

## 产生变活霉素的变株的分离与初步鉴别

李焕娄 吕婉瑜 张月琴 金文藻 陶佩珍 刘小普 何依萍 曾应

(中国医学科学院医药生物技术研究所,北京 100020)

对天然无抗菌活性的链霉菌 1254 菌株进行诱变,获得了二株有抗菌活性的变株。变株 113 产生的抗生素为一组新萜环类化合物,有抗病毒活性,定名为变活霉素。变株 2-6 产生碱性水溶性物质。初步实验结果表明,原株 1254 及变株 2-6 均是胞壁类型 I,为链霉菌属。变株 113 为胞壁类型 IV,不含有枝菌酸。原株 1254 与变株 113 的阻断变株共合成的产物与变活霉素相同,以放线紫红素聚酮合成酶基因 *actI* 为探针与原株 1254 的总 DNA 进行 Southern 杂交为阳性。根据这二个实验的结果推断,在 1254 菌株中可能存在一条变活霉素的合成途径,但有的基因处于未表达状态,诱发突变使其被活化。

**关键词** 抗病毒抗生素;活性变株;链霉菌

链霉菌的基因组中可能存在着一些未被表达的生物合成基因,称为沉默基因。这些基因如得以表达则有可能合成更多种类的代谢产物<sup>[1]</sup>。这一设想近几年来得到了愈来愈多的实验支持<sup>[2-4]</sup>,并在分子水平上进一步证明了沉默基因的存在<sup>[5,6]</sup>,为扩大开发微生物资源提出了新的思路。为了探讨这一设想在新抗生素筛选中实际应用的可能性,我们对一株天然无抗菌活性的链霉菌进行了诱变处理,获得了二株有抗菌活性的变株,对其中一株进行了较深入的研究。该变株所产生的抗生素为一组新化合物,定名为变活霉素。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌种

链霉菌 1254 菌株为本所新抗生素二室自浙江省土壤中分离得到,经过多种条件培养均未发现有抗菌活性。

#### (二) 培养基

斜面培养基(%): 酵母膏 0.4, 葡萄糖 0.4, 麦芽汁 1.0, 琼脂 1.5, pH7.3。

发酵培养基(%): 淀粉 2.0, 黄豆饼粉 2.5, 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 0.1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.15,  $K_2HPO_4$  0.1,  $NaCl$  0.3,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.0007,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.001,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.0008,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.0002, pH7.0。

固体发酵培养基: 发酵培养基加琼脂 1.5%。

生物检定培养基(%): 肉膏 0.5, 蛋白胨 1.0, 葡萄糖 0.1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.025,  $CaCl_2$  0.015, pH7.0。

#### (三) 活性变株的检出

将枯草芽孢杆菌 188 的芽孢与噬菌体 sp10 以适当的配比混合接种于融化的检定培养基中, 倒成平板, 37℃ 培养后噬菌斑密集致使检定菌的生长呈网状。如在被检定样品的周围只出现透明圈(网状生长被抑制), 则说明该样品只有抗细菌活性; 如只出现致密的生长圈则是只有抗噬菌体的活性; 如在透明圈的周围还有一致密生长圈, 则说明该样品兼有抗细菌及抗噬菌体的活性。

#### (四) 细胞组分的测定

二氨基庚二酸(DAP)及糖的分析分别采用 Lechevalier<sup>[7]</sup>及 Stanek 等<sup>[8]</sup>所报道的方法。

#### (五) 共合成实验

采用 Delic 等报道的方法<sup>[9]</sup>。

#### (六) DNA 同源性的测定

*act1* DNA 探针的制备采用切口平移法进行 <sup>32</sup>P 标记, 同源性测定采用 Southern 杂交法, 均根据 Hopwood 等报道的方法<sup>[10]</sup>略加修改。

