

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(7):923-933; 4 July 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

高产紫杉醇菌株的诱变选育及其差异表达基因消减 cDNA 文库的构建

赵凯^{1,2}, 孙立新³, 王旋¹, 李秀凉¹, 王歆¹, 周东坡^{1*}

¹黑龙江大学生命科学学院, 微生物黑龙江省高校重点实验室, 农业微生物技术教育部工程研究中心, 哈尔滨 150080

²黑龙江省农业科学院生物技术研究所, 哈尔滨 150086

³黑龙江大学附属医院, 哈尔滨 150080

摘要:【目的】选育高产紫杉醇菌株, 并构建选育到的高产紫杉醇菌株与出发菌株 HD₁₋₃ 差异表达的 cDNA 消减文库。【方法】分别采用硫酸二乙酯和紫外线与硫酸二乙酯复合诱变处理菌株 HD₁₋₃ 孢子; 以选育到的高产紫杉醇菌株为 tester, 菌株 HD₁₋₃ 为 driver, 应用抑制性消减杂交技术构建选育到的高产紫杉醇菌株与菌株 HD₁₋₃ 差异表达的 cDNA 消减文库。【结果】试验确定的 *Nodulisporium sylviforme* 紫杉醇产生菌 HD₁₋₃ 孢子复合诱变的适宜条件为: 将 10⁶ cfu/mL 孢子悬液经过 8% 硫酸二乙酯处理 15 min 后, 在电磁搅拌下, 用紫外灯 (30 W, 距离 30 cm) 照射处理 45 s, 获得了 1 株遗传性状稳定、高产紫杉醇的突变株——UD₁₄₋₁₁, 其紫杉醇产量从出发菌株 HD₁₋₃ 的 232.73 ± 4.61 μg/L 提高至 312.81 ± 7.51 μg/L; 构建的文库滴度为 1.2 × 10⁷ cfu/mL, 阳性克隆率 75.3%, 片段大小主要集中在 300 bp - 1.0 kb。【结论】选育到了 1 株遗传性状稳定、高产紫杉醇突变株; 成功地构建了高产紫杉醇菌株 UD₁₄₋₁₁ 与菌株 HD₁₋₃ 差异表达的 cDNA 消减文库, 为寻找、分离微生物生物合成紫杉醇相关基因和利用基因工程或代谢工程手段定向设计改造菌株奠定基础。

关键词: 紫杉醇, 内生真菌, 诱变育种, 抑制性消减杂交, cDNA 文库

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 07-0923-11

紫杉醇 (taxol) 是一种复杂的具有抗癌活性的三环二萜类化合物, 最早是由美国的 Wani 等 (1971)^[1] 分离自短叶红豆杉 *Taxus brevifolia*。在临床上, 用于治疗乳腺癌、卵巢癌、子宫癌等人体多种恶性肿瘤^[2-4]。随着紫杉醇临床用途的不断拓宽, 市场需求的稳定增长, 利用目前的生产技术, 即从红

豆杉中提取紫杉醇或其中间体的方法, 对资源损耗太大, 不能满足市场需求, 亟待解决原料短缺的问题。微生物发酵法是可以无限生产、大量获取紫杉醇的很有前景的方法。但目前利用内生真菌发酵生产紫杉醇基本处于试验阶段, 离工业化大规模生产还有相当大的距离, 主要限制因素是筛选到的菌株产量太低和

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30970090); 中国博士后科学基金项目 (20090450136); 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目 (2010RFQXS043); 黑龙江省普通高等学校新世纪优秀人才培养计划 (1251-NCET-005); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (11551377); 黑龙江大学高层次人才 (创新团队) 支持计划 (hdt2010-17)

* 通信作者。Tex/Fax: +86-451-86609016; E-mail: zhoudp2003@yahoo.com.cn

作者简介: 赵凯 (1973 -), 男, 黑龙江阿城人, 教授, 现主要从事于生物制药与微生物遗传育种方面的科研工作。E-mail: zk395@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-02-14; 修回日期: 2011-03-27

缺乏内生真菌紫杉醇生物合成的分子生物学基础研究,因此,高产菌株的选育成为当前的首要任务^[5]。

传统的诱变育种虽然是菌种选育中经常使用的方法,但存在诱变效率低、筛选工作量大、周期长、重复诱变过程造成一些无关的或负向突变的积累等缺点,从而导致菌株对诱变条件不敏感,很难再继续应用常规诱变育种提高产量,甚至出现生长速度减慢、对底物同化利用能力下降、对环境耐受能力下降等方面的退化。因此,目前工业菌株的选育已由传统的诱变选育向利用基因工程、代谢工程手段定向设计改造菌株方向转变,菌株选育速度显著加快^[6-10]。然而,后者的成功实施需要建立在详尽了解产物生物合成的分子基础和遗传调控机制的基础之上,才能实现在分子水平实现对产物生物合成代谢的人工调控。近年来,关于红豆杉细胞生物合成紫杉醇途径的研究取得了突破性的进展,一些关键酶基因已被分离、鉴定及克隆^[11-24]。但是,由于红豆杉细胞培养与内生真菌生物发酵合成紫杉醇的途径相差甚远,基因序列可能差异也较大,迄今为止国内外尚未见从紫杉醇产生菌中分离到紫杉醇生物合成相关基因的报道。

抑制性消减杂交(Suppression Subtracted Hybridization,SSH)技术是20世纪90年代末出现的一种筛选差异表达基因技术^[25]。SSH技术应用两次消减杂交和两次抑制性PCR,在消减杂交过程中使丰度不同的cDNA拷贝数趋于平衡,灵敏度提高,保证了较低丰度的差异表达基因也能够得到有效的克隆,与其它差异基因分离方法相比具有独特的优越性^[26]。因此,本研究在以往工作的基础上,以紫杉醇产生菌HD₁₋₃为出发菌株,采用紫外线和硫酸二乙酯复合诱变选育高产紫杉醇菌株。以选育到的高产紫杉醇菌株为Tester,菌株HD₁₋₃为Driver,采用SSH技术研究*Nodulisporium sylviforme*紫杉醇产生菌HD₁₋₃与高产紫杉醇菌株之间差异基

