

双亲灭活制备粘质沙雷氏菌和红曲霉的跨界产色素融合子 *

周 林 朱 爽 潘敏芬 蔡泽加 许尧滨

(广东药学院 生命科学与生物制药学院 广东 广州 510006)

摘要 目的 :采用双亲灭活原生质体技术制备粘质沙雷氏菌和红曲霉的跨界产色素融合子 ,并测定其抑菌活性。方法 :经 0.2%溶菌酶处理获得粘质沙雷氏菌的原生质体并热灭活 ,经混合酶(0.8%溶菌酶 +1.2%蜗牛酶 +1.6%纤维素酶)处理获得红曲霉的原生质体并紫外灭活 ,用含 25% PEG 的原生质体融合剂进行促融合与再生。观察融合子的菌落形态和色素合成能力 ,测定融合子色素提取物对金黄色葡萄球菌的抑制活性。结果 :在优化条件下 ,粘质沙雷氏菌原生质体的形成率为 92.58% ,红曲霉原生质体形成数约为 10⁶ 个 /mL ,两菌原生质体灭活率均为 100%。共获得 13 个融合子 ,9 个能产红色素 ,融合率为 1×10⁻⁵%。其中 8 个融合子的 95%乙醇提取物对金黄色葡萄球菌表现出不同程度的抑制。结论 :采用双亲灭活原生质体技术 ,能够制备具有抑菌活性的粘质沙雷氏菌和红曲霉的跨界产色素融合子。

关键词 跨界原生质体融合 粘质沙雷氏菌 红曲霉 色素

中图分类号 :Q939.9 R915 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)08-1436-04

Preparation of Cross-border Integration of Sub-pigment in Serratia Marcescens and Monascus by Parents Inactivated Protoplast Technology*

ZHOU Lin[△], ZHU Shuang, PAN Min-fen, CAI Ze-jia, XU Yao-bin

(Guangdong Pharmaceutical University, School of Life Science and Biopharmacology, 510006, Guangzhou China)

ABSTRACT Objective: To prepare inter-kingdom pigmented fusant from *Serratia marcescens* and *Monascus* by double parents inactivated protoplasts method and determine the inhibition activity of the pigmented fusants. **Methods:** The protoplast of *Serratia marcescens* was obtained by 0.2% lysozyme treatment and then inactivated by heat treatment, while the protoplast of *Monascus* was obtained by enzyme mixture with 0.8% lysozyme, 1.2% snail enzyme and 1.6% cellulase, then inactivated by ultraviolet treatment. The protoplast fusion of double inactivated parents was carried out using fusion solution with 25% polyethylene glycol. The morphology and pigment produced ability of the fusants were observed, while the inhibition activity of the pigment extractive on *Staphylococcus aureus* was tested. **Results:** Under the optimal conditions, the protoplast formation rate of *Serratia marcescens* and *Monascus* was 92.58% and 106/mL, respectively. The protoplast inactivated rate of both microbes was 100%. Thirteen protoplast fusants was prepared while nine of them can produce pigment with 1 × 10⁻⁵% fusion rate. Pigment extractive with 95% ethanol from eight protoplast fusants showed inhibiton on *Staphylococcus aureus* of varing degree. **Conclusion:** Inter-kingdom protoplast fusants of *Serratia marcescens* and *Monascus* with antimicrobial activity can be prepared by double parents inactivated protoplasts method.

Key Words: inter-kingdom protoplast fusion; *Serratia marcescens*; *Monascus*; pigment

Chinese Library Classification(CLC):Q939.9, R915 **Document code:**A

Article ID:1673-6273(2011)08-1436-04

前言

原生质体融合能将遗传形状不同的细胞经过基因重组融合为一个新的细胞 ,是一种重要的细胞工程技术。原生质体融合在提高菌种的产酶活力^[1,2]、代谢产物的含量^[3,4]、降解污染物的能力^[5,6] ,以及对环境的耐受性^[7,8]等微生物育种方面的应用已有报道。目前 ,原生质体融合在食品、医药领域的应用限于种或属间融合 ,跨界融合的报道很少。我们认为 ,与属种间的融合相比 ,跨界融合更有可能产生结构和功能新颖的分子 ,因而在药物或前体分子产生方面 ,提供了不同于常规的“组合化学合成或高通量筛选”的新的途径。本文尝试应用原生质体融合技术 ,制备具有抑菌活性的跨界产色素融合子。

粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)属于革兰氏阴性细菌 ,能够产生一类具有吡咯环结构的紫红色素 - 灵菌红素 (*Prodigiosin*)。研究表明 ,灵菌红素及其衍生物具有抗细菌^[9]、抗真菌^[10]、抗疟疾^[11]、免疫抑制^[12]和抗肿瘤^[13]等活性。灵菌红素类似物或衍生物正成为药物研究的热点。而红曲霉是一种重要的药用真菌 ,能够产生多种具有抑菌活性的色素 ,也是产生降脂药物 - 诺伐他汀(*Monacolin K*)类化合物的主要来源^[14,15]。本研究尝试将能产生灵菌红素的粘质沙雷氏菌和产生多种色素的红曲霉进行跨界融合 ,为获得新型结构的色素活性物质提供实验基础。粘质沙雷氏菌与红曲霉的跨界融合在国内外未见报道。

1 实验材料

* 基金项目 广东药学院博士启动基金(2006SMK01) ;广东省高等学校大学生创新实验项目(1057310036)

作者简介 :周林(1977-) ,男 ,博士 ,讲师 ,主要从事生物活性物质的发酵和生物转化研究。

△通讯作者 周林 ,电话 :020- 39352151 ,Email: bio_zhoulin@163.com

(收稿日期 :2010- 12- 21 接受日期 :2011- 01- 15)

1.1 菌株

粘质沙雷氏菌菌株 *Serratia marcescens* ZL3, 从焦化废水中分离鉴定并保存^[16]; 红曲霉菌株 *Monascus ruber* 5031, 购自中国工业微生物菌种保藏中心, 广东药学院生科院李浩明教授惠赠。

1.2 试剂

溶菌酶、纤维素酶(上海伯奥生物科技有限公司, 生化试剂); 蜗牛酶(南京百泰生化技术公司, 生化试剂); PD 培养基(自制); 琼脂粉、蛋白胨、酵母提取物(广东环凯微生物科技有限公司, 生化试剂); 其余试剂均为国产分析纯。PBS 缓冲液: 用 0.2 mol/L pH5.8 磷酸缓冲液配制。原生质体稳定液: 含 0.6 mol·L⁻¹ NaCl 的 PBS 缓冲液。原生质体融合剂: 25% PEG, 用 0.05 mol·L⁻¹ CaCl₂ 配制, 另加 0.05 mol·L⁻¹ 甘氨酸。

1.3 培养基

1.3.1 生长培养基

LB 培养基(g·L⁻¹): 蛋白胨 10、酵母提取物 5、NaCl 10, 蒸馏水定容至 1 L。

PD 培养基: 200 g 土豆去皮, 切块, 加水煮沸 30 min, 双层纱布过滤后加入 20 g 葡萄糖, 搅拌溶解, 加水至 1 L。固体培养基中均加入 2% 的琼脂粉, 121℃ 高压灭菌 20 min。

1.3.2 再生培养基

在 LB 培养基或 PD 培养基中加入终浓度为 0.6 mol·L⁻¹ 的 NaCl 获得相应的再生培养基。

1.4 仪器

SHZ-82 气浴恒温振荡器(江苏金坛市宏华仪器厂); H1650-W 台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); HH-1 数显恒温水浴锅(江苏金坛市宏华仪器厂); B104 生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司); SPX 智能型生化培养箱(宁波江南仪器厂); TP-402 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); Ultrospec 1100pro 紫外可见分光光度计(Biochrom 公司生产); HVE-50 高压灭菌锅(华粤行仪器有限公司)等。

2 实验方法

2.1 粘质沙雷氏菌原生质体制备

粘质沙雷氏菌甘油种活化过夜, 按 5% 接种量接入 30 mL LB 培养基, 30℃ 200 r·min⁻¹ 培养 3.5 h。取 10 mL 菌液 4000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 用 PBS 洗涤两遍并重悬于 5 mL PBS 中, 取 100 μL 用无菌水稀释并涂布于 LB 平板(血球计数板计数并调整稀释倍数), 控制菌落数为 10⁸-10⁹ 个/mL, 28℃ 培养 2 d 后记录菌落数, 计算酶解前的总菌数。取 50 μL 菌悬液, 分别加入 0.2% 溶菌酶 2、4、6 μL, 35℃ 水浴 40 min, 4000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液。用含盐 PBS 缓冲液洗涤两遍, 4000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 最后重悬于 1 mL 原生质体稳定液。各取 100 μL 用无菌水梯度稀释并分别涂布于 LB 培养基, 每个平板做 3 个平行, 28℃ 培养 2 d 后记录菌落数, 活菌计数法计算原生质体形成率。原生质体再生率的计算类似以上过程, 不同的是用 100 μL 0.6 mol·L⁻¹ NaCl 替换无菌水稀释并涂布于 LB 再生平板培养基。

