

偶发分枝杆菌 MF2 和 MF96 生物转化差异的机理研究

凌良飞¹ 戈梅^{2,3*} 付磊⁴ 黄为一^{1*} 陈代杰^{2,3}

(¹南京农业大学微生物学系 南京 210095) (²上海医药工业研究院 上海 200040)

(³上海来益生物药物研究开发中心 上海 201203) (⁴中国药科大学药学院 南京 210009)

摘要 :偶发分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*)亲株(MF2)和突变株(MF96)存在生物转化差异,通过静息细胞系统转化研究发现:在反应达到平衡后,亲株中产物大部分以雄甾烯二酮(Δ^4 -androstenedione, 4AD)的形式存在,而突变株中产物大部分为睾酮(testosterone, TS)。为了研究二者的转化差异,采用无细胞系统转化的手段进行了比较研究,结果表明:在添加足量的 NAD⁺ 和 NADH 后,亲株和突变株的转化产物比例基本相同。由此推测:在静息细胞中的转化产物比例不同可能是由于辅酶 NAD⁺ 与 NADH 的比例不同引起的。最后通过测定亲株和突变株中辅酶 NAD⁺ 和 NADH 的比例证实该推测是正确的。

关键词 :17 β -甾体羟基脱氢酶, 辅酶, 生物转化

中图分类号 :Q935 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)04-0526-04

睾酮在人体内主要由睾丸间质细胞产生,在临床上睾酮可以治疗原发性和继发性男性性腺功能减退,维持男性第二特征、性功能^[1],也可以防止骨质疏松^[2],并维持正常肌块、红细胞的生成;睾酮也可作为同化激素,促使蛋白质的合成及细胞的生成^[3]。其生物合成的最后一步是通过 17 β -甾体羟基脱氢酶(17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, EC 1.1.1.63, 17 β -hsd)将雄甾烯二酮(Δ^4 -androstenedione, 4AD)还原得到睾酮(testosterone, TS)^[1](图 1)。这一反应在细菌、真菌中也能发生^[5-7]。

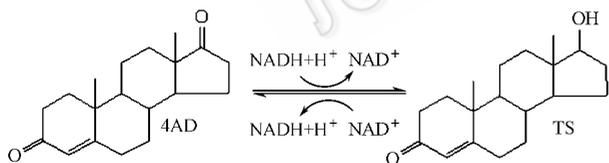


图 1 雄甾烯二酮与睾酮间的相互转化

Fig.1 Intertransformation between 4AD and TS

在上海来益生物药物研究开发中心研究 4AD 的基础上^[4],通过对偶发分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*)进行各种诱变首次得到了一株可将植物甾醇转化为 TS 的高产菌,为了探讨亲株和突变株生物转化的差异,本文对亲株和突变株中的 17 β -甾体羟基脱氢酶和参与反应的辅酶 NAD⁺ 和 NADH 进行了比较研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 :偶发分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*) MF2 和 MF96,来自上海来益生物药物研究开发中心。

1.1.2 主要试剂和仪器 :NAD⁺、NADH、4AD 和 TS 均为 Sigma 产品;JY-92-II 超声波细胞破碎仪购于上海新芝生物技术研究所;Agilent1100 series 高效液相色谱购于 Agilent 公司;色谱柱为 ODS C-18 型反相柱购于大连化学药物研究所。

1.2 培养基、种子培养、细胞收集

均按文献[4]操作。将 50mL 的富集培养物 4℃ 4000 × g 离心 10min,收集菌体,分别以无菌水和 pH 为 6.0 的 PBS 缓冲液(下同)洗涤一次,称重后按 1g/3mL 的浓度稀释在 PBS 缓冲液中。

1.3 静息细胞系统的转化

参考文献[10]操作。在 10mL 三角瓶中,加入 1mL 菌悬液,分别加入 4AD 和 TS 的乙醇溶液(13.0g/L)0.02mL,在 28℃ 转速 220r/min 的条件下转化,分别于 0、20、40、60、80、100、120min 取样(每组 3 个重复),加 4mL 无水甲醇终止反应。15000 × g 离心 10min,上清用 HPLC 法测定 4AD 和 TS 浓度,计算转化率。以反应时间为横坐标,转化率为纵坐标,绘

基金项目 :国家“十五”科技攻关项目(2003AA2Z3149)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-21-50801478 E-mail :gemei @yeah.net(戈梅);microb@njau.edu.cn(黄为一)

