

纤溶酶产生菌原生质体形成与再生条件的探索

梁惠仪, 郭勇

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 本文研究了菌龄、酶浓度、酶解时间、酶解 pH、温度、渗透压稳定剂及青霉素对枯草芽孢杆菌 DC-12 原生质体形成和再生的影响。确定了 DC-12 原生质体最佳的形成和再生条件是以改良 HM 高渗溶液作稳渗系统, 在 pH 7.5、酶浓度为 0.2 mg/ml (活力单位为 50000 U/g) 和 35 °C 的条件下酶解 60 min; 此条件下所得原生质体形成率为 96.1%; 以 0.6 mol/L NaCl 为渗透压稳定剂的 DM₃ 再生培养基中再生率为 21.6%。

关键词: 原生质体; 形成和再生; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: Q925; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)05-0023-03

Study on Protoplast Formation and Regeneration of Fibrinolytic

Enzyme-producing Strains

LIANG Hui-yi, GUO Yong

(College of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effects of different factors, such as age, lysozyme dosage, enzymatic time, the pH value, temperature, osmotic stabilizer, and penicillin, on protoplast formation and regeneration of Bacillus strains DC-12 were studied. The most suitable hypertonic buffer, culture time, pH value, lysozyme dosage, reaction temperature and time were HM hypertonic buffer, 7.5, 2.0 mg/mL, 37 °C and 60 min, respectively, with which the rate of protoplast formation and regeneration were 95.8%. If 0.6 mol/L NaCl was used as the regeneration hypertonic buffer, the rate of protoplast formation and regeneration was 21.6%.

Key words: Protoplast; Formation and regeneration; Bacillus

原生质体融合技术是 20 世纪 70 年代发展起来的一门技术^[1], 目前已作为高频重组的有效方法和遗传学工具, 越来越受到国内外生物学者的广泛重视。发酵豆豉的枯草芽孢杆菌所产生的纤溶酶能高效溶解体外血栓, 具有十分重要的开发价值。但由于野生型菌株的酶活偏低, 而且经过多次循环育种后菌株容易产生疲劳效应^[2], 很难用于工业化大生产。进行原生质体融合育种可以将彼此不同的优良基因组合在一起, 从而获取高纤溶酶菌株。在原生质融合过程中, 获得较高融合率的必要条件是较高的原生质体形成率和再生率^[3], 而原生质体的形成和再生受诸如酶浓度, 酶解时间, 酶解 pH, 渗透压稳定剂等因素的影响, 必须探索适合于该菌原生质体形成和再生的最佳条件。本研究对此菌的原生质体的形成和再生条件进行了研究, 为进一步原生质体融合选育优良重组菌株打下基础。

收稿日期: 2007-02-06

作者简介: 梁惠仪, 硕士研究生, 研究方向为产纤溶酶的筛选, 基因组重排育种及发酵特性分析

1.1.1 菌种: 纤溶酶产生菌 DC-12 (本实验室提供)。

1.1.2 菌体生长培养基: 营养肉汤培养基

1.1.3 溶菌酶溶液:

用无菌药匙准确称取适量溶菌酶于无机试管内, 加入适量高渗溶液使溶菌酶的浓度达 1.0 mg/ml, 常温下振荡溶解, 备用。溶菌酶: Sigma 公司。

1.1.4 高渗溶液

改良的 HM 溶液 (%): NH₄Cl 0.1, TRis 1.2, KCl 0.0035, NaCl 0.0058, Na₂SO₄·10H₂O 0.03, MgCl₂·5H₂O 0.426, 葡萄糖 0.2, 蔗糖 170.117, pH 7.5。

1.1.5 再生培养基 (DM₃)

下层: 1 mol/L 琥珀酸钠 500 ml, 5% 水解酪蛋白 100 ml, 10% 酵母膏 50 ml, 3.5% KH₂PO₄ 和 1.5% K₂HPO₄ 100 ml, 20% 葡萄糖 25 ml, 1 mol/L MgSO₄ 20 ml, 2% 牛血清蛋白 5 ml, 4% 琼脂 200 ml, pH 7.0, 1×10⁵Pa, 20 min 灭菌。

上层: 0.6% 琼脂糖, 其余同上。

1.2.1 原生质体制备和再生方法^[4,5]

(1) 将纤溶酶产生菌 DC-12 接种到 LB 完全固

体培养基上,活化 24 h, 再接种到 LB 液体培养基中, 37 °C, 180 r/min, 培养 14 h, 然后按 1%的接种量接入到装有 40 ml LB 液体培养基的 100 ml 三角瓶中, 37 °C, 180 r/min, 继续活化培养 4.5~5 h, 至 OD 值约为 0.8。

(2) 培养结束后立即取下摇床, 6000 r/min 下离心 10 min, 弃去上清液, 用生理盐水洗涤 2 次后, 再用 HM 液洗涤 1 次, 最后用 HM 液悬浮, 制成 $(2\sim5)\times 10^8$ 个/mL 的菌悬液, 取一定量的菌体做适当稀释涂布平板, 计总菌数(活菌计数), 记作 A。

