

# 菊欧氏杆菌质粒和染色体在 Echcin类 抗生素生物合成中的作用\*

刘景晶<sup>1</sup> 王金生 方中达

(南京农业大学植保系, 南京 210014)

**摘 要** 含有 22kb 质粒的菊欧氏杆菌野生株 B<sub>3</sub> 能产生 Echcins, 脱质粒菌株 B<sub>3</sub> 丧失了产生 Echcin 的能力, 转座子 Tn5 插入质粒也可以使菊欧氏杆菌产生 Echcin 的能力丧失, 表明质粒上的基因与 Echcin 类抗生素生物合成有关。将菊欧氏杆菌质粒接合转移到大肠杆菌中, 并不能使大肠杆菌成为 Echcin 生产菌, 说明除了质粒上的基因外, 菊欧氏杆菌染色体的基因也参与了 Echcin 的生物合成。四种 Echcin 的抑菌谱, 理化特性和结构特点的系统比较结果提示它们是由同一代谢途径合成的。

**关键词** 菊欧氏杆菌; 抗生素; 质粒

1954 年 Fredericq 等人发现大肠杆菌产生的蛋白质抗生素 Colicin 是由 Col 质粒编码的<sup>[1]</sup>。此后, 多达 30 个属 100 多种细菌中都发现了类似的物质<sup>[2]</sup>, 这类蛋白质性质的抗生素总称为细菌素 (Bacteriocin), 它们大多直接由质粒上的基因编码产生<sup>[3]</sup>。1979 年 Echandi 和 Meyer 对菊欧氏杆菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 产生的抗生物质进行详细研究, 他们的结论是菊欧氏杆菌产生的抗生物质是热不稳定的高分子蛋白质性质的细菌素<sup>[4]</sup>; 1985 年 Dominique 等人对 9 株不同来源的菊欧氏杆菌产生的抗生物质进行研究, 认为它们是一类热稳定的低分子蛋白质性质的细菌素。虽然国外学者对菊欧氏杆菌所产生的抗生物质的性质各抒己见, 但都没有获得纯品及测定其精确结构。我们从菊欧氏杆菌发酵液中分离了抗生物质纯品, 它们易被中性盐沉淀, 这是一种类似于蛋白质的特性, 这类抗生素带强正电荷, 易吸附在蛋白质表面。结构分析表明这类抗生素不是蛋白质, 而是具有广谱抗生活性的多胺类抗生素, 我们将之命名为 Echcin<sup>[6]</sup>。本文进一步证明这类抗

生素虽然有别于经典的细菌素, 但它们的产生也与质粒有关。同时从 Echcin 类抗生素的理化性质和化学结构角度进一步说明菊欧氏杆菌的质粒和染色体 DNA 在 Echcins 生物合成中所起的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

Ech B<sub>3</sub> Ech 广 - 4 Ech ER- 1 是菊欧氏杆菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 的野生株, 含质粒, 分别从浙江、广东和江苏的水稻茎基部分离。Ech B<sub>3</sub> Ech 广 - 1 分别是 Ech B<sub>3</sub> 和 Ech 广 - 4 经热处理脱除质粒的菌株。WZ11 转座子 Tn5 插入 Ech B<sub>3</sub> 的 pWZ12 质粒的抗生素相关基因所得到的突变株<sup>[7]</sup>。WZ65 Ech B<sub>3</sub> 的 pWZ12 质粒经转座子 Tn5 插入标记后 (抗生素相关的基因未失活) 接合转移到大肠杆菌所得到的结合子<sup>[7]</sup>。Se10R 从发生软腐的马铃薯组织中分离的 *E. carotovora* pv. *carotovora*, 本实验用作抗生素生物测定的指示菌。

### 1.2 培养基和培养条件

\* 收稿日期 1997-07-26 <sup>1</sup> 现在地址: 中国药科大学生物化学教研室 210009

抗生素发酵采用记为 GGA 的培养基, 成分为: 蔗糖 10 g, 谷氨酸 2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, 水 1000 ml; 灭菌后用氨水调 pH 6.5 培养 24 h 的种子菌按 2% 的比例接入发酵培养基。发酵在 10L 发酵罐中进行, 发酵温度为 28℃。

