

复合诱变和抗性筛选利迪链菌素高产菌株*

郭卫寰 李小兵 元英进**

(天津大学化工学院制药工程系 天津 300072)

摘要 :为解决利迪链霉菌生产能力低的问题,以 *Streptomyces lydicus* AS 4.2501-P28 为出发菌株,应用紫外和吖啶橙诱变,结合抗生素的抗性筛选,得到稳定高产的 *S. lydicus* AS 4.2501-L8,发酵水平达到 177.0 $\mu\text{g/mL}$,较出发菌株提高了 96.2%。

关键词 :利迪链霉菌,利迪链菌素,复合诱变,抗性筛选

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0831-05

Breeding of High Streptolydigin-Producing Strain by Complex Mutagenesis and Resistance Selection*

GUO Wei-Huan LI Xiao-Bing YUAN Ying-Jin**

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract :A high Streptolydigin-producing strain *Streptomyces lydicus* AS 4.2501-L8 with genetic stability was obtained from the original strain *S. lydicus* AS 4.2501-P28 by mutagenesis with UV and acridine orange, followed by resistance selection. Its yield of Streptolydigin was 177.0 $\mu\text{g/mL}$, 96.2% higher than the original strain.

Key words :*Streptomyces lydicus*, Streptolydigin, Complex mutagenesis, Resistance selection

利迪链菌素(Streptolydigin,图1)为典型的Tetramic acid类抗生素^[1],具有良好的抗细菌、抗肿瘤、抗HIV蛋白酶活性。最新研究表明,利迪链菌素是一个重要的RNA聚合酶抑制剂,相继在Cell和Mol Cell上有3篇相关论文论及^[2-4],引起了广泛关注。本实验室从土壤中筛选得到利迪链霉菌变种AS 4.2501(*Streptomyces lydicus* AS 4.2501),但其生产能力很低,直接影响进一步的研究。

本实验室曾以 *S. lydicus* AS 4.2501 为出发菌株,经UV和 HNO_2 复合诱变,筛选MIC浓度的前体物质丙酸钠、缬氨酸、葡萄糖的抗性突变株,得到了*Streptomyces lydicus* AS 4.2501-P28,提高菌种的生产能力^[5]。

在此基础上,以*Streptomyces lydicus* AS 4.2501-P28为出发菌株,通过紫外和吖啶橙诱变,并选用5种抗菌药:链霉素、红霉素、林可霉素、左氧氟沙星

和环丙沙星,以MIC浓度作为标记,筛选抗性基因突变株,进一步改良菌株。

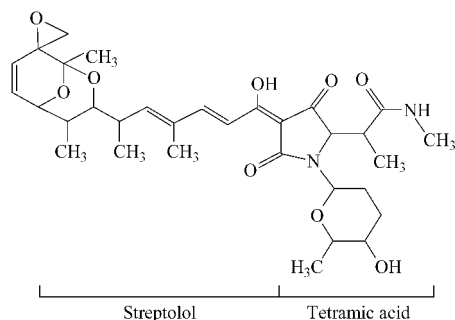


图1 利迪链菌素的分子结构(包括Streptolol和Tetramic acid两部分)

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

菌种:利迪链霉菌 P28 作为出发菌株。

固体斜面培养基(g/L):淀粉 20,葡萄糖 5,蛋白

* 国家自然科学基金资助项目(No. 20425620)

** 通讯作者 E-mail: yjyuan@tju.edu.cn

收稿日期:2007-01-05,修回日期:2007-04-02

胨 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 0.5, 玉米浆 2, 琼脂 20, pH 自然, 1×10^5 Pa 蒸汽灭菌 20 min。

摇瓶种子培养基(g/L): 淀粉 30, 葡萄糖 5, 酵母浸膏粉 2, 蛋白胨 4, K_2HPO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 0.5, pH 自然, 1×10^5 Pa 蒸汽灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L): 淀粉 40, 葡萄糖 5, 蛋白胨 2, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 0.5, pH 6.5, 1×10^5 Pa 蒸汽灭菌 20 min。摇瓶及 2 L 发酵罐的培养均采用此配方。

培养条件: 固体斜面接种后于 28℃ 培养 10d, 摇瓶培养: 铲取 0.5 cm² 培养好的斜面接种于装有 30 mL 培养液的 250 mL 三角瓶中, 220 r/min、28℃ 回转式摇床发酵培养 96h。

