

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620071151970

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

粘细菌的分离鉴定及生物多样性研究

Study on the Isolation, Identification and Biodiversity of Myxobacteria

孙颖

指导教师姓名: 钱晓鸣 副教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2010 年 月

论文答辩日期: 2010 年 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: _____ 教授

评 阅 人: _____

2010 年 5 月

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

| | |
|------------------------------|-----|
| 摘 要..... | I |
| ABSTRACT..... | III |
| 第一章 前 言..... | 1 |
| 一、粘细菌的概述..... | 1 |
| 1 粘细菌的生物学特性..... | 1 |
| 1.1 粘细菌的滑行运动的研究..... | 1 |
| 1.2 粘细菌的生活循环史的研究..... | 2 |
| 1.3 粘细菌的代谢产物产生特点..... | 3 |
| 2 粘细菌的研究概况..... | 4 |
| 2.1 粘细菌的基因方面研究..... | 4 |
| 2.2 粘细菌的蛋白质组研究..... | 5 |
| 3 粘细菌的应用..... | 6 |
| 4 粘细菌研究的制约因素..... | 6 |
| 二、粘细菌的多样性..... | 7 |
| 1 粘细菌的遗传多样性..... | 7 |
| 2 粘细菌的种属多样性..... | 8 |
| 3 粘细菌的生态多样性..... | 11 |
| 3.1 粘细菌的分布具有多样性..... | 11 |
| 3.2 不同地域同种生境中分布的粘细菌具有差异..... | 12 |
| 3.3 极端环境中也存在着粘细菌..... | 14 |
| 3.4 粘细菌与其他微生物共生..... | 16 |
| 4 粘细菌的代谢产物多样性..... | 16 |
| 4.1 代谢产物种类的多样性..... | 16 |
| 4.2 作用类型的多样性..... | 19 |
| 三、粘细菌聚酮合酶基因..... | 21 |
| 四、粘细菌的研究意义与内容..... | 22 |
| 第二章 材料与amp;方法..... | 23 |

| | |
|-------------------------------|-----------|
| 一、 材料 | 23 |
| 1 土样..... | 23 |
| 2 常用粘细菌分离, 发酵, 及活性筛选培养基..... | 25 |
| 2.1 粘细菌分离纯化培养基..... | 25 |
| 2.2 粘细菌发酵培养基..... | 26 |
| 2.3 抗性实验培养基..... | 27 |
| 3 抗性实验指示菌..... | 28 |
| 4 抗肿瘤活性测试常用肿瘤细胞株..... | 28 |
| 5 常用试剂..... | 28 |
| 6 化合物的分离纯化和结构测定中常用的溶剂..... | 30 |
| 7 主要试剂及耗材..... | 30 |
| 8 常用仪器..... | 31 |
| 二、方法 | 32 |
| 1 技术路线..... | 32 |
| 2 粘细菌分离..... | 32 |
| 2.1 粘细菌的分离流程..... | 32 |
| 2.2 粘细菌的纯化及纯度测定..... | 34 |
| 3 抗菌活性测定..... | 36 |
| 4 抗氧化活性测定..... | 36 |
| 5 抗肿瘤活性测定..... | 37 |
| 6 菌株鉴定..... | 38 |
| 7 DMSA 和 BSA 对 PCR 结果的影响..... | 40 |
| 8 粘细菌聚酮合酶基因的研究..... | 40 |
| 9 菌株发酵及粗提物的提取..... | 41 |
| 10 天然产物的分离纯化方法..... | 41 |
| 第三章 结果分析 | 44 |
| 一、粘细菌的分离 | 44 |
| 二、粘细菌的活性测定 | 51 |
| 1 抗菌活性的测定..... | 51 |
| 2 抗氧化活性的测定..... | 55 |
| 3 抗肿瘤活性的测定..... | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 三、DNA 的提取及 PCR 条件的优化 | 60 |
| 1 DNA 提取条件的优化 | 60 |
| 2 PCR 条件的优化 | 60 |
| 2.1 DMSO 对 PCR 扩增效果的影响 | 60 |
| 2.2 BSA 对 PCR 扩增效果的影响 | 62 |
| 四、粘细菌活性菌株 PKS 基因 | 62 |
| 五、具有生物活性的粘细菌的系统分类 | 65 |
| 1 粘细菌活性菌株的分类鉴定 | 65 |
| 2 粘细菌的系统发育树 | 65 |
| 六、粘细菌系统发育树与生物活性及 KS AT 基因 | 69 |
| 七、对粘细菌 XMU-Cb-01 菌株次生代谢产物的提取 | 71 |
| 第四章 讨论与结论 | 73 |
| 一、土样中粘细菌生态多样性及活性多样性 | 73 |
| 二、嗜细菌粘细菌 DNA 提取及其 PCR 条件的探索 | 76 |
| 三、粘细菌菌株多样性 | 78 |
| 四、粘细菌菌株的 PKS 基因多样性 | 79 |
| 五、菌株 XMU-Cb-01 次级代谢产物分离 | 80 |
| 六、结论与展望 | 80 |
| 参考文献 | 82 |
| 致 谢 | 93 |