1.3 发酵液中抗生素 Echcins 的比色效价和生物效价测定

1.3.1 比色效价测定 Echcins 用改良的 Wagner 氏试剂 (碘 2.5 g, 碘化钾 4 g, 蒸馏水 1000 ml) 进行奈氏比色法测定: 将改良的 Wagner 试剂: 水 = 0: 40, 1: 39, 2: 38... 37: 3, 38: 2, 39: 1 梯度稀释; 分别编号为 1, 2, 3... 38, 39, 40 将离心除去菌体的发酵液加入等体积经 20 倍水稀释的改良 Wagner 氏试剂与标准色价进行比色, 定出发酵液比色效价。

1.3.2 生物效价测定 用 Se10R 为指示菌, 纸碟法测定。每纸碟加倍比稀释的发酵液 25 μl, 以出现抑菌圈的滴度定为发酵液的抗生素效价。

1.4 脱质粒菌株的检视

1.4.1 显色法测定 将待检菌株点接在营养琼脂平板上, 28℃ 培养 48 h, 用棉球将菌苔擦去, 在平板上倒入改良的 Wagner 试剂显色 10 min, 倾去试剂后观察原菌落处培养基的颜色变化。

1.4.2 生物测定 将待检菌株点接在营养琼脂平板上 28℃ 培养 24 h, 喷 Se10R 再培养 12 h, 观察抑菌圈有无。

1.4.3 质粒提取 见文献 [8]

1.5 理化性质分析 见文献 [6]

## 2 结果

### 2.1 Echcin 生物合成与质粒的关系

将能产生 Echcin 的菊欧氏杆菌的单菌落在营养琼脂平板上划线培养时, 有些原本呈褐色的菌落一部分区域会长出乳白色的菌苔, 类似于真菌中的角变现象 (图 1)。

将褐色菌落和乳白色菌落分别纯培养后, 用 Se10R 为指示菌进行测定, 结果显示



Fig 1. The plasmidless white colone appeared abngside the brown colone harbored the plasmid

褐色菌落对 Se10R 有抗生活性, 白色菌落失去了对 Se10R 的抗生活性。将分别来自浙江、广东和江苏的 Ech B<sub>3</sub>、Ech 广-4 和 Ech ER-1 三个菌株分别在平板上划线检查, 结果表明不同地理来源的菊欧氏杆菌都存在这种“角变”现象。分别测定褐色菌落和乳白色菌落对马铃薯的致病性, 表明乳白色菌落虽然失去了对指示菌 Se10R 的抗生活性, 但依然保持着对植物的致病性。

将褐色菌落和“角变”产生的白色菌落分别培养后抽提质粒, 显示褐色菌落有质粒, 白色菌落质粒脱落 (图 2)。

抗生素 Echcins 可以与 Wagner 试剂发生呈色反应, 反应液呈棕褐色 [6]。将含质粒的菌株 Ech B<sub>3</sub> 和脱质粒的菌株 Ech B<sub>3</sub> 点接在营养琼脂平板上生长 48 h 后, 用 Wagner 试剂对菌落下方的琼脂进行显色, 观察到 Ech B<sub>3</sub> 菌落下方的琼脂被染成棕褐色而脱质粒的 Ech B<sub>3</sub> 菌落下方的琼脂不显色, 这说

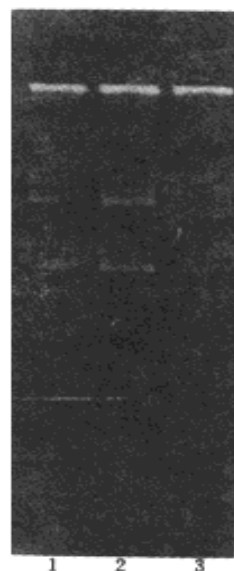


Fig 2. Detection of the plasmid of the strains (Lane 1, 2) Ech B<sub>3</sub>, a wild strain producing the Echcins; (lane 3) Ech B<sub>3</sub>, a strain producing non Echcins.

