

产非达霉素药用植物内生放线菌N12W0304的分类鉴定

丁彦博 穆云龙 霍培元 单越琦 徐岩 路新华* 张雪霞*
(微生物药物国家工程研究中心, 河北省工业微生物代谢工程技术研究中心,
华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 石家庄 050015)

摘要: **目的** 对一株分离自药用植物仙鹤草中的产非达霉素菌株N12W0304进行分类研究。**方法** 通过形态特征、培养特征观察、生理生化特征、胞壁分析及16S rDNA序列分析等多相分类研究对菌株进行鉴定。**结果** 菌株N12W0304属于游动放线菌属(*Actinoplanes* sp.)菌株。**结论** 本报道是首次从仙鹤草中分离到游动放线菌属非达霉素产生菌。

关键词: 非达霉素; 仙鹤草; 内生放线菌; N12W0304; 分类鉴定; 游动放线菌属

中图分类号: Q939.13 文献标志码: A

Taxonomic studies on a fidaxomicin-producing strain N12W0304 isolated from the medicinal plant

Ding Yan-bo, Mu Yun-long, Huo Pei-yuan, Shan Yue-qi, Xu Yan, Lu Xin-hua and Zhang Xue-xia
(National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Hebei Industry Microbial Metabolic Engineering & Technology Research Center, New Drugs Research & Development Company of North China Pharmaceutical Group Corporation, Shijiazhuang 050015)

Abstract Objective Taxonomic studies on a fidaxomicin-producing strain N12W0304 which was isolated from the medicinal plant *Agrimonia pilosa* Ledeb. **Methods** The strain N12W0304 was identified based on morphological, physiological and biochemical characteristics, cell wall components, as well as the sequence analysis of 16S rDNA. **Results** The polyphasic taxonomical studies showed that the strain N12W0304 belonged to *Actinoplanes* sp. **Conclusion** This is the first report of a fidaxomicin-producing strain isolated from *Agrimonia pilosa* Ledeb.

Key words Fidaxomicin; *Agrimonia pilosa* Ledeb; Endophytic actinobacteria; N12W0304; Identification; *Actinoplanes*

由艰难梭菌(*Clostridium difficile*)感染所导致的腹泻、结肠炎和其他肠道疾病具有高致病性和高致死率的特性。欧洲已将该菌列为强制监测病原体, 在欧洲疾病预防控制中心(European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC)领导下分别于2002年、

2005年和2008年进行了3次全欧洲流行病学调查。长期以来, 艰难梭菌相关性腹泻(*Clostridium difficile*-associated diarrhea, CDAD)治疗一直是医学界研究的重大课题, 寻找治疗CDAD的新药更是药物研究人员的重要任务^[1]。2011年5月27日, 美国食品药

收稿日期: 2017-01-10

基金项目: 国家重大新药创制项目(No. 2014ZX09201001-003和No. 2012ZX09301002-003); 国家自然科学基金项目(No. U1403101)

作者简介: 丁彦博, 女, 生于1979年, 硕士, 高级工程师, 主要从事微生物创新药物研究, E-mail: ncpcdyb@163.com

*通讯作者, 路新华, E-mail: luxinhua89@hotmail.com; 张雪霞, E-mail: zhangxuexiazxx@163.com

品监督管理局(FDA)批准Optimer公司研发的非达霉素(fidaxomicin)上市,用于治疗CDAD。非达霉素(fidaxomicin, difucid, lipiarmycin, tiacumicin B, OPT-80, PAR-101)又名非达米星,是一种具有18元环结构的大环内酯类抗生素,其抗菌作用机理新颖,主要通过抑制细菌的RNA聚合酶而产生迅速的抗艰难梭菌感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)作用。该药为近年来FDA批准的非常少的微生物药物,相比较之前标准治疗方法的甲硝唑和万古霉素,非达霉素对耐万古霉素艰难梭菌有效,降低了45%的复发率^[2]。

本课题组在进行微生物来源的新药筛选过程中,从药用植物仙鹤草中分离到一株产生非达霉素的放线菌菌株N12W0304,这是首次报道从该植物中分离到非达霉素产生菌。本研究通过形态特征、生理生化、胞壁分析及16S rDNA序列等多相分类方法对菌株N12W0304进行分类鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验设备及试剂