2L 发酵罐的培养: 接种量 10%, 通气比为 2.0 vvm, 搅拌转速 500 r/min, pH 6.5 ~ 6.9, 培养 96h。

生物检定培养基(g/L): 酵母浸膏粉 1, 葡萄糖 5, 硫酸铵 1, 琼脂 20。90 mL 培养皿中下层倒入 15 mL 培养基, 上层为混有 100 μL 检定菌液的 6 mL 细菌培养基。

1.2 主要药品及试剂

链霉素、红霉素、林可霉素、左氧氟沙星、环丙沙星和吡啶橙均为上海生工生物工程公司产品。乙酸乙酯, 分析纯, 来自天津市标准科技有限公司。甲醇, 色谱纯, 来自天津市康科德科技有限公司。

1.3 分析方法

1.3.1 HPLC 测定利迪链菌素的含量: 用于发酵液中利迪链菌素的测定。流动相组成: 甲醇: 水: 乙酸铵 = 65 : 32 : 3, 每次注射样品量为 5 μL , 流速 0.5 mL/min, 于波长 330 nm、室温下测定。

1.3.2 发酵液的菌体干重测定及发酵滤液萃取: 将 50 mL 发酵液于 4800 r/min 离心 15 min, 收集菌体用蒸馏水洗涤 3 次, 80℃ 干燥至恒重, 称重得菌体干重(dry cell weight, DCW)。取 30 mL 上清液, 加同体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相后加 10 mL 蒸馏水洗涤, 有机相经薄膜旋转蒸发器, 在 76 kPa, 30℃ 下浓缩至干, 残留用甲醇 4 mL 溶解, 用作 HPLC 测定。

1.3.3 杯碟法测定利迪链菌素的含量: 枯草芽孢杆菌作检定菌, 在培养皿中倒入 15 mL 普通细菌培养基, 待其凝固后再倒入 6 mL 混有枯草芽孢杆菌孢子的细菌培养基, 凝固后即得到细菌平板。取发酵液

离心(6000 r/min 4 min)得到的上清液 100 μL , 注入牛津杯(直径为 7.5 mm)中, 于 37℃ 培养箱中培养 16h ~ 18h 后, 测量抑菌圈的直径, 用于对比产物的生物活性。

1.3.4 发酵液中还原糖的测定: DNS 比色法。50 μL 发酵滤液加 1.5 mL DNS 试剂, 加水至 5 mL, 煮沸 5 min, 冷却后加水至 25 mL, 722 光栅分光光度计于波长 540 nm 处比色测定。还原糖浓度由下式计算: $Y = A + BX$, Y 为还原糖浓度, X 为吸光度, 系数 A 、 B 分别为 0.14788 和 0.19836。

1.4 实验方法

1.4.1 单孢子悬浮液的制备: 用 30 mL 左右的生理盐水洗涤培养好的菌体斜面, 并用接种环轻轻将孢子刮下。将洗涤液倒入装有玻璃珠的 250 mL 无菌三角瓶中, 于摇床上 220 r/min 振荡约 10 min, 将成团孢子打散, 并用脱脂棉过滤。适当稀释单孢子悬液(10^7 个/mL), 然后将孢子悬浮液于 30℃ 下放置 2 min, 使孢子热活化, 即可进行诱变处理。

筛选程序: 前体物质 MIC 的确定 → UV 和 HNO_2 诱变剂量的确定 → 出发菌株的斜面培养 → 单孢子悬浮液的制备 → 复合诱变处理 → 平板培养 → 初筛、复筛 → 传代至遗传稳定 → HPLC 测定利迪链菌素 → 代谢参数测定(2 L 发酵罐)。

1.4.2 复合诱变处理: 紫外线主要通过胸腺嘧啶二聚体的形成改变 DNA 分子结构。吡啶橙属于移码突变诱变剂, 能够插入 DNA 分子中两个相邻的碱基之间, 造成双螺旋一定程度的延长和部分解开, 在复制过程中, 会使链上增加或缺失一个碱基, 结果引起增加或缺失位置之后全部遗传密码转录翻译的错误, 造成移码突变。本课题的复合诱变采用 UV 和吡啶橙。UV 照射时间仍定为 3 s。吡啶橙剂量的确定: 将浓度为 10^7 个/mL 的孢子悬液分别涂于以下吡啶橙浓度的固体平板: 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$, 培养 9d, 对菌落计数, 选择致死率为 25% 时对应的吡啶橙浓度。

1.4.3 5 种抗生素对 *S. lydicus* 最小抑菌浓度的测定: 将制备好的孢子悬液分别涂布于含不同浓度链霉素、红霉素、林可霉素、左氧氟沙星和环丙沙星的培养基平板, 28℃ 培养 9d, 观察记录未长菌落的各抗生素最低作用浓度, 即最小抑菌浓度(MIC)。

