

# 金属硫蛋白产生菌的诱变育种\*

王 龙 贾 乐 林稚兰

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

**摘要** 采用亚硝基胍和紫外线诱变,自金属硫蛋白(MT)产生菌酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) BD101-25 单倍体中获得遗传稳定的高  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  抗性突变株 BD101-69 和 BD101-30。并对其重金属解毒、拮抗 u.v. 和  $^{60}\text{Co}$  辐射效应、清除羟基自由基能力等生物学功能进行了研究。与出发菌株相比,上述生物学活性与酵母细胞对  $\text{Cu}^{2+}$  抗性、MT 表达量表现出正相关性。两个突变株类 MT 表达量与生物学活性皆有所提高,为酿酒酵母 MT 的理论和应用研究打下了基础。

**关键词** 金属硫蛋白, 酿酒酵母, 突变株, 生物学功能

**分类号** Q939.5 **文献识别码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-02-0102-06

## SELECTION OF MUTANTS FROM METALLOTHIONEIN PRODUCING STRAIN

Wang Long, Jia Le, Lin Zhilan

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

**Abstract** Two mutants of strains BD101-69, BD101-30 having high resistance to  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  were obtained from monokaryons of metallothionein producing strain *Saccharomyces cerevisiae* BD101-25 after mutation with NTG and u. v. Analysis and comparison of the biological function were performed between these strains. It was shown that there was a positive correlation between the heavy metal ion detoxification, protection against u. v. and  $\gamma$ -ray irradiation damage, elimination of hydroxyl radicals and yeast MT content, the resistance of yeast cells to  $\text{Cu}^{2+}$ . Two mutants showed higher biological activity and Cu-MT content.

**Key words** Metallothionein, *Saccharomyces cerevisiae*, Mutants, Biological function

金属硫蛋白(Metallothionein, 简称 MT)是一类广泛存在于生物中的低分子量、富含 Cys、能被金属诱导产生的金属结合蛋白。主要参与微量元素的贮存、运输和代谢;拮抗电离和非电离辐射;清除羟基自由基及重金属解毒等多种作用。MT 与某些微量元素缺乏症、肿瘤、心血管系统疾病、老年性痴呆等疾病防治有一定关系。酵母菌 MT 的生物学功能,只在微量元素代谢、重金属解毒方面有报道<sup>[1]</sup>,医学应用也只在风湿性关节炎治疗中有专利<sup>[2]</sup>。酿酒酵母 BD101 是最近我们筛选出的 Cu-MT 产生菌<sup>[3]</sup>业经证实酿酒酵母 Cu-MT 具清除羟基自由基

能力,动物体内药效学试验证明,酵母菌 Cu-MT 在小鼠抗  $\gamma$ -射线辐射损伤导致的血小板降低有显著改善和回升作用,酵母 Cu-MT 对老龄小鼠与衰老相关三项生化指标(SOD、过氧化脂质、B 型单胺氧化酶)有改善作用,提示酵母菌 Cu-MT 在急性放射病、肿瘤辅助药物和防衰老保健药物开发上有良好的应用前景<sup>[4]</sup>。本文较详细地观察了 MT 产生菌酿酒酵母两个突变株的

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39370021)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.39370021).

1997-12-31 收稿, 1998-05-11 修回

生物学功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 酵母菌:** 酿酒酵母 BDI01-25 ( $\text{Cu}^{2+}$  抗性  $1\text{m mol/L}$ , 不抗  $\text{Cd}^{2+}$ ) 酿酒酵母 BDI01-69 ( $\text{Cu}^{2+}$  抗性  $15.0\text{m mol/L}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  抗性  $4.0\text{m mol/L}$ ), 酿酒酵母 BDI01-30 ( $\text{Cu}^{2+}$  抗性  $25.0\text{m mol/L}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  抗性  $4.0\text{m mol/L}$ )。酿酒酵母 BDI01-69 和 BDI01-30 为 BDI01-25 单倍体经 UV 和 NTG 诱变获得高  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  抗性突变株。

