

链霉菌 702 菌株原生质体抗药性致死突变标志紫外诱变筛选研究

熊姗姗, 孙宇辉, 涂国全*

(江西农业大学生物科学与工程学院, 南昌 330045)

摘要: 实验采用庆大霉素对链霉菌 702 原生质体致死突变标志的紫外诱变筛选模型, 以提高其所产抗真菌生物活性物质的产量。实验结果表明, 紫外线处理 40 s 时, 致死率达 67.15%, 突变率高达 20.18%, 突变株经过摇瓶筛选获得高产菌株 42-23-111, 产素单位达到 949 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 比出发菌株提高了 23.2%。

关键词: 链霉菌 702; 原生质体; 抗药性致死突变标志; 诱变筛选

中图分类号: TS 201.3

文献标志码: A

文章编号: 1005-9989(2008)04-0001-04

The protoplasts resistance-chemicals mutational labelling selection model of the streptomyces 702

XIONG Shan-wei, SUN Yu-hui, TU Guo-quan*

(Department of Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)

Abstract: In order to increase the yield of antifungi substance, UV induced-mutation and the protoplasts resistance-gentamycin mutational labelling selection model was used to screen high-yield mutants of streptomyces 702. The results showed that the gentamycin-resistant mutational frequency of the protoplasts of streptomyces 702 treated by UV with 40 seconds was up to 20.18% and the lethal rate was 67.15%. High antifungi substance-producing mutant 42-23-111 was isolated in the screening experiments, and its yield of antifungi substance reached 949 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which was 23.2% higher than that produced by its parent strain.

Key words: streptomyces 702; protoplasts; the resistance-chemical mutational label; induced screening

江西农业大学生物科学与工程学院应用微生物研究室在以棉花枯萎病为靶目标开展农抗产生菌的分离筛选研究中, 从土壤中分离筛选到一株链霉菌, 简称为链霉菌 702^[1]。链霉菌 702 所产抗真菌活性物质对 7 种霉菌、酵母菌的最低抑菌浓度以及对 13 种植物病原真菌的 EC_{50} 、 EC_{90} , 证明了链霉菌 702 所产抗真菌活性物质具有很强的抑菌活性。

但是链霉菌 702 产抗真菌活性物质产量很低, 无法达到工业生产的要求。因此, 在进行菌种选育研究时突破常规的诱变随机筛选方法, 建立抗药性致死突变标志诱变筛选模型, 根据抗生素产生菌抗性基因与抗生素合成的结构基因和调控基因紧密结合连锁,

而易发生共突变的原理^[2], 选育高产菌株。本项目通过这种新颖育种途径不仅可以得到高产菌株, 而且可以使高频率获得高产菌株成为可能, 为提高抗生素产量提供一个方便有效地方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株供试菌链霉菌 702-42 菌株 (*St-reptomycetes* 702), 由本实验室甘油管冷冻保存;

抑菌测定指示菌: 桔青霉 (*Penicillium citrinum*)。

1.1.2 培养基 供试菌斜面、平板培养基: PDA 培养基; 指示菌斜面、平板培养基: PDA 培养基; 种

收稿日期: 2007-08-15 * 通讯作者

基金项目: 江西省自然科学基金项目(050010); 广东省科技攻关项目(2006B13001004)。

作者简介: 熊姗姗(1983—), 女, 江西南昌人, 硕士研究生, 研究方向为工业微生物菌种选育。

子培养基、发酵培养基：均为本实验室自行设计筛选的培养基；菌丝体培养基：S培养基^[3]；R₂软琼脂^[3]；再生培养基：R₅培养基^[3]。

1.1.3 抗生素 庆大霉素(gentamycin)：上海华美生物工程公司。

1.1.4 主要试剂 溶菌酶(用P缓冲液配制适当浓度，过滤除菌)。

1.1.5 溶液 P缓冲液^[4]；10.3%蔗糖溶液^[3]；0.01% SDS^[3]；微量元素溶液^[4]；TES溶液(0.25 mol/L pH7.2)：称取 Tris(三羟基甲烷)15.175 g，溶于450 mL蒸馏水中，用浓盐酸精确调pH=7.2，然后准确定容到500 mL；甘氨酸溶液：用无菌水配制适当浓度，过滤除菌。

