

链霉菌TRM74023的基因簇分析及其抑菌活性

刘超文, 陈乙煌, 刘阳, 陈程, 王天才, 刘松岳, 罗晓霞*
(塔里木大学生命科学与技术学院, 塔里木盆地生物资源保护利用省部共建国家重点实验室培育基地, 新疆阿拉尔 843300)

摘要: 金黄色葡萄球菌作为食源性感染的致病菌, 而抗生素的滥用使其面临“无药可用”的危机。为寻找可用的药物, 以链霉菌 TRM74023 为研究对象, 进行代谢潜力分析及其活性组分分析。基于基因组分析综合评估其代谢潜力, 以金黄色葡萄球菌作为靶标菌进行抑菌活性分析, 利用现代分离纯化鉴定技术获得活性次级代谢产物。结果表明, 该菌基因组大小为 6 885 644 bp, G+C 含量为 72.24%, 基于 ANI 的值域、DDH 的值域和系统进化树分析共同说明 TRM 74023 作为一个新种, 链霉菌 TRM74023 携带 29 个天然产物合成基因簇基因簇和 3 个抗性基因。基于抑菌活性分析分离得到两个单体化合物鉴定为放线菌素 (Actinolactomycin) 和 6-甲基水杨酸 (6-methylnicotinic-acid), 其中 Actinolactomycin ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对金黄色葡萄球菌有较强的活性, 抑菌圈直径为 21.40 mm, 其 MIC 和 MBC 分别为 $1\times 10^{-3}\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1\times 10^{-2}\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 抑菌谱表明对粪肠球菌、鲍曼不动杆菌和解淀粉欧文氏杆菌有显著抑菌效果。综上所述, 链霉菌 TRM74023 具有丰富的代谢潜力, 并且分离出了对金黄色葡萄球菌有较强抑菌效果的放线菌素, 该结果为防治金黄色葡萄球菌等食源性致病菌的药物开发奠定基础。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 链霉菌; 基因组分析; 放线菌素

文章编号: 1673-9078(2026)02-77-85 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.2.1471

Streptomyces Strain TRM74023: Gene Cluster Analysis and Antibacterial Activity

LIU Chaowen, CHEN Yihuang, LIU Yang, CHEN Cheng, WANG Tiancai, LIU Songyue, LUO Xiaoxia*
(College of Life Science and Technology, Tarim University, State Key Laboratory Incubation Base for Conservation and Utilization of Bio-Resource in Tarim Basin, Alar 843300, China)

Abstract: *Staphylococcus aureus* is a pathogenic bacterium responsible for food-borne infections. The overuse of antibiotics has led to a lack of effective pharmacological treatments for *S. aureus* infection. To identify candidate therapeutic agents, the metabolic potential and active components of *Streptomyces* strain TRM74023 were analyzed. Metabolic potential was comprehensively assessed based on a genomic analysis, and antibacterial activity was analyzed by adopting *S. aureus* as the target bacterium. Biologically active secondary metabolites were obtained through modern techniques for isolation, purification, and identification. The bacterium had a genome size of 6 885 644 bp and a G+C content of 72.24%. The average nucleotide identity (ANI), DNA-DNA hybridization (DDH) values, and phylogenetic analysis collectively suggested that TRM74023 is a novel species. In total, 29 natural product biosynthetic gene clusters and three resistance genes were found in *Streptomyces* strain TRM74023. Two monomeric compounds were isolated based on an antibacterial activity analysis and were identified as actinolactomycin and 6-methylnicotinic acid. Actinolactomycin ($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) exhibited strong activity against *S. aureus*, with an inhibition zone diameter

引文格式:
刘超文,陈乙煌,刘阳,等.链霉菌TRM74023的基因簇分析及其抑菌活性[J].现代食品科技,2026,42(2):77-85.
LIU Chaowen, CHEN Yihuang, LIU Yang, et al. *Streptomyces* strain TRM74023: gene cluster analysis and antibacterial activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(2): 77-85.

收稿日期: 2024-10-04 ; 修回日期: 2025-02-27 ; 接受日期: 2025-03-04
基金项目: 国家自然科学基金项目 (323600090); “西部之光” 青年学者项目 (2022-XBQNXX-019); 塔里木大学重大项目培育专项 (TDZKZD202202); 兵团研究生教育创新计划项目 (BTYJXM-2024-K20)
作者简介: 刘超文 (2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物分子生物学, E-mail: 2257373369@qq.com
通讯作者: 罗晓霞 (1982-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物分子生物学, E-mail: xxluo415@163.com

of 21.40 mm and MIC and MBC values of 1×10^{-3} mg·mL⁻¹ and 1×10^{-2} mg·mL⁻¹, respectively. Significant antibacterial effects were detected against *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, and *Erwinia amylovora*. In summary, *Streptomyces* strain TRM74023 demonstrated substantial metabolic potential, and actinolactomycin isolated from the bacterium exhibited strong antibacterial effects against *S. aureus*. These results can serve as a scientific basis for the development of drugs to prevent and control food-borne pathogenic bacteria, such as *S. aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*; *Streptomyces*; genomic analysis; actinolactomycin

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 是一种常见的食源性致病菌, 一旦污染食品后会分泌肠毒素, 进而引起食物中毒^[1]。据美国疾病控制与预防中心报告, 近年来, 由 *S. aureus* 引起的感染占第二位, 仅次于大肠杆菌^[2,3], 被列为一个世界性卫生难题。*S. aureus* 由于其适应性强的特性, 广泛存在食品加工和储存等过程中^[4], 产生的毒素对人体健康造成严重损害, 并且污染食物造成大量浪费, 对食品安全和经济构成重大威胁^[5,6]。使用抗生素有效抑制 *S. aureus* 是主流方法之一, 但过度使用导致抗生素耐药性产生^[7], 根据钱璟等^[8]报道, 抗性菌、抗性基因在人、动物和环境间流动与循环, *S. aureus* 防控面临巨大挑战。研究者们为解决这一问题, 需要不断开发新的药物, 通过探寻具备代谢潜力丰富的放线菌来挖掘活性次级代谢产物, 已然成一种有效方法^[9]。

