

海洋学院实习总结报告（教师版）



指导教师： 章春芳、林璐

年级： 2014 级

专业： 海洋生物

课程名称： 科研实习

时 间： 2017 年 7 月

目录

目录

1. 实习的组织与安排.....	3
1.1 实习组织概况.....	3
1.2 实习总体安排.....	3
2. 实习管理.....	3
2.1 实习单位和联系人.....	3
3. 实习过程管理.....	4
3.1 各实习单位实习内容与过程管理.....	4
3.2 成绩构成和评定方式.....	5
4. 实习取得的成果.....	5
4.1 总体情况.....	5
4.2 心得体会.....	6
4.3 指导教师评价.....	6
4.4 优秀实习周记.....	7
4.5 优秀实习总结.....	8
5. 问题和建议.....	8
5.1 存在的问题.....	8
5.2 建议.....	8
6. 附件.....	8
附件 01: 实习计划与安排.....	8
附件 02: 实习要求.....	9
附件 03: 优秀实习周记.....	10
附件 04: 优秀实习总结.....	11

1.实习的组织与安排

1.1 实习组织概况

实习安排在浙江大学海洋学院，依托学院现有设备和材料进行科研实习过程。学生在暑期实习中，需结合理论知识、了解一些实验设计思路，掌握所实习的实验技能。还应进行一些必要的文献阅读，提高科研素养。实习期间学生应定期主动向指导教师汇报实习情况。实习期间学生应严格遵守实习实验室的规章制度和工作纪律，不迟到早退。

1.2 实习总体安排

实习安排在2017年7月份。为期两周。

第1天，介绍实验安排及要求，向学生介绍可选的实习课题，熟悉实习实验室的人员仪器，督促写好实验计划。

第2天，对每个学生的课题计划进行修改，让学生与对应课题高年级研究生对接，保证学生顺利进入实习。

第3-13天，学生正式进入实验室实习，每天进行试验进展汇报。并与学生讨论修正实验实习内容。

第14天，进行试验结果总结和展示，写好实习汇报。

2.实习管理

2.1 实习单位和联系人

实习单位：浙江大学海洋学院 海洋生物所

联系人：章春芳 海洋生物所

林璐 海洋生物所

3.实习过程管理

3.1 各实习单位实习内容与过程管理

实习内容（可选方向）

1、不同培养条件对某种海洋放线菌的代谢影响

①对一株来自海洋的放线菌487 进行不同培养基培养，用大孔树脂和乙酸乙酯萃取后，过凝胶柱分离，最后通过HPLC鉴定。

②探究海洋放线菌ZS-A45在不同固体培养基中次级代谢产物种类与液体培养基中的差异。

2、检测一组放线菌代谢产物粗提物的癌细胞抑制率。

检测已经提取好的放线菌代谢产物粗提物对癌细胞的抑制率，检测癌细胞为HAM S/F-12前列腺癌细胞和P2(SW620)结肠癌细胞。

3、玉米蛋白粉辐射前后蛋白分子量的变化的研究

聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法检测评估玉米蛋白分子量辐射前后的变化。

4、微生物的常见分子操作

真菌*Aspergillus nidulans*的DNA基因组提取和电泳实验以及PCR引物的设计。

5、海洋微生物来源的化合物抗肿瘤活性检测

主要使用HAM S/F-12前列腺癌细胞和P2(SW620)结肠癌细胞来检测一组放线菌代谢产物粗提物的癌细胞抑制率从而用于后续挑选活性强的组分进行细分离；另一组检测纯化产物的各抑制效果与IC50。

过程管理

1、在实习过程中每天打卡实习，确保学生的实习时间。

2、每天上交检查实习日志，保证学生的实习进度。

3、实行“师徒制”，给每个学生安排对应课题的研究生，使学生尽快进入实习内容，同时使学生的实习能得到实时快速的指导。另外，老师每天与学生交流沟通，及时解决实习中出现的问题。这样通过老师和学长的两重管理，保证学

生的实习质量。

3.2 成绩构成和评定方式

项目及分值	内容要求	评定方式
实习态度 (20)	自觉遵守实习实验室的各项规章制度，不迟到、早退；服从实习指导教师和领导安排，积极主动，责任心强，谦虚谨慎，能处理好团队关系。	实验室组员评分
实习报告和实习日志 (50)	实习报告与实习日志是实习的重要成果之一。是实习生的实习体会、心得与感悟。因此，实习报告内容应当具体，规范，严谨，理论与实践应结合密切。实习报告撰写应符合学院要求规范。	根据上交实习报告和实习日志，教师评定结合组员互评。
实验技能和科研思维 (30)	对于实验室实习，因其一定的特殊性。实验基本技能的熟练掌握，以及科研思维的培养显得尤为重要。要求学生拥有基本的科研思维，学会科研中思考问题，解决问题。	教师评分