1.1.6 诱变剂 紫外线(UV)：本实验室设备(紫外规格：2537 Å，30 W)。

1.2 方法

1.2.1 诱变出发菌株的自然分离 链霉菌702-42菌株在PDA斜面30℃培养5~7 d，将其制备成单孢子悬液，10倍稀释法稀释涂布在PDA平板上，30℃培养5~7 d，待平板上菌落长出1~2 d，根据不同形态的单菌落，用打孔器将单菌落打孔形成琼脂块，放入空白平皿内，保持一定湿度30℃培养1~2 d，将小室中培养好的单菌落琼脂块置于双层检测平板，30℃培养24 h，菌落产生抗真菌活性物质抑制指示菌桔青霉生长，产生清晰抑菌圈，测定抑菌圈大小并计算生物效价。挑选抑菌圈较大的菌落接于PDA斜面，30℃培养5~7 d，低温保存备用。摇瓶筛选并检测发酵液中抑真菌活性物质的生物效价。

1.2.2 原生质体的制备方法 将菌株42-23培养5~7 d的斜面孢子接种于菌丝体培养基中，30℃摇瓶培养(200 r/min)43 h，将菌液倒入离心管中，3000 r/min离

心收集菌丝体，用蔗糖溶液洗涤1次，P缓冲液洗涤2次。在上述已洗涤的湿菌丝体中加入浓度为2 mg/mL的溶菌酶溶液，混合均匀，置37℃水浴保温进行酶解，每隔15 min用无菌破口移液管轻轻吹打，使溶菌酶与菌丝充分作用，酶解1 h后加入5 mL P缓冲液，先低速(500 r/min)离心3 min，除去未酶解的菌丝体。将上清液转移至另一离心管中，3000 r/min离心沉淀原生质体，弃上清液，将原生质体悬浮于10 mL P缓冲液中。

1.2.3 诱变出发菌株原生质体敏感抗生素的筛选和抗药性致死浓度的测定 将制备好的出发菌株原生质体悬液稀释成适当浓度，取0.1 mL与R₂软琼脂混匀平铺于含庆大霉素不同浓度的R₅再生平板上，30℃培养5~7 d，观察不同平板上的再生菌落数。凡是在前一个低浓度平板上已长出菌落而在后一个较高浓度平板上未长出菌落的，后一浓度即为庆大霉素对出发菌株原生质体的致死浓度。

1.2.4 紫外线诱变剂量的测定 将制备好的菌株42-23原生质体悬液置于波长2537 Å、功率30 W的紫外灯下30 cm处照射0(对照)、20、40、60、80、100 s，适当稀释取0.1 mL与R₂软琼脂混匀后平铺于含致死浓度的庆大霉素和不含庆大霉素的R₅再生平板上，30℃避光培养5~7 d，至长出成熟菌落，同时统计致死率。

1.2.5 抗药性突变株的制备 取5 mL制备好的原生质体悬液置于波长2537 Å、功率30 W的紫外灯下30 cm处照射40 s，适当稀释后取0.1 mL与R₂软琼脂混匀，平铺于含庆大霉素致死浓度的R₅再生平板上，30℃培养5~7 d，生长出的单菌落即为庆大霉素抗性紫外突变株，计算菌落数并将单菌落挑接于PDA斜面上30℃培养5~7 d，待斜面孢子丰满，置于4℃冰箱保存。

$$\text{致死率}(\%) = 1 - \frac{\text{UV处理的原生质体液在不含庆大霉素平板上长出的菌落数}}{\text{未经UV处理的原生质体液在不含庆大霉素平板上长出的菌落数}} \times 100$$

$$\text{突变率}(\%) = \frac{\text{UV处理的原生质体液在含庆大霉素平板上长出的菌落数}}{\text{未经UV处理的原生质体液在不含庆大霉素平板上长出的菌落数}} \times 100$$

