

尿苷产生菌的选育

程远超, 刘康乐, 徐庆阳

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300222)

摘要: 以野生型枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) TJ374为出发菌株, 采用DES(硫酸二乙酯)及UV(紫外)诱变处理, 筛选具有 $2TU^r$ (2-硫尿嘧啶抗性)和 $6AU^r$ (6-氮尿嘧啶抗性)及 UP^- (尿苷磷酸化酶缺失)标记的菌株, 获得一株尿苷产生菌Tc142, 36℃摇瓶发酵72h最高可产尿苷 $3.34g \cdot L^{-1}$ 。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 尿苷; 菌种选育

中图分类号: TQ929; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)01-0020-03

The Breeding of Uridine Producing Strain

CHENG Yuan-chao, LIU kang-le, XU Qing-yang

(College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: A mutant *Bacillus subtilis* Tc142 producing uridine was obtained by DES and subsequent UV mutagenesis using wild type *Bacillus subtilis* TJ174 as the parent strain. The mutant Tc142 has been marked with $2TU^r$ 、 $6AU^r$ and UP^- , using which, uridine content in the fermentive liquor at 36℃ after 72 h reached $3.34g/L$.

Key words: *Bacillus subtilis*; Uridine; Breeding

尿苷是重要的合成药物的中间体^[1], 可以修复导致疾病的破损基因, 提高机体抗体水平, 促进和改善脑细胞代谢, 可以阻断各种癌细胞和病毒复制时的基因合成, 并被用于制造氟尿嘧啶、脱氧核苷、碘苷、溴苷、氟苷等特效生物药物。国际上, 日本有两家公司供应发酵法生产的尿苷产品, 但其供应的产品数量较少, 且售价偏高。国内仅上海太平洋生物高科技公司一家曾采用RNA水解法生产尿苷, 由于工艺落后, 成本高, 现已停产。预计国内市场年需求量约30t, 国际市场150t, 而世界目前年产量还不足50t, 所以发酵法生产尿苷市场前景看好, 出口创汇可观。

传统的嘧啶核苷的生产是使用核糖核酸(RNA)经化学方法水解, 然后制备两种嘧啶核苷, 这不仅需要大量的优质RNA原料, 而且两种嘌呤核苷(腺苷和鸟苷)及两种嘧啶核苷(胞苷和尿苷)都必须平衡产销, 否则成本价会很高^[1]。而发酵法则是借助于微生物, 通过诱变扩大其合成核苷的能力, 从而能够大规模地单一地根据市场需求生产尿苷, 降低此类药物的生产成本。1980年代至1990年代中期, 日本科学家开始发表发酵法生产尿苷的成果, 而国内尚无这方面研究成果报导。本文主要研究了尿苷生产菌株的诱变选育。

1 材料与方法

收稿日期: 2006-08-24

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) TJ374, 由天津科技大学应用微生物实验室提供。

1.2 培养基

基本培养基^[2](g/L): 葡萄糖 5、柠檬酸钠 1、 $(NH_4)_2SO_4$ 2、 KH_2PO_4 6、 K_2HPO_4 14、 $MgSO_4$ 0.2、琼脂 20。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 40、蛋白胨 10、酵母膏 10、玉米浆 10ml、 $MgSO_4$ 0.5、 KH_2PO_4 0.5。

发酵培养基^[2,3](g/L): 葡萄糖 120、尿素 20、玉米蛋白粉 7、玉米浆 30ml、豆浓 5ml、 $CaCl_2$ 0.5、 $MgSO_4$ 0.5、 KH_2PO_4 0.5、 $CaCO_3$ 5。

1.3 诱变筛选方法

1.3.1 菌悬液的制备

新鲜斜面菌种接种于肉汤摇瓶, 34℃培养 8~10h, 以 10%的接种量转接于肉汤摇瓶, 34℃培养至对数生长前期, 离心收集细胞; 磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗涤 3 次; 用装有玻璃珠的三角瓶振荡 30min 分散细胞后, 稀释成 10^8 个/mL 的菌悬液。

