

正交法优化嗜酸氧化亚铁硫杆菌冷冻干燥保护剂^{*}张燕飞 何 环 师舜阳 万民熙 杨 宇^{*}

(中南大学资源加工与生物工程学院 长沙 410083)

摘要: 利用正交实验方法,以甘油、海藻糖、蔗糖和牛血清蛋白为因素,对嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. ferrooxidans*) 冷冻干燥保护剂的最优化配比进行了研究。直观分析、因素指标分析和方差分析的结果表明:由甘油、海藻糖、蔗糖和牛血清蛋白组成的冷冻干燥保护剂中,对存活率影响的主次顺序依次为:甘油>海藻糖>牛血清蛋白>蔗糖。保护剂的最优化组合为甘油 5%、海藻糖 15%、蔗糖 18%、牛血清蛋白 10%。经过验证,该组合的保护剂可使冷冻干燥嗜酸氧化亚铁硫杆菌的存活率达到 94%。

关键词: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌; 冷冻干燥; 保护剂; 正交实验; 保藏

中图分类号: Q93- 33 **文献标识码:** A

Freeze- drying Cryoprotectant Optimized by Orthogonal Experiment for *Acidithiobacillus ferrooxidans*

ZHANG Yan- fei, HE Huan, SHI Wu- yang, WAN Min- xi, YANG Yu^{*}

(School of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, 410083, China)

ABSTRACT: The optimized freeze- drying cryoprotectant of *Acidithiobacillus ferrooxidans* was studied by orthogonal experiment, in which glycerol, trehalose, sucrose and bovine serum albumin (BSA) were regarded as factors. The results of Direct- viewing analysis, the factor index analysis and variance analysis indicated that in freeze- drying cryoprotectant, which is composed of glycerol, trehalose, sucrose and BSA, the gradation of influencing survival rate is in tum as follows: glycerol > trehalose > sucrose > BSA. The optimized combination of freeze- drying cryoprotectant consists of 5% (w/v) glycerol, 15% trehalose, 18% sucrose and 10% BSA. , in which, the survival rate of *Acidithiobacillus ferrooxidans* could reach 94% .

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; Freeze- dry; Cryoprotectant; Preserve; Orthogonal experiment

嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*, 简称 *A. ferrooxidans* 菌, 以前被称作氧化亚铁硫杆菌)^[1]嗜酸好氧, 是一种化能自养的革兰氏阴性菌, 以亚铁(Fe^{2+})、元素硫(S^0)或金属硫化矿(S^{2-})作为能量来源, 以空气中的 CO_2 为碳源, 并吸收氮、磷等无机营养物质合成菌体细胞^[2]。在多种金属硫化矿的生物冶金研究中, *A. f* 菌被公认为是主要的浸矿菌种之一^[3, 4], 国内外研究机构一直在开展对该菌的研究和选育工作^[5]。然而, 获得具有优良性状的菌株之后, 进行对菌种资源的保藏工作是必不可少的。众多研究表明: 频繁传代保藏会使微生物发生突变, 活性降低, 出现退化现象^[6]。目前, 在嗜酸氧化亚铁硫杆菌保藏方面, 周吉奎等人^[7]探索了干燥保存对氧化亚铁硫杆菌氧化活性的影响, David Cleland 等人^[6]研究了 Glycine betaine 作为冷冻保护剂, 对原核生物冷冻保藏的影响。

冷冻干燥^[9]对许多类别微生物的保藏是一种极佳的方法, 保藏期可达 10 年以上。美国典型菌种保藏中心(ATCC)有 95% 以上的菌株用此法保存。为了提高微生物真空冷冻干燥后细胞的成活率及稳定性, 常在冷冻时加入各种保护剂在冷冻干燥过程中保护活细胞^[10- 11]。本文利用正交试验设计的

方法, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表, 以嗜酸氧化亚铁硫杆菌 CMS 菌株为试验对象, 优化了冷冻干燥保藏嗜酸氧化亚铁硫杆菌的保护剂的配方。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*A. ferrooxidans*) CMS 菌株 (genbank DQ062118), 分离自江西九江城门山铜矿。

1.1.2 培养基: 9K 培养基^[12]: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0g, KCl 0.1g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 44.5g, H_2O 1000mL, pH2.0。

