

赖家豪,熊桂红,刘冰,等.放线菌活性物质的挖掘与分离技术研究进展[J].江苏农业科学,2022,50(13):82-89.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.13.014

放线菌活性物质的挖掘与分离技术研究进展

赖家豪,熊桂红,刘冰,蒋军喜,游婧,刘彤珂

(江西农业大学农学院植物保护系,江西南昌 330045)

摘要:放线菌是一类广泛分布且备受人类关注的微生物资源,其能产生多种多样的结构新颖、具有生物活性的次级代谢产物,是多种天然产物的重要来源,具有极大的研究和开发价值。本文阐述了以生物活性为导向进行筛选挖掘、基因组挖掘、转录组挖掘等放线菌天然活性物质的挖掘手段,并结合近年研究成果分别论证各方法的优势及适用条件,为合理选择挖掘手段提供参考;概述了溶媒萃取法、离子交换层析法、薄层层析法等天然活性物质分离方法及其优缺点。文中重点综述伴随着基因组学和现代分子生物学的迅速发展而兴起的包括生物信息学分析、同源表达、异源表达等利用基因组挖掘活性物质的方法,以期为微生物资源的挖掘与利用提供相应的参考。最后合理分析目前放线菌开发利用中存在的一些问题,并简要提出相应的建议,就将来放线菌的研究方向和发展前景进行了展望。

关键词:放线菌;活性物质挖掘;分离技术;基因组挖掘;微生物资源

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)13-0082-08

放线菌是一类形体微小多样、主要呈菌丝状生长、以孢子进行繁殖的原核微生物,其生长形态多变,呈丝状、放射状、星状分枝,也可形成不规则形状的杆状或球状,属于革兰氏阳性菌^[1-2]。该类菌

存在于多种生态环境中,凭借其独特高级的次级代谢系统产生诸多结构新颖、具有明显生物活性的次级代谢产物,是一类极具价值的微生物资源^[3]。放线菌与人类的生产和生活关系极为密切,其产生的活性物质广泛应用于农业、医药、食品、工业、环境污染治理等各个方面。在农业方面可作抗菌剂、杀虫剂以及除草剂等,如井冈霉素、春雷霉素、多氧霉素等已应用于植物病害防治中^[4-6];在医药方面可作抗肿瘤药物,治疗心血管疾病药物等,如蒽环类(阿霉素)、肽类(博来霉素和放线菌素 D)等^[7-8];在食品方面可被应用于天然食品添加剂和

收稿日期:2021-11-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460139);江西省自然科学基金(编号:20161BAB204184);江西省科技支撑计划(编号:20121BBF60024)。

作者简介:赖家豪(1998—),男,江西瑞金人,硕士,主要从事植物病理学研究。E-mail:2286349575@qq.com。

通信作者:刘冰,博士,副教授,主要从事植物病害生物防治方面的研究。E-mail:lbzjm0418@126.com。

[45] Keim P, Diers B W, Shoemaker R C. Genetic analysis of soybean hard seededness with molecular markers. [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1990, 79(4): 465-469.

[46] Sakamoto S I, Abe J, Kanazawa A, et al. Marker-assisted analysis for soybean hard seededness with isozyme and simple sequence repeat loci [J]. Breeding Science, 2004, 54(2): 133-139.

[47] Satoshi W, Teuku T, Naoki Y, et al. Analysis of QTLs for reproductive development and seed quality traits in soybean using recombinant inbred lines [J]. Breeding Science, 2004, 54(4): 399-407.

[48] Liu B, Fujita T, Yan Z H, et al. QTL mapping of domestication-related traits in soybean (*Glycine max*) [J]. Annals of Botany, 2007, 100(5): 1027-1038.

[49] Singh R K, Raipuria R K, Bhatia V S, et al. Identification of SSR markers associated with seed coat permeability and electrolyte leaching in soybean [J]. Physiology and Molecular Biology of

Plants, 2008, 14(3): 173-177.

[50] 艾丽娟,陈强,杨春燕,等.大豆籽粒硬实加性和上位性 QTL 定位[J].作物学报,2018,44(6):852-858.

[51] 陈静静,刘谢香,于莉莉,等.利用 BSA 法发掘野生大豆种子硬实性相关 QTL [J]. 中国农业科学,2019,52(13):2208-2219.

[52] Sun L, Miao Z, Cai C, et al. *GmHsl-1*, encoding a calcineurin-like protein, controls hard-seededness in soybean [J]. Nature Genetics, 2015, 47(8): 939-943.

[53] Jang S J, Sato M, Sato K, et al. A single-nucleotide polymorphism in an endo-1,4- β -glucanase gene controls seed coat permeability in soybean [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128527.

[54] 魏臻武,盖钧镒.豆科模式植物——蒺藜苜蓿[J].草业学报,2008,17(1):114-120.

[55] Soltani A, Walter K A, Wiersma A T, et al. The genetics and physiology of seed dormancy, a crucial trait in common bean domestication [J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 58.