1.4.4 抗生素抗性突变株的分离 将 UV 诱变的孢子悬液分别涂布于含 MIC 浓度的链霉素、红霉素、林可霉素、左氧氟沙星、环丙沙星及 5 种抗生素组合的培养基平板上,所有培养基平板含选定的吡啶橙浓度 28℃培养 9d,生长出的菌落即为抗性突变株。在自发突变条件下,即孢子悬液不经 UV 和吡啶橙复合诱变处理,其它操作跟诱变条件一样,筛选抗性突变株。

2 结果与讨论

2.1 5 种抗生素对出发菌株的最小抑制浓度

所选抗生素对利迪链霉菌 P28 的最小抑菌浓度是在固体培养基上 28℃培养 9d 检测。MIC 的实验结果分别为:链霉素 30 μg/mL,红霉素 2 μg/mL,林可霉素 150 μg/mL,左氧氟沙星 6 μg/mL,环丙沙星 8 μg/mL。5 种抗生素组合的最小抑菌浓度测定均以各抗生素的 MIC 浓度进行组合检测,结果 0.2 倍的组合浓度为最小抑菌浓度(0.2 × MIC)。出发菌株对红霉素、左氧氟沙星、环丙沙星较敏感,对林可霉素的敏感性差得多,对组合浓度则相当敏感。

2.2 吡啶橙对出发菌株 P28 生长的影响

将孢子悬液分别涂于不同吡啶橙浓度的培养基平板,培养 9d,对菌落计数,结果如表 1。考虑到复合诱变会增加致死率,本次实验选择致死率为 20%左右,对应的吡啶橙浓度为 0.3 μg/mL。

表 1 吡啶橙对出发菌株生长的影响

处理剂量(μg/mL)	0	0.2	0.5	1	5	10
菌落数(个)	20	18	13	11	8	3
致死率(%)	0	10	35	45	60	85

2.3 单个和组合链霉素、红霉素、林可霉素、左氧氟沙星、环丙沙星抗性突变对利迪链菌素生物合成的影响

本实验考查在复合诱变处理和自发突变两种条件下抗性突变株的筛选,进一步对比 5 种药品单个及其组合的 MIC 浓度的筛选效果。

2.3.1 自发突变条件下 5 种药品单个和组合的抗性筛选 制备好的单孢子悬液不经诱变处理,分别涂布于含 1 × MIC、2 × MIC、4 × MIC 浓度的链霉素、红霉素、林可霉素、左氧氟沙星、环丙沙星,以及 0.12 × MIC、0.16 × MIC、0.2 × MIC、1 × MIC 组合

浓度的培养基平板,28℃培养 9d。结果如表 2 所示,单个抗生素的 2 × MIC、4 × MIC 浓度及组合 0.2 × MIC、1 × MIC 浓度下没有突变株,1 × MIC 浓度的链霉素、红霉素、环丙沙星也没有突变株。在含 150 μg/mL 林可霉素的筛选平板上有 3 个突变株,在含 6 μg/mL 左氧氟沙星的筛选平板上有 2 个突变株,在含 8 μg/mL 环丙沙星的筛选平板上有 2 个突变株,0.16 × MIC 组合浓度有 6 个突变株,0.12 × MIC 组合浓度有 22 个突变株。从实验结果来看,超过 1 × MIC 浓度极难有突变株生长,即使 1 × MIC 浓度下突变株也极少。所挑选的 35 个突变株经传代复筛,仅有 4 个正突变株,正向突变率为 11.4%,产量最高为左氧氟沙星抗性突变株,96 h 摇瓶发酵单位为 104.3 μg/mL,比出发菌株提高了 15.6%。

表 2 自发突变条件下的抗生素抗性筛选

组别	MIC 浓度	挑选菌落数	正突变株	单株最大增幅
链霉素	30 μg/mL	0	0	0
红霉素	2 μg/mL	0	0	0
林可霉素	150 μg/mL	3	0	0
左氧氟沙星	6 μg/mL	2	1	15.6%
环丙沙星	8 μg/mL	2	0	0
1 × 组合	1 ×	0	0	0
0.2 × 组合	0.2 ×	0	0	0
0.16 × 组合	0.16 ×	6	1	4.6%
0.12 × 组合	0.12 ×	22	2	11.3%

