

# 平板影印与 AHBA 合成酶基因筛选用于安莎类 抗生素产生菌的分离

徐 祯, 徐庆妍, 胡志钰, 郑忠辉, 黄耀坚\*

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 基因筛选是筛选具有抗生素产生潜力微生物的新方法. 针对筛选中单菌落分离纯化不仅工作量大, 而且耗费时间, 采用一种将平板影印技术与 PCR 扩增技术相结合从土壤中快速获得具有安莎类抗生素产生潜力的放线菌的方法. 根据安莎类抗生素合成途径中的 3-氨基-5-羟基苯甲酸合成酶(AHBAs)基因的保守性, 通过放线菌的培养、影印、AHBAs 基因的 PCR 扩增, 已从 33 份土样中获得 8 株 AHBAs 阳性菌株. 结果表明: 该方法是一种非常有效的能够快速获得 AHBAs 基因阳性菌株的方法, 并且该方法可扩展用于从土壤中分离其他有价值的抗生素产生菌.

**关键词:** 放线菌; 3-氨基-5-羟基苯甲酸合成酶基因; 高通量筛选; PCR 扩增; 平板影印

中图分类号: Q 935

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2012)01-0107-05

放线菌的代谢产物是研发临床抗生素的主要来源, 目前已知的具有生物活性的次级代谢产物约有半数来源于放线菌, 这些具有生物活性的次级代谢产物包括: 杀菌剂、肿瘤抑制剂和酶<sup>[1]</sup>. 过去的 50 年, 人们在新药的探索中, 在放线菌分离这一领域投入了大量的精力, 其中通过传统筛选方法, 从放线菌及真菌中分离获得许多天然产物, 有的已研发成药物, 广泛地用于临床治疗<sup>[2]</sup>, 然而, 传统的筛选方法已经无法满足当今人们对新型化合物探索的要求.

基因筛选相对于传统的筛选方法, 更具有目的性, 它能够筛选特定的抗生素产生菌. 鉴于已经获得了许多抗生素合成基因的全序列, 使得预测菌株是否具有特定抗生素产生潜力成为可能<sup>[3]</sup>. 在过去的 10 年中, 基因筛选技术获得了广泛的关注, 并且成功筛选获得了很多具有价值的抗生素<sup>[4-6]</sup>.

安莎霉素包括苯安莎霉素和萘安莎霉素, 属于大环内酯类抗生素, 大多由植物和放线菌产生<sup>[7-8]</sup>. 许多安莎类抗生素, 例如: 格尔登霉素和利福霉素已经用于临床试验和治疗. 研究表明, 安莎类抗生素是由同一个起始单元 3-氨基-5-羟基苯甲酸(AHBA), 通过 I 型聚酮途径合成的. AHBA 的合成至少需要 7 个酶的作

用. 这 7 个酶中, 3-氨基-5-羟基苯甲酸合成酶(AHBAs)是催化 AHBA 合成最后一步的酶<sup>[9-10]</sup>, 由此检测 AHBAs 的存在与否判断放线菌是否具有安莎类抗生素产生潜力<sup>[5-6]</sup>.

尽管基因扩增技术使得人们更加容易寻找目标抗生素产生菌, 但在基因扩增前菌株的分离、纯化还无法实现高通量<sup>[5-6, 11]</sup>. 针对这一问题, 本文对基因扩增技术进行了改进, 实现了高通量筛选. 建立了高通量筛选安莎类抗生素产生菌的方法, 筛选出 8 株 AHBAs 基因阳性菌株, 并对其进行了初步的化学分析.

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

33 份土样来源于厦门大学后山植物根际土壤、昆明市植物根际土壤及青海乐都植物园植物根际土壤. 土样于室温下自然风干 30 d.

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 放线菌的分离

1 g 土样于无菌水中梯度稀释 10 倍, 100 倍, 获得土壤悬液. 100  $\mu$ L 土壤悬液涂布于高氏一号培养基平板(50 mg/L 重铬酸钾), 28  $^{\circ}$ C 培养 11 d.

