

## 红色链孢霉 RNase N<sub>i</sub> 高产菌株的选育

张其玖 刘增印

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

本文介绍了红色链孢霉 (*Neurospora crassa*) RNase N<sub>i</sub> 高产菌株的选育和 RNase N<sub>i</sub> 的鉴定。

1. 以红色链孢霉 3.1602 (鸟氨酸缺陷型) 为原始菌株, 经 1/5000 三乙撑四胺 30℃ 振荡处理 2 小时, 继以<sup>60</sup>钴照射 4 分钟 (13.2 千伦琴/分钟), 照射剂量为 52.8 千伦琴。分离得到红色链孢霉 OA047 菌株 (鸟氨酸-腺嘌呤双重营养缺陷型)。以红色链孢霉 3.1604 (野生型) 为原始菌株, 经 100 微克分子 MN'NG 28℃ 振荡处理 2 小时, 分离得到红色链孢霉 WA011 (腺嘌呤营养缺陷型)。这两个菌株在改良的 Fric's 培养基上, 比原始菌株产酶能力分别提高约 20 倍。

2. 红色链孢霉 OA047 菌株在 5% 麸皮培养基中, 28℃ 振荡培养 72 小时, 酶产量为 114.5 单位/毫升。红色链孢霉 WA011 菌株在 5% 豆饼粉培养基中, 产酶量为 100 单位/毫升。两个菌株产酶能力比在 Fric's 培养基中又提高了五倍。

3. 红色链孢霉 OA047 菌株发酵的粗酶液中不含有磷酸单酯酶和其它磷酸二酯酶。RNase 的活力十分稳定, 在 pH1.5—2.0 条件下, 加热 80℃ 2 分钟, 酶活力未见降低。红色链孢霉 OA047 菌株产生的 RNase, 经测定其天然 RNA 酶解产物末端核苷 3'-磷酸, 和该酶对人工均聚多核苷酸水解作用, 以及对 2', 3' G>P 的水解作用等项分析证明是 RNase N<sub>i</sub>。

红色链孢霉核糖核酸酶 [RNase N<sub>i</sub>, Ribonuclease Guanine-nucleotide-2-transferase (cyclizing), *Neurospora crassa*, EC2. 7. 7. 26] 与 RNase T<sub>i</sub> 比起来, 不仅具有相同的碱基专一性, 而且具有较高的转磷酸活性和较低的水解活性。因此, RNase N<sub>i</sub> 不仅在 RNA 结构分析方面可以代替 RNase T<sub>i</sub>, 而且在寡聚核苷酸的合成方面比 RNase T<sub>i</sub> 更为有用。RNase N<sub>i</sub> 的发酵生产, 分离提纯以及用于寡聚核苷酸的合成, 近年来国外已有不少的报道<sup>[1-6]</sup>。本文主要报道 RNase N<sub>i</sub> 的高产菌株的选育和 RNase N<sub>i</sub> 的鉴定。

## 材料和方法

### (一) 菌株

中国科学院微生物研究所提供红色链孢霉

11 个菌株。诱变原始菌株有鸟氨酸缺陷型 3.1602 和野生型 3.1604 两个菌株。

### (二) 菌体悬浮液的制备

诱变用的原始菌株在试管斜面培养基上 28℃ 培养 5—7 天, 挑取孢子或菌丝 4—5 环, 转入无菌的盛有玻璃珠的三角瓶中, 加入约 10 毫升的无菌水, 剧烈摇动五分钟。以无菌脱脂棉或多层纱布过滤。重复处理 1—2 次。最后将菌体悬浮液在 1% 的 NaCl 溶液中作适当稀释, 分装在试管中备用。

### (三) 诱变方法

#### 1. γ-射线处理

照射源为<sup>60</sup>钴, 剂量率为 13.2 千伦琴/分钟。剂量范围为 40—92 千伦琴。

2. N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MN'NG) 处理。

本文于 1979 年 1 月 17 日收到。

按 Malling 等人的方法<sup>[7]</sup>, 将 50 微克分子和 100 微克分子两种浓度的 MN'NG 28℃ 振荡处理 2 小时。

3. 以一定浓度三乙撑四胺 (Triethylene Tetramine, 20℃ 0.989/毫升) 适当处理后继以<sup>60</sup>钴  $\gamma$ -射线照射。

