

氮离子注入选育阿维拉霉素高产菌株的研究

贺亚男 朱传合 杜连祥* 路福平

(天津科技人学生物工程学院天津市工业微生物重点实验室 天津 300222)

摘要: 以提高产绿链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) SV-1 产阿维拉霉素 (Avilamycin) 产量为目的, 采用低能氮离子注入技术, 辅之以链霉素抗性筛选法进行诱变选育研究。结果表明, “马鞍” 区域即注入剂量范围在 $3 \times 10^{15} \sim 5 \times 10^{15}$ ions/cm² 诱变效果最佳, 菌株的抗药性突变与产量突变密切相关, 链霉素抗性筛选法具有可行性。在摇瓶条件下, 最终获得稳定性良好, 阿维拉霉素产量达到 83.5 mg/L, 较出发菌株提高 195% 的突变株 SVT-45。实验表明, 离子注入技术是一种有潜力的微生物诱变育种新方法。

关键词: 离子注入, 诱变选育, 链霉素抗性筛选, 阿维拉霉素

中图分类号: Q 939.92 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0039-04

Study on Breeding of High-yield Avilamycin-producing Strains by Nitrogen Ion Implantation

HE Ya-Nan ZHU Chuan-He DU Lian-Xiang* LU Fu-Ping

(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, Biotechnology Engineering Department, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222)

Abstract: To obtain high-yield avilamycin-producing strains, low energy N⁺ ion implantation technology and screening of streptomycin-resistant mutants are used in the study on breeding mutation. The results show that, “saddle” region, which range is from 3×10^{15} to 5×10^{15} ions/cm², has got better induced mutation action. It also means that the strain's resistant mutation and yield mutation closely correlate to each other, and the method of streptomycin resistant screening is feasible. We have isolated a high-yield strain SVT-45 which the productivity is 195% higher than the original strain's in the rotation-flask experiments. These results showed that the ion implantation was an effective method for microbe mutagenesis.

Key words: Ion implantation, Mutation breeding, Screening of Streptomycin-resistant mutants, Avilamycin

阿维拉霉素 (Avilamycin) 是由产绿链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 发酵而生成的二氢异扁枝衣酸酯, 属于正糖霉素族寡糖类抗生素, 对革兰氏阳性致病菌有较强抑制作用^[1]。此外, 阿维拉霉素还是一种新型消化促进剂或代谢调节剂, 具有稳定良好的促生长和预防动物疾病的双重作用, 安全性高、残留极低、对环境无影响, 目前作为饲料添加剂已在很多国家、地区销售。

近年来, 将离子注入技术用于抗生素产生菌诱变育种已取得明显进展, 如利福霉素、之江菌素、林可霉素等多种抗生素产量都有大幅提高。离子束作为一种新的诱变源成果显著, 原因在于离子注入生物体时同时存在能量沉积、质量沉积及电荷交换效应, 从而提供众多诱变条件, 使其

突变范围广, 突变程度高, 便于筛选到符合生产要求, 产量提高的突变体^[2]。

但是诱变方法产生的突变是随机的, 突变无方向性导致目标菌株筛选工作量大, 直接影响诱变育种的工作效率。我们在进行阿维拉霉素高产菌株选育时, 根据分子育种中关于抗生素产生菌抗性基因与抗生素合成基因以及调控基因紧密连锁而容易发生共突变的理论^[3], 利用链霉素抗性筛选法作为诱变育种的辅助筛选手段, 结合氮离子注入诱变, 进行定向育种, 提高了筛选效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 出发菌株: 产绿链霉菌 (*Streptomy-*

* 通讯作者 Tel: 022-60270037, E-mail: nikolai1982n@sina.com

收稿日期: 2006-03-10, 修回日期: 2006-04-25

ces viridochromogens) SV-1, 本研究室保存; 敏感菌株: 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 10209, 中国工业微生物菌种保藏中心。

1.1.2 培养基: 斜面、平板分离培养基为高氏一号合成培养基^[4]; 种子培养基: 麦芽汁 10g, 酵母浸粉 4g, 葡萄糖 4g, $\text{CaCl}_2 \cdot 0.1\text{g}$, 定容至 1L, pH 7.2; 发酵培养基: 葡萄糖 10g, 可溶性淀粉 30g, 大豆饼粉 22g, 酵母浸粉 8g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.5g, $\text{CaCl}_2 \cdot 0.1\text{g}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 0.05\text{g}$, 定容至 1L, pH 7.2; 生物检测培养基, 上层: 酵母膏 3g, 蛋白胨 10g, 牛肉膏 5g, 葡萄糖 10g, 氯化钠 5g, 琼脂 10g, 定容至 1L, pH 7.2; 下层: 素琼脂 20g。以上培养基灭菌条件: $1 \times 10^5 \text{ Pa}$, 15 ~ 20min。

