

链霉菌 702 菌株原生质体抗药性致死突变标志 NTG 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, 江西 南昌 330045)

摘要:采用庆大霉素对链霉菌 702 原生质体致死突变标志的 NTG 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,NTG 处理 90min 时,致死率达 71.32%,突变率高达 48.58%,突变株经过摇瓶筛选获得高产菌株 NTG-20,其所产抗真菌活性物质的生物效价达到 1680 μ g/mL,比出发菌株产量提高了 118%,菌株 NTG-12 和 NTG-3 的产量也比出发菌株产量相应提高了 95% 和 70%。

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:Q813.5 文献标识码:A 文章编号:0254-5071(2008)24-0038-03

Study on NTG mutation screening of resistance-chemical mutational label of protoplasts from streptomyces 702

XIONG Shanwei, SUN Yuhui, TU Guoquan*

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

Abstract: In the paper, NTG mutation screening of resistance-chemical mutational label of protoplasts from streptomyces 702 was adopted to increase the yield of antifungi substance. The results showed that the lethality and mutation rate reached 71.32% ,48.58% respectively, and high antifungi substance-producing mutant NTG-20 was isolated by shaking flask culture, biological potency of antifungal bioactive substance reached 1680g/mL, which improved 118% than its parent strain, the yield from NTG-12 and NTG-3 improved 95% and 70% than the parent strain.

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

链霉菌 702 菌株既产抗细菌物质,又产抗真菌物质。根据抗细菌活性组分 S2 的紫外、红外、核磁共振、质谱的测定数据,确定化学结构与美国在 1982 年报道的放线菌素 X2(*Actionmycin X2*)同质,为国内首次发现并鉴定,命名为红谷霉素(Honggumycin)。其所产抗真菌物质初步确定为多烯类抗生素。

链霉菌 702 菌株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。本实验通过这种新颖育种途径不仅可以得到高产菌株,而且可以使高效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 702-42-23 菌株(*Streptomyces 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

(1)供试菌斜面、平板培养基:PDA 培养基;(2)指示菌斜面、平板培养基:PDA 培养基;(3)种子培养基、发酵培养

基:均为本实验室自行设计筛选的培养基;(4)菌丝体培养基:S 培养基^[2];(5)R₂软琼脂^[2];(6)再生培养基:R₃培养基^[2]。

1.1.3 试剂

庆大霉素(gentamycin):购自上海华美生物工程公司;溶菌酶:用 P 缓冲液配制成适当浓度,过滤除菌;亚硝基胍(NTG):购自上海试剂一厂。

1.1.4 溶液

(1)P 缓冲液^[3];(2)微量元素溶液^[3];(3)0.01% SDS^[3];(4)10.3% 蔗糖溶液^[3]。

(5)TES 溶液(0.25mol/L、pH 7.2):称取 Tris(三羟基甲烷)15.175g,溶于 450mL 蒸馏水中,用浓盐酸精确调 pH 值为 7.2,然后准确定容至 500mL。

(6)甘氨酸溶液:用无菌水配制成适当浓度,过滤除菌。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的制备方法

将菌株 702-42-23 培养 5d~7d 的斜面孢子接种于菌丝体培养基中,30℃ 摇瓶培养(200r/min)43h,将菌液倒入离心管中,3000r/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 2mg/mL 的溶菌酶溶液,混合均匀,置 37℃ 水浴保温进行酶解,每隔 15min 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 1h 后加入 5mL P 缓冲液,先低速

收稿日期:2008-06-05

基金项目:江西省自然科学基金(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,在读硕士,研究方向为工业微生物菌种选育;涂国全*,教授,通讯作者。

(500r/min)离心3min,除去未酶解的菌丝体。将上清液转移至另一离心管中,3000r/min离心沉淀原生质体,弃上清液,将原生质体悬浮于10mL P缓冲液中。

1.2.2 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0.1mL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5d~7d,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。

1.2.3 NTG 诱变处理菌株 702-42-23 原生质体

取1mL NTG 母液加入原生质体悬液4mL,配制成2mg/mL NTG 溶液,在(28±2)℃、180r/min条件下分别作用0min、30min、60min、90min、120min。将经NTG处理的原生质体悬液用冷的生理盐水大量稀释终止反应,并作成一定稀释度,分别涂布于含1.2μg/mL庆大霉素和不含庆大霉素的R5再生平板上,30℃培养4d~6d,观察并计算菌落数,生长出的单菌落即为抗药性NTG突变株。

$$\text{致死率}(\%) = 1 - \frac{\text{庆大霉素 R5 平板上生长的菌落数}}{\text{未经 NTG 处理的原生质体液在不含庆大霉素 R5 平板上生长的菌落数}} \times 100\%$$

$$\text{突变率}(\%) = \frac{\text{庆大霉素 R5 平板上生长的菌落数}}{\text{未经 NTG 处理的原生质体液在不含庆大霉素 R5 平板上生长的菌落数}} \times 100\%$$