#### 1.2.2 平板影印

采用经典影印法<sup>[12]</sup>, 木质的影印印章外面套有一个尼龙布, 一起高温高压灭菌. 11 d 后, 挑选菌落数在 40~120 个之间的平板用于影印. 印章首先紧密无滑

收稿日期: 2011-02-28

基金项目: 中央高校基本业务费资助项目(2010121092, 2011121037); 科技部国际科技合作项目(2007DFA30970)

\* 通信作者: yjh@xmu.edu.cn

动地与原始平板接触,之后紧密无滑动地分别和影印1板和影印2板(高氏一号培养基无添加重铬酸钾)接触.平板于28℃培养6d,获得和原始平板菌落分布相似的2个影印板.

1.2.3 DNA提取及AHBAs基因扩增

DNA提取及AHBAs基因扩增按图1所示的3个步骤进行:

1) 用5 mL 无菌水将影印2板所有菌落孢子洗脱,3 000 r/min离心收集.混菌DNA提取及纯化参考文献[13].用于PCR扩增的引物、体系及程序参考文献[6],珍贵束丝放线菌(*Actinosynnema pretiosum*) ATCC 31565用作PCR扩增的阳性对照.

2) 影印2板基因扩增出现阳性条带后,将与之对应的影印1板划分为4部分,对这4部分分别进行1)中的操作,确定阳性菌株所在区域.

3) 将原始平板中与影印1板阳性菌株所在区域的所有菌落分别挑至斜面(高氏一号培养基)28℃培养6d,再将斜面菌株转接至无菌的6孔培养板培养.28℃培养6d后,对单个菌落分别进行1)中的操作,最终确定阳性菌株.

1.2.4 AHBAs基因及16s rRNA基因测序

PCR扩增得到的AHBAs基因连接到PMD-18-Tvector (Takara Co., Japan),测序由广州英韦创津生物科技有限公司完成.同时,对AHBAs基因阳性菌株进行16S rRNA扩增,细菌通用引物27f和1492r.扩增产物由广州英韦创津生物科技有限公司测序.

1.2.5 AHBAs基因阳性菌株的抗菌和细胞毒活性测定

AHBAs基因阳性菌株在淀粉酵母膏蛋白胨(SYP)培养基(淀粉10g,酵母提取物4g,细菌蛋白胨

2g)中28℃、摇床震荡(150 r/min)培养7d.菌丝过滤获得发酵液,加入等体积乙酸乙酯萃取,收集乙酸乙酯相,经减压浓缩获得粗提物.抗菌活性检测用滤纸片法,具体步骤参照参考文献[14].枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC 9372(简称枯草),大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922(简称大肠),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923(简称金葡),藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) ACCC 41016(简称藤黄),白色假丝酵母(*Candida albicans*) As 2.538(简称白假)和黑曲霉(*Aspergillus niger*) ACCC 30005(简称黑曲)作为指示菌.细胞毒活性采用MTT法<sup>[15]</sup>,检测对肝癌细胞株HepG-2抑制率,阳性对照为顺铂(锦州药厂).生长抑制率计算参照文献[6].

1.2.6 苯安莎类抗生素早期鉴别

将AHBAs基因阳性菌株粗提物20 μL点样于TLC(青岛GF<sub>254</sub>)板上,在V(乙酸乙酯):V(二氯甲烷):V(正己烷):V(甲醇)=9:6:6:1展层剂中展层,用2 mol/L的NaOH显色.具体方法参见文献[16].能够产生格尔登霉素的链霉菌属(*Streptomyces*)的LZ35<sup>[17]</sup>作为阳性对照.