1.1.3 主要仪器: 离子注入装置由郑州大学提供, 能量: 30keV, 脉冲: 25Hz, 真空度 $5 \times 10^{-2} \text{ Pa}$ 。

1.2 方法

1.2.1 阿维拉霉素检测方法—高效液相检测法 (HPLC): 色谱条件: 检测器, Biotronik BT3030 UV-VIS 检测器; 色谱柱, Thomenex Primesphere C_{18}HC 柱; 流动相, 乙腈: 0.2% 磷酸氢二氢 (51: 49), pH 3.20; 流速, 1.2mL/min; 进样量, 20 μL ; 检测波长, 214nm。含量计算: 采用外标法。

1.2.2 菌株分离纯化: 采用琼脂块法, 用 $\phi 8$ 打孔器打出若干单菌落, 对其进行敏感菌检测, 利用抗生素效价测量仪测量抑菌圈直径, 选取直径大于 8mm 的菌落进行摇瓶发酵, 发酵结果用 HPLC 法测定阿维拉霉素产量, 选取产量最高者作为出发菌株。

1.2.3 单孢子悬液制备: 将斜面孢子用生理盐水洗下, 转移到装有玻璃珠的无菌三角瓶中振荡打散, 用无菌脱脂棉过滤, 调整孢子浓度为 10^8 个/mL。

1.2.4 出发菌株链霉素最小抑制浓度测定: 将制备好的孢子悬液分别涂布于含有不同浓度链霉素

的培养基平板上, 37℃ 培养 3 ~ 5d, 记录平板上未长菌落的链霉素最低作用浓度, 即确定为链霉素对该菌的最小抑制浓度。

1.2.5 离子注入诱变: 每个无菌平板加入 0.1mL 孢子悬液, 涂布均匀, 无菌风吹干 (每一注入剂量做一个真空对照), 用 30keV 的氮离子 (N^+) 注入处理, 剂量分别为 3、8、10、30、50、80、100、200 $\times 10^{14} \text{ ions/cm}^2$ 。注入后用无菌水洗下菌体, 适当稀释。将诱变孢子稀释液分别涂布在含致死浓度链霉素和不含链霉素的高氏培养基平板上, 分别进行菌落计数, 凡是在含链霉素致死浓度平板上长出的菌落均为链霉素抗性基因 (str) 突变株。

存活率 (%) = 注入后不含链霉素平板上长出的菌落数/真空对照平板上长出的菌落数 $\times 100\%$

1.2.6 高产菌株筛选方法: 从每个注入剂量处理后的含链霉素平板上挑取若干 str 突变株菌落于高氏斜面, 长好后将斜面孢子制成浓度为 10^8 个/mL 孢子悬液, 吸取适量悬液于种子培养基中, 28℃、180r/min 振荡培养至对数生长期, 再以 2% 的接种量转接到发酵培养基, 28℃、180r/min 回转式摇床发酵 3 ~ 5d。HPLC 法检测阿维拉霉素产量, 挑选高产菌株。

2 结果与分析

2.1 出发菌株的选择

选取抑菌圈直径大于 8mm 的菌落共 11 株进行摇瓶发酵, 发酵结果用 HPLC 法测定阿维拉霉素产量。实验结果如表 1。由表 1 可以看出琼脂块法结果与摇瓶发酵结果具有较高相关性, 说明生物鉴定平板筛选单菌落琼脂块的可行性。实验最终选取 43 号菌株作为出发菌株, 阿维拉霉素产量为 28.3mg/L。单菌落形态为典型同心圆, 中间突起, 边缘整齐, 表面孢子丰满白色。

表 1 单菌落琼脂块法纯化结果

Mutants	2	6	35	43	45	49	60	66	71	72	97
Dia. of antibiotic circle (mm)	10.3	10.5	10.1	11.8	9.6	8.8	11.3	8.5	10.6	10.0	8.3
Potency of flask fermentation (mg/L)	25.0	26.2	23.7	28.3	16.4	12.0	27.6	11.6	25.9	23.5	10.8

