

西南科技大学

硕士学位论文

植物根际放线菌MY048的分子鉴定与抑菌活性成分分离

姓名：赵俊凌

申请学位级别：硕士

专业：药用植物

指导教师：侯大斌;阮期平

20070410

摘 要

本文以抗金葡球菌的能力为指标,对药用植物(川乌)的根际放线菌 MY048 菌株进行了菌株分子的鉴定、培养基组成与发酵条件的优化、代谢活性物质的分离纯化等几个方面的研究,结果如下:

运用现代分子生物技术,从 MY048 的基因组里获取 16SrDNA,对其进行序列测定及系统发育分析,最后鉴定 MY048 为链霉菌属放线菌。

为了提高活性物质的产量,进行通过碳氮源与其浓度及无机盐实验,筛选出培养基组成的最佳配比为:可溶性淀粉 2%,葡萄糖 0.5%,酵母浸粉 0.5%、牛肉浸膏 0.3%, CaCO_3 0.2%、 K_2HPO_4 0.02%。

通过培养条件的实验,确定最适初始 pH 为 7.0~7.2,最适温度为 28℃,最适接种量为 10%,最佳种龄 48h,最佳装液量为 15%,最佳摇床转数为 200r/min,最佳发酵时间为 144~168h。按照上述优化后的发酵条件,进行 10L 罐发酵培养。

对经乙酸乙酯萃取获得有抑菌活性的粗提物的理化性质进行研究,在此基础上,运用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析与制备型 HPLC 等分离纯化手段,获得 1 个抑菌高活性化合物,最后通过分析型 HPLC 分析纯度达到 96%。

关键词:放线菌 抑菌活性 菌种鉴定 条件优化 分离纯化

Abstract

Based on the index of antibacterial activities, this thesis studied bioactive metabolite produced by actinomycetes MY048 from the root of *Aconitum*. The major contents of research contained as follows: molecular identification of MY048 strains, optimization of fermentation condition and culture medium, as well as separation and purification of bioactive substances and so on.

By mean of the technique for molecular biology, 16SrDNA sequence was obtained from the genome of MY048. The result of sequencing and phylogenetic analysis showed MY048 was identified as *Streptomyce*.

In order to increase the production, the research for medium composition including carbon source, nitrogen source and their concentrations, as well as orthogonal experiments was implemented .the result showed that the optimal medium composition contained soluble starch2%, glucose 0.5%, yeast extract Powder 0.5%, beef Extract 0.3%;K₂HP0₄ 0.02 %and CaCO₃0.2%.

The result of culture condition displayed that the optimal fermentation conditions was initial pH7.0-7.2, temperature 28℃, inoculation volume 10%, seed age 48h, liquid volume15%, culture time 144h, vibration 200r/min. On the basis of the optimized conditions, MY048 was fermented by 10L fermentor.

On the foundation of the research for physical and chemical nature of the raw substances extracted from the fermentation broth of MY048 by ethyl acetate, the active substance 1 were separated and purified by means of silica gel column chromatography, Sephadex LH20 column chromatography and preparative HPLC. The analytic HPLC indicated that its content is 96%, the analysis of H-NMR, 3C-NMR HMBC, HSQC, and ROESY has been conducting.

Key word: Actinomycete; Antibacterial activity; Strain identification; Fermentation conditions; Separation and Purification

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得西南科技大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

签名：赵俊凌

日期：2007.4.10

关于论文使用和授权的说明

本人完全了解西南科技大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文的复印件，允许该论文被查阅和借阅；学校可以公布该论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。
(保密的学位论文在解密后应遵守此规定)

签名：赵俊凌

导师签名：侯长斌

日期：2007.4.10

1 绪论

1.1 立题背景与目的意义

金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 是临床常见的高致病性细菌。自从 20 世纪 40 年代青霉素问世以来, 该菌引起的感染性疾病曾受到较大控制。随着青霉素的广泛使用, 该菌的某些菌株产生青霉素酶, 该酶能水解 β -内酰胺环, 使青霉素失活, 从而表现为对青霉素耐药。甲氧西林能抗青霉素酶的水解作用, 自 1959 年应用临床后曾经有效控制了 *S. aureus* 产酶株的感染。然而, 1961 年在英国又首先发现了能耐甲氧西林的 *S. aureus* (MRSA)^[1], 至 20 世纪 70 年代后各国相继报道, 80 年代其感染几乎遍及全球, 最高可占 *S. aureus* 感染总数的 58%。MRSA 感染, 乙型肝炎和获得性免疫缺陷综合征一直被列为世界范围内三大最难解决的感染性疾病, 成为各国研究的热点^[2]。近年来, *S. aureus* 对抗生素的耐药情况日渐严重, MRSA 不但对甲氧西林耐药, 而且对所有 β -内酰胺类抗生素及其他抗菌药物耐药 MRSA 还可通过改变抗生素的作用靶位, 产生修饰酶, 降低膜通透性等不同机制, 对氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、利福平产生不同程度的耐药^[3]。

放线菌作为一类重要的微生物, 以产生种类繁多的生物活性物质而广泛受到重视。目前, 放线菌仍是抗生素的主要微生物来源, 临床使用的抗生素有 70% 是由放线菌产生的。现已发现和分离出的由放线菌产生的抗生素多达 4000 多种, 其中, 有 50 多种抗生素已经得到广泛的应用, 如链霉素、红霉素、多氧霉素、金霉素、卡那霉素、氯霉素和庆大霉素等用于临床治疗人的多种疾病。随着病原微生物对抗生素抗性的提高, 寻找具有新型作用机制的抗生素显得十分必要。

本实验室在绵阳及附近地区主要药用植物 (乌头) 的根系特殊环境中筛选抗有抑菌活性的放线菌, 以 *S. aureus* ATCC6538 为指示菌株, 对分离到的 100 多株放线菌进行活性测定, 发现一株来自药用植物的根部土壤的菌株 MY048 具有有较强抑菌活性的。本论文对菌株 MY048 及次生代谢产物进行了系统研究, 拟为深入开发能够用于临床治疗 *S. aureus* 感染的新药寻找新的先导化合物。

1.2 国内外研究进展

1.2.1 抗生素

抗生素是由微生物产生的,具有抑制其它微生物生长或杀灭其他微生物的性能的化学物质。1929 年秋,当英国科学家 Fleming 发现了在含有金黄色葡萄球菌的培养基平板上的青霉菌菌落周围细菌不能生长的现象,通过研究,他发现了一种能够抗细菌物质,这就是青霉素。牛津大学病理学教授弗洛里在 1938-1939 年对已知的由微生物产生的抗生物物质进行了系统的研究,在以钱恩为首的一批优秀化学家的帮助,于 1940 年提取和纯化出可用于肌肉注射的青霉素成品,抗生素的时代随之而到来。

随着微生物学、生物化学、有机化学基础理论的发展以及分子遗传学和新技术的进步,新抗生素的筛选方法已逐步从传统方法过渡到更为理性化的新方法。美国放线菌专家瓦克斯曼与他的研究小组于 1941 年从放线菌培养液中找到了紫放线菌素^[4],并在 1944 年发现了第一个用于临床的由放线菌产生的新抗生素—链霉素。瓦克斯曼的成就引起人们在世界范围内寻找土壤微生物所产生的其它抗生素,于是开始了大规模筛选抗生素的时代。在短短的一二十年间,相继发现了金霉素(1947)、氯霉素(1948)、土霉素(1950)、制霉菌素(1950)、红霉素(1952)、卡那霉素(1958)等。这些抗生素的问世,使当时的细菌性疾病与立克次体病得以成功的治疗,也正是在这一时期,抗生素研究进入了有目的、有计划、系统化的阶段。并建立了大规模的抗菌素制药工业,生产方法亦工业化。进入 60 年代,人们从微生物中寻找新的抗生素的速度明显放慢,取而代之的是半合成抗生素的出现,从此开始了用化学方法对已有的抗生素进行化学结构改造的新时期,开辟了抗生素研制的新道路。目前,发现和分离的天然抗生素有四、五千种,半合成抗生素达三、四千种,用于临床的大约有 350 种。

1.2.1.1 抗生素的分类

(1) 按生物来源分类

放线菌:主要产生酸性、碱性、中性和两性的抗生素,其中以碱性化合物较多。包括氨基糖苷类(如链霉素、新霉素、卡拉霉素等);四环类(如四环素、金霉素、土霉素等);放线菌素类(如放线菌素 D 等);大环内酯类(如红霉素、螺旋霉素、柱晶白霉素等)和多烯大环内酯类(如制霉菌素、抗滴虫霉素等)等;

真菌：产生脂环芳香类或简单的氧杂环类抗生素，多数为酸性化合物。例如，桔霉素、青霉素、头孢菌素等；

细菌：产生一般是具有复杂化学结构的多肽类物质抗生素，多数为碱性，对肾脏有毒性。例如，多粘霉素、杆菌肽、短杆菌素、枯草杆菌素等；

动植物：植物主要产生蒜素、番茄素、鱼素等，动物主要产生抗菌肽。

(2) 按生物合成分类

① 氨基酸肽类衍生物

简单的 AA 类抗生素：如环丝氨酸；

寡肽类抗生素：青霉素头、孢菌素；

多肽类抗生素：多粘菌素、杆菌肽；

多肽大环内酯类：放线菌素；

含嘌呤及嘧啶基因类：曲古霉素、嘌呤霉素；

② 糖类衍生物

糖苷类：链霉素、新霉素、卡那霉素和巴龙霉素等；

与大环类内酯连接的糖苷类抗生素：如红霉素、碳霉素等；

③ 乙酸、丙酸衍生物

乙酸衍生物：如四环类抗生素、灰黄霉素等；

丙酸衍生物：如红霉素等；

多烯和多炔类抗生素：如制霉菌素、曲古霉素等；

(3) 化学结构分类

① β -内酰胺类：主要包括头孢菌素和青霉素两大类；

② 氨基糖苷类：如链霉素、新霉素、卡那霉素、庆大霉素、春日霉素等；

③ 大环内酯类：如红霉素、柱晶白霉素、麦迪加霉素等；

④ 苯烃基胺类：如氯霉素、甲枫氯霉素等；

⑤ 四环类：如金霉素、土霉素、四环素等；

⑥ 多肽类：如多粘菌素、放线菌素、杆菌肽等；

⑦ 多烯类：如制霉菌素、两性霉素 B 等；

⑧ 葱环类：如柔红霉素、阿霉素、正定霉素等；

⑨ 环桥类：如利福霉素、利福平等；

⑩ 其他：如创新霉素、磷霉素等；

(4) 按作用对象分类

- ① 抗 G⁺ 菌的抗生素：主要是青霉素、红霉素、林可霉素；
- ② 抗 G⁻ 菌的抗生素：主要多粘菌素；
- ③ 抗真菌：主要有放射线菌酮、制霉菌素、灰黄霉素、两性霉素；
- ④ 抗结核分枝杆菌：主要有链霉素、新霉素、卡那霉素、巴龙霉素和丝氨酸等；
- ⑤ 抗肿瘤：主要有放线菌素 D、丝裂菌素 C、博来霉素、柔毛霉、阿霉素；
- ⑥ 抗病毒与噬菌体：主要有青霉素、四环类抗生素、艾霉素；
- ⑦ 抗原虫：青霉素、红霉素能抗梅毒螺旋体，四环类抗生素能抗阿米巴原虫，嘌呤霉素、巴龙、抗滴虫素能抑制原虫；

1.2.1.2 抗生素的作用机制

(1) 抑制细胞壁合成

主要有磷霉素、环丝氨酸、杆菌肽、 β -内酰胺类及万古霉素、替考拉宁等。磷霉素抑制有关酶系阻碍 N-乙酰胞壁酸的合成，环丝氨酸通过抑制 D-丙氨酸的消旋酶和合成酶阻碍了 N-乙酰胞壁酸五肽的形成，从而阻碍胞浆内肽聚糖前体的形成；万古霉素的作用机制是抑制 MNAc-五肽与脂载体结合形成直链十肽二糖聚合物；杆菌肽的作用机制是能与类脂载体上的十一聚异戊二烯焦磷酸形成复合物，阻断二糖五肽与胞壁受体结合；青霉素作用靶位是胞浆膜上的青霉素结合蛋白 (PBPs)，表现为抑制转肽酶的转肽作用，从而阻碍了肽聚糖的交叉联接。

(2) 影响细胞膜的通透性

主要包括多肽类抗生素（如多粘菌素 B、E）、多烯类抗生素（如两性霉素 B、制霉菌素）与吡咯类抗生素（如咪康唑、酮康唑、氟康唑）等。多粘菌素分子具两性性，能选择性地与细菌细胞膜中的磷脂结合，从而影响细胞膜结构；两性霉素、制霉菌素等主要与细胞膜上麦角固醇结合，使膜通透性增加导致菌体内的蛋白质、核苷酸、氨基酸、糖和盐类等外漏，从而使细菌死亡；咪康唑、酮康唑、氟康唑等可抑制真菌细胞膜中固醇类生物合成而影响其通透性。

(3) 抑制蛋白质合成

属于此类的抗生素有氨基糖苷类、氯霉素、红霉素、林可霉素类、四环素类及大环内酯类抗生素。氯霉素、林可霉素和大环内酯类抗生素与细菌核糖体 50S 亚基结合，抑制蛋白质合成的延长阶段；四环素类抗生素与核糖体 30S 亚基结合，阻止氨基酰 tRNA 向 30S 亚基的 A 位结合，从而抑制蛋白质合成；氨基糖苷类抗生素与 30S 亚基结合，抑制蛋白质合成的起始及密码子识别。

(4) 抑制核酸代谢

属于此类的药物有利福霉素、新生霉素、灰黄霉素、喹诺酮类、磺胺类和抗肿瘤药物，不同的抗生素通过不同的机制干扰或抑制微生物细胞核酸（DNA 或 RNA）的合成。喹诺酮类药物能抑制 DNA 的合成；利福霉素和利福平直接作用于 RNA 聚合酶而抑制 RNA 的合成；磺胺类抗生素抑制二氢叶酸合成酶而妨碍叶酸代谢，最终影响核酸合成，从而抑制细菌的生长和繁殖。

(5) 抑制生物能作用

如抗霉素 A，是呼吸链电子传递体系的抑制剂，能够抑制电子转移；寡霉素能阻抑细胞能量代谢中的氧化磷酸化过程。

1.2.2 细菌耐药性研究

随着抗生素的广泛运用，在临床上亦引起了一些问题，如细菌耐药性逐年增加致使一些抗生素疗效降低，一些不致病的细菌成为条件致病菌等。

1.2.2.1 耐药性产生的方式

(1) 固有耐药性

在长期抗生素压力下通过诱导突变，对抗生素产生了抵抗力。这种耐药有种属特异性，来源于该细菌固有的自然特性，耐药基因存在于染色体上。非发酵的-杆菌如绿脓杆菌、醋酸不动杆菌、假单胞菌属及大多数-杆菌耐万古霉素和甲氧西林；肠球菌耐头孢菌素；厌氧菌耐氨基糖甙类药物；铜绿假单胞菌耐头孢氨苄、头孢克洛、头孢噻肟、头孢吡辛、四环素；嗜麦芽窄食假单胞菌耐泰能、美平等，这些是耐药性产生的原始遗传基础。这种高度固有耐药性是由于菌体外膜的通透性低与继发的双重耐药机制（诱导产生头孢菌素酶和抗生素导出泵所致）。

(2) 染色体突变

染色体突变是细菌耐药性产生的原始遗传基础，质粒的产生和传播是细菌扩散耐药性、新菌株获得耐药性的一种快捷方式。突变可发生于分子，也可发生于质粒和转座子的基因上。如质粒编码产生的超广谱 β -内酰胺酶可能由于和酶基因点突变导致，若酶基因连续突变可从本质上增强酶的活力，使新一代头孢菌素灭活。某些调节区共同的突变可产生头孢菌素酶，致对第三代头孢菌素耐药。

耐药质粒广泛存在于 G⁻、G⁺菌中，耐药性质粒可通过转导、转化、接合及转座 4 种方式进行传递或转移；转座现象是细菌耐药性播散的重要方式，可使耐药因子增多造成多重耐药性，带有多重耐药基因的质粒，从一种微生物进入另一种微生物，不断传给后代还可转移至无此质粒的细菌，使敏感菌变为耐药菌。耐药菌株在长期进化过程中可能通过染色体断裂或缺失，使带有耐药基因的片段脱离形成耐药性质粒，通过质粒的转移和插入堆积，使耐药性在不同菌株间传播，使同一菌株抗菌谱扩大。

(3) 多重耐药性

细菌耐药性从对单种药物耐药发展至多种耐药，即某种细菌对多种作用机制不同的抗菌药物产生的耐药性。耐药机制是两个或多种不同的机制相互作用决定一种细菌对一种抗菌药物的耐药水平。如多重耐药大肠杆菌菌株是外膜通透性下降与主动外排系统的协同作用所致高度的耐药性。

1.2.2.2 耐药机制

细菌的耐药机制非常复杂，不同的细菌其耐药机制不同，归纳起来有以下几种机制：

(1) 产生灭活酶或钝化酶

产生灭活酶是引起细菌耐药性的最重要机制，产酶菌往往表现明显的耐药性。细菌产生的灭活酶有多种，主要有 β -内酰胺酶、氨基糖甙灭活酶、乙酰转移酶 CAT、核苷酸转移酶、酯酶等通过修饰，它们能通过水解乙酰化、磷酸化等方式破坏抗生素的活性。

① β -内酰胺酶 质粒介导或染色体突变使细菌产生 β -内酰胺酶，可水解破坏 β -内酰胺环，使 β -内酰胺类抗生素灭活。这是大多数致病菌对此类抗生素产生耐药性的主要机制。目前 β -内酰胺酶已有 230 余种，包括 TEM 系列酶、SHV 系列酶、OXA 系列酶、PSE 系列酶、头孢菌素酶等。随着新的 β -

内酰胺类抗生素的临床应用,新的酶类不断产生,近年报道的 ESBL 可能来源于 TEM 和 SHV 酶,由于其固有序列的基因点突变导致的^[5]。

② 金属酶(碳青霉稀酶 IMP-1) 金属酶为 Bush 的 B 类酶^[6]其由染色体介导,能水解亚胺培南、美罗培南以及大多数 β -内酰胺类药物,但对氧哌嗪、青霉素和氨曲南影响较小,不被克拉维酸和他唑巴坦所抑制。

③ 氨基糖甙类灭活酶 双功能的氨基糖甙类灭活酶(6-N 氨基糖甙类乙酰转移酶, 2-o-氨基糖甙类磷酸转移酶)是葡萄球菌和肠球菌高水平耐氨基糖甙类药的重要机制,也是不动杆菌对氨基糖甙类耐药机制^[7]。此酶在分子不同的区域内存在二种不同的氨基糖甙改造因子,是由 Th-4100 转座子内 6--aac-A-20 基因编码合成,该基因可插入 R 质粒及氨基糖甙类抗生素染色体基因中,导致革兰阳性菌中氨基糖甙类抗药性的快速传播。

④ 乙酰基转移酶 某些细菌(如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、肠球菌、肺炎链球菌及流感嗜血杆菌等)对氯霉素耐药性主要是由于质粒编码产生的乙酰基转移酶所致,该酶使氯霉素转化为无活性代谢产物,而失去抗菌活性。

⑤ 拓扑异构酶 该酶又称脱氧核糖核酸旋转酶,由 *gyrA* 和 *gyrB* 编码,基因的突变引起靶酶脱氧核糖核酸旋转酶的改变,使喹诺酮类药物失去抑制此酶的活性,而使细菌获得耐药性。

