

# 快速鉴定格尔德霉素产生菌——吸水链霉菌 17997 中的洋橄榄叶素

李书芬<sup>1</sup>, 武临专<sup>1</sup>, 陈菲菲<sup>1,2</sup>, 王红远<sup>1</sup>, 孙桂芝<sup>1</sup>, 王以光<sup>1</sup>

1 中国医学科学院/北京协和医学院 医药生物技术研究所 卫生部抗生素生物工程重点实验室, 北京 100050

2 中国医药集团四川抗菌素工业研究所, 成都 610052

**摘要:** 对格尔德霉素产生菌吸水链霉菌 17997 的发酵液乙酸乙酯提取物进行了硅胶板 TLC 初步分离和 NaOH 溶液喷涂显色, 对显红色、具有抗革兰阳性菌活性的条带进行了 HPLC 分析, 提示抗革兰阳性菌活性化合物可能为大环二内酯类抗生素洋橄榄叶素; 以 dTDP-葡萄糖-4,6-脱水酶 (Tgd) 基因保守区设计 PCR 引物, 扩增了吸水链霉菌 17997 基因组 DNA 中的 *tgd* 并进行了序列分析, 表明吸水链霉菌 17997 含有洋橄榄叶素生物合成基因簇中的 *tgd* 基因; 对 NaOH 溶液喷涂显红色的化合物进行 LC-(+)-ESI-MS 分析, 证实其为洋橄榄叶素。因此, 吸水链霉菌 17997 产生洋橄榄叶素; 同时, 建立了一种快速鉴定洋橄榄叶素及其产生菌的方法, 主要包括 TLC 硅胶板分离、NaOH 溶液显色、HPLC 和 LC-MS 分析, 以及 *tgd* 的 PCR 检测与序列分析。

**关键词:** 吸水链霉菌 17997, 洋橄榄叶素, 液相色谱-质谱联用 (LC-MS), dTDP-葡萄糖-4,6-脱水酶, 格尔德霉素

## Rapid identification of elaiophylin from *Streptomyces hygroscopicus* 17997, a geldanamycin producer

Shufen Li<sup>1</sup>, Linzhan Wu<sup>1</sup>, Feifei Chen<sup>1,2</sup>, Hongyuan Wang<sup>1</sup>, Guizhi Sun<sup>1</sup>, and Yiguang Wang<sup>1</sup>

1 Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics of Ministry of Health, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

2 Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Sinopharm, Chengdu 610052, China

**Abstract:** To identify the anti-bacterial compound(s) from *Streptomyces hygroscopicus* 17997, a geldanamycin producer, silica gel thin layer chromatography (TLC) was used to separate the secondary metabolites of *S. hygroscopicus* 17997. Compound(s) from the silica gel TLC with anti-Gram positive bacteria activity and becoming red upon color reaction by 2.0 mol/L NaOH was analyzed by HPLC. The UV absorption profile and the retention time of a peak of HPLC were identical to those of authentic elaiophylin. A conserved region of dTDP-glucose-4,6-dehydratase (Tgd) gene was amplified by PCR from the genomic DNA of *Streptomyces hygroscopicus* 17997. DNA sequence analysis of the amplified DNA fragment indicated that it

**Received:** September 25, 2010; **Accepted:** January 29, 2011

**Supported by:** National Major Special Science and Technology Project on Major New Drug Innovation (No. 2009ZX09501-008).

**Corresponding author:** Linzhan Wu. Tel: +86-10-63165283; E-mail: wulinzhan@yahoo.com.cn

科技部“重大新药创制”科技重大专项 (No. 2009ZX09501-008) 资助。

should be the *tgd* gene of elaiophylin biosynthetic gene cluster. These results implied that the compound in the peak of HPLC was elaiophylin, a macrodiolide antibiotic. The compound was then confirmed to be elaiophylin by LC-(+)-ESI-MS, which revealed that *Streptomyces hygroscopicus* 17997 was an elaiophylin producer. At the same time, a fast procedure, which consisted of silica gel TLC, color reaction, HPLC, PCR detection and DNA sequence analysis of *tgd* gene, and LC-(+)-ESI-MS, was established for rapid identification of elaiophylin and its producer.