体视显微镜(Olympus公司,型号SZX7),光学显微镜(Olympus公司,型号CX31),扫描电子显微镜(日立公司,型号S-3500N),PCR仪(Gene公司,型号Veriti™),紫外凝胶成像仪(Fujifilm公司,型号LAS-3000);DAP标准品和糖标准品购自Sigma公司,其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 植物内生放线菌分离

仙鹤草样品采集自云南(北纬23°22'39.648",东经104°47'17.0808",海拔1498m),样品采集后保存于4℃,并尽快进行菌株分离。

仙鹤草样品经自来水多次冲洗除去表面泥土后,在无菌条件下依次采用如下程序进行表面消毒:0.01% Tween-20处理1min,有效氯含量为4.5%~5%的次氯酸钠处理3min,无菌2.5%硫代硫酸钠处理10min,75%乙醇处理5min,无菌水清洗3~4次,无菌10%碳酸氢钠浸泡10min。表面消毒后的仙鹤草样品经无菌滤纸充分吸干水分,在无菌条件下粉碎后撒在分离培养基平板上,于28℃培养3~6周,待放线菌菌落长出后,挑取至高氏1号培养基^[3],纯化后培养于ISP2斜面培养基。

分离培养基采用5种,分别为自来水酵母粉琼脂

(TWX9)^[4],酵母酪素琼脂(YECD)^[4],腐植酸维生素琼脂(HV)^[5],1/10营养琼脂(NA)^[6],水琼脂(WA)培养基^[6]。其中,除了WA外,其余培养基均补充放线菌酮和制霉菌素各50μg/mL。纯化采用高氏1号培养基。

菌株N12W0304在ISP2斜面培养基上28℃培养14d左右,用20%甘油于-80℃保存菌体。

1.2.2 菌株分类鉴定

(1)形态学特征:用ISP2-ISP7标准培养基对菌株进行划线培养和埋片培养,于28℃分别培养7、14、21和28d进行观察,选取生长较好的培养基的典型菌落形态,用体视显微镜进行宏观菌落拍摄;选取生长较好的培养基上的埋片分别于光学显微镜和扫描电子显微镜下对菌株菌丝形态进行拍摄。

(2)培养特征:将菌株接种于ISP2-ISP7标准培养基上,于28℃培养14~21d,观察其培养特征,菌株的颜色以《链霉菌鉴定手册》^[7]附录的色谱记录。

(3)细胞壁化学成分分析:全细胞壁氨基酸分析和全细胞糖分析按照徐丽华等^[8]对放线菌系统学研究中的方法进行。

(4)生理生化特征:对菌株的碳源利用、酶学特性实验和生长温度实验等生理生化特征的观察,同样参考文献^[8]进行。

(5)菌株16S rDNA序列分析:①基因组DNA提取:对菌株的基因组DNA提取参考文献^[8]的微波法进行。②16S rDNA序列扩增及测序:(a)扩增引物序列如下^[8]:27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';1492r:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。(b)PCR扩增体系及条件:菌株16S rDNA序列扩增体系见表1。PCR扩增条件为:95℃预变性5min→95℃变性1min、55℃退火1min、72℃延伸3min(共30个循环)→72℃后延伸5min。PCR产物经纯化后送上海生

表1 菌株的16S rDNA序列扩增体系
Tab. 1 Amplification system of 16S rDNA sequence

体系	加量/μL
DNA模板	2
引物27f	2
引物1492r	2
dNTPs(2.5mmol/μL)	4
Taq DNA聚合酶	0.25
10×PCR Buffer	5
ddH ₂ O	34.75

工生物工程技术公司测序。③系统进化树的构建和分析：将菌株的16S rDNA序列利用BLAST分析软件在Gen Bank中进行比对，选取同源性高的典型菌株的16S rDNA序列作为参比对象，然后用CLUSTAL X软件进行分析，并用MEGA 5软件中的邻接法和最大似然法进行系统发育分析。

