

# 不同放线菌属的化学与分子分类

阮继生 郎艳军 石彦林 屈良鹤\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

随着科学的发展与新技术在分类学中不断地应用,放线菌分类学已从经典的形态分类转向化学分类(细胞壁化学组份,磷酸类脂,枝菌酸及甲基萘醌等)。现在有些国家又开展了分子分类。本实验室自80年代始开展了放线菌化学分类,建立了上述化学指征的分析方法。自90年代起,又开展了分子分类,DNA-DNA 杂交、23S rRNA 寡核苷酸序列分析。

近来,许多人用16S rRNA 部分序列区分微生物不同的基因种<sup>[1,2]</sup>。作者选用了23S rRNA 部分序列区分放线菌的不同属种。现将研究结果简报如下:

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

菌株10,13,23,C<sub>43</sub>,350,41,53,4650及N分离自云南省土壤中。C<sub>51</sub>及3306来自日本微生物菌种保藏中心。

### 1.2 形态和生理生化试验

采用放线菌分类通用的方法<sup>[3]</sup>。

### 1.3 细胞壁化学组份

全细胞化学组份采用王平改良 Hasegawa 的薄板快速分析方法<sup>[4]</sup>。纯细胞壁分析采用 Lechevalier 和 Lechevalier 的分析方法<sup>[5]</sup>。

### 1.4 磷酸类脂分析

采用 Lechevalier 和 Lechevalier 的分析方法

### 1.5 枝菌酸测定

使用 Minnikin 的方法<sup>[6]</sup>

### 1.6 甲基萘醌分析

采用吴诚华等改进 Kroppenstedt 及 Collins 的方法<sup>[7]</sup>。

### 1.7 RNA 提取与序列分析

菌种培养在本纳特培养液中,28℃下摇床培养,于生长稳定期时,离心收集菌体。用 LiCl 方法<sup>[8]</sup>提取 RNA,序列分析按屈良鹤快速序列分析法进行<sup>[9]</sup>。引物采用生二素链霉菌(*Streptomyces ambofaciens*) P457 通用的引物,相当于 *E. coli* rRNA 457-477),利用逆转录酶<sup>32</sup>P 标记的寡核苷酸在5'末端进行延伸,序列用高压电泳分离,同位素自显影。

## 2 结果和讨论

### 2.1 形态

菌株 C<sub>51</sub> 气丝与基丝生长发育良好,孢子丝直或波曲形,呈长孢子丝链。菌株 C<sub>43</sub> 气丝与基丝生长发育良好,基丝有横隔并断裂。菌株 4153 无气丝,在基丝上着生短孢子梗,在梗顶端着生1个孢子。菌株

本课题获国家自然科学基金委重大项目资助。

\* 广州中山大学生物工程中心。

本文于1993年7月9日收到。

10、13、23、350、3306、4650 及 N 的气丝与基丝生长发育良好,在气丝上着生短孢子梗,在梗上生 1 个孢子。基丝上偶尔也着生单个孢子,着生两个孢子者少见。

## 2.2 化学分类指征

菌株的化学分类指征如细胞壁化学组份、磷酸类脂、甲基萘醌及枝菌酸的结果列入表 1。

表 1 菌株的化学分类指征的结果

菌株	细胞壁化学组份		磷酸类脂型	甲基萘醌	枝菌酸
	氨基酸组份	糖模型			
C <sub>51</sub>	I (含 LL-DAP、甘氨酸)	C 无特征性糖	PI 含磷脂酰乙醇胺	MK-9(H <sub>4</sub> H <sub>6</sub> )	—
C <sub>43</sub>	IV (含 meso-DAP)	阿拉伯糖 半乳糖	PI 含磷脂酰乙醇胺	MK-9(H <sub>4</sub> H <sub>2</sub> )	—
4153	I (含 meso-DAP、甘氨酸)	木糖 阿拉伯糖	PI 含磷脂酰乙醇胺	MK-9(H <sub>4</sub> )、 MK-10(H <sub>4</sub> )	—
3306, 10 13, 23 350, 4650 N	IV (含 meso-DAP)	阿拉伯糖 半乳糖	PI 含磷脂酰乙醇胺	MK-9(H <sub>4</sub> )	—

注: C<sub>51</sub> = 灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*);

3306 = 绿色糖单孢菌 (*Saccharomonospora viridis*);

350 经与 3306 的 DNA-DNA 体外杂交,其同源率为 36%,可能为一新基因种。

根据形态与化学分类指征相结合定属的原则<sup>[10,11]</sup>, C<sub>51</sub> 菌属于链霉菌属 (*Streptomyces*); C<sub>43</sub> 菌属于拟无枝酸菌属 (*Amycolatopsis*); 4153 菌属于小单孢菌属 (*Micromonospora*); 菌株 3306、10、13、23、350、4650 及 N 属于糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*)。

## 2.3 23S rRNA 的 5' 末端序列测定

为了验证属级的化学分类指征与 23S rRNA 序列的相关性,测定了 23S rRNA 的 5' 末端序列。10 株菌的序列结果见图 1。图 1 结果表明:同一属内的菌株如链霉菌属中生二素链霉菌与灰色链霉菌 (C<sub>51</sub>) 在 130 个核苷酸中其差异 < 1%; 在糖单孢菌属中 3306、10、13、23、350、4650 及 N 七株菌之间在 100 核苷酸中未发现一个差异。由此说明,选用的生二素链霉菌中 P<sub>437</sub> 为引物的 23S rRNA 401—542 这段序列,它不能区分开同一属内不同种或菌株。而这段序列能区分开不同属的菌。像链霉菌属 C<sub>51</sub> 与糖单孢菌属有 33—34% 个核苷酸不同、与拟无枝酸菌属 C<sub>43</sub> 有 37/130 个不同,与小单孢菌属 4153 有 38/130 个不同。糖单孢菌属 3306 等与拟无枝酸菌属 C<sub>43</sub> 有 18/130 个不同,与小单孢菌属 4153 有 32/130 个不同(表 2)。因而,实验结果表明,23S rRNA 的 5' 末端序列可以区分开不同属的菌。这段序列是划分属与属间亲缘关系的重要指征。

