

533-536
(20)

同工酶技术在金霉素链霉菌鉴别中的应用

管萍¹⁾ 景建洲²⁾ 孙连魁²⁾

TQ927

(1)西北工业大学化工系,710072,西安; (2)西北大学生物学系,710069,西安; 第一作者 27岁,女,硕士)

摘要 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳对四环素生产菌——金霉素链霉菌的酯酶同工酶和过氧化物酶同工酶进行了测定。实验结果表明:①电泳条件不同对测定结果造成不同影响;②4个供试菌株的过氧化物酶同工酶谱基本相同,均有4条酶带,不能将各菌株区分开;③4个供试菌株的酯酶同工酶谱不完全相同。其中金霉素链霉菌1-27M26,75-S-2和3[#]菌株或1-27M26,15[#]和3[#]菌株的酯酶同工酶谱不同,而75-S-2和15[#]菌株的酶谱相同。1-27M26,75-S-2或15[#]与3[#]菌株是不同菌株。其酯酶同工酶谱可作为鉴别菌株的指标。

关键词 金霉素链霉菌; 酯酶同工酶; 过氧化物酶同工酶; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

分类号 Q556

四环素

近年来,伴随着国内制药业的迅速发展,各厂家选育新的优良菌株的工作进展很快。但与之相应的鉴别新菌株的手段却停滞不前。到目前为止,国内仍普遍采用传统的形态学鉴定方法,如比较菌落颜色、形态、菌丝和孢子的直径等。然而,微生物的生长受各种外界因素影响很大,形态特征易随各因素的改变而改变。因此,传统方法存在较大的局限性。其可靠性不够高,说服力不强,不能反映菌株间的本质区别。寻找一种简便、准确、迅速且确实能体现菌株间差异的鉴别方法,显得极为迫切。

同工酶是同一机体中功能相同,结构不同的酶。酶是基因的产物,机体中同工酶的组成和结构的不同反映了机体间基因的差异即本质差异^[8]。因此,自50年代以来,国内外将同工酶的分离分析技术广泛应用于物种鉴定、分类进化、遗传与变异、真菌分类、病菌致病力等方面的研究,并取得了很多有价值的成果^[9-11]。利用同工酶对制药业中的四环素生产菌——金霉素链霉菌进行分析鉴定,这在国内尚属首次。本文采用聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳,对4个经形态学方法鉴定为不同菌株的金霉素链霉菌的过氧化物酶同工酶和酯酶同工酶进行了测定分析。同时,对测定过程中的电泳条件也进行了探讨。其目的在于寻找一种较合理、较完善的鉴别菌株的方法,以适应现代制药业的发展。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试的金霉素链霉菌(*Streptomyces aureofaciens*)共4株,均由西安制药厂提供。编号分别为1-27M26,75-S-2,15[#],3[#],其中,75-S-2由1-27M26经诱变后得到,为低产、抗性菌株,1-27M26为高产敏感菌株。15[#]由1-27M26与75-S-2经一次融合杂交后选育得到,为高产、敏感、耐低溶解氧菌株。3[#]菌株由15[#]与75-S-2经二次融合杂交后选育得到,为高产、抗性菌株。经形态学方法鉴定,四菌株为不同菌株,且15[#]和3[#]菌株已在生产中推广应用^[12]。

1.1.2 试剂 所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 菌体培养^[1,2] 将供试验菌株在平板分离培养基上34℃条件下活化4d(平板分离培养基:粗面

粉 20 g, 蛋白胨 0.5 g, K_2HPO_4 0.8 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2), 然后移至斜面孢子培养基, 34 °C 培养 4 d (斜面孢子培养基: 麸皮 32 g, 琼脂 22 g, $MgSO_4$ 0.05 g, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.15 g, K_2HPO_4 0.1 g, 蒸馏水 1 000 mL)。选取菌落形态一致, 孢子丰满的斜面, 用 5 mL 无菌水冲洗斜面, 将菌悬液接入含 25 mL 种子摇瓶培养液的 200 mL 三角瓶内 (种子摇瓶培养基: KNO_3 1 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5 g, $FeSO_4$ 0.01 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 4 g, 酵母膏 4 g, 蒸馏水 1 000 mL), 于 30 °C 摇床振荡培养 20 h。显微镜下检查有无霉菌或其他杂菌。

