

# 离子束诱变中 *Bacillus fordii* MH602 菌体 保护剂的研究

阮建兵, 潘瑶, 何冰芳

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** 离子束诱变过程中, 菌体细胞较长时间处于干燥、营养贫瘠的条件下, 死亡率高。本研究比较了在干燥、营养贫瘠条件下, 多种寡糖对对数生长期的嗜热海因酶产生菌 *Bacillus fordii* MH602 菌体细胞的保护作用。海藻糖效果显著, 其最佳保护剂量为 2%; 同时证明海藻糖的保护作用没有对离子注入效应产生负面影响; 首次报道了在离子束诱变技术中采用海藻糖作为保护剂提高突变率和诱变效果。相关结论对于抗干燥性能较差的微生物采用离子束诱变技术进行菌种选育具有实际指导作用。

**[关键词]** 离子束, 诱变, 育种, 海藻糖, 干燥, 保护剂

**[中图分类号]** Q 936 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)04-0066-03

## Study on Protectors for *Bacillus fordii* MH602 in the Ion Beam Mutation

Ruan Jianbing, Pan Yao, He Bingfang

(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** During the ion beam mutation process, microbes have to be put under a dry condition without nutrient for a long time, thus results in a high death rate of the cells. *Bacillus fordii* MH602 can produce thermostable hydantoinase. Very low survival rate is obtained when MH602 is treated with ion beam in the exponential growth phase. In order to protect the cells under the dry condition, the effects of several oligo-saccharides on the cells of MH602 are determined. The best protector is trehalose with the optimal concentration of 2%. Negative effects from ion beam mutation of trehalose are not found. This is the first report that trehalose can be used as a protector to improve the mutation rate and effects from the ion beam mutation. These results can help the strains used to have poor ability to resist dry conditions in the ion beam mutation.

**Key words:** ion beam, mutation, breeding, trehalose, dry, protector

## 0 引言

离子束诱变集理化诱变因子于一体, 具有突变率高、突变谱广的特点, 其突变率一般要比自然突变率高 1 000 倍以上, 为工业微生物诱变育种提供了广阔的空间<sup>[1]</sup>。该技术为我国科学工作者余增亮在 20 世纪 80 年代首创<sup>[2]</sup>。在我国, 离子束诱变技术已广泛应用于农作物品种和微生物菌种育种。

为了防止高速离子束引起空气中一些分子的解离, 离子注入诱变需在真空条件下进行。离子注入诱变预处理常选用对数生长期的菌体细胞, 配成菌悬液后涂布于无菌的空平皿制成干菌膜再用于诱变<sup>[3]</sup>。配成菌悬液后, 细胞内外渗透压差影响菌体的存活; 对于不耐干的菌种来说, 制成干菌膜后, 在干燥、营养贫瘠的条件下菌体死亡率很高, 大大影响了离子束诱变的效率。离子束诱变预处理仅有采用生理盐水平衡菌体内渗透压以对菌体细胞进行保护的相关报道<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2006-04-18.

基金项目: 国家 973 项目 (2003CB716000), 国家自然科学基金重点基金资助项目 (20336010)。

作者简介: 阮建兵, 1980—, 硕士研究生, 主要从事微生物理论与应用的学习与研究。E-mail: ruanjianbing@163.com

通讯联系人: 何冰芳, 女, 1962—, 博士, 教授, 主要从事微生物理论与应用的教学与研究。E-mail: bingfanghe@njut.edu.cn

海藻糖是一种非还原性双糖,许多微生物、低等动植物在不良环境下,通过体内调节合成海藻糖以抵御逆境胁迫。海藻糖对生物体和生物大分子有良好的非特异性保护作用,能够降低干燥对菌体细胞膜、脂质体等的伤害<sup>[5]</sup>。

海因酶是一类水解海因类物质制备多种手性氨基酸的关键酶<sup>[6]</sup>。本研究在对对数生长期时抗干燥能力差的海因酶产生菌 *Bacillus fordii* MH602 的诱变过程中,为了选择一种高效的菌体保护剂用于离子束诱变预处理,对海藻糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖、蔗糖和生理盐水在制干菌膜过程中对菌体的保护作用进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

*Bacillus fordii* MH602 为本实验室自行筛选的嗜热海因酶产生菌<sup>[7]</sup>。

### 1.2 培养基

肉汤平板培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母膏 5.0,NaCl 5.0,琼脂 20.0。