近些年来, 链霉菌作为放线菌属的一大类, 依旧作为药物开发不可或缺的重要来源, 大约有 70% 药物来自于链霉菌的次级代谢产物。这些药物在各个领域都有应用, 其中 75% 用于食品、医药和农业^[10]。链霉菌以生产抗生素而闻名, 一般生境里链霉菌菌种资源挖掘似乎已经处于“瓶颈期”了, 于是研究者将目光转向了极端环境中的链霉菌, 其能产生新的代谢产物的潜在可能性更大^[11,12]。因此, 充分利用极端环境中的链霉菌产生的活性次级代谢产物, 对于确保食品安全、医药开发、环境保护和农业发展等方面都至关重要。随着生物技术的快速发展, 研究者对链霉菌的研究逐渐深入, 而测序技术的迭代升级和基因测序成本降低, 以高通量测序技术分析全基因组序列, 并且序列比对的研究重心也逐渐从个体单一参考基因组向群体序列的泛基因组 (Pan-genome) 比较的方法^[13]转移。借助现代生物信息的手段, 通过基因组学研究, 基因组的测序和注释后, 可以预测其代谢途径、潜在的生物合成基因簇和耐药基因, 从而评估其代谢潜力^[14], 帮助学者深入理解物种进化, 揭示菌株间的差异, 发现新的功能基因, 指导抗生素的研发。刘晶莹等^[15]以基因组信息为导向, 成功定向激活海洋来源 *Streptomyces cavourensis* NA4 中沉默的 II 型聚酮类次级代谢产物生物合成基因簇, 鉴定新产生的次级

代谢产物的结构和抑菌活性。亢文佳等^[16]基于链霉菌 *Streptomyces* sp. TP-A0365 的基因组序列, 发现新吡嗪酮类天然产物生物合成的非核糖体肽合成酶 (NRPS) 编码基因并分离得到 Provalin。

本研究以塔克拉玛干沙漠怪柳根际土壤分离的链霉菌 TRM74023 为研究材料, 通过分析该菌株的代谢潜力指导挖掘其活性次级代谢产物。采用 antiSMASH 预测天然产物合成基因簇和耐药基因, 旨在对菌株的代谢潜力进行综合评估。基于这些代谢潜力分析数据, 采用现代分离纯化鉴定技术成功分离出对 *S. aureus* 具有活性的化合物—Actinolactomycin。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

菌株 *Streptomyces pratensis* TRM74023 由实验室前期从怪柳根际土壤中分离得到, 其基因组的登录号为 JBBBEN 00000000。

实验采用的病原菌为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* [ATCC25939]), 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis* [ATCC29212], *E. faecalis*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* [ATCC27853], *P. aeruginosa*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* [ATCC25922], *E. coli*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumonia* [ATCC10031], *K. pneumonia*)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii* [ATCC19606], *A. baumannii*)、沙门氏菌 (*Salmonella enterica* [NCTC8297], *S. enterica*)、志贺氏菌 (*Shigella Castellani* [NCTC 4837], *S. Castellani*)、解淀粉欧文氏菌 (*Erwinia amylovora* [CCPPB 0273], *E. amylovora*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans* [NCYC 4144], *C. albicans*) 保藏于塔里木大学塔里木盆地生物资源保护利用省部共建国家重点实验室。

1.2 主要仪器与设备

100 L BR20049-9 发酵罐, 上海保兴生物设备工程有限公司; LPG10 高速离心喷雾干燥机, 常州市大迈干燥设备有限公司; Hei-VAP Advant 旋转蒸发仪, 德国海道尔夫; ZF-A 紫外透射反射分析仪, 上海骥辉分

析仪器有限公司; GF 254 硅胶板, 青岛海洋化工厂; Ascend™ 500 M 核磁共振仪, 德国布鲁克 (Bruker) 公司; GZX-9240 MBE 鼓风干燥箱, 上海博迅实业有限公司; EPOCH 酶标仪, 上海博腾仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组分析

接种 TRM74023 菌种于 TSB 液体培养基 (购自北京奥博星生物技术有限责任公司) 中, 置于 30 °C 培养 6 d 后, 8 000 r·min⁻¹ 离心收集菌体, 委托南京派森诺基因科技有限公司基于 Illumina Hiseq 2000 测序平台对 TRM74023 全基因组进行测序、拼接、组装和注释分析。

通过 Ezbiocloud 分析筛选出与 TRM74023 菌株相似度最高的 19 株菌株, 在 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载全基因组参考序列, 采用 Pepperan 算法对所有菌株进行泛基因组分析, ITOL 可视化, 利用 imgeGP 在线软件构建泛基因组曲线图进行泛基因组分析^[17]。

利用 OrthoFinder v2.2.1 对所有菌株同源蛋白家族的鉴定。基于菌株 TRM74023 核心基因组、菌株同源蛋白、泛基因组的构建系统发育树, 并计算 ANI 和 DDH 进行分析。

采用 antiSMASH 预测 TRM74023 及其相似菌株的生物合成基因簇, 对这些预测的基因簇进行统计和比较基因组分析。

基于抗生素耐药基因可以提供对菌株代谢能力的评估。将 TRM74023 利用综合抗菌研究数据库 (Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD; <https://card.mcmaster.ca/>) 预测其耐药基因并评估其耐药潜力^[18]。

1.3.2 代谢产物的发酵、纯化分离及其鉴定

菌株 TRM74023 接种于 ISP4 液体培养基作为种子液配置 3 L 进行培养, 置于 180 r·min⁻¹、30 °C 恒温培养箱 3 d。将所需的 70 L 小米培养基原料加入 100 L 发酵罐中, 加水定容至 70 L, 同时配 3 mol·L⁻¹ NaOH 溶液以及 HCl 溶液调剂 pH 值, 将发酵罐进行 121 °C 高温灭菌 30 min, 灭菌后待温度冷却至 30 °C, 将种子液接种培养 7 d, 控制 pH 值为 7.0, 温度为 30 °C, 转速为 180 r·min⁻¹。在此期间每 2 d 采集一次发酵液进行显微镜观察。将 70 L 发酵产物经喷雾干燥器干燥获得淡黄色干粉状固体共 853.02 g。

将干粉通过 85% (φ) 甲醇溶解超声萃取, 使用旋转蒸发仪减压浓缩成浸膏后, 与 1 倍质量的 100~200 硅胶搅拌作为上样, 将 5 倍质量的 100~200 目的硅胶

装柱 (110 mm×1 100 mm)。薄层色谱 (TLC) 点板确定配比体系为二氯甲烷: 乙酸乙酯=2:1 和二氯甲烷: 甲醇=10:1, 比例按照极性从小到大依次洗脱进行 2 V (V 为柱体积, 3 L) 洗脱, 最后使用甲醇卸柱。获得粗提组分 Fr.1 (502 mg) 和 Fr.2 (469 mg), 并进行活性追踪。将活性粗提组分 Fr.2 再使用填充 Sephadex LH-20 凝胶柱层析进行进一步纯化, 从而洗脱得到两个单体化合物。

