

生孢囊放线菌及其它属菌的甲基萘醌

陆晓涛 阮继生

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用高压液相层析对 31 个属 90 株生孢囊放线菌及其它属菌的甲基萘醌进行了测定。其结果表明: 游动放线菌属、小瓶菌属和小单孢菌属的甲基萘醌为 MK-9(H₄) MK-10(H₄), 无定形孢囊菌属和游动单孢菌属的甲基萘醌为 MK-9(H₄), 指孢囊菌属的甲基萘醌为 MK-9(H₄) MK-9(H₄), 链孢囊菌属的甲基萘醌为 MK-9(H₄) 或 MK-9(H₄), 螺孢菌属的甲基萘醌为 MK-9(H₄) MK-9(H₄), 游动双孢菌属的甲基萘醌为 MK-9(H₂) MK-9(H₄)。不同放线菌属的甲基萘醌组份是较稳定的, 可作为属的分类特征之一。建议用甲基萘醌与形态和细胞壁化学组份相结合区分放线菌中的不同属。

关键词 生孢囊放线菌; 甲基萘醌

醌是原核生物细胞原生质膜上的组份, 在电子传递和氧化磷酸化中起重要作用。早期的研究结果发现不同微生物醌的组份不同^[1-4], 以后系统地研究了醌在细菌和放线菌中的分布、结构及其在分类学中的应用^[5-10]。

在微生物中, 醌主要有两种类型: 甲基萘醌(简称为 MK, 即 2-甲基-3-多异戊烯基-1,4-萘醌)和泛醌(简称为 Q, 即 2,3-二甲氧基-5-甲基-6-多异戊烯基-1,4-萘醌)。革兰氏阳性细菌包括放线菌主要合成甲基萘醌。醌的异戊烯基侧链长度(1—14 个异戊烯基单位)和氢的饱和度不同^[11]作为不同微生物属的分类依据。

本实验的目的在于分析生孢囊放线菌各属菌的甲基萘醌, 用其它属的代表菌(国外做过醌)作对比, 验证我们采用方法的可靠性, 同时阐述甲基萘醌在放线菌分类中的作用。

材料与 方法

(一) 菌株

被检测的放线菌 31 个属 90 株菌列于

表 1。其中除 28 株未定名外, 其余已知菌来自日本、美国及本实验室鉴定过的保藏菌。

菌体收集: 接种 Bennett 培养液, 30℃ 摇床培养 3—5d, 至对数期, 离心收集菌体, 用蒸馏水洗两次, 将菌体冰冻干燥, 避光干燥保存。

(二) 醌的提取与纯化

按 Collins 的方法^[12]。取冰冻干菌体 100mg, 用氯仿: 甲醇 (2:1V/V) 50ml 混合溶剂, 在磁力搅拌器上振荡 1—2h, 过滤收集液体, 用旋转蒸馏器(40℃)蒸干。用 1—2ml 氯仿: 甲醇 (2:1V/V) 重新溶解, 在 Kieselgel 60F₂₅₄ 薄板上点样成窄带, 在已烷: 乙醚 (85:15V/V) 中展层, 紫外灯 (254nm) 下观察。甲基萘醌在绿色荧光背景下显示暗褐色带 (Rf = 0.7—0.8), 将其刮下, 用 1ml 氯仿在玻璃漏斗中抽滤洗

本文于 1988 年 4 月 6 日收到。

承国家自然科学基金委员会资助; Dr. Akio scino, Prof. Mary P. Lechevalier 赠送标准菌种; Dr. R. M. Kroppenstedt 赠送甲基萘醌 (MK) 标准品; 吴诚华、秦敏协助测定样品, 特此一并致谢。

表1 生孢囊放线菌及其它属甲基萘醌的组份
Table 1 Menaquinone composition of sporangia forming actinomycetes
and other genera

