

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(7):934-940; 4 July 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

放线菌 *Streptomyces* sp. FJ3 的核糖体工程改良与活性产物的分离

海乐, 黄宇琪, 廖国建, 胡昌华*

西南大学药学院, 重庆 400716

摘要: 【目的】利用核糖体工程抗性筛选技术, 获得有抗菌活性突变株, 并对突变株新产生活性物质进行研究。【方法】以三峡库区筛选出的无抗菌活性放线菌野生株为出发菌, 通过单菌落挑选与平板划线培养, 分离筛选具有链霉素和利福平抗性突变株; 通过摇瓶发酵和对发酵液进行纸片法活性测定, 获得抗金黄色葡萄球菌活性突变株; 采用高效液相色谱法 (HPLC) 分析其发酵液组分, 通过 LC-MS 对变化峰进行分析; 进行 16S rDNA 及形态学鉴定。【结果】链霉素和利福平对放线菌菌株 FJ3 的 MIC 分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 在 FJ3 突变菌株中, 共获得 24 株链霉素突变菌株和 20 株利福平突变菌株, 抗菌活性筛选显示 6 株具有抗菌活性, 其中 2 株链霉素突变菌株对金黄色葡萄球菌有强抑菌活性, 采用 Doskochilova 溶剂系统纸层析结果表明, 该活性物质为一种核酸类抗生素, HPLC 和 LC-MS 显示该活性物质可能为硫藤黄菌素。【结论】利用核糖体工程技术可以改变放线菌的次级代谢, 获得具有生物活性的突变株, 拓展药源放线菌活性菌株新资源。

关键词: 三峡库区, 放线菌, 核糖体工程, 链霉素抗性, 抗金黄色葡萄球菌活性

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 07-0934-07

“核糖体工程”概念最早是 Ochi 等学者提出来, 其基本原理是通过基因工程的手段, 向编码微生物核糖体蛋白中引入特定类型的突变, 改变与次级代谢途径生物合成密切相关的静止生长期时核糖体的行为, 从而提高或刺激次级代谢产物的表达。通常所采用的方法是使用能够作用于核糖体或 RNA 聚合酶的抗生素 (如链霉素、利福平、庆大霉素等) 处理微生物, 获得其高抗性菌株, 进而分析突变株中次级代谢产物表达量的变化^[1-3]。核糖体工程研究主要用于提高抗生素产量方面, 经此方法所产生的诱变菌株其抗生素的产量有明显提高^[4-5]。Ochi 课题组报道, 经多种抗生素依次抗性筛选, 积累多药的

抗性突变, 可以使天蓝色链霉菌产放线紫红素提高 180 倍^[6]。近年来, 随着研究的深入, 发现微生物的抗生素抗性突变还可诱发或激活野生株原本不产生的代谢产物生物合成途径^[7], Hosaka 等用链霉素、利福平双重抗性突变土壤中一株无活性苯胺紫链霉菌 (*Streptomyces mauvecolor*) 获得了新的化合物 Piperidamycin^[1]。这些研究显示在核糖体蛋白或 RNA 聚合酶突变可能激活隐性 (cryptic) 微生物次级代谢产物的生物合成, 因此可以通过核糖体工程的方法获得新型次级代谢产物, 为新药开发提供重要的先导化合物。

本研究根据“核糖体工程”的原理, 采用链霉素

基金项目: 重庆科技创新能力建设项目 (CSTC2009CB1010); 重庆科技攻关重点项目 (CSTCAB1029)

* 通信作者。Tel: +86-23-68250520; E-mail: chhu@vip.sina.com

作者简介: 海乐 (1980 -), 男 (回族), 湖南邵阳人, 药师, 硕士研究生, 主要从事微生物药物来源与分析研究。E-mail: haile6@163.com

收稿日期: 2010-12-28; 修回日期: 2011-04-19

和利福平对来自三峡库区的4株未表现抑菌活性放线菌进行抗性诱导突变,以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌为指示菌对其诱变菌株进行抑菌活性筛选,获得了两株对金黄色葡萄球菌具有显著抑菌活性的链霉素抗性突变菌株 FJ3-2、FJ3-6,并对其形态特征和产生的抑菌活性物质进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器:江苏培英 TH2-C 恒温振荡器,上海福玛 QYZ2112 恒温摇床,上海精天电子仪器有限公司 JA2003A 电子天平,重庆永生实验仪器厂电热鼓风干燥器,苏州净化 SW-CJ-4FD 单人单面净化工作台,美国 GRANT 公司 XB70 制冰机,重庆永生生化培养箱,美国 Myclear Thermalcycler 公司 PCR 仪,湖南湘仪 TGL-46M 高速冷冻离心机,北京天一仪器厂 DYY-8C 电泳仪,日本岛津 LC-20AT 高效液相,岛津 2010 液质联用仪。

