

紫杉醇

高产菌株的选育及其
生物合成的代谢调控

赵凯 著



 中国科学技术出版社



紫杉醇高产菌株的选育及其 生物合成的代谢调控

赵 凯 著

中国科学技术出版社
· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

紫杉醇高产菌株的选育及其生物合成的代谢调控/赵凯著.
—北京:中国科学技术出版社,2009.1
ISBN 978-7-5046-5165-5

I. 紫… II. 赵… III. 微生物-发酵-应用-抗癌药-研究
IV. TQ465

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 044000 号

自 2006 年 4 月起本社图书封面均贴有防伪标志,未贴防伪标志的为盗版图书。

中国科学技术出版社出版
北京市海淀区中关村南大街 16 号 邮政编码:100081
电话:010-62103210 传真:010-62183872
<http://www.kjpbooks.com.cn>
科学普及出版社发行部发行
北京长宁印刷有限公司印刷

*

开本:889 毫米×1194 毫米 1/32 印张:7.5 字数:266 千字
2009 年 1 月第 1 版 2009 年 1 月第 1 次印刷
定价:26.00 元
ISBN 978-7-5046-5165-5/TQ·19

(凡购买本社的图书,如有缺页、倒页、
脱页者,本社发行部负责调换)

内 容 简 介

本书是一部采用内生真菌发酵生产抗癌药物紫杉醇的学术专著,是作者结合多年的多项重大科研成果,并参阅了大量的国内外文献撰写而成的。

全书共分八章。第一章主要讲述紫杉醇的由来、功能及其抗癌机理;第二章详细地介绍了紫杉醇的生产技术研究现状;第三章论述了紫杉醇的各种萃取、分离以及含量测定方法;第四章系统地介绍了发酵培养条件的优化和培养基组成对紫杉醇产生菌紫杉醇产量的影响;第五章对影响紫杉醇产生菌原生质体制备、再生和诱变的因素进行了详细研究。同时,对诱变菌株和出发菌株间以及诱变菌株间的遗传变异进行了初探;第六章重点介绍了紫杉二烯合成酶基因的克隆;第七章为紫杉二烯合成酶基因和紫杉醇产生菌 HQD₃₃ 基因组 DNA 的 Southern 杂交;第八章为紫杉醇生物合成研究的展望。书后还列出了主要参考文献,便于读者深入研究时查阅。

本书是一部具有自己特色、体系新颖、学术性强、理论与实践并重的学术专著。在内容安排上注重了科学性、先进性、系统性和条理性,图文并茂,体例规范,语言通顺流畅,涉及内容丰富而广泛。本专著可作为生物制药专业、肿瘤专业、生物工程专业师生的参考书,也可作为相关领域研究人员与癌症患者及医护人员的参考用书。

责任编辑 杨 艳

责任校对 孟华英

责任印制 安利平

前 言

21 世纪,癌症将成为人类的“第一杀手”。许多人将癌症视为洪水猛兽,谈癌色变,认为癌症是不治之症。可见,癌症的防治任务十分艰巨,受到了国内外学者的极大关注,是一个十分活跃的研究领域。紫杉醇是继阿霉素和顺铂后的热点抗癌药物,它使众多的癌症患者看到了生命的曙光,是目前治疗乳腺癌、卵巢癌和子宫癌的特效药。紫杉醇临床应用的成功,是天然药学领域的一个重要事件,在学术界和临床上都产生了广泛而深刻的影响。但非常遗憾的是,随着紫杉醇临床用途的不断拓宽,市场需求的稳定增长,利用目前的紫杉醇生产技术,即从红豆杉原料中提取紫杉醇或其中间体的方法,不能满足市场需求,且从红豆杉中提取紫杉醇会使红豆杉物种生存受到威胁,因此,亟待解决的一个问题是原料短缺。内生真菌发酵生产紫杉醇或中间体,是解决这个问题的重要途径,且具有诱人的发展前景,将产生巨大的经济效益和社会效益。

