

网络出版时间:2014-07-09 11:51

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2014.08.022

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwfufu.2014.08.022.html

1 株抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌放线菌的 鉴定及其代谢产物活性分析

杨 静,易麟乙,刘 美,王刘庆,廖美德

(华南农业大学 天然农药与化学生物学教育部重点实验室,广东 广州 510642)

【摘 要】 【目的】对从原始森林土壤中分离得到的 1 株抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的放线菌 AF1 进行分类鉴定,并对其代谢产物活性进行分析。【方法】通过菌株形态学特征、生理生化特征观察和 16S rDNA 序列分析,对 AF1 菌株进行分类鉴定;采用琼脂平板打孔法,测定 AF1 菌株发酵产物的稳定性及 AF1 菌株发酵产物乙酸乙酯粗提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌活性。【结果】电子显微镜观察显示,AF1 菌株分生孢子直或呈波浪弯曲状,孢子链呈松散螺旋状,AF1 菌株能利用葡萄糖、D-半乳糖、麦芽糖、鼠李糖和蔗糖,不能利用 D-果糖、D-甘露醇和肌醇,可以水解淀粉但不能水解纤维素。AF1 菌株 16S rDNA 序列全长 1 242 bp(GenBank ID:KF059834.1),与加利利链霉菌 XSD-102(*Streptomyces galilee* XSD-102)的相似度为 100%,初步确定菌株 AF1 为加利利链霉菌(*S. galilee*);AF1 发酵产物对外界环境不敏感,在 30~80 °C 下活性稳定,90 °C 处理 60 min 时活性丧失,在 pH 2~10 下活性稳定,耐受紫外线照射;其乙酸乙酯提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的最低抑菌质量浓度(MIC)为 68 µg/mL。【结论】AF1 菌株为加利利链霉菌(*S. galilee*),其代谢产物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌具有抗菌活性。

【关键词】 加利利链霉菌;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;分类鉴定;抑菌活性

【中图分类号】 Q93-331;S476.8

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)08-0008-07

Identification of an Actinomycetes strain with resistance to MRSA and activity of its metabolites

YANG Jing, YI Lin-yi, LIU Mei, WANG Liu-qing, LIAO Mei-de

(Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education,
South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: 【Objective】 The purpose of this work was to identify and characterize the *Streptomyces* strain AF1, which was selected from Madagascar forest soil with resistance to MRSA. 【Method】 The strain AF1 was characterized by observation of morphology, physiological and biochemical characterizations and 16S rDNA sequence analysis. Using agar diffusion plate method, the stability of fermentation products of AF1 and the resistance to MRSA were measured. 【Result】 The conidium of AF1 strain was straight or wavy curved, and the spore chain was loose spiral. AF1 strain could use glucose, galactose, sucrose, maltose and rhamnose but not fructose, mannitol and inositol. AF1 strain could hydrolyze starch but not cellulose. The 16S rDNA of AF1 was 1 242 bp (GenBank ID:KF059834.1), having the homology of 100% with potato scab pathogen XSD-102. The antimicrobial substance was not sensitive to the external environment. It had stability when pH was 2—10, temperature was 30—80 °C, or under ultraviolet radiation. The activity

【收稿日期】 2013-12-23

【基金项目】 广东省海洋渔业局项目(A201001D02)

【作者简介】 杨 静(1988—),女,河南潢川人,硕士,主要从事微生物代谢产物研究。E-mail: yangjingchen@stu. scau. edu. cn

【通信作者】 廖美德(1965—),男,湖北黄梅人,副教授,博士,主要从事微生物与天然农药生物技术研究。

E-mail: liaomeide@scau. edu. cn

was lost when treated by 90 °C for 60 min. The MIC of ethyl acetate extract against MRSA was 68 μg/mL

【Conclusion】 AF1 strain was identified as *Streptomyces galilee* AF1 and its metabolites showed antimicrobial activity against MRSA.

Key words: *Streptomyces galilee*; MRSA; identification; antimicrobial activities

自 1961 年英国 Jevons 发现首例耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA)以来^[1],在欧美及亚洲相继出现有关 MRSA 所致的感染,到 20 世纪 80 年代,MRSA 感染几乎遍及全球,成为临床上最常见的病原菌之一。近年来,MRSA 感染疾病的流行病学发生了显著变化,由最初的医院获得性感染发展为社区获得性感染,自 Saravolatz 等^[2]首次报道社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*community-acquired MRSA*, CA-MRSA)感染后,CA-MRSA 感染病例在全球陆续被报道,MRSA 对人类健康的威胁日益严重。最近的研究结果表明,MRSA 一般具有多重耐药特征,临床已经分离到对万古霉素耐药的菌株(VRSA)^[3],从长期与患乳腺炎奶牛接触的工作人员体内分离得到了相同的 MRSA 菌株,表明 MRSA 可能在人与动物之间相互传播^[4]。MRSA 已经成为临床抗菌感染治疗的首要难题,并与乙型肝炎、艾滋病一起被称为当今世界三大感染顽疾^[5],因此,研发新型抗 MRSA 药物刻不容缓。

