

# 复合诱变选育 9 $\alpha$ -羟基青蒿素高转化率菌株

唐萍艳, 刘吉华, 余伯阳

(中国药科大学中药复方实验室, 江苏 南京 211198)

**[摘要]** 采用紫外和微波诱变方法对具有转化青蒿素产生 9 $\alpha$ -羟基青蒿素活性的链霉菌 ATCC13273 进行处理, 以含有青蒿素为唯一碳源的筛选培养基进行选育. 结果表明: 通过紫外微波复合诱变的方法可以有效地提高 ATCC13273 的生物转化率, 9 $\alpha$ -羟基青蒿素的产率为 50.7%, 约为原菌株的 2 倍.

**[关键词]** 9 $\alpha$ -羟基青蒿素, 复合诱变, 选育

**[中图分类号]** Q931 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2011)03-0107-04

## Breeding of the High 9 $\alpha$ -Artemisinin Transformation Ratio Strain by Compound Mutation

Tang Pingyan, Liu Jihua, Yu Boyang

(Department of Complex Prescription of TCM, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**Abstract:** To increase the 9 $\alpha$ -hydroxy-artemisinin transformation ratio, fermented *Streptomyces griseus* ATCC-13273 in the way of ultraviolet (UV) and microwave compound mutation, and bred it by medium which uses artemisinin as the only carbon source. It proved that it is an effective way to increase the ratio of *Streptomyces griseus* ATCC-13273 transforms artemisinin into 9 $\alpha$ -hydroxy-artemisinin by UV ray and microwave compound mutation, the yield of 9 $\alpha$ -hydroxy-artemisinin is 50.7%, which is almost twice higher than the initial strain's.

**Key words:** 9 $\alpha$ -hydroxy-artemisinin, compound mutation, breeding

青蒿素 (Artemisinin, QHS) 是我国科学工作者首先从植物黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 叶中分离获得的抗疟活性成分, 具有高效低毒的特点<sup>[1]</sup>, 尤其对具有抗氯喹能力的脑疟和畸形疟具有良好的效果<sup>[2]</sup>. 其衍生物如双氢青蒿素、蒿甲醚<sup>[3]</sup>、青蒿酯钠<sup>[4]</sup>、青蒿琥酯<sup>[5]</sup>等均已应用于临床. 但由于青蒿素过氧桥结构的不稳定性, 使得对青蒿素的化学修饰难以在其 C-12 位以外位点进行, 极大限制了青蒿素衍生物的制备及其活性相关研究. 近年来科研工作者对青蒿素生物转化做了很多研究<sup>[6-9]</sup>, 我们通过生物催化手段成功地在青蒿素 C-12 以外位点引入可修饰基团<sup>[10]</sup>. 本研究通过紫外和微波复合诱变的方法, 对具有青蒿素转化活性的链霉菌 ATCC-13273 进行复合诱变, 提高青蒿素转化为 9 $\alpha$ -羟基青蒿素的生物转化率, 为青蒿素多位点修饰产物的制备奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 原菌株

灰色链霉菌 ATCC-13273 为美国阿依华大学 John P. N. Rosazza 教授所赠.

#### 1.1.2 培养基

①斜面培养基 (PDA 培养基): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g, VB 微量,

收稿日期: 2011-03-25.

基金项目: 江苏省“六大人才高峰”资助项目.

通讯联系人: 唐萍艳, 硕士研究生, 研究方向: 中药活性生物转化. E-mail: boyangyu59@163.com

琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 自然, 0.1 Mpa, 121℃, 灭菌 30 min;

②筛选平板培养基: 青蒿素 1 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 g, NaCl 0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g,  $KNO_3$  1.0 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 自然, 0.1 Mpa, 121℃, 灭菌 30 min;

③发酵培养基: 葡萄糖 20 g, 酵母膏 5 g, 豆粕 5 g, NaCl 5 g,  $K_2HPO_4$  5 g, 水 1 000 mL, pH 自然, 0.1 Mpa, 121℃, 灭菌 20 min.

## 1.2 方法

### 1.2.1 孢子悬液的制备

将菌种转接至斜面培养基活化培养 4 d, 加入无菌水, 振荡, 制成浓度为  $10^6$  个/ml 的孢子悬液.

