

基于微孔板的高通量筛选 6-羟基烟酸转化菌方法的建立

杨瑶, 袁生*, 戴亦军, 尚广东

(南京师范大学生命科学学院, 南京市微生物技术工程研究中心, 南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 南京 210046)

摘要:建立了一种基于 96 孔板-酶标仪的双波长紫外分光光度法高通量筛选 6-羟基烟酸转化菌的方法。实验以 251nm 为测定波长、231nm 为参比波长测定转化样品的 6-羟基烟酸含量, 6-羟基烟酸与 $A_{251-231}$ 在 0.5~11 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内有良好的线性关系, 服从朗伯-比尔定律, 平均回收率为 99.11%~100.81%。利用 96 孔板-酶标仪, 每天筛选量可达到 2000~5000 个反应, 达到高通量筛选要求。

关键词:微孔板; 高通量筛选; 双波长紫外分光光度测定; 烟酸; 6-羟基烟酸

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2008)01-0112-04

生物转化是指利用生物体代谢过程中产生的酶对有机化合物某一特定部位(基团)的作用, 使它转变成结构上相类似的另一种化合物。在微生物酶系催化下进行的生物转化称作微生物转化(microbial transformation)^[1]。筛选体系(包括转化菌株的筛选、转化产物和底物的筛选等)的建立是微生物转化研究中最迫切解决的问题, 没有有效的筛选方法将大大降低研究效率, 同时耗费人力及物力资源。因此, 以微生物转化烟酸生成 6-羟基烟酸的研究为例, 建立了基于 96 孔板-酶标仪的高通量筛选 6-羟基烟酸转化菌的方法, 对其他转化菌的大规模筛选有参考价值。

随着烟碱类杀虫剂的迅速发展, 6-羟基烟酸作为合成该类杀虫剂重要的中间体^[2~4]开发前景的广阔, 微生物转化生产 6-羟基烟酸已成为国外研究热点^[5~9], 本实验室在高产菌株筛选、发酵产酶条件优化等方面已开展研究^[10~13], 如今迫切需要建立高通量筛选 6-羟基烟酸转化菌的方法以提高工作效率。此外, 烟酸羟基化相关基因的克隆也正在进行, 已

构建了 6-羟基烟酸产生菌鞣酮丛毛单胞菌 *Comamonas testosteroni* JA1 基因组文库, 希望通过高通量筛选转化子获得能够转化烟酸生成 6-羟基烟酸的阳性克隆, 进而得到烟酸脱氢酶的基因的相关及全基因序列。有效的高通量筛选阳性克隆的方法也是该研究成功的关键。

目前, 在烟酸微生物转化的研究中, 6-羟基烟酸的生成都是由高效液相色谱 HPLC 检测的^[5~9, 14], 该方法准确, 灵敏度高, 但样品要经过色谱柱的分离, 因此分析时间长, 无法达到高通量筛选的要求。利用 96 孔板-酶标仪对烟酸和 6-羟基烟酸的紫外吸收波谱进行分析, 选取合适的波长对可吸收曲线部分重叠的转化样品进行 6-羟基烟酸生成量的测定及双波长紫光分光光度法, 结果满意, 由于样品无须分离, 分析时间大大缩短, 每天可检测 2000~5000 个反应, 完全达到高通量筛选要求, 解决了基因文库的筛选中大量突变体筛选的难题, 对于类似具有转化产物和底物光吸收波长改变的研究工作建立高通量的筛选方法也具有一定的参考价值。

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2004BA308A22-12); 江苏省高校自然科学重大基础研究项目(06KJA21016); 江苏省“六大人才高峰”项目(06-C-014)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-25-85891067; E-mail: yuansheng@njnu.edu.cn

作者简介: 杨瑶(1981-), 女, 南京人, 博士研究生, 主要从事微生物转化研究。E-mail: cranny_yang@hotmail.com

收稿日期: 2007-05-08; 修回日期: 2007-07-19

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

紫外-可见连续波长酶标仪 Multiskan Spectrum (Thermo electron corporation); 标准品: 6-羟基烟酸为 Acros(Belgium)产品, 烟酸及其余试剂均为国产分析纯。

标准溶液的配制: 用磷酸缓冲液(0.02mol/L, pH 值 7.0)准确配制 25 μ g/mL 的 6-羟基烟酸标准溶液和 25 μ g/mL 的烟酸标准溶液。

1.2 实验方法

分别取 25 μ g/mL 的 6-羟基烟酸标准溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10.0、11.0、12.0、13.0、15.0mL 于 6 个 25mL 容量瓶中, 用磷酸盐缓冲液定容至刻度, 以 251nm 为测定波长, 231nm 为参比波长, 磷酸盐缓冲液为参比溶液, 测定上述溶液在两波长下的吸光度差 $\Delta A_{251-231}$ 。所有测试样品均在 96 孔板中进行吸光度分析, 测定体积 200 μ L。

