

UV 与 NTG 复合诱变选育咪唑立宾高产菌

张祝兰* 唐文力 杨煌建 任林英 孙菲 郑榕

(福建省微生物研究所 福建省新药(微生物)筛选重点实验室 福建 福州 350007)

摘要: 为选育咪唑立宾的高产菌株, 对咪唑立宾产生菌 *Eupenicillium* sp. E-0509-2 的孢子分别进行了紫外线照射(UV)、亚硝基胍(NTG)和 UV + NTG 复合诱变处理筛选突变株。结果表明试验所确定的咪唑立宾产生菌的孢子诱变适宜条件为: 将孢子悬液在电磁搅拌下, 经紫外线照射处理 60 s 后, 以 3.0 g/L NTG 处理 20 min。经发酵筛选试验, 获得了一株遗传性状稳定、高产咪唑立宾的诱变菌株 *Eupenicillium* sp. E-UN41, 其咪唑立宾产量较出发菌株提高 13 倍。

关键词: 咪唑立宾, 正青霉菌, 复合诱变

Breeding of a High Mizoribine-producing Strain by Composite Mutation with UV and NTG

ZHANG Zhu-Lan* TANG Wen-Li YANG Huang-Jian REN Lin-Ying
SUN Fei ZHENG Rong

(Fujian Provincial Key Laboratory of Screening for Novel Microbial Products,
Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou, Fujian 350007, China)

Abstract: *Eupenicillium* sp. E-0509-2 was used as an original strain to carry out mutagenetic breeding adopting UV, NTG and UV + NTG, respectively. The spore suspension of E-0509-2 was treated by UV irradiation for 60 seconds, followed with 3.0 g/L NTG for 20 minutes under magnetic stirring. After further screening experiments on fermentation, a mutant *Eupenicillium* sp. E-UN41 which was able to produce mizoribine with high yield and could be stably passed on genetics was eventually found. The Mizoribine yield of *Eupenicillium* sp. E-UN41 was enhanced more than 13 times higher than that of the original strain.

Keywords: Mizoribine, *Eupenicillium*, Composite mutation

咪唑立宾(Mizoribine, MZ, bredinin)是 1971 年从霉菌 *Eupenicillium brefeldianum* 培养液中分离而得的一种咪唑类核苷^[1], 能特异性地抑制快速增长的淋巴细胞、如 T 细胞、B 细胞的分裂和增殖, 从而产生免疫抑制作用, 属新型免疫抑制剂^[2-4]。1984 年获日本厚生省批准用于肾移植后排异反应的预

防及治疗狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、肾病综合征及系统性红斑狼疮等^[5-6]。1991 年 12 月起在日本临床肾移植中应用, 咪唑立宾已广泛应用于临床肾移植, 取代硫唑嘌呤作为常规免疫抑制用药^[7-8]。我国近年来也将其作为肾移植抗排斥药用于临床。其主要副作用为胃肠道反应、血液系统障碍和过敏症

基金项目: 福建省科技重点项目(No. 2009R10003-3)

* 通讯作者: Tel: 86-591-83470740; ✉ jessylan9963@sina.com

收稿日期: 2009-12-16; 接受日期: 2010-03-11

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

状, 偶见骨髓功能抑制和急性肾功能衰竭。本课题组在筛选免疫调节剂过程中, 分离到一株产咪唑立宾的正青霉菌 *Eupenicillium* sp. E-0509-2, 该野生菌的发酵单位低, 难以实现工业化生产, 高产菌株的选育成为首要任务。我们以野生菌为出发菌株, 采用 NTG 作为诱变剂, 进行了常规的孢子诱变育种, 以期找出 NTG 诱变的最佳诱变剂量, 并选育出高产咪唑立宾的诱变菌株, 充分发挥菌株的遗传潜力, 大幅度提高菌株的咪唑立宾产量。

1 材料和方法

1.1 菌株

正青霉菌 *Eupenicillium* sp. E-0509-2, 由福建省微生物研究所提供。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基、平板培养基: 马铃薯培养基 (PDA)。

1.2.2 发酵培养基: 可溶性淀粉 2.5%, 葡萄糖 1%, 黄豆粉 2.0%, 麸质粉 0.8%, 玉米浆粉 0.6%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, pH 7.0。