1.2.4 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40mL发酵培养基中,30℃、200r/min发酵6d后,取样用无水乙醇浸提48h,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。

1.2.5 抗药性突变株的摇瓶复筛

将初筛入选菌株挑菌块于装有20mL种子培养基的250mL三角瓶中,30℃、200r/min发酵48h,再将种子液接入装有40mL发酵培养基的250mL三角瓶中,30℃、200r/min发酵96h,取样用无水乙醇浸提并进行生物活性检测。

1.2.6 链霉菌 702 所产抗真菌活性物质生物效价测定

采用一剂量法^[6-7]。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平板上进行抑菌测定,发酵液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 庆大霉素对菌株 702-42-23 原生质体的致死浓度的测定结果(见表1)

由表1表明,菌株702-42-23原生质体对庆大霉素较敏感,其对原生质体致死浓度为1.2μg/mL,以此为菌株702-42-23原生质体抗药性致死突变标志。

表1 庆大霉素对菌株 702-42-23 原生质体致死浓度的测定结果

Table 1. The lethal dosage of gentamycin to Streptomyces 702 protoplasts

抗生素浓度/(μg·mL ⁻¹)	再生菌落数/(个·mL ⁻¹)	致死率/%
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

2.2 NTG 对菌株 702-42-23 原生质体的诱变效果

通过2mg/mL NTG 4种不同作用时间对菌株702-42-23原生质体的诱变作用,将诱变处理的原生质体悬液分别涂布于含1.2μg/mL庆大霉素的R5再生平板上和不含庆大霉素的R5再生平板上进行培养。统计抗药性突变菌落数和NTG作用于原生质体的存活率和抗药性致死突变率,结果见表2。

表2 NTG 对 702-42-23 原生质体作用不同时间的致死率与突变率

Table 2. Lethality and mutation rate of 702-42-23 protoplasts treated by NTG in different time

NTG 诱变时间/min	存活率/%	致死率/%	突变率/%
0	100.00	0.00	0.00
30	64.22	35.78	12.00
60	41.33	58.67	18.04
90	28.68	71.32	48.58
120	7.63	92.37	14.33
150	1.62	98.38	4.11

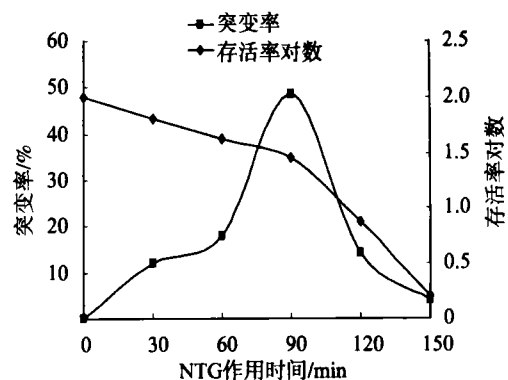


图1 NTG 对 702-42-23 原生质体的杀菌作用和诱变作用

Figure 1. Sterilization and mutation of NTG on 702-42-23 protoplasts

NTG 对菌株 702-42-23 原生质体的杀菌作用和诱变作用见图1。由图1可知,存活率与作用时间呈反比关系,

NTG 对 702-42-23 原生质体作用 90min 时,突变率达到最高为 48.58%,此时致死率也高达 71.32%。

2.3 抗药性 NTG 突变株的摇瓶初筛结果

经过 NTG 4 种不同作用时间对 702-42-23 原生质体的诱变作用,在含 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 R5 平板上挑取 280 株单菌落,通过摇瓶筛选分别测定各菌株产抗真菌生物活性物质的效价,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 2,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 63 株,约占 22.5%。

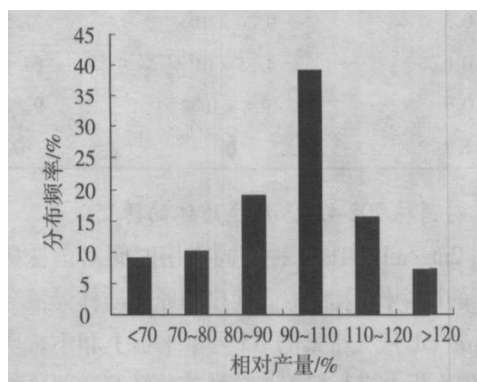


图 2 抗药性 NTG 突变株相对产量分布频率图

Figure 2. Distributing frequency of the relative yield of gentamycin-resistant NTG mutants