#### (四) 营养缺陷型的鉴定

采用逐个测定方法。

基本培养基, 1000 毫升溶液中含有: 蔗糖 15 克, 酒石酸铵 5 克,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 克,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 克,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 克,  $\text{NaCl}$  0.1 克, 生物素约 50—100 微克, 琼脂 15 克。红色链孢霉 3.1602 菌株的基本培养基每升含鸟氨酸 50—100 毫克。

完全培养基, 在 1000 毫升基本培养基中加入 2 克酵母膏。

上述三种培养基中均需要分别加入 0.75% 的 L-山梨糖, 以抑制菌丝的蔓延。

经诱变处理的孢子悬浮液, 3000rpm 离心 10 分钟, 用 1%  $\text{NaCl}$  溶液洗涤 2—3 次, 作适当稀释后涂布在完全培养基平皿中, 35℃ 保温 48 小时, 然后将所有的单个菌落, 用无菌牙签分别逐个接入基本培养基和补加培养基平皿中, 35℃ 保温 24—30 小时, 检出缺陷型变异株, 转接到试管斜面上培养, 保存。

试管斜面培养基与上述完全培养基相似, 仅以 20 克甘油代替 15 克蔗糖。

#### (五) RNase 活力测定

按高井等人的方法<sup>[1]</sup>。底物为酵母 RNA。将商品酵母 RNA, 经 Sephadex G-25 过滤纯化。具体操作参考 Uozumi 等人的方法<sup>[8]</sup>。

#### (六) 发酵试验

种子: 500 毫升三角瓶中加入 150 毫升改良的 Frie's 培养液。把在试管斜面上生长 3—5 天的菌体接入三角瓶中, 28℃—30℃ 振荡培养 48 小时。

发酵: 发酵培养基采用改良的 Frie's 液体培养基。500 毫升三角瓶装 150 毫升培养液。

接种量: 按 5% 加入。

培养条件: 28℃—30℃ 振荡培养 72 小时。发酵液经铺有脱脂棉的玻璃漏斗过滤或以 2800rpm 离心 10—15 分钟。滤液或离心液即为粗酶液。

#### (七) 磷酸单酯酶 (PMase) 和磷酸二酯酶 (PDase) 活力的检查

底物分别为对硝基苯磷酸和双对硝基苯磷酸。具体操作按高井等人方法<sup>[1]</sup>。

#### (八) RNase 作用的碱基专一性的测定

RNase 酶解天然酵母 RNA, 按 Uchida 等人方法<sup>[9]</sup>鉴定其作用的碱基专一性。

RNase 对人工均聚多核苷酸的水解作用, 采用的均聚多核苷酸有: 多聚次黄嘌呤核苷酸 (Poly I), 多聚胞嘧啶核苷酸 (Poly C), 多聚腺苷酸 (Poly A) 和多聚次黄嘌呤:多聚胞嘧啶核苷酸 (Poly I:C)。

反应系统: 0.5 毫升反应液中含有 0.07 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0 或 7.5) 和一定量的均聚多核苷酸, 以及一定量的 RNase。每个反应管加入少许氯仿, 加塞密封 37℃ 反应六小时。

反应液点在华特曼 1 号滤纸上。用 Sandon 高压电泳仪进行分离, 作定性观察。

#### (九) RNase 对 2', 3' G > P 的水解作用

按 Hashimoto 等人方法<sup>[10]</sup>。

2', 3' G > P 按 Kaike 等人方法<sup>[11]</sup>进行纯化。

## 结 果

#### (一) 现有的红色链孢霉 11 个菌株产酶能力

现有各种不同生化特性的红色链孢霉 11 株, 在试管斜面上转接三次后, 接入改良的 Frie's 培养基, 28℃ 振荡培养 72 小时, 发酵液经脱脂棉过滤, 测定滤液中 RNase 活力。结果如表 1 所示。从表 1 可以看出, 现有的 11 株红色链孢霉产 RNase 能力很低。因此, 我们进行了人工诱变选种。

#### (二) 诱变选种

我们以红色链孢霉 3.1602 和 3.1604 两个菌株为原始菌株, 作不同条件的诱变处理, 得到不同突变株 300 多个, 其中腺嘌呤营养缺陷型 24 株, 鸟氨酸、腺嘌呤双重营养缺陷型 53 株。产酶量高的有红色链

表 1 红色链孢霉 11 个菌株产 RNase 能力

菌株号*	营养缺陷型	酶活力(单位/毫升)
3.1602	鸟氨酸缺陷型	1.1
3.1604	野生型	0.9
3.1606	多标记	0.8
3.1608	野生型	0.6
3.1598	野生型	0.7
3.1599	野生型	0.7
3.1601	野生型	0.7
3.1613	野生型	0.3
3.1614	野生型	0.7
3.1615	野生型	0.9
3.1616	野生型	0.6