防腐剂,如蓝色素、类胡萝卜素等^[9]。可见,获得放线菌的活性物质具有广阔的用途和极高的开发应用价值。然而,活性物质的挖掘和分离远比想象中复杂,存在很多难题,如辛苦分离出来的化合物已经被报道而失去研究价值,某些代谢物在常规条件下无法合成,或活性物质表达量太低等。因此,本文综述近几十年发展起来的活性物质挖掘和分离方法,以期对挖掘和利用微生物活性物质提供试验思路和方法。

1 活性物质的挖掘

1.1 以生物活性为导向进行筛选

放线菌活性物质的挖掘手段丰富多样,应用最早、最传统的是以生物活性为导向,从放线菌的发酵液粗提物中分离筛选出天然产物的方法。其中的生物活性范围广泛,包括杀虫杀螨、抑菌、抗癌、抗肿瘤等等,利用这些生物活性对放线菌产生的代谢物质进行筛选,不仅操作简单,出结果快速,而且成本低,要求低,至今仍被广大研究者用于简单的放线菌活性物质挖掘筛选。到目前为止,利用这种方法,已经发现了诸多天然活性物质。路丹丹等以黄瓜枯萎病原菌 (*Fusarium. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 作为活性跟踪指示菌,从 *Streptomyces rimosus* M527 的发酵液中分离得到活性化合物——龟裂杀菌素^[10]。刘倍伶以对苹果黄蚜、朱砂叶螨、小菜蛾、黏虫的毒杀活性,对黏虫的拒食活性为导向,从 *S. hygroscopicus* 11-9-3 的发酵液中筛选出 2 个对朱砂叶螨具有较好毒杀活性的化合物 1-acetyl-4,5-dihydroxyanthracene-9,10-dione 和 1,8-dihydroxy-6-methylanthracene-9,10-dione,以及对黏虫有一定拒食活性的化合物 convolvulol^[11]。She 等以抗菌活性为指导,从 *S. chrestomyceticus* BCC 24770 的发酵液中分离出 2 种新化合物 chresdihydrochalcone 和 chresphenylacetone,其中化合物 chresdihydrochalcone 对多种革兰氏阳性耐药菌具有抑制活性,具有开发为抗生素的潜力^[12]。由此可见,利用该方法筛选活性物质不仅简便,选择性高,还能获得理想的结果,具有一定的可行性和优势,今后将继续用于科研试验中。不过这种传统筛选方法仍具有一些局限,比如大部分最终获得的活性物质是前人已研究的化合物;发酵液中活性化合物的含量低导致后续筛选和分离提纯较为困难;部分活性化合物的产生要求给予放线菌一般实

验室很难提供的特殊培养条件等。

1.2 基因组挖掘

为解决传统活性物质挖掘技术存在的问题,近年来,研究者们不断钻研、创新,取得了显著的进展。基因组挖掘技术就是新发展起来的一种热门研究方法。随着基因组测序技术的迅速发展和完善,微生物基因组大规模测序和分析被普遍和广泛地应用于放线菌活性物质的发现和利用。放线菌基因组挖掘主要指在对放线菌进行全基因组测序的基础上,利用生信分析网站及软件对获得的组装序列进行分析,寻找次级代谢产物合成基因簇的保守序列,进行基因预测及功能注释,预测次级代谢产物的生物合成途径和化学结构,从而顺利分离鉴定目标化合物^[13]。这种方法使我们对放线菌代谢产物结构功能的认识更加深刻,相比较传统筛选方法,能够更迅速和准确地寻找到新的或具有活性的化合物,为后续活性物质的分离鉴定提供理论基础。除此之外,该方法还可能对化合物结构进行定向改造,使其具有更好的生物活性,这是传统筛选方法所不具备的。基因组挖掘方法丰富多样,各有千秋,并且往往灵活结合使用时效果更佳,特别是以下简要阐述的几种手段。

1.2.1 生物信息学分析 生物信息学分析起步于 20 世纪 90 年代,发展至今已经比较成熟,是基因组挖掘技术的重要手段,并成为很多挖掘方法的必要前提和可靠依据。在对放线菌进行全基因组测序后,可以借助相关软件对测序数据进行生物信息学分析,主要包括基因组组装及组分分析、基因预测与功能注释、比较基因组分析、群体进化和物种分型分析、直系同源簇 (cluster of orthologous group, 简称 COG) 聚类分析、基因组可视化分析及次级代谢产物合成基因簇预测,并且分析预测生物合成基因簇可能编码合成新的结构。近年来,许多研究者利用生物信息学分析技术,准确地从放线菌中分离到目标活性物质。如 Peng 等通过对筛选得到的角环素潜在生产菌进行生物信息学分析,得到预测产物为 saquayamycins 类角环素,最终从该菌株的发酵培养液中分离到新化合物 landomycin N、galtamycin C、vineomycin D 和 saquayamycins B 类角环素化合物,其中 saquayamycins B 在对肝癌细胞 HepG-2、SMMC-7721 和 plc-prf-5 的抑制作用中显示出有效的细胞毒活性^[14]。王冕等通过基因组生物信息学分析,推测海洋链霉菌 IMB3-202 基因组中含

有一条吡嗪唑生物合成基因簇,最终从发酵产物中分离到对宫颈癌 HeLa 细胞和结肠癌 HCT116 细胞均具有很强的细胞毒活性的星形孢菌素、3'-O-去甲基星形孢菌素等吡嗪唑类化合物^[15]。近年来,随着分子生物学和信息技术等多学科的迅速发展,生物信息学分析不断完善,主要表现在分析工具多样化,分析技术全面准确,利用该手段,能从大量嘈杂的数据中提取有用的生物学信息,是放线菌活性物质挖掘研究中至关重要的法宝。