2 结果与分析

2.1 形态学特征

菌株N12W0304在ISP2培养基上无气丝，菌落呈现瓜瓢粉色，近圆形，直径约3.0~3.5mm，边缘不整齐，表面有皱褶状凸起(图1)。基内菌丝纤细、不断裂。孢囊从基丝长出，呈近球形，直径约12~15μm，表面不光滑(图2~3分别为菌株光学显微镜和扫描电镜下观察到的基内菌丝及其上着生的孢囊形态)。其基丝上着生近球形孢囊，属于游动放线菌属(*Actinoplanes*)典型形态特征。

2.2 培养特征

菌株N12W0304在ISP2-ISP6培养基上培养14d，无气丝，基丝呈现瓜瓢粉或者落英淡粉色，表面有皱褶或粗糙；在ISP7培养基上基丝呈鲑鱼红色，有春梅红色可溶性色素，具体培养特征如表2所示。

2.3 细胞壁化学成分分析

菌株N12W0304的全细胞壁氨基酸分析含有内消



图1 菌株N12W0304在ISP2培养基上的单菌落形态
Fig. 1 Colony morphology of strain N12W0304 in ISP2 medium



图2 菌株N12W0304光学显微镜下形态
Fig. 2 Mycelium morphology of strain N12W0304 by optical microscope



图3 菌株N12W0304电子显微镜下形态
Fig. 3 Mycelium morphology of strain N12W0304 by scanning electron microscope

表2 菌株N12W0304的培养特征
Tab. 2 Culture characteristics of strain N12W0304

培养基	生长情况	表面状态	基丝颜色	可溶性色素
ISP2	+++	皱褶多	瓜瓢粉(III14')	无
ISP3	+	皱褶	瓜瓢粉(III14')	无
ISP4	++	硬质	落英淡粉(III12')	无
ISP5	+++	粗糙	瓜瓢粉(III14')	无
ISP6	++	粗糙	落英淡粉(III12')	无
ISP7	+++	皱褶	鲑鱼红(IV25')	春梅红(VI53')

注：“+”、“++”和“+++”分别表示生长弱、中等和良好

旋二氨基庚二酸(meso-DAP)和甘氨酸，胞壁II型；全细胞糖型D，含有木糖和阿拉伯糖。符合游动放线菌属(*Actinoplanes*)胞壁特征。

2.4 生理生化特征

2.4.1 碳源利用情况

菌株N12W0304可以利用葡萄糖、阿拉伯糖、蔗糖、木糖、甘露醇、果糖、鼠李糖、甘露糖、乳糖等大多数实验用糖，不利用肌醇、棉籽糖、纤维素和水杨苷。

2.4.2 酶学特性实验特征

在酶学特性实验中，菌株N12W0304淀粉水解、硝酸盐还原和明胶液化呈阳性，过氧化氢酶反应和酪氨酸酶反应、牛奶凝固和胨化以及纤维素分解阴性，苹果酸钙水解不确定。

2.4.3 生长温度实验

菌株N12W0304在26~40℃生长，在42℃以上不生长，在28~30℃生长最好。

2.5 16S rDNA序列分析

对菌株N12W0304的16S rDNA序列进行扩增并测序，得到1430个有效碱基。将序列提交GenBank后获得登录号KX664460，通过对序列进行BLAST