4.实习取得的成果

4.1 总体情况

学生都能遵守实验室的规范和制度，不迟到不早退，按时完成实习内容，熟练掌握要求的各项实验技能。

更可贵的是，这次实习培养了学生团队合作精神。此次实习学生通过阅读文献资料，提出问题解决问题，积极讨论，将理论联系实践，培养了学生基本的科研素养和能力。

另外，此次实习过程中，不断出现实验中的问题，解决问题。学生的表现获得了认可，增强了自信，产生了内在的动力，感受到科研实习的魅力，增加了学

生学习科研的兴趣。

4.2 心得体会

转眼间两周的实习不知不觉就结束了，回首实习过程，亦有颇多感悟。第一，提前安排和准备尤其重要。实习时间非常紧凑，如何让学生尽快有序的进入实习过程非常重要。这就需要老师做好提前的准备，把每项工作安排到天，方便学生尽快进入实习。第二，严格要求，俗话说严师出高徒，对学生的严格要求能让学生更有效的完成实习内容。每天要求学生汇报讨论，积极思考，虽然刚开始学生们有点不适应，但到后来学生们真正学习到了知识和技能，便都感觉付出的都是值得的。第三，开放的讨论环境。在刚进入实习期间有些学生会存在不好意思询问讨论的情况。在实习期间安排制定研究生对接每一个学生，让学生更好更快的融入环境，并能积极的和学长老师们进行讨论。

4.3 指导教师评价

此次实习过程中几位同学的表现都很好。

黄昀同学谦虚谨慎，勤奋好学。注重理论和实践相结合，将大学所学的课堂知识能有效地运用于实际实验中，对于别人提出的工作建议，可以虚心听取。表现出较强的求知欲，并能够仔细观察、切身体验、独立思考、综合分析，灵活运用自己的知识解决工作中遇到的实际困难。

陈芋宏同学在实习前就主动了解实习内容，提前采样分菌，到分离鉴定的内容，积极性非常高。做事踏实，严谨。知其然还要知其所以然，探知精神可嘉。

叶童瑶同学待人诚恳，作风朴实。实习期间，能与实验室成员相处，交流融洽，善于取长补短，虚心好学，注重团队合作。

陈梦泽同学在实习期间遇到问题，能主动查找文献解决问题。积极参与组内的讨论。有很好的科研素养。

陈桑萝同学综合素质较好，能在实习过程中积极交流，取长补短。在实习实验遇到问题或者瓶颈时，能冷静分析，提取解决方案，逐个排除实物原因。非

常仔细负责。

4.4 优秀实习周记

姓名	黄昀	学号	3140100239	班级	海科 1402					
时间	2017.7.2	周次	1	星期	星期日					
地点	浙江大学海洋学院海科楼 107									
实习内容： (可以列表记录每天的主要工作内容) 最小抑菌浓度的测定：将 ZS-A45 菌株活化后在高氏一号液体培养基中培养 3d。并配置红霉素母液，通过倍半稀释法依次得到一系列浓度的红霉素溶液；配置碘乙酰胺母液，通过倍半稀释法依次得到一系列浓度的碘乙酰胺溶液；通过倍半稀释法稀释 DMSO，依次得到一系列浓度的 DMSO 溶液。 由稀到浓，在 96 孔板中加入试剂与菌液并用移液枪吹打均匀，另设等量空白培养基与菌液两组对照。37℃恒温培养 3d，肉眼无法观察到微生物生长的药物最低浓度即为最小抑菌浓度 不同固体培养基对于 ZS-A45 次级代谢产物表达的影响：在无菌条件下，接种菌体于内装固体培养基的锥形瓶中，28℃静置培养 30d，乙酸乙酯提取浸泡过夜，浓缩得到粗提物浸膏。并通过 HPLC 分析各个固体培养基下生成的次级代谢产物的异同。										
收获与感想：(250-300 字) 在实习过程中，通过不断学习正确使用高效液相色谱的方法，对放线菌 ZS-A45 在不同培养条件下生成的次级代谢产物进行分离与分析，进而分析判断与在高氏一号液体培养基中生成的次级代谢产物相比，其主产物 3'-N-methyl-Medermycin 的产率是否增大，是否激活新的代谢通路进而生成新的次级代谢产物。整个过程不仅是一个探究实验结果的过程，也是一个学习与熟悉如何通过色谱方法分离分析次级代谢产物粗提物的过程。在五种固体培养基中，主要的次级代谢产物 3'-N-methyl-Medermycin 的产率均降低甚至消失，但是生成了新的次级代谢产物，需要进一步通过活性研究验证在固体培养基中形成的次级代谢产物是否具有较高的生物活性，以决定是否进一步扩大培养。										
建议与意见：(200 字左右) 在这次暑期实习过程中不仅学习到了许多新的知识与经验，同时也体会到了科研工作的魅力所在，但是十天的暑期实习难以开展一些较为全面的实验工作，因此希望能够增加下届的暑										

