

文章编号 :1009-038X(2002)05-0456-04

NTG 对 *E. coli* 突变株聚唾液酸产量的影响

詹晓北, 于军华, 吴剑荣, 朱莉, 仇英海, 王磊

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘要:在不同的 pH 条件下,用 NTG 连续处理 *E. coli* 得到突变菌株 JY II-74。摇瓶培养,发酵液中聚唾液酸产量达 2 800 mg/L,比出发菌株提高了 1 300 mg/L,提高幅度为 72.5%,且生产能力稳定。提取发酵液中的聚唾液酸,红外光谱鉴定其纯度,¹³C 核磁共振图谱表明,该多糖是一种 α -2,8 糖苷键连接的唾液酸同聚物。

关键词:聚唾液酸;NTG;pH

中图分类号:Q 933

文献标识码:A

Screening of Polysialic Acid Yield of *E. coli* by NTG Mutagenesis

ZHAN Xiao-bei, YU Jun-hua, WU Jian-rong, ZHU Li, QIU Ying-hai, WANG Lei

(Industrial Biotechnological Key Laboratory of Education Ministry, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Escherichia coli* was continuously treated with NTG under the different of pH. As a result, the mutant JY II-74 was obtained. The mutant JY II-74 produced 2 800 mg/L of polysialic acid in cultivation of shaking-flask, which was 72.5% higher than the starting strain. The productive capability of mutant was stable. Polysialic acid was purified from *Escherichia coli* broth. Analysis of infrared spectra confirmed that the product was identical with that of standard sample. Its purity was up to 98%. ¹³C-NMR spectrum showed that this polysaccharide was a 2,8- α linked homopolymer of sialic acid.

Key words: polysialic acid; NTG; pH

N-乙酰神经氨酸或 N-羟乙酰神经氨酸以 α -2,8, α -2,9 或 α -2,8/ α -2,9 糖苷键连接而成的直链分子称为聚唾液酸(polysialic acid or colominic acid)^[1],其经过酸水解或酶水解后得到唾液酸单体。唾液酸在医学领域有着广泛的用途^[2]。人们首先在蛋黄粉、牛乳乳清、酪蛋白和血清中提取到唾液酸单体^[3-6],但是上述方法产量低,成本高。为了提高聚唾液酸的产量,降低成本,以后又在 *Escherichia coli* K235 的发酵液中发现聚唾液酸^[5]。为

此,作者用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)处理出发菌株,收到良好的效果,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*) K235-WXJ4(作者所在研究室保藏)。

1.1.2 种子培养基(g/L) NaCl 5,胰蛋白胨 10,牛肉膏 5, pH 7.0 ~ 7.2。

收稿日期 2002-03-20; 修订日期 2002-06-26。

基金项目 江苏省自然科学基金项目(BK99190)资助课题。

作者简介 詹晓北(1962-),男,北京人,工学博士,副教授。

1.1.3 斜面培养基(g/L). 种子培养基中加入琼脂 15~20.

1.1.4 发酵培养基(g/L) 固体山梨醇 30, NH_4Cl 6, 胰蛋白胨 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 22, MgSO_4 0.6, pH 7.5~7.8.

1.1.5 鉴别培养基(g/L) 发酵培养基, 加上琼脂 15~20, 再加入 1% 溴百里酚蓝指示剂.

1.2 实验方法

1.2.1 斜面培养 保存的斜面菌种, 接一环到新鲜的斜面培养基上, 37 °C 培养 12 h.

1.2.2 菌悬液制备 接一环长好的斜面菌种到装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C, 220 r/min, 培养 12 h. 无菌条件下吸取 20 mL 到装有 20 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C, 220 r/min, 同步培养 2 h. 培养好后的培养液在无菌条件下 4 000 r/min 离心 10 min, 用相同体积 pH 9.0 的 Tris-马来酸缓冲液或 pH 6.0 的磷酸缓冲液^[7]洗涤 2~3 次, 即得到菌悬液.

1.2.3 NTG 处理方法 称取 10 mg NTG, 加 10 mL 的甲醇溶解, 在无菌条件下, 吸取 5 mL 菌悬液到 10 mL 具塞玻璃离心管中, 同时加入 0.5 mL 的 NTG 甲醇溶液, 37 °C, 100 r/min, 振荡.

