

产紫杉醇菌株原生质体诱变育种的研究

Study on Breeding up High-yield Strain of Taxol by Protoplast Mutagenesis

赵 凯^{1,2} 周东坡^{1*} 平文祥¹ 刘 军¹ 马 玺¹ 金 涛¹

ZHAO Kai^{1,2}, ZHOU Dong-Po^{1*}, PING Wen-Xiang¹, LIU Jun¹, MA Xi¹ and JIN Tao¹

1. 黑龙江大学生命科学学院, 哈尔滨 150080

2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001

1. Life and Science College of Heilongjiang University, Harbin 150080, China

2. State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

摘 要 对紫杉醇产生菌 NCEU-1 的原生质体进行了紫外线和氯化锂复合诱变, 筛选制霉菌素抗性突变株, 共筛选出了 4 株正突变株。经发酵筛选试验, 获得了一株遗传性状稳定、高产紫杉醇的原生质体诱变菌株——UL₀₄₋₅, 其紫杉醇产量从出发菌株的 314.07 μ g/L 提高至 418.24 μ g/L。

关键词 紫杉醇, 紫杉醇产生菌, 原生质体诱变

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0848-04

Abstract In order to obtain resistant mutants to nystatin, ultraviolet radiation and LiCl were used to mutagenize the protoplasts of taxol-producing fungi NCEU-1, and four positive mutants with high yield of taxol were screened out on nystatin flat. After further screening experiments on fermentation, a mutant strain—UL₀₄₋₅ which was able to produce taxol with high yield and could be stably passed on in genetics was eventually found, it's ability to produce taxol was improved from 314.07 μ g/L (strain NCEU-1) to 418.24 μ g/L (strain UL₀₄₋₅).

Key words taxol, taxol-producing fungi, protoplast mutagenesis

紫杉醇 (taxol) 最早是由美国的 Wani 等 (1971)^[1] 分离自短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*), 是一种复杂的具有抗癌活性的二萜类化合物。在临床上, 用于治疗乳腺癌、卵巢癌、绒毛膜癌、子宫癌等人体多种恶性肿瘤^[2,3,4]。 *Nodulisporium sylviforme* 是周东坡等 (2001)^[5,6] 在 1993 年从东北红豆杉 (*Taxus cuspidata*) 韧皮部分离到的一种内生真菌, 为中国一新记录属——多节孢属, 紫杉醇产量最初经高效液相色谱 (HPLC) 测定为 51.06 ~

125.70 μ g/L, 后经一系列诱变选育, 获得了产量达到 314.07 μ g/L 的诱变株 NCEU-1, 较此前报道的其它菌种发酵单位高, 是一种很有前途的紫杉醇产生菌。

工业微生物菌种质量的优劣对发酵工业有极其重要的影响。目前微生物诱变育种在发酵工业的菌种选育中独占鳌头, 国内外发酵工业中采用的各种生产菌种品系绝大多数是诱变菌株。诱变育种除能提高代谢产物外, 还可达到改进产

Received: May 8, 2005; Accepted: July 5, 2005.

This work was supported by the grants from the National Natural Science foundation of China, the Fifteen Important Item of Heilongjiang (No. GA02C101) and Emphasis Item of Harbin (No. 011421126).

* Corresponding author. Tel: 86-451-88194798; E-mail: zhoudp2003@yahoo.com.cn

国家自然科学基金 (No.) 黑龙江省“十五”重大攻关项目 (No. GA02C101) 和哈尔滨市重点项目 (No. 011421126) 资助。

品质量、扩大品种和简化生产工艺等。本研究旨在通过原生质体诱变,进一步选育紫杉醇高产菌株,充分发挥菌株的遗传潜力,大幅度提高菌株的紫杉醇产量,为通过微生物发酵法生产紫杉醇早日实现工业化生产奠定坚实的基础,从根本上解决紫杉醇药源不足问题。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 :HQD₃₃系自东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)分离到的内生真菌——树状多节孢(*Nodulisporium sybiforme*)^[5,6],其孢子经UV、EMS、⁶⁰Co、NTG等一系列的诱变,筛选获得的突变衍生株NCEU-K(其紫杉醇产量为314.07μg/L)做为出发菌株。

1.1.2 培养基:

(1)PDA液体培养基^[7];

(2)PDA固体培养基:向上述PDA液体培养基配方中加入2%的琼脂后灭菌;

(3)再生培养基:向PDA固体培养基配方中加入氯化钠,使其终浓度为0.7mol/L后灭菌;

(4)改良的S-7培养基^[7]:在原S-7基础上将苯丙氨酸增至终浓度5.0mg/L,新增酪氨酸至1.5mg/L,新增亚油酸至1.5mg/L。

1.1.3 主要试剂:溶壁酶(lywallzyme)购自广东微生物研究所,蜗牛酶(snailase)购自北京百泰生化技术公司,纤维素酶(cellulase)购自上海丽珠东风生物技术有限公司,和溶菌酶(lysozyme)中国科学院上海生物化学研究所等。

1.2 方 法

1.2.1 菌丝体培养和收集:首先在PDA斜面培养基上活化出发菌株NCEU-1一次,再在PDA液体培养基中再活化一次(50mL/250mL锥形瓶),然后以3%接种量接种至PDA液体培养基,28℃静止培养3d(200mL/500mL锥形瓶),培养好的菌丝体以3000r/min离心10min,收集菌丝体,用渗透压稳定剂(0.7mol/L氯化钠)洗涤2次,再转入平底试管,每管湿菌体重1g。

1.2.2 原生质体制备^[8]:将用pH5.5~6.0、0.7mol/L氯化钠渗透压稳定剂配制的3%溶壁酶+1%蜗牛酶+1%的溶菌酶+3%纤维素酶的混合酶制剂,以1mL/250mg湿菌体加入平底试管,然后在30℃恒温水浴中酶解,酶解时间6h,取酶解液用3层无菌镜头纸过滤以除去残存的菌丝体及菌丝片段,滤液以3000r/min离心10min,收集原生质体,之后用0.7mol/L的氯化钠洗涤2次后重新悬浮于0.7mol/L的氯化钠中,在显微镜下观察原生质体的形成,并通过血球计数板计数。

1.2.3 原生质体再生:采用双层平板培养法进行^[8]。将上述原生质体悬液用渗透压稳定剂(0.7mol/L氯化钠)按10倍稀释法,吸取不同稀释度的原生质体悬液0.5mL加入4.5mL PDA半固体试管中,搓匀后倒入PDA固体平板,在28℃下培养3~5d,同时,再吸取0.5mL原生质体悬液注入4.5mL蒸馏水中裂

解20min,稀释后涂PDA平板。最后根据菌落数计算再生率。
1.2.4 制霉菌素最小抑制浓度的筛选:配制含不同终浓度制霉菌素的平板(70μg/mL、75μg/mL、80μg/mL、85μg/mL、90μg/mL、95μg/mL、100μg/mL)将出发菌株NCEU-1在PDA固体培养基上继代培养,获得的新鲜孢子稀释至10⁴~10⁶(cfu/mL),取上述孢子悬液0.1mL直接涂布于含制霉菌素的平板。将涂菌平板置28℃恒温培养,3d后观察结果,选择完全抑制紫杉醇产生菌生长的最小制霉菌素浓度。

1.2.5 原生质体诱变:首先,将制备到的原生质体用0.7mol/L氯化钠调整,使其终浓度为10⁶cfu/mL。照射前,先打开紫外灯预热30min,使光波趋于稳定,然后将稀释的原生质体悬液5mL放入直径6cm盛有无菌转子的平皿中。分别用不同的时间(10s、20s、30s、40s、50s、60s)进行紫外线照射处理(30W,照射距离30cm);同时设立未照射处理对照组。另一组在含0.6%LiCl(W/V)的平板中作紫外照射(复合诱变)。

采用双层平板培养法于再生培养基再生突变株,在28℃恒温培养箱中暗培养6d后,获得原生质体再生突变株。同时,以未经诱变的原生质体同样操作作为对照,进行致死率的测定。

1.2.6 突变株的抗性筛选:

预筛:将得到的再生诱变株继代培养,然后接种至含95μg/mL制霉菌素平板,28℃恒温培养,3d后挑取在抗性平板里生长良好的菌落作为预筛得到的抗性菌株。

将预筛得到的再生诱变株继代培养,然后分别接种至含105μg/mL、115μg/mL、125μg/mL、135μg/mL制霉菌素平板,28℃恒温培养,3d后经初筛、复筛挑取在抗性平板里生长良好的菌落作为抗性菌株。

初筛:将诱变处理后的原生质体悬液适当稀释,采用双层平板培养法在PDA再生培养基上培养,28℃恒温培养3~5d,观察菌落生长并统计菌落数。选择再生平板上生长速度快、菌落直径大的单菌落,用来筛选紫杉醇高产菌株;同时,淘汰菌落明显偏小、生长速度慢、菌丝稀薄、易老化的菌落。

复筛:用改良的S-7培养基,于25℃,120r/min的恒温摇床上避光培养初筛中得到的菌株,500mL三角瓶培养基装量为250mL,培养12d后,过滤发酵液,萃取紫杉醇,然后通过薄层析与高效液相色谱法分别对紫杉醇进行定性和定量分析。同时,以出发菌株NCEU-1为对照,进一步筛选高产菌株。

1.2.7 遗传稳定性的测定:对获得的正突变株连续培养5代,以出发菌株作对照,选择遗传稳定性较好,紫杉醇产量稳定提高的突变株作为正突变株予以保留。

1.2.8 紫杉醇提取方法[参照文献[7]]

1.2.9 紫杉醇定性及半定量方法:用诱变后获得的抗性菌株作三角瓶固体发酵,同时以原始出发菌株作对照。参照文献[7],用Sigma公司产的紫杉醇标准品作对照。

1.2.10 紫杉醇定量方法[参照文献[7]]:用Sigma公司产的紫杉醇标准品作对照

2 结果与讨论

2.1 原生质体的制备和再生

本试验制备原生质体的目的是为了除去紫杉醇产生菌细胞壁对紫外线的阻碍作用。因此,原生质体形成率越高,诱变的机率越大。但在原生质体制备过程中,随原生质体形成率提高,再生率反而下降,而过低的再生又对诱变选育优良菌株产生不利影响。本试验研究发现,紫杉醇产生菌的原生质体形成率在72%左右时形成率与再生率达到最优配比,这时较有利于原生质体的诱变,此时,原生质体制备率为最大值 2.23×10^7 (cfu/mL)。

2.2 原生质体诱变育种

2.2.1 最小抑制浓度实验 从表1可以看出,在制霉菌素浓度为70 μ g/mL和75 μ g/mL时,培养基中菌体生长情况及状态与对照组基本相同,制霉菌素浓度大于80 μ g/mL时,孢子生长受到明显抑制,而当其浓度大于95 μ g/mL时,菌体则不生长。因此选定95 μ g/mL为最小抑制浓度。

表1 制霉菌素浓度对紫杉醇产生菌的抑制效果

Table 1 The effect of inhibition of nystatin concentration to taxol-producing fungi

Nystatin concentration (μ g/mL)	Amount of clones (plate 1)	Amount of clones (plate 2)	Amount of clones (plate 3)
0	56	54	57
70	53	50	52
75	51	49	50
80	34	33	34
85	16	21	19
90	1	1	3
95	0	0	0
100	0	0	0

2.2.2 紫外线照射适宜剂量的选择 各种诱变剂有不同的剂量表示方式,剂量一般指强度与作用时间的乘积。化学诱变常以一定温度下诱变剂的浓度和处理时间来表示。在育种实践中,还常以杀菌率来作诱变剂的相对剂量。本试验以紫外线照射时间作诱变剂量。适宜剂量则以对紫杉醇产生菌原生质体的致死率为指标进行选择。紫外线照射剂量与紫杉醇产生菌原生质体的致死率关系如图1所示。

由图1可看出,紫外线对紫杉醇产生菌的原生质体致死作用明显。在诱变育种工作中,过去在用紫外线作诱变剂时,常采用致死率为90%、99%或99.9%的相对剂量,而目前大家则比较倾向采用较低的剂量,常采用致死率为70%~75%,以利于微生物正向突变的进行。本试验应用紫外线对紫杉醇产生菌的原生质体进行处理,当照射60s时,紫杉醇产生菌的原生质体基本上完全致死(致死率为98.54%)。因此,本试验选定紫外线照射时间40s作为适宜诱变剂量(致死率为72.51%)对紫杉醇产生菌的原生质体进行紫外线-氯化锂复合诱变。

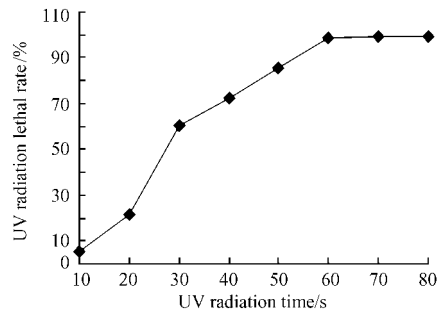


图1 原生质体致死率与诱变剂量的关系

Fig. 1 The relationship of between lethal rate of protoplast and mutagen dose

2.2.3 紫外线-LiCl复合诱变及制霉菌素抗性突变株的筛选 氯化锂本身并无诱变作用,但在抗生素产生菌的诱变育种中表明,其与一些诱变因子具有协同作用^[9]。据报道,采用氯化锂前处理的诱变效果较好,LiCl在一定浓度范围内,有利于菌体突变的发生。因此,本试验采用向原生质体悬液中加入0.6% LiCl (W/V)后,立即在紫外光下照射40s,以对紫杉醇产生菌的原生质体进行复合诱变。同时,以紫外线单独照射40s作为对照。本试验通过对紫杉醇产生菌的原生质体进行多次复合诱变后,涂布120个制霉菌素平板(含制霉菌素95 μ g/mL),共获得29株在制霉菌素平板上生长良好的抗性突变菌株。

2.2.4 高产菌株的筛选 将上述获得的29株抗性突变菌株分别接种至含105 μ g/mL、115 μ g/mL、125 μ g/mL、135 μ g/mL制霉菌素平板,经初筛后共获得36个生长良好的单菌落;之后,将再通过复筛获得的菌株发酵,经HPLC定量分析后,紫杉醇产量凡高于出发菌株NCEU-1(其紫杉醇产量为314.07 μ g/L)的突变株即为正变株(试验结果见表2)。最后选出了4株紫杉醇产量有所提高的菌株(正变率为13.8%),其中在制霉菌素含量为135 μ g/L的抗性平皿中筛选出的UL_{04.5}诱变株的紫杉醇产量较出发菌株有明显提高,以Sigma公司生产的紫杉醇标准品图谱为对照,经HPLC定量分析后,计算该诱变株发酵液中紫杉醇含量为418.24 μ g/L。每次试验测定发酵液中紫杉醇含量都采用3个平行组,测试结果为各重复的平均值。对菌株UL_{04.5}连续传代培养,结果发现该突变株遗传稳定性较好,传代两次产紫杉醇量稳定。试验经5次重复均得出了一致的结果,证明该突变株紫杉醇产量具有十分可靠的稳定性。

表2 制霉菌素抗性与紫杉醇产量间的关系

Table 2 The relationship of between nystatin resistance and the yield of taxol

Nystatin concentration (μ g/mL)	Amount of clones	Amount of positive mutation	The yield of taxol of positive mutation
105	16	0	
110	12	1	327.46 μ g/L
125	6	2	356.63 μ g/L
135	2	1	418.24 μ g/L

本试验对制霉菌素抗性与紫杉醇产量间的关系进行了探讨, 研究表明突变菌株获得制霉菌素抗性的同时也提高了紫杉醇产生菌产生紫杉醇的能力, 即随着制霉菌素抗性的提高, 其紫杉醇产量也随着相应地提高。目前, 制霉菌素抗性与紫杉醇产量之间的相关性机理尚不能做出确切的理论解释, 推测可能是制霉菌素抗性基因与紫杉醇产量某一相关基因紧密连锁, 或者是二者处于同一操纵子调控之下, 或处于相同正调控基因的影响之下发挥其生物学功能。

近来紫外线诱变原生质体已成功应用于多种微生物, 本文首次研究了紫杉醇产生菌原生质体的制备与再生并确定了其最佳条件。采用紫外线和氯化锂复合诱变紫杉醇产生菌原生质体的方法筛选紫杉醇高产菌株, 为树状多节孢 (*Nodulisporium sylviforme*) 菌种诱变提供了可靠的途径; 同时, 在紫杉醇高产菌株的选育中, 以制霉菌素抗性作为相关选择性状能够推进此类微生物的快速育种, 并为发酵法生产抗癌药物紫杉醇提供了有应用前景的高产菌株。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Wani MC, Taylor HL, Wall ME *et al.* Plant antitumor agents VI: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 1971, **93**: 2325 - 2327
- [2] Woo HL, Swenerton KD, Hoskins PJ. Taxol is active in platinum resistant endometrial adenocarcinoma. *Ann J Clin Oncol*, 1996, **19**

(3): 290 - 291

- [3] Jones WB, Schneider J, Shapiro F *et al.* Treatment of resistant gestational choriocarcinoma with Taxol: A report of two cases. *Gynecol Oncol*, 1996, **61**(1): 126 - 130
- [4] Pulkkinen JO, Elomaa L, Joensuu H *et al.* Paclitaxel-induced apoptotic changes followed by time-lapse video microscopy in cell lines established from head and neck cancer. *J Can Res Clin Oncol*, 1996, **122**(4): 214 - 218
- [5] Zhou DF(周东坡), Ping WX(平文祥), Sun JQ(孙剑秋) *et al.* Study on isolation of taxol-producing fungus. *Journal of Microbiology*(微生物学杂志) 2001, **21**(1): 18 - 20
- [6] Zhou DF(周东坡), Sun JQ(孙剑秋), Yu HY(于寒颖) *et al.* *Nodulisporium*, A genus new to china. *Mycosystema*(菌物系统), 2001, **20**(2): 148 - 149
- [7] Zhao K(赵凯), Zhou DF(周东坡), Wang W(王伟). Effect of the components of culture on taxol-producing strain *Nodulisporium Sylviforme* for the yield of taxol. *Journal of Fungal Research*(菌物研究) 2003, **12**: 18 - 20
- [8] Zhao K, Zhou DP, Ping WX *et al.* Study on preparation and regeneration of protoplast from taxol-producing fungus *Nodulisporium sylviforme*. *Nature and Science* 2004, **2**(2): 52 - 59
- [9] Sun W(孙伟), Liu AY(刘爱英), Liang ZQ(梁宗琦). Breeding for the high-yield Monacolin K strains of *Monascus sp.* by the mutagenesis of UV & LiCl. *Journal of Huazhong Agricultural University*(华中农业大学学报) 2004, **23**(1): 168 - 170