将两种化合物溶解于 CDCl₃ 中, 质量浓度为 15 mg·mL⁻¹。单体化合物借助 ¹³C NMR 和 ¹H NMR 进行结构鉴定, 结合微谱数据库 (<http://www.nmrdata.com/>) 和查询相关文献的数据进行比较, 确定化合物结构。

1.3.3 确定单体化合物的活性

采用滤纸法对所分得单体化合物进行活性测试分析, 以评估其对 *S. aureus* 拮抗的能力。单体化合物用 2 mL 甲醇溶解, 确定终质量浓度为 1 mg·mL⁻¹, 用无菌滤纸片蘸取单体化合物溶液, 以甲醇作为空白对照, 放置于 30 °C 的恒温培养箱培养 48 h 后记录抑菌圈大小, 进行活性分析。此外, 测定单体化合物对 1.1 中常见的病原菌测定抑菌活性谱。

利用 96 孔板进行 10 倍稀释法测定 MIC 和 MBC, 将 *S. aureus* 接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、150 r·min⁻¹ 振荡培养至合适浓度后稀释备用。实验组每孔加入 180 μL 菌液, 第一孔中加入 1 mg·mL⁻¹, 依次吸取 20 μL 利用移液枪吹打混匀, 实验重复 3 组, 设置阳性对照孔 (只加菌液, 不加 Actinolactomycin 溶液) 和阴性对照孔 (只加培养基, 不加菌液和 Actinolactomycin 溶液; 另一组, 加入纯甲醇 (不含 Actinolactomycin) 的代替实验组中空白对照)。培养 12 h, 利用酶标仪工作站 GEN5CHS 3.11 测定 600 nm 的 OD 值, 确定 MIC。吸取该浓度及其周边未改变 OD 值的混合液 20 uL, 分别均匀涂布于平板上, 37 °C 恒温培养 24 h 后观察培养基表面, 以无明显菌落生长的浓度为 MBC。

1.3.4 数据分析

所有试验数据采用 Excel 和 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 试验重复进行 3 次, 数据用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果与讨论

2.1 基于基因组分析的 TRM 74023 代谢潜能评估

2.1.1 TRM74023 及其相似菌株基因组比较分析

为了充分挖掘 TRM74023 的代谢潜能, 本研究采用 illumina 平台对其菌株进行全基因组测序, 经 spade 拼接, prokka 进行注释, 结果表明链霉菌 TRM74023

的基因组全长 6 885 644 bp，G+C 含量为 72.24%。

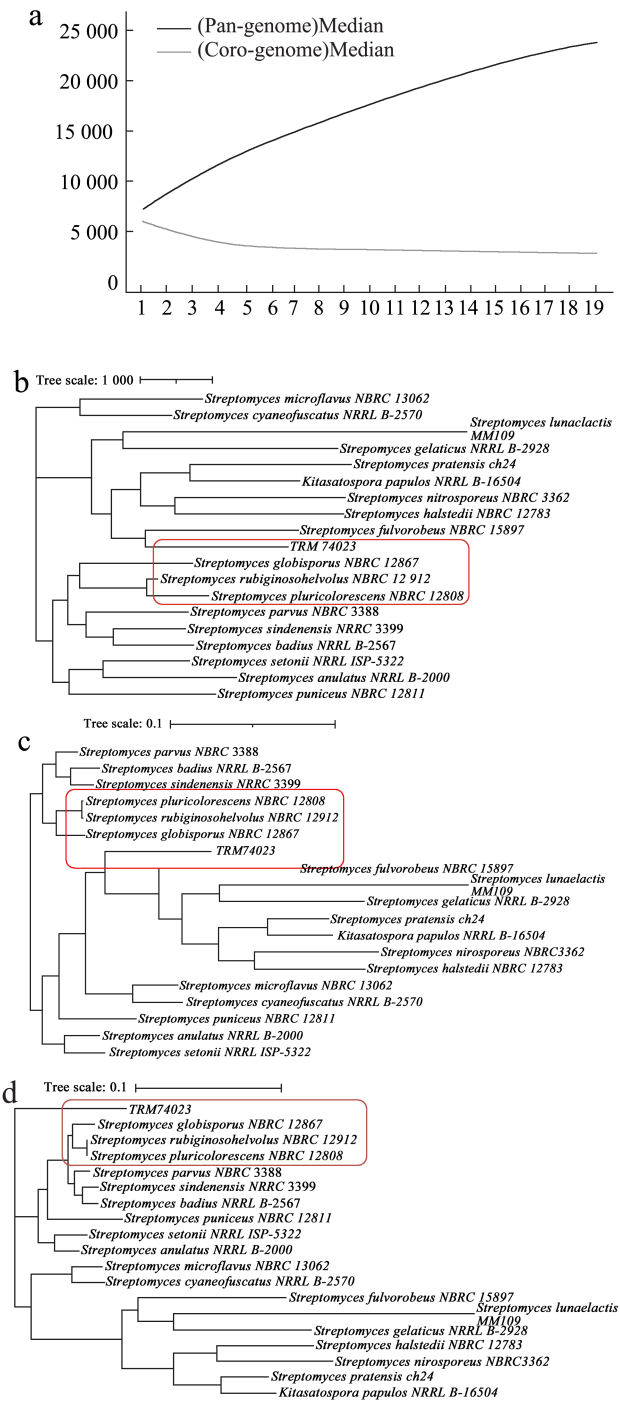


图 1 菌株 TRM74023 基于基因组分析泛基因组特征拟合曲线和系统发育树

Fig.1 Building tree based on core genome, strains homologous protein, pangenome of strain *Streptomyces* TRM74023

注：图 1 基于基因组分析泛基因组特征拟合曲线和系统发育树了解相似菌株基因组的稳定性和进化关系；a 为基于 TRM74023 和相似菌株的泛基因组和核心基因的泛基因组特征拟合曲线，b 为基于单拷贝基因对 TRM74023 进行核心基因组构建系统发育树；c 为基于直系同源基因分析构建系统发育树；d 为利用 Peppan 进行泛基因组扫描构建系统发育树。

