

研究报告

一株产钙调磷酸酶抑制剂链霉菌 CZW-15 的 筛选鉴定及发酵条件研究

吴鹏飞 周亮 刘俊麟 崔志峰*

(浙江工业大学生物与环境工程学院 浙江 杭州 310032)

摘要:【目的】筛选产钙调磷酸酶抑制剂的放线菌菌株。【方法】通过酵母报告基因(*CDRE::LacZ*)高通量筛选模型与人体钙调磷酸酶试剂盒检测相结合的方法,从土壤放线菌中筛选产钙调磷酸酶抑制剂的菌株;根据形态和培养特征、生理生化实验以及 16S rRNA 基因序列比对进行菌株鉴定;采用单因素实验和正交实验对发酵条件进行优化。【结果】从土壤中筛选得到一株产高活性钙调磷酸酶抑制剂的放线菌 CZW-15,经鉴定属于链霉菌属(*Streptomyces*)。酵母报告基因检测显示其发酵上清液对依赖酵母钙调磷酸酶的报告基因表达抑制活性 IC_{50} 为 7.4 mL/L,而对照药物 FK506 的 IC_{50} 为 65 μ g/L。该菌的最佳摇瓶发酵配方为(%):玉米粉 2、酵母粉 0.1、 K_2HPO_4 0.04、 $MgSO_4$ 0.04、NaCl 0.05、 $FeSO_4$ 0.001;发酵条件为:初始 pH 7.5,温度 28 $^{\circ}C$,转速 180 r/min,装液量 50 mL/250 mL,接种量 4%,培养时间 4 d。优化后 1.5 μ L 发酵上清液对依赖酵母钙调磷酸酶的报告基因表达抑制活性达到 117%,比优化前提高 4.5 倍。【结论】CZW-15 属于链霉菌属,该菌产生高活性的抑制酵母钙调磷酸酶的活性物质。

关键词: 放线菌, 钙调磷酸酶, 抑制剂, 筛选, 发酵条件

Screening, identification and fermentation conditions optimization of *Streptomyces* CZW-15 with inhibitory activities on calcineurin

WU Peng-Fei ZHOU Liang LIU Jun-Lin CUI Zhi-Feng*

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310032, China)

Abstract: [Objective] To screen actinomycetes strains with calcineurin inhibitory activity. [Methods] Actinomycetes strains with calcineurin inhibitory activity were screened by a yeast report gene (*CDRE::LacZ*) based high throughput screening model and a calcineurin phosphatase assay kit. The isolated actinomycetes strains were indentified by morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. And the fermentation conditions were optimized by single factor and orthogonal experiment. [Results] Strain CZW-15 with high inhibitory activity on calcineurin was isolated from soil, and it belongs to the *Streptomyces* spp.. Yeast report gene assay showed that the fermentation supernatant of CZW-15 inhibited yeast calcineurin-dependent gene

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(No. LY12C14008)

*通讯作者: Tel: 86-571-88320741; 信箱: zfcui@zjut.edu.cn

收稿日期: 2015-02-26; 接受日期: 2015-04-16; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-14

expression with $IC_{50}=7.4$ mL/L, and the IC_{50} of FK506 was 65 μ g/L. The optimum fermentation conditions of CZW-15 were as follows: 2% corn flour, 0.1% yeast extracts, 0.04% K_2HPO_4 , 0.04% $MgSO_4$, 0.05% NaCl, 0.001% $FeSO_4$, at initial pH of 7.5, 28 °C, 180 r/min, liquid volume 50 mL in 250 mL flask, inoculation size of 4% for 4 d. At the optimum conditions, the calcineurin inhibitory activity of 1.5 μ L fermentation supernatant of CZW-15 reached 117%, increased 4.5 times. **[Conclusion]** CZW-15 belongs to *Streptomyces* spp., and produces highly active substances with calcineurin inhibitory activity.

Keywords: Actinomycetes, Calcineurin, Inhibitor, Screening, Fermentation conditions

钙调磷酸酶(Calcineurin, CN)是一种在真核生物中高度保守的受 Ca^{2+} /钙调素(CaM)调节的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶。在人体中,钙调磷酸酶作为 Ca^{2+} 信号途径调节的信号酶,在免疫调节、学习记忆、细胞信号转导和肌肉量调节等方面起重要作用^[1-3]。钙调磷酸酶抑制剂如他克莫司(FK506)和环孢素 A (CosA)是目前临床上使用最广泛的免疫抑制剂^[4]。但这些药物仍具有较大的毒副作用,如肾毒性、高血糖等多种不良反应^[5-7],急需开发低毒高效的新型钙调磷酸酶抑制剂。

近年来,Prescott 等报道从消炎镇痛类中药材石蚕香科(*Teucrium chamaedrys*)和假荆芥属(*Nepeta cataria*)中分离得到的咖啡酸苯乙醇苷(Teucroside)、毛蕊花糖苷(Verbascoside)和苯丙素苷(Lamioside A)不需任何的亲免疫蛋白,能直接抑制钙调磷酸酶活性^[8]。Wang 等从中草药中发现山奈酚(Kaempferol)和槲皮素(Quercetin)在体外或 Jurkat 细胞中均能与钙调磷酸酶的催化亚基结合,非竞争性直接抑制钙调磷酸酶^[9-10]。陈东生等发现中草药菝葜提取物具有抑制钙调磷酸酶的活性,可有效抑制 T 细胞活化核因子(NFAT)脱磷酸化反应,阻止 IL-2 等基因转录^[11]。从天然物质筛选钙调磷酸酶抑制剂已成为新的研究热点^[12-13]。

