

学校编码: 10384
学 号: 9626009

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

学 位 论 文

海洋放线菌 N350 抗肿瘤活性物质的研究

李 军

指导教师: 郑 忠 辉 副教授

黄 耀 坚 副教授

厦门大学生物学系

申请学位级别: 硕 士 专业名称: 微生物学

论文提交日期: 1999.7. 论文答辩日期: 1999.7.25

学位授予单位和日期: 厦 门 大 学

答辩委员会主席: 郑志成 教 授

评阅人: 方金瑞 研究员

郑志成 教 授

1999 年 7 月 26 日

海
洋
放
线
菌
N
3

5 0 抗肿瘤活性物质的研究

厦门大学

厦门大学博士学位论文摘要库

摘 要

本文以改进的生化诱导分析(BIA)固体法作为抗肿瘤活性物质的初筛模型,对从台湾海峡厦门海区潮间带分离到的 655 株海洋微生物进行筛选,得到 16 株能产生作用于 DNA 的抗肿瘤活性物质的菌株,筛选得率约为 2.4%。结合体外肿瘤细胞抑制模型 MTT 分析法,从 16 株阳性菌中复筛出一高活性菌株放线菌 N350。对该菌株的分类地位进行研究,根据其形态、培养特征及理化性质,将其暂定为浅绛红链霉菌海洋变种 (*Streptomyces purpurascens* var. *marinus*)。

对 N350 菌株产生的抗肿瘤活性物质进行早期鉴别,结果表明:该活性物质具有酸碱指示性质;难溶于水、石油醚,易溶于甲醇、乙醇,溶于苯、DMSO、乙酸乙酯、酸水中;粗提物经氯仿-甲醇(3:2)的展层系统展开后,以薄层层析-BIA 法检测,在 Rf 值为 0.73 处有一阳性斑点,其它化学显色结果和阿霉素等蒽环类抗肿瘤抗生素相似;该活性物质的中性甲醇溶液的紫外-可见光吸收光谱扫描结果显示,在 λ 233nm、252nm、480nm、494nm 等处有特征吸收峰,加入 0.5%醋酸镁甲醇溶液后,溶液颜色变紫,可见吸收峰在 540nm 和 579nm 处 OD 值增大,在 0.1N NaOH 甲醇溶液中峰型红移,且 $E_{556\text{nm}}/E_{596\text{nm}}=1.11$;该活性物质的盐酸水解物的 HPLC 检测结果显示与柔红霉素有一相同的出峰时间。由此,我们初步认为 N350 产生的抗肿瘤活性物质属于蒽环类柔红霉素族的物质。对该活性物质的生物活性检测表明:其具有抗革兰氏阳性菌作用;对小鼠的 LD_{50} 为 30mg/kg;对体外 P388 和 KB 细胞的生长有较强的抑制作用, IC_{50} 分别为 156ng/mL 和 250ng/mL;对小鼠体内移植性肿瘤有显著的效果,以 10mg/kg 的剂量一次性腹腔注射给药,对 S180 实体瘤的抑制率为 34.2%,对艾氏腹水癌的 ILS 为 82.9%。表明该活性物质具有潜在的应用前景。

经对 N350 菌株产生抗肿瘤活性物质的发酵条件研究表明,该菌株产生抗肿瘤活性物质的适宜发酵培养基为:1L 人造海水中含黄豆粉 30g、可溶性淀粉 40g、 $CaCO_3$ 5g、 $NaNO_3$ 1g、 K_2HPO_4 1g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g。在此培养基中,以 10%的接种量,500mL 三角烧瓶 60mL 培养基装量,于 28℃下进行 5d 摇瓶发酵,抗肿瘤活性物质产量可达 118.6mg/L。

关键词:海洋微生物、抗肿瘤、BIA

目 录

摘要.....	I
英文摘要.....	II
前言.....	1
一、抗肿瘤药物的研究进展.....	1
二、海洋微生物及其产生的抗肿瘤活性物质的研究.....	5
三、抗肿瘤活性物质的筛选方法.....	8
四、本课题研究目的、意义和内容.....	12
材料与amp;方法.....	14
一、材料.....	14
二、方法.....	17
结果与分析.....	21
一、产生菌的筛选.....	21
二、N350 菌株的鉴定.....	27
三、N350 菌株产生的抗肿瘤活性物质的研究.....	30
四、N350 菌株产生抗肿瘤活性物质发酵条件的研究.....	41
讨论.....	45
一、筛选模型的选择及改进.....	45
二、海洋微生物抗肿瘤活性物质产生菌的筛选.....	47
三、N350 菌株发酵液中的活性物质.....	48
四、N350 菌株产生抗肿瘤活性物质的发酵条件.....	49
结论.....	50
参考文献.....	51
致谢.....	59

STUDY ON THE ANTITUMOR AGENT FROM A MARINE ACTINOMYCETES, N350

ABSTRACT

In this work, an improved BIA spot test was utilized as an antitumor prescreen model. 16 strains, out of all 655 tested marine microorganisms isolated from the intertidal zone of the Xiamen coast, Taiwan Strait, were found having positive induction activity. Moreover, strong activity of an actinomycetes, N350 was observed using BIA liquid test in parallel with MTT assay. The N350 strain was subsequently taxonomically proposed as *Streptomyces purpurascens* var. *marinus*, basing on its morphological features, culture characteristics, physiological and biochemical characteristics.

One of characteristics of this antitumor agent is similar to pH indicator, and it is soluble in methanol, ethanol, benzene, dimethyl sulfoxide and acidic water but insoluble in water and petroleum benzene. The induction activity of the separated spots was detected by BIA *in situ* after developed in the TLC (solvent system: chloroform-methanol (3:2)). Then the crude antitumor substance was preliminarily purified and the R_f 0.73 spot, which has identical chemical color development results with those of anthracyclines, such as adriamycin, was found to be bioactive. The other physico-chemical properties of this antitumor agent, including UV/VIS spectrum (λ 233nm, 252nm, 480nm, 494nm), the absorbance at λ 540nm and λ 579nm turning to be higher when solved in 0.5% Mg(OAc)₂-MeOH while the color of the solution becoming purple, the ratio of E556nm/E596nm being 1.11 in 0.1N NaOH-MeOH and its aglycone having the same retention time of HPLC as daunomycinone, demonstrated that it belongs to the same group of hydroxyl anthra-quinone chromophores as daunomycin.

