

酵母超氧化物歧化酶高产菌的选育

张博润 田宇清 黄英* 谭华荣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 采用常规筛选方法从 300 多株不同种属的酵母菌中筛选到两株细胞生物量和超氧化物歧化酶(SOD)含量都较高的菌株(酿酒酵母,编号为 Y-8 和 Y-111)作为实验出发菌。经单倍体分离、N-甲基-N-亚硝基-N'-硝基胍(MNNG)诱变和群体杂交等手段,从中选育出一株细胞生物量略高于实验出发菌、超氧化物歧化酶高达 1350U/g 湿菌体的 SOD 高产菌株(编号为 ZDF-48),它的 SOD 产量分别为实验出发菌株 Y-8 和 Y-111 的 2.2 倍和 2.4 倍。经分离纯化后蛋白含量及超氧化物歧化酶活性测定等研究,证明我们选育出的 ZDF-48 是一株生产超氧化物歧化酶的优良品系。

关键词 酿酒酵母,超氧化物歧化酶,选育

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,简称 SOD)是一种以超氧阴离子(O_2^-)为底物的酶,它在保护细胞抵抗过氧化物残基的毒害作用中担负着重要角色。纯化的 SOD 可用于治疗超氧阴离子伤害引起的多种疾病,它在防御超氧阴离子的毒性、抗辐射损伤、预防衰老以及防治肿瘤、免疫性疾病方面均有重要作用。此外,SOD 还可作为食品及化妆品等的添加剂。SOD 的应用基础研究是目前国际上一个十分活跃的课题^[1-5]。国内关于 SOD 的研究主要偏重于从动、植物细胞提取、纯化和检测方法的改良^[6-11]。有关微生物 SOD 的研究不多^[12],尤其是有关 SOD 高产菌的选育及 SOD 工程菌的构建等研究尚未见正式报道。据 Nedeva 等人^[5]报道,不同种属的酵母菌细胞中 SOD 含量有所差异,粗酶液中每毫克蛋白的比活在 10—40 个酶活单位之间。本文报道酵母 SOD 高产菌的选育结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

以本实验室收集保藏的 300 多株不同种属的酵母菌为实验出发菌株。

1.2 培养基

1.2.1 YEPD 培养基^[13]。

1.2.2 YNB 培养基^[13]。

1.2.3 生孢培养基^[13]。

1.2.4 发酵培养基(%):葡萄糖 4,蛋白胨 1,酵母粉 0.5,CuSO₄·H₂O 微量,ZnSO₄·7H₂O 微量,自然 pH 值。

* 四川大学生物工程系代培硕士研究生。

本文于 1993 年 8 月 12 日收到。

1.3 筛选方法

将待测菌在 YEPD 培养基斜面上活化,以相同接种量接于 YEPD 液体培养基中,于 28℃ 摇床(转速为 220r/min)培养 24 小时,离心,水洗收集细胞,称量记录生物量,取 0.1g 湿菌体悬于 3ml 50mmol/L、pH8.3 的磷酸盐缓冲液中,用超声波破碎细胞,于 4000r/min 离心得上清液,测蛋白含量和 SOD 酶活力。

1.4 单倍体的分离

采用常规方法分离单倍体。

1.5 诱变及突变株的分离^[14]

1.6 杂交及杂交子代的分离鉴定

采用群体杂交法将两亲株细胞在 YEPD 培养基斜面上混和,28℃ 培养 24 小时,制成菌悬液,饥饿 4—6 小时,涂布选择培养基,28℃ 培养 2—3 天,对长出的单菌落进行分离鉴定,确定是否为杂交子代。

1.7 酵母 SOD 的分离纯化^[15]