明菊欧氏杆菌质粒的存在直接与 Echcin类抗生素生物合成相偶联(图 3)。为了进一步证实 Echcin类抗生素的生物合成与质粒的关系,将 Ech B<sub>3</sub>和 Ech B<sub>1</sub>在 2 × 10L的两个发酵罐中同步发酵,每 4h用 Wagner试剂显色法和生物效价测定法检测发酵液中的 Echcins,结果表明,在为期 24h的发酵过程中,Ech B<sub>1</sub>的发酵液与 Wagner试剂均无反应,也无抗生活性;Ech B<sub>3</sub>的发酵液能与 Wagner试剂反应,其反应液的颜色深浅与生物效价的高低相一致(图 4)。对两菌株的发酵液进行平行提取,从 Ech B<sub>3</sub>发酵液中能提取到 4种 Echcins,而从 Ech B<sub>1</sub>的发酵液中不能提取到任何痕迹量的 Echcins,说明菊欧氏杆菌质粒脱落后,产生 Echcins的能力不是下降,而是完全丧失。

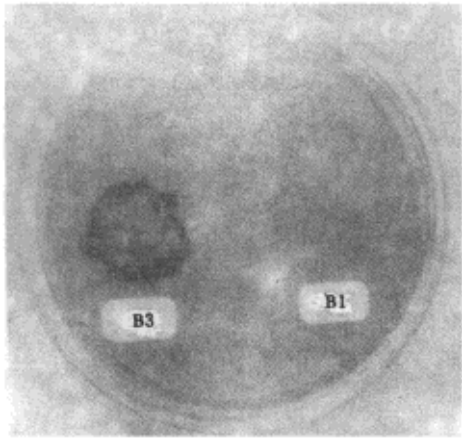


Fig 3. The color reaction of medium below Ech B<sub>3</sub> colony and Ech B<sub>1</sub> colony with wagner's reagent

2.2 Echcin的生物合成与菊欧氏杆菌染色体的关系

将 WZ11 Ech B<sub>3</sub>、WZ65和 Ech B<sub>3</sub>的发酵液分别与 Wagner试剂反应,仅有野生株 Ech B<sub>3</sub>能发生呈色反应,转座子插入质粒 pWZ12的菌株 WZ11脱质粒菌株 Ech B<sub>1</sub>以及 pWZ12接合转移到 *E. coli*的结合子 WZ65的发酵液都不能与 Wagner试剂反应

(图 5),说明 Echcin类抗生素的生物合成除了与质粒有关外,还需要菊欧氏杆菌染色体 DNA基因的参与。

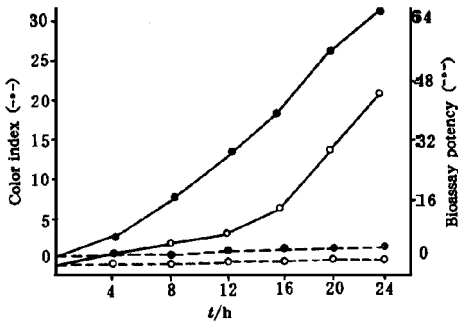


Fig 4. Time course of color index and bioassay potency of broth culture  
—— Ech B<sub>3</sub>; ---Ech B<sub>1</sub>

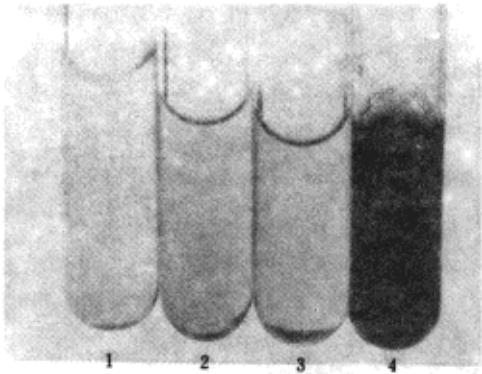


Fig 5. The reaction of broth culture of several strains with modified Wagner's reagent (1) *E. drysanthemii* WZ11, a mutant strain which plasmid pWZ12 was inserted by transposon Tn5; (2) *E. chrysanthemii* B<sub>1</sub>, a plasmidless strain which plasmid pWZ12 was cured; (3) *Eschericia coli* WZ65, a conjugator harboring the plasmid of *Erwinia chrysanthemii*; (4) *E. chrysanthemii* B<sub>3</sub>, a wild strain harboring pWZ12