2 结果与分析

2.1 平板影印率

不同菌落数的原板影印率比较见图2.当原板菌落数为100~120 CFU时影印率最高,影印1板的影印率为84.14%,影印2板的影印率为73.49%;当原板菌落数为40~60 CFU时,影印1板、影印2板的影印率分别下降到62.7%,62.2%.尽管菌落多时可以提高影印率,但生长过密会导致菌落重叠,增加分离难

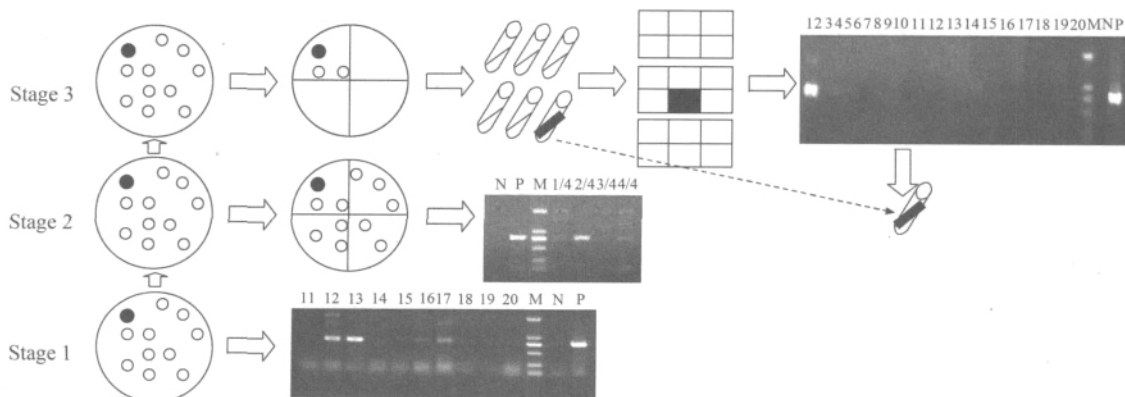


图1 安莎类抗生素产生菌高通量筛选流程图

Fig.1 The screening procedure for ansamycins-producing actinomycetes based on replica plating-PCR amplification technique

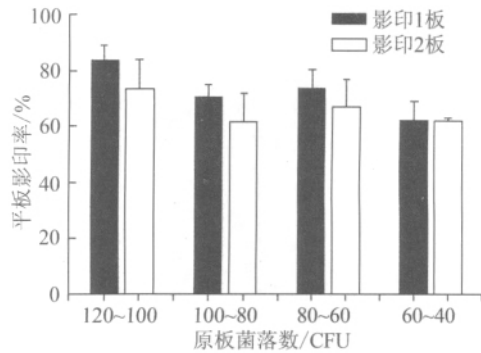


图 2 影印 1 板与影印 2 板的影印率(3 个重复)  
Fig. 2 The colonies recover rates of master plate in replica plate 1 and 2 (calculated by three replicates)

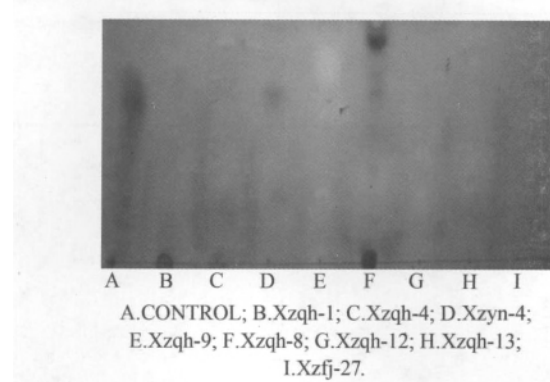


图 3 AHBA 基因阳性菌株粗提物颜色反应  
Fig. 3 The color reaction of the fermentation extracts from AHBA-positive strains

度. 所以选择 40~120 CFU 的平板作为影印原板.

### 2.2 AHBA 基因阳性菌株测序结果

通过该高通量筛选的方法从 33 份土样, 共计 33 个分离平板, 获得 8 个阳性平板, 并且得到 9 个阳性区, 共挑取培养 211 株放线菌株, 从中分离得到 8 株 AHBA 基因阳性菌株. 这一结果表明, 安莎类抗生素产生菌的高通量筛选方法是可行的.