1.8 测定方法

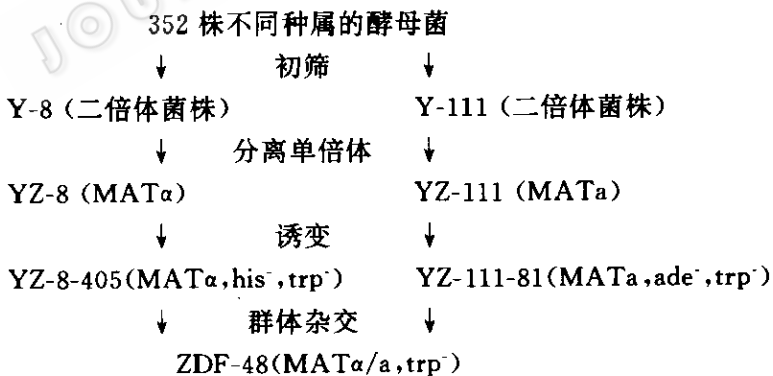
1.8.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳:按文献[16]进行。

1.8.2 可溶性蛋白含量测定:按文献[17]进行。

1.8.3 SOD 活性测定:按文献[10]和[11]进行。

2 结果和讨论

2.1 酵母 SOD 高产菌株的选育谱系



2.2 酵母 SOD 高产菌株的选育过程

2.2.1 初筛:首先按材料和方法中所述,对本实验室收集保藏的 300 多株不同种属的酵母菌进行初筛。所测定的 352 株菌均产 SOD,但含量差异较大,细胞生物量也因菌株而异。我们从中选出两株 SOD 产量较高、细胞生物量也较高的菌株(酿酒酵母,编号为 Y-8 和 Y-111)作为实验出发菌株,企图通过单倍体分离、诱变、杂交或融合等途径进一步提高其 SOD 产量。

2.2.2 单倍体的分离:采用常规分离法进行 Y-8 和 Y-111 菌株的单倍体分离,具体操作

如下:将 Y-8 和 Y-111 菌株接种到生孢培养基,28℃培养 3—5 天,制成菌悬液,用 1% 的蜗牛酶于 30℃处理 1 小时后,加玻璃珠剧烈振荡以使子囊孢子释放出来,然后稀释涂 YEPD 平皿,28℃培养 2—3 天,挑选长出的较小的菌落,通过测定生孢能力、交配型及细胞形态观察确定是否为单倍体。从 Y-8 菌株分离到 54 个单倍体,编号为 YZ-1—YZ-54;从 Y-111 菌株分离到 62 个单倍体,编号为 YZ-55—YZ-116。然后对获得的单倍体进行细胞生物量和 SOD 产量测定,从中选出两株细胞生物量和 SOD 产量相对高的单倍体(YZ-8 和 YZ-111)作为诱变出发菌。

2.2.3 亚硝基胍诱变:按文献[14]的方法,用 MNNG 对 YZ-8 和 YZ-111 进行诱变,致死率为 99.5%。然后对存活单菌落进行细胞生物量、SOD 产量及营养缺陷标记测定,从所测的菌株中选到几株 SOD 产量较高的菌株。其中 YZ-8-405 的 SOD 产量约为 850U/g 湿菌体,是诱变出发菌 Y-8 的两倍多;细胞生物量接近诱变出发菌;它带有组氨酸和色氨酸营养缺陷标记。YZ-111-81 的 SOD 产量约为 760U/g 湿菌体,比诱变出发菌 YZ-111 提高近一倍;细胞生物量与诱变出发菌相同;它带有腺嘌呤和色氨酸营养缺陷标记。根据这两株突变株的交配型不同,并带有营养缺陷标记,希望通过杂交途径来达到进一步获得细胞生物量和 SOD 产量更高的菌株的目的。

2.2.4 群体杂交和杂交子代的分离鉴定:根据我们的实验设计,经诱变选育出高产菌株后,再采用融合或杂交手段进一步提高细胞生物量和 SOD 产量。由于诱变获得的 YZ-8-405 的交配型是 α , YZ-111-81 的交配型是 a , 它们都带有色氨酸缺陷标记,同时还带有一个不同的营养缺陷标记(见表 1), 这为选择杂交子代提供了方便。具体操作如下:将 YZ-8-405 和 YZ-111-81 的细胞在 YEPD 培养基斜面上混合进行群体杂交,28℃培养 24 小时,制成菌悬液,饥饿 4—6 小时,涂布在选择培养基(YNB+TRP)上,28℃培养 2—4 天。然后对长出的菌落进行营养缺陷标记、交配型、生孢能力测定和细胞形态观察,分离鉴定杂交子代。再对杂交子代进行细胞生物量和 SOD 含量测定。从所测定的杂种中选出一株 SOD 产量高的杂种菌株,编号为 ZDF-48。其细胞生物量为 5.23g/100ml 培养基,略高于实验出发菌 Y-8 和 Y-111;SOD 产量为 1350U/g 湿菌体,比实验出发菌高一倍多。

