

# 产生抗肿瘤抗生素 Sandramycin 的南极放线菌 *C*<sub>3905</sub> \*

胡继兰 张春颖 娜 仁 李 毅

(中国医学科学院 中国协和医科大学医药生物技术研究所 北京 100050)

**摘 要** :从南极乔治王岛土壤分离到一株诺卡氏菌形放线菌 *C*<sub>3905</sub> 菌株。其气生菌丝白色,基内菌丝无色至乳脂或浅粉,菌丝直径 0.5~0.8 $\mu$ m,断裂为杆状和球状体,表面光滑。胞壁化学 I 型,无枝菌酸,磷酸类酯 PI 型,优势甲基萘酯为 MK-9(H<sub>4</sub>)。DNA 中 G+C 含量为 68.3~68.9mol%。兼性嗜冷,生长适温为 15 $^{\circ}$ C~20 $^{\circ}$ C。产生抗肿瘤抗生素 sandramycin。基于以上特征及分子遗传分类的研究结果,我们建议 *C*<sub>3905</sub> 菌株作为白色类诺卡氏菌的一个变种,命名为白色类诺卡氏菌南极变种, *Nocardioides albus* var. *antarcticus*。

**关键词** :白色类诺卡氏菌南极变种, sandramycin, 兼性嗜冷生物, 抗癌

中图分类号 :Q939.13 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2000)06-0646-51

曾经报道从南极乔治王岛土壤中分离到 77 株放线菌和丝状真菌,对其生物学特征及生物活性作了初步的探索<sup>[1]</sup>。在进一步研究中,发现放线菌 *C*<sub>3905</sub> 菌株的活性物质经提纯鉴别证明与抗肿瘤抗生素 Sandramycin 相同。关于 *C*<sub>3905</sub> 抗生素理化性质的研究将在另文报道<sup>[2]</sup>。本文报告 *C*<sub>3905</sub> 菌株的生物学性状及分类鉴定结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

*C*<sub>3905</sub> 菌株用甘油甘氨酸琼脂从南极乔治王岛土壤于 15 $^{\circ}$ C 分离。模式菌 *Nocardioides albus* IMET7807 由是中国微生物菌种保藏中心提供。

### 1.2 生物活性研究

将 *C*<sub>3905</sub> 菌株接种于液体发酵培养基(培养基成分:淀粉 10g,蔗糖 15g, KNO<sub>3</sub> 1g, 胨 2g, NaCl 3g, 黄豆粉 10g, pH7.0, 水是溶至 1L)于 15 $^{\circ}$ C 振荡培养 6~7d, 上清液分别检测抗微生物及抗肿瘤活性。提纯品的活性检测与发酵液相同(微生物用纸碟法,抗肿瘤用精原细胞法<sup>[3]</sup>)。

### 1.3 分类学研究

按国际链霉菌计划(ISP)<sup>[4]</sup>及 Williams<sup>[5]</sup>的培养基和方法观察形态培养特征及生理生化特性。细胞壁氨基酸和全细胞水解液醚分析参照 Becker<sup>[6]</sup>、Lechevalier<sup>[7]</sup>及 Hasagawa<sup>[8]</sup>的方法。磷酸类酯、甲基萘醌、枝菌酸的分析、DNA 中 G+Cmol% 测定以及 rDNA 相似性的分析均由中国科学院微生物研究所放线菌室根据刘志恒等引用的条件和

\* 国家自然科学基金资助(39270012)

作者简介 胡继兰(1928-),女,湖北潜江人,中国医学科学院医药生物技术研究所研究员,主要从事微生物药理学研究

收稿日期:1999-09-06,修回日期:2000-01-03© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

方法<sup>[9]</sup>协助完成。

C<sub>3905</sub>菌株在以上实验观察中均培养于 15℃。化学分类分析用菌丝均用两种不同培养基培养分别取得结果。

## 2 结果

### 2.1 生物活性

C<sub>3905</sub>菌株的发酵液对精原细胞检测显示很强的活性,同时抗各种革兰氏阳性细菌。以八联球菌为检定菌追踪分离到的纯品其理化性质与抗肿瘤抗生素 Sandramycin 相同<sup>[2]</sup>,提纯品的生物活性见表 1。

表 1 C<sub>3905</sub>菌株的生物活性

Table 1 Biological activity of C<sub>3905</sub>

Test organism	MIC( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	0.98
<i>Staphylococcus aureus</i> 209p	1.96
<i>Sarcina lutea</i>	0.98
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.98
<i>Proteus vulgaris</i> OX19	>250
<i>Escherichia coli</i> B	>250
<i>Mycobacterium</i> 607	7.8
<i>Candida albicans</i>	>250
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>250
<i>Penicillium avellanium</i>	>250
Antitumor activity( spermatogonia assay )	2.8