通过 AHBA 基因 PCR 产物的分析发现在 GeneBank 数据库中, 8 株菌与已知的安莎霉素合成基因有 60%~84% 的相似度(表 1). 通过 16S rRNA 序列的比对, 这 8 株菌与链霉菌属有 99%~100% 的相似度, 均属于链霉菌属.

### 2.3 苯安莎类抗生素早期鉴别结果

8 株阳性菌株的粗提物 TLC 分析结果如下,

Xzqh-8 和 Xzyn-4 经过 NaOH(2mol/L) 处理后分别由黄色变成紫色和紫红色, 这一结果表明其中存在苯安莎类抗生素<sup>[16]</sup>. Xzqh-8 的颜色反应同阳性对照相同(图 3), 8 株阳性菌株中有 2 株具有苯安莎类抗生素的产生潜力.

### 2.4 AHBA 基因阳性菌株的抗菌和细胞毒活性测定

在 8 株 AHBA 基因阳性的菌株中有 7 株具有明显的抗菌活性, 其中 Xzqh-8, Xzqh-9, Xzjf-27 能够抗多种指示菌. 有 6 株菌具有细胞毒活性, 细胞毒活性的计算通过质量浓度为 50 μg/mL 粗提物对 HepG-2 肿瘤细胞株生长的抑制率得到, 其中 Xzqh-8 和 Xzjf-27 对 HepG-2 肿瘤细胞株的抑制率大于 80%(表 2).

表 1 AHBA 基因阳性菌株 GenBank 相似度比较结果  
Tab. 1 The blast results of AHBA genes identified at GeneBank

菌株号	GenBank 中最相近的序列	相似度/%	最相近序列的登录号
Xzqh-1	不产色链霉菌赤虹变种 NRRL 3061( <i>Streptomyces achromogenes</i> subsp. <i>rubra-diris</i> NRRL 3061)红迪菌素合成基因簇	81	<a href="#">AJ871581</a>
Xzqh-4	山丘链霉菌 Tu 1892( <i>Streptomyces collinus</i> Tu 1892)萘霉素合成基因簇	84	<a href="#">AF131877</a>
Xzqh-8	吸水链霉菌 NRRL 3602( <i>Streptomyces hygroscopicus</i> NRRL 3602)格尔登霉素合成基因簇	60	<a href="#">AY952143</a>
Xzqh-9	不产色链霉菌赤虹变种 NRRL 3061( <i>Streptomyces achromogenes</i> subsp. <i>rubra-diris</i> NRRL 3061)红迪菌素合成基因簇	81	<a href="#">AJ871581</a>
Xzqh-12	不产色链霉菌赤虹变种 NRRL 3061( <i>Streptomyces achromogenes</i> subsp. <i>rubra-diris</i> NRRL 3061)红迪菌素合成基因簇	81	<a href="#">AJ871581</a>
Xzqh-13	地中海拟无枝菌酸菌 S699 ( <i>Amycolatopsis mediterranei</i> S699)利福霉素合成基因簇	74	<a href="#">AF040570</a>
Xzyn-4	吸水链霉菌 17997( <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 17997)格尔登霉素合成基因簇	81	<a href="#">AY077756</a>
Xzjf-27	地中海拟无枝菌酸菌 S699( <i>Amycolatopsis mediterranei</i> S699)利福霉素合成基因簇	73	<a href="#">AF040570</a>

表 2 AHBA<sub>s</sub> 基因阳性菌株的抗菌、细胞毒活性统计

Tab.2 The antimicrobial and cytotoxic activities of AHBA<sub>s</sub>-positive strains

菌株号	指示菌						抑制率/%
	大肠	金葡	枯草	藤黄	白假	黑曲	
Xzqh-1	-	+	-	++	+++	+	34.6
Xzqh-4	-	-	-	+	-	-	22.9
Xzqh-8	-	++	++	+++	-	+	88.0
Xzqh-9	-	+	+	++	+	-	36.1
Xzqh-12	-	+	-	-	-	-	-
Xzqh-13	-	-	-	-	-	-	-
Xzyn-4	-	+	-	-	-	-	59.3
Xzjf-27	-	-	-	+++	-	-	83.4

注:抗菌活性大小是通过测量抑菌圈大小来表示的,单位:mm;+. 抑菌圈<6;++. 6<抑菌圈<10;+++. 10<抑菌圈<15;- . 没有抑菌活性.