## 结 果

### (一) 活性变株的分离及其产物的分析

链霉菌 1254 菌株的孢子悬液经 UV 处理后涂布在固体发酵培养基上, 28℃ 培养 7—10 天后挖块测定其抗细菌和抗噬菌体活性。从 6000 多个菌落中选到二株有活性的变株, 编号 113 及 2-6。变株 113 表现有抗细菌和抗噬菌体的活性, 而变株 2-6 则只抗细菌。

变株 113 所产生的抗生素经化学结构测定证明为一组萜环类新化合物, 定名为变活霉素, 其主要组分为变活霉素 A<sup>[11]</sup>, 并有 4 个小组分变活霉素 B, C, D 及 7-脱氧变活霉素 A<sup>[12]</sup>。其中变活霉素 A 除对某些革兰氏阳性和阴性细菌有抗菌活性外, 在组织培养内对单纯疱疹 I 型及 II 型病毒, 流感甲病毒和柯萨奇 B<sub>2</sub> 型病毒的致细胞病变作用均有明显的抑制作用<sup>[13]</sup>。变株 2-6 所产生的抗生素为碱性水溶性物质, 其抗菌谱也不同于变活霉素, 有关理化性质及生物活性的测定在进行中。

### (二) 原株 1254 和变株 113、2-6 某些分类特征的比较

培养及形态特征: 在酵母膏麦芽汁琼脂 (ISP II)、燕麦琼脂 (ISP III) 及无机盐淀粉琼脂 (ISP IV) 上原株 1254 的营养菌丝为褐色, 孢子丝为灰色或灰黄色, 而变株 113 的营养菌丝为桔色或深桔色, 孢子丝为粉色, 二者有明显的差别。变株 2-6 除在 ISP IV 培养基上营养菌丝带有黄色外其他培养特征均与原株 1254 相似。原株 1254 及变株 2-6 的孢子链均为直带波曲, 变株 113 则为直带环形或钩状。三个菌株的孢子都是柱形, 表面光滑, 基内菌丝不断裂, 不形成菌核或孢子囊。

抗菌谱: 活性变株发酵液的抗菌谱见表 1。

细胞的化学组分特征: 全细胞水解物的化学分析结果表明, 原株 1254 及变株 2-6 均含有 LL-DAP, 没有特征性糖, 为细胞壁 I 型, 变株 113 含有 DL-DAP, 阿拉伯糖和半乳糖, 为细胞壁 IV 型, 不含有枝菌酸。

根据上述分类特征, 原株 1254 及变株 2-6 应为链霉菌属, 而变株 113 则不属于链霉

表 1 链霉菌 1254 及其变株 113, 2-6 的抗菌谱

Table 1 Antimicrobial spectrum of *Streptomyces* sp. 1254 and its mutants 113, 2-6

测定菌 Test organisms	菌株 Strain*		
	1254	113	2 6
<i>Staph. aureus</i> 209P	-	+	+
<i>Microc. luteus</i> NCIB 196	-	+	+
<i>Bac. subtilis</i> NCIB 3610	-	+	+
<i>E. coli</i> NCIB 9132	-	+	+
<i>E. coli</i> K <sub>12</sub> ( $\lambda$ )	-	-	+
<i>Proteus vulgaris</i> OX19	-	+	-
<i>Cand. albicans</i> CBS 562	-	-	-
<i>Sacch. cerevisiae</i> CBS 1171	-	-	-
<i>Asp. niger</i> LIV 113	-	-	-
<i>Bacteriophage</i> sp. 10	-	+	-

\* +: 有活性 Active - : 无活性 Inactive

菌属。这三个菌株的进一步分类学研究将另行报道<sup>[4]</sup>。

### (三) 原株 1254 与变株 113 的共合成试验

为了探讨变株 113 获得产生变活霉素的能力是否与原株 1254 的某些沉默基因的表达有关, 将原株 1254 与变株 113 的阻断变株 310 进行了共合成实验。28℃ 培养 10 天后用枯草芽孢杆菌测定活性。结果表明, 在菌株 310 的一侧显示有抗菌活性, 而二个菌株单独培养则没有抗菌活性(图 1)。将此活性物质进行硅胶 G 薄板层析得到二个斑点, 其 Rf 值与变活霉素的二个斑点一致。这二个斑点洗脱物的紫外吸收光谱也与变活霉素相应的二个斑点相同(图 2, 斑点 2 的资料未列出)。

