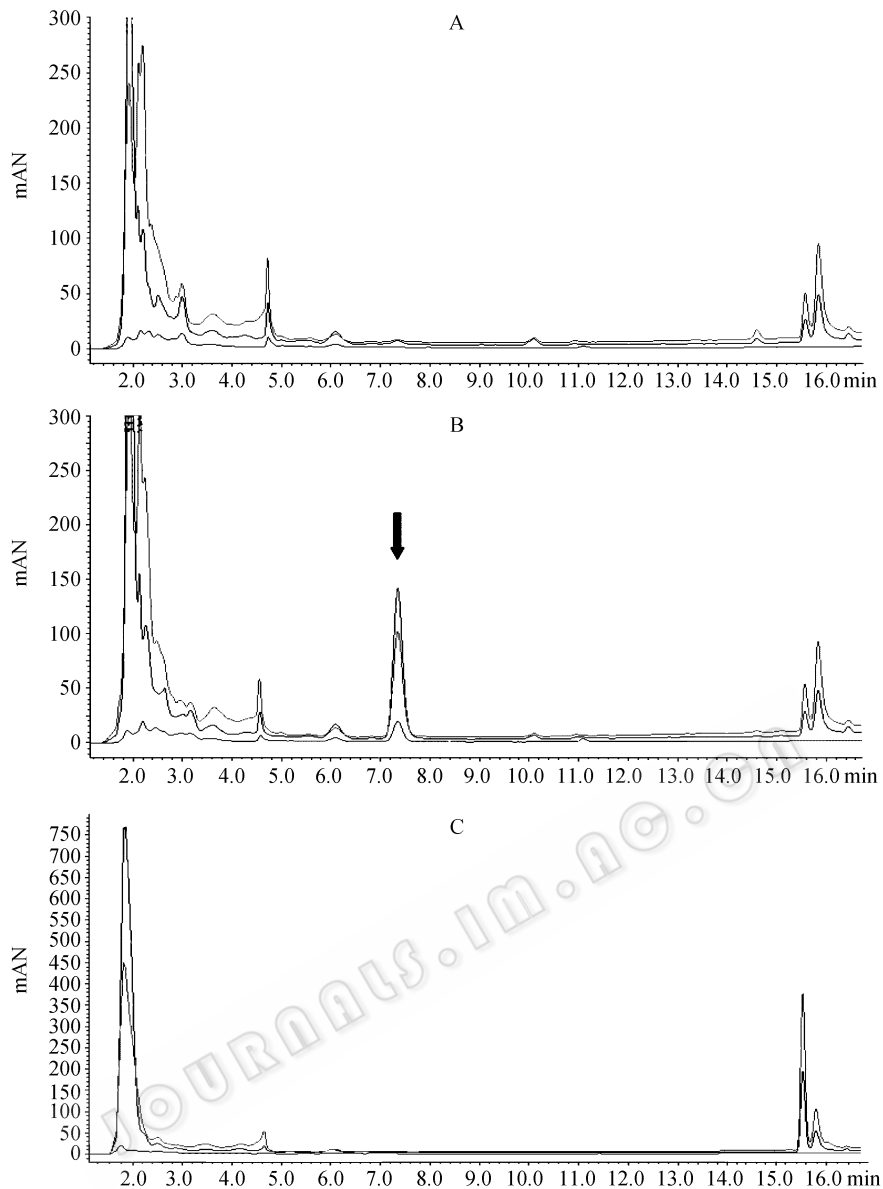


图2 FXJ1.296与*B. subtilis*单培养及共培养发酵产物的HPLC分析

Fig. 2 HPLC analysis of fermentation extracts of FXJ1.296, *B. subtilis* and their coculture. (A) FXJ1.296. (B) Coculture of FXJ1.296 and *B. subtilis*. (C) *B. subtilis*. The arrow indicates the new peak.

