

两株产生免疫抑制剂的小双孢菌分离株的鉴定

李晓虹 朱宝泉 龚炳永

(上海医药工业研究院 上海 200040)

摘 要 :从江苏无锡土壤中分离到两株玫瑰小双孢菌 SIPI-226 和 SIPI-207 ,经形态、化学分析、Ribotyping 及 16S rRNA 分析 ,两菌株细胞壁含 meso-DAP、磷酸类脂 PIV、无枝菌酸 ,醌为 MK-9(H₀ ,H₂ ,H₄) G+ C mol% 分别为 68.3 和 69.4。经初步鉴定为玫瑰小双孢菌的两个新亚种 玫瑰小双孢菌无锡亚种(*Microbispora rosea* subsp. *wuxiensis*)和玫瑰小双孢菌鼋头渚亚种(*Microbispora rosea* subsp. *yuantouzhuensis*)。菌株 SIPI-226 和 SIPI-207 分别为玫瑰小双孢菌无锡亚种和玫瑰小双孢菌鼋头渚亚种的典型菌株。

关键词 :玫瑰小双孢菌 ,玫瑰小双孢菌无锡亚种 ,玫瑰小双孢菌鼋头渚亚种

中图分类号 :Q938 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2001) 01-0094-07

在筛选免疫抑制剂的过程中 ,分离到玫瑰小双孢菌的两菌株 SIPI-226 和 SIPI-207 ,它们对小鼠脾淋巴细胞转化及小鼠混合淋巴细胞反应均具有免疫抑制作用。其中 SIPI-226 具有强的免疫抑制活性。本文报道两菌株 *M. rosea* subsp. *wuxiensis*. nov. 和 *M. rosea* subsp. *yuantouzhuensis* subsp. nov. 的分离鉴定。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

菌种 SIPI-226 和 SIPI-207 通过干热法从无锡土壤中分离得到。本实验典型菌株为日本菌种保藏中心提供 ,列于表 1。

表 1 本实验用菌株
Table 1 Strains used in this study

Species	Strain designation
<i>Microbispora wuxiensis</i>	SIPI-226
<i>Microbispora yuantouzhuensis</i>	SIPI-207
<i>Microbispora rosea</i>	JCM 3006 ^T
<i>Microbispora amethystogenes</i>	JCM 3021 ^T
<i>Microbispora chromogenes</i>	JCM 3022 ^T
<i>Microbispora diastatica</i>	JCM 3023 ^T
<i>Microbispora parva</i>	JCM 3024 ^T
<i>Microbispora indica</i>	JCM 8971 ^T
<i>Microbispora karnatakensis</i>	JCM 8972 ^T

T :type strain

作者简介 李晓虹(1965 -) ,女 ,山西襄汾人 ,1999 年博士毕业 ,主要从事基础微生物学研究 ,现为第二军医大学国际合作肿瘤研究所博士后(上海 200433)。
收稿日期 :1999-12-13 ,修回日期 :2000-05-20
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.2 形态观察

在燕麦片琼脂上插片培养 28℃ ,14 d ,用光学显微镜及电子显微镜观察拍照。

1.3 培养特征及生理生化特征

在 8 种不同的培养基上 28℃ 培养 14 d ,观察并记录培养特征 ,颜色参照文献 [1] ,生理生化试验采用 Gordon 和 Shiring 等人的方法^[2,3]进行。

1.4 细胞化学

全细胞水解液化学组分依照 Lechevalier^[4]和 Hasegawa^[5]的方法 ,磷酸类脂的成分分析依照 Lechevalier 的方法^[4] ,醌的提取和分析使用 Collins^[6]和吴诚华等人的^[7]方法。

1.5 DNA 中 G + C mol% 的测定

主要依照 Marmur 和 Doty 等人的 T_m 值测定方法^[8]。

1.6 限制性内切酶长度多态性分析 (Ribotyping)

DNA 准备如上 ,探针 P64 是包括链霉菌 *Streptomyces lividans* 的 5S、16S 和 23S 的 rRNA 的重组质粒 pUC18。9 个菌株的 DNA 用 *Bam*HI ,37℃ 酶切过夜 ,酶切的 DNA 片段在 1% 琼脂糖 TAE buffer 中 ,90V 下电泳 2h ,之后通过 Southern blotting^[9]转移至尼龙膜。标记、ribotyping 和检查参照制造商的要求。

