

大孔树脂吸附法高通量快速提取 微生物次生代谢产物*

王俊波 曹文涛**

贵州大学化学与化工学院, 贵阳 550003

摘要 为建立一种适合药物高通量筛选的快速提取微生物代谢产物中小分子化合物的方法, 采用弱极性 AB-8 和中等极性 ADS-17 大孔吸附树脂从细菌发酵液吸附小分子代谢产物, 并用 50% 乙醇溶液将吸附的小分子化合物洗脱下来, 干燥后用二甲亚砜溶解备用; 应用流感病毒神经氨酸酶作为抗流感病毒药物筛选的靶标, MUNANA 作为底物, 测定发酵液中活性物质对神经氨酸酶的抑制活性。优化了神经氨酸酶抑制试验条件, 底物 500 倍稀释、病毒用量 1 μL 、pH 6.0 为最佳反应条件。证实了大孔吸附树脂吸附法纯化的微生物发酵液中小分子化合物粗提物具有不同程度的流感病毒神经氨酸酶抑制活性。与直接使用发酵液及用有机溶剂乙酸乙酯提取法比较, 用大孔吸附树脂吸附法制备的细菌代谢产物的抗流感病毒神经氨酸酶活性明显好于直接使用发酵液。该方法与乙酸乙酯提取法效果相当, 但制备更简便, 能实现高通量筛选。

关键词 微生物代谢产物; 大孔吸附树脂; 流感病毒; 神经氨酸酶; 高通量筛选

中图分类号 Q 93-33 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)06-0732-05

微生物具有极高的遗传多样性, 并产生结构和生物活性多样性的次生代谢产物^[1]。现代药物研发研究越来越依赖于高通量筛选 (high throughput screening, HTS), 而快速高通量制备微生物代谢产物粗提取物是实现高通量药物筛选的第一步。高通量筛选要求能处理尽可能多的样品。尤其是现在的分析检测手段对样品量要求越来越小。另外, 灵敏的生化检测和基于机制的检测方法尤其是 HTS 所采用的方法比原先基于细胞的检测方法更加切实可行, 降低了对初提取物进行大量溶剂分离的要求。HTS 需要以化学多样性为基础, 因为 HTS 有快速筛选大量物质 (提取物或化合物) 的能力。天然产物是 HTS 的一个巨大资源库, 为药物的研究开发提供了更多的样品, 而且效益高、成本低。从种类繁多的各类生物中提取活性物质的技术有多种。活性成分根据结构种类可分为蛋白质、脂质、多糖类、生物碱、黄酮类、苷类、木脂素以及其他高分子化合物。而从微生物发酵液中提取活性物质经常用到的方法有大孔树脂亲和柱分离法、有机溶剂萃取法等。但 these 方法都很难实现微生物代谢产物的高通量制备。因此建立一种快速高通量制备微生物代谢产物

粗提取物的方法将大大加快微生物药用资源的开发利用速度^[2-5]。

微生物药物是来源于微生物的次级代谢产物及其衍生物, 这些药物包括抗细菌感染、抗肿瘤、抗病毒以及酶抑制剂、免疫调节剂、受体拮抗剂和一些其他药理活性的药物^[6-8]。微生物来源广, 生长周期短, 代谢易于控制, 通过大规模发酵可以实现工业化生产, 与动植物相比, 具有潜在的产业化优势。微生物的多样性以及代谢产物的多样性, 为发现新药以及先导化合物提供了丰富的资源。因此, 建立和完善微生物活性物质开发的上游技术——粗提物快速制备方法具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

AB-8 大孔吸附树脂、ADS-17 大孔吸附树脂、2-N-吗啡啉-乙磺酸 (MES)、2'-O-4-methylumbelliferyl N-acetylneuraminic acid (MUNANA) 购自 Sigma 公司; 160 份芽孢杆菌发酵液和流感病毒 H1N1 A/PR/8/34 由中国科学院武汉病毒研究所提供。