2.2.5 酵母高产菌株选育:结果见表 1。

表 1 酵母 SOD 高产菌的选育结果

Table 1 Result of the breeding of the SOD high-producing strain from yeasts

菌株编号 No. of strain	倍体性 Ploidy (n)	生孢能力 Spore formation	交配型 Mating type	营养缺陷 Auxotroph	生物量 Biomass (g/100ml)	SOD 含量 Content of SOD (U/g cells)
Y-8	2n	+			5.10	610
Y-111	2n	+			5.20	560
YZ-8	n	—	α		2.71	420
YZ-111	n	—	a		2.75	390
YZ-8-405	n	—	α	his ⁻ , trp ⁻	2.68	850
YZ-111-81	n	—	a	ade ⁻ , trp ⁻	2.74	760
ZDF-48	2n	+		trp ⁻	5.23	1350

2.3 ZDF-48 菌株的细胞培养及 SOD 的分离纯化

2.3.1 细胞培养和收集: 将 ZDF-48 菌株在 YEPD 培养基上活化两次, 接种一环于 30ml YEPD/250ml 三角瓶中, 28℃ 摇床 (转速为 220r/min) 培养 14 小时, 以 5% 接种量接到发酵培养基中, 28℃ 摇床培养 24 小时, 离心, 水洗两次, 将菌体称重后放 -10℃ 冷冻, 供分离纯化 SOD。

2.3.2 SOD 的分离纯化: 参照文献 [15], 略有修改。从冰箱取出冷冻的酵母细胞, 室温溶化。按每克细胞加 4ml 0.1mol/L 的 NaHCO₃ 溶液, 加 3ml 乙醇-氯仿 (5:3, V/V) 溶液, 搅拌 2 小时。12000r/min 离心 10 分钟, 收集上清液, 在搅拌条件下缓缓加入固体 K₂HPO₄ (300g/L), 继续搅拌 30 分钟。在 4℃、12000r/min 离心 10 分钟收集上相, 在 4℃ 搅拌条件下缓缓加入 0.8 体积的冷丙酮, 混合后放置 5 分钟, 于 4℃、12000r/min 离心 10 分钟收集沉淀物。将沉淀物溶于适量的 0.025mol/L pH7.8 的磷酸缓冲液中, 加入适量已处理过的 DE-32 纤维素吸附杂蛋白, 搅拌 30 分钟后, 过滤除去 DE-32 纤维素。然后在 0.0025 mol/L pH7.8 的磷酸盐缓冲液中透析 6—10 小时, 换 2—3 次缓冲液。将透析液上 2.5cm × 22cm 的已处理过的 DE-32 纤维素柱, 用 0.0025 mol/L—0.05mol/L, pH7.8 的线性梯度磷酸盐缓冲液洗脱, 流速为 5ml/min, 每管收集 6ml。经蛋白含量和 SOD 酶活性测定, 将含 SOD 酶活性高的洗脱液合并, 冷冻干燥得 SOD 产品。酵母 SOD 高产菌 ZDF-48 的 SOD 分离结果见图 1、2、3 和表 2。

