

肌苷高产菌株的选育

刘长云 毛建农 史奎林¹

(中国药科大学微生物学教研室, 南京 210009)

摘要 以肌苷产生菌枯草芽孢杆菌 MBS-12 为出发菌株, 经紫外线诱变处理获得一株具有腺嘌呤、组氨酸、苯丙氨酸、硫胺素四重营养缺陷型并对 8-氮杂鸟嘌呤、6-巯基嘌呤有双重抗性的突变株 LSBS-1255(ade^- , his^- , phe^- , thi^- , 8-AG^r, 6-MP^r), 在摇瓶试验中该变异株的产量显著高于亲株, 摇瓶试验产肌苷达 27.43 mg/ml, 最高可达 29.10 mg/ml, 发酵周期为 72 h, 菌株性状稳定。

关键词 肌苷; 枯草杆菌; 紫外诱变; 菌株选育

肌苷(Inosine, Ino.)又称次黄嘌呤核苷, 在医药和食品等方面具有重要作用。我们以具有 ade^- , his^- , thi^- 三重遗传标记的枯草芽孢杆菌 MBS-12 为出发菌株, 通过紫外诱变处理, 得到一株具有 ade^- , his^- , phe^- , thi^- 四重营养缺陷型标记且具有 8-AG^r 和 6-MP^r 双重抗性的突变株 LSBS-1255, 经摇瓶发酵试验 LSBS-1255 最高产肌苷达 29.10 mg/ml。

1 材料和方法

1.1 材料

试剂 硅胶 HF-254(青岛海洋化工厂); CMC-Na(上海化学试剂采购供应站); 醋酸丁酸、正丁醇、冰醋酸(AR, 南京化学试剂厂); 肌苷标准品(BR, 上海试剂二厂); 盐酸(AR, 上海试剂二厂); 次黄嘌呤标准品(Hypoxanthine Fluka Chemie AG, CH-9470 Buchs. Packed in Switzerland)。

仪器 752 紫外分光光度计(上海第二分析仪器厂); 721 分光光度计(上海第三分析仪器厂); 离心机(上海手术器械厂); 三用紫外分析仪(UV-1 型)(上海顾材电光仪器厂)。

出发菌株 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) MBS-12, 实验前经纯化鉴定为三重缺

陷型(ade^- , his^- , thi^-)。

培养基 斜面培养基, 肉汤培养基, 基本培养基。完全培养基见文献[1]。种子培养基, 发酵培养基见文献[2]。

补充培养基: 在基本培养中添加以下物质(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)制成各种补充培养基: 腺嘌呤, 黄嘌呤, 鸟嘌呤, 组氨酸, 硫胺素, 苯丙氨酸, 脯氨酸。

含抗生素培养基: 在基本培养基中添加 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 磺胺。

含抗性类似物培养基: 在基本培养基中添加 8-氮杂鸟嘌呤(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)或 6-巯基嘌呤(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

改进发酵培养基(%): 在文献[2]发酵培养基中加入组氨酸 0.01 mg/ml, 尿素 0.5 g, 腺嘌呤 0.2 mg/ml, 次黄嘌呤 0.3 mg/ml, L-谷氨酸 0.4 mg/ml, L-苯丙氨酸 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。pH 7.2, 装量 20 ml/500 ml 瓶, 玻璃珠 20 颗/瓶。

1.2 方法

1.2.1 紫外诱变方法

出发菌株生长曲线的测定

将出发菌株 37℃ 斜面活化 20 h, 取一环斜面菌种接种于 20 ml 肉汤培养基中, 每隔 2 h 取样测 OD_{660} , 当 OD_{660} 变化减小后改为 1 h 取样一次, 以时间为横坐标, 以 OD_{660} 为纵坐

标作图,得出菌株生长曲线。

MBS-12 的紫外诱变

出发菌株的分离纯化 先将 MBS-12 进行平板划线,挑取其中最大的单菌落移到新鲜斜面上 37℃ 培养 24 h,冰箱保藏。

出发菌株的紫外诱变处理^[3] 取纯化后的出发菌株 37℃ 斜面活化 20 h,取一环斜面菌接种于 20 ml 肉汤培养基中,34℃,180 r/min 培养 8 h,分别取 0.09,0.1,0.15,0.17 和 0.2 ml 用 L 棒均匀涂布室温干燥后的完全培养基平板上,进行紫外照射(15W、30 cm 垂直距离),剂量分别为 10.0,11.0,11.5,12.5,15.0 min,用黑布包好,37℃ 培养 48 h。