原生质体形成率(%)=(酶解前菌数-酶解后剩余菌数)/酶解前菌数×100。

原生质体再生率(%)=(再生平板的菌落数-普通平板的菌落数)/(酶解前菌落数-酶解后菌落数)×100

2.2 红曲霉原生质体制备

红曲霉接种于 PDA 斜面培养基, 32℃ 培养 7 d。用 5 mL 无菌水洗下斜面孢子, 制成孢子悬液, 参考文献^[17]的方法制备红曲霉原生质体, 血球板计数法计算原生质体形成率(个/mL)。调整混合酶液的浓度为 0.8% 溶菌酶+1.2% 蜗牛酶+1.6% 纤维素酶。

2.3 粘质沙雷氏菌原生质体的热灭活

取 1 mL 粘质沙雷氏菌原生质体(浓度约 10⁶ 个/mL)于 60℃ 水浴, 在 20、30、40、50、60 min 各取 100 μL 涂布于 LB 再生培养平板上。30℃ 培养 3 d, 观察菌落数并计算不同处理时间的致死率。原生质体致死率(%)=(灭活前的原生质体再生率-灭活后的原生质体再生率)/灭活前的原生质体再生率×100。

2.4 红曲霉原生质体的紫外灭活

取 1 mL 红曲霉原生质体(浓度为 10⁶ 个/mL)在 20 W 的紫外灯下, 距离 10 cm 照射, 在 2、3、4 min 各取 100 μL 用锡纸包裹避光 20 min 后涂布于 PDA 再生培养平板上。32℃ 培养 3 d, 观察菌落数并计算不同处理时间的致死率。

2.5 原生质体的融合与再生

各取 1 mL 灭活的粘质沙雷氏菌和红曲霉原生质体, 混合后 2000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集原生质体, 加入 1.5 mL 原生质体融合剂, 30℃ 水浴 20 min, 1000 r·min⁻¹ 离心 5 min。弃上层清液, 用 1.0 mol·L⁻¹ 山梨醇溶液洗涤 2 次, 稀释并涂布于 LB 和 PDA 再生培养平板上, 30℃ 培养 4 d, 计算融合率^[18]。

2.6 融合子的筛选与生长特性

观察融合子再生平板, 若再生平板上有菌落长出, 而灭活后未发生融合的原生质体的再生培养平板上未有菌落长出, 表明灭活率达 100%, 则所得到的菌落是粘质沙雷氏菌和红曲霉的跨界融合子。将能产生色素的融合子在 LB 培养基上连续传代 10 次, 观察融合子的菌落形态、细胞形态和色素合成能力。

2.7 融合子色素的提取与对金黄色葡萄球菌的抑制

挑取产色素融合子的菌落到 3 mL LB 液体培养基活化过夜。按 5% 的接种量接入 50 mL LB 培养基, 30℃ 170 r·min⁻¹ 的条件下培养 72 h。5000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收菌, 用蒸馏水洗涤 1-2 次, 湿菌体放到 80℃ 烘箱干燥 24 h, 将菌体研磨成粉末。称取各融合子菌粉 0.4 g, 加入 8 mL 95% 乙醇, 振荡约 10 min 后静置 2 h, 于 8000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 转移上清并用 95% 乙醇稀释, 使各融合子色素提取液的 OD₄₈₅ 值一致(0.300±0.005)。然后以 LB 培养基: 色素提取液=14:1(V/V)的比例倒制各融合子色素提取液的平板, 每个样品做 3 个平行, 空白对照仅含等量 95% 乙醇。

金黄色葡萄球菌在 LB 培养基上 37℃ 活化过夜, 用无菌水稀释 10⁷ 后取 100 μL 涂布到含色素提取液的平板以及空白对照平板。将各平板置于 37℃ 培养箱培养 24 h, 观察菌落生长情况, 计算菌落数量和抑菌率。其中抑菌率(%)=(空白对照皿菌落数-试验皿菌落数)/空白对照皿菌落数×100。