\* 系中国科学院微生物所菌种保藏编号。

孢霉 WA011 (腺嘌呤缺陷型) 和 OA047 (鸟氨酸、腺嘌呤双重营养缺陷)。这两个菌株在改良的 Fric's 液体培养基上, 28℃ 振荡培养 72 小时, RNase 活力分别达到 19 单位/毫升和 22 单位/毫升, 比原始菌株产酶能力提高约 20 倍。

诱变条件: 以红色链孢霉 3.1604 为原始菌株, 用 MN'NG 100 微克分子, 在 28℃ 振荡处理 2 小时, 分离得到 WA011 菌株。以红色链孢霉 3.1602 为原始菌株, 先用 1/5000 三乙撑四胺 28℃ 振荡处理 2 小时, 继以<sup>60</sup>钴照射 4 分钟 (13.2 千伦琴/分钟), 分离得到 OA047 菌株。

### (三) 摇瓶试验

在诱变选种的基础上, 为了进一步提高红色链孢霉 OA047 和 WA011 菌株的产 RNase 能力, 我们做了初步的营养条件试验。

以改良的 Fric's 培养基为基础, 分别以 5% 的麸皮、豆饼粉和玉米粉代替 Fric's 培养基中的蔗糖。在 5% 麸皮培养基和 5% 豆饼粉培养基中, 每 1000 毫升加入 2NHCl 4 毫升, 15 磅灭菌 30 分钟。28℃ 振荡培养 72 小时, 测定发酵液中 RNase 活力, 结果见表 2。WA011 菌株在 5% 豆

饼粉培养基中产酶量最高; 而 OA047 菌株在 5% 麸皮培养基中产酶量最高。产酶量分别为 Fric's 培养基的 5 倍。

表 2 不同培养基对 *N. crassa* OA047 和 WA011 菌株产酶能力的影响

菌株	培养基	麸皮	豆饼粉	玉米粉	改良 Fric's
<i>N. crassa</i> OA047 (单位/毫升)		114.5	14.0	65.0	22.0
<i>N. crassa</i> WA011 (单位/毫升)		44.7	100.0	47.0	19.0

### (四) 红色链孢霉 OA047 菌株发酵液中 RNase 的鉴定

1. 磷酸单酯酶 (PMase) 和磷酸二酯酶 (PDase) 的检查

我们检查了改良的 Fric's 培养基和麸皮培养基两种发酵液中的 PMase 和 PDase 的活力。酶液用量为 0.2 毫升。改良的 Fric's 培养基发酵的粗酶液的 RNase 活力为 9—11 单位, 麸皮培养基发酵液的粗酶液的 RNase 活力为 19—36 单位, 37℃ 保温 65 分钟和 180 分钟, 均未测出 PMase 和 PDase 的活力。

#### 2. RNase 的稳定性

粗酶液以 2N HCl 调 pH1.5—2.0, 迅速加热至 80℃, 保持 2 分钟后立即冷却, 测其加热前后 RNase 活力变化, 结果见表 3。表 3 说明, 加热处理 RNase, 其活力基

表 3 *N. crassa* OA047 发酵液中 RNase 对热的稳定性

样品批号	发酵培养基	酶活力 (单位/毫升)		活力比(加热后/加热前)
		加热前	加热后	
I	5% 麸皮	118.5	128.0	1.08
II	5% 麸皮	182.5	177.0	0.97
III	5% 麸皮	95.0	92.0	0.97
IV	改良 Fric's	45.5	45.9	1.01
V	改良 Fric's	50.0	55.5	1.11

表 4 酵母 RNA 水解产物中末端核苷 3'-磷酸\*

样 品	A260	核 苷 酸	鸟 苷	尿 苷	胞 苷	腺 苷
未加酶水解液		1.15	0.050	0.030	0.005	0.040
RNase T <sub>1</sub> 水解液**		1.08	0.371	0.010	0.000	0.033
RNase 发酵液的水解液 (麸皮培养基)		0.865	0.295	0.020	0.015	0.020
RNase 发酵液的水解液 (改良 Frie's 培养基)		1.30	0.435	0.028	0.010	0.045
纯化的 RNase 的水解液***		0.695	0.253	0.008	0.005	0.018