筛选突变菌株

将长出的单菌落用无菌牙签分别挑到对应的完全培养基和基本培养基平板上,34℃ 培养 48 h,在基本培养基上不长的即为营养缺陷型,将其移到新鲜斜面上,保存。另外将一些虽不是营养缺陷型但菌落形态有明显变化的菌落同时进行保存。

鉴定突变株的营养标记和抗性标记

将筛选出来的突变株分别用各种补充培养基和抗性类似物及磺胺药物培养基进行鉴定,同时用基本培养基进行对照,选出具有有利遗传标记的突变株。

1.2.2 肌苷的分析测定方法

展开剂的选择

在薄板规格、点样量及外界条件相同的情况下,利用 9 种展开剂分别对肌苷及次黄嘌呤进行薄层层析,结果见表 1。

从时间和分离效果(ΔR_f)综合考虑,选定展开剂为醋酸丁酯-正丁醇-乙酸-水(80:20:50:24),对其多次重复性试验,结果稳定。

肌苷标准曲线的绘制

精密称取肌苷标准品 270 mg 于 10 ml 容量瓶中定容,得浓度为 27.0 mg/ml 的肌苷标准水溶液,精确稀释浓度分别为:21.6、16.2、10.8、5.4 和 2.7 mg/ml,分别点样 5 μ l 于薄层板上,以醋酸丁酯-正丁醇-醋酸-水

Tab 1. ΔR_f values and development times in different developing agents for Ino. and hypoxanthine

Developing agents	ΔR_f	Developing times, min
A:B:C(4:1:1)	0.1087	85
D:A:B:C(80:15:40:24)	0.1178	39
D:A:B:C(10:15:8:6)	0.1476	65
D:A:B:C(80:15:60:24)	0.1127	51
D:A:B:C(80:15:80:24)	0.1127	59
D:A:B:C(80:25:60:24)	0.1407	53
D:A:B:C:E(80:15:40:24:20)	0.0980	47
D:A:B:C(80:20:50:24)	0.1467	46
D:A:B:C(80:10:50:25)	0.1379	116

A:n-butyl carbinol; B:acetic acid; C:H₂O; D:acetic acid n-butyl ester; E:alcohol

(80:20:50:24)为展开剂进行层析,在紫外灯下确定肌苷斑点位置,用铅笔标出其范围,然后用刮刀刮下,再用 0.01 mol/L HCl 6 ml 浸泡 2.5 h,2500 r/min 离心 25min,用 752 紫外分光光度计测 OD₂₅₃,以 OD₂₅₃为纵坐标,以肌苷标准液浓度为横坐标作图即得肌苷标准曲线。

发酵液中肌苷的含量测定

取发酵液 0.5 ml,3500 r/min 离心 20 min,取上清液同上法点样层析,刮下肌苷斑点,用 HCl 浸泡,离心,取上清液测 OD₂₅₃,根据肌苷标准曲线方程算出肌苷含量。层析时需以一定浓度的肌苷标准液作为对照。

1.2.3 肌苷发酵实验

菌种纯化分离:挑取大菌落移种到斜面上。

菌种活化:37℃ 斜面活化 18~20 h。

种子培养:取一环活化的斜面菌种接种于 30 ml 种子培养基中,34℃,180 r/min 培养 20 h。

发酵培养:取 1 ml 种子液接种到 20 ml 发酵培养基中。34℃,180 r/min 条件下发酵,定时取样,同上法测 OD₂₅₃,同时测其 pH 值,并作镜检。