1.2.6 抗药性突变株的摇瓶初筛 将突变株接入PDA斜面进行培养保存，同时将这些菌株挑菌块分别接种于40 mL发酵培养基中，30℃200 r/min发酵6 d后，取样用无水乙醇浸提48 h，并进行生物活性检测。通过活性比较，选出活性比较高的菌株作为初筛入选菌株进行二级摇瓶发酵复筛。

1.2.7 抗药性突变株的摇瓶复筛 将初筛入选菌株挑菌块于装有20 mL种子培养基的250 mL三角瓶中，30℃200 r/min发酵48 h，再将种子液接入装有40 mL发酵培养基的250 mL三角瓶中，30℃200 r/min发酵96 h，取样用无水乙醇浸提并进行生

物活性检测。

1.2.8 链霉菌702所产抗真菌活性物质生物效价测定——剂量法^[6-7] 发酵液效价的标定以Natamycin作为对照抗生素，采用一剂量法在桔青霉指示菌平板上进行抑菌测定，以对照抗生素浓度为纵坐标、以校正后的抑菌圈直径为横坐标，得到对照抗生素的标准曲线和线性回归方程。链霉菌702发酵液用无水乙醇稀释浸提、离心。上清液稀释到一定倍数后，作为抑菌测定液。按照对照抗生素标准曲线的制备方法求得发酵液的抑菌圈直径平均值的校正值，再根据相应标准曲线和发酵液样品的稀释倍数，求得每毫

升样品所含的各抑真菌活性物质的效价。

2 结果与分析

2.1 出发菌株的自然分离

对链霉菌 702-42 单孢子悬液进行稀释并涂布于 PDA 平板上, 30 °C 培养 3-5 d 生长出单菌落, 挑接了不同类型的菌落 136 个, 以桔青霉为指示菌, 测定其抑菌圈, 按抑菌圈直径进行分布频率统计, 绘制频率分布图, 如图 1 所示。从中挑取抑菌圈较大的 15 个菌株进行摇瓶筛选, 结果选出编号 42-23 菌株生物效价为 770 μg/mL 作为诱变出发菌株。

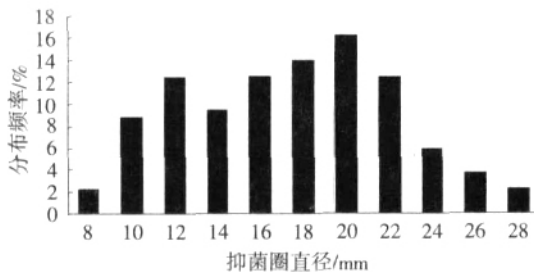


图 1 菌株 702-42 自然选育抑菌圈的频率分布图

2.2 庆大霉素对菌株 42-23 原生质体的致死浓度的测定

表 1 庆大霉素对链霉菌 702 原生质体致死浓度的测定

抗生素名称	抗生素浓度/ (μg/mL)	再生菌落数/ (cfu/mL)	致死率/%
庆大霉素	0	1.27 × 10 ⁸	0
	0.3	9.20 × 10 ⁷	27.56
	0.6	4.55 × 10 ⁷	64.17
	0.9	9.8 × 10 ⁶	92.28
	1.2	0	100

由表 1 可知, 菌株 42-23 原生质体对庆大霉素较敏感, 其对原生质体致死浓度为 1.2 μg/mL, 以此为菌株 42-23 原生质体抗药性致死突变标志。

2.3 紫外线诱变剂量的测定

通过 UV 5 种不同照射时间对菌株 42-23 原生质体的诱变作用, 分别计算再生菌落数并计算 UV 对原生质体的存活率和抗药性致死突变率, 结果见表 2。

表 2 UV 不同时间处理 42-23 原生质体的致死率与突变率

UV时间/s	存活率/%	致死率/%	突变率/%
0	100	0	0
40	32.85	67.15	20.18
80	5.85	94.15	4.03
120	1.90	98.10	0.62
160	0	100	0