2.2 高产突变株的分离筛选

2.2.1 链霉素对 SV-43 菌株孢子最小抑制浓度测定: 分别取浓度为 10^8 个/mL 的孢子悬浮液 0.1 mL 涂布于含有不同链霉素浓度的平皿中, 结果见表 2。由表 2 可知, 链霉素对 SV-43 菌株孢子致死浓度检测为 $200\mu\text{g/mL}$, 以此为抗性突变标志。

表 2 链霉素对 SV-43 菌株孢子致死浓度测定

Streptomycin($\mu\text{g/mL}$)	40	80	120	160	180	200	220	240
Growth	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

注: +++ 为菌落生长多, ++ 为菌落生长一般, + 为菌落生长少, - 为无菌落生长

2.2.2 离子注入效应: (1) 氮离子束诱变处理对 SV-43 菌株存活率的影响: 随氮离子注入剂量的增加, 菌株存活率曲线呈“马鞍型”变化: 即小剂量注入时存活率较高, 随剂量增加存活率下降, 当注入剂量增至 3×10^{15} ions/cm² 时, 存活率降为 22%, 但剂量继续增加至 5×10^{15} ions/cm² 时, 存活率回升到 23%, 然后又逐渐下降, 注入剂量超过 2×10^{16} ions/cm² 后存活率为零 (图 1)。相关研究指出, 这种现象是由于低剂量时离子只对细胞表面进行损伤, 随剂量增加能量沉积产生大量自由基, 导致 DNA 和生物膜等生物大分子损伤, 存活率下降; 剂量继续增加, 大量连续注入电荷的堆积产生很强的库仑斥力, 对被注入细胞形成一个“保护屏障”, 且大量堆积的电荷可形成一个弱电场, 这种电场的刺激效应可以激活菌体内的修复酶, 提高损伤修复的效率, 存活率又有所回升; 当剂量上升到一定程度, 能量沉积和动量传递所造成的严重损伤超出生物大分子的修复能力, 存活率再次下降^[5]。(2) 氮离子束诱变处理对链霉素抗性突变株阿维拉霉素产量突变率的影响: 从每个注入剂量处理平板上挑取 100 个左右抗药性突变株转接于斜面, 进行摇瓶发酵, HPLC 法检测阿维拉霉素产量。规定产量高于出发菌株 5% 的突变株称为正突变, 小于 5% 的为负突变, $\pm 5\%$ 之间的为未突变。结果见表 3 及图 2。从图表可以看出, 注入剂量在 $3 \times 10^{15} \sim 5 \times 10^{15}$ ions/cm² 范围可以得到较高的产量正突变率 (40.5% ~ 47.5%), 同时该区域的负突变率也较高, 反映了这个剂量范围有最好的诱发突变作用。这与文献报道^[6]在“马鞍”区域, 即存活率在 20% ~ 30% 之间菌株最

易发生突变相一致。

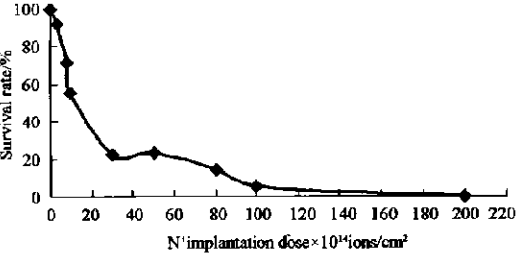


图 1 在 30keV 能量不同剂量下的存活率

从表 3 还可以看出, 链霉素抗性突变株的产量突变率具有较高水平, “马鞍”区域达到 80% 以上, 这表明菌株的抗药性突变与产量突变密切相关。

表 3 氮离子注入后链霉素抗性突变株产量突变率统计表

dose $\times 10^{14}$ ions/(cm ²)	3	8	10	30	50	80	100
Positive mutation rate(%)	12.2	19.3	35.1	40.5	47.9	32.4	14.5
Negative mutation rate(%)	8.7	15.6	30.6	42.8	40.3	51.1	62.8

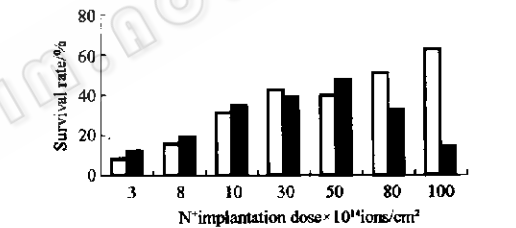


图 2 不同剂量下的产量突变率
□ 负变率, ■ 正变率

2.2.3 高产菌株的筛选: 经过 8 次摇瓶发酵, 从近 800 株链霉素抗性突变株中筛选出 190 多株正变株, 其中有 22 株菌的阿维拉霉素生产能力提高 30% 以上, 特别是 SVT-45 的产量较出发菌株提高 195%。结果见表 4。

