

复合诱变定向选育腺苷生产菌

张天瑞, 刘淑云, 徐庆阳

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 以枯草芽孢杆菌 HJ-9(Xan⁻)为出发菌株, 根据代谢工程原理, 采用原生质体紫外诱变和微波诱变相结合的方法, 定向筛选出了具有黄嘌呤缺陷、腺嘌呤脱氨酶阴性、磺胺胍抗性的腺苷生产菌 HS-5, 其摇瓶发酵产量由出发菌株的 1.06 mg/mL, 提高到 3.15 mg/mL。

关键词: 原生质体; 紫外诱变; 微波诱变; 育种

中图分类号: TQ464.3; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)03-0017-04

Compound Mutation and Directive Breeding of

Adenosine Production Strain

ZHANG Tian-rui, LIU Shu-yun, XU Qing-yang

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, 300457, China)

Abstract: In this paper, *Bacillus subtilis* HJ-9(Xan⁻) was selected as the parent strain and treated by protoplast mutagenesis with ultraviolet and microwave, giving a adenosine-producing strain *B.subtilis* HS-5. The yield of the mutant increased from 1.06 mg/mL to 3.15 mg/mL.

Key words: protoplast; UV; microwave; mutation breeding

腺苷 (adenosine) 即腺嘌呤核苷, 是急诊处理快速性心律失常和药物负荷试验的常规用药, 已证实它具有心脏保护作用, 可增强心肌对缺血的耐受力, 减少心肌的再灌注损伤, 减小梗死面积^[1,2]。腺苷同时还是一种重要的医药中间体, 可合成多种药用核苷类物质, 如8-氮腺苷、三磷酸腺苷 (ATP)、腺苷酸、阿糖腺苷等。腺苷的生产主要有RNA降解法、化学合成法和发酵法, 其中发酵法生产腺苷的成本最低, 并且具有产量高、周期短、易操控等优点。目前, 国内外对发酵法生产腺苷的研究都取得了一定进展^[3]。

根据代谢工程原理作者采用原生质体紫外诱变与微波诱变相结合的方法选育腺苷生产菌。使用紫外线对原生质体进行诱变, 会由于去除了细胞壁对紫外线的阻碍, 使诱变的效果更加明显^[4]。微波诱变已被证明其诱变效果远比传统的理化因子好, 正变频率高、且操作简单, 安全可靠^[5,6], 将两者相结合后对腺苷生产菌进行诱变选育, 以期提高其腺苷产量。

1 材料和方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) HJ-9(Xan⁻), 天

收稿日期: 2006-10-20

作者简介: 张天瑞, 女, 研究生, 研究方向为代谢控制发酵

津科技大学代谢控制发酵研究室保藏。

1.2 培养基

肉汤培养基、完全培养基、基本培养基和再生完全培养基见文献^[7]。

补充培养基: 在基本培养基上添加10 mg/L黄嘌呤, pH 7.0。

抗性培养基: 在补充培养基上添加1 g/L磺胺胍制成抗性培养基。

种子培养基(%): 葡萄糖2.0, 酵母粉1.0, 蛋白胨1.5, 玉米浆0.5, 尿素0.9, NaCl 0.25, pH 7.0。

发酵培养基(%): 葡萄糖10.0, 酵母粉1.0, 玉米浆0.5, NH₄Cl 2.0, KH₂PO₄ 0.2, MnSO₄ 0.005, 尿素0.375, MgSO₄ 2.0, CaCO₃ 3.0, pH 6.6。

1.3 菌悬液的制备

取活化斜面上的菌种1环于盛有30 mL肉汤培养液的500 mL三角瓶中, 34 °C, 170 r/min 培养, 定时取样, 绘制菌体的生长曲线, 根据结果, 取对数生长稳定期的菌体, 转接继续培养至对数生长期, 取出, 4000 r/min 离心10 min, 弃去上清液, 原生质体紫外诱变所用菌悬液用高渗溶液 (SMM 液) 洗涤两次, 最后悬于 SMM 液中。微波诱变所用菌悬液用生理盐水洗涤并悬于生理盐水中。

1.4 诱变与筛选方法

1.4.1 原生质体紫外诱变

原生质体的制备方法,原生质体形成率和再生率的计算方法见文献^[7]。取原生质体悬浮液于培养皿内进行紫外线诱变,功率15 W紫外灯(距离30 cm)作不同时间的照射处理,至所需时间后,用SMM液适当稀释,倾注于再生完全培养基平板上,32 ℃培养至长出菌落,计算致死率。

1.4.2 微波诱变见文献^[8]