2.3.2 复合诱变条件下 5 种抗生素单个和组合的抗性筛选 单孢子悬液经 UV 照射 3 s,所涂的培养基平板均含 0.3 μg/mL 吡啶橙,其它跟自发突变条件的操作一样,涂布的平板于 28℃培养 9d。结果如表 3 所示,正突变株最多、单株发酵水平增幅最大的均为林可霉素抗性突变株,相对较高的 4 个菌株分别提高 96.2%、66.9%、47.2%、31.3%,其中产量最高的菌株为 L8,经传代至遗传稳定后,96 h 摇瓶培养,最高发酵单位为 177.0 μg/mL,比出发菌株 P28 的 90.2 μg/mL 提高了 96.2%,增幅显著。

跟自发突变相比,复合诱变处理可明显提高菌株的突变几率,有更多的菌落生长,正向突变率也有提高,达 15.0%,尤其是林可霉素筛选得到的正向突变率高达 36.0%。目前关于抗生素抗性突变株的筛选报道,既有诱变处理的^[6],也有自发突变筛选的^[7,8],但均没有对比两种条件下的筛选效果,从

本实验的结果分析,复合诱变处理的正向突变率更高,突变株的生产能力提高幅度更大。

表 3 可以看出,组合条件下正向突变率相当低,可能是多重作用易引发负向突变,就如诱变剂量越大,正变率越低。而部分文献推荐多重抗生素组合^[7,8],从本实验结果中得不到支持,多重抗生素组合可能更有利于负向突变,如阻断突变株的筛选。

实验中观察到一个明显的现象,林可霉素抗性突变株的表型发生了很大变化,突变株菌落重复出现 3 种颜色:黄色、黑色、灰白色。而已有的研究发现,林可霉素抗性突变位点有 3 个^[9],本实验中林可霉素抗性突变株表现出的 3 种颜色进一步验证了这一研究。反之,不同表型的抗性突变株又可用于突变位点及抗性基因的研究。

表 3 UV 和吡啶橙复合诱变条件下的抗生素抗性筛选			
MIC 浓度	挑选菌落数	正突变株	单株最大增幅
链霉素	15	2	15.6%
红霉素	15	3	26.1%
林可霉素	25	9	96.2%
左氧氟沙星	16	2	40.5%
环丙沙星	15	1	15.6%
1 × 组合	0	0	0
0.2 × 组合	5	0	0
0.16 × 组合	11	2	9.5%
0.12 × 组合	31	1	4.6%

2.4 高产菌株 L8 的代谢产物分析

生产能力最高的菌株是林可霉素抗性突变株 L8,摇瓶发酵水平提高了 96.2%,培养 96h 达 177.0 μg/mL。残糖浓度、菌体浓度、pH 等代谢参数的变化趋势与出发菌株 P28 没有明显差异(数据未显示)。为分析突变株增加部分的代谢产物,L8 与出发菌株的摇瓶发酵液经萃取后分别进行 HPLC 测定,如图 2 所示,L8 与出发菌株的 HPLC 峰形非常相似,主峰的保留时间分别为 6.963min 和 7.000min,说明突变株 L8 产量的提高就是利迪链菌素增加的结果。

为进一步分析林可霉素抗性突变株 L8 的代谢产物变化情况,发酵液萃取物进行了 LC/ESI-MS 分析。如图 3 所示,LC/MS 总离子流谱中有一主峰,另外,在 35.58min 和 41.33 min 还有两个小峰,为分析

这些峰对应产物的分子质量,对总离子流谱的 0min ~ 80 min 进行全扫描,对应的 ESI-MS 谱显示,主要代谢产物对应的分子离子为 m/z 600.3 $[M-H]^-$,正好就是利迪链菌素的分子质量(600 D),其它代谢产物的相对吸收度都很小,对应含量很低。所有这些说明 L8 代谢产物的提高就是目的产物利迪链菌素。