This antitumor substance exhibits inhibitory activity against Gram-positive bacteria. It also presents strong cytotoxicity to P388 and KB cell *in vitro*, IC₅₀ being 156ng/mL and 250ng/mL respectively, while showing LD₅₀ 30mg/kg in the acute toxic experiment to mice. In addition, its inhibitory activities against S180 solid tumor and Ehrlich Ascites carcinoma in mice, inhibition rate and ILS being 34.2% and 82.9% respectively, showed a promising applicable value.

The optimal fermentation conditions were established. With 10% inoculum and 500mL Erlenmeyer flask containing 60mL fermentation medium, which was made from artificial sea water and in each liter consists of 30g soybean powder, 40g soluble starch, 5g CaCO₃, 1g NaNO₃, 1g K₂HPO₄, 1g MgSO₄ · 7H₂O, the fermentation was carried out at 28°C for 5 days on a rotary shaker and the production of the active substance was 118.6mg/L.

Keywords: Marine actinomycetes; Antitumor agent; BIA

前 言

癌症是严重威胁人类生命的常见病和多发病,全世界每年死于癌症的病人超过 700 万^[1]。在我国,恶性肿瘤死亡率也明显增加,从 1988 年的 119.12/10 万到 1992 年 125.76/10 万,占我国致死病因的第二位^[2]。癌症发病形势迫人。

目前癌症的临床疗法主要有手术治疗、放射治疗、化学药物治疗和生物治疗,其中后两者发展迅速。癌症的治疗已在很大程度上依赖于抗肿瘤药物的开发。抗癌药物的研究现已进入一个新的阶段,据估计全世界有约 500 个实验室从事抗癌药物的筛选、化学及药理研究^[3]。

一、抗肿瘤药物的研究进展

虽然早在公元前 1500 年癌症已为人们所知晓,而且在许多古代医学著作中有用草本植物治疗癌症的记载,但在 1930 年以前,用药物治疗癌症一直未引起人们的重视,直到 50 年前人们才开始根据癌症患者本身激素状况的变化,应用雄性激素及雌性激素来治疗乳癌、前列腺癌及其它类型的肿瘤。不久以后,由于发现氮芥类和叶酸类似物有抗白血病的作用,因而引起了对癌症化疗剂的认真研究^[4]。

在过去的几十年里,抗癌药物的发展取得了显著的成就,尽管在治疗肺癌、乳癌及前列腺癌等方面的效果不尽人意,但已有很多新药进入临床,治疗血癌及生长快的实体瘤^[5]。70 年代末,美国国立卫生研究院指出,在 28 项当代医科生物学重大成就中,肿瘤化学治疗占 3 项,这就是研制并发现了 40 余种对晚期癌有效的抗癌药^[6],使癌症患者的生存时间明显延长。

第一个抗癌药氮芥,是 1942 年耶鲁大学的 Dougherty 用 Gardner 淋巴肉瘤进行试验,获得成功^[6]。Welch 及 Farber 等发现叶酸可使白血病恶化,导致第二个抗癌药叶酸拮抗剂的发现。50 年代抗代谢物及烷化剂研究发展很快,这一时期发现了氨甲喋呤、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、溶肉瘤素等。60 年代及 70 年代是抗癌药发现的加速时期,这一时期的特点是新型细胞毒抗癌药不断发现,在植物中发现了长春新碱及鬼臼乙叉甙(VP-16),在抗生素发酵液中发现了博莱霉素、丝裂霉素及阿霉素,抗代谢合成药有阿糖胞苷、FT-207 等,而顺铂的发现使实体瘤治疗进入新的阶段。80 年代以来,生物反应调节剂成为抗肿瘤药物研究的前沿^[6]。

随着抗肿瘤药物不断的开发,抗癌新药的研究难度加大,周期延长,耗资增多,因此,抗肿瘤新药的研究主要着重于已知有效药物的结构改造,以寻找毒副作用小、抗癌谱较广的衍生物及类似物,特别集中在蒽环类及第二代铂类化合物的研究。

由于药物的抗肿瘤机制尚不十分明确,虽然发现了一些新的抗肿瘤药物,但盲目性很大。随着分子肿瘤学的发展,人们发现细胞周期失控是癌变的重要原因。细胞内存在着促使细胞增殖与抑制增殖的两种作用体系,促进增殖系统成分的过度表达与抑制增殖系统成分的缺失均可引起细胞增殖失控而导致癌变。肿瘤细胞内的微管蛋白、DNA 拓扑异构酶、癌基因和蛋白激酶 C 等在细胞增殖失控过程中起着重要作用。因此将它们作为新靶点,有助于发现特异性的抗肿瘤药物。此外,研究开发直接作用于膜水平上的新靶点也是寻找新抗肿瘤药物的新思路。这些方面的研究工作已取得很大成就^[7]:

1、铂络合物:该类物质的作用机制是通过与 DNA 结合形成交叉键,从而破坏 DNA 的功能使之不能再复制而起作用。由于毒性大,生物利用度低等缺点,又研制出了第三代铂络合物 JM-216,对卵巢癌显示出很好的作用,毒性低,不良反应少,现已进入 I 期临床阶段^[7]。双核双铂络合物的临床前评价表明,该化合物不仅有较好的抗肿瘤活性,而且水溶性较好,其抗癌机制是两个 Pt 原子与 DNA 的两条链进行内部交联而起作用。

2、微管蛋白结合剂：微管蛋白已成为许多抗肿瘤药物的靶点，紫杉醇是这类药物的代表，它是治疗对顺铂耐药的卵巢癌和晚期乳癌的重要药物。目前临床上使用的仍是从紫杉属树木、树皮中的提取物，为解决药源紧缺，对紫杉醇进行了结构改造，发现紫杉特尔(Taxotere) 有较好的水溶性，疗效也优于紫杉醇^[8]，正在进行Ⅱ期临床试验。另一类微管蛋白结合剂是长春新碱，目前已上市的长春新碱长春瑞宾(Vinorelbine)^[9,10]是通过改造长春新碱而发现的，其抗癌谱广，毒性低。此外，正进行Ⅱ期临床的利索新(Rhizoxin)是从霉菌(*Rhizopus sinensis*)培养液中提取的16元大环酰胺，有高度活性，IC₅₀在ng/ml水平^[11]，其抗肿瘤作用约是长春新碱的10倍，并对长春新碱耐药的肿瘤也有效。另外，Combrestain结构简单，对动物肿瘤模型作用强，预示着其极具开发前景。

