

放线菌系统学

——原理、方法及实践

徐丽华 李文均 刘志恒 姜成林 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

放线菌是产生抗生素等药物和其他生物活性物质的重要微生物资源。放线菌分类学是放线菌资源开发利用,尤其是抗生素等药物开发利用的基础。本书利用作者和国际同行的最新研究成果,以分子系统学为重点,全面论述现代放线菌系统分类学的发展简史、基本原理、分类系统,介绍目、科、属和每个属有效发表的种及其原始文献;并根据作者长期从事放线菌分类研究和教学所取得的新进展和新经验,结合我国的国情,详细论述放线菌分类程序和实验方法。本书还对放线菌分类学存在的问题及值得研究的问题进行了探讨。

本书可用作大专院校相关专业师生的教学参考书,也可供微生物资源开发利用方面的研究人员和技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

放线菌系统学:原理、方法及实践/徐丽华等主编.—北京:科学出版社,2007

ISBN 978-7-03-017700-1

I. 放… II. 徐… III. 放线菌 IV. Q939.13

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 082538 号

责任编辑:庞在堂 夏 梁 李久进 沈晓晶/责任校对:朱光光

责任印制:张克忠/封面设计:耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双 青 印 刷 厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007年4月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2007年4月第一次印刷 印张:30 1/2 插页:2

印数:1—2 500 字数:704 000

定价:78.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

放线菌系统学

——原理、方法及实践

Actinomycete Systematic

——Principle, Methods and Practice

作者（按姓氏笔画排列）：

- 田新朋 中国科学院南海研究所，云南大学微生物研究所
刘志恒 中国科学院微生物研究所
李文均 云南大学微生物研究所
陈国忠 中国科学院过程工程研究所，云南大学微生物研究所
张玉琴 中国医学科学院医药生物技术研究所，云南大学微生物研究所
张建丽 北京理工大学
姜成林 云南大学微生物研究所
姜 怡 Leibniz-Institut für Meereswissenschaften, an der Universität Kiel, Germany
云南大学微生物研究所
娄 恺 新疆农业科学院特殊环境微生物资源重点实验室
徐丽华 云南大学微生物研究所
唐蜀昆 云南大学微生物研究所
职晓阳 云南大学微生物研究所
黄 英 中国科学院微生物研究所
熊 智 西南林学院

前 言

放线菌系统学是关于放线菌分类地位、分类系统、分类方法的科学。放线菌系统学是放线菌资源开发利用的理论基础之一。自 20 世纪 50 年代起,我国放线菌系统学的奠基人阎逊初院士及其同事们就开创了我国放线菌系统学的研究。半个多世纪以来,经过至少三代人的艰苦努力,2004~2005 年,我国放线菌分类学工作者在国际微生物系统学权威杂志 (*International Journal of Systematic and Evolutionary of Microbiology*, *IJSEM*) 发表论文的数量排名已上升到第二位,我国放线菌系统学研究在国际上已占有一席之地,成为国际微生物系统学界的一支重要力量。

为了进一步推动我国放线菌系统学的持续发展,推动学科队伍建设,使放线菌系统学更好地为放线菌资源开发利用服务,我们根据近年来国内外放线菌系统学研究的最新进展和成就,结合作者多年来的工作实践和知识积累,试图就现代放线菌系统学的基本理论、分类系统、分类方法做一个较全面的介绍,对一些值得研究的问题提出建议。全书共分两篇 21 章,图文并茂。每章均附有主要参考文献便于读者进一步查阅,书的最后附有放线菌名录索引。由于书中有些内容较新,所以有些新种和新化合物尚未有中文译名,留下原名备作参考。

本书是集体劳动的成果,每一章都由 1~3 位作者撰写,姜怡做版式校对,职晓阳做图表加工,由徐丽华、刘志恒、姜成林统稿,力求章节内容连贯、系统。在本书的编写过程中,我们也高兴地看到,我国年轻一代放线菌系统学研究骨干已经成长起来,为放线菌系统学的发展注入了新的活力。

作者要特别感谢日本 Shinji Miyadoh 先生同意我们使用《放线菌图鉴》中的一些精美图片。我们也特别感谢科学出版社庞在堂等同志为本书的出版付出的辛劳。在此我们也真诚希望读者对本书提出批评指正。

本书获得国家重大基础研究发展规划项目 (973 项目、2004CB719601)、国家自然科学基金项目 (30560001)、云南省国际合作计划 (2005GH21)、云南省自然科学基金 (2004 C0002Q) 及新世纪优秀人才支持计划项目资助。特此致谢。

作 者

2006 年 5 月 9 日于昆明

目 录

前言

第一篇 放线菌系统学原理及实验方法

第一章 概论	3
1.1 放线菌在微生物系统学中的地位	3
1.2 放线菌生物学的发展	5
1.3 放线菌生物技术的发展	11
1.4 放线菌资源的开发与利用	15
主要参考文献	24
第二章 放线菌系统分类学的过去和现在	27
2.1 国外概况	27
2.2 国内概况	30
2.3 几个值得重视的问题	31
主要参考文献	32
第三章 形态特征和培养特征在分类中的意义	33
3.1 放线菌的基本形态	33
3.2 放线菌形态特征和培养特征的稳定性	36
3.3 形态分化的分子机制	37
主要参考文献	39
第四章 生理生化特性	40
4.1 生理生化实验的内容	40
4.2 实验方法	40
4.3 API 细菌数值鉴定系统	47
4.4 Biolog 全自动和手动细菌鉴定系统	52
主要参考文献	53
第五章 化学分类原理	54
5.1 细胞壁化学类型	55
5.2 全细胞水解物糖类型	66
5.3 磷酸类脂分析	69
5.4 醌组分分析	74
5.5 枝菌酸分析	79
5.6 脂肪酸分析	80
5.7 全细胞蛋白 SDS-PAGE 分析	87

5.8 核糖体蛋白双向凝胶电泳 (2D-PAGE) 分析	90
主要参考文献	91
第六章 分子系统学原理及方法	93
6.1 核酸的提取、分离与纯化	93
6.2 聚合酶链反应	99
6.3 凝胶电泳技术	108
6.4 16S rRNA 基因序列分析	119
6.5 DNA (G+C) mol%测定	119
6.6 DNA 同源性分析	129
6.7 RNA 同源性分析	135
6.8 DNA 分子指纹分析	136
6.9 DNA 探针及其应用	140
6.10 特异性引物应用于菌株的快速鉴别	143
主要参考文献	147
第七章 生物信息学在放线菌系统学中的应用	150
7.1 提交序列到数据库	150
7.2 16S rRNA 系统进化树的构建	155
7.3 RNA 二级结构分析在分类学中的应用	189
主要参考文献	199
第八章 多相分类	202
8.1 种的概念	202
8.2 属的概念	202
8.3 哪些菌株值得进行分类鉴定	202
8.4 放线菌分类鉴定的基本程序	203
8.5 有效发表的刊物	205
8.6 如何撰写论文	205
8.7 投稿	207
主要参考文献	207

第二篇 各 论

第一章 放线菌在原核生物中的地位	211
1.1 放线菌纲的建立	211
1.2 放线菌门的研究进展	213
主要参考文献	218
第二章 放线菌亚目	220
2.1 放线菌科及主要属	220
主要参考文献	231
第三章 丙酸杆菌亚目	234
3.1 丙酸杆菌科及主要属	234

3.2 类诺卡氏菌科及主要属	241
主要参考文献	253
第四章 微球菌亚目	255
4.1 微球菌科及各属	261
4.2 博戈里亚湖菌科及各属	270
4.3 短杆菌科及各属	271
4.4 纤维单孢菌科及各属	273
4.5 皮杆菌科及各属	276
4.6 皮生球菌科及各属	280
4.7 嗜皮菌科及各属	281
4.8 间孢囊菌科及各属	283
4.9 琼斯氏菌科及各属	291
4.10 微杆菌科及各属	292
4.11 原小单孢菌科及各属	309
4.12 稀有杆菌科及各属	314
4.13 血杆菌科及各属	315
4.14 阎氏菌科及各属	315
4.15 布登堡菌科及各属	317
主要参考文献	319
第五章 棒杆菌亚目	323
5.1 棒杆菌科及各属	325
5.2 迪茨氏菌科及各属	330
5.3 戈登氏菌科及各属	332
5.4 分枝杆菌科及各属	336
5.5 诺卡氏菌科及各属	343
5.6 慢反应脂肪酸菌科及各属	351
5.7 冢村氏菌科及各属	352
5.8 威廉姆斯氏菌科及各属	354
主要参考文献	356
第六章 假诺卡氏菌亚目	359
6.1 假诺卡氏菌科及主要属	359
6.2 束丝放线菌科及主要属	372
主要参考文献	379
第七章 链霉菌亚目	381
7.1 链霉菌科及主要属	381
主要参考文献	387
第八章 链孢囊菌亚目	390
8.1 拟诺卡氏菌科及主要属	391
8.2 链孢囊菌科及主要属	396

8.3 高温单孢菌科及主要属	408
主要参考文献	417
第九章 小单孢菌亚目	418
9.1 小单孢菌科及主要属	418
主要参考文献	435
第十章 弗兰克氏菌亚目	436
10.1 弗兰克氏菌亚目各科的系统发育关系	436
10.2 弗兰克氏菌科及主要属	441
10.3 嗜地皮菌科及主要属	443
10.4 中村氏菌科及主要属	447
10.5 鱼孢菌科及主要属	448
10.6 热酸菌科及主要属	449
10.7 “动孢菌科”及主要属	450
主要参考文献	453
第十一章 糖霉菌亚目	455
11.1 糖霉菌科及主要属	455
主要参考文献	457
第十二章 未归类各属	459
12.1 双孢放线菌属	459
12.2 珊瑚放线菌属	460
12.3 卓孢菌属	461
12.4 佩尔泽氏菌属	461
12.5 苏黎世菌属	462
主要参考文献	462
第十三章 高温放线菌科	464
13.1 高温放线菌属	465
13.2 莱斯氏属	466
13.3 黄色高温微杆菌属	466
13.4 清野氏菌属	467
13.5 直丝菌属	467
主要参考文献	468
附录：放线菌科属名录	469