因表达,构建消减cDNA文库,为寻找、分离微生物生物合成紫杉醇差异表达相关基因和利用基因工程、代谢工程手段定向设计改造菌株奠定基础;同时,通过与细胞培养合成紫杉醇途径的比较,为对内生真菌与其宿主相互关系的研究提供新的证据与思路。

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(*Nodulisporium sylviforme*)^[27-28],其孢子经常规选育和原生质体诱变获得的突变株HD₁₋₃(紫杉醇产量为232.73±4.61 μg/L)为本试验的出发菌株。

1.1.2 培养基:PDA液体培养基^[29];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;改良的S-7培养基:在Strobel^[30]1993原S-7培养基基础上将苯丙氨酸、酪氨酸、亚油酸增至终浓度1.5-5.0 mg/L;LB/Amp/X-gal/IPTG培养基。

1.1.3 主要试剂:Oligotex mRNA kit,购自QIAGEN公司;PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit,购自Clontech公司;pMD 20-T Vector,Access RT-PCR System,IPTG,X-gal,RNase-free DNaseI,M-MLV反转录酶,购自Promega公司;DNA Fragment Purification Kit Ver 2.0,焦磷酸二乙酯(DEPC),*EcoR*I,T₄DNA Ligase,dNTP,MgCl₂均购自TaKaRa公司;氨苄青霉素,E_xTaq酶,购自广州宝泰克生物工程有限公司;电泳用琼脂糖为西班牙进口试剂。

酵母提取物、胰蛋白胨由英国Oxoid公司生产;其它各种试剂DES、EDTA、SDS、饱和酚、异丙醇、Tris-HCl等均为国产分析纯。紫杉醇定量所用试剂均为色谱纯。

1.1.4 引物:引物均由上海生物工程有限公司合成。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

Name of primer	Sequence(5'→3')
cDNA synthetic primer	TTTTGTACA AGCT(T)30VN-3'(N=A,C,G,or T; V=A,G,or C)
PCR primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC
Nested PCR primer 1	TCGAGCGGCCGCCCGGCAGGT
Nested PCR primer 2R	AGCGTGCTCGGGCCGAGGT
Adaptor 1	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGCAGGTGCCCGTCCA
Adaptor 2R	CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGCTCGGGCCGAGGTACCTCGGCC

1.2 高产紫杉醇菌株的诱变选育

1.2.1 菌株的活化培养: 将菌株 HD₁₋₃ 转接到 PDA 斜面培养基上, 28℃ 培养 3 d, 活化 HD₁₋₃ 2-3 次。

1.2.2 孢子悬液的制备: 参照文献 [31] 进行。

1.2.3 诱变处理: 硫酸二乙酯 (DES) 诱变: 用乙醇试剂将 DES 溶液配制成分终浓度分别为 2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%。分别取 2 mL 不同浓度的 DES 处理液与 2 mL 稀释的孢子悬液混合, 置于直径 6 cm 的培养皿内, 开启磁力搅拌器, 在 26℃-28℃ 条件下分别处理 8、10、12 min 后, 用 pH 8.0 的磷酸缓冲溶液稀释终止反应, 进行 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 系列梯度稀释。从每个稀释度中取 0.2 mL/皿涂布于加有 25-30 mL PDA 固体培养基平板上, 28℃ 避光恒温培养 3-5 d, 计数各梯度平皿菌落数并计算致死率。每次试验测定结果都采用 3 个平行组, 测试结果为各重复样的平均值。

$$\text{致死率} = 1 - \frac{\text{诱变后菌落数} \times \text{稀释倍数}}{\text{诱变前孢子数} \times 0.2} \times 100\%$$

DES + UV 复合诱变: 取经过适当浓度 DES 处理的孢子悬液 5 mL, 放入直径 6 cm 盛有无菌转子的平皿中, 在电磁搅拌下, 用紫外灯 (30 w, 距离 30 cm) 照射处理 45 s^[31]。照射完毕后, 在红灯下进行梯度稀释涂平皿, 用黑布包裹, 置 28℃ 培养 3-5 d, 计数各梯度平皿菌落数并计算致死率。每次试验测定结果都采用 3 个平行组, 测试结果为各重复样的平均值。

1.2.4 突变株的抗性筛选: 参照文献 [32] 进行。

1.2.5 发酵液中紫杉醇提取及其定性和定量方法: 参照文献 [33] 进行。以 Sigma 公司的紫杉醇标准品作对照。

1.2.6 遗传稳定性的测定: 对获得的正突变株连续培养 6 代, 以菌株 HD₁₋₃ 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。

1.3 高产紫杉醇菌株消减菌株 HD₁₋₃ cDNA 文库的构建

1.3.1 菌丝体培养和收集: 菌丝体培养和收集参照文献 [34] 进行。分别在发酵培养的第 2、3、4、6、8、10、12、14 d 测定紫杉醇的产量, 为确定紫杉醇产生菌总 RNA 提取时间提供依据。

1.3.2 紫杉醇产生菌总 RNA 的提取与 mRNA 分离和纯化: 参照 Promega 公司 RNAgents (Total RNA

Isolation System 操作手册中的 Modified RNAgents) System Protocol 说明分别提取菌株 HD₁₋₃ 和选育到的高产紫杉醇菌株总 RNA。测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 和 A₂₆₀/A₂₃₀ 比值, 并用 1% 变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。mRNA 的分离和纯化按照 Oligotex mRNA kit 操作手册说明进行, 获得的 mRNA 经检测后保存于 -80℃ 冰柜中。