库比对结果表明, 此物质的理化性质与已报道的醌霉素类抗生素存在差异。FXJ2.014-3及FXJ2.014-HB的HPLC-UV-MS/MS分析数据见表1。

2.4 FXJ2.014-3与FXJ2.014-HB的生物活性分析

抗菌活性测定结果表明, FXJ2.014-3与FXJ2.014-HB对试验选取的部分测试菌株表现出不同程度的抑制作用(10 μg /片和20 μg /片滤纸片测得的抗菌活性结果一致): FXJ2.014-3对MRSA表现出强抑制作用, 而FXJ2.014-HB对其无抑制作用; FXJ2.014-3对耐药铜绿假单胞菌无抑制作用, 而

FXJ2.014-HB对其表现出弱抑制作用; 且FXJ2.014-3对枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的抑制作用强于FXJ2.014-HB(表2)。可见两者的抗菌谱与抗菌活性有明显差异。

抗肿瘤活性测定结果表明, FXJ2.014-3与FXJ2.014-HB对试验选取的5种肿瘤细胞系均表现出抑制作用, FXJ2.014-3对各肿瘤细胞系的抑制作用均非常强, IC_{50} 值均低于实验检测的最低限(0.195 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 明显强于FXJ2.014-HB对各肿瘤细胞系的抑制作用(表3)。可见, 两者的抗肿瘤活性有明显差异。