1.1.3 保护剂: 甘油(购自 BBI)、海藻糖(购自 SIGMA)、蔗糖(购自 SIGMA)、牛血清蛋白(购自 BBI)。

1.2 实验方法

1.2.1 正交实验设计: 因素与水平选择如表 1, 以存活率作为指标。由于各个因素间互相影响很小, 所以选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交实验。

1.2.2 菌种的培养与收集: 将 *A. ferrooxidans* 菌 CMS 菌株培养至对数生长期, 过滤去除黄钾铁矾, 10000rpm 离心 20min 收

^{*} 基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(NO. 2004CB619201), 国家自然科学基金创新研究群体项目(NO. 50321402)

作者简介: 张燕飞(1981-), 男, 汉族, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学与生物冶金

^{*} 论文联系人: 杨宇, 副教授, 电话: 13574842681; E- mail: zhangyanfei@ 126. com

(收稿日期: 2006- 04- 13 接受日期: 2006- 04- 30)

集菌体,用稀硫酸(pH2.0)清洗菌体 2 次。10000rpm 离心 5min 后弃上清,将沉淀菌泥用无菌水重悬,用血球计数板计数后每分装到 1.5mL 离心管(每支 0.5mL) ,10000mp 离心 5min, 弃上清,菌泥用 0. 5mL 保护剂悬浮,转移至已灭菌的安瓿管。

表 1 因素水平表

Table 1 The factors and levels selected

水平	因素			
	A 甘油	B 海藻糖	C 蔗糖	D 牛血清蛋白
1	5%	10%	6%	5%
2	10%	15%	12%	10%
3	15%	20%	18%	15%

表 2 正交设计数据及结果

Table 2 the original values and experimental result of orthogonal experiment

实验号	A 甘油	B 海藻糖	C 蔗糖	D 牛血清蛋白	指标一 存活率(%)
实验 1	5%	10%	6%	5%	56
实验 2	5%	15%	12%	10%	73
实验 3	5%	20%	18%	15%	49
实验 4	10%	10%	12%	15%	26
实验 5	10%	15%	18%	5%	47
实验 6	10%	20%	6%	10%	31
实验 7	15%	10%	18%	10%	47
实验 8	15%	15%	6%	15%	41
实验 9	15%	20%	12%	5%	30
空白	0	0	0	0	2
均值 K1	59. 333	43. 000	42. 667	44. 333	T= 399
均值 K2	34. 667	53. 667	43. 000	50. 333	
均值 K3	39. 333	36. 667	47. 667	38. 667	
极差 R	24. 666	17. 000	5. 000	11. 666	

2.1 直观分析

从表 2 的试验结果可以直接看出: 甘油 5%、海藻糖 15%、蔗糖 18%、牛血清蛋白 10%(即 A₁B₂C₃D₂) 为最佳保护剂组合。

2.2 因素指标分析

2.2.1 因素指标图

甘油、海藻糖、蔗糖、牛血清蛋白四种因素在不同水平层面对 A. f 菌冷冻干燥后的指标(存活率) 有着不同的影响(图 1)。

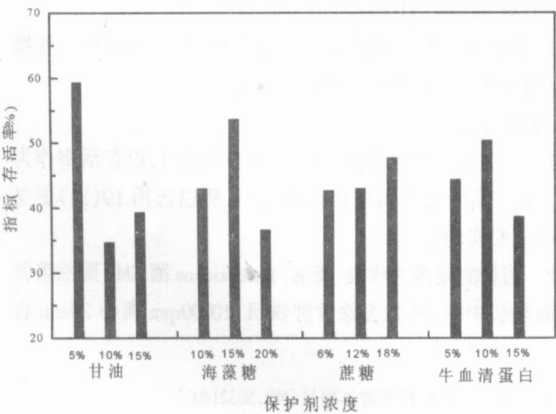


图 1 因素与指标关系趋势图

Figure 1 Trendline of relationship between factors and responses

1.2.3 预冻和冷冻干燥: 将装有菌液的安瓿管, 先在 4℃ 平衡 30min, 再放置于- 20℃ 预冻 2h。然后用真空冷冻干燥机冷冻干燥 24 小时。真空封口后置 4℃ 保藏。

1.2.4 存活率的测定: 置 4℃ 保藏 48 小时后, 用 1mL 灭菌 9K 基本盐(pH2.0) 将冻干菌重悬, 室温放置 2h, 用血球计数板计数, 存活率(%)= 冻干后活菌数/ 冻干前活菌数× 100%。