⑥ 氯霉素乙酰转移酶 某些革兰阴性杆菌、葡萄球菌、D 组链球菌可产生氯霉素乙酰转移酶,使氯霉素失去抗菌活性。

⑦ 红霉素酯酶和其它灭活酶 革兰阴性杆菌、某些链球菌、葡萄球菌可分离出灭活酶,使大环内酯类、林可霉素等抗菌药物灭活。

(2) 靶位结构的改变

靶位结构包括靶标蛋白空间结构变化和靶部位组成的变化,细菌在抗生素作用下产生诱导酶对菌体成分进行化学修饰,使其与抗生素结合的有效部位变异,使药物不敏感而细菌本身的生物功能正常:①青霉素结合蛋白编码的基因突变:青霉素结合蛋白的编码基因突变致构象改变,与 β -内酰胺类药物结合降低而耐药;②拓扑异构酶编码基因突变:编码促旋酶的、基因及编码拓扑异构酶的、基因突变,其表达产物的构象改变即可致细菌对喹诺酮类耐药;③细菌 16SrRNA 基因突变,氨基糖甙类药物对其失去作用,编码 SI2 核糖体蛋白的 *rpsL* 基因及编码 16SrRNA 的 *rrs* 基因的突变,都会使核糖体靶位点改变,使得细菌基因突变,红霉素类药物对其失去作用。

肺炎链球菌对青霉素与其它 β -内酰胺类抗生素的耐药机制的根本原因是青霉素结合蛋白 PBP 的改变。肺炎链球菌有 6 个 PBP 的, 分子量由 43~100Kb。敏感肺炎链球菌的 PBP-1a/1b, PBP-2a/2x/2b 都很容易被 β -内酰胺类抗生素结合而杀菌。肺炎链球菌耐药株则 PBP-1a, 2x, 2a 与 2b 这 4 个分子量较大的 PBP 与青霉素的亲和力明显降低^[8]。

链霉素耐药株的细菌核蛋白体 30S 亚基上链霉素作用靶位 P10 蛋白质发生改变; 利福平的耐药性是细菌 RNA 多聚酶的 β 亚基发生改变, 使其与药物的结合力降低而耐药。由质粒介导的对林可霉素和红霉素的耐药性, 系细菌核蛋白体 23S 亚基的腺嘌呤甲基化, 使药物不能与细菌结合所致变。

(3) 膜的通透性改变

药物长期作用, 导致细菌改变了外膜蛋白, 使菌体外膜通透性下降, 阻碍抗生素进入细胞内膜靶位。外膜通透性降低是由于膜孔蛋白的缺陷、多向性突变、特异性通道的改变及膜脂质双层的改变所致。常见于假单胞菌、醋酸不动杆菌、肠球菌等对 β -内酰胺类、氨基糖甙类、氯霉素、喹诺酮类抗生素的耐药。

基因突变也可导致膜的通透性降低, 可使能量代谢如电子运受到影响而减少氨基糖苷类药物的吸收; 也可药物的转运系统缺损而减少药物的摄取量; 细菌四环素耐药主要由于所带的耐药质粒可诱导产生种新的蛋白, 阻塞了细胞壁水孔, 使药物无法进入有研究表明, 细菌对药物的摄取量与药物的亲水性或疏水性也有关。

(4) 主动泵出

细菌获得编码转运蛋白基因, 表达的编码蛋白能细菌中形成存在主动外排系统可排出已进入细菌内的药物使抗生素在细菌体内的积累减少从而使细菌获得耐药性, 这些基因都由质粒介导。膜主动外排系统一般由 3 部分组成: 外膜通道蛋白、融合蛋白和质膜外排蛋白。近年来研究表明, 在细菌的主动外排系统主要分为四大类: ①主要易化超家族 (MFS), 与哺乳动物的葡萄糖易化转运器具有同源性; ②耐药结节分化家族 (RND), 包括能够泵出镉、钴和镍离子的转运蛋白; ③葡萄球菌多重耐药家族, 由比较小的含有四个跨膜螺旋的转运器组成; ④ATP 组合盒转运器 (ABC), 包括两个跨膜区和两个 ATP 结合亚单位; ⑤药物代谢转运分子 (DMT) 家族和 MOP (MOP) 家族. 真核细胞中, 除上述个主要超家族外, 还存在有机阴离子转运分子 (OAT) 家族和内涵

体多重药物转分子 (MET) 家族^[9]。在这些外排泵超家族中, 仅仅 ABC 超家族以 ATP 解提供能量, 其余都以质子驱动力提供能量。DMT 家族以小多重耐药转运子 (SMR) 为代表, MOP 家族以多种抗菌药排出转运分子 (MATE) 为代表。

AcrAB-TolC 外排泵系统是大肠埃希菌的最主要多重药物外排系统, 由药物质子转运子 AcrB、周质融合蛋白 AcrA 和外膜通道蛋白 TolC 组成。在正常状况下, AcrAB-TolC 表达有助于大肠埃希菌抵抗肠道的胆盐、脂肪酸等疏水性物质的入侵。但是 AcrAB-TolC 高水平表达表现出对多种化合物的耐受^[10]; 外排底物包括四环素、氯霉素、红霉素、 β -内酰胺类、利福平和氟喹诺酮类等。

铜绿假单胞菌主动外排系统主要由 3 部分组成: ① 外膜通道蛋白, 如 OprM、OprJ 和 OprN, 主要形成细胞内有害物质排出细胞外的通道; ② 融合蛋白, 如 MexA、MexC 和 MexE; ③ 内膜蛋白, 具有主动识别有害物质作用, 如 MexB、MexD 和 MexF。在铜绿假单胞菌中至少存在 3 类主动外排系统: MexAB-OprM、MexCD-OprJ 和 MexEF-OprN。在铜绿假单胞菌膜主动外排系统中起最主要作用的是 MexAB-OprM, 它是铜绿假单胞菌固有多重耐药性和获得性多重耐药性的主要原因。MexAB-OprM 主动外排系统所需能量由 H^+ 药物反转运体逆转 H^+ , 形成 H^+ 浓度差而产生的动力所提供^[11]。

(5) 形成生物被膜

细菌生物被膜 (BBF) 是指细菌粘附于固体或有机腔道表面, 形成微菌落, 并分泌细胞外多糖蛋白复合物将自身包裹其中而形成的膜状物。细菌间的多糖蛋白复合物形成孔道维持细菌物质代谢。细菌形成生物被膜后, 往往对抗菌药物产生耐药性, 其原因有: ① 细菌生物被膜可减少抗菌药物渗透; ② 吸附抗菌药物钝化酶, 促进抗菌药物水解; ③ 细菌生物被膜下细菌代谢低下, 对抗菌药物不敏感; ④ 生物被膜的存在阻止了机体对细菌的免疫力, 产生免疫逃逸现象, 减弱机体免疫力与抗菌药物的协同杀菌作用。

生物被膜的阻止渗透作用也不相同: 铜绿假单胞菌形成的生物被膜对环丙沙星、哌拉西林和过氧化氢的渗透有屏障作用; 而氨苄西林和环丙沙星可透过肺炎克雷伯菌形成的生物被膜, 利福平可透过表葡菌形成的生物被膜, 但却不能杀死膜内细菌, 提示包埋于被膜中的细菌除了依靠生物被膜的屏障作用以外, 一定存在着其它机制保护膜内细菌的生存。

(6) 保护抗生素作用靶位:

① 核糖体保护蛋白：核糖体保护蛋白 (RPPS) 由基因编码，该蛋白能阻遏四环素与细菌核糖体结合使药物失去作用。淋病奈瑟菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、肺炎链球菌、李斯特菌、加德纳菌均可获含基因质粒而耐四环素。

② 红霉素甲基化酶：当细菌获得 *erm* 基因表达红霉素甲基化酶，使细菌核糖体 23S rRNA 基因甲基化，大环内酯类对细菌失效而耐药。在肺炎链球菌中发现有 *ermA*、*ermB* 基因，得到 *erm* 基因的细菌可同时表现为对大环内酯类-林可霉素-链阳菌素 B 耐药，简称 MSLB 耐药。

③ 获得功能取代蛋白 (酶)：金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌可获 *MECA* 基因，表达 PBP2 蛋白，使 β -内酰胺类药物虽与 PBP2 结合，但 PBP2 仍占具转肽酶活性，仍然可合成细胞壁；连接酶：万古霉素等糖肽类可与细菌细胞壁成分-丙胺酰- γ -丙氨酸结合抑制细菌细胞壁肽聚糖的合成。耐万古霉素菌株获得 *VANA*、*VANB*、*VANC*、*VAND* 与 *VANE* 基因可表达一组功能相似的连接酶，即 3D-丙胺酰-D-乳酸取代正常的细胞壁肽聚糖成分-丙胺酰-D-丙氨酸，-丙胺酰-D-丝氨酸取代正常胞壁成分。

1.2.3 耐药型金葡球菌的耐药机制

1.2.3.1 PBP2a 与相关基因

青霉素结合蛋白 (PBPs) 由金黄色葡萄球菌自身合成。普通的金黄色葡萄球菌合成 5 种与 β -内酰胺类抗生素亲和力较高的 PBPs，包括 PBP1、PBP2、PBP3、PBP3c 和 PBP4。PBPs 参与合成细菌细胞壁的转肽酶、羧肽酶和内肽酶，催化糖肽交叉联接反应，对细菌的生长繁殖起着极其重要的作用。

MRSA 染色体中含有 *mecA* 基因^[12]，能合成一种相对分子质量为 78×10^3 的、与 β -内酰胺类抗生素亲和力较低的青霉素结合蛋白 PBP2a (PBP2c)。PBP2a 蛋白属高分子量 PBP，具有与高亲和力 PBPs 相同的青霉素结合基序，结合能力却很低，能在 MRSA 中高亲和性 PBPs 结合 β -内酰胺类抗生素失活后，代替 PBPs，维持细菌的生长和存活，从而使 MRSA 表现出耐药性。

mecA 基因的基本调节基因为 *mecI* 和 *mecR1* 基因。*mecI* 基因编码 *mecI* 蛋白，后者为抑制因子、DNA 结合蛋白，抑制下游结构基因的表达，当其结合到 *mecA* 基因的启动子上时，抑制 *mecA* 基因的转录，从而不能产生 PBP2a。*mecR1* 基因编码的 *mecR1* 蛋白为诱导因子，当其接触到诱导剂 B2 内酰胺类抗生素时被活化，活化的 *mecR1* 蛋白能够去除 *mecI* 蛋白对 *mecA* 基因的阻遏作用，使 *mecA* 编码产生 PBP2a 蛋白^[13]。*mec* 序列中含有一个或数个拷贝的插入

序列 IS431/IS257, 在其他耐药基因的同源重组和转座子整合中起到接受连接位点的作用, 这些其他抗生素及金属离子抗性、耐药基因可以通过转座子作用及质粒传播整合到插入序列外侧, 进而表达出来, 使 MRSA 表现出多重耐药性, 并且使源于质粒的耐药基因可以稳定地遗传。

1.2.3.2 其它基因:

fem 因子, 是金黄色葡萄球菌染色体中的固有基因, 包括 femA、femB、femC、femD、femE 和 femF^[14]。femA 和 femB 为两个相连的开放阅读框对细菌细胞壁的五甘氨酸侧链以及肽间桥的生物合成是必需的。当其失活时, 金黄色葡萄球菌细胞壁糖肽中的五甘氨酸肽间桥变成单甘氨酸, 并且影响细菌的多种代谢机制, 导致 MRSA 对 β 内酰胺酶类抗生素以及多种其他类抗生素的耐药性降低。femC 引起谷氨酰胺合成酶基因 glnA 转录和活化及异谷氨酰胺的酰胺化。其失活时, 谷氨酰胺合成受阻, 异谷氨酰胺的酰胺化作用降低, 导致糖肽的交叉连接降低 MRSA 对 β -内酰胺酶类抗生素耐药性降低。

hmrC、hmrD 和 chr 基因是染色体突变基因, 引起 MRSA 对甲氧西林的高度耐药, 其机制尚未阐明^[15]。控制胞壁及胞外蛋白质表达的球状调节子 agr 和 sar, 任一个发生失活均可导致小球状的高水平耐药 MRSA 亚群出现, 并使细菌胞壁中 PBP1 和 PBP3 数量减少。

1.2.4 放线菌

放线菌是因菌丝呈放射状而得名, 自从 1877 年 Cohn 从牛的颈肿病中发现放线菌以后, 直到本世纪 40 年代初期, 放线菌还是未被人们所熟知的一类微不足道的微生物, 当时仅报道了含义不很明确的四五个属, 比较知名的是对人和动物有致病性的放线菌属 (Actinomycetes)、诺卡氏菌属 (Nocardia) 和被认为是细菌的分枝杆菌 (Mycobacterium)。随着认识的深入, 到 60 年代放线菌被确认是原核生物, 与细菌的关系极为密切, 甚至可以包括在广义的细菌中。目前, 在《伯杰氏系统细菌学手册》第四卷中, 放线菌属于原核生物界, 厚壁菌门、放线菌纲、放线菌目 (Actinomycetales)^[16]。

放线菌在自然界的分布极为广泛, 存在于各种不同的自然生态环境里, 其种类繁多, 代谢功能各异, 是一类有着广泛实际用途的生物资源。现在已发现的数万种微生物来源的生物活性物质和临床使用的大约 100 种抗生素中, 约有 70% 是由放线菌所合成的次生代谢产物。放线菌产生的活性物质主要有抗菌物质与抗肿瘤物质, 还包括抗病毒物质、抗虫物质、免疫抑制剂、

酶抑制剂、受体拮抗剂、抗氧化剂、多糖、色素以及胞外水解酶，如淀粉酶、几丁质酶、纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶和蛋白酶等^[17]。

近 20 年来，从普通环境中的放线菌分离得到的先导化合物的数量锐减。据估计，目前分离到的放线菌种类，仅为实际存在种类的 0.1%~1.0%，因此，放线菌还存在着大量的未知种群等待发现。在这种理论的指导下，各国的科研人员采用新的分离技术从一些特殊环境中等发现能产生新化合物的放线菌。

1.2.4.1 抗真菌活性物质

Kurosawa K 报道^[18]从放线菌 (*Str. spectabilis*) 发酵液中分离的硝苯吡喃酮 (nitrophenyl pyrone) SNF 4435C、D (图 1-1)，它们都具有免疫抑制活性和抗白色念珠菌的作用；来自链霉菌 *Str. sp SNA 15896*^[19] 的大环结构的 Neoantimycin 类似物 SW-163 A 和 B，也具有免疫抑制作用和抗丝状和酵母样真菌的作用；Gerber^[20]等从海洋线菌 (12396) 中分离得到桔色色素 (图 1-2)，它有抑制真菌活性；Capon 等从维多利亚 Lorne 海岸采集到的海洋放线菌 MST-MA190^[21]培养液中分离得到芳香氨基酸类化合物 Lorneamides A and B，活性研究结果显示 Lorneamides B (图 1-3) 对枯草杆菌的 LDP 为 50ug/mL，具有中等抗菌活性；Kitamura^[22]研究组在海洋链霉菌 AP77 的培养液中分离得到一种抗真菌的 160 kD 的蛋白质 SAP，显示强烈的抗真菌活性。

此外，我国焦炳华^[23]课题组从中国东海一株嗜盐的海洋放线菌 XD20 菌株中分离到 2 个体生物碱类化合物 CPA 和 CPB，具有抗真菌和细胞毒活性；崔洪霞^[24]等从胶州湾海洋链霉菌 M095 的代谢产物中获得一种对丝状真菌毛霉 *miehei* (T284) 有显著抑制作用的化合物。

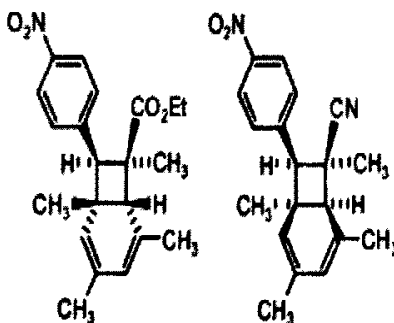


图 1-1
SNF 4435C、D

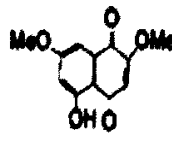


图 1-2
桔色色素

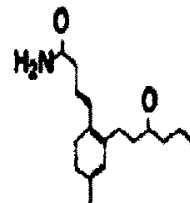
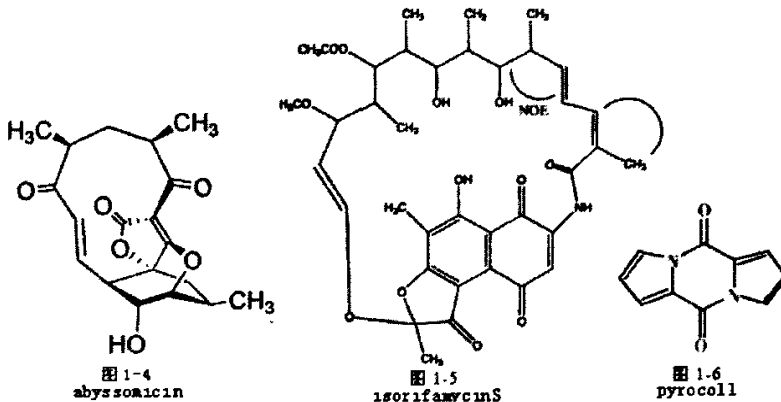


图 1-3
Lorneamides B

1.2.4.2 抗细菌活性物质

Asolkar RN^[25]通过抗菌活性跟踪筛选,从海洋链霉菌B7046得到一大环内酯类新化合物Calcomycin B,它对金黄色葡萄球菌的MIC₉₀达到0.39ug/mL,对枯草杆菌的MIC为6.25ug/mL,显示高效的抗菌活性;Riedlinger J等从一株海洋放线菌Verrucosispora中分离到有抗G⁻及金黄色葡萄球菌的物质abyssomicin C^[26](图1-4);廖文彬等从海洋放线菌HSL-6^[27]中分离能产生对金黄色葡萄球菌有强烈抑制作用的活性物质;P.Sujatha等^[28]从放线菌BT-408中分离到多肽类抗生素SBR-22,它抗菌谱广泛,特别对MRSA有很强的抑制作用;黄惠琴等^[29]从海南三亚海域的海绵中分离到一株抗MRSA的海洋放线菌A115,其对81株MRSA中的64株有明显的抑制效果,从小单孢菌属AM105^[30]发酵液中分离得到一种新结构的化合物isorifamycin S(图1-5),MIC结果反映isorifamycin S抑菌活性明显优于目前临床药物rifamycin SV;

张海涛等^[31]在大连海域潮间带繁茂膜海绵上分离到一株链霉菌B37,它的代谢产物能够专一的抑制革兰氏阳性细菌(金葡菌)。此外,Cho等从一株海洋放线菌中分离得到具有抗菌活性的五元环内酯化合物^[32];Mincer^[33]等从一种新放线菌属海洋单孢菌中分离鉴定出一系列结构新颖的化合物,命名为Salinosporamides,这些化合物具有很强抗菌活性;dieter等^[34]从嗜碱放线菌2409的发酵液中分离得到了pyrocoll(图1-6),该化合物具有抗菌活性,对不同的Arthrobacter菌株均有较好的抑制作用(为1μg/mL),且对丝状真菌也有一定的抑制作用。



1.2.4.3 抗肿瘤活性物质

盐屋链霉菌 *Streptomyces sioyaensis* SA-1758^[35]是从海底淤泥中分离到的,该菌株可产生一种结构新颖的生物碱 Altemicindin(图1-7),此化合

