



鸟苷产生菌解淀粉芽孢杆菌的选育

吴 飞, 史建明, 谢希贤, 陈 宁

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 出发菌 GR001 通过形态观察、生理生化实验、16S rDNA 同源性序列分析及部分特异性基因序列分析鉴定为解淀粉芽孢杆菌。以 GR001 为出发菌, 通过化学诱变选育出一株遗传标记为腺嘌呤营养缺陷、6-巯基嘌呤抗性以及蛋氨酸亚砷抗性 ($Ade^- + MSO^r + 6-MP^r$) 的突变株 GR600。以 GR600 为受体菌, 采用原生质体转化法获得转化子 GR607 ($Ade^- + MSO^r + 6-MP^r + km^r$), 鸟苷产量高达 20.82 g/L。

关键词: 鸟苷; 解淀粉芽孢杆菌; 诱变; 原生质体

中图分类号: Q815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2010)02-0001-04

Breeding of Strain *Bacillus amyloliquefaciens* for Guanosine-Producing

WU Fei, SHI Jian-ming, XIE Xi-xian, CHEN Ning

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: According to the characteristics of morphology, physiology and biochemistry experiment and the comparison of 16S rDNA and pur-operon sequence, original strain GR001 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. A mutant GR600 ($Ade^- + MSO^r + 6-MP^r$) was obtained from GR001 by DES treatment. GR600 as a recipient, with the method of protoplast transformation, a transformant GR607 ($Ade^- + MSO^r + 6-MP^r + km^r$) was obtained, guanosine production can reach 20.82 g/L.

Keywords: guanosine; *Bacillus amyloliquefaciens*; mutation; protoplast

鸟嘌呤核苷 (Guanosine) 又名 9-β-D-呋喃核糖基鸟嘌呤, 简称鸟苷。鸟苷在食品和医药领域都有广泛的应用。鸟苷是生产鸟苷酸的重要原料, 鸟苷酸和肌苷酸具有呈味性, 且与谷氨酸钠有协同效应, 混合制成的强力味精鲜味可提高数倍至数十倍, 成为食品工业中最佳形式的调味品。鸟苷是利巴韦林、阿昔洛韦、无环鸟苷、三氧唑核苷、三磷酸鸟苷钠等核苷类抗病毒药物的重要原料。目前, 利巴韦林等核苷类抗病毒药物因不易产生耐药性、活性强、副作用少, 已在治疗流感、口腔疱疹、流行性出血热、乙型脑炎、病毒性肝炎等疾病方面得到广泛应用^[1-3]。目前, 鸟苷需求以每年 10%~20% 的速度增加, 市场前景非常乐观。

随着 20 世纪 60 年代对核苷酸发酵研究的开展, 日本研究者发现枯草芽孢杆菌等可以在发酵液中积

累核苷类物质^[4]。随后的研究得到了一系列积累嘌呤核苷的芽孢杆菌, 并阐明了芽孢杆菌嘌呤核苷的代谢途径, 取得了很大的成就。Matsui 等^[5]对鸟苷产生菌进行了一系列研究, 解释了抗甲硫氨酸亚砷、得夸菌素、狭霉素 C、磺胺胍等突变体积累鸟苷的机制, 将枯草芽孢杆菌 No.1411 诱变为抗蛋氨酸亚砷 (MSO^r) 突变株, 选育出 No.14119 鸟苷高产菌株可以积累 9.6 g/L 的鸟苷。国内, 张蓓等^[6]以枯草芽孢杆菌 NK₃ 为亲株, 采用紫外线原生质体诱变技术, 获得了具有腺嘌呤缺陷、抗 8-氮杂黄嘌呤等遗传标记的鸟苷产生菌 NK3-249, 在最佳发酵条件下平均积累鸟苷达 12 g/L。

目前国内的主要鸟苷生产菌产鸟苷能力较低, 使发酵法生产鸟苷成本居高不下, 影响鸟苷生产的发

收稿日期: 2009-09-03; 修回日期: 2009-12-03

基金项目: 国家科技重大专项课题 (2008ZX09401-05)

作者简介: 吴 飞 (1984—), 男, 江西南康市人, 硕士研究生; 通信作者: 陈 宁, 教授, ningch@tust.edu.cn.

