

# 青霉素酰化酶高产菌株的快速筛选方法

刘建国 杨秀琴 吴径才

(河北大学生物工程研究所,保定)

**摘要** 采用青霉素梯度琼脂平皿筛选法,利用对青霉素 G 高抗性表型,专一筛选大肠杆菌青霉素酰化酶高产突变株。一次涂皿可淘汰绝大部分未突变株。我们从青霉素 G 梯度琼脂平皿上获得 528 株,从中得到 32 株产酰化酶活性高于出发菌株的正突变株,正突变率为 6.06%,最高突变幅度为 96.6%。

**关键词** 青霉素酰化酶;青霉素 G 梯度琼脂平皿

青霉素酰化酶 (penicillin acylase) (E. C. 3.5.1.11) 是半合成抗生素工业中一种重要酶类。它可以催化裂解青霉素生产 6-氨基青霉烷酸 (6-APA),也可以催化 6-APA 逆向合成氨苄青霉素或其它半合成青霉素。

提高大肠杆菌酰化酶活性,除了用基因工程等高新技术手段外,常规诱变育种方法也是提高酰化酶活性的一种重要手段。由于不了解青霉素酰化酶的代谢途径,在常规诱变育种时,人们不得不采用随机挑选的方法,逐一发酵测定诱变后菌株的酰化酶活性以决定取舍。这种方法工作效率低,操作繁琐,而且实验盲目性大。

本文介绍了一种简单、快速高效率的筛选方法,可淘汰大量未突变的菌株。

## 材料和方法

### (一) 菌种

*E. coli* 108, 华北制药厂赠送。

*E. coli* As 1.349 购自中科院微生物研究所。

### (二) 培养基及培养条件

BYSP 培养基成分 (%)<sup>[1]</sup>: 牛肉膏 0.5 g, 酵母粉 1 g, 氯化钠 0.25 g, 苯乙酸 0.2 g, 用 2N NaOH 调至 pH 7.25。15 磅灭菌 20 分钟。固体培养基加入 1.5% 琼脂粉。

培养条件: 250 ml 三角瓶装 10 ml 培养基, 28℃ 培养 24h, 摇床转速 120 r/min。

### (三) 抗生素

青霉素 G 钠盐: 华北制药厂产品。

### (四) 青霉素酰化酶活性检测方法

见文献[2]。

### (五) 亚硝基胍诱变处理

1. 根据生长曲线选取对数生长期菌体。菌种在 BYSP 培养基中 37℃ 培养 3 小时,离心,菌体用 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 5.5) 制成菌悬液,使细胞密度达  $5.9 \times 10^8$ /ml。

2. 依致死曲线,采用亚致死剂量。在上述菌悬液内加入亚硝基胍,使其终浓度为 100  $\mu$ g/ml,于 37℃ 保温 30 分钟,致死率为 82%。

### (六) 正突变株初筛

1. 青霉素 G 梯度平皿的制作 在直径 9cm 灭菌平皿中倒入 15 ml 1% 琼脂,迅速将平皿倾斜,使皿底倾角为 6°,室温冷却至凝固。将平皿放置水平,倒入 20 ml 含青霉素 G 300u/ml 的 BYSP 固体培养基,待凝。使出发菌株只能在青霉素 G 浓度最低的一侧生长。

2. 涂平皿: 经适当稀释后吸取 0.1 ml 诱变后菌液涂于含青霉素 G 梯度琼脂平皿上。37℃ 培养 24h。在靠近青霉素 G 浓度高的一侧随机选择 3—4 个菌落,保存菌种,进行酰化酶活性测定。

### (七) 正突变株复筛

初筛后菌株逐一发酵,检测酰化酶活性。

(八)  $\beta$ -内酰胺酶活性测定方法见文献[3]。

## 结果与讨论

(一) 菌株对青霉素 G 的抗性与产酰化酶量的关系

菌株对青霉素G的抗性除了与  $\beta$ -内酰胺酶活性有关外,还与菌株本身产青霉素酰化酶活性有关。我们选取5株  $\beta$ -内酰胺酶活性很低的菌株,测定其青霉素酰化酶活性及其对青霉素G的抗性,结果见表1。