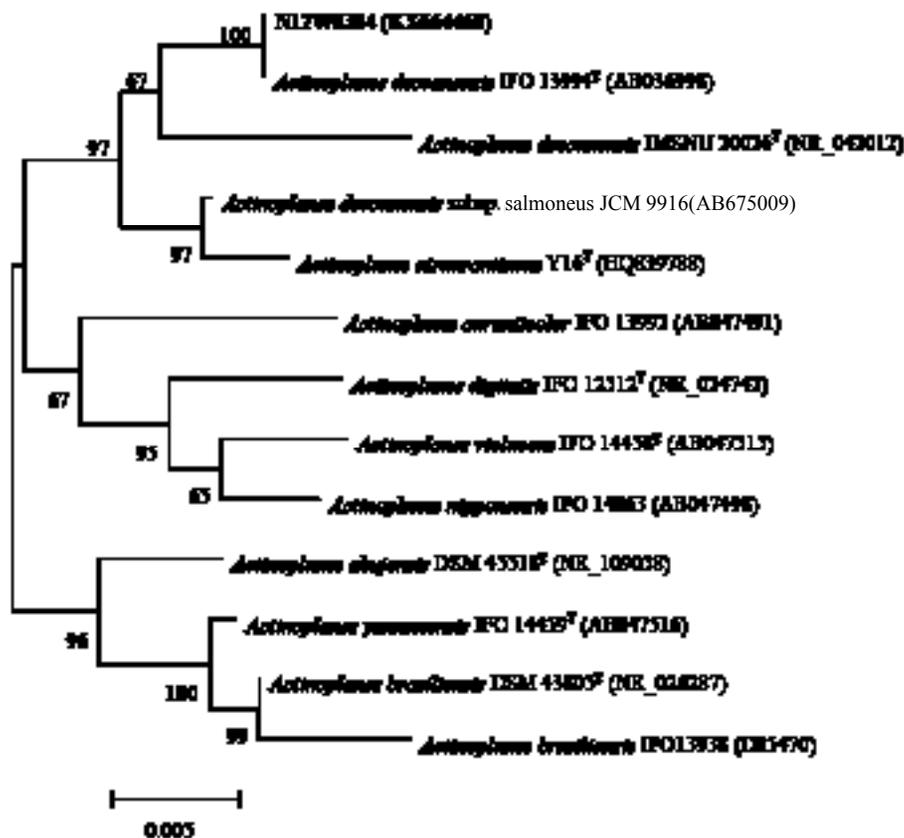


图4 基于16S rDNA序列分析构建的菌株N12W0304的系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree of strain N12W0304 based on the sequence analysis of 16S rDNA

比对, 选取同源性高的典型菌株16S rDNA序列作为参比对象, 然后用CLUSTAL X软件进行分析, 并用MEGA 5软件中的邻接法和最大似然法进行系统发育分析, 构建的系统发育树如图4所示。

从图4系统发育树结果看, 非达霉素产生菌N12W0304属于游动放线菌属(*Actinoplanes*)。N12W0304与菌株*A. deccanensis* IFO 13994^T (AB036998)聚为一支, 证明二者系统进化关系最近, 且N12W0304与该菌株的序列相似性也最高, 达到100%。这2株菌株与菌株*A. deccanensis* IMSNU 20026^T (NR_042012)聚为一支, 成为一个相对独立的分支, N12W0304与*A. deccanensis* IMSNU 20026^T (NR_042012)的序列相似性为98.63%。与该分支进化关系接近的还有菌株*A. deccanensis* subsp. *salmonus* JCM 9916 (AB675009)和*A. atraurantiacus* Y16^T (HQ839788), N12W0304与二者的序列相似性分别为99.2%和98.84%。此外, 与N12W0304序列相似性在98%以上的菌株还有*A. yunnanensis* IFO 14459^T (AB047516)和*A. brasiliensis*

DSM 43805^T (NR_026287), 其序列相似性分别为98.19%和98.12%, 但在系统进化树上的关系明显较远。与其他序列相似性低于98%的菌株, 在系统发育树上的关系也较远。

3 讨论与结论

综合以上形态学、培养特征、生理生化特征、细胞壁类型分析和16S rDNA序列分析结果, 非达霉素产生菌N12W0304属于游动放线菌属(*Actinoplanes*)菌株, 与德干高原游动放线菌*Actinoplanes deccanensis* IFO 13994^T (AB036998)最为接近。

文献报道的非达霉素产生菌主要有游动放线菌属(*Actinoplanes*)的德干高原游动放线菌(*A. deccanensis*) ATCC21983菌株^[9-10]、指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)的橙黄指孢囊菌哈姆登亚种(*D. aurantiacum* subsp. *hamdenensis*) NRRL18085菌株^[11-14]和链孢菌属(*Catellatospora*)的菌株Bp3323-81^[15]。将本研究分离到的游动放线菌属菌株N12W0304与报道的德干高原游动放线菌ATCC21983菌株^[9-10]进行比较, 在形态学

