

文章编号: 1673-1689(2010)03-0416-05

# 一株他克莫司产生菌的筛选及鉴定

李玲, 陈林, 杨文革, 管珺, 胡永红\*

(南京工业大学 制药与生命科学学院, 南京 210009)

**摘要:** 添加 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  和 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素对土样进行预处理, 采用抑菌圈法初筛得到 71 株能抑制白色假丝酵母生长的菌株, 高效液相色谱法检测代谢产物复筛, 获得一株他克莫司产生菌株。对菌株形态学特征、培养特征、生理生化特征、细胞化学组分和 16S rDNA 序列进行分析。结果表明: NJYH2618 为革兰氏阳性菌, 生长温度 15~ 38  $^\circ\text{C}$ , 最适生长温度 28  $^\circ\text{C}$ , 生长 pH 6.5~ 8.5, 最适 pH 7.0, 能利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、果糖、乳糖、鼠李糖等常见碳源。细胞水解产物成分和 16S rDNA 序列分析表明, 此菌株属链霉菌属, 命名为 *Streptomyces* sp. NJYH2618。

**关键词:** 他克莫司; 鉴定; 链霉菌; 16S rDNA

中图分类号: Q 939

文献标识码: A

## Isolation and Identification of a Tacrolimus Producing Strain

LI Ling, CHEN Lin, YANG Wen-ge, GUAN Jun, HU Yong-hong\*

(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** In order to isolate a tacrolimus producing strain, soil samples were initially treated with 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  and 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  benzylpenicillin. Seventy-one actinomycetes were isolated by anti-fungal activity against *Candida albicans* then the metabolites origin from those isolations were further analysis by HPLC. Among these, only one tacrolimus producing strain was determined. It was identified by culture characteristics, morphological characteristics, physiological, biochemical properties and 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis. The screened strain was gram-positive, the growth temperature ranged from 15  $^\circ\text{C}$  to 38  $^\circ\text{C}$  (the optimum was 28  $^\circ\text{C}$ ); the growth pH ranged from 6.5 to 8.5 (the optimum at 7.0). The strain can grown on glucose, sucrose, maltose, xylose, fructose, lactose and rhamnose. Based on the results of the general taxonomical characteristics and the 16S rDNA sequence, the isolated has proven to be *Streptomyces* and named *Streptomyces* sp. NJYH2618.

**Key words:** tacrolimus, identification, *Streptomyces*, 16S rDNA

他克莫司 (tacrolimus), 是一种大环内酯类免疫抑制剂<sup>[1]</sup>。1984 年首次由日本藤泽制药从筑波链霉菌 (*Streptomyces tsukubaensis* No. 9993) 的发酵培养基中发现<sup>[2]</sup>, 之后国内外进行了他克莫司的基础和临床研究, 1993 年 4 月正式确认了其在“抑制肝脏移植排斥反应”方面所具有的作用和疗效,

之后国内外进行了他克莫司的基础和临床研究, 1993 年 4 月正式确认了其在“抑制肝脏移植排斥反应”方面所具有的作用和疗效,

收稿日期: 2009-03-26

基金项目: 国家 863 计划项目 (2007AA02Z211)。

\* 通讯作者: 胡永红 (1968-), 女, 江苏南通人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事发酵工程、酶工程及生物分离工程方面的研究。Email: hyh@njut.edu.cn。

同年5月正式投放国际市场。他克莫司与环孢菌素的作用机制相似,具有高效低毒、副作用小等优点。除了在抑制器官移植排斥反应方面具有显著疗效外,还广泛应用于斑秃、牛皮癣、银屑病、鱼鳞病、糖尿病、白塞氏病、变应性皮炎、类风湿性关节炎以及多发性硬化病等自身免疫疾病的治疗<sup>[3]</sup>。

作者从不同地区的土壤中分离得到一株他克莫司产生菌,通过对其形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞化学组分以及16S rDNA序列进行分析,确定其为链霉菌。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 土样来源 土样采集自南京、海南、合肥等地。