3 结果和讨论

3.1 原生质体的制备

由表 1 可知,粘质沙雷氏菌 ZL3 原生质体形成率随着溶菌酶用量的增加而增加,其中加入 6 μ L 0.2%溶菌酶(酶液终浓度为 0.021%) ,原生质体形成率为 92.58% ,再生率为 26.83%。制备的粘质沙雷氏菌原生质体具有较高的活性。

表 1 溶菌酶的浓度对粘质沙雷氏菌 ZL3 原生质体形成率和再生率的影响(35℃水浴 40min)
Table 1 Effect of the concentration of lysozyme on the protoplast formation and regeneration rate of *Serratia marcescens* ZL3 (water bath at 35℃ for 40min)

concentration of lysozyme (wt%)	formation rate of protoplast(%)	regeneration rate of protoplast(%)
0.007%	67.64%	9.52%
0.014%	80.65%	16.00%
0.021%	92.58%	26.83%

参考文献^[15]方法制备的红曲霉 5031 的原生质体形成数为 10⁵ 个 /mL ,远低于文献中报道的 4.2 $\times$ 10⁸ 个 /mL 的原生质体形成数。这也说明即使相同属的不同菌株 ,其原生质体制备的最优条件也不尽相同。这一方面反映了不同属种微生物细胞壁结构的差异 ,同时反映了实验用酶以及实验操作对实验结果的影响。通过调整混合酶的用量 ,实验条件下红曲霉原生质体形成数达到 10⁶ 个 /mL ,再生率为 5.47%。可以满足原生质体融合的要求。

3.2 原生质体的灭活

双亲灭活原生质体是利用理化因素对双亲原生质体进行

处理 ,使其失去细胞壁的再生能力 ,经过不同处理的原生质体融合后 ,又可恢复细胞壁的再生能力。因此 ,灭活的条件控制对原生质体细胞的再生尤为关键 ,过度灭活将造成原生质体细胞的死亡而导致无法再生。即使在确定的灭活条件下 ,仍然要留样培养以监测实际的灭活效果。

由表 2 可知 ,浓度约 10⁶ 个 /mL 的粘质沙雷氏菌 ZL3 在 60℃水浴下保持 50 min 可以达到 100%的致死率 ,故粘质沙雷氏菌 ZL3 的热灭活时间确定为 50 min。红曲霉 5031 在实验条件下 ,用紫外光处理 3 min 即可以达到 100%的致死率(表 3) ,故红曲霉 5031 的紫外光灭活时间定为 3 min。

表 2 不同热灭活时间下粘质沙雷氏菌 ZL3 的致死率
Table2 Death rate of *Serratia marcescens* ZL3 during different heat inactivation time

Time(min)	20	30	40	50	60
Death rate(%)	99.98%	99.99%	99.99%	100%	100%

表 3 不同紫外灭活时间下红曲霉 5031 的致死率
Table3 Death rate of *Monascus ruber* 5031 during different ultraviolet inactivation time

Time(min)	2	3	4
Death rate(%)	95.83%	100%	100%

3.3 融合子的检出

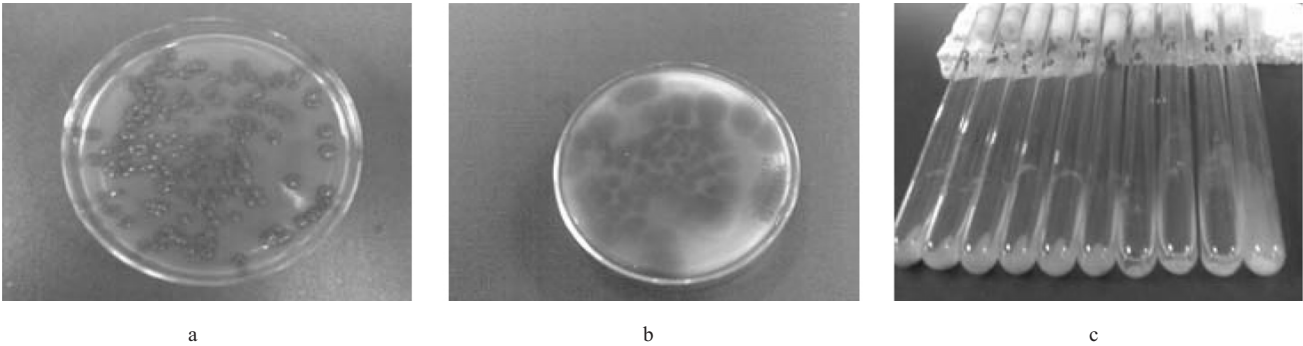
目标融合子的检出是原生质体融合技术的关键。抗性标记选择和营养陷型互补选择等经典方法时间长、工作量大 ,而且在筛选营养陷型或抗性菌株时 ,可能丢失亲本的优良性状。而采用双亲灭活原生质体方法 ,只有融合子才能在再生平板上生长 ,结合目标产物的性状或生物活性 ,就可以较容易的获得目标融合子。在 LB 和 PDA 的再生平板上均有融合子长出 ,共获得 13 个融合子 ,融合率为 1 $\times$ 10⁻⁶%。融合率低的原因可能是两亲本分属不同的界 ,亲缘关系较远 ,融合相对困难。通过优化化学融合的条件 ,如细胞密度、PEG 浓度、Ca²⁺ 浓度等参数 ,或者尝试电融合、磁场融合^[19]、微流控芯片^[20]等手段提高融合率。