1.2.2 菌体收集 菌液经布氏漏斗减压过滤, 菌体用蒸馏水洗涤 3~4 次, 收集称重, 置于冰箱中冷冻过夜。

1.2.3 酶液制备 每种菌株称取菌体 2 g, 加入 2 mL 1/15M $Na_2HPO_4-KH_2PO_4$ 缓冲液 (pH=7.0) 和 0.1 g 石英砂, 冰浴中研磨成匀浆, 于 0 °C 10 000 转/min 离心 15 min, 取上清液, 0~4 °C 分装保存。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶板和凝胶柱制备 参照杨太兴⁴ 鉴定的酯酶同工酶和过氧化物酶同工酶的 Tris-柠檬酸凝胶系统和 Tris-HCl 凝胶系统分别制备凝胶。前者相应的电极缓冲液为 Tris-甘氨酸低离子强度缓冲液, 后者为高离子强度缓冲液。分离胶浓度 10%, 浓缩胶 4%。

1.2.5 电泳分离 点样后, 于冰箱中电泳。开始 10 min 电流强度为 1 mA/cm 或 1 mA/管, 以后调为 2 mA/cm 或 2 mA/管。整个电泳过程要求电流保持恒定, 指示剂迁移到凝胶柱或板下端 1 cm 左右, 停止电泳。每个酶样分别在两种凝胶系统中采用垂直平板和圆盘电泳两种方式进行测定, 重复测定 10 批样品。

1.2.6 染色 按文献 5 配制过氧化物酶染液, 将凝胶板或凝胶柱浸入染液, 室温下, 10 min 即显清晰的蓝色酶带。按文献 4 配制酯酶同工酶染液, 30 °C 条件下染色 30 min, 酶带呈玫瑰红色。染色完毕后, 用无离子水冲洗 3~4 次, 放入 7% 醋酸溶液中固定脱色, 4 °C 以下保存。

1.2.7 照相、扫描 将染色后的凝胶板或柱绘图、拍照, 并在岛津 CS-930 双波长薄层扫描仪上进行扫描。过氧化物酶同工酶扫描波长为 540 nm, 酯酶同工酶为 520 nm。

2 结果与讨论

2.1 电泳条件的确定

采用两种凝胶系统和电泳方法对金霉素链霉菌四菌株的酯酶及过氧化物酶同工酶的测定结果表明, 垂直平板凝胶电泳即使在达到最大点样量时, 仍未有酶带出现。而圆盘凝胶电泳只要点样量足够大, 就会有酶带。这可能是由于菌种微小, 含酶量太少或酶活不高, 垂直平板电泳点样量较小, 酶量不足以与染液发生颜色反应。圆盘电泳可以满足点样量较大的需求, 故在测定时应选用圆盘电泳方式。在实验中我们还发现在不同的凝胶系统中测定这两种同工酶会产生不同的结果。4 个供试菌株的酯酶同工酶只有在 Tris-柠檬酸凝胶系统和相应的电极缓冲液中电泳时才有酶带出现 (图 2), 在 Tris-HCl 凝胶系统中始终没有酶带, 而这 4 个菌株的过氧化物酶同工酶的电泳行为却恰恰相反。在 Tris-HCl 系统中酶谱较全且清晰 (图 1), 在 Tris-柠檬酸系统中只有一条酶带, 酶谱缺失严重。这可能由于酯酶同工酶与过氧化物酶同工酶所带电荷量不同或分子结构、大小不同的缘故, 经过多次重复实验后, 我们认为测定酯酶同工酶时应采用 Tris-柠檬酸凝胶系统, 测定过氧化物酶同工酶应采用 Tris-HCl 凝胶系统。

2.2 供试菌株过氧化物酶同工酶谱的比较分析

从图 1 可以看出, 菌株 1-27M26, 75-S-2, 15[#], 3[#] 都具有 E_1, E_2, E_3, E_4 4 条较清晰的主酶带 (由正极向负极编号), 4 条酶带的迁移位置基本相同, 酶活强弱不同。菌株间酶活的差异不能稳定存在, 重现性极差, 几乎每次实验结果均不相同。在个别情况下, 凝胶柱脱色后还会出现很浅的 E_1 和 E_2 酶带 (见 3[#] 菌株的酶谱), 但这两条酶带不稳定, 时隐时现。根据以上结果, 我们认为 4 个菌株的过氧化物酶同工酶谱基本相同, 没有本质不同, 酶活的差异仅仅是由于每次实验条件的差异造成的或过氧化物酶本身不

