

用原生质体融合技术选育肌苷高产菌

王岳五 张 蓓 周与良

(南开大学生物系, 天津 300071)

肌苷又称次黄嘌呤核苷, 在医疗及食品等方面具有重要用途^[1,2]。目前, 我国肌苷发酵水平较低, 在工业生产上仅为 10g/L 左右, 如何提高肌苷生产菌的产能是当前一个重要研究课题。我们根据代谢控制原理^[3], 经 DES 诱变处理, 有目的地获得了具有 Ade^+ + Xan^+ + SG^+ 和 Ade^- + His^- + $8-AG^+$ 标记的突变株, 经原生质体融合将目的标记加以组合, 获得了可积累 24.58g/L 肌苷的融合子 F22。该菌株可望应用于工业生产。

材料与方 法

(一) 菌种

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 7171-9-1 (Ade^- + Thi^- + $8-AG^+$) (天津味精厂提供, 本室保存菌种)。

(二) 培养基与有关溶液

1. 完全培养基(%): 牛肉膏 1.4, 蛋白胨 1, 酵母膏 1, NaCl 0.5, pH 7.0—7.2 (固体培养基加 2% 琼脂)。

2. 基本培养基(%): 葡萄糖 0.5, 柠檬酸钠 0.1, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, K_2HPO_4 1.4, KH_2PO_4 0.6, 琼脂 2, pH 7.0—7.2。

3. 补充培养基: 培养基 2 中添加以下物质, 制成各种补充培养基: 腺嘌呤 50 μ g/ml, 黄嘌呤 50 μ g/ml, 组氨酸 50 μ g/ml, 硫胺素 50 μ g/ml。

4. 含抗生素培养基: 培养基 3 中添加磺胺胍 200 μ g/ml, 8-氮鸟嘌呤 200 μ g/ml。

5. 高渗固体培养基: 培养基 1 中添加 0.5mol/L 蔗糖, 20mmol/L $MgCl_2$, 20mmol/L 顺丁烯二酸, 琼脂 2, pH 7.0—7.2 (高渗半固体培养基的琼脂量改为 0.8%)。

6. 高渗选择培养基: 培养基 2 中添加 0.5mol/L 蔗糖, 20mmol/L $MgCl_2$, 20mmol/L 顺丁烯二酸, 腺嘌呤、黄嘌呤及组氨酸各 50 μ g/ml, 磺胺胍和 8-氮鸟嘌呤各 200 μ g/ml, pH 7.0—7.2 (高渗半固体选择培养基的琼脂量改为 0.8%)。

7. 种子培养基(%): 葡萄糖 2, 酵母膏 1, 玉米浆 0.5, 蛋白胨 1, 尿素 0.8, NaCl 0.25, 腺嘌呤、黄嘌呤及组氨酸各 0.004, pH 7.0。

8. 发酵培养基(%): 葡萄糖 12, 玉米浆 0.4, 药用酵母粉 1.8, K_2HPO_4 0.6, $(NH_4)_2SO_4$ 1.4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 尿素 0.5, $CaCO_3$ 2, pH 7.2。

9. 0.1mol/L 磷酸缓冲液: 61ml 0.1mol/L $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 和 39ml 0.1mol/L KH_2PO_4 混合。

10. SMM 缓冲液: 0.5mol/L 蔗糖, 20mmol/L 顺丁烯二酸, 20mmol/L $MgCl_2$, pH 6.5。

11. SMMD 溶液: SMM 缓冲液中加 DNase 5 μ g/ml。

12. PEG 溶液: 40% PEG 6000 溶于 SMMD 溶液中。

(三) 诱变

参照文献[4],用 1% DES 诱变处理 60 分钟。

(四) 原生质体制备

将获得的突变株 N_{10} 和 N_{100} 的新鲜斜面分别接入培养基 1 中, 32℃ 振荡培养过夜。取 1ml 接入 20ml 新鲜液体培养基中, 32℃ 振荡培养至对数期, 离心收集菌体, 用 SMM 缓冲液洗两次, 悬于 SMM 缓冲液中。分别加入终浓度为 2.4mg/ml 和 1.6mg/ml 的溶菌酶, 34—36℃ 保温, 镜检。至大部分细胞呈圆球形时, 离心除酶, 用 SMM 溶液悬浮。

(五) 原生质体再生及形成率、再生率计算^[5]

(六) 原生质体融合^[6]