1.7 16S rRNA 序列分析及系统发育

用于 PCR 扩增的两个引物是 5' TTACCTGATAGCGGCCGCAGAGTTTGATCCTG-GCTCAG 3' (*Escherichia coli* 16S rRNA 第 8 到 27 个核苷酸) 和 5' TACAGGATC-CGCGGCCGCTACGQ (C/T) TACCTTGTTACGACTT 3' (*Escherichia coli* 16S rRNA 的第 1492 到 1513 个核苷酸) 下划线是 *Not* I 的酶切位点)

1.7.1 16S rRNA PCR 扩增 每个 PCR 混合物包含 100ng 的基因 DNA ,两引物 20pmol , dNTP 分别为 200mmol/L ,2.5U 的 Taq DNA 多聚酶 ,PCR 30 个循环 (95℃ ,40s ;50℃ ,30s ;72℃ ,2min)。

1.7.2 克隆和 16S rRNA 序列分析 纯化的 16S rRNA PCR 引物用 *Not* I 酶切 ,然后克隆到质粒 pBluescript KS 中。 *E. coli* DH5 α 感受态细胞用连接混合物转移 ,转移作用利用 α -互补实验在 5mL LB 中 (100 μ g/mL 氨苄青霉素) 过夜培养分离质粒。 16S rRNA 序列分析用 PHYLIP 软件^[10]生成 ,系统发育树用 Neighbor-joining 方法^[11]建立。

1.7.3 核酸序列存取号码 本论文所用菌株 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中存取号码分别为 : *M. amethystogenes* JCM 3021 ,U48988 ; *M. chromogenes* JCM 3022 ,U48989 ; *M. diastatica* JCM 3023 ,U48990 ; *M. parva* JCM 3024 ,U48985 ; *M. bispora* JCM 3082 ,U58524 ; *M. bispora* ATCC 19993^T ,U58523 ; *Actinoplanes philippineensis* U58525 ; *M. aerata* ,U48984 ; *Microtetrapora recticatena* ,U 48979 ; *Microtetraspora roseola* ,U 48980 ; *Streptosporangium corrugatum* ,U 48991 ; *Streptosporangium fragile* ,U 48992。

2 结果和讨论

2.1 SIPI-226 和 SIPI-207 的形态特征

两菌株 G⁺ ,不抗酸。基内菌丝直径为 0.5 μ m~0.7 μ m。在单轴分支的气丝上形成纵队排列的双孢子 (如图 1 2) ,孢子表面光滑 ,具有短的孢子梗 ,双孢子交替生长在侧枝的