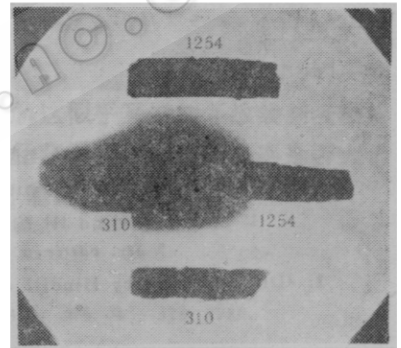


图 1 共合成实验

Fig. 1 Co-synthesis test

### (四) *actI* DNA 与原株 1254 及其变株 DNA 同源性测定

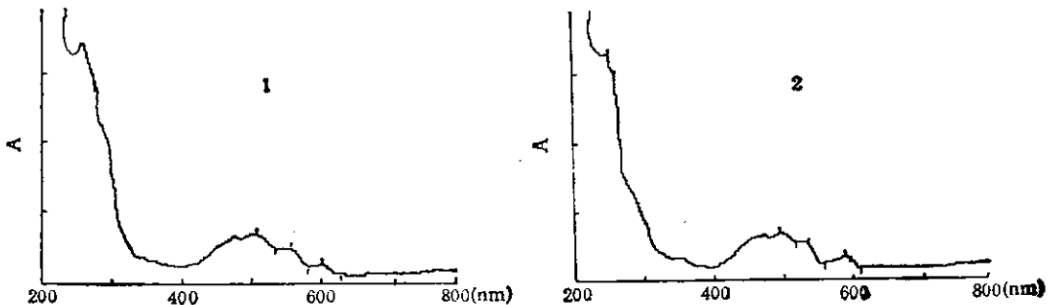


图 2 共合成产物(1)及变活霉素(2)的紫外光谱(甲醇)

Fig. 2 UV spectrum of co-synthesis product (1) and mutactimycin (2)

以放线紫红素聚酮合成酶基因 *actI* DNA 为探针, 分别与菌株 1254、113 及 310 的总 DNA (经 *Bgl*III 酶切) 进行 Southern 杂交实验。结果如图 3 所示, *actI* DNA 与菌株 1254 DNA 的约 2.2kb 片段有明显的同源性, 而与菌株 113、310 及硫霉素产生菌 *Str. cattleya* (阴性对照) 的 DNA 均未显示出杂交带。

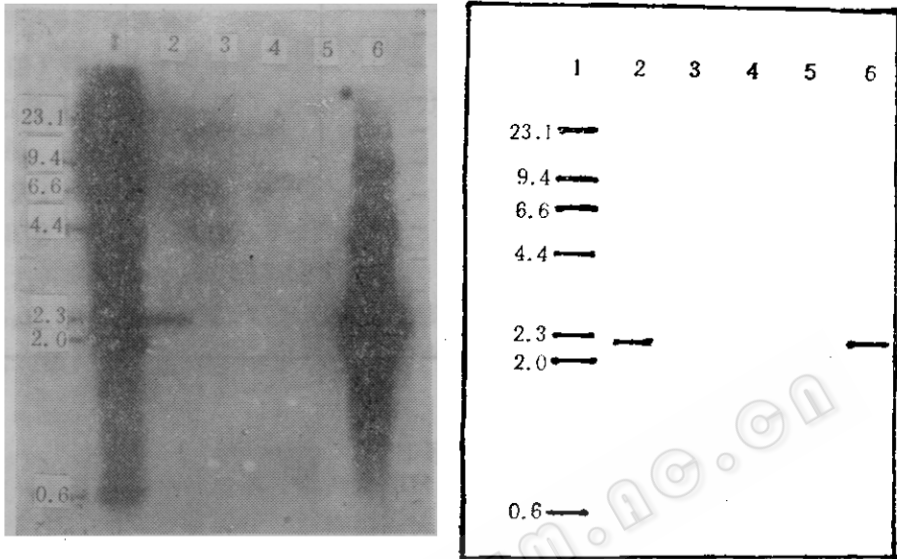


图 3 探针 *actI* 与菌株 1254、113 及 310 的 DNA Southern 杂交实验

Fig. 3 Southern hybridization of *actI* probe to DNA from strains 1254, 113 and 310