3、蒽环类和新的嵌入剂：亲脂性碘阿霉素(Iodoboxorubicin)和吗啉蒽环类化合物(MX-2)是目前临床试验中很有希望的蒽环类抗肿瘤药物。其中前者正进行Ⅱ期临床评价^[12]。蒽吡啶类(Anthrapyrazoles)^[13]是一类结构与蒽环类和米托蒽醌(Mitoxantrone)相似的新型嵌入剂，该类化合物中的洛索蒽醌(Losoxantrone, CI-941)已进入临床评价阶段，其很可能成为治疗乳癌的新药^[14]。

4、DNA拓扑异构酶新的抑制剂：以抑制DNA拓扑异构酶Ⅱ而产生细胞毒作用的抗癌药物有阿霉素、丁氧吡烷(MST-16)等^[15]。喜树碱类似物CPT-11是上市不久的能抑制Ⅰ型拓扑异构酶的一种新型药物，比喜树碱抗癌效果要好，且毒性低^[16]。

5、序列选择性DNA小沟结合剂：对DNA小沟有专一性结合的药物可用作细胞毒药物(如烷化剂)的载体，从而阻止肿瘤细胞生长所必需的调节转录因子对DNA序列的识别。这类新型的烷化剂是以高度专一的A-T连接序列方式与DNA小沟结合。Carzalesin(U-80244)是A残基序列选择性DNA单烷化剂，已进入临床试验。最近发现的U-77779是双烷化剂，对小鼠L1210白血病作用很强^[17]。

6、芳基磺酰脲类：该类化合物主要通过在线粒体内积聚而使其功能失活产生作用^[18]。Sulofenur(LY 186641)在体内有很好的抗肿瘤活性，其第二代——磺酰脲类衍生物LY 217989和LY 295501，现正进行临床试验。

7、生长因子受体功能抑制剂：用于治疗晚期前列腺癌的苏拉明(Suramin)可竞争性抑制血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子β(TGFβ)、表皮生长因子(EGF)和纤维母细胞生长因子(FGF)与其受体结合。Bombesin有望进入临床治疗小细胞肺癌^[19]。此外，还有Somatostatin类似物能抑制表皮生长因子刺激细胞生长^[20]等。

8、酪氨酸激酶抑制剂：许多生长因子受体和某些致癌基因产物是蛋白酪氨酸激酶(PTK)，目前发现的有抑制酪氨酸激酶和抗增生作用的化合物有生物黄酮类化合物Genistein、酪氨酸类化合物Erbstatin、Lavendustin及4-氨基喹啉类化合物。这类化合物能抑制PTK活性，从而阻断受体自动磷酸化过程和生长因子依赖性细胞增生，对癌细胞有高特异性，值得注意。目前正进行临床研究。

9、蛋白激酶C(PKC)的抑制剂：PKC的过度表达与某些恶变和肿瘤转移密切相关。PKC抑制剂有Staurosporine、Calphostin及地喹氯胺类，其中Staurosporine是目前发现的最强的PKC抑制剂，已进入临床评价阶段^[21]。

此外，还有蛋白激酶A(PKA)的抑制剂如8-氯环磷酸腺苷、磷脂代谢抑制剂如Ilmofosine、芳香酶抑制剂Vorozole、端粒酶抑制剂、抗敏剂等也正进入临床或即将进入临床。

肿瘤化疗药物的研究取得了重大成就，但抗肿瘤药研究的范围并不局限于此，另一类药物相继出现，如分化诱导剂、癌的化学预防药等^[22](表1)。

近几年研究较多的重要的诱导分化剂有维生素A类(维甲类、视黄类, RA)^[23,24]，它

已有人工改造的第 2 代、第 3 代，其中第 3 代视黄类化合物 TTNPB (arotinoid) 的活性较 RA 高 1000 倍^[25]。目前已发现的分化诱导剂

表 1 肿瘤防治药物的发展方向

Table 1 Developing orientation on drugs of preventing and curing tumor

药物类型	发展策略
杀伤型细胞毒药物	针对新靶点提高选择性 针对实体瘤 克服肿瘤抗药 新的化学结构 新的作用机理
癌细胞分化诱导剂	促进癌细胞分化
癌细胞编程死亡诱导剂	诱导癌细胞死亡
癌化学预防	抗致突变 抗促癌 抗化学及病毒致癌
抗转移药	减少癌细胞脱落 抑制血小板聚集 消灭小的转移灶
生物反应调节剂	调节机体免疫功能

有内源性诱导剂如巨噬细胞粒细胞诱导剂 (MGI)、糖皮质激素和维生素 D₃、cAMP、 α -肿瘤坏死因子、 γ -干扰素等；外源性诱导剂如亚硒酸钠、正丁酸、维甲类、佛波酯类、放线菌素 D、丝裂霉素、六甲撑双乙酰胺 (HMBA)、N-甲基甲酰胺 (NMF)^[11]等。对癌细胞分化剂的寻找和作用机理的研究越来越多，成为近年抗癌药研究的重要方向之一。

人们在不断寻找治疗癌症的新抗癌药的同时，正大力寻找预防癌变的抗促癌、抗致突变物质。NCI 的化学预防部已评审了近千种有化学预防潜力的化合物，并选出 250 种化学预防药进行动物毒性试验，挑选了 22 种进行人群的化学预防干预实验^[26]，已发现二氟甲基鸟氨酸、钼酸盐、炎痛喜康、去氢表雄酮、4-羟基苯维甲酰胺等有明显效果。目前这一方向的研究正日益得到重视。

近几年国外制药企业研究开发的药品中抗癌新药开发品种多，排序一直位居前列^[27,28,29]，可见抗肿瘤药物的研究正在全球掀起一个热点。

二、海洋微生物及其产生的抗肿瘤活性物质的研究

新颖的具有药理活性物质有两个来源：一是有机合成，一是活的生物体。直到本世纪初，药物还都是从自然界中取得。虽然随着有机化学的发展使得合成药物得以激增，但是天然产物依然在化学治疗中起着主导作用。这不仅有许多天然产物在药物的半合成中得以应用，而且它们是合成新药的先导化合物。据估计，现代的药物中有 40~45% 来源于自然界，或直接从天然产物衍生而来^[30]。