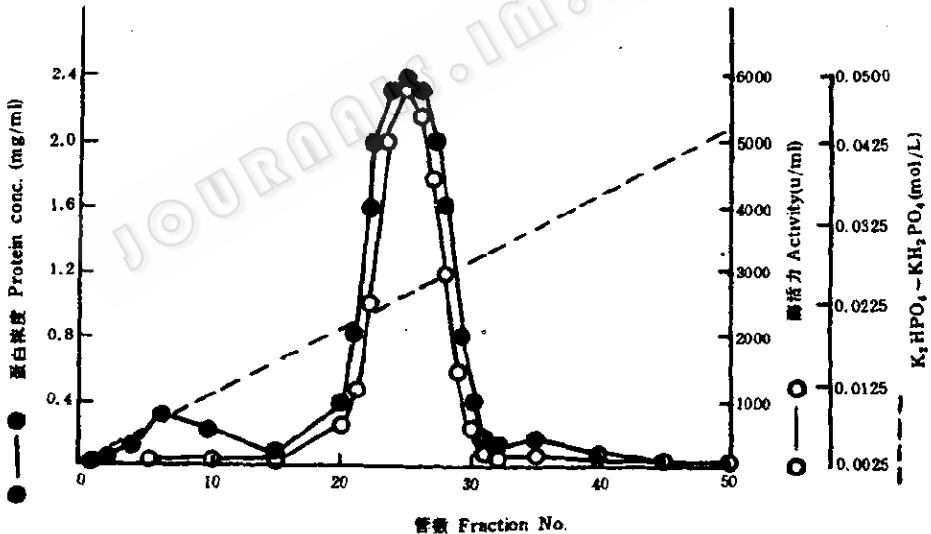


图 1 从 ZDF-48 菌株分离提取 SOD 的 DE-32 纤维素柱洗脱图
Fig. 1 Chromatography of isolated SOD from ZDF-48 on DE-32 column

综上所述, 我们采用初筛→单倍体分离→诱变→杂交这一育种途径选育出一株 SOD 高产菌株 ZDF-48, 其细胞生物量略高于实验出发菌株 Y-8 和 Y-111, 细胞 SOD 含量高达 1350U/g 湿菌体, 是实验出发菌株 Y-8 的 2.2 倍, 是另一实验出发菌 Y-111 的 2.4 倍。纯化获得的 SOD 在聚丙烯酰胺凝胶电泳上只呈现一条带, 并具有生物活性 (见图 2 和图 3)。研究结果证明 ZDF-48 是一株生产 SOD 的优良品系, 具有实际应用前景。

表2 从ZDF-48菌株的100克湿菌体提取SOD各步纯化结果

Table 2 Results of the different step of purification of SOD from 100g fresh cells of ZDF-48

步骤 Step	总体积 Total volume (ml)	总蛋白 Total protein (mg)	总酶活 Total activity (u)	比活 Specific activity (U/mg)	收率 Recovery (%)	纯化倍数 Fold of purification
1. 氯仿-乙醇提取 Chloroform- ethanol extract,	700	4998	263340	52.7	100	-
2. 盐析 Salting	100	1316	221000	167.9	84	3.2
3. 丙酮沉淀 Acetone precipitate	25	430	212633	494.5	81	9.4
4. 吸附 DE-32 filtrate	23	147.2	162162	1101.6	62	20.9
5. 透析 Dialysis	40	130	160216	1232.4	61	23.4
6. 柱层析 Chromatography on DE-32 Column	24	48.2	152940	3172.0	58	60.2

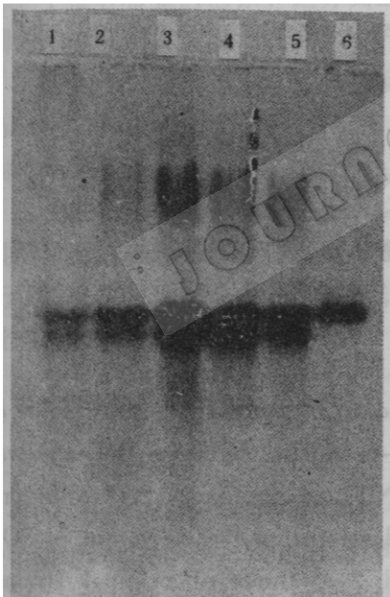


图2 各纯化步骤的SOD聚丙烯酰胺凝胶电泳图

1—6带相应于表2中的步骤1—6。

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of the different step of purification of SOD

Lane 1—6 same to steps 1—6 in table 2.