1.1.2 指示菌 抗菌活性测定所用指示菌为白色假丝酵母(*Candida albicans* ATCC10231),购自广东省微生物菌种保藏中心。

1.1.3 主要试剂和仪器 他克莫司标准品:购自Sigma公司;其他试剂:均为化学纯和分析纯,色谱分析所用试剂:色谱纯;高效液相色谱仪:DIONEX P680 购自美国戴安公司制造;CX-31 电子显微镜:购自日本奥林巴斯株式会社制造;Fresco 离心机:购自 Heraeus 公司;PCR 仪:购自 Eppendorf 公司;PYX-DHS 隔水式电热恒温培养箱:购自上海跃进医疗器械厂;HYG-IIa 迴转式恒温调速摇瓶柜:购自上海欣蕊自动化设备有限公司。

### 1.1.4 培养基

1) 高氏一号培养基:可溶性淀粉 20 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, NaCl 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g, 琼脂粉 20 g, 水 1 000 mL, pH 7.0。

2) PDA 培养基:去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 20 g, 水 1 000 mL, pH 自然。

以上培养基于 1.01 × 10<sup>5</sup> Pa 高压下, 121 °C 蒸气灭菌 15~20 min。

### 1.2 菌株分离和培养

将采集的土样室温风干,用研钵研碎,60 目筛子过筛,添加 75 μg/mL K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>和 2 μg/mL 青霉素,混合均匀后于 120 °C 干热 1 h<sup>[4]</sup>,冷却备用。分离时选用高氏一号培养基。取一定量处理后的土样平铺于灭过菌的光滑硬纸板上,纸面积略大于培养皿的口径,将多余的土轻轻倾去,见纸板上有一层细土粒粘附即可。接种时将倒好培养基的皿盖微微揭开,将土壤纸板粘土面向下轻轻插入并覆盖

其上,用皿盖微微触动一下纸板并立刻抽出,盖好皿盖即接种完毕。28 °C 恒温培养 7 d,挑取菌落大、气生菌丝丰茂的单个菌落于发酵培养基(高氏一号)中,28 °C、200 r/min 培养 5 d。将发酵液离心(室温 8 000 r/min 离心 10 min),取上清液,进行代谢产物抗菌活性测定。

### 1.3 初筛——代谢产物抗菌活性检验

将筛选菌发酵液上清液与 PDA 培养基混合,配成不同质量浓度的发酵液培养基,倒入直径 9 cm 的消毒培养皿中,制成平板,同时离心空白发酵培养基,将上清液和无菌水代替发酵上清液作为对照。将培养 2 d 的白色假丝酵母菌块( $d=0.6\sim 0.8$  cm)接入平板中央;也可取 0.1 mL 筛选菌发酵液于 PDA 培养基平板上,用三角涂布棒涂布均匀,直接将假丝酵母菌块接入平板中央,有菌的一面朝下<sup>[5]</sup>。接种后置恒温培养箱中 28 °C 培养,每隔 24 h 按十字交叉法测量菌落直径,观察菌落颜色、生长情况、菌核有无生成等。

### 1.4 复筛——代谢产物的鉴定

将初筛得到的具有抑菌活性的菌株摇瓶培养,将甲醇和发酵液按 1:1 的比例混合,摇匀,振荡 10 min, 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液作为待测样品。高效液相色谱(HPLC)条件:高效液相色谱仪 DIONEX P680, 色谱柱 Kromasil C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为  $V_{\text{异丙醇}}:V_{\text{水}}=35:65$ , 流速为 1.0 mL/min, 柱温 50 °C, 检测波长 220 nm。将初筛菌株代谢产物的 HPLC 图谱与标准品图谱进行比较分析,确定代谢产物的种类<sup>[6]</sup>。

### 1.5 形态特征

采用插片法观察<sup>[7]</sup>,菌株置于高氏一号培养基平板上,28 °C 培养 7 d,用显微镜观察并描述菌株的形态特征。

### 1.6 培养特征

在 28 °C,以 6 种常用的培养基培养 7~12 d<sup>[8]</sup>,观察菌株基内菌丝和气生菌丝在各种培养基上的形态特征、有无可溶性色素产生及生长状况等。

### 1.7 生理生化特征

参照文献[9],测定菌株的生理生化特征。

### 1.8 细胞化学成分分析

采用薄层板层析法(TCL)<sup>[10]</sup>,对菌株的细胞进行全细胞水解液的氨基酸和糖型分析。

### 1.9 16S rDNA 序列分析及其系统发育分析

DNA 提取参照文献[11],采用通用引物 Pf(5'-AGAGTTT GATCATGGCTCAG-3')和 Pr(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 16S rD-