作者简介 :凌良飞(1980-)男,江苏盐城人,硕士研究生,研究方向为微生物发酵与酶工程。E-mail :lingliangfei @126.com

收稿日期 :2004-11-08,修回日期 :2005-01-11

制反应过程曲线。

1.4 无细胞系统的制备及其转化

在冰浴条件下,超声波处理菌悬液破碎细胞,处理后的悬液在 4℃,10000 × g 离心 10min,所得上清即为无细胞抽提液(Cell-free extract)。在 10mL 三角瓶中加入 1mL 无细胞抽提液,分别加入 TS 和 4AD 的乙醇溶液(13.0g/L)0.02mL,转化条件同 1.3。无细胞抽提液加入 TS 和 4AD 后,各自再分别加入辅酶 NAD⁺ 和 NADH 至终浓度为 350mmol/L,转化条件同 1.3。

1.5 辅酶 NAD⁺、NADH 的提取

参考文献 12,13 操作。将新鲜制备的菌体放入 -70℃ 的超低温冰箱,冰冻成固体状后取出,在低温下用研钵研成粉末状。测定 NAD⁺ 时,取 0.2g 菌体粉末,用 1mL 事先预冷的 3mol/L 高氯酸抽提。在冰浴中,超声处理抽提悬液,然后用 2mol/L 的氢氧化钾溶液中和,并 10000 × g 离心 10min。上清送 HPLC 测定浓度(每组 3 个重复)。测定 NADH 时,取 0.2g 菌体粉末,用 1mL 事先预冷的含有 50% 乙醇(V/V)的 0.5mol/L 氢氧化钾溶液抽提,然后在冰浴中超声处理,10000 × g 离心 10min,上清送 HPLC 测定浓度(每组 3 个重复)。

1.6 提取方法收率的测定

取 NAD⁺ 和 NADH 的标准品,分别配制成浓度为 70μg/mL 和 58μg/mL 的标准溶液。取 1mL 标准溶液,按 NAD⁺ 及 NADH 提取方法处理后送 HPLC 测定其浓度,并计算出此方法的收率。

1.7 辅酶 HPLC 分析方法

根据洪平等^[11]的方法进行测定。

2 结果

2.1 静息细胞的转化反应

图 2 为静息细胞转化 TS 和 4AD 的反应曲线。从图 2-A 中可以看出,突变株可快速将大部分的 4AD 转化为 TS,反应曲线表现出明显的 S 型,而亲株只能转化少量的 4AD。而在转化 TS 的反应中,如图 2-B 所示,情况恰好相反,亲株可快速将大部分的 TS 转化为 4AD,而突变株只能转化少量的 TS。这种现象可能有两种原因:一是催化可逆反应的酶活力有差异——亲株中催化 4AD 生成 TS 的酶活力很低,催化 TS 生成 4AD 的酶活力很高,突变株中正好相反;二是亲株和突变株中参与反应的辅酶水平存在差异。为确定其原因,我们又进行了无细胞系统中的转化实验。

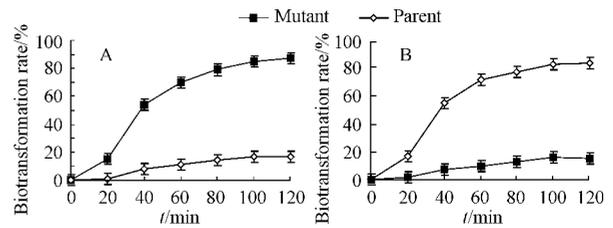


图 2 (A) 静息细胞转化 4AD 的反应曲线;(B) 静息细胞转化 TS 的反应曲线

Fig.2 (A) Reaction curve of biotransformation of 4AD in resting cell ; (B) Reaction curve of biotransformation of TS in resting cell

2.2 无细胞系统的转化

无细胞系统中转化 4AD 和 TS 的结果如图 3 所示。从图中我们可以看出,在无细胞系统中,没有加入辅酶后,反应结果和静息细胞转化相似:突变株对 4AD 的转化率比亲株高,而亲株对 TS 的转化率比突变株高,但转化率都明显下降,可能是细胞被破碎后,酶和辅酶被稀释,从而导致转化率下降。

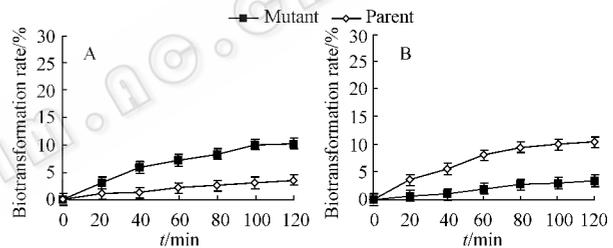


图 3 无细胞系统转化 4AD (A) 和 TS (B)