\* 反应系统: 0.75 (或 0.9) 毫升反应液含有粗酶液 0.1 毫升 (7—35 酶单位), 纯化的 RNA 3.2 毫克, 0.08M Tris-HCl (pH7.5) 37℃ 保温 60 分钟。

\*\* 纯化的 RNase T<sub>1</sub> 经聚丙烯酰胺凝胶电泳检查 50 微克酶蛋白为一个区带。

\*\*\* 按 Kasai 等人方法<sup>[2]</sup>, 以 *N. crassa* OA047 菌株发酵液为粗酶液, 纯化的 RNase N<sub>1</sub>, 聚丙烯酰胺凝胶电泳检查, 24 微克酶蛋白为一个区带。

本上不变。此外, 粗酶液在酸性条件下, 加少许氯仿, 低温 (5℃ 左右) 保存数月, RNase 活力也未见降低。

### 3. 酶作用的碱基专一性

(1) 酵母 RNA 酶解产物末端核苷 3'-磷酸的测定: 大分子酵母 RNA 经 RNase 水解, 酸处理开环, 大肠杆菌 PMase 脱磷和 0.3N KOH 水解等四步处理, 酶解产物中的末端核苷 3-磷酸转化为核苷。处理好的样品点在华特曼一号滤纸上, 下行层析。溶剂系统为正丁醇: 异丁酸: 水: 浓氨水 = 75:37.5:2.5:2.5。将各个核苷和核苷酸的斑点剪下, 用 0.01N HCl 洗脱, 作定量测

定, 结果如表 4 所示。由表 4 可以看出, 酵母 RNA 经纯化的 RNase 水解作用, 其末端核苷 3'-磷酸为鸟苷酸。粗酶液中主要酶解产物为鸟苷酸。但尚有微量的腺苷酸和嘧啶核苷酸。这可能是由于底物 RNA 不均一引起的; 也可能是由于发酵液中存在除 RNase N<sub>1</sub> 以外的作用于腺嘌呤核苷酸残基和嘧啶核苷酸残基一类的 RNase。

(2) 对均聚多核苷酸的水解作用: 为了进一步确定 OA047 菌株发酵液中 RNase 作用的专一性。我们作了 RNase 对均聚多核苷酸 PolyI, PolyC, PolyA 和 PolyI:C 的水解作用。结果如图 1—4 所示。纯化

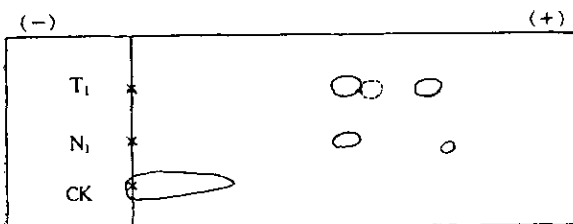


图 1 RNase 对 PolyI 的水解作用

反应条件: 0.5 毫升反应液含 PolyI 30A<sub>260</sub>, 纯化的 RNase 70 单位 (RNase T<sub>1</sub> 为 37.5 单位), 0.07M Tris-HCl (pH7.5)。电泳条件: 0.03M 磷酸缓冲液 (pH7.0), 6000V, 34—44 毫安, 电泳 35 分钟。

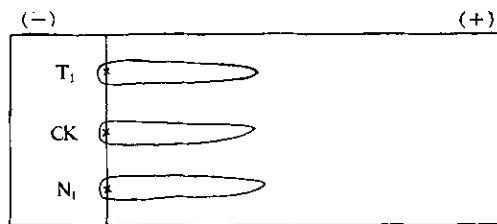


图 2 RNase 对 Poly C 的水解作用

反应条件: Poly C 为 19.5A<sub>260</sub>, 其他条件与图 1 相同。电泳条件: 0.03M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0), 6000V, 44—56 毫安, 电泳 45 分钟。

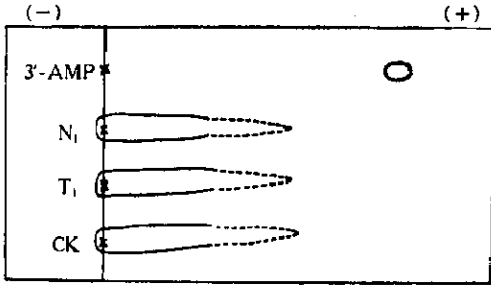


图3 RNase 对 PolyA 的水解作用  
反应条件: 0.5 毫升反应液含 PolyA 40A<sub>100</sub>,  
其他条件与图1 相同。  
电泳条件: 0.03M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0),  
6000V, 44—56 毫安, 电泳 45 分钟。