两侧。

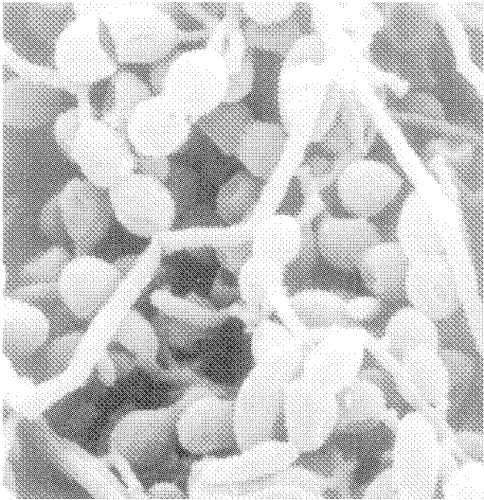


图 1 菌株 SIPI-226 的气丝和孢子丝

Fig. 1 Aerial mycelium with spores
of strain SIPI-226

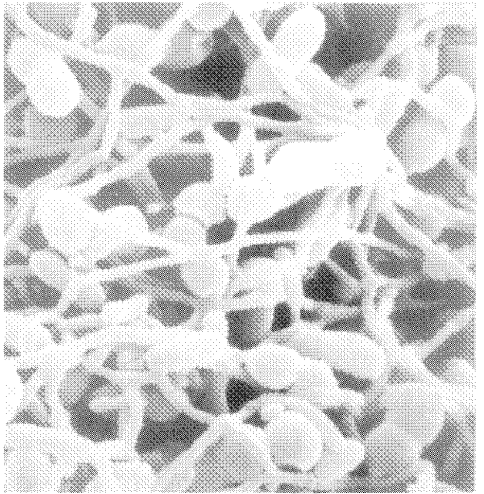


图 2 菌株 SIPI-207 的气丝和孢子丝

Fig. 2 Aerial mycelium with
spores of strain SIPI-207

2.2 培养特征

菌株 SIPI-226 和 SIPI-207 的培养特征和生理生化特征见表 2 和表 3。

表 2 菌株 SIPI-226 和 SIPI-207 的培养特征

Table 2 Cultural characteristics of strains SIPI-226 and SIPI-207

Medium	SIPI-226	SIPI-207
Oatmeal agar	Am white	Grayish white
	Sm deep yellow	Brown
	Sp none	Grayish green
Starch agar with yeast extract	Am none	None
	Sm light yellow	Brown
	Sp none	Brownish green
Glycerol asparagine agar	Am white	Light brown
	Sm white	Light brown
	Sp none	None
Potato agar	Am none	None
	Sm pale pink	Brownish green
	Sp none	Brownish green
Inorganic salts starch agar	Am white	Light brown
	Sm white	Light brown
	Sp none	None
Yeast malt exact agar	Am none	None
	Sm colorless	Colorless
	Sp none	None
Benett agar	Am none	None
	Sm pinkish-yellow	Deep-brown
	Sp none	None
Glucose asparagine agar	Am none	None
	Sm deep-yellow	Brownish green
	Sp none	None

表 3 菌株 SIPI-226 和 SIPI-207 与其他中温小双孢菌生理生化特征比较

Table 3 Comparison of physiological and biochemical characteristics of SIPI-226 and SIPI-207 with other species of genus mesophilic *Microbispora*

Character	Strain								
	JCM 3006 ^T	JCM 3021 ^T	JCM 3022 ^T	JCM 3023 ^T	JCM 3024 ^T	JCM 8971 ^T	JCM 8972 ^T	SIPI-226	SIPI-207
Milk peptonization	d	++	++	+	+	++	++	—	—
Gelatine Liquefaction	d	—	++	—	—	—	+++	—	—
Starch hydrolysis	—	+	++	+++	—	—	+++	—	—
Nitrate reduction	+	+	+	—	—	+++	+++	+	—
Melanoid pigment	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Vitamin requirement	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Soluble pigment	—	+	++	—	—	++	+++	—	++
utilization of :	(PYB) (LYP)			(DOY) (DOY)			(DBG)		
D(+)Glucose	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Glycerol	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—
L(+)Arabinose	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—
L(+)Rhamnose	+++	—	—	—	+	+++	++	—	—
Inositol	—	+	+++	—	—	—	++	++	++
Growth temperature	28℃	+	+	+	+	+	+	+	+
	35℃	+	+	+	+	+	+	+	+
	55℃	—	—	—	—	—	—	—	—

— :negative ; + :slight ; ++ :good ; +++ :excellent ; d :double ; DOY :deep orange yellow ; PYB :pale yellow brown ; LYP :light yellow pink ; DBG :deep brow green.

2.3 化学分类特征

菌株 SIPI-226 和 SIPI-207 及相关小双孢菌的化学分类特征见表 4。

表 4 菌株 SIPI-226 和 SIPI-207 与有关小双孢菌的化学分类特征

Table 4 Chemotaxonomic characteristics of strains SIPI-226 and IPI-207 and related *Microbispora* strains

Strain	Cell wall	Phospholipids	Menaquinone	G + C mol %
SIPI-226	Ⅲ	PIV	MK-9(H ₂)	68.3
SIPI-207	Ⅲ	PIV	MK-9(H ₄)	69.4
<i>M. rosea</i> JCM 3006 ^T	Ⅲ	PIV	MK-9(H ₂)	71
<i>M. amethystogenes</i> JCM 3021 ^T	Ⅲ	PIV	MK-9(H ₂)	71
<i>M. chromogenes</i> JCM 3022 ^T	Ⅲ	PIV	MK-9(H ₄)	71
<i>M. diastatica</i> JCM 3023 ^T	Ⅲ	PIV	MK-9(H ₂)	71
<i>M. parva</i> JCM 3024 ^T	Ⅲ	PIV	MK-9(H ₂)	71
<i>M. indica</i> JCM 8971 ^T	Ⅲ	PIV	MK-9(H ₂)	71
<i>M. karnatakensis</i> JCM 8972 ^T	Ⅲ	PIV	MK-9(H ₂)	71

2.4 限制性内切酶酶切片段长度多态性分析 (RFLP)

