

软化芽孢杆菌原生质体的形成和再生研究

冯瑞山 陈建华 盛勤 吴梧桐

(中国药科大学生物制药学院, 南京 210009)

摘要 用甘氨酸和青霉素对软化芽孢杆菌体进行酶解前的预处理。处理后菌在溶菌酶浓度为 5 mg/ml, 作用温度 42℃, 作用时间 2 h 下, 原生质体形成率为 90%~99%, 再生率达 50%~70%。

关键词 软化芽孢杆菌; 原生质体的形成; 原生质体的再生

在维生素 C 二步发酵的生产实践中, 发现能与氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 组合的伴生菌较多。我们采用软化芽孢杆菌和氧化葡萄糖酸杆菌组成混合菌系。本文主要研究软化芽孢杆菌原生质体的形成和再生, 为下一步与氧化葡萄糖酸杆菌原生质体融合提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株: 软化芽孢杆菌。

培养基: 1) 山梨糖培养基(%) : 山梨糖 0.5, 酵母膏 0.5, 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1.0, 硫酸镁 0.2, 碳酸钙 0.5, pH6.7; 2) BPY 培养基; 3) DM₃ 再生培养基^[1]。

试剂: SMM 和 PAB^[2]; SMMP; 2×SMM 4.75 份+2×PAB 4.75 份+5% 牛血清白蛋白 0.5 份; 5% 牛血清白蛋白, 膜滤器过滤; 20% 甘氨酸液; 青霉素液: 青霉素 2.4 mg 溶于水 10 ml 中, 膜滤器过滤; 溶菌酶液: 用 SMMP 配制; 萘啶酸液: 萘啶酸 50 mg 溶于无菌水 10 ml; 利福平液: 利福平 25 mg 溶于无菌水 10 ml, 先加少量乙醇溶解。

1.2 方法

1.2.1 平板培养 混合菌划线分离于山梨糖培养基, 采用梯度平皿法, 筛选萘啶酸、利

福平耐药菌株。

1.2.2 原生质体的形成 16 h 过夜活化菌液, 按 2% 接种量种入含 1% 甘氨酸的 BPY 培养基, 29℃, 180 r/min 振荡培养至对数生长期约 6 h, 后加入 0.9 μg/ml 青霉素, 继续振荡 3 h 至对数生长期末期。收集菌体, 用 SMMP 洗涤两次, 最后制成一定浓度的菌悬液。加入溶菌酶液, 使其作用终浓度为 5 mg/ml, 于 42℃ 恒温水浴轻微振荡 2 h, 而后 6000 r/min 离心 20 min, 沉淀物重新悬浮在 SMMP 液, 即得原生质体悬液。

1.2.3 原生质体再生 将上述原生质体悬液分别以水和 SMMP 作渗透休克处理和渗透稳定处理。经适当稀释, 分离在山梨糖培养基和 DM₃ 双层再生培养基上, 其中 DM₃ 双层再生培养基上层为软琼脂。29℃, 培养 3 d。计数, 计算原生质体形成率和再生率^[1]。

$$\text{形成率} = (A - B) / A \times 100\%$$

$$\text{再生率} = (C - B) / (A - B) \times 100\%$$

A: 酶作用前 CFU/ml, B: 渗透休克处理后 CFU/ml, C: 渗透稳定液处理后 CFU/ml。

2 结果与讨论

2.1 B30-6 耐药菌株的获得

将混合菌划线分离, 获得软化芽孢杆菌, 经测定对红霉素、卡那霉素、四环素、氯霉素、

链霉素、萘啶酸和利福平均敏感。采用梯度平皿法,在含萘啶酸梯度平板上,获得 4 株耐药菌,经测定,其中对 B-30 菌 MIC 为 $160\text{ }\mu\text{g/ml}$,经传代,耐药性稳定。但我们发现氧化葡萄糖杆菌在含 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 萘啶酸平板上培养至 7 d,有少数菌生长。为获得有利于融合子筛选遗传标记,故以 B-30 菌为出发菌,在含利福平梯度平板上,获得 B30-6 菌,经测定,它能同时在含萘啶酸 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 和利福平 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的含药平板上生长,且遗传性稳定。而氧化葡萄糖杆菌 G10-3 在此平板上不生长。

2.2 前处理对菌体生长影响

本试验曾用未经预处理的对数生长末期的菌,再加入含溶菌酶的高渗液,间隔一定时间测定其在波长在 570 nm 时的 OD 值,至酶作用 16 h 时,其 OD 值并不下降。镜检极少原生质体,故认为该菌对溶菌酶不敏感。Araki 等^[3]报道,在软化芽孢杆菌同一种内的不同菌株间,对溶菌酶的敏感度差别较大。这现象可能和细菌的胞壁中肽聚糖结构差异有关。在一些耐溶菌酶的软化芽孢杆菌的胞壁肽聚糖中,发现一种 N-未被取代的葡萄糖胺残基,如用醋酸酐 N-乙酰化后,即变得对溶菌酶敏感。因此,为获得原生质体,必须进行酶解前的预处理。

2.2.1 甘氨酸的作用 图 1 是 B30-6 在 BPY 液中的生长曲线,从图中看,加入 1% 甘氨酸,并不明显抑制菌体生长,对其形态也无显著影响。甘氨酸可以取代细菌胞壁肽聚糖中 D-丙氨酸残基,因而干扰多糖链和肽链之间的正常交联,继而影响了肽聚糖的结构及刚性,增强溶菌酶对胞壁的作用^[4]。