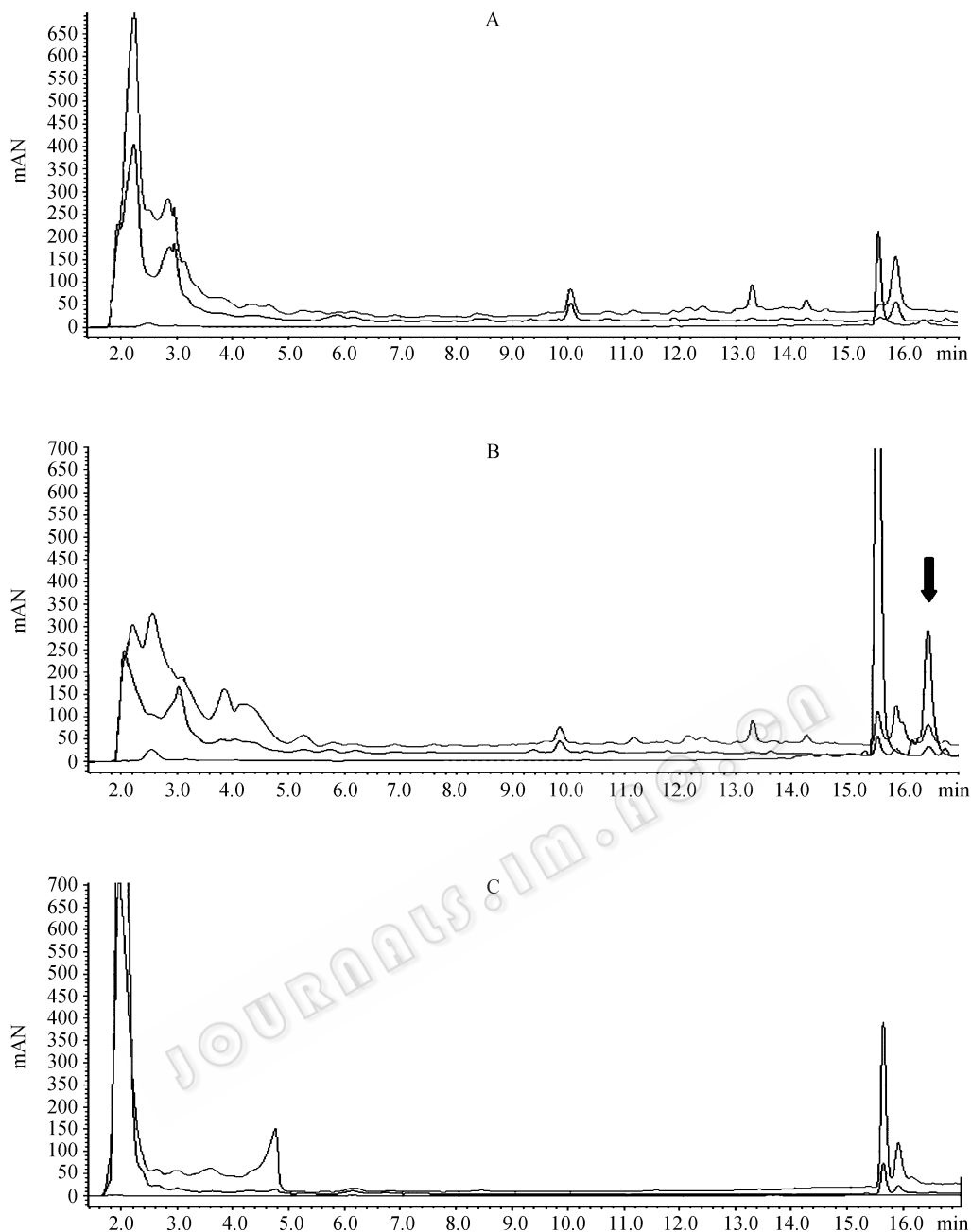


图3 AS 4.1252 与 *B. subtilis* 单培养及共培养发酵产物的 HPLC 分析

Fig. 3 HPLC analysis of fermentation extracts of AS 4.1252, *B. subtilis* and their coculture. (A) AS 4.1252. (B) Coculture of AS 4.1252 and *B. subtilis*. (C) *B. subtilis*. The arrow indicates the new peak.

3 讨论

链霉菌 FXJ2.014 的主要活性产物为醌霉素 A, 又称棘霉素(Echinomycin)、左霉素(Levomycin), 美国国家癌症研究所(National Cancer Institute)二期临床试验显示此化合物的成药可能性非常小, 原因之一是其细胞毒性非常大, 毒副作用显著^[12]。链霉菌

FXJ2.014 与枯草芽孢杆菌的共培养产生了在相同条件下单培养时没有的生物活性组分 FXJ2.014-HB, 其抗菌、抗肿瘤活性($IC_{50} < 10 \mu\text{mol/L}$)良好, 且细胞毒性明显弱于毒副作用大的醌霉素 A, 有可能成为低毒性的候选抗生素。由于本研究的分离纯化手段较为单一, 目前尚未得到其纯物质进行详细的结构解析, 但可以看出, 2 种菌株的共培养的确产生了其

表 1 FXJ2.014-3 与 FXJ2.014-HB 的理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of FXJ2.014-3 and FXJ2.014-HB

Characteristic examined	FXJ2.014-3	FXJ2.014-HB
Appearance	Pale yellow powder	Very pale yellow powder
ESI-MS mass spectrum (positive)	1123.5 [M+Na] ⁺ 、1101.4[M+H] ⁺ 、1139.4[M+K] ⁺ 、1053.5	1123.5 [M+Na] ⁺ 、1139.4[M+K] ⁺
ESI-MS mass spectrum (negative)	1099.3[M-H] ⁻ 、1135.3、1051.5	1099.2[M-H] ⁻ 、1051.1
ESI-MS-MS2; main fragment ions** of mass 1123.5	847.2、897.1、982.1、 1010.1 [*] 、1011.1	982.2、 1010.1 [*] 、1123.1
ESI-MS-MS3; main fragment ions of mass 1010.1	714.0、847.1、897.0、 982.1 [*] 、992.0	714.1、811.1、897.1、 982.1 [*]
ESI-MS-MS4; main fragment ions of mass 982.1	452.0、536.8、555.1、568.0、668.0、783.1、 847.1 [*] 、911.1、952.1	527.1、568.3、668.1、782.9、 847.2 [*] 、855.4、
Molecular formula	C ₅₁ H ₆₄ N ₁₂ O ₁₂ S ₂	—
Molecular weight (D)	1100	1100
HPLC Rt (min)	5.9	Unstable
UV absorptivity (nm)	203、243、323	203、244、325
Soluble	Chloroform, DMSO, MeOH	Chloroform, DMSO, MeOH
Insoluble	Hexane, water	Hexane, water

Note: “*””: major ion; “***”: the intensities of the fragment ions reported here are at least 5% of the total intensity of all ions observed in any given analysis.