**Keywords:** *Streptomyces hygroscopicus* 17997, elaiophylin, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), dTDP-glucose-4,6-dehydratase, geldanamycin

在对格尔德霉素 (Geldanamycin, GDM; 一种苯醌型安莎类抗生素) 产生菌吸水链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus* 17997 的次级代谢产物进行研究时, 发现其发酵上清液具有抗革兰阳性菌活性<sup>[1]</sup>。格尔德霉素具有抗真菌活性, 但不具有抗革兰阳性菌活性。萘安莎类抗生素如利福霉素 (Rifamycin)、萘霉素 (Naphthomycin) 和红迪菌素 (Rubradirin) 等, 具有显著的抗革兰阳性菌活性。在

吸水链霉菌 17997 的基因组 DNA 中存在可能负责萘安莎类抗生物合成的基因<sup>[1-3]</sup>, 因而曾经推测该菌株具有萘安莎类抗生素产生潜能, 但是该推测始终没有得到证实。

本研究对吸水链霉菌 17997 产生的一个具有抗革兰阳性菌活性化合物进行了快速鉴定, 确证为洋橄榄叶素 (Elaiophylin; 又称阿沙霉素 B, azalomycin B; 化学结构见图 1), 具体报道如下。

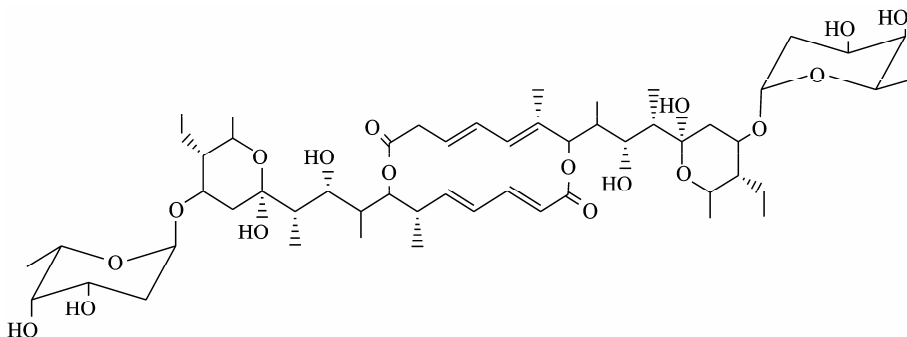


图 1 洋橄榄叶素化学结构

Fig. 1 Chemical structure of elaiophylin.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌种: 吸水链霉菌 17997, GDM 产生菌; 枯草芽胞杆菌 63501, 革兰阳性检定菌; 上述菌株均为本实验室保藏。

培养基: ISP2 培养基: 酵母提取物 0.4%, 麦芽提取物 1.0%, 葡萄糖 0.4%, 琼脂粉 1.8%。液体发酵培养基: 淀粉 2%, 棉子饼粉 0.5%, 葡萄糖

0.5%, 玉米浆 1.0%, 酵母粉 0.5%,  $\text{CaCO}_3$  0.2%。生物检定培养基: 蛋白胨 0.6%, 牛肉膏 0.3%, 酵母膏 0.3%, 葡萄糖 0.1%, 琼脂 1.2%, pH 7.2。

试剂: 酵母提取物 (Yeast extract)、麦芽提取物 (Malt extract), 英国 Oxoid 公司产品, 葡萄糖为国产分析纯试剂。TLC 硅胶板 (GF<sub>254</sub>), 山东烟台吉德精细化工有限公司或青岛海洋化工分厂产品。乙酸乙酯 (EtOAc)、甲醇、二氯甲烷、环己烷等有机溶剂为北京化工厂分析纯试剂。洋橄榄叶素对