第一篇 放线菌系统学 原理及实验方法

第一章 概 论

1.1 放线菌在微生物系统学中的地位

放线菌因其菌落呈放射状而得名。最早是由 Cohn (1875) 自人泪腺感染病灶中分离到一株丝状病原菌——链丝菌 (*Streptothrix*) 被发现的, 而后 Harz (1877) 从牛颈肿病灶中分离到类似的病原菌, 并命名为牛型放线菌 (*Actinomyces bovis*)。因绝大多数放线菌具有发育良好的菌丝体, 19 世纪以前人们曾将放线菌归于真菌中。随着科学的发展及新技术的应用, 人们的认识逐渐深入, 才将放线菌列于细菌之中。克拉西里尼科夫 (Krassil'nikov) 首先将放线菌放在植物界、原生植物门、裂殖菌纲中。后有人认为把无真正细胞核的放线菌放在植物界不妥, 因此, 将其列入动物界和植物界之外的原生生物界 (Protista) 内。1968 年, Murray 提出原核生物界 (Procaryotae) 和真核生物界 (Eucaryotae) 之后, 放线菌被归于原核生物界。1978 年, Gibbens 和 Murray 根据细胞壁的有无和细胞壁的性质建议将原核生物界分为: 薄壁菌门 (Gracilicutes), 包括革兰氏阴性细菌; 厚壁菌门 (Tenericutes), 包括革兰氏阳性细菌; 疵壁菌门 (Mendosicutes), 包括无肽聚糖细胞壁的细菌; 柔膜菌门 (Mollicutes), 包括无细胞壁的支原体类细菌。放线菌被包括在厚壁菌门中。在 1989 年出版的《伯杰氏系统细菌学手册》(*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) 中, 放线菌被划分在原核生物界, 厚壁菌门, 分枝菌纲 (Thallobacteria), 放线菌目 (Actinomycetales)。

1987 年, Woese 通过对 500 多种生物的 16S rRNA 序列的系统发育学分析, 提出了著名的生命三域学说, 即真细菌域 (Eubacteria)、古细菌域 (Archaeobacteria) 和真核生物域 (Eucaryota)。1990 年, Woese 等通过 rRNA 及 RNA 聚合酶 (RNA polymerase) 分子结构特征和序列的比较发现核苷酸分子的结构和序列比表型更能揭示生命的进化关系, 将地球上的生命分为 3 个基本类群, 正式建立了三域分类系统图 I-1-1, 并将生物分类的最高等级命名为域 (domain) (域的拉丁文结尾为 -a)。生命三域分别为古菌域 (Archaea)、细菌域 (Bacteria) 和真核生物域 (Eucarya), 每个域包含两个或多个界 (kingdom)。细菌域的界尚未给出具体划分, 但放线菌所属的厚壁菌门归于细菌域 (图 I-1-2)。

Stackebrandt 和 Woese 根据 16S rRNA 相似性, DNA-DNA 杂交和 DNA-rRNA 杂交的结果构建了放线菌与其他生物之间的系统发育树。结果表明, 放线菌作为高 (G+C)mol%、革兰氏阳性 (G^+) 细菌的一个分支, 与芽孢杆菌属、乳杆菌属、链球菌属、梭菌属构成的梭状菌分支有着共同的起源 (Fox et al. 1980; Stackebrandt et al. 1981; Stackebrandt et al. 1983; Woese et al. 1985)。1997 年, Stackebrandt 等通过对 16S rRNA/rDNA 序列分析, 提出了放线杆菌纲 (Actinobacteria) 这一新的分类等级, 并将放线杆菌纲分为 5 个亚纲。《伯杰氏系统细菌学手册》第二版采纳了这一分类观点。迄今, 各国系统学家综合各种证据 (见第二篇第一章), 已将放线菌提升

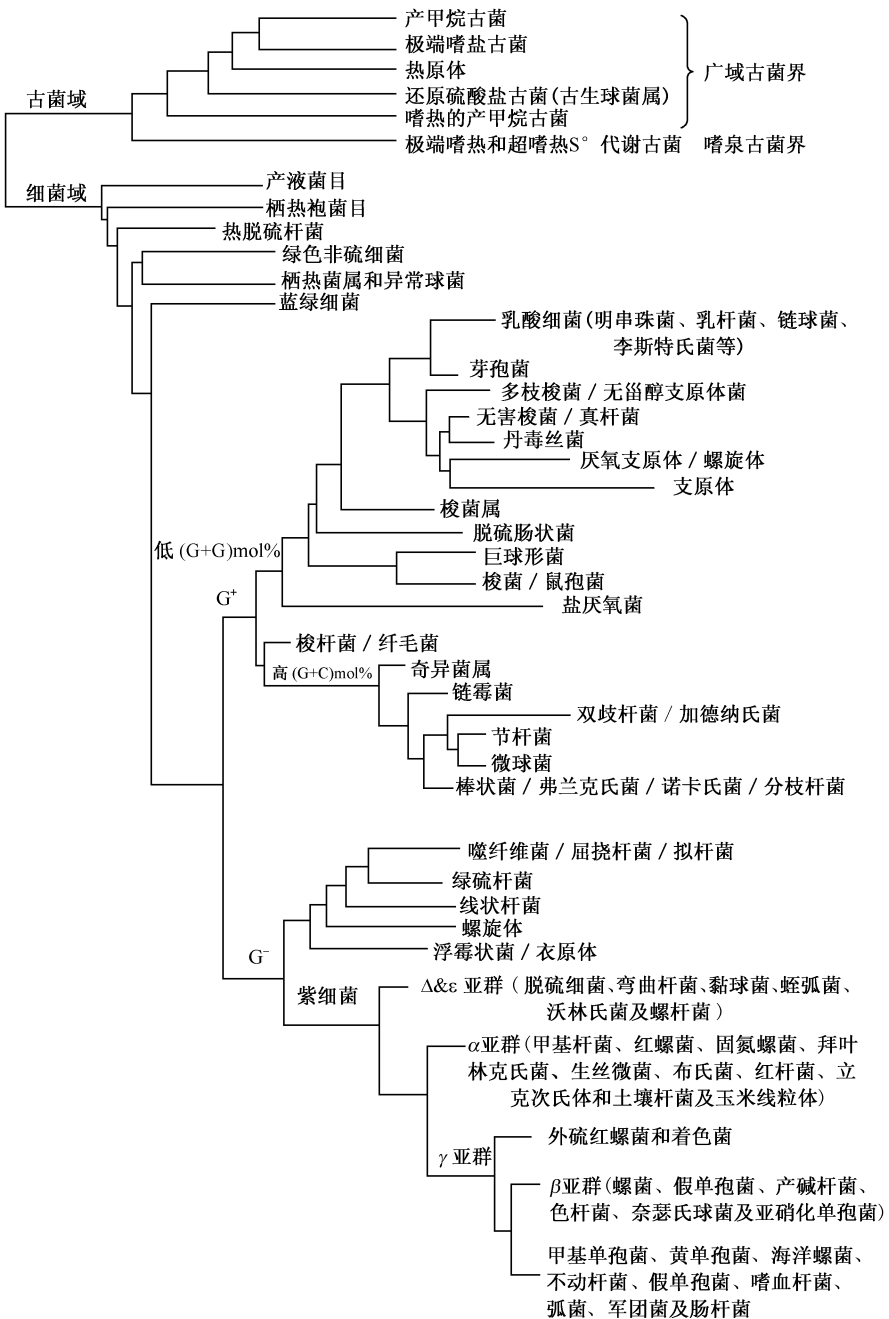


图 I-1-1 16S rRNA 序列同源性分析的细菌系统发育图

(Woese 1990 细菌系统发育图改编)

为放线菌门。放线菌门属于原核生物界细菌域第 14 门，与其他 16 个门并列。放线菌门仅有放线菌纲 (Class I Actinobacteria)。放线菌纲有 5 个亚纲：醋微菌亚纲 (Subclass II Acidimicrobidae)、红细菌亚纲 (Subclass III Rubrobacteridae)、红螬菌纲 (Subclass

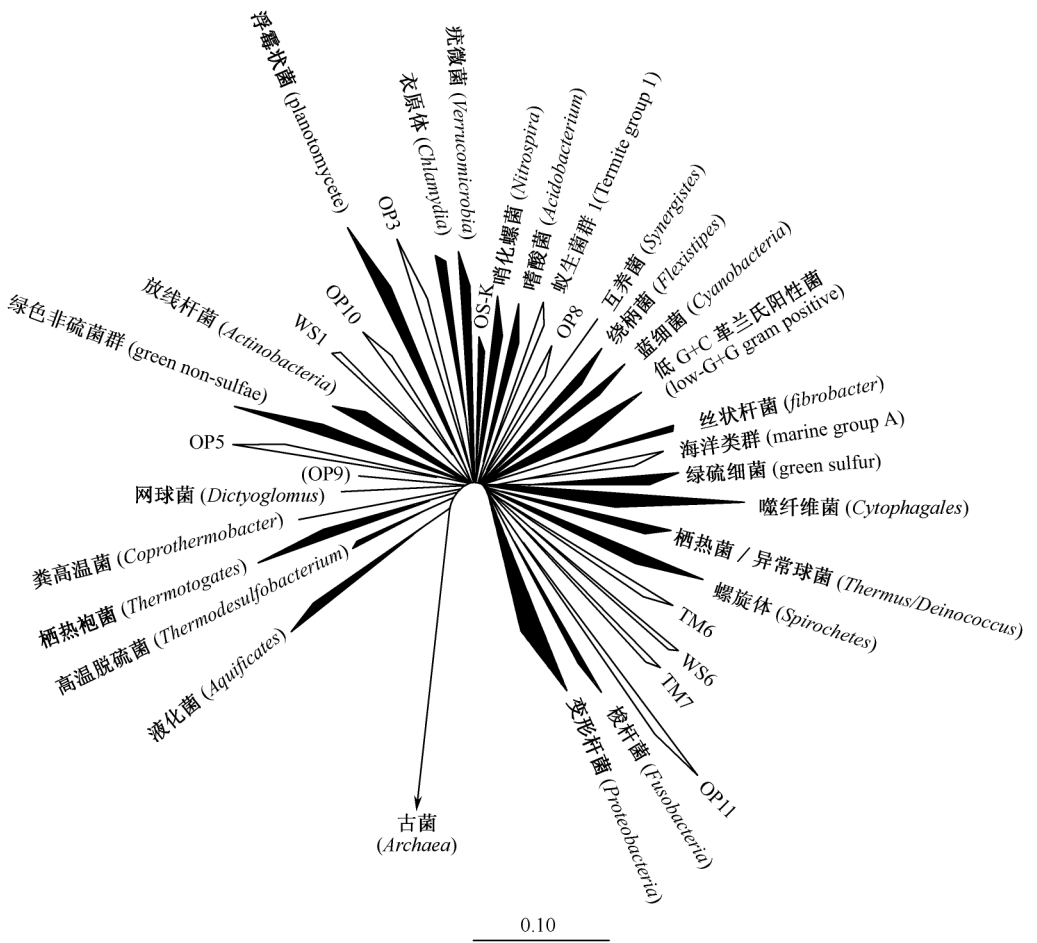


图 I-1-2 细菌域的进化距离树，表示了目前被承认的细菌门和推测（候补）的细菌门的构建采用 ABR 软件包和 1997 年 3 月 ABR 释放的序列数据。含有两个或更多序列的聚类成的细菌门用楔状表示，楔的深度反映了分支的深度。可培养的细菌门用黑色表示，只是环境中的序列聚类的细菌门用框表示。线段长度代表 10% 核苷酸差异的距离