表 2 FXJ2.014-3 与 FXJ2.014-HB 的抗菌活性

Table 2 Antimicrobial activities of FXJ2.014-3 and FXJ2.014-HB

Bioactive component	Antimicrobial activity									
	MRSA	MDR-EC	BS	CA	EC	SA	MDR-PA	VC	MG	KP
FXJ2.014-3	++	-	+++	++	-	++	-	-	+++	-
FXJ2.014-HB	-	-	++	+	-	++	+	-	+++	-

Note: “-”: negative; “+”, weakly positive; “++”: positive; “+++”: strongly positive MRSA, multi-drug resistant *S. aureus* 1-1; MDR-EC, multi-drug resistant *E. coli* 4-1; BS: *B. subtilis* CGMCC1.2428; CA: *C. albicans* CGMCC2.538; EC: *E. coli* CGMCC1.2385; SA: *S. aureus* subsp. *aureus* CGMCC1.2386; MDR-PA, multi-drug resistant *P. aeruginosa* 6-1; VC: *V. cholera* C6706; MG: *M. gilvum* 7-1; KP: *K. pneumoniae* 5-1.

表 3 FXJ2.014-3 与 FXJ2.014-HB 的抗肿瘤活性

Table 3 Antitumor activities of FXJ2.014-3 and FXJ2.014-HB

Bioactive component	IC ₅₀ (μg/mL)				
	A549	HL-60	MDA-MB-231	HCT-116	HepG2
FXJ2.014-3	<0.195	<0.195	<0.195	<0.195	<0.195
FXJ2.014-HB	1.821	1.228	2.124	3.148	5.945

单培养时没有的生物活性组分,可见利用 2 种不同菌株的共培养来获得次生代谢产物是一种很有潜力的菌种资源利用途径。

本试验以抗生素的主要产生菌——放线菌为目标菌株,选取了自然界中普遍存在的枯草芽孢杆菌作为共培养的供试菌株,使 2 种菌株的共培养获得了成功。共培养体系成功建立的关键是控制好 2 种菌株的接种量、接种时间、接种顺序以及培养发酵条件。共培养过程中,可能会出现后接种的枯草芽孢杆菌被放线菌产生的抗生素抑制的现象,这时需要通过实验确定放线菌产抗的具体时间,在放线菌

产抗前将合适接种量的枯草芽孢杆菌接入到培养基中,保证两菌共培养试验的成功。

由于共培养研究的复杂性,目前对于链霉菌 FXJ2.014 与枯草芽孢杆菌共培养得到的新活性组分的产生机理还不清楚。根据前人在共培养研究方面的相关文献,可以对产生机理作如下几点推测: 1) 营养条件的改变诱导产生。两菌共培养时,由于枯草芽孢杆菌生长繁殖很快,较短时间内取代放线菌成为优势菌,同时大量消耗培养基中的营养成分,使培养基迅速达到寡营养状态。寡营养条件的迅速形成可能使放线菌的生长与产抗状态发生改变,从而

诱导了抗生素的产生。有证据表明, 放线菌中抗生素的合成与培养基的营养程度及成分有关, 如日本学者 Okami 等^[13]从浅海污泥中分离到的放线菌菌株 SS-20, 在普通放线菌发酵培养基中不产生抗生素, 只有在含有极稀营养(正常 YE 培养基稀释 16 倍)和 3% NaCl 浓度的培养基中才能产生除疟霉素 (Aplasmomycin)。2) 两菌协同作用的结果。自然生态环境中不同微生物间竞争、拮抗、共生、协同的现象较为普遍^[14], 共培养的微生物在生长代谢过程各自产生的酶类相互协同能将某一底物转化为另一物质。如 1980 年中国科学院微生物研究所与北京制药厂合作发明的“维生素 C 二步发酵法”^[15,16], 其第二步是将氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacterium oxydans*) 与条纹假单胞杆菌 (*Pseudomonas striata*) 共培养发酵, 通过两菌的相互协同将 L-山梨糖转化成维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸。3) “沉默基因”的激活。放线菌中许多抗生素合成相关基因在普通条件下不表达或极低水平表达, 为沉默基因^[5], 共培养过程中另一菌产生的代谢产物可能激活了放线菌的某些沉默基因, 从而产生了抗生素。这种利用外界条件诱导或基因工程的手段开发处于沉默状态的基因系统, 引发放线菌藏匿的隐性能力表达的方法, 可能对发现新抗生素有重要价值^[17]。Yamashita 等^[18]通过原生质体融合突变激活链霉菌中含有卡那霉素的抗性基因从而产生新抗生素 Indolizomycin。4) 基因横向转移。基因横向转移是一种普遍的自然现象^[19], 在一定条件下某些抗生素基因能够在不同菌株间发生横向转移, 在获得基因的菌株中得到表达从而产生新抗生素。Kurosawa 等^[8]通过链霉菌与红球菌共培养使链霉菌的相关抗生素基因转移到红球菌中并表达, 从而筛选到 2 种新的抗生素 Rhodostreptomycins A 与 B。总之, 抗生素的产生机理具有多样性和复杂性, 它是微生物本身和外界环境共同作用的结果; 对本试验中放线菌与枯草芽孢杆菌共培养产生活性次生代谢产物的机理尚待进一步研究。