3.4 融合子的培养特性

根据 13 个融合子在 LB 固体培养基上的菌落特点 ,可分

为四类 :①1#-9# 融合子 ,能产色素 ,生长 24 h 可观察到菌落 ,呈粉红色 ,圆形、光滑、半湿润、容易挑起。②10# 融合子 ,生长 24 h 可观察到菌落 ,呈灰白色 ,圆形、光滑、半湿润 ,容易挑起。③11#、12# 融合子 ,在融合子中生长最快 ,24 h 能观察到较大的菌落 ,呈白色 ,圆形、光滑、湿润、容易挑起。④13# 融合子 ,生长最慢 ,72 h 能观察到菌落 ,呈米白色 ,3 - 6 d 菌落光滑 ,第 7 d 菌落边缘见绒毛状细丝 ,菌落较干燥 ,不易挑起。1#-9# 能产色素的 9 个融合子在 LB 培养基上连续传 10 代 ,菌落形态无显著差异 ,均能稳定的合成色素。实验中还发现 ,进行液体培养时 ,7#-9# 融合子以及粘质沙雷氏菌色素的产生并不稳定 (图 1-c ,7-10 号试管均呈淡黄色) ,可能是在液态培养条件下 ,色素的合成更容易受到环境条件 ,如溶氧水平、培养时间等的影响 ,具体原因还有待研究。

将试管中的培养液静置 2 h 后进行观察 ,1#-9# 融合子发



a. 粘质沙雷氏菌的 LB 平板 b. 红曲霉的 PDA 平板
c. 融合子和粘质沙雷氏菌的 LB 试管(从左至右依次为 1#—9# 融合子,10 号管为粘质沙雷氏菌)

图 1 粘质沙雷氏菌、红曲霉和融合子的培养形态(28℃培养 90 h)
Figure 1 Culture morphology of *Serratia marcescens*, *Monascus* and protoplast fusant(cultured at 28℃ for 90 h)

生明显的沉降现象，而粘质沙雷氏菌菌液却保持浑浊（图 1-c）。在油镜下进行观察，融合子的细胞呈圆球形，和粘质沙雷氏菌相似，但细胞体积明显比粘质沙雷氏菌大，细胞壁也更厚。

3.5 融合子色素的提取与抑菌活性

将各种色素的乙醇提取液在 200-700 nm 进行紫外和可见光区扫描。融合子色素的最大吸收波长约 485 nm，而粘质沙雷氏菌和红曲霉色素的最大吸收波长分别为 535 nm 和 505 nm，

说明融合子产生的醇溶性色素和双亲产生的醇溶性色素明显不同。另外，我们用 RAPD 分子鉴定的方法也证实了 1#-9# 融合子不同于双亲（结果未呈）。

由表 4 培养 24 h 时，除了 9# 融合子，1#-8# 融合子色素的提取液对金黄色葡萄球菌均表现出一定的抑菌活性。特别是 1 号融合子（命名为跨界融合子 SYM）在实验条件下表现出很高的抑菌活性。

表 4 9 种融合子色素提取物对金黄色葡萄球菌的抑制
Table 4 Inhibition on *Staphylococcus aureus* of pigments extractive from nine protoplast fusant