照品由中国科学院成都生物研究所李国友博士惠赠<sup>[4]</sup>, 以及澳大利亚 Bioaustralis 公司产品。PCR 引物及相关试剂由宝生物工程 (大连) 有限公司合成或提供。

## 1.2 方法

吸水链霉菌 17997 的培养与发酵: 新鲜的吸水链霉菌 17997 孢子斜面 (ISP2 培养基, 28 °C 培养 7~10 d, 挖块接种于液体发酵培养基, 28 °C 振荡 (200 r/min) 培养 48~96 h。发酵液离心后, 弃沉淀; 发酵上清液用于乙酸乙酯 (EtOAc) 提取分析等。

EtOAc 提取: 取吸水链霉菌 17997 发酵上清液 25 mL, 用等体积 EtOAc 萃取, 倾出 EtOAc 萃取液, 室温吹干, 复溶于约 0.5 mL EtOAc 中。

硅胶板 TLC 分离检测以及 NaOH 显色: 取上述 20  $\mu$ L EtOAc 提取物浓缩液, 硅胶板 TLC 初步分离, 在 EtOAc: 二氯甲烷: 正己烷: 甲醇 (9: 6: 6: 2, V/V/V/V) 溶媒系统中展开后, 用 2.0 mol/L NaOH 溶液喷涂 (一种针对格尔德霉素及其生物合成类似物的显色方法<sup>[5]</sup>), 照相记录。

抗革兰阳性菌活性检测: 将上述 TLC 硅胶板 (没有用 NaOH 溶液喷涂显色) 贴到含枯草芽胞杆菌 63501 的生物检定培养基平板上约 1 min, 揭去硅胶板, 将平板置于 37 °C 培养 16 h, 平板上透明带对应的硅胶板条带含有抗革兰阳性菌活性化合物。

HPLC 和 LC-MS: 将硅胶板上含有抗菌活性化合物的条带用 EtOAc 洗脱下来后, 吹干, 复溶于少量甲醇中, 进行 HPLC 和 LC-MS 分析。HPLC 分析: Dikma Diamonsil C18 反相色谱柱, (5  $\mu$ m, 150 mm $\times$  4.6 mm); 20%~100% 甲醇梯度洗脱, 30 min; 流速 1 mL/min; 检测波长 256 nm。LC-MS 分析: Agilent 1200 液相色谱系统与 Applied Biosystems/MSD SCIEX (Concord, Ont, Canada) 公司的 Qstar LC-MS 质谱仪联用, 配有 Turbo Ionspray 离子化源。液相色谱条件同 HPLC。质谱检测条件: 喷雾电压 5.5 kV; 温度 450 °C; 解簇电压 80 V; 雾化气 40 相对单位,

辅助气 30 相对单位, 均为氮气; 全扫描监测, 正离子方式, 质荷比 (m/z) 范围为 100~1 300; 采用信息依赖扫描模式获得二级质谱; 碰撞压力设为高; 碰撞能量为 50eV。

dTDP-葡萄糖-4,6-脱水酶基因保守区的 PCR 扩增: 上游引物 P1 序列 5'-GSGGSGSSGCSGGSTTC ATSGG-3', 下游引物 P2 序列 5'-GGGWRCTGGYRS GGSCCGTAGTTG-3'<sup>[6]</sup>; 其中, R=A/G, W=A/T, Y=C/T, S=C/G。吸水链霉菌 17997 总 DNA (PCR 模板) 提取, 微波法<sup>[7]</sup>; 使用宝生物工程 (大连) 有限公司 Taq LA 聚合酶、GC Buffer I 进行 PCR, PCR 主要参数为: 96 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环。