1.2.2 同源表达 尽管利用生物信息学分析获得了大量的数据,但事实上,活性物质的挖掘仍然不易,经常会碰到各种各样的难题,特别是有些放线菌的生物合成基因簇的表达量很低,或者甚至不表达。为此,近年来研究者们开发了一些手段去诱导这些基因簇表达,从而获得大量的天然活性产物。这种通过某些手段诱发机体自身所带的基因表达的方法称为同源表达^[16]。比如,通过优化放线菌的培养条件来诱导基因表达并获得产物就是常用的方法之一。由于放线菌产生的某些代谢物在常规条件下无法合成,可以给予一些比较特殊的营养和生物条件甚至是特定的胁迫环境来激活这些代谢物的合成,如特定的碳源、高温和其他菌株共培养等^[17-18]。近些年,国内外就有许多成功的事例,如 Hifnawy 等通过共培养 *Micromonospora* sp. UR56 和 *Actinokineospora* sp. EG49 这 2 种放线菌,诱导产生了具有抗菌和抗生物膜活性的吩嗪-1,6-二羧酸二甲酯、吩嗪-1-羧酸等 4 种物质^[19]。此外,通过操纵调控因子也可以激活生物合成基因的表达。其中最常用的手段是过表达正调控基因,正调控基因主要指一些转录、翻译激活因子等,因此利用这种方法可以有效地获得新型活性化合物。Du 等从 *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 的 SARP-7 过表达突变株中分离得到一个新的多烯类化合物 ishigamide^[20]。Yan 等通过表达 *wbl* 基因,促进了十一烷基菌红素和放线紫红素的合成^[21]。Laureti 等通过对 *S. anbofaciens* ATCC23877 基因簇上的 LAL 家族调控基因进行过表达,合成了具有抗结肠癌 HT29 细胞系活性的 stambomycins A-D^[22]。过表达转录、翻译激活基因取得了如此多成果,已然成为研究者们常用的挖掘手段,除此外敲除某些转录抑制基因也是有效的挖掘手段,如 Bunet 等敲除生二素链霉菌(*S. anbofaciens*)中 TetR 家族途径特异性转录抑制基因 *alpW*,可以合成醌那霉素类抗

生素^[23]。

1.2.3 启动子替换 放线菌代谢途径复杂,操纵调控因子并不能激活所有的次级代谢基因簇,对于一些隐秘基因簇的激活,可以尝试使用强组成型或者强诱导型启动子替换原始启动子。启动子是 RNA 聚合酶识别、结合和开始转录的一段 DNA 序列,多数位于结构基因转录起始点的上游,被称为基因表达的“开关”^[24]。因此,进行启动子替换往往能够取得较为可观的结果。2020 年,孙涛利用 gBAS 重组系统将唐菖薄伯克霍尔德菌(*Burkholderia gladioli*) ATCC 10248 中 6 个未知的 NRPS 基因簇的原始启动子替换为庆大霉素抗性基因的强启动子 *P_{genta}*,成功激活 BGC2 和 BGC5,并获得了几种由脂肪酸链和氨基酸缩合而成的线性脂肽,均为新化合物^[25]。同年,Zheng 等通过将巨大副伯克霍尔德菌(*Paraburkholderia megapolitana*) DSM 23488 中 2 个隐秘基因簇的启动子替换为强启动子 *P_{apra}*,激活了沉默的 BGC,成功挖掘到新型脂肽类化合物 haereomegapolitanin^[26]。

1.2.4 异源表达 由于放线菌产生活性天然物质的过程仍存在许多难题(如有些放线菌生长缓慢,或者很难获得纯培养物,有些微生物操纵调节因子较难进行等),因此将其生物合成基因簇克隆并在合适的宿主中异源表达成为一种有效且备受关注的天然产物挖掘策略。异源表达是指通过基因工程,将生物合成基因簇中的多个基因或整个基因簇放到异源宿主中进行表达,从而获得特定天然产物^[27]。目前放线菌基因簇异源表达常用的宿主菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*)、链霉菌(*Streptomyces*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等^[28]。随着生物技术日新月异的发展,异源表达可操作性逐渐提高,且挖掘到新型天然活性产物的概率较大,因此受到了越来越广泛的关注。Antosch 等将 *Streptomyces* sp. T6239 的基因簇 *ika* 在体外进行重排,然后将结构基因置于诱导型启动子 T7 的控制下,转化至大肠杆菌中异源表达,分离得到具有成药前景的 *ikarugamycin*^[29]。2018 年,Yu 等构建了包含完整 ST 基因簇的质粒 pDRX-27,并转入到 *S. coelicolor* M1146 中异源表达,获得了一种具有生物活性的抗生素——streptothricin^[30]。Shi 等利用生物信息学分析,从 *S. chrestomyceticus* NA4264 中鉴定出能够合成环二肽合酶的 *pcm* 基因簇,但该基因簇在常规培养条件下不表达,于是将其在 *S. albus* 中

异源表达,产生了一种新的高度修饰的环二肽——purincyclamide^[31]。尽管从目前研究的进展来看,异源表达的方法能够有效地分离到目标代谢产物,提高活性物质的产量,但该方法仍存在许多挑战,比如一般生物合成基因簇都比较大,表达克隆载体构建及基因表达难度较高,需要导入化合物生物合成的前体来解决异源宿主缺乏这些前体的问题,未来仍然需要花费大量工作去攻克这些问题,使得天然活性物质的挖掘更加简单快速^[18]。