由于微生物次级代谢产物的化学结构及生物活性的多样性使之受到广泛的重视。自从

1929 年发现青霉素以来, 对陆源的细菌和真菌的深入研究显示微生物作为结构新颖、具有生物活性的物质的来源具有巨大潜力。在过去的 70 年里, 从微生物中发现了三、四万种的天然产物, 其中有生物活性的超过 1 万种, 有抗菌、抗肿瘤活性的超过 8000 种。现在, 已有 100 余种微生物产物作为抗生素、抗肿瘤制剂而用于临床^[31]。尽管人们仍在进行深入的研究, 但很显然, 随着陆源资源的不断开发, 发现新颖的代谢物的可能性越来越小, 而且对传统的抗生素出现耐药性的情况也越来越多。因此, 扩大微生物来源以寻找新的生物活性物质是十分必要的。Omura^[32]等许多学者强调微生物来源要有新颖性和多样性, 极端环境(如高盐、高温、高压、高碱、低温等)近来颇引人注目, 人们开始转向从海洋中寻找新的具有药理活性物质。

海洋覆盖着地球表面积的 71%, 有着孕育生命的适宜环境。海洋生物处于特异的环境: 温度较低且没有急剧的变化、高浓度的盐和高的水压、生物体用整个机体来吸收稀薄的营养、容易受到病原微生物的侵袭^[33]等, 因此产生了与陆地生物不同的代谢系统和机体防御系统。人们可以期待从海洋生物及其代谢产物中开发出不同于陆地生物来源的具有特异、新颖、多种多样化学结构的新物质。

西方系统地、科学地寻找海洋天然产物基本上是由耶鲁大学 Bergmann 在五十年代开始的^[34], 迄今仅在肉眼可见的海藻及海洋无脊椎动物中就已发现 3700 多种天然产物^[35], 包括有多肽类、萜类、生物碱类、大环聚酯类、聚醚类等化合物。近年来, 国际上在海洋生物抗肿瘤活性物质研究方面已取得了令人瞩目的成果。如 Harada H 报道的从日本海岸采集的海洋绿藻 *Cladophoropsis vaucheriaeformis* 的甲醇浸提物对小鼠淋巴瘤 L1210 细胞有选择毒性, 而对正常细胞 NIH-3T3 无任何影响, 预示着海洋绿藻 *C. Vaucheriaeformis* 可能含有一种独特的抗肿瘤物质, 这种物质对 L1210 具有选择性的细胞毒, 而且可能是小分子量的物质, 因此能被甲醇溶解^[36,37]。Callystatin A 是从海绵中分离得到的有潜在的细胞毒活性物质, 其对 KB 细胞的 IC₅₀ 仅为 0.01ng/mL^[38]。从海鞘中分离的 Ecteinascidin-743(ET-743, NSC-648766)是一种新的生物碱, 有体外抗肿瘤活性, 对乳癌、卵巢癌、黑色素瘤值得进一步的临床研究^[39]。此外, 正在研制中并将或已进入临床的海洋天然抗肿瘤活性物质还有: Aerophysinin 1^[40]、环肽 Didemnin B^[41]、吡啶生物碱 Dercitin^[42]、苔藓抑菌素 Bryostatin 1^[43]、Punaglandin^[44]、Namenamicin^[45]、Echthinaschidine^[33]等。

与上述海洋动植物相比, 海洋微生物抗肿瘤活性物质的研究还相对落后, 但已显示出诱人的前景。

海洋微生物种类繁多, 不仅包括海洋中生息起源的种类, 而且有陆地起源后流入海洋中并适应了微生物。前者因海洋环境的独特而具有特殊的生理性状和遗传背景; 后者因发生了生理上和代谢系统的适应, 会形成与陆地土壤微生物不一样的代谢系统, 因此, 它们都极有可能产生作为代谢产物的新颖的生物活性物质。早在 1945 年就从靠近意大利撒丁岛的地中海海底污泥中分离到顶头孢霉菌, 它能产生新的抗菌物质头孢菌素 C^[46]。近来, 在寻找新颖的微生物产物中, 海洋微生物已经成为一个重要的研究热点, 不断有从海洋微生物中发现新的有生物活性的次级代谢产物的报道。现在, 无论是学术界还是工厂企业, 都对海洋微生物产生了极大的兴趣^[47]。

四、五十年代, 海洋微生物学领域的先驱如 Claude ZoBell 开始了真正的海洋微生物的数量和多样性的研究^[31], Rosenfeld 和 ZoBell 首先认识到海洋微生物化学合成的潜力, 大规模系统地研究海洋微生物产生的抗菌活性物质, 直到 1958 年, Grein 与 Meyers 才真正从海洋微生物代谢产物中筛选出抗生素^[48], 但未得纯品。第一个纯化的海洋微生物代谢产物是 Burkholder 及其同事分离的含溴高的吡咯抗生素(后来命名为 Pentabro-mpseudiline), 在体外有很强的抗革兰氏阳性菌活性, 且具有抗肿瘤活性, 它是由一种自由生活于海水中的海洋细菌发酵而来^[31]。

海洋的底泥营养丰富,不同区域的组分不同,因此形成不同的菌系。七十年代初,Okami及其同事率先进行了从日本海岸的浅水到深水的底泥中分离微生物的研究工作。1975年,东京微生物化学研究所报道从Sagami海湾的底泥中分离出的放线菌*Chainia Purpurogena*产生的抗菌素SS-228Y^[49,50,51],虽然光化学和热不稳定,但具有很强的抑制革兰氏阳性菌活性,亦能在体内抑制小鼠艾氏腹水癌,在低浓度即显示显著的生命延长率。从加利福尼亚海深处底泥中分离得到的革兰氏阳性菌C-237,产生的一种Macrolactin A^[52]显示出很强的体外抗小鼠B16-F10黑色素瘤活性,其IC₅₀为3.5μg/mL,且其亦能抑制几种病毒,包括单纯疱疹病毒(IC₅₀=5.0μg/mL)和人免疫缺陷病毒HIV(IC₅₀=10μg/mL)。近来又报道了一个新结构的生物碱Altemicidin,是由海洋*Streptomyces Sioyaensis* SA-1758产生的,它在体外有抗小鼠L1210白血病和IMC癌细胞系活性,IC₅₀分别为0.84μg/mL和0.82μg/mL^[53,54]。从Acklins岛盐湖的底泥中分离的曲霉属的海洋真菌体中,分离到Aspergillamides A和B,其中前者对人体瘤细胞系HCT-116有很强的细胞毒性(IC₅₀=16ng/mL)^[55]。CAÑEDO LM等^[56]从海洋底泥中分离出一种芽孢杆菌*Bacillus sp.* PhM-PHD-090,从该菌株的培养液中分离了一种新的异香豆素(Isocoumarin) PM-94128,其对肿瘤细胞株P388、A-549、HT-29以及MEL-28表现出较强的细胞毒活性(IC₅₀皆为0.05μM)。

