43 卷 4 期
2003 年 8 月
微 生 物 学 报
Acta Microbiologica Sinica
Vol.43 No.4
August 2003

薄层层析指导下的嗜碱放线菌菌株 YIMGQ-14 次生代谢产物研究

李铭刚[1] Groth Ingrid[2] 李一青[1] Sattler Isabel[2] 文孟良[1*]
([1]云南大学 教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)
([2]Hans-Knöll-Institute for Natural Product Research, Beutenbergstraβe 11a, D-07745 Jena, Germany)

摘 要：在微生物资源的开发研究过程中，利用 TLC 方法，配合 TLC 数据库的检索，对嗜碱放线菌菌株 YIMGQ14 的次生代谢产物进行了研究。并从中分离纯化出两个具有生物活性的专利化合物"Umycin C"和"Umycin B"。结果证明：相对于常规的生物活性筛选，TLC 法在微生物次生代谢产物研究中具有快速、简便、经济的特点，适合于小量常规筛选的目的。通过进一步对相关的 TLC 数据库进行构建和补充，将能极大地改善该方法的使用效率。

关键词：薄层层析(TLC)，次生代谢产物，放线菌
中图分类号：Q939.13 文献标识码：A 文章编号：0001-6209(2003)04-0481-06

自从 20 世纪 40 年代 Waksman 从放线菌中发现链霉素以来，放线菌生物学的研究及抗生素的开发随之蓬勃发展起来，并在 20 世纪 50~60 年代达到了高潮，为人类的医疗保健事业作出了巨大的贡献[1]。

现在很多专家相信，并非存在于自然界的所有类型的抗生素均被发现，如果我们研究过去未曾研究过的异常生活环境中的稀有微生物，找到新的有用化学结构的机会将是较大的。考虑到去重复问题，很有必要考察不同种类的放线菌，特别是尚未详细研究过的亚群(属)放线菌，稀有或难分离及培养的放线菌菌株[2,3]。

自从 Fleming 爵士在 1928 年发现了青霉素以来，在接下来的几十年里，许多抗生素，如：大环内酯类抗生素、四环素类抗生素、多稀类抗生素、氨莎环类抗生素以及氨基糖甙类抗生素主要是通过经典的琼脂扩散法(Agar diffusion assay)被发现。该方法在 20 世纪 60~70 年代被"酶和受体结合分析"(Enzyme and receptor binding assay)所取代。之后的十几年里，分子和细胞生物学的发展产生了现在使用的高通量筛选手段。在以上各种方法中，经典的琼脂扩散法出现的问题越来越多，生物筛选过程中大量的抗生素被重复发现。另外，琼脂扩散法除了可以用来进行抗感染筛选外，还不能扩展到其它的生物测定领域。"酶和受体结合分析"也有其不足之处，比如因为假阳性结果而浪费大量的样品。至于现在被许多大型制药企业所采用的高通量筛选，其实并不适合于少量的样品筛选。而且，用高通量

基金项目：国家科技部重点项目(2001CCC00600)；云南省自然科学基金(2001C003R)
* 通讯作者。Tel：86-871-5032170；Fax：86-871-5173878；E-mail：mlwen@ynu.edu.cn
作者简介：李铭刚(1973-)，男，浙江省海盐县人，助理研究员，博士，主要从事微生物次生代谢产物研究。E-mail：mgli727@yahoo.com
收稿日期：2002-11-04，修回日期：2003-01-09

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

法来进行筛选也并不是一个经济的方法。一般说来,用高通量来筛选每个样品的成本为1美元。如果是自动平行分析天然来源的粗提物,还会更加昂贵[4]。

面对避免重复问题和避免纯化合物假阳性问题,在20世纪80年代,Zahner和化学家Keller-Schierlein及Zeeck根据不断增长的薄层层析(Thin layer chromatography,TLC)知识和染色剂知识,提出了一个新的筛选策略,它就是后来被称作的"化学筛选"。这个策略的提出是基于这样一个假设:新结构的化合物必定会具有令人感兴趣的生物活性[5]。因此,化学筛选至少可以作为寻找新生物活性化合物的一种系统途径。本文在此基础上对一株嗜碱放线菌YIMGQ14的次生代谢产物进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

放线菌(*Streptomyces caviscabies*)YIMGQ14,从中国青海省的碱性土壤中分离纯化获得。

1.2 培养基

1.2.1 麦芽和酵母浸膏培养基(种子培养基):酵母浸膏4g,葡萄糖4g,麦芽浸膏5g,维生素B1 1mg,维生素B6 1mg,核黄素1mg,苯丙氨酸1mg,生物素1mg,丙氨酸0.3g,定容至1L,pH 9.0。