本项目组前期从原始森林土壤中分离、筛选得到 1 株放线菌菌株,本研究对其形态特征、生理生化特征、分类地位及其代谢产物的作用范围和抗菌活性物质的部分特性等进行了探讨,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株由广州医学院第一附属医院检验科赠送。

1.2 放线菌 AF1 菌株的分离与纯化

将从非洲原始森林收集的土壤样品系列稀释后,涂布在高氏 1 号培养基上。28 °C 培养 10 d 后挑取所有单菌落进行 2 次纯化,分离筛选到目标菌株,将其命名为 AF1 菌株。

1.3 培养基

所用的培养基有高氏 1 号培养基、LB 培养基、琼脂培养基(ISP1)、胰蛋白胨琼脂培养基(ISP2)、甘油 d 门冬素琼脂培养基(ISP3)、L-酪氨酸琼脂培养基(ISP4)、察氏培养基(ISP5)、伊莫松培养基(ISP6)

和瓦氏肉汁培养基(ISP7),7 种 ISP 培养基的配方参见文献[6-7]。

1.4 AF1 菌株的培养、发酵及其乙酸乙酯粗提物的制备

将 AF1 菌株接种到高氏 1 号固体培养基上,28 °C 培养 10 d,取分生孢子制备孢子悬液,接种到装有高氏 1 号液体培养基的锥形瓶(150 mL/500 mL)中,于 28 °C、160 r/min 摇瓶培养 7 d,然后 8 000 r/min 离心 20 min,取上清液用双层滤纸过滤得发酵液。滤液用乙酸乙酯萃取 3 次,收集萃取液,减压蒸馏浓缩可得到发酵液的乙酸乙酯粗提物。

1.5 AF1 菌株的鉴定

1.5.1 形态观察 在高氏 1 号培养基平板上铺单层透析袋膜,接种培养 AF1 孢子,培养 10 d 待分生孢子形成后,剪取透析袋膜粘台,经超临界干燥、喷镀后,用扫描电子显微镜观察菌丝和孢子形态^[6]。

1.5.2 培养特征 按参考文献[7-8]的方法,将 AF1 菌株孢子分别接种到 ISP1、ISP2、ISP3、ISP4、ISP5、ISP6 和 ISP7 培养基上,在 28 °C 恒温培养箱中培养 30 d,观察记录其培养特征,按 ISCC COLOR CHARTS 色谱记录菌落颜色^[9]。

1.5.3 生理生化特性 参照《链霉菌鉴定手册》^[10]中的方法,测定 AF1 菌株的明胶液化、牛奶凝固和胨化、硫化氢产生、纤维素及碳源利用等生理生化特征。

1.5.4 16S rRNA 序列分析及其系统发育分析 参照文献[11]的方法提取 AF1 菌株基因组 DNA。PCR 扩增采用通用引物 F: 5'-AGAGTTTGATC CTGGCTCAG-3', R: 5'-ACGGCTACCTTGTTAC GACT-3'。PCR 反应体系总体积 25 μL,其中包括 10×Buffer 2.5 μL, dNTP 0.2 μL, MgCl₂ 2.2 μL, Primer F 2 μL, Primer R 2 μL, Taq 酶 0.3 μL (3 U/μL), DNA 模板 1.0 μL, ddH₂O 14.8 μL。反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 33 个循环; 循环结束后, 72 °C 再后延 3 min。将 PCR 产物送上海生工生物工程技术服务公司测序, 测序结果用 BLAST 软件和 Mega5.0^[12]构建系统发育树。

1.6 AF1 菌株代谢产物的生物活性

1.6.1 发酵液的稳定性 (1)热稳定性。参照文献

[13],将待测发酵产物分别置于 30(室温),50,70,80,90,100 ℃ 条件下水浴,水浴时间设 30 和 60 min 2 个处理,待降至室温后,分别取处理后的发酵液 20 μL ,采用琼脂平板打孔法(孔径为 6 mm)^[14]测定其对 MRSA 的抑菌活性,重复 3 次。以室温下放置的发酵液作为对照。相对抑菌活性计算公式为:

相对抑菌活性=(处理组抑菌圈直径-6 mm)/(对照组抑菌圈直径-6 mm) $\times 100\%$ 。

(2)酸碱稳定性。用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 将发酵液 pH 值分别调节至 2.5,3.5,5.5,6.5,7.3,8.9,9.8 和 10.2;常温静置 30 min 后,用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 溶液调节发酵液 pH 至 7.3;取处理后的发酵液 20 μL ,采用琼脂平板打孔法测定其对 MRSA 的抑菌活性,重复 3 次。以发酵液作为对照,计算相对抑菌活性。

(3)对紫外线照射的稳定性。取 10 mL 发酵液 5 份,置于波长 254 nm、功率 30 W 的紫外灯下 20 cm 处^[15],照射时间为 20,30,40,50 和 60 min;分别取处理后的发酵液 20 μL ,采用琼脂平板打孔法测定对 MRSA 的抑菌活性,重复 3 次。以发酵液作为对照,计算相对抑菌活性。

1.6.2 代谢产物萃取溶剂的选择 将 AF1 菌株接种到高氏 1 号培养基上,置于 29 ℃、160 r/min 的摇床上进行发酵培养,培养 7 d 后用双层滤纸过滤,滤液分别用等体积的三氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、正丁醇在分液漏斗中进行萃取。上下颠荡 10 次,静置萃取 20 min。分别取上、下层进行抑菌活性测定。