1.2.5 代谢比较分析 由于放线菌产生的大部分活性物质都属于其次级代谢产物,因此对其发酵代谢产物的研究是至关重要的,特别是目前可借助现代分子生物学手段使得从代谢产物中挖掘到活性物质变得更简单明确。代谢比较分析法是指先对放线菌生物合成基因簇中的关键基因进行敲除或是异源表达来构建突变株,再寻找野生型和突变株的代谢产物谱图的差异,并结合生物信息学预测的产物理化性质来直观地发现对应的代谢产物^[32]。将基因簇中的关键基因失活,再通过比较野生型和突变株的代谢谱图(HPLC 或 LC-MS)来寻找差异,最终能够分离鉴定出基因簇对应的产物。如 Lee 等利用这种方法从 *Streptomyces* sp. W3002 中分离到 2 种新的链米酮衍生物^[33]。王俊博等通过构建目标基因簇大片段缺失突变株,并同野生型菌株比较代谢谱图发现了制霉菌素^[34]。对于异源表达生物合成基因簇,可比较野生型宿主和异源宿主的代谢谱图(LC-MS),新出现的代谢物一般即为基因簇产物,再进一步分离鉴定。如 Corre 等通过构建 *mmf* 基因的整合质粒 pIJ6566,并将其整合到天蓝色链霉(*S. coelicolor*) M512 中进行异源表达,经过代谢谱图比较后发现了第 1 个自体诱导物 methylenomycin,其能调控链霉菌中抗生素的产生^[35]。

1.3 转录组挖掘

广义的转录组指某一特定生理条件下,细胞内全部基因转录产物 RNA 的总和,包括转运 RNA、核糖体 RNA、信使 RNA 以及各种非编码 RNA,狭义的转录组指细胞内全部 mRNA 的总和^[36]。与基因组不同的是,转录组的定义中包含了时间和空间的限定。转录组挖掘技术是指通过对某一状态(如不同培养基或某个时间点培养)的放线菌进行转录组测序及分析,得到放线菌基因簇的转录情况,反映放线菌应对不同环境刺激后,其应对基因的动态表达状况,从而挖掘功能基因或基因簇^[37]。该技术能为

发现化合物提供更直接的信息,并且有助于发现具有转录活性的与未知天然产物相关的生物合成途径,在放线菌次级代谢产物的生物合成机制和挖掘研究领域呈现出广阔的应用前景^[38]。Han 等借助转录组分析,从 *Nocardiosis gilva* YIM 90087T 中分离得到能够调节渗透压平衡的四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶^[39]。Amos 等利用这种方法,对不同环境条件下的 *Salinispora pacifica* 进行转录组测序,并且对高表达的生物合成基因簇进行生物信息学分析,成功预测并分离得到一种新型 salinipostins^[40]。Qu 等在不同条件下对链霉菌(*S. flaveolus*) DSM 9954 进行发酵培养,最终选用产生代谢产物最多的使用 V 培养基发酵 4 d 的样品进行转录组分析,最终发现了化合物 sangliferrin 的生物合成基因,并且发现了新的聚酮合酶和非核糖体多肽基因^[41]。相比较于基因组挖掘技术,转录组挖掘从 RNA 层次研究生物合成基因及基因簇表达情况,提供不同条件下各个基因的表达情况,从而获得更高效的有用信息,在放线菌活性物质挖掘手段中占据重要地位,相信未来利用该技术将会挖掘出大量具有巨大应用价值的活性物质。

2 活性物质的分离方法

2.1 溶媒萃取法

溶媒萃取法最早应用于 19 世纪分析化学领域,并且在 1925 年因二苯基硫卡巴腓的发现而获得了迅速的发展,如今应用于多个领域,在放线菌的活性物质分离方面取得了不少研究成果。该方法巧妙利用化合物在 2 种不相溶或者微溶的溶剂中的溶解度或者分配系数不同的原理,使得待萃取的化合物转移到溶解度更大的溶剂中,并经过多次反复萃取,将化合物分离出来^[42]。比较常见的萃取溶剂有:水、亲水性有机溶剂(乙醇、甲醇、丙酮等)、亲脂性有机溶剂(石油醚、苯、三氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯等)。这种方法是活性物质挖掘过程中最为常用的分离提取方法之一,具有简单方便、成本低、对环境友好等优点,广大研究者利用该方法获得了理想的活性物质。Cho 等借助这种方法用乙酸乙酯萃取 *Streptomyces* sp. CS392 发酵液中的活性物质,最终分离得到 3 种对多种革兰氏阳性耐药菌具有很高活性的化合物^[43]。Driche 等通过用二氯甲烷从 *Streptomyces* sp. AT37 的发酵液中提取到一种对耐多药金黄色葡萄球菌具有显著活性的化合物

(AT37-1)^[44]。尽管该方法具备众多优点,但仍存在一些短板,如分离出的物质仅为粗提物,纯度不够高,由此可见结合其他分离技术来获得纯物质是必不可少的。

2.2 离子交换层析法

随着生物化学研究的不断发展,离子交换层析被广泛用于各种生化物质如氨基酸、核酸、酶类、糖类、脂类等的分离纯化。与其他层析法不同,离子交换层析法的固定相为离子交换剂,常用的如离子交换纤维素、离子交换树脂等,凭借流动相中的组分离子与固定相上的平衡离子进行可逆交换时的结合力大小差异,使得目标化合物从混合物中分离出来^[45]。近年来,研究者们热衷于利用该方法分离放线菌次级代谢产物中的水溶性生物活性物质。2016 年, Savitha 等利用该方法从筛选到的链霉菌菌株中分离得到可用于治疗淋巴细胞性白血病的 L-谷氨酰胺酶^[46]。2019 年, Dhamodharan 等利用离子交换层析法从 *S. radiopugnans* VITS8 中分离得到对溶栓性疾病有药用潜力的纤溶酶粗品^[47]。这种方法特异性较高,分离效果好,并且树脂等离子交换剂也便宜,不过即便是用最精确控制的条件下,仅用此方法分离到的物质也不是特别纯。