TRM74023 与这些相似菌株基因组的变化趋势逐渐稳定，链霉菌的泛基因组整体呈现闭合形 ($\alpha=0.557$, $\gamma=0.316$)，核心基因的数量接近恒定值。本实验数值的敏感性和特异性 $\geq 95\%$ 的基因，存在于 $\leq 25\%$ 的对照组中，核心基因 2 617 个占总数的 11.0%，壳基因 (shell genes) 6 840 个，占比为 28.6%，云基因 (cloud genes) 14 441 个，占比为 60.4% (如图 1a)。链霉菌基因组与泛基因组基因家族成正相关，而核心基因组中的基因家族随着测试链霉菌的数量增加而减少，逐渐趋于稳定。

为研究菌株 TRM74023 与相似菌株之间进化关系，基于核心基因组、同源蛋白及泛基因组建树分析菌株间亲缘关系和同源性。利用 CJ Bioscience 的在线平均核苷酸鉴定工具分析基因组 ANI 值为：菌株 TRM74023 和 *Streptomyces globisporus* NBRC 12 867 为 86.98%，和 *Streptomyces pluricologrescens* NBRC 12 808 为 87.04%，及 *Streptomyces rubiginosohelvolus* NBRC 12 912 为 87.04%。利用 GGDC 3.0 在线工具分析 DDH 值为：菌株 TRM74023 和 *Streptomyces globisporus* NBRC 12 867 为 43.40%，和 *Streptomyces pluricologrescens* NBRC 12 808 为 39.90%，及 *Streptomyces rubiginosohelvolus* NBRC 12 912 为 42.70%；基于系统进化树发现 TRM74023 与其最相似的三株菌株 *Streptomyces globisporus* NBRC 12 867，*Streptomyces pluricologrescens* NBRC 12 808，*Streptomyces rubiginosohelvolus* NBRC 12 912 呈现明显分支。基于 ANI 的值域、DDH 的值域和系统进化树分析共同说明 TRM74023 可能作为一个新种 (如图 1b、1c、1d)。

2.1.2 TRM74023及其相似菌株代谢潜力进行评估

2.1.2.1 基于比较基因组与相似菌株的代谢分析

菌株 TRM74023 及相似菌株进行 antiSMASH 分析，结果表明菌株 TRM74023 具有 29 个基因簇，相较于其他相似菌株而言，代谢潜力较为丰富。通过比较基因组学分析 (如图 2 所示)，所有菌株具有 Terpene 和 NRPS-independent-siderophore (非核糖体肽合成酶-独立铁载体合成酶) 的基因簇，分别占基因簇总数的 17% 和 7%。其次，大部分菌株携带 NRPS、羊毛硫肽 III 类 (Lanthipeptide-class-iii)、NRPS-like、TIPKS 和 T3PKS 等类型，以上类型占总基因的 65%，菌株 TRM74023 共携带 5 个 Terpene、3 个 NRPS、1 个 RiPP-like 有和 4 个 NRPS-like、2 个 TIPKS 和 2 个 T3PKS，这些基因簇可合成相关的聚酮类抗生素、萜类化合物、非核糖体肽类抗生素等，表明具有合成多种次级代谢产物的能力。同时，19 株菌株均含有促进植物生长的促生酶因子。

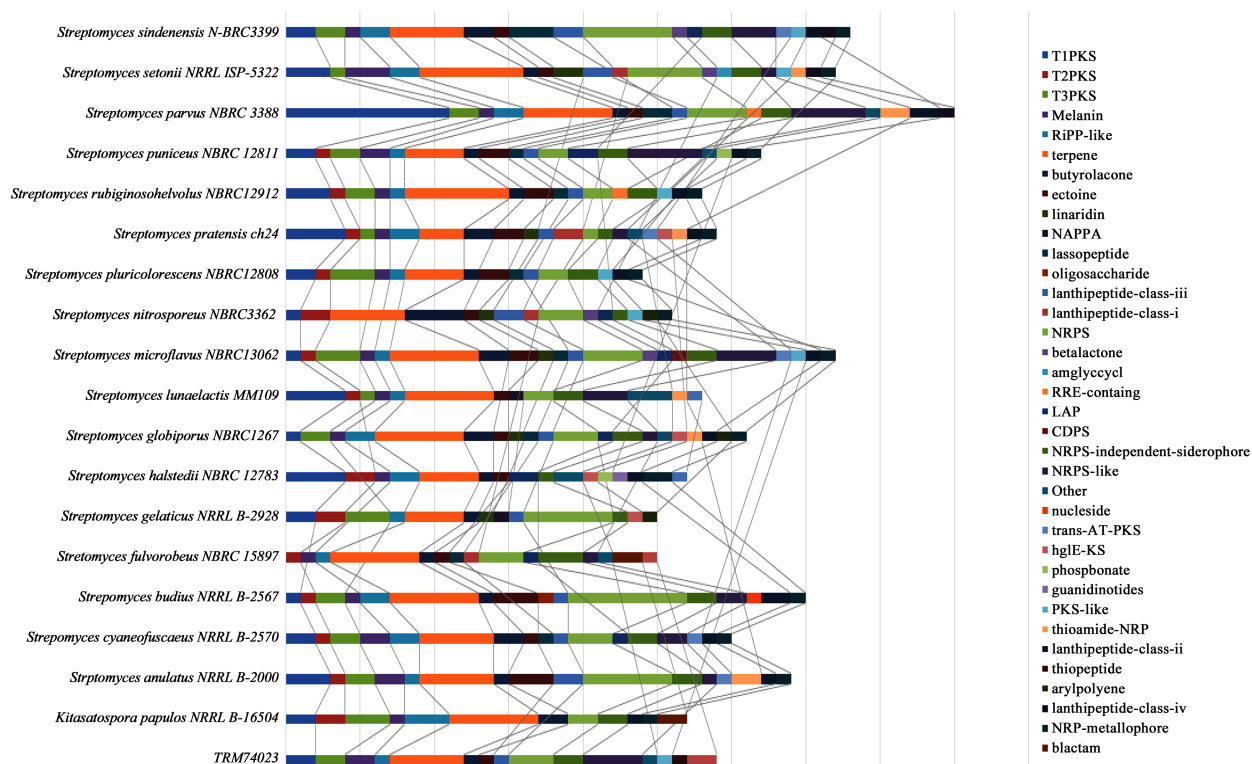


图 2 基于 TRM 74023 及其相似菌株的抗生素生物合成基因簇分析

Fig.2 Analysis of antibiotic biosynthesis gene clusters based on TRM 74023 and its similar strains