1.1.2 材料和试剂:大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌等检定菌来自重庆市药检所。硫酸链霉素、利福平(北京鼎国生物技术有限责任公司),其他试剂均为分析纯。

1.1.3 微生物培养基:①高氏一号培养基(L):可溶性淀粉 20.0 g、NaCl 0.5 g、KNO₃ 1.0 g、FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g、KH₂PO₄ 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、琼脂 20.0 g、蒸馏水 1000.0 mL 配制,pH 值为 7.2 - 7.4;②GYM 培养基:葡萄糖 4.0 g、酵母提取物 4.0 g、麦芽提取物 10.0 g、蛋白胨 1.0 g、NaCl 2.0 g、琼脂 20.0 g、蒸馏水 1000.0 mL;③发酵培养基:可溶性淀粉 20.0 g、黄豆饼粉 15.0 g、葡萄糖 5.0 g、酵母提取物 2.5 g、CaCO₃ 5.0 g、NaCl 5.0 g、蒸馏水 1000.0 mL,pH 值为 7.2。

1.2 链霉素、利福平抗性突变菌株筛选

1.2.1 链霉素、利福平最低抑菌浓度测定:取一个新鲜培养的放线菌平板,加入 5 mL 无菌水反复冲洗,将斜面上的孢子用灭菌过的接种铲刮下,制成孢子悬浮液。再经滤纸(杭州新星 9 cm 直径)过滤后,收集孢子悬液,镜检并调整孢子的浓度约为 10⁶ mL⁻¹。

将制备好的孢子悬浮液取 0.2 mL 分别涂布于

含有不同浓度抗生素(0、1、2……10……) μg/mL 的 GYM 培养基平板上,相同浓度设置二个平行,28℃ 培养 5 d,观察不同平板上的菌落生长情况,记录未生长菌落的抗生素最低作用浓度,即确定为抗生素对该菌的最小抑菌浓度(MIC)。

1.2.2 抗性突变株的筛选分离与活性检测:将制备好的孢子悬浮液分别涂布于含有不同 MIC 倍数抗生素的 GYM 培养基平板上,相同浓度设置 2 个平行,28℃ 培养,挑取单菌落于含相应抗生素浓度的试管斜面培养基上,得到抗性突变株并纯化。采用纸片法检测突变菌抗菌活性。

1.3 菌种初步鉴定

1.3.1 FJ3 原始菌株与活性突变菌株的表型特征比较:在培养基平板上划线涂菌,28℃ 培养 5 - 7 d,观察原始和突变菌落特征,如气丝、基丝和色素等。

1.3.2 FJ3 原始菌株 16S rDNA 鉴定:用溶菌酶法提取总 DNA,进行 16S rDNA 的扩增,PCR 扩增使用通用引物 27F/1495r (正向引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物:5'-ACGGCTACCTTGTTACGA CT-3'),由英骏生物技术有限公司完成。扩增条件为:93℃ 预变性 2 min,93℃ 变性 1 min,52.4℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1.5 min,72℃ 后延伸 5 min 进行 30 个循环。PCR 产物用 1% 的琼脂糖电泳后,得到 1500 bp 左右的片段,切胶回收。由北京华大基因科技股份有限公司进行测序,所得的 16S rDNA 序列拼接完整后与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对,确定分离菌株的分类地位。

1.4 抑菌活性物质的初步研究

采用溶剂 Doskochilova 系统^[8]对供试发酵液进行纸层析实验,结合生物自显影绘制活性物质在 8 个溶剂体系中的展开曲线,再通过与已知抗生素在相同溶剂系统中的展开曲线比对,初步判断该抗生素类别。实验中所用溶剂系统:Ⅰ. 水饱和的正丁醇;Ⅱ. 水饱和的正丁醇,内含 2% 对甲苯磺酸(质量分数,下同);Ⅲ. 正丁醇-乙酸-水(2:1:1,V/V,下同);Ⅳ. 水饱和的正丁醇,内含 2% 六氢吡啶;Ⅴ. 以正丁醇饱和的 0.5 mol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液;Ⅵ. 正丁醇饱和的水,内含 2% 对甲苯磺酸;Ⅶ. 苯-甲醇(4:1),滤纸先用 0.5 mol/L、pH 7.0 的磷酸缓冲液处理后晾干;Ⅷ. 甲醇-水(3:1),水内含 3% 氯化钠,滤纸先用 5% 硫酸钠处理后晾干。