用形态、化学分类指征与 23S rRNA 序列分析相结合区分属,可以由表及里地在分子水平上识别放线菌。这在国内外微生物分类学中系首次报道。

C <sub>51</sub>	CGTAGAGGGT	AAGACCCCG	TA*GCCTAAA	CATTGACCGT	TCG***TTTG	50
S. a	-----	-----	-----G---	---CAG-G-C	-----	
3306 <sup>T</sup>	--G--T---	G---GT---	--C-TT---	-TGCATGTCC	-T-A-----	
C <sub>43</sub>	-CG--T---	T---GT---C	--C--GA---	--CGTTTT-G	ATTTTG-G-C	
4153	-----C---	T-T-GT---	----GTG---	GTGGCCTG-C	-TC---G--	
C <sub>51</sub>	AGAGACACCC	AAGTAGCACG	GGGCCCGAGA	AATCCCGTGT	TAATCTGGCG	100
S. a	-----	-----	-----	-----	-----	
3306 <sup>T</sup>	TTG-TGT---	C-----GC	-A--TT-T-G	---T-GC-TG	-----*	
C <sub>43</sub>	T-G-TTT---	C-----GC	-A--TT-T-G	---TTGC--G	-----*	
4153	G---CTC---	-----GGC	--A--CTT-	---TGCGC	-----C-A	
C <sub>51</sub>	GGACCACCCG	CTAAGCCTAA	ATATTCCCTG	GTGACCGATA	GCGGA	150
S. a	-----	-----	-----	-----	-----	
3306 <sup>T</sup>	-----	G-----	---C-T---	--T---C---	-----	
C <sub>43</sub>	-----	GG-----	---C-T---	AA---C---	-----	
4153	-----T-	GG-----	---C-T---	--T---C---	-----	

图 1 不同菌株 23S rRNA 5'末端区的序列图谱

上述序列相当于 *Streptomyces ambofaciens* 23S rRNA 5'末端 401—542 核苷酸。

被测试菌号所列出的核苷酸是与 C<sub>51</sub> 不同者, 相同者则用虚线表示; 删除者用五星表示。

S. a = *Streptomyces ambofaciens*

C<sub>51</sub> = *Streptomyces griseus*

C<sub>43</sub> = *Amycolatopsis* sp.

4153 = *Micromonospora* sp.

3306<sup>T</sup> = *Saccharomonospora viridis*

T 代表其它 6 株菌如 10, 13, 23, 350, 4650 及 N。

表 2 不同菌株 23S rRNA 5'末端序列的差异比较

	C <sub>51</sub>	S. a	3306 <sup>T</sup>	C <sub>43</sub>	4153
C <sub>51</sub>	—	1/130	33/130	37/130	38/130
S. a	0.012	—	34/130	37/130	37/130
3306 <sup>T</sup>	0.310	0.322	—	18/130	32/130
C <sub>43</sub>	0.358	0.358	0.154	—	35/130
4153	0.370	0.358	0.300	0.344	—

注: 右上方数字代表序列中不同的核苷酸数; 左下方数字系用 Kimura's 公式换算出的 Knuc 值。

## 参 考 文 献

- [1] Mirza M S *et al.* *FEMS Microbiology Letters*, 1991, **83**: 91-98.
- [2] Nazaret S *et al.* *J of Bacteriology*, 1991, **173**: 4072-4073.
- [3] 阮继生. 放线菌分类基础. 北京: 科学出版社. 1977.
- [4] 王平. 微生物学通报, 1986, **13**(5): 228-231.
- [5] Lechebaliier M P, Lechebaliier H A. Special Publication N. 6. In: Deitz A *et al.* ed. The Society for Industrial Microbiology. Arlington: Arlington V A, 1980. 227-291.
- [6] Minnikin D E *et al.* *Chromatography*, 1980, **188**: 221-233.
- [7] 吴减华, 等. 微生物学通报, 1989, **16**(3): 176-179.
- [8] Auffray C, Rougeon F. *Eur J Biochem*, 1980, **107**: 303-314.
- [9] Qu L H *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1983, **11**: 5903-5920.
- [10] Williams S T *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 4. Baltimore: The Williams & wilkins Co, 1989. 2348-2545.
- [11] 阮继生, 等. 放线菌研究及应用. 北京: 科学出版社. 1990. 1-72.

## CHEMICAL AND MOLECULAR TAXONOMY OF DIFFERENT GENERA OF ACTINOMYCETES

Ruan Jisheng Lang Yanjun Shi Yanlin Qu Lianghu\*

(Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** According to the morphological characteristics and chemotaxonomic criteria including cell wall composition, phospholipids, mycolic acids, menaquinones, 10 strains of actinomycetes were divided into 4 genera such as *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Amycolatopsis* and *Saccharomonospora*. The result of 5' terminal of 23S rRNA sequence analysis is correspondent to the result of chemotaxonomy. Our experiment showed that 5' terminal of 23S rRNA sequence can distinguish different genera of actinomycetes. There are small differences (< 1%) among strains within genus of *Streptomyces* (2 strains) and *Saccharomonospora* (7 strains).

**Key words** Chemotaxonomy, Molecular taxonomy

\* Biotechnology Research Centre, Zhongshan University, Guangzhou 510275.