结合泛基因组特征拟合曲线和比较基因组分析,推测链霉菌 TRM74023 与其相似菌株核心基因组稳定,其代谢功能必然具有一致性,代谢产物可能具有多条共同代谢途径。

2.1.2.2 菌株 TRM 74023 代谢潜力分析

为进一步探究菌株 TRM74023 代谢潜力,通过对菌株的天然产物基因簇相似度进行统计分析,结果表明菌株 TRM74023 携带多种丰富的天然抗菌物质合成基因且相似度大部分都不高,可能具有合成潜在新化合物的潜力。其中,7 个基因簇与能合成代谢产物的基因簇相似度低于 15%,分别为潮霉素(Hygromycin)、雷那霉素(Leinamycin)、非那霉素(Feinamycin)、丝裂霉素(Mitomycin)、福克新菌素 A-D (Fosmicins A-D)、费西洛霉素(Ficellomycin)、森杜拉西丁(Senduracidin)和乌伦霉素(Ulleungmycin);其余 5 个非 100% 相似度的合成基因簇有格利沙宗(Grixazone)、藿烯(Hopene)、丝裂霉素(Mitomycin)、链丝菌素(Stenothricin)、腔霉素 P1 (Coelimycin P1);8 个合成基因簇与已发现的产物的基因簇的相似度为 100%,分别为四氢嘧啶(Ectoine)、黑色素(Melanin)、异视黄醛(Isorenieratene)、叶绿素脱镁叶绿酸 a 加氧酶(SGR PTMs)、土臭素(Geosmin)、柚皮素(Naringenin)、兰肽前体(AmfS)、去铁胺(Bdesferrioxamin B)。

预测结果中,被注释为 NRPs-like 一类基因簇,

有一个与氨基酚类抗生素 Chloramphenicol 合成基因簇相似度为 11%,可能会产生新化合物;另一个与氨基糖苷类的 Hygromycin 合成基因簇相似度为 9%,其通过抑制蛋白质合成来杀死病菌^[19]。菌株 TRM 74023 还预测出 Leinamycin 的相似度仅仅为 2%,而 Leinamycin 是一个复杂的大环内酯化合物,含有一个核心的大环结构,该结构上连接了多个不同的取代基,具有广谱抗菌活性^[20],还预测到两个 Mitomycin 相似度分别为 4% 和 25%,其具有广谱的抗肿瘤活性。另一个值得注意的是, NRPS 类的 Ulleungmycin,相似度只有 9%,具有抗甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)活性^[21]。其次, T3PKS 预测编码一个 III 聚酮合酶,这种酶在生物合成中负责组装复杂的聚酮化合物,与 Naringenin 生物合成相关,相似度为 100%,对细菌有抑菌活性。环境中 Fe 含量低的情况下,进行铁离子的捕获来促进植物生长,同时起到抑菌作用, Siderophore 预测编码铁载体 Ficellomycin (5%) 与去铁胺 Desferrioxamin B (100%)。

综合 antiSMASH 分析结果,菌株 TRM74023 具有丰富的代谢潜力,可编码如 Chloramphenicol、Leinamycin、Mitomycin、Naringenin 和 Ulleungmycin 等基因簇的代谢产物对靶标菌 *S. aureus* 有活性,说明该菌株可以作为防治 *S. aureus* 的候选菌株,值得去深入挖掘其次级代谢产物。

表 1 基于综合抗生素耐药性数据库的菌株TRM74023耐药性扫描

Table 1 Resistance scanning of strain TRM74023 based on comprehensive antibiotic resistance database						
RGI 标准	抗生素抗性	检测标准	抗性基因家族	药物类别	耐药机制	一致性/%
Strict	HelR	protein homolog model	helicase-like RNA polymerase protection protein	rifamycin antibiotic	antibiotic target protection	74.48
Strict	Nocardia farcinica rox	protein homolog model	rifampin monooxygenase	rifamycin antibiotic	antibiotic inactivation	71.94
Strict	qacJ	protein homolog model	small multidrug resistance (SMR) antibiotic efflux pump	disinfecting agents and antiseptics	antibiotic efflux	38.83

2.1.2.3 菌株TRM74023耐药基因分析

基于耐药基因数据库 CARD 对菌株 TRM74023 进行耐药性分析，结果表明菌株包含解旋酶样 RNA 聚合酶保护蛋白，小型多药耐药（SMR）抗生素外排泵，利福平单加氧酶基因家族如表 1。在比对的 HelR 蛋白质同源模型中，解旋酶样 RNA 聚合酶保护蛋白的耐药机制是抗生素靶点保护；比对的诺卡氏菌 rox 蛋白质同源模型中，利福平单加氧酶使抗生素失活；比对 qacJ 蛋白质同源模型中，小型多重耐药性（SMR）抗生素外排泵能将 β -内酰胺类、氨基糖苷类、二氢叶酸抑制剂等抗生素外排^[22]。根据刘玉文等^[23]的报道，抗生素产生菌所编码的抗生素耐药基因用于保护其自身产生的生物活性分子可能带来的潜在损伤，这说明该菌株有可能产生上述类型抗性的抗生素。

菌株的拮抗和代谢能力是协同的，生物抗性基因和生物合成基因是抗生素形成的重要组成部分，研究耐药基因可探索新的抗生素类型或提高抗生素产量。例如，中国矿业大学的研究人员证明，轮状链霉菌中抗性基因的协同作用增加了土霉素的产生^[24]，这一发现不仅为土霉素等抗生素的工业化生产提供了新的策略，也暗示了耐药基因在提升抗生素产量方面的巨大潜力，而链霉菌 TRM74023 预测有利福平的抗性基因，未来可基于抗性基因的协同作用，有望发现和提高目标抗生素的产量。

2.2 基于现代分离纯化技术对TRM74023代谢产物鉴定

通过菌株 TRM74023 对 *S. aureus* 拮抗活性追踪并分离目标活性化合物，本研究采用大批量发酵代谢产物，使用硅胶柱和凝胶柱层析的分离，成功分离纯化得到两个单体化合物 TRM74023-1、TRM74023-2，其中菌株 TRM74023 粗提物的硅胶展层条件主要如图 3，通过 NMR 分析数据，结果如下：