IV Coriobactridae、球杆菌亚纲 (Subclass V Sphaerobacteridae)、放线菌亚纲 (Subclass Actinobacteridae)。放线菌亚纲有放线菌目 (Order I Actinomycetales) 和双歧杆菌目 (Order II Bifidobacteriales)。目前，放线菌目包括 10 个亚目 40 个科约 170 多个属。本书描述涉及 40 个科，176 个属。

1.2 放线菌生物学的发展

1.2.1 分子系统学

放线菌 (actinomycete) 是一类具有分枝状菌丝体的高 (G+C)mol %、革兰氏阳性细菌。从 Cohn 发现放线菌至今已有 100 多年的历史，放线菌分类学作为研究放线菌的基础学科，已经由以往的经典分类 (classical classification)、化学分类 (chemot-

onomy) 发展到了现在的分子分类 (molecular taxonomy), 从而建立了放线菌分子系统学 (molecular systematics of actinomycete), 也称分子分类学 (molecular taxonomy)。

Harz (1877) 虽是最早对放线菌进行描述的学者, 但直到 1916 年前后, Waksman 等在研究土壤微生物时, 才首次把一些微小“真菌”或丝状细菌称为“放线菌”(actinomycete), 并详细描述了这些微生物。1942 年链霉素的发现, 以及 20 世纪五六十年代抗生素工业的兴起, 极大地促进了放线菌分类学研究的开展。同时, 相继出版了 *Guide to the Bacteria and Actinomycetes* (Krassil'nikov 1949)、*Problems in the Classification of Antagonists of Actinomycetes* (Gause 1957) 等经典专著, 尤其是 1961 年 Waksman 的专著《放线菌的属和种分类鉴定和描述》的出版标志着放线菌分类学的形成。这个时期的放线菌分类可称为经典分类或传统分类 (traditional classification), 主要的依据是放线菌的形态特征、培养特征及生理生化特性。

20 世纪 50 年代发展起来的数值分类 (numerical classification) 是应用计算数学原理和技术来辅助定义微生物分类单位。根据微生物分类学信息, 借助计算机对表型数据进行比较。数值分类应用在将大量独立的菌株归群以至定种或更高类群方面曾取得广泛成功, 尤其是在链霉菌的研究上, Williams 等 (1983) 通过数值分类研究, 将已报道的 475 种链霉菌合并成了 77 个种 (或簇), 一定程度上理顺了链霉菌混乱的分类系统。

Cummins 等 (1956) 最早指出 G^+ 菌细胞壁化学组分是有用的化学分类特征。1964 年, Lechevalier 夫妇等进行了放线菌化学分类的研究, 并在 1971 年发表了主要依据化学指征的分类系统, 从而使放线菌分类进入了化学分类时期。从 20 世纪 70 年代开始, 化学分类被各国放线菌分类学者所接受, 化学分类技术和方法也日趋完善。放线菌分类学的研究内容从个体形态水平深入到了细胞化学水平, 并总结出了规律性的结论, 建立了放线菌的化学分类体系。经常使用的特异性细胞化学特性包括: 细胞壁化学组分 (主要是氨基酸和糖)、枝菌酸、脂肪酸、磷酸类脂、甲基萘醌、全细胞蛋白及核糖体蛋白电泳分析等。

随着科学技术的快速发展, 尤其是分子生物学、细胞化学、分子遗传学、分子生态学以及生物信息学的发展, 放线菌分类学研究也从传统的表观水平跨越到了分子水平。20 世纪 80 年代, Stackebrandt 等根据 16S rRNA 相似性、DNA-rRNA 和 DNA-DNA 杂交的结果, 描绘了放线菌和其他生物之间的系统发育树, 这标志着放线菌分类学分子分类时期的开始。分子分类是在分子水平上对生物个体的 DNA 和 RNA 进行分析, 并根据获得的基因型信息对生物个体进行分类, 也有人将其称为基因型分类 (genotypic taxonomy)。近年来, 随着分子生物学的发展又出现了一些直接以 DNA 和蛋白质为基础的分型方法, 如核糖体基因分型 (ribotyping)、限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析、扩增性 rDNA 限制性酶切片段分析 (ARDRA)、随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析、低频限制性酶切片段分析 (LFRFA)、Rep-PCR 基因指纹技术及全细胞蛋白 SDS-PAGE 指纹图谱分析等, 形成了在分子水平上研究认识生物的自然进化关系和生物多样性的基础生物科学, 即分子系统学。

放线菌分类学在经历了长期曲折的发展历程后, 人们的认识已经从表观现象向基因

本质逐步深入，以分子系统学为核心，综合微生物多种不同的信息，包括表型（phenotypic）、基因型（genotypic）和系统发育（phylogenetic）信息，来研究微生物系统进化的多相分类（polyphasic taxonomy）方法已成为研究放线菌各级分类单位的最有效手段。多相分类将生物的各种信息和数据综合起来，可用于所有水平上的分类单位的描述和定义，更能反映生物间系统进化关系。多相分类的研究方法及其适用的分类等级水平见表 I-1-1。

表 I-1-1 多相分类信息在不同分类水平上的适用性

信息来源	方法	适用的分类等级		
		属或以上	种	亚种或以下
基因型数据				
染色体 DNA	DNA 碱基组成[(G+C) mol%]	✓	✓	
	DNA-DNA 杂交		✓	✓
	限制性酶切图谱 (PFGE、RFLP、AFLP)		✓	✓
	全基因组测序	✓	✓	✓
DNA 片段	DNA 探针	✓	✓	✓
	DNA 测序（如： <i>gyrB</i> 和 <i>recA</i> 基因， MLST）	✓	✓	✓
	基于 PCR 的 DNA 指纹图谱（如：PCR- RFLP、RAPD、Rep-PCR）		✓	✓
rRNA	DNA-rRNA 杂交	✓	✓	
	核酸序列	✓	✓	
	ribotyping, ARDRA		✓	✓
表观数据				
蛋白质	氨基酸序列	✓	✓	
	SDS-PAGE		✓	✓
	血清学分析	✓	✓	✓
化学特性	脂肪酸	✓	✓	
	异戊烯醌	✓	✓	
	糖脂	✓	✓	
	枝菌酸	✓	✓	
	肽糖	✓	✓	
	极性类脂	✓	✓	
	氨基酸	✓	✓	
	糖	✓	✓	
	壁酸	✓	✓	
全细胞化学组分指 纹图谱	拉曼分散色谱		✓	✓
	FT-IR		✓	✓
	PyMS		✓	✓
细胞表型特征	形态特征	✓	✓	
	生理生化特征	✓	✓	
	快速酶学测定		✓	✓

注：PFGE，脉冲场电泳；RAPD，随机扩增多态 DNA 指纹图谱；REP-PCR，重复 DNA 序列 PCR；MLST，多位点序列分型；RFLP，限制性片段长度多态性分析；ARDRA，扩增 rDNA 限制性酶切片片段分析；AFLP，扩增片段长度多态

放线菌分类学的研究具有理论和实际意义。当前主要从两个方面进行放线菌分类学

的研究，一是为了实用的需要，建立各种放线菌的信息库，以便人们查证、认识各种放线菌，从而更有效地开发利用放线菌资源及有效地控制有害放线菌；二是为了探讨放线菌的系统发育，建立反映放线菌进化关系的自然分类系统，以揭示各种放线菌的本质特征和相互关系，丰富生物多样性研究的内容。

1.2.2 分子生态学

放线菌作为一类具有广泛实际用途和巨大经济价值的微生物类群，其分子生态学是微生物分子生态学的重要组成部分。伴随着放线菌分类学的发展，放线菌生态学的研究由萌芽时期、发展时期进入到了分子生物学时期，产生了放线菌分子生态学（molecular ecology of actinomycete）。

放线菌生态学研究是从 19 世纪末建立放线菌属（*Actinomyces*）开始的。直至 20 世纪 40 年代初期，放线菌还是不为人们熟知的一类微不足道的微生物，当时发表的放线菌只有四五个属。能产生链霉素的链霉菌（*Streptomyces*）（Waksman et al. 1943）的发现是放线菌生态学研究的一个转折点。从发现链霉菌至 20 世纪 90 年代初期，是放线菌生态学快速发展的时期，以研究放线菌在各种环境的生态分布规律为重点。这个时期的很多研究工作是以分类学为主，在方法学上取得重大进展，并发现了大量放线菌新种、新属。Liesack 等（1992）利用 16S rDNA 分子序列和探针检测中度酸性土壤中的未培养或迄今尚不能培养（uncultured or hitherto unculturable）的放线菌种类组成，标志着放线菌分子生态学研究的开始。他们的研究表明，自然环境中存在着许多尚未为人所知的放线菌（Stackebrandt et al. 1993）。从此很多国际同行纷纷采用分子生物学方法研究不同自然环境中的放线菌。

放线菌分子生态学的研究内容目前主要是采用分子生物学技术，研究不同自然环境中放线菌的多样性、分布状况以及它们的数量动态；目前的放线菌分子生态学方法还不能揭示各种群和群落的生态学功能。应用于放线菌分子生态学的方法大致可以分成两大类，即全程 rRNA 分析法（full-cycle rRNA analysis）和 DNA 指纹分析法（DNA fingerprinting）。相关技术有荧光原位杂交（fluorescence *in situ* hybridization, FISH）、流式细胞计数法（flow cytometry, FCM）和共聚焦激光扫描显微法（confocal laser scanning microscopy, CLSM）。20 世纪 90 年代后，rRNA 分析法与 FISH 法结合而成为更为全面的分析方法，故有时也称为全程 rRNA 分析法，主要包括序列测定和探针检测。生态学所指的指纹是群落指纹（community fingerprint），包括已知和未知、可培养和尚未培养的微生物。近年来 DNA 指纹分析法的发展非常迅速，如限制性酶切片段长度多态性分析、扩增性 rDNA 限制性酶切片段分析、rRNA 基因间区分析（RISA）、长度异质性分析（LH-PCR）以及变性梯度凝胶电泳分析（DGGE）等。这些方法以电泳图带谱或带型（band profile, banding pattern）的形式为结果，可比性较好，是复杂自然微生物群落快速比较研究非常有用的方法。此外，可以从群落 DNA 指纹分析法产生的带型中切下任意一条带，进行克隆和序列测定，或者利用一系列类群特异探针进行杂交，从而分析环境样品中的种类组成。