**1.1.2 培养基:** 见参考文献 [3]。

### 1.2 方法

**1.2.1 单倍体的分离和筛选:** 采用酶解法对 MT 产生菌酿酒酵母 BDI01 进行单倍体分离。从中选出  $\text{Cu}^{2+}$  抗性高、MT 含量和生物量高的单倍体 BDI01-25。

**1.2.2 亚硝基胍和 UV 诱变:** 按常规用亚硝基胍 ( $100\mu\text{g/L}$ ) 对酿酒酵母 BDI01-25 单倍体进行诱变, 从大量突变株中选出  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  抗性及生物量提高的 BDI01-69 突变株, 再按常规用 UV 诱变突变株 BDI01-69, 从中选出  $\text{Cu}^{2+}$  抗性及生物量略有提高的突变株 BDI01-30。

**1.2.3 酵母菌中 Cu-MT 含量测定:** 用 Scheuhammer 银/血红蛋白饱和法测定<sup>[5]</sup>或按文献 [3] 法测定经 Sephadex G50 层析柱分离的 Cu-MT 粗品。

**1.2.4 细胞生物量测定:** 稀释分离法测活菌数、真空冷冻干燥法测细胞干重或稀释 20 倍菌悬液的  $A_{600}$  光密度值。

**1.2.5 铜含量测定:** 用 PU2000 型原子分光光度计测定细胞中铜含量 (用真空冷冻干燥酵母细胞, 经硝酸、高氯酸消化测铜含量)、细胞内游离铜含量 (酵母细胞破碎后上清液适当浓缩, 经 Sephadex G-50 层析柱分离, 收集相应于第 3 个蛋白峰位置的游离铜)、MT 中铜含量 (酵母细胞破碎后上清液适当浓缩, 经 Sephadex G-50 层析柱分离, 收集相应于第二个蛋白峰,  $254\text{nm} > 280\text{nm}$  吸收值、富含铜的部分)。

**1.2.6 UV 和  $^{60}\text{Co}$  辐射效应:** 三株 MT 产生菌以

$10^8$  个 / mL 菌液浓度接受 UV 辐射, 紫外灯功率 15W, 波长  $260\text{nm} \sim 266\text{nm}$ , 灯距 30cm, 照射时间 5、10、15、20s。三株 MT 产生菌以  $10^{10}$  个 / mL 菌液浓度接受  $^{60}\text{Co}$  照射, 照射剂量为 2000、4000、8000、12000 Rad / s。照射后稀释平板菌落计数, 与未照射时总菌数比较, 计算致死率, 每组 5 个重复。

**1.2.7 清除 OH 自由基能力:** 制备不同  $\text{Cu}^{2+}$  浓度诱导的三株菌 MT 活性干酵母, 按 Fellous<sup>[6]</sup> 法检测抗坏血酸系统中所产生的 OH 自由基能力的消除, 蛋白质测定采用双缩脲法<sup>[7]</sup>。

**1.2.8  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  抗性突变株遗传稳定性检测:** 按陈新杰等方法<sup>[8]</sup> 分别以  $\text{Cu}^{2+}$  抗性 ( $1\text{m mol/L}$ 、 $15\text{m mol/L}$ 、 $25\text{m mol/L}$ ) 选择平板检测 50 世代三株菌  $\text{Cu}^{2+}$  抗性水平。

## 2 结果与讨论

### 2.1 高 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 抗性突变株选育

酵母属的营养细胞均为稳定的二倍体或多倍体。为了获得稳定的重金属抗性, MT 含量及生物学活性更优良的突变株, 首先要对出发菌株进行单倍体分离。根据文献报道, 酿酒酵母对  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  的抗性是受第 VIII 染色体远端着丝粒 42 分摩位置 *cup1* 基因座 (MT 结构基因和蛋白质 X 结构基因) 控制的, 酵母菌中  $\text{Cu}^{2+}$  或  $\text{Cd}^{2+}$  抗性水平和细胞内 Cu-MT 和 Cd-MT 含量及 *cup1* 基因座拷贝数呈正相关性<sup>[9]</sup>。从表 1

表1  $\text{CuSO}_4$  诱导剂量对三株菌生长及 MT 表达量影响

菌株	$\text{CuSO}_4$ 诱导剂量 (mmol/L)	生物量 (g/L)	Cu-MT 表达量 (mg/L)
BDI01-25 (抗 $\text{Cu}^{2+}$ $1\text{m mol/L}$ )	0.1	8.7	2.64
	0.5	8.7	3.30
	1.0	8.5	20.00
	1.5	6.5	6.60
BDI01-69 (抗 $\text{Cu}^{2+}$ $15\text{m mol/L}$ )	1.0	9.6	10.00
	10.0	9.3	13.92
	15.0	6.6	22.19
BDI01-30 (抗 $\text{Cu}^{2+}$ $25\text{m mol/L}$ )	1.0	8.2	4.60
	15.0	10.5	9.14
	20.0	6.4	23.50