2 结果

2.1 吸收光谱和 λ 的选择

分别取 25 μ g/mL 的 6-羟基烟酸标准溶液和 25 μ g/mL 的烟酸标准溶液 10mL 于 2 个 25mL 的容量瓶中, 以磷酸盐缓冲液定容至刻度, 以该磷酸盐缓冲液为参比, 在 190~400nm 波长范围内扫描, 吸收图谱见图 1。可见, 6-羟基烟酸最大吸收波长为 251nm, 选 251nm 为测定波长, 运用等吸收法^[15]进行比较, 以确定消除 6-羟基烟酸和烟酸的相互干扰, 选 231nm 为参比波长。

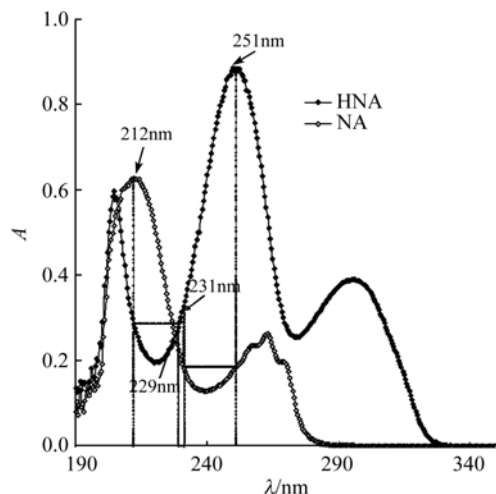


图 1 6-羟基烟酸和烟酸的紫外吸收光谱

Fig.1 Absorption spectrum of 6-hydroxynicotinic acid and nicotinic acid.

2.2 工作曲线

按实验方法配制一系列 6-羟基烟酸标准溶液, 分别在 251nm 和 231nm 测定 A 值得 $A_{251-231}$ 与 $c(6\text{-羟基烟酸})/(\mu\text{g/mL})$ 的线性回归方程为 $A_{251-231} = 0.0522c + 0.0095$, $R^2 = 0.9999$, 结果表明, 6-羟基烟酸与 $A_{251-231}$ 在 0.5~11 μ g/mL 浓度范围内有良好的线性关系, 服从朗伯-比尔定律。随机选取一个转化样品, 测得其 $A_{251-231}$ 值为 0.488, 根据标准曲线得样品 6-羟基烟酸浓度为 9.17 μ g/mL, 与 HPLC 测得该样品 6-羟基烟酸浓度 9.16 μ g/mL 结果一致, 说明随机样品的 $A_{251-231}$ 与 6-羟基烟酸浓度线性关系良好。

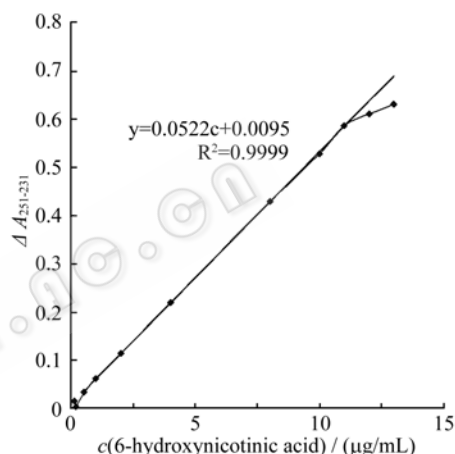


图 2 6-羟基烟酸浓度(c)与的 $\Delta A_{251-231}$ 标准曲线

Fig.2 Standard curve of 6-hydroxynicotinic acid in $\Delta A_{251-231}$.

2.3 稳定性试验

取标准曲线项下的溶液分别在 0、30min 和 2h 测定吸光值, 吸光值无变化, 表明 2h 内样品吸光值稳定。由于样品通过 96 孔板-酶标仪测量, 测量时间短, 2h 内的样品吸光值稳定符合实验要求。

2.4 菌体代谢物干扰实验

JA1 菌株培养后离心、洗涤并悬浮于磷酸盐缓冲液中, 将振荡 1~2d 的菌悬液离心, 取上清, 以磷酸盐缓冲液为参比测试 $A_{251-231}$, 进行菌体代谢物的干扰实验, 发现在实验波长范围内, 上述物质均无吸收或吸收很小, 故对测定无影响。