物在体外对肿瘤细胞株 L1210 及 IMC 肉瘤细胞的 IC_{50} 分别为 0.84 g/mL 和 0.82 g/mL, 且还有微弱的抗菌活性, 但是体内毒性较高, LD_{50} 为 0.3 mg/kg; Tapiocas 等人在采集于加利福尼亚海沟的一种珊瑚表面分离到的链霉菌的培养物中发现了结构新颖的 Octalacions A 和 B^[35], 这两种化合物分别是寡霉素 A 的 20-羟基衍生物和肠菌素的 5-脱氧衍生物, 是含有少见的八元环的内酯官能团的 19 碳酮基化合物, Octalacions A 在体外有抗 B16-F17 鼠黑素瘤和 HCT-116 人胃癌细胞活性, 其 IC_{50} 值 分别为 0.0072 g/mL, 0.5 g/mL; 曾伟等从海洋放线菌 N350^[37] 的脂溶性发酵产物中纯化并鉴定了 4 个化合物, 分别为反式-13-二十二碳单烯酰胺, 7, 4-二羟基异黄酮、6-甲氧基-7, 4-二羟基异黄酮及 β -胡萝卜素, 其中, 前三中物质具有抗肿瘤活性, 抑制人口腔上皮癌 KB 细胞生长的 ID_{50} 分别为 15, 811, 512 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, 抑制人白血病细胞 HL-60 生长的 ID_{50} 分别为 7, 218, 119 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. 这些化合物均首次在海洋放线菌中得到分离;

Streptomyces aureoverticillatus NPS001583^[39] 是来自于海底沉积物的链霉菌, 它能代谢产生一种 22 个原子的大环内酰胺 Aureoverticillactam, Aureoverticillactam 对多种肿瘤细胞有细胞毒性; 王健等从黄直丝链霉菌 Z4-007^[39] 发酵物中分离得到 1 个活性化合物 1-(2, 4-二羟基-3, 5-二甲基)-(2E, 4E)-己二烯-1-酮, 该化合物是一种新的细胞周期抑制剂, 该化合物在高浓度时将小鼠乳腺癌 tsFT210 细胞分裂周期抑制在 G_0/G_1 期, 而在低浓度时则抑制在 G_2/M 期并显示出一定的细胞凋亡诱导活性; *Streptomyces nodosus* NPS007994 是从加利福尼亚的海底沉积物中分离到的一株放线菌, 它产生的 Lajollamycin^[40] 对肿瘤细胞 B16-F10 有抑制作用, 他还对药敏型及耐药型革兰氏阳性菌有抑制作用; Thioviridamide^[41] 是橄榄绿链霉菌产生的一类细胞凋亡诱导剂, 它有专一的毒性, 对肿瘤细胞对 Ad12-3Y1, E1A-3Y1 的 IC_{50} 分别为 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Jeong SY^[42] 等从海洋链霉菌 KORDI-32 的发酵液中分离到的一种新的嘧啶类化合物 Streptokordin 与四种已知化合物 nonactin, dilactone, trilactone, nonactin, 其中 Streptokordin 对七种人类肿瘤细胞有明显的细胞毒性, 但对细菌的生长无抑制作用。

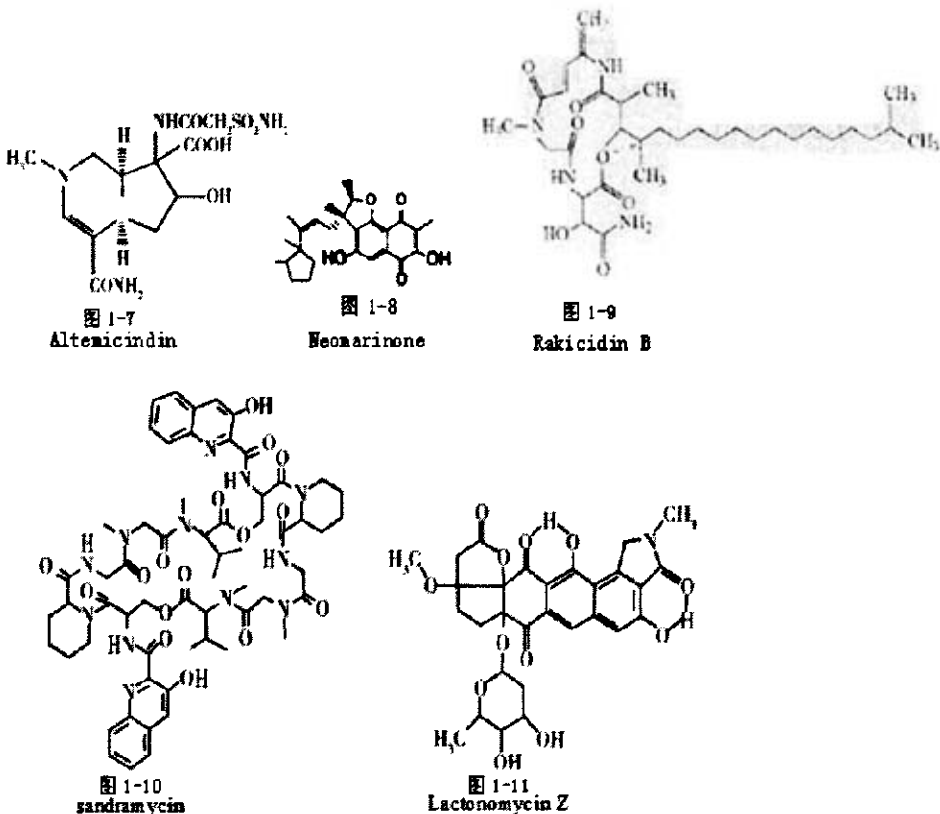
Thiocoraline 是一种具有显著抗肿瘤活性的缩酚肽, 它来自于印度洋的一株小单孢菌^[43], 其对肿瘤细胞 P388, A-549, HT-29 及 MEL-28 的 IC_{50} 分别为 0.002, 0.002, 0.01 及 0.002 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 可显著抑制 DNA 和 RNA 的合成, 进一步的抗肿瘤机制研究表明, 它具有细胞周期阻滞作用, 但不抑制拓扑异构酶 II 及 DNA 断裂, 最主要的抗肿瘤机制可能在于抑制 DNA 聚合酶, 目前已经进入临

床前试验; Antibiotic IB-96212^[44]对肿瘤P388有很强的细胞毒性作用 (IC_{50} 0.001mg/mL), 对肿瘤A-549HT-29和MEL-28的 IC_{50} 为1 mg/mL; Ingo H Hard^[45]等从海洋放线菌CNH-099分离到的含倍半萜的新萘醌类抗生素Neomarinone (图1-8), 体外对HCT-116有中等细胞毒性 (IC_{50} =0.8mg/L), 它对60种癌细胞的平均 IC_{50} 为10ug/mL; 日本Furumai等发现来自小单胞菌TP-A0468^[46]发酵液的醌环类抗生素Kosinostatin, 对白血病U937细胞的毒性 IC_{50} 为0.091 μ g/mL, 与阿克拉霉素A相当, 同时, 还对21种人类癌细胞具有抑制作用 IC_{50} 小于0.1 μ M, 而它和阿克拉霉素A对人的DNA拓扑异构酶的 IC_{50} 分别为1~30 μ M和3~10 μ M; Wang等^[47]从海洋小单胞菌IM2670的甲醇提取物分离得到2个吡啶生物碱: Streptonigrin及其衍生物, 它们都有很强的通过激活p53蛋白诱导肿瘤细胞细胞凋亡的活性。

Lomaiviticins A^[48]为DNA损伤剂, 具有较强抗肿瘤活性, 对一系列肿瘤细胞群有细胞毒活性, 其 IC_{50} 值在0.01~98ng/mL范围内, 它的作用方式与多柔比星、丝裂霉素不同, 已进入I期临床试验; Lyngbouilloside^[49]来自于海洋放线菌Cyano bacterium Lyngbya Bouillonii的发酵液, 对成神经细胞瘤细胞有较弱的细胞毒性, IC_{50} 值为17 μ g/mL; 江红^[50]等从福建海滩土分离到青铜小单胞菌FIM 02-523, 产生脂肽类抗肿瘤抗生素Rakicidin B, 曾报道来自陆地土壤的小单胞菌Micromonospora sp. No. 8385-2也产生此类抗生素。Rakicidin A, B, 从海洋小单胞菌FIM02-523发酵液中共分离出5个化合物 (FW523-1, 2, 3, 4, 5)。FW523-1, 2的分子量与Rakicidin A一致, 两者可能是同分异构体, FW523-3与Rakicidin B (图1-9) 同质, 能够抑制肿瘤细胞L929的生长, 而且与临床上常用的免疫抑制剂环孢素有相当免疫抑制活性, FW523-4, 5的分子量分别为634和592, 前者比Rakicidin B结构上多一个-CH₂, 后者比Rakicidin A少一个-CH₂, 两者可能为新组分。

曲新颜^[51]等利用细胞周期抑制为抗肿瘤活性指标, 从其海洋来源的放线菌3295代谢产物中分离得到1个具有抗肿瘤活性的化合物I, 结构鉴定为邻苯二甲酸二丁酯。化合物T对小鼠乳腺癌温敏型tsFT210细胞具有G₀/G₁期细胞周期抑制作用; 李德海^[52]等进行海洋微生物抗肿瘤活性筛选过程中, 从11014的发酵产物分离得到25个化合物, 包括一个五元环内酯类化合物, 8个酚类衍生物和13个环二肽, 采用SRB法测定了13个环二肽的体外抗肿瘤活性, 其中环二肽10在5ug/mL时有较强的体外抗肿瘤活性, 1、3、4、8、9、12具有弱的体外抗肿瘤活性, 同时发现这些环二肽的体外抗肿瘤作用在5~100ug/mL范围内不具有浓度依赖性, 其他化合物未表现出体外抗肿瘤活性;

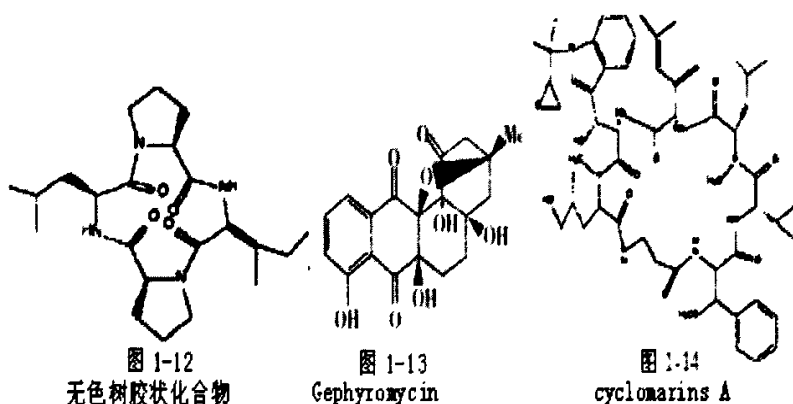
胡继兰等^[53]从南极乔治王岛土壤中分离到 1 株放线菌 3905, 其生长适宜温度为 15℃-20℃, 该菌株经发酵后能产生抗肿瘤抗生素缩酚酸肽 sandramycin (图 1-10)。Holtzel^[54]等从 1 株嗜碱链霉菌 623 的发酵中能产生抗菌及抗肿瘤物质 LactonomecinZ (图 1-11), 该物质具有微弱的抗革兰阳性菌活性, 并对人类胃癌细胞有显著抑制作用 (IC₅₀ 为 0.19 μg/mL), 对乳腺癌及肝癌细胞的抑制活性较差等。



1.2.4.4 其他

JShin 等^[55]从海洋放线菌 (MKN349A) 中得到具有对白血病 K-562 细胞有很好活性的组分, 又经进一步地分离纯化得到无色树胶状化合物 (图 1-12)。Bringmann 等^[56]从南极土壤中分离到 1 株嗜冷放线菌 NTK 14, 并从其发酵液中得到了有特殊氧桥结构的新化合物 Gephyromycin (图 1-13), 能使神经细胞中 Ca²⁺ 浓度迅速增加, 使蛋白质及酶的作用受到影响, 可用做谷氨酸收缩剂。Renner^[57]等从放线菌 *Streptomyces* sp (CNB2982) 中分离得到 cyclomarins

A (图 1-14), 它是活性最强的抗炎剂, 体内水肿活性实验中, 当给药浓度为 $30 \mu\text{g/mL}$ 时, 水肿抑制率为 45%。



综上所述, 生活在特殊环境下的放线菌作为一类的重要微生物资源已越来越受到人们重视。由于环境的影响, 这些放线菌可能已经进化出了新的基因, 新的基因能够产生独特合成途径与代谢途径, 这不仅确保其在这些环境中生存, 也能够产生并积累具有大量特殊结构与特殊功能的性物质。对它们及其它们次生代谢产物的系统研究, 不仅为人们认识与发现新的放线菌提供了必要的依据, 同时也为开发新的抗菌药物、抗病毒药物、抗肿瘤药物、生物毒素、酶类、免疫抑制剂以及酶类抑制剂等提供了丰富的资源。

1.3 研究的主要内容

1.3.1 放线菌 MY048 的种属鉴定

运用分子手段, 获得出放线菌 MY048 的 16S rDNA 基因, 进行序列测定, 通过序列分析与鉴定, 确立 MY048 的种属。

1.3.2 放线菌 MY048 的发酵条件优化

对 MY048 的培养基组成 (碳源及浓度、氮源及浓度) 与发酵条件 (温度、时间、初始 pH、接种量、装液量、种龄、转数) 的进行系统研究, 提高发酵产物的生物量。

1.3.3 活性物质的分离与纯化

以 *S. aureus* ATCC6538 标准菌株为药物筛选模型中的关键指示菌，采用活性追踪法，综合运用薄层层析、硅胶柱层析、凝胶柱层析以及高效液相色谱等手段对放线菌 MY048 的发酵产物进行分离纯化，从粗提取物中分离、纯化出能够抑制 *S. aureus* ATCC6538 菌株的活性化合物。

1.3.4 活性物质的理化性质鉴定

通过热稳定性、酸碱稳定性、紫外荧光检测、溶解性反应和紫外吸收光谱分析等了解其理化性质。

2 材料与amp;方法

2.1 材料

放线菌 MY048, 由绵阳师范学院分子生物学与生物制药重点实验室从绵阳地区药用植物(川乌)的根部筛选获得到; 供试菌: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、腊样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 等均为该实验室保存。

2.2 仪器与试剂

2.2.1 主要仪器

仪器	型号	产地
梯度 PCR	Themo-HybaiddPx2	美国
旋涡混合器	Voreex-Genie2	美国
冰箱	BCD-216E/BN	海尔集团公司
紫外可见分光光度计	752	上海菁华
紫外透射反射分析仪	ZF-H	上海康华
恒温制冷和加热水浴	ChillMaster	德国
全自动发酵罐	10LB. BRU	德国
高压液相色谱仪	Agilent 1100	美国
紫外全波长扫描仪	MLtrospec 3300	Amersham
微波炉	970721T9-6	格兰式微波炉电器
电子分析天平	BP211D	德国
酸度计	PP-15E	德国 sartorius
电热恒温真空干燥箱	DEF-1	上海康华仪器
超声波洗涤器	KH-600DB	江苏昆山超声仪器
移液器	Eppendorf	德国
恒温培养摇床	HE-9211K	上海康华
恒温培养培养箱	PYS-DHS 400-BS-2	上海康华生

冷冻离心机	5415DIR	德国
恒温水浴锅	HH-6	上海康华
超净工作台	SB-JC-1A	上海康华
全自动高压灭菌锅	SANYO LA60 Autoclave	日本
凝胶成像分析系统	UNIVERSAL HOOD II	美国 BIO-RAD
超纯水系统	Milli-QBiocel	美国
制冷机	Sim-F124	日本

2.2.2 主要试剂与溶液

试剂名称	来源
HSGF254 高效薄层板	青岛海浪硅胶干燥剂厂
薄层层析硅胶 GF254	青岛海浪硅胶干燥剂厂
柱层析硅胶 (H)	青岛海浪硅胶干燥剂厂
葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20	
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	TAKARA
<i>LA</i> DNA 聚合酶	TAKARA
T4 DNA 连接酶	TAKARA
DL15000, DL2000	TAKARA
dNTP	TAKARA
argrose	BBI
agar power	ARMESCO (天泰分装)
四水氯化锰	BBI
PIPES	AMRESCO (上海生工分装)
甘油	AMRESCO (天泰分装)
甘氨酸	AMRESCO (天泰分装)
溴化乙锭	AMRESCO
酵母提取物	OXOID
蛋白胨	OXOID
无水氯化钙	天津市天达净化材料精细化工厂
乙酸钾	成都科龙化工
乙二醇四乙酸二钠	AMRESCO 天泰分装

饱和酚	上海生工
DMSO	上海生工
Tris-base	AMRESCO (天泰分装)
氨苄青霉素	上海生工
卡那霉素	上海生工
四环素	上海生工
Buffer I	50mM 葡萄糖; 25mM Tris (pH8.0); 10mM EDTA (pH8.0);
Buffer II	0.2M NaOH; 1%SDS;
Buffer III	5M 乙酸钾 60mL; 冰乙酸 11.5 mL; 水 28.5 mL
TB Buffer	3.0g PIPES (10mM); 2.2g CaCl ₂ ·2H ₂ O (5mM); 18.6g KCl 定容 100 mL
溶菌酶溶液	10mg/mL
蛋白酶 K 溶液	20mg/mL
KAC 溶液	5mol/L, pH4.8
NaAC 溶液	3mol/L, pH5.2
酚/氯仿/异戊醇	25/24/1
氯仿/异戊醇	24/ 1
70%乙醇	70mL 无水乙醇, 加 ddH ₂ O 至 100mL
10%SDS 溶液	10g SDS 定容至 100mL
0.1%SDS 溶液	0.1g SDS 固体定容 100mL
0.5 mol/L EDTA (pH8.0)	在 800mL 水中加入 186.1g 二水乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na·2H ₂ O), 在磁力搅拌器上剧烈搅拌, 用 NaOH 调节溶液的 pH 值至 8.0 (约需 NaOH 颗粒 20g) 然后定容至 1L 分装后高压灭菌, 备用

2.3 培养基

2.3.1 发酵培养基

高氏一号培养基：可溶性淀粉 20g、氯化钠 0.5g、磷酸氢二钾 0.5g、硝酸钾 1g、琼脂 20g、硫酸亚铁 0.01g、硫酸镁 0.5g、蒸馏水 1000mL pH 7.2^[59]。

种子培养基：葡萄糖 10g、硫酸镁 0.5g、可溶性淀粉 20g、酵母浸粉 10g、牛肉浸膏 3g、蒸馏水 1000mL pH 7.2。

发酵培养基：葡萄糖 5g、可溶性淀粉 20g、酵母浸粉 5g、牛肉浸膏 3g、碳酸钙 2g、磷酸氢二钾 0.2g、蒸馏水 1000mL pH 7.2。

2.3.2 分子鉴定培养基

LB 培养基：10g 胰化蛋白胨、5g 酵母提取物、10g 氯化钠、蒸馏水 1000mL pH7.2。

SOC 培养基：20g 胰化蛋白胨；5g 酵母提取物；0.5gNaCl、1mol/LMgCl₂1mL、1mol/L KCl 2.5mL、1mol/L 葡萄糖 2mL pH 7.0。