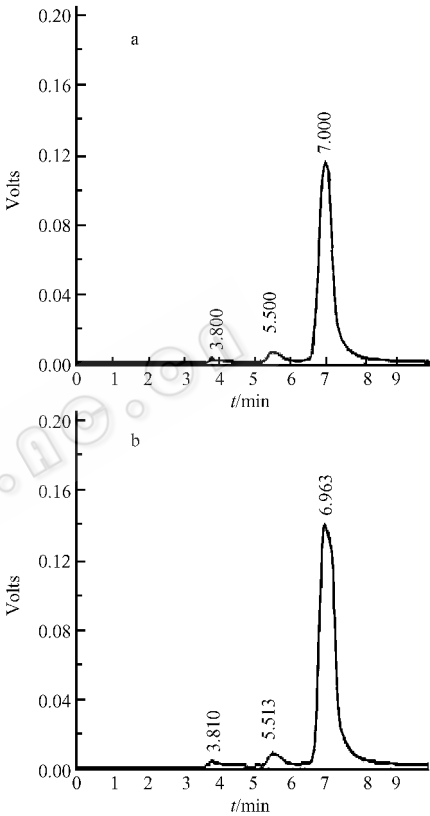


图 2 高产菌株 L8(b)和出发菌株 P28(a) 发酵液萃取物的 HPLC 谱图对比

3 结论

(1)本实验采用 5 种抗菌药最小抑菌浓度作为标记,筛选出大量抗性基因突变株,其中生产能力最高的菌株是利用林可霉素筛选得到的抗性突变株 L8,摇瓶发酵单位为 177.0 μg/mL,比出发菌株 P28 提高了 96.2%。结果证明了利用抗药性突变株选育获得高产菌株的可行性。

(2)实验结果对比显示,复合诱变处理比自发突变条件下的抗性筛选效果好得多,复合诱变处理可明显提高菌株的突变几率,正向突变率高(15.0%)。尤其是利用林可霉素筛选得到的正向突变率高达 36.0%,且多数突变株的产量增幅较大。

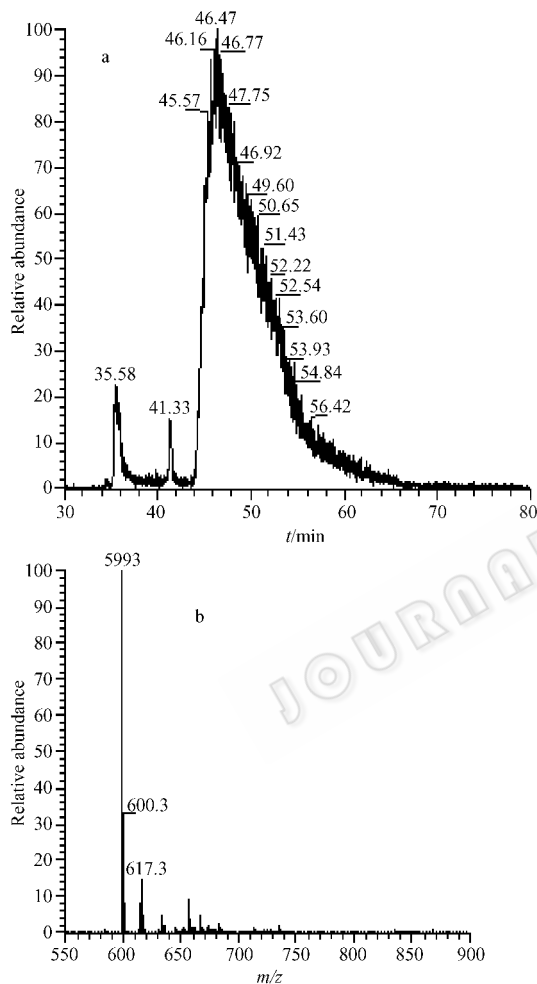


图3 菌株 L8 代谢产物的 LC/ MS 总离子流谱 (a)及全扫描 (0 ~ 80 min) 对应的 ESI-MS 谱 (b)

(3) 5 种抗生素组合的条件下不论高浓度还是低浓度,正向突变率均较低(8.0%),而单个抗生素条件下得到的正向突变率高达 19.4%。因此,单孢子悬液经复合诱变处理,再进行单个抗生素抗性突变株的筛选,可快速、有效地提高菌株的生产能力。

参考文献

- [1] Chen H, Harrison P H. *Org Lett*, 2004, **6**: 4033 ~ 4036.
- [2] Kyzer S, Zhang J, Landick R. *Cell*, 2005, **122**: 494 ~ 496.
- [3] Temiakov D, Zenkin N, Vassilyeva M N, *et al.* *Mol Cell*, 2005, **19**: 655 ~ 666.
- [4] Tuske S, Sarafianos S G, Wang X, *et al.* *Cell*, 2005, **122**: 541 ~ 552.
- [5] Xiao-Bing Li, Qiao Bin, Ying-Jin Yuan. Differential analysis of secondary metabolites by LC/MS following strain improvement of *Streptomyces lydicus* AS 4. 2501. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2006, **45**, in press.
- [6] 涂国全,刘 妹,黎循航. *中国抗生素杂志*, 2002, **27**(6): 321 ~ 325.
- [7] Hu H, Ochi K. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(4): 1885 ~ 1892.
- [8] 胡海峰,越智幸三. *中国抗生素杂志*, 2003, **28**(1): 53 ~ 54.
- [9] Kobayashi H, Nakajima H, Shimizu Y, *et al.* *J Vet Med Sci*, 2005, **67**(8): 795 ~ 800.