甲基萘醌 Menaquinones		MK-8			MK-9				MK-10					
菌株 Strains		-	(H ₂)	(H ₄)	-	(H ₂)	(H ₄)	(H ₆)	(H ₈)	-	(H ₂)	(H ₄)	(H ₆)	(H ₈)
CWI														
<i>Streptomyces</i> sp.	C51						+	+++	++					
<i>S.</i> sp.	A40						++*	+++	+++					
<i>Actinopycnidium caeruleum</i>	C12	+	+	+			++	++	+++					
<i>Actinosporangium violaceum</i>	C13						++	+++	+					
<i>Chainia kunmingensis</i>	C21					+++	++*	++	+					
<i>Elytrosporangium carpinense</i>	C28					+	+	++	+++					
<i>Microellobosporia cinerea</i>	C32						+	+++	++					
<i>Nocardioides flavus</i>	C36	+		+++			+							
<i>Kineosporia aurantiaca</i>	C61					+	+++	+						
<i>Microstreptospora cinerea</i>	133						+	+++	++*					
CWI														
<i>Actinoallotheichus cyanogriseus</i>	C1						+++							
<i>Micromonospora</i> sp.	A17						+++	+					++*	
<i>Amorphosporangium castaneum</i>	C19					+	+++	++	+					
<i>Dactylosporangium matsuzakiense</i>	C22						+	++	+++					
<i>D. salmonum</i>	C25				+	+	+++	+++	++					
<i>D. fusco-aurantiacum</i>	C26						+	++	+++					
<i>D. fusco-aurantiacum</i> var. <i>ailaoshanicum</i>	C27						+	+	+++					
<i>Actinoplanes violaceus</i>	C3	+					+++	+					++	
<i>A. pallidoaurantiacus</i>	C4	+					+++	+					+	
<i>A. roseosporangium</i>	C6	+	+		++		+++	+					++*	+
<i>Actinoplanes purpeobrunneus</i>	C9	+	+		+	+	+++				+		++*	+
<i>A. aurantiacus</i>	C11	+					+++	+					+	
<i>A. saroveporensis</i>	A41	+			+	+	+++				+		++*	
<i>A. urahensis</i>	A42		+			+	+++	+					++	+
<i>A. liguriae</i>	A43		+	+		+	+++	+					++*	+
<i>A. azureus</i>	A44		+	+			+++	+					+	
<i>A. brasiliensis</i>	A45	+	+				+++	+					+	
<i>A. caeruleus</i>	A46					+	+++	+					+	
<i>A. ferrugineus</i>	A48						++	+++	+					
<i>A. garbadiensis</i>	A49						+++							
<i>A. ianshinogenes</i>	A50						+++	+						
<i>A. italicus</i>	A51					+	+++	+					++*	
<i>A. nipponensis</i>	A52					+	+	+++	+					
<i>A. rectilineatus</i>	A53						+++						+	
<i>A.</i> sp.	A24						+++	+					++	+
<i>A.</i> sp.	A25						+	++*	+++					
<i>A.</i> sp.	B23				+	+	++*	+++	+					
<i>A.</i> sp.	B24						+	++*	+++				+	
<i>A.</i> sp.	B29					+	+++	+					++*	

表 1 (续)

甲基萘醌 Menaquinones 菌株 Strains		MK-8			MK-9					MK-10				
		-	(H ₂)	(H ₄)	-	(H ₂)	(H ₄)	(H ₆)	(H ₈)	-	(H ₂)	(H ₄)	(H ₆)	(H ₈)
<i>A. sp.</i>	B39							++	+++	++				
<i>A. sp.</i>	B41				+			+	+++			+		
<i>A. sp.</i>	B52							+	+++	+				
<i>A. kinshanensis</i>	B61							+++	+			+		
<i>Ampullariella lobata</i>	B56	+				+	+++	+				+	*	
<i>A. violaceochromogenes</i>	B55	+		+		+	+++	+				+	*	
<i>A. regularis intermedia</i>	B59	+					+++							
<i>A. kunmingensis</i>	B60	+				+	+++					+	*	
<i>A. cylindrica</i>	B62	+				+	+++	+				+	*	
<i>A. pekinensis</i>	B63					+	+++	+				+	*	
<i>A. pilifera</i>	B64	+					+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B1	+					+++	+				+		
<i>A. sp.</i>	B2						+++	+				+		
<i>A. sp.</i>	B3	+					+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B4		+				+++	+				+		
<i>A. sp.</i>	B5	+					+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B6	+				+	+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B7					+	+++	+				+		
<i>A. sp.</i>	B8		+	+		+	+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B9						+++	+				+		
<i>A. sp.</i>	B10						+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B11						+++	+				+		
<i>A. sp.</i>	B12						+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B13	+				+	+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B14						+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B15		+				+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B17		+			+	+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B18					+	+++	+				+	*	+
<i>A. sp.</i>	B19		+	+		+	+++	+				+	*	+
<i>A. sp.</i>	B20					+	+++	+				+	*	+
<i>A. sp.</i>	B21					+	+++	+				+	*	
<i>A. sp.</i>	B22						+++	+				+		
CWIII														
<i>Actinomadura pelletieri</i>	C22					+	+	+++	+					
<i>Actinosynnema sp.</i>	C17					+	+++					+	*	
<i>Microbispora rosea</i>	C33					+	+++	+				+		
<i>Nocardioopsis dassonvillei</i>	C39										+	+	*	+++
<i>Planobispora longispora</i>	C41	+	+			+++	++	+	+					
<i>Planomonospora parontospora</i>	C42	+	+				+++	+			+	+	*	
<i>Spirillospora albida</i>	C49	+			+		++	+++				+		
<i>Sireptosporangium amethystogenes</i>	C55						++	+++	++					
<i>S. rubroaurantiacum</i>	C52					+	+++	+						