看出,同株菌中 Cu-MT 的表达量与诱导剂量有关,在菌株允许生理临界范围内,其 Cu-MT 表达量随诱导剂量增加而增加;不同  $\text{Cu}^{2+}$  抗性水平三株菌中 BD101-69 和 BD101-30 突变株比出发菌株 BD101-25 最适诱导剂量时 Cu-MT 表达水平确有增加。且  $\text{Cu}^{2+}$  抗性的遗传性相当稳定,出发菌株 BD101-25 与突变株 BD101-69、BD101-30 在非选择性培养液中生长 50 世代后  $\text{Cu}^{2+}$  抗性分别仍保持在 100%、93.46% 和 96.53%。

## 2.2 突变株生物学活性

上述结果表明,突变株 MT 含量比出发菌株略有提高,MT 是酿酒酵母细胞中经  $\text{Cu}^{2+}$  诱导产生的一种金属结合蛋白,哺乳动物 MT 具有重金属解毒、拮抗紫外线、 $^{60}\text{Co}$  辐射和消除 OH 等多种生物学功能。为了检验突变株是否比出发菌株具有更优良的性状,我们对产 MT 的突变株进行了上述 4 种生物学功能考察。

**2.2.1 重金属解毒:** 酿酒酵母细胞中 MT 含量水平与诱导剂量有关。从出发菌株 BD101-25 (图 1) 分析,在低浓度范围内 ( $0.01 \sim 0.50 \text{ mmol/L}$ ),即酵母菌生理所允许的浓度范围内,菌生长基本保持恒定,没有大量 Cu-MT 形成;当培养液中  $\text{Cu}^{2+}$  浓度达生理允许临界水平范围内 ( $0.50 \sim 1.00 \text{ mmol/L}$ ),菌生长保持恒定,细胞内  $\text{Cu}^{2+}$  的吸收、Cu-MT 中  $\text{Cu}^{2+}$  均明显增加,达

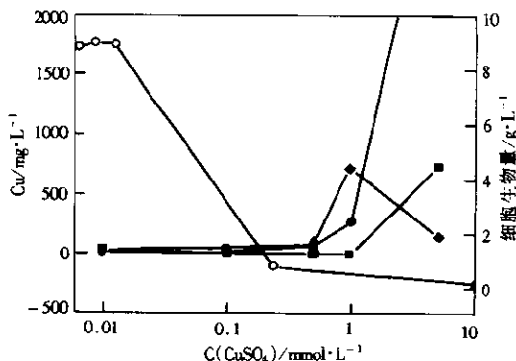


图1 BD101-25菌株细胞生长、 $\text{Cu}^{2+}$  吸收MTs 含量水平与 $\text{CuSO}_4$  诱导剂量关系

1 细胞生物量—○—, 2 细胞中铜—●—,  
3 MTs中铜—◆—, 4 细胞内游离铜—■—

到最大值,细胞内吸收  $\text{Cu}^{2+}$  60% 左右存在于 Cu-MT 中,但细胞内游离  $\text{Cu}^{2+}$  却很低,表明胞内过量的  $\text{Cu}^{2+}$  结合于经诱导产生的 Cu-MT 上,进一步证实酵母中 MT 的解毒功能;当培养液中  $\text{Cu}^{2+}$  浓度大于  $5.0 \text{ mmol/L}$  时,胞内虽然积累了非常过量的  $\text{Cu}^{2+}$ ,但每个 Cu-MT 分子只结合 4 个 Cu 原子<sup>[3]</sup> (本次实验也证实了细胞 Cu-MT 中 Cu 的含量为  $12.4 \sim 14.4 \mu\text{g/Cu-MT} / 10^{10}$  细胞),胞内仍有大量游离的  $\text{Cu}^{2+}$  存在,  $\text{Cu}^{2+}$  毒性占统治地位,致使细胞生长受到明显抑制或致死;由于细胞数目急剧下降,导致每升培养液中类 Cu-MT 产量明显降低。BD101-69 突变株 Cu-MT 含量水平与诱导剂量关系 (图 2) 与出发菌株 BD101-25 类似,但各自