在过去几年的放线菌分子生态学研究中，人们在不同陆生和海洋水生环境中发现了几个新的 16S rDNA 序列族（Liesack et al. 1992; Rheims et al. 1996a、b）。它们所

代表的是属于放线杆菌纲中至今未培养的微生物类群。由于它们具有世界分布性，因此，这些未培养放线菌类群在其生态系统中发挥着重要的作用。对上述这些克隆所对应的放线菌进行纯培养分离进行多次尝试均未成功，因为用分子生物学手段检测到的微生物并不是都能够设计出合适的培养条件并得到其纯培养。随着更多的新的微生物被分离得到，纯培养分类群系统进化树得以不断完善，提高了分子生态学研究的精确性，能够对环境样品中的 16S rRNA/rDNA 序列所代表的分类群及其在环境中的生态学功能有更准确的认识。这将使得对自然环境放线菌种类组成、细胞数量及各个分类群的生态学功能研究更加深入，也将为人类开发、利用和保护放线菌资源提供重要的指导作用。利用放线菌分子生态学方法一旦检测到新的潜在的放线菌类群的存在且知道其分类地位，就能够指导我们按照系统发育关系与之相近的可培养放线菌的新陈代谢特性和营养需求设计培养条件，从环境样品中分离获得其纯培养，最终确定新的放线菌类群。

1.2.3 分子遗传学

近年来，随着放线菌遗传分析技术的发展，对放线菌的研究也更深入、更广泛，大大地促进了其在各实际领域的应用，特别是在环境污染的生物修复等方面，已显示出了极大的作用和深厚的开发潜力，对放线菌及其产物生成遗传学的研究具有重要的理论及实践意义。

1.2.3.1 分子遗传学发展过程

早在 20 世纪 50 年代初期放线菌遗传学研究工作就已经开始。由 Hopwood 发现的天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) A3(2) 一直是放线菌遗传学研究的模型菌株。放线菌分子遗传学也是伴随链霉菌分子遗传学的发展而发展起来的，主要经历了体内研究、体外研究和计算机虚拟 (*in silico*) 遗传学研究 3 个阶段。

20 世纪六七十年代的体内研究阶段积累了大量有意义的发现：可扩散分子——A 因子 [灰色链霉菌 (*S. griseus*) 中]、SCP1 质粒及致育性、CCC 质粒 (SCP2)、转座子 [委内瑞拉链霉菌 (*S. venezuelae*) 中]、线性质粒 [娄彻氏链霉菌 (*S. rochei*) 中] 及整合质粒等。这些发现为放线菌分子遗传学的发展奠定了基础。

20 世纪 80 年代，随着 DNA 重组及其他分子生物学技术的发展，开始了体外遗传学研究。体外研究的发展又可分为两个阶段：一是生物物理和分子生物学的基本特征的分析，如基因和操纵子的结构、转录、翻译和代谢的控制；二是通过基因克隆研究链霉菌某些特殊特征的分子遗传学，如分化、发育和次生代谢产物的合成等。

20 世纪 90 年代，随着计算机信息处理技术的发展，产生了计算机虚拟遗传学，即通过将测定的 DNA 序列与数据库中已有序列相比较，推测基因功能。测序和虚拟遗传学分析使推测一个发育基因的功能所需的时间缩短数年之久，并不断产生新成果。在抗生素生物合成领域，计算机虚拟遗传学也扮演了决定性的角色，通过序列的虚拟遗传学分析阐明生物合成装配途径，开辟了用合成酶基因工程组合来生物合成天然产物的新兴领域。预期链霉菌转录组、蛋白质组和代谢组的研究将成为放线菌遗传学的新阶段。

1.2.3.2 次生代谢分子调控

放线菌和其他细菌的显著区别是它的复杂细胞周期。放线菌能形成气生菌丝体和分生孢子、孢囊和其他形态结构，并在此过程中产生次生代谢产物。目前已证明这两个过程在遗传学上是相互关联的。近期的研究认为，各种次生代谢物充当着基因调控作用，复杂的形态分化过程毫无疑问也需要多种调控分子（次生代谢物）的参与（Hodgson 2000）。药理学研究发现，许多次生代谢产物具有医药和植物保护方面的用途，已作为抗细菌、抗真菌和抗肿瘤药物被广泛应用。

放线菌次生代谢的分子遗传学是目前工业微生物学最为活跃的研究领域之一，这主要表现在以下两个方面。第一，在理论研究上的价值。放线菌有着独特的遗传学结构，根据最近完成的天蓝色链霉菌 A3(2) 的基因组序列分析，天蓝色链霉菌拥有大约 7825 个编码基因（Bentley et al. 2002）。这一数字不仅远大于革兰氏阴性菌大肠杆菌（*Escherichia coli*）的 4289 个基因和革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）的 4099 个编码基因，甚至大于真核生物啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）基因组的 6200 个编码基因。通过对基因组的比较研究发现，其中仅仅大约 2000 个基因是维持天蓝色链霉菌生长和繁殖所必需的，而剩余的大量基因都可能涉及各种各样的次生代谢活动。目前对于这一类基因的进化起源、功能和调控的了解还十分有限。相信随着分子生物学和功能遗传学技术的发展和运用，对这一类“次生代谢”基因的研究将会为阐明初生代谢和次生代谢的基因调控等生物学问题提供更多的实验证据。其次，为了从放线菌中获得更多更有效的抗菌和抗肿瘤药物，放线菌次生代谢产物合成机制的研究受到了广泛的重视，越来越多的放线菌次生代谢产物的合成及调控基因被克隆。对这些生物合成基因结构的分析导致了 20 世纪 90 年代初期对 I 型和 II 型聚酮类次生代谢产物合成机制的阐明（Hopwood 1997）。这些发现为开展次生代谢药物的人工设计以及组合生物学合成（combinatorial biosynthesis）提供了理论和实践上的可能性。

1.2.4 生物信息学

生物信息学是伴随基因组研究而产生的一门新兴的交叉学科，它的研究内容随着基因组研究的发展而发展。

广义地说，生物信息学从事与基因组研究相关生物信息的获取、加工、储存、分配、分析和解释。这一定义包括了两层含义，一是对大量数据的收集、整理与服务，即管理这些数据；另一个是从中发现新的规律，即应用这些数据。具体地说，生物信息学是把基因组 DNA 序列信息分析作为源头，找到基因组序列中代表蛋白质和 RNA 基因的编码区；同时，阐明基因组中大量存在的非编码区的信息实质，破译隐藏在 DNA 序列中的遗传语言规律；在此基础上，归纳、整理与基因组遗传信息释放及其调控相关的转录谱和蛋白质谱的数据，从而认识代谢、发育、分化、进化的规律。生物信息学还利用基因组中编码区的信息进行蛋白质空间结构的模拟和蛋白质功能的预测，并将此类信息与生物体和生命过程的生理生化信息相结合，阐明其分子机制，最终进行蛋白质、核酸的分子设计和药物设计。

基因组研究之所以需要依赖生物信息学，原因之一是伴随着基因组研究，相关信息

出现了爆炸性增长，迫切需要对大量生物信息进行处理。根据国际数据库的统计，DNA 碱基数现在已达 140 亿，大约每 14 个月翻一番。同时，电子计算机芯片对于数字处理能力的增长也相当于每 18 个月翻一番。因此，计算机能够有效地管理和运行大量数据。但是，基因组研究需要依赖生物信息学更为本质的原因是基因组数据的复杂性。通俗地说，生物的遗传密码就是 4 种核苷酸 A、T、G、C 字符连接起来的线状长链。这种链往往很长，如何读懂它是个极大的难题。基因组研究最终是要把生物学问题转化成对数字符号的处理问题。要解决这样的问题就必须发展新的分析理论、方法、技术、工具，就必须依赖计算机的信息处理。

目前生物信息学用于放线菌研究的主要内容为以下几个方面：

(1) 获取不同放线菌的完整基因组。基因组大规模测序的每一个环节都与信息分析紧密相关。从测序仪的光密度采样与分析、碱基读出、载体标识与去除、拼接、填补序列间隙，到重复序列标识、读框预测和基因标注，每一步都是紧密依赖生物信息学的软件和数据库。而要获得完整准确的基因组序列，这一复杂程序往往要进行很多遍。

(2) 发现新基因和新的单核苷酸多态性。生物信息学的方法是发现新基因的重要手段，包括利用 EST 短 cDNA 序列数据库发现新基因（也称基因的电脑克隆）和从基因组 DNA 序列中预测新基因。

(3) 基因组中非编码蛋白质区域的结构与功能研究。近年来的研究表明，在放线菌这样的微生物中，非编码蛋白质的区域只占整个基因组序列的 10%~20%，但是随着生物的进化，非编码区越来越多。普遍的认识是它们与基因的表达调控有关。

(4) 在基因组水平研究放线菌系统进化。近几年来，随着基因组序列数据的大量增加，对序列差异和进化关系的争论也越来越激烈。首先，同一种群基于不同分子序列所重构出的进化树可能不同。因此，发展了多种根据基因组指纹图谱研究系统进化的手段，而这些手段的广泛、有效实施依赖于生物信息学软件和数据库。其次，对“垂直进化”和“水平演化”之间关系的讨论正逐渐引起人们的重视，也就是近年来发现的基因的“横向迁移现象”。一直被认为保守、垂直进化的 rRNA 基因在不同种群的放线菌中也发现了短片段的“横向迁移现象”，其结果虽可导致序列差异，但这种差异与进化无关（Wang et al., 2000）。

(5) 放线菌次生代谢药物设计和改造。为了从放线菌中获得更多更有效的抗菌和抗肿瘤药物，越来越多的放线菌次生代谢产物的合成及调控基因被克隆，对这些生物合成基因结构的分析阐明了相关次生代谢产物的合成机制（Hopwood 1997）。这些发现为开展次生代谢药物的人工设计、已知药物分子的改造、大幅度提高产率等提供了理论和实践上的可能性。

1.3 放线菌生物技术的发展

1.3.1 分离培养与纯化技术

在人类基因组和后基因组研究确定寻找下一代化学治疗剂和新的生物活性物质的目标中，放线菌作为一类重要的微生物资源，通过新的和稀有放线菌（rare actinomycete）的分离，寻找和发现新的生物活性物质和代谢产物，其潜力仍然是其他生物无法比拟