1.3.3 抑制性消减杂交: 以选育到的高产紫杉醇菌株为 Tester (试验方), 菌株 HD₁₋₃ 为 Driver (参照方), 采用 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit, 50 × PCR Enzyme Mix 说明进行 SSH 操作。以纯化的 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA (dscDNA); dscDNA 经 Rsa I 酶切后, 将 Tester dscDNA 分为两组 Tester1-1 和 Tester1-2, 分别与 Adaptor 1, 2R 连接, 16℃ 反应过夜; 在连接效率鉴定满意 (>25%) 后, 将 Adaptor 1 Tester1-1 dscDNA 和 Adaptor 2R Tester1-2 dscDNA 分别与过量的 Driver dscDNA 在 68℃ 下杂交 8 h 后, 立即将两组经过第 1 次消减杂交的体系混合, 另加经 Rsa I 酶切的 Driver cDNA, 在 68℃ 杂交过夜后, 在热循环仪中 68℃ 加热 7 min, -20℃ 贮存备用; 以第一次 PCR 产物为模板, 在 50 × Advantage Klen Taq 聚合酶作用下进行第二次 PCR 扩增。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 采用 TaKaRa 公司的 DNA 片段纯化试剂盒纯化 PCR 产物。

1.3.4 消减 cDNA 文库建立及克隆分析: 将回收的 PCR 纯化产物与 pMD 20-T Vector 连接, 转化到 *E. coli* JM109, 涂布于 LB/Amp/X-gal/IPTG 平板上, 经蓝白斑及 PCR 扩增筛选阳性克隆。挑取阳性克隆到 LB 液体培养基中 37℃ 培养过夜, 加入甘油至终浓度为 20%, 分装, -80℃ 冻存。文库质量鉴定包括计算文库滴度、文库阳性克隆率和插入片段大小。重组质粒经过筛选鉴定后, 挑选其中的阳性克隆进行测序。序列分析由上海生工生物技术有限公司完成。所用测序仪器为 ABI PRISM 377-96。采用 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中的 Blast 程序对测序结果检索分析。

2 结果和分析

2.1 高产紫杉醇菌株的诱变选育

2.1.1 DES 溶液浓度和处理时间的选择: 在诱变育

种工作中,常采用致死率为 90%、99% 或 99.9% 的相对剂量,而目前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^[31]。因此,本试验选择孢子致死率 70% - 75% 为指标来确定 DES 溶液浓度和处理时间。由表 2 可看出,在 DES 溶液浓度和处理时间对菌株 HD₁₋₃ 孢子致死率的影响上,DES 溶液浓度影响要大一些,当 DES 溶液浓度为 12% 处理 15 min 时,菌株 HD₁₋₃ 孢子致死率为 100%。因此,本试验选定 DES 浓度为 8% 处理 15 min 作为适宜诱变剂量(致死率为 74.3% ± 4.3%),对菌株 HD₁₋₃ 孢子悬液进行 DES 诱变。

表 2 菌株 HD₁₋₃ 孢子致死率和不同 DES 浓度与处理时间的关系

Table 2 The relationship of between lethal rate of spores of strain HD₁₋₃ and different DES concentrations and treatment time

DES concentration / %	t / min	Lethal rate / %
2	5	23.1 ± 1.6
	10	40.5 ± 1.8
	15	48.3 ± 3.4
	20	56.7 ± 3.6
4	5	29.6 ± 2.7
	10	48.5 ± 2.5
	15	54.4 ± 2.9
	20	61.3 ± 3.2
6	5	37.6 ± 4.1
	10	56.8 ± 4.6
	15	61.4 ± 3.8
	20	69.7 ± 4.3
8	5	48.5 ± 3.6
	10	68.5 ± 4.3
	15	74.3 ± 4.3
	20	82.6 ± 5.4
10	5	61.6 ± 4.7
	10	78.4 ± 4.6
	15	88.2 ± 5.4
	20	97.2 ± 6.7
12	5	76.1 ± 5.6
	10	92.6 ± 5.2
	15	100
	20	100

2.1.2 紫外线-DES 复合诱变及制霉菌素抗性突变株的筛选:本试验采用将菌株 HD₁₋₃ 孢子悬液经过 8% DES 处理 15 min 后,在电磁搅拌下,用紫外灯(30 w,距离 30 cm)照射处理 45 s,以对菌株 HD₁₋₃ 孢子进行复合诱变;同时,以紫外线单独照射 45 s

和 8% DES 处理 15 min 作为对照。通过对菌株 HD₁₋₃ 孢子进行多次诱变后,涂布 540 个制霉菌素 PDA 固体培养基平板(含制霉菌素 95 μg/mL)^[32],共获得 126 株在制霉菌素平板上生长速度快、菌落直径大的抗性突变株(表 2)。

2.1.3 高产紫杉醇菌株的筛选:将上述获得的 126 株抗性突变株分别接种至含 105、115、125、135 μg/mL 制霉菌素平板,经初筛后共获得 183 个生长良好的单菌落;之后,将初筛获得的突变株通过摇瓶发酵培养进行复筛,经 TLC 和 HPLC 分析后,紫杉醇产量凡高于菌株 HD₁₋₃ 的突变株即为正变株。最后选出了 37 株紫杉醇产量有所提高的菌株(正变率为 29.4%),其中在 UV + DES 复合处理的制霉菌素含量为 135 μg/L 的抗性平板中筛选出了 1 株突变株 UD₁₄₋₁₁ 的紫杉醇产量较出发菌株有明显提高,经 HPLC 定量分析后,突变株 UD₁₄₋₁₁ 发酵液中紫杉醇含量为 312.81 ± 7.51 μg/L(图 1),较菌株 HD₁₋₃ 紫杉醇产量提高了 34.41%。

经 Waters 液相色谱-质谱联用分析进一步表明,突变株 UD₁₄₋₁₁ 的纯化产物含有紫杉醇(分子量为 853.92)特有的准分子离子峰 [M + Na]⁺ 为 m/z 876.19(图 2),证明突变株 UD₁₄₋₁₁ 纯化的组分与紫杉醇分子的质谱特征相符。对突变株 UD₁₄₋₁₁ 连续传代培养,结果发现该突变株遗传稳定性较好,传代六次产紫杉醇量稳定。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。

