

链霉菌属菌株 AS 4.693 和 AS 4.702 的分类学研究*

刘志恒 钱宇冬 张亚美 石彦林 谢家仪

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 链霉菌属“Setae”种群原为北里孢菌属 *Kitasatosporia* (Omura, 1982)。1992年, Wellington 根据 16S rRNA 序列分析结果将其并入链霉菌属, 并建立“Setae”种群。通过对保藏的链霉菌 AS 4.693、AS 4.702 进行的形态学、细胞化学、分子遗传分类研究结果表明, 它们与链霉菌属“Setae”种群中的典型种——西唐链霉菌 *Streptomyces setae* (JCM3304^T) 具有相似性。它们的 rDNA 相似性高达 100%, 证明它们应归属于同一种群。AS 4.693 定名为西唐链霉菌不规则新亚种 *Streptomyces setae* subsp. *irregularis* nov., AS 4.702 定名为西唐链霉菌波曲弗氏新亚种 *Streptomyces setae* subsp. *flexuofradiae* nov.

关键词 西唐链霉菌不规则新亚种, 西唐链霉菌波曲弗氏新亚种, “Setae”种群

中国微生物菌种保藏委员会收藏的菌号分别为 AS 4.693、AS 4.702 两株放线菌, 形态类似链霉菌, 原名分别为不规则链霉菌 *Streptomyces irregularis* (Yen et Deng, 1965) 及波曲弗氏链霉菌 *Streptomyces flexuofradiae* (Yen et Deng, 1965)^[1]。通过我们对其进行形态、化学、生理生化及分子遗传学分类的研究, 尤其是对它们的 rDNA 与新建立的链霉菌属“Setae”种群的典型菌株 *Streptomyces setae* JCM3304^T^[2] 相似性分析研究结果发现, 它们为同一种群。本文报告对 AS 4.693, AS 4.702 的分类研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

菌株 *Streptomyces irregularis* AS 4.693 分离自广东海安土壤中, 1970年3月收集^[1]。菌株 *Streptomyces flexuofradiae* AS 4.702 来自中国科学院西北分院生物土壤研究所, 1964年收集^[1]。

菌株 *Streptomyces setae* JCM3304^T (= ATCC33774 = IFO14216 = KM6054) 来自日本微生物菌种保藏中心, 为本项研究的模式菌株。

1.2 形态观察

在燕麦粉培养基^[3]上插片培养, 用光学显微镜和电子显微镜观察并拍摄菌丝、孢子形态照片。

1.3 培养特征

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于1996年5月31日收到。

在7种不同的培养基上^[1]28℃, 培养7~14d, 观察并记录培养特征, 颜色记录使用中国科学院编译出版委员会名词室编(科学出版社, 1957)的《色谱》^[4]。

1.4 细胞化学

全细胞水解液化学组分分析以 Lechevalier(1980)^[5]和 Hasegawsa(1983)^[6]的方法进行; 纯细胞壁化学组分分析按照 Lechevalier(1980)^[5]的方法; 磷酸类脂的成份分析用 Lechevalier(1980)的方法^[5]; 全细胞壁甲基脂的分析用 Minnikin(1979, 1980)的方法^[7]; 醌的提取、分析使用 Collins(1985)和吴诚华等人的方法^[8, 9], 进行高压液相分析。

1.5 生理生化

按照 Gordon(1974)和 Shirling(1966)等人报道的方法^[3, 10]进行。

1.6 DNA 的 G + C mol% 的测定

主要参照 Marmur 和 Delay(1962)等人的 T_m 值测定方法^[11]。大肠杆菌 (*E. coli* AS 1.365) 的 DNA 为参照 DNA G + C mol% 值。