的。迄今许多已知具有商业意义的代谢产物的发现，几乎均是依靠新的筛选系统及新的微生物分离和鉴定技术的使用。然而，由于长期以来在天然产物的筛选过程中使用传统的菌种分离和鉴定技术，导致大量缺乏明确鉴定的菌株被重复分离和使用，因此从中发现新化合物的概率在逐渐降低，严重地影响着新的生物活性物质的筛选效率。近年来，国内外科学家为提高放线菌天然产物的筛选效率，在利用人功能基因组和微生物基因组研究的成果改进或设计新的筛选系统的同时，正在开展从自然生态环境中选择性分离放线菌的分离技术的研究。Atalan 等 (2000) 报道使用一种分散差速离心方法 (dispersion and differential centrifugation, DDC) 从土壤样品中分离链霉菌比常规的稀释平板法提高效率 3~12 倍。这一方法主要是打破了土壤团粒，将颗粒内与之胶联的菌丝体释放出来。使用这一方法发现了产生无纤维素酶的木聚糖胞内酶 (cellulase-free endo-xylanase) 的链霉菌新种高温嗜粪链霉菌 (*Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov.)。吕志堂等 (2000) 根据放线菌的营养特性和对抗生素的敏感性，设计出分离假诺卡氏菌的选择培养基，结合土样的物理处理，显著提高了分离假诺卡氏放线菌的阳性检出率，并发现了糖多孢菌 (*Saccharopolyspora*)、拟无枝菌酸菌 (*Amycolatopsis*)、诺卡氏菌 (*Nocardia*) 等属的新种。新的研究还表明，链霉菌生态学对于寻找和发现天然产物具有相当大的意义。寻找存在于土壤颗粒间隙和植物根际弱酸性环境 (pH3.5~6.5) 中的放线菌，有可能发现产生抗真菌活性物质和在低 pH 下有高活性的酶类。

放线菌是抗生素、酶和酶抑制剂的重要来源，放线菌的分离和分类研究是伴随着抗生素工业的兴起而发展起来的。过去的菌种筛选工作主要集中在链霉菌属，但自从 20 世纪 50 年代发现有价值的抗生素，如紫色小单孢菌及其他小单孢菌产生的庆大霉素 (gentamycin)，诺卡氏菌属产生的利福霉素 (rifamycin)，马杜拉放线菌属产生的马杜拉霉素 (maduromycin)、洋红霉素 (carminomycin) 等以后，表明稀有放线菌更具有产生新抗生素的潜力。非链霉菌或稀有放线菌作为新的生理活性物质的重要来源成为关注的热点。稀有放线菌不是一个分类单元 (taxa)，而是指用常规的分离程序和分离手段进行样品分离时，一些出现频率要比常见的链霉菌低得多的类群。也有学者笼统地把所有的非链霉菌 (no-streptomycete group) 归为稀有放线菌。放线菌的最主要分离源是土壤，链霉菌是其优势菌群，而非链霉菌的分布密度相对来说非常低。20 世纪 60 年代 Lechevalier 曾用 3 种培养基及常规的稀释平板涂布法对 16 种不同来源的土样进行放线菌的分离，其结果是 95% 的放线菌属于链霉菌属，游动放线菌及小单孢放线菌等 10 多个属的稀有放线菌仅占 5% 左右，可见稀有放线菌的数量之稀少。

20 世纪的微生物学，其研究对象基本上是在人工合成培养基上研究可以培养的微生物。过去常用的分离方法如平板分离法，通常只能分离到一些在普通的实验室条件下能够生长和分离的微生物，不能培养的微生物 (viable but non-culturable microorganism, VBNC) 不会被发现。VBNC 类微生物系指现有培养条件下无法分离和培养的微生物类群。由于人们的知识和能力有限，用现有的分离方法无法将其从各种生存环境 (如土壤、活性污泥、海水等) 中完全分离出来。分子生物学方法研究的结果表明，研究、定名过的微生物仅是实有数的 1% 而已。之所以绝大多数包括放线菌在内的微生物未被发现，其主要原因还是受分离条件和技术的限制。因此，放线菌尤其是稀有放线菌的选择分离技术仍然是放线菌生物学研究和资源开发中的重大课题，同时也是应用微生物

物工作者在大规模菌种筛选过程中，为扩大菌种来源必须解决的现实问题。

如何分离包括 VBNC 在内的自然界中存在的绝大多数微生物是目前微生物学工作者研究的热点之一。现在国外有些实验室（例如日本北里研究所的生物机能研究室）对 VBNC 类微生物的分离进行了广泛的探索。他们认为，一类土壤依存微生物，即所谓土壤浸出物（soil extract）需求菌，在培养基中必须有土壤营养物质存在的情况下才能生长。因此，在分离培养基中添加土壤提取液有利于这类微生物的分离。还有一些菌为互营养微生物，即一种微生物的代谢产物为另一种微生物提供生长必需的营养，如链霉菌产生的土腥素（geosmin）为其他许多土壤放线菌生长所需。因此在分离培养基里添加土腥素也可以分离到更多的稀有放线菌。研究还发现，一类微小菌落（micro colony），在固体培养基平板上分裂几代后就停止分裂生长，因此在平板上还不足以形成可见菌落，但是转接到液体培养基后则可以检测到菌体的生长。我国学者赵红娟（2000）在日本北里研究所利用土壤提取物、geosmin 产生菌共培养技术分离到了常规方法难以培养的 VBNC 类链霉菌。云南大学微生物研究所唐蜀昆等（2007）利用复合盐培养基，从新疆盐土分离到大量未知放线菌。总之，由于这些难培养微生物对生长条件的要求比较苛刻，因而分离难度较大。但是，一旦分离到这类微生物，新菌种的可能性就很大。

1.3.2 基因工程技术

随着基因工程技术的飞速发展，在新的抗生素的发现和已知抗生素的改造及菌种选育工作中越来越多地采用了基因工程的方法和技术。如利用基因工程方法改造抗生素生物合成基因簇特异性调节基因来提高抗生素产量。通过增加基因的剂量来克服代谢的瓶颈是一种简便的提高抗生素产量的途径，但有时并不奏效。因为抗生素的产生主要是通过前体路线，而不是通过增强本身生物合成的能力。对于某些抗生素的生物合成来说，合成基因序列的多拷贝实际上会导致减产，其原因可能由于毒性中间产物的过量积累或者由于竞争结合必需的正调节因子所引起的。目前基因工程技术在放线菌产生抗生素方面的应用主要有以下途径。

（1）抗生素生物合成基因簇有关基因的克隆。已经有 30 余种抗生素的生物合成基因成功地进行了克隆。目前常用的抗生素生物合成基因的克隆方法和策略主要有以下几种：① 将目的基因克隆到标准宿主菌中，通过检测基因产物检出阳性克隆；② 利用阻断突变株进行基因克隆；③ 通过克隆某种抗生素的抗性基因来分析和检出与其连锁的抗生素生物合成基因；④ 利用鸟枪法将抗生素产生菌的 DNA 大片段克隆到非产生菌中；⑤ 以已克隆的生物合成基因为探针克隆同源的抗生素生物合成基因。

（2）利用组合生物技术产生新的抗生素。大环内酯类、萜环类和聚醚抗生素等均属于聚酮类化合物，负责这类抗生素合成的 I 型聚酮化合物生物合成酶（polyketide biosynthase, I 型 PKS, 简称聚酮合酶）的成模块方式组装的合成机制已经被深入研究过。除了合成大环内酯类抗生素的 PKS 外，其他 PKS 的酶活性、专一性都不很高，而且在生物合成过程中被重复使用。据此，美国斯坦福大学的 Khosla 教授提出了组合生物合成（combinatorial biosynthesis）的理论。利用组合生物技术产生新的抗生素已经成为新药研究的一个重要领域。以 I 型 PKS 为研究对象的组合生物合成已经取得了很大的进展。Khosla 通过将不同来源的 PKS 进行重组、添加或删除的方式产生了非天然的天

然化合物。随着对放线菌次级代谢产物生物合成研究的逐步深入，组合生物合成的设计和操作会更有逻辑性和针对性。此外与液相质谱联用和核磁共振结合的高通量筛选也会加速具有新结构和新活性的“非天然”天然产物的分离鉴定工作。

(3) 通过激活抗生素的沉默基因来获得新的抗生素。大多数放线菌具有比其表现性状更多的产生抗生素的潜力，在自然条件下存在于菌体中不表达或以极低水平表达，可在特定的条件下被激活而表达活性产物的基因被称作沉默基因。通过基因克隆、诱变处理、菌株或种间自然接合、原生质体融合等技术激活处于休眠状态的沉默基因有可能发现新的抗生素。

(4) 利用基因重组技术改良抗生素的生产菌。采用的主要方法有以下几种：① 通过解除抗生素生物合成中的限速步骤来提高抗生素的产量；② 通过引入抗性基因和调节基因来提高抗生素的产量；③ 通过引入氧结合蛋白来提高抗生素的产量；④ 通过增加促使中间产物转化为有效组分的酶基因，通过敲除或破坏次要组分的生物合成基因，和通过不同抗生素生物合成基因之间的重组提高抗生素产生菌的有效组分的含量。

1.3.3 功能基因组学技术

随着 DNA 测序技术在 20 世纪 90 年代初期革命性突破，生物全基因组序列测定已缩短到只需几个月的时间，目前已经完成了 100 多个微生物基因组的全序列测定。2002 年 5 月，由英国 Wellcome 基金会 Sanger 研究所和 John (Innes) 研究所合作完成了天蓝色链霉菌 A3 (2) 的全序列测定，成为第一个对公众开放的链霉菌基因组。我们知道生物体作为一个复杂的有机体系统，对其局部代谢活动的阐明并不一定产生对整体的了解，因此需要引入具有“整体性”的研究方法。功能基因组学技术就是在此需要下发展起来的。各种功能基因组学研究手段在 20 世纪 90 年代后期得到了迅速的发展，使得科学家们能够同时分析数千个基因，产生和某一细胞状态相关的大量完备和量化的数据。目前所应用的功能基因组学研究技术可分为以下 4 类：

(1) 系统地改变基因结构，并通过进一步的表型分析研究基因的功能和调控特性。主要有两种改变基因结构的方法：第一是采用转座子 (transposon) 进行随机引发突变，并进而对突变株进行表型分析；第二是突变基因组的每一个基因，产生一个完整的突变株文库，进而进行表型研究。最近，哈佛大学的 Losick 研究组首次构建了一个可用于天蓝色链霉菌中大规模产生基因突变株的方法 (Gehring et al. 2000)。该方法使用 *Tn5* 转座子进行 DNA 体外诱变。他们的研究发现了许多先前未知的功能基因，涉及色素形成、气生菌丝和分生孢子的形成等。