1.5 代谢产物的 HPLC 及 LC-MS 研究

将原始菌株和突变菌株在相同条件下平行发酵后,分别取 2 种发酵液各 30 mL,加 30 mL 正丁醇超声提取,静置后取 20 mL 有机相水浴蒸干,最后加 5 mL 蒸馏水溶解提取物。对提取产物分别进行 HPLC 检测,色谱柱:ODS-C₁₈, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 流动相: 甲醇/水 (10/90); 流速: 0.5 mL/min; 检测: SPD-6A (267 nm)。岛津 2010 液质联用仪条件为氮气: 1.5 L/min; CDL: 300 摄氏度; heat block: 300°C; scan 模式。

2 结果和分析

2.1 无活性放线菌抗链霉素与利福平的 MIC 值

选用实验室保存的来源于三峡库区的无抗菌活性的 4 株放线菌 BD20、FJ3、WZ20、FJ5 进行链霉素、利福平 MIC 值的测定,结果如表 1。

表 1 4 株无活性放线菌对链霉素、利福平的 MIC 值和活性突变菌数目

Table1 The MIC of streptomycin and rifampicin for 4 inactive actinomycete strains and the number of active mutant strain

Strain	MIC of str / (μg/mL)	MIC of rif / (μg/mL)	Number of active mutant
FJ5	2	90	7
FJ3	0.5	110	6
WZ20	0.2	25	6
BD20	0.7	20	4

2.2 链霉素和利福平耐药性突变菌的分离结果

利用 2、4、8 MIC 倍数的链霉素、利福平对上述 4 株放线菌分别进行了抗性筛选。通过反复的单菌落挑选和划线培养,总共得到链霉素突变菌和利福平突变菌株共 170 株,其中有 23 株有抑菌活性(如表 1)。在有抑菌活性的突变株中发现 2 株 2 倍 MIC 的 FJ3 链霉素突变株 FJ3-2 和 FJ3-6 对金黄色葡萄球菌有较强的抑菌活性,如图 1。

2.3 FJ3 原始菌株与耐药突变菌株的表型特征比较

菌落表型如图 2 所示,出发菌株 FJ3 在培养平板上的菌落圆形突起,气生菌丝丰富为乳白色,而且茂盛,基丝分枝发达,基内菌丝为褐色,不断裂,无横隔;突变菌株 FJ3-2 和 FJ3-6 菌株的菌落平坦,孢子量明显减少,气生菌丝也明显减少,基内菌丝浅褐色,并有浅褐色色素产生。

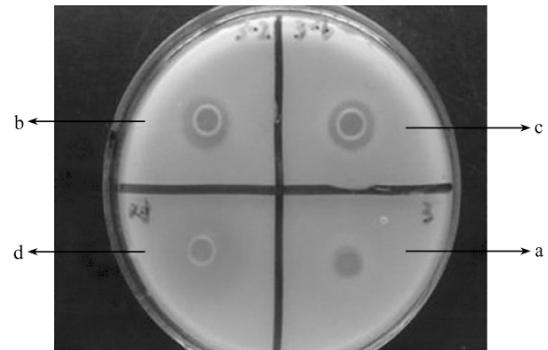


图 1 FJ3 菌株 (a)、FJ3-2 菌株 (b)、FJ3-6 菌株 (c) 发酵液和链霉素对照 (d) (10 μg/mL) 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

Fig. 1 Inhibition activity of fermentation broth of strain str FJ3 (a), FJ3-2 (b), FJ3-6 (c) and streptomycin (d) (10 μg/ml) against staphylococcus aureus.