Catalog

| | |
|--|------------|
| Abstract in Chinese | I |
| Abstract in English | III |
| Chapter One Introduction | 1 |
| I Study on Myxobacteria | 1 |
| 1 The biology of myxobacteria | 1 |
| 1.1 Motility | 1 |
| 1.2 The life-cycle of myxobacteria | 2 |
| 1.3 Characteristic of production of bioactive compounds | 3 |
| 2 Research survey of Myxobacteria | 4 |
| 2.1 Genes..... | 4 |
| 2.2 Proteome | 5 |
| 3 Uses of myxobacteria | 6 |
| 4 Constraints on study of Myxobacteria | 6 |
| II Diversity of Myxobacteria | 7 |
| 1 Genetic diversity | 7 |
| 2 Diversity of specie | 8 |
| 3 Ecological diversity | 11 |
| 3.1 Diversity of distribution..... | 11 |
| 3.2 Different species of the same ecological environments..... | 12 |
| 3.3 Myxobacteria in extreme environments..... | 14 |
| 3.4 Symbiosis with other microorganisms..... | 16 |
| 4 Diversity of metabolites of <i>Myxobacteria</i> | 16 |
| 4.1 Diversity of species..... | 16 |
| 4.2 Diversity of mechanisms..... | 19 |
| III The PKS gene of <i>Myxobacteria</i> | 21 |
| IV Significance and content of this thesis | 22 |
| Chapter Two Materials and Methods | 23 |
| I Materials | 23 |
| 1 soils | 23 |
| 2 Culture medium | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1 Culture medium for purification of Myxobacteria..... | 25 |
| 2.2 Culture medium for fermentation of Myxobacteria..... | 26 |
| 2.3 Culture medium for resistance test | 27 |
| 3 Indicative microbes | 28 |
| 4 Cell for antitumor test | 28 |
| 5 Reagent..... | 28 |
| 6 Chemicals for purification and structure analysis..... | 30 |
| 7 Reagent and other materials | 30 |
| 8 Apparatus | 31 |
| II Methods..... | 32 |
| 1 Technology Roadmap | 32 |
| 2 Isolation and purification of Myxobacteria..... | 32 |
| 2.1 Isolation of Myxobacteria..... | 32 |
| 2.2 Purification of Myxobacteria | 34 |
| 3 Antimicrobial test..... | 36 |
| 4 Antioxidant test | 36 |
| 5 Antitumor test | 37 |
| 6 Identification of strains..... | 38 |
| 7 The effect of PCR result on account of DMSO and BSA | 40 |
| 8 Reach on PKS gene of Myxobacteria | 40 |
| 9 Fermentation and extraction of crude extract | 41 |
| 10 Purification of natural product..... | 41 |
| Chapter Three Results..... | 44 |
| I Isolation of Myxobacteria..... | 44 |
| II The analysis for bioactivities of Myxobacteria..... | 51 |
| 1 Antimicrobial test of Myxobacteria..... | 51 |
| 2 Aantioxidant test of Myxobacteria | 55 |
| 3 Antitumor test of Myxobacteria | 57 |
| III Optimization of methods for DNA's extraction and PCR..... | 60 |
| 1 Optimization of methods for DNA's extraction..... | 60 |
| 2 Optimization of methods for PCR..... | 60 |
| 2.1 The effect of PCR result on account of DMSO | 60 |
| 2.2 The effect of PCR result on account of BSA | 62 |
| IV Study of PKS gene of the bioactive Myxobacteria | 62 |

| | |
|--|-----------|
| V The taxa of the bioactive Myxobacteria..... | 65 |
| 1 The identification of Myxobacteria | 65 |
| 2 Phylogenetic tree of Myxobacteria | 65 |
| VI Phylogenetic tree ,biological activity and KS AT gene..... | 69 |
| VIII Extraction of secondary metabolites of XMU-Cb-01 | 71 |
| Chapter Four Discussion and conclusion | 73 |
| I The bioactive and ecological diversity of Myxobacteria..... | 73 |
| II Optimization of methods for DNA extraction and PCR..... | 76 |
| III Diversity of strains | 78 |
| IV The PKS diversity of the bioactive Myxobacteria..... | 79 |
| V Secondary metabolites purification..... | 80 |
| VI Conclusion and Prospect | 80 |
| References | 82 |
| Acknowledgement..... | 93 |