由于抗生素的广泛和长时间使用, 细菌对抗生素的耐药性问题日益严重, 现有的抗生素药物已经跟不上耐药菌的发展。因此迫切需要进一步发现和开发新型、高效、低毒的抗耐药菌抗生素。作为一种很有潜力的发掘新抗生素的途径, 共培养方法为

现有微生物资源的开发利用揭示了新思路。

致谢 感谢浙江海正药业技术中心进行生物活性组分的抗肿瘤活性测定工作。

REFERENCES

- [1] Bérday J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*, 2005, **58**(1): 1–26.
- [2] Goodfellow MO, Donell AG. Search and Discovery of Industrially Significant Actinomycetes. In: Baumberg S, Hunter I, Rhodes M, *et al.* Microbial Products: New Approaches. Cambridge: Cambridge University Press, 1989: 343–383.
- [3] Quale J, Landman D, Saurina G, *et al.* Manipulation of a hospital antimicrobial formulary to control an outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis*, 1996, **23**(5): 1020–1025.
- [4] Fenical W, Jensen PR. Developing a new resource for drug discovery: Marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol*, 2006, **2**(12): 666–673.
- [5] Hopwood DA, Chater KF. Fresh approaches to antibiotic production. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1980, **290**(1040): 313–328.
- [6] Rosamond J, Allsop A. Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics. *Science*, 2000, **287**: 1973–1976.
- [7] Shimizu H, Mizuguchi T, Tanaka E, *et al.* Nisin production by a mixed-culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(7): 3134–3141.
- [8] Kurosawa K, Ghiviriga I, Sambandan TG, *et al.* Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(4): 1126–1127.
- [9] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, *et al.* The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, **390**: 249–256.
- [10] Castillo U, Strobel GA, Ford EJ, *et al.* Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiol*, 2002, **148**: 2675–2685.
- [11] Tominage H, Ishiyama M, Ohset O, *et al.* A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell visibility assay. *Anal Commun*, 1999, **36**: 47–50.
- [12] Schilsky RL, Faraggi D, Korzun A, *et al.* Phase II study of echinomycin in patients with advanced breast cancer: A report of cancer and leukemia group B protocol 8641. *Invest New Drugs*, 1991, **9**: 269–272.
- [13] Okami Y, Okazaki T, Kitahara T, *et al.* Studies on marine microorganisms. V. A new antibiotic, aplasmomycin, produced by a streptomycete isolated from shallow sea mud. *J Antibiot*, 1976, **29**(10): 1019–1025.
- [14] Burgess JG, Jordan EM, Bregu M, *et al.* Microbial

