

豆豉溶栓酶产生菌株的诱变育种

豆孝伟, 陈桂光, 张云开, 梁智群

(广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004)

摘要: 以豆豉溶栓酶产生菌株蜡状芽胞杆菌 DC-101 为出发菌株, 通过微波和紫外线对该菌株的联合诱变作用, 得到一株遗传稳定性较好的高产菌株 DC-301, 其产酶能力是出发菌株的 2.67 倍。

关键词: 溶栓酶; 微波; 诱变育种

中图分类号: TS261.1⁺5; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)03-0033-03

Mutation of *Douchi* Fibrinolytic Enzyme Producing Strain

DOU Xiao-wei, CHEN Gui-guang, ZHANG Yun-kai, LIANG Zhi-qun

(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Mutant DC-301 was got with microwave and ultraviolet radiation treatments, which is stable after several subcultures. The yield of the fibrinolytic enzyme produced by the mutant is 2.67 times higher than those by wild strain *Bacillus cereus* DC-101.

Key words: fibrinolytic enzyme; microwave; mutation breeding

豆豉是由大豆发酵而成, 是中国传统的保健食品。豆豉不含胆固醇, 除富含不饱和脂肪酸、多种维生素、矿物质、蛋白质、大量人体必需氨基酸等营养成分外, 还含有豆豉溶栓酶和多聚谷氨酸等生理活性成分, 因此具有多种保健功能, 如: 溶血栓、降血压、抗菌、预防骨质疏松症, 提高蛋白质消化率、抗氧化性等^[1]。

在我国, 血栓性疾病造成的损失极为严重, 尤其是随着人们生活水平和生活方式改变导致膳食中高脂肪、高蛋白的过量摄取和老龄化社会的到来, 血栓性疾病已超过癌症和糖尿病成为第一大健康杀手, 每年约有 100 多万人因此死亡^[2-6]。溶栓酶是治疗此类疾病的有效药物。豆豉溶栓酶具有安全性好, 在体内作用时间长, 药效持久等优点, 而且对顽固性血栓的治疗效果较好, 极有希望成为新一代理想的预防和治疗血栓的生化药物。本实验室筛选到一株产豆豉溶栓酶菌株, 为了提高其产酶能力, 本课题进行了利用微波和紫外线照射的诱变技术对产溶栓酶蜡状芽胞杆菌的诱变效应的研究。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

冻干人纤维蛋白原: 上海莱士; 凝血酶: 广西华兴生物制品有限公司; 尿激酶: 哈尔滨三联药业有限公司; 酵母粉: OXOID •LTD; 纤维蛋白(Fibrin Bovine

收稿日期: 2006-11-03

通讯作者: 梁智群教授, 博士生导师, 主要从事发酵工程和微生物学研究。

Blood): MP Biomedicals.inc; 其它试剂均为分析纯。

1.2 菌种

蜡状芽胞杆菌 DC-101 为本实验室保存。

1.3 培养基

种子培养基: 葡萄糖 0.5%, 蛋白胨 1%, 酵母膏 0.5%, NaCl 0.5%, 调 pH 至 7.2。

发酵培养基: 可溶性淀粉 2.0%, 豆浆 5%, 酵母膏 0.3%, KH₂PO₄ 0.1%, K₂HPO₄ 0.3%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, 调 pH 至 7.2。

LB 培养基: 胰蛋白胨(Trypton) 1%, 酵母粉(Yeast extract) 0.5%, NaCl 1%, 调 pH 至 7.0~7.2。

初筛培养基: LB 培养基+2%纤维蛋白

复筛培养基: LB 培养基+凝血酶+纤维蛋白原

1.4 方法

1.4.1 纤维蛋白原-琼脂平板的制作

据 Astrup 纤维蛋白平板法^[7]略加改进。称取 1.5 g 琼脂糖放入 250 ml 烧瓶中, 加入 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min, 冷却至 55~60 °C。在超净工作台上量取 10 mL 注入到直径为 9 cm 的平皿中, 加入 1 mL 凝血酶溶液 (10 U/mL) 和纤维蛋白原溶液 5 ml (含 11 mg 纤维蛋白原), 迅速混匀, 静置使其凝固, 凝固后即成为半透明的纤维蛋白原-琼脂平板。用直径为 2 mm 无菌不锈钢打孔器打孔, 每个平板打孔 4~6 个, 4 °C 保存备用。