表 1 (续)

菌株 Strains		甲基萘醌 Menaquinones			MK-8				MK-9				MK-10				
		-	(H ₂)	(H ₄)	-	(H ₂)	(H ₄)	(H ₆)	(H ₈)	-	(H ₂)	(H ₄)	(H ₆)	(H ₈)			
CW IV																	
<i>Nocardia asteroides</i>	C35		++				+++										
<i>N. asteroides</i>	727		+++														
<i>N. coeliaca</i>	C81			+++													
<i>Pseudonocardia azurea</i>	C43	+		+		+	+++	+								+	
<i>P. simavensis</i>	L13		+++	++		++*	+									+	
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	C45		+++			+	+	+	+								
<i>Saccharomonospora caesia</i>	C47	+		+	*		+++									+	
<i>Saccharopolyspora hirsuta</i>	C48	++				+	+	+++	+							+	
其 它																	
<i>Catenuloplanes japonicus</i>	C20		+			+	+						+++	++		++	
<i>Kiratsospora clausa</i>	C31	+		+				+++	++								

注: “+++”表示主要成份; “++”表示超过主要成份 50% 以上的含量; “+”表示较少的含量; “*”表示同一级水平中较高的含量。

“+++” Major component; “++” Overbalance 50% of major component; “+” Smaller component; “*” The more component than the same degree.

脱, 得到纯化的醌化合物。由于醌极易氧化, 在提取与保存过程中, 应避强光, 勿与酸、碱和水接触, 提纯的醌最好立即进行测定分析。

(三) 反向高压液相层析 (RPHPLC)

用 Waters 公司的高压液相色谱仪, 柱为十八烷基硅烷 (ODS 5 μ m, 250 \times 4.6mmid), 流动相为乙腈: 异丙醇 (75: 25V/V), 流速 1ml/min, 温度 40 $^{\circ}$ C, 270nm 紫外下监测并用计算机进行综合分析。以甲基萘醌标准品 MK-6, MK-7, MK-8, MK-9, MK-9(H₂), MK-9(H₄), MK-9(H₆), MK-9(H₈) 作对比。

结 果

甲基萘醌的分析结果见表 1。

细胞壁化学组份 I 型菌链霉菌属 (*Streptomyces*) (见图 1)、孢囊放线菌属 (*Actinosporangium*), 小荚孢囊菌属 (*Microellobosporia*), 小链孢囊菌属 (*Microstreptospora*) 的甲基萘醌均为 MK-9(H₆)

MK-9(H₂) MK-9(H₄), 而鞘孢囊菌属 (*Elytrosporangium*) 和孢器放线菌属 (*Actinopycnidium*) 的甲基萘醌为 MK-9(H₂) MK-9(H₆) MK-9(H₈), 钦氏菌属 (*Chaina*) 的甲基萘醌为 MK-9(H₂), MK-

