

氩离子注入介导麻黄基因组 DNA 转化获得产麻黄碱重组酵母菌

毛培宏^{1,2**}, 马向东^{1,3**}, 金 湘¹, 杨红梅², 娄 恺^{2*}

(¹ 新疆大学离子束生物技术中心 乌鲁木齐 830008)

(² 新疆特殊环境微生物实验室 新疆农业科学院微生物研究所 乌鲁木齐 830091)

(³ 湖北大学生命科学学院 武汉 430062)

摘 要 通过氩离子(Ar^+)注入介导蓝麻黄基因组 DNA 在异常汉逊酵母(*Hansenula anomala*)中随机转化,转化后的酵母菌经 BTB 指示性辅助筛选、斜面传代、液体培养、铜铬盐定性检测和 RP-HPLC 定量检测,获得了遗传稳定的以葡萄糖为碳源、 $NaNO_3$ 为氮源生物合成麻黄碱和(或)伪麻黄碱的重组酵母菌 3 株。液体培养 72h,RP-HPLC 测试胞外麻黄碱和伪麻黄碱的最高产量分别为 11.87mg/L 和 4.11mg/L,胞内伪麻黄碱最高含量为 294.86mg/g,干细胞胞内麻黄碱未检出。分析了 Ar^+ 注入介导蓝麻黄基因组 DNA 在酵母菌中的遗传转化效率,探讨了麻黄基因组 DNA 大分子的完整性对其在酵母菌中遗传转化的影响。

关键词: 氩离子注入;介导;麻黄基因组 DNA;重组酵母;麻黄碱

中图分类号: Q539, Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0905-05

麻黄碱(*l*-ephedrine)和伪麻黄碱(*d*-pseudoephedrine)是干旱半干旱荒漠地区药用植物麻黄的主要生物碱类次生代谢产物,具有重要的药用价值。在欧美国家,含麻黄碱的药物多达 300 余种。据专家预测,未来几年国内外市场对麻黄碱的需求量每年可达 2600 ~ 3000 吨。中国是世界上唯一通过天然植物提取麻黄碱的国家,提取 1 吨麻黄碱需要消耗掉 200 ~ 300 吨野生麻黄^[1]。麻黄是重要的蓄水保土、防风固沙的灌木植物,对维持荒漠地区脆弱的生态平衡具有显著作用,其种群所处生境十分恶劣,种子很难萌发,在麻黄生长区,很难见到麻黄的实生苗。因此,野生麻黄资源一旦遭到破坏,则很难恢复。由于经济利益的驱动,人们对麻黄长期的掠夺式采挖,致使荒漠地区的生态环境日益恶化。若能构建产麻黄碱和伪麻黄碱的微生物工程菌株,最终实现麻黄碱和伪麻黄碱的微生物发酵生产,将对我国干旱半干旱荒漠地区生态环境的保护产生深远的影响。但是,药用植物的次生代谢产物一般由多基因控制^[2],麻黄碱和伪麻黄碱的生物合成途径复杂^[3~5],且受环境影响较大,加之目前还没有与麻

黄碱生物合成相关的基因的任何信息,因此,至今无人按照常规的基因工程方法构建工程菌。在此背景下,进行药用植物麻黄基因组 DNA 的遗传转化构建产麻黄碱和伪麻黄碱转基因工程菌的研究具有重要的理论和现实意义。

离子注入生命体的独特机理,使其成为一种新的转基因手段^[6]。在药用植物基因组 DNA 的遗传转化方面,宋道军等^[7]利用离子注入介导法将药用植物银杏总 DNA 导入 3-16 和 SR2-14-2 两种西瓜,在转化的西瓜当代叶片中检测出了银杏内酯的含量分别为 17.0756 μ g/g 和 45.9998 μ g/g,这表明外源 DNA 供体植物银杏中与银杏内酯生物合成相关的多个基因在受体植物西瓜中得到了表达。但至今还没有药用植物总 DNA 或基因组 DNA 在微生物中遗传转化成功的报道,基于离子注入介导 DNA 大分子遗传转化的原理^[8],我们开展了离子注入介导蓝麻黄基因组 DNA 在异常汉逊酵母菌中的随机转化研究,以期获得产麻黄碱和伪麻黄碱的转基因酵母工程菌株,分析了 Ar^+ 注入介导蓝麻黄基因组 DNA 在酵母菌中的遗传转化效率,并对麻黄基因组 DNA 大