NA 的 PCR 扩增<sup>[12]</sup>。PCR 反应条件: 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min 40 s, 共 32 个循环。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 回收条带送宝生物工程(大连)有限公司测序。将该序列通过 BLAST 程序与 GenBank 中的核酸数据进行对比分析, 利用 ClustalX (Version 1.8) 和 MEGA 2.0 软件进行多序列比对及系统发育树构建, 明确菌株 NJYH2618 的分类地位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的分离、筛选

放线菌的培养时间较长, 筛选时比较容易被细菌、真菌和霉菌干扰而不易筛出。为降低杂菌干扰, 作者通过对土样 120 °C 干热 1 h, 添加 75 μg/mL  $K_2Cr_2O_7$  和 2 μg/mL 青霉素进行预处理。从土样中初筛得到 31 株对白色假丝酵母 (*Candida albicans*) 有抑制作用的菌株, 对这 31 株菌的代谢产物进行高效液相色谱分析, 通过与标准品图谱(保留时间 10.560 min) 比较, 发酵液 HPLC 图谱中 10.787 min 的图谱峰极可能是他克莫司, 由此获得一株他克莫司产生菌 NJYH2618, 见图 1。

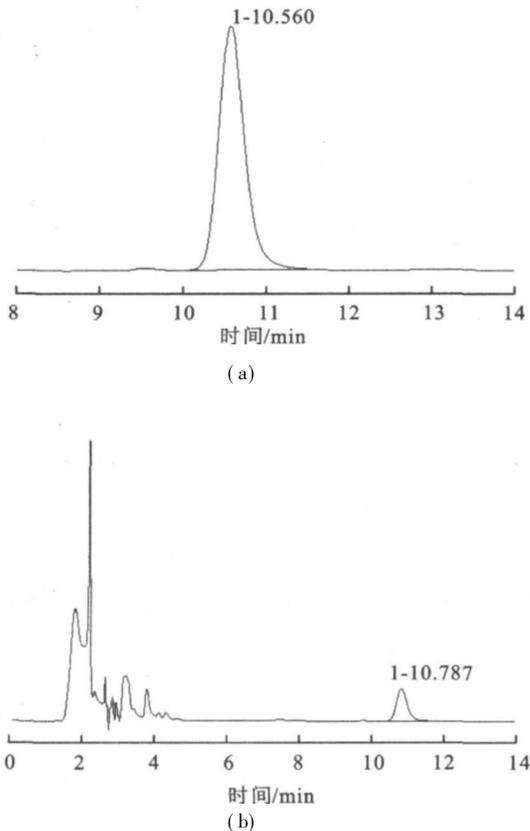


图 1 他克莫司标准品(a)和 NJYH2618 发酵液 HPLC 图谱(b)

Fig. 1 HPLC profile of tacrolimus standard and fermentation broth of the strain NJYH2618

### 2.2 形态观察

此菌株为革兰氏阳性菌, 高氏一号琼脂培养基上 28 °C 培养 8 d。从图 2 可以看出: 菌落正面为青灰色, 反面为暗黄色, 菌落干燥, 不透明, 表面形状褶皱, 菌落与培养基连接紧密, 难以挑取。采用插片法, 在光学显微镜下观察(放大 400 倍), 基内菌丝发育良好, 无横隔, 不断裂; 气生菌丝生长良好, 多分枝, 孢子丝直或柔曲。

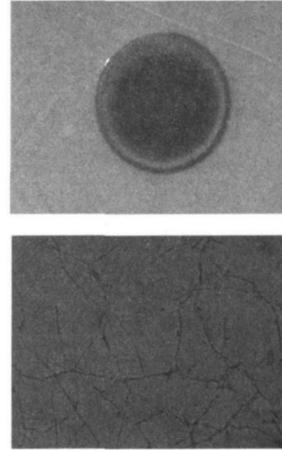


图 2 菌株 NJYH2618 的菌落及菌丝形态(400×)  
Fig. 2 Morphological characteristics of the strain NJYH2618(400×)

### 2.3 培养特征和生理生化特征

表 1 为菌株 NJYH2618 在不同培养基上的生长情况, 其中在 PDA 培养基上生长良好, 气生菌丝青灰色, 基内菌丝黄褐色, 有黄褐色色素产生。

生理生化实验结果见表 2, 菌株 NJYH2618 能使明胶液化, 牛奶酪化, 淀粉水解; 不能使牛奶凝固; 该菌能在 15~38 °C 范围内生长, 最适生长温度 28 °C; pH 生长范围为 6.5~8.5, 最适 pH 7.0; 能利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、果糖、乳糖、鼠李糖等常见碳源。