(3) 其余 HM 菌悬液转移至小三角瓶(100 mL)中, 再加入一定的溶菌酶, 在一定温度和 pH 值下水浴中保温酶解一段时间。

(4) 取上述酶解后的原生质体液, 立即在 6000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 用 HM 液洗涤 1 次, 最后悬浮于等体积的 HM 液中。

(5) 取上述原生质体液各 0.5 mL, 分别用无菌水和 HM 液进行系列稀释, 用最后三个稀释浓度涂布平板, 无菌水稀释液涂 LB 平板, HM 液稀释液涂 DM₃ 平板, 每皿涂 0.1 mL, 每组相同浓度涂 3 皿, 30 °C 下培养 24~36 h, 计算菌落数。无菌水稀释为未被酶解的细菌数, 记作 B; HM 液稀释为再生原生质体数和未被酶解的细菌数, 记作 C。

1.2.2 原生质体形成率和再生率的计算

$$\text{原生质体形成率(\%)}=(A-B)/A$$

$$\text{原生质体再生率(\%)}=(C-B)/(A-B)$$

其中: A 为处理前菌落数; B 为未被酶解的菌落数; C 为再生原生质体数和未被酶解细菌数。

2 结果与讨论

2.1 酶的浓度的影响

由表 1 可知, 溶菌酶为 0.1 mg/ml 时, 细胞壁不能充分水解破坏, 原生质体释放数量少, 还可能导致脱壁不彻底, 给融合造成障碍; 当酶浓度为 0.4 时, 原生质体的再生率显著下降, 这可能是由于酶浓度过高使原生质体脱水皱缩^[2], 活性下降引起的, 故选择为 0.2.0 mg/ml 最佳酶浓度。

表 1 溶菌酶浓度对原生质体形成和再生的影响

溶菌酶/(mg/mL)	0.1	0.2	0.3	0.4
原生质体形成率/%	75.3	84.7	86.8	88.7
再生率/%	15.4	17.9	13.3	9.7

注: 37 °C 酶解 30 min, 酶活单位为 50000 U/g

2.2 酶解时间的选择

表 2 酶解时间对原生质体形成和再生效果的影响

酶解时间/min	15	30	45	60	75	90	105
原生质体形成率/%	49.5	73.8	84.3	91.6	92.9	94.3	94.8
再生率/%	22.3	20.2	18.6	16.8	10.2	5.3	4.2

注: 溶菌酶浓度为 0.2 mg/mL, 37 °C 酶解, 酶活单位为 50000 U/g

表 2 知随着时间的推移, 原生质体形成率逐渐增加, 60 min 时达到最高并进入稳定状态, 原生质体不再随时间的推移明显增加, 但从 60 min 之后再生率则下降明显, 可能的原因时酶解时间过长对原生质体造成损伤, 不利于再生。因此, 60 min 为适宜酶解时间。

2.3 酶解 pH 的确定

表 3 不同 pH 对原生质体形成和再生的影响

酶解 pH	5.5	6.5	7.5	8.5
原生质体形成率/%	69.6	79.8	95.3	87.6
再生率/%	14.2	15.6	19.7	18.8

注: 溶菌酶浓度为 0.2 mg/mL, 37 °C 酶解 60 min, 酶活单位为 50000 U/g。(表 4 同)。

表 3 知, 原生质体的形成率在 pH 7.5 时达到最高, pH 过高或过低是不利于原生质体形成的, 而 pH 对再生率则影响不大, 所以选择 pH 7.5 为最佳酶解 pH。

2.4 酶解温度的选择

温度过低和过高都不利于原生质体再生, 过低势必延长酶解时间来获得相同数量的原生质体, 从而增加酶对早先形成原生质体毒害作用, 过高则对酶活性造成不利影响^[2], 由表 4 知, 35 °C 为最佳酶解温度。

表 4 不同温度对原生质体形成和再生的影响

温度/°C	25	30	35	40	45
原生质体形成率/%	76.8	81.3	96.1	95.8	79.5
再生率/%	20.8	21.3	23.8	17.8	9.7

2.5 添加青霉素对原生质体形成和再生的影响

由表 5 可知, 添加青霉素反而不利于原生质体制备, 这与文献的报道报道有差异^[6], 可能是因为青霉素抑制的菌体生长, 从而使菌体转化成芽孢状态有关, 故不在培养基中添加青霉素。

表 5 添加青霉素与否对原生质体形成和再生的影响

青霉素浓度/(μg/ml)	5.0	2.5	1.2	0
原生质体形成率/%	75.8	82.6	90.8	94.7
再生率/%	19.6	20.4	21.3	23.2

注: 溶菌酶浓度为 0.2 mg/mL, pH 7.5, 35 °C 酶解 60 min, 酶活单位为 50000 U/g

2.6 再生培养基中不同渗透压稳定剂对原生质体再生的影响

由表 6 可知, NaCl, 蔗糖, 甘露醇对原生质体再生相差不大, 但甘露醇较贵, 而蔗糖在多次实验中发

现容易使长出的菌落迅速铺开,不利于计数和挑选,NaCl 能克服这个缺点,且便宜,故选择 0.6 mol/L NaCl 磷酸盐缓冲系统作为再生培养基的渗透压稳定剂。