摘要

天然产物是药物的重要来源。许多常用的临床药物均来自于微生物次级代谢产物。在其他已知微生物来源的新天然产物的发现量日趋减少的情况下,粘细菌由于它们结构新颖,生物活性多样而备受瞩目。然而,粘细菌还没有得到广泛的调查和利用。目前国内能够分离和纯化粘细菌的实验室屈指可数,可供培养的菌种资源还十分有限,由这一物种的生物学特性所决定难于分离和纯化进而难于筛选的特性,制约了对粘细菌天然产物的挖掘。

本论文以云南、武夷山、江西、福建等地的土样为研究材料,除了采用食草动物粪便诱导等常用方法对粘细菌子实体进行诱导、富集及分离纯化,还在此基础上对上述方法进行了改进,提高了粘细菌纯化的效率。

通过对上述样品的研究,从 130 份土样中分离得到了 120 株粘细菌,并从中纯化了 83 株。

以抗菌模型,抗氧化模型,抗肿瘤模型对上述粘细菌的发酵粗提物进行活性筛选。生物活性测定结果显示,供测菌株中有 56 株显示出一种或几种抗菌活性,占供测菌株的 67%; 50 株显示出对 HeLa、HepG2 细胞的抗肿瘤活性,占供测菌株的 60%; 具有抗氧化活性的菌株为 16 株,占供测菌株的 19%。

研究比较了粘细菌基因组 DNA 常规提取方法即丙酮裂解法和 CTAB 提取法,并对其进行了改良。使之更彻底地破解粘细菌细胞壁,更彻底地去除胞外多糖及蛋白质等杂质,为后续实验提供更高质量的粘细菌基因组 DNA。

通过 16SrDNA 的分析,对 73 株粘细菌活性菌株进行了分子鉴定和系统发育分析。结果表明可鉴定的 73 株粘细菌分布在 6 个属中,粘球菌属(*Myxococcus*),堆囊菌属(*Sorangium*),孢囊杆菌属(*Cystobacter*)为优势属。

采用两对引物来考察粘细菌聚酮合酶基因多样性。共扩增 70 株具有生物活性的菌株的 KS 结构域和 AT 结构域。结果共有 43 株能被一种或两种引物扩增,分别产生大小约 680bp 及 810bp 的扩增产物; 其中有 39 株可以被 KS 结构域特异性引物扩增; 10 株可以被 AT 结构域特异性引物扩增; 6 株可以同时被两对引物扩增产生阳性结果。

本文结果表明,粘细菌是包含有丰富的抗菌和抗肿瘤活性的菌株的微生物

类群,利用 KS 和 AT 结构域的扩增可以为粘细菌的高通量筛选提供可行的途径。

关键词: 粘细菌 分离 多样性 生物活性 PKS 基因

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Nature products are important source of Medicine. Many important clinical medicine are microbial secondary metabolites. *Myxobacteria* have a distinguished advantage in the field of producing antibiotics. Many types of novel compound with good biological activities are found from *Myxobacteria*. However, the *Myxobacteria* as a microbial resource itself has not been widely investigated and used. Currently, few domestic laboratories can separate and purificate *Myxobacteria*, the strain resources for training are still limited. It Constraints on the mining of natural products of myxobacteria because of the characteristics of difficult to separate and purificate.

The soil samples collected from Yunnan, Wuyi Mountains, Jiangxi, Fujian and other regions of China, were used as the materials in this experiment. And dung pellets of herbivorous animal can be used to induce many kinds of fruiting bodies of the *Myxobacteria* in different colors, size, and shapes. We isolated and purified strains under traditional procedure. According to the special character of *Myxobacteria*, we designed several new purification methods, which made it easier for purification of *Myxobacteria*.

Through studying on these samples, From 130 soil samples and barks in these areas, 120 *Myxobaeteria* strains were isolated and 83 strains of them were purified.

Crude fermentation extraction of each stain was tested by several different bioactive screening programs including anti-microbial activity, anti-tumor activity, anti-oxidation activity. The result of the bioactive tests showed that 73 strains of the *Myxobacteria* displayed one or more than one bioactivities. 56 strains (67%) displayed anti-microbial activities on one or more than one of six indicator organisms. 50 strains (60%) displayed anti-tumor activity on HeLa, Hep G2 cells. The strains with anti-oxidation activity was 16 (19%).