1.3 诱变选育

1.3.1 孢子悬液的制备: 经 PDA 斜面培养基活化的出发菌株 E-0509-2, 转接 PDA 平板, 26°C 培养 10 d, 培养好的新鲜斜面生长物加适量的生理盐水, 用接种针洗下菌体, 移入小三角瓶内, 振荡 20–30 min, 完成后用带棉花塞的小漏斗过滤, 得到单孢子悬液。

1.3.2 诱变处理: (1) UV 诱变。一切操作在红光下或避光进行。在超净台上取孢子悬液 8 mL 于直径 9 cm 的带无菌搅拌子平皿中, 盖上皿盖, 将平皿置于磁力搅拌器上, 在距离 30 cm 的紫外灯 (30 W) 下开启磁力搅拌器, 打开皿盖, 边照射边搅拌, 分别照射 30、60、90、120 s。在无菌操作的条件下将诱变处理的菌悬液梯度稀释到 10^{-4} 至 10^{-6} , 从每个稀释度中取 0.1 mL/皿涂布于加有 20 mL PDA 的平皿上, 置 26°C 避光培养 10 d, 挑取单菌落。(2) NTG 诱变。称取亚硝基胍 (NTG, Fluka Inc.) 适量, 加少量的丙酮溶解后用 Tris 缓冲液 (pH 8.0 Tris-HCl) 配制成不同浓度 (1、3、6 g/L) 的 NTG 溶液; 用适量的已灭菌的 Tris 缓冲液制备单孢子悬液, 取单孢子悬液与 NTG 溶液按 1:1 混合, 于 26°C 振荡处理, 分别于

10、20、30、60 min 用 Tris 缓冲液稀释终止反应后梯度稀释涂平皿, 26°C 培养 10 d, 挑取单菌落。(3) NTG + UV 复合诱变。取经过 NTG 处理的孢子悬液 5 mL, 放入直径 6 cm 盛有无菌转子的平皿中, 在电磁搅拌下, 用紫外灯 (30 W, 距离 30 cm) 照射处理一定时间。照射完毕后, 在红灯下进行梯度稀释涂平皿, 26°C 避光培养 10 d, 挑取单菌落。

1.4 发酵

采用划线法将培养好的单菌落孢子接种于装有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 26°C、250 r/min 振荡培养 108 h。

1.5 检测

以 Sigma 公司产的咪唑立宾标准品作对照。发酵液离心, 上清液进行高效液相色谱 (HPLC) 检测, 以样品峰面积/标准液峰面积 \times 标准液浓度计算效价。HPLC 分离条件: 检测波长 210 nm, 色谱柱 Lichrospher NH_2 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , Hanban sci. & Tech.), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25°C。流动相 70 mmol/L KH_2PO_4 缓冲液 (用 H_3PO_4 调 pH 2.5): 乙腈 = 30:70 (V/V), 进样量 20 μL 。

2 结果

2.1 UV 照射时间的选择

试验中观察到, 菌株 E-0509-2 对紫外线敏感, 随着紫外线照射时间的延长, 菌株的致死率随之上升, 紫外照射时间 120 s, 孢子致死率达到 97.8%。紫外线的照射时间 60 s 致死率为 70.6%。以发酵效价高于出发菌株 110% 或低于出发菌株 90% 的诱变菌株为突变株, 紫外线处理 60 s 其正突变率最高, 见表 1。因此选择 60 s 的处理时间为紫外线合适的处理剂量。

表 1 不同 UV 照射时间对菌株致死率及突变率的影响
Table 1 Effects of different UV irradiation time on death rate and mutation rate

出发菌株 Original strain	UV 时间(s) UV radiation time (s)	致死率(%) Death rate (%)	总变异率(%) Total mutation rate (%)	正突变率(%) Positive mutation rate (%)
E-0509-2	Control	—	25.9	3.7
	30	29.2	37.3	21.4
	60	70.6	52.6	30.2
	90	91.7	48.9	26.7
	120	97.8	54.5	9.1