基金项目: 国家自然科学基金(10365001)

* 通讯作者。Tel: 86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

** 作者简介: 对文章有同等贡献。毛培宏(1960 -)男,湖北麻城人,研究员,主要从事微生物代谢调控、离子束生物技术和分子生物学研究与教学。E-mail: phmao@xju.edu.cn; phmao@china.com; 马向东(1961 -)男,湖北仙桃人,博士,副教授,主要从事微生物学和分子生物学教学与研究。E-mail: mabo1978@163.com

其他作者: 凌海秋¹, 柯 涛³, 武宝山¹

收稿日期: 2006-12-31; 接受日期: 2007-01-19; 修回日期: 2007-03-30

分子的完整性对其在酵母菌中遗传转化的影响进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:异常汉逊酵母(*Hansenula anomala*)来源于中国普通微生物菌种保藏管理中心(编号 2.340)。

1.1.2 主要试剂和仪器:葡萄糖·H₂O, NaNO₃, 酵母膏粉, K₂HPO₄·3H₂O, MgSO₄·7H₂O, 琼脂粉, 溴百里香酚蓝(BTB), CuSO₄, NaOH, 乙腈(层析纯), 石英砂, 变色硅胶, CTAB 及基因组 DNA 提取用试剂(包括 RNase)等从 ABI 公司购买; 麻黄碱和伪麻黄碱标准品由新疆国际实业股份有限公司麻黄素事业部提供, 符合 FDA 标准。IBB Device 1 多功能离子注入机由中国科学院等离子体物理研究所研制并赠送, Sigma 3-18K 离心机购自 Sigma 公司, Waters 1525 反相高压液相色谱仪(RP-HPLC)购自 Waters 公司。

1.1.3 培养基:① YPD 培养基^[9](每升含酵母膏 10g, 蛋白胨 20g, 葡萄糖 20g); ② BTB 平板培养基(每升含葡萄糖·H₂O 100g, NaNO₃ 10g, 酵母膏粉 5g, K₂HPO₄·3H₂O 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, BTB 0.2g, 琼脂粉 10g, pH7.0); ③ 斜面培养基(每升含葡萄糖·H₂O 100g, NaNO₃ 10g, 酵母膏粉 5g, K₂HPO₄·3H₂O 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, 再加入琼脂粉 10g, pH7.0); ④ 液体培养基(每升含葡萄糖·H₂O 100g, NaNO₃ 10g, 酵母膏粉 5g, K₂HPO₄·3H₂O 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, pH7.0)。

1.2 野生麻黄的采集及其基因组 DNA 的制备

野生蓝麻黄(*Ephedra glauca*)的采集及应用 CTAB 法制备其基因组 DNA 的方法均按参考文献[10]的方法进行。

1.3 酵母菌膜的制备

1.3.1 以保护液为载体的菌膜制备^[11]将酵母菌斜面菌种接入 YPD 培养液中, 230r/min, 28℃~30℃培养 12h。用保护液对酵母菌培养液进行稀释。取浓度为 1.0×10⁷ CFU/mL 的菌体稀释液 0.1mL, 用无菌玻璃刮铲均匀涂布于直径为 90mm 的无菌平皿中央, 无菌风吹干制成菌膜。

1.3.2 以基因组 DNA 的 TE 缓冲液为载体的菌膜制备取 28℃~30℃培养 12h 的酵母菌的斜面菌种 2 环悬浮于浓度为 400μg/mL 的麻黄基因组 DNA 的 TE 缓冲液中, 使菌体浓度达到 1.0×10⁸ CFU/mL, 轻

摇使菌体分散, 取 0.1mL 用无菌玻璃刮铲均匀涂布于直径为 90mm 的无菌平皿中央, 无菌风吹干制成菌膜。

1.4 酵母菌膜的离子注入^[11]

将 2 种方法制备的菌膜分别置于离子注入机小真空靶室的无菌靶台上, 采用能量 15KeV、剂量 15.0×10¹⁵ ions/cm² 的 Ar⁺ 在 10⁻³ Pa 真空状态下, 以 5s 脉冲方式注入酵母菌膜。以真空条件下未注入 Ar⁺ 的酵母菌膜为对照。

