

离子注入介导甘草基因组 DNA 转化酵母菌

金 湘¹, 毛培宏^{1*}, 吕 杰^{1,2}

(1. 新疆大学物理科学与技术学院 离子束生物技术中心, 新疆 乌鲁木齐 830008;

2. 南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 以甘草酸为目标产物, 探讨氮离子(N⁺)和氩离子(Ar⁺)注入介导甘草基因组 DNA 在酵母菌中的转化。方法 通过 N⁺ 和 Ar⁺ 注入介导乌拉尔甘草基因组 DNA 在异常汉逊酵母 *Hansenula anomala* 中随机转化, 转化后的酵母菌经斜面传代和液体培养后, 用醋酐-浓硫酸定性检识和 RP-HPLC 方法, 检测重组酵母菌培养液中甘草酸和甘草次酸的量。结果 获得了生物合成甘草酸和/或甘草次酸的重组酵母菌 5 株。液体培养 96 h, RP-HPLC 测试其培养液中甘草酸最高量 114.49 mg/L, 18-甘草次酸和 18-甘草酸最高量分别为 0.56 和 0.81 mg/L。TLC 检测发现其中 1 株重组酵母菌的培养液中含一种未知的红色组分。结论 采用离子注入介导甘草基因组 DNA 大分子转化技术, 可获得易于人工培养的产生甘草酸等次生代谢产物的微生物工程菌株。

关键词:离子注入; 甘草基因组 DNA; 重组酵母菌; 甘草酸

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)03-0461-04

Transformation of *Glycyrrhiza uralensis* genomic DNA into yeast mediated by ion implantation

JIN Xiang¹, MAO Pei-hong¹, LU Jie^{1,2}

(1. Institute of Ion Beam Biotechnology, College of Physic Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830008, China; 2. College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract : Objective With the sole object of glycyrrhizic acid products, the methods were investigated for *Glycyrrhiza uralensis* genomic DNA transformation into *Hansenula anomala* by nitrogen and argon ion implantation. **Methods** The genomic DNA from *G. uralensis* was randomly transferred into *H. anomala* by nitrogen and argon ion bombardment. The recombined yeasts were cultured by the slant and liquid cultivation, in which the contents of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid were determined by acetic anhydride-H₂SO₄ qualitative test and RP-HPLC determination. **Results** Five recombined yeast strains that produced glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid were obtained. After cultured in liquid medium for 96 h, the highest content of glycyrrhizic acid in the cultivation liquid was 114.49 mg/L and that of 18-glycyrrhetic acid and 18-glycyrrhetic acid were respectively 0.56 and 0.81 mg/L by RP-HPLC. A kind of unknown red component was found in the cultivation liquid of one recombined strain by TLC. **Conclusion** The recombined yeast strains of producing glycyrrhizic acid could be obtained *G. uralensis* genomic DNA transformation into yeast mediated by the ion implantation.

Key words: ion implantation; *Glycyrrhiza uralensis* F. genome DNA; recombined yeast; glycyrrhizic acid

甘草为豆科甘草属多年生深根性草本植物, 具有抗寒、耐热、抗盐碱等优良特性, 是荒漠、半荒漠地区保持水土、改良土壤、防风固沙的重要药用植物。甘草酸(glycyrrhizic acid, GA)是甘草地部分最重要的五环三萜皂苷类生理活性物质之一, 高剂量的 GA 可以完全阻止 SARS 病毒的复制^[1]; GA 能促进

艾滋病患者免疫力的恢复, 诱导干扰素, 抑制癌细胞的生长^[2,3]。GA 一直依赖于植物来源, 属于资源依赖型产品。若能构建产 GA 的微生物工程菌株, 最终实现 GA 的微生物发酵生产, 将对干旱、半干旱、荒漠地区生态环境的保护产生深远的影响。但 GA 的生物合成途径复杂, 目前还没有与 GA 生物合成

收稿日期: 2009-06-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30560182, 30960006)