放线菌作为天然生物活性物质的宝库,从中筛选钙调磷酸酶抑制剂是一条行之有效的途径。临床上广泛使用的他克莫司(FK506)和环孢素 A (CosA)均来源于微生物^[14-15]。本研究从杭州的土壤中筛选到一株产高活性的钙调磷酸酶抑制物质的放线菌,并对其进行了菌种鉴定和发酵条件优化,可能具有较好的开发应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株及质粒: 酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae* WHU2d (*Mata trp1Δ*, *ade2Δ*, *leu2Δ*, *ura3Δ*, *his3Δ*)由日本广岛大学宫川都吉教授惠赠。质粒 pAMS366 (*pLG178-4X-CDRE::Cyc1::LacZ*)由美国斯坦福大学 Cyert 教授惠赠。酵母报告基因 (*CDRE::LacZ*)菌株 CHW-1 由本实验室将质粒 pAMS366 导入 WHU2d 菌株后获得和保存。

1.1.2 样品采集: 样品采集时间为 2013 年 10 月下旬,在杭州市植物园、小和山、西溪湿地等地随机布点采样 30 份土样。

1.1.3 主要试剂和仪器: FK506 (他克莫司)购自 Sigma 公司; ONPG (邻硝基苯 β -D-半乳糖苷)、Taps (三羟甲基氨基丙磺酸)、Lysozyme (溶菌酶)、dNTPs、*Taq* 酶等购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 人体钙调磷酸酶试剂盒购自 Enzo life sciences 公司; PCR 仪购自德国 Biometra 公司; 酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.1.4 主要培养基: 高氏合成培养基(g/L): 淀粉 20.0, KNO_3 1.0, $MgSO_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.5, NaCl 0.5, $FeSO_4$ 0.01, pH 7.5。

YNB 合成培养基(g/L): 酵母氮碱 6.70, 葡萄糖 5.00, 省却混合物 0.80^[16], 腺嘌呤 0.04, 色氨酸 0.04, 亮氨酸 0.10, pH 5.5。

种子培养基(g/L): 淀粉 20.0, KNO_3 1.0, $MgSO_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.5, NaCl 0.5, $FeSO_4$ 0.01, 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 1.0, 酵母提取物 0.5, 牛肉膏 0.5, pH 7.5。

初始发酵培养基: 以高氏合成培养基为初始发酵培养基。

1.2 放线菌分离纯化

称取 5 g 土壤于无菌平皿中自然风干, 再将其放到 45 mL 无菌生理盐水中, 200 r/min 混匀 20 min, 最后以 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 梯度稀释涂布于高氏培养基平板上, 30 °C 培养 5 d 后, 挑取形态不一样的单菌落重新划线接种在高氏培养基平板上, 反复多次, 待菌落形态稳定后, 编号保存。

1.3 酵母报告基因高通量筛选方法

挑取单菌落至装有 5 mL 高氏培养基的试管中 30 °C、200 r/min 培养 4 d, 离心取发酵上清液备用。以酵母报告基因菌株 CHW-1 为指示菌, 依据 Margassery 等^[12]的方法进行高通量筛选: 取 25 μ L 处于对数期(OD_{600} 为 0.8)的酵母菌悬液与 25 μ L 待测样品(发酵上清液)混合在 96 微孔板中 30 °C 孵育 0.5 h, 加 25 μ L Taps (pH 8.1) 30 °C 孵育 1 h, 加入 75 μ L Z-buffer 和 75 μ L 裂解液 30 °C 孵育 0.5 h 后, 加入 25 μ L 4 g/L 的 *LacZ* 底物 ONPG 30 °C 反应 20 min, 最后加入 60 μ L 1 mol/L 的 Na_2CO_3 终止反应, 测定 420 nm 处吸光值, 即为 *LacZ* 表达量。*LacZ* 相对表达量则是以负对照的 *LacZ* 表达量的值为 1 计算得到。*LacZ* 相对表达量抑制率 = $(OD_{\text{正对照}} / OD_{\text{负对照}} - OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{负对照}}) / (OD_{\text{正对照}} / OD_{\text{负对照}} - OD_{\text{负对照}} / OD_{\text{负对照}}) \times 100\%$ 。实验以加 Taps 组为正对照, 不加 Taps 组为负对照, FK506 为药物对照。如果 25 μ L 待测样品(发酵上清液)的相对抑制率已接近 100%, 则减少发酵上清液样品量后重新测定, 以准确测定其抑制活性。每个样品设置 3 个平行, 实验重复 3 次(检测结果以每次设置的正负对照为基准)。

1.4 发酵粗提物制备

对酵母报告基因高通量筛选得到的具有明显抑制酵母钙调磷酸酶活性的菌株, 进一步做 50 mL 摇瓶培养和发酵粗提物的制备。即将 100 μ L 菌悬液接种在 50 mL 液体种子培养基/250 mL 摇瓶中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 2 d, 制成种子液。将种子液以 4% 的接种量接入 50 mL 发酵培养基/250 mL

摇瓶中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 4 d 后, 12 000 r/min 离心, 收集发酵上清液。分别用正丁醇、乙酸乙酯、二氯甲烷(抽提剂:发酵液=1:1, 体积比)对发酵上清液进行抽提, 抽提物经 50 °C 旋转蒸发干燥后, 溶解于适量的 ddH₂O 中得到发酵粗提物, 作为人体钙调磷酸酶试剂盒检测用样品。