1.7 rDNA 相似性分析

1.7.1 DNA 制备: DNA 制备主要参照 Chater K. F. 等(1982)的方法^[12]。称湿菌体(-20℃保存)3g, 悬浊于 5ml TE 缓冲液中(0.03mol/L Tris-HCl, 0.1mol/L EDTA, pH8.0)。玻棒搅拌均匀。加溶菌酶 lysozyme (5mg/g 细胞), 搅拌并于 37℃ 下 6~24h。加 2.0ml 0.5mol/L 的 EDTA 至终浓度 0.1mol/L, 小心混合并加入蛋白酶 K(P.5130, Sigma)至终浓度 200μg/ml, 37℃ 约 2h。加 1ml 20% 的 SDS 至终浓度为 2%, 37℃ 2h, 至液体透明。冷至室温后, 加缓冲液 0.1mol/L Tris + 0.1mol/L NaCl(pH9.0)至终体积 10ml, 加入相同体积的苯酚:氯仿:乙醇 = 25:24:1(P.3803, Sigma), 4℃ 混合 20min, 10000r/min 冷冻离心 10min。取上清液加两倍体积的冷乙醇(-20℃), 用干净的玻棒卷丝。溶解 DNA 于 5~10ml 0.1SSC 中, 加 RNase 至终浓度为 100μg/ml(Rnase 使用前要在沸水中煮沸 10min), 37℃ 保温 2h, 冷却后加等量体积的苯酚混合液(P.3803, Sigma), 再次提取 DNA。溶解 DNA 于 0.1SSC 中, 按 9:1(V/V)加 3mol/L NaCl + 0.01mol/L EDTA, 再加 0.54 体积的异丙醇, 沉淀 DNA。用紫外分光光度计测 230nm, 260nm, 280nm 处 DNA 溶液的吸光值。DNA 样品纯度应处于以下范围: A₂₆₀:A₂₈₀ ≥ 1.8, A₂₆₀:A₂₃₀ ≥ 2.0。

1.7.2 探针 P64 的标记: 以 DIG(Digoxigenin, 俗称地高辛)标记的质粒 PUC18 rDNA 作为探针(DIG-P64), 此质粒来自于 *Streptomyces lividans*, 经构建含有 16S, 23S, 5S rRNA 序列^[13]。探针 P64 由波兰科学院免疫与化疗研究所(Polish Academy of Sciences Ludwik Hirszfild Institute of Immunology and Experimental Therapy)微生物实验室提供。

1.7.3 限制性酶切: 2μg DNA 用 1μl Bam HI(567604, Boehringer Mannheim GmbH, Germany)酶切, 反应总体积按酶制造商的规定配制成 20μl 混合液。酶切后的 DNA 片段在 90V 的水平电泳槽上电泳 2h, 琼脂糖浓度为 1%, 缓冲液 TE 成分为 36mmol/L Tris, 30mmol/L Na₂HPO₄ + 1mmol/L EDTA^[14]。电泳中以 1kb 的 DNA ladder 为 marker, 测 DNA 的大小。

DNA 片段用 Southern Blotting 方法^[14]从胶上转移至尼龙膜 (Hybond - N+, Removerating 0.45 μ m)上。

1.7.4 杂交及显色: 以 DIG 标记探针, 进行预杂交、杂交及杂交体的免疫学检测参见“DIG system user's guide for filter hybridization”^[15]。