除了自由生活于水体和海底沉积层外,相当多的微生物与其它的海洋生物处于共生、附生、寄生或共栖的关系中,它们一方面从海洋动植物宿主中获取营养,另一方面可产生各种活性物质以利于宿主生长代谢或增强宿主的抵御能力。人们是在研究河口小虾*Palaemon Macrodactylus*的致病菌时发现这一现象的^[31]。这种动物的卵表面覆盖着细菌,若除净这些表面细菌,就很快会因感染致病真菌而死亡。该研究预示着从这些具保护性的微生物中很可能会发现新颖的抗生素。Monaghan等提出,与真核多细胞生物共生或对其致病的微生物在新的活性物质筛选中值得注意^[57]。

人们越来越多地发现有一些具有开发前景的活性物质其实并不是由海绵、海藻、海葵等这些海洋动植物产生的,而是由与其共生的微生物产生的^[58]。Dercitamide是一个复杂的有生物活性的海洋天然产物,从深海处的海绵*Dercitus sp.*和浅水处的海鞘*Cystodytes sp.*中都分离出该活性物质,表明该活性物质极有可能是由与其共生的微生物产生的。二酮哌嗪(Diketopiperazine)是从海绵*Tedania ignis*中分离的,已证明,事实上是由与海绵共生的一种微球菌属的海洋细菌产生的^[59]。冈田软海绵酸(Okadaic acid)对P388白血病和L1210白血病细胞作用的IC₅₀分别为 1.7×10^{-3} 和 1.7×10^{-3} μg/mL,在0.12mg/kg以上对小鼠显示毒性^[60]。它最早是从日本海绵(*Halichondria okadai*)^[61]中提取的,但后亦从沟鞭藻*Prorocentrum lima*、*P. concavum*和*Dinophysis acuminata*^[62]中分离到,自此人们认为Okadaic acid这种毒素是由藻类产生的。从Sagami海湾的海藻表面分离出一种黄杆菌属的*Flavobacterium ugliginosum* MP-55,它能产生一种多糖Marinactan,有抗小鼠S180实体瘤作用^[63,64],每天10~50mg/kg的剂量,给药10天,其抑癌率为79~90%,该物质已进入临床试验。从冲绳产的一种扁虫体内分离出一种前沟藻*Amphidinium sp.*大量培养获得成功,并从提取物分离到3种新结构的抗肿瘤大分子毒素Amphidinolide A、B、C,对L1210的IC₅₀值分别为2.4、0.0014、0.0058μg/mL^[33]。Moore和Scheuer从皮沙海葵科(Zooanthid)毒沙群海葵(*Palythoatoxica*)分离得沙群海葵毒素,是已知毒性最强的非蛋白质海洋毒素,已证明它是由共生细菌产生的,用最小致死量的1/10剂量,即可完全治愈小鼠艾氏腹水癌^[65]。ROMERO F.等近来报道的Thiocoraline是从印度洋的软珊瑚中分离出的小单孢菌L-13-ACM2-092产生的,它对P388、A-549以及MEL-28细胞株有细胞毒活性,且有很强的抗革兰氏阳性菌活性,其机理是能和超螺旋DNA结合并抑制RNA合成^[66,67]。

综上所述,尽管对海洋微生物的研究相对少,但已有的成果却相当鼓舞人心。显然,海洋微生物是一个潜在的抗肿瘤药物天然资源。然而目前人们对海洋的开发利用程度仍很低。

据估计, 至今从海洋中已筛选出的有潜在应用前景的化合物不足 1%, 而微生物产物只占其中的 1% 左右^[68]。由于能在标准的条件下培养的海洋微生物不到 5%^[31], 这就限制了对一些有开发前景的新颖的海洋微生物的分离培养, 因此在加强海洋微生物基础生物学研究的基础上, 精心设计分离条件与发酵条件, 以适应海洋微生物特殊的生理性状和遗传背景, 更好地挖掘海洋微生物的潜力。

三、抗肿瘤活性物质的筛选方法

开发新抗肿瘤药物有两个最重要的问题: 一是取材; 二是筛选方法, 即如何检出抗肿瘤活性物质^[69]。有效的筛选模型和方法是发现新药的关键。目前人们探讨的方法大体上归于非肿瘤系统和肿瘤系统模型两大类。

1、非肿瘤系统筛选模型

此类模型不使用肿瘤细胞, 而是利用与肿瘤细胞相近似的性质或利用通过变异改变细胞遗传性的性质以及利用抗癌药物作用机理而建立的一类体外筛选模型, 大致可分为以下三种:

(1) 生物细胞模型

迄今已知的生物细胞模型主要有胚胎生长抑制法、原生动物试验法、马铃薯花冠瘤试验法、精原细胞法等。

目前, 已知海胆胚胎是一种可代替的细胞系统。由于新鲜的受精卵为一种能迅速分裂的细胞, 受试化合物的活性可以通过观察细胞分裂的过程来测定。在这种鉴定方法中, 受精 5 分钟内加入待测物质, 对照组出现第一个卵裂的时间为 2 小时后, 如果待测物浓度为 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更低时便能抑制 80%~100% 的卵裂, 则表示待测物有活性, 该法快速, 不需特殊的细胞培养、方法和设备。

鳃足虫生物鉴定是原生动物试验法中的一种简单的致死试验, 虽然不能代表抗肿瘤活性, 但它是一种良好的细胞毒指示性试验, 能迅速地评价组份的活性。

马铃薯花冠瘤是一种植物肿瘤系统。花冠瘤为土壤杆菌引起的植物肿瘤病, 一旦发病, 便脱离正常的控制机制而自行生长, 独立于植物的正常控制机制。已有研究表明, 此种试验可相当准确地预测 P388 体内试验的活性, 可能有一些假阳性结果, 但假阴性率极低。与动物模型的组织培养法相比, 该法具有迅速、不需贵重设备和技术熟练的人员等优点。

