

链激酶* 产生菌的选育及其种子培养基

苏州第一制药厂 上海医药工业研究院生物化学药物研究室

1933年蒂勒特等^[1]发现 β -溶血性链球菌能产生一种促进人血凝块溶解的物质。1945年克里奇滕森等^[2]指出该物质是一种激酶,激活纤维蛋白酶原转变为纤维蛋白酶,因而称作链激酶(streptokinase)。五十年代初制成不纯的链激酶药品制剂,作清疮消炎用,其中还含有链球菌脱氧核糖核酸酶等其他物质。1952年约翰逊及蒂勒特等^[3]首次在动物身上作了链激酶体内溶解血栓研究。1959年约翰逊及马卡泰^[4]在人体上证实了其促进血栓溶解的作用。初期阶段链激酶纯度不高,副反应很大,不适于作溶解血栓治疗用,六十年代后对分离、提纯工艺作了一系列工作,纯度不断改进,近年来已获得高纯度静脉注射用链激酶制剂,大量用于临床,成为溶解血栓疗法中的一个重要药物^[5,6]。

我们曾对链激酶生产用的菌种、培养基、发酵条件、分离提纯作了研究,筛选得到了菌种,制定了初步适合生产链激酶的工艺流程,进行了一定数量的临床验证,效果良好。在此基础上,我们又对目前生产用菌种作了改良研究,以提高发酵单位,并且对种子培养基成份作了改进,以半合成培养基代替原牛肉浸液培养基,以利于扩大生产。本文报道用紫外线诱变方法提高链激酶生产用菌种发酵单位及种子培养基改良的研究。

一、材料和方法

(一)培养基

1. 羊血琼脂培养基 酪蛋白胨1%,氯化钠0.5%,琼脂2.5%,牛肉浸液加至100%,pH 7.2,灭菌后再加去血纤维羊血10%制成斜面或平板。

2. 原种子培养基 酪蛋白胨2%,氯化钠0.5%,牛肉浸液加至100%,pH 7.2。

3. 1号种子培养基 酪蛋白胨(或鱼粉胨)3%,酵母膏0.2%,磷酸二氢钾0.122%,磷酸氢二钠0.9%,硫酸镁0.008%,硫代乙醇酸0.12%,维生素混合液(每毫升含 B_1 , B_2 , B_6 , 泛酸钙,烟酰胺各2毫克, B_{12} 0.001毫克)0.2%,铁液(每毫升含硫酸亚铁1.2毫克,盐酸0.01毫升)1%,pH 7.2。

4. 2号种子培养基 血纤维维2%,玉米浆3%,麦芽汁2%,酵母膏0.5%,氯化钠0.5%,pH 7.2。

5. 发酵培养基 鱼粉胨1.2%,酵母膏0.2%,食盐0.2%,磷酸氢二钠0.135%,蔗糖2%,麦芽糖浆2%,pH 7.4。

(二)紫外线诱变育种

原始菌种 β -溶血性链球菌 C_2 为苏州制药厂供给,经一级种子培养后,用玻璃珠和石英砂打断菌链,过滤,制得单细胞菌体悬浮液,稀释后在波长2537 Å紫外灯下距离30厘米照射20秒,然后接种于羊血琼脂培养基上,37℃培养,分离单菌落菌株。经过发酵,测定发酵液中链激酶产量,筛选高产菌株。

得到的高产菌株,再经一级种子培养,打断菌链过滤制得单细胞悬浮液,纯化分离,发酵,测定酶产量,反复三次以上,得到纯种的高产诱变菌株。

(三)发酵方法

斜面菌株接种于5毫升原种子培养基中,pH 7.2,

* 本厂产品名溶栓酶。

37℃培养 5—10 小时,再取 2 毫升接入 20 毫升发酵培养基中,pH 7.2—7.4,37℃ 培养,待 pH 降到 6.7 以下改为 33℃ 培养,并每隔 1 小时用 3M 碳酸钠调 pH 至 7.2—7.4,继续培养 10—12 小时,然后测定发酵液中每毫升链激酶效价。

(四)链激酶效价测定法

选取适用的人胎盘血浆,以硼酸缓冲液(2.5% 硼酸溶液 45 份加 0.5% 氯化钠溶液 45 份,加 4% 四硼酸钠 10 份)1:7 稀释,取 0.8 毫升稀释的人胎盘血浆,加入 0.1 毫升链激酶(参照标准品,标准品约含 15—60 链激酶单位/毫升),再加 0.1M 氯化钙 0.25 毫升,轻轻迅速摇匀后,置 37℃ 水浴保温。观察记录管内血浆由凝结到溶解的时间作横坐标,链激酶标准品已知单位作纵坐标,制得标准曲线。待检样品同上法链激酶测定,依据标准曲线求得发酵液中链激酶的效价。

二、试验与结果

(一)高产菌株的筛选

应用生产菌株 β-溶血性链球菌 C₂ 进行紫外线诱变育种,分离得到近 570 个菌株,通过牛肉浸液种子培养基培养、发酵,选育得到 3 株酶产量高于原菌种的新菌株(表 1)。