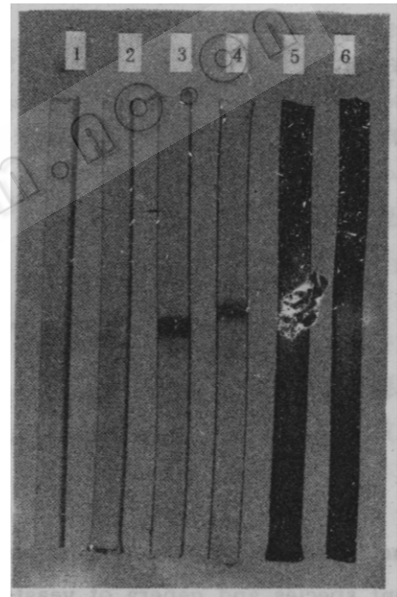


图3 纯化的SOD和标准Cu,Zn-SOD的聚丙烯酰胺凝胶电泳比较

1,3,5:纯化的SOD;2,4,6:标准Cu,Zn-SOD

1和2:酶活性正染;3和4:蛋白质染色;5和6:酶活性负染。

Fig. 3 A comparison of purified SOD from ZDF-48 and standard Cu,Zn-SOD(Sigma)

1,3,5; Purified SOD from ZDF-48; 2,4,6; Standard Cu,Zn-SOD(Sigma) gels 1 and 2; positive staining of enzyme activity; 3 and 4; protein staining; 5 and 6; negative staining of enzyme activity.

参 考 文 献

- [1] Greco M A, Hrab D I, Magner W *et al.* *J Bacteriol*, 1990, **172**:317—325.
- [2] Heinzen R A, Frazier M Z, Mallavia L P. *Infect Immun*, 1992, **60** (9):3814—3823.
- [3] Gralla E B, Thiele, D J, Silar P *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (19):8558—8562.
- [4] Roy D G, Klaenhammer T R, Hassan H M. *Mol Gen Genet*, 1993, **239**: 33—40.
- [5] Nedeva T S, Savov V A, Kujumdzieva-Savova *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1993, **107**: 49—52.
- [6] 张博润, 谭华荣. 微生物学通报, 1992, **19** (6): 352—356.
- [7] 阎家麒, 朱建梅, 桂兴芬, 等. 中国医药工业杂志, 1992, **23** (11):481—483.
- [8] 邹国林, 罗时文, 袁名宜, 等. 生物化学与生物物理学报, 1992, **24** (2):180—184.
- [9] 陈浩, 张炳然, 黄瀛寰, 等. 中国医药工业杂志, 1993, **24** (3):97—100.
- [10] 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰. 生物化学与生物物理进展, 1991, **18** (2):163.
- [11] 杨唐斌, 梅尚筠. 生物化学与生物物理进展, 1991, **18** (6):468—470.
- [12] 屠幼英, 倪福弟, 陆应钰. 微生物学通报, 1992, **19** (1):18—20.
- [13] 张博润, 酵母菌原生质体融合. 见: 贾盘兴, 蔡金科等主编. 微生物遗传学实验技术. 北京: 科学出版社, 1992. 259—276.
- [14] 张博润, 刘书锋, 王永红, 等. 遗传, 1985, **7** (5):12—13.
- [15] Goscin S A, Fridovich I. *Biochim Biophys Acta*, 1972, **289**: 276—283.
- [16] 莽克强, 徐乃正, 方荣祥编. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京: 科学出版社, 1975, 32—34.
- [17] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265—275.

THE BREEDING OF THE SOD HIGH-PRODUCING STRAIN FROM YEASTS

Zhang Borun Tian Yuqing Huang Ying Tan Huarong

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract The SOD producing strains were obtained from more than 300 strains of different species and genera of yeasts. A SOD high-producing hybrid (ZDF-48) was bred through isolation of haploid, mutation by MNNG and population hybridization. The biomass of the hybrid was the same as original strains and the content of SOD reached 1350U/g fresh cells, which were 2.2 and 2.4 times of original strains' (*Saccharomyces cerevisiae* Y-8 and Y-111), respectively. The isolation and purification of SOD, protein concentration and bio-activity have been also studied. We concluded that ZDF-48 belonged to an excellent SOD producer.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Superoxide dismutase, Breeding