1.2.4 初筛 将处理好的菌悬液 4 000 r/min, 离心 10 min, 用 pH 9.0 的 Tris-马来酸缓冲液或 pH 6.0 的磷酸缓冲液洗涤 3~4 次, 上清液用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液处理. 将洗涤好的菌悬液适当稀释, 涂布于鉴别培养基, 根据变色圈的大小筛选合适的菌株接种斜面, 37 °C 培养 12 h 复筛.

1.2.5 复筛 将长好的初筛菌种斜面, 挑取一环, 接到装有 40 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C, 220 r/min, 培养 54~56 h, 测发酵液中的聚唾液酸量.

1.2.6 聚唾液酸测定^[7] 用间苯二酚-盐酸法. 红外光谱鉴定纯度. ¹³C 核磁共振 35 °C Bruker DXP-400, 在 400 MHz 下操作, 聚唾液酸溶解在 D₂O 中 (pH 7.0), 质量浓度为 80 mg/mL.

1.2.7 聚唾液酸的纯化 除去菌体的发酵液中加入一定量的饱和氯化钙溶液, 离心去除沉淀; 上清液用超滤装置 (CMW 10 000) 进行浓缩, 浓缩液加入 5 倍体积分数为 95% 的乙醇, 静置若干小时后离心, 所得沉淀物用体积分数为 75% 的乙醇洗涤, 离心 3 遍. 将沉淀聚唾液酸粗品溶解于水, 加入硫酸铵使达到质量分数为 50% 的饱和度, 静置后离心去除蛋白沉淀; 上清液用 Sevag 试剂去蛋白, 之后用透析膜透析 48 h, 透析液过阳离子交换柱 (争光

TD013, 10 mm × 80 mm) 进行脱色和去除杂质. 一个柱体积去离子水洗脱, 收集液体进行冷冻真空干燥, 即得到纯度较高的聚唾液酸.

1.2.8 聚唾液酸的精制 所得到的聚唾液酸溶解于 15 mmol/L, pH 8.0 的磷酸缓冲液中, 然后过一用 25 mmol/L, pH 7.2 磷酸缓冲液平衡的 DEAE-Sephadex A-75 柱子 (15 cm × 1.0 cm). 柱子用 5 个柱体积平衡缓冲液洗涤, 聚唾液酸用 240 mL 0~0.5 mol/L NaCl (溶解于相同缓冲液) 线形梯度洗脱, 收集洗脱液, 测定聚唾液酸产量. 收集部分含有聚唾液酸透析 24 h, 冷冻干燥即得到纯品聚唾液酸.

1.3 设备

DPX-400 超导核磁共振仪 (Bruker, 瑞士产品) 由中科院上海有机化学研究所提供; AKTA-explorer 快速纯化系统 (pharmacia, 瑞典产品); IR-440 红外光谱仪 (岛津, 日本产品); 争光 TD013 树脂由杭州争光树脂厂提供.

2 结果与讨论

用 NTG 处理 *E. coli* 在不同的 pH 条件下作用的方式不同. 为了提高聚唾液酸的产量, 实验采用连续处理的方法, 即在第 1 次处理完毕后, 筛选得到高产突变株后, 不进行培养基优化, 直接进行下一次处理. 以下为第 2 次处理的结果.

2.1 致死率的测定

按 1.2.2 制得的菌悬液, 在 pH 6.0 的条件下, 用 0.1 mg/mL NTG 处理, 每隔 15 min 取样. 涂布于鉴别培养基, 37 °C 培养 4~5 d. 观察菌落的大小和形状, 记数, 计算致死率 (见表 1).

表 1 NTG 处理时间和致死率的关系

Tab.1 The relation of time and deadly probably by NTG mutagenesis

处理时间/min	活菌数/个	致死率/%
0	258	0
15	136	49.2
30	91	64.8
45	30	88.4
60	1	100

NTG 被称为“超常诱变剂”, NTG 在不同的 pH 条件下作用的原理不同. 在碱性条件下, 生成重氮甲烷引起杀菌和变异; 在酸性条件下, 生成亚硝酸导致菌株死亡和变异^[8]. 所以实验在不同条件下连

续处理产聚唾液酸菌株,处理时间过短,细胞突变程度较小,菌落数目太多,挑取和观察都不方便;处理太长则致死率和负突变率增加.因此,选择45min为NTG的处理时间.