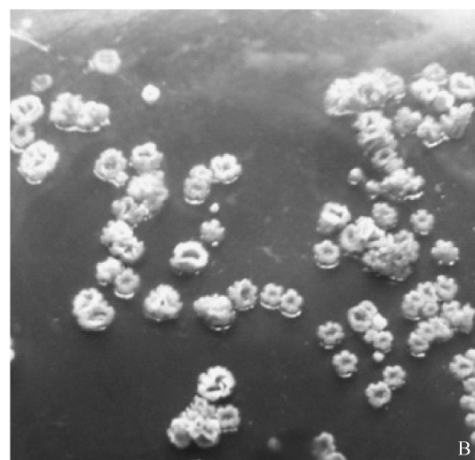
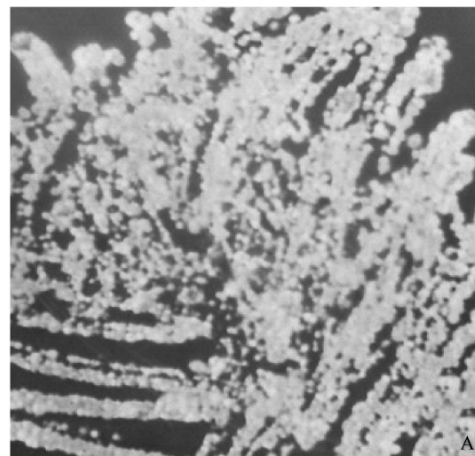


图 2 原始菌株 FJ3 (A) 和链霉素耐药突变菌株 FJ3-2 (B) 在 GYM 培养基上的表型特征

Fig. 2 Morphology of strain FJ3 (A) and streptomycin resistance mutant str FJ3-2 (B) on GYM medium.

2.4 FJ3 原始菌株 16S rDNA 序列分析

测序结果显示 FJ3 的 16S rDNA 序列有 1450 bp, 在数据库中进行 BLAST 分析, FJ3 菌株属于链霉菌属, 与 *Streptomyces* sp. MV32 (Accession: FJ857947.1) 的序列一致性为 98%。结合形态学特征, 将该菌命名为 *Streptomyces* sp. FJ3 strain (GenBank Number: JF511476)。

2.5 抑菌活性物质的初步研究

根据抗生素在捷克八溶剂体系中的比移值

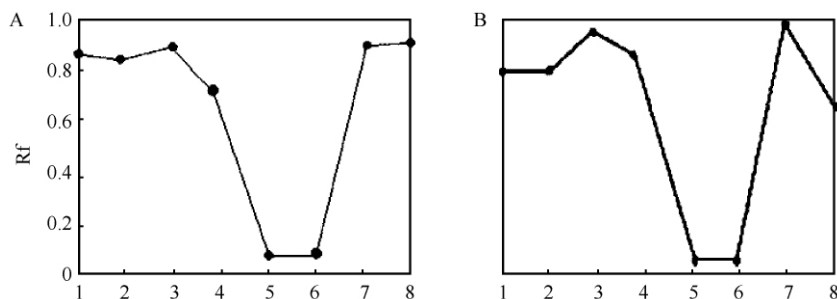


图 3 FJ3-2 发酵液和硫藤黄菌素在 Daskochilova 溶剂系统中的 Rf 曲线图

Fig. 3 The Rf curve of the fermentation broths of FJ3-2 and thiolutin in Daskochilova system. A: The fermentation broths of FJ3-2; B: Thiolutin.

2.6 突变菌株代谢产物的 HPLC 及 LC-MS 研究

从图 4 可以看出 FJ3-6、FJ3-2 与 FJ3 相比, a 峰峰面积明显增大, 同时出现 2 个新峰 b、c, 发酵液经正丁醇、乙酸乙酯、氯仿、石油醚萃取对有机相活性测定表明活性物质溶于正丁醇, 基本不溶解于乙酸乙酯、氯仿、石油醚, 这说明活性物质水溶性较强, 在分析柱上对处理过的 FJ3-2 发酵液进行多次超载进

(Rf) 绘制出活性成分的展开曲线(图 3)。从图中看出, 活性成分在第 I、II、III、VII 和 VIII 5 个展开剂中的 Rf 值都接近 1.0, 在第 V、VI 系统中基本无迁移, 说明该抗生素的极性较大。与典型抗生素纸层析图谱比对, 发现该抗生素的图谱与核酸类抗生素硫藤黄菌素的图谱较为相似, 因此初步判断菌株 FJ3-2 所产抑制细菌的活性物质可能是核酸类抗生素。