菌株通过 rRNA ribotyping 获得的杂交结果及相似值见表 5。

表 5 菌株 ribotyping 相似值

Table 5 Strain homology by rDNA ribotyping

Organism	Ssm/%								
	JCM3006 ^T	JCM3021 ^T	JCM3022 ^T	JCM3023 ^T	JCM3024 ^T	JCM8971 ^T	JCM8972 ^T	SIPI-226	SIPI-207
JCM3006 ^T	100	63	70	61	65	50	57	62	57
JCM3021 ^T	62	100	70	61	65	50	57	62	57
JCM3022 ^T	68	62	100	61	70	50	57	50	70
JCM3023 ^T	63	61	61	100	65	57	55	65	55
JCM3024 ^T	58	58	62	57	100	57	67	57	67
JCM8971 ^T	58	50	50	57	57	100	50	50	57
JCM8972 ^T	55	57	57	55	67	50	100	62	53
SIPI-226	63	61	50	65	57	50	70	100	55
SIPI-207	57	57	68	55	67	57	53	55	100

2.5 16S rRNA 序列分析和系统发育

菌株 SIPI-226 和 SIPI-207 及相关小双孢菌种序列之间的相似值列于表 6。系统发育树见图 3。

表 6 16S rRNA 序列相似水平

Table 6 Levels of 16S ribosomal DNA sequence similarity Percent Similarity

	1	2	3	4	5	6		
1		98.3	98.3	98.7	98.6	97.8	1	<i>M. amethystogenes</i> . seq
2	1.7		99.4	97.9	98.4	97.2	2	<i>M. chromogenes</i> . seq
3	1.7	0.6		98.1	98.2	97.3	3	<i>M. diastatica</i> . seq
4	1.3	2.2	1.9		98.2	98.7	4	<i>M. parva</i> . seq
5	1.4	1.6	1.9	1.9		98.0	5	R-207. seq
6	2.2	2.8	2.7	1.4	2.1		6	R-226. seq
	1	2	3	4	5	6		

3 讨论

1990 年 ,Miyadoh 等人根据生理生化、化学特征和 DNA-DNA 杂交分析 ,把 7 株中温小双孢菌属菌株归为玫瑰小双孢菌玫瑰亚种 *M. rosea* subsp. *rosea*^[11]。菌株 SIPI-226、SIPI-207 和 7 株中温小双孢菌通过生理生化、化学特征及 16S rRNA 序列比较 ,SIPI-226 和 SIPI-207 分别有 97.2%~98.7% 和 98.2%~98.6% 的相似值 ,认为与 7 株中温小双孢菌属于同一种。其 Ribotyping 相似值在 50%~70% 之间 ,进一步证实以上结果。但菌

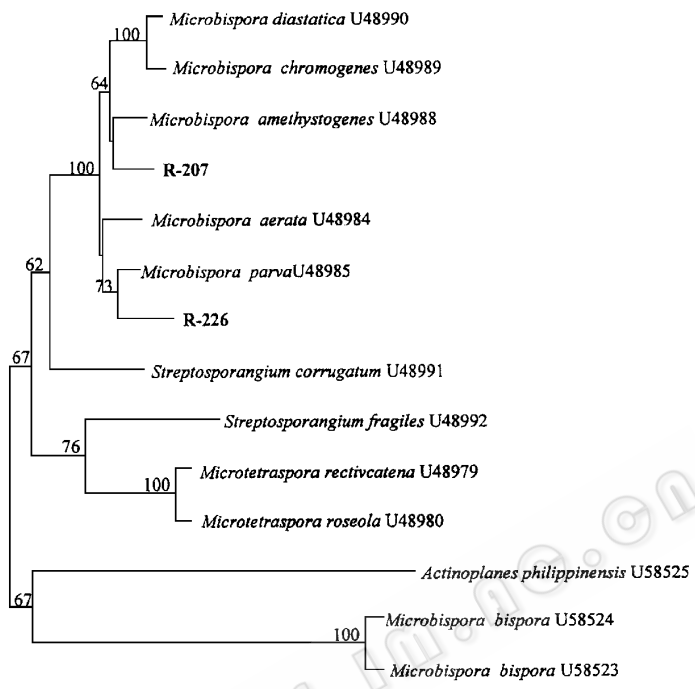


图 3 菌株 SIPI-226 和 SIPI-207 与相关小双孢菌及其他相关菌属的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree for the strains SIPI-226 and SIPI-207 with related genus

株 SIPI-226、SIPI-207 和 7 株中温小双孢菌标准菌株相比 ,在培养特征、生理生化特征如牛奶酪化、色素产生、淀粉水解、明胶液化、碳源利用方面有所不同。

基于以上理由 ,判断菌株 SIPI-226 和 SIPI-207 属于 *M. rosea* 两个新亚种 ,命名为 *Microbispora rosea* subsp. *wuxiensis* subsp. nov. 和 *Microbispora rosea* subsp. *yuan-touzhuensis* subsp. nov.