1.5 人体钙调磷酸酶试剂盒检测

为了检测高通量筛选到的菌株是否对人体钙调磷酸酶也具有抑制活性, 按照人体钙调磷酸酶试剂盒的方法对其发酵粗提物的钙调磷酸酶抑制活性进行检测, 以 ddH₂O 为空白对照, 样品设置 3 个平行, 实验重复 3 次。

1.6 菌种鉴定

1.6.1 形态学特征: 将高氏培养基平板上 30 °C 培养 8 d 的放线菌菌落分别在光学显微镜和扫描电镜下观察菌丝形态。

1.6.2 培养特征及生理生化特征: 参照《放线菌快速鉴定与系统分类》推荐的培养基和方法^[17]。

1.6.3 系统发育树特征: 以待测菌株基因组 DNA 为模板, 用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F [5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3'] 和 1492R [5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3'] 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ L, 包括 10 \times PCR buffer 5.0 μ L, 基因组 2.0 μ L, 27F (10 μ mol/L) 2.0 μ L, 1492R (10 μ mol/L) 2.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L, 5 U/ μ L *rTaq* 酶 0.5 μ L, ddH₂O 34.5 μ L。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增片段测序后通过 NCBI 数据库 BLAST 比对, 选取相似度最高且有效发表的菌株, 先用 Clustal X 进行序列比对, 再用 MEGA 4.0 中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 确定其分类地位^[18]。

1.7 发酵条件优化

1.7.1 不同碳源、氮源对发酵液活性的影响: 以高氏培养基为对照, 在培养条件不变的情况下, 碳源:

以 2%(质量体积比)的比例,分别用玉米粉、全麦粉、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖代替高氏培养基中的淀粉。氮源:以 0.1%(质量体积比)的比例分别用硫酸铵、硝酸钠、酵母粉、黄豆饼粉、蛋白胨代替高氏培养基中的硝酸钾。不同碳源、氮源对发酵液活性的影响按酵母报告基因高通量方法进行测定,实验重复 3 次,最后得到最佳碳源和氮源。

1.7.2 培养基成分正交实验:选择最佳碳源(玉米粉)和氮源(酵母粉)以及无机盐 K_2HPO_4 和 $MgSO_4$ 共 4 个因素,设置 3 个水平,利用正交实验表 $L_9(3^4)$ 进行正交实验(表 1),每个实验组设置 3 个重复,实验重复 3 次后得到确定培养基配方。通过酵母报告基因高通量方法测定,以 LacZ 相对表达量抑制率为评判标准。对菌株 CZW-15 发酵培养基各营养组分正交实验所得数据进行极差分析,得到最佳培养基组成。

1.7.3 培养条件优化:通过正交实验确定培养基配方后对发酵条件进行优化:(1)接种量:在其他条件不变的情况下,接种量分别为 2%、4%、6%、8%、10%。(2)起始 pH:在其他条件不变的情况下,用 pH 计将优化后培养基分别调至 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。(3)装液量:在其他条件不变的情况下,250 mL 摇瓶中分别装入 30、50、70、90、110 mL 培养基。(4)摇床转速:在其他条件不变的情况下,分别设置摇床转速 140、160、180、200、220 r/min。(5)培养温度:在其他条件不变的情况下,分别设置培养温度 25、28、30、32 °C。(6)培养时间:在其他条件不变的情况下,分别培养 1、2、3、4、5、6、7、

8、9 d。用酵母报告基因高通量方法测定发酵液活性,实验重复 3 次,得到最佳发酵条件。

2 结果与分析

2.1 高通量筛选产钙调磷酸酶抑制剂菌株

用酵母报告基因(*CDRE::LacZ*)高通量筛选模型对 320 株放线菌菌株进行初筛,分别取发酵上清液 25 μ L,以酵母 CHW-1 为指示菌测定 LacZ 表达活性,结果得到一株具有强抑制作用的放线菌 CZW-15,其相对抑制率达到 104% (图 1A)。为了排除饱和和效应引起的测定数据不准确,对不同剂量的该发酵上清液的抑制活性进行了检测,结果显示该发酵上清液的 IC_{50} 为 7.4 mL/L,而对照药物 FK506 的 IC_{50} 为 65 μ g/L (图 1B 和 C)。

2.2 人体钙调磷酸酶试剂盒检测

为了排除发酵上清液中的磷酸根离子对人体钙调磷酸酶试剂盒方法的影响,对 CZW-15 发酵上清液分别用正丁醇、乙酸乙酯和二氯甲烷进行等体积抽提,发现正丁醇可以很好地抽提发酵液中活性物质(结果待发表)。CZW-15 发酵上清液的正丁醇抽提物经旋转蒸发干燥后,溶解于少量水中得到 CZW-15 发酵粗提物(0.7 g/L)。

如图 2 所示,用人体钙调磷酸酶试剂盒方法对该发酵粗提物的钙调磷酸酶抑制活性进行检测,发现其对钙调素依赖性人体钙调磷酸酶也具有抑制效果,10 μ L (7 μ g)的发酵粗提物使钙调素依赖性人体钙调磷酸酶的活性下降到 67% (抑制率 33%),表明 CZW-15 发酵上清液不仅对酵母钙调磷酸酶具有明显抑制作用,而且对人体钙调磷酸酶也有抑制活性。

