

# 产辅酶 Q<sub>10</sub> 的类球红细菌原生质体制备和再生研究

宋丽雅<sup>1</sup>, 乔志新<sup>2</sup>, 李伟静<sup>2</sup>, 贺敏<sup>2</sup>, 赵华<sup>1</sup>, 于群<sup>2</sup>

1. 北京工商大学理学院, 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048
2. 军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850

**摘要** 辅酶 Q<sub>10</sub>(CoQ<sub>10</sub>)是人类细胞自身产生的内源性辅酶因子,是一类天然抗氧化剂,目前已广泛应用于医药、食品、化妆品等诸多领域。基因组改组技术的核心内容为原生质体融合,为了提高基因组改组的效率,提高辅酶 Q<sub>10</sub> 的产量,本研究对产辅酶 Q<sub>10</sub> 的类球红细菌原生质体制备及再生条件进行了优化,通过生长曲线、正交试验等确定了原生质体制备及再生的适宜条件:溶菌酶浓度 1mg/mL、作用温度 37℃、作用时间 1h 以及再生培养基蔗糖浓度 10%。在此条件下,类球红细菌原生质体形成率可达到 96.1%,再生率可达到 28.8%。这为进一步对该菌的基因组改组研究奠定了基础。

**关键词** 辅酶 Q<sub>10</sub>;类球红细菌;原生质体

中图分类号 Q939.9

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.34.003

## Protoplast Preparation and Regeneration of Coenzyme Q<sub>10</sub> Producing Strain *Rhodobacter sphaeroides*

SONG Liya<sup>1</sup>, QIAO Zhixin<sup>2</sup>, LI Weijing<sup>2</sup>, HE Min<sup>2</sup>, ZHAO Hua<sup>1</sup>, YU Qun<sup>2</sup>

1. Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, School of Science, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China
2. Beijing Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

**Abstract** Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) is an endogenous enzyme cofactor that may be found in every cell in the human body and an important natural antioxidant widely used in many fields, such as medicine, food and cosmetics. The protoplast fusion is an important process in the genome shuffling. In order to improve the efficiency of the genome shuffling and the CoQ<sub>10</sub> production, this paper studies the conditions of the protoplast preparation and the regeneration of CoQ<sub>10</sub> to produce the strain *Rhodobacter sphaeroides*. The parameters of the proper protoplast formation and the regeneration were determined through the growth curve and the orthogonal experiment: the lysozyme concentration is 1mg/mL, the enzymatic temperature is 37℃; the enzymatic time is 1h and the sucrose concentration is 10%, and under these conditions, the protoplast formation rate is 96.1% and the protoplast regeneration rate reaches 28.8%. Therefore, the optimized conditions of the protoplast preparation and the regeneration for the genome shuffling of *Rhodobacter sphaeroides* are obtained.

**Keywords** Coenzyme Q<sub>10</sub>; *Rhodobacter sphaeroides*; protoplast preparation and regeneration

### 0 引言

辅酶 Q<sub>10</sub>(Coenzyme Q<sub>10</sub>, CoQ<sub>10</sub>),又名泛醌、癸烯醌,其化学名称为:2,3-二甲氧基-5-甲基-6-癸烯基苯醌,是一种脂溶性醌类化合物。CoQ<sub>10</sub>广泛存在于动物、植物及微生物体内,

是生物细胞呼吸链中的重要递氢体,与 ATP 的形成息息相关,参与生物体内多种生理活动,具有保护和恢复生物膜结构的完整性、稳定膜电位和增强免疫反应等作用<sup>[1-3]</sup>。CoQ<sub>10</sub>广泛应用于医药、化妆品和保健品领域,用于心力衰竭、冠心

收稿日期:2012-07-09;修回日期:2012-09-28

基金项目:北京市科技计划项目(Z0005190043421);北京工商大学学科与研究生教育-化妆品科学与技术学科建设项目(PXM2012-014213-000068)

作者简介:宋丽雅,讲师,研究方向为生物育种与酶工程,电子邮箱:songly@th.btbu.edu.cn

病、高血压病、糖尿病、癌症、艾滋病、急慢性肝炎、帕金森症等多种疾病的辅助性治疗<sup>[4-7]</sup>。近年来的研究表明,口服 CoQ<sub>10</sub> 还能有效消除他汀类降血脂药物导致的横纹肌溶解等副作用<sup>[8]</sup>。

