

NTG 诱变选育埃博霉素高产菌株的研究

罗立新, 陆一鸣, 潘力

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 纤维堆囊菌产生的次级代谢产物埃博霉素是受医学界广泛关注的抗癌良药, 由于其较低的产量阻碍了其工业化的发展。本文采用纤维堆囊菌 DSM11999 作为出发菌株, 通过 NTG 化学诱变的方法, 诱变浓度 300 $\mu\text{g/mL}$, 处理时间 30 min, 来筛选优良菌种, 最终得到两株埃博霉素 A 的产量分别为 17.3 mg/L 和 17.4 mg/L 优良菌株。

关键词: 纤维堆囊菌; NTG; 育种

中图分类号: TQ465.9; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)03-0001-03

Screening of High Epothilone-producing Mutants of *Sorangium cellulosum* by NTG Mutation

LUO Li-xin, LU Yi-ming, PAN Li

(College of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Epothilone is a secondary metabolite of *Sorangium cellulosum* and a kind of highly effective anti-cancer medicine. However, its yield is very low, which blocks its industrial fermentation production. In this paper, several mutant strains were obtained by NTG mutation with NTG concentration and mutation time being of 300 $\mu\text{g/mL}$ and 30 min, respectively. Finally two high epothilone A-producing strains were obtained and their yields reached 17.30 mg/L and 17.40 mg/L.

Key words: *Sorangium cellulosum*; NTG; screen

粘细菌 (Myxobacteria) 是一类高等的原核生物, 它具有复杂的多细胞行为, 是革兰氏阴性细菌, 能够产生丰富的生物活性次级代谢产物, 而且产物生物活性的多样性可以与著名的链霉菌类群相比拟^[1]。

纤维堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*) 属于粘细菌的溶纤维素类群, 它产生的大环类酯类化合物埃博霉素 (Epothilone) 具有促微管聚合的活性, 是目前引起医药界广泛关注的抗癌物质。埃博霉素能与真核细胞中的微管骨架结合, 导致染色体分离受阻, 细胞核不能分裂, 作用的有效浓度为 10~20 ng/mL。埃博霉素的作用机制与著名的抗癌药物紫杉醇相同, 但是其来源简单不受限制, 毒性更小^[2]。虽然目前有很多种化学法可以合成埃博霉素, 但是具有反应条件苛刻, 成本高, 合成路线长以及产率低等缺点^[3], 而且会对环境造成污染, 不是绿色的化学反应, 而工业发酵制备合成埃博霉素则可以克服上述缺点^[4]。维堆囊菌 Soce90 菌株已在 350 L 发酵罐进行了发酵合成

收稿日期: 2006-10-24

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (031357)

作者简介: 罗立新 (1966-), 男, 博士, 副教授, 主要从事微生物制药和生物化工方面的研究

epothilones 的实验, 获得 11 mg/L 的 A 和 22 mg/L 的 B^[5]。但产量很不稳定。

本文作者采用亚硝基胍 (NTG) 作为诱变剂, 研究不同诱变条件下的诱变效应, 筛选出了埃博霉素产量较高的几株突变株。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 纤维堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*) DSM 11999 菌株购于 German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany)

1.1.2 种子培养基 (G52 培养基): 酵母粉 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, 脱脂奶粉 2 g/L, 马铃薯淀粉 8 g/L, 无水葡萄糖 2 g/L, EDTA 铁钠 8 g/L, 用 KOH 调 pH 至 7.4, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

1.1.3 pH 6.0 磷酸缓冲液: K_2HPO_4 2 g/L, KH_2PO_4 8 g/L, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

1.1.4 发酵培养基 (1B12 培养基): 马铃薯淀粉 20 g/L, 脱脂奶粉 11 g/L, EDTA 铁钠 8 mg/L, 用 KOH 调 pH 至 7.8, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

1.1.5 VY/2 固体培养基: 酵母提取物 5 g/L,

CaCl₂·2H₂O 1 g/L, V_{B12} 0.5 mg/L, Agar 15 g/L, 用 KOH 调节 pH 至 7.2。

1.1.6 1B12 液体发酵培养基: 马铃薯淀粉 20 g/L、脱脂奶粉 11 g/L、EDTA-Fe-Na 8 mg/L, 用 KOH 调 pH 至 7.8。

1.1.7 MB 平板: 酵母粉 1%, 蛋白胨 3%, 葡萄糖 3%, 琼脂粉 1.5%, 灭菌后加入美蓝无菌水溶液, 使其终浓度为 1 mg/30 mL。

1.2 方法

1.2.1 菌种的诱变: 取培养了 40~42 h 的 G52 培养物 5 mL, 离心收集菌体, 用 pH 6.0 的磷酸缓冲液洗涤两次, 然后重悬于 5 mL pH 6.0 的磷酸缓冲液中, 制成菌悬液。取 NTG 母液, 加入菌悬液中, 配制成各浓度的含 NTG 的菌悬液, 在不同温度下进行诱变处理 30 min。将菌悬液 4 °C 离心, 用冷的无菌水洗涤 3 次以终止诱变^[6]。加入相同体积的 G52 液体培养基, 30 °C, 180 r/min 培养 1.5 h, 渡过生理延时期^[7]。将诱变后的菌悬液用无菌生理盐水进行适当的十倍稀释, 涂于 VY/2 平板, 30 °C, 培养 2~3 d。