Fig.3 Biotransformation of 4AD (A) and TS (B) in cell-free extract

加入足量的 NAD⁺ 和 NADH 后,无细胞系统中转化 4AD 和 TS 的结果如图 4 所示。从图中我们可以看出,在无细胞系统中,加入足量的 NAD⁺ 后,亲株和突变株中的酶都可将 TS 转化为 4AD,两者反应曲线类似,转化率也大致相同;加入足量的 NADH 后,亲株和突变株中的酶都可将 4AD 转化为 TS,两者反应曲线类似,转化率也大致相同。因此,我们推测,亲株和突变株中产物比例的不同是由于辅酶

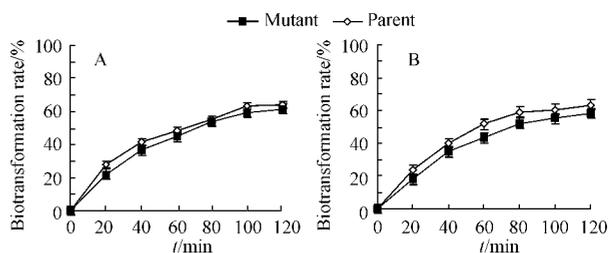


图 4 (A) 无细胞系统转化 TS (加入 NAD⁺); (B) 无细胞系统转化 4AD (加入 NADH)

Fig.4 (A) Biotransformation of TS in cell-free extract (supplemented with NAD⁺); (B) Biotransformation of 4AD in cell-free extract (supplemented with NADH)

NAD⁺/NADH 的比例不同引起的。为了证明这一点,我们测定了亲株和突变株中辅酶 NAD⁺ 与 NADH 的比例。

2.3 处理过程中 NAD⁺、NADH 收率的测定

按 1.5 所述的方法处理后, HPLC 测定 NAD⁺ 和 NADH 的浓度。NAD⁺ 和 NADH 的回收率分别可达 98% 和 97%, 说明本文的处理方法收率较高, 可以准确测定亲株与突变株中 NAD⁺ 和 NADH 的浓度。

2.4 亲株和突变株中 NAD⁺ 和 NADH 水平的测定

按 1.5 中所述的方法处理样品后, HPLC 测定的图谱如图 5 所示。将 NAD⁺ 和 NADH 的标准品配制成不同浓度的曲线, 分别测定后制成标准曲线。根据标准曲线测定样品中 NAD⁺ 和 NADH 的浓度。计算亲株中 $C_{\text{NAD}^+} = 41.9 \mu\text{mol/L}$, $C_{\text{NADH}} = 0.5 \mu\text{mol/L}$; 突变株中 $C_{\text{NAD}^+} = 47.3 \mu\text{mol/L}$, $C_{\text{NADH}} = 55.0 \mu\text{mol/L}$ 。亲株中, 辅酶浓度之比 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}] = 41.9/0.5 = 83.8$, 而突变株中辅酶浓度之比 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}] = 47.3/55.0 = 0.79$, 明显低于亲株, 因此亲株的转化产物中 4AD 占大部分, 而突变株中 TS 占优势。

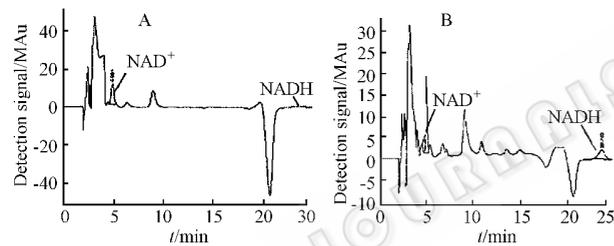


图 5 (A) 亲株中的 NAD⁺ 和 NADH 图谱; (B) 突变株中的 NAD⁺ 和 NADH 图谱

Fig.5 (A) NAD⁺ and NADH in parent stain; (B) NAD⁺ and NADH in mutant strain

3 讨论

关于对 17 β -甾体羟基脱氢酶的研究国内外有很多相关报道, 但主要侧重对动物(老鼠、人、猩猩)进行研究。目前为止, 对微生物中 17 β -甾体羟基脱氢酶的研究很少有报道^[7-9], 且主要集中在对其酶的分离、纯化上, 对偶发分枝杆菌中的 17 β -甾体羟基脱氢酶的研究还没有报道, 本文首次对一株偶发分枝杆菌及其突变株的 17 β -甾体羟基脱氢酶及其辅酶 NAD⁺/NADH 进行了比较研究。通过对两株菌在静息细胞系统和无细胞系统中转化 TS 和 4AD 及其辅酶含量测定, 确定亲株和突变株生物转化差异的因素是由于辅酶 NAD⁺ 和 NADH 的比例不同造成的。