• 杨太兴编, 电泳技术检验种子纯度, 北京, 中国科学院遗传研究所, 1993, 36~44

够稳定造成的,不是因基因差异。同工酶谱相同的原因可归结为两点:第一,75-S-2 是经 1-27M26 诱变得到的^[1,2],它的基因突变位点不在过氧化物酶同工酶的结构基因位点上,而且在一次和二次融合杂交产生 15[#]和 3[#]菌株的过程中,该结构基因始终没有发生变异或丢失,而是稳定地遗传下来并表达了。第二,供试菌株之间亲缘关系很近,种间优势低,同工酶谱差异小或无差异。这与李继耕等人^[4-6]的研究结果相符。因此,实验证实,过氧化物酶同工酶不能区分这 4 个菌株,不适宜作为鉴别手段。

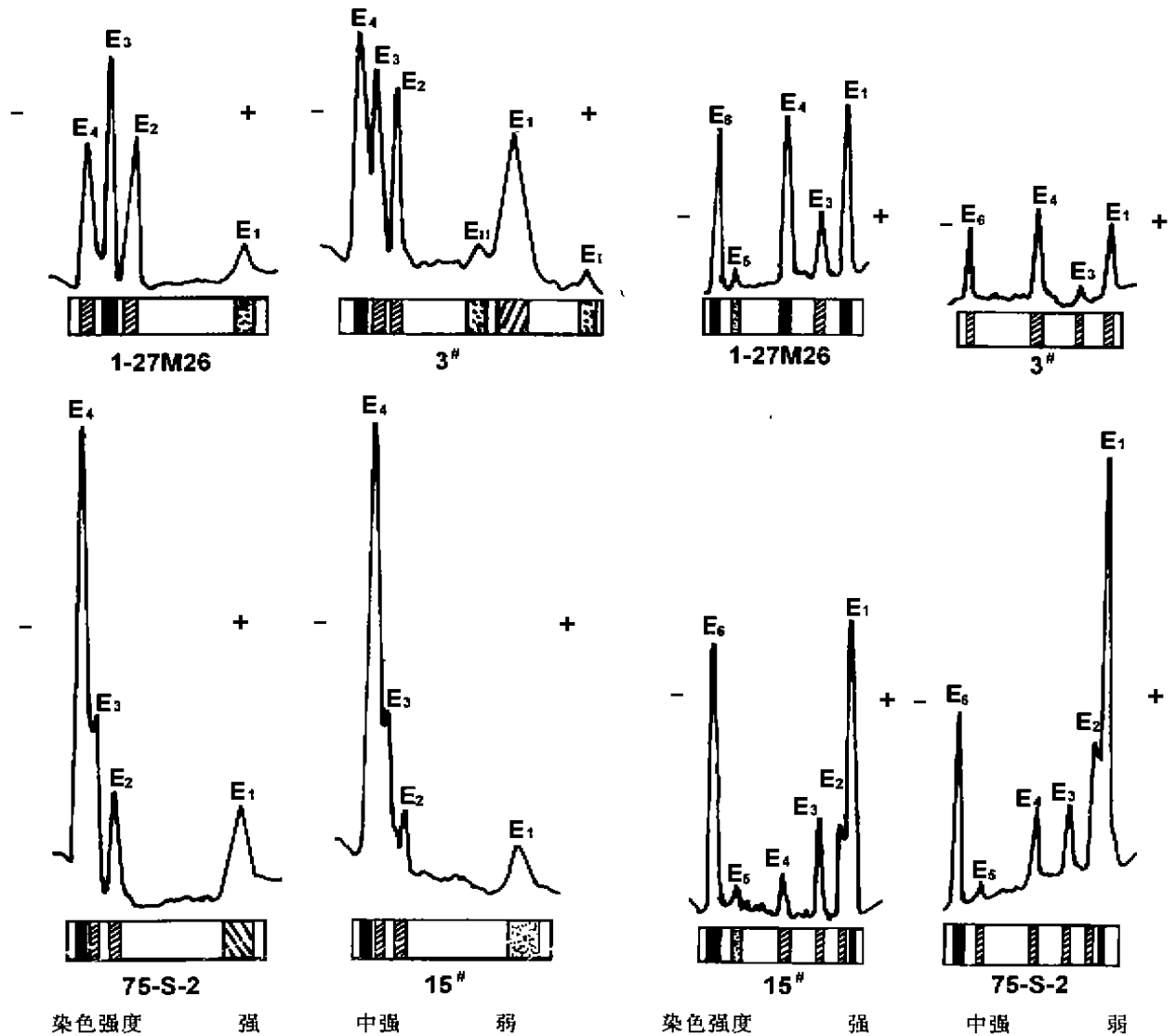


图 1 金霉素链霉菌过氧化物酶同工酶图谱及扫描曲线
(扫描波长 540 nm)

Fig. 1 The Peroxidase Isozyme Patterns and Scanning Line of the *S. aureofaciens*
(scanning wavelength 540 nm)