2.4 抗药性 NTG 突变株的摇瓶复筛结果

将产量提高 10% 以上的 63 个菌落进行摇瓶发酵,分别测定其所产抗真菌活性物质及红谷霉素的生物效价。抗真菌物质产量最高的前 20 个菌株的生物效价见表 3,其对应所产红谷霉素产量见表 4。

表 3 NTG 抗药性突变株摇瓶复筛的抗真菌活性物质产量

Table 3. Antifungi substance yield of gentamycin-resistant NTG mutants by shaking flask culture

突变株	抗真菌物质效价/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	相对效价/%	突变株	抗真菌物质效价/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	相对效价/%
702-42-23 (CK)	770	100	NTG-8	1092	142
NTG-20	1680	218	NTG-34	1002	130
NTG-12	1500	195	NTG-139	998	130
NTG-3	1308	170	NTG-160	967	126
NTG-77	1200	156	NTG-24	951	124
NTG-72	1188	154	NTG-90	948	123
NTG-91	1160	151	NTG-114	940	122
NTG-11	1144	149	NTG-121	910	118
NTG-120	1140	148	NTG-2	906	117
NTG-32	1130	147	NTG-30	898	116
NTG-101	1115	145			

表 4 NTG 抗药性突变株摇瓶复筛的红谷霉素产量

Table 4. Honggumycin yield of gentamycin-resistant NTG mutants by shaking flask culture

突变株	红谷霉素生物效价/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	相对效价/%	突变株	红谷霉素生物效价/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	相对效价/%
702-42-23 (CK)	880	100	NTG-8	880	100
NTG-20	1060	120	NTG-34	820	93
NTG-12	1025	116	NTG-139	826	94
NTG-3	988	112	NTG-160	820	93
NTG-77	950	108	NTG-24	738	84
NTG-72	942	107	NTG-90	695	79
NTG-91	930	106	NTG-114	620	70
NTG-11	935	106	NTG-121	0	0
NTG-120	920	105	NTG-2	464	53
NTG-32	905	103	NTG-30	490	56
NTG-101	895	102			

实验结果表明,比出发菌株产素能力提高 50% 以上的菌株有 6 株,其中高产菌株 NTG-20 产抗真菌活性物质的生物效价为 1680 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比出发菌株产量提高了 118%,菌株 NTG-12 和 NTG-3 的产量也比对照菌株产量相应提高了 95% 和 70%。并且筛选到 NTG-121,经验证,其在固体和摇瓶培养条件下均不产抗细菌活性物质(红谷霉素),产抗真菌物质单位为 910 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 小结与讨论

3.1 应用庆大霉素抗性基因突变筛选模型,对菌株 702-42-23 原生质体采用 NTG 诱变处理,获得了 280 株抗药性突变株,发生正突变的为 63 株,正突变率约为 22.5%,经摇瓶复筛获得 NTG-20 菌株,其所产抗真菌活性物质的生物效价达到 1680 $\mu\text{g}/\text{mL}$,比出发菌株产量提高了 118%,菌株 NTG-12 和 NTG-3 的产量也比对照菌株产量相应提高了 95% 和 70%。并且筛选到 NTG-121,经验证其在固体和摇瓶培养条件下均不产抗细菌活性物质(红谷霉素),产抗真菌物质单位为 910 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.2 实验探索并建立的原生质体抗药性致死突变标志诱变筛选模型大幅度的淘汰了野生型,浓缩了突变型,减少筛选的工作量并提高了工作效果,研究结果表明该方法是行之有效的。

参考文献:

- [1] 涂国全,刘 姝,黎循航,等. 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[J]. 中国病毒学,2000,15(1):205-210.
- [2] 周东坡,平文祥. 微生物原生质体融合[M]. 哈尔滨:黑龙江科学出版社,1990:45-245.
- [3] 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[J]. 浙江大学学报:工业版,2006,40(7):1263-1265.
- [4] 徐 平. 放线菌素 X₂ 高产菌株的抗药性致死突变标志的诱变筛选研究[J]. 江西农业大学:自然科学版,2006,28(1):123-125.
- [5] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005,二部:附录 XI.
- [6] 周 启,王道本. 农用抗生素和微生物杀虫剂[M]. 北京:中国农业出版社,1998.