1.5 麻黄基因组 DNA 的导入及转化菌株的筛选

离子注入结束后, 立即用 2mL 浓度为 400μg/mL 的蓝麻黄基因组 DNA 的 TE 缓冲液浸泡离子注入后的菌膜, 28℃~30℃静止温育 2h 后, 用无菌玻璃刮铲反复洗脱 2min, 获得洗脱液。取 0.1mL 洗脱液用无菌玻璃刮铲均匀涂布于 BTB 平板培养基, 倒置, 于 28℃~30℃培养 72h。筛选产生蓝色指示圈的菌落。未注入 Ar⁺ 的酵母菌膜也按相同方法处理, 并以 2mL 无菌水代替麻黄基因组 DNA TE 缓冲液, 浸泡离子注入后的菌膜为对照。

1.6 重组酵母麻黄碱的检测

将转化后在 BTB 指示性平板上生长的产生蓝色指示圈的酵母菌菌落分别接入斜面, 28℃~30℃培养 72h。从斜面分别转接入液体培养基, 置摇床 230r/min, 28℃~30℃培养 72h。

液体培养结束后, 3500r/min 离心 10min, 收集上清液, 用于测定重组酵母菌胞外麻黄碱和伪麻黄碱含量。收集菌体, 蒸馏水洗涤离心 3 次, -20℃预冻 10min, 置于研钵中, 加入液氮, 与石英沙共研, 蒸馏水洗至 10mL 离心管, 4000r/min 离心 15min, 弃细胞碎片, 收集上清液, 用于测定重组酵母菌的胞内麻黄碱和伪麻黄碱含量。同时, 将平行实验收集的细胞于 105℃干燥至恒重, 测定样品的细胞干重。

1.6.1 麻黄碱和(或)伪麻黄碱的铜铬盐定性检识方法^[12]: 分别取上述上清液 1mL, 依次加入浓度 10.0% 的 CuSO₄·5H₂O 试液 0.1mL, 浓度 40.0% 的 NaOH 试液 0.1mL, 乙醚 1.0mL, 振摇后放置分层, 记录乙醚层和水层的颜色。

1.6.2 麻黄碱和(或)伪麻黄碱的 RP-HPLC 定量检测方法: Waters 1525 pump 反相高压液相色谱仪(RP-HPLC), UV2487 双通道紫外检测器, 检测波长(λ) 210nm, Kromasil 100-5 C18 色谱柱(4.6mm×150mm), Breeze 3.30 色谱工作站。流动相 0.02mol/L KH₂PO₄: 乙腈 = 95:5; 流量: 1.2mL/min。每次进样量 10.0μL。为了减少测试误差, 在 RP-HPLC 测试过程

中,每隔 3~5 个测试样品,进行 1~2 次标样测试。

2 结果和分析

2.1 BTB 平板培养基初步筛选

麻黄碱和伪麻黄碱分子结构中的氮原子在侧链上,因此碱性较强,其 pK_a 值分别为 9.58 和 9.74。指示剂 BTB 由黄色→蓝色的 pH 范围为 5.8~7.6。在 BTB 平板培养基上,若重组酵母菌落周围出现黄色指示圈,意味着该菌株可能具有麻黄碱和(或)伪麻黄碱的生物合成能力,但不能分泌到胞外。若重组酵母菌落周围出现蓝色指示圈,意味着该菌株能将胞内合成的麻黄碱和(或)伪麻黄碱分泌到胞外。通过 BTB 指示性平板初步筛选,共获得菌落周围呈蓝色的阳性转化子 458 个(其中 319 个来源于保护液制膜,139 个来源于麻黄基因组 DNA TE 缓冲液制膜)分别编号后,全部移接入斜面培养基。真空条件下未注入 Ar^+ 的酵母菌,在导入麻黄基因组 DNA 处理中,未获得阳性转化子。以 2mL 无菌水代替麻黄基因组 DNA TE 缓冲液,浸泡离子注入后的菌膜为对照的处理中,也未获得阳性转化子。