收稿日期: 2010-03-08; 修回日期: 2010-07-16

* 贵州省科学技术基金项目 (黔科合 J 字 [2008] 2088 号) 资助

** 通讯作者. E-mail: cwtgz@163.com

王俊波, 男, 1985 年生, 硕士. 研究方向: 应用微生物. E-mail: wjb325@yahoo.com.cn

水浴锅(DKB-600B)、电热恒温鼓风干燥机(DHG-9123A)由上海一恒科技有限公司生产,台式离心机(SORVALL pico)由德国生产,恒温培养箱(DHP-9272)购自上海精宏实验设备有限公司,多标记微孔板读取仪(EnVision 2102)由美国PerkinElmer公司生产。

1.2 微生物代谢产物的快速提取

将发酵液置于80℃水浴锅中恒温加热30 min使蛋白质变性,离心取上清,将3 mL上清加入到含有0.15 g预处理后的AB-8和ADS-17混合树脂的离心管中,室温下振摇4 h,转速30 r/min,移去上清。用0.5 mL蒸馏水清洗充分吸附后的树脂后加入1 mL 50%乙醇溶液,于室温下振摇3 h,转速30 r/min,洗脱液干燥保存备用。

1.3 流感病毒神经氨酸酶抑制试验的优化

化合物MUNANA是神经氨酸酶的特异性底物,在神经氨酸酶的作用下可产生代谢产物,其产物在365 nm的激发光下能产生450 nm的荧光,荧光强度的变化可以灵敏地反映神经氨酸酶的活性。未分解的底物在315 nm处能被激发,产生374 nm的荧光。酶促反应体系中含有32.5 mmol/L MES缓冲液(pH 6.0)、4 mmol/L CaCl₂、7 μmol/L的底物MUNANA、1 μL病毒溶液,反应终体积为60 μL。37℃孵育90 min后加入终止液100 μL,终止液中

包括83%的乙醇以及0.14 mmol/L的KOH溶液。设定的参数为:激发光波长365 nm,发射光波长450 nm^[9-13]。

1) 流感病毒神经氨酸酶及底物用量对酶促反应的影响。在反应缓冲体系中其他条件不变,改变酶量,分别为0.25、0.50、1.00、2.00 μL,37℃孵育90 min后加入终止液,测定不同酶量反应下的荧光值,并分别以相应病毒量以及底物作为空白对照。在本试验条件下固定酶量为0.5 μL,改变底物量观察底物量对反应的影响。底物分别按1:500、1:800、1:1200梯度稀释,每组均做3个平行试验。

2) 缓冲体系pH对酶促反应的影响。在反应缓冲体系中(32.5 mmol/L MES、4 mmol/L CaCl₂、7 μmol/L MUNANA(1:500稀释)),加入酶量为1 μL的病毒稀释液20 μL,反应终体积为60 μL。37℃孵育60 min后加入终止液100 μL,待酶标仪预热10 min后,在设定的参数条件下测量反应体系的荧光值。反应缓冲体系的pH值分别为3.6、5.0、6.0、7.0、8.0,以相应pH的底物以及病毒液作为空白对照组。