2.3 薄层层析法

薄层层析别称薄层色谱(thin layer chromatography,简称 TLC),属于固-液吸附色谱法,同时具有柱色谱和纸色谱的优点。其利用待分离物中各组分对吸附剂吸附能力的差别,借助展开剂的作用使得各组分在薄层板上获得不同的移动速度从而分离开来,并且还能通过计算比移值(R_f)来进行定性分析等^[48-49]。薄层层析法容易操作,仪器简易,显色迅速,同时混合物分离效率高,耗时短,普遍应用于混合物的分离、定性及定量分析^[50-51]。近年来,技术人员对薄层色谱法在缩短时间周期、优化分离效果、提升检测质量及灵敏性、保证定量精度及降低生产成本等方面进行不懈研究,取得较大突破。在该方法不断完善进步的同时,其在放线菌活性物质分离方面的应用也逐渐普遍。就在 2021 年 2 月, Kamaruddin 等利用这种方法从海洋放线菌中筛选分离出可作为阿尔茨海默氏症患者的最佳治疗剂的乙酰胆碱酯酶抑制剂(AchEIs)^[52]。Saadouli 等利用乙酸乙酯萃取、硅胶柱层析、薄层色谱结合的方法,从 *S. misionensis* V16R3Y1 中分离提纯出具有广谱抗菌活性的环二

肽(1-亮氨酸-1-脯氨酸)^[53]。虽然目前该方法仍然存在分离生物高分子效果不理想的短板,但相信接下来的几年将会有所突破。

2.4 硅胶柱层析法

与其他层析方法相比,硅胶柱层析法具有操作简便,样品承载量大,封闭操作有机溶剂挥发少,成本低等优点,是天然产物分离纯化的首选方法之一^[54]。其分离原理是依据物质在硅胶上的吸附力不同而导致活性物质与硅胶表面的许多游离状态和活性状态的基团发生不同强度的相互作用,从而使物质分离^[55-56]。通常情况下,相比极性较弱的物质,极性较大的物质更易被硅胶吸附,总体层析过程实际上就是吸附、解吸、再吸附、再解吸。至今,硅胶柱层析分离技术在放线菌活性物质分离领域已有很多典型应用。Ravi 等借助三氯甲烷萃取和硅胶柱层析从海洋链霉菌(*streptomyces* sp.) VITLGK012 中分离提纯出对普通变形杆菌表现出高效抗菌活性的含氮化合物 gancidinW^[57]。Suga 等使用该方法从内生放线菌(*Allostreptomyces* sp.) K12-0794 的发酵液中分离出了 2 个新的化合物,分别称为 hamuramicins A 和 hamuramicins B,均显示出对水稻条纹病原菌有生长抑制活性^[58]。凭借其低成本、易操作等优点,再加上分离效果佳,硅胶柱层析方法已经受到国内外众多研究者的青睐。

2.5 大孔吸附树脂吸附法

大孔吸附树脂是 20 世纪 70 年代发展起来的一种非离子型高分子聚合物吸附剂,具有良好的大孔网状结构和较大的比表面积,主要利用范德华力和氢键形成的吸附力从溶液中有选择地吸附有机物质,来实现分离提纯化合物的目标^[59]。其不仅理化性质稳定,应用范围广,而且对有机物选择性较好,可重复使用。将大孔吸附树脂吸附技术应用于放线菌活性物质的分离具有较大的发展潜力,目前已经有许多研究者利用该方法分离纯化出抗生素、生物碱类、黄酮类等成分^[60]。Chen 等利用该方法从 *S. ahysroscopicus* STZ 中分离提纯到对烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus,简称 TMV)表现出有效抗病毒活性的化合物 ϵ -聚-1-赖氨酸^[61]。牛世全等利用三氯甲烷萃取和大孔吸附树脂吸附法对放线菌 DA4-3-12 产生的活性物质进行初步分离,得到对植物病原真菌有良好抑制效果的脂溶性活性物质^[62]。从近几年的文献报道来看,大孔吸附树脂吸附法用于放线菌活性物质的分离纯化研究往往

能取得不错的结果,但树脂成本较高,品种有限,分离操作较为复杂,今后若能开发出价格实惠、高选择性的树脂,则可为活性物质的分离提供一条实用的技术途径。

2.6 高效液相色谱法

高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, 简称 HPLC) 是一种以液体为流动相,基于仪器方法的高效能分离手段^[63]。该技术最早形成于 20 世纪 70 年代初,是在气相色谱和经典液相色谱的基础上发展起来的,如今已是现代分离测试的重要手段。HPLC 利用溶质在固定相和流动相之间溶解度、吸附能力等的差异而引起不同程度的排阻作用使得不同成分在两相间进行连续多次交换时分离出来^[64-65]。不同的是,该方法在技术上采用了高性能色谱柱、高精度输液泵、高灵敏度检测器等,从而实现了分析速度快、分离效率高和操作自动化,这是其他色谱法很难达到的。总体来说,该方法具有适用范围广、前处理简单、分离度好、准确度高、分析时间短、检测通量高、兼具分离和分析功能、可在线检测等优势^[66-67]。凭借这些优势,近年来研究者们逐渐倾向选择该方法用于活性物质的分离。2017 年, Ahmad 等利用高效液相色谱法从 *Streptomyces* sp. AGM12-1 中分离纯化到一种表现出显著抗肿瘤活性的二酮吡嗪衍生物^[68]。同年 Mohanasrinivasan 等借助 HPLC 法在 *S. violaceus* VITYGM 的粗提物中检测纯化到一种肌动蛋白,具有应用于治疗心血管疾病的药物开发的潜力^[69]。尽管高效液相色谱法应用如此广泛,并拥有众多优势,但仍存在需要借助科技创新发展来改进的地方,如分析成本和保养维护费用较高、存在“柱外效应”(即从进样到检测器之间,除柱子以外的任何死空间中如进样器、柱接头、连接管、检测池等,如果流动相的流型有变化,被分离物质的任何扩散和滞留都会显著地导致色谱峰的加宽)、柱效率降低等^[70]。