2.2 NTG 溶液浓度和时间的选择

化学超诱变剂 NTG 诱变的机理为通过烷化作用使菌体的碱基直接发生变化, 改变菌体的性状, 并使其生长迅速, 产咪唑立宾能力增强。本试验以 NTG 的浓度和处理时间作诱变剂量, 适宜剂量则以对咪唑立宾产生菌的致死率为指标进行选择。不同 NTG 溶液浓度和处理时间下菌株 E-0509-2 孢子致死率如表 2 所示。由表 2 可看出, 在 NTG 溶液浓度和处理时间对咪唑立宾产生菌 E-0509-2 孢子致死率的影响上, NTG 溶液浓度影响要大一些。应用不同浓度 NTG 对咪唑立宾产生菌悬液进行处理, 当其浓度超过 6.0 g/L、处理 30 min, 咪唑立宾产生菌 E-0509-2 孢子致死率达 98%以上。因此, 本试验选

表 2 NTG 诱变剂量与菌株致死率的关系
Table 2 The relationship between death rate and mutagen dose

NTG (g/L)	致死率 Death rate (%)			
	10 min	20 min	30 min	60 min
1.0	40.2	53.1	65.7	92.1
3.0	64.8	71.0	80.2	95.3
6.0	92.8	95.9	98.1	99.1

定 NTG 溶液浓度 3.0 g/L、处理 20 min 作为适宜诱变剂量(致死率为 71.0%), 对咪唑立宾产生菌进行 NTG 诱变。

2.3 NTG-UV 复合诱变突变株的筛选

本试验采用将咪唑立宾产生菌 E-0509-2 孢子悬液经过 3.0 g/L NTG、处理 20 min 后, 在电磁搅拌下, 用紫外灯(30 W, 距离 30 cm)照射处理 60 s, 以对咪唑立宾产生菌 E-0509-2 的孢子进行复合诱变; 同时, 以紫外线单独照射 60 s 和 3.0 g/L NTG 处理 20 min 作为对照。本试验通过对咪唑立宾产生菌 E-0509-2 的孢子进行多次诱变后, 涂布 PDA 固体培养基平板, 经初筛后共获得 313 株突变菌株(其中经紫外线单独诱变获得的突变株为 139 个, NTG 单独处理获得的突变株为 116 个, 紫外线和 NTG 复合处理获得的突变株为 58 个), 将初筛获得的正突变株通过摇瓶发酵培养进行复筛, 经 HPLC 定量分析后, 最后选出了 31 株咪唑立宾产量较出发菌株有非常明显提高的菌株, 其中在紫外线和 NTG 复合处理的平板上获得了一株咪唑立宾产量较出发菌株提高了 13 倍的突变株 E-UN41, 见表 3。

表 3 突变株的发酵水平比较
Table 3 Compare on mizoribine production of mutants with E-0509-2

Strains	Relative titer	Strains	Relative titer	Strains	Relative titer	Strains	Relative titer
E-U32	915	E-U112	1168	E-N171	1235	E-UN 41	1401
E-U51	1101	E-U119	1013	E-N178	1173	E-UN 86	1108
E-U61	1234	E-U123	1062	E-N183	1048	E-UN 95	1223
E-U82	1096	E-N58	979	E-UN 2	1128	E-UN 99	1194
E-U87	1172	E-N128	1063	E-UN 3	1288	E-UN 105	1153
E-U93	984	E-N130	1150	E-UN 19	1326	E-UN 117	1274
E-U104	1016	E-N133	1177	E-UN 22	1188	E-UN 122	1298
E-U107	993	E-N167	968	E-UN 26	1093	E-0509-2	100

2.4 菌株 E-UN41 斜面保藏对发酵效价的影响

为考察菌种斜面保藏时间的稳定性, 将菌株 E-UN41 接种于斜面培养基上, 待生长好后置于 4℃ 保藏, 测定保藏不同时间的菌株的发酵效价。结果以新鲜斜面为对照, 其保藏 10、20、30、60、90 d 的相对效价分别为 105%、112%、106%、97%、99%。结果表明菌种斜面在 4℃ 保藏 3 个月稳定。

2.5 菌株 E-UN41 传代试验

为考察菌株传代的稳定性, 对菌株 E-UN41 连续传代培养, 以 4℃ 冰箱保存 7 d 后生长良好的第一

代菌株为对照, 结果其第 1、2、3、4、5 代的相对单位分别为 100%、106%、99%、96%、98%, 表明菌株 E-UN41 传代对发酵水平无明显影响。提示该突变株遗传稳定性较好。