21 世纪是生命科学时代与现代生物技术时代。生物制药产业是新时期的“黄金产业”与“朝阳产业”。尤

其对抗癌新药的研究和生产将是永恒的重大课题和不衰的产业。笔者顺应社会与时代的需求,多年来一直致力于抗癌药物紫杉醇产生菌的分离、纯化,菌种的选育、改造,工程菌株的构建和内生真菌发酵生产紫杉醇发酵培养条件优化等的研究工作。现将作者近年来的研究工作结晶整理汇集起来,并结合大量的国内外文献进行了较为全面的概括与综述,以飨读者。

全书共分八章,分别对紫杉醇的由来和功能及其抗癌机理;紫杉醇的生产技术研究现状;紫杉醇的萃取、分离以及化学分析、含量测定的方法;紫杉醇的生物合成途径;紫杉醇产生菌产紫杉醇发酵条件探讨及培养基的优化;紫杉醇高产菌株原生质体诱变育种,诱变菌株和出发菌株间以及诱变菌株间的遗传变异进行了初探;紫杉醇生物合成途径中紫杉二烯合成酶基因的克隆以及紫杉二烯合成酶基因和紫杉醇产生菌 HQD₃₃ 基因组 DNA 的 Southern 杂交;展望了随着研究工作的不断深入,利用产紫杉醇内生真菌进行大规模发酵生产重要抗癌药物紫杉醇,具有广阔的前景,该法必将是未来发展的主导方向,将成为抗癌药物紫杉醇来源的重要途径;同时,如果对这一类群真菌的工业化研发取得成功,还会带动多种相关新产品的长期、持续开发。的确,正如某些文学家所赞誉的那样:“科学工作者利用现代生物技术手段已经或正在随心所欲地改造现有生物,不断地创造出可产某种新产品或增产某种珍贵产品的新物种

来,以造福人类”!在本书结尾列出了主要参考文献,以便读者深入研究时享用。

本书的出版受到国家自然科学基金项目、黑龙江省“十五”重大科技攻关项目、哈尔滨市青年科学基金项目、黑龙江省教育厅海外学人科研资助项目、黑龙江大学杰出青年基金项目和黑龙江大学博士文库基金的资助,为此笔者表示由衷的感谢。同时,借本书出版之际,向指导我的博士生导师周东坡教授和博士后合作导师童光志教授,致以由衷的感谢和崇高的敬意;也感谢黑龙江大学生命科学学院的领导、老师和我的同窗及弟子的大力支持和帮助。

希望本书的出版,对药学专业、生物制药专业、肿瘤专业、生物技术、生物工程专业的学者、研究人员和制药工业的工程技术人员提供有益的参考,对相关专业的师生有所裨益,对希望开展紫杉醇治疗的各类癌症患者及医护工作者有一定的指导作用。同时,在本书的撰写过程中,由于笔者经验不足、时间仓促、业务水平的限制,本书难免有纰漏、不妥,甚至谬误之处,恳请有关专家、同仁和广大读者批评指正。

赵 凯

2008年2月于黑龙江大学

序 一

在现代生物技术、现代信息技术、新能源技术、新材料技术等发展腾飞的 21 世纪,生命科学发展更为神速,已发展成了自然科学中的带头学科,使得现代生物技术 在各国国民经济的发展中和 GDP 总值的贡献率均发挥着极其重要的作用。21 世纪是生命科学时代与现代生物技术时代。生物制药产业是新时期的“黄金产业”与“朝阳产业”。尤其对抗癌新药的研究和生产将是永恒的重大课题和不衰的产业。因此,经济学家称“生物经济时代即将到来!”

癌症是严重威胁人类健康与生命的疾病,是近年来人类疾患中仅次于心脑血管疾患的第二大死因。全球每年因患癌症而死亡的人数高达 800 万之多,仅我国每年死于癌症者就有近百万人,且有逐年增长的趋势。据世界卫生组织在 2002 年 7 月 1 日发表的一项研究报告表明,在今后的 20 年,新癌症患者人数将由目前的每年 1000 万人增至 1500 万人。因此,许多人将癌症视为洪水猛兽,谈癌色变,认为癌症是不治之症。可见,癌症的防治任务还十分艰巨,癌症的防治问题业已受到了国内