1.  $\lambda$  DNA 经 *Hind* III 酶切作为标记; 2. 1254 菌株; 3. 113 菌株; 4. 310 菌株;  
5 *Str. cattleya* 作为阴性对照; 6. *actI* DNA 作为阳性对照。

1.  $\lambda$  DNA digested by *Hind* III as markers; 2. Strain 1254; 3. Strain 113; 4. Strain 310;  
5. *Str. cattleya* as negative control; 6. *actI* DNA.

## 讨 论

天然无抗菌活性的链霉菌经过诱变处理形成有抗菌活性的变株, 文献中已有报道<sup>[10]</sup>, 但对此等变株形成的机制却很少探讨。Mortlock 曾提出, 突变改变了有关酶的基因调节或者引起其结构基因的改变, 可能是微生物产生新的代谢产物的重要机制<sup>[11]</sup>。我们的共合成实验结果初步说明, 在原株 1254 及变株 113 中可能存在着一条共同的变活霉素生物合成途径, 只是在原株 1254 中该途径的某种酶的基因可能处于未表达状态。经诱变后此沉默基因得以表达, 从而使变株 113 形成了产生抗生素的能力。已知变活霉素所属的萜环类抗生素的生物合成来自聚酮体 (polyketide), 因此菌株 1254 的 DNA 与 *actI* DNA 杂交的阳性结果为这一推断提供了进一步的论据。至于变活霉素产生菌 113 菌株及其阻断变株的 DNA 与 *actI* DNA 杂交未显示出阳性结果的问题, 目前还难以作出确切的解释, 文献中也有类似的报道。Malpartida 等以 *actI* DNA 为探针分别与 18 个聚酮类抗生素产生菌的基因组 DNA 进行 Southern 杂交, 其中有红霉素、土霉素、克念菌素及 curamycin 4 个抗生素的产生菌未能获得阳性结果。相反, 有的非聚酮类抗生素, 如氯霉素产生菌的 DNA 却与 *actI* DNA 显示出了杂交带。根据这些实验结果, 作

者的结论是聚酮体的合成与 *actI* DNA 同源的 DNA 序列有关, 尽管这种相关性并不完全<sup>[11]</sup>。

原株 1254 为链霉菌, 而其变株 113 则不是链霉菌属。二者在分类学上有如此大的差异, 使我们考虑到菌株 113 是否来自污染的问题。根据共合成实验及与 *actI* 基因同源性测定的结果推断, 此种可能性基本上可以排除。Grein 等报道, 柔红霉素产生菌 *Str. peuceitius* 经诱变处理后获得了一个变株, 其胞壁化学类型及形态特征均有明显的改变, 被划归小单孢菌属。此变株除产生 4 个新萜环类化合物外, 还能合成原株所产生的几个抗生素。据此, 作者认为此新菌株不是来自污染, 而是突变的结果<sup>[19]</sup>。尽管目前这方面的报道还不多, 但由于链霉菌的遗传不稳定性, 诱发突变引起某些分类特征的巨大改变看来是可能的。