方面,菌株ATCC21983^[9-10]在琼脂上形成大量直径4~7 μm 的孢囊,孢囊球形有不规则表面^[9],这与菌株N12W0304较为相似;在培养特征方面,ATCC21983菌株^[9-10]在ISP2-ISP6培养基上无气丝,基丝呈现浅橙色、浅琥珀色和橙色,在ISP7培养基上基丝呈琥珀色至浅棕色,有棕色可溶性色素,表面有皱褶或者硬质、粗糙,这与菌株N12W0304呈现粉色为主以及可溶性色素有所不同;在生理生化特征上,菌株N12W0304和ATCC21983^[9-10]的碳源利用情况较为接近,二者仅在甘露醇、果糖的利用上有所不同,在酶学特征性实验中,二者除了苹果酸钙水解反应不确定之外,仅在酪氨酸酶反应结果上有所不同,也较为相似。从生长温度看,菌株ATCC21983^[9-10]在26~42 $^{\circ}\text{C}$ 生长,在28 $^{\circ}\text{C}$ 生长最好,在42 $^{\circ}\text{C}$ 生长这在游动放线菌属中是较为少见的^[9],与菌株N12W0304明显不同。可见,在形态学和生理生化特征方面,菌株N12W0304与ATCC21983^[9-10]较为接近,但在培养特征和生长温度方面二者较为不同,可见本研究分离到的游动放线菌属非达霉素产生菌N12W0304与报道的该属非达霉素产生菌ATCC21983^[9-10]不同。

上述报道的包括游动放线菌属菌株ATCC21983^[9-10]在内的非达霉素产生菌均分离自土壤样品,而本研究的菌株N12W0304分离自药用植物仙鹤草,不同的生境来源也决定了该菌株与同属菌株ATCC21983^[9-10]的不同。在最新版的伯杰氏细菌鉴定手册(2012年第5卷)中收录的以及后续几年在International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology、Systematic and Applied Microbiology、Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology和Actinomycetologica等杂志上有效发表的游动放线菌属菌株中,绝大多数分离自土壤以及沉积物样品^[16],分离自其他生境的主要有分离自地衣的*A. lichenis*^[17]、分离自虎皮兰根际的*A. rhizophilus*^[18]、分离自大豆根的*A. hulinensis*^[19]、以及分离自落叶层的*A. tropicalis*和*A. cibodasensis*菌株^[20],分离自药用植物仙鹤草的游动放线菌属菌株未见报道。

仙鹤草,又名龙茅草、黄龙尾、脱力草、瓜香草、老牛筋和狼芽草,是一种在临床上运用较广的药用植物,具有止血、强心、抗菌和驱虫等功效。

近几年对其内生真菌的分离及其抗菌活性的研究较多,如陈笑笑等^[21]的研究,分离到对金黄色葡萄球菌具有抑菌活性的菌株;傅若秋等^[22]对21种中草药提取物对MRSA的抗菌作用的研究发现,仙鹤草和半枝莲提取物具有明显的抗MRSA作用,尤其是仙鹤草水提物的杀菌活性最强,浓度为25mg/mL时杀菌率达100%,而对于其内生放线菌的研究相对较少。药用植物内生菌是影响宿主活性成分积累的一大因素已经被多种研究所证实^[23],本研究获得的可以产生抗艰难梭菌抗生素非达霉素的内生游动放线菌属菌株N12W0304为研究仙鹤草内生放线菌与宿主的活性成分的关系提供了宝贵的材料。

综上所述,本研究从药用植物仙鹤草中分离得到的一株产生非达霉素的内生放线菌N12W0304,通过形态学、培养特征、生理生化特征、细胞壁类型分析和16S rDNA序列分析等结果,该菌株属于游动放线菌属(*Actinoplanes*)菌株,与德干高原游动放线菌*Actinoplanes deccanensis* IFO 13994^T(AB036998)最为接近,其不同于以往报道的非达霉素产生菌,且是首次报道从仙鹤草中分离到的游动放线菌属菌株。该菌株为后续研究仙鹤草内生放线菌与宿主的活性成分的关系提供了宝贵的实验材料。