2.3 菌株鉴定

在高氏培养基培养 8 d 后的 CZW-15 的电镜照片见图 3。根据《放线菌快速鉴定与系统分类》中的 8 种供试培养基对菌株 CZW-15 的培养特征进行检测的结果见表 2。在高氏培养基上,菌株 CZW-15 气生菌丝呈淡粉红,基内菌丝呈玉米黄,无可溶性色素产生(表 2)。生理生化实验表明菌株 CZW-15

表 1 正交实验因素和水平设计

Table 1 The factors and levels of orthogonal test

因素 Factors	水平 Levels (g/L)		
Corn flour (A)	18	20	22
Yeast extract (B)	0.9	1.0	1.1
$MgSO_4$ (C)	0.4	0.5	0.6
K_2HPO_4 (D)	0.4	0.5	0.6

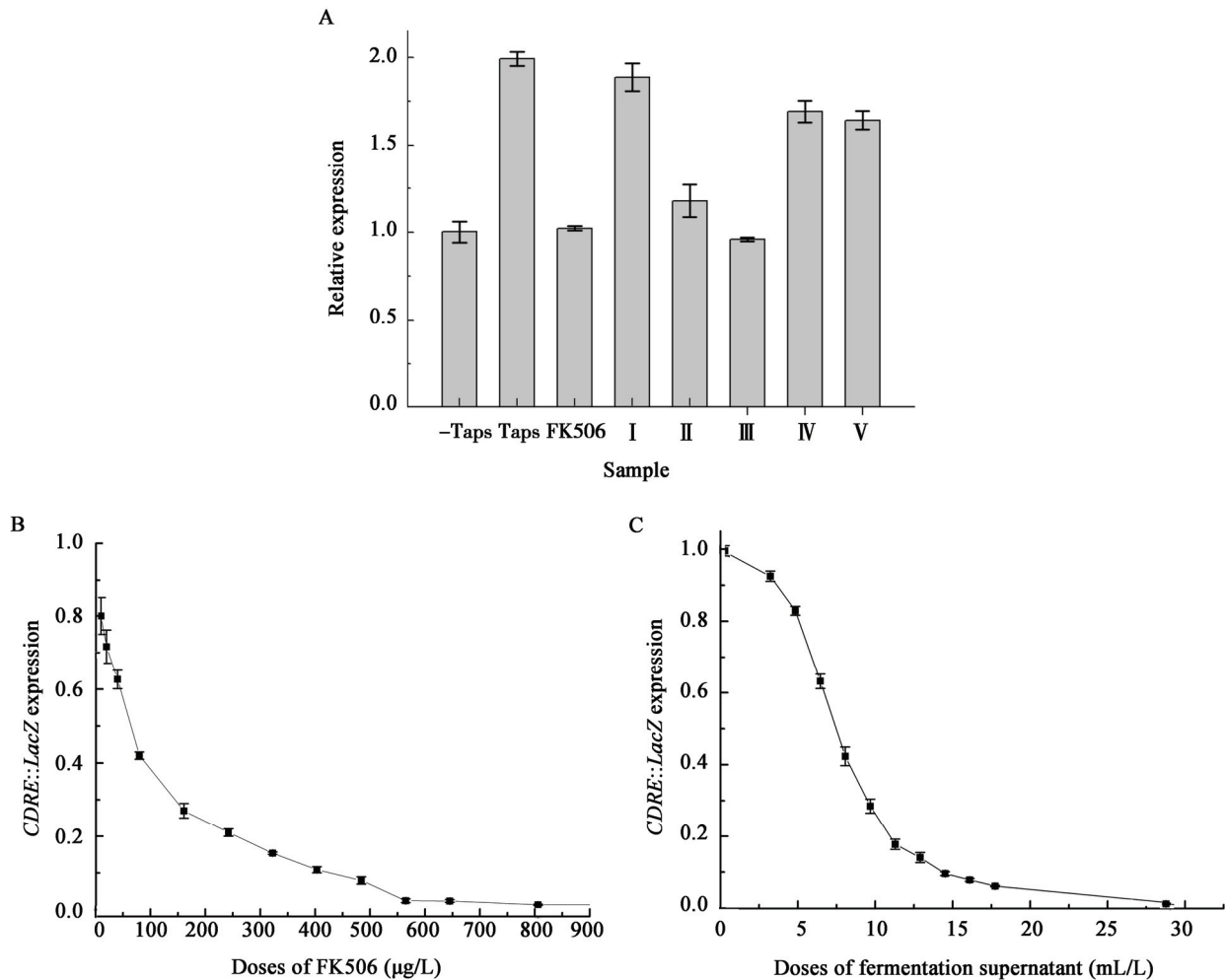


图 1 CZW-15 发酵上清液对酵母钙调磷酸酶依赖基因(*CDRE::LacZ*)表达的抑制作用
 Figure 1 Inhibition of yeast calcineurin-dependent gene expression (*CDRE::LacZ*) by the fermentation supernatant of CZW-15

注: A: 高通量筛选结果, 除了负对照外, 其余样品组均添加 Taps (pH 8.1)。-Taps: 负对照; Taps: 阳性对照; FK506: 25 μL (7 mg/L); I: 25 μL CZW-28; II: 25 μL CZW-46; III: 25 μL CZW-15; IV: 25 μL CZW-74; V: 25 μL CZW-102。B: 不同剂量的 FK506 对依赖酵母钙调磷酸酶的报告基因(*CDRE::LacZ*)表达的抑制活性曲线, 并通过设置未经诱导的酵母实验组排除背景的吸光度干扰。C: 不同剂量的发酵上清液对依赖酵母钙调磷酸酶的报告基因(*CDRE::LacZ*)表达的抑制活性曲线, 并通过设置未经诱导的酵母实验组排除背景的吸光度干扰。