### 3 讨 论

自从 Lederberg 发明了影印法<sup>[12]</sup>,这项技术就被成功地用于微生物的各个领域<sup>[18-19]</sup>,然而这项技术却从未用于微生物的分离. 本文采用影印法与基因筛选相结合的方法从 33 份土样中分离得到 8 株 AHBA<sub>s</sub> 阳性菌株. 通过 AHBA<sub>s</sub> 基因的比对,这些菌株同 Genebank 中的安莎类抗生素合成基因具有很高的相似性. 基本上可以认为这些菌株具有产生安莎类抗生素的潜力. 同时鉴于这些筛选出的菌株中绝大多数菌株都具有一定的抗菌及细胞毒活性,因此其次级代谢产物有值得进一步研究的价值.

将平板影印法和基因筛选的方法相结合大大提高了基因筛选的有效性. 武临专等运用基因筛选方法从 1 900 株放线菌中分离得到 33 株 AHBA<sub>s</sub> 基因阳性菌株<sup>[5]</sup>,然而分离和纯化 1 900 株放线菌的工作是十分耗费人力和时间的. 本文通过第一步的 PCR 扩增就将 1 400 多个 AHBA<sub>s</sub> 基因阴性菌株排除,最后只有少数几个菌株被分离纯化,由此,达到了高通量筛选的目的. 值得一提的是,这种方法还可以扩展到从土壤中分离纯化其他抗生素产生菌,例如:利福霉素、紫杉醇等萘安莎类抗生素. 本方法一开始就可以将大量的非目标菌落排除,因此可以节省很多时间和人力.

平板影印基因筛选的方法不仅可以用于分离链霉菌属这种能够产生大量孢子的菌株,还可以用于分离一些产孢和气丝都较少的稀有放线菌属的菌株. 本试

验还对小单孢菌属的分离进行了初步的探讨. 我们利用 Hayakawa 推荐的培养基分离小单孢菌<sup>[20]</sup>,当原始板的菌落数在 100~120 CFU 时,影印 1 板和影印 2 板的影印率平均分别为 67.8%和 58.1%. 利用小单孢菌属(*Micromonospora*)的 FXY332<sup>[21]</sup>(AHBA<sub>s</sub> 基因阳性菌)作为参照菌株,将其接种于小单孢分离培养基,与其他菌一起影印,经过 3 步的 AHBA<sub>s</sub> 基因的 PCR 扩增,该阳性菌株成功地得到分离. 这一结果表明平板影印-PCR 的方法同样适合于其他稀有放线菌的高通量筛选.

同其他基因筛选方法一样,本方法的建立只能够预测其产生安莎类抗生素的潜力<sup>[5]</sup>,因此化学和生物学的早期鉴别方法是十分必要的. 由影印基因筛选方法筛选出的 8 株阳性菌株中,Xzqh-8 和 Xzyn-4 具有苯安莎类抗生素独有的颜色反应和一定的抗菌和细胞毒活性. 这些早期鉴别特征更进一步证明了高通量影印基因筛选安莎类抗生素和其他抗生素产生菌方法的可行性和有效性.