(七) 融合子的检出及稳定性测定

将融合处理后的原生质体悬液适当稀释, 用夹层法培养于培养基 6 中, 32℃ 培养至长出菌落。用牙签法将培养基 6 平板上长出的菌落依次点接在培养基 2 和培养基 3 平板上, 32℃ 培养。选择只在加有腺嘌呤、黄嘌呤和组氨酸的基本培养基平板上才生长的菌落, 保存。在培养基 1 上连续传代 10 次后, 再分别点接在培养基 2、培养基 3 和培养基 4 上, 淘汰不稳定的融合子, 挑选稳定的融合子, 保存。

(八) 肌苷发酵、

1. 种子培养: 于 250ml 三角瓶中装 20ml 培养基 7, 将新鲜菌斜面接种 1 环后于 32℃ 120r/min 振荡培养 17 小时。

2. 发酵: 于 500ml 三角瓶中装 20ml 培养基 8, 接种量 5% (v/v), 32—34℃ 于 120—160r/min 振荡培养 72 小时。

3. 肌苷含量测定: 采用纸层析法, 用 DU-7 型紫外分光光度计测定^[4]。

结果与讨论

(一) 出发菌株的构建

1% DES 对枯草杆菌 7171-9-1 的诱变效应, 结果见图 1。

由图 1 可知, 用 1% DES 处理 60 分钟时, 枯草杆菌 7171-9-1 的存活率为 9.52%, 因此选定 60 分钟做为诱变处理的最佳时间。

将诱变处理后长出的菌落转接到培养基 2 平板上, 对不在其上生长的菌落进行鉴定, 即先在各种补充培养基上鉴定其营养缺陷标记, 然后再在含各种结构类似物的培养基上鉴定其抗药性。在获得的 328 株突变株中, 获得了遗传标记分别为 $Ade^- + Xan^- + SG^+(N_{10})$ 和 $Ade^- + His^- + 8-AG^+(N_{100})$ 的出发菌株。稳定性测验表明, 其回复突变率均小于 10^{-4} , 具有较高的稳定性。

