

运用均匀设计法优化超声波破碎根结线虫天敌真菌-1 细胞的条件研究

马爱瑛, 张靠稳, 刘 嵩

(北方民族大学 生命科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 运用均匀设计法对超声波破碎根结线虫天敌真菌-1 (destroying fungi of root-knot nematode 以下简称 DFRKN-1) 细胞提取碱性磷酸酶的条件进行优化, 摸索出了超声波破碎条件为: 超声功率 100 W, 菌液浓度 30%, 超声时间 2 s, 间歇时间 7 s, 总时间 35 min 时, 得到细胞破碎混合物中蛋白浓度最高, 蛋白浓度从 0.7306 g/mL 提高到了 2.6269 g/mL, 比优化前提高了 3.6 倍; 超声功率 100 W, 菌液浓度 30%, 超声时间 6.5 s, 间歇时间 7 s, 总时间为 10 min 时, 得到细胞破碎混合物中碱性磷酸酶活力最高, 从 458 U/mL 提高到 1 725 U/mL, 比优化前提高了 3.8 倍。

关键词: DFRKN-1; 均匀设计; 碱性磷酸酶; 超声波法; 细胞破碎

中图分类号: Q 949.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)03-0045-03

根结线虫是一种定居型内寄生线虫, 侵染植物根系产生根结, 具有分布广泛, 危害性大等特点。作物根结线虫病的防治比较困难, 轮作和使用非寄生植物或抗病植物是目前控制这些线虫最主要的方法。但大多数根结线虫种类具有广泛的寄生范围, 利用作物轮作控制根结线虫病害具有一定的局限性, 使用化学杀虫剂又会产生环境污染。因此越来越多的人开始认识到生物防治的重要性。张靠稳从宁夏温室黄瓜根结线虫上分离得到一株天敌真菌-1, 简称 DFRKN-1, 此分离物对根结线虫有一定的致病作用, 该菌能够从根结线虫的卵、二龄幼虫和成虫体表直接侵入。该课题在前期研究的基础上, 进一步对 DFRKN-1 细胞的破碎方法进行研究, 采用均匀设计法对超声波破碎此细胞提取碱性磷酸酶的条件进行优化, 为该菌的生理生化特性研究及开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

DFRKN-1, 由课题组实验室提供。

1.2 试剂

第一作者简介: 马爱瑛(1978), 女, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学方向的研究。E-mail: pureasa@163.com。

通讯作者: 张靠稳(1962), 男, 陕西兴平人, 本科, 副教授, 现从事温室蔬菜病害方面研究及植物生理学本科教学工作。E-mail: zkw620821@yahoo.com.cn。

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目(NZ0739); 宁夏教育厅高校科研资助项目(2006JY019)。

收稿日期: 2008-10-21

玉米粉购于超市, PNPP 为北京拜尔迪生物公司产品, Tris-HCl, NaCl, 正丁醇均为国产分析纯。

1.3 仪器

HUP-400A 超声波破碎仪为天津恒奥科技有限公司制造; Sigma 3k-30 低温高速离心机购自德国 Sigma 公司; HH-4 数显恒温水浴锅国华电器有限公司生产; UV-754N 紫外可见光光度计上海精密科学仪器有限公司产品; DELTA-320 酸度计购自梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.4 均匀设计优化超声波破碎细胞的条件

影响超声波破碎效果的因素及水平如表 1 所示。

表 1 影响超声波破碎效果的因素及水平

Table 1	Factors and levels ultrasonic cell-break					
	1	2	3	4	5	6
X1 功率 Supersonic power/ W	100	150	200	250	300	350
X2 浓度 Consistency/ %	5	10	15	20	25	30
X3 超声时间 Supersonic time/s	2	3	4	5	6	7
X4 间歇时间 Intermittence time/ s	2	3	4	5	6	7
X5 总时间 Total time/ min	10	15	20	25	30	35

根据东北制药总厂研究院张承恩编制的均匀设计软件包(WUST)得到 U12(65)均匀设计表, 将表 2 的条件代入安排出 12 组试验。

1.5 优化分析

用均匀设计软件包(WUST)建立多元回归方程, 进行方差分析, 求得优化条件。

1.6 验证

按照均匀设计软件包(WUST)分析试验数据所得到的优化条件进行超声波破碎, 8 000 r/min, 4℃, 离心 5 min, 取上清液测蛋白质浓度和碱性磷酸酶活力。