1.4.2 尿激酶标准曲线的制作

精确称取标准品尿激酶溶于 pH 7.2 的无菌磷酸盐

缓冲溶液中,制成浓度为 2 U/ μ L、4 U/ μ L、6 U/ μ L、8 U/ μ L、10 U/ μ L 的尿激酶溶液。然后吸取 10 μ L 该溶液点滴在纤维蛋白原-琼脂平板的孔内。静置 10 min 后放置在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内保温 18 h,观察并测量透明圈的垂直直径。以尿激酶溶液浓度的大小为横坐标,透明圈垂直直径的乘积为纵坐标作图,绘出尿激酶标准曲线。

1.4.3 豆豉溶栓酶活力的测定

将发酵液在 4 $^{\circ}$ C、8000 r/min 离心 10 min,将上清液适当稀释,吸取 10 μ L 点滴在纤维蛋白原-琼脂平板上的孔内,操作方法同上。然后根据尿激酶标准曲线,推算出发酵液中所含豆豉溶栓酶相当于标准尿激酶的浓度单位。

1.5 诱变处理

1.5.1 菌悬液的制备

斜面种子接一环到种子培养基中,37 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 18 h。由所制得的该菌生长曲线可以知道,该菌在培养到 18 h 时达到对数生长期末期。此时的菌体生长较旺盛,最适合用于制备菌悬液。取种子培养液 200 mL,4 $^{\circ}$ C、8000 r/min 离心 10 min,弃去上清,无菌生理盐水洗涤、离心菌体两次。最后把所得的菌体悬浮在 10 mL 无菌生理盐水中,制成菌悬液。

1.5.2 最适诱变剂量的选择

剂量的大小常以致死率和变异率来确定。诱变剂对产量性状的诱变作用,大致有如下趋向:处理剂量大,致死率高(90%~99%),在单位存活细胞中负变菌株多,正变菌株少。但在不多的正变株中可能筛选到产量提高幅度大的变株。经长期诱变的高产菌株正突变率的高峰多出现在低剂量区,负变率在高剂量时更高。高剂量处理时,形态突变率和负变株出现多,两者的高峰值几乎是相平行的。正变株出现少,并且往往负突变大于正突变。但对诱变史短的低产菌株来说,情况恰好相反,正变株的高峰比负变株高得多。用小剂量进行诱变处理时,致死率约 50%~80%,在单位存活细胞中正突变株多,然而大幅度提高产量的菌株可能较少。其他一些具有较长诱变史的高产菌株和低产野生菌株,与以上趋向大致相似^[8]。

将适量上述菌悬液经紫外灯、微波炉分别诱变处理。由于该菌株是野生菌株,所以低剂量处理一定时间后取样,梯度稀释涂布初筛平板,恒温培养后,根据初筛平板上菌落生长状况,绘制致死率曲线;把初筛平板上有透明圈的菌株用无菌牙签点接到复筛平板上,恒温培养后,每个剂量下挑取 100 株菌株,测定其所产生的透明圈面积与菌落面积的比值,结果与出

发菌株对比。为了降低由于操作上引起的误差,认为菌株产酶量变化在 $\pm 10\%$ 以上的是发生变异的,绘出正变率、负变率曲线。

1.5.3 紫外诱变处理

取上述菌悬液 10 mL 倒入直径为 6 cm 的无菌平皿内,选择最适剂量在紫外灯下照射(15 W,距离 30 cm,预热 30 min)一定时间后,取样 1.0 mL,在红光下梯度稀释后涂布在初筛平板上,用黑布包裹后在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 18 h,观察、记录菌落生长状况。