1.4 微生物代谢产物粗提物对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用

将157份细菌发酵液粗提物样品溶于50 μL二甲亚砜(DMSO)放置过夜,用缓冲液将样品按照

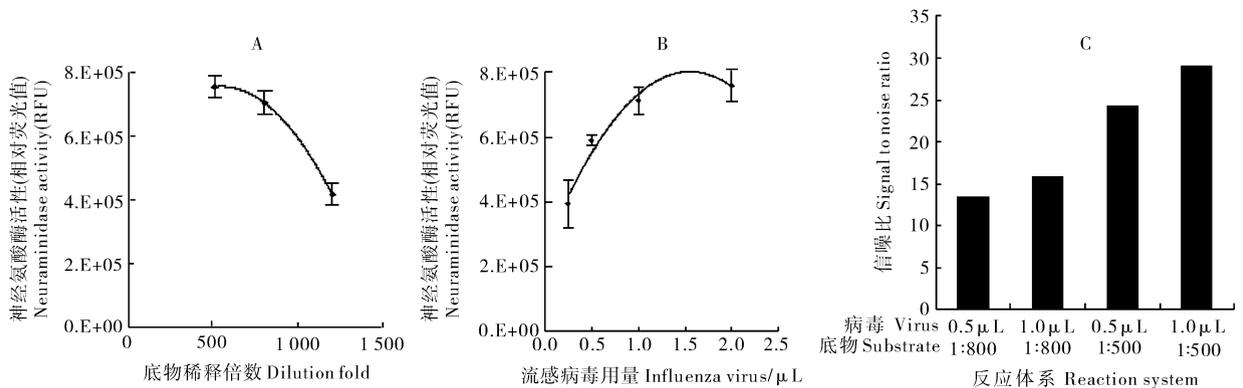


图1 病毒用量以及底物浓度对酶促反应的影响

Fig. 1 Effects of virus dosage and substrate concentrations on the neuraminidase enzymatic activity

A. 在反应体系其它条件不变的条件下固定病毒量(血凝效价为2⁹)为1 μL,底物MUNANA(5 mg/mL)分别按1:500、1:800、1:1200做梯度稀释 The assay contains 32.5 mmol/L MES, 4 mmol/L CaCl₂, 1 μL of virus solution, pH 6.0. The substrate MUNANA was diluted with buffer as follows, 1:500, 1:800 and 1:1200. The reaction was carried out at 37℃ and the incubation time was 90 min; B. 在反应体系其他条件不变的条件下固定底物量为7 μmol/L(1:500),病毒量分别为0.25、0.50、1.00、2.00 μL The same protocol as in A was performed besides that the concentration of substrate was 7 μmol/L and the volumes of the viruses changed from 0.25 μL to 2 μL; C. 病毒分别为0.5和1 μL,底物为1:500和1:800稀释时测量底物和病毒对反应体系的影响;信噪比 = F_{产物}/F_{本底}, F_{产物}为反应后测定值, F_{本底}为不加酶时的测定值。This assay was conducted to determine how different amounts of substrate and viruses affect neuraminidase activity. The diluted folds of substrate were 500 and 800, and the volumes of viruses used were 0.5 and 1 μL. The other components in the buffer system were not changed.

一定比例稀释,并加样 20 μL 。将病毒按照 1 : 20 稀释后加 20 μL 到加样孔中,室温下作用 10 min。加入 1 : 500 稀释的底物 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 90 min。加入终止液 100 μL , 终止酶促反应,于设定好的参数条件下读取反应体系的荧光值。以病毒和底物、底物、病毒及样品作对照。

2 结果与分析

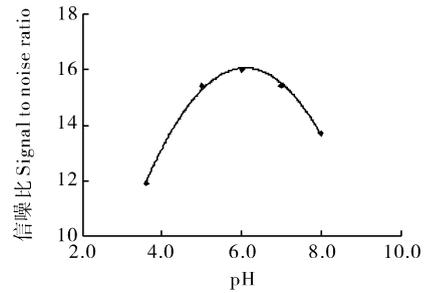
2.1 流感病毒神经氨酸酶抑制试验反应体系的优化

1) 病毒及底物用量的确定。鉴于反应产物在 365 nm 的激发光下能产生 450 nm 的荧光,未分解的底物在 315 nm 处能被激发,产生 374 nm 的荧光,故底物本身发出的荧光对测定结果有一定的干扰。底物荧光(本底)在酶反应产物荧光信号所占的比率与底物浓度密切相关,底物本底占测定信号比率反映底物对测定信号的干扰程度。为使干扰信号减小到最低,我们对底物与病毒的用量进行了优化,结果如图 1 所示,图 1-A 结果显示底物在 500 ~ 1 200 倍稀释时的荧光值逐渐降低,而图 1-B 病毒浓度为 1.5 μL 时,荧光值达到高峰。为确定最佳信噪比,并使反应处于最佳条件,分别选择了底物为 500 和 800 倍稀释、病毒用量为 1.0 和 0.5 μL 进行优化。结果(图 1-C)表明,在底物为 500 倍稀释、病毒量为 1 μL 时,信噪比最高。因此确定此酶促反应体系中最佳底物用量为 7 $\mu\text{mol/L}$ (即 1 : 500 稀释),病毒用量为 1 μL 病毒储存液。