2 结果

2.1 形态学特征

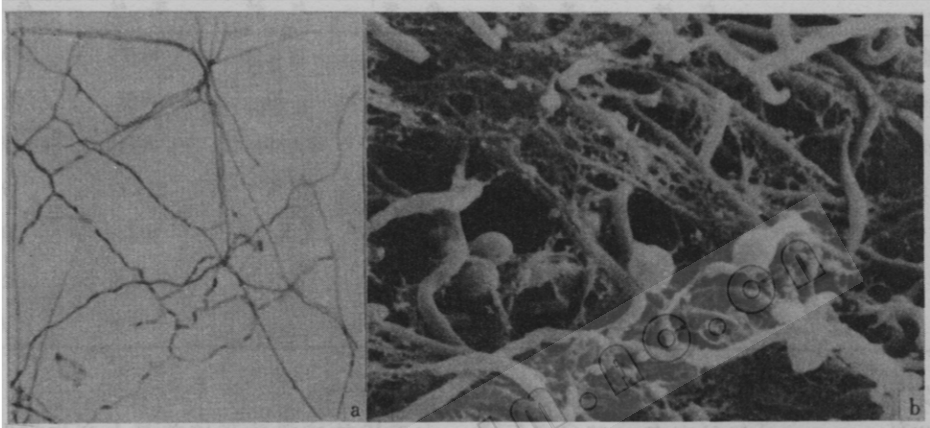


图 1 菌株 AS 4.693 的形态

a. 菌丝 ($\times 1200$); b. 孢子链和孢子 (SEM $\times 8000$).

Fig. 1 Morphology of strain AS 4.693

a. Mycelium morphology; b. Morphology of spore-chains and spores.

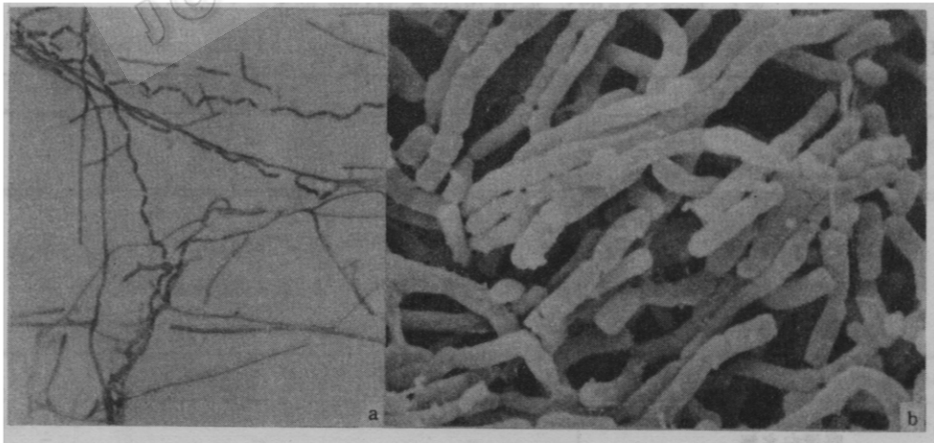


图 2 菌株 AS 4.702 的形态

a. 菌丝 ($\times 1200$); b. 孢子链和孢子 (SEM $\times 8000$).

Fig. 2 Morphology of strain AS 4.702

a. Mycelium morphology; b. Morphology of spore-chains and spores.

菌株 AS 4.693 气丝和基丝发育良好, 气丝有分隔, 断裂; 基丝无隔, 未见断裂; 电镜下观察菌丝体表面光滑, 顶端有膨大(图 1)。

菌株 AS 4.702 基丝和气丝均发育良好, 气丝有横隔, 断裂为断裂孢子; 基丝无隔, 未见断裂; 电镜下观察菌丝体断裂孢子表面光滑(图 2)。

表1 菌株AS 4.693和AS 4.702的培养特征

Table 1 Cultural characteristics of strain AS 4.693 and AS 4.702

	AS 4.693			AS 4.702		
	气 丝	基 丝	色 素	气 丝	基 丝	色 素
蔗糖酵母浸汁	粉白	鲑鱼红	微染	荷花白	桔橙	无
酵母麦芽糖浸叶	少, 白	肉色	无	无	肉色	微染
无机盐淀粉琼脂	少, 白	蚌肉白	无	稀, 蚌肉白	乳白	无
燕麦粉琼脂	白	金叶黄	无	白	铁水红	无
贝恭特琼脂	荷花白	金叶黄	象牙黄	落英淡粉	蜜黄	无
高氏琼脂	蚌肉白	榴萼黄	淡肉色	荷花白	瓜瓤粉	尘灰
察氏琼脂	粉白	金叶黄	无	粉白	金叶黄	无