2 结果与分析

从表 1 和图 1 可以看出: (1) 甘油为 10% 时, CMS 菌株存活率低于甘油为 5% 和 15% 时, 而且甘油为 5% 时指标值最大, 达到 59. 333。(2) 海藻糖 10%、15% 和 20% 三个水平中 15% 最合适。(3) CMS 的存活率随保护剂中蔗糖的含量的提高而提高, 18% 为最佳。(4) 牛血清蛋白含量为 10% 时为最佳, 此时菌株的存活率高于其他水平的存活率。

2.2.2 四种因素对存活率影响的主次顺序

极差 R 是同一列三个水平的最大值与最小值之差, 极差大的意味着该因素对测定指标的影响大, 通常是主要影响因素; 极差小, 则意味着该因素的影响程度小, 是次要影响因素。依据表 2 中极差的大小, 四种因素对存活率影响的主次顺序依次为: 甘油> 海藻糖> 牛血清蛋白> 蔗糖。

2.3 方差分析

由于实验所设计的正交表各列均饱和, 且因素蔗糖的极差和偏差平方和明显偏小, 所以选用蔗糖的偏差平方和作为误差平方和, 蔗糖偏差平方和对应的自由度作为误差平方和的自由度。

表 3 冻干保护剂方差分析表
Table 3 The results of variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F	F _{0.10}	F _{0.05}	显著性
甘油	1030.222	2	515.111	21.972	9	19	* *
海藻糖	442.889	2	221.4445	9.445	9	19	*
蔗糖	46.889	2	23.4445	1.000	9	19	NS
牛血清蛋白	204.222	2	102.111	4.355	9	19	NS
误差	46.89	2	515.11				

$F_{0.10} < F < F_{0.05}$ 时, 对应因素为显著因素, 记为*
 $F < F_{0.10}$ 时, 对应因素为非显著因素, 记为 NS
 $F > F_{0.05}$ 时, 对应因素为高度显著因素, 记为* *
* When $F_{0.10} < F < F_{0.05}$, correspondence factor is a significant one.
NSWhen $F < F_{0.10}$, correspondence factor isn't a significant one.
* * When $F > F_{0.05}$, correspondence factor is a highly significant one.

方差分析结果显示, 甘油对菌株 CMS 冷冻干燥存活率的影响高度显著; 海藻糖对菌株 CMS 冷冻干燥存活率的影响显著; 蔗糖和牛血清蛋白对菌株 CMS 冷冻干燥存活率的影响不显著。

2.4 最优化结果的验证

对经优化得出的冷冻干燥保护剂的最佳配比进行验证, 计算存活率, 从表4 结果可知:

表 4 冷冻干燥保护剂的效果验证
Table 4 Validation of the optimization of Freeze-drying Cryoprotectants

保护剂	冷冻干燥前菌浓度(个/mL)	冷冻干燥后菌浓度(个/mL)	存活率(%)
A ₁ B ₂ C ₃ D ₂	1.2 × 10 ⁹	1.13 × 10 ⁹	94%
不加保护剂	1.2 × 10 ⁹	2.4 × 10 ⁷	2%

以 A₁B₂C₃D₂(即甘油 5%、海藻糖 15%、蔗糖 18%、牛血清蛋白 10%) 为嗜酸氧化亚铁硫杆菌冷冻干燥保护剂, 进行冷冻干燥保藏, 其存活率可达 94%。

3 讨论

嗜酸氧化亚铁硫杆菌作为一种极端环境微生物, 具有独特的生理结构, 对低 pH、低营养的环境已经非常适应, 这使得常规的冷冻干燥效果不好, 选用合适的保护剂可以使得冷冻干燥后存活率得到极大的提高^[13-14]。冷冻干燥常用的保护剂有脱脂乳、海藻糖、葡聚糖、蔗糖和牛血清蛋白^[15]。但是, 它们之中没有一种可以广泛适用于任何微生物的冷冻干燥的保护剂, 通常都是根据不同冻干对象, 选择不同的配比组合。

正交试验设计方法可以高效、全面、低工作量地考察多个因素的不同水平对指标的影响, 通过极少的试验次数得出最佳的水平组合^[16]。并确定四种因素对存活率影响的主次顺序, 优化了冷冻干燥保藏嗜酸氧化亚铁硫杆菌的保护剂的配方。通过验证实验, 嗜酸氧化亚铁硫杆菌 CMS 冷冻干燥后的存活率达 94%, 相比未加保护剂直接冷冻干燥的对照的存活率(2%) 高了 47 倍。