2.2 菌株 UD₁₄₋₁₁ 消减菌株 HD₁₋₃ cDNA 文库的构建

2.2.1 菌株 HD₁₋₃ 和 UD₁₄₋₁₁ 总 RNA 提取时间的确定:TLC 分析结果表明,菌株 HD₁₋₃ 和突变株 UD₁₄₋₁₁ 在发酵培养第 2 天和第 3 天时检测不到紫杉醇产生,表明此阶段菌株紫杉醇生物合成尚未开始;在发酵培养第 4 天时,可检出微量的紫杉醇产生;在发酵培养第 5 天以后紫杉醇产量逐渐提高,合成速度显著加快,尤其在发酵培养第 11 天时菌株 HD₁₋₃ 和 UD₁₄₋₁₁ 紫杉醇产量差别最大,之后紫杉醇产量基本趋于稳定。考虑到从紫杉醇合成相关基因开始转录、表达到紫杉醇的生成之间有一定的间隔,因此,本试验确定在菌株 HD₁₋₃ 和 UD₁₄₋₁₁ 发酵培养至第 11 天时收集菌丝体提取其总 RNA。

2.2.2 菌株 HD₁₋₃ 和 UD₁₄₋₁₁ 总 RNA 的提取与

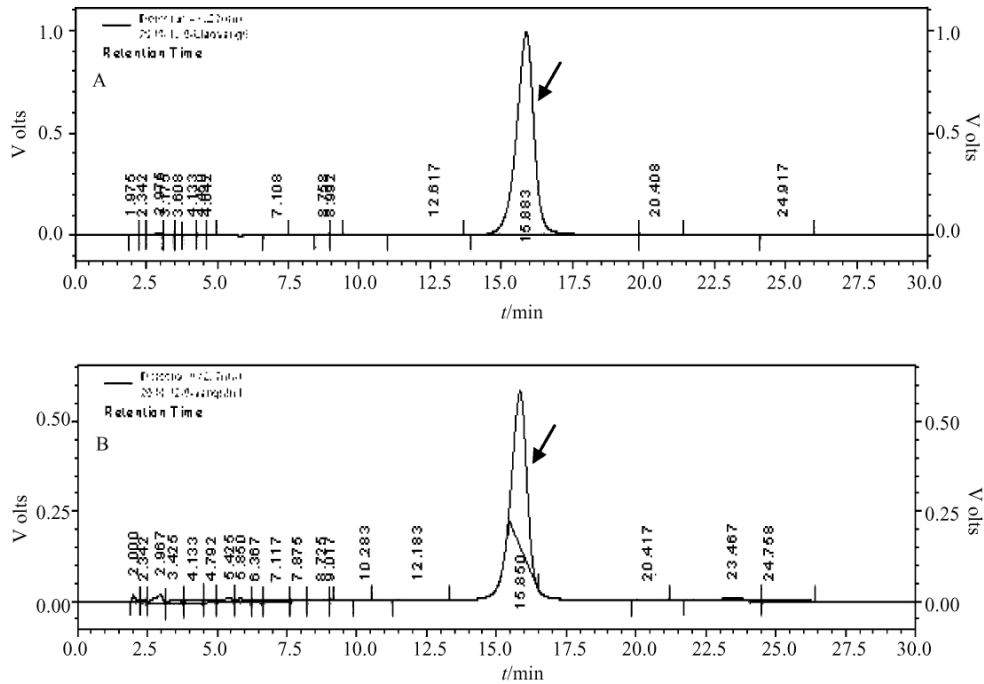


图 1 高效液相色谱分析图谱。箭头表示为紫杉醇的峰

Fig. 1 Chromatograms of HPLC analysis. Arrow indicates the peak corresponding to taxol. A: HPLC spectrum of authentic standard taxol; B: HPLC spectrum of sample extracted from strain UD₁₄₋₁₁.

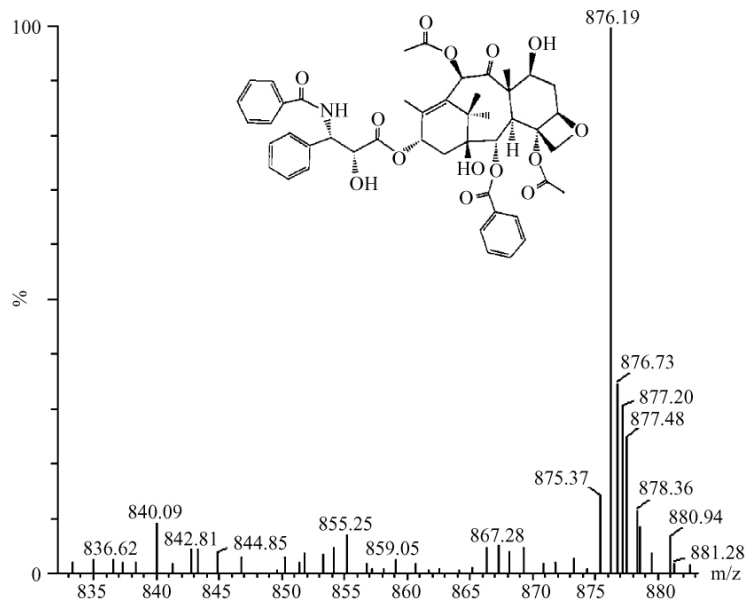


图 2 菌株 UD₁₄₋₁₁ 纯化产物的质谱图。箭头所示为紫杉醇的准分子离子峰 $[M + Na]^+$

Fig. 2 A representative MS of the purified product from strain UD₁₄₋₁₁. The molecular mass shown as $[M + Na]^+$ is indicated by an arrow.

mRNA 分离纯化: 提取到的菌株 UD₁₄₋₁₁ (Tester) 和 HD₁₋₃ (Driver) 总 RNA, 利用紫外分光光度计测定 RNA 样品的 A_{260}/A_{280} 在 1.9 - 2.1 之间, A_{260}/A_{230} 在