2.2 培养特征

菌株 JCM3304^T 气丝白色, 基丝象牙黄, 在无机盐淀粉琼脂培养基上产生枫叶黄的色素; 孢子柱状, 表面光滑^[16]。

菌株 AS 4.693, AS 4.702 的培养特征见表 1。

2.3 生理生化特性

表2 菌株AS 4.693、AS 4.702及JCM3304^T的生理生化特性

Table 2 Differentiating physiological characteristics of strain AS 4.693, AS 4.702 and JCM3304^T

		AS 4.693	AS 4.702	JCM3304 ^T
牛 奶	凝固	+	+	+
	胨化	+	+	+
明胶水解		-	-	-
淀粉水解		+	+	+
硝酸盐还原		-	-	-
纤维素上生长		+	+	-
硫化氢产生		-	-	-
酪氨酸酶产生		-	-	-
酪蛋白水解		-	-	-
苹果酸钙分解		+	+	ND*
最 适 pH	5.0	+	+	ND
	8.0	+	+	+
	9.0	+	+	+

(续表2)

		AS 4.693	AS 4.702	JCM3304 ^T
耐 盐 范 围 (%)	1	+	+	+
	2	+	+	-
	3	+	+	-
	4	+	+	-
	4.5	+	+	-
最适 温度	28℃	+	+	+
	50℃	-	-	-
碳 源 利 用	D-果糖	+	+	-
	蔗糖	+	+	-
	D-葡萄糖	+	+	+
	D-木糖	+	+	+
	D-甘露醇	-	-	-
	L-阿拉伯糖	+	+	+
	L-鼠李糖	+	+	-
	棉子糖	+	+	-
	D-甘露糖	+	+	ND
	乳糖	-	-	ND
	麦芽糖	-	-	ND
	糊精	+	-	ND
	菊粉	-	-	ND
	D-半乳糖	-	-	ND
	甘油	+	-	ND
	D-山梨醇	-	-	ND
	D-卫矛醇	-	-	ND
	肌醇	-	-	-
	D-核糖	+	+	ND
	山梨糖	-	-	ND
D-蜜二糖	-	-	-	

* ND, no description.

表3 菌株 AS 4.693, AS 4.702 和 JCM3304^T 的细胞化学组分及 DNA G+C mol% 值Table 3 Cell chemistry and DNA G+C mol% of strain AS 4.693, AS 4.702 and JCM3304^T

菌株	胞壁类型	糖型	磷酸类脂	酰型MK	DNA G+C mol%
AS 4.693	II	C	III	10(4, 6), 9(8)	75.1
AS 4.702	II	C	III	10(4), 9(8), 10(6)	71.1
JCM3304 ^T	**	C	II	9, 10	73

** 含有少量 LL-DAP, 多量 meso-DAP^[2], 纯细胞壁水解液含甘氨酸^[18].菌株 AS 4.693、AS 4.702 及 JCM3304^T[17, 18] 的生理生化特征见表 2。

2.4 细胞化学和 DNA G+C mol% 分析结果

细胞化学组分和 DNA G+C mol% 分析结果见表 3, 其中标准菌株 *Streptomyces setae*(JCM3304^T) 的资料取自刘志恒先前发表的实验数据^[18]。

2.5 rDNA 相似性分析结果

菌株 AS 4.693, AS 4.702 和 JCM3304^T 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。

由图可知, 菌株 JCM3304^T, AS 4.693, AS 4.702 有相同的 Ribotype 图谱, 即出现分子量相同的 4.1, 6, 8, 10, 12kb 的五个片段。所以, 三株菌 rDNA 的相似性为 100%。

3 讨论

菌株 *Streptomyces setae* JCM3304^T 形态类似链霉菌, 最早根据细胞壁中含有 LL-及 meso-两种类型的 DAP, 将其作为新属——北里孢菌属 *Kitasatosporia*^[16]。后来越来越多的实验数据表明, 该属表现明显的形态和化学异源性^[18,22]。1992 年, Wellington 根据 16S rRNA 的基因序列分析, 建议将 *Kitasatosporia* 并入链霉菌属 *Streptomyces*, 并为有此特性的菌株建立一西唐种群“*Setae group*”^[2]。这一建议很快得到了世界放线菌分类学界的认同^[18, 22]。菌株 JCM3304^T 作为这一种群的标准菌株。