表 6 不同渗透压稳定剂对原生质体再生的影响

渗透压稳定剂/(0.6 mol/L)	KCl	NaCl	蔗糖	甘露醇
再生率/%	14.8	21.6	22.7	23.4

注:溶菌酶浓度为 0.2 mg/mL, pH 7.5, 35 °C 酶解 60 min, 酶活单位为 50000 U/g

3 结论

DC-12 原生质体最佳的形成和再生条件是以改良 HM 高渗溶液作稳渗系统,在 pH 7.5, 酶浓度为 0.2 mg/ml (酶活单位为 50000 U/g) 和 35 °C 的条件下酶解 60 min; 此条件下所得原生质体形成率为 96.1%; 以 0.6 mol/L NaCl 为渗透压稳定剂的 DM₃ 再生培养基中再生率为 21.6%。

(上接第 10 页)

实验证实绿豆中存在胰蛋白酶抑制因子。

通过(NH₄)₂SO₄ 分级沉淀 (50%~90%)、DEAE-实验室 Sepharose CL-6B 离子交换和 Sephacryl S-200 凝胶过滤等方法可分离纯化绿豆中胰蛋白酶抑制因子。

胰蛋白酶抑制因子在较宽的温度和 pH 值范围内稳定。

参考文献

- [1] 赵永芳.生物化学技术原理及其应用(第二版)[M].武汉:武汉大学出版社,1994
- [2] 陈中.酶钝化豆类种子胰蛋白酶抑制子的研究[D].华南理工大学博士学位论文,2000
- [3] D.R.马歇克, J.T.门永, R.R.布格斯等著,朱厚础等译.蛋白质纯化与鉴定实验指南[M].北京:科学出版社,1999

(上接第 13 页)

3.1 采用均匀实验确定了较适宜的发酵条件为发酵温度 30 °C、嗜酸乳杆菌 5%、植物乳杆菌 1.5%、发酵时间 12 h。

3.2 采用四元二次通用旋转组合试验将发酵温度、La、Lp 两菌种接种量、发酵时间四因素对发酵蔬菜汁的产酸量进行回归,得到方程 $Y=0.4394+0.102x_1+0.0338x_3+0.1107x_4-0.0163x_1^2$, 其中 x_1 为发酵温度、 x_3 为植物乳杆菌接种量、 x_4 为发酵时间、 Y 为发酵蔬菜汁的产酸量。通过这回归方程可对乳酸发酵蔬菜汁在不同条件下的产酸量进行大致的估计和预测,这一研

参考文献

- [1] Fodor K & Alföldi L. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium* proc[J].Natl Acad Sci USA,1976,73(6): 2147-2150.
- [2] 施巧琴,吴松刚.工业微生物育种学[M].北京:科学出版社,2003
- [3] 涂永勤,肖崇刚.蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)原生质体形成与再生条件研究[J].生物学杂志,2005,22(5):17-19
- [4] 周东坡,平文祥.微生物原生质体融合[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1990
- [5] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [6] 陈乃应,印小明.芽孢杆菌原生质体的形成和质粒转化的研究[J].微生物学报,1986,26(2):134-142
- [7] 刘伊强,王稚平等.芽孢杆菌原生质体的形成、再生及种间融合的研究[J].微生物学报,1994,34(1):76-80
- [4] 杨晓泉,文方德,张水华等.花生胰蛋白酶抑制剂的纯化与纯化研究[J].营养学报,1998,20(3):246
- [5] Ashok P. Giri, Abhay M. Harsulkar, Vasanti V. Deshpande, et al. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinase[J].Plant physiol,1998, 116: 393-403
- [6] 邱毅.除去大豆的不良因素提高豆奶质量[J].四川食品工业科技,1995,2:20-21
- [7] 苏拔贤.生物化学制备技术[M].北京:科学出版社
- [8] 黄纪昆.碱性内切蛋白酶的大豆蛋白改性及胰蛋白酶抑制因子降解研究[D].广州:华南理工大学学士学位论文,1999
- [9] 王重庆,李云兰,李德昌等.高级生物化学实验教程[M].北京:北京大学出版社,1994
- [10] 励建荣,顾振宇,冯成汉.用酶去除大豆抗营养因子的研究[J].中国粮油学报,1997,12(2):15

究方法和结果在工业化生产中具有实际的指导作用。

参考文献

- [1] 中国普通微生物菌种保藏管理中心.菌种目录(第三版)[M].中国农业科技出版社,1997
- [2] 侯红漫,宋海波.酸菜汁中乳酸菌的分离、鉴定及应用[J].食品科学,1997,(1):29-32
- [3] 宁正祥等.食品成分分析手册[M].中国轻工业出版社,1998: 32-35