### 2.2 形态特征

C<sub>3905</sub>菌株在各种合成培养基上培养有明显的气生菌丝和基内菌丝的分化,菌丝有分枝,直径 0.5~0.8 $\mu\text{m}$ ,两种菌丝均断裂为不规则的杆状乃至球状小体,表面光滑,不能运动。15℃培养时菌丝生长好,断裂发生在菌落出现的第 4 天,而培养在 28℃ 时生长很差,但断裂发生早,几乎与菌落同时出现。断裂的片断起初为杆状,后期几乎都变为球状(图 1、2)。

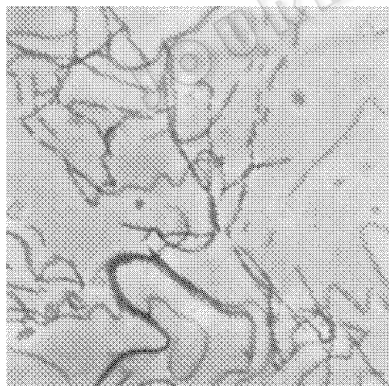


图 1 C<sub>3905</sub>菌株培养于 Bennett 's 琼脂上的初级菌丝

Fig.1 Primary mycelium of strain C<sub>3905</sub> on Bennett 's agar 7 days $\times$ 600

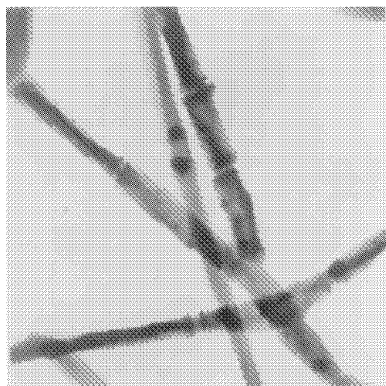


图 2 C<sub>3905</sub>菌株的气生菌丝孢子样断裂

Fig. 2 Aerial mycelium of strain C<sub>3905</sub> fragmented into spore-like elements

Glycerol-asparagine agar 8~10days $\times$ 1500.

## 2.3 培养特性

C<sub>3905</sub>菌株培养在 ISP No. 2、No3、No6 以及 Bennet's 等有机培养基中均不形成气生菌丝,菌落多呈无色面团状。基内菌丝多有菌丝束。而培养在各种合成培养基中则形成雪花状白色气生菌丝。基内菌丝一般无色,日久变为乳脂或淡黄。一般无可溶性色素,日久会使培养基呈淡黄色。在蔗糖查氏琼脂中培养日久,基丝和可溶性色素呈淡红色(表 2)。

表 2 C<sub>3905</sub>菌株的培养特征

Table 2 Cultural characteristics of strain C<sub>3905</sub>

Medium	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment
ISP medium No. 2	None	Colorless, pasty wrinkled	None
ISP medium No. 3	None	Colorless	None
ISP medium No. 4	Smowy, white	Colorless	None
ISP medium No. 5	Smowy, white	Colorless	None
ISP medium No. 6	None	Colorless, pasty wrinkled	None
ISP medium No. 7	White	Colorless~Cream	Light yellow
Czapek's agar( sucrose )	White	Colorless~Pink	None or pink
Czapek's agar( glucose )	White	Colorless~Cream	None or light yellows
Glucose-asparagine agar	None	Colorless~Cream	Yellowish or None
Gauze No. I agar	White	Colorless or light yellow, pinkish	None or light yellow

## 2.4 生理生化特征

生理生化特性见表 3 表 4。

表 3 C<sub>3905</sub>菌株的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain C<sub>3905</sub>

Formation of melanoid pigment		Degradation activity	
ISP medium No. 1	-( Negative )	Gelatin	+
ISP medium No. 1	-	Starch	+
ISP medium No. 1	-	Casein	+
H <sub>2</sub> S production	+( Positive )	Tyrosine	+
Nitrate reduction	+	Urea	-
Milk peptonization	+	Chitin	+
Milk coagulation	+		
Growth tests		Growth tests	
Growth temperature range	0~28℃	Malachite green( 0.01% )	Moderate
Optimum temperature	15℃~20℃	Crystal violet( 0.01% )	Trace
pH4.3	No growth	Sodium azide( 0.01% )	No growth
Pheno( 0.1% )	No growth	NaCl tolenavice( 1%~3% )	Growth

表 4 *C*<sub>3905</sub> 菌株碳源和氮源的利用Table 4 Utilization of carbon sources and nitrogen sources of *C*<sub>3905</sub>