## 2 结果与讨论

### 2.1 抗菌活性化合物的 HPLC 分析

在对吸水链霉菌 17997 次级代谢产物分析时, 发现一条在 TLC 硅胶板上用 NaOH 溶液喷涂显红色的条带 (图 2)。抗菌活性分析显示: 该红色条带所对应的化合物 (未显色) 具有抗革兰阳性菌活性。将该条带所含化合物从硅胶板上洗脱下来后进行 HPLC 分析, 出现一个显著的洗脱峰, 其紫外吸收峰形与保留时间均与文献报道的洋橄榄叶素基本一致<sup>[8-9]</sup>。有报道在格尔德霉素产生菌的次级代谢产物中发现洋橄榄叶素<sup>[9-10]</sup>。

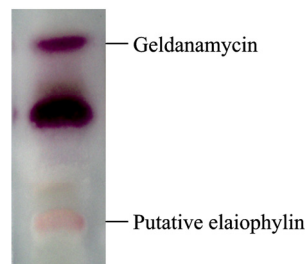


图 2 吸水链霉菌 17997 发酵液乙酸乙酯提取物经 TLC 硅胶板分离后用 2.0 mol/L NaOH 溶液喷涂显色结果  
Fig. 2 Color reaction by spraying 2.0 mol/L NaOH onto the TLC silica gel of EtOAc extract of the fermentation supernatant of *Streptomyces hygroscopicus* 17997.

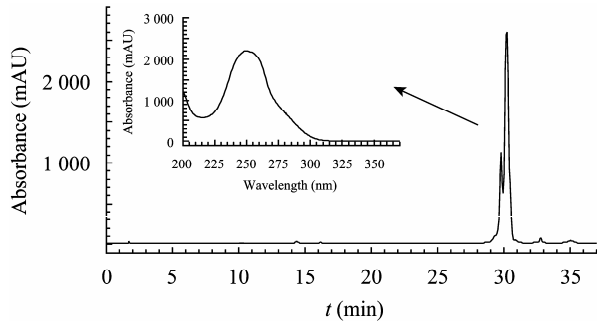


图3 吸水链霉菌 17997 所产生的抗革兰阳性菌活性化合物的 HPLC 谱图

Fig. 3 HPLC profile of the compound with anti-Gram positive bacteria activity from *Streptomyces hygroscopicus* 17997.

对吸水链霉菌 17997 菌丝体用丙酮浸泡提取和分析后,发现更多的 NaOH 溶液喷涂显红色化合物,这与洋橄榄叶素作为次级代谢产物主要存在于菌丝体内的报道相符合<sup>[11]</sup>。将该化合物与洋橄榄叶素对照品混和后进行 HPLC 分析,二者的保留时间和紫外吸收峰形一致;洋橄榄叶素对照品在 TLC 硅胶板上用 NaOH 溶液喷涂显示相同的红色。因此,该化合物很可能是洋橄榄叶素。

## 2.2 吸水链霉菌 17997 基因组 DNA 含有洋橄榄叶素 dTDP-葡萄糖-4,6-脱水酶 (Tgd) 基因

洋橄榄叶素化学结构中含有 2-脱氧-L-岩藻糖 (2-deoxy-L-fucose) 组分。已知葡萄糖通过磷酸化、dTDP 化、脱水、还原、差向异构化等反应生成 2-脱氧-L-岩藻糖,再经糖基转移酶催化进入到洋橄榄叶素分子中;2-脱氧-L-岩藻糖的生物合成需要 Tgd<sup>[12]</sup>。采用 *tgd* 基因保守区设计的引物,以吸水链霉菌 17997 基因组 DNA 为模板,PCR 得到一条预计大小 (约 0.6 kb) 的特异性 DNA 条带 (图 4)。对该 DNA 条带进行测序 (GenBank Accession No. HQ260658),它所编码的氨基酸序列,与美国专利 US 7595187 报道的洋橄榄叶素生物合成基因簇中 dTDP-葡萄糖-4,6-脱水酶基因 (EMBL Accession No. GP697132) 保守区编码氨基酸序列几乎完全相同 (Identities=154/158 (97%), Positives=156/158 (98%), Gaps=1/158 (0%))<sup>[13]</sup>,从而确证 PCR 扩增