期实习的周期与长度。

4.5 优秀实习总结

黄昀同学在实习过程中态度认真、实验积极、勇于创新，实习总结也很到位，表现优秀，详见附件04

5.问题和建议

5.1 存在的问题

实习周期太短。导致学生实习内容很少，锻炼程度不够。由于时间很短，很多课题的前期内容由老师提前准备好，弱化了学生的主动性。

5.2 建议

延长实习的周期，让学生有充裕的时间深度的参与到实习实验中来。

6.附件

附件 01：实习计划与安排

授课内容	教学目标	授课模式	学时分配
------	------	------	------

海生方向各位老师进行课题研究课题的介绍	了解海洋生物专业不同研究方向的特点	讲授、实习	6
实验室安全规范常识	了解基本实验室安全操作规范，化学试剂使用与安全规范、仪器操作规范、气体钢瓶安全使用、实验室防护知识等	讲授、实习	8
进入指导教师实验室进行培训	了解基本实验操作技术，实验室安全规范；对整个实验课题的选题、方案确定、实验展开、实验技巧、数据分析、结果讨论等实验流程	实验室实习	30
讨论、总结	完成实习报告	学生自行撰写报告	4
合计			48

附件 02：实习要求

实习方式与要求

由专业老师进行各研究方向的认识入门讲解；

进入实习部门的专业实验室进行实验室安全规范培训、仪器操作培训、实验技能培训；

通过撰写专题研究报告、实习总结等形式强化学生的实习效果。

课程要求：

1、通过实习了解海洋生物专业不同研究方向的特点；了解某些实验操作技术、试剂配制、生物学技术、化学分析方法等。丰富和扩大学生的专业知识领域。

2、通过进入实验室进行专业实验操作培训，了解基本实验操作技术，实验室安全规范；对整个实验课题的选题、方案确定、实验展开、实验技巧、数据分析、结果讨论等实验流程有所了解。

3、参加实际科研实验操作，灵活运用已学的理论知识解决实际问题，培养

学生独立分析问题和解决问题的能力。

考试评分与建议

最终考核成绩根据科研实习期间的实验室安全规范常识考试成绩、日常实验操作规范程度、实验日记、科研实习总结四部分综合评定。

附件 03：优秀实习周记

姓名	黄昀	学号	3140100239	班级	海科 1402
时间	2017.7.2	周次	1	星期	星期日
地点	浙江大学海洋学院海科楼 107				
实习内容：行间距 1.3，5 号宋体，不加粗；下同。 (可以列表记录每天的主要工作内容) 最小抑菌浓度的测定：将 ZS-A45 菌株活化后在高氏一号液体培养基中培养 3d。并配置红霉素母液，通过倍半稀释法依次得到一系列浓度的红霉素溶液；配置碘乙酰胺母液，通过倍半稀释法依次得到一系列浓度的碘乙酰胺溶液；通过倍半稀释法稀释 DMSO，依次得到一系列浓度的 DMSO 溶液。 由稀到浓，在 96 孔板中加入试剂与菌液并用移液枪吹打均匀，另设等量空白培养基与菌液两组对照。37℃恒温培养 3d，肉眼无法观察到微生物生长的药物最低浓度即为最小抑菌浓度 不同固体培养基对于 ZS-A45 次级代谢产物表达的影响：在无菌条件下，接种菌体于内装固体培养基的锥形瓶中，28℃静置培养 30d，乙酸乙酯提取浸泡过夜，浓缩得到粗提物浸膏。并通过 HPLC 分析各个固体培养基下生成的次级代谢产物的异同。					
收获与感想：(250-300 字) 在实习过程中，通过不断学习正确使用高效液相色谱的方法，对放线菌 ZS-A45 在不同培养条件下生成的次级代谢产物进行分离与分析，进而分析判断与在高氏一号液体培养基中生成的次级代谢产物相比，其主产物 3'-N-methyl-Medermycin 的产率是否增大，是否激活新的代谢通路进而生成新的次级代谢产物。整个过程不仅是一个探究实验结果的过程，也是一个学习与熟悉如何通过色谱方法分离分析次级代谢产物粗提物的过程。在五种固体培养基中，主要的次级代谢产物 3'-N-methyl-Medermycin 的产率均降低甚至消失，但是生成了新的次级代谢产物，需要进一步通过活性研究验证在固体培养基中形成的次级代谢产物是否具有较					

高的生物活性，以决定是否进一步扩大培养。

建议与意见：（200 字左右）

在这次暑期实习过程中不仅学习到了许多新的知识与经验，同时也体会到了科研工作的魅力所在，但是十天的暑期实习难以开展一些较为全面的实验工作，因此希望能够增加下届的暑期实习的周期与长度。

附件 04：优秀实习总结

不同培养条件对海洋放线菌 ZS-A45 菌株 次级代谢产物表达的影响

浙江大学海洋学院，黄昀

摘要：

海洋放线菌因其产生结构新颖、功能多样的天然活性产物而备受关注。特殊多样的海洋生态环境，赋予了海洋放线菌复杂独特的代谢途径，其次级代谢产物在结构类型与生物活性等方面都呈现出与陆生放线菌不同的特点与多样性，成为了发现天然活性产物与新药先导化合物的重要来源。本次实习主要以海洋放线菌 ZS-A45 为实验菌株，探究其在不同固体培养基中次级代谢产物种类与液体培养基中的差异，其次通过选择性地添加酶抑制剂，研究其对菌株相关代谢途径的影响。