1.7 蛋白质浓度和碱性磷酸酶活力的测定

1.7.1 蛋白质浓度的测定^[1] 采用紫外分光光度计通过比色来测定蛋白质的含量。

1.7.2 碱性磷酸酶酶活力的测定 参照文献^[2]操作,略

有改动。

2 结果与分析

2.1 均匀设计法优化超声波破碎结果

表2 超声波破碎的均匀设计方案及试验结果

Table2 Uniform design of ultrasonic cell—break and its results

试验号 No.	功率 Supersonic power/ W	浓度 Consist- ency/ %	超声时间 Supersonic time/ s	间歇时间 Intermittence time/ s	总时 Total time/ min	蛋白质浓 Consisten- cy of protein/ mg * mL ⁻¹	酶活力 Enzyme activity/ U * mL ⁻¹
1	250	20	2	3	35	2.0254	295
2	200	30	3	4	25	1.7381	255
3	150	25	6	5	35	2.627	1570
4	300	30	5	6	10	1.7302	1195
5	350	15	4	6	30	0.9825	10
6	250	10	7	7	25	0.4794	163
7	300	5	3	5	15	0.2667	147
8	100	5	5	3	30	0.1529	197
9	350	25	6	2	20	1.3571	141
10	150	15	7	4	15	1.1201	223
11	200	10	4	2	10	0.7307	97
12	100	20	2	7	20	1.4212	201

在冰浴条件下进行超声波破碎,经3次12组试验所测定的各组蛋白质浓度和酶活力的平均数据如表2所示。

2.2 设计包(WUTS)分析结果^[3]

利用均匀软件设计包(WUTS)对表2分析结果如下。

2.2.1 蛋白质浓度分析 Y1 值含量的回归方程:经回归方程分析得出,超声波破碎细胞的过程中,影响蛋白质浓度的主要因素是菌液浓度和总时间,其次是功率,间歇时间的影响最小;Y1 值方差分析,通过对回归方程

进行方差分析,得出决定系数 $Ra^2 = 0.928747425302491$,标准差 $S = 2.2472E-01$,证明该方程建立在误差范围之内,方程可信。

2.2.2 酶活力分析 Y2 值含量的回归方程:经回归方程分析得出,超声波破碎细胞的过程中,影响酶活力的主要因素是功率和菌液浓度,其次是超声时间,间歇时间的影响最小;Y2 值方差分析:通过对回归方程进行方差分析,得出决定系数 $Ra^2 = 0.71928319559159398$,剩余标准差 $S = 2.7653E+02$,证明该方程建立在误差范围之内,方程可信。

表3 蛋白浓度优化结果

Table 3 Results of the optimization to the consistency of protein

序号 No.	变量名称 Factors	最小值 Minimum	最大值 Maximum	初始值 Initial value	优化值 Optimization value
X1	功率 Supersonic power/ W	100	350	225	100
X2	浓度 Consistency/ %	5	30	17.5	30
X3	超声时间 Supersonic time/ s	2	7	4.5	2
X4	间歇时间 Intermittence time/ s	2	7	4.5	7
X5	总时间 Total time/ min	10	35	22.5	35
MY1	蛋白质浓度 Consistency of protein/ mg * mL ⁻¹	0.153	2.627	0.967	3.426

表4 碱性磷酸酶酶活力优化结果

Table4 Results of the optimization to the alkalinity phosphatase enzyme activity

序号 No.	变量名称 Factors	最小值 Minimum	最大值 Maximum	初始值 Initial value	优化值 Optimization value
X1	功率 Supersonic power/ W	100	350	225	100
X2	浓度 Consistency/ %	5	30	17.5	30
X3	超声时间 Supersonic time/ s	2	7	4.5	6.5
X4	间歇时间 Intermittence time/ s	2	7	4.5	7
X5	总时间 Total time/ min	10	35	22.5	10
MY2	酶活力 Enzyme activity/ U * mL ⁻¹	10	1570	604.225	2048.447

2.2.3 优化结果 通过计算机软件对数据的优化分析,最佳优化破碎条件如表3.4。对于蛋白质浓度来说,优化条件为,功率100W,浓度30%,超声时间2s,间歇时

间7s,总时间35min,且蛋白质浓度的期望值可高达3.426mg/mL。对于酶活力来说,优化条件为:功率100W,浓度30%,超声时间6.5s,间歇时间7s,总时间