表1 菌株的酰化酶活性与对青霉素G抗性试验结果

菌株编号	酰化酶活性 (u/100ml)	对青霉素G抗性 (u/ml)
<i>E. coli</i> As 1.349	5.26	100
<i>E. coli</i> 108	9.02	150
<i>E. coli</i> 217	9.71	170
<i>E. coli</i> 189	11.42	200
<i>E. coli</i> 295	12.30	220

由表1可见,菌株对青霉素G的抗性确实与其酰化酶产量有关。

(二) 采用青霉素梯度平皿筛选法的优越性

筛选平皿中加入适量青霉素能使绝大部分出发菌株不能生长,因此可以提高筛选效率。但诱变后正突变株的酰化酶产量不可能预先知道,因此很难确定筛选用青霉素G剂量。使用青霉素G梯度琼脂平皿能很好地克服因采用单一剂量青霉素G带来的盲目性。即如果青霉素G剂量设计不当将导致筛选失败。采用梯度平皿筛选法结果见图1。

(三) 青霉素梯度平皿筛选法与常规筛选法的比较

我们用常规随机筛选法筛选 NTG 诱变 *E. coli* 108 后的菌株 8501 株,正突变 1 株,正突变率为 0.012%,最高突变幅度为 7%;用青霉素G梯度平皿筛选法筛选 NTG 诱变 *E. coli* 108 后的菌株 528 株,正突变 32 株,正突变率为 6.06%,最高突变幅度为 96.6%。结果见表2。

表2 青霉素梯度平皿筛选法与常规随机筛选法的比较

项目	青霉素梯度平皿筛选法	常规随机筛选法
筛选总株数	528	8501
正突变株数	32	1
负突变株数 (含 $\beta$ -内酰胺酶活性提高株数)	465	13
未突变株数	31	8487
正突变率(%)	6.06	0.012
最高突变幅度(%)	96.6	7.0

由此可见,青霉素梯度平皿筛选法虽然筛选出高  $\beta$ -内酰胺酶活性菌株的可能性,但从正突变率可以看出该法淘汰了大量未突变的出发菌株,该法是高效率的;从最高突变幅度来看,该法确实是有效可行的。

(四) 采用青霉素G抗性筛选法的弊端

由于青霉素酰化酶与  $\beta$ -内酰胺酶都能导致菌株对青霉素G抗性提高,因此在筛选出的高抗性突变体中,除了有酰化酶活性提高的菌株外,也会有大量的  $\beta$ -内酰胺酶活性提高的菌株。

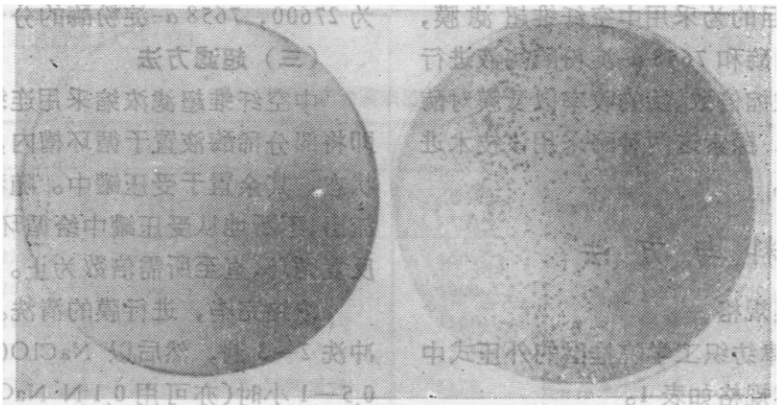


图1 梯度平皿琼脂上菌体生长情况  
左: 出发菌株; 右: 诱变菌株

(下转第281页)

## 参 考 文 献

- [1] Mayer H., et al.: Plasmid of Medical, Environmental and Commercial Importance. K. N. Timmis and A. Pühler, editors. Elsevier and

North-Holland Biomedical Press. p. 459—470, 1979.

- [2] 张启先等: 微生物学报, 19(3): 302—308, 1979。  
[3] 黄翠芬等: 遗传工程理论与方法, 第 205—206 页, 科学出版社, 北京, 1987 年。