1.6.3 代谢产物的溶解性 将发酵液的乙酸乙酯粗提物溶于丙酮中,等体积分成 15 份,待丙酮挥发完全后,分别用 2 mL 的水、甲醇、乙醇、丙酮充分溶解,每处理重复 3 次。取处理后的发酵液 20 μL ,采用琼脂平板打孔法测定其对 MRSA 的抑菌活性。

1.7 AF1 菌株发酵液乙酸乙酯粗提物对 MRSA 的最低抑菌质量浓度(MIC)

采用微量肉汤稀释法,测定 AF1 菌株发酵产物对 MRSA 的 MIC^[16]。将 AF1 菌株发酵液的乙酸乙酯粗提物用丙酮溶解制成质量浓度为 1 088 $\mu\text{g/mL}$ 的抗菌药物。将 MRSA 在 LB 琼脂板上活化,然后接种在 LB 液体培养基上培养 12 h,作为指示菌。取无菌试管(12 mm $\times$ 100 mm)12 支,每管加 1 mL LB 培养基,在第 1 管中加入抗菌药物原液(1 088 $\mu\text{g/mL}$)1 mL 混匀,按倍比稀释法依次稀释。然后在每管中加入制备好的 MRSA 接种物各

1 mL。第 1 管至第 11 管药物质量浓度分别为 544,272,136,68,34,17,8.5,4.25,2.125,1.06 和 0.53 $\mu\text{g/mL}$,每个梯度重复 3 次。将混合液置于温度 30 ℃、转速 160 r/min 的摇床上培养 5 h 后,以未添加粗提物的培养管作为对照,测定 MRSA 培养液的吸光度(OD₆₀₀),根据 NCCL 有关规定^[17](后文列出),计算活性物质的 MIC 值。按上述方式测试相同体积丙酮对 MRSA 生长的抑制作用。

2 结果与分析

2.1 AF1 菌株的分类鉴定

2.1.1 菌株形态和培养特征 图 1-A 显示,放线菌 AF1 在高氏 1 号培养基上培养 10 d 后,菌落表面呈浅灰色,有脊状褶皱,能产生棕红色可溶性色素;分生孢子丝直或呈波浪弯曲状,孢子成链呈松散螺旋状,不形成分生孢子包囊,分生孢子大小 1.5 $\mu\text{m}\times$ 0.45 μm ,呈柱形,表面光滑(图 1-B,C,D)。

AF1 菌株在 7 种 ISP 培养基上培养 30 d 后,其特征观察结果见表 1。由表 1 可以看出,AF1 菌株在 ISP1、ISP4 和 ISP5 培养基上生长较慢,在其他 4 种培养基上生长良好,后期菌落边缘有轮纹现象;在 7 种培养基上均能产可溶性色素,其中在 ISP1、ISP3 和 ISP5 上为棕红色色素,在 ISP4 和 ISP7 上为灰色色素,在 ISP2、ISP6 上分别为浅褐色和银灰色色素。

2.1.2 生理生化特性 AF1 菌株的生理生化特性测定结果见表 2。由表 2 可见,AF1 菌株能利用葡萄糖、D-半乳糖、麦芽糖、鼠李糖和蔗糖,不能利用 D-果糖、D-甘露醇和肌醇;能水解淀粉,但不能水解纤维素;在明胶液化、黑色素、牛奶凝固、产硫化氢及硝酸盐还原酶等试验中均呈阳性。

2.2 AF1 菌株的 16S rDNA 序列测定及系统发育分析

测得 AF1 菌株的 16S rDNA 全长为 1 242 bp,全序列已在 GenBank 中登记,登录号为 KF059834.1。BLAST 软件比对结果显示,AF1 菌株与 GenBank 中加利利链霉菌 XSD-102(*Streptomyces galilee* XSD-102)菌株的同源率为 100%,与 *Streptomyces bolili* HBUM174851 和 *Streptomyces* sp. SX-4 的相似性均为 99%。用 Mega5.0 软件构建的系统发育树(图 2)显示,AF1 与上述 3 种菌株的进化距离最近。