TRM74023-1：白色粉末，旋转蒸发干燥后得

到 10.01 mg，根据 4a、4b 图，化合物结构鉴定为 ¹H NMR(500 MHz,DMSO)，2.52 (1H,m,H-2)，4.02 (1H, q, H-4)，1.64~1.92 (2H, m, H-5)，1.51~1.99 (2H, m, H-6)，3.87 (1H, H-7)，1.76~1.77 (2H, H-8)，4.96 (1H, H-9)，1.10 (1H, d, 3-CH₃)，1.24 (1H, d, 9-CH₃)。 ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)。174.21 (C-2)，45.23 (d, C-3)，80.05 (d, C-4)，28.13 (t, C-5)，31.39 (t, C-6)，76.74 (d, C-7)，42.30 (t, C-8)，69.06 (d, C-9)，12.82 (q, 3-CH₃)，20.49 (q, 9-CH₃)。通过文献查阅发现，该化合物与报道的文献吻合^[25]，鉴定出的放线菌素（Actinolactomycin）如图 4c 所示，在某些类型的癌症治疗中，该化合物能够抑制 DNA 的复制和 RNA 的合成。

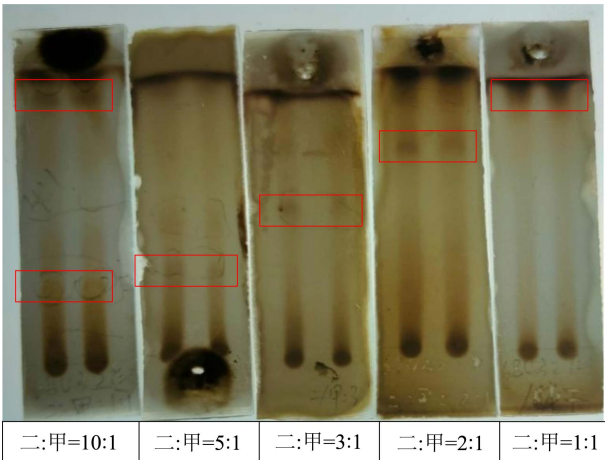


图 3 菌株 TRM74023 粗提物的薄层色谱硅胶层析条件
Fig.3 Thin-layer chromatography (TLC) and silica gel chromatography conditions for the crude extract of strain TRM74023

TRM 74023-2：白色结晶粉末，旋转蒸发干燥后得到 8.20 mg，不溶于水，分子式为 C₇H₇NO₂，根据图 4d、4e，化合物结构鉴定为 ¹H NMR(500 MHz,CD₃Cl₃)：d 11.09(1H,s,1-COOH,2-OH)，7~7.38(1H,t,4-H)；6.89(1H、d、5-H)；6.79 (1H, d, J=7.32Hz, 6H)，2.65(3H, s, 3CH₃)。 ¹³C NMR(125 MHz, CD₃Cl₃)，d175.86 (COOH)，163.39 (C-2)，

142.39 (C-6), 135.04 (C-4), 122.81 (C-5), 115.46 (C-3), 110.45 (C-1), 23.70 (CH₃)。查阅文献^[26]发现, 该化合物与文献报道基本一致。该化合物已被鉴定为 6-甲基烟酸 (6-Methylnicotinic-acid), 其结构如图 4f 所示。6-甲基烟酸作为合成除草剂 2-羟基烟酸的中间体, 也是非甾体抗炎药 (NSAIDs) 依托昔布 (Etoricoxib) 的前体物质, 作为合成药物的原料。

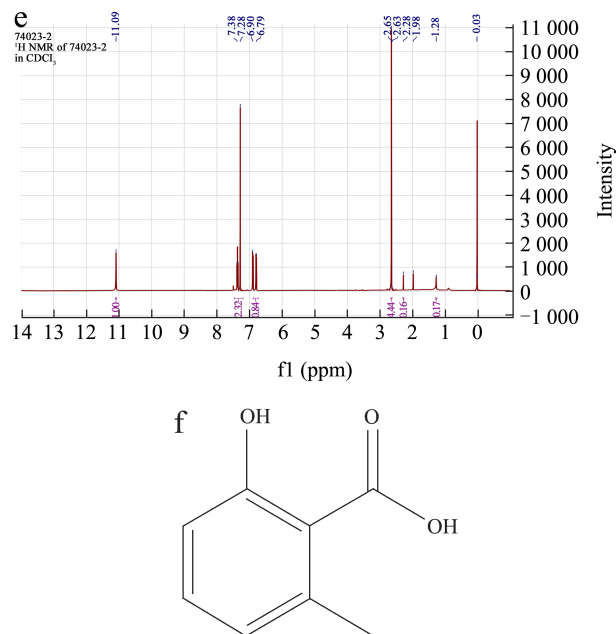
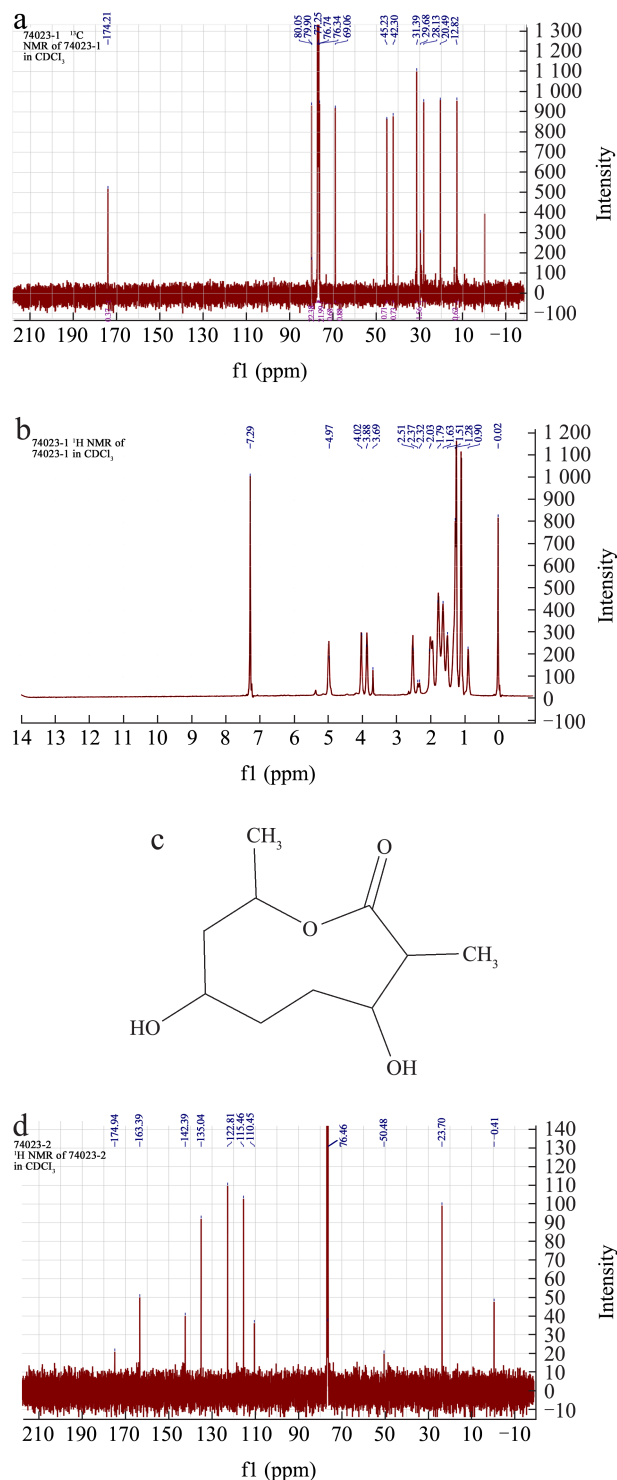


