

南极土壤微生物宏基因组文库构建 及其抗肿瘤活性初探*

赵晶¹ 杨祥胜¹ 曾润颖^{2,3**}

1. 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005; 2. 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 厦门 361005;

3. 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005

摘要 微生物代谢产物是药物的重要来源之一, 然而采用传统的分离培养筛选的手段仅能对不到1%的微生物资源进行研究开发. 通过构建环境样品微生物宏基因组文库能突破人工培养的瓶颈, 直接克隆到完整的次级代谢产物合成基因簇, 并从中寻找新的药物和活性次级代谢产物. 实验直接提取南极中山站排污口土壤样品中微生物总基因组DNA, 以黏粒(SuperCos 1)为载体, 构建了宏基因组文库, 获得了约27 000个克隆子, 平均插入片段在35 kb以上, 覆盖了至少946 Mb的微生物基因组信息. 通过差异性DNA修复试验(DDRT)法对该文库进行筛选, 获得13个具有抗肿瘤活性的克隆子, 并采用MTT法对其中活性较高的克隆子进行细胞毒活性测定, 表明克隆子AE-3对卵巢癌细胞具有明显的生长抑制作用.

关键词 南极土壤微生物 宏基因组文库 抗肿瘤活性 次级代谢产物

微生物作为生物活性物质的一个重要来源, 为筛选和开发抗肿瘤药物提供了丰富的资源. 在过去几十年里, 人们从微生物资源中获得了众多的活性物质. 然而, 随着微生物活性产物研究开发的广泛开展, 可培养微生物往往被重复培养和筛选, 从中筛选到新活性物质的几率逐步下降. 而且, 利用现有技术培养的微生物仅占微生物总种类数的1%左右, 而多达99%的未培养(uncultured)或非可培养(non-culturable)微生物没有得到研究^[1], 因此新物质的发现迫切需要新的技术和方法. 宏基因组技术的建立, 避开了传统的微生物的分离培养, 能够最大限度地开发利用未/非可培养微生物的功能基因. 同时, 迄今为止所发现的大多数活性物质的生物合成基因都是成簇排列的, 因此需要通过宏基因组技术来克隆到完整的次级代谢产物合成基因簇, 并从中寻找新的药物和活性次级代谢产物^[2-4].

尽管从20世纪60年代开始至今已分离得到了几十种具有潜在抗肿瘤活性的新物质^[5], 但恶性肿瘤中90%以上的实体瘤的治疗未能达到满意效果, 因此抗肿瘤新药筛选在肿瘤治疗中占重要地位. 南极的极端环境中生存着众多尚未得到研究的特殊微生物, 为筛选特异、新颖的抗肿瘤药物提供了丰富的资源. 目前在利用构建环境宏基因组文库进行活性物质筛选的研究中, 通过构建Cosmid或细菌人工染色体(BAC)文库获得了次级代谢途径的聚酮合成酶基因、抗菌素、抗生素等多种天然产物^[4,6-8], 但尚未见到通过构建环境样品宏基因组文库筛选到抗肿瘤活性克隆子的报道, 尤其是在南极、深海等极端环境中. 本文构建了南极土壤样品的宏基因组DNA的Cosmid文库, 并采用指示菌株的差异性DNA修复试验(DDRT)^[9]作为抗肿瘤活性物质的筛选模式对所构建的文库进行初步筛选, 获得了13

2006-05-17 收稿, 2006-07-10 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 40406029)

** 通讯作者, E-mail: runyingzeng@yahoo.com.cn

个具有潜在抗肿瘤细胞活性的克隆子, 并对其细胞水平的抗肿瘤活性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

指示菌株 343/591 和 343/636 购自上海医药工业研究院; 卵巢癌细胞株 HO-8910 由中国科学院细胞库提供; 低熔点琼脂糖酶购自 Epicentre 公司; SuperCos 1 Cosmid Vector kit 和 Gigapack III XL Packaging Extract 购自 Stratagene 公司; T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 消毒过滤膜装置购自 Millipore 公司。

南极沉积物样品取自中山站排污口, 样品于 2005 年 2 月中国第 21 次南极考察期间采集, 采集后保存于 -20°C , 带回实验室在无菌超净台分装后, 转移至 -80°C 保存。

