文章编号：1009－038X(2003)04－0083－05

用于育种的结构类似物的计算机辅助选择

李秀敏， 姜绪林， 杨 毅， 张星元
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214036)

摘 要：借助于计算机，对已成功地用于菌种筛选的一些结构类似物及它们对应的化合物的三维空间结构的相似性和使用效果，分别进行了测试和比较. 介绍了使用 ACD labs 软件包为菌种选育选用合适的结构类似物的方法.

关键词：结构类似物；微生物育种；计算机辅助选择
中图分类号：TP 391.7 **文献标识码**：A

Computer Aided Selection of Analogues for Screening Improved Mutant Strains

LI Xiu-min， JIANG Xu-lin， YANG Yi， ZHANG Xing-yuan
(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: It is of great importance to select suitable analogues when breeding. It is possible to know three-dimensional structure of analogues by using the software——ACD labs. In this article, the three-dimensional structure of many analogues used before was compared and analysed respectively with the actual compounds, and computer-aided selection of suitable analogues was briefly introduced.

Key words: analogues; breeding; computer-aided selection

“常规诱变—定向筛选”是选育菌种(高产突变株)的一种重要手段. 因为常规诱变的方向不定，所以要靠‘筛子’来定向. 结构类似物是最常用的筛分工具. 作者运用 ACD labs 软件包分别比较了作者所在实验室在氨基酸、维生素、抗生素高产菌选育过程中所使用的结构类似物与对应的代谢中间产物的三维空间结构，以及结构类似物作为‘筛子’用于定向筛选的效果. 在此基础上讨论了使用 ACD labs 软件包为‘常规诱变—定向筛选’育种选用合适的结构类似物的方法及其应用前景.

1 方法及其使用的相关化合物

1.1 化学物质立体结构的确定

ACD labs 软件包是高级化学软件开发公司(Advanced Chemistry Development Inc. 简称 ACD)的网站 www. acdlabs. com 下载的 ACD/ChemSketch 3.5软件包，安装后在程序菜单显示 ChemSketch 3.5(化学草图)和 3D(三维空间图)两部分. ACD/ChemSketch 是该公司设计的软件包，有如下主要功能：(1)用于绘制化合物的化学结构式并测算它们的性质(结构模式)；(2)用于文本和图象处理(绘图模式)；(3)对以下性质进行估算(所绘分子

收稿日期：2003－04－01； 修回日期：2003－05－18.
作者简介：李秀敏(1979－)，女，山东聊城人，发酵工程硕士研究生.

万方数据

式状态栏）相对分子质量，百分组成，摩尔折射率，摩尔体积，等张比容，折射率 ，表面张力，密度，介电常数，极性等. 作者主要使用与化学结构式和三维立体结构有关的部分.

运行 Chemsketch，在画图模式下选择合适的模板，在画图区单击鼠标左键，然后转移到结构模式，在已有的模板上进行原子或基团的添加或替换，直到最后得到目标分子为止；然后运行 3D，在 Chemsketch 窗口的左下角，单击 Copy to 3D，3D 窗口就会出现对应化学结构式的立体结构，最后 3D 会对该结构进行最优化，得到与想要的分子最接近的立体结构模型；单击相应的快捷键，在该窗口的最下端就会显示此分子的结构参数.

1.2 相关化合物

1.2.1 结构类似物

中英文名称对照	英文缩写
S -(2-氨乙基)-L-半胱氨酸(S-aminoethylcysteine)	AEC
D,L-1,2,4-三唑-3-丙氨酸(D,L-triazol-3-alanine)	TRA
L-天冬氨酸氧肟酸盐(L-aspartic Acid β-hydroxamate)	L-AAH
2-噻唑丙氨酸(2-thiazolyl-alanine)	TA
S-甲基半胱氨酸(S-methyl cysteine)	MC
磷霉素(fosfomycin)	FOM

1.2.2 目的产物对应的结构类似物

L-赖氨酸(L-lysine)	AEC
L-组氨酸(L-histidine)	TRA,TA
L-天冬氨酸(L-aspartic acid)	L-AAH
L-缬氨酸(L-valine)	TA
L-脯氨酸(L-proline)	MC
腺嘌呤核苷(adenine nucleotide)	杀结核菌素
庆大霉素 Cla(gentamicin Cla)	PEP