1.2.2 正突变优势菌株的初筛: 无菌操作取直径 1~2 mm 的单菌落接种于 G52 液体培养基, 30 °C、180 r/min 振荡培养 3 d 后, 接入 1B12 发酵培养基, 接种量为 20% (V/V)。6 d 后, 用 5 mm 新华滤纸片浸泡发酵液, 置于美蓝平板上, 每个平板上都有一个原种的发酵液作为对比, 或者用牛津杯, 在杯中加 200 μL 发酵液。美蓝平板上涂有古巴 1 号 AS2.1189.5 酿酒酵母。

1.2.3 正突变菌株的复筛: 2~3 d 后挑选有蓝色抑菌圈且抑菌圈大于原种的菌落, 于 G52 液体培养 3 d 后, 再接于 1B12 培养基中发酵培养 6 d, 最后取发酵液离心 16000 r/min、7 min 后取上清液通过高效液相色谱检测产物峰。色谱条件^[8]如下:

色谱柱: Agilent XDB-C18, 200×4.6 mm; 柱温: 30 °C; 检测: 250 nm, UV-DAD detection; 流动相: 磷酸-乙腈溶液 (V_{0.02%磷酸}:V_{乙腈}=59:41)。

2 结果和分析

2.1 标准曲线的测定

2.1.1 标准溶液的配制: 将标准品 Epothilone A, synthetic (购于 Merck, Calbiochem, Oncogene, Novagen) 溶于色谱纯的甲醇溶液, 配制成一系列浓度, 分别为: 6.67 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL、50 μg/mL。

2.1.2 标准溶液的检测: 使用 HPLC 检测标准样, 色谱条件同上, 进样量为 20 μL, 每个浓度进样三次以

保证数据的正确性。同时使用色谱纯甲醇进行空白对照。

2.1.3 标准曲线的绘制: HPLC 所得的色谱图见图 5。

由色谱图可以看出埃博霉素的出峰时间在 16 min 左右, 将各个浓度所得的数据汇总, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 见图 1。

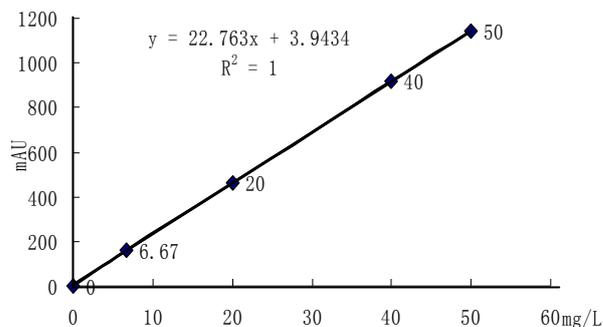


图 1 Epothilone A 标准曲线

由标准曲线图可以看到相关系数 R=1, 可见有非常好的相关性。

2.2 NTG 化学诱变

2.2.1 种子液稀释倍数的确定: 把不同稀释倍数的种子液 100 μL 涂布 S42 培养基平板, 培养 48 h 后对菌落计数, 发现当稀释倍数为 10⁰~10⁵, 菌落个数太多, 菌悬液中细胞团太多, 还未形成单细胞状态, 而稀释倍数 10⁷ 时菌落个数太少, 减少出现高产突变株的机率, 由此可确定种子液的稀释倍数为 10⁶。结果见表 1。

表 1 菌悬液菌落计数

菌悬液 稀释倍数	不同平皿的菌落数		平均值
	1	2	
10 ⁴	成片	成片	成片
10 ⁵	356	410	383
10 ⁶	70	91	9
10 ⁷	2	0	1

2.2.2 致死率和 NTG 剂量、时间的确定: 将未用 NTG 处理的菌悬液所涂的平板与用 NTG 处理不同浓度的菌悬液分别稀释 10⁶ 倍后涂 VY/2 培养基平板, 培养 48 h 后进行菌落计数, 按照下式计算致死率^[11]:

死亡率 = (未用 NTG 处理的菌落数 - 用 NTG 处理的菌落数) / 未用 NTG 处理的菌落数

细菌的一般处理浓度为 100~1000 μg/mL^[9,10], 我们选取 NTG 终浓度为 100、300、500、700 μg/mL, 均在 30 °C 下水浴处理 30 min, 实验结果见图 2。另外取浓度为 300 μg/mL 的菌悬液分别水浴处理 15、30、45、60 min, 实验结果见图 3。