外学者极大的关注。

当前,化学治疗仍是抗肿瘤三大治疗方式中最重要的手段之一。因此,抗癌药物的研制是时代赋予广大医药工作者和生物技术人员的历史重任,迄今抗肿瘤药物的研究,仍是一个十分活跃的研究领域,其发展极其迅猛,并已取得了令人瞩目的成就。紫杉醇以其独特的抗癌机理,被广大医药工作者研究确证是一种抗癌的特效药,它使众多的癌症患者看到了生命的曙光。但非常遗憾的是,30多年来人们一直是靠“杀鸡取卵”的方式,以破坏自然资源和生态环境为代价,从红豆杉树中分离提取紫杉醇。由于紫杉醇在抗癌症治疗方面的特殊疗效和紫杉醇药源上的巨大矛盾,市场经济规律就决定了紫杉醇药价在国际市场上的极度昂贵。在高额利润的驱动之下,一些不法经营者疯狂地剥树皮或盗伐大批的红豆杉树木。结果造成资源枯竭、生态环境严重破坏。为此,广大科研工作者开始寻觅合成紫杉醇的新药源和新的生产方式。本书作者赵凯副教授自攻读博士学位以来,在内生真菌发酵生产抗癌药物紫杉醇研究方面技术水平国际领先,选育出了高产紫杉醇菌株,是目前国内外报道的紫杉醇产量最高的菌株;已完成了中试工艺研究,为微生物发酵法生产紫杉醇的早日产业化生产奠定了基础。

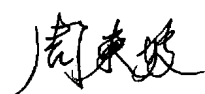
该专著是作者总结多年来从事紫杉醇科研工作的结晶,本专著特色鲜明、体例新颖,具有前瞻性与科学

性,知识先进且系统完整、结构严谨、理论与实践并重、语言通顺流畅、图文并茂、可读性强,是具有较大参考价值的优秀学术专著。我愿意向制药工程、基础药学、基础医学、肿瘤学、生物技术等专业教师、研究生、本科生及有关科研人员、癌症患者和医护人员推荐这部学术著作。

教授、博士生导师

黑龙江大学

2008年4月18日



序 二

癌症是继心脑血管疾病后成为危害人类生命健康的第二“杀手”。尽管目前已有数十种化疗或辅助抗癌药物用于临床治疗,但大多数药物只能病情缓解,无法达到治愈的目的。

随着生物技术的成熟及生物工程制药业的高速发展,抗癌药物的研究与开发已进入一个崭新的时代,并取得了令人瞩目的成就。紫杉醇作为新一代抗癌药物的代表,具有独特的作用机理,是继阿霉素和顺铂后的热点抗癌新药,是目前治疗乳腺癌和卵巢癌的特效药。由于天然植物红豆杉中紫杉醇的含量较低,从红豆杉中提取紫杉醇会使红豆杉物种生存受到威胁,因此,通过生物合成途径生产紫杉醇无疑是一个很好的途径。作者多年来一直致力于抗癌药物紫杉醇产生菌的分离、纯化,菌种选育、改造,工程菌株的构建和发酵条件优化的研究工作,在内生真菌发酵生产抗癌紫杉醇研究方面技术水平国际领先,选育出了高产紫杉醇菌株,是目前国内外报道的紫杉醇产量最高的菌株;已完成了中试工艺研究,为微生物发酵法生产紫杉醇的早日产业化生产奠

定了基础。

该专著自成特色、体例新颖、系统完整、知识新颖、科学性强、深入浅出、图文并茂、重点突出、通俗易懂、理论与实践并重,是医药专业技术人员一部难得的参考用书,我愿意向从事紫杉醇或相关药物研究、开发、生产的科研人员和从事肿瘤研究和治疗的人员及患者、研究生、本科生推荐这部学术著作,希望对生物医药产业、广大癌症患者带来福音。

博士

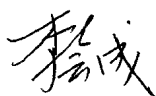
研究员级高级工程师

副总经理

哈药集团技术中心

哈药集团生物工程有限公司

2008年4月18日

Handwritten signature in black ink, appearing to read '梁成' (Liang Cheng).