的 DNA 片段属于洋橄榄叶素生物合成基因簇中的 *tgd* 基因保守区。吸水链霉菌 17997 中存在洋橄榄叶素 *tgd* 基因,提示其具有产生洋橄榄叶素的遗传基础。

## 2.3 抗菌活性化合物与洋橄榄叶素具有相同的 LC-MS 谱

为了确证吸水链霉菌 17997 中的抗革兰阳性菌活性化合物为洋橄榄叶素,对其进行了 LC-(+)-ESI-MS 分析 (图 5): MS<sup>1</sup> 显示一个  $m/z=1\ 047.7$  的加合

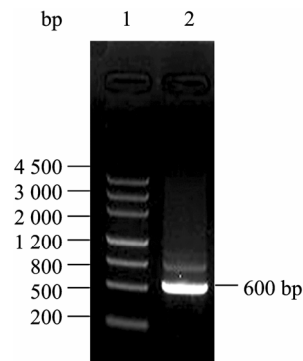


图4 PCR 扩增吸水链霉菌 17997 中的 *tgd* 保守区

Fig. 4 PCR amplification of the conserved region of *tgd* from *Streptomyces hygroscopicus* 17997. 1: DNA marker; 2: the conserved region of *tgd* (600 bp) from *Streptomyces hygroscopicus* 17997.

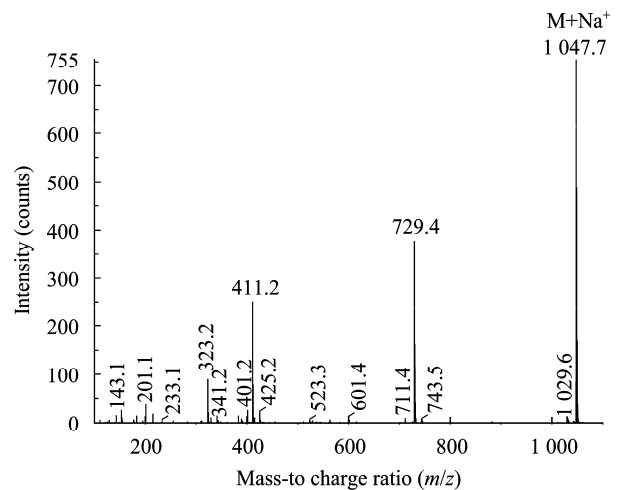


图5 吸水链霉菌 17997 中产生的抗菌活性化合物的二级 MS 谱图

Fig. 5 The MS<sup>2</sup> profile of the compound with antibacterial activity from *Streptomyces hygroscopicus* 17997.

离子 ( $[M+Na]^+$ ), 其  $MS^2$  主要碎片离子为  $m/z=729.4$  和  $411.2$ 。已知洋橄榄叶素的分子式为  $C_{54}H_{88}O_{18}$ , 精确分子质量  $1\ 024.60$ 。该化合物与文献所述的洋橄榄叶素  $MS^1$  和  $MS^2$  结果一致<sup>[14]</sup>。其中,  $m/z=729.4$  碎片离子系分子丢失两个 2-脱氧-L-岩藻糖组分形成,  $m/z=411.2$  碎片离子系分子的内酯环组分进一步脱水形成。因此, 该抗菌活性化合物被证实为洋橄榄叶素。

### 3 讨论

吸水链霉菌是链霉菌属中的一个比较常见种。据不完全统计, 吸水链霉菌能够产生 100 多种不同的次级代谢产物; 此外, 同一菌株产生一种以上不同化学结构的抗生素并不少见。洋橄榄叶素是一种大环二内酯类抗生素, 在雷帕霉素 (Rapamycin)、尼日利亚菌素 (Nigericin) 和除莠霉素 (Herbimycin) 等抗生素产生菌 (属于吸水链霉菌) 的次级代谢产物中均发现了洋橄榄叶素<sup>[15-16]</sup>。