2.02 - 2.08 之间, 表明本试验提取到的菌株 UD₁₄₋₁₁ 和 HD₁₋₃ 总 RNA 纯度较高; 通过 1% 变性琼脂糖凝胶电泳检测 (图 3), 可见提取到的总 RNA 样品中有

十分清晰的 28S、18S 条带,且 2 条带的比值大于 2:1。5.8S 条带几乎看不见,说明提取的总 RNA 未发生降解,完整性好,同时也未见有其它条带出现,可排除 DNA 的污染。因此,本试验提取到的紫杉醇产生菌细胞总 RNA 纯度和完整性均达到了可以进行下一步试验的要求。mRNA 完整性和大小通过琼脂糖凝胶电泳检测呈现弥散条带,表明纯化效果良好,可用于 cDNA 合成。

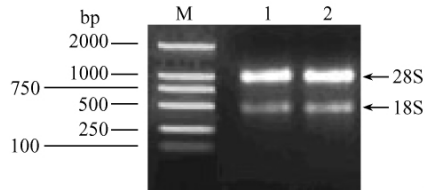


图 3 东北红豆杉细胞总 RNA 电泳分析

Fig. 3 Electrophoresis analysis of total RNA from the strain UD₁₄₋₁₁ and HD₁₋₃. M: DNA Marker DL2000; 1. HD₁₋₃; 2. UD₁₄₋₁₁.

2.2.3 Tester 和 Driver dscDNA 的鉴定与酶切分析:由图 4 可知,菌株 UD₁₄₋₁₁ 和 HD₁₋₃ dscDNA 在酶切前片段大小主要分布在 500 bp - 3 kb 之间,说明得到了 dscDNA;经过 *Rsa* I 酶切后,酶切片段大小主要分布在 100 bp - 2 kb 之间,同酶切前 dscDNA 片段相比,酶切后 dscDNA 片段条带范围明显变小,

说明 *Rsa* I 消化完全。

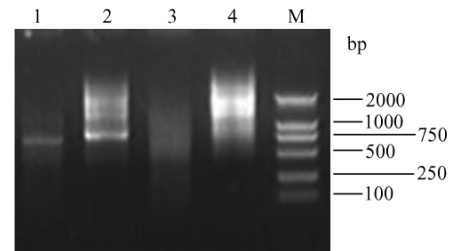


图 4 dscDNA 经 *Rsa* I 酶切前后的结果分析

Fig. 4 Analysis of dscDNA before and after *Rsa* I digestion. M: DNA Marker DL2000; 1: After *Rsa* I digestion of Tester dscDNA; 2: Before *Rsa* I digestion of Tester dscDNA; 3: After *Rsa* I digestion of Driver dscDNA; 4: Before *Rsa* I digestion of Driver dscDNA.

2.2.4 抑制性消减杂交分析:由图 5 可以看出,消减后的样品 PCR 扩增带型同未消减的对照相比,带型略有不同,表明两轮杂交是成功的。消减后 cDNA 的第一次 PCR 产物条带弥散,而再经过巢式 PCR 的特异性扩增,结果发现弥散条带明显变亮,特异性明显提高,表明特异表达或差异表达的基因被大量富集,说明所构建的消减文库具有很高的消减效率。

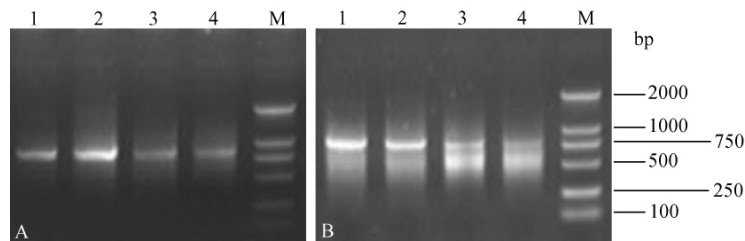


图 5 抑制性消减杂交产物的 PCR 分析

Fig. 5 Analysis of suppression subtracted hybridization PCR product. A: Primary PCR; B: Secondary PCR. M: DNA Marker DL2000; 1, 2: PCR after subtracted hybridization; 3, 4: PCR of unsubtracted hybridization.

2.2.5 cDNA 消减文库扩增及克隆的序列分析鉴定:将回收的消减杂交后的第二次抑制性 PCR 纯化产物与 pMD 20 - T Vector 连接,转化到 *E. coli* JM109 进行 cDNA 消减文库扩增。扩增后 cDNA 消减文库包含 316 个白色克隆,克隆饱满清晰,白色克隆占总菌落的 87% 以上,文库滴度为 1.2×10^7 cfu/mL。随机挑取 28 个白色克隆,抽提纯化质粒,以 Nested PCR Primer 进行菌液 PCR 扩增分析,从图 6 可以看出,其中阳性克隆 21 个,阳性克隆率

75.3%,阳性克隆中插入片段大小在 250 bp - 2.0 kb 之间,主要集中在 300 bp - 1.0 kb,与理论设计大小相符。随机挑取 15 个具有插入片段阳性克隆进行测序,利用 GenBank 中的数据库进行同源性比较分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 结果(表 3)发现 15 个 ESTs 代表了 6 个不同的基因,其中克隆 10 和 14 的 ESTs 与紫杉醇生物合成相关,其余的 ESTs 代表了 5 个不同的新基因。