Note: A: Results of high throughput screening, with the exception of negative control, all treatments included stimulation by addition of Taps (pH 8.1). -Taps: Negative control; Taps: Positive control; FK506: 25 μL (7 mg/L); I: 25 μL of CZW-28; II: 25 μL of CZW-46; III: 25 μL of CZW-15; IV: 25 μL of CZW-74; V: 25 μL of CZW-102. B: Inhibition of yeast calcineurin-dependent gene expression (*CDRE::LacZ*) by different doses of FK506, the control containing un-stimulated yeast was used to subtract background absorbance. C: Inhibition of yeast calcineurin dependent gene expression (*CDRE::LacZ*) by different doses of fermentation supernatant of CZW-15, the control containing un-stimulated yeast was used to subtract background absorbance.

能使明胶液化, 硝酸盐还原, 产黑色素和硫化氢, 牛奶不凝固但可酪化, 淀粉水解且能利用淀粉, 降解纤维素但不能利用纤维素, 产脂肪酶, 不产脲酶。碳源利用实验表明, 菌株 CZW-15 可以利用葡萄糖、

蔗糖、麦芽糖、肌醇、甘露醇、L-鼠李糖和 L-阿拉伯糖(表 3)。

将菌株 CZW-15 的 16S rRNA 基因序列扩增得到 1 500 bp 左右大小的条带, 经测序得到 1 490 bp

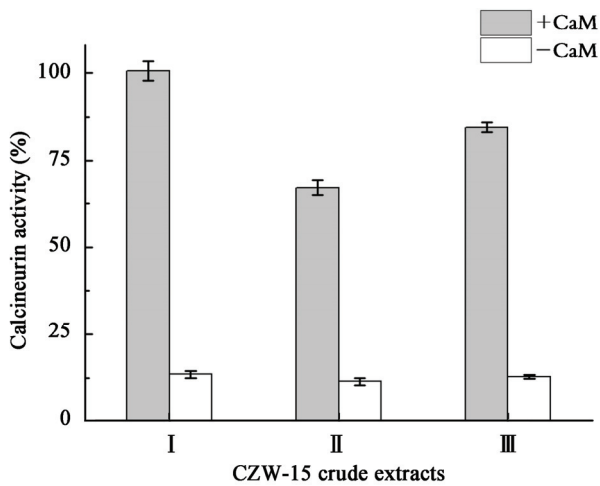


图2 CZW-15粗提物对人体钙调磷酸酶的抑制活性
Figure 2 Inhibition of CZW-15 crude extracts on human calcineurin

Note: I: Control; II: 7 µg; III: 3.5 µg.

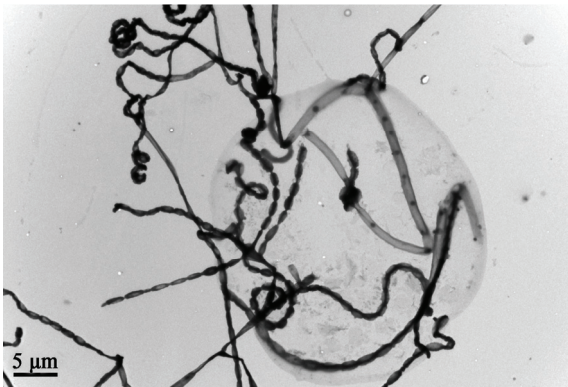


图3 CZW-15电镜照片
Figure 3 Scanning electron microscope (SEM) photographs of CZW-15

的序列并已上传至 GenBank，获得登录号为 KJ996111。通过在 NCBI 上 BLAST 比对，选取与其同源性最高且有效发表菌株的相关序列，利用 MEGA 4.0 中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树 (图 4)，结果表明 CZW-15 与 *Streptomyces galbus* DSM40480 (相似率为 99.3%)、*Streptomyces* sp. SAP193.2 (相似率为 99.2%) 最为相似。

2.4 菌株 CZW-15 发酵条件优化

2.4.1 不同碳、氮源对菌株 CZW-15 发酵液活性的

培养基 Medium	气生菌丝 Aerial mycelium	营养菌丝 Vegetative mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
ISP-1	Pure white	Greem	None
ISP-2	Light pink	Dafford yellow	None
ISP-3	Antique pink	Signal orange	None
ISP-4	Antique pink	Greem	None
ISP-5	Pure white	Pasted orange	None
ISP-6	Oyster white	Signal brown	Red brown
ISP-7	Light pink	Copper brown	Clay brown
GS	Light pink	Maize yellow	None

实验内容 Term	实验结果 Result	实验内容 Term	实验结果 Result
Gelatin liquefaction	+	Urease	-
Hydrolysis of starch	+	Glucose	+
Lipase	+	L-arabinose	±
H ₂ S production	+	D-fructose	±
Melanoid pigment	+	Inositol	+
Cellulose decomposition	+	D-mannitol	+
Cellulose utilization	-	Sucrose	+
Nitrate reduction	+	L-rhamnose	±
Coagulation of milk	-	Maltose	+
Peptonization of milk	+	Lactose	+

注：+：结果阳性；±：长势不佳；-：实验结果阴性或不生长。
Note: +: Represent positive result; ±: Worse result; -: Negative result.