关键词：

海洋放线菌次级代谢产物固体培养基酶抑制剂培养条件

Different Secondary Metabolite of Actinomycete ZS-A45 under Defferent Culture Condition

Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan 316021,China;

Abstract:

Because of actinomycetes' novel structure and large amount of functions, actinomycetes are being paying more attention to. Various ocean environment give actinomycetes complex ways of metabolism, which are completely different from actinomycetes on the land. Because of that, ocean actinomycetes become the important source of the leading compound. We researched the secondary metabolite of actinomycete ZS-A45 under defferent solid culture medium and defferent inhibitors of enzymes.

Key words:

Ocean actinomycetes, secondary metabolite, solid culture medium, inhibitors of enzymes, culture conditions

报告字数：大于等于 3000 字

1. 实习内容概述

覆盖着地球 71% 表面积的浩瀚海洋，蕴藏着极其丰富的海洋生物资源。作为海洋环境中，特别是深海极端环境中重要的海洋生物资源，海洋微生物以其独特的生物学特性、活性次级代谢产物以及生态功能而备受关注。我国地处太平洋西部，大陆海岸线长达 1800 公里，属我国管辖之渤海、黄海、东海与南海四海区面积达约 300 万平方公里，大小岛屿 6000 余座【1】，有着丰富的海洋微生物资源，随着陆地微生物资源的逐步开发，各国逐渐将目光投向拥有巨大潜力而开发尚浅的海洋环境，合理开发利用海洋微生物资源亦成为了我国目前面临的重大研究课题。

放线菌是一类具有高(G+C)mol%含量的革兰氏阳性细菌，具有复杂的形态分化过程与合成种类丰富的活性次级代谢产物的能力。自 1875 年 Cohn 从人泪腺感染病灶中分离到一株链丝菌(*Streptothrix*)以来，放线菌由于其拥有独特的合成多种结构复杂的次级代谢产物的能力而引起了人们的广泛关注。也正是缘于其丰富多样的次级代谢产物的不断发现，放线菌逐渐成为了迄今最重要也是最庞大的药用微生物种群，是近代抗生素等制药工业最重要的微生

物资源之一。

特殊多样的海洋生境,赋予了海洋放线菌以提取丰富多样且天然产物活性显著的新药先导化合物的巨大可能性与潜力。众多海洋放线菌可产生各种各样的次级代谢产物,根据其化学结构可分为糖苷类、生物碱类、大环内酯类、肽类、醌类、萜类、聚醚类等。结构决定性,放线菌次级代谢产物的结构多样性,同样决定着次级代谢产物的活性多样性,结构类型丰富多样新颖独特的放线菌次级代谢产物,展现出了其次级代谢产物活性特征的多样性。

微生物次级代谢产物发现初期,常常面临基因信息不明或者需要对众多微生物进行筛选的问题,直接采用基因工程和代谢工程的手段,则存在着周期长、通量低的缺点。科学家们发现基于培养手段的 OSMAC 方法有独特的优势。OSMAC 即 one strain many compounds,是指使用一系列简单可行的方法对微生物培养过程中可能涉及到的影响因素加以改变,以增加其次级代谢产物的种类和含量的研究方法【2】。基因组学的研究表明在实验室单一或相似的培养条件下,微生物中存在大量常规培养条件下未被表达的代谢途径,即“沉默代谢途径”【3】。改变微生物生长的微环境可以激活菌株的“沉默代谢途径”,提高微生物次级代谢产物的多样性。目前 OSMAC 策略在菌株的再开发利用及药物先导化合物的发现中发挥了重要的作用并且得到了广泛的应用。该策略通过改变菌株的培养条件,添加相关前体或抑制剂,菌株的混合培养等方式干扰菌株常规的生物代谢,激发了菌株产生多样性化合物的潜能。

本次实习主要探究从微生物的固态发酵以及添加相关酶抑制剂两方面,对于海洋放线菌 ZS-A45 的次级代谢产物表达的影响。

固态发酵法能够显著提高某些放线菌次级代谢产物多样性,能够充分发掘现有药用放线菌产生新次级代谢产物的潜能。

通过选择不同的反应路径会得到结构多样性的产物,如果选择性的添加不同途径的酶抑制剂则会抑制相关代谢途径,同时可能促进其他通路相关代谢产物的合成。针对海洋放线菌 ZS-A45 萘醌类次级代谢主产物的代谢途径中的聚酮合成和氧化反应分别选择了以下几种抑制剂:聚酮反应的抑制剂——碘乙酰胺;氧化反应的抑制剂——红霉素。