表 1 菌株 NJYH2618 的培养特征

Tab. 1 Cultural properties of strain NJYH2618

培养基	基内菌丝	气生菌丝	可溶色素	生长状况
高氏一号	青灰	黄灰	黄褐	良好
克氏一号培养基	白	乳白	无	良好
PDA 培养基	铅灰	黄褐	黄褐	很好
肉汤培养基	白	黄褐	黄褐	良好
察氏培养基	白	黄灰	黄褐	良好
燕麦片培养基	白	黄褐	黄褐	良好

表2 菌株 NJYH2618 的生理生化特征

Tab. 2 Physiological and biochemical properties of strain NJYH2618 agar block method

性质	描述	性质	描述
明胶液化	+	葡萄糖	+
牛奶凝固	-	蔗糖	+
牛奶胨化	+	乳糖	+
淀粉水解	+	果糖	+
产色素	+	木糖	+
生长温度	15~ 38 ℃	麦芽糖	+
最适生长温度	28 ℃	鼠李糖	+
pH 值	6.5~ 8.5	山梨糖	-
最适 pH 值	7.0	棉籽糖	-

注: + 生长或者利用; - 不生长或者不利用

## 2.4 细胞化学成分分析

菌株 NJYH2618 全细胞水解产物中含 L-DAP、甘氨酸和天冬氨酸等氨基酸, 含葡萄糖、半乳糖和核糖等糖类。这些特征与链霉菌属特征相符

合, 命名为 *Streptomyces* sp. NJYH2618。

## 2.5 16S rDNA 序列分析及其系统发育分析

对 NJYH2618 菌株的 16S rDNA 的扩增片段进行测序, 长度为 1 433 bp, 登录 GenBank (Accession number: FJ842651), 用 Blast 进行同源性分析, 发现菌株 NJYH2618 与链霉菌属 (*Streptomyces*) 菌株高度相关, 说明该菌株属链霉菌属。选取同源性最高 (99%) 的 11 株菌株, 利用 ClustalX (Version 1.8) 和 MEGA2.0 软件进行多序列比对及系统发育树构建, 用 Neighbor-Join 法得到系统进化发育树见图 3。在系统发育树中, NJYH2618 和 *Streptomyces alboniger* NBRC12738, *Streptomyces moderatus* NBRC 13432 聚为一簇。到目前为止, 已报导的他克莫司产生菌有以下 4 种<sup>[13-15]</sup>: *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces kanamyceticus*, *Streptomyces glaucescens* 和 *Streptomyces clavuligerus*, NJYH2618 在进化树中的位置与这 4 株菌不同。

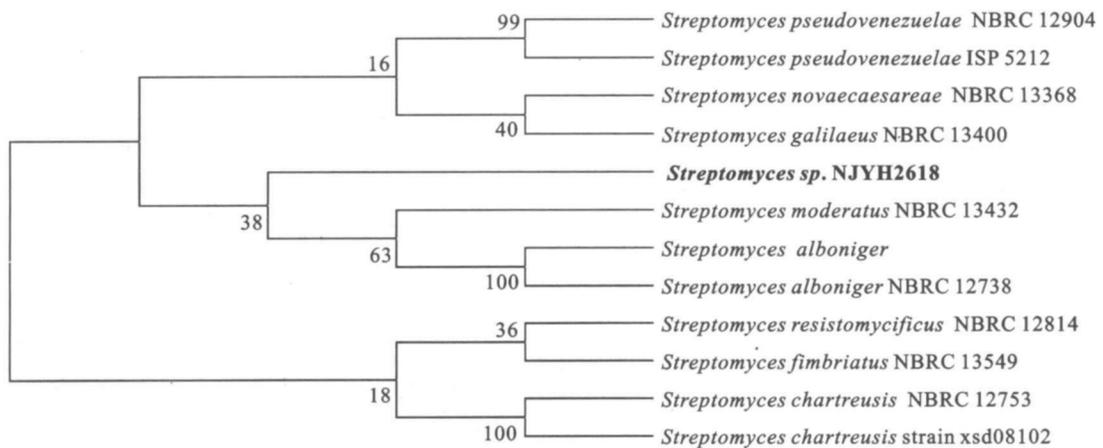


图3 菌株 NJYH2618 与相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain NJYH2618 and its relatives