2.2 重组酵母菌产麻黄碱和(或)伪麻黄碱的定性检识

麻黄碱和(或)伪麻黄碱标准品的铜铬盐反应结果为乙醚层呈紫红色,水层呈蓝色。在本研究中,由于培养液本身的黄色对铜铬盐反应的干扰,含麻黄碱和(或)伪麻黄碱的重组酵母菌培养液在铜铬盐反应中,乙醚层颜色大多为粉红色,而水层大多为红棕色。根据各菌株培养液的铜铬盐定性检识结果,获得了铜铬盐阳性反应的在转接培养 3 次后还稳定的 T_3 代重组酵母菌株 52 株。

2.3 重组酵母菌产麻黄碱和(或)伪麻黄碱的定量检测

3 株 T_6 代重组酵母菌培养液的 RP-HPLC 测试结果表明,编号 0406 和 0458 的 2 个菌株只产生胞外麻黄碱,而菌株 0451 只产生胞外伪麻黄碱(表 1)。

胞内 RP-HPLC 测试结果表明(表 1),菌株 0406 和 0458 合成的伪麻黄碱完全不能分泌到胞外。这意味着麻黄碱和伪麻黄碱在重组酵母菌胞内合成,并由未知的运输机制转运至胞外,且对麻黄碱和伪麻黄碱具有专一性。由此推测重组酵母菌株 0406 和 0458 在离子注入介导转麻黄基因组 DNA 过程中,并未获得控制伪麻黄碱转运的基因,或者是获得了该基因,但其处于沉默状态。

菌株 0458 的胞内伪麻黄碱含量几乎到达细胞

表 1 重组酵母菌 T_6 代 72h 胞外及胞内麻黄碱和伪麻黄碱的产量

Table 1 The yields of *l*-ephedrine or *d*-pseudoephedrine produced in excellular medium and incellular solution of T_6 generation recombinated yeasts cultured for 72h

Strain No.	Excellular(mg/L)		Incellular(mg/g dry cells)	
	<i>l</i> - ^a	<i>d</i> - ^b	<i>l</i> -	<i>d</i> -
0406	2.35	- ^c	-	23.59
0451	-	4.11	-	-
0458	11.87	-	-	294.86
ontrol strain(<i>H. anomala</i>)	-	-	-	-
Liquid medium	-	-	-	-

a: *l*-ephedrine; b: *d*-pseudoephedrine; c: not detected.

干重的 30%(表 1),从其色谱图(图 1)中可以看出,伪麻黄碱与保留时间(RT)为 9.641min 的未知物质未完全分离,这说明胞内伪麻黄碱并不是处于游离状态,而是与某一物质呈紧密结合状态。

药用植物麻黄中的生物碱主要有 6 种,为 3 对立体异构体^[1]。在重组酵母菌培养液 PR-HPLC 测试中出现了一些未知峰(图 1 中的 RT9.641 和图 2 中的 RT12.235),这些位于麻黄碱和(或)伪麻黄碱附近的未知峰可能是麻黄碱的立体异构体。

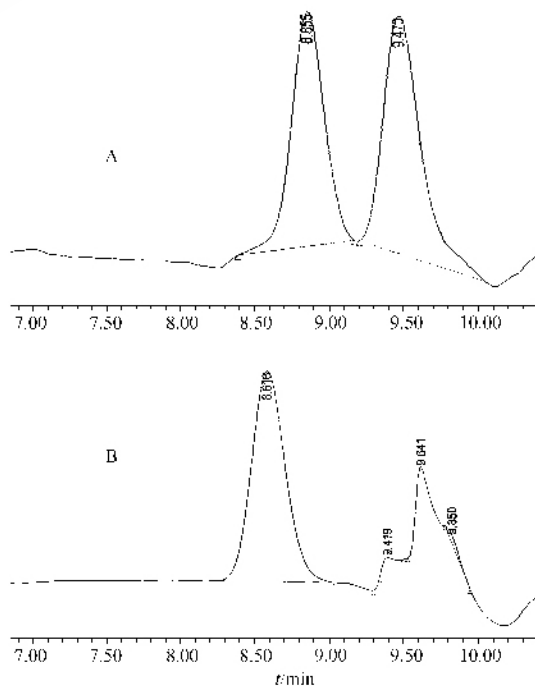


图 1 0458 菌株 T_6 代胞内麻黄碱的 RP-HPLC 色谱图

Fig. 1 RP-HPLC analysis of *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine produced in the incellular solution of strain 0458 of T_6 generation recombinated yeasts. A: Standard samples: *l*-ephedrine RT8.855min, *d*-pseudoephedrine RT 9.470 min; B: Incellular solution of strain 0458 cultured for 72 h of T_6 generation yeasts: *d*-pseudoephedrine RT9.419min.