其中,碘乙酰胺是一种特异性不可逆的酶抑制剂,能抑制以-SH 为活性基的酶类,如聚酮途径所必须的 CoA 的作用便与巯基有关,能被特异性不可逆的抑制;红霉素对于 P450 氧化酶有一定的抑制作用,在代谢产物的生物合成中氧化反应是一种很普遍的反应,因此该途径的酶抑制剂也是被研究和利用最多的。

1.1. 实验材料

试剂与药品：可溶性淀粉、硝酸钾、磷酸氢二钾、七水合硫酸镁、氯化钠、七水合硫酸亚铁、海盐、无水乙醇、甲醇、四氯甲烷、乙酸乙酯、硫酸乙醇、三氟乙酸、大米、麸皮、豆粕、红霉素、碘乙酰胺、DMSO。

仪器设备：台秤、电子分析天平、电热恒温鼓风干燥箱、高压蒸汽灭菌锅、冷藏冷冻冰箱、超净工作台、冷藏冷冻冰箱、电热恒温水浴锅、恒温培养箱、恒温摇床、旋转蒸发仪、循环水式多用真空泵、低温冷却液循环泵、超声波清洗池、热风枪、薄层层析硅胶板、暗箱式紫外分析仪、毛细管柱、HPLC、96 孔板。

1.2. 实验方法

本次实习主要以海洋放线菌 ZS-A45 为实验菌株，探究其在不同固体培养基中次级代谢产物种类与液体培养基中的差异，其次通过选择性地添加酶抑制剂，研究其对菌株相关代谢途径的影响。

1.2.1. 最小抑菌浓度的测定

高氏一号培养基：可溶性淀粉 20g，硝酸钾 1g，磷酸氢二钾 0.5g，七水合硫酸镁 0.5g，氯化钠 0.5g，七水合硫酸亚铁 0.01g，海盐 25g。

将 ZS-A45 菌株活化后在高氏一号液体培养基中培养 3d。

配置红霉素母液 10mg/ml，取 10uL、990uL 空白培养基稀释 100 倍得到 100ug/ml 的红霉素溶液，通过倍半稀释法依次得到 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.20ug/ml 的红霉素溶液。

配置碘乙酰胺母液 400mg/ml，通过倍半稀释法依次得到 200、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39mg/ml，200、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.20、0.10、0.05、0.025、0.0125、0.00625、0.00313、0.00156、0.00078ug/ml 的碘乙酰胺溶液。

通过倍半稀释法稀释 DMSO，依次得到 500、250、125、625、313、156、78、39、20uL/ml 的 DMSO 溶液。

由稀到浓，在 96 孔板中加入 100uL 试剂与 100uL 菌液并用移液枪吹打均匀，另设等量空白培养基与菌液两组对照。37℃ 恒温培养 3d，肉眼无法观察到微生物生长的药物最低浓度即为最小抑菌浓度

1.2.2. 不同固体培养基对于 ZS-A45 次级代谢产物表达的影响

大米培养基：大米 40g，海水 60ml；麸皮培养基：麸皮 25g，海水 100ml；豆粕培养基：豆粕 25g，海水 75ml；大米麸皮培养基：大米 20g，麸皮 12.5g，海水 80ml；大米豆粕培养基：大米 20g，豆粕 12.5g，海水 70ml。

在无菌条件下，接种菌体于内装固体培养基的 500ml 锥形瓶中，28℃静置培养 30d，乙酸乙酯提取浸泡过夜，浓缩得到粗提物浸膏。

1. 2. 3. 不同生物合成酶途径抑制剂对于 ZS-A45 次级代谢产物表达的影响

根据 ZS-A45 菌株对于红霉素与碘乙酰胺的最小抑菌浓度（MIC），在无菌条件下，接种菌体于内装 250ml 高氏一号培养基的锥形瓶中，按照 0、0.1MIC、0.5MIC、MIC 的浓度添加酶抑制剂，置于摇床 28℃，180r/min 振荡培养 30d，乙酸乙酯萃取，浓缩得到粗提物浸膏。

1. 2. 4. 次级代谢产物的高效液相色谱分析

粗提物浸膏经高效液相色谱分析方法，比较各个培养条件下的放线菌 ZS-A45 生成次级代谢产物的差异。

1. 3. 实验结果

1. 3. 1. 最小抑菌浓度的测定

经过 37℃恒温培养 3d 后，96 孔板上肉眼无法观察到微生物生长的药物最低浓度即为最小抑菌浓度，如下表 1 所示。

表格 1 三种化合物下放线菌 ZS-A45 的最小抑菌浓度（MIC）			
化合物	碘乙酰胺	红霉素	DMSO
MIC	6.25ug/ml	12.5ug/ml	0.125ug/ml

根据放线菌 ZS-A45 对于 DMSO 的最小抑菌浓度可知，作为碘乙酰胺与红霉素母液配置的溶剂，稀释之后 DMSO 不会对碘乙酰胺与红霉素的最小抑菌浓度测定造成影响。并根据红霉素与碘乙酰胺的最小抑菌浓度（MIC），按照 0、0.1MIC、0.5MIC、MIC 的浓度添加酶抑制剂。