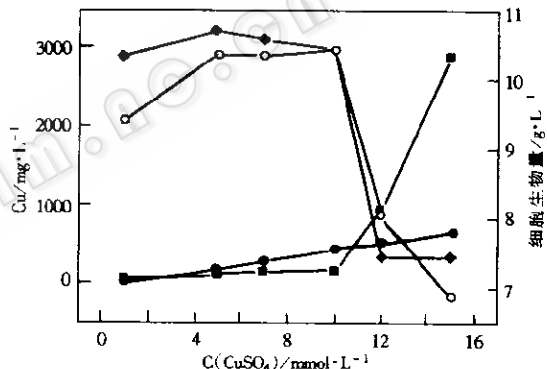


图2 BD101-69菌株细胞生长、 $\text{Cu}^{2+}$  吸收MTs 含量水平与 $\text{CuSO}_4$  诱导剂量关系

1 细胞生物量—○—, 2 细胞中铜—●—,  
3 MTs中铜—◆—, 4 细胞内游离铜—■—

对重金属解毒能力也不同, BD101-25 对  $\text{Cu}^{2+}$  解毒能力的临界水平在  $1.0 \text{ mmol/L}$ ; 而 BD101-69 突变株对  $\text{Cu}^{2+}$  解毒能力临界水平提高至  $10.0 \text{ mmol/L}$ 。

**2.2.2 拮抗 UV 辐射效应:** MT 中 Cys 上的巯基可有效地清除 UV 辐射所致的超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^-$ ), 哺乳动物经 UV 诱导可观察到 MT 的合成, MT 亦有增强机体拮抗 UV 辐射的效应。表 2 显示突变株拮抗紫外线辐射效应较出发菌株确有提高, 且 UV 损伤后致死率的下降率在一定范围内随菌株  $\text{Cu}^{2+}$  抗性水平增加而增高。

**2.2.3 拮抗<sup>60</sup>Co $\gamma$ -射线辐射效应:**哺乳动物 MT 中 Cys 的巯基,可以消除 $\gamma$ -射线发射出的电离辐射所引起的各类自由基,特别是 OH $^{\cdot}$  自由基(2-SH + 2OH $\longrightarrow$  -S-S- + 2H<sub>2</sub>O)。三株 MT 产生菌拮抗 $\gamma$ -射线辐射效应(表 3)显示<sup>60</sup>Co 损伤后致死率的下降率随突变株 Cu<sup>2+</sup>

表2 MT产生菌拮抗UV辐射效应

时间 (s)	项目	菌株		
		BD101-25	BD101-69	BD101-30
5	致死率%	97.30	94.02	90.87
	致死率的 下降率%	0.00	3.37	6.61
10	致死率%	97.90 <sup>*</sup>	96.11	91.30
	致死率的 下降率%	0.00	1.83	6.54
15	致死率%	98.50	97.63	93.75
	致死率的 下降率%	0.00	0.88	4.82
20	致死率%	99.00	98.17	96.01
	致死率的 下降率%	0.00	0.84	3.41

注:本试验进行 5 次,每组试验都是 5 个样品均值。表 2 所列为一次试验结果。经 *t* 检验,除 \* 所示为  $p<0.05$  外,其余均为  $p<0.01$ ,差异极显著。*F* 值方差分析表明处理间差异亦极显著。

表3 MT产生菌拮抗<sup>60</sup>Co辐射效应

菌株	项目	剂量 (rad/ s)			
		2000	4000	8000	12000
BD101-25	致死率%	97.46	97.93	98.40	99.34
	致死率的 降低率%	$\pm 0.09$	$\pm 0.06$	$\pm 0.04$	$\pm 0.03$
	降低率%	0.00	0.00	0.00	0.00
BD101-69	致死率%	94.55	95.66	97.66	98.67
	致死率的 降低率%	$\pm 0.03$	$\pm 0.09$	$\pm 0.06$	$\pm 0.04$
	降低率%	3.00	2.32	0.75	0.67
BD101-30	致死率%	93.28	95.46	97.47	98.60
	致死率的 降低率%	$\pm 0.07$	$\pm 0.04$	$\pm 0.04$	$\pm 0.03$
	降低率%	4.30	2.52	0.95	0.75