Utilization of carbon sources					
L-Arabinose	+++	Sucrose	++	Xylitol	-
D-Xylose	+++	D-Galactose	+++	Ribitol	+++
D-Glucose	+++	Raffinose	+++	Trehalose	+++
L-Rhamnose	+++	Cellulose	-	Cellobiose	+++
D-Mannitol	+++	Starch	+++	Sodium acetate	+
Inositol	+++	Dextrin	+++	Sodium citrate	+
D-Fructose	+++	Glycerol	+++	Control	-
Utilization of nitrogen sources					
L-Serine	++	L-Arginine	+++	L-Methionine	+
D-Threonine	++	L-Lysine	+	Asparagine	+++
L-Histidine	+++	L-Tryptophan	+	Control	-
L-Cysteine	-				
+++ : Good    ++ : Moderate    + : Trace    - : No growth					

## 2.5 细胞化学组份及 DNA 中 G + C mol % 值

细胞化学组份及 G + C 比值见表 5。

表 5 *C*<sub>3905</sub> 菌株的细胞化学分类特征及 DNA G + C mol % 值

Table 5 Cell chemotaxonomic characteristics and DNA G + C mol % of strain *C*<sub>3905</sub>

Cell wall diamino acid	LL-DAP (Predominant) meso-DAP (A little)
Sugar	Glucose, Arabinose (trace)
Mycolic acid	None
Menaquinone	MK-9 (H <sub>4</sub> ) (Predominant); MK-9 (H <sub>2</sub> ), MK-8 (H <sub>2</sub> )
Phospholipid	I
DNA G + C mol %	68.3 ~ 68.9

## 2.6 rDNA 相似性分析结果

*C*<sub>3905</sub> 菌株与 *N. albus* IMET7807 的 DNA 经 *Bam* HI 酶切, 采用 Southern 杂交方法与探针 DIG-P64 杂交, 所得 rDNA 相似性分析结果见图 3。由图 3 显示 *C*<sub>3905</sub> 菌株与 IMET7807 的 Ribotype 图谱不相同, 前者有两条带, 后者仅一条带。

## 2.7 分类鉴定

*C*<sub>3905</sub> - A 抗生素与抗肿瘤抗生素 Sandramycin 相同。Sandramycin 的原产生菌为 *Nocardioides* sp. (ATCC39419)<sup>[10]</sup> 但无分类特征描述, 无法进行菌株的比较。但原产生菌是中温菌, 适宜发酵温度是 27°C。*C*<sub>3905</sub> 是

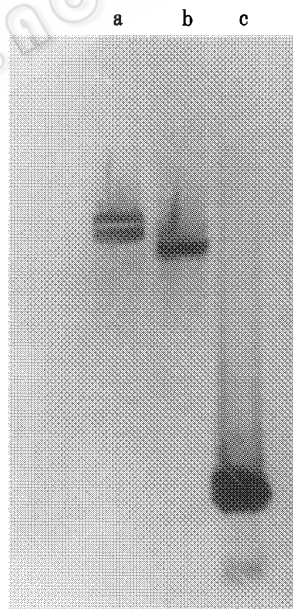


图 3 *C*<sub>3905</sub> 菌株与 IMET7807 菌株同源性分析

Fig. 3 Ribotyping results of strain *C*<sub>3905</sub> and strain IMET 7807

a. Strain *C*<sub>3905</sub>; b. Strain IMET 7807; c. 1kb DNA ladder.

兼性嗜冷菌,发酵适温为 15℃。

根据形态培养特征、细胞壁含优势 LL-DAP、无枝菌酸、磷酸类酯 PI 型等分析结果, C<sub>3905</sub> 菌株非常近似 *Nocardioides albus*<sup>[11,12A]</sup>,但 C<sub>3905</sub> 菌株胞壁同时含有少量 meso-DAP,利用肌醇和棉子糖,兼性嗜冷,特别是细胞化学组份中优势醌型为 Mk-9(H<sub>4</sub>),不同于国内外学者关于类诺卡氏菌的甲基萘醌为 Mk-8(H<sub>4</sub>)的报道<sup>[12B,13-16]</sup>。C<sub>3905</sub> 菌株曾用两种不同的培养基培养菌丝,所得分析结果均为 Mk-9(H<sub>4</sub>),说明这一特征是稳定的。C<sub>3905</sub> 菌株与 *N. albus* 的比较见表 6。