2.3 Echcin类抗生素生物合成途径

从菊欧氏杆菌发酵液中分离到四种抗生素单体,我们报道了分子量最小的 EchcinI的结构,表明是多胺类新抗生素<sup>[6]</sup>。依分子量大小我们将四种抗生素依次称为 EchcinI、EchcinII、EchcinIII和 EchcinIV。生物活性测定表明,四种 Echcin都能抑制各种真菌的生

长,能有效地杀死革兰氏阴性和阳性细菌,对艾氏腹水癌细胞也有很强的抗生活性,均属广谱类抗生素(见表 1)。

理化性质研究表明,虽然四种 Echcin 的熔点和分子量各不相同,但晶体形状、溶解特性以及多种呈色反应都是相同的(见表 1)。

Tab 1. Microbial activity and physico-chemical properties of Echcin I-IV

	Echcin			
	I	II	III	IV
Antimicrobial activity				
Fungi <i>Fusarium solani</i>	+	+	+	+
<i>Phytophthora parasitica</i>	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+
Bacteria ( $\mu\text{g/ml}$ )				
<i>Escherichia coli</i>	2	8	4	64
<i>Erwinia carotovora</i>	4	8	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	2	8	16
<i>Proteus vulgaris</i>	2	4	4	4
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	4	4	8	4
<i>Streptococcus tetragera</i>	4	2	4	8
Cell ( $\mu\text{g/ml}$ )				
EAC	3.4	12.5	6.75	6.4
Physico-chemical properties				
Appearance	white crystal	white crystal	white crystal	white crystal
Melting Point( $^{\circ}\text{C}$ )	82.5-84	70-72	76.5-78	62.5-64
Molecular weight (from FAB-MS)	654	696	841	840
Silica-gel thin layer <sup>(1)</sup> ( $R_f$ )	(a) 0.34 (b) 0.36 (c) 0.76	(a) 0.34 (b) 0.36 (c) 0.76	(a) 0.34 (b) 0.36 (c) 0.76	(a) 0.34 (b) 0.36 (c) 0.76
Paper chromatography <sup>(2)</sup> ( $R_f$ )	(d) 0.8 (e) 0.84	(d) 0.42 (e) 0.48	(d) 0.86 (e) 0.92	(d) 0.07 (e) 0.12
UV (Chloride in water) $\lambda$ :	189	189	189	200
IR (KBr) $\text{cm}^{-1}$	3367, 3283, 3194, 2920, 2849, <u>2820</u> , 1605, 1468, 1356, 1139, 1068, 945, 849, 722	3356, 3288, 3205, 2920, 2849, 1620, 1563, 1551, 1468, 1356, 1139, 1068, 948, 849, 722	3366, 3287, 3193 2921, 2850, <u>1631</u> , <u>1579</u> , 1563, 1468, 1356, 1139, 1068, 947, 850, 722	3367, 3288, 3195 2921, 2850, <u>1710</u> , 1607, 1468, 1356, 1139, 1068, 942, 848, 722
Color reaction				
Molish's reagent	-	-	-	-
Sakaguchi's reagent	-	-	-	-
Droegendorff's reagent	Orange precipitate	Orange precipitate	Orange precipitate	Orange precipitate
Wagner's reagent	Brown precipitate	Brown precipitate	Brown precipitate	Brown precipitate
Bentrad's reagent	Hazel precipitate	Hazel precipitate	Hazel precipitate	Hazel precipitate
Mayer's reagent	White precipitate	White precipitate	White precipitate	White precipitate