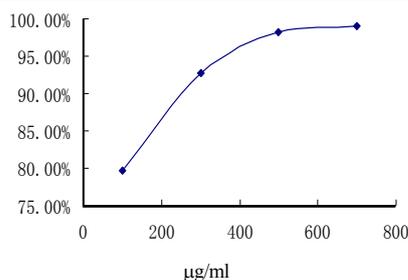


图2 NTG致死率浓度梯度

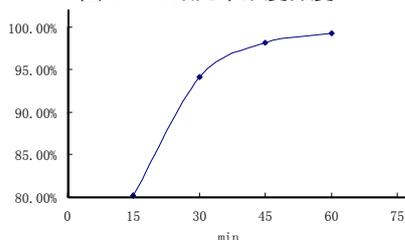


图3 NTG致死时间梯度

为得到满意的诱变结果,选择致死率约为90%的致死浓度,即NTG诱变剂浓度为300 µg/mL,诱变处理时间30 min,种子液的稀释度为 10^6 倍,作为诱变条件。诱变之后得到39株菌。

2.2.3 正突变优势菌株的初筛:将NTG诱变所得的39株菌,进行MB平板的抑菌圈实验。挑选出抑菌圈明显大于原种的菌株。一共有10株,其编号分别为11、12、2'、3'、8'、10'、12'、13'、15'、22'。

2.2.4 正突变优势菌株的复筛:将初筛所得的菌株的发酵液离心取上清,进行HPLC检测并与原种进行比较。所得结果如图4。

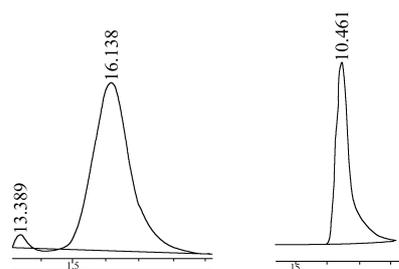


图4 诱变种22'的

发酵液色谱图

图5 溶于甲醇的

Epothilone A 色谱图

图4、图5可知诱变种的发酵液色谱出峰时间与标准品Epothilone A基本一致,也在16 min左右,结果可信。

原种内的埃博霉素A的含量较少几乎检测不到,从复筛的十株中我们共得到两株埃博霉素A产量较高的菌株15'和22',他们的峰面积分别为397.85880、400.0219 mAU,将其代入峰面积(Y)代入回归方程: $Y=22.763x+3.9457$

得出15'含EpoA 17.30 mg/L, 22'含EpoA 17.40

mg/L。比原种的产量有大的提高。具体数据见图6。

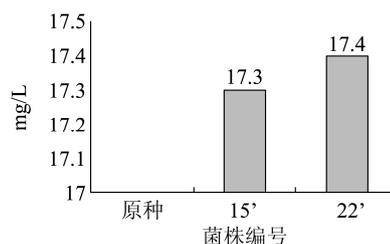


图6 诱变菌株与原种埃博霉素A产量对比

3 结论和展望

实验表明,通过NTG化学诱变育种的方法可以有效地提高纤维堆囊菌产埃博霉素的产量。将菌液稀释至 10^6 涂VY/2平板,经300 µg/mL的NTG溶液处理30min后,得到正突变的优良菌株可以使产量由原本的基本不产到大大提高,达到预期的目的。

由于以前还未见有关于粘细菌NTG化学诱变的报道,而粘细菌属于革兰氏阴性菌,于是本实验参照大肠杆菌等革兰氏阴性菌的NTG化学诱变的方法,这方面的研究不免还有很多可以改善之处,以后可以加强这方面的探讨和研究,进一步改善实验的操作条件从而得到性能更优良更稳定的菌株。另外还可以进行通过多次诱变使达到优秀的性状得以积累,同时还可以结合紫外诱变,以达到筛选高产菌株的目的。

参考文献

- [1] 王海英,张利平.微生物学通报,2003,115~116.
- [2] 李越中,胡玮,周璐.药学学报,2001,155~160.
- [3] 周文华,杨辉荣,危恒毅等.化工进展,2003,694~698.
- [4] Ranjan Patnaik,Susan Louie,Vesna Gavrilovic.Genome shuffling of lactobacillus for improved acid tolerance. Nature biotechnology,2002,20(7):707~712.
- [5] Gerth K, Bedorf N, Irschik H et al. Epothilones A and B: antifungal and cytotoxic compounds from Sorangium cellulosum(myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. J Antibiot, 1996;49:560
- [6] 李凤梅,刘长江,郑艳等.生物技术,2005,15(1):34~35.
- [7] 王瑞霞,等.微生物学通报,2005,32(5):10~13
- [8] 李越中,Klaus Gerth, Hans Reichenbach. 中国抗生素杂志,1998,420~424
- [9] 钱存柔,黄仪秀.微生物实验教程[M].北京:北京大学出版社,2000,4.
- [10] 周俊初.微生物学实验手册 [M].上海科学出版社,1986
- [11] 施巧琴,吴松刚.工业微生物育种学(第2版),北京:科学出版社,2003