展. 因此, 加强对鸟苷菌种的选育研究获得鸟苷高产菌具有重要意义. 本文所出发菌 GR001 具有初始积累 0.81 g/L 鸟苷的能力, 通过形态观察、生理生化实验、16S rDNA 同源性序列分析及部分特异性基因序列分析, 鉴定该菌为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*). 以 GR001 为出发菌, 在代谢工程理论指导下, 通过化学诱变及基因工程手段选育出一株遗传标记为 $Ade^- + MSO^+ + 6-MP^+ + km^+$ 的鸟苷高产菌 GR607.

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

出发菌株 GR001 由天津科技大学代谢工程研究室保存; 大肠杆菌 XL1-Blue 感受态细胞购于北京 Biomed 公司.

质粒 pDG148 由天津科技大学代谢工程研究室保存.

1.2 培养基

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 牛肉膏 3, $(NH_4)_2SO_4$ 2, KH_2PO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.01, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 玉米浆 30 mL, pH 7.0 ~ 7.2, 7.5×10^4 Pa 灭菌 15 min.

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 120, 酵母粉 10, $(NH_4)_2SO_4$ 30, KH_2PO_4 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.01, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, 玉米浆 50 mL, pH 7.0 ~ 7.2, 7.5×10^4 Pa 灭菌 15 min.

1.3 主要试剂

DES、鸟苷 (标样)、腺嘌呤、6-巯基嘌呤、蛋氨酸亚砷, 北京 Solarbio 公司; 质粒 DNA 提取试剂盒及 PCR 反应等各种试剂, 北京 Biomed 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京 TIANZD 公司.

1.4 出发菌 GR001 的菌种鉴定

形态观察与染色: 细菌在 LB 平板上 37 °C 恒温培养 2 d, 观察菌落形态, 进行革兰氏染色和芽孢染色, 在光学显微镜下观察个体形态.

生理生化鉴定: 采用 Biolog 微生物自动鉴定仪测定.

16S rDNA 同源性分析: 正向引物为 16f: 5'-GAG AGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物为 16r: 5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3', 得到的 PCR 产物用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒纯化并委托北京 Biomed 公司测序.

嘌呤操纵子序列同源性分析: 根据 KEGG 公布的解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) FZB42 全基因序列^[7]设计引物对嘌呤操纵子进行 PCR 扩增, PCR 产物用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒纯化并委托北京 Biomed 公司测序.

1.5 菌种选育与工程菌构建方法

DES 诱变, 见参考文献[8].

重组质粒的构建中涉及的质粒提取、PCR 扩增、DNA 片段的回收、酶切、纯化、与载体的连接、转化等操作参见文献[9]相关内容.

原生质体的制备、再生和原生质体转化, 参见文献[10].

1.6 种子培养和摇瓶发酵

摇瓶种子培养: 500 mL 三角瓶中培养基装液量 25 mL, 36 °C、140 r/min 摇床培养 8 h, 稀释 20 倍使其 A_{600} 为 0.6 ~ 0.8.

摇瓶发酵: 500 mL 带挡板的三角瓶中培养基装液量 30 mL, 接种量 10%, 36 °C、220 r/min 摇床培养 12 h 后补加氨水, 维持 pH 在 6.4 ~ 6.7, 40 h 补加葡萄糖维持残糖在 1% ~ 3%, 60 h 发酵结束后测定鸟苷产量.

1.7 分析方法

葡萄糖采用 SBA-40C 生物传感仪测定.

鸟苷发酵液预处理及标样配制: 精确量取 1 mL 发酵液, 用 pH 12 的 NaOH 溶液充分溶解可溶物质 (沸水浴 10 min 即可), 并定容至 100 mL, 12 000 r/min 离心收集上清液; 标样用 pH 12 的 NaOH 溶液溶解, 分别配制成 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L 的质量浓度.