### 1.2.2 诱变方法<sup>[11]</sup>

1.2.2.1 紫外诱变方法 打开 15 W 紫外灯预热 15 min. 吸取 15 mL 的菌悬液加入直径 9 cm 的培养皿中, 置于磁力搅拌器上搅拌, 培养皿距紫外灯 20 cm 处, 分别照射 0 s、15 s、30 s、45 s、60 s、90 s, 取 0.5 mL 处理过的孢子悬液均匀涂布于筛选培养基平板上, 28℃ 避光培养 7 d, 进行菌落计数. 根据对照平板上的菌落数, 计算紫外不同辐射时间的致死率. 致死率(%) = (对照菌落数 - 处理菌落数) / 对照菌落数 × 100%.

### 1.2.2.2 微波诱变方法<sup>[12]</sup>

微波处理采用 2 450 MHz 的微波炉, 输出功率为 700 W, 微波输入功率为 1 050 W, 采用低温热分散法消除微波的热效应. 将已经过紫外处理致死率在 75% 的菌株制备成孢子悬液, 分别微波辐照 0 s、15 s、30 s、45 s、60 s、90 s, 取 0.5 mL 均匀涂布于筛选培养基平板上, 28℃ 避光培养 7 d, 进行菌落计数后制作出致死率曲线, 同上.

### 1.2.3 突变株的筛选

突变菌株的筛选方法参见文献[13], 并加以适当的调整. 从致死率为 75% 的突变菌株培养皿中挑选出长势较好的菌落, 将其接种于装有 25 mL 液体发酵培养基的三角瓶(250 mL)中, 置于 28℃, 180 r/min 的摇床中进行发酵培养, 在菌体对数生长期加入 10 mg 青蒿素底物, 继续发酵培养 84 h. 发酵结束后, 乙酸乙酯等体积萃取发酵液 3 次, 提取物以甲醇溶解, 定容至 25 mL, 进行 HPLC 分析.

### 1.2.4 突变株的遗传稳定性检验

用菌体连续传代的方法, 考察诱变后筛选到的高产菌株的遗传稳定性. 将筛选出的正突变优势菌株连续传代 5 次, 将其接入发酵培养基中进行发酵培养, 考察其生物转化率稳定性.

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外线诱变剂量的确定

紫外线处理时间对菌株的致死率见图 1. 随着诱变时间的延长, 致死率不断上升. 诱变时间为 30 s 时, 致死率为 70%; 诱变时间为 90 s 时, 致死率达 100%. 紫外线致死率一般在 75% 左右时正突变率最高<sup>[14]</sup>, 所以确定较佳的紫外诱变时间为 45 s.

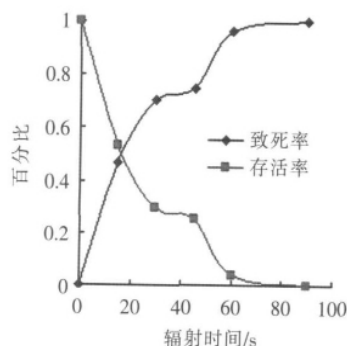


图1 紫外诱变时间与菌株致死率的关系

Fig.1 Relationship between ultraviolet irradiation time and lethal rate

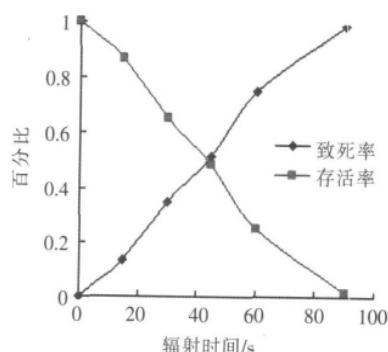


图2 微波诱变与菌株致死率的关系

Fig.2 Relationship between microwave irradiation time and lethal rate

## 2.2 微波诱变剂量的确定

微波极强的穿透效应使胞内外水分子同时产生剧烈转动,从而引起细胞壁通透性发生变化,更易使细胞内代谢物分泌出来.2 450 MHz 微波能使水分子 180°/s 的速度来回转动 24.5 亿余次,强烈的转动摩擦使得胞内 DNA 分子氢键和碱基堆积力受损,最终引起 DNA 分子结构变化导致遗传变异<sup>[12]</sup>.在微波辐射的过程中,将装有孢子悬液的三角瓶至于冰浴中,并每 10 s 停止辐射,使菌悬液温度始终保持在 10 ~ 15℃,以最大程度消除了微波的热效应,使非热效应充分反映出来.从诱变结果看,微波辐射 60 s 时致死率为 74.5%,为最佳的辐射时间(图 2).