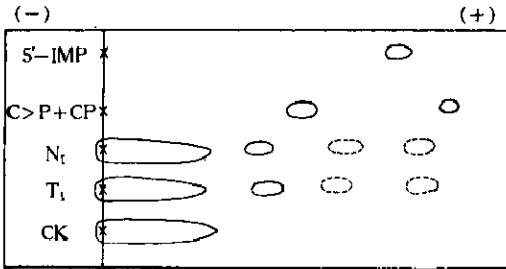


图4 RNase 对 Poly I:C 的水解作用  
反应条件: 0.5 毫升反应液中含有 Poly I:C 12.5A<sub>100</sub>,  
其他条件与图1 相同。  
电泳条件: 0.03M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0), 6000V,  
44—56 毫安, 电泳 45 分钟。

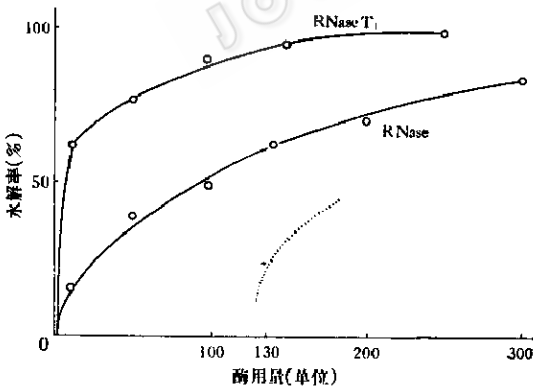


图5 RNase 对 2', 3'G > P 的水解作用  
RNase 的反应系统: 0.5 毫升反应液中含 0.5 毫  
克 2', 3'G > P, 0.1M Tris-HCl 缓冲液 (pH7.0),  
各管加入不同的酶量, 37℃ 保温 6 小时。  
RNase T<sub>1</sub> 的反应系统: 除缓冲液 pH 为 7.5 外, 其  
他条件均同 RNase 反应系统。  
电泳条件: 0.03M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0), 6000V,  
44—45 毫安, 电泳 45 分钟。

的 RNase N<sub>1</sub> 和 RNase T<sub>1</sub> 一样只水解

Poly I (如图 1), 对 Poly C 和 Poly A 没有作  
用 (如图 2, 3), 对 Poly I:C 有部分水解作  
用。Poly I 和 Poly I:C 的水解产物主要是  
I > P 和少量的 I<sub>P</sub>。

#### 4. 对 2', 3'G > P 的水解作用

OA047 发酵液 RNase 和 RNase T<sub>1</sub> 分  
别与 2', 3'G > P 于 37℃ 保温 6 小时, 分别  
各取 50 微升样品点在华特曼一号滤纸上,  
电泳分离。把 2', 3'G > P 和 3'-GMP 斑点  
剪下, 用 0.01N HCl 洗脱 48 小时 (15°—  
18℃), 测其 260 毫微米的吸收值。结果如  
图 5 所示。纯化的 OA047 RNase 对 2', 3'  
G > P 的水解作用很弱。RNase T<sub>1</sub> 在 10  
个单位, 37℃ 水解 6 小时, 水解率为 62%;  
而 OA047 RNase 要达到同样的水解率则  
需要 140 单位。

## 讨 论

我们工作证明, 红色链孢霉 3.1604 野  
生菌株产生胞外 RNase 的能力很低, 这与  
高井<sup>[1]</sup>的报道是一致的。为了得到产酶能  
力高的菌株, 我们以 3.1604 和 3.1602 为原  
始菌株进行诱变处理, 在处理过程中我们  
发现产酶能力高的菌株不只限于腺嘌呤缺  
陷型菌株, 在形态上发生变异的一些菌株  
均有一定的产 RNase 能力。

经过摇瓶试验, OA047 菌株在 5% 麸  
皮液体培养基中产酶量为改良 Frie's 培养  
基的 5 倍。但是该菌株在 5% 豆饼粉培养  
基中产酶量较低。然而, WA011 菌株在  
5% 豆饼粉培养基中产酶量最高, 为对照  
Frie's 培养基产酶量的 5 倍, 在 5% 麸皮培  
养基中产酶量较低。显然, 二者不仅在形  
态上有差异, 而且在生化特性上也有不  
同。