近年来, 对微生物次级代谢产物、特别是抗生素的生物合成机制有了越来越多的研究和认识, 并积累了大量的抗生素生物合成基因 (簇) 序列信息。基于特定生物合成必需基因的保守序列设计寡核苷酸引物, 通过 PCR 可以快速筛选潜在的具有特定化学结构特点的抗生素产生菌<sup>[17-19]</sup>; 再通过序列分析与比对, 可以为推测菌株可能产生的抗生素化学结构或类型提供重要的提示或参考。本文通过证实吸水链霉菌 17997 含有 dTDP-葡萄糖-4,6-脱水酶基因, 并通过序列分析表明它属于洋橄榄叶素生物合成基因簇中与 2-脱氧-L-岩藻糖生物合成相关的 dTDP-葡萄糖-4,6-脱水酶基因, 提示该菌株具有产生洋橄榄叶素的遗传基础, 为推测抗革兰阳性菌活性化合物为洋橄榄叶素提供了重要的参考。

洋橄榄叶素具有抗革兰阳性菌、抗线虫、抗原生动物、免疫抑制和抗哺乳动物肿瘤细胞等多种生物学活性; 在基于单纯的生物活性筛选模式的微生

物次级代谢产物研究中, 被重复发现 (分离纯化和化学结构解析) 多次。本文报道了洋橄榄叶素及其产生菌的一种快速、简易鉴定方法; 其中, 洋橄榄叶素在 TLC 硅胶板上用 NaOH 溶液喷涂显红色的特性属于首次报道, 其 ESI(+)- $MS^2$  谱图是首次公开给出, 适用于洋橄榄叶素类化合物及其产生菌的早期快速鉴别和排重。洋橄榄叶素用 NaOH 溶液处理显红色的原理, 推测是由于分子中的内酯键在碱性条件下发生水解后分子再脱水增加一个共轭双键, 以及分子生成钠盐所致。

致谢: 中国科学院成都生物研究所李国友博士惠赠洋橄榄叶素对照品。中国医学科学院药物研究所分析中心完成 LC-MS 分析。

### REFERENCES

- [1] He WQ. The studies on geldanamycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces hygroscopicus* 17997[D]. Beijing: Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, 2006.  
赫卫清. 吸水链霉菌 17997 中格尔德霉素生物合成基因簇的研究[D]. 北京: 北京协和医学院/中国医学科学院, 2006.
- [2] He WQ, Wu LZ, Gao QJ, et al. Identification of AHBA biosynthetic genes related to geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *Curr Microbiol*, 2006, 52(3):197-203.
- [3] Gao QJ. Cloning and molecular analysis of ansamycins antibiotics biosynthetic gene cluster from *Streptomyces hygroscopicus* 17997, a geldanamycin producer[D]. Beijing: Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, 2002.  
高群杰. Geldanamycin 产生菌吸水链霉菌 17997 中安莎类抗生素生物合成基因簇的克隆与研究[D]. 北京: 北京协和医学院/中国医学科学院, 2002.
- [4] Gong YM, Chen J, Yang T, et al. Secondary metabolites with anti-*Staphylococcus aureus* activity from *Streptomyces hygroscopicus*. *Chin J Appl Environ Biol*, 2010, 16(2): 261-263.  
龚雨梅, 陈军, 杨涛, 等. 吸水链霉菌抗金黄色葡萄球菌代谢产物. 应用与环境生物学报, 2010, 16(2):