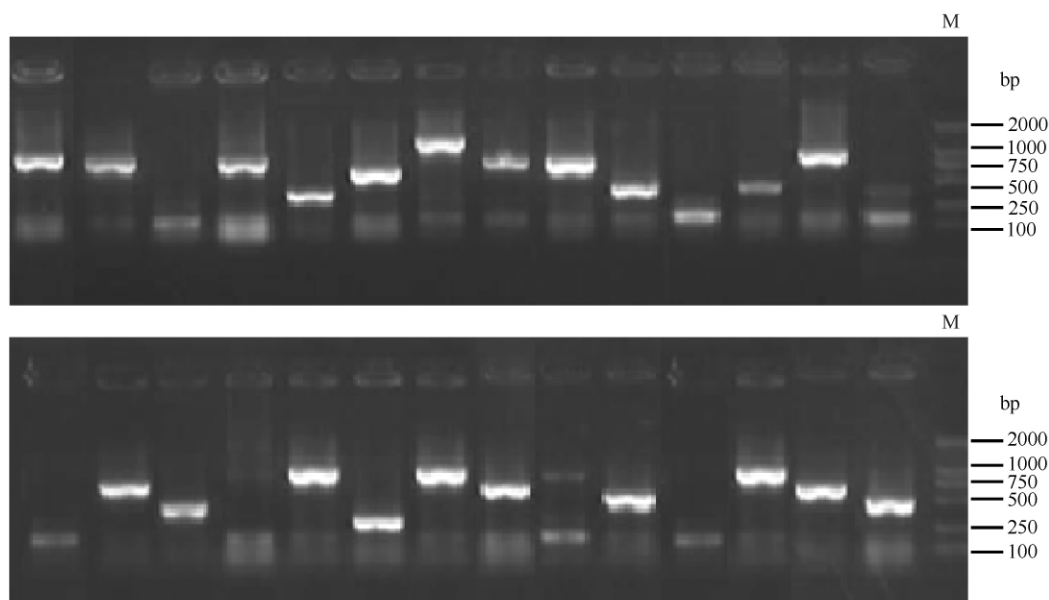


图 6 pMD 20-T Vector 转化子的鉴定

Fig. 6 Identification of Transformants of pMD20-T Vector. M:DNA Marker DL2000.

表 3 阳性克隆测序及 GenBank 同源序列比较结果

Table 3 Sequencing and GenBank homology search of positive clones

Clones	Size /bp	Blast homology	Score value	Expect value	Identities /%
01	361	unknown			
02	377	unknown			
03	606	Human DNA sequence from clone RP11-812120 on chromosome 6	890	0.0	469/478 (98%)
04	364	Homo sapiens chromosome 15 clone RP112382A20	111	9e-22	56/56 (100%)
05	321	unknown			
06	302	Human DNA sequence from clone RP112356N1 on chromosome 1	861	2e-06	261/268 (97%)
07	604	Homo sapiens chromosome 19 clone CTB-184G21	878	0.0	459/463 (100%)
08	565	Human DNA sequence from clone RP42813B7 on chromosome 1	847	0.0	413/444 (93%)
09	422	unknown			
10	591	RelA [<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>Paratuberculosis</i> str. k10]	317	2e-85	150/198 (75%)
11	399	<i>Neurospora crassa</i> mitochondrial COI gene for cytochrome oxidase subunit I (exon 1-5)	186	4e-45	75/119 (63%)
12	330	unknown			
13	302	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50 genomic DNA	61.9	6e-07	61/71 (85%)
14	560	<i>Neurospora crassa</i> calmodulin-dependent protein phosphatase mRNA	108	1e-22	50/60 (83%)
15	403	Homo sapiens chromosome 3 clone RP112132II7	848	0.0	97% (351/362)

3 讨论

本试验采用的原始菌株 HQD₃₃ 为中国一新记录属——多节孢属 *Nodulisporium sylviforme*^[27-28], 因对

其遗传背景缺乏了解,且本试验选育到的稳定的高产紫杉醇菌株 UD₁₄₋₁₁ 为通过长期诱变选育而得到的,如再继续采用常规诱变育种手段则难以获得显效。紫杉醇生物合成过程中相关基因,尤其是关键酶基因的研究,对于阐明紫杉醇的生物合成途径和

高产紫杉醇基因工程菌株的构建具有重要意义。虽然目前红豆杉细胞合成紫杉醇过程中相关酶基因的克隆与鉴定取得了很大的进展^[11-24],但迄今为止在国内外还尚未发现有从紫杉醇产生菌中分离到紫杉醇生物合成相关基因的报道。因此,微生物合成紫杉醇相关基因的分离及其功能分析是构建高产紫杉醇基因工程菌株的重点。

克隆基因的方法有多种,如利用逆向克隆策略和同源 PCR 策略等。但对于 *Nodulisporium sylviforme* 紫杉醇产生菌这类遗传背景不清楚,且要分离的目的基因还不确定时,采用分离差异表达基因的方法具有很大的优势,如 mRNA 差异显示技术(mRNA differential display reverse transcription PCR, DDRT-PCR)、表达性差异显示分析(Representational Difference Analysis, RDA)技术、交互差减 RNA 差别显示(Reciprocal Subtraction Differential RNA Display, RSDD)技术及 SSH 技术。SSH 技术不仅克服了 DDRT-PCR 假阳性率高和 RDA 技术消减杂交轮次较多的缺点,而且由于 SSH 技术采用了均等化和富集目标基因片段的方法,也保证了低丰度 mRNA 的检出,在第一轮杂交即可使稀有基因富集 1000 倍,具有速度快、效率高,一次反应可同时分离几十或上百个差异表达的基因;重复性好;敏感程度高,对高、低丰度的差异表达基因都能有效分离等特点^[35],目前 SSH 技术已被广泛用于差异表达基因的鉴定研究中^[36-38]。

本试验采用 UV、DES 和 UV + DES 处理对菌株 HD₁₋₃孢子的诱变效果进行了研究,发现 UV 照射、DES 和 UV + DES 复合处理对菌株 HD₁₋₃都有很好的诱变效果,但 UV + DES 复合处理的效果更佳,选育到了比出发菌株 HD₁₋₃紫杉醇产量提高了 34.41% 的突变株 UD₁₄₋₁₁,为 *Nodulisporium sylviforme* 紫杉醇产生菌诱变育种提供了可靠的途径。以选育到的高产紫杉醇菌株 UD₁₄₋₁₁为 tester,出发菌株 HD₁₋₃为 driver,采用 SSH 技术构建了菌株 UD₁₄₋₁₁与 HD₁₋₃差异表达基因的 cDNA 消减文库,为阐明内生真菌紫杉醇的生物合成途径和构建高产紫杉醇基因工程菌株的研究奠定了基础。