(1) Solvents (a) Acetic ether-Pyridine-Ethyl alcohol-Ammonia liquor (20: 3: 3: 3)  
(b) *n*-butanol-Acetic acid-Water (4: 1: 5)  
(c) Dichloromethane-Diethylamine-Methanamide (20: 2: 1)

(2) Paper was treated with 0.2mol/L NaCl Solution.  
Solvents (d) Acetic ether-*n*-butanol-Formic acid (8: 5: 1)  
(e) Chloroform-*n*-butanol-Methanol (5: 5: 3)

Echcin I ~ III的紫外吸收光谱在 200~400nm 均无吸收,仅在 189nm 处有强吸收。Echcin IV 在 220~360nm 处有吸收,最大吸收在 200nm 处。红外光谱比较显示,四种抗生素多数红外吸收谱带是相同的,均有 3000~3400, 1600(-NH), 2920, 2850(-CH<sub>2</sub>-), 1139(C-N)及 722(C-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C<sub>n</sub>>)。然而各种 Echcin 也各有特征的吸收谱带, Echcin I 在 1605 有强的单一谱带,在 Echcin II 红外光谱图上,该区附近有多条谱带, Echcin III 在该区则有 1650 1579 1563 三条谱带, Echcin IV 与 Echcin I 比较则是在 1600 附近多出一条 1709 强吸收谱带。

FAB 质谱研究表明几种 Echcins M+ 1 峰各不相同,依次为 Echcin I 655, Echcin II 697 Echcin III 842 和 Echcin IV 841,但 *m/e* 56, 67, 100, 128, 210, 227, 337 和 464 碎片是四种抗生素共有的强吸收峰。红外光谱和质谱分析结果都提示四种 Echcin 属于同一系列衍生物,因此,单基因失活会使菊欧氏杆菌丧失对所有四种 Echcin 的合成能力。值得注意的是 Echcin I 的 M+ 1 是 655<sup>[6]</sup>,而 Echcin II - Echcin IV,在 *m/e* 654 或 656 处也有强吸收,提示 Echcin II、III、IV 可能是以 Echcin I 为基本骨架进一步衍生而成的。

### 3 讨论

1) 在营养琼脂上生长的菊欧氏杆菌会自行脱去质粒,质粒脱落后,产生 Echcin 类抗生素的能力也随之丧失,说明质粒参与了 Echcin 的生物合成。

2) 用转座子 Tn5 插入菊欧氏杆菌一个大小约 22kb 的质粒 pWZ12,这种单一位点插入突变会使菊欧氏杆菌失去合成所有 4 种 Echcin 的能力;抗菌谱和理化性质比较表明

4 种抗生素的性质是十分相似的;遗传学方法生物活性测定及理化性质比较研究结果都提示菊欧氏杆菌产生的 4 种 Echcin 类抗生素可能是由同一条代谢途径合成的。

3) 在分类上,菊欧氏杆菌与大肠杆菌同属肠杆菌科,通过结合转移将菊欧氏杆菌质粒 pWZ12 引入大肠杆菌,所获得的结合子 *E. coli* WZ65 并不能产生 Echcin 类抗生素,说明 Echcin 的生物合成仅仅依赖 pWZ12 上载荷的基因是不够的,还需要菊欧氏杆菌染色体 DNA 基因参与。pWZ12 上的 Echcin 相关基因产物是四种 Echcin 生物合成的调控因子还是一个关键的抗生素合成酶,需要进一步探明。

### 参考文献

- 1 Fredericq P. Transduction genetique des proprietes colicinogènes chez *Escherichia coli* et *shigella sonne*. *Compt Rend*, 1954, **148** 399
- 2 Vidaver A K. Bacteriocin: The lure and the reality. *Plant Dis*, 1983, **67** 471
- 3 Jacobe F, Lwoff A, Siminovitch A, et al. Definition de quelques terms relatifs a la lysine, *Ann-Inst Pasteur*, 1953, **84** 222
- 4 Echand E, Mayer JW. Production, properties and morphology of bacteriocin from *Erwinia chrysanthemi*, *Phytopathology*, 1979, **69** 1204
- 5 Dominique E, Tousaint A. Bacteriocin-resistant mutants of *Erwinia chrysanthemi* possible involvement of iron acquisition in phytopathogenicity. *J Bacteriol*, 1985, **163** 221
- 6 刘景晶,王金生,方中达.菊欧氏杆菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 产生新抗生素 Echcin I 的化学结构分析,中国药科大学学报,1996, **27**(9): 551
- 7 韦忠民,王金生,方中达.转座子 Tn5 与诱导菊欧氏杆菌产细菌素菌株突变的研究.南京农业大学学报,1987, **10**(2): 48
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989