CoQ<sub>10</sub> 的生物合成途径非常复杂,并且其在原核和真核生物中的合成途径有所不同,但是均包括:对羟基苯甲酸的合成、聚异戊烯侧链的合成以及芳香环的修饰 3 部分<sup>[9]</sup>。目前,CoQ<sub>10</sub> 的制备方法主要有 3 种:动植物提取法、化学合成法和微生物发酵法。其中,微生物发酵法由于产物易于分离、活性好,被认为是最有前景的方法。获得优良的发酵菌株是微生物发酵法生产 CoQ<sub>10</sub> 的关键。自然界中有多种微生物可以产生 CoQ<sub>10</sub>, 包括土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等, 其中, 类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 中 CoQ<sub>10</sub> 含量较高,是产生 CoQ<sub>10</sub> 的理想菌株<sup>[10]</sup>。利用传统的物理、化学等诱变手段是优化菌种,提高 CoQ<sub>10</sub> 的产量的重要方法。

基因组改组技术是 Stemmer 等于 1998 年提出的一种微生物育种方法,它通过多个正突变体递进融合来进行基因组随机重组,快速筛选所需表型有重大改进的菌株,将改组的对象从单个基因扩展到整个基因组<sup>[11]</sup>。原生质体融合技术是基因组改组育种的核心内容,而原生质体的制备和再生则是原生质体融合的前提和重要步骤,因而本研究主要探讨了 CoQ<sub>10</sub> 的产生菌:类球红细菌原生质体的制备及再生的条件,以期类球红细菌的基因组改组研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*), 兼性厌氧菌,购自中国科学院微生物所中国普通微生物保藏管理中心。

#### 1.1.2 培养基

基础培养基(低渗培养基):牛肉膏 1.5g/L,葡萄糖 1.0g/L,酵母提取物 1.5g/L,胰蛋白胨 5.0g/L,NaCl 3.5g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 6.08g/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.32g/L,pH 值 7.0。以上培养基于 121℃,20min 高压灭菌。固体培养基中按照 1.5%—2.0%的比例加入琼脂粉。

再生固体培养基(高渗培养基):在基础培养基的基础上,添加不同浓度的蔗糖。

#### 1.1.3 主要试剂和缓冲液

SMM 缓冲液:蔗糖 0.5mol/L,MgCl<sub>2</sub> 0.02mol/L。调 pH 值为 7.0。121℃,20min 高压灭菌,于 4℃保存备用。

溶菌酶溶液:称取溶菌酶(Amresco)溶于 SMM 缓冲液,配制终浓度为 0.5—2mg/mL 的溶菌酶溶液,过滤除菌,于 4℃保存备用。

## 1.2 方法

### 1.2.1 生长曲线的测定

从 *Rhodobacter sphaeroides* 菌生长的平板中挑取单菌落

接入 10mL 液体培养基(基础培养基)中,置于恒温振荡培养摇床中培养,220r/min,30℃。将培养 20h 的菌液按照 2% 的接种量再次转接到多支装有 10mL 同样液体培养基的试管中。置于恒温振荡培养摇床中培养,30℃,220r/min。在一定时间间隔下,取样,检测不同时间生长的菌密度值(OD<sub>600</sub>)。

### 1.2.2 原生质体的制备与再生

将对数生长期的 *Rhodobacter sphaeroides* 菌液离心,6000r/min,5min,收集菌体。以 SMM 缓冲液洗涤菌体 2 次,使菌体保持高渗透压的状态。将洗涤后的菌体离心,收集沉淀(6000r/min,5min),再加入等体积配制好的不同浓度的溶菌酶溶液进行处理,混匀后于不同温度摇床中缓慢摇动(85r/min)。不同时间后,取菌液离心,6000r/min,5min。用 SMM 缓冲液洗涤沉淀 2 次。将洗涤后的菌体离心(6000r/min,5min),收集菌体,以等体积的 SMM 缓冲液重悬,分别以去离子水和 SMM 缓冲液稀释涂布于含有不同蔗糖浓度的再生平板上,以去离子水稀释的一组作为对照组。将上述平板置于 30℃ 恒温培养箱中进行培养,72h 后观察原生质体形成和再生情况。