鸟苷含量采用反向液相色谱法测定. 测定条件: 色谱分离柱为 Agilent Eclipse XBD C₁₈ (3.5 μm, 4.6 mm × 150 mm), 流动相为 4% 乙腈, 流量为 1.2 mL/min, 检测波长 260 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL.

2 结果

2.1 出发菌 GR001 的菌种鉴定

2.1.1 菌体特征及菌落特征

菌体呈短杆状, 染色均匀, 具运动性, 兼性厌氧, 可形成内生芽孢, 孢囊膨大呈椭圆形, 游离芽孢表面着色弱, 革兰氏染色呈阳性. 在 LB 培养基上呈白色不透明菌落, 表面粗糙, 菌落边缘不规则.

2.1.2 生理生化鉴定

采用 Biolog 微生物自动鉴定仪鉴定菌株 GR001 为芽孢杆菌属, 其中与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amy-*

loliquefaciens)及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)最为相似,相似性大于98%。

2.1.3 16S rDNA 同源性鉴定

将 PCR 所测得的 16S rDNA 大小为 1 545 bp 序列在国际核酸数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 中进行同源序列搜索. 结果显示,同源性较高的菌株为 *Bacillus amyloliquefaciens* 及 *Bacillus subtilis* 的同源性大于 98%。

2.1.4 嘌呤操纵子序列同源性分析

将测序所得嘌呤操纵子 13 000 bp 序列在国际核酸数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 中进行同源序列搜索. 结果显示,与 *Bacillus amyloliquefaciens* 的同源性为 95%,与 *Bacillus subtilis* 的同源性为 81%。

综合上述结果并参考文献[11],鉴定 GR001 菌株为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。

2.2 鸟苷生产菌株的选育

在代谢工程理论指导下,通过对出发菌解淀粉芽孢杆菌 GR001 鸟嘌呤核苷代谢途径分析得到该菌的理想载流途径^[12]见图 1。

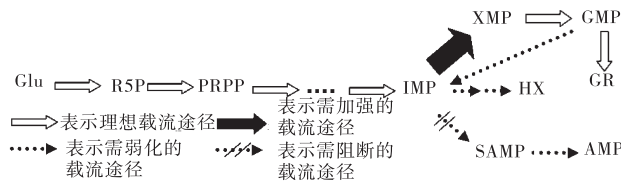


图 1 鸟苷生产菌代谢途径示意图

Fig.1 Metabolic pathway of guanosine-producing strain

2.2.1 诱变育种

鸟嘌呤核苷酸生物合成途径中的关键酶有磷酸核糖焦磷酸(PRPP)转酰胺酶、肌苷酸(IMP)脱氢酶和腺苷琥珀酸(SAMP)合成酶. 其中磷酸核糖焦磷酸(PRPP)转酰胺酶特异性地受 AMP 和 ADP 完全反馈抑制,受 IMP、GMP、ATP 抑制较弱;IMP 生物合成酶系受嘌呤系化合物的反馈阻遏. 采用 DES 诱变选育腺嘌呤营养缺陷株,阻断 IMP 至 AMP 途径,通过限量添加腺嘌呤(发酵培养基中酵母粉供给),从而解除腺嘌呤对嘌呤操纵子的反馈阻遏及嘌呤合成途径中关键酶 PRPP 转酰胺酶的反馈抑制,有利于重要中间产物 IMP 的积累,从而提高鸟苷积累量。

鸟嘌呤核苷酸合成的前体物 PRPP 是由葡萄糖经 HMP 途径合成的中间产物,HMP 途径活跃的菌株可以提高 PRPP 的量. 关键酶磷酸核糖焦磷酸激酶催化 5'-磷酸核糖转化为 PRPP,而其受到嘌呤系化合物的反馈抑制. 因此,要加强 HMP 途径,必须解除嘌呤