2.2 初筛和复筛

2.2.1 初筛 将处理好的菌悬液,在无菌条件下稀释到 10^{-12} ,涂布于鉴别培养基,37℃培养4~5d.在培养好的鉴别培养基上,根据菌落大小和变色圈的大小,挑取75株接到新鲜的斜面培养基上,37℃培养12h,复筛.

2.2.2 复筛 在pH9.0条件下,得到的高产突变株产量在2200mg/L左右,所以第2次处理得到的突变株产量应该在2700mg/L左右才有意义.在挑取的75株突变菌株中,摇瓶复筛得到12株高产突变株(见表2).

表2 高产突变菌株的聚唾液酸产量

Tab.2 The production of polysialic acid of high-yield mutants mg/L

菌株	PSA	菌株	PSA
JY II -4	2776	JY II -50	2785
JY II -17	2851	JY II -51	3070
JY II -19	2707	JY II -53	3026
JY II -34	3060	JY II -66	2978
JY II -43	2849	JY II -74	2933
JY II -45	2736	JY II -76	2933

为了减少工作量,复筛时每株接1个摇瓶,获得高产突变株后,重复实验时,每株接3个摇瓶,测发酵液中的聚唾液酸质量浓度,结果见表3.在表3中,有几株突变株在重复实验中产量明显比复筛时低,突变株中最终挑选6株高产突变株(JY II -17, JY II -51, JY II -53, JY II -66, JY II -74和JY II -76)进行下一步测试.

表3 高产突变株重复实验的聚唾液酸产量

Tab.3 The production of polysialic acid of repeated experiment of high-yield mutants mg/L

菌株	PSA	菌株	PSA
JY II -4	2213	JY II -50	2314
JY II -17	2791	JY II -51	2786
JY II -19	2477	JY II -53	2719
JY II -34	2315	JY II -66	2758
JY II -43	2176	JY II -74	2841
JY II -45	1836	JY II -76	2589

2.2.3 遗传稳定性的测试 为了进一步检测突变株的性质,需要进行遗传稳定性测试.对高产突变株进行连续传代,测发酵液中聚唾液酸的质量浓度,结果见表4.表4中6株高产突变株中,JY II -51、JY II -66和JY II -74的聚唾液酸质量浓度相对稳定,而在这3株中,仅JY II -74的产量一直在2800mg/L左右,其它两株的产量徘徊在2200mg/L左右.在不同pH条件下用NTG连续处理出发菌株,第1次处理得到的突变株产量稳定在2200mg/L左右,所以选取JY II -74作为高产突变株保存.

表4 高产突变株遗传稳定性检测的聚唾液酸产量

Tab.4 The inherit stability of high-yield mutants

菌株	菌株代数					
	第1代	第2代	第4代	第6代	第8代	第10代
JY II -17	2791	2016	1960	1995	2421	1879
JY II -51	2786	2269	2021	2358	2426	2223
JY II -53	2719	2071	1980	2167	2162	1909
JY II -66	2758	2000	2173	2223	2517	2223
JY II -74	2841	2649	3034	2892	2821	2730
JY II -76	2589	1970	2117	2284	2654	2132

2.2.4 和亲本的聚唾液酸比较 突变株和出发菌株的聚唾液酸产量比较见表5.JY I -24是第1次处理后得到的稳定高产突变株,产量比出发菌株提高了600mg/L. JY II -74是第2次处理后得到的高产突变株,产量比第1次提高了700mg/L,比出发菌株提高了近1300mg/L,提高幅度为75.2%.

表5 突变株和出发菌株的聚唾液酸产量的比较

Tab.5 The compare of polysialic acid between mutants and the starting strain

出发菌株	聚唾液酸质量浓度/(mg/L)
亲本	1650
JY I -24	2261
JY II -74	2902

2.3 聚唾液酸的纯化

2.3.1 聚唾液酸纯化 发酵液中磷酸盐较多,需加入氯化钙去除;超滤不仅可以起到浓缩作用,而且可以脱盐脱色,对后面的分离起很大作用;加入乙醇使聚唾液酸、蛋白质等大分子物质沉淀下来,还可将一些小分子杂质去除.分别用硫酸铵和Sevag

试剂法去除蛋白质,再经过阳离子柱脱色后,冷冻干燥得到的聚唾液酸纯度质量分数为 95.7%,蛋白质几乎完全被去除。

2.3.2 唾液酸的精制 为了进一步去除杂质,提高聚唾液酸纯度,把聚唾液酸样品用 DEAE-Sephadex A-75 进行分离。DEAE-Sephadex 兼有离子交换和分子筛的作用,能够得到相对分子质量分布比较集中的聚唾液酸。透析去掉磷酸盐和氯化钠,冷冻干燥后得到的聚唾液酸产品纯度质量分数可达到 98% 以上。