影响：取 2.5 µL 发酵液用酵母报告基因 (CDRE::LacZ) 高通量模型测定钙调磷酸酶的抑制活性，结果表明 5 种供试碳源中玉米粉的效果最佳，以玉米粉为碳源的培养基的发酵液活性(相对抑制活性)是淀粉(对照，CK)的 1.96 倍(图 5A)，因此选择玉米粉作为最佳碳源。在 5 种供试氮源中酵母粉

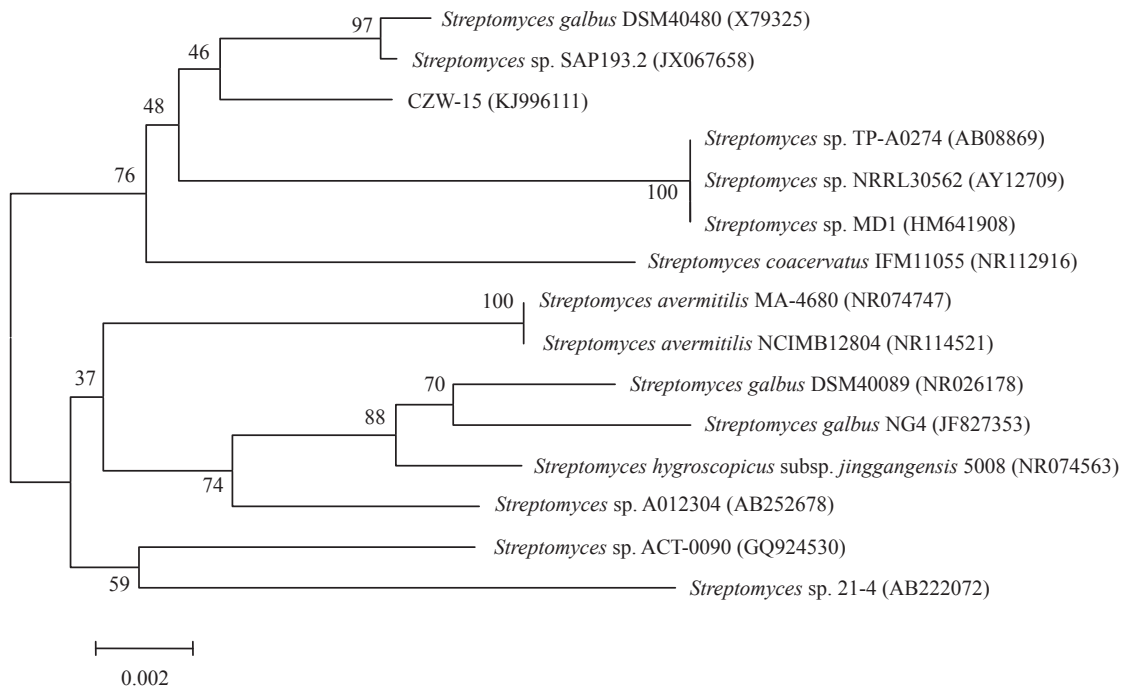


图 4 菌株 CZW-15 与其相关菌株的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain CZW-15 and other related strains download from GenBank

注: 分支点数据为自聚值; 标尺为 0.002, 表示相似性百分比; 括号中为菌株序列注册号。

Note: Number at nodes indicated levels of bootstrap support (%) based on 1 000 resample datasets. Bar: 0.2% sequence divergence. Numbers in parentheses represent the sequence accession number in GenBank.

的活性最高, 以酵母粉为氮源的培养基的发酵液活性(相对抑制活性)是 KNO_3 (对照, CK) 的 2.05 倍, 蛋白胨和黄豆粉也有较明显的提高发酵液活性的作用(图 5B), 因此选择酵母粉为最佳氮源。

2.4.2 营养组分的正交实验和培养条件优化: 以玉米粉、酵母粉、 MgSO_4 、 K_2HPO_4 为因素, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行无交互作用的正交实验, 检测各因素不同配比下发酵液相对抑制活性(表 4)。由极差分析可见 $\text{RB} > \text{RC} > \text{RD} > \text{RA}$, 即 4 个因素对发酵结果的影响强度依次为酵母粉、 MgSO_4 、 K_2HPO_4 、玉米粉, 最佳配比为 B2C1D1A2, 最佳发酵培养基组成(g/L)为: 酵母粉 1.0, MgSO_4 0.4, K_2HPO_4 0.4, 玉米粉 20, FeSO_4 0.01。

在确定发酵培养基组成配比的情况下, 对发酵培养条件包括起始 pH、温度、转速、培养天数、装液量、种子液接种量进行优化。结果表明, 种子

液接种量 4%, 起始 pH 7.5, 发酵培养基装液量 50 mL/250 mL, 180 r/min、28 °C 恒温培养 4 d 时的发酵液活性最高(结果待发表)。实验选定此条件为最佳发酵培养条件。取 1.5 μL 发酵液用酵母报告基因(*CDRE::LacZ*)高通量模型测定钙调磷酸酶的抑制活性, 结果表明经优化后, 1.5 μL CZW-15 发酵液的相对抑制活性达到 117%, 是优化前发酵液的相对抑制活性(26%)的 4.5 倍(图 6)。

3 结论

本研究通过酵母报告基因高通量模型从土壤中筛选到一株产高活性钙调磷酸酶抑制物的放线菌 CZW-15, 其发酵上清液稀释了 10 倍后对酵母钙调磷酸酶仍有 50% 的抑制活性, 即其 IC_{50} 为 7.4 mL/L 发酵上清液, 而对照药物 FK506 的 IC_{50} 为 65 $\mu\text{g/L}$ (图 1)。为了检测该发酵上清液是否对人体钙调磷酸酶也具有抑制活性, 先进行了正丁醇抽提并制成发