## 3 结 语

作者利用平板初筛、摇瓶复筛, 从土壤中筛选了一株他克莫司产生菌株, 经鉴定该菌株为链霉菌 *Streptomyces* sp. NJYH2618。通过对其形态特征、培养特征、生理生化特性以及 16S rDNA 序列进行分析, 确定其分类地位。迄今为止, 中国关于发酵法产他克莫司的研究较少, 尚未有工业化的报

道, 关于此菌株的研究工作正在进行中。抗生素发酵除受营养因素的限制以外, 合适的发酵条件也是不可忽视的重要因素。今后的工作可以考虑从以下几个方面展开: 对他克莫司发酵条件中一些主要影响因素进行分析; 优化产物的分离提纯工艺; 对菌株代谢过程进行研究, 明确发酵培养基中各成分的利用情况与菌丝生长和发酵液活性之间的关系, 从而有效地提高他克莫司产量。

## 参考文献(References):

- [ 1 ] Kino T, Hatanaka H, Miyata S, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*: immunosuppressive effect of FK-506 in vitro[J]. **J Antibiotics**, 1989, 40: 1256- 1265.
- [ 2 ] Tanaka H, Kuroda A, Marusawa H, et al. Structure of FK-506: a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces* [J]. **J Am Chem Soc**, 1987, 109: 5031- 5033.
- [ 3 ] 杨文革, 管璐, 胡永红. 发酵法产他克莫司的研究进展[J]. 现代化工, 2008, 28(2): 34- 37.  
YANG Wen-ge, GUAN Jun, HU Yong-hong. Progress in fermentation of tacrolimus[J]. **Modern Chemical Industry**, 2008, 28(2): 34- 37. (in Chinese)
- [ 4 ] 司美茹, 薛泉宏, 来航线. 放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制方法研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 61- 65.  
SI Mei-ru, XUE Quan-hong, LAI Hang-xian. Studies on selection of the isolation medium for actinomycetes and inhibition methods to miscellaneous microorganism[J]. **Microbiology**, 2004, 31(2): 61- 65. (in Chinese)
- [ 5 ] Sat Oshi Omura, Yuzuru Iwai, Yoko Takahashi, et al. Herkimycin, a new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*[J]. **Journal of Antibiotics**, 1979, 32(4): 254- 261.
- [ 6 ] YEO Joon Yoon, CHA Yong Choi. Nutrient effects on FK-506, a new immunosuppressant, production by *Streptomyces* sp. in a defined medium[J]. **J Ferment Bioeng**, 1997, 83: 599- 603.
- [ 7 ] 沈萍, 范秀容, 李广武, 等. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 40- 41.
- [ 8 ] Park D H, Kim J S. *Streptomyces luridiscabiei* sp. Nov. which cause potato common scab disease in Korea[J]. **Int J Sys Evol Micmbiol**, 2003, 53: 2049- 2054.
- [ 9 ] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 296- 1246.
- [ 10 ] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerophilic actinomycetes[J]. **J Gen Appl Microbiol**, 1983, 29: 319- 322.
- [ 11 ] Osborn F, Blinder R, Justin R E, et al. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 39- 40.
- [ 12 ] 钟义华, 唐蕾, 吴亢, 等. 具有 $\beta$ -半乳糖苷酶转苷能力的菌株筛选及鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 83- 85.  
ZHONG Yi-hua, TANG Lei, WU Kang, et al. Screening and identification of  $\beta$ -galactosidase producing microorganism with transgalactosylation activity[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(5): 83- 85. (in Chinese)
- [ 13 ] Hideyuki Muramatsu, Seri Intan Mokhtar, Masaaki Katsuoka, et al. Phylogenetic analysis of immunosuppressant FK 506-producing *Streptomyces* strains[J]. **Actinomycetologica**, 2005, 19: 33- 39.
- [ 14 ] Ranbaxy Laboratories Limited. Production of tacrolimus using new *Streptomyces* species [P]. America: WO2005038009A2, 2005-04-28.
- [ 15 ] CKD Bio Corp. Microorganism producing tacrolimus and mass-productive method tacrolimus using the same[P]. America: WO2005063963A1, 2005-07-14.

(责任编辑:李春丽)