The effect of two methods for extracting total DNA of *Myxobaeteria* which were Aetone isolation method, CTAB method and innovative method was compared. The innovative method was made over from CTAB method and can destroy cell wall of

Myxobaeteria more drastically and wipe off extracellular amylose more effective than by other methods which offer total DNA of higher quality for the study of molecular biology of *Myxobacteria*.

The identification of 73 bioactive *Myxobacteria* strains by 16SrDNA assay and phylogenetic analysis indicated that the strains were distributed in 6 generas and a lot of the strains were *Myxococcus* spp., *Sorangium* spp., *Cystobacter* spp..

The diversity of polyketide synthase (PKS) gene was investigated using two pairs of primers KS,AT,The KS and AT domain of 70 bioactive *Myxobacteria* were amplified.43 strains of them can be amplified and amplification products displayed 680bp and 810bp DNA bands by 1 or 2 pairs of primers, respectively. 39 strains by primer KS,10 strains by primer AT, 6 strains can be amplified by both of the 2 primers.The result showed the diversity of the PKS gene of these 73 *Myxobacteria*.

The study on the *Myxobacteria* indicated *Myxobacteria* have antimicrobial activity and antitumor activity.And It's a feasible way to provide high-throughput screening of myxobacteria by using KS and AT domains amplification analysis.

Key words: *Myxobacteria*; Isolation ; Diversity; Bioactivity; PKS gene

第一章 前言

一、粘细菌的概述

1 粘细菌的生物学特性

早在1809年,德国植物学家H.F.Link就发现并命名了第一株粘细菌*Polyangium vitellinum*^[1]。1857年英国生物学家M.J.Berkeley又发现并命名了另外两个属种的粘细菌:橙色标桩菌(*Stigmatella aurantiaca*)和藏红花软骨霉状菌(*Chondromyces crocatus*)。到了1892年,美国植物学家Roland Thaxter首先阐述了粘细菌奇特的生活史^[2],从此引起了科学界对粘细菌的注意。

粘细菌(*Myxobacteria*)是一类可以滑行运动的单细胞革兰氏阴性杆菌^[3],也是原核生物中行为表现特殊而复杂的一种单细胞型微生物类群。细胞呈杆状或球菌状。细胞膜有弹性,不僵硬;细胞富含胞外粘液物质,无鞭毛,对多种抗生素敏感(如红霉素,四环素,链霉素,卡那霉素,新霉素等)^[4];营养细胞埋于粘液中,一般为 $0.4-1.5 \times 2-15 \mu\text{m}$,依种和条件而异^[5];有细胞核;繁殖方式为横轴二分裂法;细胞运动呈规律性,运动时细胞形状变化,细胞弯曲;有复杂的发育循环史^[6];在整个发育循环史中以多种发育形态存在。

粘细菌是腐生性菌,可依赖于其分泌的一系列攻击性水解酶以降解不溶的生物大分子如蛋白质、纤维素、肽、脂质、核酸及原核和真核的完整细胞及其亚细胞结构,对自然界中物质与能量的循环具有重要意义^[7]。

粘细菌具有独特的生活史和特殊的滑行运动,可以合成全新结构、高活性、作用机制特殊的次级代谢产物。它在细胞分化、发育、细胞间信号传导与调控、生物进化研究以及抗生素药物筛选等方面具有重要的理论意义和经济价值^[8, 9, 10],正在成为专家学者们的研究热点。

1.1 粘细菌滑行运动的研究

粘细菌与其他原核生物相比显著不同的地方是可以进行群体活动,粘细菌的群体运动及其与众不同的生活循环史都是以滑行运动为基础完成的^[11],目前,对滑行运动的动力学的研究已经很深入,由此提出了粘细菌的两种运动机制,并找到了喷射机制的相关证据^[12, 13]。

粘细菌的滑行运动是由两套独立的运动系统所完成的：A型运动系统和S型运动系统^[14]。其中A型运动是以菌落边缘的单个细胞的运动为主，而S型运动则是多个细胞以菌团的形式运动为主^[15]。

粘细菌的双运动系统对于粘细菌适应复杂多变的自然环境是非常重要的。研究表明，粘细菌的A型运动适于坚硬干燥的表面，而S型运动则适于潮湿润滑的环境，实验室培养过程中则表现为A型运动在1.5%的琼脂表面上表现明显，而S型运动则在0.3%的琼脂表面上表现明显^[16]。

S型运动系统在多细胞行为如子实体的形成过程中起着重要作用，并且仅调控细胞间距离在一个细胞长度内的滑动运动。在自然环境中，S型运动使粘细菌聚团运动，并适应潮湿润滑的环境，获得生长优势。