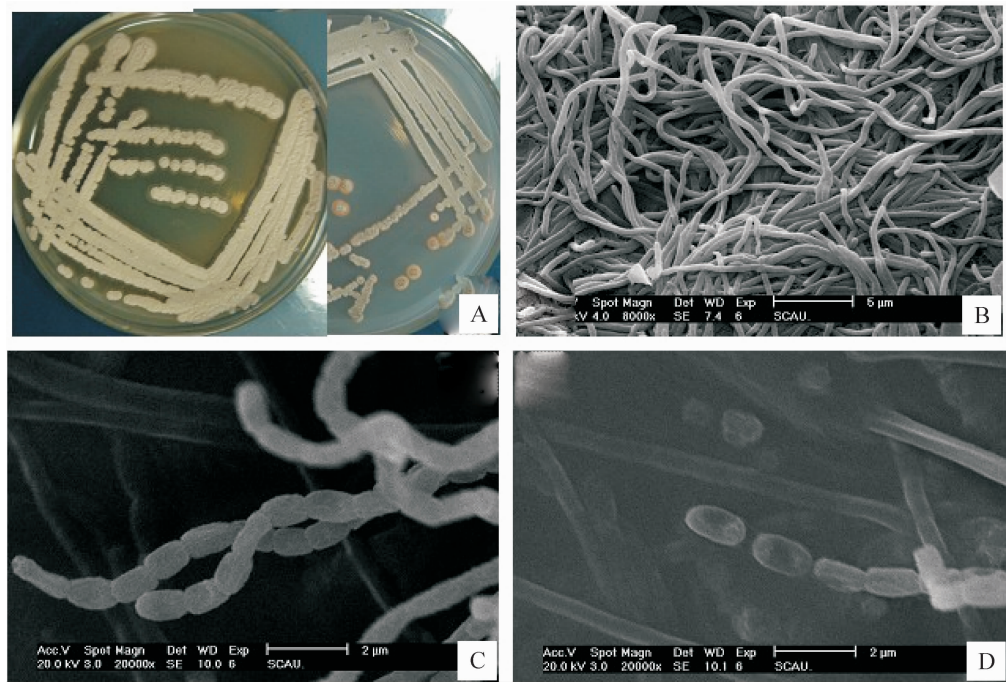


图 1 菌株 AF1 的形态特征

A. AF1 菌落特征;B(8 000×),C(20 000×)和 D(20 000×). 分别为 AF1 菌丝和孢子的扫描电镜

Fig. 1 Morphological characteristics of strain AF1

A. Colony of strain AF1;B represents the morphological characteristics of hypha of AF1 under a scanning electron microscope (8 000×);C and D represent the morphological characteristics of hyphae and spores of AF1 (20 000×),respectively

表 1 AF1 菌株在 7 种 ISP 培养基上的培养特征

Table 1 Characteristics of strain AF1 cultured on seven different media

培养基 Media	基内菌丝颜色 Substrate mycelium color	气生菌丝颜色 Aerial mycelium color	生长状况 Growth	可溶性色素 Soluble pigment
ISP1	乳白色 Oyster white	银灰色 Silvery grey	一般 Moderate	棕红色 Brown
ISP2	白色 White	白色 White	良好 Abundant	浅褐色 Pale brown
ISP3	乳白色 Oyster white	棕红色 Brown	良好 Abundant	棕红色 Brown
ISP4	白色 White	乳白色 Oyster white	一般 Moderate	灰色 Grey
ISP5	浅黄色 Pale yellow	桃红色 Peach tan	一般 Moderate	棕红色 Brown
ISP6	银灰色 Silvery grey	银灰色 Silvery grey	良好 Abundant	银灰色 Silvery grey
ISP7	青灰色 Green-gray	青灰色 Green-gray	良好 Abundant	灰色 Grey

表 2 AF1 菌株的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical properties of strain AF1

项目 Item	试验结果 Test result	项目 Item	试验结果 Test result
葡萄糖 D-glucose	+	明胶液化 Gelatin liquefaction	+
D-半乳糖 D-galactose	+	硫化氢和黑色素 Sulfureted hydrogen and melanin formation	+
麦芽糖 Maltose	+	牛奶凝固 Milk coagulation	+
鼠李糖 L-rhamnose	+	牛奶胺化 Milk peptonization	—
蔗糖 Sucrose	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
D-果糖 D-fructose	—	纤维素水解 Cellulose hydrolysis	+
D-甘露醇 D-mannitol	—	肌醇 I-inositol	—

注: +, 阳性; —, 阴性。
Note: +, Positive; —, Negative.

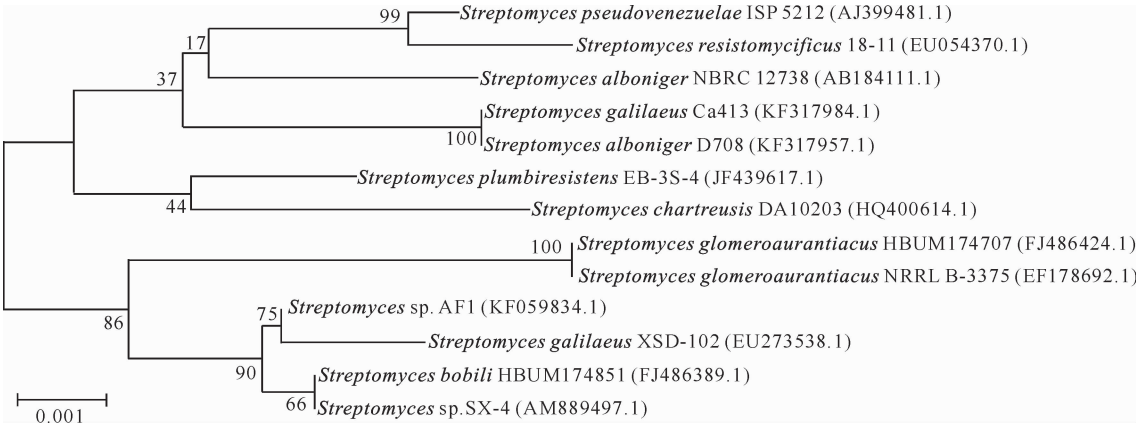


图 2 AF1 菌株 16S rDNA 序列的系统发育树

图中的数据是 bootstrap 检验值,表示该分支通过 bootstrap 检验次数占总次数的百分比

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain AF1 based on 16S rDNA gene sequence