系化合物对磷酸核糖焦磷酸激酶的反馈调节. 通过选育 6-巯基嘌呤抗性突变株,可解除磷酸核糖焦磷酸激酶所受的反馈调节,增强HMP 途径. 蛋氨酸亚砷是蛋氨酸结构类似物,比 IMP 和 GMP 对 5'-核苷酸酶的亲和性高很多倍,通过选育蛋氨酸亚砷抗性突变株,可以使 IMP 对肌苷酸(IMP)脱氢酶的亲和性提高,从而能够抑制鸟苷生物合成途径中副产物肌苷的积累. 蛋氨酸亚砷抗性突变株还可部分解除 GMP 对 IMP 脱氢酶的反馈抑制,减弱 GMP 对肌苷酸(IMP)脱氢酶表达的反馈阻遏,减轻 GMP 对嘌呤操纵子转录的弱化作用及嘌呤合成途径中关键酶磷酸核糖焦磷酸转酰胺酶的反馈抑制。

对出发菌 GR001 进行 DES 化学诱变依次赋予腺嘌呤营养缺陷、6-巯基嘌呤抗性以及蛋氨酸亚砷抗性株($Ade^- + MSO^+ + 6-MP^r$)遗传标记,最后经分离纯化获得一株鸟苷高产菌GR600,其定向选育谱系见图 2。

| 菌株 | 鸟苷产量/(g·L ⁻¹) |
|---------------------------|---------------------------|
| 解淀粉芽孢杆菌GR001 | 0.81 |
| ↓ 1%DES, 30 min | |
| GR133(Ade^-) | 9.62 |
| ↓ 1%DES, 30 min | |
| GR450(Ade^+MSO^+) | 13.55 |
| ↓ 1%DES, 30 min | |
| GR600($Ade^+MSO^+MP^r$) | 16.22 |

图 2 鸟苷生产菌 GR600 诱变谱系

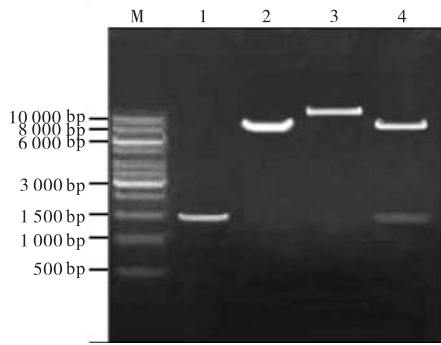
Fig.2 Rational breeding of guanosine-producing strain GR600

2.2.2 鸟苷工程菌的构建

肌苷酸(IMP)脱氢酶是鸟苷合成途径中的关键酶,是整个鸟苷合成中的限速步骤. 提高该基因的表达可加强 IMP 到 GMP 途径代谢流,使鸟苷积累量提高^[13-14]。

根据 KEGG 发布的解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 基因序列设计一对引物(P1: 5'-GAGAGTCGACGAGGGGATTACTAATGTG-3', P2: 5'-GAGAGCATGCTTATGAAATTGTAT-3'),对 GR001 的肌苷酸(IMP)脱氢酶的编码基因 *guaB* 进行 PCR 扩增得到大约 1 500 bp 的片段. 经测序与解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 的肌苷酸(IMP)脱氢酶的编码基因 *guaB* 比较,编码氨基酸完全相同. 用 *SalI* 和 *SphI* 双酶切该片段及载体 pDG148,采用凝胶电泳分别切胶回收纯化;双酶切片段与载体 pDG148 用 T4 连接酶 16 °C 过夜连接,将连接产物加入大肠杆菌 XL1-Blue 感受态细胞中转化筛选转化子. 验证确认构建成功后提取重组质粒. 采用原生质体转化法将质粒导入 GR600 中利用卡那霉素

抗性(km^r)筛选出转化子 GR607. 电泳结果见图 3.



M. 1 000 bp Marker; 1. *guaB* PCR 产物; 2. 重组质粒 pDG148-*guaB* 未酶切; 3. 重组质粒 pDG148-*guaB* 经 *Sa*I 单酶切; 4. 重组质粒 pDG148-*guaB* 经 *Sa*I 和 *Sph*I 双酶切.

图 3 重组质粒琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoretogram of recombinant plasmid

2.2.3 鸟苷工程菌 GR607 遗传稳定性验证

将工程菌 GR607 进行单菌落分离,然后连续摇瓶传代 20 代,并进行遗传标记验证和摇瓶发酵产苷实验,结果见表 1. 由表 1 结果可知,工程菌 GR607 通过液体摇瓶连续转接 20 代菌株的遗传标记和产苷能力稳定,可用于进一步研究.