1.5.4 微波诱变处理

将紫外诱变后的高产菌株培养制备菌悬液,取菌悬液 2 mL 注入 10 mL 的无菌离心管中,选择最适剂量用微波处理(每辐射 10 s 取出一次放到冰水混合物中冷却 10 s,然后继续处理,累计处理时间到规定时间)。把所取样品梯度稀释后涂布初筛平板,37 $^{\circ}$ C 培养 18 h 后,观察、记录菌落生长状况。

1.5.5 初筛

选取初筛平板上产生透明圈的菌落,用无菌牙签点接到复筛平板上(每皿点接 4~6 株)。37 $^{\circ}$ C 培养 18 h,观察、记录菌落生长状况和菌落周围透明圈的变化。

1.5.6 复筛

挑取复筛平板上透明圈面积与菌落面积之比较大的菌落进行液体发酵和遗传稳定性实验。

2 结果与分析

2.1 尿激酶标准曲线图

根据 1.4.2 方法制得的尿激酶标准曲线如图 1。由图 1 可以看出,在尿激酶浓度较低时,透明圈面积与尿激酶浓度具有明显的相关性,可以用来估算发酵液中溶栓酶的浓度。

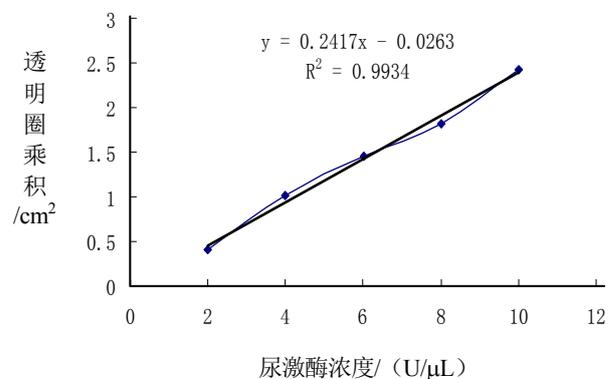


图 1 尿激酶标准曲线

2.2 紫外线对菌株的影响

将菌悬液在紫外灯下照射处理 10 s、20 s、30 s、40 s、50 s、60 s 后取样,所取样品梯度稀释后涂布初

筛平板, 然后进行复筛, 观察菌落生长情况并记录菌数。根据菌落生长状态和数目绘制致死率、正变率、负变率曲线, 如图 2。

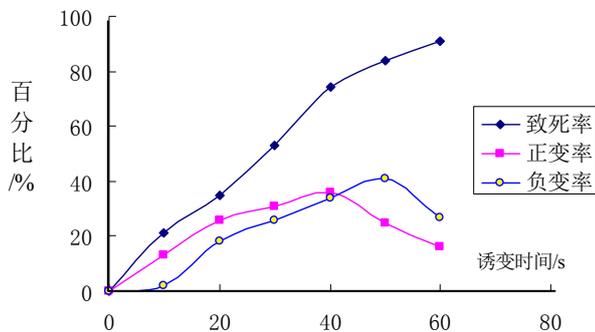


图 2 紫外线对菌株的影响

图 2 表明该菌株对紫外线相当敏感, 随着照射时间的延长, 致死率逐渐上升, 当紫外照射到 60 s 时, 致死率已经达到 91%; 而正变率和负变率随照射时间的延长先上升后下降, 正变率、负变率分别在 40 s、50 s 时达到最大。因此, 选择在 40 s 正变率最高时进行紫外诱变处理。

2.3 微波对菌株的影响

按照 2.2 方法, 绘制微波诱变处理时的致死率、正变率和负变率曲线, 如图 3。根据图 3 曲线可知, 致死率随诱变时间的延长, 逐渐升高, 当诱变时间到 70 s 时, 致死率达到 96.5%; 正变率在诱变 50 s 时达到最高, 负变率在 60 s 时达到最高。因此选择在 50 s 正变率最高时进行诱变处理。