图 2 金霉素链霉菌酯酶同工酶图谱及扫描曲线
(扫描波长 520 nm)

Fig. 2 The Esterase Isozyme Patterns and Scanning Line of the *S. aureofaciens*
(scanning wavelength 520 nm)

2.3 酯酶同工酶的分析比较

4 个供试菌株的酯酶同工酶图谱和扫描曲线显示(图 2):菌株 1-27M26, 75-S-2, 15[#], 3[#]都具有 4 条迁移位置基本相同的主酶带 E₁, E₂, E₃, E₄(从正极向负极编号)。75-S-2 和 15[#]还具有 E₂ 和 E₅ 酶带, 1-27M26 的酶谱多了一条 E₅ 酶带, 同工酶谱的组成出现了差异。这种差异反映了前两种菌株中的酯酶结构基因与 1-27M26 菌株中的不同, 它们发生了本质变化。因此, 75-S-2 和 15[#] 与 1-27M26 不是同一种菌株。

3[#] 菌株的酶谱与另 3 种菌株的酶谱也有较大不同, 属于缺失型酶谱。我们认为 75-S-2 和 15[#] 进

行二次融合杂交产生 3⁺菌株时,它们的 E₂、E₃ 酯酶同工酶结构基因丢失或发生变异而不能表达。因此, 3⁺菌株不具有这两条酶带,它是不同于另 3 个菌株的新菌株。

75-S-2 和 15⁺菌株的酯酶同工酶谱相同,只是个别酶带的酶活有少许差异,这种差异重现性差。因此这两个菌株是否是不同菌株还有待进一步研究。这一结果与形态学鉴定结果不符。

至此,我们可以得出这样的结论:1-27M26,75-S-2,3⁺或 1-27M26,15⁺,3⁺这 3 个菌株是不同菌株,与形态学鉴定结果完全一致。

综上所述,在已确定的电泳条件下,利用过氧化物酶同工酶不能区分菌株间的差异。利用酯酶同工酶则可以迅速、准确地地区分 3 种菌株,避免了传统鉴定方法准确性不高的缺点,具有简便可行,可靠性强,重现性好等特点,较适于推广到生产实际中去。

参 考 文 献

- 1 陈五岭,杨晓燕,郭宝珠等.四环素产生菌 15⁺菌株的选育.西北大学学报(自然科学版),1994,24(2):143~146
- 2 陈五岭,景建洲,杨晓燕等.金霉素链霉菌抗噬菌体菌株-3⁺的选育.抗生素通讯,1995(4):2~5
- 3 黄寿松,翁坚.几种植物中的过氧化物酶同工酶分析.遗传,1980,2(3):7~10
- 4 李继耕,杨太兴,曾孟潜.同工酶与玉米杂种优势研究 I.遗传,1979,1(3):8~11
- 5 李继耕,杨太兴,曾孟潜.同工酶与玉米杂种优势研究 II.遗传,1980,2(4):4~6
- 6 杨太兴,曾孟潜,李继耕.同工酶与玉米杂种优势研究 III.遗传,1981,3(6):31~33
- 7 黄永芬,汪清胤,王海廷.从番茄过氧化物酶同工酶表型差异探讨杂种优势机理.遗传学报,1985,12(3):193~199
- 8 胡能书,万贤国编.同工酶技术与应用.长沙:湖南科学出版社,1985.10~13
- 9 李清锐,朱华,王彰明.江苏麦类禾谷镰刀菌酯酶同工酶测定.植物病理学报,1985,15(4):217~223
- 10 张用梅,陈宗胜.苏芸金杆菌的酯酶分析.微生物学报,1981,21(2):197~203
- 11 徐敬友,陆家云,方中达.六种疫霉菌体可溶性蛋白质和酯酶的聚丙烯酰胺凝胶平板电泳研究.真菌学报,1993,12(1):54~64

责任编辑 徐象平

Application of Isozyme Techniques in Determination of *S. aureofaciens*

Guan Ping¹⁾ Jing Jianzhou²⁾ Sun Liankui²⁾

(1)Department of Chemical Engineering, Northwestern Polytechnical University, 710072, Xi'an,

2)Department of Biology, Northwest University, 710069, Xi'an)

Abstract The esterase and peroxidase isozymes of four *S. aureofaciens* strains are determined by using polyacrylamide gel electrophoresis, and therefore proper electrophoresis conditions are resulted. The peroxidase isozyme patterns of these strains are the same, but their esterase isozyme patterns are different. They can be used as an index to determine strains.

Key words *S. aureofaciens*; peroxidase isozyme; esterase isozyme; polyacrylamide gel electrophoresis