表 4 部分高产突变株筛选结果

Mutants	Potency (mg/L)	Relative level (%)
SV-43	28.3	100
SVT-8	38.5	136
SVT-22	37.1	131
SVT-41	49.2	174
SVT-45	83.5	295
SVT-87	40.5	143
SVT-101	37.1	131
SVT-180	46.4	164

续表4

SVT-266	39.1	138
SVT-395	55.8	197
SVT-398	44.6	158
SVT-429	38.2	135
SVT-505	41.3	146
SVT-532	42.2	149
SVT-557	39.9	141
SVT-604	37.6	133
SVT-615	44.1	156
SVT-618	50.7	179
SVT-632	40.6	143
SVT-690	38.4	136
SVT-737	49.6	175
SVT-768	45.3	160

2.3 高产菌株的稳定性试验

选择高产突变株 SVT-41、SVT-45、SVT-395、SVT-618、SVT-737 进行生产阿维拉霉素的生产稳定性实验, 对其进行反复传代4次, 结果如表5。在以上5株高产突变株中, SVT-45的产量能够稳定在80.6~83.5mg/L范围内, 并且在固体斜面培养基上其孢子速度基本一致, 将各代菌株接种于液体发酵培养基内, 其进入快速生长期的时间和最高生物量均基本一致, 表明该菌生产稳定性良好。

表5 阿维拉霉素生产稳定性实验结果

Generation	Production of avilamycin (mg/L)				
	SVT-41	SVT-45	SVT-395	SVT-618	SVT-737
1	49.2	83.5	55.8	50.7	49.6
2	41.3	82.0	50.7	45.3	47.5
3	30.5	82.4	33.6	34.1	40.2
4	27.8	80.6	31.4	28.9	31.7

3 结论

(1) 采用低能氮离子注入的方法对阿维拉霉素产生菌 SV-43 进行诱变, 通过链霉素抗性筛选法筛选, 最终获得一株稳定性良好, 产量达到83.5

mg/L, 较出发菌株提高195%的突变株 SVT-45。

(2) 不同注入剂量对菌株存活率及阿维拉霉素产量突变率效应的研究表明, “马鞍”区域即注入剂量 $3 \times 10^{15} \sim 5 \times 10^{15}$ ions/cm² 产量正突变率高达40.5%~47.5%, 同时该处的负突变率也较高, 表明这个剂量范围有最好的诱发突变作用。

(3) 实验发现链霉素抗性突变株的产量突变率具有较高水平, 表明菌株的抗药性突变与产量突变密切相关, 采用链霉素抗性筛选具有可行性。有研究表明, *relC* 基因缺失突变株完全丧失产生抗生素能力, 而通过引入能赋予链霉素抗性的 *str* 突变可恢复其产素能力^[7]。采用特定的 *str* 突变使任何一种微生物的抗生素产率都会有一个显著的增加。这个新颖的育种途径将为提高抗生素产量提供一个方便有效的方法^[8]。

(4) 本实验将氮离子注入诱变技术结合链霉素抗性筛选法第一次应用于阿维拉霉素产生菌的选育, 在利用离子注入突变范围广、突变程度高等优点的基础上, 又通过链霉素抗性筛选法大幅度浓缩了突变型, 提高了菌种选育的工作效率。实践证明, 采用氮离子注入方法选育阿维拉霉素高产突变株是行之有效的。

参考文献

- [1] Weitnauer G, Mühlenweg A, Trefzer A, et al. *Chemistry & Biology*, 2001, 8: 569~581.
- [2] 吴丽芳, 李红. *物理*, 1999, 28(12): 708~712.
- [3] Hosoya Y, Okamoto S, Teal A R, et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42(8): 2041.
- [4] 杜连祥. *工业微生物学实验技术*. 天津: 天津科学技术出版社, 1992. 279.
- [5] 宋道军, 余增亮. *核技术*, 1999, 22(3): 129~132.
- [6] 余增亮. *离子束生物技术引论*. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998. 241~246.
- [7] 杨东靖, 陈冠群, 陈巍, 等. *微生物学通报*, 2003, 30(4): 29~32.
- [8] Burkhard S, Yishak G K, Therdeak P, et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(10): 2877~2928.