2) 最佳反应 pH 的确定。神经氨酸酶是一种糖蛋白,其活性受溶液 pH 影响。当固定酶和底物用量而改变反应缓冲液的 pH 时,结果显示, pH 6.0 测量结果的信噪比最高(图 2),故反应缓冲体系的 pH 值选择 6.0。

2.2 大孔树脂吸附法与有机溶剂萃取法的比较

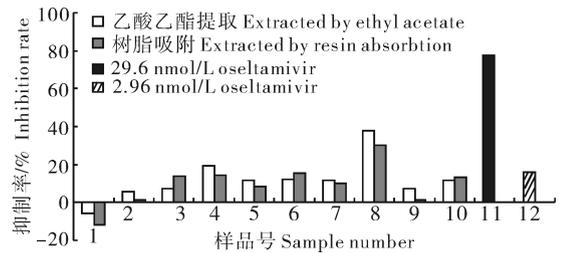
随机选取 10 种放线菌发酵液各 100 mL,用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液后于旋转蒸发仪中旋干,所得样品溶于 500 μL DMSO 中。取相同的 10 种发酵液各 3 mL,用已建立的提取方法提取,并将提取物溶解于 50 μL DMSO 中。将所制备的样品按照已确定的神经氨酸酶反应条件进行神经氨酸酶抑制活性检测。由图 3 可看出,大孔树脂吸附法得到的提取物抗病毒活性与乙酸乙酯提取物效果相当。



在反应体系其他条件不变时固定底物用量为 7 $\mu\text{mol/L}$,病毒量(血凝效价为 2^9)为 1 μL 时改变反应体系的 pH,分别在 pH 3.6、5.0、6.0、7.0、8.0 测量体系荧光值,并计算出信噪比。The reaction system contains 32.5 mmol MES, 4 mmol/L CaCl_2 , 7 μmol MUNANA, 1 μL of virus solution. The reaction was carried out at 37 $^{\circ}\text{C}$ and at different pH, 3.6, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0. The incubation time was 90 min. After the reaction is finished, the fluorescence was read on a plate reader (Envision of Perkin-Elmer).

图 2 pH 对流感病毒神经氨酸酶反应的影响

Fig. 2 The effects of pH on neuraminidase activity of influenza virus



将 10 份乙酸乙酯粗提物和 10 份大孔树脂提取物溶于 DMSO 中,各取 0.2 μL DMSO 溶解液进行神经氨酸酶抑制活性检测。The stock solution made from 20 extracts prepared through two different methods, acetoacetate extraction and macro-porous adsorption resin (AB-8 and ADS-17, 1 : 1) purification, were diluted 100 times before being used in fluorescent assays targeting neuraminidase.

图 3 大孔树脂吸附法与乙酸乙酯萃取法所得微生物代谢产物抗流感病毒神经氨酸酶活性的比较

Fig. 1 Comparison of anti-neuraminidase activities of extracts made from resin-purification method and ethyl acetate extraction method

2.3 大孔树脂吸附法所得微生物代谢产物抗流感病毒神经氨酸酶活性测定

由于样品本身可能具有一定的自发荧光,这会对测定结果产生影响,所以我们采用下列计算方法校正测量值以减少干扰因素对试验结果的影响:

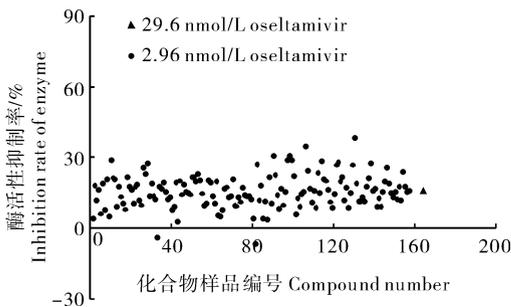
$$F_{\text{样}} = F_{\text{测量值}} - F_{\text{BL(样)}} + F_{\text{BLB}}$$

$$\text{抑制率} = 100\% - 100\% \times (F_{\text{样}} - F_{\text{BLS}}) / (F_{\text{PC}} - F_{\text{BLS}})$$