### 参考文献:

- [1] Lam K S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(3): 245-251.
- [2] Baltz R H. Antimicrobials from actinomycetes[J]. *Back to the Future Microbe*, 2007, 2:125-131.
- [3] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups [J]. *Microb Ecol*, 2005, 49(1):10-24.
- [4] Bok J W, Hoffmeister D, Maggio-Hall L A, et al. Genomic mining for *Aspergillus* natural products[J]. *Chem Biol*, 2006, 13(1):31-37.
- [5] Huitu Z, Linzhuan W, Aiming L, et al. PCR screening of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthase gene leads to identification of ansamycins and AHBA-related antibiotic producers in actinomycetes[J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 106(3):755-763.
- [6] Wu Y, Lu C, Qian X, et al. Diversities within genotypes, bioactivity and biosynthetic genes of endophytic actinomycetes isolated from three pharmaceutical plants[J]. *Curr Microbiol*, 2009, 59(4):475-482.
- [7] Wehrli W. Ansamycins. Chemistry, biosynthesis and biological activity[J]. *Top Curr Chem*, 1977, 72:21-49.
- [8] Chang H B, Kim J H. Antioxidant properties of dihydroherbimycin A from a newly isolated *Streptomyces* sp. [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(4):599-603.

- [9] Yu T W, Bai L, Clade D, et al. The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(12):7968-7973.
- [10] He W, Wu L, Gao Q, et al. Identification of AHBA biosynthetic genes related to geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997 [J]. Curr Microbiol, 2006, 52(3):197-203.
- [11] Zhu N, Zhao P, Shen Y. Selective isolation and ansamycin-targeted screenings of commensal actinomycetes from the " maytansinoids-producing" arboreal *Trewia nudiflora* [J]. Curr Microbiol, 2009, 58(1):87-94.
- [12] Lederberg J, Lederberg E M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants [J]. J Bacteriol, 1952, 63(3):399-406.
- [13] Christensen H, Angen O, Mutters R, et al. DNA-DNA hybridization determined in micro-wells using covalent attachment of DNA [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50(Pt 3):1095-1102.
- [14] Fleming H P, Etchells J L. Occurrence of an inhibitor of lactic acid bacteria in green olives [J]. Appl Microbiol, 1967, 15(5):1178-1184.
- [15] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1/2):55-63.
- [16] Liu A M, Wu L Z, Wang Y G. A color reaction method for early preliminary discrimination of benzenic ansamycins [J]. Chinese J Antibiotics, 2008, 33:403-406.
- [17] 刘最. 土壤稀有放线菌选择分离及系统分类研究 [D]. 厦门:厦门大学, 2010.
- [18] Grunstein M, Hogness D S. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72(10):3961-3965.
- [19] Esko J D, Raetz C R. Replica plating and in situ enzymatic assay of animal cell colonies established on filter paper [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75(3):1190-1193.
- [20] Hayakawa M, Sadakata T, Nonomura H. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil [J]. J Ferment Bioeng, 1991, 72:320.
- [21] 方筱玉. 海洋小单孢菌的选择性分离、鉴定、生物活性及种群多样性的研究 [D]. 厦门:厦门大学, 2010.

## Replica Plating and Gene Screening Combined to Separate AHBA Synthase Gene Positive Actinomycetes

XU Zhen, XU Qing-yan, HU Zhi-yu, ZHENG Zhong-hui, HUANG Yao-jian\*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Gene mining is a new strategy to discover microbial natural products. However, it is laborious to inoculate and purify test strains before gene amplification, so gene mining can not be applied to large amounts of samples. Herein, a high throughput method for the gene mining of soil actinomycetes, combining the replica plating technique and PCR amplification was recommended. In the present work, 3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthase (AHBAs) were used as amplified gene. Through soil actinomycetes culture, colony replica planting, PCR amplification of AHBAs genes, isolation of positive strains and characterization of fermentation extracts, eight AHBAs positive strains were selected from 33 plants rhizosphere soil samples. The results showed that the replica plating-gene screening combined technique was useful for the rapid selection of ansamycin-producing actinomycetes, and it could be applied to search for producers of other antibiotics in natural soils.

**Key words:** actinomycetes; AHBAs gene; high throughput selection; PCR amplification; replica plating