The data in the figure are the bootstrap test values, representing the ratio of times each branch passes to the total number of times by bootstrap detection

2.3 AF1 菌株代谢产物的稳定性

2.3.1 热稳定性 AF1 发酵液中活性物质的热稳定性测定结果见图 3。

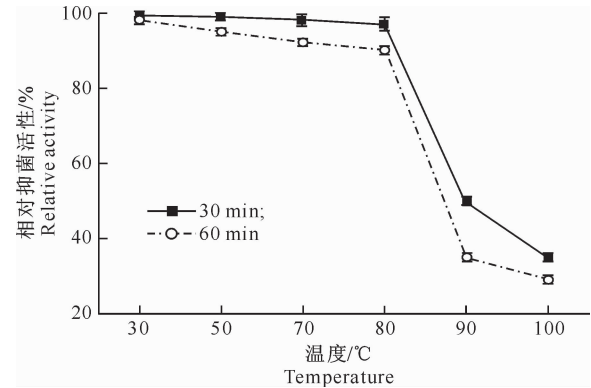


图 3 AF1 菌株抑菌活性物质的热稳定性

Fig. 3 Effect of temperature on antimicrobial activity of strain AF1

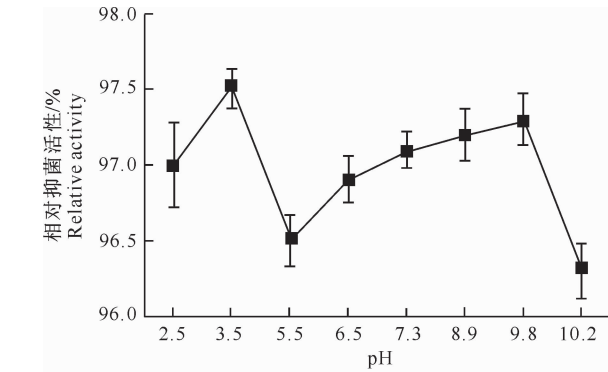


图 4 pH 对 AF1 菌株发酵液中抑菌活性物质稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH on antimicrobial activity of strain AF1

由图 3 可知,在 30~80 °C 下,AF1 菌株代谢产物生物活性降低不明显,随着处理时间的延长,活性略有降低。90 和 100 °C 时生物活性明显下降,90 °C 处理 60 min 和 100 °C 条件下活性几乎消失。

2.3.2 酸碱稳定性 不同 pH 处理条件下,AF1 发酵液中物质的抑菌活性测定结果见图 4。图 4 表明,在试验 pH 范围内,pH 值对发酵液中物质的抑菌活性影响不明显,抑菌活性保持稳定。但随着 pH 值的改变,发酵液的颜色变化较大,在酸性条件下呈橘黄色,并逐渐过渡到棕红色。

2.3.3 对紫外线照射的稳定性 AF1 发酵液对紫外线照射的稳定性测定结果见图 5。图 5 表明,AF1 发酵液经紫外线照射不同时间后,其生物活性有一定的降低但不明显,说明其抗菌活性物质具有一定的紫外线耐受性。

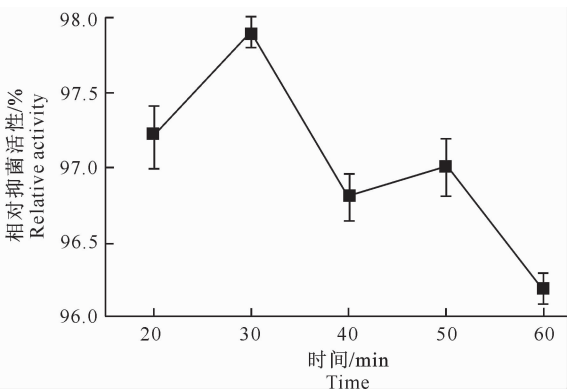


图 5 紫外线照射对 AF1 菌株发酵液中抑菌活性物质的影响

Fig. 5 Effect of ultraviolet ray on antimicrobial activity of stain AF1

2.4 AF1 菌株抑菌活性物质萃取溶剂的选择

由表 3 可见,在原始 pH 条件下,AF1 菌株发酵液中的生物活性物质大部分能被乙酸乙酯和正丁醇萃取,三氯四烷萃取效果相对较弱,石油醚几乎不能萃取。

表 3 有机溶剂对 AF1 菌株发酵液活性物质的萃取效果
Table 3 Extraction of active substances of strain AF1 by organic solvent

溶剂 Solvent	抑菌圈直径/mm	
	水相 Aqueous phase	有机相 Organic phase
乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.00	4.10±0.05
正丁醇 Butyl alcohol	0.00	4.30±0.09
三氯甲烷 Trichloromethane	2.33±0.12	1.43±0.03
石油醚 Petroleum ether	4.10±0.05	0.00

2.5 AF1 菌株发酵液乙酸乙酯粗提物中活性物质的溶解性

由表 4 可知,AF1 菌株发酵液乙酸乙酯粗提物中抗菌活性物质在丙酮和甲醇溶液中的溶解度较高,根据相似相溶原理,可初步判断 AF1 菌株发酵液中抗菌活性物质是一种中高度极性的物质。