3 展望

放线菌作为一类重要且具有巨大产生天然活性物质潜能的微生物资源被人们愈加重视,其产生的天然活性物质因具有抑菌、杀虫、抗肿瘤活性、免疫抑制调节、食品防腐及其他多种重要活性而备受关注,放线菌及其天然活性代谢产物的探索已经成为一个热点研究领域^[71-72]。尽管对放线菌及其活

性产物的研究越来越深入,天然活性物质的挖掘、分离技术愈来愈先进,但也存在一定问题,在此笔者提出一些建议:(1)目前放线菌产生的诸多活性物质仍未被挖掘或者很难分离提取出来,这就要求科研工作者不断开发新技术,寻找好方法,将天然活性物质的挖掘、分离技术作为重点研究对象,结合时代前沿技术,不断创新。(2)放线菌产生的天然活性物质虽然种类多、活性高、用途广,但进行规模化的工业化生产并投放到市场上的产品微乎其微,今后应当利用生物工程及发酵工程等技术,研究适合目标放线菌的发酵条件,加快天然活性物质的产业化进程。(3)放线菌新型天然活性物质的发现概率较低,很难满足新药或者新杀菌剂和杀虫剂等开发的需求,除了创新活性物质挖掘技术外,还可以前往高温高压、无光照等极端自然环境以及深海火山、极地海洋等处于原始状态的地区,寻找新菌,挖掘新物质。

参考文献:

- [1] 杨 静, 廖美德. 放线菌资源及其应用[J]. 世界农药, 2014, 36 (1): 22-26.
- [2] McHugh K E, Sturgis C D, Procop G W, et al. The cytopathology of *Actinomyces*, *Nocardia*, and their mimickers [J]. Diagnostic Cytopathology, 2017, 45 (12): 1105-1115.
- [3] 郑 丹, 李鹤鸣, 韩 力. 土壤放线菌资源及其应用[J]. 绿色科技, 2021, 23 (2): 183-187, 193.
- [4] Yu Y, Bai L Q, Minagawa K, et al. Gene cluster responsible for validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *jinggangensis* 5008 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71 (9): 5066-5076.
- [5] Ikono S, Aoki D, Hamada M, et al. DNA sequencing and transcriptional analysis of the kasugamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces kasugaensis* M338 - M1 [J]. The Journal of Antibiotics, 2006, 59 (1): 18-28.
- [6] Isono K, Asahi K, Suzuki S. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. XIII. The structure of polyoxins [J]. Journal of the American Chemical Society, 1969, 91 (26): 7490-7505.
- [7] 丁 衍, 苏雨欣, 庞启华. 海洋放线菌抗肿瘤活性物质的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32 (2): 323-333, 357.
- [8] Olano C, Méndez C, Salas J A. Antitumor compounds from marine actinomycetes [J]. Marine Drugs, 2009, 7 (2): 210-248.
- [9] 刘晓飞, 侯 艳, 马京求, 等. 放线菌的筛选及应用研究进展 [J]. 饲料研究, 2020, 43 (3): 140-143.
- [10] 路丹丹, 赵艳芳, 马 正, 等. 龟裂链霉菌 M527 抗真菌物质的分离鉴定及其在黄瓜枯萎病防治中的应用[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32 (6): 783-787.
- [11] 刘倍伶. 土壤放线菌 11-9-3 的鉴定及其代谢产物杀虫活性成分研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019: 20-22.