1.3.2 UV 诱变育种

按参考资料略作改进^[4]。

1.3.3 DES、UV 复合诱变育种^[4]

取 20mL 菌悬液用 1%DES 30℃、160r/min 处理 30min, 离心、洗涤、适当稀释后进行 UV 诱变。

1.3.4 筛选方法

经诱变处理过的菌悬液,适当稀释后,根据所要求得到的不同突变株,分别作不同的处理。长出菌落后再经过点接不同培养基平板对比检出所需要的突变株。

1.4 培养方法

种子培养:取斜面 34℃活化 24h 的新鲜菌种,接入种子培养基 36℃、170r/min 培养 8~10h。

发酵培养:取种子菌液按 10%接种量接入发酵培养基,36℃、220r/min 培养 72h。

1.5 测定方法

采用高效液相(HPLC)方法测定发酵液中尿苷产量:色谱柱:5C18-150A,4.6mm×150mm,流动相:4%乙腈+96%纯净水,柱温:30℃,流速:0.5ml/min。吸收波长:262nm。

2 结果

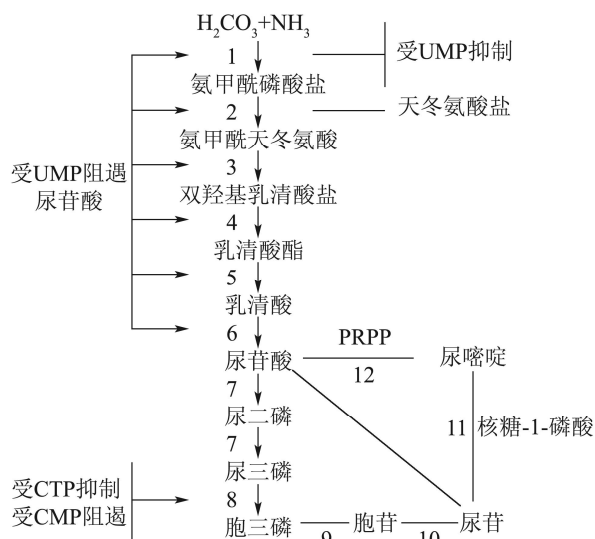


图1 枯草芽孢杆菌嘧啶核苷酸生物合成及代谢调控^[1,7]

1- 氨甲酰磷酸合成酶 P; 2- 天冬氨酸氨甲酰转移酶; 3- 二氢乳清酸酶; 4- 二氢乳清酸脱氢酶; 5- 乳清酸磷酸核糖转移酶; 6- 乳清酸脱羧酶; 7- 尿苷酸激酶; 8- 胞三磷合成酶; 9- 5' 2 核苷酸酶 (非专一性磷酸酯酶); 10- 胞苷脱氨酶; 11- 尿苷磷酸化酶; 12- 尿嘧啶磷酸核糖基转移酶。

如图 1, 根据枯草芽孢杆菌嘧啶核苷酸生物合成及代谢调控机制, 首先筛选尿嘧啶缺陷型菌株, 从中选出产乳清酸和乳清苷酸最多的一株, 即得到嘧啶核苷代谢流较大的菌株, 然后筛选具有 2-硫尿嘧啶抗性 (2TU^r) 和 6-氮尿嘧啶抗性 (6AU^r) 的菌株, 解除尿苷酸对氨甲酰磷酸合成酶 P、天冬氨酸氨甲酰转移酶、二氢乳清酸酶、二氢乳清酸脱氢酶、乳清酸磷酸核糖

转移酶、乳清酸脱羧酶的阻遏^[1,5,6], 以扩大嘧啶核苷代谢流; 从中选出产尿嘧啶和尿苷总量最多的一株, 选育尿苷磷酸化酶缺失 (UP⁻) 菌株, 以切断尿苷进一步代谢, 使其得到积累。从中筛选具有 2TU^r+6AU^r+UP⁻ 的菌株。

