

一种检测酵母嗜杀活性的简便方法及其应用

刘巍峰 鲍晓明 高 东

(山东大学微生物系, 济南 250100)

摘 要 本文以嗜杀酵母 ERR1 为材料建立了一种双层平板单菌落嗜杀活性检测法。此法与常规营养缺陷型筛选方法相结合, 可直接筛选出具有嗜杀活性的酵母营养缺陷型菌株 MK2-3: $K^+R^+Leu^-$, 并成功地用于检测理化因子对嗜杀质粒的消除作用。进一步采用此法在直接混合培养中做出了嗜杀酵母对敏感酵母作用的动力学曲线。结果表明, 敏感酵母活菌数在混合培养的对数生长后期开始急剧下降。

关键词 嗜杀活性, 双层平板, 单菌落检测, 混合培养物, 酵母菌

嗜杀酵母的细胞质中存在有染色体外遗传因子——嗜杀质粒(Killer plasmid)。该质粒具有编码嗜杀毒素蛋白的能力, 此毒素能杀死同族及亲缘酵母。由于这一特殊性质, 嗜杀酵母

不仅是真核生物核外遗传研究的理想材料, 而

本文为山东省自然科学基金资助项目
1994-11-28 收稿

且在食品及发酵工业上有着广泛的应用前景。通过育种,诸如细胞杂交、原生质体融合及基因工程技术,将嗜杀酵母的嗜杀质粒转到优良酵母菌中,使其获得嗜杀活性,能杀死侵染的野生酵母,用于防止野生酵母的污染。因此有必要建立一种简易的嗜杀活性检测方法。本实验在改进 Russell(1986)的嗜杀活性检测方法基础上^[1],建立了双层平板单菌落检测法。此法操作简单,结果明显,具有广泛的适用性。

1 材料和方法

1.1 菌株

嗜杀酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ERR1 及敏感酵母 *S. cerevisiae* ERS1 均由本实验室保存。

1.2 培养基

1.2.1 YEPD 培养基(g/l): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 10, pH5.4, 0.7×10^5 Pa 灭菌 20min。固体培养基加 1.8~2.0% 的琼脂。

1.2.2 PYG 下层培养基^[1](g/l): 蛋白胨 3.5, 酵母膏 3.0, KH_2PO_4 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, 葡萄糖 10.0, pH4.3, 琼脂 20.0, 0.7×10^5 Pa 灭菌 20min。

1.2.3 PYG 上层培养基^[1]: 上述下层培养基中加入琼脂 1.2%, 琼脂融化后加美蓝至 0.003%, 0.7×10^5 Pa 灭菌 20min。使用时水浴溶化,冷却至 50℃ 使用。

1.3 方法

1.3.1 双层平板单菌落检测法: 嗜杀酵母 ERR1 在 YEPD 培养液中活化,适当稀释,涂抹 PYG 下层平板,22℃ 培养 2d,长出单菌落,倾注上层 PYG 半固体培养基(0.1ml 敏感菌/10ml 培养基),凝固后 22℃ 培养观察。

1.3.2 具有嗜杀活性的营养缺陷型的筛选^[2]: 在诱变剂处理后的涂抹平板上按上述方法选择具有嗜杀活性的单菌落,并以常规营养缺陷型筛选方法进行具有嗜杀活性的营养缺陷型菌株的筛选。

1.3.3 理化因子对嗜杀质粒的消除作用: 以合适剂量的不同理化因子处理的 ERR1 菌悬液

涂平板计算杀菌率,并用单菌落检测法计算消除率。

1.3.4 嗜杀酵母 ERR1 对敏感酵母 ERS1 作用的动力学曲线测定: ERR1 和 ERS1 分别接种于 5ml YEPD 液体培养基中。22℃ 培养 24h 后,按 1:50 (ERR1:ERS1) 比例以 0.5% 转接 100ml YEPD 液体培养基中,22℃ 培养。每隔 12h 取样,单菌落检测法分段计算总菌数和嗜杀菌数。

2 结果与讨论

2.1 双层平板单菌落检测法

双层平板单菌落法对嗜杀活性的检测结果如图 1 显出清晰的单菌落抑菌圈。该法可以与常规平板计数相联系,在常规计数的基础上,直接检测单菌落的嗜杀活性,步骤简单,便于观察,可广泛用于与计数有关的实验中。例如具有嗜杀活性的营养缺陷型菌株筛选及测定理化因子对嗜杀质粒的消除作用等。与传统的方法相比,在野生酵母、嗜杀融合子及转化子的筛选上更有优越性。

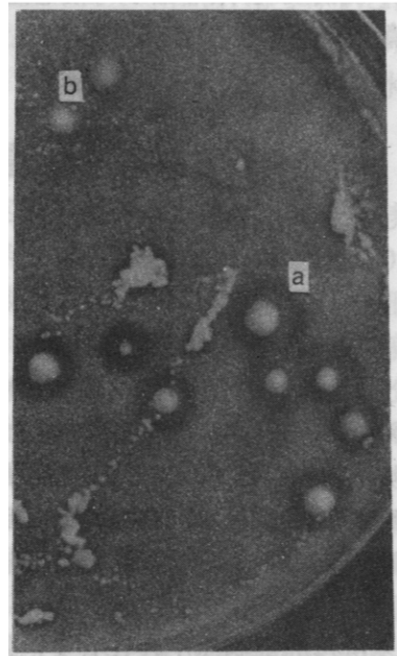


图 1 双层平板单菌落嗜杀现象

a. 具有嗜杀活性的单菌落 b. 无嗜杀活性的单菌落
将上述方法与常规营养缺陷型筛选相结

合,按图2程序筛选出具有嗜杀活性的亮氨酸营养缺陷型标记酵母菌株 MK2-3: $K^+R^+Leu^-$, 可以作为嗜杀质粒原生质体融合转移的供体菌株,用于具有嗜杀活性的酵母融合子的选育^[4]。对理化因子的稳定性是染色体外遗传因子的一个基本性质,我们成功地利用双层平板单菌落法检测了几种理化因子对嗜杀质粒的消除作用,结果见表1。