SOB 培养基：20g 胰化蛋白胨；5g 酵母提取物；0.5gNaCl、1mol/L MgCl₂ 1mL、1mol/L KCl 2.5mL、pH 7.0。

2.3.3 活性检测培养基

牛肉膏蛋白胨培养基：蛋白胨 10g，牛肉浸膏 3g，NaCl 5g，琼脂粉 20g，蒸馏水 1000mL，pH7.4~7.6^[58]。

2.4 分子鉴定

2.4.1 总DNA的提取

参考文献^{[59][60]}等的实验方法进行改进。

- (1) 取处于平台初期的 MY048 菌液 1.0mL 放入 1.5mL EP 管中，12,000/min，4℃离心 9 min 弃上清，再次离心 2min，彻底去上清；
- (2) 加入 1.0mL TE 缓冲液，振荡混匀，-20℃过夜，12,000r/min，4℃离心 9 min 弃上清，瞬时离心；
- (3) 加入 500 μL 细胞裂解缓冲液，加入 10 μL 溶菌酶，置于 65℃水浴中 120min；
- (4) 冷却至室温，加入 10 μL 蛋白酶 K，置于 37℃水浴中 60min，冷却；
- (5) 加入等体积酚：氯仿：异戊醇（25：24：1），振荡，充分混匀；
- (6) 12,000r/min，4℃离心 9min，取上清液于 1.5mL 离心管；
- (7) 加入 1/10 体积 NaAc-HAc 缓冲液；

- (8) 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇，轻轻混匀，静置直到 DNA 析出；
- (9) 12,000r/min 离心 2min，去上清液；
- (10) 加入 70%乙醇漂洗，适当风干，溶于 20-30 μ L TE 溶液中待用。

2.4.2 PCR 扩增

(1) 30 μ L 反应体系

15 μ L 2 \times GC Buffer, 1.6 μ L MgCl₂, 2.4 μ L dNTP, 1.05 μ L 5' -P, 1.05 μ L 3' -P, 0.15 μ L La Taq , 3.0 μ L Template, 5.75 μ L ddH₂O;

(2) 循环体系

95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 65 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min 进行 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min^[61-65];

(3) 电泳检测: 1.0%琼脂糖胶 10 μ L 点样。

2.4.3 胶回收

采OMEGA-柱式DNA胶回收试剂盒，操作步骤如下：

(1) 在紫外光下，用干净手术刀切下含有目的DNA片段的琼脂块，放入 1.5mL收集管中；

(2) 按每100 μ L/100mg琼脂糖凝胶的比例加入Binding Buffer，置于 65 $^{\circ}$ C水浴中7min，加热融胶时，每2min混匀一次，使胶彻底融化；

(3) 将融化的胶溶液转移到收集管内的HiBi-DNA spin-column中，室温放置2min后10000r/min离心1min；

(4) 取下HiBi-DNA spin-column柱，倒掉收集管中的废液，将HiBi-DNA spin-column放入同一个收集管中，加入700 μ L SPW buffer，10000r/min室温离心1min；

(5) 重复上步骤；

(6) 取下HiBi-DNA spin-column柱，倒掉收集管中的废液，将HiBi-DNA spin-column放入1.5mLEP中，12000r/min室温离心15s；

(7) 将HiBi-DNA spin-column柱转移至新的1.5mLEP管中，加入30 μ L DNA Elution Buffer或ddH₂O (pH>7.0)，室温放置2min；

(8) 12000r/min室温离心1min，离心管中的液体即为回收的DNA片段可立即使用或保存于一20 $^{\circ}$ C备用；

(9) 取4 μ L DNA、1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2.4.4 连接 (将PCR产物与T载体连接)

(1) 30 μ L 反应体系

目的基因	1.5 μ L
pMD18-T vector	1.0 μ L
T4DNA ligase	2.0 μ L
10 \times T ₄ DNAligase buffer	3.0 μ L
dd H ₂ O	14 μ L (1.5mL EP 反应);

(2) 枪头混匀, 瞬时离心;

(3) 16 $^{\circ}$ C, 24 小时;

2.4.5 感受态细胞的制备

(1) 取出在-80 $^{\circ}$ C存储的 *E. coli* 菌株, 在 LB 平板上划线 37 $^{\circ}$ C 培养, 过夜;

(2) 挑取单菌落到 5mL SOB culture medium, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 6-8 小时;

(3) 取 2mL 加入 100mL SOB(加 MgCl₂)培养基内 18 $^{\circ}$ C, 摇床培养 OD=0.5;

(4) 取出放到冰水中 10min, 3000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 彻底除上清;

(5) 沉淀中加入初菌液总体积的 1/3 的 TB 溶液, 冰浴约 10min;

(6) 3000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 15min, 去上清;

(7) 沉淀溶于 TB 中 (4mL);

(8) 冰水浴 10min;

(9) 加 7% 终体积 DMSO(0.3mL)边加边摇(用剪过的枪头将沉淀吹散);

(10) 冰水浴 10min;

(11) 0.5mL/管, 分装于预冷过的 Eppendorf 管 (1.5mL);

(12) 液氮速冻, -80 $^{\circ}$ C 储存。

2.4.6 转化

(1) 将连接 sample 10 μ L 放入 1.5mL EP 管中, 65 $^{\circ}$ C, 水浴 10min, 冰水浴 2min, 离心 2min;

(2) 取出 *E. coli* DH5 α competent cell;

(3) 在超净工作台将 150 μ L competent cell 加入 1.5 mL EP 管, 混匀;

(4) 冰水浴 20 min;

(5) 42 $^{\circ}$ C 水浴 22 s, 再冰浴 2 min (水银温度计控制);

- (6) 加入 950 μL SOC culture medium, 轻轻摇匀;
- (7) 转入 50 mL 尖底管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 culture 1 h;
- (8) 涂平板 (LB+Amp), 平板先预热, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜;
- (9) 扩大培养: 挑单菌落于 5mL/50mL 尖底管中 37 $^{\circ}\text{C}$ 液体 culture 12-16h;
- (10) 在无菌台内取 1mL 菌液到 EP 管中作保菌用, 做标签;
- (11) 提取重组 plasmid, 20 μL ddH₂O 溶解, 电泳检测;

2.4.7 重组质粒提取

- (1) 1.5mL (750 $\mu\text{L}\times 2$) 菌液, 12000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 离心, 去上清, 再瞬时离心, 彻底去上清;
- (2) 加入裂解液 buffer I 133 μL , 用枪头吹散, 混匀;
- (3) 加入 133 μL 2% SDS, 133 μL 0.4 NaOH, 颠倒混匀 5 次 (现用现混合);
- (4) 加入 buffer III 200 μL 颠倒混匀, 冰水浴 5min;
- (5) 取出 12000g 4 $^{\circ}\text{C}$, 9min 离心, 将上清转移到新的 EP 管;
- (6) 12000g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 9min 离心, 将上清转移新的 EP 管中;
- (7) 加入 2 倍体积的无水乙醇 (800 μL), 颠倒混匀;
- (8) 放入冰箱 (-20 $^{\circ}\text{C}$), 半小时左右 (时间可长一些或过夜);
- (8) 取出 12000g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 9min, 去上清;
- (9) 加入 70% 乙醇 1000 μL , 12000g, 离心 3min;
- (10) 加入 70% 乙醇 1000 μL , 12000g, 离心 3min, 用枪头吸净上清;
- (11) 放入超净工作台风干 (15 min);
- (12) 用 ddH₂O (20-25 μL) 溶解, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.4.8 重组质粒检测

- (1) 30 μL 反应体系
15 μL 2 \times GC Buffer, 1.6 μL MgCl₂, 2.4 μL dNTP, 1.05 μL 5' -P, 1.05 μL 3' -P, 0.15 μL La Taq, 3.0 μL Template, 5.75 μL ddH₂O.
- (2) 循环体系
95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1min, 65 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5min 进行 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min^[62-65]。
- (3) 电泳检测: 1.0% 琼脂糖胶 10 μL 点样。

PCR 的产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测，如果在 1.5kb 处有一明显的电泳条带，表明 16SrDNA 的目的片段以被成功连接到 T-载体上。将转化好的菌体穿刺培养，寄送大连宝生物公司测序。

2.4.9 序列比对与系统发育分析

将菌株 16S rDNA 序列结果，通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据库中，调出的相关放线菌菌株的 16SrDNA 序列，用 ClustalX 1.8 对 16SrDNA 基因序列行数据处理，用 Treeview 构建进化树。

2.5 MY048 的发酵条件优化

菌种活化：将 4℃ 保存菌种转接高氏一号平板，28℃ 培养 3d~5d；

种子液制备：挑取活化菌种，接入装有 20mL 种子培养基的 100mL 三角瓶中，28℃、200r/min 下培养 72h 作为活化的种子液；将活化的种子液进行二级种子培养，接种量 10%，培养时间 48h。

摇瓶培养：取 5mL 种子液接入装有 50mL 培养基的 250mL 三角瓶中，28℃、200r/min 下培养 144h。

生物活性检测：纸片扩散法，浓缩萃取液后，用甲醇溶解样品，将滤纸片（6mm）贴在涂有指示菌液的平板上，再用移液枪吸取 10μL 滴入滤纸片（6mm），37℃ 培养 24h 后测量抑菌圈的直径。抑菌活性(mm)=抑菌圈直径(mm) - 纸片直径 (mm)。

菌体浓度检测：取离心后收集菌体，在 105℃ 烘至重量恒定后测其干重。

2.5.1 培养基组成的影响

参考有关文献^[65-68]的方法。

2.5.1.1 碳源的影响

实验选择分别选择葡萄糖、可溶性淀粉分别作为碳源，作为碳源，浓度为 1%，摇瓶培养，采用纸片法测发酵液抑菌活性。

2.5.1.2 碳源浓度的影响

采用不同浓度的葡萄糖、可溶性淀粉（0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%）进行发酵实验，测定不同碳源浓度对活性物质合成的影响^{[65][66]}。

2.5.1.3 氮源的影响

分别以酵母浸粉、蛋白胨、牛肉浸膏、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源，浓度为 0.5%，摇瓶培养，测定发酵液抑菌活性。

2.5.1.4 氮源浓度的影响

采用不同浓度的酵母浸粉，牛肉浸膏（0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%）进行发酵实验，研究不同氮源浓度对活性物质合成的影响^{[68][69]}。

2.5.2.5 碳氮源正交实验

在上面单因素实验的基础上，以、葡萄糖（A）、可溶性淀粉（B）、酵母浸粉（C）及牛肉浸膏（D）为 4 因素，每因素取 3 水平，每组设置 3 平行，按正交表 $L_9(3^4)$ 进行实验，碳、氮源均匀设计安排见表^[70]。

表 2-1 碳氮源正交实验

Table. 2-1 the orthogonal experiment of carbon source and nitrogen source

水平	因素			
	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
1	0.5	1.5	0.4	0.2
2	1.0	2.0	0.5	0.3
3	1.5	2.5	0.6	0.4

2.5.1.6 无机盐的影响

采用优化后的培养基，分别加入不同浓度 KH_2PO_4 （0%、0.02%、0.04%、0.06%、0.08%）， CaCO_3 （0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%），以确定其最佳的浓度。

2.5.2 培养条件的影响

参考有关文献等^{[69][70][71]}的方法。

2.5.2.1 起始 pH 的影响

采用优化后发酵培养基, 用 1mol/L HCl 或 NaOH 溶液调整培养基初始 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 检测发酵后发酵液的抑菌活性。

2.5.2.2 温度的影响

将优化后的发酵培养基, 分别于 24℃、26℃、28℃、30℃、32℃, 振荡培养后测定发酵液抑菌活性。

2.5.2.3 种龄的影响

将培养时间分别为 24h、36h、48h、60h、72h 的摇瓶种子, 以 10% 的接种量接种于发酵优化培养基, 28℃ 培养后测活。

2.5.2.4 接种量的影响

将种子液按装液量的 4%、6%、8%、10%、12%, 分别接入优化培养基中, 检测发酵液的抑菌活性。

2.5.2.5 装液量的影响

将种子液接入装有 50mL、100mL、150mL、200mL、250mL 发酵液的 500mL 三角瓶中, 摇瓶培养后检测发酵液的抑菌活性。

2.5.2.6 发酵时间的影响

采用优化发酵培养基配方, 分别发酵 48h、72h、96h、120h、144h、168h, 测定发酵时间对抑菌活性物质合成的影响。

2.5.2.7 转数的影响

采用优化发酵培养基配方, 分别发酵 100r、150r、200r、250、300r 测定发酵时间对抑菌活性物质合成的影响。

2.5.3 10L 发酵罐培养试验

(1) 将菌种在高氏一号斜面培养基上培养 3~5 天, 挑单菌落接入到液体种子培养基中, 28℃、200r/min、72h;

(2) 再以 10% 的接种量将进行二级培养, 培养条件条件 28℃、

200r/min, 48h;

(3) 配制 9L 发酵培养基, 将其注入 10L 全自动发酵罐, 灭菌 121℃、30min;

(4) 将二级种子液 1L 在无菌操作台上转移到已灭菌的两个进样瓶中;

(5) 设定发酵的相关参数: 温度 28℃, 搅拌转数 200r/min, 通氧量 80%, 罐空气进口压力 0.2Mpa, 罐空气出口压力 0.04Mpa, 发酵过程 PH 自然;

(6) 待培养基冷却到 28℃时, 打开进样器, 让种子液进入发酵罐, 开始发酵;

(7) 记录发酵的起始时间, 发酵在 144h 左右时终止, 以金黄色葡萄球菌为指示菌, 用纸片法测定发酵液抑菌活性。

2.6 分离预试验

参考相关文献^[72-78]等方法。

2.6.1 萃取剂的选择

活性物质在不同有机相中的分配值有差异, 选择适当有机溶剂进行萃取; 能够最大限度的获得活性产物。取发酵上清液 10mL, 用乙酸乙酯、氯仿、石油醚、四氯化碳、正丁醇进行等三倍的体积萃取, 减压浓缩后, 分别测定其萃取物质的活性。

2.6.2 萃取液的 pH 选择

溶液的 pH 会影响活性物质在水相与有机相中的分布, 为了让有机溶剂能够萃取出更多活性物质, 需要确定最佳的萃取 pH 值。取 10mL 发酵上清液, 分别调节 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 加入三倍体积的乙酸乙酯, 充分混匀, 静置过夜, 分别检测萃取液抑菌活性。

2.6.3 抑菌活性测定

通过纸片扩散法测定 MY048 发酵液的抗菌谱。在无菌条件下, 吸取 60 μL 各种菌的菌悬液至平板上, 均匀涂布, 用无菌镊子取滤纸片 (D=6mm) 贴在培养基上, 然后在滤纸片上均匀的滴入 10 μL 减压浓缩后的粗提物, 37℃ 恒温培养 24h, 测量抑菌圈的直径。

2.6.4 活性成分的分布

分别取上清液与菌体破碎后提取液 10mL, 经乙酸乙酯萃取, 减压浓缩后, 分别测定活性物质的效价。

2.6.5 热稳定性

分别取上清液 10mL, 在不同温度 75℃、100℃与不同时间 30min、45min、60min 处理后, 冷却至室温后将 pH 调至中性, 经乙酸乙酯萃取后, 减压浓缩, 用未作处理的发酵液的粗提物为对照, 测定活性物质的效价。

2.6.6 酸碱稳定性

分别用 1mol/LHCl 或 NaOH 将 10mL 上清液的 pH 值调为 1、3、5、7、9、11、13, 在常温下放置 48h, 然后 pH 调回到 7.0, 乙酸乙酯萃取浓缩后, 与未作处理的发酵液的粗提物对照, 测定抑菌活性。

2.6.7 对照实验

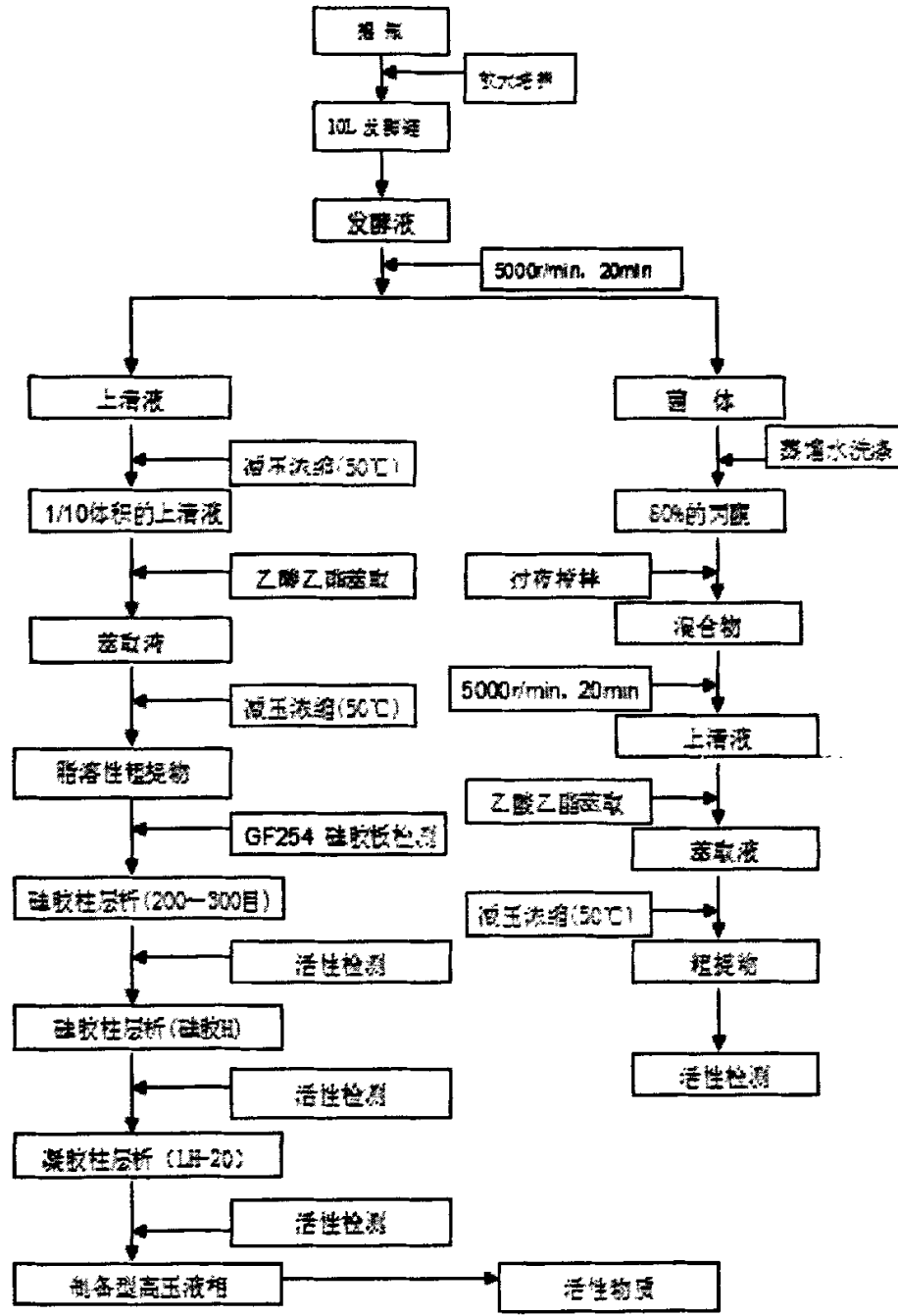
分别用移液枪吸取氨苄青霉素钠 (10mg/mL)、卡那霉素 (30mg/mL)、四环素 (10mg/mL) 以及发酵粗提物各 10 μ L, 滴加在涂有金葡萄球菌平板上的纸片上, 37℃恒温培养 24h, 测量抑菌圈的直径。

2.7 分离纯化

2.7.1 活性成分萃取

将发酵液, 在 4℃、转数 5000r/min 离心 20min, 得到上清液与菌丝体: 菌丝体加入 80%的丙酮, 过夜搅拌, 离心后减压浓缩, 将丙酮从水溶液完全蒸发, 加入等体积的乙酸乙酯萃取三次; 发酵上清液减压浓缩至原体积的十三分之一, 加入等体积的乙酸乙酯萃取, 重复三次上述操作过程, 将萃取液在旋转蒸发仪上 40℃减压浓缩, 4℃保存备用。