2.3.3 聚唾液酸的鉴定 红外光谱如图 1 所示,所得的红外光谱与文献报道相一致^[9]; ¹³C 核磁共振谱如图 2 所示。经过化学诱变后,聚唾液酸的结构为以 α -2,8 糖苷键连接的唾液酸同聚化合物。

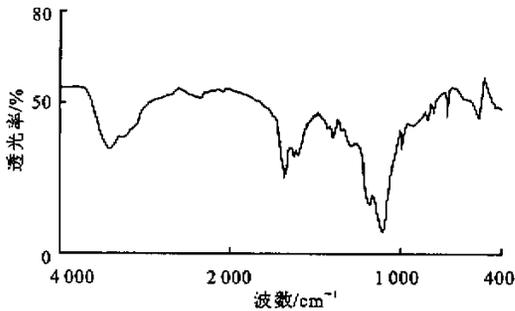


图 1 聚唾液酸的红外光谱

Fig. 1 Infrared spectra of polysialic acid

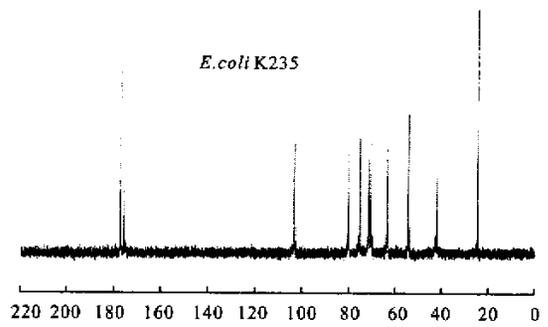


图 2 *Escherichia coli* K235 的聚唾液酸的 ¹³C NMR 谱

Fig. 2 ¹³C NMR result of polysialic acid of *Escherichia coli* K235 in D₂O

3 结 论

野生菌株对物理化学诱变是很敏感的,实验所用的菌种经过物理诱变,再用化学方法处理时聚唾液酸产量的提高幅度仍然很高。

实验用溴百里酚蓝为指示剂,作为检测鉴别培养基中产酸能力强弱的标准,从而作为初筛手段,节省了时间和劳动力,达到了快速、简便、高效筛选高产聚唾液酸菌株的目的。

不同的化学诱变剂作用于菌体的原理不同,充分利用其互补效应,能够收到良好的效果。出发菌株经过化学诱变,聚唾液酸的结构为以 α -2,8 糖苷键连接的唾液酸同聚化合物。

参考文献:

- [1] BARR G T, GOEBEL W F. Colominic acid - a substance of bacterial organic related to sialic acid[J]. *Nature*, 1959, 179: 206.
- [2] ZBIGNIEW J WITCZAK, KARL A NIEFORTH. Carbohydrate in Drugs Design[M]. New York: Marcel Dekker, 1997.
- [3] LEKH RAJ JUNEJA, MAMORU KOKETSU. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membran[J]. *Carbohydrate Research*, 1991, 214: 179-186.
- [4] WHITEHOUSE M W, ZILLIKEN F. Isolation and determination of neuraminic (sialic) acids[J]. *Methodes of Biochemical Analysis*. 1960, 8, 199-218.
- [5] MASSKARN SHIMATANL. Process for manufacturing sialic s-containing composition[P]. United States Patent, 5,270,462, 1993-12-14.
- [6] SCHAUER R. Sialic Acid Chemistry, Metabolism and Function[M]. New York: Wien New York Springer-Verlag, 1982.
- [7] SVENNERHOLM LARS. Quantitative estimation of sialic acid[J]. *Biochim Biophys ACTA*, 1957, 24: 604-611.
- [8] 陈代杰, 朱宝泉. 工业微生物菌种选育与发酵控制技术[M]. 上海: 科学技术文献出版社, 1986.
- [9] YOSHIHIRO UCHIDA, YOJI TSUKADA, TSUNETAKE SUGIMORI. Improve microbial production of colominic acid, a homopolymer of N-Acetylneuraminic acid[J]. *Agr Biol Chem*, 1973, 37(9): 2105-2110.

(责任编辑 杨 勇)