Fusant	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#
Inhibition rate	100%	40.7%	46.4%	40.0%	34.2%	37.9%	40.7%	58.6%	-12.1%

粘质沙雷氏菌和红曲霉跨界产色素融合子的制备，为筛选具有生物活性的新型色素分子提供了实验依据。但实验条件下双亲的原生质体融合率较低，融合条件仍可以进一步优化以产生尽可能多样的色素分子。融合子的生物学特性、融合子色素的结构和功能还有待研究。

参考文献(References)

[1] El-Bondkly AM, El-Gendy MM. Keratinolytic activity from new recombinant fusant A YA2000, derived from end ophytic *Micromonospora* strains[J]. *Can J Microbiol*, 2010, 56(9): 748-760

[2] Khattab AA, Bazaraa WA. Screening, mutagenesis and protoplast fusion of *Aspergillus niger* for the enhancement of extracellular glucose oxidase production [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, 32(7): 289-294

[3] Wang C, Zhang X, Chen Z, et al. Strain construction for enhanced production of spinosad via intergeneric protoplast fusion [J]. *Can J Microbiol*, 2009, 55(9): 1070-1075

[4] Jin ZH, Xu B, Lin SZ, et al. Enhanced production of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* by genome shuffling [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 159(3): 655-663

[5] Zhang XX, Jia HY, Wu B, et al. Genetic analysis of protoplast fusant Xhhh constructed for pharmaceutical wastewater treatment [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(6): 1910-1914

[6] 赵大勇, 于洪峰, 潘文扬, 等. 金属元素对 Xhhh 菌株表达 MnP 酶及降解污染物的影响[J]. *土壤*, 2006, 39(3): 448-452
Zhao Da-yong, Yu Hong-feng, Pan Wen-Yang, et al. Effects of metals on MnP expression and wastewater degradation efficiency of Xhhh[J]. *Soils*, 2007, 39(3): 448-452(In Chinese)

[7] Winkler J, Rehmann M, Kao KC. Novel *Escherichia coli* hybrids with enhanced butanol tolerance[J]. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(7): 915-920

[8] Hatvani L, Manczinger L, Kredics L, et al. Production of *Trichoderma* strains with pesticide-polyresistance by mutagenesis and protoplast fusion[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 89(3-4): 387-393

[9] Cang S, Sanada M, Johdo O, et al. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol [J]. *Biotech Lett*, 2000, 22(22): 1761-1765

[10] Nakashima T, Kato Y, Yamaguchi K, et al. Evaluation of the anti-trichophyton activity of a prodigiosin analogue produced by γ -proteobacterium, using stratum corneum epidermis of the Yucatan micropig [J]. *J Infect Chemother*, 2005, 11(3): 123-128

[11] Matz C, Deines P, Boenigk J, et al. Impact of violacein producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(3): 1593-1599

[12] Pandey R, Chander R, Sainis KB. A novel prodigiosin like immunosuppressant from an alkalophilic micrococcus sp[J]. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3(2): 159-167

(下转第 1435 页)