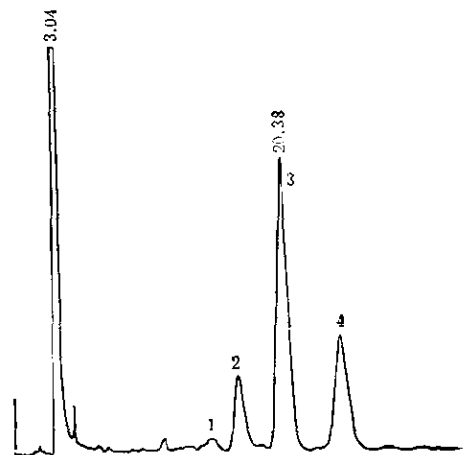


图 1 高压液相色谱仪分离链霉菌的甲基萘醌
Fig. 1 Menaquinones of *Streptomyces* sp. isolated by HPLC

1. MK-9(H₂) 2. MK-9(H₄)
3. MK-9(H₆) 4. MK-9(H₈)

9(H₄), 类诺卡氏菌属 (*Nocardioide*s) 的甲基萘醌为 MK-8(H₄), 动孢菌属 (*Kineosporia*) 的甲基萘醌为 MK-9(H₄)。

细胞壁化学组份 II 型菌中, 指孢囊菌属的 4 个种除鲑色指孢囊菌的甲基萘醌为 MK-9(H₆) MK-9(H₄) MK-9(H₈) 外, 其它 3 个种均为 MK-9(H₈) MK-9(H₆) 异壁放线菌属 (*Actinoalloteichus*)、无定形孢囊菌属 (*Amorphosporangium*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*)、小瓶菌属 (*Ampullariella*) 和游动放线菌属 (*Actinoplanes*) 中绝大多数菌的甲基萘醌都以 MK-9(H₄) 为主, 后 3 个属还含有一定量的 MK-10(H₄), 但日本游动放线菌 (*Actinoplanes nipponensis*)、生铁游动放线菌 (*Actinoplanes ferrugineus*) 及 4 株未定名的游动放线菌 (B23、B39、B41 及 B52) 的甲基萘醌以 MK-9(H₆) 为主, 而另外两株未定名的游动放线菌 (A25 及 B24) 的甲基萘醌则以 MK-9(H₈) 为主。

细胞壁化学组份 III 型菌中, 马杜拉放线菌属 (*Actinomadura*)、螺孢菌属 (*Spirillospora*) 的甲基萘醌以 MK-9(H₆) 为主, 束丝放线菌属 (*Actinosynnema*)、小双孢菌属 (*Microbispora*)、游动单孢菌属 (*Planomonospora*) 的甲基萘醌均以 MK-9(H₄) 为主, 游动双孢菌属的醌为 MK-9(H₂) MK-9(H₄), 拟诺卡氏菌属 (*Nocardioopsis*) 的甲基萘醌为 MK-10(H₆) MK-10(H₄)。链孢囊菌属中两个种不同, 生晶紫链孢囊菌的甲基萘醌以 MK-9(H₄) 为主, 而红橙链孢囊菌 (*Streptosporangium rubroaurantiacum*) 的甲基萘醌以 MK-9(H₄) 为主。

细胞壁化学组份 IV 型菌中, 诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、红球菌属 (*Rhodococcus*) 的甲基萘醌为 MK-8(H₄) MK-8(H₂), 假诺卡氏菌 (*Pseudonocardia*) 属中两个种

不同, 一个种的甲基萘醌为 MK-9(H₄), 另一个种的则为 MK-8(H₂), 糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*) 和糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*) 的甲基萘醌均为 MK-9(H₄)。

另外, 如日本串动菌属 (*Catenuloplanes*) 的甲基萘醌为 MK-10(H₂) MK-10(H₄) MK-10(H₆), 北里孢菌属 (*Kitasatospora*) 的甲基萘醌为 MK-9(H₄) MK-9(H₆)。

应该说明的, 除星状诺卡氏菌 C-35 (*Nocardia asteroides*) 外, 所测试的多数菌的甲基萘醌的结果都与国外报道的一致。

讨 论

目前, 生孢囊放线菌各属菌的分类比较混乱, 各家说法不一。Farina 和 Bradley^[13] 用 DNA 体外杂交实验表明, 游动放线菌属、小瓶菌属和指孢囊菌属之间具有高水平的 DNA 同源性。Stackebrandt^[14] 用 DNA-DNA 杂交实验也表明, 游动放线菌属、无定形孢囊菌属、小瓶菌属、指孢囊菌属和小单孢菌属之间具有高水平的 DNA 同源性。我们的数值分类结果^[15] (133 株生孢囊放线菌及其它菌属, 119 项实验) 与前人的结论基本相符。无定形孢囊菌属位于游动放线菌属中, 游动放线菌属与小瓶菌属相似性极高, 而与指孢囊菌属、链孢囊菌属、螺孢菌属、游动单孢菌属和游动双孢菌属的相似性依次降低。