2 结果与讨论

2.1 出发菌株生长曲线

出发菌株生长曲线见图 1。

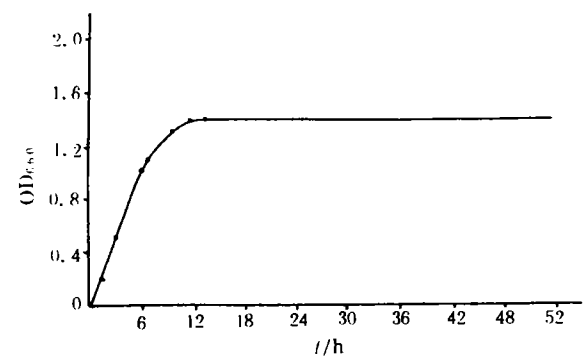


Fig 1. MBS-12 growth curve

2.2 肌苷标准曲线

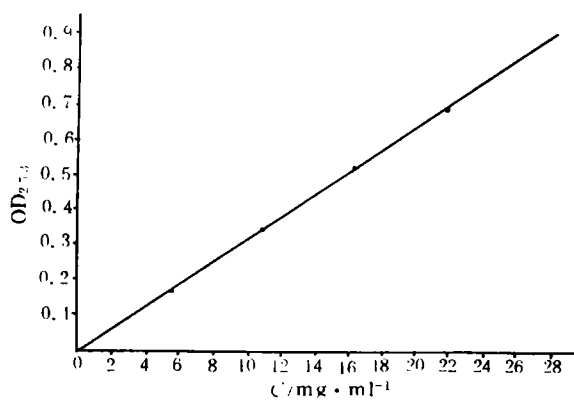


Fig 2. Ino. standard curve

肌苷浓度与吸收度的相关系数 $r = 0.9987$, 表明肌苷标准曲线线性良好, 其线性回归方程为 $y = 0.0323x + 2.683 \times 10^{-4}$, (y 代表 OD_{253} , x 代表肌苷浓度)。

2.3 菌种诱变结果

- 1) 共挑单个菌落 3 万个, 获得营养缺陷型突变株 79 个, 有特殊形态的菌株 7 株。
- 2) 由枯草芽孢杆菌的肌苷生物合成的代谢调控机制, 我们推测带有黄嘌呤、鸟嘌呤营养缺陷标记或带有 8-氮杂鸟嘌呤, 6-巯基嘌呤或磺胺抗性标记的突变株有可能具有较

高的产苷能力。对上述突变株进行了鉴定: 1247 号菌为鸟嘌呤营养缺陷型, 1244 号菌为黄嘌呤营养缺陷型。1230, 1254, 1255, 1264, 1267, 1269 号菌带有 6-巯基嘌呤抗性。1231, 1254, 1255, 1241, 1217 号菌带有 8-氮杂鸟嘌呤抗性, 1230 号菌具有磺胺抗性。其中 1255 号菌还带有苯丙氨酸营养缺陷标记。

3) 用最初的发酵培养基对 14 株菌(其中 1243, 1250, 1251 号菌为脯氨酸营养缺陷型)进行发酵培养, 在进行紫外显色时发现除了 1255 号菌发酵样品颜色比 10.8 mg/ml 的标准品颜色深, 其余的比标准品颜色浅, 故最后决定采用 1255 号菌进行发酵。

4) 紫外诱变致死率、突变率与诱变剂量的关系, 见表 2。

Tab 2. Relationship among death rate, mutation rate and mutagenic dosage for ultraviolet light treatment

Ultraviolet light treatment time, min	Death rate	Mutation rate, Auxotroph
10	39.9	0.567
11	46.6	0.130
11.5	53.1	0.130
12.5	90.2	0.320
15	99.3	0.767

1255 突变株是选用 15 min 照射剂量诱变得到的。

5) 出发菌株发酵结果(72 h), 见表 3。

Tab 3. Results of fermentation test for starting strain(MBS-12)

No.	OD ₂₅₃	Ino. production, mg/ml
1	0.249	7.70
2	0.225	6.96
3	0.253	7.82
4	0.191	5.91
5	0.158	4.88
Average	0.215	6.65

突变株 1255 发酵 60 h 和 72 h 结果, 见表 4。

Tab 4. Results of fermentation test for mutant LSBS-1255

No.	OD ₂₅₃ (60 h)	Ino. production, mg/ml	OD ₂₅₃ (72 h)	Ino. production, mg/ml
1	0.499	15.45	0.673	20.83
2	0.549	16.99	0.711	22.01
3	0.525	16.25	0.703	21.76
4	0.498	15.41	0.671	20.77
5	0.501	15.50	0.687	21.26
Average	0.541	15.91	0.689	21.33

1255 突变株采用改进培养基后的发酵结果,见表 5。

Tab 5. Fermentation results of mutant 1255 by improved medium

No.	OD ₂₅₃ (60 h)	Ino. production, mg/ml	OD ₂₅₃ (72 h)	Ino. production, mg/ml
1	0.743	23.01	0.914	28.31
2	0.729	22.56	0.795	24.60
3	0.745	23.21	0.940	29.10
4	0.733	22.69	0.895	27.71
Average	0.734	22.72	0.866	27.43

2.4 稳定性实验^[4]

1) 斜面连续传代对肌苷积累的影响实验表明,当连续传代分别为 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14 时,肌苷的含量分别为

27.60, 27.51, 27.49, 28.01, 28.11, 24.59, 26.63, 27.74, 28.31, 26.71, 28.26, 27.03, 27.48 mg/ml。由此看出,斜面连续转接 14 次,肌苷产量未见降低。