鉴于不同菌株其发酵过程中紫杉醇合成的动力学有所差异,为了确保后续试验取样的准确性,本试验对菌株 UD₁₄₋₁₁和 HD₁₋₃在改良的 S-7 发酵培养基

中合成紫杉醇的动态变化进行了研究,以确定两菌株 mRNA 水平差异最大的时期为总 RNA 提取的最佳时间。试验结果表明,提取的总 RNA 纯度较高,完整性好,可用于 cDNA 合成。

酶切效率对于 SSH 的成败非常关键,因此,试验中必须尽量优化反应参数、避免误差,以保证 *Rsa* I 酶切反应的高效性。本试验将菌株 UD₁₄₋₁₁和 HD₁₋₃ dscDNA 酶切前后 dscDNA 在 1% 琼脂糖凝胶上同时电泳,发现酶切后的 dscDNA 片段明显小于酶切前的 dscDNA 片段,说明酶切较完全;同时,为了保证接头的高效连接,本试验在连接前对酶切产物进行了纯化,连接时应用了高质量的 DNA 连接酶,并且适当的延长了连接时间。

两轮消减杂交是 SSH 技术的核心,是试验成败的关键。首先,必须保证在杂交时加入过量的 Driver cDNA,以使 Driver cDNA 驱动 Tester cDNA 杂交而形成异源双链分子 cDNA,从而使 Tester cDNA 中差异表达基因的目标 cDNA 得到大量富集;其次,必须严格控制杂交温度,使双链 cDNA 分子准确的退火,确保差异表达基因在第一次消减杂交后处于游离单链状态;第三,必须严格控制杂交时间,若杂交时间不足,Tester 和 Driver 的共同序列得不到完全退火消减,造成假阳性率提高。若杂交时间太长,Tester 和 Driver 中的部分同源序列发生退火,造成敏感性下降。本试验在杂交时,对 Tester 和 Driver dscDNA 的酶切产物进行严格定量,确保 Driver dscDNA 是 Tester dscDNA 的 30 倍。同时,试验时严格控制杂交温度及时间,两轮消减杂交后,PCR 产物重复性好,表明特异表达或差异表达的基因被大量富集,说明本试验已成功地构建了菌株 UD₁₄₋₁₁与 HD₁₋₃差异表达的 cDNA 消减文库,文库滴度为 1.2×10^7 cfu/mL,阳性克隆率 75.3%。本试验下一步将获得的抑制消减杂交片段,经过 Northern 杂交或反向 Northern 杂交进行鉴定,去除假阳性;对筛选出来的阳性 ESTs 进行大量测序,然后进行 BLAST 分析,对有意义的 ESTs 可以通过 cDNA 末端快速扩增(RACE)方法获得全长基因,以明确所筛选的特异性片段的功能及表达特征,为利用基因工程或代谢工程手段定向设计改造菌株奠定基础。

参考文献

- [1] Wani MC , Taylor HL , Wall ME , Coggon P , McPhail AT . Plant antitumor agents VI: The isolation and structure of taxol , a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* , 1971 , 93 : 2325-2327.
- [2] Woo HL , Swenerton KD , Hoskins PJ. Taxol is active in platinum-resistant endometrial adenocarcinoma. *American Journal of Clinical Oncology* , 1996 , 19 : 290-291.
- [3] Jones WB , Schneider J , Shapiro F , Lewis JL. Treatment of resistant gestational choriocarcinoma with Taxol: a report of two cases. *Gynecologic Oncology* , 1996 , 61 : 126-130.
- [4] Pulkkinen J O , Elomaa L , Joensuu H , Martikainen P , Servomaa K , Grenman R. Paclitaxel-induced apoptotic changes followed by time-lapse video microscopy in cell lines established from head and neck cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* , 1996 , 122 : 214-218.
- [5] 赵凯 , 平文祥 , 周东坡. 内生真菌发酵生产紫杉醇的研究现状与展望. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2008 48(3) : 403-407.
- [6] 张惠展. 途径工程—第三代基因工程. 北京: 中国轻工业出版社 2002.
- [7] 张蓓. 代谢工程. 天津: 天津大学出版社 2003.
- [8] 刘文 , 唐功利. 以生物合成为基础的代谢工程和组合生物合成. *中国生物工程杂志 (China Biotechnology)* , 2005 25(1) : 1-5.
- [9] Stephanopoulos G , Alper H , Moxley J. Exploiting biological complexity for strain improvement through systems biology. *Nature Biotechnology* , 2004 , 22 (10) : 1261-1267.
- [10] Stephanopoulos G , Alper H. Metabolic engineering challenges in the post-genomic era. *Chemical Engineering Science* , 2004 , 59 : 5009-5017.
- [11] Jennewein , Rithner SCD , Williams RM. Taxol biosynthesis: taxane-13- α -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2001 , 98 : 13595-13600.
- [12] Schoendorf A , Rithner CD , Williams RM. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 beta-hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2001 , 98 : 1501-1506.
- [13] Walker K , Schoendorf A , Croteau R. Molecular cloning of a taxane-4(20), 11(12)-dien-5 α -ol-acetyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 2000 , 374 : 371-380.
- [14] Walker K , Croteau R. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane 2 α -O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2000 , 97 : 13591-13596.
- [15] Walker K , Croteau R. Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2000 , 97 : 583-587.
- [16] Walker K , Fujisaki S , Long R. Molecular cloning and Heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in taxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2002 , 99 : 12715-12720.
- [17] Walker K , Long R , Croteau R. The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyl-transferase from *Taxus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2002 , 99 : 9166-9171.
- [18] Wildung MR , Croteau R. A cDNA clone for taxadiene synthase , the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* , 1996 , 271 : 9201-9204.
- [19] Hu GW , Wen TY , Yuan YJ. Cloning of taxadiene synthase cDNA from the cell line of *Taxus cuspidata*. *Chinese Journal of Biotechnology* , 2000 , 16 (2) : 158-160.
- [20] Wang W , Shi Q , Zhu P. cDNA Cloning , expression and characterization of taxadiene synthase , a diterpene cyclase from *Taxus chinensis*. *Acta Botanica Sinica* , 2002 , 44 : 181-187.
- [21] MyDoanh Chau , Rodney Croteau. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2 α -