相对于S型运动而言，A型运动的研究进展相对缓慢，并且在A型运动机制的解释方面，科研工作者之间存在很大的差异，并提出了两种不同的模型：粘液喷射模型与转动机制模型。粘液喷射模型的提出基于黄色粘球菌细胞极上观察到的环状结构和彩虹状分泌的粘液，因此提出粘细菌的前进动力可能来源于粘液分泌所产生的推动力^[17]。转动机制模型则推测细胞外存在一个马达复合体，它能够诱导细胞表面的分子器转动而沿细胞表面产生运动的波纹从而带动细胞向前运动^[18]。

1.2 粘细菌的生活循环史的研究

对于粘细菌的生活周期的动力学的研究已经比较透彻^[19]。

粘细菌在营养丰富的条件下，营养细胞不断分裂，进行营养生长循环。一旦营养匮乏，某些细胞便分泌出一些信号物质^[20, 21]（如环腺苷酸cAMP），以吸引周围的细胞向它们聚集，于是许多营养细胞便逐渐聚在一起形成一个细胞堆，随后这个细胞堆又演化成多细胞结构，约含有 10^4 — 10^6 个单细胞，即子实体^[22]。在子实体内的营养细胞变成休眠的粘孢子，形成孢子时，10%营养细胞变孢子，90%自溶。粘孢子在适合的环境条件下萌芽，生成营养细胞，完成生活循环^[23]。

粘细菌子实体通常具有鲜艳的颜色，它们分泌类胡萝卜素等色素，作用是保护细胞不受光氧化作用的损伤，还可以吸收阳光以在光感受作用的电子穿梭过程中充当氧化还原的中间体以及光感受作用和荷尔蒙作用中所需的前体分子^[24]。

粘孢子的产生是为了抵抗不良生活环境，如寒冷、高温、缺氧、干燥、酸性

PH等。子实体的产生是为了储存足够数量的细胞以开始一轮新的生命循环^[25]。

利用粘孢子的抗干燥能力，可从培养基上的无菌滤纸片上收集到较多粘孢子，在干燥器中干燥后可存活10至25年。

1.3 粘细菌的代谢产物产生特点

粘细菌是活性天然产物的多产菌种。其产物结构新，种类多，作用方式多样。不同来源的粘细菌可以相同的活性天然产物：如粘细菌产生的有些天然产物可以同时从陆地来源粘细菌和海洋来源粘细菌中获得；另外，*M. xanthus* DK1622 可以产生多种活性天然产物，包括myxochromid, myxalamid, antibiotic myxovirescin, siderophore myxochelin，DKxanthenes cittilin，antibiotics saframycin, althiomycin等^[26]，其中大部分化合物可从其他菌株分离得到。

粘细菌次级代谢产物的另一个特征是化合物产生菌株可以产生一系列相似性极小的化合物，如*Chondromyces crocatus*的一些菌株产生了一系列完全不同的代谢产物（如：ajudazols, chondramides, chondrochlorens, crocacins, rocapeptins, and thuggacins in strain *C. crocatus* Cm^[27-29]），同时一株粘细菌可以产生一个化合物家族的多种类似物，如堆囊菌属的一株菌可以产生近50种不同的soraphen（一种真菌抑制剂），又如*Myxococcus fulvus*的一个菌株可以产生30种myxothiazole。

Mxobacteria xanthus 产生的活性产物多数是聚酮化合物或非核糖体肽或二者的杂合，基于对*M. xanthus* DK1622 菌株基因组序列的分析，已经揭示了很多参与天然产物合成的基因簇，研究显示，该菌株基因组中至少有18个天然产物合成的基因簇，这也说明该菌株具有产生活性代谢产物的巨大潜力，我们现在得到的天然产物只是其中很小的一部分^[30]。

另外，粘细菌产生天然产物的能力是以株为单位的，Daniel Krug 通过对不同地域中分离得到的98株*Mx. xanthus* 的代谢产物的分析，发现该菌种的不同菌株产生化合物能力有所差异，如althiomycin和saframycin 是很难分离得到的化合物，98株中只有两株产生这两种物质，这也更进一步说明了，粘细菌在天然产物产生方面的差异是以菌株为单位而不是以种属为单位的^[31]；同时，多个种属粘细菌可以产生同一种天然产物，如*Angiococcus*，*Archangium*和*Cystobacter* 种属中的有些菌株均可产生针对多种耐药癌细胞具有强细胞毒活性的tubulyisin及其类似物^[26]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库