作者简介: 金 湘(1960—), 女, 新疆奇台人, 助理研究员, 主要从事微生物代谢、分子生物学和离子束生物技术相关领域研究。

*通讯作者 毛培宏 Tel: (0991)4543656 E-mail: phmao@china.com; phmao@xju.edu.cn

相关的基因信息,因此,至今无人按照常规的基因工程方法构建工程菌。

离子注入生命体的独特机制,使其成为一种新的转基因手段^[4]。在药用植物基因组 DNA 转化酵母菌方面,吕杰等^[5]利用离子注入介导药用植物麻黄基因组 DNA 转化酵母菌,获得了遗传稳定的以葡萄糖为碳源、NaNO₃ 为氮源生物合成麻黄碱和/或伪麻黄碱的重组酵母菌。基于离子注入介导 DNA 大分子遗传转化的原理^[4],笔者进行了离子注入介导甘草基因组 DNA 在异常汉逊酵母菌中的随机转化,以期获得产 GA 的重组酵母菌株。

1 材料与与方法

1.1 菌种:异常汉逊酵母 *Hansenula anomala* 2340,来源于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 主要试剂和仪器:葡萄糖·H₂O,蛋白胨,酵母膏粉,琼脂粉,石英砂,变色硅胶,皂苷类物质定性检识试剂和薄层色谱试剂,RP-HPLC 试剂[其中 GA、18-甘草次酸(18-glycyrrhetic acid,18-GAs)和 18-甘草酸(18-glycyrrhietic acid,18-GAs)购自 Sigma 公司];CTAB 及基因组 DNA 提取用试剂。IBB Device 1 多功能离子注入机,Sigma 3—18K 离心机,Waters1525 RP-HPLC 色谱仪。

1.3 YPD 培养基:酵母膏 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 000 mL。

1.4 野生甘草的采集及其基因组 DNA 的制备:野生乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* F. 的采集方法及应用 CTAB 法制备其基因组 DNA 的方法均按文献方法^[6]进行。

1.5 酵母菌膜的制备及其离子注入:按文献方法^[5]进行。

1.6 甘草基因组 DNA 的导入:离子注入结束后,立即用 2 mL 质量浓度为 400 μg/mL 的甘草基因组 DNA 的 TE 缓冲液浸泡离子注入后的酵母菌膜,28~30 ℃ 静止温育 2 h 后,用无菌玻璃刮铲反复洗脱 2 min,获得洗脱液。取 0.1 mL 洗脱液用无菌玻璃刮铲均匀涂布于 YPD 平板培养基,倒置,于 28~30 ℃ 培养 72 h。未注入 Ar⁺ 或 N⁺ 的酵母菌膜也按相同方法处理,并以 2 mL 无菌水代替甘草基因组 DNA TE 缓冲液,浸泡离子注入后的菌膜为对照。

1.7 重组酵母菌培养液 GA 的检测:将 YPD 平板培养基上生长的酵母菌菌落分别接入 YPD 斜面,28~30 ℃ 培养 72 h,分别转接 YPD 液体培养基,置摇床 230 r/min、28~30 ℃ 培养 96 h。液体培养结束后,8 000 × g 离心 10 min,收集上清液,进行皂苷类物

质的定性检识、薄层色谱检测和 RP-HPLC 测试。

GA 的 RP-HPLC 检测方法^[7,8]:Waters 1525 pump RP-HPLC 色谱仪,UV2487 双通道紫外检测器,检测波长()210 nm,Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(150 mm ×4.6 mm),Breeze 3.30 色谱工作站。流动相:0.2 mol/L 乙酸铵-[甲醇-乙腈(2:1)](75:25);体积流量:1.2 mL/min。每次进样量 10.0 μL。

GA_s 的 RP-HPLC 检测方法^[7,8]:流动相:0.2 mol/L 乙酸铵-[甲醇-乙腈(2:1)](70:30),其他条件与 GA 的 RP-HPLC 检测方法相同。

2 结果和分析

2.1 重组酵母菌培养液中皂苷类物质的定性检识:通过 Ar⁺ 和 N⁺ 注入介导甘草基因组 DNA 在酵母菌中的转化,获得了 1 266 株 T₂ 代重组酵母菌,其中 Ar⁺ 注入介导获得 494 株,N⁺ 注入介导获得 772 株。以皂苷类物质为目标组分,对 T₂ 代和 T₃ 代重组酵母菌培养液进行醋酐-浓硫酸(Liebermann-Burchard's reaction)定性检识,结果表明,T₂ 代菌株培养液中皂苷类物质的阳性反应率平均为 22.91%,其中 27.93%可遗传至 T₃ 代。由此获得了产皂苷类物质的 T₃ 代重组酵母菌 81 株。真空条件下未注入 Ar⁺ 或 N⁺ 的酵母菌,在导入甘草基因组 DNA 的处理中,未获得皂苷类物质阳性反应的菌株。以 2 mL 无菌水代替甘草基因组 DNA TE 缓冲液,浸泡离子注入后的菌膜为对照的处理中,也未获得皂苷类物质阳性反应的菌株。