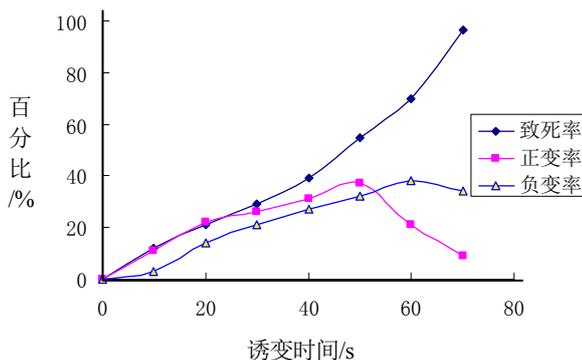


图 3 微波对菌株的影响

2.4 诱变结果

由出发菌株制备菌悬液, 紫外线处理后进行初筛、复筛, 测量透明圈面积与菌落面积的比值, 筛选出一株高产菌株 DC-201, 与出发菌株对比, 圈面积/菌面积由出发菌株的 2.386 提高到 3.388, 是出发菌株的 1.42 倍; 由菌株 DC-201 制备菌悬液微波处理 50 s 后, 进行初筛、复筛, 得到一株高产菌株 DC-301, 圈面积/菌面积达到了 6.585, 是出发菌株的 2.76 倍。

2.5 液体发酵测发酵液中酶活力

将菌株 DC-301 进行液体发酵培养, 发酵液离心测定其酶活力与出发菌株 DC-101 对比, 其酶活力由 2243 U/mL 提高到了 5989 U/mL, 是出发菌株的 2.67 倍。

2.6 遗传稳定性分析

对该高产菌株连续传代发酵培养 5 代, 测定其产酶能力的稳定性情况, 稳定性情况如图 4。由图分析可知, 连续传代培养 5 代后, 其产酶能力仍保持 96.5% 以上。说明该菌株性状比较稳定, 可稳定遗传。

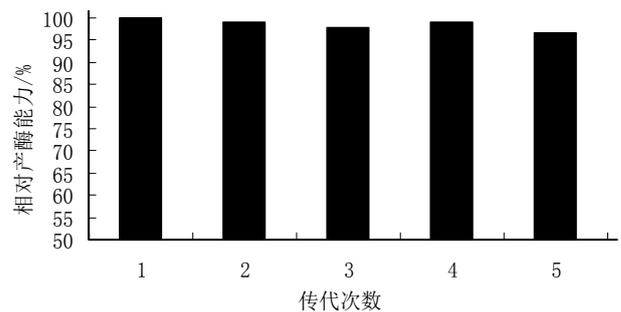


图 4 遗传稳定性

3 讨论

紫外线被 DNA 吸收后引起突变的原因, 主要是形成嘧啶二聚体。嘧啶二聚体不仅可以由单链上相邻的两个胸腺嘧啶之间反应后形成, 也可以产生于双链相对应的两个胸腺嘧啶之间。微生物在正常生长情况下进行 DNA 复制时, 因二聚体的交联作用, 阻碍双链分开, 复制到此处就无法进行下去, 造成 DNA 异常状态。如果在一条单链上出现嘧啶二聚体, 则会影响复制过程中碱基的正常配对, 造成新链碱基序列与母链不同而引起突变。

微波作为一种高频电磁波, 是一种最常用的物理诱变因素, 能刺激水、蛋白质、核苷酸、脂肪和碳水化合物等极性分子快速震动^[9]。从而可引起基因突变, 最终导致表型的变化, 如产生色素、产酶能力的变化以及抗药性的改变等。与其他方式相比, 微波诱变具有操作简单、安全、变异率高、辐射损伤轻等优点。而微波与其他诱变剂的复合处理, 也具有潜在的诱人的诱变效果^[10]。

本实验就是利用微波和紫外线照射的诱变技术对产溶栓酶蜡状芽孢杆菌的诱变效应进行研究。以豆豉溶栓酶产生菌株蜡状芽孢杆菌 DC-101 为出发菌株, 通过紫外、微波诱变处理, 得到一株遗传稳定性较好的高产菌株, 其产酶能力由出发菌株的 2243 U/mL 提

(下转第 38 页)