OA047 菌株发酵液的粗酶液以对硝  
基苯磷酸和双对硝基苯磷酸为底物, 在较  
长的反应时间后, 也未发现 PMase 和 PDase

活力。OA047 菌株发酵液中的 RNase 对热是稳定的。粗酶液在酸性条件下, 加少许氯仿、低温保存较长时间, RNase 活力未见降低。经 OA047 RNase 水解酵母 RNA 产物末端核苷 3'-磷酸和对均聚多核苷酸水解作用的检查, 证明该酶专一地水解鸟苷酸和次黄嘌呤核苷酸残基, 说明它与 RNase T<sub>1</sub> 具有相同的碱基专一性。对 2', 3' G>P 水解作用的结果表明, OA047 菌株产生的 RNase, 水解 2', 3' G>P 的能力比 RNase T<sub>1</sub> 低 14 倍。以上结果说明, OA047 菌株产生的 RNase 与高井<sup>[1]</sup>等人报道的 RNase N<sub>1</sub> 相同。

OA047 菌株粗酶液具有活力高, 酶活稳定, 不含有磷酸单酯酶和磷酸二酯酶等杂酶的优点, 便于制备纯化 RNase N<sub>1</sub>, 是一株较好的 RNase N<sub>1</sub> 生产菌株。我们已

用该菌株大量制备纯化了的 RNase N<sub>1</sub>。

## 参 考 文 献

- [1] 高井纪荣、内田庸子、江上不二夫, 生化学, **39**: 473, 1967。
- [2] Kasai, K. et al.: *J. Biochem.*, **66**:389, 1969.
- [3] Ueda. K. et al.: 醱酵工學雜誌 **49**:981, 1971.
- [4] Takebe, H. et al.: 醱酵工學雜誌, **49**:989 1971.
- [5] Koike, T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **190**: 257, 1969.
- [6] Koike, T. et al.: *J. Biochem.*, **70**:55, 1971.
- [7] Mulling, H. Y., F. J. De Serres: *Molec. Gen. Genet.*, 106: 195, 1970.
- [8] Uozumi, T. et al.: *Arg. Biol. Chem.*, **33**: 25, 1969.
- [9] Uchida, T., and G. Egami: *J. Biochem.*, **61**:44, 1967.
- [10] Hashimoto, J., and T. Uchida: *J. Biochem.*, **70**:903, 1971.

## STUDIES ON THE SELECTION AND CULTIVATION OF RIBONUCLEASE $N_1$ -HIGH PRODUCING STRAIN OF *NEUROSPORA CRASSA*

Zhang Qi-jiu      Liu Zeng-yin

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

The selection and cultivation of ribonuclease  $N_1$ -high producing strain of *Neurospora crassa* as well as the identification of its ribonuclease is introduced in this paper.

(1) When initial strain, *N. crassa* 3.1602 (ornithineless) was treated by 1/5000 triethylene tetramine at 28° for 2 hours, and followed by the treatment with  $\gamma$ -ray irradiation delivered by  $^{60}\text{Co}$  at a dose rate of 13.2 Kr for 4 minutes (total dose, 52.8 Kr), a double auxotrophic strain, ornithineless and adenineless OA047 was derived. *N. crassa* strain WA011 was obtained from initial strain, 3.1604 (wild-type) by the treatment with 100  $\mu\text{m}$  N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine at 28° for 2 hours.

(2) *N. crassa* strain OA047 was grown in shaking flasks containing 5% wheat bran at 28°—30° for 72 hours, and the activity of ribonuclease in the culture filtrate was 114.5 units/ml. The activity of ribonuclease in the culture filtrate of *N. crassa* strain WA011 also reached

about 100 units/ml, after it was grown in shaking flasks containing 5% soybean powder at 28°—30° for 72 hours. The productivity of ribonuclease of both strains, under cultural condition as described above, was successfully increased to 100 times as compared with that of its initial strains growing in modified Frie's medium.

(3) Crude extract of *N. crassa* strain OA047 does not contain enzymic activities of phosphomonoesterase and phosphodiesterase ribonuclease in crude extract is very stable. After it was heated at 80° for 2 minutes at pH 1.5—2.0, its activity was almost fully retained. Ribonuclease in the culture filtrate of *N. crassa* OA047 was identified as ribonuclease  $N_1$  by the estimation of 3'-terminal residue of digestion products of yeast RNA, of its hydrolyzation of homopolynucleotides (Poly I, Poly C, Poly A and Poly I: C) and its hydrolase activity for 2', 3'-cyclic guanylic acid.