1.2.2 大豆粉培养基(发酵培养基):大豆粉20g,甘露醇20g,定容至1L,pH9.5~10.0。

1.3 仪器

TLC测定平板:DC-Fertigplatten Durasil-25UV_{254},德国MACHEREY-NAGEL公司。固相萃取柱:AmberchromTM 161C,150mg,1mL塑料管,美国Supelco公司。固相萃取仪器:Rapid Trace SPE workstation,美国Zymark。自动点样器:CAMAG Autosampler Ⅲ,瑞士制造。TLC成像仪:UV/VIS lamp,CAMAG Reprostar 3.0,瑞士制造。

1.4 固相萃取流程

先用5mL甲醇清洗固相萃取柱(4.998 mL/min),之后用5mL蒸馏水清洗固相萃取柱(4.998 mL/min),再将50mL发酵上清液加到样品柱中(1.5 mL/min),然后用6mL蒸馏水清洗固相萃取柱(10.002 mL/min),最后用1mL甲醇洗脱吸附到固相萃取柱上的化合物并收集甲醇洗脱液。

1.5 TLC展开系统

氯仿:甲醇(C:M)=9:1。正丁醇:乙酸:水(B:E:W)=4:1:5(上层)。

1.6 TLC检测方法

在UV_{254}光源下检测平板上化合物的暗斑。在UV_{365}光源下检测平板上化合物发出的荧光。茴香醛/硫酸(Anis显色剂)化学试剂显色(120℃,5min)。二甲氨基苯甲醛/盐酸(Ehrlichs显色剂)化学试剂显色(120℃,5min)。苔黑酚/硫酸(Orcin显色剂)化学试剂显色(120℃,5min)。

1.7 化合物的去重复检索

与德国HKI研究所合作,利用其TLC数据库进行检索和去重复。根据化合物在TLC平板上的物理化学性质与标准对照物(包括色醇和色氨酸)对照后进行检索。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.8　分离和纯化

发酵上清液粗提物是采用普通硅胶 G 柱层析进行初步分离的，然后再采用 Sephadex LH-20 进行纯化。

1.9　结构解析和鉴定

与德国 HKI 研究所合作，采用常规的波谱分析方法进行。

2　结果

2.1　菌株发酵次生代谢化合物的 TLC 筛选

菌株 YIMGQ14 发酵上清液经过 SPE 处理后，甲醇洗脱液用 TLC 方法进行检测，根据德国 HKI 研究所 TLC 筛选数据库检索，从中筛选获得两个特殊的薄层层析条带（表 1）。

表 1　菌株 YIMGQ14 发酵液 TLC 筛选结果

Table 1　The TLC screening result of the strain GQ14 fermentation broth

The code of bands	UV_{254} signal	UV_{365} signal	C∶M position	B∶E∶W position	Anis visualization	Ehrlichs visualization	Orcin visualization	Searching result
GQ14-1	Y	Y	M	M	B	B	G	ND
GQ14-2	Y	Y	U	U	B	B	G	ND

The standard reference substance in“ C∶M ”developing system is tryptophol；The tryptophan is the standard reference compound in“ B∶E∶W ”developing system.“ Y ”means the band has the UV absorbance or fluorecence emission properties；“ M ”means that the position of band lies in the middle of the two standard references；“ U ”means that the position of the band lies in the behind of the two standard references；“ B ”means that the chemical visualization color is brown and“ G ”means grey；“ ND ”means that the substance has not been found in the TLC database.

2.2　发酵液固相萃取

用 300L 发酵罐放大发酵 GQ14（实际发酵量为 140L）。发酵液经过离心后，发酵上清液用制备型固相萃取柱进行处理。然后用甲醇 水混合溶剂将吸附到 SPE 柱上的化合物洗脱下来。在洗脱过程中，甲醇比例按时间进行递增。一共获得 6 个馏分（表 2）。

表 2　GQ14 发酵液馏分分布

Table 2　The SPE fractions of the fermentation supernantant from strain YIMGQ14

Fraction code	Beginning time/min	Ending time/min	Methanol concentration/%	Collection volumn/L
F1	5.00	8.00	40	1.00
F2	8.00	11.00	80	14.40
F3	11.00	14.00	100	0.90
F4	14.00	17.00	100	10.00
F5	17.00	20.00	10	0.55
F6	20.00	23.00	10	1.10

我们将以上 6 个馏分同时在 TLC 平板上点板，得到了各个馏分的 TLC 图谱（图 1）。然后根据 TLC 图谱所提示的信息将第 1、第 2 和第 3 馏分合并蒸去甲醇，并用等体积的乙

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

酸乙酯萃取 4 次,有机相合并蒸干后的粗提物(编号为粗提物 1,重量为 4g)用于分离纯化上述第 1 个筛选点。

1、2、3 个馏分乙酸乙酯萃取后剩下的水溶液减压蒸干后,用 1L 甲醇液充分洗涤 3 次,洗涤液蒸干后的粗提物(编号为粗提物 2,重量为 5g)用于分离纯化上述第 2 个筛选点。