冷冻干燥现将高浓度的微生物细胞迅速冷冻至 -20℃, 再用真空泵减压升华冷冻悬浮液中的水分。保护剂可改变细胞冷冻干燥时的物理、化学环境, 减轻或免除在冷冻初期因形成冰晶而造成的损害, 提高存活率^[14]。不同保护剂(因素)对嗜酸氧化亚铁硫杆菌冷冻干燥后的存活率影响不同, 因素指标分析、极差分析和方差分析均表明其主次顺序依次为: 甘油 > 海藻糖 > 牛血清蛋白 > 蔗糖。甘油作为低温保藏常用保护

剂^[9, 11, 15, 13], 在嗜酸氧化亚铁硫杆菌冷冻干燥保护剂中的含量显著影响其存活率, 当含量为 5% 时, 效果最好。David Cleland 等人报道用蔗糖/牛血清蛋白作为冻干保护剂对嗜酸氧化亚铁硫杆菌冷冻干燥后的存活率达 81%^[8], 而我们用最优化结果 A₁B₂C₃D₂(即甘油 5%、海藻糖 15%、蔗糖 18%、牛血清蛋白 10%) 为嗜酸氧化亚铁硫杆菌冷冻干燥保护剂, 进行冷冻干燥保藏, 其存活率可达 94%。

据 Anchordoguy TJ 等人的研究^[15, 17-19] 表明, 海藻糖非常适合作为保护剂, 并能达到理想的保护效果。本试验也表明当海藻糖含量为 15% 时有较高的存活率, 而太多(10%) 或太少(20%) 均使得存活率降低。

4 结论

通过正交试验, 冷冻干燥嗜酸氧化亚铁硫杆菌的保护剂的最优化组合为甘油 5%、海藻糖 15%、蔗糖 18%、牛血清蛋白 10%。经过验证, 该组合的保护剂可使冷冻干燥嗜酸氧化亚铁硫杆菌的存活率达到 94%。

参考文献

[1] Kelly Donovan P and Wood Ann P. Reclassification of some species of Thiobacillus to the newly designated genera Acidithiobacillus gen. nov., Halothiobacillus gen. nov. and Thermithiobacillus gen. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 511- 516
[2] Kenneth L Temple, Arthur R Colmer. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium Thiobacillus ferrooxidans[J]. Journal of Bacteriology, 1951, 61: 605- 611
(下转第 10 页)

前列腺癌细胞株中, 外源性的 PGE2 可使 COX-2 抑制剂 NS2398 引起的 VEGF 表达的下调发生逆转^[8]。COX-2 的催化产物 PGE2 可以通过依赖 PGE2 的途径诱导 MMP-2 和 MMP-9 生成^[9]。Callejas NA 等^[10]也发现在肝细胞中 COX-2 上调 MMP-2、MMP-9 表达, COX-2 在诱导肝细胞分泌有活性的 MMPs 中发挥了重要作用。大量的 MMP-9 的分解基底膜和细胞外基质, 有利于成纤维细胞及内皮细胞等迁移并在其中生长, 促进形成新生血管。因此, 可以推断 COX-2 不仅通过促进 MMP-9 合成增加以降解细胞外基质和基底膜, 促进肿瘤的侵袭和转移, 还可以直接促进肿瘤组织中新生血管的形成, 增强了肿瘤的侵袭能力和转移能力。本试验利用免疫组化法在蛋白水平检测 PESV 对 COX-2 和 MMP-9 在前列腺癌细胞中的表达影响, 结果发现, 与对照组相比, COX-2、MMP-9 表达均下调, 且差异有统计学意义($P < 0.05$); 进一步用 RT-PCR 法在 mRNA 水平检测 PESV 对 MMP-9 在前列腺癌细胞中表达影响, 结果亦发现其表达下调, 与对照组比较, 其差异有统计学意义($P < 0.05$)。本研究结果充分证实了 PESV 不仅可以直接抑制 COX-2 的表达, 还可以间接抑制 MMP-9 的表达, 具有抑制肿瘤侵袭、转移和抗血管生成的双重作用。因此, 可以预见具有 COX-2 抑制剂样作用的蝎毒多肽提取物 (PESV) 在抗肿瘤转移的治疗中, 将具有良好的应用前景。