1.4.3 腺嘌呤脱氨酶阴性菌株的筛选

将原生质体紫外诱变处理后再生的菌落,挑入完全培养基,编号并用影印法接种,按文献^[9]的方法筛选,获得菌株后进行酶活测定^[10]。

1.4.4 磺胺胍抗性菌株的筛选

取微波诱变处理后的菌液,稀释后涂布于含有磺胺胍抗性培养基上,37 ℃培养7 d,挑取单菌落接入保藏斜面,并进行摇瓶发酵测腺苷产量。

1.5 测定方法

将菌株接入活化培养基活化24 h后接入种子培养基,在34 ℃、170 r/min下培养11 h后以10%接种量接入发酵培养基并在36 ℃、220 r/min培养60 h。培养完后用高效液相色谱法测定发酵液中腺苷含量,色谱柱为Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为磷酸盐-甲醇缓冲液(pH 6.5) ($V_{\text{磷酸盐缓冲液}}:V_{\text{甲醇}}=85:15$),检测波长260 nm,流速0.8 mL/min,柱温30 ℃,进样量20 μL。

2 结果

2.1 原生质体紫外诱变

2.1.1 HJ-9 菌体生长曲线的绘制

HJ-9 菌体生长曲线见图1。由图1可知菌体在4 h进入对数生长期,10 h后进入稳定期。根据曲线,选择7~8 h的菌体进行原生质体制备。

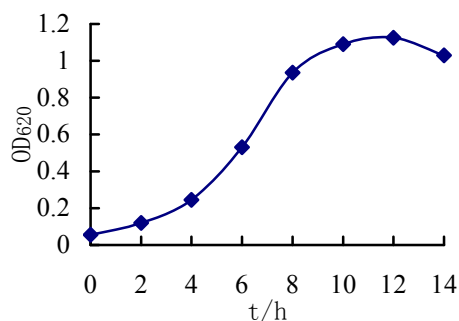


图1 HJ-9 菌体生长曲线

2.1.2 酶浓度的确定

制备好的菌液用不同终浓度的溶菌酶处理 20

min, 所得酶浓度与原生质体形成率及再生率的关系如图2, 当酶浓度达1 mg/mL时, 原生质体形成率可达99.1%, 原生质体再生率为3.7%。当酶浓度继续增大时, 原生质体形成率增加缓慢, 再生率下降, 因此选择最适酶浓度为1 mg/mL。

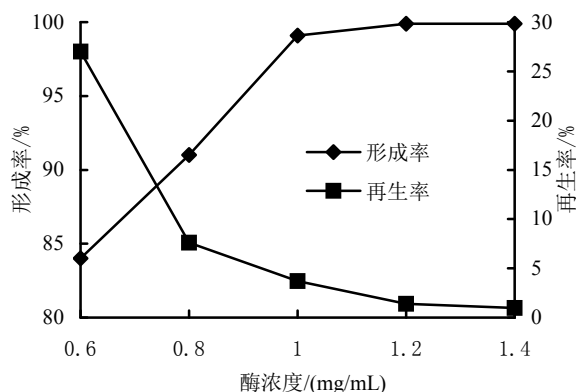


图2 酶浓度与原生质体形成率及再生率的关系

2.1.3 酶解时间的确定

用终酶浓度为1 mg/mL 溶菌酶对菌体作用不同时间, 所得酶解时间与原生质体形成率及再生率的关系如图3。当酶解时间小于20 min, 原生质体形成率小于99%, 超过20 min, 原生质体形成率则增加缓慢。在本实验中要对原生质体进行诱变, 需要较高的形成率和一定的再生率, 所以选择20 min 为最适酶解时间。

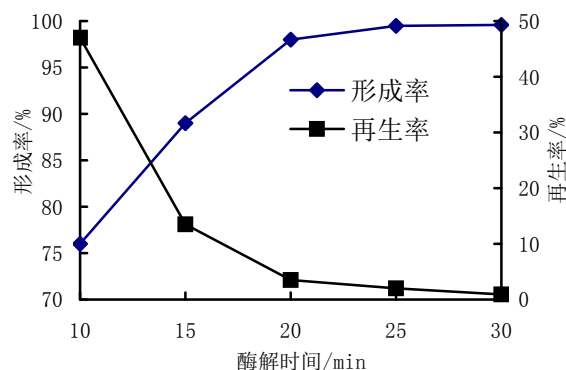


图3 酶解时间与原生质体形成率及再生率的关系

2.1.4 原生质体紫外诱变的致死曲线

将原生质体悬浮液, 用紫外线分别照射0 s、5 s、10 s、15 s、20 s、25 s, 以照射时间为横坐标, 致死率为纵坐标, 绘出紫外线对HJ-9菌原生质体的致死曲线, 结果如图4所示。由图4可知, 原生质体经紫外线照射后, 在0~15 s照射时间内, 致死率明显增加, 15 s后, 曲线变化平缓。一般认为致死率在70%~80%之间诱变

效果最好,根据致死曲线,决定采用10 s作为紫外原生质体诱变的最佳作用时间。

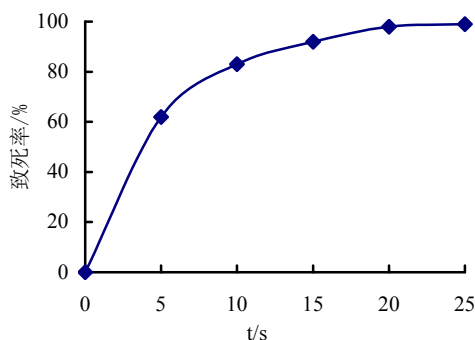


图4 紫外线对HJ-9菌原生质体的致死曲线

2.2 微波诱变

选用频率2450 MHz的微波对菌悬液进行辐照诱变,辐照时间为0 s、50 s、100 s、150 s、200 s、250 s。辐照处理后,以照射时间为横坐标,致死率为纵坐标,绘出微波诱变剂量效应曲线,结果如图5所示。由图可以看出随着微波辐照时间的增加,致死率也随着增加。根据结果,选取150 s作为最佳诱变时间。