1.2 环境样品宏基因组 DNA 提取

根据原位裂解法的基础上加以改进^[10]。在 5 g 样品中加入核酸提取缓冲液(100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH8.0), 100 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 100 mmol/L EDTA (pH8.0), 1.5 mol/L NaCl, 1% CTAB, 10% 蔗糖溶液), 蛋白酶 K (终浓度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 溶菌酶 (终浓度 1 mg/mL) 和 2% SDS, 混合均匀, 于摇床中 50°C 低速振荡过夜; 裂解完全后离心, 上清加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 溶液抽提, 直至抽提液中的杂蛋白消失。总 DNA 用 0.3 mol/L 醋酸钠 (pH5.2) 和 2.5—3 倍体积的预冷的无水乙醇进行沉淀, 最终溶解于 1 mL 双蒸水。粗提总 DNA 用低熔点琼脂糖电泳进行检测, 并用低熔点琼脂糖酶回收纯化。

1.3 宏基因组文库的构建

宏基因组 DNA 文库构建参照 SuperCos 1 Cosmid Vector kit 和 Gigapack III XL Packaging Extract 相关的操作指导手册进行。噬菌体包装蛋白包装效价根据公式计算:

$$\text{效价 (pfu/mL)} = \text{克隆数} \times \text{稀释倍数} / \text{包装后用于涂板的实际体积 (mL)}$$

按包装效价计算整个 Cosmid DNA 文库中全部克隆

子的数目:

$$\text{总数目} = \text{包装效价 (pfu/mL)} \times \text{包装好的 Cosmid DNA 文库总体积 (mL)}$$

1.4 筛选培养基的配制

用于 343/591, 343/636 菌种增殖培养的蛋白胨-肉汤培养基含聚蛋白胨 2%, 胰蛋白胨 0.5%, 乳糖 1%, 氯化钠 0.5%。使用前加入 5 mL Trace 溶液^[10], 内含 CaCl_2 0.002%, MgSO_4 0.002%, FeSO_4 0.001%, 盐酸硫氨酸 0.001%, L-组氨酸、L-精氨酸、L-脯氨酸、L-赖氨酸各 0.05%, 烟酸 0.01%, 以及 1/100 体积的 70% 乙醇 (含 1% d-生物素)。

1.5 DDRT 试验

菌株 343/591 为 DNA 修复缺陷菌株, 而 343/636 菌株具有紫外损伤和 DNA 修复能力^[9]。343/591 和 343/636 菌株分别接种于蛋白胨-肉汤培养基中, 37°C 振荡培养 12—16 h, 用蛋白胨-肉汤培养基进行稀释, 使两菌株的 OD_{450} 值相同, 在 30 mL 蛋白胨-固体培养基中加入 0.3 mL 菌液后倒入平皿静置 1 h。

将保存的 DNA Cosmid 宏基因组文库转接到筛选培养基上, 将形成抑菌透明圈的阳性克隆挑出接种于 LB 液体培养基, 37°C 振荡培养 8—20 h。将不同培养时间的发酵液浸入 8 mm 直径的滤纸片, 把滤纸片贴在上述固体培养基上于 37°C 培养 12 h, 以产生的抑菌圈大小的差异来判断其是否对 DNA 造成损伤以及活性高低。实验以在临床使用的抗肿瘤抗生素丝裂霉素 (0.5 μg) 作为阳性对照。

1.6 MTT 法测定体外肿瘤细胞生长抑制率

将克隆子 AE-1, AE-3 和含有 SuperCos 1 的 XL1-Blue MR 菌株置于 37°C 振荡培养 10—11 h, 使各菌体达到对数生长期, 测定 OD_{600} 值, 用 LB 培养基稀释菌液, 使其 OD_{600} 值均为 1.2。菌液离心后用无菌过滤膜装置过滤除菌, 制成受试物。消化收集处于对数生长期的 HO-8910 卵巢癌细胞, 制成单细胞悬液, 接细胞于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 加入不同的受试物 (稀释倍数均为 10, 100, 500, 1000 倍), 培养 72 h 后弃培养液, 用 PBS 洗后加入