其中 $F_{\text{样}}$ 为加化合物样品时反应的实际应得

值, $F_{BL(样)}$ 为仅以样品作为对照时测得的荧光值, F_{BLB} 为以缓冲液作为对照组测得的荧光值, F_{PC} 为不加化合物样品的对照值, F_{BLS} 为以底物作为对照组测得的荧光值。

由图4可看出,与阳性对照药物 oseltamivir 比较,从细菌发酵液用大孔树脂吸附法提取制备的样品的神经氨酸酶抑制率都不高,这应该与样品中小分子化合物浓度较低有关,且还出现了一些负值,推测是由于样品的荧光本底值太高,掩盖了样品的神经氨酸酶抑制活性。此外,这157份样品的抑制率比较接近,应该与样品都是由同种属不同菌株发酵液中提取的有关,提示同种的不同菌株产生次生代谢产物的种类和浓度相似。



将157份提取物于50 μ L DMSO溶解过夜,取0.2 μ L DMSO溶解液用20 μ L缓冲液稀释,并按本文“1.4”中的反应体系进行神经氨酸酶抑制剂筛选试验 157 extracts were prepared by macro-porous adsorption resin (AB-8 and ADS-17, 1 : 1) purification, the extracts were dissolved in 50 μ L DMSO, and kept overnight at the room temperature to make sure the extracts were dissolved efficiently. 0.2 μ L of extract in DMSO was diluted in 20 μ L reaction buffer and was added to the neuraminidase inhibition assay system.

图4 大孔树脂吸附法所得微生物代谢产物对流感病毒神经氨酸酶活性的抑制作用

Fig. 4 Neuraminidase inhibition by 157 extracts prepared by resin adsorption method

3 讨论

3.1 微生物代谢产物中生物活性物质的提取

大孔吸附树脂具有强大的吸附能力、洗脱容易、机械强度高、抗污染能力强等优点,其孔径大小、比表面积、骨架密度、极性等性能都可以控制调节,并可以任意选择,可用于吸附各种小分子化合物。微生物次级代谢产物多为水溶性物质且含量低,用有机溶剂萃取无法有效地对其进行浓缩,用大孔吸附树脂的方法既可以对活性物质进行富集,同时又可以分离纯化,用少量的树脂就可以处理大量的

发酵液^[14-16]。本试验中采用了弱极性的大孔树脂 AB-8 与中等极性的 ADS-17 进行 1 : 1 混合对发酵液中的物质进行吸附,弱极性的 AB-8 可以吸附发酵液中弱极性物质,而中等极性的大孔树脂 ADS-17 可以吸附中等极性和极性物质。提取中使用的发酵液只有 3 mL,相对于有机溶剂提取(100~250 mL)来说,可以大大减少发酵过程中的所需的人力、物力、财力。洗脱液采用 50% 乙醇,用量少、成本低,且减少了有机溶剂对环境的污染。提取过程设备简单、操作简便,可以同时多种发酵液进行提取,在短时间内能得到大量的提取物,因此比有机溶剂提取法更适合高通量筛选具有抗病毒活性的菌株。

3.2 抗流感病毒药物的筛选

在对 157 种微生物代谢产物进行抗病毒活性筛选时,如果直接用发酵液来测量,由于发酵液中成分复杂,活性代谢物浓度低,测量结果无法分析判定,不具有筛选性。用有机溶剂提取费时费力,且需应用大量有机溶剂,提取效果不好。采用大孔吸附树脂吸附法提取后溶于有机溶剂 DMSO 的方法快速简便,有机溶剂用量少,适合于微生物代谢产物的高通量提取和制备。利用神经氨酸酶抑制试验筛选抗流感病毒药物时,化合物本身的自发荧光对测定结果仍然有一定的干扰,但可以通过设置恰当的对照对所得结果进行校正分析。该方法快速、简便易行,得到的粗提物具有可筛选性,随着该方法的不断应用和完善,将在高通量微生物来源药物的筛选和新药发现中有一定的应用前景。