经过我们对菌株 AS 4.693, AS 4.702 一系列形态、生理生化、细胞化学及分子遗传学方面的研究表明, 它们与“*Setae*”种群中的标准菌株 JCM3304^T 在形态和一些化学特征上有许多相似性。

菌株 AS 4.693, AS 4.702, JCM3304^T 的形态类似于链霉菌。培养特征和生理特性, 菌株 AS 4.693, AS 4.702 在嗜盐范围和某些碳源利用

方面显示出比菌株 JCM3304^T 更大的生长适应性(详见实验结果部分)。菌株 JCM3304^T 细胞壁含有 LL-meso-两种类型的 DAP, 并含甘氨酸, 糖型 C; 而菌株 AS 4.693 和 AS 4.702 含有 meso-DAP, 纯细胞壁含甘氨酸, 糖型 C。三株菌均含有 MK9 及 MK10, 且 DNA 中 G+C mol% 含量在 71%~75% 范围内。但菌株 AS 4.693 和 AS 4.702 的磷酸类脂类型(PIII)不同于“*Setae*”种群中的现有已知种(磷酸类脂型 PII)^[22]。

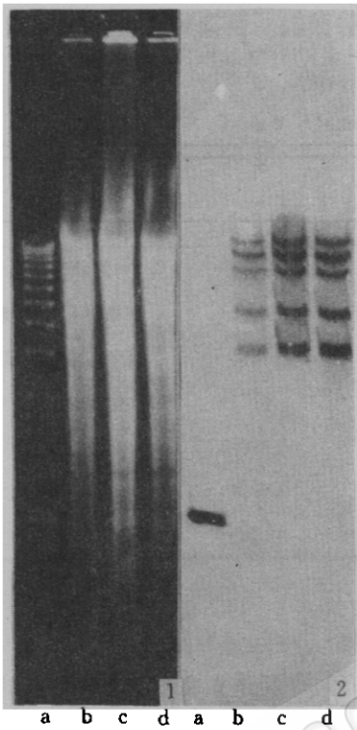


图 3-1 Bam HI DNA 酶切片段电泳后照相结果

a. 1kb DNA ladder; b. 菌株 JCM3304^T;
c. 菌株 AS 4.702; d. 菌株 AS 4.693.

Fig. 3-1 Photographs of b. JCM3304^T strain
c. AS 4.702 strain and d. AS 4.693 strain's
DNA fragments and a. 1kb DNA ladder
after electrophoresis

图 3-2 酶切片段与 DIG-P64 DNA 杂交结果

a. 1kb DNA ladder; b. 菌株 JCM3304^T;
c. 菌株 AS 4.702; d. 菌株 AS 4.693.

Fig. 3-2 Ribotypes patterns of a. 1kb DNA ladder,
b. JCM3304^T, c. AS 4.702, d. AS 4.693

DNA 相似性分析的结果表明,三株菌的 rDNA Ribotype 相似性高达 100%,说明它们在分子遗传学上属于同一个种群^[20, 21]。

我们考虑到菌株 AS 4.693, AS 4.702 在碳源利用、抗菌性^[1]等方面有所不同,将它们转入链霉菌属西唐种群后,分别作为西唐链霉菌不规则新亚种 AS 4.693 *Streptomyces setae* subsp. *irregularis* nov. 和西唐链霉菌波曲弗氏新亚种 AS 4.702 *Streptomyces setae* subsp. *flexuofradiae* nov.。