2.2 重组酵母菌培养液的 RP-HPLC 检测:将 T₃ 代皂苷类物质定性检识为阳性的重组菌株连续传代至 T₈ 代,其中 5 株重组菌株的定性检识仍为阳性,说明其产皂苷类物质的性能稳定,培养液的 RP-HPLC 检测结果(表 1)表明,重组菌株 N7059 培养液中 GA 质量分数为 114.49 mg/L,18-GAs 和 18-GAs 质量分数分别为 0.56 和 0.80 mg/L,而重组菌株 A2053 的培养液中未检出 18-GAs。这 5 个重组菌株培养液中的 GA 和 GA_s 的量各不相同,说明它们在 GA 和 GA_s 生物合成代谢方面存在差异,反映了离子注入介导外源 DNA 大分子转化的随机性和重组酵母菌的遗传多样性。

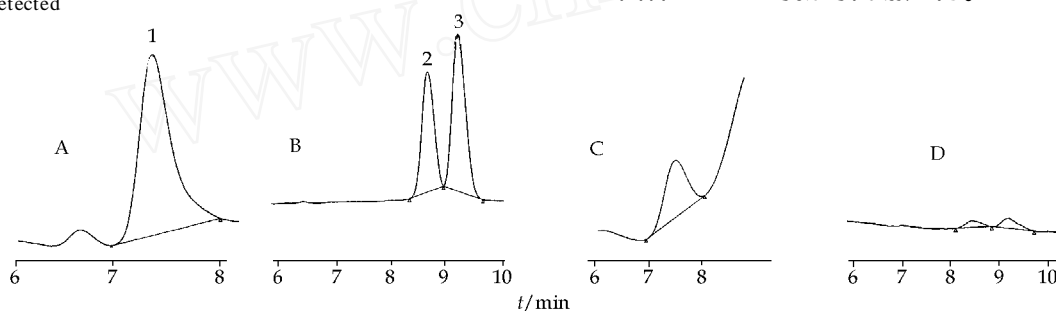
尽管重组菌株 N7059 培养液中 GA 量较高,但从其 RP-HPLC 色谱图(图 1-B)中发现,GA 与其保留时间(RT)更长的未知组分未完全分离,这说明 GA 在培养液中并不是处于游离状态,而是与某一组分呈紧密结合状态,而其 GA_s 则处于游离状态(图 1-D)。

2.3 重组酵母菌培养液的薄层色谱检测:将生物合

表 1 重组酵母菌 T8 代培养液中 GA 和 GAs 的量
Table 1 Yields of GA and GAs in extracellular solutions of generation T8 recombined yeasts

菌株编号	GA/ (mg · L ⁻¹)	18 - GAs/ (mg · L ⁻¹)	18 - GAs/ (mg · L ⁻¹)
A1027	60.25	0.14	0.11
A2053	65.02	0.03	—
A2163	48.41	0.18	0.20
A2474	25.25	0.42	0.81
N7059	114.49	0.56	0.80
对照菌株 2340 液体培养基	—	—	—

—:未检出
—:undetected



A, B-对照品 C, D-重组菌株 N7059 T8 代 96 h 培养液

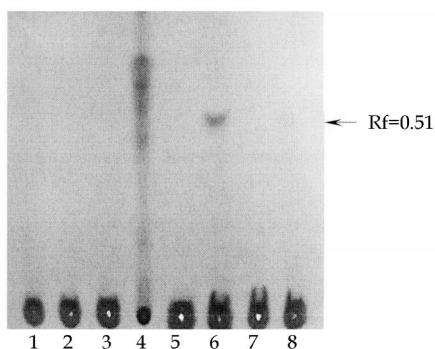
A, B-reference substances C, D-extracellular solution of recombined strain N7059 generation T8 cultured for 96 h