表 6 C<sub>3905</sub> 菌株与已知相似种的比较

Table 6 Comparison of strain C3905 with related species

	<i>Nocardioides albus</i> pauser 1976	Strain C <sub>3905</sub>
Morphology	Hyphae 0.5~1μm in diameter, fragment into rod to coccus, surface smooth.	Hyphae 0.5~0.8μm in diametes, fragment into rod to coccus, surface smooth.
Aerial mycelium	Thin, chalky	Smowy, white
Substrate mycelium	Whitish to light yellow aged cultures light brown, pasty	Colorless to cream or pink, pasty
Soluble pigment	None aged cultures light brown	None or light yellow, pink
Growth temperature	18~37℃	0~28℃
Optimum temperature	28℃	15~20℃
Formation of melanoid	Negative	Negative
Pigment		
H <sub>2</sub> S production	Positive	Positive
Utilization of carbon sources		
Raffinose	-	+++
Inositol	-	+++
Cell wall diamino acid	LL-DAP	LL-DAP, a little meso DAP
Mycolic acid	None	None
Menaquinone	MK-8(H <sub>4</sub> ) <sup>[14,16]</sup>	MK-9(H <sub>4</sub> ) (Predominant), MK-8(H <sub>2</sub> ), MK-9(H <sub>2</sub> )
Phospholipid	I	I
G + C mol%	66.5	68.5~68.9

- : No growth

+++ : Growth good

最后, DNA 相似性分析结果进一步说明 C<sub>3905</sub> 菌株与 *N. albus* IMET7807 在分子遗传学上有差异。综观以上研究结果,我们建议 C<sub>3905</sub> 菌株作为白色类诺卡氏菌的一个变种,命名为白色类诺卡氏菌南极变种 *Nocardioides albus* var. *antarcticus*。

致谢 本文得到中国科学院微生物研究所刘志恒教授的协助和指导,特此致谢!

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 胡继兰,李月英,王丽萍,等.微生物学报,1993,33(2):151~156.
- [ 2 ] 王哲君,戚长青,陈文君,等.中国抗生素杂志,1999,24(5):388~391.
- [ 3 ] Zhen Y S, Xue Y C, Spitgy K H, et al. Proc 13th Jnt Congr Chemother, part 223, No. 7, Vienna. 1983. 38~44.
- [ 4 ] Shirling E B, Gottlieb D. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, 16: 313~336.
- [ 5 ] Williams S T, Goodfellow M, Wellington M H, et al. *J Gen Microbiol*, 1983, 129: 1815~1830.
- [ 6 ] Becher B, Lechevalier M P, Lechevalier H A. *Appl Microbiol*, 1965, 13: 23~6243
- [ 7 ] Lecherlier M P. *J Lab Clin Med*, 1968, 71: 934~944.
- [ 8 ] Hasagawa T, Takigawa M, Tanida S. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, 29(4): 319~322.
- [ 9 ] 刘志恒,钱宇冬,张亚美,等.微生物学报,1997,37(5):327~344.
- [ 10 ] Mutson J A, Bush J A. *J Antibiot*, 1989, 42(12):1763~1767.
- [ 11 ] Pauser H. *Int J Syst Bacteriol*, 1976, 26(1):58~65.
- [ 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,1990.22~23(12A):138~141(12B).
- [ 13 ] Collins M D, Cockcroft S, Wallbanks S. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44(3):523~526.
- [ 14 ] Tamura T, Yokota A. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44(3):608~611.
- [ 15 ] Yoon J-H, Rhee S-K, Lee J-S, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 47(4):933~938.
- [ 16 ] 张利平,宋尚直,阮继生.微生物学报,1990,30(3):177~181.

## A ACTINOMYCETE STRAIN C<sub>3905</sub> PRODUCING ANTITUMOR ANTIBIOTIC SANDRAMYCIN FROM ANTARCTICA

Hu Jilan Zhang Chuang Na Ren Li Yi

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050)

**Abstract:** A nocardioform actinomycete strain C<sub>3905</sub> was isolated from a soil sample collected in King George island, Antarctica. Its aerial mycelium is white, substrate mycelium is colorless to cream or pink. The hyphae of mycelium 0.5 μm~0.8 μm in diameter and they fragment into irregular rod to coccoid elements with smooth surface. Cell wall type I. The mycolic acids are lacking. M<sub>1</sub>-9 H<sub>4</sub> is the predominant menaquinone component. Phospholipid type PI. The G + C content of DNA is 68.3~68.9 mol%. Facultative psychrophile. The optimum temperature for growth is 15°C~20°C. Produces antitumor antibiotic sandramycin. Based on the characteristics above as well as the investigation of the molecular genetics. We propose that strain C<sub>3905</sub> should be placed in the *Nocardiooides albus* as a variant named *Nocardiooides albus* var. *antarcticus*.

**Key words:** *Nocardiooides albus* var. *antarcticus*, Sandramycin, Antitumor, Facultative psychrophile

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39270012)