2.2.2 青霉素的作用 图 1 显示对数生长期中期约为 6 h,此期菌体生理状态相对一致,代谢旺盛,对青霉素敏感性强。故此时加入适量的青霉素,作用至对数生长末期,可抑制细

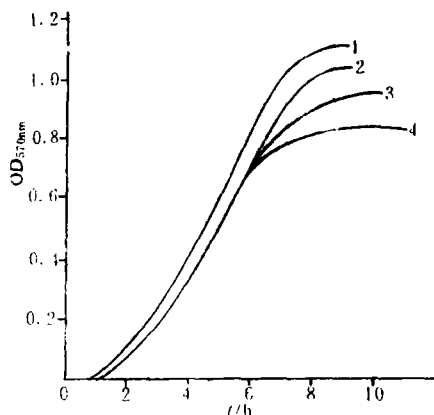


Fig 1. Sensitivity of B30-6 to glycine and penicillin

1. control 2. glycine 3. glycine + penicillin $0.9\text{ }\mu\text{g/ml}$

4. glycine + penicillin $1.5\text{ }\mu\text{g/ml}$

胞壁的合成,增强菌体对溶菌酶的敏感性。经测定该菌对青霉素的最低抑菌浓度为 $1.2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。故选择青霉素预处理的适量范围 $0.6\sim 1.2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。当浓度为 $1.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 时,菌的生长明显减慢。

2.2.3 巯基乙醇的作用 为进一步提高菌体对溶菌酶的敏感性,曾在上述处理后的菌中,加入 0.7% 巯基乙醇,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴作用 30 min。巯基乙醇能打开二硫键,使蛋白质的结构变得松散。但实验结果表明,原生质体形成未见明显提高。

2.3 B30-6 原生质体形成及再生最适条件

影响原生质体的形成和再生的因素很多,我们对青霉素浓度、溶菌酶浓度及其作用时间和温度进行了研究。采用正交设计,按 $L_8(2^7)$ 正交表进行统计分析。实验结果见图 2。同时考查了这四个因素的相互关系,确定了 B30-6 原生质体形成和再生的最适条件为:青霉素浓度 $0.9\text{ }\mu\text{g/ml}$,酶浓度 5 mg/ml ,酶作用温度 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$,作用时间 2 h。在此条件下,原生质体形成率 $90\%\sim 99\%$,再生率达 $50\%\sim 70\%$,实验结果见表 2。

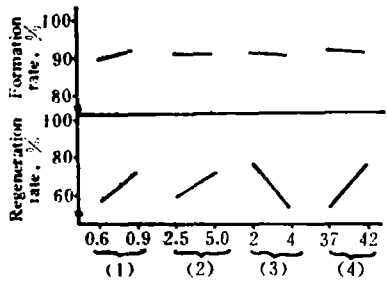


Fig 2. Effects of different factors on preparation and regeneration rate of protoplasts

(1) concentration of penicillin, $\mu\text{g/ml}$; (2) concentration of lysozyme, mg/ml ; (3) time of lysozyme treatment, h ; (4) temperature of lysozyme treatment, $^{\circ}\text{C}$

Tab 2. The rate of protoplast formation and regeneration of B30-6

No.	1	2
Before treatment of lytic enzyme (A)	2.4×10^9	8.9×10^8
Treatment of osmotic shock (B)	2.4×10^7	9.0×10^7
Treatment of osmotic stability (C)	1.23×10^9	6.6×10^8
Protoplast formation rate	99%	90%
Protoplast regeneration rate	50.75%	71%

3 小 结

1) 通过梯度平皿法,选育一株对萘啶酸和利福平双耐菌 B30-6。

2) B30-6 酶解前预处理:培养基中加入 1%甘氨酸,摇至对数中期约 6 h,加入青霉素 0.9 $\mu\text{g/ml}$,继续振摇 3 h 至对数生长末期。

3) B30-6 原生质体形成及再生的最佳条件为:青霉素 0.9 $\mu\text{g/ml}$,溶菌酶作用浓度 5 mg/ml ,作用时间 2 h,作用温度 42 $^{\circ}\text{C}$ 。其形成率 90%~99%,再生率达 50%~70%。

致 谢 本文得到了陈小英教授的支持和指导。

参 考 文 献

1 冯瑞山,陈小英,陈知本. 葡萄球菌 DNA 的原生质体转化. 中国药科大学学报,1992,23(4):239

2 Chang S, Cohen SN. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by plasmid DNA. *Mol Gen Gene*, 1979, 168:111

3 Yoshio Araki, Tokuji Nakatkni, Koji Nakayama, et al. Occurrence of N-nonsubstituted glucosamine residue in peptidoglycan of lysozyme-resistant cell wall from *Bacillus macerans*. *J Bio Chem*, 1972,247(19):6312

4 张伟心,杨启瑞. 细菌细胞壁结构物质的生物合成. 微生物学通报,1985,12(1):44

Protoplast Formation and Regeneration of *Bacillus macerans*

Feng Ruishan, Chen Jianhua, Sheng Qin, Wu Wutong
School of Biopharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract Protoplast formation and regeneration methods of lysozyme-resistant *Bacillus macerans* B30-6 are reported. Culture was prepared with glycine and penicillin before the treatment of lysozyme (5 mg/ml) in 42 $^{\circ}\text{C}$ for 2 hours. The rates of protoplast formation and regeneration were 90%~99%, 50%~70% respectively.

Key words *Bacillus macerans*; Protoplast formation and regeneration