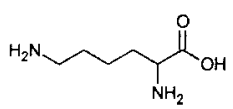
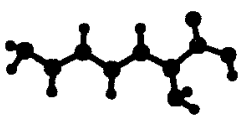
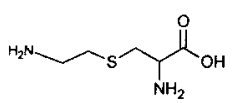
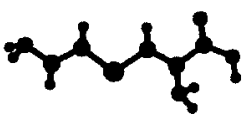
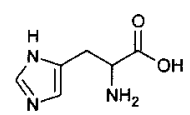
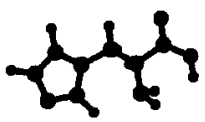
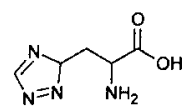
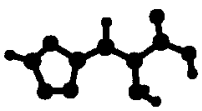
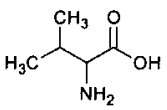
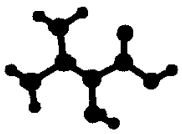
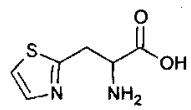
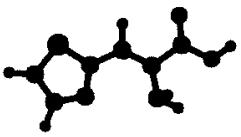
2 结果和讨论

2.1 结构类似物与对应代谢物结构比较

结构类似物与对应代谢物结构比较见表 1.

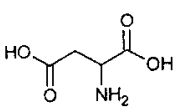
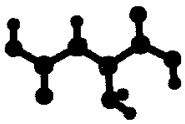
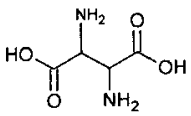
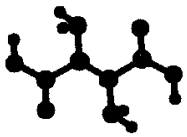
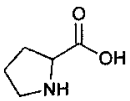
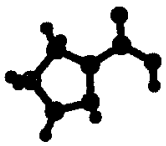
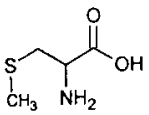
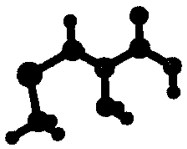
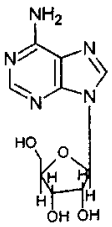
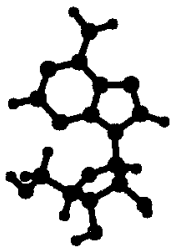
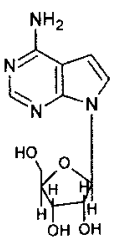
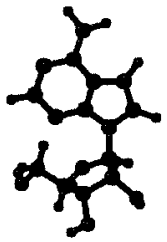
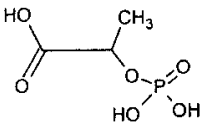
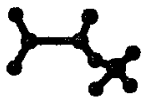
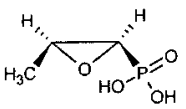
表 1 结构类似物与对应代谢物结构比较

Tab.1 The structural difference between metabolites and their analogues

名称	结构式	立体构象	结构比较
Lys			
AEC			除了图中所示的键角有微小差别外，其余部分基本相同. S 原子替代了 Lys 中相应的 C 原子，使键角缩小了约 4 °. ★★★*
His			
TRA			对应环中 N 原子的个数造成了 His 和 TRA 结构的主要区别，使图示的键角缩小了约 15 °. ★★
Val			虽然 TA 有噻唑环，但是和 TA 对应部分的结构参数仍基本相同. ★★
TA			

万方数据

续表 1

名称	结构式	立体构象	结构比较
Asp			只有一个碳原子上连接的基团不一样，Asp 中连的 H 原子被 L-AAH 中的氨基取代 . ★★
L-AAH			
Pro			主要是 Pro 存在一个五元环，而 MC 则没有形成环，而且从图中可以看出二者分子立体形状有重大差异 . ★
MC			
腺嘌呤核苷			腺嘌呤核苷嘌呤环上的 N 原子被杀结核菌素的一个 C 原子取代 . 除此之外，没有多大差别 . ★★★
杀结核菌素			
PEP**			PEP 中有羧基相连，磷酸根通过 O 原子与 C 原子相连，而且未形成环 . FOM 形成三元环，磷酸根与三元环直接相连 . ★
FOM**			

注 :* 相似程度以★表示,★个数越多,表示两分子越相似 ;* * 本软件对含有磷原子的结构不能优化 .