结果指出,5Pu 309 等 3 个菌株产链激酶能力平均高于原菌种 C₂ 50%,其余大多数菌株产酶能力低或接近原菌种,数据从略。

表 1 诱变菌株产酶情况

菌株编号	试验批号	效 价 (单位/毫升)	原菌种效价 (单位/毫升)
5Pu 309*	721025	840; 600	450; 400
5Pu 309*	721030	900; 900	700; 700
5Pu 309*	730309	600; 560	350; 350
3Pu 323**	720822	900	600
3Pu 323**	720825	1200; 735	450; 450
3Pu 323**	730404	900	760
3Pu 240***	720927	1200; 1050	510; 450
	721101	1050; 900	700; 700
	721108	963; 900	650; 563
	730321	830; 780	600; 550
平均值		600—900	400—600

- * 从存活率 17% 的血平板上分离菌落并纯化五次后得到菌株。
** 从存活率 17% 的血平板上分离菌落并纯化三次后获得的菌株。
*** 原始菌种二级种子液增殖后诱变,从存活率 6.25% 的血平板上分离菌落并经三次纯化获得的菌株。

(二)种子培养基的改进

随着链激酶在医药上用量的增加和发酵规模的扩大,原三级种子培养基采用牛肉浸液,由于大量供应的困难,我们试验中采用了多种合成或半合成培养基进行替代,得到上列 1、2 号种子培养基,试用效果比较符合要求(表 2)。

表 2 种子培养基比较

培养基	菌 种	试验批号	发酵容量	效 价 (单位/毫升)	原培养基效价 (单位/毫升)
1 号	C ₂	711012	20 毫升	600	600
1 号	C ₂	711013	20 毫升	525	525
1 号	C ₂	711015	20 毫升	300	300
1 号	C ₂	730525	150 升	500	—
1 号	C ₂	730529	150 升	375	—
1 号	C ₂	730601	150 升	375	—
1 号	5Pu 309	730312	150 升	880	—
1 号	5Pu 309	730313	150 升	1120	—
1 号	5Pu 309	730315	150 升	675	—
2 号	5Pu 309	730323	20 毫升	900	900
2 号	3Pu 323	730405	20 毫升	900	900
2 号	3Pu 240	730315	20 毫升	830	700
2 号	3Pu 240	730606	150 升	1190	—
2 号	3Pu 240	730608	150 升	1190	—
2 号	3Pu 240	730614	150 升	680	—
2 号	3Pu 323	730609	150 升	800	—
2 号	3Pu 323	730612	150 升	680	—
2 号	3Pu 323	730613	150 升	900	—

结果指出,经采用1或2号种子培养基,接原菌种C₂发酵,链激酶产量平均仍为400—600单位/毫升,接3个诱变菌种发酵,链激酶产量平均仍为600—900单位/毫升。

(三)稳定性试验

在诱变育种工作中,常常出现这样的情况,一个菌株初分离时产量较高,但在接种传代过程中产量下降了,这可能是由于菌落不纯等原因所引起。我们筛选得到的5Pu 309等3个菌株,经连续传5—11代后,进行对比试验(表3),结果说明是相对稳定的。

表3 诱变菌种各代产酶量比较

菌株编号	代数	种子培养基	效价 (单位/毫升)
5Pu 309	2	1号	680
5Pu 309	3	1号	760
5Pu 309	4	1号	680
5Pu 309	5	1号	760
3Pu 323	2	2号	760
3Pu 323	3	2号	760
3Pu 323	4	2号	760
3Pu 323	5	2号	760
3Pu 240	3	原培养基	900
3Pu 240	5	原培养基	860
3Pu 240	7	原培养基	990
3Pu 240	9	原培养基	1050
3Pu 240	11	原培养基	1095

三、讨 论

应用微生物育种得到高产菌株,在抗菌素及食品等工业方面,已得到较好效果。但对于链球菌育种,目

前尚不多见。由于生产上需要,我们两个单位协作,初步采用诱变育种方法,使产生链激酶的 β -溶血性链球菌C₂。通过紫外线诱变处理并进行分离纯化,从570个菌株中筛选得到5Pu 309、3Pu 323及3Pu 240 3个新菌株,发酵链激酶产量每毫升600—900单位,较原菌种C₂发酵每毫升400—600单位提高50%。另外,还将该菌株进行二次紫外线或钴60、硫酸二乙酯或乙烯亚胺等物理、化学诱变剂处理,均未获得更好菌株。其他诱变剂或杂交育种等方法,还待今后工作中进一步探讨。

选用种子培养基,主要目的是革除牛肉浸液。鉴于溶血性链球菌是兼性厌氧菌,且营养要求较高,我们参考产生胶原酶的组织梭菌培养基^[7]并稍加改进,去除其中鸟嘌呤、生物素等对菌种影响不大的成份,而硫代乙醇酸或其钠盐系属必需成份,是为1号培养基。2号培养基需由血纤维蛋白配伍,但成份较简单。这二种培养基均可根据原料供应情况作为三级种子培养基代替牛肉浸液培养基,效果相似。

新菌株冷冻干燥保存二年仍保持原有产酶能力。

参 考 资 料

- [1] Tillett, W. S. and Garner, R. L.: J. Exp. Med. 58:485. 1933.
- [2] Christensen, L. R. and McLeod, C.M.: J. Gen. Physio. 28:363. 1945.
- [3] Johnson, A. J. and Tillett, W. S.: J. Exp. Med. 95:449. 1952.
- [4] Johnson, A. J. and McCarty, W. R.: J. Clin. Invest. 38:1627. 1959.
- [5] Verstratens: Drugs 5:353—6. 1973.
- [6] Brogden, B. N., Speight, T. M. and Avery, G. S.: Drugs 5:357—445. 1973.
- [7] Chiulli, A. J. and Wegman, E. H.: Brit patent 1, 192, 937. 1970.