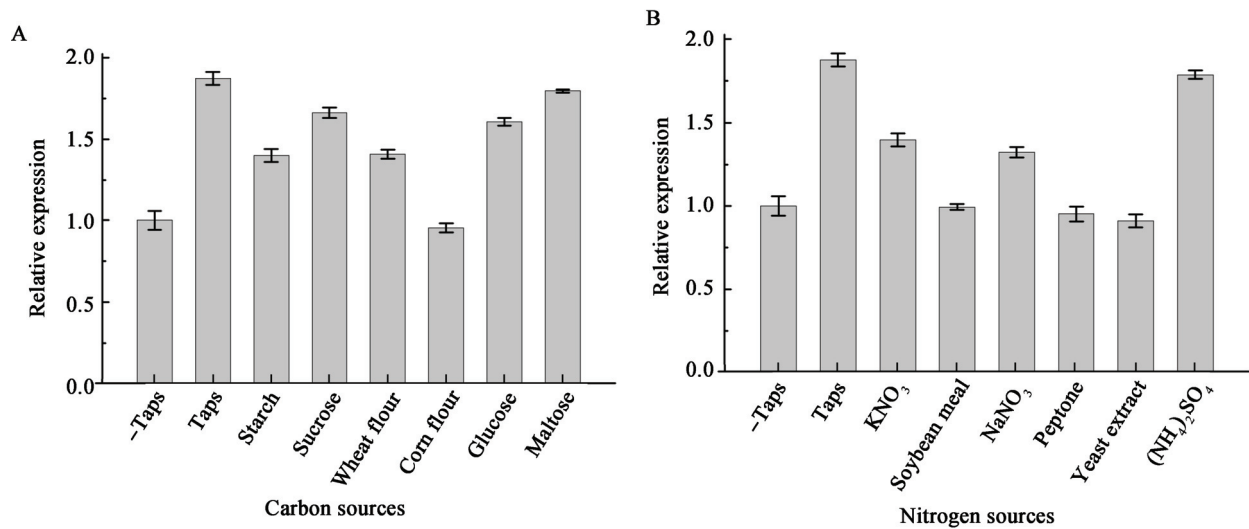


图5 不同碳氮源对菌株 CZW-15 发酵液活性的影响

Figure 5 Effects of different carbon and nitrogen sources on inhibition activity of fermentation supernatant from CZW-15

Note: -Taps: Negative control, Taps: Positive control.

表4 菌株 CZW-15 发酵培养基各营养组分正交实验
Table 4 Results of the orthogonal test with different nutritional factors on inhibitory activity of fermentation supernatant from CZW-15

编号 No.	A	B	C	D	相对抑制活性 Relative expression inhibition (%)
1	1	1	1	1	77.5
2	1	2	2	2	58.5
3	1	3	3	3	66.0
4	2	1	2	3	55.0
5	2	2	3	1	113.5
6	2	3	1	2	94.0
7	3	1	3	2	49.5
8	3	2	1	3	102.5
9	3	3	2	1	74.0
K1	67.3	60.7	91.3	88.3	
K2	87.5	91.5	62.5	67.3	
K3	75.3	78.0	76.3	74.5	
R	20.2	30.8	28.2	21.0	

酵粗提物，再用人体钙调磷酸酶试剂盒检测，结果表明该发酵粗提物对人体钙调磷酸酶确有抑制活性，10 μL (7 μg)的发酵粗提物使人体钙调磷酸酶的活性下降到 67% (抑制率 33%)(图 2)。但与酵母细胞中测定的对酵母钙调磷酸酶抑制活性(IC₅₀ 为 7.4 mL/L 发酵上清液)相比较，用试剂盒测定的对人

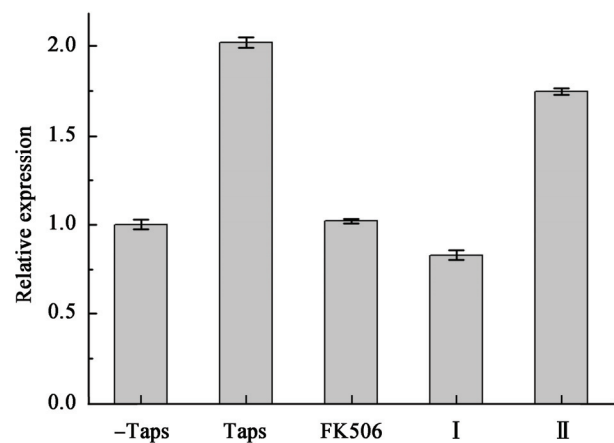


图6 发酵条件优化结果

Figure 6 Optimization of fermentation conditions

注: -Taps: 负对照; Taps: 正对照; FK506: 25 μL (7 mg/L); I: 1.5 μL 优化后发酵上清液; II: 1.5 μL 优化前发酵上清液。

Note: -Taps: Negative control; Taps: Positive control; FK506: 25 μL (7 mg/L); I: 1.5 μL of fermentation supernatant after optimization; II: 1.5 μL of fermentation supernatant before optimization.