UV 对菌株 42-23 原生质体的致死作用和诱变作用见图 2。

从图 2 中可以看出, 随着紫外线照射剂量的增加, 菌株 42-23 原生质体的诱变致死率逐渐上升, 当剂量达到 160 s 时, 致死率达到 100%, 照射剂量和

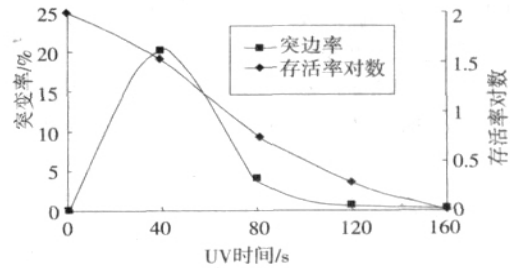


图 2 UV 对菌株 42-23 原生质体的杀菌作用和诱变作用

致死率基本上呈线性关系。诱变统计结果表明, UV 处理 40 s 对菌株 42-23 原生质体的致死率可达 67.15%, 突变率高达 20.18%, 以此为最佳诱变条件。

2.4 抗药性突变株的摇瓶初筛结果

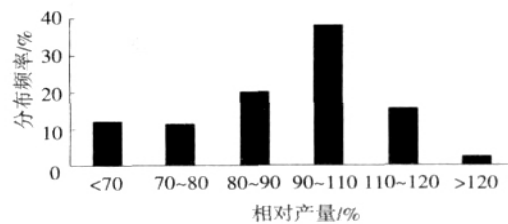


图 3 抗药性突变株相对产量分布频率图

在含致死浓度的庆大霉素平板上分离得到 186 株抗性突变菌株, 通过摇瓶筛选分别测定各菌株产抑真菌生物活性物质的生物效价, 以未诱变的出发菌株的摇瓶发酵的平均效价为 100%, 分别求出抗药性突变株相对产素单位。抗性突变株产量分布见图 3, 分别以相对产素单位 90~110 为未突变型, 相对产素单位在 90 以下为负突变型, 相对产素单位在 110 以上为正突变型, 其中正突变株 34 株, 约占 18.28%。

2.5 抗药性突变株的摇瓶复筛结果

表 3 抗药性突变株摇瓶发酵结果

突变株	平均生产能力/(μg/mL)	相对生产能力/%
42-23 (CK)	770	100
42-23-5	890	115
42-23-14	800	104
42-23-52	777	101
42-23-58	500	65
42-23-72	898	116
42-23-91	625	81
42-23-111	949	123
42-23-112	644	84
42-23-115	879	114
42-23-116	900	117
42-23-131	710	92
42-23-134	911	118
42-23-139	676	88
42-23-160	690	90
42-23-169	858	111
42-23-171	908	118
42-23-174	635	93
42-23-178	700	91

根据摇瓶初筛结果,选取比出发菌株产素单位提高15%以上的18株抗药性突变株进行摇瓶复筛,结果见表3。菌株42-23-111产抑真菌生物活性物质的生物效价达到949 $\mu\text{g/mL}$,比出发菌株提高了23.2%。

3 小结与讨论

对菌株42-23原生质体采用紫外线诱变处理,获得了大量庆大霉素抗性突变株,对UV不同诱变剂量下的突变率、致死率的综合分析表明,随着紫外线照射时间的延长,致死率逐渐提高,当紫外线照射40 s时,致死率67.15%,突变率达到20.18%。对分离得到186株抗药性突变株进行分析,正突变率约18.28%,将突变株摇瓶复筛得到高产菌株42-23-111,其所产抗真菌生物活性物质生物效价达到949 $\mu\text{g/mL}$,比诱变出发菌株提高了23.2%。

参考文献:

- [1] 李昆太,黎循航,涂国全.702生物防腐剂对细菌霉菌和酵母菌类抑菌效果的初步测定.江西农业大学学报(自然科学版),2002,24(5):599-602
- [2] 涂国全,刘姝,黎循航.梅岭霉素产生菌抗药性突变标志诱变筛选模型的初步研究.中国病毒学,2000,15(1):205-210
- [3] 周东坡,平文祥.微生物原生质体融合.哈尔滨:黑龙江科学出版社,1990:45-245
- [4] 徐志南,董悦涵.米多霉素产生菌的诱变育种和原生质体的融合研究.浙江大学学报(工学版),2006,40(7):1263-1265
- [5] 徐平.放线菌素X-2高产菌株的抗药性致死突变标志的诱变筛选研究.江西农业大学(自然科学版),2006,28(1):123-125
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(二部).北京:化学工业出版社,2005,附录XI
- [7] 周启,王道本.农用抗生素和微生物杀虫剂.北京:中国农业出版社,1998

书讯

化学工业出版社食品类精品图书

《食品馅料生产技术与配方》刘延奇 主编 大32开平装 22.00元 2008-03上市

本书主要介绍一些常见的制馅原料和馅料制作工艺,涉及原料的选择、制馅设备、馅料的口味调制、馅料护色和营养配伍等。书中针对蒸制食品、煮制食品、焙烤食品和煎炸食品等各类食品的馅料配方和制作要点进行详细介绍。本书内容丰富、实用性强,对带馅食品的生产有很好的借鉴作用,可作为食品馅料生产者和食品相关专业师生参考。

《糕点生产工艺与配方》马涛 主编 大32开平装 28.00元 2008-01上市

本书是《食品工艺与配方系列》的一个分册,系统介绍糕点生产的原辅料、月饼生产工艺与配方、糕点生产工艺与配方、中式糕点生产工艺与配方,对各类糕点在生产过程中出现的问题进行了详细的论述和解答。

本书适于糕点企业生产技术人员、食品科学与工程专业及相关专业教学参考书。

《乳品分析与检验》李春 主编 大32开平装 28.00元 2008-02上市

本书是根据食品安全的乳品卫生分析与检验的要求编写的。本书作为乳品专业本科教学辅助用书,同时也作为乳品检验员的培训教材。参考了大量的食品和乳品的分析和检验方面专业书籍和期刊。重点介绍了原料乳及乳制品检验和成分分析的方法。

本书包括三大部分。一是乳品基础知识,包括乳样的采集、保存和分析与检验中的材料、原料乳和乳制品概况,SPSS统计分析软件的应用。二是乳和乳制品的理化、感官、微生物分析与检验,包括乳和乳制品感官评价、液态乳制品质量分析检验、固态乳制品质量分析与检验、乳制品生产原辅料成分分析与检验、乳和乳制品微生物分析与检验、乳制品中营养成分分析检验、乳和乳制品中重金属及农药残留分析检验、功能乳制品中活性成分分析与检验。三是影响原料乳质量因素和现代乳品检测技术。

本书适于食品工程、发酵工程、生物工程等相关专业师生阅读。

《功能性高倍甜味剂》胡国华 主编 大32开平装 32.00元 2008-03上市

本书从糖苷类高倍甜味剂、蛋白质类甜味剂、二肽高倍甜味剂、蔗糖衍生物高倍甜味剂、常见合成类高倍甜味剂、新型合成高倍甜味剂、高倍复合甜味剂等方面对功能性高倍甜味剂的种类、制备、改性、加工特性及其在食品中的应用进行了详细的介绍。

本书适于从事食品添加剂、食品、医药、饲料、化学合成、生物技术等方面研究的科研和技术人员参考,也可供高等院校食品、医药等相关专业师生阅读。

以上图书全国各大新华书店均有销售,邮购方法 加收10%邮寄费)。汇款地址:北京市东城区青年湖南街13号
收款人:化学工业出版社发行部 邮编:100011 邮购电话:010-64519432 信息反馈:liuguohui@cip.com.cn
(为庆祝化学工业出版社建社55周年,优惠活动尽在化工社网站:www.cip.com.cn)