表 1 GR607 遗传稳定性及产苷验证结果

Tab.1 Genetic characteristic and productivity of GR607

| 传代次数 | 1 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 遗传标记 | + | + | + | + | + | + |
| 产量/(g·L ⁻¹) | 20.30 | 20.82 | 19.20 | 20.31 | 19.88 | 19.75 |

注:“+”表示具有“Ade⁻+MSO^r+6-MP^r+km^r”遗传标记.

3 结 语

运用核酸代谢调控理论,采用传统诱变育种与现代分子生物学手段相结合的方法,阻断嘌呤代谢过程中腺嘌呤合成,获得腺嘌呤营养缺陷型突变株,解除腺嘌呤对嘌呤操纵子的反馈阻遏及嘌呤合成途径中关键酶磷酸核糖焦磷酸(PRPP)转酰胺酶的反馈抑制;筛选 6-巯基嘌呤抗性以及蛋氨酸亚砷抗性株解除了嘌呤类物质对关键酶的反馈抑制;通过将 *Bacillus amyloliquefaciens* GR001 染色体 DNA 中的肌苷酸(IMP)脱氢酶基因 *guaB* 克隆到载体 pDG148 中,并转化至生产菌中加强 IMP 到 GMP 途径;使得工程菌的核酸代谢流向积累鸟苷的方向,选育出一株遗传标记为 Ade⁻+MSO^r+6-MP^r+km^r 的鸟苷高产菌 GR607. 在未经优化的摇瓶发酵条件下,最高可产鸟苷 20.82 g/L.

参考文献:

- [1] 应国清,石陆娥,唐振兴. 核苷酸的生产及其在医药食品中的应用[J]. 食品研究与开发,2004,25(4):120-123.
- [2] 王浩,武钦佩. 核苷类抗病毒化合物的研究进展[J]. 生命科学仪器,2006,4(1):11-14.
- [3] 张文婷,倪孟祥,张绍谭. 核苷类抗病毒药物进展[J]. 抗感染药学,2005,2(2):55-59.
- [4] Momose H, Nishikawa H, Katsuya N. Regulation of purine nucleotide synthesis in *Bacillus subtilis*. I. Enzyme repression by purine derivatives[J]. Gen App Microbiol, 1964(10):343-349.
- [5] Matsui H, Sato K, Enei H, et al. Mutation of an inosine-producing strain of *Bacillus subtilis* to DL-methionine sulfoxide resistance for guanosine production[J]. Appl Environ Microbiol, 1977,34(4):337-341.
- [6] 张蓓,张克旭,王健,等. 基于途径分析的鸟苷发酵条件优化[J]. 云南大学学报:自然科学版,2004,26(6A):74-78.
- [7] Chen X H, Koumoutsi A, Scholz R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Nat Biotechnol, 2007,25(9):1007-1014.
- [8] 陈宁,张克旭,王东洋,等. *L*-谷氨酸生产菌的选育及其发酵条件的研究[J]. 发酵科技通讯,2002,31(1):11-13.
- [9] 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 赛德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 马学军, 舒跃龙, 译. 4 版. 北京: 科学出版社, 2005:20-26.
- [10] 杜连祥. 工业微生物学实验技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2006:195-196.
- [11] Buchanan R E, Gibbens N E. 伯杰氏细菌鉴定手册 [M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》翻译组,译. 8 版. 北京:科学出版社,1984:729-751.
- [12] 周昌平,王健,陈宁. 鸟嘌呤核苷高产菌的育种策略[J]. 生物技术通讯,2004,15(5):527-529.
- [13] Glesne D A, Collart F R, Huberman E. Regulation of IMP dehydrogenase gene expression by its end products, guanine nucleotides[J]. Mol Cell Biology, 1991,11(11):5417-5425.
- [14] Miyagawa K, Kimura H, Nakahama K, et al. Cloning of the *Bacillus subtilis* IMP dehydrogenase gene and its application to increased production of guanosine[J]. Bio Technology, 1986,4:225-228.