2.2　运用结构类似物育种结果

张星元[1] 于 1981 年筛选赖氨酸高产菌时,发现添加了 AEC^r 的突变株的赖氨酸产量是出发菌株的赖氨酸产量的 17 倍 . 潘军华[2] 于 2001 年通过筛选 TRA^r 株使原来不产组氨酸的出发菌株的组氨酸产量达 2.10 g/L . 熊筱晶等[3] 通过实验室研究工作,得到具有 $D\text{-}Arg^r$ 和 MC^r 遗传标记的突变株,其精氨酸产量提高了 100% . 作者于 2002 年进行缬氨

万方数据

酸菌种选育工作,得到对缬氨酸结构类似物 2-TA 具有抗性和对 L-Asp 结构类似物 L-AAH 超敏的突变株,使其缬氨酸产量分别提高 0.98 倍和 1.45 倍.

结构类似物除了对氨基酸育种工作具有极其重要的意义外,在各种菌种选育工作中都得到了广泛应用.张星元、王琴等[4]于 1997 年选育阿舒假囊酵母的杀结核菌素抗性突变株使核黄素产量提高了 10%.杀结核菌素是腺嘌呤核苷的结构类似物,腺嘌呤核苷是核黄素合成的前体.张星元、范铭琦等[5]在选育庆大霉素 Cla 高产菌时,筛选 FOM 超敏突变株,减少合成细胞壁的代谢流,从而使庆大霉素 Cla 效价提高 75%～101%.

2.3 讨 论

2.3.1 结构类似物 结构类似物是指某些与指定代谢中间产物或合成代谢途径的终产物空间结构相似而代谢性能(指分解代谢和合成代谢)不同的化合物.由于空间结构上相似,它们可以分别代替酶的底物、膜上载体蛋白的输送物、变构蛋白的效应物、特殊的蛋白质激活物、电子传递链中的氢载体等与对应的酶、载体、变构蛋白、受体蛋白等相结合.又由于它们的代谢性能与它们各自对应的物质不同,它们的存在会干扰细胞的正常代谢,起代谢拮抗作用,故有代谢拮抗物(metabolic antagonist)和抗代谢物(anti-metabolite)之称.

结构类似物作为筛分工具可以制备两类“筛子”.其一用来筛选对结构类似物耐受性变得更高的突变株,即用来筛分结构类似物抗性突变株的“筛子”;其二用来筛选耐受性变低了的突变株,即用来筛分结构类似物超敏突变株的“筛子”.

选育对结构类似物耐受性发生了变化的突变株是育种工作的重要步骤.用结构类似物抗性突变株的“筛子”筛分出来的突变株,是具有结构类似物抗性表型的突变株,其中包含两种可能与高产有关的突变株,一种是调节突变株,另一种是输送体系缺损突变株.用结构类似物超敏突变株的“筛子”筛分出来的突变株,是具有结构类似物超敏性表型的突变株,这种超敏性是与生长有密切关系的酶的欠损突变的表征.抗生素一般是指由微生物合成的具抗生功能的化学物质,不同类型的抗生素在结构上的差别很大,它们中有许多分别是某一些营养因子(如氨基酸、维生素、嘌呤、嘧啶)、代谢中间产物和一些生物大分子的结构类似物.如青霉素是 D-Ala-D-Ala 的潜在的结构类似物,磷霉素是 PEP 的结构类似物,嘌呤霉素是腺嘌呤核苷酸的结构类似物.此外,还有一些抑制能量代谢的抗生素(包括 CoQ 的结构类似物).

2.3.2 结构类似物与代谢物的相似程度与育种效果的关系 由表 2,3 可以看出,结构类似物与其代谢物之间结构越相似,对筛选高产菌越有利.

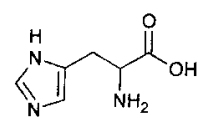
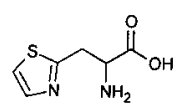
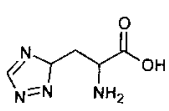
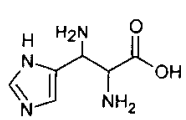
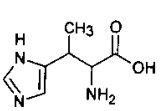
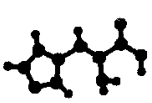
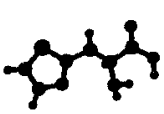
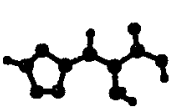
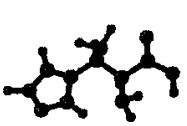
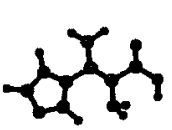
表 2 结构类似物与代谢物的相似程度与目的产物提高率