2.1 尿嘧啶缺陷株的获得

以野生型枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) TJ374 为出发菌株, 经 DES 处理 (致死率控制在 80% 左右)^[4]后, 将限制性培养基平板上长出的单菌落以依次点样法点在①MM、②MM+尿苷 (20μg/ml)、③MM+尿嘧啶 (20μg/ml) 上, 在培养基①、②上不生长, 在培养基③上长的菌落再重复点接操作, 在培养基①、②上不生长, 在培养基③上长的菌落即为尿嘧啶缺陷型菌株。经过摇瓶发酵考核, 筛选出一株菌 No.28, 积累乳清酸、胞苷、尿苷总和最多, 见表 1。

表 1 尿嘧啶缺陷菌株嘧啶物质产量/g·L⁻¹

菌种编号	乳清酸	胞苷	尿苷	总量
TJ174	0.10	0.00	0.00	0.10
No.28	1.34	0.26	0.31	1.91
No.07	0.62	0.37	0.15	1.24
No.11	1.09	0.05	0.33	1.47
No.12	1.13	0.18	0.17	1.48
No.17	0.73	0.14	0.38	1.25
No.44	1.14	0.09	0.23	1.46
No.51	0.72	0.06	0.27	1.05

2.2 2TU^r 菌株的获得

将 No.28 经 DES、UV 处理后的菌悬液收集细胞, 生理盐水洗涤三次, 涂布在 MM+2TU (0.1mg/ml)^[1]平板上, 筛选出产胞苷、尿苷和尿嘧啶最多的一株菌, 作为下一步得出发菌株, 逐步加大 2TU 药物选择压力, 筛选抗不同 2TU 浓度的菌株, 最后确定最适抗性浓度为 0.6g/L, 获得一株菌 No.607 产嘧啶类物质 1.14g/L, 见表 2。

表 2 2TU^r 菌株嘧啶类物质产量/g·L⁻¹

菌种编号	选择压力/(g/L)	胞苷	尿苷	尿嘧啶	总量
No.28	—	0.26	0.31	0.00	0.57
No.117	0.1	0.13	0.26	0.44	0.83
No.332	0.3	0.06	0.39	0.51	0.96
No.607	0.6	0.05	0.36	0.73	1.14
No.011	1.0	0.17	0.30	0.68	1.15

2.3 2TU^r+6AU^r 菌株的获得

将 No.607 经 DES、UV 处理后的菌悬液收集细胞, 生理盐水洗涤三次, 涂布在 MM+2TU (0.6mg/ml)+6AU (1mg/ml)^[1]平板上, 筛选出产

胞苷、尿苷和尿嘧啶最多的一株菌,作为下一步得出发菌株,逐步加大 6AU 药物选择压力,筛选抗不同 6AU 浓度的菌株,最后确定最适抗性浓度为 5g/L (含 6AU 5g/L 的 MM 平板在 4℃时有一定量 6AU 析出,更高浓度的 6AU 溶液常温下难以制得),获得一株菌 No.2 产嘧啶类物质 3.86g/L,见表 3。

表 3 2TU^r+6AU^r菌株嘧啶类物质产量/g·L⁻¹

菌种编号	6AU 选择压力/g·L ⁻¹	胞苷	尿苷	尿嘧啶	总量
No.607	0.0	0.05	0.36	0.73	1.14
No.2143	1.0	0.06	0.25	1.23	1.54
No.2209	2.0	0.05	0.15	1.76	1.96
No.2316	3.0	0.07	0.23	2.14	2.44
No.2421	4.0	0.06	0.31	2.65	3.02
No.2547	5.0	0.05	0.33	3.48	3.86