活性物质的分离与纯化路线图



2.7.2 薄层层析

参考有关文献^[80]的方法。

2.7.2.1 GF254 硅胶板的制备

取适量薄层色谱用的硅胶 GF₂₅₄ 10g, 置于研钵中, 加 0.5%CMC-Na 澄清溶液 30mL, 研磨均匀, 勿使产生气泡, 可加入少量无水乙醇, 使成为无气泡状态后铺板 40 块左右 (7.5cm) 薄层板厚度为 0.3mm 左右, 摇动摊平凉干, 使用前 110℃活化 2h。

2.7.2.2 展开剂体系的选择

参考有关文献文献氯仿-甲醇 (95:5)、甲苯-甲醇 (14:2)、甲醇-石油醚 (9:1)、甲醇-氯仿 (9:1)、甲醇-乙酸乙酯-三氯甲烷 (1.5:2:2)、丙酮-氯仿 (9:1)、氯仿: 甲醇 (9:1~3:1), 石油醚-乙酸乙酯 (5:1~1:1) 等进行实验, 以摸索出分离效果相对较好的有溶剂系统。

2.7.2.3 展层与显色

用甲醇溶解后在层析板上点样, 将其置于层析缸中, 当溶剂前沿距上段 1cm 处, 取出晾干; 在紫外光下观察出现的斑点, 同时用碘蒸气熏蒸或 15% H_2SO_4 浸泡后 120℃显色 2h。

2.7.2.4 活性检测

用铅笔标明各组分的位置, 根据各组分的相对移动值计算 R_f 值; 用小刀将铅笔划出的条带逐一的刮下, 用乙酸乙酯进行萃取, 测定其抑菌活性^[80]。

2.7.3 硅胶柱层析

参考有关文献^[80-83]的方法。

2.7.3.1 装柱

(1) 称 30-70 倍于上样量 200-300 目硅胶, 加入干硅胶体积一倍的石油醚, 充分搅拌。

(2) 选用径高比在 1:5~10 减压柱, 将柱底与茄形瓶连接, 固定住阀门, 加入约 1/3 体积石油醚, 将匀浆一次倾入玻璃柱内。

(3) 自然沉降片刻后, 打开下端阀门, 加入更多的石油醚, 用恒流泵从底部抽真空, 直到柱床体积不在减小; 然后将其尽量压实, 这样可以使分离度提高很多, 且避免过柱时由于柱床萎缩产生开裂。

2.7.3.2 上样

取适量起始洗脱剂将样品溶解，加入少量的硅胶充分拌样，减压浓缩抽干后，在柱面铺匀，拌样硅胶体积为柱体积的 1:10 为宜；表面再覆盖一层硅胶粉，防止大量加入洗脱液时将表面硅胶冲起造成液面不平整。

2.7.3.3 样品收集与活性检测

使用梯度洗脱法，先加入石油醚，在加石油醚-乙酸乙酯的混合液，最后加乙酸乙酯-甲醇，每个梯度大约是 2 倍柱体积；将各组分的洗脱剂减压浓缩，用纸片法分别测活性，对有活性的组分进行进一步分离。

2.7.4 凝胶柱层析

参考相关文献^[85]。

采用 Sephadex LH-20 对薄层层析所得样品进一步纯化，柱层析洗脱剂为氯仿-甲醇 (3:1)，采用分部收集的方法，GF254 薄层检测纯度。

2.7.4.1 预处理

将干胶颗粒悬浮于 5~10 倍的蒸馏水或甲醇中充分溶胀，然后除去极小的颗粒。

2.7.4.2 装填

将玻璃层析柱固定在与地面垂直铁架上，关闭下端流出口，将调成较稀薄的凝胶液灌入层析柱内，凝胶缓缓沉降直到所需高度为止，用直径与柱内径相等滤纸片轻轻盖在凝胶床表面。放置一段时间后开始用洗脱剂平衡，平衡凝胶床过夜，使用前检查层析床是否均匀，发现纹路、分层等不正常现象时应重新装柱。

2.7.4.3 上样

凝胶床经平衡后，吸去上层液体，待平衡液下降至床表面时，关闭流出口，用滴管加入样品液，打开流出口，使样品液缓慢渗入凝胶床内。当样品液面恰与凝胶床表面持平时，小心加入少量洗脱液冲洗管壁，然后继续用大量洗脱液洗脱。

2.7.4.4 洗脱

加完样品后，将层析床与洗脱液储瓶、检测仪、分部收集器及记录仪相连，根据被分离物质的性质，预先估计好一个适宜的流速，定量地分部收集流出液，每组分从 1 到数 mL，各组分进行定性分析。

2.7.5 高压液相色谱

采用 Aglient1100 高压液相分析仪对样品进行检测与分离。色谱柱为 ZORBAX SB-C18, 5 μ m 4.6mm X 20mm, Agilent 生产; Venuisil XBP-C18 10 μ m 20 X 250, Agela technologies inc 生产; 柱温: 23 $^{\circ}$ C; 洗脱剂: 甲醇、乙腈、水。

2.7.5.1 清洗进样阀

选择适当的样品环(检测: 20 μ L、制备: 5mL), 然后用平头注射器吸取去离子水对进样阀清洗, 重复数次, 尽可能的将进样阀的残留物去除。

2.7.5.2 清洗柱子

用脱气后的纯甲醇或乙腈溶剂冲洗色谱柱 1-2h 除去柱上的杂质, 然后用流动相平衡色谱柱 1h, 直至基线趋近零。

2.7.5.3 样品处理

将少量的样品溶解于流动相中, 上柱前经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 然后用微量进样针吸取适量的样品溶液, 注射到进样阀中(分析型的样品量不超过 20 μ L、半制备的样品体积不超过 5mL)。

2.7.5.4 洗脱分析

根据紫外全波长扫描的结果, 选择检测波长, 设定相关的参数(流动相比例、流速、柱温、最大柱压等)后, 开始进样。在不同分离条件下, 样品在分离过程形成的不同高压液相色谱图, 对其进行综合的分析, 确立目标物质与杂质分离的最佳条件。

2.7.5.5 样品收集

按照最佳分离条件, 选择半制备型色谱柱, 大量进样后, 根据管道的体积与色谱图上的出峰时间, 计算出收集样品的时间。将所有收集到的样品减压浓缩, 进行活性检测。

3 结果与分析

3.1 MY048 的分子鉴定

3.1.1 MY048 DNA 的电泳图

将单克隆菌中提取到的总DNA，在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳检测（如图3-1）。结果表明：基因组DNA条带完整，适合用于16S rDNA的扩增。

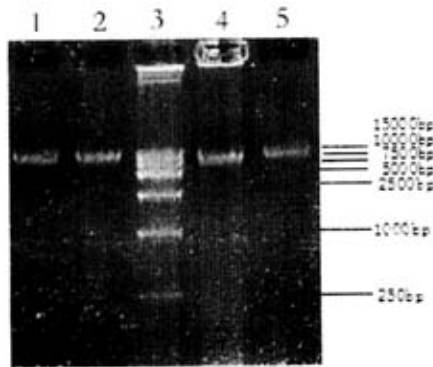


图 3-1 MY048 的基因组 DNA

Fig.3-1 Genome of MY048

1, 2, 4, 5. 基因组 DNA; 3. Marker: DL15, 000bp

3.1.2 PCR 扩增产物

以总 DNA 样品为模板，通过 16SrRNA 通用引物扩增得到的 PCR 产物，经 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 3-2。扩增产物大小约为 1.5Kb 与理论值相吻合，因此判断该产物为 16S rDNA。

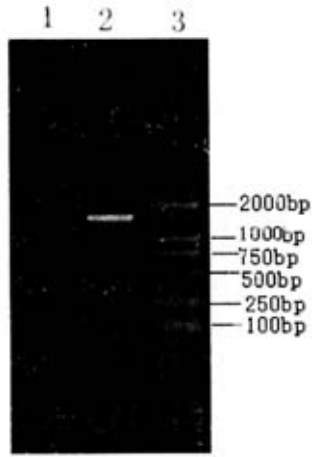


图3-2 PCR扩增产物

Fig. 3-2 the product of PCR

1. 阴性对照; 2. 16SrDNA; 3. DL2000

3.1.3 重组质粒的电泳图

以重组 pMD-18T 质粒为模板，扩增得到的 PCR 产物，经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 3-3。

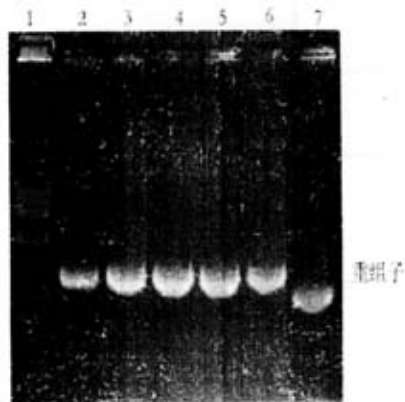


图3-3 重组质粒的PCR 扩增产物

Fig.3-3 the product of PCR

1. DL15000bp; 2~6. 阳性重组子; 7. 阴性对照;

3.1.4 系统发育分析

通过 PCR 方法克隆菌株 MY048 的 16SrDNA 并进行测序, 获得 16S rDNA 近全长序列。将 MY048 的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中相关序列进行比对, 根据序列同源性从高到低的原则, 选取 11 个菌株用于序列分析并构建系统发育树。序列分析由 BIOEDIT 程序生成, 用 Neighbor-joining 法, 用 Treeview 得到系统进化发育树, 见图 3-4。同源性分析发现, MY048 与链霉菌属菌株的序列相似性比较高, 其中 MY048 与 AF290616 的相似性最高, 为 98.6%。据此判断, 菌株 MY048 属于链霉菌属, 命名为 *Streptomyces* sp. MY048。

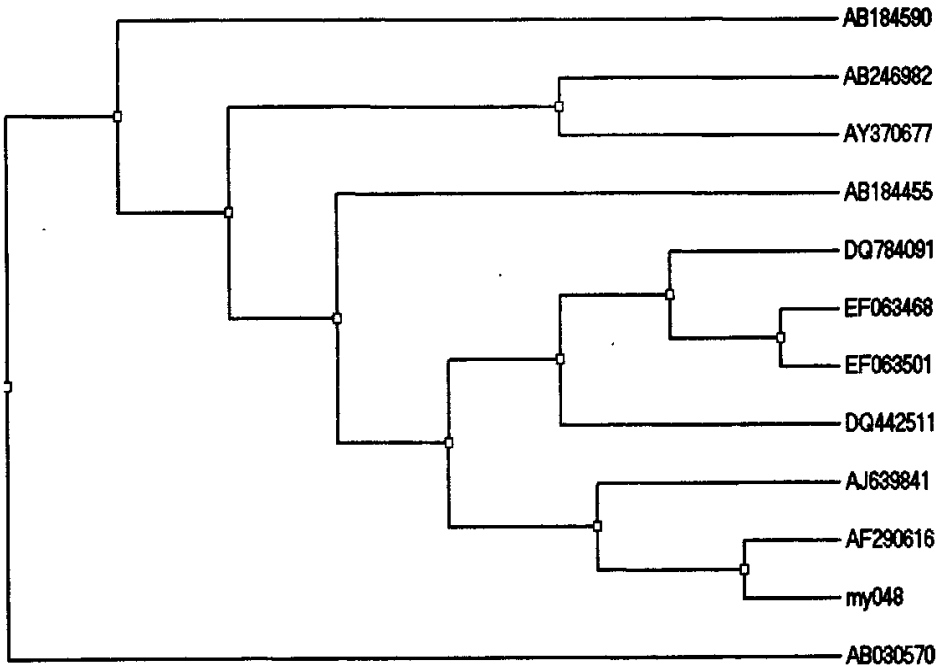


图 3-4 MY048 与相关菌株的系统发育树

Fig. 3-4 Phylogenetic tree of stain MY048 and relative strains

3.2 MY048 的发酵条件优化

3.2.1 培养基组成

3.2.1.1 碳源的影响

本试验以 1% 的质量浓度加入葡萄糖、可溶性淀粉，菌株所产生的活性物质的抑菌圈分别为 13.0cm、12.0cm，可以看出葡萄糖、可溶性淀粉都可以作为发酵的碳源。

3.2.1.2 碳源浓度的影响

在实验中分别加入不同浓度的葡萄糖、可溶性淀粉作为碳源。从可以看出，当葡萄糖浓度为 1% 时，发酵液抑菌活性最好；以可溶性淀粉作为碳源，浓度为 2% 时，活性最好。

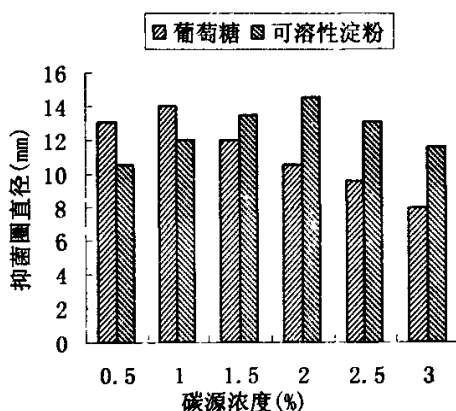


图 3-5 不同浓度的碳源对 MY048 活性物质产量的影响

Fig. 3-5 Effect of different concentration carbon sources on the production of bioactive substances

3.2.1.3 氮源的影响

分别以 0.5% 的酵母浸粉、蛋白胨、牛肉浸膏、 KNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4NO_3 作为氮源。结果表明，酵母浸粉、蛋白胨、牛肉膏以及 KNO_3 均可作为氮源，其中酵母浸粉、牛肉膏对 MY048 的活性影响较大，抑菌圈分别为 15.5mm、12.5mm。

3.2.1.4 氮源浓度的影响

分别加入不同浓度的氮源，测定氮源浓度对 MY048 产活性物质的影响。如图 3-6，可以看到，当添加适量的氮源时，会促进活性物质的产生。酵母浸粉浓度大于 0.5% 时抑菌圈直径最大，牛肉浸膏浓度在 0.3% 时抑菌圈最大。

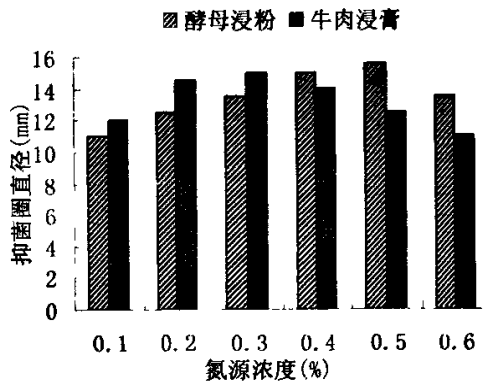


图 3-6 不同浓度的氮源对 MY048 活性物质产量的影响

Fig.3-6 Effect of different concentration nitrogen sources on the production of bioactive substances

3.2.1.5 碳源与氮源正交实验

为了提高发酵液中活性物质的含量，寻找到最佳碳源、氮源的比例，以葡萄糖、可溶性淀粉、酵母浸粉和牛肉浸膏为 4 因素，每因素取 3 水平，每组设置 2 个平行，按正交表 L₉(3⁴) 进行实验，结果见表 3-7。

表 3-1 碳氮源正交实验结果

Table.3-1 The results of orthogonal experiment of Carbon sources and nitrogen sources

	A	B	C	D	I (mm)	II (mm)	均值 (mm)
1	1.5	0.5	0.4	0.2	14.5	15.5	15.0
2	1.5	1.0	0.5	0.3	16.5	17.0	16.8
3	1.5	1.5	0.6	0.4	15.3	14.3	14.8
4	2.0	0.5	0.5	0.4	18.8	18.0	18.4
5	2.0	1.0	0.6	0.2	16.0	17.0	16.5
6	2.0	1.5	0.4	0.3	15.5	16.5	16.0
7	2.5	0.5	0.6	0.3	14.0	14.0	14.0
8	2.5	1.0	0.4	0.4	13.0	13.5	13.3
9	2.5	1.5	0.5	0.2	12.3	12.5	12.4
K1	46.4	47.5	44.3	43.9			
K2	50.9	45.6	47.6	46.8			
K3	39.7	44.0	46.1	46.5			
R	3.8	1.2	0.8	1.0			

对碳氮源正交实验的结果进行统计分析，得到最优碳氮源组合是 $A_2B_1C_2D_2$ ，即葡萄糖 0.5%，可溶性淀粉 2%，酵母浸粉 0.5%，牛肉浸膏 0.3%，各因子对活性物质产量的影响是：可溶性淀粉 > 葡萄糖 > 牛肉浸膏 > 酵母浸粉。

3.2.1.6 无机盐的影响

磷酸盐不但是核蛋白等重要细胞物质的组成部分，而且还是许多辅酶、高能磷酸键的组成部分，磷是微生物菌体生长繁殖所必需的成分，也是合成代谢产物所必须的， KH_2PO_4 可起到调节细胞的渗透压，作为某些酶的辅助因子维持细胞功能等作用；菌体快速生长阶段中会代谢产生的大量酸， $CaCO_3$ 可以中和过量酸，起到调节 pH 值的作用，以便于菌体的继续生长。在上述培养基中，分别加入不同浓度 KH_2PO_4 、 $CaCO_3$ ，发酵后进行价效比较发现，当 KH_2PO_4 的浓度为 0.04 时，抑菌活性最强，见表 3-2；当 $CaCO_3$ 0.2% 浓度，有最大抑菌效果，见表 3-3。

表 3-2 KH_2PO_4 浓度对 MY048 产活性物质产量的影响Table. 3-2 Effect of KH_2PO_4 concentration on the production of bioactive substances

浓度 (%)	0	0.02	0.04	0.06	0.08
抑菌圈 (mm)	18.0	19.5	20	18.5	15.0

表 3-3 CaCO_3 浓度对 MY048 产活性物质产量的影响Table. 3-3 Effect of CaCO_3 concentration on the production of bioactive substances

浓度 (%)	0	0.1	0.2	0.3	0.4
抑菌圈 (mm)	20.0	21.5	22.0	20.5	18.5

3.2.2 培养条件的影响

3.2.2.1 起始 pH 的影响

培养基的 pH 值,对微生物的生长具有非常明显的影响,也是影响发酵过程中各种酶活的重要因素, pH 过高或过低都可能影响到菌体的生长和其次生代谢产物的合成。培养基初始 pH 对 MY048 活性物质的产量影响。如图 3-7,可以看出,发酵液的起始 pH 在 6.0~8.0 时,抑菌圈变化不大,当 pH 7.0 时抑菌圈直径最大,因此将 pH 值控制在 7.0~7.2 之间。

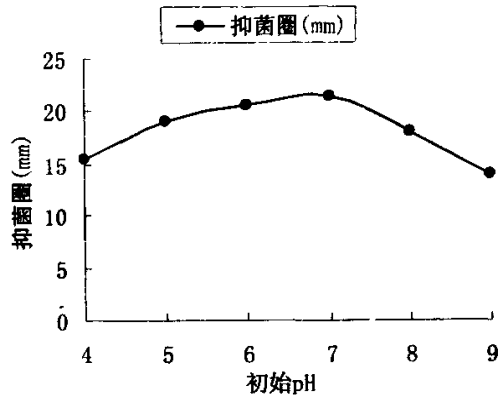


图 3-7 起始 pH 对 MY048 产活性物质产量的影响

Fig. 3-7 Effect of pH on the production of bioactive substances

3.2.2.2 温度的影响

微生物的生长和合成药物的代谢活动都是在各种酶的催化作用下进行的，酶的催化需要适当的温度。只有在合适的温度下，菌体生长和代谢产物和合成才能顺利的进行；如果温度不适宜就会抑制其代谢过程的酶的活力，从而影响微生物的菌体生长与代谢产物的合成。培养温度对 MY048 活性物质的产量影响如图 3-8，可以看到，在 28℃ 时抑菌圈直径最大，为此选择培养温度 28℃。