含 0.2 mg/mL MTT 的 PBS 溶液, 继续培养 4 h, 去除 MTT, 加入 DMSO 与甘氨酸缓冲液, 37°C 温育 0.5—1 h, 用酶标仪测定吸光值($\lambda=570$ nm), 其中 4 孔以全培养液作空白对照, 4 孔作细胞悬浮液对照, 每样平行测试 3 孔, 以阿霉素作为阳性对照, 同时以 LB 液体培养基和 SuperCos1 的发酵液上清作为实验对照组。

抑制率按照以下公式计算^[11]:

$$\text{抑制率} = 100\% \times (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{实验}}) / OD_{\text{实验}}$$

2 结果

2.1 DNA 提取结果

构建宏基因组文库的前提是获得大片段、高纯度和高浓度的宏基因组 DNA, 采用原位裂解法能最大限度地获取环境样品中的总 DNA, 避免因被样品微粒吸附而造成微生物 DNA 的损失, 尤其适用于生物量较低的极端环境样品。实验结果表明, 我们所得 DNA 片段在 50 kb 以上, 满足构建 Cosmid 文库的要求(图 1)。

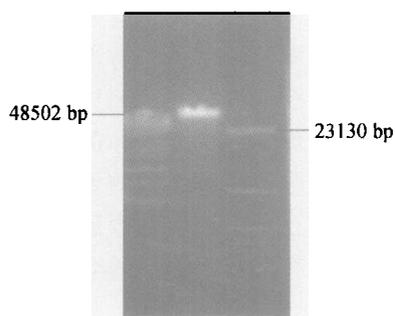


图 1 南极沉积物样品总 DNA 提取结果
从左到右依次为: λ DNA/mix, 提取的 DNA,
 λ DNA/*Hind* III

2.2 宏基因组文库构建

对文库进行滴度测定时, 每 10 μ L 包装后的重组 Cosmid 能够获得 510 个克隆子, 根据包装效价公式的计算, 所构建的 Cosmid 宏基因组文库包装效率为 5.1×10^4 pfu/mL。该文库包装总体积为 530 μ L, 因此可获得 27 030 个克隆子。以平均插入片段 35 kb 计算, 该宏基因组文库至少包括了 946 Mb 极端环境样品总 DNA, 满足后续功能基因筛选及寻找新

基因的要求。

2.3 DDRT 法结果

利用 DDRT 法对环境样品 Cosmid 文库进行功能筛选, 发现 13 个克隆子的发酵液和离心后的上清液对 DNA 修复缺陷菌株 343/591 具有抑制作用而对野生菌株 343/636 无抗菌作用, 其中 AE-1 和 AE-3 产生的抑菌圈最大, 抗菌活性较强。用蛋白胨-肉汤培养基对这两个克隆进行培养, 取不同培养时间的发酵液和上清进行检测, 包括阳性对照在内的所有测试样品在含野生菌株 343/636 菌株的蛋白胨-肉汤培养基上均不产生透明圈, 而在含缺陷型菌株 343/591 的培养基上产生抑菌圈的结果见表 1 和图 2 (AE-1 的图未列出)。结果表明在菌液培养 8 h 至 20 h 间, 细菌数量虽随培养时间延长一直处于增长趋势, 但菌液和上清的抑菌活性(抑菌圈直径)在不同的生长时间阶段中均无明显差异, 表明其发酵 8h 后即可达到最高活性。在阳性对照实验中, 343/591 对丝裂霉素(0.5 μ g)引起的 DNA 损伤不能修复, 致死效率大, 抑菌圈为 17 mm, 见图 2。

表 1 克隆子 AE-1 和 AE-3 不同培养时间的发酵液及上清对菌株 343/591 的抑菌活性比较 (直径/mm)^{a)}

时间 /h	AE-1			AE-3		
	OD_{600}	发酵液 抑菌圈	上清 抑菌圈	OD_{600}	发酵液 抑菌圈	上清 抑菌圈
8	0.730	14	13	1.105	15	13
9	0.974	15	13	1.201	14.6	13.4
10	1.207	14	13	1.360	15	13.4
11	1.233	15	12	1.363	15	13
12	1.425	14	12.6	1.508	14	12.6
13	1.434	14	12	1.595	15	12
14	1.547	14	11	1.721	15	12.6
15	1.651	15	11	1.787	15	13.4
16	1.698	14	10	1.834	15	13
17	1.810	15	11	1.871	15	13
18	1.851	15	11	1.894	15	12.6
19	1.876	15	11	1.910	14	13