(2) 系统监测基因转录过程。目前已经发展了几种可以同时高效率地监测数千个基因转录的方法，其中较为普遍使用的是微矩阵 (microarray) 技术。一个芯片上可以包括数千个 DNA 样品斑点，每一个样品斑点可以代表基因组中的某一特点基因 (基因转录子, transcriptomic)，每个样品斑点都可以参与异源杂交实验。使用微矩阵技术可以系统地获取和某一特定生理状态相关的全面的细胞信息。可以预见，随着天蓝色链霉菌基因组序列的公布，在今后几年将会见到更多的对天蓝色链霉菌所进行的功能基因组学研究，这些信息的积累和准确诠释将会有助于我们对次生代谢活动的系统认识，增加次生代谢产物的合成。

(3) 对基因编译的蛋白的系统监测，例如各种蛋白质组学 (proteomics) 技术。蛋白质组学是一种可以同时大规模分析细胞内蛋白质合成的方法，这一方法来源于 20 世纪 70 年代发明的双向蛋白电泳技术，在 90 年代后期，随着基因组信息数据库的建立以及质谱仪的引入，这一技术得以完善成熟。瑞士巴塞尔大学 Thompson 研究组使用双向凝胶蛋白电泳技术研究了天蓝色链霉菌对各种外部压力刺激的效应，他们发现不同的细胞发育阶段有着特殊的蛋白表达模式，每一种不同的外界环境刺激也会诱发一组特定的蛋白表达。这表明可能存在着多种调控系统独立控制着不同的压力反应 (Vohradsky et al. 2000)。如果应用蛋白质组学技术对放线菌各种代谢活动中发生变化的蛋白进行分析定名，将会对功能细胞代谢的产生进一步了解。

(4) 系统监测细胞代谢过程中各种代谢中间或终产物，例如代谢组学 (metabolomics) 技术。它是用来全面系统测定细胞内各种代谢分子的新兴技术，尚未用于放线菌的研究。鉴于代谢组学技术可以帮助了解细胞代谢途径中的流量变化 (flux change)，这对于放线菌代谢工程和优化次生代谢产物的合成过程将会有重要的意义。

1.3.4 体外分子定向进化与分子育种

体外分子定向进化 (molecular directed evolution) 是近几年发展起来的一种对生物活性分子进行改造的新策略，可以在对目标蛋白的三维结构信息和作用机制尚未了解的情况下，通过对编码基因的随机突变、重组和定向筛选，获得具有改进或全新功能的生物活性分子，大大缩短育种进程，使在自然条件下需要几百万年的进化过程在短时间内得以实现。以 DNA 改组技术 (DNA shuffling) 为代表的体外分子定向进化与分子育种技术近几年在实际应用中已经取得了令人瞩目的成就。

DNA 改组技术是由美国学者 Stemmer (1994) 首次提出，也被称作分子育种 (molecular breeding)。它是基于 PCR 技术对一组基因群体 (进化上相关的 DNA 序列或筛选出的性能改进序列) 进行重组、创造新基因的方法。使用单基因 DNA 改组技术，已经有了若干成功的例子，使有些酶的活性得到了不同程度的提高。当 DNA 改组用来重组一套进化上相关的基因时，又被称为族系改组 (family shuffling)。该技术一个典型的成功例子是对 4 种头孢菌素酶的基因进行体外分子定向进化与分子育种，使酶的活力增加了 270~540 倍，而使用单基因 DNA 改组技术酶的活力只增加了 8 倍 (Cramer et al. 1998)。

体外分子定向进化大大加快了人类改造和开发包括酶分子在内的生物活性分子新功能的步伐。截至 2000 年底，已有几十种药用蛋白质分子经定向进化得到了改进。目前，利用体外分子定向进化与分子育种所取得的成就主要有以下几个方面：生物分子活性的提高和稳定性的改善、抗体亲和力的提高、新型疫苗和其他药物分子的发现、新的代谢途径的开发等，甚至可以用来预测自然进化中新突变的出现。总之，以 DNA 改组技术为代表的体外分子定向进化与分子育种技术是目前应用最方便、有效，可将有利突变迅速积累的体外分子进化工程技术，该技术广泛适用于单一基因、家族性基因、单一代谢途径，甚至整个基因组等各个层面的体外分子进化。

1.4 放线菌资源的开发与利用

放线菌是一类比其他微生物更为丰富的生物活性物质资源，历史上为抗生素工业的建立和发展发挥过巨大作用。放线菌广泛存在于不同的自然生态环境中，种类繁多、代谢功能各异，其特有形态和生物学特性是研究生物形态发育和分化的良好材料；许多放线菌能产生生物活性物质，是一类具有广泛实际用途和巨大经济价值的微生物资源。医药工业的发展使人们认识到微生物多样性是发展健康保护和疾病控制新药的必需和潜在的重要因素。其理由是：50%以上的先导化合物均源于微生物；市场最低估计，微生物药物每年大约为 500 亿美元，占据整个药物市场值的一半。今天随着放线菌生物多样性研究的进展，放线菌仍然具有产生新的生物活性物质的极大潜力。

1.4.1 放线菌生物多样性

1.4.1.1 陆生放线菌多样性

放线菌是广泛分布于土壤中的优势微生物类群。它们能降解大量的不同种类的有机化合物，对有机物的矿化起着重要作用。虽然大多数放线菌为离体腐生型微生物，但极少数是人和动植物的致病菌。另一方面，它们降解橡胶制品，利用矿物燃料生长而产生污染水体的异味物质，或者生长在污水处理场的活性污泥里，形成黏稠的絮状泡沫。极端生态环境（如高温、高压、厌氧、低温、酸碱盐及营养贫乏极限等环境）中也有放线菌生存。近年的研究结果正为新一代的生物工艺与微生物产品的开发提供新的资源。

1.4.1.2 海洋放线菌多样性

由于海洋环境的特殊性，海洋微生物具有独特的代谢方式，产生的代谢物化学结构具有极大的复杂性和多样性。海洋环境作为微生物源药物的发现或探索有 3 个理由：首先地球上 71% 的面积被海洋所覆盖，其深度大多在 2000m 以上；其次是已经公认的观点说明，生命是在海洋中进化并形成了最为丰富的生物多样性，实际上 35 个动物门中 20 个门是海洋专性动物，而仅有一个是专性陆生的。这一丰富的海洋生物多样性也同样反映了广泛的化学多样性。第三，海洋环境有着复杂和极端的地质化学及生命起源的生态因素，它是生物共同生活的家园。近 20 年来，有关海洋微生物产生新的具有生物活性的次级代谢产物的报道逐渐增多，海洋微生物作为活性物质的新来源正日益为国内外海洋研究者所重视。目前已发现的放线菌还有链霉菌、迪茨氏菌、红球菌、盐孢菌、“海洋霉菌”、气微菌、盐水杆菌、疣孢菌、微杆菌、皮生球菌、考克氏菌、戈登氏菌、微球菌、短状杆菌、酸微菌、“微丝菌”等。可见，海洋放线菌是大有开发潜力的微生物资源。

海洋放线菌是海洋细菌抗肿瘤活性物质的重要来源，最先成为海洋微生物研究的热点。除了在海洋中发现了一些陆生放线菌以外，还发现并描述了如 *Salinospora*, *Mari-nomyces* 和 *Salinibacterium* 等海栖类放线菌新属 (Bull et al. 2005)。还从 *Salinospora* 分离菌株中发现了高效蛋白体 (proteasome) 抑制剂 salinosporamide A。从

海洋疣孢菌 (*Verrucosispora*) 的分离菌株中筛选到新的抗肿瘤活性物质 abyssomicin。

最近美国加利福尼亚州拉霍亚市 Scripps 海洋研究所的科学家 Fenical 及其同事也发现, 先前未知的放线菌菌株可产生具有抗生或抗癌特性的化学物质。Fenical 把他在深海沉积物中采集到的这种新的放线菌称为盐生孢菌 (*Salinospora*)。根据 Fenical 的初步检测, 在其所鉴定的 2500 个盐生孢菌株中, 有很多菌株可产生具有潜在治疗效果的化学物质。进一步研究中, Fenical 及其同事检测了盐生孢菌中产生的盐生孢菌酰胺的分子结构, 发现此种分子可在体外抑制人类的结肠癌、肺癌和乳腺癌细胞的生长。因此认为, 盐生孢菌所产生的盐生孢菌酰胺有望成为治疗人类癌症的药物 (Hardt et al. 2000)。

近年来从海洋小单胞菌中发现了引人注目的抗肿瘤活性物质, 已引起人们的重视。kosinostatin 和异醌环素 B (Furumai 2002) 是从海洋小单胞菌属 TP-A0468 的培养液中分离得到的一类醌环类抗生素。Francisco Romero 研究组对印度洋海域的小单胞菌属代谢产物进行了抗肿瘤活性筛选, 得到了两个抗肿瘤化合物 thiocoraline 和 IB-96212 (Rosa et al. 2000), 其中 IB-96212 是小单胞菌 L-25-ES25-008 (从海绵中分离) 产生的结构新颖的大环内酯类化合物。因此, 海洋环境是发现和筛选新的放线菌物种和代谢产物的宝贵资源。

最近几年的工作证明, 从海洋放线菌发现新生物活性物质的概率甚至超过陆生放线菌。从海洋放线菌获得的部分活性物质有灰紫红菌素 A, 盐孢胺 A、B, marinone, 薰衣菁蓝素, gutingimycin, 盐胺, 河豚毒素, pyrostatin A 和 B, pyrizinostatin, sporolides A、B, 海洋霉素 A、B, 四并霉素 D1, 色霉素 A3, 肠球菌素, actphenol, maltophilin, 棘霉素, 抗霉素 A, sporavidin A1, 巴佛洛霉素, 非律平, 脂霉素, 兔菌素, aboysomicins, ikarugamycin, elalomycin, prridindolol, saphenoc acid, 1-N-methyl-(E, Z)-albonoursin, 1, 6-dihydroxyphenazine, Bu-4664L 等。

1.4.1.3 植物内生放线菌

植物内生菌 (plant endophyte) 一词最早由 Unger (1937) 在研究植物内寄生的病原真菌时使用。随后的研究表明, 植物内生菌是植物微生态系统中的组成部分。在不同健康植物的根、茎、叶及果实中均生活着微生物的正常菌群, 它们的代谢活动及产物可促进宿主植物适应外界各种 (生物、非生物) 环境压力, 维持生态系平衡。迄今的研究表明, 植物内生菌可与植物结瘤固氮, 产生生长素促进宿主生长, 产生抗生素增加植物的抗病性, 产生次生代谢活性物质使植物具有抗逆、抗虫、除草功能。植物内生菌的诸多功能性状已经成为人们实际利用的新的生物资源。