### 1.3 离子注入设备

核工业西南物理研究所研制的多功能离子注入机 LZD-900。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 干菌膜的制作

将培养 16 h 处于对数生长期的 *B. fordii* MH602 菌体分散于无菌溶液至初始菌悬液  $OD_{640\text{ nm}} = 0.3$ ,稀释 10 倍后,取 100  $\mu\text{L}$  菌悬液涂布于直径为 9 cm 的无菌空平皿上,无菌风干,无菌条件下放置 1h。

#### 1.4.2 离子注入

将干菌膜放置于离子注入机靶室内,采用  $2.0 \times 10^{15} \sim 3.40 \times 10^{16} \text{ ions/cm}^2$  的剂量注入能量为 10 keV 的  $\text{N}^+$ ,脉冲方式每次注入时间 5 s,间隔时间 15 s。离子注入后,用 1 mL 无菌溶液(与配制菌悬液时用的)一致)将平皿上菌膜洗下,取 100  $\mu\text{L}$  涂布于肉汤培养基,进行培养。

#### 1.4.3 存活率计算

干菌膜或离子注入处理样品培养 24 h 后,计菌落个数  $N$ 。将初始菌悬液稀释 10 倍后,取 100  $\mu\text{L}$  直接涂布于肉汤平板,以所生长的菌落数  $N_0$  为对照。计算存活率,存活率  $= N/N_0 \times 100\%$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同保护剂的保护效果

分别采用 2% 的海藻糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖、蔗糖溶液和生理盐水配制菌悬液,制成干菌膜,洗脱,计算菌体细胞存活率。结果如图 1 所示,在不添加保护剂的情况下,干燥 1 h 后, *B. fordii* MH602 菌体细胞存活极低,说明该菌株对数生长期时抗干能力差,不能直接用于离子注入诱变。生理盐水及各种寡糖对该菌体具有不同程度的保护效果,其中寡糖对 *B. fordii* MH602 菌体的保护效果优于生理盐水。所试寡糖中,海藻糖的保护效果最佳,所得存活率达到未经干燥菌悬液的 90%。海藻糖具有保护生物细胞和生物活性物质在脱水、干旱、高温、冷冻、高渗透压及有毒试剂等不良环境下免遭破坏的功能,在干燥状态下能有效保护生物大分子<sup>[8]</sup>。本研究的结果也表明采用海藻糖作为保护剂,能显著增强菌体的抗干能力,为诱变的高效率提供了很好的保障。

### 2.2 最佳保护剂浓度的选择

实验表明海藻糖溶液的浓度对菌体的保护效果影响很大(图 2),海藻糖浓度为 2% 时,菌体存活率最高,而再增加浓度,存活率反而下降。2% 的海藻糖溶液保护效果最佳,可能是该浓度既保证配制菌悬液时

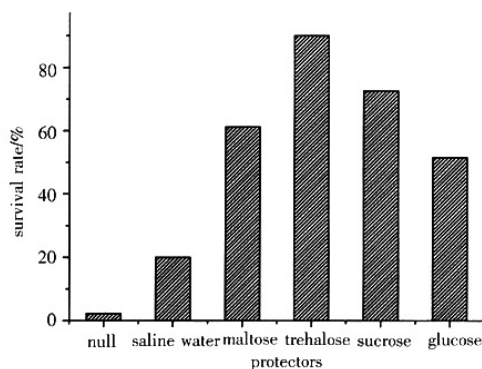


图 1 不同保护剂对干燥条件下 *B. fordii* MH602 存活率的影响

菌体内外的渗透压差较小,又能使菌体有较好的耐干能力,达到了对生物膜的最佳保护状态.

### 2.3 保护剂对离子注入诱变效应的影响

甌卫军等人曾分析脱脂奶用作保护剂可能会引起离子注入时的能量反射和屏蔽作用,影响诱变效果<sup>[4]</sup>.为弄清采用海藻糖作为保护剂是否会对离子注入产生屏蔽,在 2% 的海藻糖保护下,用不同剂量的  $N^+$  离子注入 *B. fordii* MH602 菌体,绘制了离子注入诱变存活率曲线(图 3).