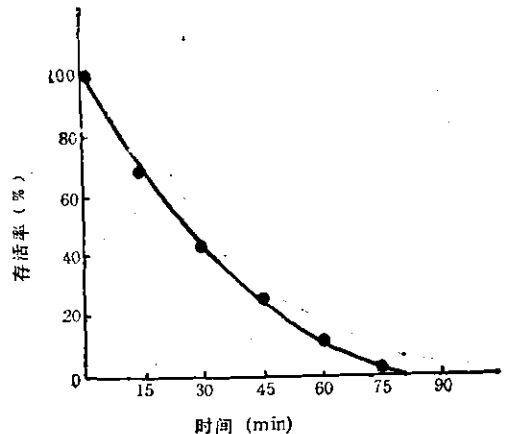


图 1 DES 对亲株枯草杆菌 7171-9-1 的致死效应

(二) 出发菌株原生质体的形成与再生

1. 酶浓度的确定: 由图 2 可知, N_{10} 菌株原生质体化的最佳酶浓度为 2.4mg/ml, N_{100} 菌株的最佳酶浓度为 1.6mg/ml。

2. 酶解温度的确定: 由图 3 可知, N_{10} 菌株原生质体化的最佳酶解温度为 36℃, N_{100} 菌株的最佳温度为 34℃。

(三) 原生质体融合与融合子的检出

在扫描电镜下可清晰地观察到 N_{10} 和 N_{100} 菌株原生质体的融合情况, 结果见图 4。

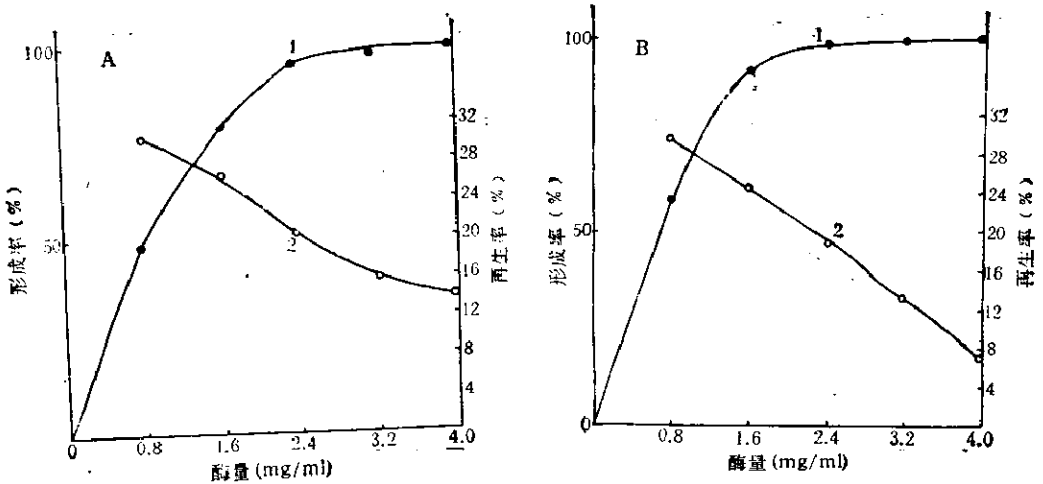


图2 酶浓度与形成率和再生率的关系

A: N_{53} 菌株; B: N_{168} 菌株

1. 形成率; 2. 再生率

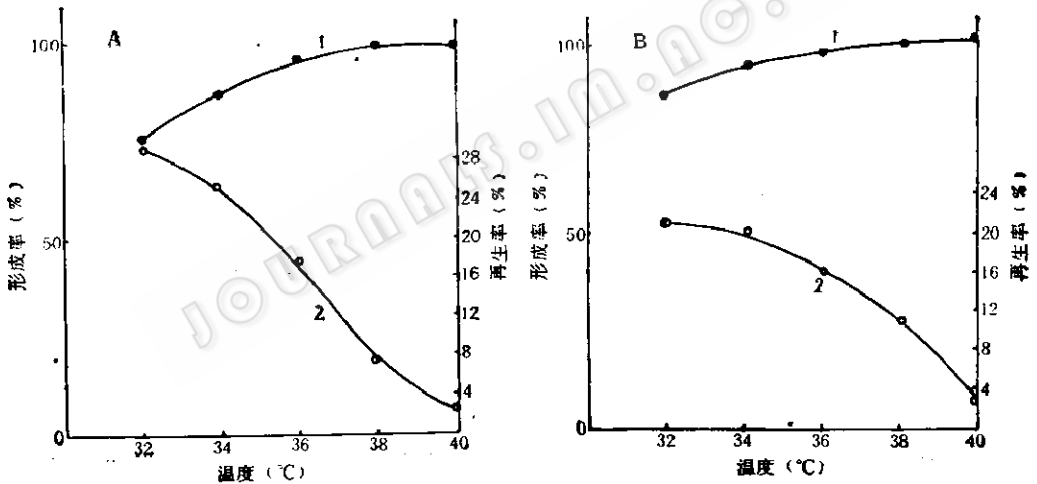


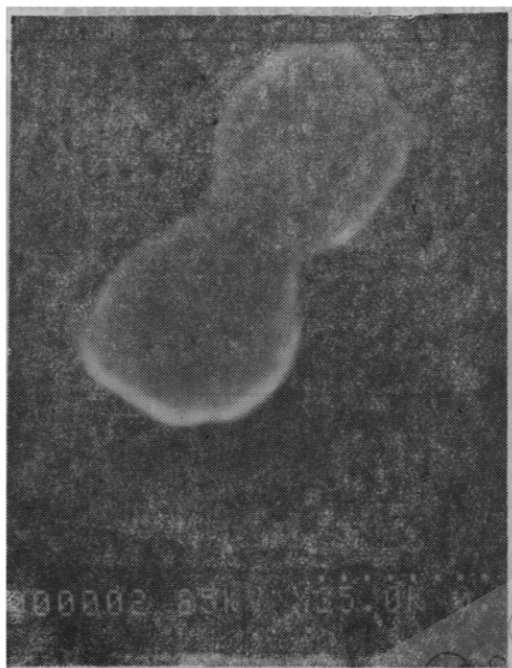
图3 酶解温度与形成率和再生率的关系

A: N_{53} 菌株; B: N_{168} 菌株

1. 形成率; 2. 再生率

将经 PEG 处理的原生质体悬液用夹层法培养于培养基 6 中, 32°C 培养。因 N_{53} 为 $8-AG^+$, N_{168} 为 SG^+ , 故两者在培养基 6 中均不生长, 在其上长出的菌落初步可认为是两亲株融合而形成的融合子。经测定, 获得具有 $SG^+ + 8-AG^+$ 遗传标记融合子的融合频率为 5.4×10^{-4} 。将具有 $SG^+ + 8-AG^+$ 标记的融合子分别点接在各种补充培养基上, 挑取仅在加有腺嘌呤、黄嘌呤和组氨酸的基本培养基上才生长的菌落, 由于其具有 $Ade^- + Xan^- + His^- + SG^+ + 8-AG^+$ 标记, 因此可认为它们是两亲株融合而形成的目的融合子。不断分离淘汰不稳定的融合子, 最终获得 25 株稳定的融合子 F1—F25。通过对其初筛产苷测定, 发现融合子 F22 初筛产苷最高, 达 18.44g/L, 为此对融合子 F22 进行了复筛。