样, 对 a、b、c 三峰单独收集, 脱溶后采用纸片法测定 3 个馏分对金黄色葡萄球菌的抑菌活性。结果表明, 仅峰 b 馏分表现出明显的抑菌活性。图 5 显示 b 峰中负离子 ESI-MS 在 m/z 226.8 处给出 $[M-H]^-$, 推测其分子量为 227.8, 这与硫藤黄菌素的分子量 228.3 (分子式: $C_8H_8N_2O_2S_2$) 基本一致, 所以活性物质含有硫藤黄菌素的可能性较大。

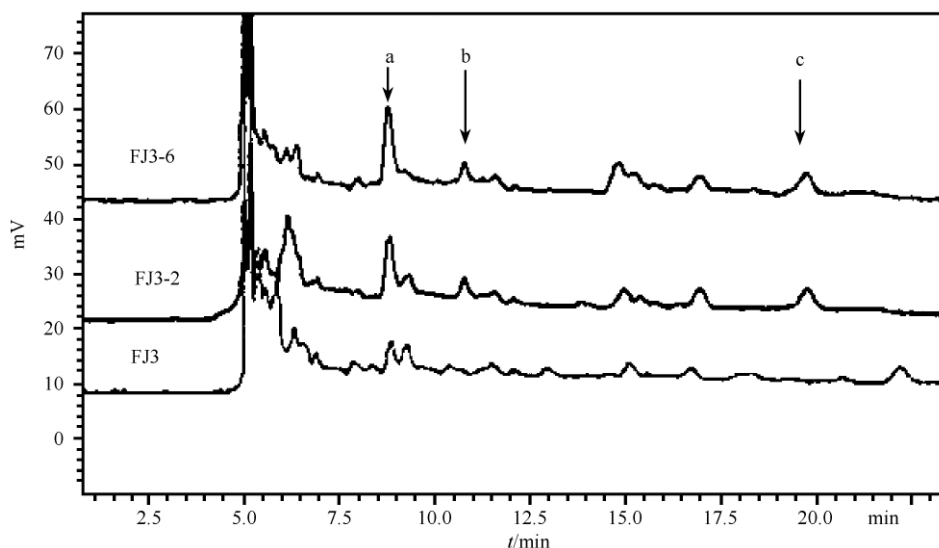


图 4 FJ3 与 FJ3-6、FJ3-2 发酵液的 HPLC 分析

Fig. 4 HPLC chromatogram of fermentation broths of strain FJ3 and the mutant FJ3-2, FJ3-6.

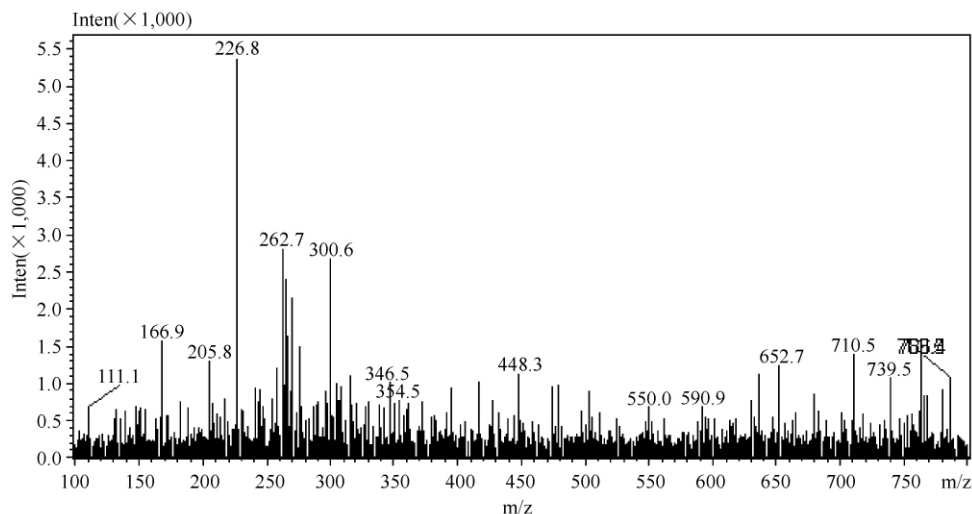


图5 FJ3-2的b峰LC-MS图

Fig. 5 The peak b of FJ3-2 determined by LC-MS.