1. 3. 2. 不同固体培养基对于 ZS-A45 次级代谢产物表达的影响

在不同固体培养基中，得到粗提物浸膏经过高效液相色谱分析，结果如下图 1 所示，粗提物产率如表 2 所示。

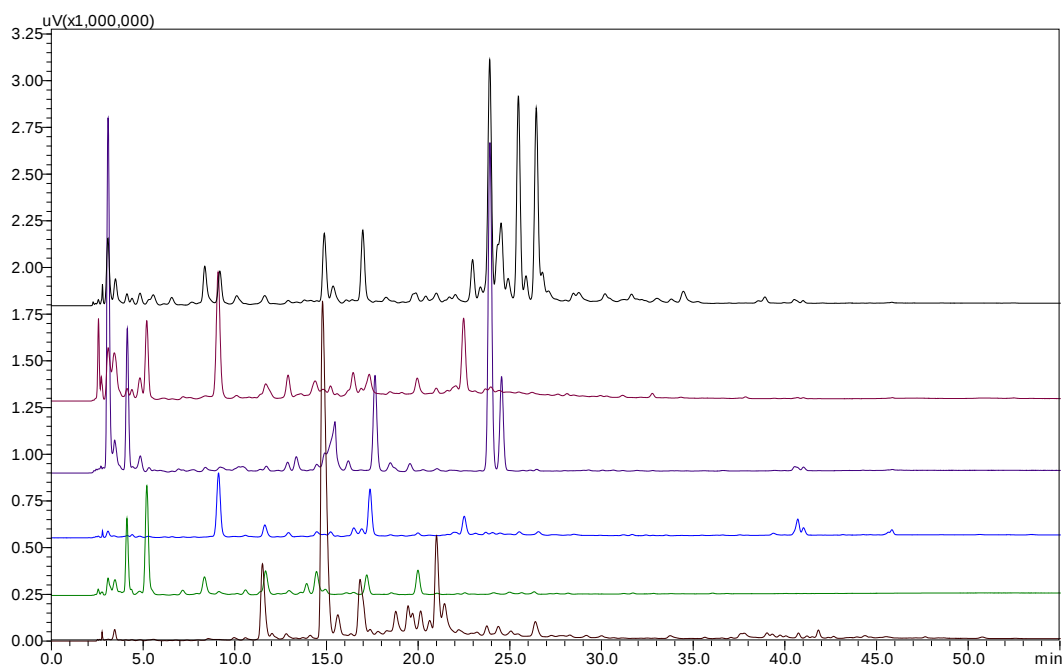


Figure 2 不同固体培养基下放线菌次级代谢产物的高效液相分析图

（由下至上依次是高氏一号液体培养基、大米、麸皮、豆粕、大米加麸皮、大米加豆粕固体培养基下的次级代谢产物）

表格 2 不同固体培养基及高氏一号液体培养基下放线菌 ZS-A45 的产率

浓度	高氏一号	大米	麸皮	豆粕	大米加麸皮	大米加豆粕
产率	43.3mg	565.7mg	80.3mg	238.4mg	44.8mg	78.1mg

与高氏一号液体培养基相比，固体培养基中放线菌 ZS-A45 次级代谢产物的产率均有一定程度的增大，且在大米固体培养基与豆粕固体培养中放线菌 ZS-A45 次级代谢产物的产率最大。由粗提物的高效液相色谱分析可知，与高氏一号液体培养基相比，大米固体培养基中代表主要次级代谢产物的 15min 处色谱峰，以及 11.5min、17min 与 21min 处的色谱峰面积减小或消失，出现新的 4min 与 5min 处的色谱峰。与高氏一号液体培养基相比，麸皮固体培养基中代表主要次级代谢产物的 15min 处色谱峰，以及 11.5min、17min 与 21min 处的色谱峰面积减小或消失，出现新的 9min 处的色谱峰。与高氏一号液体培养基相比，豆粕固体培养基中代表主要次级代谢产物的 15min 处色谱峰，以及 11.5min 与 21min 处的色谱峰面积减小或消失，出现新的 3min、4min、24min 与 25min 处的色谱峰。与高氏一号液体培养基相比，大米加麸皮固体培养基中代表主要次级代谢产物的 15min 处色谱峰，以及 11.5min、

17min 与 21min 处的色谱峰面积减小或消失，出现新的 3min、4min、5min、9min 与 23min 处的色谱峰。与高氏一号液体培养基相比，大米加豆粕固体培养基中代表主要次级代谢产物的 15min 处色谱峰，以及 11.5min 与 21min 处的色谱峰面积减小或消失，出现新的 3min、23min 与 26min 处的色谱峰。

在五种固体培养基中，主要的次级代谢产物 3'-N-methyl-Medermycin 的产率均降低甚至消失，但是生成了新的次级代谢产物，需要进一步通过活性研究验证在固体培养基中形成的次级代谢产物是否具有较高的生物活性，以决定是否进一步扩大培养。