小鼠睾丸内的细精管上皮细胞即造精细胞是机体内繁殖很旺盛的细胞之一, 细精管内有很多正在发育的各级精细胞, 抗肿瘤物质在睾丸内能选择性地抑制或破坏细精管内生长旺盛的精原细胞, 而其他的细胞在一定时间内仍保留着, 利用这一特点, 把筛选的样品进行睾丸内注射, 观察精原细胞的变化, 从而作为抗肿瘤活性物质的筛选方法。该法筛选出的基本上限于有细胞分裂抑制作用的化合物, 而且小鼠用量大, 剂量难以控制, 但比一般体外筛选特异性较高, 比一般体内筛选法敏感性较高。

(2) 微生物模型

微生物模型因其快速、简便、低耗费、特异性高等特点使之在抗肿瘤活性物质的初筛方法中具有无法比拟的优势。对于微生物模型, 人们研究较多的主要有噬菌体诱导法、抗噬菌体法、生化诱导分析 (BIA) 法、发光细菌诱导分析法 (PIA), 此外, 还有 BIP 法、细菌 DNA 修复法、厌氧菌法、细胞膜缺陷型酵母变株筛选法等。

早在 1953 年, Lwoff 就指出原噬菌体的诱导作用具有筛选诱变、致癌和制癌剂的潜力^[70]。该法是采用携带 λ 原噬菌体的野生大肠杆菌菌株, 当所检测的样品中含有能直接作用于宿主 DNA 或干扰 DNA 合成的成份时, 就引起 λ 原噬菌体脱离宿主 DNA, 在宿主细胞中进行复制、繁殖, 并释放出来。通过检测噬菌斑来判断样品中是否含有潜在的抗肿瘤活性物质。

基于原噬菌体诱导作用对抗癌物质的筛选的这一利用, 人们认为诱导物同样可能抑制

噬菌体的繁殖,由此产生了检测抗噬菌体的活性的初筛模型—抗噬菌体法。该法是采用枯草杆菌和噬斑突变型的温和噬菌体 SP10,以检测抑制溶菌的能力来判断活性物质。但该法并不能针对抗肿瘤抗生素,对其他的不具抗癌活性的抗生素亦能检测出来。

生化诱导分析(BIA)法^[71]是由噬菌体诱导试验延伸而来。Lein等在1962年首次报道了利用BIA法从微生物发酵液中筛选抗肿瘤抗生素^[72],该法的结果得到肯定,并逐渐被推广应用。其原理是利用遗传学方法使溶源菌带有 β -LacZ基因片段,以溶源菌产生 β -半乳糖苷酶取代噬菌体与损坏DNA的化合物进行反应,加入产色底物6-溴-2-萘- β -吡喃半乳糖苷,就可观察到诱导的 β -半乳糖苷酶,从而检测出潜在的抗肿瘤活性物质。Moreau等人证明了体外的BIA诱导活性与小鼠的体内抑癌活性有很好的相关性^[73],可用于大量样品的筛选。

Steinburg等^[74]用平颚发光杆菌来研究直接与DNA相互作用的药物筛选方法(PIA法),他们选用平颚发光杆菌不发光变种,当检测的样品能与DNA结合就能够明显地刺激它的生物发光,从而进行抗肿瘤活性物质的初筛。

(3) 针对机理的筛选模型

一般认为,比较理想的筛选系统不是随机筛选,而是应以机理为基础或针对机理(mechanism-oriented)的筛选系统。目前,国外制药企业、研究部门都非常重视以分子机理为靶点的药物筛选。

随着对癌基因和抗癌基因的认识,人们已经知道这些基因的蛋白产物参与肿瘤细胞中的信号传导过程。许多癌基因蛋白和生长因子受体都是蛋白激酶,癌基因和生长因子的突变会使其磷酸化能力异常,丧失信号传递活性,从而阻断细胞增殖,因此,蛋白激酶被看作抗癌药物研究非常重要的靶点。

近来人们发现端粒酶的激活和表达程度与肿瘤的发生和转移具有十分密切的关系,该研究已成为世界关注的热点。端粒酶在90%的癌细胞中过度表达,理论上讲,抑制端粒酶活性便可能抑制肿瘤的生长和转移,端粒酶已成为肿瘤治疗的新靶点。通过对端粒酶抑制剂的筛选,可能找到有效的抗癌药物。

DNA拓扑异构酶抑制剂的研究是当前许多实验室致力的方向。拓扑异构酶作用于DNA时,超螺旋状态的DNA在解旋过程中经历不同的过渡态,每一种状态的DNA具有不同的电泳位移,用凝胶电泳分析天然产物提取物对拓扑酶-DNA复合体的稳定能力或抑制松弛能力,从而筛选出具有抑制拓扑异构酶这一重要靶点的抗癌药物。

此外,细胞骨架微管蛋白是一种比较传统的靶点,干扰微管蛋白聚合或解聚的药物具有抗有丝分裂活性,紫杉醇的问世使微管靶点重新得到重视。由于肿瘤细胞的血管与正常细胞血管的构成、基膜成分、通透性等特性明显不同,因此,选择性抑制癌细胞血管生成也已成为一种新的筛选策略。其他的筛选机理还有细胞程序性死亡、亲和DNA、癌细胞浸润与转移等。

非肿瘤系统的筛选模型虽然有其简便、特异性高等优点,但毕竟不能代替肿瘤系统,必须与肿瘤系统结合起来,才能更客观明确地反映其抗肿瘤活性。

2、肿瘤系统筛选模型

这类模型有体内与体外两种:

(1) 体外筛选方法

肿瘤细胞对药物敏感与否可以用体外所构建的各种反映肿瘤细胞活力或存活状态的实验系统来表示,据现有的资料来看,人们研究比较多的体外筛选方法大致有以下几种:

1) 人癌干细胞集落形成检查法(HTCA)^[75]:单细胞悬液在双层琼脂中培养,通过加药与不加药培养72小时后计数干细胞繁殖形成的集落数,估定癌对该药的敏感性大小。其优点是能直接测定药物对干细胞的影响,且能处理相当多的样品。该法可检定人的淋巴细胞杀

细胞能力，亦可筛选生物应答调节剂^[73]。

2) 琥珀酸脱氢酶抑制法 (SDI Test)^[76]：利用癌细胞的琥珀酸脱氢酶去掉琥珀酸的氢原子，使之转为延胡索酸的活性，脱掉的氢原子用 MTT (Methy-thiazolyltetrazolium) 接受，产生紫红色甲臍 (Formazan) 沉淀，收获的 H⁺ 用颜色深浅来定量，通过检测残存的癌细胞数而得知化疗药杀灭癌细胞的能力。