2.5 样品的测定

研究表明(表 1), JA1 菌株可边生长边转化烟酸, 菌体培养至对数期, 培养基中的 1%烟酸可全部转化为 6-羟基烟酸, 因此本实验直接检测对数期后培养液中有无 6-羟基烟酸生成。样品溶液的制备: 将实验室保藏菌株 JA1 按照文献^[10]培养 12h, 离心上清液 100 $^{\circ}$ C 灭活 3min, 稀释适当倍数, 测定 $A_{251-231}$, 代入方程计算浓度。同时, 样品按文献^[14]

中的 HPLC 方法进行 6-羟基烟酸含量分析。结果见表 1, 双波长方法和 HPLC 方法对相同的样品进行含量分析, 差异不显著。

表1 双波长法和HPLC方法检测6-羟基烟酸(n=8)
Table 1 The analytical results of 6-Hydroxynicotinic Acid (n=8)

Reaction time/h	Dual-wavelength /($\mu\text{g/mL}$)	RSD/%	HPLC/ $(\mu\text{g/mL})$
0.5	2.62 \pm 0.04	1.5	2.63 \pm 0.05
1	5.30 \pm 0.09	1.7	5.24 \pm 0.12
2	10.99 \pm 0.19	1.7	11.05 \pm 0.14

The average value of twp samples were used for t statistics test, T=1.0874(p>0.05) shows no significant difference. RSD(Relative Standard Deviation)=SD/mean*100%

2.6 回收率的测定

对样品中添加一定标准 6-羟基烟酸溶液, 表 2 为测得回收率和精密度数据, 回收率和精密度结果满意。

表2 样品中6-羟基烟酸回收率及精密度试验(n=8)
Table 2 The recovery and precision of 6-hydroxynicotinic Acid (n=8)

Reaction time /h	Measure value /($\mu\text{g/mL}$)	Added/ ($\mu\text{g/mL}$)	Measure value/ ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery/%	RSD/%
0.5	2.62	1	3.64 \pm 0.04	100.81	1.1
1	2.62	4	6.60 \pm 0.05	99.23	0.8
1	5.30	4	9.29 \pm 0.14	99.11	1.5

2.7 6-羟基烟酸转化菌的高通量筛选实例

在学校花房附近采集土样, 采用以烟酸为唯一碳源的方法, 筛选到大量利用烟酸的微生物, 约 1500 株菌^[11]。转化样品适当稀释后, 经 96 孔板检测菌体转化烟酸 2h 的 6-羟基烟酸的生成量, 以 JA1 菌株为对照, 筛选出 4 株具有较高的转化效率的转化菌株(表 3)。通过 96 孔板的高通量检测, 1500 个转化样品的产物检测 1.5h 完成, 而 HPLC 检测需要约 500h, 可见, 菌株筛选效率大大提高。

表3 菌株转化烟酸的羟基化酶的活力测定

Table 3 Hydroxylase activity of strain for transforming nicotinic acid

Name of strain	$\Delta A_{251-231}$	c(6-Hydroxynicotinic acid)/($\mu\text{g/mL}$)	Enzyme activity/(U/mL)
JA1	0.579	10.91	0.33
NJ-104	0.296	5.49	0.16
NJ-111	0.421	7.88	0.24
NJ-789	0.197	3.59	0.11
NJ-1136	0.222	4.07	0.12

3 讨论

烟酸经微生物转化生成 6-羟基烟酸, 生物转化过程中烟酸和 6-羟基烟酸两组分混合存在于样品中。分析表明烟酸与 6-羟基烟酸紫外最大吸收波长不同且吸收峰有重叠, 因此, 建立了一种双波长紫外分光光度法测定混合组分中 6-羟基烟酸的生成, 并利用 96 孔板-酶标仪快速、高通量地测定, 该方法简便、经济, 且测定结果与 HPLC 方法测定的结果差异不显著, 准确度和回收率结果满意。

能够高通量测定转化样品中产物的含量是该方法最大的优点。常规的 HPLC 色谱法分析样品, 由于样品中混合成分需经过色谱柱分离, 因此分析时间较长, 样品处理量有限。文中建立的方法, 通过 6-羟基烟酸紫外最大吸收波长和检测波长的吸收光值获得转化样品中混合组分中 6-羟基烟酸的含量, 该方法无须分离样品, 并且基于 96 孔板-酶标仪的各种取样、混合、离心装置, 操作时间的极大缩短, 每天筛选量可达到 2000~5000 个反应, 达到了高通量分析的要求。值得注意的是, 此方法同样可结合常规分光光度计使用, 只是每次测量的样本数有限。

本实验室已将该方法应用于 6-羟基烟酸高产菌株及其烟酸羟基化酶基因克隆的筛选工作, 并取得很好结果, 大大促进了相关研究工作。该方法也可以为其它生物转化菌株的高通量筛选方法的建立提供借鉴作用。