1.3.3. 不同生物合成酶途径抑制剂对于 ZS-A45 次级代谢产物表达的影响

在含有不同浓度碘乙酰胺的液体培养基中，得到粗提物浸膏经过高效液相色谱分析，结果如下图 2 所示，粗提物产率如表 3 所示。

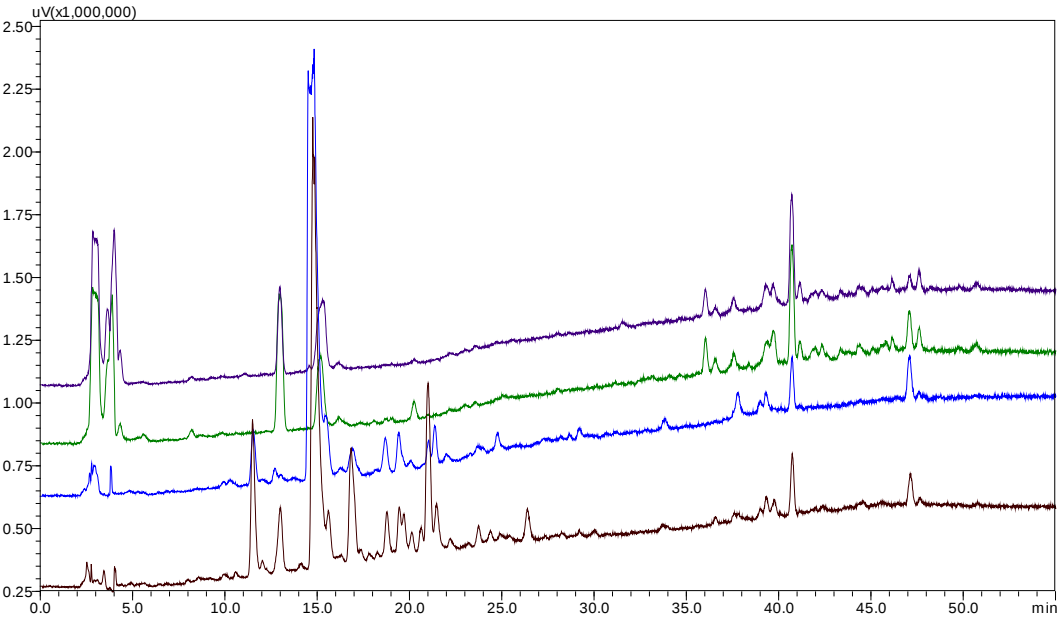


Figure 2 各个浓度碘乙酰胺下放线菌次级代谢产物的高效液相分析图
(由下至上依次是碘乙酰胺浓度为 0、0.1MIC、0.5MIC、MIC 的培养条件)

表格 3 四个碘乙酰胺浓度下放线菌 ZS-A45 的产率

浓度	0	0.1MIC	0.5MIC	MIC
产率	43.3mg	32.6mg	21.0mg	21.9mg

与空白对照相比，在 0 到 1 倍的 MIC 浓度范围内碘乙酰胺的浓度越高，放线菌 ZS-A45 的产率越低。由粗提物的高效液相色谱分析可知，2.5min、3.5min、13min、41min 处的色谱

峰高随着碘乙酰胺浓度的升高存在一定程度的增大，位于 15min 处代表放线菌 ZS-A45 主要次级代谢产物的色谱峰高随着碘乙酰胺浓度的升高存在一定程度的减小，除此之外其他色谱峰高均随着碘乙酰胺浓度的升高而减小或消失。且由高效液相色谱分析可知，在碘乙酰胺对聚酮合成途径的抑制作用下没有激活新的代谢通路形成新的次级代谢产物。