参考文献

- [1] DEBBAB A, ALY A H, EDRADEBEL R, et al. Bioactive metabolites from the endophytic fungus stemphylium globuliferum isolated from mentha pulegium[J]. J Nat Prod, 2009, 72 (4): 626-631.
- [2] 杜冠华. 高通量药物筛选[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [3] 徐志红, 蒋志胜. 药物筛选新方法——高通量筛选[J]. 生物学通报, 2003, 38(3): 7.
- [4] 杜冠华. 高通量药物筛选技术进展与新药开发策略[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(1): 31.
- [5] 史继静, 焦新生, 刘朝奇. 高通量筛选在抗病毒药物筛选中的应用[J]. 生命的化学, 2008, 28(3): 339-342.
- [6] SZEKERES A, LEITGEB B, KREDICS L, et al. Peptaibols and related peptaibiotics of Trichoderma[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2005, 52(2): 137-168.

- [7] BEHAL V. Nontraditional microbial bioactive metabolites [J]. *Folia Microbiol*, 2010, 46(5):363-370.
- [8] DEMAIN A L. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry [J]. *Ciba Found Symp*, 1992, 171:3-23.
- [9] 曹鸿鹏, 陶佩珍, 杜冠华. 流感病毒神经氨酸酶抑制剂筛选模型的建立和应用[J]. *药学学报*, 2002, 37(12):930-933.
- [10] POTIER M, MAMLI E L, BELISLE M, et al. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic) substrate [J]. *Anal Biochem*, 1979, 94:287-296.
- [11] WETHERALL N T, TRIVEDI T, ZELLER J, et al. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(2):742-750.
- [12] NAYAK D P, REICHL U. Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus [J]. *J Virol Methods*, 2004, 122(1):9-15.
- [13] KALBFUSS B, KNOCHLIEN A, KROBER T, et al. Monitoring influenza virus content in vaccine production: precise assays for the quantitation of hemagglutination and neuraminidase activity [J]. *Biologicals*, 2008, 36(3):145-161.
- [14] 黎海彬, 李小梅. 大孔吸附树脂及其在天然产物研究中的应用 [J]. *广东化工*, 2005, 32(3):22-25.
- [15] 顾觉奋, 魏爱琳. 大孔网状吸附剂在微生物制药分离纯化上的应用 [J]. *离子交换与吸附*, 2002, 18(3):281-288.
- [16] 许月卿, 赵仁兴, 白天雄, 等. 树脂吸附法处理磺胺脒生产废水的工艺 [J]. *环境科学*, 2003, 24(6):139-143.

Rapid and High Throughput Extraction of Secondary Metabolites from Microorganisms Using Macro-Porous Adsorption Resin

WANG Jun-bo CAO Wen-tao

College of Chemical Engineering of Guizhou University, Guiyang 550003, China

Abstract Macro-porous adsorption resins, AB-8 and ADS-17, were used to extract small chemical molecules from bacterial fermentation liquid and the absorbed small molecules were eluted with 50% ethanol. The neuraminidase inhibition activities of the extracts were determined with a sensitive fluorometric assay using the substrate sodium (2'-O-4-methylumbelliferyl N-acetylneuraminic acid, MUNANA), the reaction was carried out at pH 6.0 and in the presence of 1.0 μ L of viral solution. The results showed that resin purification method is much better than using fermentation liquid directly. The small molecules can be greatly enriched and the amount of fermentation liquid required in resin purification method is much less than that of organic reagent extraction. Extracts of resin-purification method is equivalent to ethyl acetate extraction in activity against neuraminidase of influenza virus H1N1. But the cost of time and reagent is much less, indicating that the resin purification method is suitable for high throughput preparation of microbial metabolites.

Key words microbial metabolites; macro-porous adsorption resin; influenza virus; neuraminidase; high throughput screening

(责任编辑:张志钰)