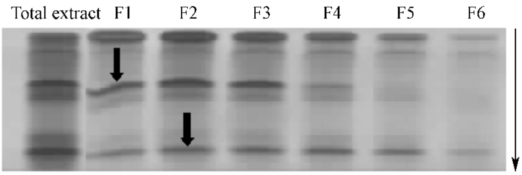


图 1 菌株 YIMGQ14 SPE 处理后的 6 个馏分 TLC 图谱

Fig.1 The TLC pattern of the 6 SPE fractions from strainYIM GQ14

The band showed by a black arrow on the TLC pattern of F1 fraction is No.2 target substance ;The No.1 target substance is showed by a black arrow on the TLC pattern of F2 fraction. The developing direction is showed by the arrow outside the main figure. The TLC developing system is B ∶E ∶W = 4 ∶1 ∶5. The chemical visualization reagent is Anis/sulfuric acid under the 120℃ for 5min.

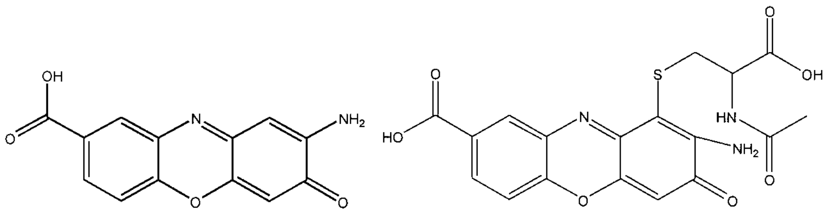
2.3 化合物的分离和纯化

2.3.1 1 号目标点的分离和纯化 将粗提物 1 号首先用硅胶 G 柱层析进行初步的分离,洗脱溶剂系统为乙酸乙酯和甲醇的梯度混合溶剂(甲醇浓度从 20% 到 80%)。从中一共获得了 14 个粗提馏分。其中的第 12 号馏分(380mg)包含我们所需的 1 号目标物质。12 号馏分采用 Sephadex LH-20 凝胶进行纯化,洗脱溶剂为甲醇,最终获得了一个棕色粉末状纯化合物(6mg),编号为 GQ14-1。

2.3.2 2 号目标点的分离和纯化 将粗提物 2 号首先用 Sephadex LH-20 凝胶进行粗分,所用溶剂系统为甲醇与水的混合物(甲醇∶水 = 3∶1)。从中一共获得 9 个粗提馏分。其中的第 5 号馏分(542mg)包含我们所需的 2 号目标物质。5 号馏分继续采用 Sephadex LH-20 凝胶进行纯化,洗脱溶剂为甲醇,最终获得一个棕红色粉末状纯化合物(51mg),编号为 GQ14-2。

2.4 目标化合物的结构鉴定

目标化合物用氘代二甲基亚砜溶解后,分别送测 ^{1}H NMR、1D-^{13}C NMR、HMQC 以及 HMBC 测定。同时,化合物还送测了元素分析,红外及紫外分析。根据所得结果,最终推测出 GQ14-1 和 GQ14-2 化合物的分子结构(图 2)。



GQ14-1 GQ14-2

图 2 GQ14-1 及 GQ14-2 化合物的化学结构式

Fig.2 The chemical structure of the compounds GQ14-1 and GQ14-2

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

根据以上结构式,我们对这两个化合物进行了结构检索,结果发现它们均为两个专利结构化合物,而且都有生物活性。GQ14-1 对应的专利化合物名称为‘Umycin C’[6],GQ14-2 对应的专利化合物名称为‘Umycin B’[6]。

3 讨论

尽管从 YIMGQ14 菌株中发现的化合物为两个已知的化合物,但由于这两个化合物均为有生物活性的专利天然产物,它们还未能被 HKI 的 TLC 数据库收录,出现重复被发现并不意外。但这不能说明该方法并不有效。事实上,该筛选策略在德国 HKI 研究所得到了充分的运用。在 1985～1992 年期间,该所一共对 8000 个来源于微生物的粗提物进行了化学筛选(其中包括 5200 株放线菌和 2800 株真菌)。从中筛选分离出 259 个化合物,其中 129 个为新结构化合物,比例达到了 50%。由此证明该方法的有效性。另外,我们还对 TLC 筛选点之外的其它 4 个点也进行了分离和纯化,结果均为普通的化合物,它们分别是色氨酸、二肽、蔗糖和脂肪酸。由此进一步证明该方法在去重复方面的优越性。