- hydroxylase involved in Taxol biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 427: 48-57.
- [22] Guo YK, Miao ZQ, Qiu CX, Zhang L, Zhao LX, Li ZG, Xu TF, Zhang LD, Gong YF, Zhao DL, Liu DH, Sun XF, Tang KX. Molecular cloning and characterization of a taxadienol acetyl transferase cDNA from *Taxus x media*. *Plant Science*, 2004, 167: 759-764.
- [23] Xiao Y, Zhao D, Wang G. cDNA cloning of taxadiene synthase functioning in taxol biosynthesis. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(10): 2138-2146.
- [24] Christem AA, Gibson DM, Bland J. Production of taxol or taxol-like compounds in cell culture. US Patent No 5019504, 1991.
- [25] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93: 6025-6030.
- [26] Ji W, Wright MB, Cai L, Flament A, Lindpaintner K. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics*, 2002, 3: 12-18.
- [27] 周东坡, 平文祥, 孙剑秋, 周晓辉, 刘晓兰, 杨德柱, 张建平, 郑喜群. 紫杉醇产生菌分离的研究. *微生物学杂志 (Journal of Microbiology)* 2001 21(1): 18-20.
- [28] 周东坡, 孙剑秋, 于寒颖, 平文祥, 郑喜群. 中国一新记录属—多节孢属. *菌物系统 (Mycosystema)*, 2001, 20(2): 277-278.
- [29] 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.
- [30] Sterle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxant production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science*, 1993, 260(9): 214-216.
- [31] 赵凯, 王颖, 王旋, 孙宇石, 平文祥, 周东坡. NTG 和 UV 复合诱变选育紫杉醇高产菌株的研究. *黑龙江大学学报 (Journal of Natural Science of Heilongjiang University)* 2008 25(1): 74-77.
- [32] 赵凯, 周东坡, 平文祥, 刘军, 马玺, 金涛. 产紫杉醇菌株原生质体诱变育种的研究. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)* 2005 21(5): 848-851.
- [33] Zhao K, Ping WX, Zhang LN, Liu J, Lin Y, Jin T, Zhou DP. Screening and breeding of high taxol producing fungi by genome shuffling. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2008, 51(3): 222-231.
- [34] 赵凯, 平文祥, 马玺, 刘军, 周东坡. 紫杉醇高产菌株的原生质体诱变选育及其遗传变异初探. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2005 45(3): 355-358.
- [35] 黄薇, 方孝东, 赵文明, 林栖凤. 分离差异表达基因的方法. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2002, 18(4): 521-524.
- [36] Huang XW, Li YX, Niu QH, Zhang KQ. Suppression subtractive Hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(4): 753-760.
- [37] Adisak Prapavorarat, Siriporn Pongsomboon, Anchalee Tassanakajon. Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34: 611-617.
- [38] Li DM, Staehelin C, Zhang YS, Peng SL. Identification of genes differentially expressed in *Mikania micrantha* during *Cuscuta campestris* infection by suppression subtractive hybridization. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166: 1423-1435.

Screening of high taxol producing fungi by mutagenesis and construction of subtracted cDNA library by suppression subtracted hybridization for differentially expressed genes

Kai Zhao^{1,2}, Lixin Sun³, Xuan Wang¹, Xiuliang Li¹, Xin Wang¹, Dongpo Zhou^{1*}

¹ Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education, Harbin 150080, China

² Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China

³ Hospital of Heilongjiang University, Harbin 150080, China

Abstract: [Objective] To screen mutants with high yield of taxol, and construct cDNA subtractive library of obtained mutant and primary strain HD₁₋₃. [Methods] The spores of taxol-producing fungus HD₁₋₃ were treated by diethyl sulphate (DES), ultraviolet radiation and diethyl sulphate (UV + DES). cDNA subtractive library of taxol producing fungi from the mRNA of obtained mutant with high yield of taxol tester and HD₁₋₃ driver was constructed by using suppression subtracted hybridization (SSH). [Results] The optimal conditions for mutagenesis of strain HD₁₋₃ were as follows: the spore suspension was treated with 8% DES for 15 min, followed by UV irradiation (30w, 30cm distance) for 45sec under magnetic stirring, a mutant UD₁₄₋₁₁ which was able to produce taxol with high yield and could be stably passed on genetics was found. Its ability to produce taxol was improved from $232.73 \pm 4.61 \mu\text{g/L}$ (strain HD₁₋₃) to $312.81 \pm 7.51 \mu\text{g/L}$ (strain UD₁₄₋₁₁). The titer of the constructed cDNA library was 1.2×10^7 cfu/mL, the recombinant rate reached to 75.3% and the length of the inserted fragments was mostly 300 bp-1.0 kb. [Conclusion] A mutant UD₁₄₋₁₁ with high yield was obtained, and cDNA subtractive library of the mutant UD₁₄₋₁₁ and strain HD₁₋₃ was constructed. The study laid solid foundation for isolation of taxol biosynthesis related genes and construction of engineering strains with high yield of taxol by genetic techniques.

Keywords: Taxol, endophytic fungi, mutagenic breeding, suppression subtracted hybridization, cDNA library

(本文责编: 张晓丽)

Supported by National Science Foundation of China (30970090), by the China Postdoctoral Science Foundation funded project (20090450136), by the Innovation Foundation of Harbin Science and Technology Bureau (2010RFQXS043), by the Program for New Century Excellent Talents In Heilongjiang Provincial University (1251-NCET-005), by the Research Program Heilongjiang Education Bureau (11551377) and by the High-level Talents (innovation team) Project of Heilongjiang University (Hdtd2010-17)

* Corresponding author. E-mail: zhoudp2003@yahoo.com.cn

Received: 14 February 2011 / Revised: 21 March 2011