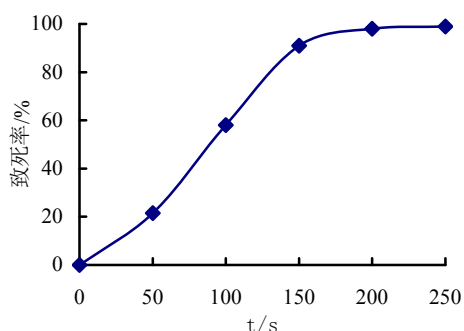


图5 微波辐射诱变的致死曲线

2.3 腺嘌呤脱氨酶阴性菌株的筛选

根据代谢工程理论,要大量积累腺苷,需阻断AMP→IMP代谢途径,使合成的腺苷不再被消耗,即选育缺失腺嘌呤脱氨酶突变株。经原生质体紫外诱变,筛选在添加有50 mg/L 8-氮鸟嘌呤(8-AG)的补充培养基上不能生长的突变株^[9],经酶活测定和摇瓶发酵测定产量,获得了具有腺嘌呤脱氨酶阴性标记并有较高产量的突变株HD-8(表1),将此菌保藏并作为下一步诱变的出发菌株。

表1 腺嘌呤脱氨酶阴性突变株筛选结果

| 菌株 | HJ-9 | HD-1 | HD-2 | HD-8 | HD-17 | HD-22 |
|--------------|------|------|------|------|-------|-------|
| 生长情况* | + | - | - | - | - | - |
| 腺嘌呤脱氨酶活性 | + | - | - | - | - | - |
| 腺苷产量/(mg/mL) | 1.06 | 1.73 | 1.79 | 2.11 | 1.68 | 1.89 |

注:生长情况为在添加8-AG的补充培养基上生产情况

2.4 磺胺胍抗性菌株的筛选

为增加由PRPP→IMP主代谢流的通量,促进腺苷的积累,可选育磺胺类药物的抗性突变株。将微波诱变后的菌液,涂布于含有磺胺胍的抗性培养基上,培养7d后挑取单菌落,随机挑选进行酶活测定和摇瓶发酵检测产苷量。部分结果见表2。

表2 SG抗性突变菌筛选结果

| 菌株 | HS-5 | HS-9 | HS-11 | HS-12 | HS-17 | HS-23 | HS-25 | HS-29 |
|-----|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 活性* | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 产量* | 3.15 | 2.59 | 3.05 | 2.90 | 2.82 | 2.44 | 2.40 | 3.09 |

注:活性为腺嘌呤脱氨酶的活性;产量为腺苷产量/(mg/mL)

由表2可知,所筛选具有磺胺胍抗性突变株的腺苷产量明显高于出发菌株,腺嘌呤脱氨酶经检测仍为阴性,其中HS-5的产量可达3.15 mg/mL,比出发菌株提高1.97倍。

2.5 菌株遗传稳定性测定

对突变株HS-5进行了遗传稳定性实验,每传代2次进行摇瓶发酵,测定腺苷产量。实验结果见表3。

表3 HS-5遗传稳定性实验

| 遗传代数 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 平均值 |
|------|------|------|------|------|------|------|
| 遗传标记 | + | + | + | + | + | |
| 产量* | 3.21 | 3.04 | 3.10 | 2.97 | 3.13 | 3.09 |

注:产量为腺苷产量/(mg/mL)

由表3可知突变株HS-5遗传标记稳定,未发生回复突变,产量稳定。

3 讨论

HJ-9为肌苷生产菌经化学诱变选育而来,经多次诱变后,已对化学诱变剂产生耐受性,现采用原生质体紫外诱变和微波诱变相结合的方法,对该菌进行定向选育,成功筛选出HS-5,说明复合诱变对选育腺苷生产菌是行之有效的。采用枯草芽孢杆菌HJ-9为出发菌株,经过原生质体紫外诱变,筛选出腺嘌呤脱氨酶阴性突变株HD-8,摇瓶发酵产苷量比出发菌株提高了0.99倍,后经微波诱变,筛选出具有磺胺胍抗性的突变株HS-5,发酵产苷可达3.15 mg/mL,比出发菌株提高1.97倍,且遗传性状稳定。

筛选出的HS-5已具有黄嘌呤缺陷、腺嘌呤脱氨酶阴性、磺胺胍抗性标记,在以后的研究中将进一步增加8-氮鸟嘌呤抗性、8-氮杂黄嘌呤抗性,6-巯基嘌呤抗性标记,以解除嘌呤代谢途径中的反馈抑制,增加腺苷产量。

(下转第26页)