### 1.2.3 计算公式

原生质体制备率(细胞破壁率,%)=(加酶前菌数-加酶后低渗平板菌数)/加酶前菌数×100%=(原生质体数/总菌数)×100%

原生质体再生率(%)=(加酶后高渗平板菌数-加酶后低渗平板菌数)/(加酶前菌数-加酶后低渗平板菌数)×100%=(再生菌落数/原生质体数)×100%

### 1.2.4 原生质体制备的正交设计

确定原生质体形成和再生中重要的 4 个条件和 3 个水平(表 1),进行 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验。

表 1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交设计表

Table 1 Orthogonal design of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)

因素	蔗糖浓度 /%	溶菌酶作用 时间/h	溶菌酶作用 温度/℃	溶菌酶浓度 /(mg·mL <sup>-1</sup> )
水平 1	7.5	2	30	0.5
水平 2	10.0	4	34	1.0
水平 3	12.5	6	37	2.0

## 2 结果与分析

### 2.1 生长曲线的测定

研究表明,原生质体融合细胞的敏感期为对数生长期<sup>[12-13]</sup>,因此本研究首先测定类球红细菌的生长曲线。将类球红细菌进行液体培养,不同时间取样,检测样品 OD<sub>600</sub> 值,绘制生长曲线,如图 1 所示,*Rhodobacter sphaeroides* 菌在接种后 5—15h 进入对数生长期,15h 开始进入平台期,所以本研究选定接种后 10h 作为制备原生质体的时间。

### 2.2 类球红细菌原生质体形成率与再生率的正交试验结果

原生质体制备的关键在于微生物细胞壁的溶解,因而用

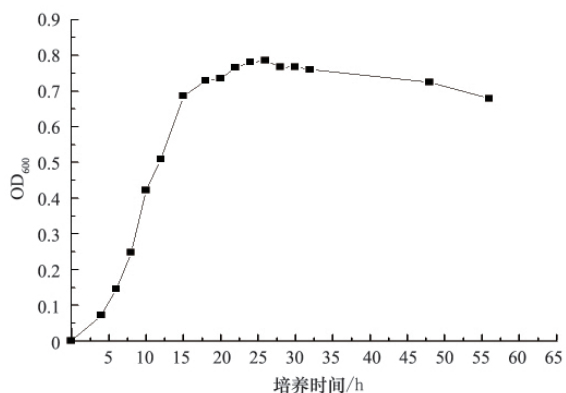


图1 类球红细菌生长曲线

Fig. 1 The growth curve of *Rhodobacter sphaeroides*

于微生物破壁的酶、酶作用的时间以及酶作用的温度对于原生质体的形成至关重要。溶菌酶对于细菌的细胞壁有较好地溶解作用,所以本研究采用溶菌酶作为破壁酶。除了酶的影响之外,再生培养基中蔗糖的浓度也会影响原生质体的再生状况。综合上述因素,本研究选择了再生培养基中蔗糖的浓

度、溶菌酶作用时间、溶菌酶作用温度以及溶菌酶浓度4个因素进行4因素3水平的 $L_9(3^4)$ 正交试验,考查 *Rhodobacter sphaeroides* 菌原生质体的形成率与再生率。

表2显示了原生质体形成率和再生率的正交试验结果,由结果可知,几个因素对于原生质体的形成率影响均不是很大,由高到低分别为:溶菌酶作用温度>溶菌酶作用时间>溶菌酶浓度>蔗糖浓度。其最优组合为:酶作用时间2h,温度37℃,溶菌酶浓度0.5mg/mL。由原生质体再生率的试验结果可知,4个因素中,溶菌酶作用时间、溶菌酶作用温度和溶菌酶浓度均对原生质体的再生率有较大影响,其影响由高到低分别为:溶菌酶作用温度>溶菌酶作用时间>溶菌酶浓度>蔗糖浓度。随着时间的延长和酶作用温度的增加,原生质体形成率不断下降,最佳组合为:蔗糖浓度10%,酶作用时间2h,温度30℃,溶菌酶浓度2.0mg/mL。表2的结果还表明,原生质体形成与再生的最佳条件有所不同,但是4个因素中,影响最大的因素均为温度与酶作用时间,因此确定对二因素进行进一步实验,以探讨对原生质体融合及再生均有利的条件。而溶菌酶浓度二者结果相反,因而取中间值1mg/mL,蔗糖浓