参考文献

[1] Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer Statistics, 2004[J]. CA Cancer J Clin., 2004, 54(1): 8-29

[2] 张维东, 崔亚洲, 姚成芳, 等. 蝎毒多肽提取物抗肿瘤血管生成作用

用的实验研究报, 2005, 21(6): 708-711

[3] 张维东, 崔亚洲, 武利存, 等. 蝎毒多肽提取物的抗血管生成作用[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(3): 343-346

[4] 张维东, 崔亚洲, 贾青, 等. 蝎毒多肽提取物对小鼠 S180 肉瘤和 H22 肝癌血管生成抑制作用的实验研究[J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(2): 152-155

[5] Basset P, Bellocq JP, Wolf C, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. Nature[J], 1990, 348(6303): 699-704

[6] Shekhar MP, WerdeJJ, Santner SJ, et al. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implication for tumor development and progression[J]. Cancer Res. 2001, 61(4): 1320-1326

[7] Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis[J]. Biochim. Biophys. Acta., 2000, 1470(2): M69-78

[8] Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell lines[J]. Clin. Exp. Metastasis, 1999, 17(8): 687-694

[9] Cipolletti F, Prontera C, Pini B, et al. Overexpression of Functionally Coupled Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E Synthase in Symptomatic Atherosclerotic Plaques as a Basis of Prostaglandin E2-Dependent Plaque Instability[J]. Circulation, 2001, 104(8): 921-927

[10] Callejas NA, Casado M, Diaz-Guerra MJ, et al. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes[J]. Hepatology, 2001, 33(4): 860-867

(图 A-图 F 请见封3)

(上接第7页)

[3] Nemati M, Harrison S T L, Hansford G S, et al. Biological oxidation of ferrous sulphate by Thiobacillus ferrooxidans: a review on the kinetic aspects[J]. Biochemical Engineering Journal, 1998(1): 171-190

[4] 柳建设, 张艳华. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长动力学方程的应用. 现代生物医学进展, 2006, 6(2): 5-8

[5] 谢建平, 刘新星, 刘文斌, 等. Acidithiobacillus ferrooxidans 中磁小体的提取. 生物磁学, 2005, 5(3): 7-10

[6] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科学出版社, 2003

[7] 周吉奎, 邱冠周, 钮因健, 等. 干燥保存对氧化亚铁硫杆菌(Fe^{2+})氧化活性的影响[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2004, 35(1): 39-42

[8] Cleland David, Krader Paul, McCree Coral et al. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 58: 31-38

[9] 李华, 骆艳娥, 刘延琳. 真空冷冻干燥微生物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29(3): 78-82

[10] Nowshari MA, Bren G. Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of expanded mouse blastocysts frozen by a simple rapid-freezing procedure[J]. Theriogenology, 1998, 50(7): 1001-13

[11] Simone, F. P., Brown, E. M. (Eds.), 1991. ATCC Preservation

Methods: Freezing and Freeze-Drying[J]. American Type Culture Collection, Rockville, MD, 7-13

[12] 张在海. 铜硫化矿细菌浸出高效菌种选育及浸出机理[D]. 长沙: 中南大学, 2002

[13] Mills CK, Gherna RL. Cryopreservation studies of Campylobacter[J]. Cryobiology, 1988, 25: 148-152

[14] 李钟庆. 微生物菌种保藏[M]. 北京: 科学技术出版社, 1989

[15] Hubalek, Z., 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms[J]. Cryobiology 46, 205-229

[16] 何少华, 文竹青, 姜涛. 实验设计与数据处理[M]. 长沙: 国防科技大学出版社, 2002

[17] Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing[J]. Cryobiology. 1987 Aug, 24(4): 324-31

[18] Charles L. Guy, Joan L. A. Huber, and Steven C. Huber. Sucrose Phosphate Synthase and Sucrose Accumulation at Low Temperature[J]. Plant Physiol. 1992 September, 100(1): 502-508

[19] S. H. Loomis, J. F. Carpenter, T. J. Anchordoguy, John H. Crowe, B. R. Brandhini. Cryoprotective capacity of end products of anaerobic metabolism[J]. Journal of Experimental Zoology Volume, 1989, 252(1): 9-15