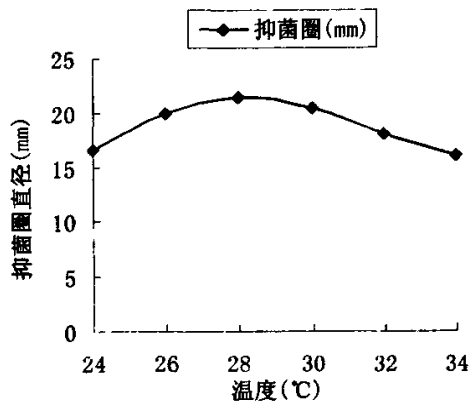


图 3-8 温度对 MY048 产活性物质产量的影响

Fig. 3-8 Effect of temperature on the production of bioactive substances

3.2.2.3 种龄的影响

分别将不同种龄的种子液接种于发酵培养基,按 10%接种量的,28℃振荡培养 144h 后,测定抑菌圈直径。种龄对 MY048 活性物质产量的影响如图 3-9,当种龄为 48h 时,发酵液的抑菌圈最大,所以最佳种龄应为 48h。

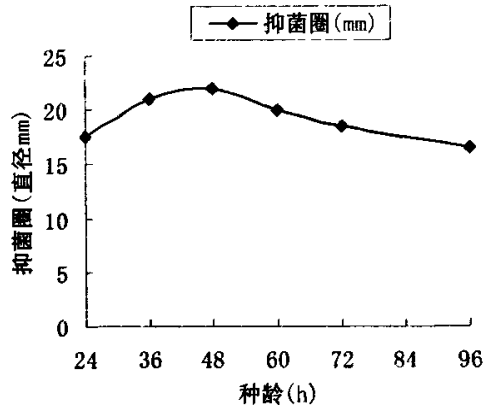


图 3-9 种龄对 MY048 产活性物质产量的影响

Fig. 3-9 Effect of age on the production of bioactive substances

3.2.2.4 接种量的影响

在发酵液中的菌体浓度对其次生代谢有重要的影响,当起始菌体浓度过低时,会延长发酵周期,从而影响代谢产物的稳定性;当菌体浓度过高时,会过快营养物质的消耗,会导致有毒物质的大量积累,这可能改变菌体的代谢途径,降低活性物质的产量。由图 3-10 可以看出,以不同的接种量接入优化培养基中,发酵结束后发现当接种量为 10%,抑菌圈直径最大可达到 22.0mm,为此选择接种量为 10%。

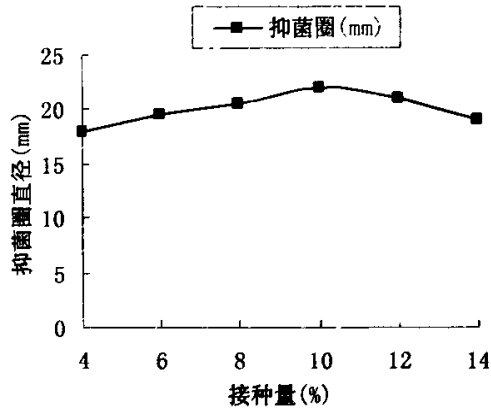


图 3-10 接种量对 MY048 活性物质产量的影响

Fig.3-10 Effect of inoculation volume on the production of bioactive substances

3.2.2.5 装液量的影响

对于好氧型微生物，氧对其生长有至关重要的作用，在微生物的发酵过程中，发酵液的溶氧会直接影响的菌体代谢活动。当溶氧不足时，菌体生长会受到影响；当溶氧过大时，又会抑制代谢产物的合成。在 500mL 三角瓶中分别装入不同体积的培养基，考察装液量对 MY048 活性物质产量的影响。从图 3-11 可以看出，，装液量在 10%~15%时，发酵液抑菌圈直径变化不大，但当装液量大于 20%时，发酵液抑菌圈直径明显变小，500mL 三角瓶装液量为 15% (75mL)。

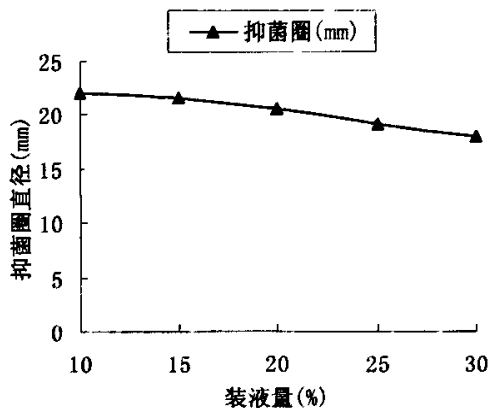


图 3-11 装液量对 MY048 产活性物质产量的影响

Fig. 3-11 Effect of culture volume on the production of bioactive substances

3.2.2.6 发酵时间的影响

微生物发酵时间会影响到其代谢产物的最终产量。在发酵初期，菌体主要进行初级代谢产物的合成，这时次级产物的量很少；到发酵后期，菌体开始进行次生代谢产物的合成，随着发酵液中次级产物的浓度增加，菌体的代谢合成逐渐受到抑制，导致次级产物的合成受阻；在发酵末期，菌体会出现衰老、自溶现象，胞内酶可能会影响产物的活性，同时大量的细胞内含物也会增加分离纯化活性物质的难度。采用优化后的发酵培养基，分别发酵 72h, 96h, 120h, 144h, 168h, 192h 后，检测其抑菌活性，结果如图 3-12。在 72~144h 内，随着发酵时间延长，MY048 发酵液抑菌圈逐渐变大，当发酵至 144h 时，其抑菌圈达到最大值，随后则开始变小，发酵时间应该在 144h 左右。

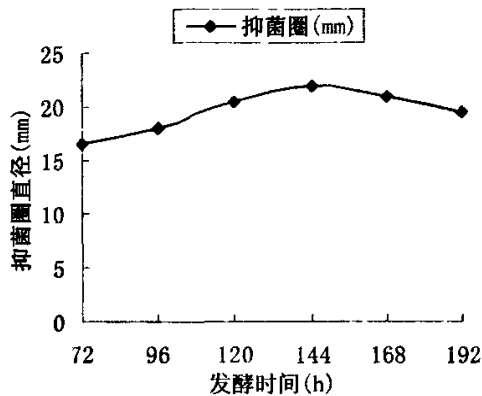


图 3-12 发酵时间对 MY048 产活性物质产量的影响

Fig. 3-12 Effect of fermentation time on the production of bioactive substances

3.2.2.7 转数的影响

分别将按 10%接种量将种子液接种于发酵培养基，28℃振荡培养转数分别为 100r、150r、200r、250r、300r，培养 144h 后测定抑菌圈直径。结果

如图 3-13，当摇床转数为 200r/min 时，活性最强。

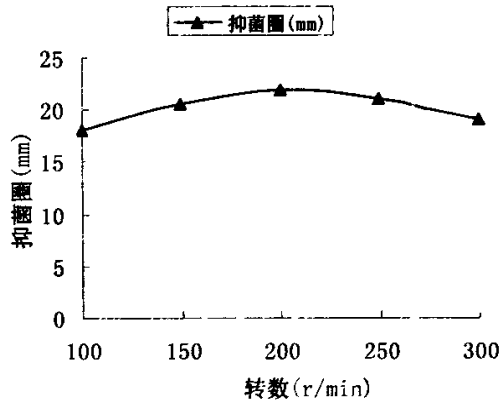


图 3-13 转数对 MY048 产活性物质产量的影响

Fig. 3-13 Effect of vibration on the production of bioactive substances

3.2.5 10L 发酵罐试验

表 3-4 发酵罐相关参数变化

Table.3-4 the relative parameter of fermentor in the course of fermentation

时间 (h)	温度 (°C)	通氧 (%)	PH 变化	干重 (mg/mL)	发酵液状态
24	28.0	80	7.08	13.5	澄清
48	28.0	80	7.26	16.1	澄清
72	28.0	100	7.04	20.2	澄清
96	28.0	80	6.80	24.4	半透明
120	28.0	80	6.44	29.2	半浑浊
144	28.0	100	6.20	26.5	浑浊
168	28.0	80	5.95	23.6	浑浊

3.3 预实验

3.3.1 萃取剂选择

经过抑菌活性测定,发现乙酸乙酯、氯仿、正丁醇均能萃取出活性物质,乙酸乙酯的萃取物的抑菌活性较强,且价格便宜,所以在试验中选择用乙酸乙酯作为萃取剂,结果见表 3-5。

表 3-5 不同有机溶剂的萃取结果

Tab.3-5 the extraction of bioactive substances with different organic solvents

有机溶剂	乙酸乙酯	氯仿	石油醚	四氯化碳	正丁醇
抑菌圈直径 (mm)	21.5	17.0	3.0	4.0	18.5

3.3.2 萃取液的 pH 选择

如表 3-6 所示,当上清液的 pH 在 6.0~7.0 之间时,乙酸乙酯都能够有效地萃取出活性物质。由于在发酵终点,其 pH 值为 6.20 左右,所以在萃取时,不需要调节发酵液的 pH。

表 3-6 不同 pH 值下的萃取结果

Table.3-6 The extraction of bioactive substances at different pH

pH	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
抑菌圈直径 (mm)	19.5	21.5	22.0	16.0	10.5

3.3.3 抗菌活性试验

以金黄色葡萄球菌 (*S. a*)、大肠杆菌 (*E. c*)，绿脓杆菌 (*P. a*)，腊样芽胞杆菌 (*B. c*) 作为指示菌，采用纸片扩散法检测菌株 MY048 菌谱，结果见表 3-7。MY048 的发酵液粗提物对上述几种指示菌均有抑制作用，尤其是对金黄色葡萄球菌 (*S. a*) 的效果明显，但对大肠杆菌 (*E. c*) 的抑制能力较弱。

表 3-7 MY048 发酵液的抗菌活性
Tab. 3-7 Antimicrobial activity of fermentation medium
against trial strains

指示菌	<i>S. a</i>	<i>E. c</i>	<i>P. a</i>	<i>B. c</i>
抑菌圈直径 (mm)	22.0	8.5	14.0	16.0

3.3.4 活性分布实验

实验结果表明 MY048 的活性物质主要分布于发酵液中 (表 3-8)，菌体中仅有少活性物质存在，该菌株为外泌型。

表 3-8 MY048 活性物质分布
Tab. 3-8 The distribution of bioactive substance
In fermentation medium

指示菌	抑菌圈直径 (mm)	
	上清液	菌体
<i>S. a</i>	21.5	8.0
<i>E. c</i>	8.5	4.0
<i>P. a</i>	13.5	5.5
<i>B. c</i>	16.0	6.0

3.3.5 热稳定性试验

原始发酵液在 75℃ 水浴中加热 30、45、60min 后，与对照没有明显的变化；在 100℃ 水浴中加热 30min 后，活性显著降低，加热 60min 后，活性完全消失。上述实验说明 MY048 发酵液的热稳定性较强（表 3-9）。

表 3-9 温度对发酵液活性的影响

Tab. 3-9 Effect of different temperature treatment on antimicrobial activity of fermentation medium

温度 指示菌	抑菌圈直径 (mm)						对照
	75℃			100℃			
	30min	45min	60min	30min	45min	60min	
S. a	22.0	22.0	22.0	4.0	2.0	0	22.0
E. c	8.5	8.5	8.0	0.5	0	0	8.5
P. a	14.0	14.0	13.5	1.5	0	0	14.0
B. c	16.0	15.5	15.5	2.0	0.5	0	16.0

3.3.6 酸碱稳定性试验

在相同条件下，将上清液进行不同 PH 处理后测定生物活性。在中性和酸碱条件下，发酵液能够保持较好的活性，抑菌圈没有明显的变化（表 3-10）；pH 值大于 11.0，小于 3.0 活性基本丧失，说明在纯化分离的过程中 PH 值对活性物质的影响不大。

表 3-10 pH 对发酵液抑菌活性的影响

Tab. 3-10 Effect of different pH on antimicrobial activity of fermentation medium

pH 指示菌	抑菌圈直径 (mm)							对照
	1	3	5	7	9	11	13	
S. a	6.0	16.0	19.5	22.0	19.0	14.5	6.5	21.5
E. c	2.0	4.0	7.0	8.0	6.0	4.5	2.5	8.0
P. a	3.5	10.0	12.0	14.5	13.5	8.0	4.0	14.0
B. c	4.5	12.0	15.0	16.5	14.0	11.5	5.0	16.0

3.3.7 抑菌对比实验

实验结果如图 3-14，青霉素的抑菌能力最强(28.0mm)，其次是四环素(21.0mm)，卡那霉素(16.0mm)的抑菌能力最小，而发酵粗产物在稀释一倍后，其抑菌圈大小(22.0mm)与四环素相近，说明该物质有较强的抑菌能力。

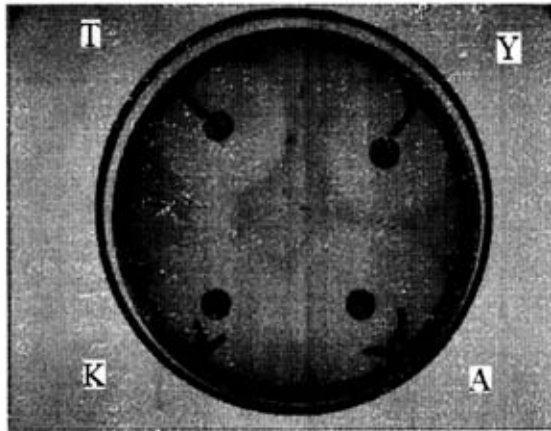


图 3-14 发酵粗产物与三种抗生素的抑菌活性比较

Fig.3-14 Anti-S.a activity of fermentation substance and 3 different antibiotics

A (氨苄青霉素) K (卡那霉素) T (四环素) Y (粗提物)

3.4 分离与纯化

3.4.1 活性物质萃取

发酵液经 5000r/min，离心 20min，将发酵上清液在旋转蒸发仪上 50℃ 减压浓缩至原体积的 1/10，用乙酸乙酯萃取，合并乙酸乙酯萃取液并在 50℃ 下减压浓缩，得到红褐色浸膏 9.2170g。

3.4.2 薄层层析

将乙酸乙酯提取物取少量，用甲醇溶解，按照甲醇-乙酸乙酯-氯仿 (1:1.5:2.5) 在 GF254 薄层板上进行分离，在凝胶成像上观测，薄层板上出现数条荧光带，如图 3-15。对其进行制备型薄层分离，用铅笔分别标记条带的位置，用小刀将条带分别刮下，用乙酸乙酯萃取后，测定活性发现，有几个条带都具有一定活性。实验中发现用纯的石油醚无法推动样品，于是用石油醚-乙酸乙酯作为展开剂对样品进行分离，根据多次薄层色谱结果发现，当石油醚-乙酸乙酯 (3:1) 作为展开剂时，最前沿的 R_f 值在 0.2~0.3 之间，可以用作柱层析的起始洗脱剂。



图 3-15 活性物质的薄层色谱图

Fig. 3-15 TLC spectrum of bioactive substances

3.4.3 硅胶柱层析

利用硅胶柱层析对萃取所得的浸膏进行粗分离,采用干法装柱,石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱后,再用乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱,每个剃度洗脱体积为 200mL,分部收集洗脱液,得到 30 组分,用 GF254 硅胶板检测,合并相近的组分,减压浓缩得到 8 个组分。活性检测(表 3-11)发现组分 I、II、III、IV 均有活性,组分 I、III、IV 的量太少,无法进行一步实验;组分 V、VI、VII、VIII 均无活性,但组分 V 的量较大,可以做进一步研究。将有活性组分 II 反复硅胶柱层析,选用氯仿-甲醇剃度洗脱,得到粗品 I;将组分 V 用氯仿-甲醇进行反复的洗脱,得到粗品 II (11mg)。

表 3-11 8 个组成的抗菌活性

Table. 3-11 The antibacterial activity of 8 mixtures

组分	1	2	3	4	5	6	7	8
颜色	浅黄	浅黄	黄	黄	深黄	红	深红	红褐
抑菌圈直径 (mm)	16.0	14.5	12.0	8.0	0	0	0	0

3.4.4 Sephadex LH-20 柱层析

采用 Sephadex LH-20 对有活性粗品 1 进一步纯化,洗脱剂为氯仿:甲醇(2:1),分部收集并检测活性,经过合并所需要的洗脱液,减压浓缩后经得浅黄色油状液体-样品 I。

3.4.5 高效液相色谱(HPLC)

全波长扫描显示样品 I 的最大紫外吸收在 220nm,样品 2 的最大紫外吸收在 260nm。高效液相色谱仪(色谱柱 ZORBAX SB-C 18, 4.6mm X 20mm 5 μm)分别检测样品 I、II 的纯度。对样品 I 的色谱峰进行面积归一化,得出该组份百分含量为 81%。对样品 II 的色谱峰进行面积归一化,得出该组份百分含量为 92%,如图 3-16。

运用半制备高效液相色谱柱对上述样品进一步纯化, Venuisil XBP-C18

20mm X 250mm 10 μ m, 柱温 23 $^{\circ}$ C, 流动相为乙腈: 溶液 (50: 50), 流速: 2mL/min, 进样量: 500 μ L (10mg/ mL), UV 检测波长 220nm, 收集保留时间 12.5min 的组分, 减压浓缩后得到化合物 I (20mg); HPLC 检测, 流动相为乙腈: 水 (50: 50), UV 检测波长为 220nm, 柱温 23 $^{\circ}$ C, 流速 1.0mL/min, 保留时间为 7.1min, 如图 3-17。