致谢 本课题研究过程中得到了南京师范大学分析测试中心冯玉英老师的悉心指导, 在此表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] 杜晨宇, 李春, 曹竹安, 等. 工业生物技术的核心—生物催化. 生物工程进展, 2002, 22(1): 9-14.
- [2] Yoshida T, Nagasawa C. Enzymatic functionalization of aromatic N-heterocycles: hydroxylation and carboxylation. *J Biosc Bioeng*, 2000, 89 (2): 111-118.
- [3] Liese A, Seelbach K, Wandrey C. 工业生物转化过程. 欧阳平凯, 林章凛译. 北京: 化学工业出版社. 2005.
- [4] 王齐, 杨亿, 肖国民. 3-甲基吡啶氮代衍生物的应用及技术进展. 化工科技市场, 2005, 2(2): 26-29.
- [5] Lehky P, Kulla H, Mischler S. Verfahren zur Herstellung von 6-hydroxynicotinsäure. European Patent Application 0152948, 1985.
- [6] Kulla H, Lehky P. Verfahren zur Herstellung von 6-hydroxy-

- Inikotinsäure. European Patent Application 0152949, 1985.
- [7] Kulla HG. Enzymatic hydroxylation in industrial application. *Chimia*, 1991, 45(1): 81–85.
- [8] Hurh B, Ohshima M, Yamane T, *et al.* Microbial production of 6-hydroxynicotinic acid, an important building block for the synthesis of modern insecticides. *J Ferment Bioeng*, 1994, 77(4): 382–385.
- [9] Nagasawa T, Hurh B, Yamane T. Production of 6-hydroxynicotinic acid from nicotinic acid by resting cells of *Pseudomonas fluorescens* TN5. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(4): 665–668.
- [10] Yuan S, Yang Y, Sun J, *et al.* A combined technology of growing culture hydroxylation of nicotinic acid and resting cells hydroxylation of 3-cyanopyridine by *Comamonas testasteroni* JA1. *Engineering in life science*, 2005, 5(4): 369–374.
- [11] 陆伟宏, 徐莉, 戴亦军, 等. 一株烟酸羟基化转化菌株的筛选和鉴定. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(1): 6–9.
- [12] 陆伟宏, 徐莉, 戴亦军, 等. 恶臭假单胞菌 NA-1 菌株烟酸羟基化酶活性的诱导和转化条件的研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(4): 551–555.
- [13] 徐莉, 袁生, 陈婷, 等. 恶臭假单胞菌 NA-1 菌株培养和静息细胞转化联合工艺生产 6-羟基烟酸研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46(1): 63–67.
- [14] 陆伟宏, 袁生, 戴亦军. 烟酸微生物转化产物的高效液相色谱分析方法. *江苏农业科学*, 2004, 3(1): 90–92.
- [15] 陈国珍, 黄贤智, 刘文远, 等. 紫外-可见分光光度法(上). 北京: 原子能出版社, 1980.

Microplate for high throughput screening of 6-hydroxynicotinic acid transforming strains

Yao Yang, Sheng Yuan*, Yijun Dai, Guangdong Shang

(Jiangsu Key Laboratory for Bioresource Technology, Nanjing Microbial Technology Research Center, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: Recently, new insecticides containing 3-chloropyridylmethyl group as a versatile building block have been developed, among which imidachloprid is a promising one. The synthesis of imidachloprid can use 6-Hydroxynicotinic acid, the first intermediate of the bacterial degradation of nicotinic acid, as a starting material. It is difficult to hydroxylate nicotinic acid at C6 position in a chemical synthesis. However, biotransformation can produce 6-hydroxynicotinic acid with industrial application possibility. Therefore, methods for large scale screening of 6-hydroxynicotinic acid-producing microorganisms are urgent. A high through-put screening method for 6-hydroxynicotinic acid transforming strains was established by determining 6-hydroxynicotinic acid based on 96-well Microplate-Multiskan Spectrum. The determination wavelength and the reference wavelength of 6-hydroxynicotinic acid were 251nm and 231nm respectively. Beer's law is obeyed in the range of 0.5–11 μ g/mL ($R^2=0.9999$) for measuring 6-hydroxynicotinic acid. The average recovery rate was 99.11%–100.81%. The results showed that there was no apparent difference between our microplate method and previous HPLC method in the detecting 6-hydroxynicotinic acid formation. The microplate method is simple, convenient and accurate. It has the potential for large scale (about 2000 ~ 5000 reactions/d) screening of 6-hydroxynicotinic acid-producing microorganisms.

Keywords: Microplate; High through-put screening; Dual-wavelength spectrum determination; Nicotinic acid; 6-hydroxynicotinic acid