# Role of the Plasmid and Chromosome in Biosynthesis of the Ehcins, Novel Antibiotics Produced by *Erwinia chrysanthemi*

Liu Jingjing, Wang Jinsheng, Fang Zhongda

Department of Plant Protection, Nanjing Agriculture University, 2100014

**Abstract** *Erwinia chrysanthemi* B3, a wild strain with a 22 kb plasmid, could produce the Ehcins, but the Ech B1 in which plasmid was cured and Ech WZ11 in which plasmid was inserted by transposon Tn5 could not produce the Ehcins. *Eschericia coli* WZ65, a conjugon harboring the plasmid of *Erwinia chrysaanthemi*, could not produce the Ehcins too. These experimental results suggested that the plasmid and the chromosome of *E. chrysanthemi* had also responsibilities for the biosynthesis of the Ehcins. It was also suggested on the basis of comparison studies of antimicrobial spectra, physico-chemical properties and structure analysis that the four Ehcins (Ehcins I-IV) were produced by a same metabolic pathway.

**Key words** *Erwinia chrysanthemi*; Antibiotics; Plasmid

## 【文摘 043】六种魔芋属植物块茎的显微鉴定研究

宋学华,戴志凌,崔 熙. 中草药, 1998, 28(9): 554

首次报道对白魔芋 *Amorphophallus albus* 西盟魔芋 *A. ximengsis* 滇魔芋 *A. yunnanensis* 南蛇棒 *A. dunni* 攸落魔芋 *A. ynloensis* 块茎进行的显微鉴定研究及对魔芋 *A. rivieri* 块茎的进一步显微观察。结果表明 6种魔芋植物块茎在显微特征方面存在一定差异;首次发现魔芋块茎含草酸钙簇晶;首次断定葡甘露聚糖团块,存在于分泌腔中。

## 【文摘 044】TLC-可见分光光度法对丝瓜藤及其炮制品质量控制的应用

程紫骅,谢 宁,吴朝阳. 中草药, 1997, 28(9): 597

用薄层刮板-可见分光光度法检测丝瓜藤及其炒黄、炒炭制品中齐墩果酸的含量。其方法回收率为 99.52%,  $r=0.9998$  ( $n=5$ ),  $RSD$  为 1.03%,取得了较为可靠的结果。证明丝瓜藤原药材及其炮制品中齐墩果酸含量无显著差别。

## 【文摘 045】淫羊藿降压有效部位中活性成分淫羊藿甙含量的 RP-HPLC 分析

孔令义,李 意. 中草药, 1997, 28(10): 656

建立了淫羊藿 *Epimedium grandiflorum* 降压有效部位中降压活性成分淫羊藿甙 (icariin) 含量的 RP-HPLC 分析方法。并对由不同产地的淫羊藿药材制备的淫羊藿降压有效部位中淫羊藿甙的含量进行了分析。这为淫羊藿降压有效部位质量标准的制定提供了依据。

## 【文摘 046】 $\alpha$ -L-天冬氨酸-D-丙氨酸异丙酯的结构确证

郭寅龙,许激扬,相秉仁,安登魁. 现代应用药学, 1997, 14(3): 28

分别运用紫外光谱、红外光谱、高分辨 $^1H$ 和 $^{13}C$ 核磁共振及高分辨自身化学电离离子化质谱测定了自制的 $\alpha$ -L-天冬氨酸-D-丙氨酸异丙酯样品,结果表明与所设计的合成产物一致。