a) 包括阳性对照在内的所有测试样品对野生菌株 343/636 均无抑菌作用

2.4 MTT 分析结果

在实验中, 选取受试菌的培养时间为 8—9 h, 此时菌体处于对数生长期, 同时根据 DDRT 实验分析表明, 此时发酵液和上清的抑菌活性(抑菌圈直

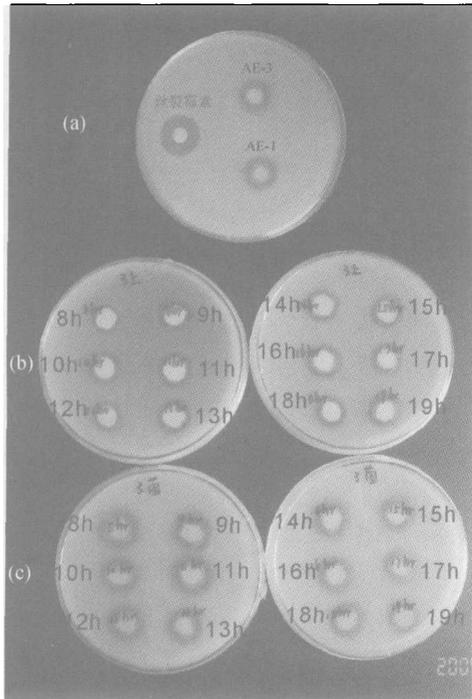


图2 AE-3不同培养时间的发酵液和上清对DNA修复缺陷菌株343/591抑菌圈
(a) 阳性对照; (b) AE-3上清; (c) AE-3发酵液

径)均较大(表1)。以卵巢癌细胞作为指示肿瘤细胞株,测定AE-1和AE-3的抗肿瘤活性。对平行样品测试结果的统计分析显示,AE-3对卵巢癌细胞增殖具有明显的抑制作用,稀释倍数为10时抑瘤率能达到55%;AE-1的抑瘤作用较不明显。两者的抑瘤率均随受试物浓度的增加而增加,初步表明在测定浓度范围内表现为剂量依赖性抑制。为了证实克隆AE-1和AE-3的抑瘤作用并非受培养基或载体的影响,同时以培养基和SuperCosmid作为实验对照,结果表明两者对卵巢癌细胞的增殖基本没有影响(图3)。

3 讨论

筛选新的抗肿瘤药物一直都是癌症治疗方面的重要课题。从抗肿瘤药物的作用机理来看,多数抗肿瘤药物的作用机制主要是作用于DNA。而多数对DNA有损伤的物质虽有一定毒性但也具有抗肿瘤作用,其中毒性等副作用小的可作为抗肿瘤药物在临床上使用。本研究利用*E. coli*差异性DNA修复测定方法,以DNA修复缺陷菌株343/591及野

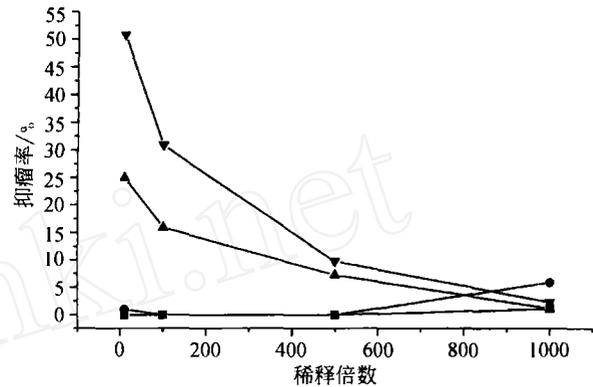


图3 受试物在不同稀释倍数下对卵巢癌细胞株的抑制率
(▲ AE-1, ▼ AE-3, ● SuperCosmid, ■ LB培养基)

生菌株343/636这两个菌株经受试物处理后在培养基上生存率的差异来判断受试物对DNA损伤的影响,从而判断其抗肿瘤活性^[9]。经过进一步试验,所筛选出的阳性克隆发酵液也在体外抑制了肿瘤细胞的生长。