表 4 有机溶剂对 AF1 菌株发酵液活性物质的溶解性
Table 4 Solubility of active materials of strain AF1 in organic solvent

溶剂 Solvent	溶液颜色 Color of solvent	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter
水 Water	不溶 Insoluble	0.00
甲醇 Methanol	棕红色 Red	11.10±0.26
乙醇 Ethanol	棕红色 Brownish red	10.90±0.09
丙酮 Acetone	棕红色 Brownish red	11.70±0.12

2.6 AF1 菌株发酵液乙酸乙酯粗提物对 MRSA 的 MIC

AF1 菌株发酵液乙酸乙酯粗提物对 MRSA 的抑菌率见图 6。

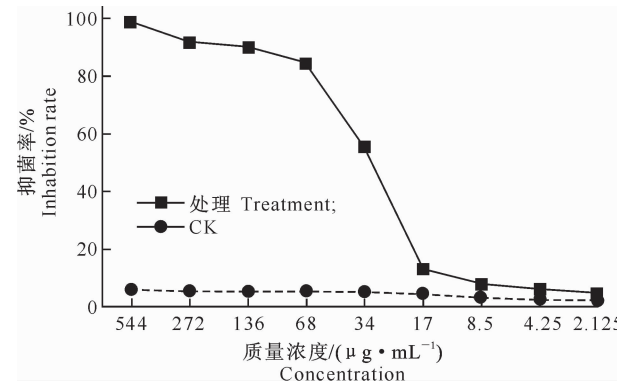


图 6 AF1 菌株发酵液乙酸乙酯粗提物对 MRSA 的抑菌率
Fig. 6 Inhibition rate of ethyl acetate extract of AF1 against MRSA

由图 6 可以看出,用质量浓度≥272 μg/mL 的 AF1 菌株发酵液的乙酸乙酯粗提物处理 MRSA 时,菌株不再生长。当粗提物质量浓度在 34~136 μg/mL 时,随着质量浓度提高,MRSA 菌体生长受到明显抑制。粗提物质量浓度低于 34 μg/mL 时,菌体生长抑制不明显。参照 NCCL^[17]的规定,与阳性生长对照管比较,可以抑制 80%细菌生长的药物质量浓度为受试菌的 MIC。因此,AF1 菌株发酵液乙酸乙酯粗提物对 MRSA 的最小抑菌质量浓度为 68 μg/mL。

3 讨论

本研究分析结果表明,AF1 菌株与加利利链霉菌 XSD-102 16S rDNA 序列的同源性达 100%,故将 AF1 菌株暂定名为加利利链霉菌(*S. galilaeus* AF1)。现有资料表明,*S. galilaeus* 为马铃薯疮痂病(Potato common scab)病原菌,张萌等^[18]分析了中国不同地区的马铃薯疮痂病病原菌发现,病原菌的分布具有种特异性和分布多样性。Oki 等^[19]在 *S. galilaeus* MA144-M1 中发现了阿克拉霉素 A 和 B(Aclacinomycin A and B)以及其他 19 种类似物,阿克拉霉素作为抗癌药物,因其较低的心脏毒性而获得极大关注^[20]。范瑾^[21]也从四川省的土壤中分离到 1 株产生萘环类抗肿瘤抗菌素的链霉菌 77-3082。另有报道发现,在培养 7 d 后的加利利链霉菌菌丝体中发现了阿柔比星(Aclarubicin)^[22-23],但未见有关其抑菌活性物质的研究报道。

MRSA 对人类健康的威胁日益严重,目前用于治疗相关感染的药物有利奈唑烷(linezolid)^[24]、达托霉素(daptomycin)^[25]、泰利霉素(tigecycline)、替加环素(tigecycline)^[26]等,还有一批处于临床研究阶段的药物如头孢吡普、达巴万星等。但是在新药研发过程中抗性菌也不断产生,且新药的研制速度不及耐药菌的产生速度,因此寻求作用方式新颖、不易产生耐药性的新品种迫在眉睫。本研究发现,AF1 菌株发酵液及其乙酸乙酯粗提物具有良好的抗细菌活性,且只对革兰氏阳性菌敏感(将另文报道),能有效杀灭耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。

[参考文献]

[1] Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin:United States,2002 [J]. Morbidity and Mortality Weekly Report,2002,51(26):565-567.
[2] Saravolatz L D,Markowitz N,Arking L,et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiologic observations during a community-acquired outbreak [J]. Annals of Internal