表1 理化因子对嗜杀质粒的影响

理化因子	剂量	致死率(%)	消除率(%)
温度(°C)	38°C	7.9	32.1
放线菌酮	$\times 10^{-7}$	13.4	22.8
溴化乙锭	10 μ g/ml	21.8	0
巯基乙醇	3%	12.8	18.2
紫外线	15w,30cm,5min	24.1	4.9

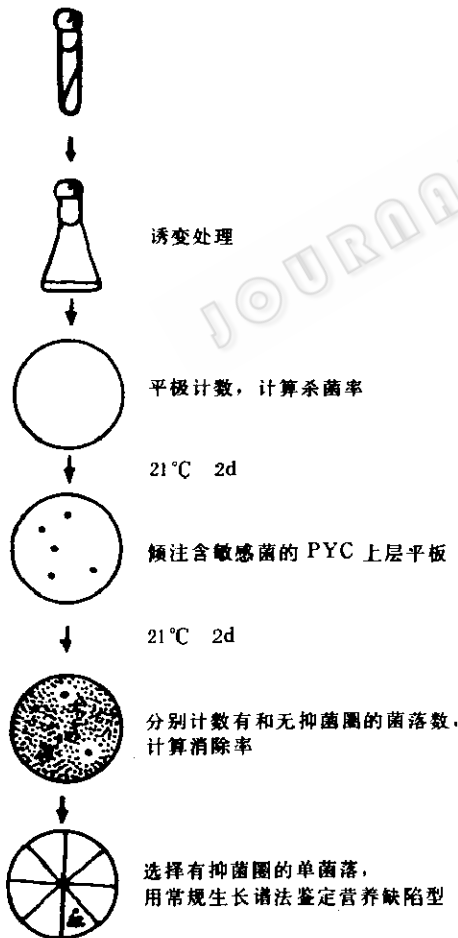


图2 具有嗜杀活性的营养缺陷型菌株的筛选流程

2.2 嗜杀酵母对敏感酵母作用的动力学曲线测定

通过直接混合培养得到的嗜杀酵母对敏感酵母作用的动力学曲线(图3),可以看出,混合培养初期敏感酵母的生长受抑制,比生长速率低于嗜杀酵母的比生长速率。在培养30h左右(相当于嗜杀酵母的对数生长后期)嗜杀酵母分泌的毒素蛋白杀死的敏感酵母数日超过因细胞分裂而增殖的敏感酵母数量,表现出敏感酵母数量在达到最大生长量之前急剧下降。这种直接混合培养更为直观地反映了嗜杀酵母对敏感酵母作用的一种动态过程。图3还表明,嗜杀酵母产生的毒素蛋白是一种随着菌体的生长繁殖而逐步积累的分泌蛋白。同时也说明,在嗜杀酵母培养的对数后期是嗜杀质粒和嗜杀毒素蛋白提取的较适时机。

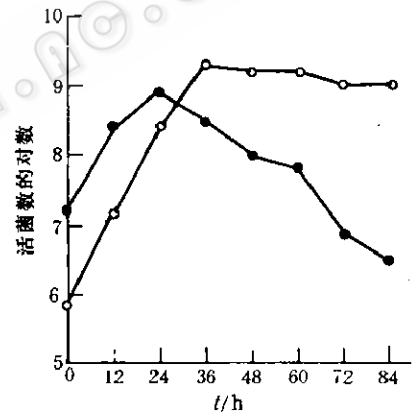


图3 嗜杀酵母对敏感酵母作用的动力学曲线

○—○嗜杀酵母 ●—●敏感酵母

酵母嗜杀系统是研究真核生物核外遗传的理想材料之一。本方法的建立将有助于嗜杀酵母的研究,并已应用于本实验室嗜杀酵母细胞融合筛选标记及融合系统的建立^[3,4],以及嗜杀因子的提取分离^[5]等研究工作。同时也可将这几种有关嗜杀质粒的实验方法引入教学,丰富教学实验内容,拓宽学生对真核微生物核外遗传的知识面。

参 考 文 献

- [1] Russel I. J Am Soc Brew Chem. 1986, 44(3): 123-124.

- [2] 白毓谦, 方善康, 高东, 等. 微生物实验技术, 济南: 山东大学出版社, 1987, 340~350.
- [3] 鲍晓明, 高东. 山东省自然科学研究进展, 北京: 中国科学技术出版社, 1993, 912~916.
- [4] 高东, 鲍晓明, 金建玲, 等. 山东大学学报, 1995, 30(2): 28~31.
- [5] 刘巍峰, 高东. 遗传, 1995, 5: 41~44.

A CONVENIENT METHOD FOR THE DETECTION OF KILLING ACTIVITY IN YEASTS AND ITS APPLICATION

Liu Weifeng Bao Xiaoming Gao Dong

(Department of microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract Here we report a dilayer plate single colony assay of killing activity in the killer yeasts. This method, combined with the routine selection method of auxotrophy, has been applied directly to select auxotrophic yeast strain with killing ability MK2-3, $K^+R^+Leu^-$. It is also used successfully to determine the curing effect of several physical and chemical factors on the killer plasmid. Further we got the dynamic curve reflecting the killer yeasts' act on the sensitive yeasts by applying a directly-mixed culture. The result shows that the living number of sensitive yeasts begins to drop dramatically after 30 hours.

Key words Killing activity, dilayer plate, single colony assay, mixed culture, yeast