运用 TLC 筛选法,除了可以用它来指导化合物的分离和纯化之外,还可以用来指导菌株发酵条件的研究。我们在之后的工作表明,用 TLC 筛选方法来指导菌株的培养条件研究可以在很短的时间内找到产生有兴趣或独特化合物的培养基组成,大大地节约了工作时间。同时,在运用 TLC 筛选的时候,结合生物活性的筛选,就更能提高工作效率。

但是,有效运用 TLC 筛选的关键在于要具备一个检索功能较强的 TLC 检索数据库。幸运的是要建立这样一个数据库所需的技术平台并不高,普通的 ACCESS 软件就可以达到建库的目的。检索的内容对技术要求也不高,主要是化合物在 TLC 平板上的物理化学性质。对建库唯一且具有很高限制性的要求是,数据库中收录的已知化合物的数量,这也是我们和 HKI 合作研究的目的。

总之,针对生物活性筛选周期较长和费用较高的不足之处,开发出能够适合中国天然产物研究小型实验室需要的物理化学筛选数据库,并建立完善的 TLC 筛选手段,必将有助于开展微生物源次生代谢产物的研究。

致谢　在本研究中,承蒙德国 HKI 研究所 Ulike Valentin 女士协助进行化合物的 TLC 筛选,德国 HKI 研究所何　坚博士协助进行化合物的结构解析和鉴定。特此表示感谢!

参 考 文 献

[1] 姜成林,徐丽华. 放线菌研究. 昆明:云南大学出版社,1998. 294～295.
[2] 陈代杰. 微生物药物学. 上海:华东理工大学出版社,1999. 13～15.
[3] Lancini G, Parenti F, Gallo G.G. 抗生素-多学科研究入门. 王以光 主译. 北京:人民卫生出版社,1998. 180～181.
[4] Grabley S, Thiericke R. Drug Discovery from Nature. Germany:Springer, 2000. 58～59.
[5] Grabley S, Thiericke R. Drug Discovery from Nature. Germany:Springer, 2000. 125～126.
[6] Eur. Pat., 1988. 260 486;CA, 109, 142586P.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

The Secondary Metabolites Research of the Alkalophlic Strain YIMGQ14 Tracked by the TLC Assay

Li Minggang[1] Groth Ingrid[2] Li Yiqing[1] Sattler Isabel[2] Wen Mengliang[1*]
([1] *Key Lab of Microbial Resources of Ministry of Education*, *Yunnan University*, *Kunming* 650091, *China*)
([2] *Hans-Knöll-Institute for Natural Product Research*, *Beutenbergstraβe* 11*a*, *D*-07745 *Jena*, *Germany*)

Abstract: In the course of the microbial resources exploitation, the secondary metabolites research of the alkalophilic strain YIMGQ-14 was carried on using the TLC method and with the coordinate of the TLC database searching. Two patented biological active compounds "Umycin C" and "Umycin B" were isolated and purified. The result showed that, compared with the ordinary biological screening, the TLC screening is fast, convenient, economical and much more suitable for the small scale daily screening purpose. With the reconstruction and supplement of the related TLC data, the working efficiency of this method can be improved greartly.

Key words: TLC (Thin layer chromatography), Secondary metabolites, *Actinomycetes*

Foundation item: Key Project of Chinese Ministry of Science and Technology (2001CCC00600); Yunan Provincial Natural Science Foundation (2001C003R)

* Corresponding author. Tel: 86-871-5032170; Fax: 86-871-5173878; E-mail: mlwen@ynu.edu.cn

Received date: 11-04-2002

The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

EDITOR-IN-CHIEF

Li Jilun Academician
(*College of Biology*, *Chinese Agricultural University*, *Beijing* 100094, *China*)

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

Tan Huarong Professor
(*Institute of Microbiology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100080, *China*)
Lu Deru Professor
(*Institute of Genetics*, *Second Military Medical University*, *Shaihai* 200433, *China*)
Wao Aoquan Professor
(*Institute of Microbiology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100080, *China*)
Qu Yinbo Professor
(*School of Life Science*, *Shandong University*, *Jinan* 250100, *China*)
Xu Jianguo Professor
(*National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control*, *Chinese Center for Disease Control and Prevention*, *Beijing* 102206, *China*)

MEMBERS OF THE BOARD

Fan Yunliu	Tien Po	Zhai Zhonghe	Qian Shijun	Huang Li
Tang Hong	Lu Chengping	Cai Yongfeng	Zheng Tianling	Guo Jun
Chen Yongqing	Zhu Baoquan	Hu Fuquan	Zhuge Jian	Yang Susheng
Cheng Chi	Shao Yiming	Xie Hong	Min Hang	Hu Yuanyang
Dong Xiuzhu	Wang Ping	Sheng Jun		

MANAGING EDITORS

Wang Jinfang Wang Min

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn