

紫杉醇高产菌株的原生质体诱变选育及其遗传变异初探

赵 凯^{1,2} 平文祥¹ 马 玺¹ 刘 军¹ 周东坡^{1*}

(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)

摘 要 :以紫杉醇产生菌 NCEU-1 为出发菌株 ,分别采用紫外线和紫外线与氯化锂复合诱变方法对其原生质体进行诱变 ,获得了两株高产紫杉醇的突变株——UV₄₀₋₁₉ 和 UL₅₀₋₆ ,其紫杉醇产量从出发菌株的 314.07 μ g/L 分别提高至 376.38 μ g/L 和 392.63 μ g/L ;同时 ,又采用 RAPD 和同工酶技术对出发菌株 NCEU-1 与两高产株 UV₄₀₋₁₉ 和 UL₅₀₋₆ 间的遗传差异进行了研究。结果表明 ,出发菌株与诱变菌株之间以及两诱变菌株之间都存在明显差异 ,为进一步研究与紫杉醇合成相关基因及诱变株产量提高的分子机制奠定了基础。

关键词 :紫杉醇产生菌 原生质体诱变 遗传差异

中图分类号 :Q933 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)03-0355-04

紫杉醇(Taxol)是一种复杂的具有抗癌活性的二萜生物碱,最早是由美国的 Wani 等(1971)^[1]分离自短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)。在体内,紫杉醇作用机理是抑制微管蛋白的解聚,破坏细胞微管的功能,从而影响纺锤体的形成,抑制肿瘤细胞的有丝分裂^[2];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^[3~5]。树状多节孢(*Nodulisporium sylviforme*)是周东坡等(2001)^[6,7]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。

本研究旨在通过原生质体诱变,进一步提高紫杉醇产量,并对高产菌株和出发菌株间的遗传差异进行分析,找出变异菌株与出发菌株间的分子差异,以期获得标志原生质体诱变后的特征性变异的分子信息,为下一步研究紫杉醇生物合成相关基因和分子育种提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 :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(*Nod-*

ulisporium sylviforme)^[6,7],其孢子经 UV、EMS、⁶⁰Co、NTG 等一系列诱变获得的突变株 NCEU-1(其紫杉醇产量为 314.07 μ g/L),以此作为本研究的出发菌株;

1.1.2 培养基 :PDA 液体培养基^[8];再生培养基:向 PDA 固体培养基中加入氯化钠,使其终浓度为 0.7mol/L 后灭菌;改良的 S-7 培养基^[9]:在原 S-7 基础上将苯丙氨酸增至 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 :Pst I、T4 连接酶、dNTP、Taq DNA 聚合酶、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司;pGEM-T Vector 购自 Promega 公司;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;溶菌酶(lysozyme)购自中国科学院生物化学研究所;其它的各种生化试剂等均为国产分析纯。

1.2 菌丝体培养和收集

经 PDA 斜面培养基活化的出发菌株 NCEU-1,在 PDA 液体培养基中再活化 1 次(50mL/250mL 锥形瓶)。然后,以 3% 接种量接种至 PDA 液体培养基,28 $^{\circ}$ C 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)洗涤两次,再转入平底试管,每管湿菌体重量 1g。

基金项目 :黑龙江省“十五”重大攻关项目(GA02C101)哈尔滨市重点项目(011421126)

* 通讯作者。Tel 86-451-88194798 E-mail zhoudp@yahoo.com.cn

作者简介 赵 凯(1973-)男,黑龙江人,讲师,在站博士后,主要从事于生物制药与微生物方面的研究。E-mail zk395@yahoo.com.cn

收稿日期 2004-08-17,修回日期 2005-01-08

1.3 原生质体制备和再生

参考文献 10 进行。

1.4 原生质体诱变^[11]

将制备的原生质体用 0.7mol/L 氯化钠调整,使其终浓度为 10^6 个/mL。照射前,先打开紫外灯预热 30min,使光波趋于稳定,然后将稀释好的原生质体悬液 5mL 放入直径 6cm 盛有无菌转子的平皿中。紫外线照射条件为:灯管距离培养皿 30cm,30w 紫外灯照射过程用磁力搅拌器搅拌,照射一定时间后,在红灯照明下,系列稀释原生质体悬液;另一组悬浮在含 6mg/mL LiCl 的溶液中作紫外照射(复合诱变)后,再做系列稀释。采用双层平板培养法分别于再生培养基再生^[10],在 28℃ 恒温培养箱中暗培养 6d,获得原生质体再生株。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。原生质体诱变致死率的计算公式如下:

原生质体诱变致死率(R_{ipl})=[1 - 诱变处理后原生质体再生率(R_{ipr})/诱变处理前原生质体再生率(R_{pr})]×100%

1.5 基因组 DNA 提取

参考文献 12 提取。

1.6 同工酶的提取

培养出发菌株 NCEU-1 和突变株,收集菌体,加入 Tris-柠檬酸提取液(Tris 6.2g,柠檬酸 1.6g,加蒸馏水定溶至 1000mL,调 pH 值至 8.0)在冰浴中研磨后,置超低温高速冷冻离心机中离心提取酶液。将所提取的酶液进行凝胶电泳,用过氧化物酶同工酶、酯酶同工酶、淀粉酶同工酶、过氧化氢酶同工酶、可溶性蛋白和游离组蛋白对凝胶进行染色^[13]。

1.7 RAPD 扩增

以紫杉醇产生菌基因组 DNA 为模板,进行 RAPD 扩增。引物:引物 S1~S125 购自上海生物工程有限公司,引物 S86 序列:5'-GTGCCTAACC-3',引物 S121 序列:5'-ACGGATCCTG-3'。反应体系:模板 DNA 200ng,引物 5ng,dNTP 0.2mmol/L,10×Ex Tag Buffer(Mg²⁺),Ex Tag DNA 聚合酶 0.5U。反应条件:94℃ 5min,94℃ 1min,36℃ 1min,72℃ 2min,2~40 个循环,72℃ 7min。

2 结果和讨论

2.1 紫杉醇高产菌株的诱变

2.1.1 原生质体的诱变:用 0.7mol/L NaCl 洗涤菌丝体后,再按照 1mL 酶液/250mg 湿菌体的比例用复合酶系(pH5.5~6.0 的 0.7mol/L NaCl 配制的,由 3% 溶壁酶 + 3% 蜗牛酶 + 1% 的溶菌酶 + 3% 纤维素

酶组成)悬浮菌体,30℃ 酶解 6h。原生质体最大产量为 2.23×10^7 个/mL。将获得的原生质体过滤洗涤、系列稀释后,在含 0.7mol/L NaCl 的 PDA 再生培养基上,采用双层平板培养法再生制备到的原生质体,测得原生质体再生率最高达 72%。

向原生质体悬液中加入 0.6% LiCl 后,立即在紫外光下照射 10s、20s、30s、40s、50s、60s,分别取样进行系列稀释,在 PDA 高渗再生培养基上避光培养。同时,以紫外线单独诱变作为对照。从致死率与诱变剂量的关系(图 1)中可以看出,随着诱变剂量的增加,致死率也增加,但并不呈现明显的正比关系。

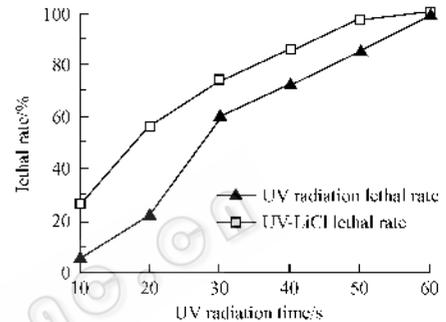


图 1 原生质体致死率

Fig.1 The lethal rate of protoplast

2.1.2 高产菌株的筛选:为降低工作量提高筛选效率,首先摸索了获得高正变率的原生质体致死率范围。每个剂量都采用五次重复,测试结果为各重复的平均值,共获得 786 个再生株,初筛了 542 个再生株(其中经紫外线单独诱变获得的再生株为 215 个,紫外线和 LiCl 复合处理获得的再生株为 327 个)将初筛获得的再生株再经复筛,然后将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(紫杉醇产量为 314.07μg/L)的突变株即为正变株。试验结果表明(表 1),UV 单独处理照射 50s 时紫杉醇产生菌的正变率较高;UV 和 LiCl 复合处理 40s 时正变率较高。

表 1 正变率与诱变剂量的关系

Table 1 The relationship of between positive mutation rate and mutagen dose

Result	UV			UV + 0.6% LiCl		
	40s	50s	60s	40s	50s	60s
Positive mutation rate/%	6.5	42.8	40.0	12.8	45.3	38.5
The number (positive mutants / tested mutants)	14/215	92/215	86/215	42/327	148/327	126/327

根据上述试验结果,本试验采用紫外线单独处理 50s 和紫外线和 LiCl 复合处理 40s 处理原生质体,共获得 274 个再生株,初筛了 250 株,复筛了 165

株 终筛了 30 株 ,最后选出了 12 株紫杉醇产量有所提高的菌株 ,其中 UV₄₀₋₁₉、UL₅₀₋₆ 两个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 ,计算两诱变株发酵液中紫杉醇含量分别为 376.38μg/L 和 392.63μg/L。每次试验测定发酵液中紫杉醇含量都采用 3 个平行组 ,测试结果为各重复样的平均值。试验经五次重复均得出了一致的结果 ,证明此两株诱变株紫杉醇产量具有十分可靠的稳定性。

原生质体诱变正变率的计算公式如下 :

原生质体诱变正变率%(Rpm)= 正变株数(Npm)/测试的突变株总数(Tm)× 100%

2.2 UV₄₀₋₁₉ 和 UL₅₀₋₆ 的遗传变异分析

2.2.1 同工酶分析 (1)各菌株间淀粉酶的差异 :由图 2 可见 ,淀粉酶同工酶数量少 ,酶谱带宽 ,其中大部分淀粉酶同工酶集中在凝胶柱的上部。在 Rf 值 0.06~0.70 之间 ,出发菌株 NCEU-1 有 3 条谱带 ,诱变株 UL₅₀₋₆、UV₄₀₋₁₉ 只有 2 条谱带 ,且酶谱完全不一致 菌株 UL₅₀₋₆ 丢失了 Rf 值为 0.70 的谱带 ;菌株 UV₄₀₋₁₉ 丢失了 Rf 值为 0.16 的谱带 ,即两种诱变条件分别使淀粉酶的 cDNA 发生了不同的突变。

(2)各菌株间可溶性蛋白的差异 :由图 3 可见 ,出发菌株 NCEU-1 在 Rf 值 0.23~0.96 之间有 10 条谱带 ,菌株 UL₅₀₋₆ 在 Rf 值 0.18~0.68 之间有五条谱带 ,菌株 UV₄₀₋₁₉ 在 Rf 值 0.18~0.86 之间有八条谱带。比较可知 ,诱变菌株 UL₅₀₋₆ 较出发菌株 NCEU-1 丢失了 Rf 值为 0.26、0.45、0.74、0.79、0.86、0.96 六条谱带 ,增加了 Rf 值为 0.18 一条谱带 ;诱变菌株 UV₄₀₋₁₉ 较出发菌株 NCEU-1 丢失了 Rf 值为 0.23、0.42、0.45、0.79、0.96 五条谱带 ,增加了 Rf 值为

0.18、0.33、0.55 共 3 条谱带。由图可见 ,出发菌株 NCEU-1 与其诱变株 UL₅₀₋₆、UV₄₀₋₁₉ 仅共有 Rf 值为 0.61 和 0.68 两条谱带 ,且两诱变株共同增加了 Rf 值为 0.18 的一条可溶性蛋白谱带。

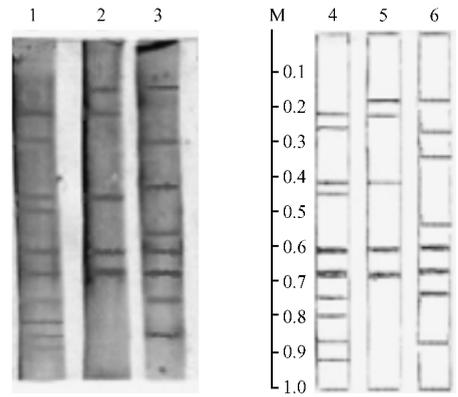


图 3 可溶性蛋白图谱

Fig.3 The analysis results of dissolubility protein
1 and 4 :Parent strain NCEU-1 2 and 5 :Mutants UL₅₀₋₆ 3 and 6 :Mutants UV₄₀₋₁₉ ,M :Ruler.

另外 ,本试验还对出发菌株 NCEU-1 和其诱变株 UL₅₀₋₆、UV₄₀₋₁₉ 的过氧化物酶同工酶、脂酶同工酶、游离组蛋白等也进行了研究 ,结果表明各酶谱都发生了不同程度的改变。

2.2.2 RAPD 分析 :RAPD 在微生物群体的多样性分析中是一种非常实用的方法 ,其展示的谱带可以揭示生物体在分子水平上的差异。

为进行 RAPD 分析 ,按 1.5 获得了质量较好的 DNA。本试验先从 125 个随机引物(S1 ~ S125)中筛选出 37 个具有多态性且重复性较好的引物对出发菌株 NCEU-1 和其突变株 UL₅₀₋₆、UV₄₀₋₁₉ 进行 RAPD 分析。结果发现 ,所有引物对基因组 DNA 都能够扩增 ,且它们在各菌株之间扩增结果差别较大。

从图 4 可以看出 ,RAPD 产生了清晰明亮的扩

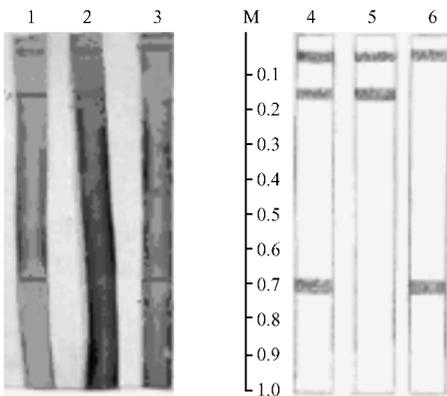


图 2 淀粉酶同工酶酶谱

Fig.2 The analysis results of amylase isozyme
1 and 4 :Parent strain NCEU-1 2 and 5 :Mutant UL₅₀₋₆ 3 and 6 :Mutant UV₄₀₋₁₉ ,M :Ruler.

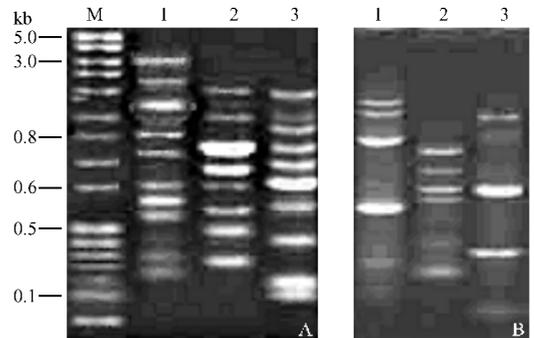


图 4 不同引物的扩增图谱

Fig.4 The amplified diagram of different primers
A :Primer S121 ;B :Primer S86. M. Marker ;1. Parent strain NCEU-1 2. Mutant UV.

