

文章编号: 1001-3806(2007)01-0041-03

沙雷氏菌产硫酸软骨素酶菌种的 CO₂ 激光辐照选育

喻 东¹, 陶 科¹, 国锦琳²

(1. 四川大学 生命科学学院, 成都 610064; 2 成都中医药大学, 成都 610075)

摘要: 为了选育高产硫酸软骨素酶菌株, 从土壤中首次筛选到一株产硫酸软骨素酶的粘质沙雷氏菌, 经过 CO₂ 激光辐射诱变 (激光功率 10W, 扩束光斑直径 0.5cm, 照射距离 23cm, 照射时间 30s), 选育出高产硫酸软骨素酶的菌株 GT596。经传代培养, 发现具有稳定的高产硫酸软骨素酶活性。

关键词: 激光技术; 硫酸软骨素酶; CO₂ 激光辐射; 粘质沙雷氏菌

中图分类号: Q631 文献标识码: A

Mutagenesis and selection of chondroitinase producing strain of *Serratia Marcescens* by CO₂ laser irradiation

YU Dong¹, TAO Ke¹, GUO Jin-lin²

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Abstract *Serratia Marcescens* GT596 was isolated from soil and brought to mutation by CO₂ laser irradiation. The radiation duration was 30s with distance of 23cm and the flash beam diameter was 0.4cm. High chondroitinase producing strain mutant GT596 was obtained after screening culture. The GT596 was found to have chondroitinase stable producing activity in descendant cultures.

Key words laser technique; chondroitinase; CO₂ laser irradiation; *Serratia Marcescens*

引 言

硫酸软骨素酶能特异地降解细胞外基质成分中糖胺多糖, 近年来在临床领域的研究非常活跃, 如大骨节病的防治^[1]; 对糖胺多糖与肿瘤等疾病发生关系的研究^[2]; 替代胶原酶和木瓜凝乳蛋白酶应用于化学髓核溶解术^[3,4]等等。

但硫酸软骨素酶目前国内没有产品供应, 全部依靠进口, 价格非常昂贵。目前报道的产该酶的菌株普遍产率低, 并且运用基因工程方法生产该酶目前仍没有稳定的工程菌, 同时传统方法诱变效果并不明显。

激光作为一种生物辐照诱变剂的效应已在生物学领域取得一系列应用研究成果^[5,6]。作者采用 CO₂ 激光辐照诱变产硫酸软骨素酶的粘质沙雷氏菌, 选育出高产硫酸软骨素酶的菌株, 为工业化生产硫酸软骨素酶提供了基础条件, 同时也为选育此类菌株提供了一种新的方法。

作者简介: 喻 东 (1969-), 男, 硕士, 主要从事蛋白质化学方面的研究。

E-mail: yd0112@163.com

收稿日期: 2005-11-08 收到修改稿日期: 2006-03-06

1 材料、方法

1.1 材料

菌种来源在土壤中筛选得到。

斜面种子培养基: (NH₄)₂SO₄ 1%; 硫酸软骨素 0.5%; NaCl 0.5%; pH 7.0

平板初筛培养基: 蛋白胨 1.5%; 牛肉膏 0.5%; 硫酸软骨素 0.2%; NaCl 0.5%; pH 7.0

液体种子培养基: 蛋白胨 2%; 蔗糖 1%; 硫酸软骨素 0.2%; NaCl 0.5%; pH 7.0

1.2 仪器

pH 计 (PSH3 型); VC750 型超声波细胞破碎仪; 连续 CO₂ 激光器: 输出电压 210V; 功率 10W; 紫外可见分光光度计 (UV1800); 超净工作台; 2L 全自动发酵罐。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化 取菌种 1 环, 接入新鲜培养基直细菌斜面内, 30℃ 培养 12h 后, 制成 1.0 × 10³ 个细胞的悬液, 取 2mL 于安培管内供照射用。

1.3.2 CO₂ 激光照射 激光束光斑直径为 0.4cm, 照射距离为 23cm, 照射时间为 5s, 10s, 20s, 30s, 35s, 40s

对照组为 0s 平行 3 组, 寻找最佳辐照量。

1.3.3 辐照菌培养 将最佳条件的照射菌悬液用生理盐水稀释成原浓度的 10^{-1} 倍 ~ 10^{-6} 倍, 取 0.2 mL 涂皿, 每个稀释度 3 个平皿。在 30°C 下培养 12h 后, 挑出形态大小不同的单菌落培养。

1.3.4 高产硫酸软骨素酶菌株的筛选 初筛采用 TAO 等人的方法^[7]。在直径 9cm 的无菌培养皿中, 注入 15mL 平板初筛培养基, 待凝固成平板后, 挑取单菌落辐照菌接种于平板上, 置 30°C 下保温 12h, 测定透明圈直径, 选取透明圈直径较大的菌株筛选。复筛通过将初筛到的菌种接入液体培养基, 于 30°C 下培养 10h, 提取酶, 测定酶活性进行筛选。