2) 将以上各代菌做成 10⁸ 菌液浓度,分别涂布于下列培养基:基本培养基(MM),完全培养基(CM),MM+ade+his+phe, MM+ade+his+thi, MM+ade+phe+thi, MM+his+phe+thi, MM+8-AG, MM+6-MP, MM+8-AG+6-MP。分别检查 4 种营养缺陷型和双重抗性回复突变情况。每只平板涂布菌液 0.1 ml。结果见表 6。由表可知 LSBS-1255 突变株遗传是稳定的。

Tab 6. Stability test of genetic marks of mutant LSBS-1255

Generations	MM+ade+his+phe	MM+ade+his+thi	MM+ade+phe+thi	MM+his+phe+thi	MM	CM	MM+8-AG	MM+6-MP	MM+8-AG+6-MP
2	—	—	—	—	—	+	+	+	+
3	—	—	—	—	—	+	+	+	+
4	—	—	—	—	—	+	+	+	+
5	—	—	—	—	—	+	+	+	+
6	—	—	—	—	—	+	+	+	+
7	—	—	—	—	—	+	+	+	+
8	—	—	one colony	—	—	+	+	+	+
9	—	—	—	—	—	+	+	+	+
10	—	—	—	—	—	+	+	+	+
11	—	—	—	one colony	—	+	+	+	+
12	—	—	—	—	—	+	+	+	+
13	—	—	one colony	—	—	+	+	+	+
14	—	—	—	—	—	+	+	+	+

2.2 结 论

1) 突变株 LSBS-1255 将肌苷产量从 6.65 mg/ml 提高到 21.33 mg/ml,通过改进发酵培养基成分,肌苷产量又从 21.33 mg/ml 提高到 27.43 mg/ml。为了进一步提高产量,缩短发酵周期,今后还可以从发酵温度、溶氧条件、最适 pH 等方面进行探讨、摸索。

2) 从腺嘌呤抗性类似物、鸟嘌呤或黄嘌呤营养缺陷型等方面还可对 LSBS-1255 进行进一步的改进。

3) LSBS-1255 待进一步中试。

参 考 文 献

1 王岳五,张 蓓,周与良. 用原生质体融合技术选育肌苷高产菌. 微生物学报, 1993,33(1):74
2 邓崇亮,徐 海. 枯草杆菌 JSIM-1019 突变株肌苷发酵研究. 微生物学通报, 1988,15(3):98
3 钱存柔编. 微生物学实验. 北京:北京大学出版社, 1983,120~128
4 王敖全,李 敏,程光胜. 枯草芽孢杆菌突变体在合成培养基中的生长和肌苷合成的研究. 微生物学报, 1977,17(2):114

Breeding of Inosin Producing Mutant

Liu Changyun, Mao Jiannong, Shi Kuilin

China Pharmaceutical University, Department of Microbiology, Nanjing 210009

Using inosine producer bacillus subtilis MBS-12 (ade^- , his^- , thi^-) as a starting strain, a mutant LS-BS-1255 (ade^- , his^- , thi^- , 8-AG^r, 6-MP^r) was obtained by ultraviolet light treatment, which can accumulate 27.43 mg/ml of inosine.

Key words Inosine; Bacillus subtilis; Induced mutation by ultraviolet light treatment; Strain breeding

中国药科大学 1993~1994 年研究生工作通报

1993 年我校共招收硕士研究生 61 名(其中外国留学生 7 名),博士研究生 14 名(其中外国留学生 2 名)。授予硕士学位 30 名(其中留学生 2 名),授予博士学位 7 名。授予在职人员以硕士生同等学力申请硕士学位 2 名。

1994 年国家招生计划为硕士生 52 名,博士生 17 名。目前硕士入学考试已结束,报名人数较 1993 年增加 15%。目前正在准备进行阅卷工作。博士生招生的报名工作已开始,估计报名人数会有所增加。另外 1994 年国家计划可招收 1 名博士后研究人员。

1993 年经申报,国务院学位委员会审核批准,我校新增一个博士学位授权点——生化药。增列博士生导师 5 名:华维一、戴德哉、张正行、相秉仁和吴梧桐。

经我校申报后,省教委批准,张正行教授、王明时教授被评为优秀研究生教师。

我校申报了五个省级重点学科:药理学、药剂学、生药学、药物分析学和生化药学,批准后江苏省将给予重点投资。

(刘黎黎)