3 讨论

本研究以4株无活性的放线菌野生株为材料,分别引入链霉素、利福平耐药性突变,得到2株对金黄色葡萄球菌有较好抗菌活性的链霉素耐药突变株FJ3-2、FJ3-6,并对其抑菌活性、形态特征、活性物质进行了研究。从二者的形态特征比较来看,引入链霉素耐药性突变改变微生物的生理特征,如孢子量明显减少、气生菌丝稀少等等。这与相关文献中对链霉素耐药突变菌株的描述一致^[9]。

与原始菌株FJ3相比,突变菌株FJ3-2、FJ3-6的发酵液产物对金黄色葡萄球菌的抑菌活性从无到有,这可以说明链霉素的耐药性突变改变了野生株的次级代谢过程。我们从HPLC可以明显的看出,突变菌株产生了不同于野生株的活性代谢产物,LC-MS显示可能是硫藤黄菌素。这个结果充分表明,微生物对抗生素的这种抗性突变不仅诱导了核糖体结构的改变,使突变株获得了对抗生素的抗性,同时也改变了其次级代谢产物的生物合成调控系统,使突变株产生某些代谢产物的能力大幅提高或者可能提供具有研究价值的新活性产物。微生物获得链霉素抗性主要是由于与核糖体结合的核糖体蛋白发生变化,其对应的基因*rpsL*或者*rsmG*发生突变,引起某些氨基酸的改变从而改变次生代谢过程诱导抗生素产量或者新化合物的产生^[9-11],本实验分析了突变前后*rpsL*基因的序列并没有改变(数据未显示),

所以有可能是*rsmG*基因或者其他基因参与突变起作用,这需要进一步验证以探讨其作用机理。

本实验重点是如何获得突变菌株,这是直接影响转化利用无活性菌株的关键。在实验中发现,采用链霉素突变比利福平突变所产生的活性突变菌更多。这可能是由于链霉素对核糖体的刺激效果比利福平更好所致。在链霉素活性突变株中也有不少活性较弱的菌株,这些菌株如果后续采用利福平耐药突变,在积累多药突变后则可能会增大抑菌活性。有文献报道^[12]在接近MIC的链霉素低浓度区,可挑取的抗性突变株总数很多,但从中筛选获取活性突变株的频率并不很高,随着链霉素浓度增高,可挑取突变株总数虽然下降,但从中获得活性突变株的百分率却显著增高。在本实验中这两株活性耐药菌株都是在2倍MIC下获得,同时还获得数株弱活性的突变株,而3倍链霉素MIC以上则很少或无突变菌产生。这说明由于不同菌株对抗生素敏感程度的不同,较敏感的菌株在低倍数MIC条件下也能获得较多活性耐药突变株。实验中新出现的可能产物硫藤黄菌素是一种抗生素,1955年Celmer和Solomon在*Streptomyces luteorectiuli*中首次发现,对革兰氏阳性菌和阴性菌具有选择性抑菌活性,2010年最新报道具有选择性抗肿瘤的活性,能够抑制体内肿瘤细胞诱导的血管生成^[13],说明该产物具有进一步研究与开发的價值,因此我们将在接下来的工作中对FJ3-2菌株发酵产物的活性物质提纯进行精确的结构和功能鉴定。

本研究证实使用核糖体工程能够激活无抗菌活性菌株产生新的抗菌物质。核糖体工程能够使用的抗生素除了链霉菌和利福平外,庆大霉素、巴龙霉素、硫链丝菌素、夫西地酸、卡那霉素、氯霉素、林可霉素等也被广泛应用,随着更多的抗生素的使用和研究工作的深入展开,用核糖体工程技术获得新的活性化合物及提高菌株产能方面将会有更广泛的应用。