- antagonism: A neglected avenue of natural products research. *J Biotechnol*, 1999, **70**: 27-32.
- [15] Yin GL, Tao ZX, Yu LH, *et al.* Studies on the production of vitamin C precursor—2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose by fermentation. I. Isolation, screening and identification of 2-keto-L-gulonic acid producing bacteria. *Acta Microbiol Sin*, 1980, **20**(3): 246-251.
尹光琳, 陶增鑫, 于龙华, 等. L-山梨糖发酵产生维生素 C 前体—2-酮基-L-古龙酸的研究. I. 菌种的分离筛选和鉴定. *微生物学报*, 1980, **20**(3): 246-251.
- [16] Yan ZZ, Tao ZX, Yu LH, *et al.* Studies on the production of vitamin C precursor—2-keto-L-gulonic acid from L-sorbose by fermentation. II. Conditions for submerged fermentation of 2-keto-L-gulonic acid. *Acta Microbiol Sin*, 1981, **21**(2): 185-191.
- 严自正, 陶增鑫, 于龙华, 等. L-山梨糖发酵产生维生素 C 前体—2-酮基-L-古龙酸的研究. II. 发酵条件的研究. *微生物学报*, 1981, **21**(2): 185-191.
- [17] Hopwood DA. Antibiotics: Opportunities for genetic manipulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1989, **324**(1224): 549-562.
- [18] Yamashita F, Hotta K, Kurasawa S, *et al.* New antibiotic-producing streptomycetes, selected by antibiotic resistance as a marker. I. New antibiotic production generated by protoplast fusion treatment between *Streptomyces griseus* and *S. tenjimariensis*. *J Antibiot*, 1985, **38**(1): 58-63.
- [19] Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 2000, **405**: 299-304.



快 讯

中科院破解 H1N1 四大分子特征

中科院动物所何宏轩研究员带领的野生动物疫病研究组通过对甲型流感病毒北美毒株的研究,发现了最新流感病毒 H1N1 的四大特征,相关成果发表在 2009 年 54 卷第 13 期的科学通报上,由武斌、王承民、董国英、罗静、赵宝华和何宏轩等 6 人共同完成。

中科院动物所何宏轩研究员带领的野生动物疫病研究组通过对甲型流感病毒北美毒株的研究,发现了最新流感病毒 H1N1 的四大特征,相关成果发表在 2009 年 54 卷第 13 期的科学通报上,由武斌、王承民、董国英、罗静、赵宝华和何宏轩等 6 人共同完成。

截止 2009 年 5 月 31 日为止,世界卫生组织确认全球 54 个国家和地区共 15510 例甲型 H1N1 流感确诊病例,死亡 115 例,给世界各国人民造成了巨大恐慌。

研究病毒分子特征,认识病原体,对了解该病非常必要。因此,该研究对甲型流感病毒北美毒株进行遗传进化分析、蛋白氨基酸序列、糖基化位点及抗药性位点分析。结果表明,它是一个来源于不同宿主、不同地域的重组株;HA 蛋白氨基酸序列分析表明北美毒株不具有高致病性流感病毒的特性;NS1 蛋白和 PB2 蛋白氨基酸序列表明对人具有明显的亲和性,但对人具有较低的致病力;M 蛋白的同源建模表明具有抗金刚烷胺类药物的结构特点,NA 蛋白序列分析表明了北美毒株仍然对神经氨酸酶抑制剂类药物敏感。这些研究结果对于预防和控制甲型流感北美毒株具有重要意义。

据 EurekAlert 中文消息,研究发现这些北美毒株同源性非常相近,它们具有四个特点:(1)不具有高致病性流感病毒的特性;(2)对人具有明显的亲和性;(3)对人具有较低的致病力;(4)对神经氨酸酶抑制剂类药物敏感,但对金刚烷胺类药物具有抗性。这些发现对于北美毒株引起的甲型流感的防控措施制定提供科学依据。

科学通报的评审专家认为:“该论文对甲型 H1N1 流感毒株北美流行株的分子特征进行了较好的分析,具有重要意义。”研究者认为,该研究结果清晰的告诉人们此次甲型流感虽对人具有明显的传染性和对金刚烷胺类药物具有抗性,但对人的致病力较低,对神经氨酸酶抑制剂类药物如达菲等仍然有效。所以这次流感是可防可控可治,对人们消除心理恐慌具有重要作用。

论文作者是中国科学院动物研究所野生动物疫病研究中心的研究人员,目前这个研究中心主要从事新现传染病的病原生态学、病原生态学重要传染病的预警分析研究工作。

该研究得到国家重点基础研究发展计划(批准号:2007BC109103)、中国科学院知识创新项目(批准号:KSCX2-YW-N-063)以及国家自然科学基金(批准号:30671576)资助。

来源:生物通