- [12] She W Y, Ye W K, Shi Y S, et al. A novel chresdihydrochalcone from *Streptomyces chrestomyceticus* exhibiting activity against Gram – positive bacteria [J]. The Journal of Antibiotics, 2020, 73 (7): 429 – 434.
- [13] Zhu S B, Duan Y W, Huang Y. The application of ribosome engineering to natural product discovery and yield improvement in *Streptomyces* [J]. Journal of Antibiotics, 2019, 8(3): 133.
- [14] Peng A H, Qu X Y, Liu F Y, et al. Angucycline glycosides from an intertidal sediments strain *Streptomyces* sp. and their cytotoxic activity against hepatoma carcinoma cells [J]. Marine Drugs, 2018, 16(12): 470.
- [15] 王 晁, 郝晓萌, 李 娇, 等. 海洋链霉菌 IMB3 – 202 产生的叫咪唑生物碱 [J]. 中国医药生物技术, 2018, 13 (2): 137 – 144.
- [16] Bachmann B O, van Lanen S G, Baltz R H. Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2014, 41 (2): 175 – 184.
- [17] Challis G L. Genome mining for novel natural product discovery [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 51 (9): 2618 – 2628.
- [18] Zerikly M, Challis G L. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining [J]. Chem Bio Chem, 2009, 10 (4): 625 – 633.
- [19] Hifnawy M S, Hassan H M, Mohammed R, et al. Induction of antibacterial metabolites by co – cultivation of two red – sea – sponge – associated actinomycetes *Micromonospora* sp. UR56 and *Actinokinespora* sp. EG49 [J]. Marine Drugs, 2020, 18(5): 243.
- [20] Du D Y, Katsuyama Y, Onaka H, et al. Production of a novel amide – containing polyene by activating a cryptic biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 [J]. Chembiochem, 2016, 17 (15): 1464 – 1471.
- [21] Yan L, Zhang Q Z, Virolle M J, et al. In conditions of over – expression, WblI, a WhiB – like transcriptional regulator, has a positive impact on the weak antibiotic production of *Streptomyces lividans* TK24 [J]. PLoS One, 2017, 12 (3): e0174781.
- [22] Laureti L, Song L J, Huang S, et al. Identification of a bioactive 51 – membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens* [J]. PNAS, 2011, 108 (15): 6258 – 6263.
- [23] Bunet R, Song L J, Mendes M V, et al. Characterization and manipulation of the pathway – specific late regulator AlpW reveals *Streptomyces ambofaciens* as a new producer of kinamycins [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193 (5): 1142 – 1153.
- [24] 朱亚鑫, 段艳婷, 高宇豪, 等. 不同 D/L 单体比 γ – 聚谷氨酸的合成与调控 [J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41 (1): 1 – 11.
- [25] 孙 涛. 唐菖蒲伯克氏菌 ATCC10248 中非核糖肽类天然产物的挖掘 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [26] Zheng W T, Wang X, Zhou H B, et al. Establishment of recombineering genome editing system in *Paraburkholderia megapolitana* empowers activation of silent biosynthetic gene clusters [J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13 (2): 397 – 405.
- [27] 张志宇, 刘东格, 卓春雨, 等. 一株降解纤维素放线菌的产纤维素酶基因克隆与表达 [J]. 微生物学通报, 2020, 47 (6): 1730 – 1739.
- [28] Zhang H R, Boghigian B A, Armando J, et al. Methods and options for the heterologous production of complex natural products [J]. Natural Product Reports, 2011, 28 (1): 125 – 151.
- [29] Antosch J, Schaefer F, Gulder T A M. Heterologous reconstitution of ikarugamycin biosynthesis in *E. coli* [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53 (11): 3011 – 3014.
- [30] Yu Y C, Tang B, Dai R X, et al. Identification of the streptothricin and tunicamycin biosynthetic gene clusters by genome mining in *Streptomyces* sp. strain fd1 – xmd [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102 (6): 2621 – 2633.
- [31] Shi J, Xu X, Zhao E J, et al. Genome mining and enzymatic total biosynthesis of purincyclamide [J]. Organic Letters, 2019, 21 (17): 6825 – 6829.
- [32] Kiran G S, Sajayan A, Priyadharshini G, et al. A novel anti – infective molecule nesfactin identified from sponge associated bacteria *Nesterenkonia* sp. MSA31 against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 157: 104923.
- [33] Lee B, Son S, Lee J K, et al. Isolation of new streptimidone derivatives, glutarimide antibiotics from *Streptomyces* sp. W3002 using LC – MS – guided screening [J]. Journal of Antibiotics, 2020, 73 (3): 184 – 188.
- [34] 王俊博, 孔令新, 乔永健, 等. 基于基因组挖掘的农抗 120 活性成分制霉菌素和丰加霉素的发现和鉴定 [J]. 微生物学报, 2021, 61 (10): 3076 – 3086.
- [35] Corre C, Song L J, O'Rourke S, et al. 2 – Alkyl – 4 – hydroxymethylfuran – 3 – carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining [J]. PNAS, 2008, 105 (45): 17510 – 17515.
- [36] 贾 泽, 江 云, 王智玮, 等. 炭样小单胞菌 JXNU – 1 抗生素合成的转录组学分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37 (9): 3817 – 3828.
- [37] Zhang Y, Liu X, Yin T, et al. Comparative transcriptomic analysis of two *Saccharopolyspora spinosa* strains reveals the relationships between primary metabolism and spinosad production [J]. Scientific Reports, 2021, 11 (1): 14779.
- [38] Yang Y, Liu B, Du X J, et al. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY – 1 [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8331.
- [39] Han J, Gao Q X, Zhang Y G, et al. Transcriptomic and ectoine analysis of halotolerant *Nocardiopsis gilva* YIM 90087 T under salt stress [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 618.
- [40] Amos G C A, Awakawa T, Tuttle R N, et al. Comparative transcriptomics as a guide to natural product discovery and biosynthetic gene cluster functionality [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114 (52): E11121 – E11130.