亲株经过各种诱变后, DNA 碱基的化学结构和

顺序或数目发生变化, 导致 DNA 损伤(如嘌呤的失落和 DNA 的断裂)而引起突变。使突变株 MF96 的生理代谢发生了变化(如糖代谢、柠檬酸循环或脂类代谢等), 使其代谢有利于 NADH 和 H⁺ 的积累。如果将 4AD 转化为 TS 则需要大量的 NADH 和 H⁺, 而突变株中正好存在大量的 NADH 和 H⁺, 使其反应有利于向 TS 方向转化, 而亲株中存在大量的 NAD⁺, 不利于 4AD 的转化, 因此亲株的转化产物中 4AD 占大部分, 而突变株中 TS 占大部分。机理研究对于以后有目的、有方向地进行高产菌株的选育工作具有指导意义。相关工作我们将进一步报道。
致谢 本文承上海来益生物药物研究开发中心罗敏玉老师和上海医药工业研究院朱春宝研究员审阅, 谨致谢意!

参考文献

- [1] Carrie J B, William J B. Androgens in men-uses and abuses. *The new England Journal of Medicine*, 1996, **334**: 707-714.
- [2] 赵建军, 裴开颜. 雄激素和骨质疏松症. 国外医学计划生育分册, 2002, **21**(3): 136-138.
- [3] Tenover J L. 老年男性的睾酮替代疗法. 中华男科学, 2001, **7**(3): 141-146.
- [4] 李莹, 戈梅, 王旻, 等. 雄甾烯二酮转化菌的诱变育种. 中国医药工业杂志, 2003, **34**(7): 322-325.
- [5] Lo C, Pan C, Liu W. Production of testosterone from phytosterol using a single-step microbial transformation by a mutant of *Mycobacterium* sp.. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2002, **28**(5): 280-283.
- [6] Liu W, Lo C. Production of testosterone from cholesterol using a single-step microbial transformation of *Mycobacterium* sp.. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1997, **19**(4): 269-272.
- [7] Richard M, Ernest V, Lewis L. $\Delta^{17}\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of *Pseudomonas testosteroni*. *Journal of Biological Chemistry*, 1977, **252**(11): 3784-3790.
- [8] Donna W P, Paul T. Isolation of novel microbial 3 α -, 3 β -, and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, **260**(25): 13648-13655.
- [9] Tea L R, Marija Z M. Purification and characterization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from the filamentous fungus *Cochliobolus lunatus*. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 1996, **59**(2): 205-214.
- [10] 苏俊, 张国政, 路福平, 等. 静息细胞法对根霉 12-# 产抗生物质机理的研究. 生物技术, 2002, **12**(6): 28-30.
- [11] 洪平, 刘虎威, 靳光华, 等. 高效液相色谱法测定骨骼肌 ATP、ADP、AMP、NAD⁺、NADH 含量. 中国运动医学杂志, 2002, **21**(1): 57-60.
- [12] Klaidman L K, Leung A C, Adams J D. High-performance liquid chromatography analysis of oxidized and reduced pyridine dinucleotides in specific brain regions. *Anal Biochem*, 1995, **228**(2): 312-317.

- [13] Noack H ,Kunz W S ,Augustin W .Evaluation of a procedure for the simultaneous determination of oxidized and reduced pyridine nucleotides and adenylates in organic phenol extracts from mitochondria. *Anal Biochem* , 1992 , **202** (1) :162 – 165.

Mechanism study on difference of biotransformation between *Mycobacterium fortuitum* MF2 and MF96

LING Liang-fei¹ GE Mei^{2,3*} FU Lei⁴ HUANG Wei-yi^{1*} CHEN Dai-jie^{2,3}

(¹ Department of Microbiology , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

(² Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry , Shanghai 200040 , China)

(³ Shanghai Health Creation Center of Biopharmaceutical R&D , Shanghai 201203 , China)

(⁴ College of Pharmacy , China Pharmaceutical University , Nanjing 210009 , China)

Abstract : Biotransformation difference between parent strain (MF2) and mutant strain (MF96) of *Mycobacterium fortuitum* was observed. Biotransformation with resting cells showed that the major products of biotransformation by both parent and mutant strains are Δ^4 -androstenedione(4AD) and testosterone(TS). Experiments with cell-free extract system showed that the proportion of 4AD/TS obtained from parent and mutant strains was almost same when enough NAD^+ and NADH were supplied in this system. It was suggested that the difference of the ratio of products transformed by both strains in resting cell system may result from their different ratio of NAD^+ /NADH. This speculation was verified to be true by determination of the amount of NAD^+ and NADH presented in both strains.

Key words : 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase , Coenzyme , Biotransformation

Foundation item : The 10th Five Years Project for National Programs for Science and Technology Development of China (2003AA2Z3149)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-21-50801478 ;E-mail : gemei @yeah.net (GE Mei); microb@njau.edu.cn (HUANG Wei-yi)

Received date :11-08-2004