参考文献

- [1] Hosaka T , Ohnishi-Kameyama M , Muramatsu H , Murakami K , Tsurumi Y , Kodani S , Yoshida M , Fujie A , Ochi K. Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nature biotechnology* , 2009 , 27 (5) : 462-464.
- [2] Hesketh A , Ochi K. A novel method for improving *Streptomyces coelicolor* A3 (2) for production of actinorhodin by introduction of *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations conferring resistance to streptomycin. *Journal of Antibiotics* , 1997 , 50 (6) : 532-535.
- [3] Ochi k , Okamoto S , Tozawa Y , Inaoka T , Hosaka T , Xu J , Kurosawa K. Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Advances in Applied Microbiology* , 2004 , 56 : 155-184.
- [4] Hu HF , Ochi k. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Applied and Environmental Microbiology* , 2001 , 67 (4) : 1885-1892.
- [5] Ochi k , Hosoya Y. Genetic mapping and characterization of novel mutations which suppress the effect of a *relC* mutation on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) . *Journal of Antibiotics* , 1998 , 51 (6) : 592-595.
- [6] Wang G , Hosaka T , Ochi K. Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Applied and Environmental Microbiology* 2008 , 74 (9) : 2834-2840.
- [7] Hu HF , Zhang Q , Ochi K. Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* Gene encoding the RNA polymerase β subunit of *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology* , 2002 , 184 (14) : 3984-3991.
- [8] 张致平. 微生物药理学. 北京: 化学工业出版社 2003.
- [9] Shima J , Hesketh A , Okamoto S , Kawamoto S , Ochi K. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3 (2) . *Journal of Bacteriology* , 1996 , 178 (24) : 7276-7284.
- [10] Yoshiko O H , Susumu O , Kozo Ochi. Development of antibiotic-overproducing strains by site-directed mutagenesis of the *rpsL* gene in *Streptomyces lividans*. *Applied and Environment Microbiology* , 2003 , 69 (7) , 4256-4259.
- [11] Tanaka Y , Komatsu M , Okamoto S , Tokuyama S , Kaji A , Ikeda H , Ochi K. Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* , 2009 , 75 (14) : 4919-4922.
- [12] 韩晓, 崔承彬, 韩小贤, 李长伟, 杨明. 放线菌野生株代谢功能的核糖体工程改造与新产抗肿瘤活性产物研究. 国际药学研究杂志 (*International Journal of Pharmaceutical Research*) , 2009 , 36 (2) : 435-442.
- [13] Jia YF , Wu SL , Isenberg JS , Dai S , Sipes JM , Field L , Zeng B , Bandle RW , Ridnour LA , Wink DA , Ramchandran R , Karger BL , Roberts DD. Thiolutin inhibits endothelial cell adhesion by perturbing Hsp27 interactions with components of the actin and intermediate filament cytoskeleton. *Cell Stress and Chaperones* , 2010 , 15 (1) : 165-181.

Ribosome engineering of *Streptomyces* sp. FJ3 from Three Gorges reservoir area and metabolic product of the selected mutant strain

Le Hai , Yuqi Huang , Guojian Liao , Changhua Hu*

Southwest University , College of Pharmacy , Chongqing 400716 , China

Abstract: [Objective] To explore new resource from inactive actinomycete strains , we screened resistant mutant strains by ribosome engineering , and analyzed the products derived from the selected mutant strains. [Methods] Three Gorges reservoir area-derived actinomycete strains including BD20、FJ3、WZ20 and FJ5 were used as initial strains , which showed no-antibacterial activities. The streptomycin-resistant (str^{R}) mutants and rifampicin-resistant (rif^{R}) mutants were screened by single colony isolation on streptomycin-containing plates and rifampicin-containing plates according to the method for obtaining drug-resistant mutants in ribosome engineering. The four initial strains and their str^{R} -mutants and rif^{R} -mutants were fermented in a liquid medium with the same composition. Mutants with anti-*Staphylococcus aureus* activity were obtained by paper chromatography. The components of fermentation broth were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and high performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Furthermore , FJ3 strain was identified by 16S rDNA and morphology. [Results] The minimal inhibitory concentration (MIC) of streptomycin and rifampicin for FJ3 was: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Twenty-four str^{R} -mutant strains and 20 rif^{R} -mutant strains of FJ3 mutant strains were selected for bioassay. The result of the antibacterial activity screening demonstrated that six strains inhibited bacteria. Two strains (FJ3-2 and FJ3-6) were screened from the streptomycin-resistance mutants of inactive strain FJ3. The result of bioassay showed that the fermentation broth of FJ3-2 and FJ3-6 exhibited obvious anti-*Staphylococcus aureus* activity. The assay of paper chromatography showed that the active substance may be nucleic acid class antibiotic via using solvent system Doskochilova. Moreover , the results of HPLC and LC-MS exhibited that this substance may be thiolutin. [Conclusion] Ribosome engineering for changing the secondary metabolic function of the inactive wild-type actinomycete strains was a feasible method for the acquirement of active mutant strains , which will be beneficial to exploit the new medical actinomycete strains.

Keywords: Three Gorges reservoir area , actinomycetes , ribosome engineering , streptomycin resistance , Anti-*Staphylococcus aureus* activity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Programs for Science and Technology Development of Chongqing (CSTC2009AB1029 , CSTC2009CB1010)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68250520; E-mail: chhhu@vip.sina.com

Received: 28 December 2010 / Revised: 19 April 2011