- [41] Qu X D, Lei C, Liu W. Transcriptome mining of active biosynthetic pathways and their associated products in *Streptomyces flaveolus* [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50 (41): 9651 – 9654.
- [42] Zhang Y, Cai J, Huang L, et al. Improving the productivity of 19, 20 – epoxy – cytochalasin Q in *Xylaria* sp. *sof11* with culture condition optimization [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2016, 46 (5): 461 – 466.
- [43] Cho S S, Choi Y H, Simkhada J R, et al. A newly isolated *Streptomyces* sp. CS392 producing three antimicrobial compounds [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35 (1/2): 247 – 254.
- [44] Driche E H, Sabaou N, Bijani C, et al. *Streptomyces* sp. AT37 isolated from a Saharan soil produces a furanone derivative active against multidrug – resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33 (6): 105.
- [45] Kosanović M, Milutinović B, Goč S, et al. Ion – exchange chromatography purification of extracellular vesicles [J]. *BioTechniques*, 2017, 63 (2): 65 – 71.
- [46] Savitha S D, Sonal J C, Basavaraj S H. Production, purification and characterization of L – Glutaminase from *Streptomyces* sp. isolated from soil [J]. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2016, 6 (7): 100 – 105.
- [47] Dhamodharan D, Jemimah N S, Merlyn K S, et al. Novel fibrinolytic protease producing *Streptomyces radiopugnans* VITSD8 from marine sponges [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17 (3): 164.
- [48] Ciura K, Dziomba S, Nowakowska J, et al. Thin layer chromatography in drug discovery process [J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1520: 9 – 22.
- [49] Hölzl G, Dörmann P. Thin – layer chromatography [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2295: 29 – 41.
- [50] Petrova E. Innovation in the pharmaceutical industry: the process of drug discovery and development [M]. New York: Springer, 2014.
- [51] 王云鹏, 马越. 养殖业抗生素的使用及其潜在危害 [J]. *中国抗生素杂志*, 2008, 33 (9): 519 – 523.
- [52] Kamaruddin M, Marzuki I, Burhan A, et al. Screening acetylcholinesterase inhibitors from marine – derived actinomycetes by simple chromatography [J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 679 (1): 012011.
- [53] Saadouli I, El Euch I Z, Trabelsi E, et al. Isolation, characterization and chemical synthesis of large spectrum antimicrobial cyclic dipeptide (1 – leu – 1 – pro) from *Streptomyces misionensis* V16R3Y1 bacteria extracts. A novel ¹H NMR metabolomic approach [J]. *Antibiotics*, 2020, 9 (5): 270.
- [54] 刘延杰, 陈弯弯, 向碧云, 等. 硅胶柱层析分离天然产物实验要点分析 [J]. *生物学通报*, 2018, 53 (6): 44 – 46.
- [55] Meng L H, Li X M, Liu Y, et al. Polyoxygenated dihydropyrano [2, 3 – c] pyrrole – 4, 5 – dione derivatives from the marine mangrove – derived endophytic fungus *Penicillium brocae* MA – 231 and their antimicrobial activity [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2015, 26 (5): 610 – 612.
- [56] 王栋, 李文均, 张玉琴, 等. 1 株抗真菌放线菌菌株 YIM31530T 的多相分类研究 [J]. *云南大学学报 (自然科学版)*, 2004, 26 (3): 265 – 269, 274.
- [57] Ravi L, Kannabiran K. Extraction and identification of gancidin W from marine *Streptomyces* sp. VITLKG012 [J]. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 80 (6): 1093 – 1099.
- [58] Suga T, Kimura T, Inahashi Y, et al. Hamuramicins A and B, 22 – membered macrolides, produced by an endophytic actinomycete *Allostreptomyces* sp. K12 – 0794 [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2018, 71 (7): 619 – 625.
- [59] 宝剑锋. 大孔吸附树脂对堆肥过程中抗生素抗性基因及细菌群落的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020: 19 – 23.
- [60] Talbot G H, Bradley J, Edwards J E, et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the infectious diseases society of America [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 42 (5): 657 – 668.
- [61] Chen J G, Liu H, Xia Z H, et al. Purification and structural analysis of the effective anti – TMV compound ϵ – poly – 1 – lysine produced by *Streptomyces ahysroscopicus* [J]. *Molecules*, 2019, 24 (6): 1156.
- [62] 牛世全, 文娜, 韩建山, 等. 一株抗植病放线菌的发酵条件优化及活性产物研究 [J]. *西北师范大学学报 (自然科学版)*, 2020, 56 (1): 69 – 77.
- [63] 吕亚兰. 高效液相色谱法在药品检验中的应用 [J]. *临床合理用药杂志*, 2021, 14 (8): 155 – 156.
- [64] 冯建永. 高效液相色谱法在农药残留分析中的应用 [J]. *化工管理*, 2017 (11): 219.
- [65] 白静, 王超, 尚延宾, 等. 高效液相色谱法简介及其在药品检验中的应用研究 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2019, 6 (94): 158.
- [66] 杨晓琼, 孔维喜, 袁建民, 等. 干热河谷特色植物余甘子中没食子酸含量的测定 [J]. *江西农业学报*, 2020, 32 (5): 77 – 82.
- [67] 孙星, 杨邦保, 闫小龙, 等. 超高效液相色谱串联质谱法分析氟唑菌酰胺在小麦和土壤中的残留与消解动态 [J]. *江苏农业科学*, 2020, 48 (19): 210 – 214.
- [68] Ahmad M S, El – Gendy A O, Ahmed R R, et al. Exploring the antimicrobial and antitumor potentials of *Streptomyces* sp. AGM12 – 1 isolated from Egyptian soil [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 438.
- [69] Mohanasrinivasan V, Yogesh S, Govindaraj A, et al. *In vitro* thrombolytic potential of actinoprotease from marine *Streptomyces violaceus* VITYGM [J]. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 2017, 14 (2): 120 – 124.
- [70] 刘敬玄. 高效液相色谱法在化妆品检测中的应用研究 [J]. *轻工标准与质量*, 2019 (3): 62 – 63.
- [71] 任建委, 杜宝中. 放线菌资源及主要次级代谢产物活性概述 [J]. *西藏科技*, 2020 (4): 15 – 18, 28.
- [72] 柏凤月, 倪孟祥. 海洋微生物来源的抗菌活性物质研究进展 [J]. *化学与生物工程*, 2016, 33 (5): 15 – 19, 25.