分析甲基萘醌的实验结果也基本符合以上的结论。除指孢囊菌属的甲基萘醌差别较大外, 游动放线菌属、无定形孢囊菌属、小瓶菌属及小单孢菌属的甲基萘醌几乎相同, 都以 MK-9(H₄) 为主, 而且这些菌的细胞壁化学组份均为 II 型, 其间的差别主要在于形态。伯杰氏系统细菌学手

册^[15]已将无定形孢囊菌属并入游动放线菌中,将小单孢菌属列入游动放线菌群中,看来这种变动是有道理的。

从甲基萘醌的实验结果也可看出,多数菌属有其代表性的甲基萘醌组份,也有些菌属具有同样的甲基萘醌组份,但它们的形态或细胞壁化学组份各异。当菌种的发酵培养基与菌龄改变时,其甲基萘醌的主要组份并未改变^[16],初步认为甲基萘醌组份在不同放线菌中是较稳定的,可作为属的分类特征之一,建议用甲基萘醌与形态和细胞壁化学组份相结合区分放线菌中的不同属。

参 考 文 献

- [1] Bishop, D. H. L. et al.: *Biochem. J.*, **83**: 606—614, 1962.
- [2] Crane, F. L.: *Biochemistry of Quinones*, ed. Morton, R. A., Academic Press, Inc., London, pp. 183—206, 1965.
- [3] Lester, R. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **234**:

- 2169—2175, 1959.
- [4] Page, A. C. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **89**: 318—321, 1960.
- [5] Jeffries, L. M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **54**: 365—380, 1969.
- [6] Yamada, Y. et al.: *J. Gen. and Appl. Microbiology*, **22**: 203—214; **227—236**, 1976. **23**: 105—108; **207—216**; **331—335**, 1977.
- [7] Collins, M. D. et al.: *J. Gen. Microbiology*, **100**: 221—230, 1977.
- [8] Collins, M. D. et al.: *ibid.*, **110**: 127—136; **111**: 453—457, 1979.
- [9] Collins, M. D. et al.: *J. Appl. Bacteriology*, **48**: 459—470, 1980.
- [10] Shah, H. N. et al.: *ibid.*, **48**: 75—87, 1980.
- [11] Dunphy, P. J. et al.: *Methods Enzymol.*, **18**: 407—461, 1971.
- [12] Collins, M. D.: *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, ed. Goodfellow, M. and D. Minnikin, Academic Press, pp. 267—285, 1985.
- [13] Farina, G. et al.: *J. Bacteriology*, **102**: 30—35, 1970.
- [14] Stackebrandt, E. B. et al.: *Int. Syst. Bacteriology*, **31**: 420—431, 1981.
- [15] Williams, S. T.: *The Actinomycetes*, **9(3)**: 129—130, 1985—1986.
- [16] Ruan, J. S. et al.: *Biology of Actinomycetes*⁸⁸, ed. Okami, Y. et al., Japan Scientific Societies Press, pp. 221—226, 1988.

THE STUDY OF MENAQUINONES IN SPORANGIA FORMING ACTINOMYCETES AND OTHER ACTINOMYCETES

Lu Xiaotao Ruan Jisheng

(Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing)

90 strains of sporangia forming actinomycetes and other organisms representing 31 genera were analyzed by HPLC for menaquinones. MK-9(H₄)MK-10(H₄) were found in *Ampullariella*, *Actinoplanes* and *Micro-monospora*. MK-9(H₄) was found in "*Amorphosporangium*" and *Planomonospora*. The genus *Dactylosporangium* contained MK-9(H₆)MK-9(H₈). MK-9(H₄) or MK-9(H₆) predominated in the genus *Streptosporangium*. *Spirillospora* had MK-9(H₆)MK-9(H₄) and *Planobispora* had MK-9(H₂)MK-

9(H₄) The results showed that menaquinones could be used as a valuable taxonomic criteria in the generic taxonomy of actinomycetes, but it should be considered with the characteristics of morphology and cell wall composition.

Key words

Menaquinones; Sporangia forming actinomycetes