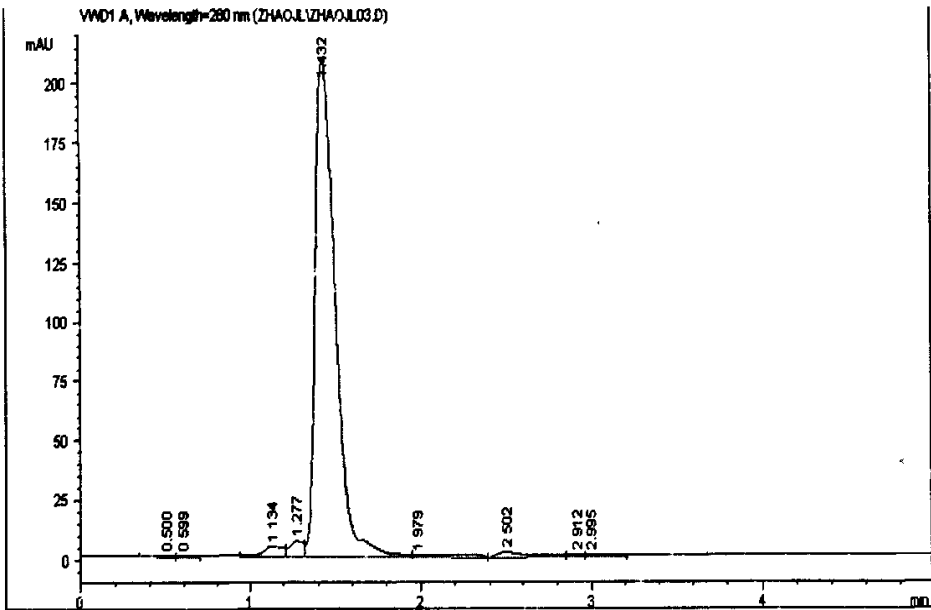


图 3-16 化合物 II 的 HPLC 图谱

Fig. 3-16 HPLC spectrum of compound II

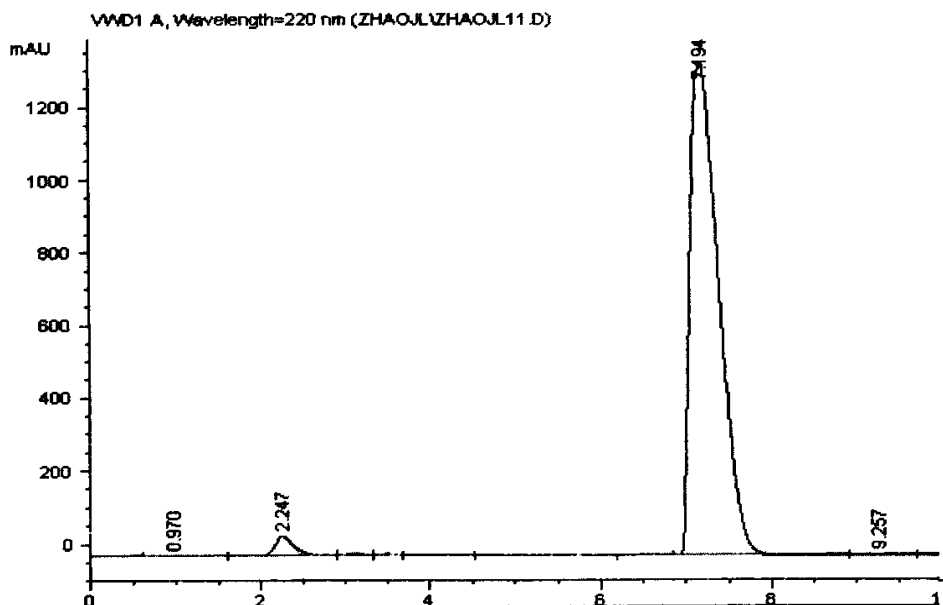


图 3-17 化合物 I 的 HPLC 图谱

Fig. 3-17 HPLC spectrum of compound I

3.4.6 化合物的理化性质

化合物 I 为黄色油状液体，有刺激性气味，常温下，易能溶于水、甲醇、乙酸乙酯等有机溶剂，最大紫外吸收在 220nm (图 3-18)。

化合物 II 为灰白色固体，无特殊气味，常温下，在水、甲醇、乙酸乙酯等溶剂中的溶解度较小，加热后，溶解度增大，其最大紫外吸收为 260nm (图 3-19)。

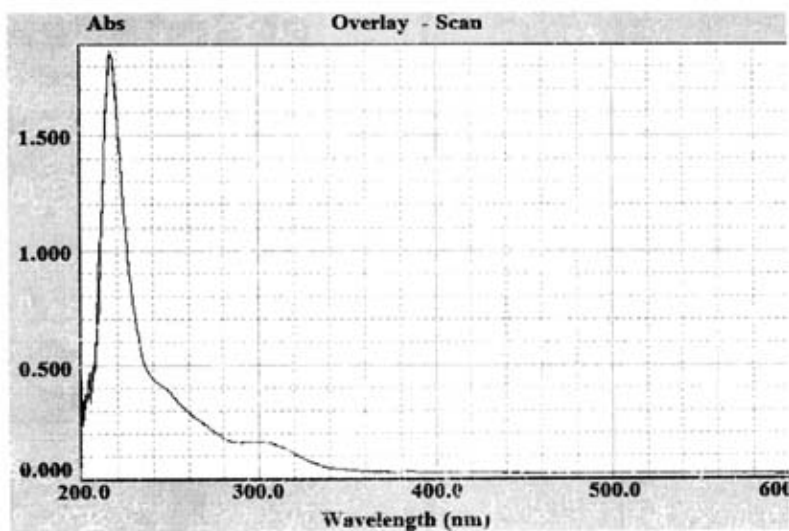


图 3-18 化合物 I 的紫外全波长扫描图

Fig. 3-18 UV-Scan spectrum of compound I

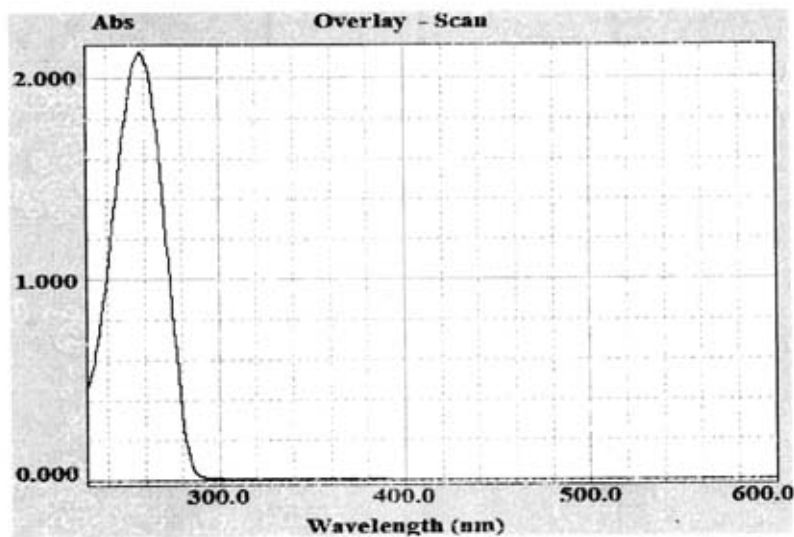


图 3-19 化合物 II 的紫外全波长扫描图

Fig. 3-19 UV-Scan spectrum of compound II

3.4.7 活性物质的抑菌实验

用甲醇将化合物 I 稀释 10 倍，分别测定其抑菌活性，结果如表 3-12。化合物 I 对金黄色葡萄球菌的抑制效果较明显，对其他的菌的活性则较弱。

表 3-12 化合物 I 的抑菌活性

Table 3-12 The antibacterial activity of compound I

指示菌 抑菌圈 (mm)	<i>S. a</i>	<i>B. c</i>	<i>E. c</i>	<i>P. a</i>
化合物 I	13.0	5.0	2.0	4.5
化合物 II	0	0	0	0

4 讨论

4.1 实验材料选择

近 20 年来,人们发现从生活在普通环境的放线菌中分离到新化合物的数量锐减;而已知化合物重复出现的机率越来越大,在这种情况下,人们开始将目光投向生活在特殊环境中(极端环境、海洋、生物体内以及植物根际等)的放线菌。它们绝大多数都具有耐高盐、高温、高压、低营养、低温、高酸碱度等的的能力。生活在这些环境中,它们其基因将发生一些改变,以便它们能够形成特殊的代谢途径。这一方面为它们的生存提供了保障,另一方面也为新化合物的产生提供了物质基础。

Anaicholas 等^[85]从一株澳大利亚海绵中分离得到的海洋放线菌 *Oceanapiasp* 中分离到一种新的分枝杆菌酶抑制剂咪唑生物碱; Lopez 等^[86]从海洋放线菌 (BL-49-58-005) 中分离得到 3 个新的吡啶物碱; Chanran 等^[87]从一株海洋小单孢菌中分离到新的抗细菌的生物碱-diazepinomicin; Strobel 的研究小组从药用植物蛇藤中分离到一株新的链霉菌 NRRL30562, 它能产生 4 种新的广谱抗生素 Munumbicins A, B, C 和 D^[88]; 后又从一种有叶蕨类植物中分离到一株新内生链霉菌 NRRL230566, 它能产生一种称为 kakadumycins 的新型抗菌素, 其中 kakadumycin A 含丙氨酸、丝氨酸和一个未知的氨基酸, kakadumycin A 有广谱的抑菌杀虫活性对炭疽芽孢杆菌和疟原虫均具有强烈的抑杀活性, 其生物活性比棘霉素强^[88]。

植物的根际是一种特殊的生态环境。由于根系的穿插, 使根际的通气条件和水分状况优于根际外, 从而形成利于微生物的生态环境; 而根系分泌物作用于根系周围环境产生根际效应。根系分泌的有机化合物除了有机酸、糖类、酚类、各种氨基酸、粘胶与胞外酶外, 还包括了种类繁多的次生代谢产物。这些次生代谢能起到保护植物免受病原体与杂草的侵害及种间化感作用, 同时也能抑制或促进根际微生物种群的生长。在这种环境中, 根际微生物能够获得丰富的营养和能源, 但它们之间同时也面临着竞争与选择压力。根际微生物为了适应这种环境, 可能会进化出一些特别的代谢途径, 一方面抑制其它微生物的生长, 另一方面拮抗植物的次生代谢产物, 从而为其生存提供必要的保证。

1978 年欧阳谅^[89]等从江西农业大学校园油茶根际土壤中分离筛选到的一株链霉菌新种-南昌链霉菌, 它能产生南昌霉素与梅岭霉素; 廖昌珑^[90]等

从三七根际分离到一株产木聚糖酶链霉菌 *Streptomyces*.0233, 其 16SrDNA 片段与中所有已注册的链霉菌分类单位均不同; 张克诚等^[91]从小麦根际筛选的一株链霉菌(*Streptomyces* spp.) S-5, 它的发酵液能有效地抑制棉花枯黄萎病菌。

目前, 国外内的文献大多是报道关于药用植物内生放线菌产生的新化合物, 而关于根际放线菌产生新的化合物的报道却很少。四川境内复杂的气候条件孕育了十分丰富的药用植物类群, 它们能够产生许多复杂的次生代谢产物, 例如萜类、芪类、异黄酮类、生物碱等化合物, 这些化合物参与药用植物的抗真菌、抗细菌以及抗病虫的活动。这对生活在它们根际的种类繁多的微生物来说, 既是一种“机遇”也是一种“挑战”。在药用植物根际这个特殊的环境中, 放线菌可能会进化出一些新的代谢方式, 以便它们能够在这种环境下生存, 这样就可能会有新的活性物质产生。为此, 我们广泛收集川乌、麦冬、黄连、杜仲、黄柏等药用植物的根际微生物, 从中分离高活性菌株。本实验所选用的菌株 MY048 就是在对药用植物川乌的根际土壤中的放线菌前期筛选的基础上, 从分离到的 100 多株放线菌中发现的一株有较强活性菌株。

4.2 放线菌的 genome 提取与 16SrDNA 的扩增

传统的放线菌的系统分类的主要依据是观察其形态特征和生理生化性状, 近年来, 分子分类作为新的分类鉴定手段被引入放线菌的分类中。放线菌的 16SrDNA 序列相对稳定而又高度保守, 分子中含有进化速度不同的区域, 相对分子量约为 1.5kb, 所代表的信息量既能反映其的进化关系, 能够为鉴定提供相对稳定可靠的信息。16SrDNA 是对放线菌进行系统分类、探讨进化比较理想的材料、已被广泛接受并应用^{[92][93]}。

放线菌是一类 (G+C) mol 含量高的 G⁺ 菌, 而且细胞壁较厚, 这就为放线菌基因组的提取以及 16SrDNA 片段的特异扩增带来了一定难度。实验中, 参考了徐平^[94]关于放线菌基因组的提取方法, 经微波处理后, 用琼脂糖检测发现, 电泳图上没有基因组的条带, 可能是微波处理的条件不合适, 没有能破开放线菌的细胞壁; 后来又采用菌落 PCR 的方法直接扩增 16SrDNA 片段, 多次实验后均发现, 在 1.5kb 左右没有出现 16SrDNA 的条带, 可能是在变性的过程中, 由于放线菌的细胞壁较厚, 而没有被打开。参考文献^[95]的提取方法加以改进, 将放线菌在 -20℃ 条件下过夜处理, 在细胞裂解液中加入适量的溶菌酶, 同时延长 65℃ 水浴时间至 2h。对上述改进方法的提取的样品, 进行检

测，得取的基因组条带清晰与完整，适合于进行下一步扩增实验。

在最初的 PCR 实验中，选用的反应体系是普通的 Ex buffer、Taq 酶以及通用引物 27f、1495r，扩增后进行电泳检测，发现没有 16SrDNA 的条带。在对整个反应体系分析后，进行了对照实验，排除了因为反应体系被污染而导致扩增失败因素，考虑到放线菌基因组中的 (G+C) mol 含量较高，于是改采用 2×GC buffer 与 la-taq 酶，同时并提高变性、退火温度，经过反复实验，16SrDNA 的基因片段被扩增出来。

4.3 发酵条件工艺的优化

微生物生产活性产物的能力不仅取决于生产菌种自身的性能，而且需要合适的环境条件，只有这样才能让它的生产能力充分表达出来。影响因素有很多，主要包括碳源、氮源、有机盐、温度、pH 等。本论文通过摇瓶发酵试验，以抗金黄色葡萄球菌的活性为指标，对菌株 MY048 的培养基组成和发酵条件进行了优化。

实验中发现，葡萄糖作为速效碳源，当浓度过高时，活性物质的产量降低，这可能是过量的葡萄糖的代谢产物，减少细胞的环腺苷酸量，因而环腺苷酸从酶合成系统的正控制物 cAMP 受体蛋白质与 cAMP 的复体分离而纯化，降低了酶的合成率从而影响了活性物质的产量；可溶性淀粉作为迟效碳源，单独使用会延缓菌体的生长时间，从而影响活性物质的产量。因此，选用一定比例的葡萄糖、可溶性淀粉共同作为 MY048 的碳源，有利于菌体的生长与活性物质的产生。酵母浸粉与牛肉浸膏中除了含有丰富蛋白质、游离氨基酸、多肽、B 类维生素、糖类、苷酸以及微量元素无机盐和生长因子等各种营养成分外，可能还含有可作为抗生素合成的前体物质。因此适量的加入作为微生物发酵的氮源，会促进微生物发酵生产。通过正交优化实验得出：以 0.5% 葡萄糖与 2% 淀粉为碳源，以 0.5% 酵母浸粉与 0.3% 牛肉浸膏为氮源，最有利于 MY048 合成抗菌活性物质。

在 10L 发酵罐的放大实验中，发现在相同的浓度下的对比实验中，发酵罐中的活性物质的抗菌能力，有一定程度地下降，这可能是发酵罐内的发酵条件与摇瓶的发酵条件存在一定差异，导致菌株的代谢途径发生了一定改变，从而影响了代谢物质的抑菌能力。大量制备有活性的化合物不但需要足够量的发酵产物，而且还要求化合物有良好的活性。所以，从发酵罐的发酵工艺需要在摇瓶发酵试验优化的工艺基础上进行适当的优化改进，以得利高活性

的发酵产物。

4.4 活性物质的分离与纯化

活性物质的分离纯化通常采用活性追踪的方法，因此以抗金葡萄球菌活性为抑菌活性指标，以分离获得抑菌活性物质。有机溶剂萃取是发酵产物提取过程中的一种常用方法。在预实验中，氯仿、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂的萃取液均能表现出一定抑菌活性能力，说明选择有机溶剂萃取 MY048 菌株发酵液中的活性物质的方法是可行。经多次萃取后，水相的抑菌能力很弱，表明抑菌活性物质不在残留的水相中。

对薄层板的分离后的组分进行活性检测后，发现其中几个组分都具有活性，但活性强度不一致。根据它们在薄层板上的色谱行为差异，初步判断可能在发酵液中存在几种有抑菌活性的物质。实验中，发现 GF₂₅₄ 薄层板在紫外 254nm 下的荧光斑点与在碘蒸气染色后上出现的条带位置有一定差异，有可能是某些物质在 254nm 处没有吸收值，没有荧光斑点。在后面的实验中，将两种方法结合起来对活性成分进行检测，增加了实验的准确性。

在高压液相色谱柱的分离过程中，开始选择了甲醇与水做为流动相进行分离，但柱压保持在很高状态，导致无法进行溶剂比例的调整，样品的分离度差。后改用乙腈与水做为的流动相，分离效果比较好。对凝胶柱层析后的样品用 C-18 柱进行半制备，将样品的纯度提高到 96%。

结 论

本研究工作取得的结果如下：

(1) 运用现代分子生物技术，通过对药用植物（川乌）的根际放线菌 MY048 的 16SrDNA 进行序列比对与系统发育分析，结果表明菌株 MY048 为链霉菌属放线菌。

(2) 通过优化性实验，确定 MY048 的液体发酵培养基的组成：可溶性淀粉 1%，葡萄糖 1.5%，酵母浸粉 0.5%、牛肉浸膏 0.3%、CaCO₃ 0.2%、K₂HPO₄ 0.02%；培养条件：最适初始 pH 为 7.0~7.2，最适温度为 28℃，最适接种量为 10%，最佳龄 48h，最佳装液量为 15%，最佳摇床转数为 200r/min，最佳发酵时间为 144h。并在此基础上，进行了 10L 罐发酵放大实验。

(3) MY048 的发酵产物能够抑制多种细菌生长，主要活性物质存在于发酵液，当 pH 6.0~7.0 时在乙酸乙酯相中的分配量最大，同时有着较强的酸碱稳定性与热稳定性。

(4) 运用乙酸乙酯萃取、硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶层析与高压液相色谱等各种分离纯化手段，从菌株 MY048 发酵产物中分离获得 1 个抑菌高活性化合物，纯度达 96%。

致 谢

本论文是在侯大斌教授、阮期平教授的悉心指导下完成的。在我攻读硕士学位的三年中，侯大斌老师对我的指导和教育付出了巨大的心血；侯老师思维敏锐、科学严谨、学识深厚、敬业创新；对我研究上要求严谨，思维上要求开阔，工作中要求认真，所有的一切都深深印在我心中。还要特别感谢绵阳师范学院阮老师的教导、关心和帮助，他们的谆谆教诲和严格要求，将使我受益终身。

本论文是在绵阳师范学院分子生物学与生物制药重点实验室完成的。在论文的实验、分析、学习和写作过程中，得到了绵阳师范学院韩文君讲师、古静燕讲师以及本科生黄跃容、关鹏等的帮助；实验研究工作中，得到了西华师范大学研究生姜立春的大力支持与帮助。此外，还得到了西南科技大学生命学院 04 级研究生舒晓燕、周建、张自伟等同学支持与帮助。在此，表示深深的敬意和感谢！

最后感谢西南科技大学给予我学习进步的机会，感谢绵阳师范学院的学习科研和工作氛围给予我科学严密的思维观念和进步认真的做事风格。再次向帮助过我，批评过我，指导过我的所有的人表示诚心的感谢！

深深地感谢父母，他们给予我默默的关怀、理解和支持！感谢帮助过我的所有的朋友！

赵俊凌

2007 年 4 月

参考文献

- [1] Mark C. Enright D. Ashley Robinson, Gaynor Randle, et al. Spratt The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99 (11):7687-7692.
- [2] 万钧, 李羲, 饶纬华. 耐甲氧西林 *S. aureus* 研究进展[J]. 国外医学呼吸系统分册 2005, 25 (1):30-33
- [3] Murray P R, Baron E J, et al. Manual of Clinical Microbiology. 7th edition [M]. Washington DC: American Society for Microbiology (ASM press), 1999, 1640-1652
- [4] Waksman J H. Waksman Sees Essential Role For Antibiotics [M]. 2000
- [5] Szabo D, Barcs I, Rozgoryi. Extended-spectrum beta-lactamases: an actual problem of hospital microbiology [J]. Acta Microbiol Immunohuns, 1997, 44(4):309-325
- [6] Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure [J]. Antimicrob Agents chemother, 1995, 39:1211-1233
- [7] 金少鸿, 张凤凯, 编译. 抗生素耐药性现状透视[J]. 国外医学药学分册, 2000; 27(2):74-78
- [8] 李家泰. 耐药球菌感染现状和合理治疗的重要性[A]. 中华医学会第七次全国感染病学术会议论文汇编[C], 北京大学临床药理研究所, 2001. P. 24-27
- [9] Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, et al. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter [J]. Bio Chem, 1997, 272:18526-18529
- [10] Okusu H, Ma D, Nikaido H, et al. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants [J]. J Bacteriol, 1996, 178(1):306-308
- [11] 王青松, 崔淑芹, 张舒. 细菌外排泵介导耐药性研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2005, 26(3):97-100
- [12] Pagliero E, Chesnel L, Hopkins J, et al. Biochemical characterization of