1.3.5 硫酸软骨素酶活性测定 按 YAMAGATA^[8] 方法进行, 取 60 μ L 粗酶液, 加入 300 μ L 底物混合液 (4-硫酸软骨素 2g/L, BSA 0.1g/L, 乙酸钠 0.06mol/L, 用 0.05mol/L, pH7.2 的 Tris-HCl 缓冲液溶解), 37°C 水浴保温 10min, 取出后加入 2.64mL 摩尔浓度为 0.05mol/L, pH1.8 的 KCHCl 缓冲液终止反应, 然后 10800g 离心 10min, 取上清液测 A_{232} (该上清液在 232nm 下的光吸收度), 根据标准曲线确定反应液中产生的不饱和二糖的浓度来计算酶活力单位数。

每分钟催化底物糖胺多糖释放出 1 μ mol 二糖产物的酶量定义为一个酶活单位 (U)。

1.3.6 变异株遗传稳定性研究 对变异株与亲株的形态进行比较, 并对传代 30 次的酶活力变化情况, 变异菌株保藏 12 个月当中酶活力变化情况进行比较, 研究变异菌株的稳定性。

2 结果与讨论

2.1 最佳辐射诱变剂量的选择

激光是一种量子流, 又称为光微粒。激光辐射可以通过产生光、热、压力和电磁效应的综合作用, 直接或间接地影响生物有机体, 引起细胞 DNA 或 RNA 改变, 导致酶的激活或抑制, 进而引起细胞分裂和细胞代谢活动的改变^[9]。

照射后的菌体在 5s, 10s, 20s, 30s, 40s 时死亡率分别为 15%, 30%, 60%, 90%, 100% (见图 1)。沙雷氏菌细胞的死亡率与 CO₂ 激光的照射时间成正相关, 即随着激光辐照剂量的增大, 致死率提高。当照射时间为 40s 时, 酵母菌细胞的死亡率达到 100%, 而最佳诱变剂量为 30s。选取辐照时间为 30s。

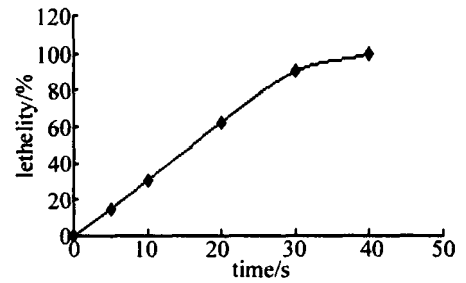


Fig 1 Relations table exposure time and lethality

2.2 初筛结果

挑选 15 株 CO₂ 激光辐照后的沙雷氏菌, 以亲株为对照, 经过 TAO 等人的方法初筛^[7], 其中有 4 株沙雷氏菌透明圈直径在 1.3cm 以上, 大致表明其酶活力较高, 见表 1。

Table 1 The enzyme activity change of the induces strain and parent strain

strain	parent strain	induces strain	induces strain	induces strain	induces strain
enzyme activity/(U · L ⁻¹)	192	322	324	316	319

2.3 复筛结果

选取透明圈直径最大且生长速度最快的诱变株 2 进行复筛, 并以亲株为对照。酶活力测定显示, 以 GT596 酶活力最高, 见表 2。

Table 2 The enzyme activity change of the induces strain and parent strain

strain	parent strain	GT595	GT596	GT597	GT598
enzyme activity/(U · L ⁻¹)	192	350.2	356.0	351.2	355.2

2.4 突变株的形态特征与遗传稳定性变化

2.4.1 菌体特征变化 为了更为全面地评判 CO₂ 激光诱变技术, 选择了一株亲株为材料, 对激光诱变后, 菌落形态、生长发育状况、发酵特征及变异性的稳定性等方面进行了深入试验与对比分析。发现 CO₂ 激光处理对菌体的生长发育产生了显著的变化, 用固体平板培养基 30°C 培养与原始菌株对比发现, GT596 菌株, 菌落较厚, 菌落背面淡黄色, 生长较快, 菌落也较大一些。GT596 菌株发育速度的加快, 可能有利于缩短生产周期与降低生产成本。

2.4.2 变异株产硫酸软骨素酶稳定性 通过发酵, 对变异株产酶的能力及遗传稳定性进行了观察 (见表 3), 可见, 变异株在发酵条件下的酶活力平均可达

Table 3 Induces strain to produce the enzyme activity and the heredity stable

num ber of passage (generation)	3	6	12	15	18	21	24	27	30
enzyme activity/(U · L ⁻¹)	352.1	356.7	354.5	355.1	356.1	353.8	354.9	355.2	352.6

354 5U/L, 经过 30 次传代培养, 其蛋白酶活力正负相差为 4 6U/L。表明变异株产硫酸软骨素酶能力具有较好的遗传稳定性。

对变异株保存不同时间(3 6 9 12 个月)后, 分别发酵测定酶活力, 正负相差仅为 5 2U/L, 说明该菌种保存稳定, 见表 4。

Table 4 Induces strain retention time with to produce the enzyme activity

retention time (month)	3	6	9	12
enzyme activity (U·L ⁻¹)	352.6	350.6	345.8	350.9

以上结果表明, 用 CO₂ 激光辐照沙雷氏菌, 具有引起高产硫酸软骨素酶的作用。传代培养证明, 诱变后的粘质沙雷氏菌高产硫酸软骨素酶能力稳定传代。

3 结 论

(1) CO₂ 激光辐照诱变菌株, 诱变剂量与致死率正相关, 并且不同的菌株的诱变剂量有种属差异, 寻找合适的辐射剂量进行诱变是 CO₂ 激光辐照诱变菌株的首要条件。