3) ³H-TdR 掺入法：药物作用效果通过嵌入 ³H-TdR，用闪烁计数仪测定 cpm 数来判断。虽然使用同位素进行筛选有一定困难，但能处理大量的样品，可用于筛选。

4) 四唑盐快速比色法 (Colorimetric Assay-MTT 法)^[77,78]：此法是在 SDI Test 基础上，八十年代由 Mosmann 发展起来的一种检测细胞生存和增殖状态的方法。MTT 在活细胞线粒体酶的参与下，被还原为紫红色的甲臍化合物，再经适当的溶剂溶解后在酶标测定仪上测吸光度，以吸光度的变化作为检测细胞毒的指标。此法简单、快速、重复性好，利于临床应用。但该法存在甲臍结晶溶解度差，本底高等问题，从而导致本法敏感性较低。国外学者对此法进行了种种改良，例如 1988 年 Paull 等提出，用可形成水溶性甲臍产物的 XTT 代替 MTT，省略常规 MTT 法中酸化异丙醇溶解甲臍结晶的步骤，但 XTT 法本身有许多不足之处，为此，Bsattke 等设计出一种新型的 MTT 类似物 MTS，其具有操作简单、快速且特异性强等诸多优点。

5) 癌细胞内 ATP 水平的测定^[76]：鹿儿岛大学医学院报告，以大鼠肝癌细胞与抗癌剂 MMC、5-Fu、BLM、ADM、cDDP 等分别培养 3 天后测细胞的 ATP 含量，发现 ATP 水平确能反映该株细胞在大鼠腹水中连续 4 天后对各抗癌剂的敏感，同时用台盼蓝推拒法判定活细胞。此外，广岛大学核医学研究所用 ATP 法测人胃癌的异体移植瘤，也指出 ATP 法测试可为药敏测定之一法。

此外，近几年还发展了一些体外药物敏感性测定方法，如流式细胞仪 (FCM) 测定细胞毒^[79]、快速荧光素测定法、NAG 酶荧光比色法、嗜银蛋白检测技术 (AgNOR) 等预测化疗药物敏感性^[80,81,82]。

(2) 体内筛选方法

1) 动物移植性肿瘤：生长在小鼠或大鼠身上的移植性肿瘤是筛选试验中最常用的模型，其优点是接种适量的癌细胞后不久即发生肿瘤，发生率可达 100%，且瘤中生长均匀，易于客观地判断疗效，接种后在短期内即可供筛选用。实体瘤以瘤重的变化作为疗效指标，腹水癌及白血病则以平均生存时间为疗效指标。

2) 异种移植：由于药物在动物中的效果与人的临床效果未必一致，因此在筛选中使用人癌作为靶子最为理想。肿瘤移植可进行异种移植，将人癌移植给裸鼠或正常免疫小鼠，但裸鼠价格昂贵，动物饲养手续繁杂，且实验时间长，在没有相当好的设备条件下实施筛选相当困难。人癌移植于小鼠肾囊下实验不用裸鼠，其敏感性 6 天内便可得结果。但移植肿瘤操作费时，且移植用的肿瘤小块的肿瘤实质与间质的比例不稳定，作为大量筛选方法的可行性还有待进一步研究。此外，还有一种方法将人癌移植于鸡胚绒毛尿囊膜进行抗肿瘤物质的筛选，该技术简单，费用少且快速，可用于筛选^[69]。

此外，体内筛选方法还有自发性肿瘤试验及诱发性肿瘤试验法，但皆因种种缺陷而难以用于大量筛选。

筛选方法的优劣对抗肿瘤物质的开发起着越来越重要的作用，美国 NCI 已经从传统的“药物本位”的体内筛选转向“疾病本位”的体外筛选，建立了一种“疾病本位”的人体肿瘤细胞株体外筛选系统^[22]。在新的筛选系统中，化合物首先要经过七大类近 60 种人类细胞株的体外筛选，然后再进行裸鼠体内的人类肿瘤异种移植研究，这是一个比较理想的筛选流程。

四、本课题研究目的、意义和内容

在过去的几十年里，恶性肿瘤的治疗虽然取得了显著成就，但癌症病人的死亡率及发病仍逐年上升，癌症至今还在严重威胁人类健康。药物治疗是治疗癌症的最重要疗法之一，已有许多证据表明，根治癌症有赖于发现新的抗肿瘤药物。目前世界各国对抗肿瘤药物的开发非常重视，每年都投入大量的人力、物力、财力进行抗肿瘤活性物质的筛选及化学药理研究。

由于过去筛选抗肿瘤活性物质主要集中在陆生生物，随着研究开发的范围不断扩大，目前除了建立全新的筛选方法，否则很难从陆生生物中筛选到新的活性物质。近几年从具有特殊生境的海洋生物中寻找新的抗肿瘤活性物质已成为当今抗肿瘤药物研究热点。

海洋面积占地球表面积的 71%，海洋中的微生物资源仅次于土壤，海洋微生物受海洋高盐、高压、低温、寡营养等特殊生境及海洋中其他生物类群的影响，使其有可能产生结构新颖、生物活性特殊的活性物质。从这些活性物质中很有可能直接筛选出具有应用价值的抗癌药物或可作为研制抗癌新药的先导化合物。目前，国外已有不少关于海洋微生物抗肿瘤活性物质的研究报道，其中，少数的抗肿瘤活性物质已进入临床试验。

我国海域面积辽阔，海岸线从温带、亚热带至热带绵延数千里，海洋微生物资源十分丰富，然而，我国对海洋微生物的研究还相对落后，国内至今尚未见大规模、系统地对海洋微生物抗肿瘤活性物质筛选的报道。因此，开展海洋微生物抗肿瘤活性物质的研究，对了解我国海洋微生物抗肿瘤活性物质资源及开发新的抗肿瘤药物具有十分重要的理论意义和应用价值。

本课题是在国家自然科学基金和省科委重点项目经费的资助下，以台湾海峡微生物为研究对象，系统地分离筛选可产抗肿瘤物质的菌株，并进行生物活性物质的提纯和性质研究，为开发宝贵的海洋微生物药用资源提供依据。主要包括：（1）建立抗肿瘤活性物质的体外筛选模型；（2）筛选从台湾海峡厦门海区潮间带采集的海洋微生物，尤其是几种海洋微生物体表和肠道中分离的细菌、放线菌和真菌产生的抗肿瘤物质；（3）对高活性菌产生的活性物质进行初步分离提纯并进行理化性质、体外体内活性研究；（4）对高活性菌株的分类地位及发酵条件进行研究。