致谢 本项研究得到了中国科学院微生物研究所所长基金的资助。波兰科学院免疫化疗研究所微生物室 Dr. Jola 提供 PUC18 rDNA, 河北大学生物系王建平先生协助测定酞型, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 阎逊初, 邓宇秀. 全国第三次抗生素大会论文集(第一卷). 北京: 科学出版社, 1965. 217~235.
- [2] Wellington E M H, Stackebrandt E, Sanders D J. *Int J Syst Bacteriol*, 1992, **42**: 156~160.
- [3] Shirling E B, Gottlieb D. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, **16**(3): 317~327.
- [4] 中国科学院编译出版委员会名词室. 色谱. 北京: 科学出版社, 1957.
- [5] Lechevalier M P, Lechevalier H A. A University Laboratory Approach In: Dietz A *et al* ed. *Actinomyces Taxonomy*. Arlington: SIM spec, publ., No. 6, 1980. 277~284.
- [6] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, **29**: 319~322.
- [7] Minnikin D E, Hutchinson IG, Caldicott A B *et al*. *J Chromatography*, 1980, **188**: 221~233.
- [8] Collins M D. Isoprenoid quinone analyses in classification and identification. In: Goodfellow M *et al* ed. *Chemical methods in Bacterial Systematics*. London: Academic Press, 1985. 267~287.
- [9] 吴诚华, 陆小涛, 秦敏, 等. 微生物学通报, 1989. **16**(3): 176~178.
- [10] Gordon R E, Barnett D A, Handerman J B *et al*. *Int J Syst Bacteriol*, 1974, **24**(1): 54~63.
- [11] Marmur J, Doty P. *J Mol Biol*, 1962, **5**: 109~118.
- [12] Chater K F, Hopwood D A, Kieser T *et al*. *Curr Topics Microb Immunol*, 1982, **96**: 69~95.
- [13] Zakrzewska-Czerwinska J, Mordarski M, Goodfellow M. *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 2807~2813.
- [14] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbors, 1982. 149~172; 382~389.
- [15] Boehringer Mannheim. DIG System user's Guide for filter hybridization. Germany: Biochemica, 1992.
- [16] Omura S, Takahashi Y, Iwai Y *et al*. *J Antib*, 1982, **35**: 1013~1019.
- [17] Takahashi Y, Iwai Y, Omura S. *J Gen Appl Microbiol*, 1984, **30**: 377~387.
- [18] Liu Z H, Gu J, Zhang J M, Shi Y L *et al*. *Actinomyces*, 1994, **5**(2): 25~30.
- [19] Mordarski M, Szyba K, Pulverer G *et al*. *Journal of General Microbiology*, 1976, **94**: 235~245.
- [20] Mordarski M, Goodfellow M, Szyba K *et al*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1977, **27**: 31~37.
- [21] Mordarski M, Goodfellow M, Szyba K *et al*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1980, **30**: 521~527.
- [22] Nakagaito Y, Shimazu A, Yokota A *et al*. *J Gen Appl Microbiol*, 1992, **38**: 627~633.

TAXONOMIC STUDIES OF TWO *STREPTOMYCETE* STRAINS AS 4.693 AND AS 4.702

Liu Zhiheng Qian Yudong Zhang Yamei Shi Yanlin Xie Jiayi

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The “setae group” of the genus *Streptomyces* was originally the genus *Kitasatosporia* (Omura, 1982). On the basis of 16s rRNA analysis, Wellington(1992) proposed to reduce *Kitasatosporia* to synonymy with *Streptomyces* as a species group——“setae group”. Two *Streptomyces* strains, AS 4.693 and AS 4.702(deposited in CCCC) were examined by using morphological, chemical and nucleic acid ribotyping methods. It was revealed that these two strains have similarity to the type strain *Streptomyces setae* JCM3304^T, and they share 100% DNA homology with JCM 3304^T. Therefore, we propose that the strain AS 4.693 be transferred to the “setae group” of genus *Streptomyces* as *Strptomyces setae* subsp. *irregularis* nov. and the strain AS 4.702 as *Streptomyces setae* subsp. *flexuofradiae* nov.

Key words *Strptomyces setae* subsp. *irregularis* nov., *Streptomyces setae* subsp. *flexuofradiae* nov., “Setae group”