目 录

第一章 概 述	(1)
第一节 紫杉醇的由来	(1)
第二节 紫杉醇的功能及其抗癌机理	(3)
一、抗癌作用	(3)
二、非癌性疾病	(5)
三、其他功能	(7)
四、紫杉醇的抗癌机理	(8)
第二章 紫杉醇的生产技术研究现状	(9)
第一节 从红豆杉树中提取紫杉醇	(9)
第二节 生物技术生产紫杉醇的研究现状	(11)
一、细胞和组织培养	(12)
二、器官培养	(22)
三、化学全合成和半合成	(24)
四、基因工程	(26)
五、微生物发酵法生产紫杉醇	(26)
六、代谢工程生产紫杉醇	(33)
第三章 紫杉醇的提取、分离与检测	(35)
第一节 紫杉醇的提取和分离	(35)
一、紫杉醇的提取	(35)
二、紫杉醇的分离	(42)

第二节 紫杉醇的分析与含量测定	(51)
一、薄层层析 (Thin Layer Chromatography, TLC)	
分析法	(51)
二、高效液相色谱 (High Performance Liquid Chroma-	
tography, HPLC) 分析法	(54)
三、质谱法 (Mass Spectrometry, MS)	(59)
四、核磁共振光谱法 (Nuclear magnetic resonance	
Chromatography, NMR)	(61)
五、X-射线晶体照相术 (X-ray crystal body photogra-	
phic technique)	(63)
六、免疫学分析法 (Immunological Methods)	(63)
七、毛细管电泳法 (Capillary Electrophoresis, CE)	(67)
八、细胞生物学方法 (Bioassay)	(67)
九、荧光学方法 (Fluorescentology Method)	(68)

第四章 紫杉醇产生菌产紫杉醇发酵培养条件探讨

及培养基的优化	(70)
第一节 紫杉醇生物合成的代谢调控	(70)
第二节 发酵过程中生物量和含糖量的变化	(78)
一、试验材料	(78)
二、试验方法	(80)
三、结果与分析	(83)
第三节 不同培养时期紫杉醇产生菌紫杉醇的	
产生情况	(86)
一、试验材料	(86)
二、试验方法	(87)
三、结果与分析	(89)
四、讨论	(90)

第四节 发酵条件对紫杉醇产生菌紫杉醇产量的影响	(91)
一、试验材料	(91)
二、试验方法	(91)
三、结果与分析	(92)
四、讨论	(95)

第五节 培养基组成对紫杉醇产生菌紫杉醇产量的影响	(96)
一、前体物间协同作用对紫杉醇产生菌生物合成紫杉醇影响的研究	(96)
二、诱导子对紫杉醇产生菌生物合成紫杉醇影响的研究	(100)
三、前体物和诱导子间的协同对紫杉醇产生菌生物合成紫杉醇影响的研究	(103)
四、前体物、抑制剂及诱导子的协同作用对紫杉醇生物合成影响的研究	(107)
五、讨论	(112)

第五章 紫杉醇高产菌株原生质体诱变育种的研究 ... (116)

第一节 原生质体诱变技术	(116)
一、丝状真菌原生质体诱变技术的研究进展	(116)
二、原生质体作为诱变材料的优越性	(118)
第二节 紫杉醇高产菌株原生质体诱变选育及其遗传变异初探	(119)
一、紫杉醇产生菌 <i>Nodulisporium sylviforme</i> 原生质体诱变育种的研究	(119)
二、紫杉醇高产菌株间遗传变异初探	(140)

第六章 紫杉醇生物合成途径中紫杉烯合成酶	
基因的克隆	(158)
第一节 紫杉醇的生物合成途径及部位	(158)
一、紫杉醇的生物合成途径	(159)
二、紫杉醇的生物合成部位	(162)
第二节 紫杉醇生物合成途径中相关酶的	
研究进展	(163)
一、紫杉醇骨架的生物合成中相关酶的研究	(163)
二、紫杉醇侧链的生物合成中相关酶的研究	(168)
三、紫杉环系统与侧链的酯化反应中相关酶	
的研究	(169)
第三节 紫杉醇合成途径中紫杉二烯合成酶	
cDNA 克隆	(169)
一、试验材料	(170)
二、试验方法	(171)
三、结果与分析	(180)
第七章 紫杉二烯合成酶基因和紫杉醇产生菌基因组	
DNA 的 Southern 杂交	(188)
一、试验材料	(189)
二、试验方法	(190)
三、结果与分析	(195)
四、讨论	(196)
五、结论	(198)
第八章 紫杉醇生物合成研究展望	(199)
参考文献	(202)