10 min, 且酶活力的期望值可高达 2 048.447 U/mL。

2.3 验证结果

按均匀软件设计包(WUTS)所得到的优化条件对细胞进行破碎, 验证结果表明, 初始条件下蛋白质浓度仅为 0.7306 mg/mL, 优化后蛋白质浓度达 2.087 mg/mL; 初始条件下碱性磷酸酶活力仅为 458 U/mL, 优化后碱性磷酸酶活力可达 1 725 U/mL。均匀设计优化后, 蛋白浓度比优化前提高 2.86 倍; 碱性磷酸酶活力比优化前提高 3.8 倍。

3 讨论

超声波法破碎细胞受到以下相关因素的影响: 超声功率、菌液浓度、工作时间、间歇时间、总时间。超声功率越高, 超声频率越高, 产生的局部瞬间压力就越大, 细胞破碎程度也就越高; 在一定范围内, 菌液浓度高, 细胞破碎混合物中所含的蛋白质和酶就越多; 工作时间、间歇时间、总时间这三个因素都是影响超声“空化效应”产生的冲击波对细胞的冲击次数的, 冲击次数越多, 细胞受到的压力就越大, 细胞破碎程度就越高, 细胞破碎混合物中所含的蛋白质和酶也就越多。

在进行均匀设计之前, 应该确定影响表达因素水平的取值范围, 再将水平范围进行均分, 确定想要进行的试验数。试验次数是水平数的 2~3 倍。之后根据因素和水平的个数和试验次数, 通过均匀设计软件包(WUST)建立均匀设计表, 最后根据均匀设计表的坐标, 进行条件定位, 建立试验方案。考虑到试验当中可能会出现随机误差, 为避免这种情况, 重复该 12 组试验 3 次,

一共做 3 批 36 组试验。完成全部试验之后, 将得到的结果输入计算机, 进行数据优化分析。将优化出的结果带入实际试验中检测并验证优化后是否比优化之前蛋白量和酶活力有所提高。

从 DFRKN-1 中提取碱性磷酸酶的过程中, 首先必须先进行细胞破碎, 由于对 DFRKN-1 细胞结构了解有限, 该试验选用了对真菌、植物和动物细胞都普遍适用的超声波细胞破碎法。在提取蛋白类物质时, 不仅要考虑蛋白量的得率, 还要考虑将蛋白活性损失降到最小。在超声操作过程中采用冰浴, 能有效缓解超声过程中产生的热引起的蛋白变性。该试验分别对获得最大蛋白浓度和最大碱性磷酸酶酶活的条件进行了优化, 结果表明, 细胞破碎液中蛋白浓度最大, 即细胞充分破碎时, 获得的碱性磷酸酶酶活并不是最大, 这说明在采用超声波进行细胞破碎时, 尽管采用冰浴等措施, 但是还是有酶活力的损失, 优化的细胞充分破碎条件, 不适用于提取碱性磷酸酶时使用。因此, 在提取 DFRKN-1 的碱性磷酸酶时, 应采用功率 100 W, 浓度 30%, 超声时间 6.5 s, 间歇时间 7 s, 总时间 10 min, 作为超声波破碎细胞的条件。

参考文献

- [1] 陈钧辉. 生物化学实验[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2006: 61-62.
- [2] 洪华生, 戴民汉, 郑孝成. 海水中碱性磷酸酶活力的测定及其在磷的循环中的作用初探[J]. 海洋与湖沼, 1992, 23(4): 415-420.
- [3] 张承恩, 刘江. 均匀设计与统计调优新技术的应用[J]. 中国医药工业杂志, 1994, 25(3): 137-139.

Using Uninform Design to Optimize Ultrasonic Cell-break Conditions of DFRKN-1

MA Ai-ying, ZHANG Kao-wen, LIU Song

(The Life Science and Engineering School of North University for Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: Using the uniform design to optimize ultrasonic cell-break conditions of DFRKN-1 to isolate alkaline phosphatase, and find out the ultrasonic cell-break condition was: When supersonic power 100 W, consistency 30%, supersonic time 2 s, intermittence time 7 s, total time 35 min, obtains the consistency of protein was highest in the cell mixture, the consistency of protein enhanced from 0.7306 g/mL to 2.087 g/mL, compared before the optimization to enhance 2.86 times; When supersonic power 100 W, consistency 30%, supersonic time 6.5 s, intermittence time 7 s, the total time 10 min, obtains the alkalinity phosphatase enzyme activity was highest in the cell mixture, enhances from 458 U/mL to 1 725 U/mL, compared before the optimization to enhance 3.8 times.

Key words: DFRKN-1; Uniform design; Alkaline phosphatase; Ultrasonic; Histiocyte catclase