注:本试验进行 2 次,表中所列为一次试验结果,每组试验都是 5 个样品均值。经 *t* 检验, $p<0.01$ ,差异极显著。*F* 值方差分析,处理间差异亦极其显著。

抗性水平和 Cu-MT 含量增加而提高。  
**2.2.4 消除 OH $^{\cdot}$  自由基能力:**超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub> $^{\cdot-}$ )、羟基自由基(OH $^{\cdot}$ )和脂自由基(ROO $^{\cdot}$ )是三种不断产生的有代表性的自由基,其中 $\cdot$ OH 自由基的作用最强。炎症、衰老、肿瘤、辐射损伤和遗传性疾病等发生均与 $\cdot$ OH 自由基增加密切相关。表 4 表明酵母菌 MT 与哺乳动物 MT 一样,也具有较强消除 OH $^{\cdot}$  自由

表4 MT产生菌消除OH自由基能力比较

菌株 (Cu <sup>2+</sup> 诱导浓度)	Cu-MT 含量	消除 $\cdot$ OH能力	
		$\Delta A_{550nm}/mg$ 蛋白	比值
BD101-25 <sup>a</sup> (1m mol/L Cu <sup>2+</sup> )	20.00	0.219 $\pm$ 0.012	a/a=1.00
BD101-69 <sup>b</sup> (15m mol/L Cu <sup>2+</sup> )	22.19	1.257 $\pm$ 0.003	b/a=5.70
BD101-30 <sup>c</sup> (20m mol/L Cu <sup>2+</sup> )	23.50	0.990 $\pm$ 0.007	c/a=4.52

注:本试验进行 2 次,表 4 所列为一次试验结果。每组试验都是 10 个样品均值。经 *t* 检验, $p<0.01$ ,差异极显著。*F* 值方差分析,处理间差异亦极其显著。

基的能力。Cu<sup>2+</sup> 抗性高的突变株消除 OH $^{\cdot}$  自由基能力明显高于出发菌株,在最适诱导剂量下相差约 5 倍。

综上所述,突变株与出发菌株相比有明显的差异。经过摇瓶和 5L 发酵罐试验进一步证实除了对 Cu<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 的耐受性和 MT 含量外,我们选育的突变株在重金属解毒、拮抗 UV 和 $\gamma$ -射线、消除 $\cdot$ OH 自由基能力等 MT 多方面生物学活性均比出发菌株更为优良。

据文献报道<sup>[10]</sup>,酵母菌对 Cu<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup> 抗性水平、Cu-MT 表达量增高除受控于 cup1 基因座串联放大外,含 cup1 基因座的染色体 VIII 二倍体化或非整倍体化,酵母菌 MT 基因启动子元件中插入 UAS(上游激活序列)序列或酵母菌染色体 VII 长臂着丝粒远端 9 分摩附近的 MT 转录调节基因 ace1 基因(或称 cup2 基因)拷贝数增加,均会使酵母菌 Cu-MT 含量增加,对 Cu<sup>2+</sup> 呈现超抗性。我们选育的突变株是受单基因调控还是多基因控制,其机制尚待进一步试验。

## 参 考 文 献

- [1] 林稚兰, 常立梅. 生物工程进展, 1996, 16(3): 33~43.
- [2] Weser U, Hartmann H J, Gartner A. Ger. Offen, 1986, DE 3433076 (A1).
- [3] 林稚兰, 常立梅. 微生物学报, 1998, 38(4): 289~294.
- [4] 林稚兰, 郝富英, 王龙等. 菌物系统, 1997, 4: 291~296.
- [5] David L E, Cheriam M G. Methods in Enzymology, 1991, 205: 83~88.
- [6] Fellous A, Lennon A M, Francon J *et al.* Eur. J Biochem, 1979, 101: 365~375.
- [7] 北京大学生物系生物化学教研室.《生物化学实验指导》. 北京: 高等教育出版社, 1979, 71~72.
- [8] 陈新杰, 高卜渝, 史文格等. 遗传学报, 1992, 19(3): 284~288.
- [9] Fogel S, Welch J W. Proc Natl Acad Sci, 1982, 79: 5342~5346.
- [10] Butt T R, Ecker D J. Microbial Review, 1987, 51(3): 351~364.