1-甘草酸 2-18 -甘草次酸 3-18 -甘草次酸

1-glycyrrhizic acid 2-18 -glycyrrhetic acid 3-18 -glycyrrhetic acid

图 1 重组菌株 N7059 培养液中 GA 和 GAs 的 RP-HPLC 图

Fig 1 RP-HPLC Chromatograms of GA and GAs in extracellular solution of recombined strain N7059



1-重组菌株 A1027 2-重组菌株 A2053 3-重组菌株 A2163 4-甘草全株 75%乙醇浸出液 5-重组菌株 A2474 6-重组菌株 N7059 7-对照菌株 8-空白培养液

1-strain A1027 2-strain A2053 3-strain A2163 4-ethanol extract from whole plant of *G. uralensis* 5-strain A2474 6-strain N7059 7-*H. anomala* 2340 as control strain 8-liquid medium

图 2 重组酵母菌株培养液在薄层色谱中的红色组分

Fig 2 TLC Analysis of red components in extracellular solution of recombined yeast strains

3 讨论

在 Ar⁺ 注入介导甘草基因组 DNA 转化获得的

成 GA 的 5 株重组酵母菌 96 h 培养液分别点样于 150 mm × 200 mm 的硅胶 GF₂₅₄ 层析板,以对照菌株 96 h 培养液、甘草全株 75%乙醇浸出液和未接种的空白培养液为对照,每个样品的总计点样量为 200 μL。在石油醚-苯-醋酸乙酯-冰醋酸(10 20 7 0.5)的溶剂中展开 45 min。在可见光下,发现重组菌株 N7059 的培养液中含一种红色组分(图 2),其 R_f 值为 0.51。在相同条件下,对照菌株、空白培养液、甘草全株 75%乙醇浸出液在 R_f 值为 0.51 处,均没有该组分。由此推测,该红色组分为重组菌株 N7059 的新的代谢产物。

494 株重组酵母菌中,只有 4 株(表 1 中的 A1027、A2053、A2163 和 A2474)的培养液中检出了 GA 和(或)GAs,以 GA 为目标产物计算,甘草基因组 DNA 中与 GA 生物合成相关基因的转化率为 0.81%。N⁺ 注入介导获得的 772 株重组酵母菌中,只有 1 株(表 1 中的 N7059)的培养液中检出了 GA 和 GAs,以 GA 为目标产物计算,甘草基因组 DNA 中与 GAs 生物合成相关基因的转化率仅为 0.13%,大大低于 Ar⁺ 注入介导的甘草基因组 DNA 转化。在离子注入过程中,非生物活性的 Ar⁺ 不会与生物靶组织发生化学反应,而以氙气的形式逸出靶面,因此,在离子注入介导外源 DNA 大分子遗传转化研究中,一般选用刻蚀效果好、化学性质稳定的 Ar⁺ 作为注入离子,有利于提高外源 DNA 的转化率和转化后代的稳定性^[9]。

许多参与次生代谢产物生物合成的多酶体系是由单个分开的具有明显的功能区域组成的^[10-13],在重组菌株 N7059 的次生代谢产物中发现一种新的红色组分(图 2),是否是因为甘草基因组与酵母菌基因组 DNA 之间的基因重组改变了次生代谢产物

的生物合成途径而产生新的代谢旁路、形成新的化合物,尚有待进一步研究。对重组菌株 N7059 产生的红色组分的结构解析研究,将为甘草与酵母菌之间的基因交流提供进一步的化学证据和分子证据。

离子注入介导外源 DNA 转化的最大特点是不需要事先知道或克隆出目的 DNA 片段,因此在目前还没有 GA 生物合成相关的基因信息的情况下,仍可采用离子注入介导甘草基因组 DNA 转化方法,以 GA 为目标产物,筛选获得易于人工培养的产生 GA 的酵母工程菌株。通过对遗传稳定的生物合成 GA 的重组酵母菌的基因组学、蛋白质组学和代谢组学的深入研究,将获得与 GA 生物合成相关的多个基因及其调控信息。

致谢:武宝山副教授和凌海秋副教授参与离子注入工作,乔坤云高级实验师和周俊副研究员进行 GA 和 GAs 的 RP-HPLC 分析测试工作。

参考文献:

- [1] Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus [J]. *Lancet*, 2003, 361 (9374): 2045-2046.
- [2] Takei M, Kobayashi M, Li X D, et al. Glycyrrhizin inhibits R5 HIV replication in peripheral blood monocytes treated with 1-methyladenosine [J]. *Pathobiology*, 2005, 72: 117-123.
- [3] Harads S. The broad antiviral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope [J]. *Biochem J*, 2005, 15 (392): 191-199.
- [4] Yu ZL. *Introduction to Ion Beam Biotechnology* [M]. New York: Springer Publishing House, 2006.
- [5] 吕杰,金湘,毛培宏,等. 氮离子注入介导麻黄基因组 DNA 转化酵母菌[J]. *中草药*, 2008, 39(8): 1227-1230.
- [6] 邵鹏柱,曹晖. *中药分子鉴定* [M]. 上海:复旦大学出版社, 2004.
- [7] 李伟,邹巧根,宋喆,等. RP-HPLC 法测定强力宁注射液及甘草提取物中三种甘草皂苷的含量[J]. *中国药科大学学报*, 2002, 33(1): 32-34.
- [8] 杨文远,郝凤霞. 用 RP-HPLC 法同时测定甘草中的甘草酸和甘草次酸[J]. *宁夏大学学报:自然科学版*, 2005, 26(1): 56-58.
- [9] Feng H Y, Yu Z L, Chu P K. Ion implantation of organisms [J]. *Mat Sci Eng R*, 2006, 54: 49-120.
- [10] 朱辉,马亮,詹良静. 采用重组微生物技术靶位筛选非抗菌活性的先导化合物[J]. *国外医药·抗生素分册*, 2001, 22(2): 69-76.
- [11] 张致平. *微生物药物学* [M]. 北京:化学工业出版社, 2003.
- [12] 曹福祥. *次生代谢* [M]. 长沙:国防科技大学出版社, 2003.
- [13] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440: 940-943.

马蹄香表达序列标签资源的 SSR 信息分析

李珊¹, 周天华², 赵桂仿², 朱云国¹, 杨晓伶¹, 程舟^{1*}

(1. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; 2. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要:目的 分析马蹄香 EST 资源的 SSR 信息, 为开发 EST-SSR 标记奠定基础。方法 从 GenBank 中获得马蹄香 EST 序列, 用 Sequencher 4.8 软件进行序列拼接得到 Uni-EST 序列, 用 SciRo Ko3.4 软件对 Uni-EST 序列进行 SSR 扫描, 分析 EST-SSR 的分布频率和重复基元的类型特征。结果 共获得 10 274 条马蹄香 EST 序列, 通过预处理共得到全长为 5.11×10^6 bp 的无冗余 Uni-EST 6 643 条。在这些序列中共搜索出 1 408 个 SSR 位点, 分布在 1 232 条 Uni-EST 序列中, 发生频率为 18.55%, EST-SSR 的平均长度为 22.30 bp, 平均每 3.63 kb 含 1 个 SSR 位点。单核苷酸重复在马蹄香 EST-SSR 中占主导地位, 发生频率为 12.24%, 其次为二核苷酸重复, 发生频率为 5.01%。在所有重复基元中, A/T 基元出现频率最高, 其次为 AG/CT。结论 马蹄香 EST 中 SSR 出现的频率较高, 并且类型较为丰富。

关键词: 马蹄香; 表达序列标签; EST-SSR

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)03-0464-05

Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from *Saruma henryi*

LI Shan¹, ZHOU Tian-hua², ZHAO Gui-fang², ZHU Yun-guo¹, YANG Xiao-ling¹, CHENG Zhou¹

(1. School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China;

2. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Objective To analyze the simple sequence repeat (SSR) information in expressed sequence

收稿日期: 2009-06-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30800087)

作者简介: 李珊(1976—), 女, 陕西西安人, 讲师, 博士, 主要从事资源植物学研究。

Tel: 13916300269 E-mail: lishanbio@yahoo.com.cn

*通讯作者 程舟 Tel: (021) 65985185 Fax: (021) 65985185 E-mail: chengzhou@mail.tongji.edu.cn