表2  $L_9(3^4)$ 正交实验结果( $n=3$ )Table 2 The results of  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment ( $n=3$ )

试验号	因素				原生质体形成率/%	再生菌落数	总菌落数	原生质体再生率/%
	蔗糖浓度/%	溶菌酶作用时间/h	溶菌酶作用温度/℃	溶菌酶浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )				
1	7.5	2	30	0.5	99.33	173±15	610±53	28.36
2	7.5	4	34	1.0	98.00	147±17	640±31	22.96
3	7.5	6	37	2.0	100.00	66±11	600±27	11.00
4	10.0	2	34	2.0	99.67	175±21	605±41	28.93
5	10.0	4	37	0.5	100.00	73±9	600±67	12.17
6	10.0	6	30	1.0	98.67	159±22	658±41	24.16
7	12.5	2	37	1.0	100.00	104±14	600±21	17.33
8	12.5	4	30	2.0	93.33	246±17	669±59	36.77
9	12.5	6	34	0.5	99.83	50±4	611±47	8.18

度取10%。

### 2.3 酶作用时间和温度对类球红细菌原生质体形成和再生的影响

在上述正交试验的基础上,进一步研究了对原生质体形成与再生影响最大的酶作用时间与温度试验,选取酶作用时间分别为1,2,3,4,5h,作用温度分别为30℃和37℃。结果表明,无论30℃还是37℃条件下,原生质体形成率均随着酶作用时间的延长不断降低,与前面正交试验结果一致;30℃时,原生质体的再生率先随时间的延长而下降,3h后随时间延长又开始升高;37℃时,原生质体再生率在5h内,随着时间的延长而不断降低;溶菌酶在37℃作用1h效果最好(表3)。由此确定了原生质体形成与再生的适宜条件:以1mg/mL溶菌酶于37℃作用1h,再以10%蔗糖配制的再生固体培养基进行原

表3 酶作用时间和温度对类球红细菌原生质体形成和再生的影响

Table 3 Effects of time and temperature on protoplast preparation and regeneration of *Rhodobacter sphaeroides*

溶菌酶作用时间/h	30℃		37℃	
	原生质体形成率/%	原生质体再生率/%	原生质体形成率/%	原生质体再生率/%
1	93.7	28.9	96.1	28.8
2	93.5	25.5	91.4	25.2
3	92.5	16.4	91.2	23.7
4	92.7	18.3	90.6	15.5
5	89.9	25.6	90.2	11.1

生质体再生。此条件下,原生质体形成率可达 96.1%,再生率可达 28.8%。

### 3 讨论

光合细菌是一类能进行光合作用而不产氧的特殊生理类群原核生物的总称。此类细菌种类繁多,生长情况不尽相同,其原生质体的制备与再生条件也各异。刘勇等<sup>[14]</sup>研究了 5 种光合细菌原生质体的形成与再生,发现一定条件下其形成与再生率各不相同,在 1mg/mL 溶菌酶条件下,嗜酸红假单胞菌原生质体形成率最低,为 52%,但其再生率可达到 45%;陈婕等<sup>[12]</sup>的研究表明,温度与时间也是影响耐盐荚膜红假单胞菌原生质体形成与再生的重要因素,其优化后的最佳条件为:温度 37℃、破壁溶菌酶量 1.0mg/mL、作用时间 3h,此条件下,其破壁率达 99.86%,再生率达 13.64%。因而针对不同光合细菌菌株,会有不同的原生质体形成适宜的条件。

类球红细菌是一类光合细菌,生长较快,接种后 5h 即可进入对数生长期。溶菌酶对该菌的破壁效果较好,1mg/mL 溶菌酶作用 1h 原生质体形成率即可达到 90%以上,但是其再生率不是很高,只能达到 20%—30%。原生质体形成与再生的最佳条件并不一致,需要研究者在其中找到兼顾二者的条件。本研究的实验结果表明,类球红细菌原生质体形成与再生的较为适宜的条件为:溶菌酶浓度 1mg/mL,酶作用温度 37℃,作用时间 1h,蔗糖浓度 10%,与陈婕等<sup>[12]</sup>的研究结果较为一致。此条件下,原生质体形成率可达 96.1%,再生率可达 28.8%。这为下一步对该菌的基因组改组研究奠定了基础。

### 4 结论

类球红细菌原生质体形成与再生的适宜条件为:溶菌酶浓度 1mg/mL,酶作用温度 37℃,作用时间 1h,蔗糖浓度 10%,此条件下,原生质体形成率可达 96.1%,再生率可达 28.8%。

#### 参考文献 (References)

[1] Leonard B, Maes M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012, 36(2): 764–

785.