Tab.2 Degree of similarity and improved level of products

结构类似物与代谢物	结构相似度	目的产物提高率/%
Lys 和 AEC	★★★	1700
Val 和 TA	★★	325
Asp 和 L-AAH	★★	76
His 和 TRA	★★	0～21
Pro 和 MC	★	100
FOM 和 PEP	★	75～101
杀结核菌素和腺嘌呤核苷	★	10

表 3 组氨酸结构类似物与代谢物的相似程度与育种效果的关系

Tab.3 Degree of similarity of analogues to histidine and the improved level of histidine produced

His 结构类似物	TA	TRA	HH	二甲基组氨酸
				
				
相似度	★★	★★	★	★
组氨酸产量/(g/L)	12[6]	11[7]		

万方数据

(下转第 90 页)

2.5.3 微生物指标 细菌总数：≤100 个/mL，大肠菌群：100 mL≤6 个 致病菌未检出.

3 结 论

1）玉米乳酸饮料产品的适口性与糖酸比和 pH 值有直接关系. pH 值以 3.8～4.2 为宜，含糖质量分数以 10% 为最佳.

2）玉米较难液化，本试验采用三段液化法，取得了较好的效果.

3）玉米乳酸饮料加入一定量的稳定剂，可提高饮料的粘度，防止出现分层现象；通过加入质量分数 0.05% 的耐酸 CMC、0.04% 的淀粉磷酸酯和 0.04% 的蔗糖酯效果最佳.

4）由于难以适应玉米浆的生长环境，逐步驯化实验中当玉米浆和牛奶的比例为体积比 14∶6 时，乳酸菌正常生长，低于这个比例则无法正常生长.

参考文献：

[1] Marion Bennion. The Science of Food[M]. San Francisco：Harpaer&publichers，1980.280.
[2] 陈兴才. 玉米乳的加工工艺优化设计[J]. 福州大学学报(自然科学版)，1997，(4)：115－117.
[3] 郭本恒. 乳制品[M]. 北京：化学工业出版社，2001.
[4] 庞钦. 以酒糟为基质的乳酸生产菌的选育及发酵的研究[J]. 酿酒，2001，(1)：62－64.
[5] 张力田. 淀粉糖[M]. 北京：轻工业出版社，1988.157－164.
[6] 杨洋. 玉米饮料加工流程主要控制工艺条件探讨[J]. 食品科学，1998，(3)：32－33.

(责任编辑 杨 勇)

(上接第 86 页)

阐明相应代谢物的三维空间结构，寻找其结构最为相近的结构类似物，是选育高产菌的一个极为重要的步骤. 应用 ACD labs 的 chemsketch 软件绘制出代谢物及其结构类似物的化学结构式，并运用 3D 程序进行最优设计，立体构象的键角、键长等许多结构参数都可以通过 3D 程序计算得到. 由此，代谢物及其结构类似物的立体结构都清晰明了.

参考文献：

[1] 张星元. 赖氨酸菌种选育机理的研究[D]. 无锡：无锡轻工业学院，1981.
[2] 潘军华. 北京棒杆菌过量合成 L-组氨酸的代谢设计与流量分析[D]. 无锡：江南大学，2002.
[3] 熊筱晶. L-精氨酸高产菌的诱变育种及其摇瓶产酸条件[J]. 无锡轻工大学学报，2003，22(2)：10－13.
[4] 张星元，王琴. 阿舒假囊酵母过量合成核黄素性能的改良[J]. 无锡轻工大学学报，1997，16(3)：14－19.
[5] 范铭琦，张星元. 庆大霉素 Cla 高产菌株推理育种的研究[J]. 中国抗生素杂志. 1998，23(6)：410－414.
[6] Sugiura M，Kisumi M. Stabilization of a histidine-producing strain of serratia marcescens[J]. **Appl Environ Microbiol**，1984 (48)：43－49.
[7] Araki K. Studies on histidine fermentation part I. L-Histidine production by histidine analog-resistant mutants from several bacteria[J]. **Agric Biol Chem**，1971，(35)：2081－2086.

(责任编辑 朱 明)

万方数据