图 4 基于核磁共振菌株 TRM74023 单体化合物结构的鉴定

Fig.4 Identification of the monomeric compound structure of the strain TRM74023 based on nuclear magnetic resonance

注: a: TRM74023-1 的 ¹³C NMR 谱图; b: TRM74023-1 的 ¹H NMR 谱图; c: TRM74023-1 的结构鉴定; d: TRM74023-2 的 ¹³C NMR 谱图; e: TRM74023-2 的 ¹H NMR 谱图; f: TRM74023-2 的结构鉴定。

2.3 基于拮抗作用对 TRM74023 代谢产物活性评价

以 *S. aureus* 为靶标, 对 TRM74023 进行拮抗活性评价。研究表明, 无菌滤纸片加入质量浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的 Actinolactomycin 可产生 $d=21.40 \pm 1.20$ mm 的抑菌圈, 其拮抗 *S. aureus* 具有较好的拮抗活性, 结果如图 5 所示。采用同样的方法, 而 6-Methylnicotinic-acid 在进行活性实验中未表现出对 *S. aureus* 有拮抗活性。

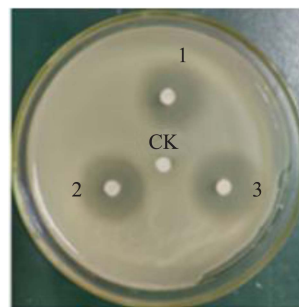


图 5 放线菌素对金黄色葡萄球菌的拮抗活性

Fig.5 Antagonistic activity of compound actinolactomycin against *S. aureus*

注: CK 为滤纸片蘸取甲醇的空白对照; 1、2 和 3 为滤纸片蘸取 1 mg·mL⁻¹ Actinolactomycin 甲醇溶液的实验组。

表 2 基于两种方法对Actinolactomycin抗菌谱的测定
Table 2 Determination of the antibacterial spectrum of
actinolactomycin based on two methods

病原菌名称	滤纸片法/mm	打孔法/mm
<i>E. faecalis</i>	23.90 ± 0.25	26.68 ± 0.68
<i>P. aeruginosa</i>	15.65 ± 0.85	16.65 ± 1.00
<i>E. coli</i>	—	—
<i>K. pneumonia</i>	—	—
<i>A. baumannii</i>	13.88 ± 0.73	19.65 ± 0.86
<i>S. enterica</i>	6.89 ± 0.55	—
<i>S. Castellani</i>	—	—
<i>E. amylovora</i>	15.43 ± 0.65	19.48 ± 0.24
<i>C. albicans</i>	—	—

注：图中对有拮抗活性的病原菌的直径统计数据用平均直径 ± 标准差表示，无抑菌活性用“—”表示。

利用两种方法对病原菌进行抗菌谱的测定，结果如表 2，TRM74023 对 *E. faecalis*、*A. baumannii*、*E. amylovora* 和 *P. aeruginosa* 具有显著抑菌活性。通过 96 孔板法测定 MIC 为 $1\times10^{-3}\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，将混合液进行涂布确定几乎不长菌落的质量浓度 MBC 为 $1\times10^{-2}\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

链霉菌 TRM74023 被确认为新种，其基因组含有 29 个天然产物合成基因簇和 3 个抗性基因，该菌种的代谢产物可能具有独特的化学结构和生物活性，为新型药物开发提供资源。本研究让人遗憾的是未挖掘到对 *S. aureus* 有活性的潮霉素、雷那霉素、丝裂霉素和乌伦霉素等及其同构型的化合物，有可能是所预测的基因簇相似度太低导致活性转移或者未表达，在活性追踪的过程中被忽略。后续的研究中，针对不同的活性靶标菌进行实验进行活性化合物分离，可采用激活沉默基因簇的方式使得其他潜在活性化合物表达，结合基因组学、转录组学、蛋白质组学等先进技术，将不表达基因进行表达可获得多种预测的 NRPS-like、PKS-like、T3PK3, Terpene、Siderophore 类型的代谢产物，以此可以挖掘更多新颖化合物。

在当前的研究报道中，相比于其他链霉菌，菌株 TRM74023 提取的代谢产物有在抗菌活性方面具有高效的特点，分离的 Actinolactomycin 因其显著的抗肿瘤特性而备受关注^[27]，而在本研究中发现 Actinolactomycin 对 *S. aureus*、*E. faecalis*、*A. baumannii* 和 *E. amylovora* 表现出较强的拮抗作用。这意味着 Actinolactomycin 不仅在抗癌方面具有潜力，还可能成为一种新的抗菌药物，用于多种食源性致病菌引起的感染疾病。从目前的研究来看，尚未有明确证据表明 *S. aureus* 会对 Actinolactomycin 产生耐药性。然而，

有报道称^[25,28]，Actinolactomycin 通过抑制 mTOR 信号通路的活性，来阻碍 HIF-1 α 蛋白的翻译过程。但从作用机制相关角度推测，存在产生耐药性的可能性。细胞也可能通过改变自身的代谢方式，减少对 HIF-1 α 的依赖，以此逃避 Actinolactomycin 的作用。未来需实验观察的耐药情况，探究耐药机制，对比与作用于相同靶点或通路的药物的耐药性差异，为临床应用提供依据。菌株 TRM74023 同样适用于工业发酵，经过发酵优化，可以实现大规模培养，并有效分离出 6-Methylnicotinic-acid。