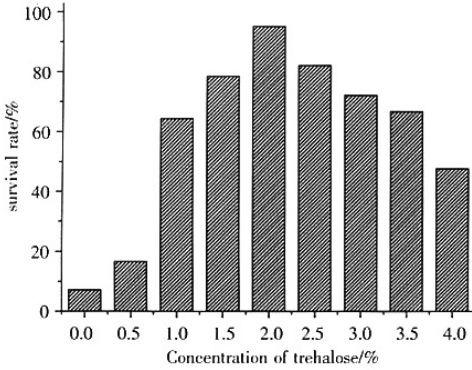


图 2 不同浓度海藻糖溶液对干燥条件下 *B.fordii* MH602 的影响

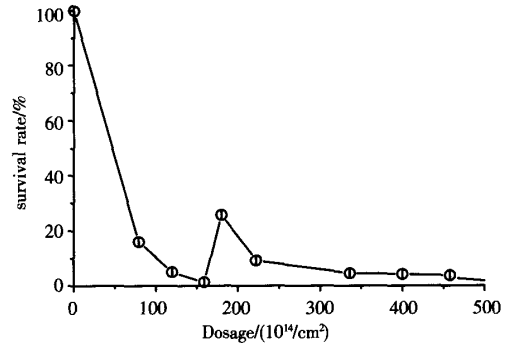


图 3 *B.fordii* MH602 的离子注入存活率曲线

*B. fordii* MH602 的离子注入存活率曲线呈马鞍型,该注入存活率曲线与文献报道的离子注入存活率典型曲线形状一致.离子注入与传统的辐射相比,除了能量沉积效应外,还有质量沉积和电荷交换效应,这 3 种效应的共同作用使低能离子注入诱变存活率曲线与传统的辐射诱变存活率曲线不同,前者为“马鞍”型曲线,后者为肩型曲线<sup>[9]</sup>.在采用海藻糖作为菌体保护剂的情况下进行低能离子注入存活率曲线呈“马鞍”型,表明在海藻糖的保护作用下,离子注入诱变效应未发生改变,海藻糖对离子注入的负面效应可以忽略.

利用海藻糖作为离子束诱变中的菌体保护剂,避免菌体细胞因干燥而死亡,同时不影响离子注入诱变效应,本研究根据马鞍型存活率曲线选择合适剂量,通过离子束诱变成功地选育到了目的菌株.

## 3 结论

离子束诱变中海藻糖能大大提高对数生长期 *Bacillus fordii* MH602 菌体的抗干能力.采用 2% 的海藻糖溶液配制菌悬液,既可防止因菌悬液中菌体细胞内外渗透压差过大等原因导致菌体的死亡,又能达到对菌体细胞壁及细胞膜的最佳保护状态.同时海藻糖的保护作用没有对离子注入效应产生负面影响.相关结果对微生物,特别是对抗干能力较差的微生物离子束诱变育种有重要的指导意义.

### [参考文献]

- [1] 余增亮,霍裕平.离子注入生物学研究述评[J].安徽农业大学学报,1994,21(3):221-225.
- [2] 余增亮.离子束生物技术引论[M].合肥:安徽科学技术出版社,1998:241-246.
- [3] 宫春波,刘鹭,谢丽源,等.离子注入微生物诱变育种研究进展[J].生物技术,2003,13(2):47-49.
- [4] 甌卫军,李茜,张石峰,等.低能  $N^+$  离子注入谷氨酸产生菌诱变育种初步研究[J].食品与发酵工业,2002,28(3):20-23.
- [5] Paiva C L, Panek A D. Biotechnological applications of the Disaccharide Trehalose[J]. Biotechnol Annu Rev, 1996(2):293-314.
- [6] Syltatk C, May O, Altenbuchner J, et al. Microbial Hydantoinsases-Industrial Enzymes from the Origin of Life? [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51:293-309.
- [7] Mei Yanzhen, He Bingfang. International Symposium on Biocatalysis and Bioprocess Engineering[C]. Ouyang Pingkai. Screening of microorganisms having thermostable hydantoinase and carbamoylase, Shanghai: East China University of Science and Technology Press, 2005.
- [8] 封德顺.海藻糖的生物学功能简介[J].生物学通报,1999,34(2):13.
- [9] 卞坡,谷运红,霍裕平,等.离子束的生物效应及应用[J].河南农业大学学报,1999,33(2):178-182.

[责任编辑:孙德泉]