尽管MTT实验表明,与从其他环境中筛选出的野生菌^[12]相比,克隆子AE-3与AE-1的发酵液活性的 ID_{50} (即抑制率达到50%时的稀释倍数)值较低。但本研究证明了可以通过构建宏基因组的方法从南极等极端环境样品中筛选出具有潜在抗肿瘤活性的克隆子,并直接获得完整的基因簇。而外源基因的表达受各种因素影响,例如载体的类型,宿主细胞的遗传类型、细胞基质、细胞的生理状态及初级代谢产物等,因此在获得完整基因簇的基础上,通过基因工程的方法将能实现其高效表达,提高其抗肿瘤活性。

未/非可培养微生物是环境样品中的主体,构建微生物宏基因组文库可以直接从这些丰富的微生物资源中筛选到活性物质相关基因或基因簇,而且借助于各种宿主菌的表达,可以克服野生型菌株培养条件的限制,缩短了培养时间,提高活性物质的产量。近年来,世界各国采用土壤、海洋浮游生物、海绵、甲虫、人唾液等样品成功构建了宏基因组文库^[3,7,13,14],已筛选到脂肪酶^[15,16]、淀粉酶^[7,17]、几丁质酶^[18]、DNAase^[7]等。Courtis^[6]等从土壤宏基因组文库中利用PCR方法扩增获得了多个新的抗生素合成途径关键酶—聚酮合成酶基因。本研究所构建的南极深海沉积物宏基因组文库

获得了至少 27 000 个克隆子, 平均插入片段在 35 kb 以上, 覆盖了至少 946 Mb 的微生物基因组信息, 获得了较为丰富的微生物群体的遗传信息, 为寻找新的功能基因簇、开发药物资源等提供了丰富的生物材料. 并且通过 DDRT 法, 通过功能筛选快速鉴别出 13 个具有潜在抗肿瘤活性的克隆子, 通过对插入片段的测序, 将获得完整的产抗肿瘤活性物质的基因簇. 预期随着后续研究的进一步开展, 从该文库中可能发现更多的活性物质和极端环境微生物特殊的代谢途径.

致谢 感谢厦门大学生命科学院细胞生物学与肿瘤细胞工程实验室欧阳高亮博士在 MTT 实验中给予的协助.

参 考 文 献

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer K. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, 59: 143—169
- Brady SF, Chao CJ, Clardy J. New natural product families from an environmental DNA (eDNA) gene cluster. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 9968—9969
- Gillespie DE, Brady SF, Bettermann AD, et al. Isolation of antibiotics Turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Envir Microbiol*, 2002, 68: 4301—4306
- MacNeil IA, Tiong CL, Minor C, et al. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001, 3: 301—308
- Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: Past, present, and future. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2: 143—148
- Courtois S, Cappellano CM, Ball M, et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Envir Microbiol*, 2003, 69: 49—55
- Rondon MR, August PR, Bettermann AD, et al. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Envir Microbiol*, 2000, 66: 2541—2547
- Wang GY, Graziani E, Waters B, et al. Novel natural products from soil DNA libraries in a *Streptomyces* host. *Org Lett*, 2000, 2: 2401—2404
- 许文思, 彭 剑, 王吉成, 等. 一种新的快速简便的抗肿瘤药物筛选模型. *中国抗生素杂志*, 2001, 26: 15—18
- Zeng R, Zhao J, Zhang R, et al. Bacterial community in sediment from the western Pacific “warm pool” and its relationship to environment. *Science in China, series D*, 2005, 48: 282—290
- Mosmann F. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55
- 李 根, 林 昱. DDRT 法筛选抗肿瘤海洋微生物. *中国抗生素杂志*, 2004, 29: 449—451
- Shiruya HB, Irren R, Kim UJ. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase pair fragments of human DNA in *E. coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 8794—8797
- Entcheva P, Liebl W, Johann A, et al. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 69: 89—99
- Lee SW, Won K, Lim HK, et al. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65: 720—726
- Henne A, Schmitz RA, Bomeke M, et al. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 3113—3116
- Yun J, Kang S, Park S, et al. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 7229—7235
- Cottrell MT, Moore JA, Kirchman DL. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 2553—2557