Igarashi 等 (2000) 从杜鹃花植物中分离到产生马勃吡喃酮 (fistupyron) 抗真菌物质的链霉菌。Uvidelio 等 (2002) 从生长在澳大利亚 Northern Territory 的药用植物肯尼迪黑质蛇纹树 (*Kennedia nigricans*) 中分离的内生链霉菌 (*Streptomyces* NRLL 3052) 菌株, 产生一种具有抗人和植物病原真菌、细菌及寄生虫 (*Plasmodium* sp.) 的广谱抗生素 munumbicin A、B、C 和 D。Pullen 等 (2002) 将生长在巴西和南非天然生境中的 3 种卫茅科树木 (*Mayt aquifolia*, *Putterlickia retrospinosa* 和 *P. verrucosa*) 分离株鉴定为西唐链霉菌 (*Streptomyces setonii*) 和桑氏链霉菌 (*Streptomyces samp-*

sonii)。后者产生抗生素氯吡咯 (chloropyrrole) 和过氯蒽环 (chlorinaed anthracycline)。氯吡咯表现抗多重性耐药细菌和分枝杆菌的高活性。Stamford 等 (2002) 从玉米叶分离到产生高产葡萄糖淀粉酶 (158U mg/L) 的内生链孢囊菌, 这种酶为胞外酶, 最高活性在 pH4.5, 70℃。

1.4.2 放线菌物种多样性

由于放线菌的生态多样性, 决定了它为适应多变的环境压力, 发生遗传变异形成的物种多样性。随着人类认知能力和手段的不断提高, 越来越多的放线菌种类被发现和描述。在历次出版的《伯杰氏细菌鉴定手册》中, 放线菌的种类不断增加, 由最初的 3 个属增加到了 170 个属, 尤其是近十年来, 放线菌属的数量增加了近两倍 (表 I-1-2)。迄今有效描述的种约达 2000 个, 其中链霉菌属的种 500 多个, 占了很大比例。因此链霉菌也被称为常见放线菌, 常规检出率占放线菌的 95% 左右, 而其他种类放线菌的常规检出率仅占 5% 左右, 被统称为稀有放线菌。尽管新的属、种不断被发现, 然而, 作为原核生物的重要成员, 其已知物种与其估计在自然界存在的数量相比仍然是微不足道的 (见表 I-1-3)。因此, 放线菌还有极其丰富多样的未知世界等待人们去发现。

表 I-1-2 历次出版的《伯杰氏细菌鉴定/系统手册》中描述的有关放线菌属的数目

版本	出版年份	属/个
1~5	1923、1925、1933、1934、1935	3
6	1948	5
7	1957	7
8	1974	28
9	1989	52
10	2005	170

表 I-1-3 微生物已知描述种与估计自然界存在种的比较

类群	已知描述种	估计存在种	所占比例/%
藻类	40 000	350 000	11.0
细菌类 (包括蓝细菌, 放线菌和未知菌)	5 500	3 000 000	0.1
真菌类 (包括酵母菌, 地衣型真菌, 粘菌, 卵菌)	70 000	1 500 000	5.0
原生动类 (除了藻和卵菌之外的原生动类)	40 000	100 000	40.0
病毒类 (包括质粒和噬菌体)	5000	500 000	1.0
总计	160 500	5 450 000	3.0

引自 Goodfellow (2005) 的报告

1.4.3 代谢产物多样性

在目前已经发现的数万种微生物来源的生物活性物质中，约有 70% 是由放线菌所合成的各种次生代谢产物，其中，仅聚酮类次生代谢产物就有近 1 万种。根据美国国家癌症中心（2001）的统计，45% 已进入市场的药物属于微生物次生代谢产物，其中仅聚酮类药品（包括红霉素、利复平和四环素等）每年就拥有近 150 亿美元的市场。放线菌所产生的生物活性代谢产物中，抗生素最引人注目。自从 20 世纪 40 年代初 Waksman 用链霉菌进行系统筛选新抗生素以来，放线菌已被认为是新抗生素产生菌的主要来源。至今发现的近万种天然抗生素中，约有 2/3 是由放线菌产生的，其中许多具有重要的医用价值而应用于临床，例如，氨基糖苷类、萜环类、氯霉素类、 β -内酰胺类、大环内酯类和四环素类抗生素。放线菌中又以常见放线菌——链霉菌产生的抗生素种类最多，占总数的 52%；其他稀有放线菌，如小单孢菌属、游动放线菌属、拟无枝菌酸菌属、链孢囊菌属等，产生的抗生素种类占总数的 15%（图 I-1-3）。放线菌也产生除抗生素外的其他多种生物活性物质，如酶及酶抑制剂、有机酸、氨基酸、维生素、甾体、生物碱、免疫调节剂等，其中，链霉菌来源的占 31%，稀有放线菌来源的占 9%（图 I-1-4），这表明稀有放线菌作为新的生物活性物质的重要来源具有很大潜力，已成为关注的热点。

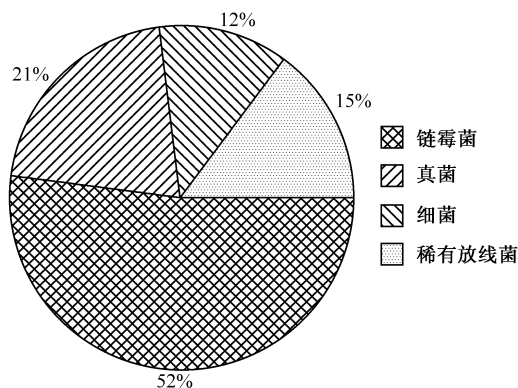


图 I-1-3 抗生素的来源

引自 Goodfellow (2004) 的报告

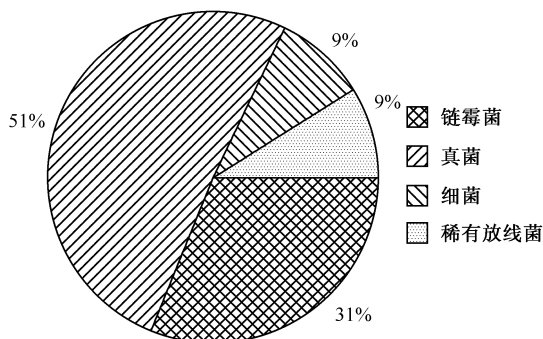


图 I-1-4 微生物产生的其他生物活性物质

引自 Goodfellow (2004) 的报告

美国 Merck 实验室的 Strohl 博士 (2004) 指出, 在医药工业中, 分类学分析的应用主要是以分类学的多样性阐述和反映化学的多样性。已经知道的事实是放线菌一个种的不同菌株往往会产生许多互不相同, 但彼此关联的天然产物 (图 I-1-5)。一项研究报告表明, 链霉菌的一些种, 如抗生链霉菌 (*Streptomyces antibioticus*)、灰色链霉菌 (*S. griseus*) 和吸水链霉菌 (*S. hygrosopicus*) 分别产生 13、32、46 种不同结构的天然产物。例如吸水链霉菌中的一些菌株可产生 bialophos、hygromycin、spectinomycin、rapamycin 等天然化合物。因此, 商业上重要的新放线菌 (novel actinobacterium) = 新天然产物 (novel natural product) = 商业上的成功 (commercial success)。因此, 放线菌的生物多样性与化学多样性间的关联已经被认为是分类学的主要指征, 分类学已经用于新药发现的预测 (Ward et al. 2004), 是新药筛选的路线图。

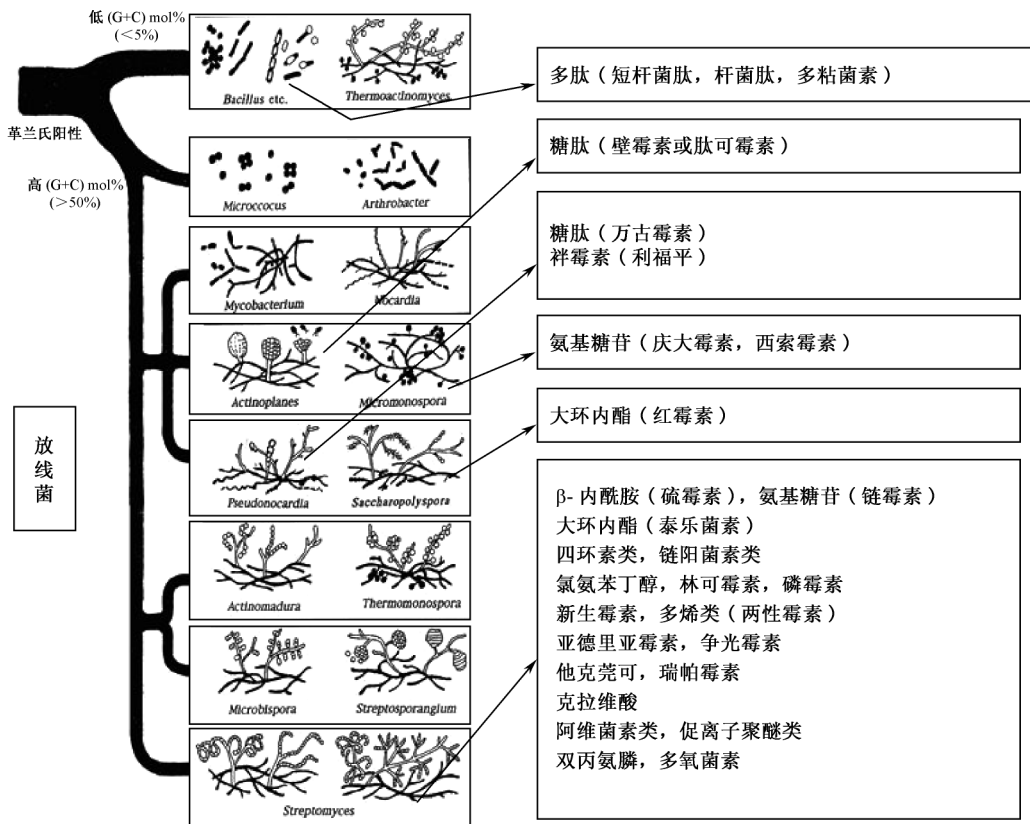


图 I-1-5 放线菌物种与代谢产物多样性间的关联示意图

引自 Marinelli (2004) 的报告

1.4.4 生物固氮

人类很早就发现生长在贫瘠土壤上的某些植物不但生长良好, 而且还能增强土壤肥力, 促进其他植物的生长。1866 年, Waranin 首先发现和报道了一些非豆科植物结瘤固氮的存在, 并使用显微镜观察了赤杨 (*Alnus*) 根瘤的切片, 认为是微生物刺激植物根部形成根瘤。后来由 Brunchorst (1886) 把这类微生物命名为弗兰克氏放线菌