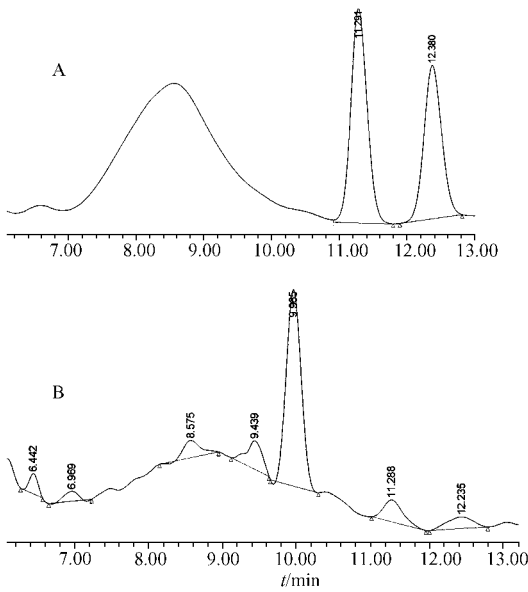


图2 0458菌株T6代胞外麻黄碱的RP-HPLC色谱图

Fig. 2 RP-HPLC analysis of *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine produced in the excellular solution of strain 0458 of T6 generation recombinant yeasts. A: Standard samples: *l*-ephedrine RT11.291min, *d*-pseudoephedrine RT 12.380min; B: Excellular solution of strain 0458 cultured for 72h of T6 generation yeasts: *l*-ephedrine RT11.288min.

2.4 氦离子注入介导麻黄基因组DNA在酵母菌中的遗传转化效率和稳定性

对T₃代各菌株培养液进行铜铬盐定性检测和RP-HPLC定量检测,获得了T₄代重组酵母菌株。对T₄代3批次的RP-HPLC检测结果及其T₅、T₆代RP-HPLC检测结果的分析,确定了遗传稳定的产麻黄碱(或)伪麻黄碱的重组酵母菌株3株(表1),分别是:0406、0451和0458,计算得知氦离子注入介导麻黄基因组DNA在酵母菌中遗传转化率为0.65%(3/458)。这3株菌株继续转代培养到T₁₁代,RP-HPLC定量检测其产生麻黄碱的性能仍然稳定。

3 结论和讨论

3.1 麻黄基因组DNA分子的大小对其在酵母菌中遗传转化的影响

经检测,本研究制备的蓝麻黄基因组DNA的纯度 $A_{260}/A_{280} = 1.82$, $A_{260}/A_{230} = 0.99$,在琼脂糖电泳中呈单一条带。本研究中,采用蓝麻黄基因组DNA的TE缓冲液为载体制备菌膜,再进行离子注入,这种方式没有获得遗传稳定的产麻黄碱重组酵母菌。这说明,离子注入使DNA大分子随机断裂^[13],而这些DNA片段并未提高外源DNA的转化率,由此推测控制麻黄碱生物合成的多个基因是紧密连锁或成簇。

已有的研究证明^[6],离子注入介导DNA大分子在受体中的转化率与该DNA大分子的随机片段的转化率相同。而本研究结果却是前者的转化率大大高于后者。这说明了对于多基因或基因簇控制的次生代谢产物或数量性状,在离子注入介导转基因中,以DNA大分子作为外源基因供体,可获得较高的转化率。

3.2 离子注入介导转基因的优点

作为一种新的转基因手段,离子注入介导转基因的最大特点就是不需要事先知道或克隆出目的基因^[8]。因此,从理论上讲,无论人们是否清楚植物的某一次生代谢产物或天然药物的生物合成途径,也无论是否清楚相关的基因,都可采用离子注入介导转基因技术,通过适当的筛选方法,从而获得易于人工培养的转基因微生物工程菌株。本研究建立的离子注入介导麻黄基因组DNA在酵母菌中的遗传转化的技术体系,可为相关研究提供参考,特别是为药用植物有效成分的次生代谢工程研究开辟了一条新的有效的途径。