2.4 2TU^r+6AU^r+UP^r菌株的获得

得到的 2TU^r+6AU^r菌株 No.2547 的发酵主产物是尿嘧啶,这样就必须使其缺失尿苷磷酸化酶活性以阻断尿苷到尿嘧啶的转化,使目的产物尿苷得到积累,同时减少副产物尿嘧啶的积累。胸苷磷酸化酶也能催化尿苷尿嘧啶的相互转化,所以尿苷磷酸化酶缺失并不会造成尿嘧啶缺陷。将 No.2547 经 DES、UV 复合诱变处理后,适当稀释,涂布在限制性培养基+2TU (0.6mg/ml)+6AU (5mg/ml) 平板上恒温培养,然后将平板上长出的单菌落点接到①MM+2TU (0.6mg/ml)+6AU (5mg/ml)、②MM+2TU (0.6mg/ml)+6AU (5mg/ml)+尿苷 (10mg/ml)、③MM+2TU (0.6mg/ml)+6AU (5mg/ml)+尿嘧啶 (50mg/ml) 上培养 5~7d,在①②上生长很差,而在③上生长较好的菌既是 2TU^r+6AU^r+UP^r菌株,做标记鉴定,选出遗传稳定的一株 2TU^r+6AU^r+UP^r菌 Tc142,可产尿苷 3.34g/L,尿嘧啶 0.06g/L。

3 讨论

作为尿苷产生菌,解除UMP对嘧啶核苷代谢前六步关键酶阻遏的2-硫尿嘧啶抗性和6-氮尿嘧啶抗性以及阻断尿苷到尿嘧啶的进一步代谢的尿苷磷酸化酶缺失标记是最重要的遗传特性,但高产菌种的获得还需要其它一些必要的缺陷型。从枯草芽孢杆菌尿苷生物合成途径上看,尿苷的前体物天冬氨酸和氨基甲酰磷酸盐与高丝氨酸的代谢关系十分密切^[8],具体的生物合

成途径如图2所示。

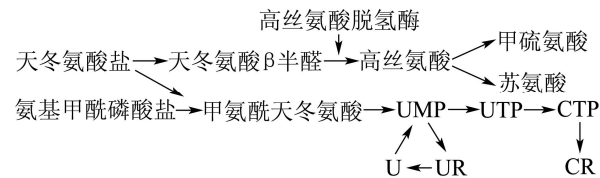


图 2 尿苷、天冬氨酸盐和相关氨基酸的生物合成途径^[8]

为了阻塞分支代谢途径,可通过传统诱变选育高丝氨酸脱氢酶缺失突变株,或将菌株的高丝氨酸脱氢酶基因敲除,即使其不再产生甲硫氨酸和苏氨酸,那么将有较多的天冬氨酸盐参与尿苷的生物合成,提高尿苷产量。

本菌株经过诱变初步获得了一些所需的标记,与亲株相比有较大的提高,抗性菌株的获得,其发酵能力确实有较大提高,但与文献报道有差距。目前所得菌种还不适合大规模工业化生产,仍需要进一步的筛选。另发酵工艺条件的改进也是提高尿苷产量的一条重要途径,在这方面需要在今后的工作中作深入研究。

参考文献

- [1] 焦瑞身,乔宾福.微生物工程[M].北京:化学工业出版社,2003
- [2] Satoru Asahi,Yutaka Tsunemi.Cytidine production by mutants of *Bacillus subtilis*[J]. Biosci.Biotech.Biochem.1994,58 (8), 1399-1402
- [3] Maneharu Doll. Opimization of Conditions for Production of Uridine by a Mutant of *Bacillus subtilis* [J].Biosci. Biotech. Biochem., 1994 ,58(9) :1 608-1 612
- [4] 杜连祥.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学出版社,1992:168-180
- [5] 张克旭,陈宁,张蓓等.代谢控制发酵[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998
- [6] 张克旭,杜连祥译. 核酸发酵[M]. 北京:中国轻工业出版社,1987
- [7] Qi Meng, Robert L. Switzer. Regulation of Transcription of the *Bacillus subtilis* pyrG Gene,Encoding Cytidine Triphosphate Synthetase [J]. Journal of Bacteriology. Oct. 2001: 5513 -5522
- [8] 乔宾福.微生物产生核苷和核酸[J].工业微生物,1998,28 (1): 22-27