材料与方法

一、材料

1、菌株、细胞株

(1) 菌株

BIA 法中的敏感指示菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*)BR513; 供筛菌株系本实验室自台湾海峡厦门海区潮间带采集的石莼、浒苔、江蓠、海兔、海葵及鲨鱼等几种海洋生物体表和肠道分离得到; 抗菌实验所用菌为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)。以上菌株均为本实验室保存菌种。

(2) 细胞株

小鼠淋巴样癌 P388D1 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所; 人口腔表皮样癌 KB 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

2、化学试剂

噻唑蓝 (MTT)	(华美公司)
坚牢蓝 RR 盐	(上海化学试剂采购供应站试剂厂)
BNG (6-bromo-2-naphthyl- β -D-galactopyranoside)	(Sigma 公司)
ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)	(中科院上海生化所东风生化技术公司)
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranoside)	(上海生工生物工程有限公司)
顺铂	(锦州制药一厂)
5-氟尿嘧啶	(锦州制药一厂)
甲氨蝶呤	(天津市河北制药厂)
丝裂霉素 C	(Kyowa Hakko Kogyo Co.Ltd)
盐酸阿糖胞苷	(北京医科大学实验药厂)
环磷酰胺	(上海华联制药公司)
长春新碱	(上海华联制药公司)
平阳霉素	(天津市河北制药厂)
DMSO	(Sigma 公司)
盐酸阿霉素	(汕头经济特区明治医药有限公司)
柔红霉素	(Farmitalia Carlo Erba Milano-Italy)
小牛胸腺 DNA	(上海牛奶公司综合厂)

3、常用试剂及培养基

(1) 试剂

1) 1 mol/L Tris: 850mL 蒸馏水中溶解 121.1g Tris, 加蒸馏水定容至 1000mL。

2) 50×Medium E: 10.0g MgSO₄·7H₂O、100.0g Citric acid H₂O、500.0g K₂HPO₄、175.0g NaH₂PO₄, 加水溶解后定容至 1000 mL, 121℃高压灭菌 20min。

3) Medium A: 10.5g K₂HPO₄, 4.5g KH₂PO₄, 1g (NH₄)₂SO₄, 0.5g 柠檬酸三钠, 加水溶解后定容至 1000 mL, 121℃高压灭菌 20min。

4) ZCM 缓冲液: 6.1g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.5g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.75g KCl, 0.246g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.7mL β -巯基乙醇, 25mg 氯霉素, 加水溶解后定容至 1000mL, pH 7.0, 4℃ 冷藏。

5) PBS 缓冲液: Na_2HPO_4 1.44g, KH_2PO_4 0.24g, KCl 0.2g, NaCl 8g, pH 7.4, 加水溶解后定容至 1000mL, 分装后 121℃ 高压灭菌 20min。

6) D-Hank's 液: NaCl 8.0g, KCl 0.40g, KH_2PO_4 0.06g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.60g, NaHCO_3 0.35g, 苯酚红 0.02g, 加双蒸水至 1000mL, 分装后 121℃ 高压灭菌 20min。

7) 0.02% Versene 消化液: EDTA 0.1g, D-Hank's 液 500mL, 用 3.7% NaHCO_3 调 pH 至 7.4, 121℃ 高压灭菌 20min。

8) 三抗母液: D-Hank's 中每毫升含 1 万单位青霉素和 1 万单位链霉素, 5 千单位卡那霉素。

9) 10% SDS-0.01N HCl: SDS 100g, 1N HCl 10mL, 加蒸馏水定容至 1000mL。

10) 硫酸-甲醛试剂: 取甲醛溶液 1mL, 加入硫酸 10mL 中混匀。

11) 茚三酮试剂: 0.5g 茚三酮溶解于 100mL 丙酮中。

12) 茴香醛-浓硫酸试剂: 浓硫酸 1mL 加到冰乙酸 50mL 中, 冷后加茴香醛 0.5mL, 临用时新配。

13) 人造海水: NaCl 29.8g, KCl 0.73g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10.7g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.4g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.1g, 加水溶解后定容至 1000mL。

14) 5mg/mL DNA^[83]: 10mg 小牛胸腺 DNA 溶于 2mL 双蒸水, 4℃ 溶解过夜, 煮沸 20min, 冷却至 22℃, 18h 后于 -70℃ 贮存。用前解冻。

(2) 培养基

1) 细胞培养基

RMPI 1640 为 Gibco BRL 公司产品。小牛血清 (特级) 为杭州四季生物工程材料研究所产品

2) 微生物培养基

① LB 培养基: NaCl 10g, 酵母粉 5g, 胰蛋白胨 10g, 加水至 1000mL, pH 7.0, 121℃ 高压灭菌 20min。固体培养基加 20g 琼脂。

② LBE 培养基: NaCl 10g, 酵母粉 5g, 胰蛋白胨 10g, 1M Tris 5mL, 加水至 1000mL, pH 7.0, 121℃ 高压灭菌 20min 后补加 4mL 50× Medium E, 10mL 20% 葡萄糖。固体培养基加 20g 琼脂。

③ 高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20g, NaCl 0.5g, KNO_3 1g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 琼脂 15~20g, 水 1000mL, pH 7.4~7.6, 121℃ 高压灭菌 20min。

④ PDA 培养基: 马铃薯 200g (去皮切片, 加水煮沸 30min, 过滤取其清液), 葡萄糖 20g, 调 pH 6.8~7.0, 加水至 1000mL。固体培养基加 20g 琼脂。

⑤ 黄豆粉培养基: 可溶性淀粉 20g, 黄豆粉 15g, 葡萄糖 5g, 酵母膏 2.5g, CaCO_3 1g, 加水至 1000mL, pH 7.5~8.0。

⑥ 培养基 I: 葡萄糖 25g, 黄豆粉 10g, 酵母粉 5g, CaCO_3 3g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g, 加水至 1000mL, pH 自然。

⑦ 培养基 II: 黄豆粉 30g, 可溶性淀粉 40g, CaCO_3 5g, NaNO_3 1g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, 加水至 1000mL, pH 自然。

⑧ 培养基 III: 葡萄糖 15g, 酵母粉 10g, 玉米浆 20g, 可溶性淀粉 40g, CaCO_3 5g, 加水至 1000mL, pH 自然。

⑨ 培养基 IV: 可溶性淀粉 20g, 黄豆粉 15g, 葡萄糖 5g, 酵母膏 2.5g, CaCO_3 1g, 加水

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库