- [2] Zhu J. Simultaneous reduction of iron-sulfur protein and Cytochrome b (L) during ubiquinol oxidation in Cytochrome bc1 complex [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104(12): 4864–4869.
- [3] Ingledew W J, Poole R K. The respiratory chains of *Escherichia coli* [J]. *Microbiol Rev*, 1984, 48(3): 222–271.
- [4] Cordero M D, Cotán D, Del-Pozo-Martín Y, et al. Oral coenzyme Q<sub>10</sub> supplementation improves clinical symptoms and recovers pathologic alterations in blood mononuclear cells in a fibromyalgia patient [J]. *Nutrition*, 2012, 28(11–12): 1200–1203.
- [5] Greenlee H, Shaw J, Lau Y K, et al. Lack of effect of coenzyme q<sub>10</sub> on Doxorubicin cytotoxicity in breast cancer cell cultures [J]. *Integr Cancer Ther*, 2012, 11(3): 243–250.
- [6] Jankovic J, Poewe W. Therapies in Parkinson's disease [J]. *Curr Opin Neurol*, 2012, 25(4): 433–447.
- [7] Quinzii C M, Hirano M. Primary and secondary CoQ (10) deficiencies in humans[J]. *Biofactors*, 2011, 37(5): 361–365.
- [8] Littarru G P, Langsjoen P. Coenzyme Q<sub>10</sub> and statins: biochemical and clinical implications[J]. *Mitochondrion*, 2007, 7(S1): S168–S174.
- [9] Choi J, Ryu Y, Seo J. Biotechnological production and applications of coenzyme Q<sub>10</sub>[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(1): 9–15.
- [10] 林丹枫, 李力, 柯崇榕, 等. 辅酶 Q<sub>10</sub> 的生物合成及其高表达研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2012, 23(3): 465–469.  
Lin Danfeng, Li Li, Ke Chongrong, et al. *Letters in Biotechnology*, 2012, 23(3): 465–469.
- [11] 陈涛, 陈海, 王靖宇, 等. DNA 及基因组改组在代谢工程中的应用 [J]. 化工学报, 2004, 55(11): 1753–1758.  
Chen Tao, Chen Xun, Wang Jingyu, et al. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2004, 55(11): 1753–1758.
- [12] 陈婕, 邱宏端, 林娟, 等. 光合细菌与嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体制备的条件研究[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2007, 35(2): 318–320.  
Chen Jie, Qiu Hongduan, Lin Juan, et al. *Journal of Fuzhou University: Natural Science Edition*, 2007, 35(2): 318–320.
- [13] 毛雨, 王丹, 李强, 等. 产琥珀酸放线杆菌的原生质体制备与再生[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(6): 103–108.  
Mao Yu, Wang Dan, Li Qiang, et al. *China Biotechnology*, 2010, 30(6): 103–108.
- [14] 刘勇, 张德咏, 谭新球, 等. 5 种光合细菌种间原生质体融合及优良农用融合子的筛选鉴定[J]. 生命科学研究, 2004, 8(4): 344–350.  
Liu Yong, Zhang Deyong, Tan Xinqiu, et al. *Life Science Research*, 2004, 8(4): 344–350.

(责任编辑 吴晓丽)

#### 《科技导报》“卷首语”栏目征稿

“卷首语”栏目每期邀请一位中国科学院院士和中国工程院院士就重大科技现象、事件,以及学科发展趋势、科学研究热点和前沿问题等,撰文发表个人的见解、意见和评论。本栏目欢迎院士投稿,每篇文章约 2000 字,同时请提供作者学术简历、工作照和签名电子文档。投稿邮箱:kjdbbjb@cast.org.cn。