- Medicine, 1982, 96(1): 11-16.
- [3] 贺 宏, 马 杰. 耐甲氧西林金葡萄菌的研究进展 [J]. 国外医药: 抗生素分册, 2007(4): 175-177.
He H, Ma J. Research progress of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. World Notes on Antibiotics, 2007(4): 175-177. (in Chinese)
- [4] Juhasz-Kaszanyitzky E, Janosi S, Somogyi P, et al. MRSA transmission between cows and humans [J]. Emerging Infectious Diseases, 2007, 13(4): 630-632.
- [5] 刘小平, 樊尚荣, 徐桂彪, 等. 168 株金黄色葡萄球菌的临床分布及耐药性分析 [J]. 中国全科医学, 2010(10): 1121-1123.
Liu X P, Fan S R, Xu G B, et al. An analysis of antibiotic resistance of 168 strains *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese General Practice, 2010(10): 1121-1123. (in Chinese)
- [6] 徐丽华, 李文均, 刘志恒. 放线菌系统学: 原理、方法与实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
Xu L H, Li W J, Liu Z H, et al. Actinomycetes systematics: Principles, methods and practice [M]. Beijing: Science Press, 2007. (in Chinese)
- [7] Shirling E T, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340.
- [8] Williams S T, Goodfellow M, Alderson G, et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera [J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129(6): 1743-1813.
- [9] Traquair J A. Conspecificity of an unidentified snow mold basidiomycete and a *Coprinus* species in the section *Herbicola* [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1980, 2(3): 105-115.
- [10] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1975: 658-665.
Group on Taxonomy of Actinomycetes in Institute of Microbiology of Chinese Academy of Science. Identification manual of streptomyces [M]. Beijing: Science Press, 1975: 658-665. (in Chinese)
- [11] 檀贝贝, 孙 蕾, 张克诚, 等. 武夷菌素产生菌 Fosmid 文库的构建及文库探针的获得 [J]. 生物技术通报, 2011(6): 116-121.
Tan B B, Sun L, Zhang K C, et al. Construction of a fosmid library of Wuyiencin's producing strain and obtaining of the library probe [J]. Biotechnology Bulletin, 2011(6): 116-121. (in Chinese)
- [12] Kim O, Cho Y, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(3): 716-721.
- [13] 龙中儿, 朱跃进, 黄运红, 等. 炭样小单孢菌 JXNU-1 广谱抗生素产物的分离及其理化性质 [J]. 微生物学通报, 2008(9): 1450-1454.
Long Z E, Zhu Y J, Huang Y H, et al. Isolation and purification of antibiotic from the fermentation broth of micromonospora carbonacea JXNU-1 and its physical-chemical properties [J]. Microbiology China, 2008(9): 1450-1454. (in Chinese)
- [14] Belofsky G N, Anguera M, Jensen P R, et al. Oxepinamides A-C and fumiquinazolines H-I: Bioactive metabolites from a marine isolate of a fungus of the genus *acremonium* [J]. Chemistry-A European Journal, 2000, 6(8): 1355-1360.
- [15] 张武岗, 冯俊涛, 张锦恬, 等. 放线菌 19G-317 菌株发酵产物抑菌活性初步研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(4): 158-162.
Zhang W G, Feng J T, Zhang J T, et al. Studies on antifungal actions of actinomycete strain 19G-317 and secondary metabolites [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2009, 37(4): 158-162. (in Chinese)
- [16] 王文莉, 王端礼, 李世荫, 等. NCCLS 方案检测氟康唑对酵母菌的最小抑菌浓度 [J]. 中华皮肤科杂志, 1996(5): 374-376.
Wang W L, Wang D L, Li S Y, et al. The minimum bacteriostasis concentration of fluconazole to yeast according to NCCL [J]. Chinese Journal of Dermatology, 1996(5): 374-376. (in Chinese)
- [17] 张光艳, 卓 超, 黎晓强. 2007—2009 年金黄色葡萄球菌对万古霉素 MIC 值变化的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2011(9): 699-702.
Zhang G Y, Zhuo C, Li X Q. Vancomycin MIC shift in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from 2007 to 2009 [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2011(9): 699-702. (in Chinese)
- [18] 张 萌, 刘 伯, 于秀梅, 等. 中国马铃薯疮痂病菌生物学特性分析 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(12): 2603-2610.
Zhang M, Liu B, Yu X M, et al. Biological characteristics analysis of the pathogens caused potato common scab in China [J]. Scientia Agriculture Sinica, 2010, 43(12): 2603-2610. (in Chinese)
- [19] Oki T, Shibamoto N, Matsuzawa Y, et al. Production of nineteen anthracycline compounds by *Streptomyces galilaeus* MA144-M1 [J]. The Journal of Antibiotics, 1977, 30(8): 683.
- [20] Oki T, Kitamura I, Yoshimoto A, et al. Antitumor anthracycline antibiotics, aclacinomycin A and analogues: I. Taxonomy, production, isolation and physicochemical properties [J]. The Journal of Antibiotics, 1979, 32(8): 791-800.
- [21] 范 瑾. 抗肿瘤抗生素阿克拉辛霉素的研究: I. 加利利链霉菌思文变种的鉴定 [J]. 微生物学报, 1979(4): 365-369.
Fan J. Studies on the antitumour antibiotics aclacinomycin: I. Taxonomical identification of *Streptomyces galilaeus* var. *siwenensis* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1979(4): 365-369. (in Chinese)
- [22] Oki T, Yoshimoto A, Matsuzawa Y, et al. Biosynthesis of anthracycline antibiotics by *Streptomyces galilaeus*: I. Glycosylation of various anthracyclines by an aclacinomycin-negative mutant and biosynthesis of aclacinomycins from aklavinone [J]. The Journal of Antibiotics, 1980, 33(11): 1331-1340.
- [23] Rätty K, Kunnari T, Hakala J, et al. A gene cluster from *Streptomyces galilaeus* involved in glycosylation of aclarubicin [J]. Molecular and General Genetics MGG, 2000, 264(1/2): 164-172.