## 2.3 正突变优势菌株的筛选

选择致死率为 75% 的平板,随机挑取长势旺盛的菌株,接入液体培养基,对青蒿素进行发酵培养后,筛选出优良突变菌株(表 1).实验结果表明,初步筛选出的这 11 株诱变菌株转化率比原菌株有较明显的提高.

表 1 筛选出的突变菌株转化率

Table 1 The transformation ratio of the selected mutation strains

Strain	QHS remained%	9 $\alpha$ -hydroxy-artemisinin yield%	Strain	QHS remained%	9 $\alpha$ -hydroxy-artemisinin yield%
出发菌	46.7	25.3	B3-8	21.9	46.7
B5	40.1	36.3	B3-12	25.3	43.8
A-14	26.3	47.4	B5-1	28.9	32.5
B3-4	33.2	34.1	B4-2	24.1	50.7
A-10	22.4	51.1	B1-10	29.8	38.4
B5-8	27.5	38.9	B3-10	37.9	25.4

## 2.4 突变菌株的遗传稳定性

对筛出的突变株传代 5 次,进行发酵培养,得到一株遗传稳定性较好的菌株 B4-2,菌株诱变前后转化产物 HPLC 分析见图 3、4.从图 4 中可以看出,诱变前,青蒿素底物峰较高,生物转化率较低;经过复合诱变后,底物峰明显减小,9 $\alpha$ -羟基青蒿素峰有明显的增高.菌株遗传稳定结果见表 2,经过 5 次传代,诱变菌株 B4-2 的转化率保持稳定.

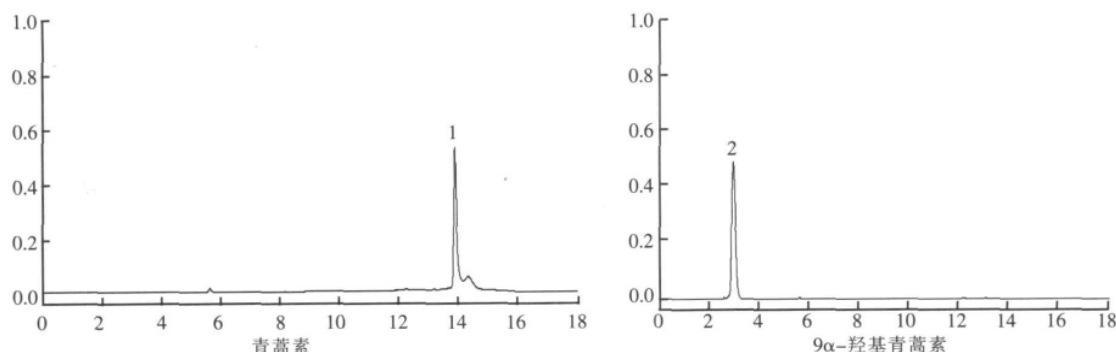
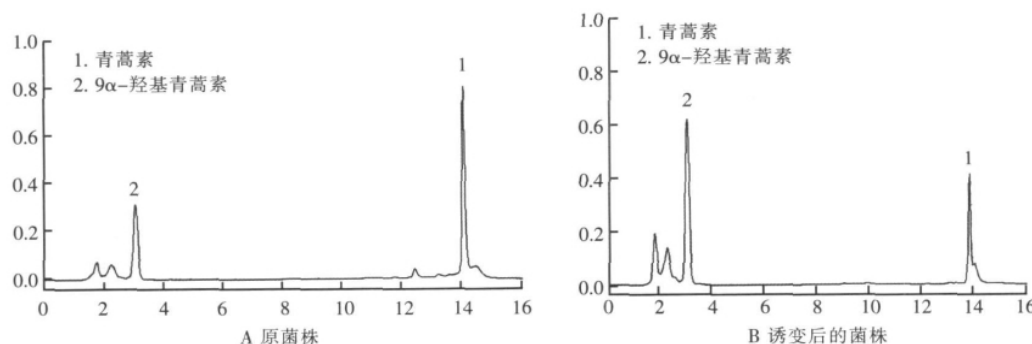
图 3 青蒿素及 9 $\alpha$ -羟基青蒿素 HPLC-ELSD 图谱Fig.3 HPLC-ELSD graph of artemisinin and 9 $\alpha$ -hydroxy-artemisinin

图 4 青蒿素生物转化 HPLC-ELSD 分析图

Fig.4 HPLC-ELSD detect artemisinin biotransformation

表 2 诱变株的遗传稳定性  
Table 2 Genetic stability for mutation strains

Generation	1	2	3	4	5
QHS remained%	24. 9	23. 1	24. 6	23. 1	24. 3
9 $\alpha$ -hydroxy-artemisinin yield%	50. 3	50. 6	50. 8	50. 9	50. 7