(*Frankia*)。但人们真正了解这类植物内生菌是在 Prommer (1959) 使用电子显微镜进行研究以后, Callaham (1978) 从香蕨木 (*Comptonia peregrina*) 根瘤中成功地分离到弗兰克氏放线菌纯培养。

弗兰克氏根瘤放线菌是能够诱导大范围的放线菌根瘤植物 (actinorhizal plant) 结瘤共生固氮的放线菌。放线菌根瘤植物是植物受弗兰克氏菌的侵染后能够形成根瘤的植物。由于植物间关系的不确定性, 以及对共生在放线菌根瘤植物的弗兰克氏菌的多样性缺乏了解, 共生物 (symbiont) 的进化到目前为止仍是模糊的。近来对菌株和植物的系统进化的研究, 以及对共生在根瘤中弗兰克氏菌多样性的研究, 为建立共生物进化的假设提供了基础。

弗兰克氏菌是原核生物, 越来越多的证据表明它们在生理代谢、进化分支和遗传背景几个方面存在丰富的多样性。20 世纪 80 年代, 对弗兰克氏菌结瘤植物及其分布, 共生放线菌分离纯化和保存技术, 弗兰克氏菌某些菌株的形态、生理特性、化学分类和固氮效率评估做了大量的研究。1989 年 Fernandez 等用弗兰克氏菌全基因组 DNA 进行 DAN-DNA 杂交和 DNA 碱基组成分析, 标志着在基因水平上研究弗兰克氏菌多样性。弗兰克氏菌的分类开始是依赖植物来源, 例如分离自赤杨的菌株就命名为赤杨弗兰克氏菌。后来随着结瘤植物的大量发现, 回接中交叉侵染现象的不断出现, 仅仅依靠植物来源给菌种命名显然不够科学。而后科学家进行了生理、生化以及细胞化学等特性的分析测定来对菌株进行分类。目前国际上对弗兰克氏菌属的分类尚未形成公认的标准。然而, 分子生物学方法, 如 DNA 同源性分析、DNA 指纹图谱分析、16S rDNA 和 23S rDNA 序列分析等, 已经应用于弗兰克氏菌的分类鉴定。对放线菌根瘤植物的系统发育等也进行了广泛的研究, 这些研究表明弗兰克氏菌存在丰富的基因多态性。基因多态性与寄主、地域、海拔、土壤 pH 等因子有很大的关联。

目前世界上已经报道了大约 8 个科 24 个属约 200 个树种具有与弗兰克氏菌共生结瘤固氮的能力。我国弗兰克氏放线菌结瘤植物约 6 科 8 属 88 个种。这 8 个属是: 赤杨属 (*Alnus*)、木麻黄属 (*Casuarina*)、杨梅属 (*Myrica*)、胡颓子属 (*Elaeagnus*)、沙棘属 (*Hippophae*)、马桑属 (*Coriaria*)、悬钩子属 (*Rubus*) 和仙女木属 (*Dryas*)。与弗兰克氏菌共生结瘤固氮的非豆科植物是一种重要的固氮资源。弗兰克氏菌与非豆科植物结瘤固氮的活性较强 (见表 I-1-4)。这些树种是陆地生态系统中有机氮输入的主要贡献者之一, 在自然界氮素循环和生态平衡中起着重要作用。这类植物为多年生, 分布广, 适应性强。如沙棘耐旱, 木麻黄耐湿、耐盐碱, 杨梅耐酸等, 被称为贫瘠土壤上的先锋树种。人们根据实践经验自发利用这一生物资源已有很长的历史。如人们早已知道应用沙棘、沙枣、胡颓子等植物在其他植物不宜生长的贫瘠土地上造林、防风和治沙。近年来正在广泛开展弗兰克氏菌的应用研究。芬兰、荷兰、印度等国已应用根瘤固氮先锋树种营造防风林, 加拿大和我国也都在一定规模上成功地应用弗兰克氏菌进行防风治沙、茶林混作等农业林业环境工程。已有的成果向人们展示了应用根瘤放线菌植物改造人类生态环境、发展持续生态农业的美好前景。在我国云南省, 桉木、木麻黄、杨梅、胡颓子等树木作为先锋树种已被用于开荒造林, 与经济植物混作套种, 如桉木与茶树套种增加茶叶产量。这些树种不但起到了防风治沙、保持水土、增加土壤肥力、改良土壤和生态环境的作用; 而且这些植物本身也向人们提供着具有极高经济价值的产品, 如维

生素含量较高的杨梅果、木材优质的高大木麻黄树、营养丰富的沙棘和沙枣等。

表 I-1-4 非豆科根瘤放线菌植物的固氮量 [单位:kg/(hm²·a)]

树种	氮素固定量	文献来源
木麻黄 <i>C. deplancheana</i>	58.3	Beching, 1975
木麻黄 <i>C. equisetifolia</i>	229.0	Beching, 1975
美洲茶 <i>Ceanothus america</i>	60.0	Beching, 1975
高沙棘 <i>Hippophae rhamnides</i> 0~3 a	27.0	Beching, 1975
13~16a	179.0	
欧洲赤杨 <i>A. glutinosa</i>	56.0	Beching, 1975
欧洲赤杨 <i>A. crispa</i>	157.0	Beching, 1975
红赤杨 <i>A. rubra</i>	300.0	Evans, 1981
香杨梅 <i>Myrica gale</i>	30.0	Schwintzer, 1981
马桑 <i>Coriaria arborea</i>	150.0	Silvester, 1981

引自：黄家彬，初议我国非豆科树木共生固氮研究方向（内部交流资料）

1.4.5 活的但不能培养的放线菌资源

美国微生物学家 Colwell 的实验室在 1982 年提出不能培养的微生物的概念，他们发现快速生长的霍乱弧菌和大肠杆菌，移植到无营养料的盐水中，经长时期的低温保存，细胞数不减，代谢活力不变，但在正常肉汤培养条件下不产生菌落，所以使用活的但不能培养（VBNC）一语描述这种潜伏状态的细菌。此后 20 年里，许多人对多种属的细菌进行实验，证明这种不能培养状态的存在是普遍的。Stackebrandt 等（2000）将那些利用分子生物学技术能够检测到，但还不能获得纯培养的微生物定义为尚未培养微生物（as yet uncultured microorganism）。大家的共识是生境中仅有一小部分微生物可用实验室方法分离培养，而不能培养的种类占绝对多数，代表了巨大的多样性。

不能培养放线菌资源如同可纯培养放线菌资源类似，主要存在形式与应用前景有：

- (1) 基因，尤其是编码功能蛋白和酶的基因；
- (2) 代谢产物，如具有生物活性的次生代谢产物，尤其是各类先导化合物（lead compound）；
- (3) 特殊代谢途径，如合成或分解、利用某些特殊化合物的新代谢途径，用于生物降解等；
- (4) 新的代谢调控机理，如用于筛选或构建高产或高活性菌；
- (5) 具有不同生态功能的微生物活细胞等，如生物膜用于污水处理，污染或破坏的微生物生态系统的恢复；
- (6) 人工构建的、可用于科研与生产的细胞。

由于不能培养的放线菌无论是其物种类群，还是新陈代谢途径、生理生化反应、产物等都存在着丰富的新颖性和多样性，因而比以往的可培养放线菌具有更为丰富和多样化的可供人类开发利用的生物资源。同时，基因组学、蛋白质组学的理论、方法与技术的发展，尤其是环境基因组学（environmental genomics 或 metagenomics）的发展，必

将在未培养放线菌资源的开发利用中发挥越来越重要的作用。

通常，利用传统纯培养法（包括各种物理分离法，如显微操作、密度梯度离心等），结合分子生态学方法与技术对自然环境微生物进行分析，了解未培养微生物的系统发育关系和基本的生理反应（如 Biolog、API 结果），然后依据其系统发育关系相近的可纯营养微生物的生理代谢特征和其生存的自然环境条件，设计培养基和培养条件，最终获得纯培养。

但是，随着微生物基因组时代（microbial genomic era）的到来，人们开始构建微生物群落的集群基因组（collective genome），并对其进行测序，得到各组成微生物的基因组序列，结合蛋白质组学的研究结果，采用比较基因组学（comparative genomics）的方法鉴定存在于各物种的所有基因。这使得人们可以详细了解未培养微生物新的代谢途径，基因表达的调控机制，找到病原、抗性基因，以及发现新的基因等。这些信息不仅可以使人们认识基因、物种进化的过程、未培养物种的组成及其系统发育关系，而且可以了解其生态学功能、确定其生态位，为准确设计培养基和培养条件，以及最终获得纯培养奠定了基础，这些都为未培养微生物（包括可培养微生物）的开发利用开辟了极为广阔的前景。因此，暂时不能获得纯培养的未培养微生物，则利用 BAC 等载体直接构建群落基因组文库（metagenome library），通过比较分析，同时获得各基因组的系统发育、主要功能基因和酶活性的数据，然后再设计培养基和培养条件，尝试分离纯化。

一旦获得微生物的纯培养，则采用可培养资源微生物相同或相似的途径进行开发利用。

由于共生等原因而不能纯培养的微生物，可考虑直接依据基因或基因组、蛋白质序列，以及其调节表达机制构建高效表达的工程细胞等途径加以开发利用。

近年抗生素基因研究已达到精细的程度，开始考虑用组合生物合成将基因进行组合，以期获得新的化合物。为了寻找更多的聚酮体合成基因，学者开始从土壤 DNA 文库中进行分离。加拿大的 Terragen Diversity 公司已从土样 DNA 经聚合酶链反应（PCR）获得第二型多聚乙酰胺合成酶（第二型 PKS，Type II polyketide synthases），经测序，构成基因盒，并在两种不同的链霉菌中表达。虽然所获得的聚酮体化合物为已知的，但这一结果充分证明土壤来源的 DNA 经过克隆和表达，已成功获得多种 PKS 基因。今后的进一步研究，将能获得新的有用产物（Seow et al. 1988）。

1.4.6 极端环境中的放线菌资源

近几十年来，极端环境微生物的研究受到广泛的重视。极端环境微生物具有独特的基因类型，特殊的生理机制及特殊的代谢产物，是一类具有很大潜力的生物资源。自 1982 年起，欧洲极端微生物开放实验室（European Laboratory Without Walls on Extremophiles）对极端环境微生物进行了广泛的合作研究。1993 年，在德国召开了第一届极端微生物生物技术会议（First Meeting on Biotechnology of Extremophiles），同时一个投入更多、规模更大、涉及人员更广的关于极端环境微生物的研究计划在欧盟各国开始实施，使国际上对极端环境微生物的研究工作又有了进一步的发展。1997 年创刊的《极端微生物杂志》（*Extremophiles*）发刊词中，Horikoshi 把极端微生物作为一个新的微生物世界（a new microbial world—extremophile）。