参考文献

- [1] 徐浩,汤飞,詹佩君,等.一种游动放线菌菌株及其应用:CN104560766A[P].2015-04-29.
- [2] 胡海峰,詹阳.一种从发酵液中分离和纯化非达霉素的工艺:CN104846043A[P].2015-08-19.
- [3] 阮继生,刘志恒,梁丽糯,等.放线菌研究及应用[M].北京:科学出版社,1990:2-18.
- [4] Coombs J T, Franco C M M. On and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(9): 5603-5608.
- [5] Hayakawa M T, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, ew method for the selective isolation of soil actino-mycetes[J]. *J Ferment Bioeng*, 1987, 65(5): 501-509.
- [6] Castillo U, Giles S, Strobel G A, et al. Scanning electron microscopy of some endophytic streptomycetes in snakevine-*Kennedia nigricans*[J]. *Scanning*, 2005, 27(6): 305-311.
- [7] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组.链霉菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1975.
- [8] 徐丽华,李文均,刘志恒,等.放线菌系统学——原理、方法及实践[M].北京:科学出版社,2007.

- [9] Parenti F, Pagani H, Beretta G. Lipiarmycin, a new antibiotic from actinoplanes. I. Description of the producer strain and fermentation studies[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1975, 28(4): 247-252.
- [10] Coronelli C, Parenti F, White R, *et al.* Lipiarmycin and its preparation: US 3978211[P]. 1976-08-31.
- [11] Theriault R J, Karwowski J P, Jackson M, *et al.* Tiacumicins, a novel complex of 18-membered macrolide antibiotics. I. Taxonomy, fermentation and antibacterial activity[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1987, 40(5): 567-574.
- [12] James B M, Marianna J, James K, *et al.* Tiacumicin compounds: US 4918174[P]. 1990-04-17.
- [13] Xiao Y, Li S M, Niu S W, *et al.* Characterization of tiacumicin B biosynthetic gene cluster affording diversified tiacumicin analogues and revealing a tailoring dihalogenase[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(4): 1092-1105.
- [14] 肖毅, 李苏梅, 马亮, 等. 台勾霉素生产菌指孢囊菌NRRL 18085遗传操作体系的建立[J]. *微生物学报*, 2010, 50(8): 1014-1022.
- [15] Kurabachew M, Lu S H J, Krastel P, *et al.* Lipiarmycin targets RNA polymerase and has good activity against multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(4): 713-719.
- [16] Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H J, *et al.* Bergey's manual of systematic bacteriology, second edition, volume five-the actinobacteria[M]. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2012.
- [17] Phongsopitanun W, Matsumoto A, Inahashi Y, *et al.* *Actinoplanes lichenis* sp. nov., isolated from lichen[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016, 66(1): 468-473.
- [18] He H, Xing J, Liu C, *et al.* *Actinoplanes rhizophilus* sp. nov., an actinomycete isolated from the rhizosphere of *Sansevieria trifasciata* Prain[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2015, 65(12): 4763-4768.
- [19] Shen Y, Liu C, Wang X, *et al.* *Actinoplanes hulinensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soybean root (*Glycine max* (L.) Merr)[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103(2): 293-298.
- [20] Nurkanto A, Lisdiyanti P, Hamada M, *et al.* *Actinoplanes tropicalis* sp. nov. and *Actinoplanes cibodasensis* sp. nov., isolated from leaf litter[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2015, 65(11): 3824-3829.
- [21] 陈笑笑, 于海宁, 应优敏, 等. 仙鹤草内生真菌的分离鉴定与抗菌活性[J]. *浙江工业大学学报*, 2011, 39(1): 39-43.
- [22] 傅若秋, 余琼, 孟德胜, 等. 21种中草药提取物对MRSA的抗菌作用研究[J]. *中国药房*, 2011(43): 4056-4058.
- [23] 于海宁, 姚振, 沈生荣, 等. 不同产地仙鹤草内生真菌分布及活性菌株筛选[J]. *浙江工业大学学报*, 2013, 41(3): 260-264.