体钙调磷酸酶抑制活性明显降低。这可能与人体钙调磷酸酶试剂盒检测是体外实验缺少免疫亲和素等细胞成分有关。由此推测, CZW-15 发酵上清液中的主要活性物质可能也同 FK506 和 CosA 一样, 需与免疫亲和素结合形成复合体后起作用, 而不能直接抑制人体钙调磷酸酶的活性^[19], 其具体作用机制还有待进一步研究。

利用传统分类学和 16S rRNA 方法对菌株鉴定结果表明 CZW-15 属于链霉菌属(*Streptomyces*), 且同菌株 *Streptomyces galbus* DSM40480、*Streptomyces* sp. SAP193.2 最为相近(图 4)。菌株 CZW-15 同 *Streptomyces galbus* DSM40480 均可产生黑色素和 H₂S, 使明胶液化、牛奶酪化等, 但也有不同之处, 如在 SP4 培养基上, 菌株 CZW-15 气生菌丝和基内菌丝分别呈古粉红色和奶白色, 而菌株 *Streptomyces galbus* DSM40480 气生菌丝分别呈淡黄色和黄色^[20]。菌株 *Streptomyces* sp. SAP193.2 的信息目前仍不全, 故无法作具体比较。

通过单因素实验和正交实验得到该菌的最佳摇瓶发酵配方(%)为: 玉米粉 2.0、酵母粉 0.1、K₂HPO₄ 0.04、MgSO₄ 0.04、NaCl 0.05、FeSO₄ 0.001, 发酵条件为: 起始 pH 7.5, 温度 28 °C, 转速 180 r/min, 装液量 50 mL/250 mL, 接种量 4%, 培养时间 4 d。优化后 CZW-15 发酵上清液的酵母钙调磷酸酶抑制活性比优化前提高了 4.5 倍。在此基础上, 进一步对培养基组分和发酵条件进行优化, 其抑制活性还可能大幅度提高。

CZW-15 产生的高活性钙调磷酸酶抑制剂可能具有较好的开发应用前景。下一步将会对该活性物进行分离纯化和结构鉴定, 并结合动物细胞和小鼠活体实验探究其作用机理和临床应用价值。

参 考 文 献

[1] Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function[J]. *Physiological Reviews*, 2000, 80(4): 1483-1521
 [2] Reese LC, Tagliatela G. A role for calcineurin in Alzheimer's disease[J]. *Current Neuropharmacology*, 2011, 9(4): 685-692
 [3] Hudson MB, Price SR. Calcineurin: a poorly understood regulator of muscle mass[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2013, 45(10): 2173-2178

[4] Williams CR, Gooch JL. Calcineurin inhibitors and immunosuppression—a tale of two isoforms[J]. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2012, 14: e14
 [5] Rezzani R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies[J]. *Histology and Histopathol*, 2006, 21(3): 301-316
 [6] Kessler M, Jay N, Molle R, et al. Excess risk of cancer in renal transplant patients[J]. *Transplant International*, 2006, 19(11): 908-914
 [7] Guitard J, Rostaing L, Kamar N. New-onset diabetes and nephropathy after renal transplantation[J]. *Diabetes and the Kidney*, 2011, 170: 247-255
 [8] Prescott TAK, Veitch NC, Simmonds MSJ. Direct inhibition of calcineurin by caffeoyl phenylethanoid glycosides from *Teucrium chamaedrys* and *Nepeta cataria*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 137(3): 1306-1310
 [9] Wang H, Zhou CL, Lei H, et al. Kaempferol: a new immunosuppressant of calcineurin[J]. *IUBMB Life*, 2008, 60(8): 549-554
 [10] Wang H, Zhou CL, Lei H, et al. Inhibition of calcineurin by quercetin *in vitro* and in Jurkat cells[J]. *Journal of Biochemistry*, 2010, 147(2): 185-190
 [11] Chen DS, Hua XL, Yu LX. Research on calcineurin activity inhibition of extracts of *Smilax china* L.[J]. *Journal of Chinese Medicinal Material*, 2007, 30(11): 1436-1439 (in Chinese)
 陈东生, 华小黎, 于丽秀. 菝葜不同溶剂提取物抑制钙调磷酸酶活性作用的研究[J]. *中药材*, 2007, 30(11): 1436-1439
 [12] Margassery LM, Kennedy J, O'Gara F, et al. A high-throughput screen to identify novel calcineurin inhibitors[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 88(1): 63-66
 [13] Prescott TAK, Panaretou B, Veitch NC, et al. A yeast chemical genetics approach identifies the compound 3,4,5-trimethoxybenzyl isothiocyanate as a calcineurin inhibitor[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(3): 455-458
 [14] Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, et al. FK506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1987, 40(9): 1249-1255
 [15] Svarstad H, Bugge HC, Dhillon SS. From Norway to Novartis: cyclosporin from *Tolypocladium inflatum* in an open access bioprospecting regime[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2000, 9(11): 1521-1541
 [16] Adams A, Kaiser CA, Gottschling DE, et al. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*[M]. Translated by Liu ZD. Beijing: Science Press, 2000: 110-112 (in Chinese)
 亚当斯 A, 凯泽 CA, 戈特施林 DE, 等. 酵母遗传学方法实验指南[M]. 刘子铎译. 北京: 科学出版社, 2000: 110-112
 [17] Ruan JS, Huang Y. *Rapid Identification and Systematics of Actinobacteria*[M]. Beijing: Science Press, 2011: 69-77 (in Chinese)
 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 69-77
 [18] Brunel B, Givaudan A, Lanois A, et al. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(2): 574-580
 [19] Ke HM, Huai Q. Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 311(4): 1095-1102
 [20] Mehling A, Wehmeier UF, Piepersberg W. Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR[J]. *Microbiology*, 1995, 141(9): 2139-2147