致谢 本论文的完成得到诸多方面的支持和帮助。其中日本菌种保藏中心(JCM)提供标准菌株 ;波兰科学院免疫化疗所 Jola 教授为我们提供标准探针 ;新加坡国立大学王越教授提供引物 ;中国科学院微生物研究所刘志恒教授、张亚美老师及河北大学生命科学院吕志堂老师对本工作给予很大的帮助 ;中国科学院上海植物生理研究所白沂涛老师帮助测定 16S rRNA 序列测定 ;上海医药工业研究院朱春宝教授在论文完成过程中也给予了很大帮助 ,中国科学院微生物研究所电镜室帮助拍摄电镜照片 ,在此一并感谢。

参 考 文 献

[1] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京 科学出版社 ,1975.
[2] Gordon R E ,Barnett D A ,Handerhan J B *et al.* *Int J Syst Bacteriol* ,1974 ,24(1) :54~64.
[3] Shirling E B ,Gottlieb D. *Int J Syst Bacteriol* ,1966 ,16: 317-327.
http://journals. im. ac. cn

- [4] Lechevalier M P ,Lechevalier H A. The Chemotaxonomic of Actinomycetes. In Dietz A *et al.* ed. A University Laboratory Approach. Arlington :SIM Special Publication ,1980. 6 :277~284.
- [5] Hasegawa T ,Takizawa M ,Tanida S. *J Gen Appl Microbiol* ,1983 **29** :319~322.
- [6] Goodfellow M ,Minnikin D E. Chemical Methods in Bacterial systematics. London :Academic Press ,1985. 267~287.
- [7] 吴诚华 ,陆小涛 ,秦 敏 ,等 . 微生物学通报 ,1989 ,**18** :176~178.
- [8] Marmur J ,Doh P. *J Mol Biol* ,1962 **5** :109~118.
- [9] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual. 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989. 304~324 363~371.
- [10] Felesenstein J. PHYLIP(Phylogenetic inference package)version 3. 5. 1 Department of Genetics ,University of Washington ,Seattle. 1993.
- [11] Saitou N ,Nei M. *Mol Biol Evol* ,1987 **4** :406~425.
- [12] Miyadoh S ,Amano S ,Tohyama H *et al.* *Journal of General Microbiology* ,1990 ,**136** :1905~1913.

CLASSIFICATION FOR TWO ISOLATES OF *MICROBISPORA* PRODUCING IMMUNOSUPPRESSANTS

Li Xiaohong Zhu Baoquan Gong Bingyong

(Shanghai Institute of pharmaceutical Industry ,Shanghai 200040 ,China)

Abstract : Two strains named SIPI-226 and SIPI-207 producing immunosuppressants were isolated from soil samples collected in park of Wuxi city in China. Identification was done by morphological observation ,chemical analysis and nucleic acid ribotyping and 16S rRNA sequence. Two strains contain meso-diaminopimelic acid in cell walls ,Type PIV phospholipids , a lack of mycolic acids ,MK-9(H₀ ,H₂ ,H₄) menaquinones and G + C content of 68.3% to 69.4% , and two strains have 97.2% to 98.6% homology in 16S rRNA gene sequences , and the DNA homology by Ribotyping are 53% to 70% ,but differ from seven other mesophilic *Microbispora rosea* strains. It could be concluded that these two strains represented two new subspecies in the genus of *Microbispora rosea* . We designated the strains as *Microbispora rosea* subsp. *wuxiensis* and *Microbispora rosea* subsp. *yuantouzhuensis* . The type strains of *M. rosea* subsp. *wuxiensis* and *M. rosea* subsp. *yuantouzhuensis* are SIPI-226 and SIPI-207 respectively.

Key words : *Microbispora rosea* subsp. *rosea* ,*Microbispora rosea* subsp. *wuxiensis* ,*Microbispora* subsp. *yuantouzhuensis*