- Streptococcus pneumonia penicillin-binding protein 2b and its implication in beta-lactam resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(5):1848-1855.
- [13] Lim T T, Coombs G W, Grubb W B. Genetic organization of *mecA* and *mecA*-regulatory genes in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Australia and England[J]. *Antimicrob Chemother*, 2002, 50(6):819-824
- [14] Robinson D A, Enright M C. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10(2):92-97
- [15] Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors in fluencing methicillin resistance in staphylococci [J]. *Arch Microbiol*, 2002, 178(3):165-171
- [16] Williams S T, Sharpe M E, Holt J C. *Bergey's manual of systematic bacteriology* [M]. Baltimore: Williams' s and Wilkins Company, 1984. 14
- [17] Thompson C J, Fink D, Nguyen L D. Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7):1020.1-1020.4
- [18] Kurosawa K, Takahashi K, Tsuda E. SNF4435C and D, novel immunosuppressant produced by a strain of *Streptomyces spectabilis*. 1. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities [J]. *J Antibiot*, 2001, 54 (7):541-547
- [19] Rakahash K, Tsuda E, Konawa K. SW-163 A and B, novel immunosuppressant produced by *Streptomyces* sp [J]. *J Antibiot*, 2001, 54(11):867-873
- [20] Nabby N G, Bonifacy W. The structure of two Naphthoquinone Pigment from a *Actinomycetes* [J]. *Biochemistry*, 2002, 31:1496-1498
- [21] Capon R J, Skene C, Lacey E, et al. Lorneamides A and B: two new aromatic amides from a southern Australian marine *Actinomycete* [J]. *Nat Prod*, 2002, 63:1682-1683
- [22] Woo J H, Kitamuta E, Myouga H, et al. An antifungal protein Marine bacterium *streptomyces* sp. Strain AP77 specific for *Pythium porphyries*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002,

68(6):2666-2675

- [23] 穆军. 中国东海海洋活性微生物的筛选及活性物质的研究[J]. 二军医大学博士后工作报告, 2003, 152
- [24] 崔洪霞, 李富超, 阎斌伦, KhaledShaaben, 秦松, HartmutLaatsch. 一株产抑制真菌活性全霉素的胶州湾海洋链霉菌[J]. 中国海洋药物杂志, 2006, 2(1):11-16
- [25] Asolkar R N, Maskey R P, Helmke E, et al. Chalcomycin B, a new macrolide antibiotic from the marine isolate streptomyces sp. B7064 [J]. J Antibiot, 2002, 55(10):893-898
- [26] Riedlinger J, Reicke A, Zahner H, et al. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine Verrucosispora strain AB-18-032 [J]. J Antibiot (Tokyo), 2004, 57(4):271-279
- [27] 廖文彬, 黄惠琴, 张开山, 孙前光, 鲍时翔. 海洋放线菌 HSL_6 抗菌物质的发酵优化与性质研究. 微生物学杂志 2005, 7(4):46-50
- [28] Sujatha. P, Bapi Raju K.V.V.S.N, Ramana T. Studies on a new marine streptomycete BT-408 Producing Polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant Staphylococcus aureus [J]. Microbiological Research. 2005, 4(2): 119-126
- [29] 黄惠琴, 吕家森, 张开山, 鲍时翔. 一株抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的海洋放线菌的鉴定及系统发育分析. 中国海洋药物杂志, 2004, 12(6):23-26
- [30] 黄惠琴, 郭夫江, 胡永华, 方哲, 任立成, 鲍时翔. 海洋放线菌活性组分 AM1052 的分离与结构鉴定. 中国海洋药物杂志. 2006, 25(4):17-21
- [31] 张海涛, 靳艳, 吴佩春, 张卫. 一株海绵放线菌的分离鉴定及活性研究. 微生物学通报, 2004, 31(5):60-64
- [32] Woong K, Hyi R, Tae S et al. New Lactone Containing Metabolites from a Marine-Derived Bacterium of the Genus Streptomyces [J]. Nat Prod, 2001, 64:664-667
- [33] Mincer T J, Jensen P R, Fencial W, et al. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments Appl Environ Microbiol, 2002, 68(10): 5005-5011

- [34] Dieter A, Hamm A, Fiedler H-P, Good fellow M, et al (.Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced by a novel alkaliphilic Streptomyces strain [J]. J Antibiotics .2003, 56:639-646
- [35] Takahashi A, Ikeda D, Nakamura H et al. Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological properties [J]. J. Antibiot. 1989, 42: 1556-1561
- [36] Tapiolas D M, Roman M, Finical W. Octalactins A and B: cytotoxic eight-membered-ring lactones from a marine bacterium, Streptomyces sp [J]. Am. Chem. Soc. 1991, 113: 4682-4683
- [37] 曾伟, 邵志宇, 徐庆妍, 郑忠辉, 黄耀坚, 郭跃伟, 苏文金. 海洋放线菌菌株 N350 产生的脂溶性抗肿瘤化合物的研究 [J]. 海洋学报, 2003, 10 (25) :145-150
- [38] Mitchell S S , Nicholson B, Teisan S, Lam K S, et al. Aureoverticillactam, a novel 22-atom macrocyclic lactam from the marine actinomycete Streptomyces aureoverticillatus [J]. Nat Prod, 2004, 67 (8):1400-1402
- [39] 王健, 崔承彬, 顾谦群, 朱伟明, 朱天骄, 刘红兵, 方玉春. 海洋来源黄直丝链霉菌产物中新细胞周期抑制剂的研究 [J]. 中国海洋药物杂志, 2005, 8 (4) :1-3
- [40] Manam R R, Teisan S. anitro-tetraene spiro-beta-lactone-gamma-lactam antibiotic from the marine actinomycete Streptomyces nodosus [J]. J Nat Prod, 2005, 68 (2):240-243
- [41] Hayakawa Y, Sasaki K, Adachi H, Furihata K. Thioviridamide, a novel apoptosis inducer in transformed cells from Streptomyces olivoviridis [J]. Antibiot (Tokyo). 2006, 59 (1):1-5
- [42] Jeong Siskin H J, Kim T S, Lee H S. Streptokordin, a new cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine-derived Streptomyces sp. KORDI-3238 [J]. J Antibiot, 2006, 59 (4):234-240
- [43] Francisco R, Femando E, Julia P B et al. Thiocoraline, a new depsipeptid with antitumor activity produced by a marine Micromonospora. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities [J]. J. antibiot, 1997, 50 (9): 734-737
- [44] Rosa I F, Francisco R. IB-96212, a novel cytotoxic macrolide produced by

- a marine Micromonospora. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities [J]. *J Antibiot*, 2000, (53):474-479
- [45] Ingo H Hardt, Paul R Jensen, William Finical. Neomarinone and New cytotoxic marine derivatives produced by a marine filamentous bacterium (Actinomycetales) [J]. *Tetrahedron Lett.*, 2000, 41(13):2073-2076
- [46] Furumai T, Igarashi Y, Hignchi H, et al. Kosinostatin, a quinocycline Antibiotic with antitumor activity from *Micromonospora* sp. TP-A0468 [J]. *J Antibiot*, 2002, 55(2):128-133
- [47] Hanshan W, Su L, Jun X, et al. Isolation of Streptonigrin and Its Novel Derivative from *Micromonospora* as Inducing Agents of p53- Dependent Cell Apoptosis [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65:721-724
- [48] Haiyin H, Weidong D, Valerie S B, et al. Lomaiviticins A and B, Potent Antitumor Antibiotics from *Micromonospora lomaivitiensis* [J]. *Am Chem Soc*, 2001, 123:53-62
- [49] Lik T, Brian LM, William HG. Lyngbouilloside, Novel Glycosidic Macrolide from the Marine Cyanobacteriu *Lyngbya bouillonii* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65:925-928
- [50] 江红, 林如, 郑卫, 程元荣. 海洋青铜小单孢菌 FIM 02-523 产生的脂肽类化合物 FW523 的分离鉴别和生物学活性[J]. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(5):267-270
- [51] 曲新颜, 顾谦群, 崔承彬, 方玉春, 刘红兵, 朱天骄, 朱伟明. 海洋来源的放线菌 3295 代谢产物的结构鉴定及抗肿瘤活性[J]. *中国海洋药物杂志*, 2004, 12(6):1-3
- [52] 李德海, 顾谦群, 朱伟明, 刘红兵, 方玉春, 朱天骄. 海洋放线菌 11014 中抗肿瘤活性成分的研究 I. 环二肽[J]. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(8):449-452
- [53] 胡继兰, 张春颖, 娜仁等. 产生抗肿瘤抗生素的南极放线菌 3905[J]. *微生物学报*, 2000, 40(6):646-651
- [54] Holtzel A, Dieter A, Schmid DG, Brown R, et al. Lactonomycin Z, an antibiotic and antitumor compound produced by *Streptomyces sanglieri* strain AK 623. *J Antibiot* 2003, 56: 1058-1061
- [55] Jongheon S, Youngman S, Hyi SL, et al. A New cyclic Peptide from a

- Marine-Derived Bacterium of the Genus *Noccardiopsis* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66:883-884
- [56] Bringmann G, Lang G, Maksimenka K, Hamm A, et al. Gephyromycin, the first bridged angucyclinone, from *Streptomyces griseus* strain NTK 14[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(11):1366-1373
- [57] Matthew K R, Shen Y C, Paul R J, et al. Cyclomarins A-C, New Anti-inflammatory Cyclic Peptide Produced by a Marine Bacterium (*Streptomyces* sp.) [J]. *J Am Chem Soc*, 1999, 121:11273-11276
- [58] 黄秀梨. 微生物学实验指导[M]. 中国:高等教育出版社, 2005, 第 114 页
- [59] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 中国:科学出版社, 2002, 第 304-324 页
- [60] 姜成林, 徐丽华, 许宗雄. 放线菌分类学[M]. 昆明:云南大学出版社, 1995, 第 36-37 页
- [61] 崔恒林, 陆玲, 陈一楠, 常青等. 产蓝色素放线菌细胞化学组分及 16SrDNA 序列分析[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(6):25-29
- [62] 张海涛, 靳艳, 虞星炬, 张卫. 16SrDNA_RFLP 分析繁茂膜海绵可培养放线菌的多样性[J]. *微生物学报*. 2005, 45(6):828-831
- [63] 闫莉萍, 洪葵, 胡申才, 刘丽华. 海南近海 30 株抗 B16 细胞活性放线菌的 16SrDNA 多样性分析[J]. *微生物学报*, 2005, 45(2):186-190
- [64] 盖婷婷, 宋学鸣, 钱秀萍, 赵凤生. 一株抗万古霉素耐药菌的抗生素产生菌 AR1148 的鉴定[J]. *工业微生物*, 2005, 35(3):36-38
- [65] 龙建友, 吴文君. 拮抗链霉菌 No. 24 菌株发酵条件优化研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2005, 33(4):52-55
- [66] 廖文彬, 黄惠琴, 张开山, 孙前光, 鲍时翔. 海洋放线菌 HSL26 抗菌物质的发酵优化与性质研究[J]. *微生物学杂志* 2005, 25(4):347~350
- [67] 王东昌. 链霉菌 S-10 菌株发酵条件的研究[J]. *吉林农业大学学报*. 2001, 23(1):35~39
- [68] 刘翠娟, 段琦梅. 抗真菌拮抗放线菌的筛选及摇床发酵条件的优化[J]. *微生物学杂志*. 2004, 24(4):12-14
- [69] 刘秋, 闫建芳, 艾勇, 于基成等. 菌株 MY02 发酵培养基的优化设计[J], *吉林农*

- 业大学学报, 2006, 28(4):361-364
- [70] 张守亮, 陈坚, 华兆哲, 堵国成. Thermobifidafusca WSH03211 突变合成角质酶的发酵条件[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(5):44-48
- [71] 黄惠琴, 吕家森, 欧阳范献, 鲍时翔. 抗 MRSA 海洋小单孢菌 AM105 发酵工艺的优化[J]. 药物生物技术, 2005, 12(1):39-42
- [72] 张波, 白红进, 付骋宇, 吴文君. 农用抗生素产生菌 2139 菌株的稳定性[J]. 植物保护, 2004, 30(5):26-29
- [73] 李勇, 李铭刚. 放线菌 YIM31249 发酵液萃取物的抗菌活性初步研究[J]. 化工时刊, 2004, 18(5):45-47
- [74] 田小卫, 龙建友, 白红进. 一株放线菌次生代谢产物抗菌活性的初步研究[J]. 植物保护, 2004, 30(2):51-54
- [75] 朱九滨, 洪葵, 庄令, 张鹏. 红树林细胞毒活性放线菌的筛选及其所产活性物质的初步研究[J]. 华南热带农业大学学报, 2005, 11(3):5-8
- [76] 李东平, 龙建友等. 放线菌 LDP-18 发酵液杀菌活性研究[J]. 西北农业学报, 2005, 14(1):102-105
- [77] 林亲雄, 奚涛, 刘纯慧, 谷俊, 邢莹莹. 海洋放线菌 M326 活性代谢产物的初步研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2006, 25(1):44-47
- [78] 赵刚, 吴元华. 一株链霉菌发酵液的抗菌谱及稳定性[J]. 农药, 2006, 45(8):525-528
- [79] 裴月湖等. 天然药物化学实验[M]. 人民卫生出版社, 2005, 54-65
- [80] 廖文彬, 鲍时翔. 红树林放线菌产抗菌活性物质的分离纯化研究[J]. 药物生物技术, 2004, 11(6), 376~380
- [81] 裴月湖等. 天然药物化学实验[M]. 人民卫生出版社, 2005, 19-30
- [82] 解修超, 梅文莉, 戴好富等. 海洋放线菌 124092 细胞毒活性和化学成分研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4):119-122
- [83] 张李桃, 孙军利, 顾学斌, 陶黎明, 张一宾. 放线菌 SPRI0518 次级代谢产物的分离提纯及结构鉴定[J]. 化学与生物工程, 23(9):29-31
- [84] 裴月湖等. 天然药物化学实验[M]. 人民卫生出版社, 2005, 86-94
- [85] Gillian M N, Gerald L, Newton R C, et al. Novel Bromotyrosine Alkaloids:

- Inhibitors of Mycothiol S-Conjugate Amidase [J]. *Organic Letters*, 2001, 3(10):1543-1545
- [86] Jose S L, Marta M I, Julia P B, et al. New Cytotoxic Indolic Metabolites from a Marine *Streptomyces* [J]. *J Nat Prod*, 2003, 66:863-684
- [87] Charan R D, Schlingmann G, Janso J, Bernan V, Feng X, Carter G T. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. *J Nat Prod*. 2004, 67(8):1431-1433
- [88] Castillo U F, Strobel G A, Ford E J, et al. Munumbicins, wide spectrum Antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL30562, endophytic on *Kennedia nigricans* [J]. *Microbiology*, 2002, 148:2675-2685
- [89] Castillo U F, Strobel G A. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL30566, an endophyte of *Grevil leapteridifolia* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 224:183-190
- [90] 张克诚, 李研学, 贾恩宽, 等. 拮抗链霉菌 S-5 对棉花病害的防治作用. *中国农学通报*, 2002, 18(2):26-29
- [91] 廖昌珑, 李文鹏, 刘士清, 王启方. 三七根际链霉菌 *Streptomyces*. 0233 木聚糖酶性质研究. *土壤通报*, 2005, 36(4):591-593
- [92] 余利岩, 刘红宇, 黄明玉, 陈睦等. *Actinobacteria* 分离株的多相分类学研究. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(11):641-652
- [93] 阮继生. 放线菌纲内-亚纲、目、亚目、科的 16SrDNA/rRNA 特征序列简介. *微生物学通报*, 2005, 32(3):129-134
- [94] 徐平, 李文均, 徐丽华, 姜成林. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA [J]. *微生物学通报*, 2003, 30(4):82-84
-

攻读硕士学位期间发表的学术论文及研究成果

一、发表的论文

[1] 赵俊凌,古静燕,侯大斌,阮期平.放线菌 MY048 中活性成分的初步研究.化工时刊,2006,20(12):6-9

[2] 赵俊凌,古静燕,侯大斌.海洋放线菌抗肿瘤活性物质研究进展.绵阳师范学院学报,2007,26(2):91-94

二、参与的科研项目

1 与绵阳师范学院重点科研项目“山茱萸多糖的抗肿瘤活性研究”[NO. MA 2004007] (项目主持人:阮期平 教授)。2004 年 9 月—2006 年 9 月。已结题。成果形式:报告、论文。

2 参与四川省教育厅应用基础项目“凤仙花航天诱变株的制备工艺”[NO. 2005B049] (项目主持人:罗英 副教授)。2007 年 1 月—2008 年 12 月,在研。

作者: [赵俊凌](#)
学位授予单位: [西南科技大学](#)

相似文献(1条)

1. 学位论文 [袁丽杰](#) 若干分离自药用植物根际土的稀有放线菌的分类鉴定及其活性产物的初步研究 2008

植物根际是微生物生长的特殊微生态环境,根际微生物在种类和数量上往往不同于非根际微生物。越来越多的研究表明,从根际微生态环境中分离得到的许多微生物具有重要生物活性,因此,植物根际微生物是一类值得深入研究与开发的微生物资源。本研究采用稀有放线菌选择性分离方法,从我国云南及重庆地区采集的60余种我国特有的药用植物的根际土样中分离得到近1000株根际放线菌。根据菌株的形态特征并结合代谢产物的生物活性,挑选了部分分离株进行系统的分类鉴定,包括形态特征和生理生化特性测定、细胞化学组分分析、16S rRNA基因序列相似性比对、基因组DNA G+C mol%和DNA-DNA同源性测定等的多相分类研究。从表型、基因型及系统发育三个层次确定其分类地位。本研究从新分离根际微生物和菌库保藏的菌株中,挑选出9株菌,进行系统的分类研究。菌株I05-00074T被鉴定为糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)的一个新种,命名为*Saccharopolyspora antimicrobica* sp. nov., 文章已发表在IJSEM, 2008, 58, 1180-1185; 菌株I03-09939代表了一个新属-异型束丝放线菌属(*Actinoallosynnema* gen. nov.), 命名为*Actinoallosynnema albus* sp. nov., 文章已撰写完成; 菌株I06-02230为放线多形态菌属(*Actinopolymorpha*)的一个新种,命名为*Actinopolymorpha cephalotaxus* sp. nov., 文章已撰写完成; 菌株I06-02658为糖霉菌属(*Glycomyces*)的一个新种,命名为*Glycomyces chongqingensis* sp. nov. (文章在整理中); 菌株I06-03147为动孢囊菌属(*Kineosporia*)的一个新种,命名为*Kineosporia aconitum* sp. nov. (文章在整理中)。分离所得1000株根际放线菌菌株经发酵和多种筛选模型的检测,显示出多种生物活性,包括抗G⁺细菌, G⁻细菌, 酵母, 丝状真菌及其他生理活性, 初筛总阳性率达31%。选取其中具有抑制绿脓杆菌SecA蛋白活性的放线多形态菌属新种I06-02230进行了扩大发酵和活性组分的分离提取,对活性成分2230A进行了初步研究,鉴于该属菌株未有生物活性报道,因此,推测2230A可能为一个新化合物,至少是一个首次从放线多形态菌属菌株代谢产物中分离得到的活性化合物。本研究首次对我国特有的若干药用植物根际放线菌资源开展了选择性分离研究和生物活性研究。所取得的初步研究成果对于充分认识我国药用植物根际微生物资源的多样性有重要意义,也为今后药用植物根际微生物资源的深入开发利用提供了可靠的实验依据。另外,在“新菌”产生“新素”的思想指导下,本论文工作实践了“通过挖掘新种来提高新药筛选的效率和命中率”的筛选策略,并取得初步成效。

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis_Y1196641.aspx

下载时间: 2009年9月17日