(2) CO₂ 激光辐照诱变菌株获得高产硫酸软骨素酶的菌株, 可能正向促进了细胞内硫酸软骨素酶代谢体系, 达到高产硫酸软骨素酶的目的。

(3) 构建高活性酶制剂的生产菌株, 采用基因工程的手段是努力的方向, 但是运用在产该酶的菌株上存在许多难题有待克服。故一时还不能提供高产和稳定的生产菌株。而采用常规的诱变手段, 由于菌株用

相同诱变剂重复诱变时, 常出现饱和现象, 处理效果往往不够理想。故通常采用几种诱变手段交替使用, 方能提高诱变效率。但目前诱变剂种类虽多, 而常用的却为数有限。激光诱变技术操作方法简便, 使用安全, 正突变效率较高, 诱变效果甚佳, 诱变后的变异性状能稳定遗传, 故是一种切实可行的新型诱变手段, 应用前景看好, 值得推广使用。

参 考 文 献

- [1] TAN X S, WU Q H, LIANG Y J *et al* Research on the etiology of KaschirBeeek disease [J]. Chinese Journal of Microecology, 1994, 6 (2): 44~45 (in Chinese).
- [2] QIL C, LNX S, LIC S Study on composition and properties of glycosaminoglycan in lung cancer [J]. Journal of Bethune University Medical Science, 1999, 25 (1): 44~46
- [3] KATO F, WATE H, M MASTSL K *et al* Chondrolysis with chondroitinase ABC: comparative study with chymopapain [J]. The Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology, 1988 (31): 63
- [4] YAMAGATA T, SAITO H, HABUCH IO *et al* Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1968, 243 (7): 1523~1535.
- [5] ZONG R H. Infrared laser and organism mutual action mechanism discussion [J]. Laser Magazine, 1988, 9 (6): 47~48 (in Chinese).
- [6] WANG R L, OU JM, SHANG H *et al* Laser illumination in fine root thunder strain selective breeding applied research [J]. Laser Magazine, 1998, 19 (4): 44~46 (in Chinese).
- [7] TAO K, WANG Zh Y, GUO J L *et al* Study on the screening of chondroitinase ABC producing strain and their fermentation technology [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2004, 29 (3): 138~141 (in Chinese).
- [8] HU W H, CHEN Y, YANG Z Sh *et al* CO₂ laser illumination yeast biology effect [J]. Laser Magazine, 2001, 21 (3): 31~33 (in Chinese).
- [9] (2): 162~166 (in Chinese).
- [6] XIN S J, FAN W P. Research on durability detecting of high performance concrete structure with fiber grating sensor [J]. Journal of Wuhan University of Technology, 2005, 27 (6): 32~34 (in Chinese).
- [7] LIAO Y B. Fiber of optics [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2000, 198~204 (in Chinese).
- [8] FU H W, FU JM, QIAO X G *et al* Study about the stress sensitivity enhancement of fiber Bragg gratings [J]. Laser Technology, 2005, 29 (2): 159~161 (in Chinese).
- [9] WANG L B, ZHANG B M, WANG D F *et al* A kind of fiber Bragg grating strain sensor with jacket [J]. Laser Technology, 2002, 26 (5): 385~387 (in Chinese).
- [10] SUN A, QIAO X G, JIA Zh A *et al* Temperature and pressure responsive characteristics of polymer packaged fiber Bragg grating with large dynamic range [J]. Chinese Journal of Lasers, 2005, 32 (2): 224~227 (in Chinese).

(上接第 14 页)

- [1] reflected wavelength shift of fiber Bragg gratings [J]. Laser Technology, 2004, 28 (3): 309~311 (in Chinese).
- [2] XIE F, ZHANG Sh L, LI Y *et al* Study on the reflected wavelength shift based on sensing elements of ir fiber Bragg gratings [J]. Laser Technology, 2002, 26 (2): 84~86 (in Chinese).
- [3] ZHANG W G, KAIG Y, DONG X Y *et al* Theoretical and experimental study of fiber grating multi point sensing [J]. Acta Optica Sinica, 2004, 24 (3): 330~336 (in Chinese).
- [4] GAO J Q, SHI B, ZHANG W *et al* Application of distributed fiber optic sensor to bridge and pavement health monitoring [J]. Journal of Disaster Prevention and Mitigation Engineering, 2005, 25 (1): 14~19 (in Chinese).
- [5] XIA Y Y, RUI R, LIANG L *et al* An attempt of embedding fiber optic Bragg grating sensors in freeway foundation to detect the porewater pressure [J]. Chinese Journal of Geotechnical Engineering, 2005, 27