增图谱, 扩增图谱的条带分布合理, 扩增带数为 3 ~ 19 条或更多, 扩增片段的分子大小在 100 ~ 3000bp 之间。亲株和两诱变株的 RAPD 图谱呈现出显著的差异, 表明在诱变过程中菌株的染色体结构发生了明显的变化, 即使来自同一亲株的不同突变株其变化也有所不同。紫杉醇高产株与出发株在 RAPD 图谱中所呈现的 DNA 差异片段, 可为进一步分析与紫杉醇产量提高有关的突变基因提供线索。

从本试验结果可以看出, 出发菌株与突变菌株间以及突变菌株之间都存在明显差异, 这表明诱变菌株紫杉醇产量的提高是由于 DNA 结构的改变与基因突变的结果。为了进一步分析此差异的规律性, 还需对出发菌株和更多的原生质体诱变菌株之间的遗传差异进行分析, 以了解 DNA 结构的改变与哪些基因位点有关以及与紫杉醇产量如何联系等, 尤其是与紫杉醇产量提高相关的基因突变的分子证据, 尚有待于进一步的深入研究。

参 考 文 献

[1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, *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] 周东坡, 平文祥. 微生物发酵法生产抗癌药物紫杉醇. 北京: 中国科学技术出版社, 2003.

[3] Woo H L, Swenerton K D, Hoskins P J. Taxol is active in platinum resistant endometrial adenocarcinoma. *Ann J Clin Oncol*, 1996, **19** (3): 290 - 291.

[4] Jones W B, 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.

[5] Pulkkinen J O, 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.

[6] 周东坡, 平文祥, 孙剑秋, 等. 紫杉醇产生菌分离的研究. 微生物学杂志, 2001, **21**(1): 18 - 20.

[7] 周东坡, 孙剑秋, 于寒颖, 等. 中国一新记录属——多节孢属. 菌物系统, 2001, **20**(20): 148 - 149.

[8] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1999.

[9] Sterle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxant production by *Taxomyces andreanae*, an endophttic fungus of pacific yew. *Science*, 1993, **260**(9): 214 - 216.

[10] Zhao K, Zhou D, Ping W, *et al.* Study on the preparation and regeneration of protoplasts from taxol-producing fungus *Nodulisporium sylviforme*. *Nature and Science*, 2004, **2**(2): 52 - 59.

[11] Zhou D, Zhao K, Ping W, *et al.* Study on the mutagenesis of protoplast from taxol-producing fungus *Nodulisporium sylviforme*. *J Am Sci*, 2005, **1**(11): 58 - 67.

[12] 何秋月. 真菌菌丝体培养和提取 DNA 方法的改进. 菌物系统, 2000, **19**(3): 434 - 435.

[13] 黄素华, 赖钟雄. 荔枝胚状体 POD 与 EST 同工酶酶谱分析. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, **31**(4): 467 - 469.

Breeding of high-yield strain of taxol by mutagenesis of protoplast and primary discussion of genetic differences between mutants and their parent strain

ZHAO Kai^{1,2} PING Wen-xiang¹ MA Xi¹ LIU Jun¹ ZHOU Dong-po^{1*}

(¹ Life and Science college of Hei Longjiang University, Harbin 150080, China)

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

Abstract: The breeding of high-yield strain of taxol was performed by protoplast mutagenesis of strain NCEU-1 using ultra-violet radiation and combined treatment of UV and LiCl. The mutants UV₄₀₋₁₉ and UL₅₀₋₆ were obtained, which raised the taxol yield from 314.07μg/L to 376.38μg/L and 392.63μg/L respectively. Genetic differences between the mutants UV₄₀₋₁₉, UL₅₀₋₆ and their parent strain were primarily compared through random amplified polymorphic DNA (RAPD) and isozyme technique. The results showed that the genetic differences were very obviously between the parent strain and its mutants and between the two mutants, which laid foundation of molecular mechanism for the study of genes related to the taxol biosynthesis and mutants for raising the taxol yield.

Key words: Taxol-producing fungi, Protoplast mutagenesis, Genetic difference

Foundation item: The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of Heilongjiang Provinc (GA02C101)

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

First author: ZHAO Kai, E-mail: zk395@yahoo.com.cn

Received date: 08-17-2004