(四) 摇瓶小试条件的确立

图4 N_{53} 和 N_{16} 菌株的原生质体融合, $\times 35000$

测定了不同因素对 F22 产苷的影响, 结果见表 1。

表 1 各种因素对发酵产苷的影响

酵母粉(%)	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4
肌苷(g/L)	10.43	12.67	15.68	24.82	17.64	14.76
玉米浆(%)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
肌苷(g/L)	17.49	23.95	19.27	17.30	17.05	10.42
尿素(%)	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
肌苷(g/L)	16.51	19.85	23.85	24.44	17.81	11.60
$(NH_4)_2SO_4$ (%)	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
肌苷(g/L)	10.94	19.21	24.75	18.89	16.71	14.33
K_2HPO_4 (%)	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
肌苷(g/L)	13.61	15.43	19.70	24.88	20.87	15.96
温度($^{\circ}C$)	32—32—32	32—33—34	34—35—36	34—34—34	36—36—36	36—37—38
肌苷(g/L)	15.44	24.66	17.25	16.92	12.59	11.37

由表 1 可知, 在最佳发酵条件下, 即药用酵母粉 1.8%, 玉米浆 0.4%, 尿素 0.5%, $(NH_4)_2SO_4$ 1.4%, K_2HPO_4 0.6%, 发酵温度为 32—33—34 $^{\circ}C$ 时, 融合子 F22 的肌苷产量达 24.58g/L (最佳条件下的平均值), 比出发菌株枯草杆菌 7171-9-1 (在其最佳条件下产苷为 9.95g/L) 提高了 1.5 倍。

(五) 目的融合子遗传稳定性测验

将目的融合子 F22 连续摇瓶传代 10 次, 测定其遗传标记及发酵产苷情况, 结果见表 2。

表2 目的融合子 F22 遗传稳定性的测定

项目	代数			
	2	4	8	10
MM	-	-	-	-
MM + Ade + His	-	-	-	-
MM + Ade + Xan	-	-	-	-
MM + His + Xan	-	-	-	-
MM + Ade + His + Xan	+	+	+	+
MM + Ade + His + Xan + SG + 8 - AG	+	+	+	+
肌苷产量 (g/L)	23.17	23.98	24.06	24.22

由表 2 可知,经连续摇瓶传代 10 次, F22 的遗传是稳定的,可望应用于工业生产中。

参 考 文 献

- [1] 王放全等: 微生物学报, 16(2): 171-176, 1976。
 [2] 邓崇亮等: 微生物学通报, 3: 98-100, 1988。
 [3] 张克旭等: 核酸发酵, 轻工业出版社, 北京, 1987 年。
 [4] 钱存柔等: 微生物学实验, 第 120-124 页, 北京大学出版社, 北京, 1985 年。
 [5] 王岳五等: 生物工程学报, 4(3): 230-233, 1988。
 [6] Aoki, R. et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., 9(4): 387-396, 1963.

SCREENING OF INOSINE-PRODUCING STRAIN BY PROTOPLAST FUSION

Wang Yuewu Zhang Bei Zhou Yuliang

(Department of Biology Nankai University, Tianjin 300071)

Taking *Bacillus subtilis* 7171-9-1 as starting strain, mutants N_{53} ($Ade^- + Xan^- + SG^+$) and N_{108} ($Ade^- + His^- + 8-AG^+$) are obtained after 60 minutes by mutagenic treatment with 1% DES. Using N_{53} and N_{108} as parents, a higher inosine productivity of F22 is gained by protoplast fusion technique. The optimum conditions of protoplast's preparation and regeneration have been determined. Under these conditions, the forming rate and the regeneration rate of the protoplasts of N_{53} and N_{108} are 94.7% and 20.9%, 91.7% and 24.4%, respectively. The fusion rate of protoplast is 5.4×10^{-4} . The best conditions of flask-shaking fermentation for F22 have also been determined and level of its inosine accumulation is 24.58 g/l. F22 has been found to be comparatively stable after 10 generations in flask-shaking, therefore, it has a higher potential value of application.

Key words Protoplast; Fusion; Inosine; Fermentation