- 261–263.
- [5] Liu AM, Wu LZ, Zhang HT, et al. A color reaction method for early preliminary discrimination of benzenic ansamycins. *Chin J Antibiotics*, 2008, 33(7): 403–406.  
刘爱明, 武临专, 张会图, 等. 苯安莎类抗生素的一种早期鉴别方法. *中国抗生素杂志*, 2008, 33(7): 403–406.
- [6] Du Y, Li TB, Wang YG, et al. Identification and functional analysis of dTDP-glucose-4,6-dehydratase gene and its linked gene cluster in an aminoglycoside antibiotics producer of *Streptomyces tenebrarius* H6. *Curr Microbiol*, 2004, 49(2): 99–107.
- [7] Xu P, Li WJ, Xu LH, et al. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes. *Microbiol China*, 2003, 30(4): 82–84.  
徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报*, 2003, 30(4): 82–84.
- [8] *Antibiotics, Its Physiological and Biochemical Properties: Volume 1*. Beijing: People's Medical Publishing House. 1977: 526–527.  
抗菌素——生理生化特性: 第一分册. 北京: 人民卫生出版社, 1977: 526–527.
- [9] Alvi KA, Peterson J, Hofmann B. Rapid identification of elaiophylin and geldanamycin in *Streptomyces fermentation* broths using CPC coupled with a photodiode array detector and LC-MS methodologies. *J Ind Microbiol*, 1995, 15(2): 80–84.
- [10] Wang H, Cui CB, Han B, et al. Elaiophylins, new cell cycle inhibitors and apoptosis inducers, produced by *Streptomyces pseudoverticillus* I. Taxonomy, production and isolation. *Chin J Antibiotics*, 2001, 26(1): 19–24.  
王浩, 崔承彬, 韩冰, 等. 假轮枝链霉菌 *Streptomyces pseudoverticillus* 产生的 elaiophylin 类新细胞周期抑制剂及细胞凋亡诱导剂 I. 菌种鉴定、发酵生产及提取分离. *中国抗生素杂志*, 2001, 26(1): 19–24.
- [11] Yan SL, Huang WY. Research progress on azalomycin B. *Microbiol China*, 2002, 29(5): 103–107.  
严淑玲, 黄为一. 阿扎霉素 B (Azalomycin B) 研究进展. *微生物学通报*, 2002, 29(5): 103–107.
- [12] Haydock SF, Mironenko T, Ghoorahoo HI, et al. The putative elaiophylin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137 is adjacent to genes encoding adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl CoA mutase and to genes for synthesis of cobalamin. *J Biotechnol*, 2004, 113(1/3): 55–68.
- [13] Haltli BA. Elaiophylin biosynthetic gene cluster: US Patent, 7595187. 2009-09-29.
- [14] Ritzau M, Heinze S, Fleck WF, et al. New macrodiolide antibiotics, 11-*O*-monomethyl- and 11, 11'-*O*-dimethylelaiophylins, from *Streptomyces* sp. HKI-0113 and HKI-0114. *J Nat Prod*, 1998, 61(11): 1337–1339.
- [15] Fang A, Wong GK, Demain AL. Enhancement of the antifungal activity of rapamycin by the coproduced elaiophylin and nigericin. *J Antibiot*, 2000, 53(2): 158–162.
- [16] Yan SL, Huang WY, Wang SM, et al. Extraction, purification and structure elucidation of antibiotic M1 in mycelia of *Streptomyces hygroscopicus* NND-52. *Chin J Antibiotics*, 2001, 26(3): 161–164.  
严淑玲, 黄为一, 王世梅, 等. 吸水链霉菌 NND-52 菌株胞内抗生素 M1 分离、纯化及结构确定. *中国抗生素杂志*, 2001, 26(3): 161–164.
- [17] Zhang HT, Wu LZ, Liu AM, et al. PCR screening of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthase gene leads to identification of ansamycins and AHBA related antibiotic producers in actinomycetes. *J Appl Microbiol*, 2009, 106(3): 755–763.
- [18] Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski A, et al. A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources. *ChemBioChem*, 2007, 8(7): 757–766.
- [19] Liu W, Ahlert J, Gao QJ, et al. Rapid PCR amplification of minimal enediyne polyketide synthase cassettes leads to a predictive familial classification model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(21): 11959–11963.