### 3 讨论

诱变育种与其他育种方法相比,具有速度快、收益大、方法简单等优点,是当前菌种选育的一种主要方法。在生产中试用得十分普遍。其中紫外线诱变主要是使 DNA 分子强烈吸收紫外线,从而引起 DNA 链断裂, DNA 分子内部和分子之间交联,核酸与蛋白质交联,嘧啶水合作用以及形成嘧啶二聚体,妨碍 DNA 链的正常解开与复制,从而引起生物体的基因突变或死亡<sup>[15]</sup>。而微波诱变主要是通过其极强的穿透效应使胞内外水分子同时产生剧烈转动,强烈的转动摩擦使得胞内 DNA 分子氢键和碱基堆积力受损,最终引起 DNA 分子结构变化导致遗传变异<sup>[12]</sup>。

本研究通过紫外和微波的复合诱变,确定了菌株致死率为 75% 时的最佳诱变条件为紫外辐射 45 s、微波辐射 60 s。经诱变处理及遗传稳定性筛选,获得一株转化青蒿素为 9 $\alpha$ -羟基青蒿素的高产菌株 B4-2,且经传代实验,其遗传稳定性较好。在实验培养条件下,转化底物青蒿素消耗率为 75. 9%,其中 9 $\alpha$ -羟基青蒿素的产率为 50. 7%,为青蒿素多位点修饰产物的制备奠定了良好的基础。

### 〔参考文献〕

- [1] 青蒿素结构研究协作组. 一种新型的倍半萜内酯 - 青蒿素 [J]. 科学通报, 1977, 22( 3): 142.
- [2] 区德锦, 黄亚铭. 国外传统医药学的抗疟药研究进展 [J]. 中国热带医学, 2010, 10( 3): 368-375.
- [3] 张庆华, 邵祥稳. 蒿甲醚注射液和双氢青蒿素片治疗疟疾 73 例疗效观察 [J]. 山西医药杂志, 2010, 39( 6): 526-527.
- [4] 郭兴伯, 符林春, 李国桥. 青蒿酯钠 I 期临床药代动力学的研究 [J]. 广州中医学院学报, 1987, 4( 1): 40-42.
- [5] 张源才, 余上海, 张永辉, 等. 超声经皮肝穿注射青蒿琥酯治疗原发性肝癌 15 例 [J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11( 2): 64-66.
- [6] 罗代娟, 罗贵甫. 青蒿素生物合成研究进展综述 [J]. 精细化工中间体, 2008, 38( 6): 12-16.
- [7] Han J, Dai J G, Cui Y J, et al. Biotransformation of artemisinin by Catharanthus roseus and Ginkgo biloba cell suspension cultures [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2003, 34( 2): 166-168.
- [8] Li L X, Su Y F, Guo D, et al. Biotransformation of artemisinin by Hairy Root Cultures of *Rheum palmatum* L. [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2002, 11( 40): 122-124.
- [9] Zhan J X, Guo H Z, Han J, et al. Biotransformation of artemisinin by fermentation of *Rhizopus chinensis* and *Cunninghamella elegans* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2002, 33( 10): 869-872.
- [10] Liu J H, Chen Y G, Yu B Y, et al. A novel ketone derivative of artemisinin biotransformed by *Streptomyces griseus* ATCC 13273 [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006, 16( 7): 1 909-1 912.
- [11] 李小平, 魏玲玲, 张慧发, 等. 保加利亚乳杆菌乳酸高产菌株的紫外诱变选育 [J]. 山西农业大学学报, 2010, 30( 1): 88-90.
- [12] 戴群, 戴传超, 顾敏. 花生四烯酸高产菌株的诱变和筛选研究 [J]. 食品科技, 2010, 3( 1): 19-22.
- [13] 赵士豪, 马同锁, 路新利, 等. 酸奶生产菌株的诱变选育 [J]. 生物技术, 2005, 15( 5): 22-24.
- [14] 董函竹, 刘沛溢, 谭天伟. 高产腺苷蛋氨酸菌株的诱变选育及培养方式研究 [J]. 生物加工过程, 2006, 4( 2): 20-23.
- [15] 陈宏军. 蛋白酶高产菌株的紫外诱变选育 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38( 3): 1 110-1 111, 130.

〔责任编辑:黄 敏〕