

产阿糖腺苷菌株的筛选

陈海龙 任美庄

(广州市微生物研究所)

黄观祥 朱瑞裴 池宏林 李诚玲

(广东省药物研究所, 广州)

据文献报道,阿糖腺苷与干扰素合并使用,治疗病毒性肝炎疗效可达70%左右^[1-3]。国外市场上提供的阿糖腺苷是以发酵法生产为主^[4]。1983年以来,我们从广东省微生物研究所以及美国农业部农业研究所等单位索取了32个菌株,从中筛选产阿糖腺苷的菌株。经过摇瓶发酵试验,通过纸层析、紫外光谱及高压液相色谱分析,与阿糖腺苷标准品比较,证明有三株菌可以产生阿糖腺苷及阿糖腺苷的类似物,现简报如下。

材料与方 法

(一) 菌株

从广东省微生物研究所得到的链霉菌(*Streptomyces*): AS 4.189、AS 4.583、AS 4.392、AS 4.743、AS 4.166、AS 4.393、AS 4.190、AS 4.495、AS 4.557、AS 4.1、AS 4.163、AS 4.462、AS 4.223、AS 4.393、AS 4.360、AS 4.748、AS 4.198、AS 4.891、AS 4.223、AS 4.744、AS 4.52、AS 4.713、AS 4.322、AS 4.794、AS 4.724、AS 4.201、AS 4.242、AS 4.807、AS 4.555、AS 4.567、MIK 4.1。

链霉菌 NRRL 3.228 来自美国农业部农业研究所。

(二) 培养基

1. 斜面培养基: 克氏一号合成培养基^[4]。
2. 茄子瓶培养基: 同上。
3. 发酵培养基(g): 酵母膏 1, 牛肉膏 1, 酪蛋白胰蛋白酶水解物 2, 葡萄糖 10, 水 1000 ml, pH 7.3, 15 磅 30 分钟蒸汽灭菌。

(三) 发酵条件

菌种转接斜面 28℃ 下培养 7 天,转入茄瓶培养,28℃ 培养 7 天,每茄子瓶接入 2 个 5000 ml 发酵培养基中,28℃ 往复摇床振荡培养 14 天。

(四) 发酵产物的提取

发酵液经 3000 r/min 离心 30 分钟,取上清液减压浓缩为 1/10,用 4N NaOH 调至 pH7.2,用活性炭吸附 60℃ 烘烤 30 分钟,再用电动搅拌机搅拌 1 小时,3000r/min 离心沉淀 30 分钟,弃去上清液,加适量双蒸馏水洗涤,再以 3000 r/min 离心 30 分钟,弃去上清液,用 50% 丙酮提取,提取液以 3000 r/min 离心 30 分钟,留取上清液(I),沉淀物加 50% 丙酮提取。沉淀物再以 3000r/min 离心 30 分钟,留取上清液(II),沉淀物加 50% 丙酮提取,同样步骤提取上清液(III)。把上清液 I、II、III 混合减压浓缩。

(五) 分析方法

1. 纸层析: 上行层析,中速滤纸。展开剂为正丁醇:冰乙酸:水 = 50:20:30。点样后,5 小时后吹干。荧光灯下检查斑点,浸泡过夜后作紫外测定。

2. 柱层析

①纤维素处理: DEAE-cellulose 无离子水浸泡过夜,3000r/min 离心 30 分钟,弃去上清液,重复三次后,用 0.5 N LiCl 浸泡洗二次(减压抽滤)。再以无离子水 3000 r/min 离心 30 分钟减压抽滤 3—5 次。取洗涤水 1—2 ml 加 1% 硝酸银检查至无氯离子,用重蒸馏水浸泡保存于冰箱。

②装柱: 将处理好的 DEAE-纤维素溶液搅拌均匀,缓慢倾入玻璃柱中,自然沉降,用大量无离子水洗至无小颗粒析出,接通核酸分析仪 (HD-76-6)。

结 果

所测 32 个菌株中有 3 株产生阿糖腺苷,其中以 NRRL 3228 效果最好,测定结果如下。

(一) 紫外吸收测定

标准品(Ara-A)吸收峰为 259 nm、208 nm,发酵液提取样品为 259nm、207nm(图 1)。

(二) 结晶纯品的熔点测定

标准品文献值为 258—259℃,发酵液提取样品为 251—257℃。

(三) 高压液相测定

标准样品 Ara-A:2 分 54 秒。化学合成样品为 2 分 37.5 秒。发酵液提取样品为 2 分 50 秒(图 2)。

(四) 结晶产率

1000 ml 发酵液提取出阿糖腺苷 2mg,这与文献报道相差较大,如果要达到工业生产水平,尚需进行诱变育种以提高单位产量。

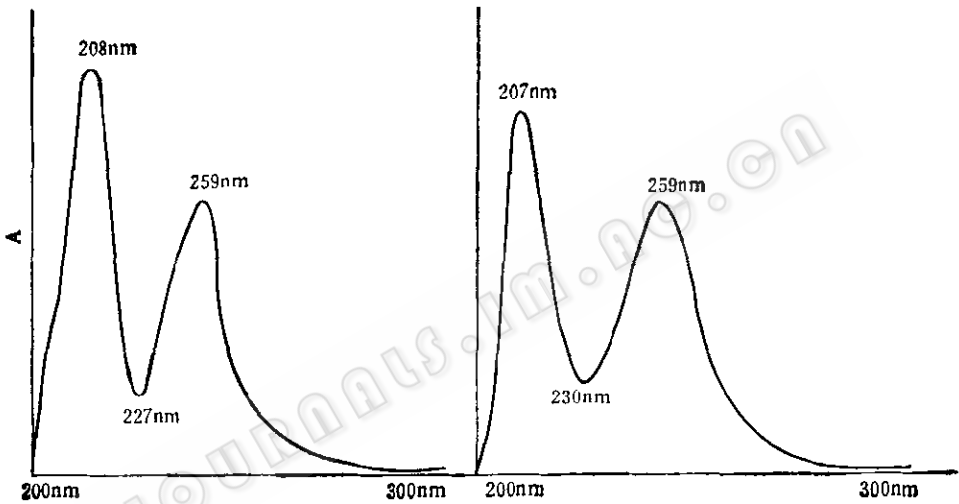


图 1 紫外线测量图谱(标准品和发酵产品)
左: A-A 标准品,右: DEAE-纤维素柱纯化样品

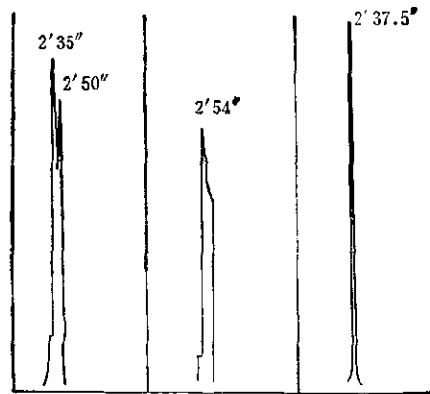


图 2 高压液相测定图谱
左: 发酵样品,中: 标准品,右: 合成样品

参 考 文 献

- [1] Smith, C. I. et al.: *JAMA*, 247(16): 2261—2265, 1982.
- [2] Thomas, H. C. et al.: *Prog. Clin. Biol. Res.*, 143: 379—393, 1983.
- [3] Goto, Y. et al.: *Japanese J. Med. Sci. Biol.*, 37(1): 9—18, 1983.
- [4] Patent Specification: 1159290, CL:-CO 7d 99/04.