3 结论

本实验以塔克拉玛干沙漠怪柳根际土壤中分离出链霉菌 TRM74023 为研究对象，因其具有拮抗食源性感染致病菌 *S. aureus* 的活性，对其进行代谢潜力分析和活性组分挖掘。基于基因组分析，结果表明链霉菌 TRM74023 基因组大小为 6,885,644 bp，G+C 含量为 72.24%，其泛基因组呈现闭合形态，核心基因数量稳定，基于 ANI 的值域、DDH 的值域和系统进化树分析共同说明 TRM74023 作为一个新种。通过 antiSMASH 预测分析，TRM74023 拥有了 29 个潜在的天然产物生物合成基因簇的存在，能够合成多种次级代谢产物，包括聚酮类抗生素、萜类化合物和非核糖体肽类抗生素，Chloramphenicol、Hygromycin 和 Leinamycin 等部分基因簇与已知抗生素基因簇相似度低，表明可能具有合成新化合物的潜力。菌株 TRM74023 基于 *S. aureus* 活性分析，成功分离出两个单体化合物 Actinolactomycin 和 6-Methylnicotinic-acid，其中 Actinolactomycin 对 *S. aureus*、*E. faecalis*、*A. baumannii* 等有显著的抑菌效果有显著的抑菌效果。综上所述，该研究表明 TRM 74023 可作为防治 *S. aureus* 等食源性病原菌的候选菌株，具有丰富的代谢潜力，从其中分离出的 6-Actinolactomycin 丰富了拮抗食源性病原菌活性产物库，并为应对日益严重的耐药性问题提供新的解决方案。

参考文献

[1] 陈培超,程芳洲,黄强,等.2021-2023年上海市嘉定区市售食品中金黄色葡萄球菌污染情况[J].上海预防医学,2024,36(7):644-649.

[2] 慕礼霞,贺治芬.冷冻猪肉食品中金黄色葡萄球菌的定性检测方法[J].食品安全导刊,2024,9:114-117.

[3] RENGGLI L, GASSER M, BUETTI N, et al. Increase in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in Switzerland: a nationwide surveillance study (2008–2021) [J]. Infection, 2023, 51(4): 1025-1031.

- [4] 康明丽,白宝清,卢涵,等.食品化学与实验[M].北京:北京师范大学出版社,2021.
- [5] RATHER M A, GUPTA K, BARDHAN P, et al. Microbial biofilm: a matter of grave concern for human health and food industry [J]. Journal of Basic Microbiology, 2021, 61(5): 380-395.
- [6] ANAND U, VAISHNAV A, SHARMA S K, et al. Current advances and research prospects for agricultural and industrial uses of microbial strains available in world collections [J]. Science of the Total Environment, 2022, 842(10): 156641.
- [7] SIVALINGAM P, HONG K, POTE J, et al. Extreme environment *Streptomyces*: potential sources for new antibacterial and anticancer drug leads? [J]. International Journal of Microbiology, 2019, 1: 5283948.
- [8] 钱璟,吴哲元,郭晓奎,等.耐药微生物和抗生素耐药基因与全健康[J].微生物学通报,2022,49(10):4412-4424.
- [9] 夏焕章,翟航.放线菌次级代谢产物研究进展[J].微生物学杂志, 2023,43(4):1-9.
- [10] 潘明慧,杨雪,杜国忠,等.合成生物学助力链霉菌天然产物农药创制与产业化[J].植物保护,2023,49(5):371-389.
- [11] NAIF A A D, GALAL A E, VEERAMUTHU D, et al. Chemical profiling of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-2 recovered from an extreme environment in Saudi Arabia as a novel drug source for medical and industrial applications [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(4): 758-766.
- [12] RUDI E D P, INGRID R, MAYRA K M, et al. Antibiotics produced by *Streptomyces* [J]. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2012, 16: 466-471.
- [13] 李鑫.基于大片段克隆技术的罗中链霉菌TRM49605次生代谢产物基因簇挖掘[D].阿拉尔:塔里木大学,2020.
- [14] SUSANA P G, ENGIN B, LADA L B, et al. Advanced methods for natural products discovery: bioactivity screening, dereplication, metabolomics profiling, genomic sequencing, databases and informatic tools, and structure elucidation [J]. Marine Drugs, 2023, 21(5): 308.
- [15] 刘晶莹,白岩,潘华奇,等.卡伍尔氏链霉菌NA4的II型聚酮基因簇的靶向激活及其产物鉴定.微生物学报[J],2023,63(10):3891-3904.
- [16] 亢文佳,吴晟,华会明,等.基于基因组挖掘的一个新的吡嗪酮类天然产物的发现[J].有机化学,2016,36(7):1696-1699.
- [17] 惠文彦,张和平.基因组分析方法在微生物分类学中的应用[J].微生物学通报,2016,43(5):1136-1142.
- [18] 宋永相,张秀凤,李艳芹,等.自抗性基因导向的活性天然产物挖掘[J].合成生物学,2024,5(3):474-491.
- [19] BOROVINSKAYA M A, SHOJI S, FREDRICK K, et al. Structural basis for Hygromycin B inhibition of protein biosynthesis [J]. RNA, 2008, 14(8): 1590-1599.
- [20] PAN G H, XU Z R, GUO Z K, et al. Discovery of the leinamycin family of natural products by mining actinobacterial genomes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017, 114(52): E11131-E11140.
- [21] SANGKEUN S, YOUNG S H, MINA J, et al. Genomics-driven discovery of chlorinated cyclic hexapeptides ulleungmycins A and B from a *Streptomyces* species [J]. Journal of Natural Products, 2017, 80(11): 3025-3031.
- [22] GAURAV A, BAKHT P, SAINI M, et al. Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors [J]. Microbiology, 2023, 169(5): 001333.
- [23] 刘玉文,蒋长斌.抗生素产生菌中抗生素耐药基因表达的研究进展[J].标记免疫分析与临床,2015,22(3):247-249.
- [24] YIN S L, WANG X F, SHI M X, et al. Improvement of oxytetracycline production mediated via cooperation of resistance genes in *Streptomyces rimosus* [J]. Science China Life Sciences, 2017, 60: 992-999.
- [25] CHENG J, HU L, YANG Z, et al. 2-Oxonanonoid antibiotic actinolactomycin inhibits cancer progression by suppressing HIF-1 α [J]. Cells, 2019, 8(5): 439.
- [26] NANTKA N P, PIECHACZEK J. Nicotinic acid derivatives. VI. Some transformations of 2-chloro-6-methylnicotinic acid [J]. Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy, 1974, 26(5): 545-548.
- [27] LIU J R, LIU J M, GAO Y, et al. Discovery of novel pimprinine and streptochlorin derivatives as potential antifungal agents [J]. Marine Drugs, 2022, 20(12): 740.
- [28] JOSEPH S Z T, TANIA T B, GAO H, et al. Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products [J]. Natural Product Reports, 2016, 33(1): 54-72.