致谢 感谢中国科学院离子束生物工程重点实验室余增亮研究员、吴李君研究员对本项工作的大力帮助,感谢乔坤云高级实验师、周俊副研究员和冯婷硕士进行RP-HPLC的分析测试工作,感谢新疆国际实业股份有限公司麻黄素事业部提供RP-HPLC测试用麻黄碱和伪麻黄碱标准品。

参 考 文 献

- [1] 查丽杭, 苏志国, 张国政, 等. 麻黄资源的利用与研究开发进展. 植物学通报, 2002, 19(4): 396-405.
- [2] Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds-in-chief. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000, 1250-1318.
- [3] Yamazaki K, Tamaki T, Uzawa S, et al. Participation of C₆-C₁ unit in the biosynthesis of ephedrine in *Ephedra*. Phytochemistry, 1973, 12: 2877-2882.
- [4] Gunnar GS, Spenser ID. Biosynthesis of ephedrine. J Am Chem Soc, 1988, 110(11): 3714-3715.
- [5] Schmidt HL, Werner RA, Eisenreich W. Systematics of ²H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways. Phytochemistry Reviews, 2003, 2: 61-85.
- [6] Yu ZL. Introduction to Ion Beam Biotechnology. New York: Springer Publishing House, 2006, 211-226.
- [7] Song DJ, Chen RL, Jun RC, et al. Super-distant molecular hybridization of plant seeds by ion beam-mediated gene cluster.

- [8] 樊永红, 毛培宏, 金 湘. 离子束介导 DNA 大分子遗传转化的研究. 生物技术, 2004, 14(3): 65 - 67.
- [9] Burke D, Dawson D, Stearns T. Methods in yeast genetics. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2000, 171 - 172.
- [10] 邵鹏柱, 曹 晖. 中药分子鉴定. 上海: 复旦大学出版社, 2004, 49 - 71.
- [11] 陆新红, 金 湘, 毛培宏. 转基因受体酵母菌的低能氩离子注入. 生物技术, 2005, 15(2): 37 - 39.
- [12] 吴剑峰. 天然药物化学. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 47 - 78.
- [13] 虞 龙, 余增亮. 低能离子注入介导 *Vc* 前体(2-KLG)产生菌 DNA 的转导. 核技术, 2004, 27(4): 264 - 268.

Production of *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine in recombined yeasts obtained by argon ion implantation mediated *Ephedra* genome DNA transformation

MAO Pei-hong^{1 2**}, MA Xiang-dong^{1 3**}, JIN Xiang¹, YANG Hong-mei², LOU Kai^{2*}

(¹ Ion Beam Biotechnology Center, Xinjiang University, Urumqi 830008, China)

(² The Key Lab of Microorganisms in Xinjiang Specific Environment, Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

(³ College of Life Science, Hubei Univeisity, Wuhan 430062, China)

Abstract :The genome DNA from *Ephedra glauca* was randomly transferred into *Hansenula anomala*, respectively, by argon ion bombardment. Then, after screening by the methods of bromothymol blue indicator selection, slant cultivation, copper chromic salt qualitative test and RP-HPLC determination, 3 strains, *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine producing recombined yeasts were obtained, which can use glucose as a carbon source, NaNO₃ as nitrogen source and be genetically stable. After cultivated in liquid medium for 72 hours and analyzed by the RP-HPLC, the recombined strains can produce *l*-ephedrine 11.87mg/L and *d*-pseudoephedrine 4.11mg/L excellular, *d*-pseudoephedrine 294.86mg/g dry cell incellular, but *l*-ephedrine not detected incellular. The transformation efficiency of *Ephedra* genome DNA transferred into yeasts via argon ion bombardment was 0.65%. The effects of *Ephedra* genome DNA macromolecule integrity on yeast transformation system were discussed. The results shown that DNA macromolecule with integrated structure used as exogenous donor can obtain higher transformation efficiency than DNA macromolecule random fragments by ion implantation mediated DNA transformation. It was inferred that biosynthesis of *l*-ephedrine and the *d*-pseudoephedrin were controlled by linked together genes or gene clusters.

Keywords : Ar⁺ implantation; mediated; *Ephedra* genome DNA; recombined yeast; ephedrine

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(10365001)

* Corresponding author. Tel: 86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

**These authors contributed equally to this work

Received 27 December 2006/Accepted :19 January 2007/Revised 30 March 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>