在含有不同浓度红霉素的液体培养基中，得到粗提物浸膏经过高效液相色谱分析，结果如下图 3 所示，粗提物产率如表 4 所示。

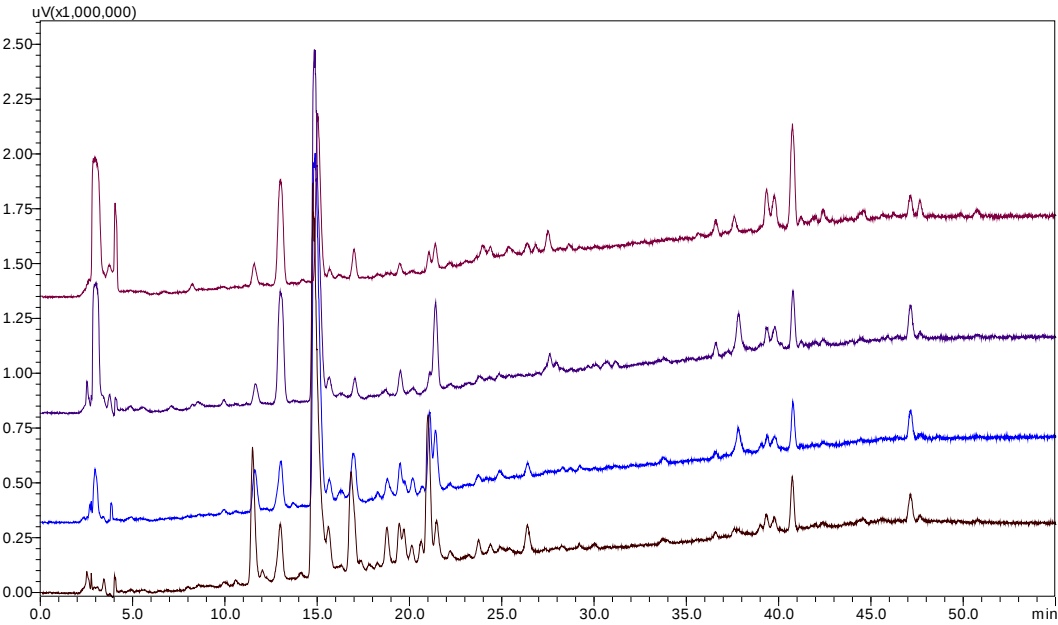


Figure 3 各个浓度红霉素下放线菌次级代谢产物的高效液相分析图
(由下至上依次是红霉素浓度为 0、0.1MIC、0.5MIC、MIC 的培养条件)

表格 4 四个红霉素浓度下放线菌 ZS-A45 的产率

浓度	0	0.1MIC	0.5MIC	MIC
产率	43.3mg	37.4mg	42.4mg	30.7mg

与空白对照相比，在 0 到 1 倍的 MIC 浓度范围内红霉素的浓度越高，放线菌 ZS-A45 的产率越低。由粗提物的高效液相色谱分析可知，2.5min、3.5min、13min、41min 处的色谱峰高随着红霉素浓度的升高存在一定程度的增大，位于 15min 处代表放线菌 ZS-A45 主要次级代谢产物的色谱峰高随着红霉素浓度的升高存在一定程度的减小，除此之外其他色谱峰高均随着红霉素浓度的升高而减小或消失。且由高效液相色谱分析可知，在红霉素对 P450 氧化酶以及对放线菌本身的抑制作用下没有激活新的代谢通路形成新的次级代谢产物。

放线菌 ZS-A45 在含有各个浓度碘乙酰胺与红霉素的培养条件下生成的次级代谢产物，在高效液相色谱分析中展现出了相似的模式，可以推测两种酶抑制剂的存在，抑制了相关代谢途径，但是没有激活新的代谢途径形成新的次级代谢产物。

2. 就某个环节或事情进行描述

本次实习主要以海洋放线菌 ZS-A45 为实验菌株，探究其在不同固体培养基中次级代谢产物种类与液体培养基中的差异，其次通过选择性地添加酶抑制剂，研究其对菌株相关代谢途径的影响。其中关键的步骤的在于采用高效液相色谱的方法，探究放线菌 ZS-A45 在不同培养条件下生成的次级代谢产物的异同。

高效液相色谱是在液相塞皮的基础上，于六十年代后期引入气相色谱理论而迅速发展起来的。与传统的液相色谱法的区别是填料颗粒小而均匀，小颗粒具有高柱效，但会引起高阻力，需要用高压输送流动相。高效液相色谱的出现不过三十多年的时间，但这种分离分析技术的发展十分迅猛，应用十分广泛，仪器结构与流程多种多样。

在实习过程中，通过不断学习正确使用高效液相色谱的方法，对放线菌 ZS-A45 在不同培养条件下生成的次级代谢产物进行分离与分析，进而分析判断与在高氏一号液体培养基中生成的次级代谢产物相比，其主产物 3'-N-methyl-Medermycin 的产率是否增大，是否激活新的代谢通路进而生成新的次级代谢产物。整个过程不仅是一个探究实验结果的过程，也是一个学习与熟悉如何通过色谱方法分离分析次级代谢产物粗提物的过程。

3. 收获与体会

在实习之前就已经系统地学习过天然药物化学相关方向的课程以及实验，接触到了相关的知识与认识，因此在这次实习过程中通过每日的实践过程，不仅对于以前学习过的知识点产生了新的认识与理解，也获得了在课堂理论学习中没有的实践经验，同时也对科研工作产生了新的理解，加深天然药物化学这门学科理解与认同，对于以后的学习工作都有着积极的影响。

4. 对专业实习的建议

在这次暑期实习过程中不仅学习到了许多新的知识与经验,同时也体会到了科研工作的魅力所在,但是十天的暑期实习难以开展一些较为全面的实验工作,因此希望能够增加下届的暑期实习的周期与长度。

- 【1】 张清丽,顾谦群,崔承彬,方玉春,刘红兵,朱天骄. 海洋来源的放线菌次级代谢产物及其生物活性[J]. 中国海洋药物,2004,05:49-54.
- 【2】 Goodfellow M, Fiedler H. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics[J]. Antonie van Leeuwenhoek. 2010, 98(2):119-142.
- 【3】 Schroeckh V, Scherlach K, Nuttmann H, et al. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009, 106(39):14578 — 14583.