近几年来放线菌沉默基因表达的研究日益引人注目, 因对这方面的深入了解, 不仅涉及到微生物的基因表达与调控等问题, 还可能为筛选新的生物活性物质提供一条新的途径。最近, Hutchinson 等对其应用前景也作了类似的估计<sup>[20]</sup>。文献中这方面的实验多是用抗生素产生菌或其阻断变株, 我们采用天然无抗菌活性的菌株似更易于说明问题, 也便于活化菌株的检出。本实验从同一株链霉菌中分得二个活性变株, 其所产生的抗生素一个为萜环类化合物, 另一个却是水溶性物质。在链霉菌 1254 与变青链霉菌 1326 的种间原生质体融合中, 不同重组体所产生的抗生素也有明显差别<sup>[21]</sup>。这些结果说明, 同一株天然无活性链霉菌被活化后, 有可能产生不同的活性物质, 这似乎又增加了放线菌沉默基因活化用于新抗生素筛选的可能性。但是, 通过这一途径获得新化合物的机率是否大于自天然有活性菌株筛选的传统做法, 还有待更多的实践才能说明。

### 参 考 文 献

- [1] Hopwood, D. A. et al.: *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*, **290**: 313—328, 1980.
- [2] Ogura, M. et al.: *J. Antibiot.*, **39**: 1443—1449, 1986.
- [3] Ishikawa, J. et al.: *ibid.*, **41**: 104—112, 1988.
- [4] Jones, G. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **259**: 14158—14164, 1984.
- [5] Hotta, K. et al.: in *Biology of Actinomycetes '88*, Japan Scientific Societies Pr. Tokyo, pp. 380—385, 1988.
- [6] Madu, A. C. et al.: *Gene*, **84**: 287—294, 1989.
- [7] Lechevalier, H. P. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **20**: 435—443, 1970.
- [8] Stanek, J. L. et al.: *Appl. Microbiol.*, **28**: 228—231, 1974.
- [9] Delic, V.: *J. Gen. Microbiol.*, **55**: 103—108, 1969.
- [10] Hopwood, D. A. et al.: *Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*, The John Innes Foundation, 1985.
- [11] 金文藻等: 中国抗生素杂志, **15**: 399—405, 1990。
- [12] 张玉彬等: 中国抗生素杂志, **16**: 157—164, 1991。
- [13] 陶佩珍等: 中国抗生素杂志, **15**: 170—174, 1990。
- [14] 张月琴等: 微生物学报(印刷中)。
- [15] Kelner, A.: *J. Bacteriol.*, **57**: 73—79, 1949.
- [16] 程元荣等: 抗生素, **9**: 245—246, 1984。
- [17] Mortlock, R. P.: *Trans Biotechnol.*, **4**: 65—68, 1986.
- [18] Malpartida, F. et al.: *Nature*, 818—821, 1987.
- [19] Grein, A. et al.: *J. Antibiot.*, **33**: 1462—1467, 1980.
- [20] Hutchinson, C. R. et al.: *J. Med. Chem.*, **32**: 929—937, 1989.
- [21] 林荣团等: 生物工程学报, **6**: 134—139, 1990。

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MUTACTIMYCIN-PRODUCING MUTANT

Li Huanlou Lu Wanyu Zhang Yueqin Jin Wenzao Tao Peizhen  
Liu Xiaopu He Yiping Zeng Ying

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

Natural non-antibiotic producing *Streptomyces* sp. 1254 was mutagenized by UV irradiation and two active mutants were isolated. Mutant 113 produced novel anthracycline compounds designated mutactimycins. Mutactimycin A was active against the bacteriophage of *Bac. subtilis* and some viruses in tissue culture. The mutant 2-6 synthesized a basic water-soluble antimicrobial antibiotic.

Chemical analysis of the whole cell hydrolysate and the morphological characterization showed that the strain 1254 and its mutant 2-6 were of chemotype I, belonging to the genus of *Streptomyces*, and the mutant 113 was of chemotype IV without mycolic acid.

Co-synthesis test of strain 1254 and a blocked mutant of strain 113 gave the active compounds identical with mutactimycins. Using the *actI* gene as a probe, the Southern hybridization revealed homology between the actinorhodin polyketide biosynthese gene and the total DNA of the strain 1254. Based on these data it was deduced that *Streptomyces* sp. 1254 should have a biosynthesis pathway for mutactimycin, but some of its genes might fail in expression and mutagenesis would make the silent gene(s) active.

**Key words** Antiviral antibiotic; Active mutant; *Streptomyces*