3 讨论

目前国内通过微生物生产咪唑立宾的研究正处于起步阶段, 仅有关亚鹏等^[9]采用均匀设计法优化咪唑立宾发酵培养基配方的报道, 尚未见咪唑立宾产生菌诱变选育方面的研究。为确定各诱变剂最适

的处理剂量,每一种诱变剂设置了一系列不同的处理剂量,对孢子悬液按诱变操作进行处理,平板分离后统计致死率。目前诱变育种比较倾向采用较低的剂量,以利于微生物正向突变的进行,本试验选择致死率在 70%–75%的诱变剂量来确定紫外线及 NTG 溶液的浓度和处理时间作为合适的处理剂量,同时亦发现该菌在致死率为 70%–75%的诱变剂量时正突变率最高。

随着分子生物学方法的不断进步,近年来出现了一些新的菌种选育方法,如重组技术等。但传统理化因子诱变育种的方法,因其具有简单、快速、有效等优点,至今仍被广泛使用^[10–12]。本文首次对咪唑立宾产生菌的孢子诱变条件进行系统的研究,并确定了其最佳条件。发现紫外线照射、NTG 和 UV + NTG 复合处理对咪唑立宾产生菌都有很好的诱变效果,但 UV + NTG 复合处理的效果更佳。采用 UV + NTG 复合诱变咪唑立宾产生菌孢子的方法筛选到 1 株比原出发菌株提高 13 倍的胞外高产咪唑立宾的突变菌株 *Eupenicillum* sp. E-UN41,为 *Eupenicillum* sp. 菌种诱变提供了可靠的途径。同时为今后进一步研究发酵法生产咪唑立宾打下基础。正青霉菌 E-UN41 主要是胞外产咪唑立宾,在试验中对菌丝提取粗提物并进行 HPLC 检测,发现胞内也有咪唑立宾产生,其效价不低于 100 mg/L,从该菌株发酵液的 HPLC 图谱中可以看出发酵产物大部分是咪唑立宾,菌株产咪唑立宾能力强,具有很好的应用价值和开发前景。

参考文献

- [1] 王文静. 免疫抑制药在器官移植中的应用概述. 中国药师, 2002, 5(9): 557–559.
- [2] 吴雪梅, 张富斌, 曹静懿. 新型免疫抑制剂——咪唑立宾. 中国临床药理学杂志, 2003, 12(3): 185–186.
- [3] 廖利民, 石炳毅, 梁春泉. 肾移植术后受者人巨细胞病毒感染与其它机会感染的研究. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9(3): 265–268.
- [4] 董亚琳, 董海燕. 免疫抑制剂咪唑立宾的药理作用及临床应用. 中国新药杂志, 2005, 14(7): 930–932.
- [5] 王意如. 免疫抑制剂研究新进展. 中国新药杂志, 2002, 11(7): 512–515.
- [6] Ishikawa H, Tsuchiya M, Itoh H. Mizoribine: experimental and clinical experience. Washington: American Chemical Society, 2003: 294–327.
- [7] 蓝荣培, 范昱, 谭建明, 等. 咪唑立宾在白细胞减少同种肾脏移植患者中的替代免疫抑制治疗. 现代泌尿外科杂志, 2004, 9(3): 142–143.
- [8] 钱叶勇, 石炳毅, 郝建华, 等. 咪唑立宾在肾移植术后的应用. 中华器官移植杂志, 2006, 27(12): 723–724.
- [9] 关亚鹏, 姜忻, 张莉, 等. 均匀设计法优化咪唑立宾发酵培养基配方. 中国抗生素杂志, 2008, 33(8): 471–473.
- [10] 梁亮, 邱雁临, 许进涛. 紫外线与亚硝酸钠复合诱变选育 L 组氨酸产生菌. 微生物学杂志, 2008, 28(2): 27–29.
- [11] 陈永浩, 王强. 透明质酸生产菌的诱变选育. 微生物学通报, 2009, 36(2): 205–210.
- [12] 蹇华丽, 钟武杰, 文有承, 等. 物化因子结合诱变选育耐温型法夫酵母. 微生物学杂志, 2009, 29(2): 77–79.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第 1 个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。