- State Pharmaceutical Administration of Quality Inspection Center for Medical Polymers. GB/T16886.6-1997, Biological evaluation——Part 6: Local response test in vivo[S]. Beijing: China Standard Press, 1997: 92-98(In Chinese)
- [7] 国家医药管理局医用高分子产品质量检测中心. GB/T16886.11-1997 医疗器械生物学评价——第 11 部分:全身毒性试验[S].北京:中国标准出版社, 1997: 177-183
- State Pharmaceutical Administration of Quality Inspection Center for Medical Polymers. GB/T16886.6-1997, ?Biological evaluation——Part 11: Systemic toxicity test [S]. Beijing: China Standard Press, 1997: 92-98(In Chinese)
- [8] Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA, et al. Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. . Comparative test system sensitivity[J]. J Biomed Mater Res, 1983, 17 (4) : 571 - 586
- [9] 金鸿莱,黄哲玮,陆华,束蓉.多西环素纳米脂质体缓释凝胶生物相容性及细胞毒性 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2007, 27 (6) : 649-651
- Jin Hong-Lai, Huang Zhe-Wei, Lu Hua, Shu Rong. The biocompatibility of self-prepared doxycycline nano-liposome sustained-release gel and its cytotoxicity [J]. Journal of Shanghai Jiao tong University (Medical Science), 2007, 27 (6) : 649-651(In Chinese)
- [10] Winkler S, Kaplan DL. Molecular biology of spider silk[J]. Rev Mol Biotech 2000, 74 : 85-93
- [11] Heslot H. Artificial fibrous proteins: a review. Biochimie, 1998, 80 : 19-31
- [12] Kadler K E. Fibril forming collagens. In Sheterline P editor. Protein profiles extracellular matrix, vol 1 [M]. London, UK : Academic Press, 1995
- [13] 刘雷良,顾伟,左保齐.蚕丝生物材料[J].丝绸,2006, 2 : 38-41
- Liu Lei-Gen, Gu Wei, Zuo Bao-Qi. Silk Biomaterials[J]. Silk, 2006, 2 : 38-41(In Chinese)
- [14] Van Luyn MJ, Van Wachem PB, Damink LO, Dijkstra PJ, Feijen J, Nieuwenhuis P. Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens [J]. J Biomed Mater Res, 1992, 26:1091-110
- [15] Lorenz Meinel, et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects[J]. Bone, 2005, 37: 688-98
- [16] Guidoin R, Marceau D, Rao TJ, King M, Merhi Y, Roy PE, et al. In vitro and in vivo characterization of an impervious polyester arterial prosthesis: the gelseal triaxial graft[J]. Biomaterials, 1987, 8: 433-41
- [17] Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS. Study on gelatin-containing artificial skin: 1. Preparation and characteristics of novel gelatine alginate sponge[J]. Biomaterials, 1999, 20: 409-17
- [18] Tabata Y, Hijikata S, Ikada Y. Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogels[J]. J Control Release, 1994, 31: 189-99
- [19] Kang HW, Tabata Y, Ikada Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering[J]. Biomaterials, 1999, 20: 1339-44
- [20] Bhattarai SR, Bhattarai N, Yi HK, Hwang PH, Cha DI, Kim HY. Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering[J]. Biomaterials 2004; 25: 2595-2602
- [21] Jongman Lee, Giyoong Tae, Young Ha Kim, In Su Park, Sang-Heon Kim, Soo Hyun Kim. The effect of gelatin incorporation into electrospun poly (L-lactide-co-3-caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility[J]. Biomaterials, 2008, 29: 1872-79
- (上接第 1439 页)
- [13] Williamson NR, Fineran P, Gristwood T, et al. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines[J]. Future Microbiol, 2006, 2(6): 1-14
- [14] Hong MY, Seeram NP, Zhang Y, et al. Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells [J]. J Nutr Biochem, 2008, 19(7): 448-458
- [15] Hong MY, Seeram NP, Zhang Y, et al. Chinese red yeast rice versus lovastatin effects on prostate cancer cells with and without androgen receptor overexpression[J]. J Med Food, 2008, 11(4): 657-666
- [16] 周林,朱爽,陈木华,等.焦化废水中 4 株苯酚高效降解菌的分离及鉴定[J]. 生物技术, 2010, 20(2): 44-46
- Zhou Lin, Zhu Shuang, Chen Mu-hua, et al. Isolation and Identification of four highly effective phenol-degrading strains from coking wastewater[J]. Biotechnol, 2010, 20(2): 44-46(In Chinese)
- [17] 张垚,段开红,牛丹丹,等.提高红曲菌 9903A 原生质体形成数
- 量和再生率的研究[J].食品研究与开发, 2006, 27(8): 54-58
- Zhang Yuan-guo, Duan Kai-hong, Niu Dan-dan, et al. Study on formation and regeneration of protoplasts from Monascus purpureus 9903A[J]. Food Res Dev, 2006, 27(8): 54-58(In Chinese)
- [18] 任柏林,谢水波,唐东山,等.单亲灭活柠檬酸杆菌与奇球菌原生质体融合的初步研究[J].微生物通报, 2010, 37(7): 740-746
- Ren Bo-lin, Xie Shui-bo, Tang Dong-shan, et al. Protoplast fusion between single inactivated Citrobacter freundii and Deinococcus radiodurans[J]. Microbiol China, 2010, 37(7): 740-746(In Chinese)
- [19] Nedukha O, Kordyum E, Bogatina N, et al. The influence of combined magnetic field on the fusion of plant protoplasts [J]. J Gravim Physiol, 2007, 14(1): 117-118
- [20] Strömberg A, Karlsson A, Ryttsén F, et al. Microfluidic device for combinatorial fusion of liposomes and cells[J]. Anal Chem, 2001, 73 (1): 126-130