插入是否可以作为区分强弱毒株的参考及其在 MDV 致病性方面的潜在作用值得进一步研究。本研究结果表明,在河南省的鸡群中可能流行着不同毒力的 MDV,一些毒株的 *Meq* 基因存在 177 或 180 bp 碱基的插入,这些毒株可能是 mMDV 毒株,但还需通过动物试验来进一步验证。本研究为河南省 MDV 的流行情况提供了重要的参考信息,同时也为今后更好地防控 MD 奠定了基础。

[参考文献]

[1] Witter R L,Schat K. Marek's disease [M]//Saif Y M. In diseases of poultry. 11th edition. Ames:Iowa State Press,2003: 407-464.

[2] Davison A J,Eberle R,Ehlers B,et al. The order herpesvirales [J]. Arch Virol,2009,154:171-177.

[3] Marek J. Multiple nervenentzuendung (polyneuritis) bei huehnern [J]. Dtsch Tierarztl Wochenschr,1907,15:417-421.

[4] Witter R L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates [J]. Avian Dis,1997,41:149-163.

[5] Jones D, Lee L, Liu J L, et al. Marek's disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumor [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1992,89(9):4042-4046.

[6] 杨庆利,韦平. 马立克氏病病毒 *meq* 基因细胞转化机制的最新研究进展 [J]. 病毒学报,2008,24(3):244-247.

Yang Q L, Wei P. The latest advances in research of mechanisms of cell transformation included by *meq* gene of Marek's disease virus [J]. Chinese Journal of Virology, 2008, 24(3): 244-247. (in Chinese)

[7] 禹乐乐,滕蔓,罗俊,等. 河南商品蛋鸡群中鸡马立克氏病的流行病学研究 [J]. 华北农学报,2012,27(6):163-166.

Yu L L, Teng M, Luo J, et al. Epidemiology of Marek's disease in commercial layer chickens in Henan province [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2012, 27(6): 163-166. (in Chinese)

[8] 张立杰. 鸡马立克氏病疫苗研究进展及病毒毒力进化态势 [J]. 中国家禽,2009,31(22):5-10.

Zhang L J. Research advances on Marek's disease vaccines and the virulence evolution trend [J]. China Poultry, 2009, 31(22):

5-10. (in Chinese)

[9] Shamblin C E, Greene N, Arumugaswami V, et al. Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein, lytic antigen pp38-and tuansformation antigen Meq-encoding genes: Association of meq mutations with MDVs of high virulence [J]. Vet Microl, 2004, 102: 147-167.

[10] Renz K G, Cooke J, Clarke N, et al. Pathotyping of australian isolates of Marek's disease virus and association of pathogenicity with meq gene polymorphism [J]. Avian Pathol, 2012, 41: 161-176.

[11] Spatz S J, Silva R F. Sequence determination of variable regions within the genomes of gallid herpesvirus-2 pathotype [J]. Arch Virol, 2007, 152: 1665-1678.

[12] Murata S, Okada T, Kano R, et al. Analysis of transcriptional activities of the Meq proteins present in highly virulent Marek's disease virus strains, RB1B and Md5 [J]. Virus Genes, 2011, 43: 66-71.

[13] Murata S, Hashiguchi T, Hayashi Y, et al. Characterization of Meq proteins from field isolates of Marek's disease virus in Japan [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2013, 16: 137-143.

[14] 施维松,刘长军,张艳萍,等. 4 株鸡马立克氏病病毒国内分离株 *Meq* 基因的克隆与序列分析 [J]. 病毒学报,2008,24(2): 117-125.

Shi W S, Liu C J, Zhang Y P, et al. Cloning and sequence analysis of the *Meq* gene of 4 Marek's disease virus isolates from China [J]. Chinese Journal of Virology, 2008, 24(2): 117-125. (in Chinese)

[15] Renz K G, Cooke J, Clarke N, et al. Pathotyping of Australian isolates of Marek's disease virus and association of pathogenicity with *meq* gene polymorphism [J]. Avian Pathol, 2012, 41: 161-176.

[16] Wozniakowski G, Samorek-Salamonowicz E, Kozdrun W. Molecular characteristics of Polish field strains of Marek's disease herpesvirus isolated from vaccinated chickens [J]. Acta Vet Scand, 2011, 53: 10.

[17] Lee S I, Takagi M, Ohashi K, et al. Difference in the *meq* gene between oncogenic and attenuated strain of Marek's disease virus serotype 1 [J]. Vet Med Sci, 2000, 64(3): 287-292.

(上接第 14 页)

[24] Tsiodras S, Gold H S, Sakoulas G, et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* [J]. The Lancet, 2001, 358(9277): 207-208.

[25] Fowler J V G, Boucher H W, Corey G R, et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus* [J]. New England Journal of Medicine, 2006, 355(7): 653-665.

[26] Denis O, Deplano A, Nonhoff C, et al. *In vitro* activities of ceftobiprole, tigecycline, daptomycin, and 19 other antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from a national survey of Belgian hospitals [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(8): 2680-2685.