

50mL-管摇床培养暨 24 孔板法筛选麦角菌突变株

朱 平 王 全 朱慧新 何惠霞

(中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所 卫生部天然药物生物合成重点实验室 北京 100050)

摘要: 麦角菌原生质体用 0.3mg/mL 亚硝基胍 (NTG) 分别处理 20, 40, 60 和 80min。随机挑取 NTG 处理后的原生质体再生单菌落共 80 个, 分别接种到 50mL 离心管 (内装 10mL 液体培养基) 中, 在 24℃、220r/min 摇床上培养 12d。在紫外灯 (254nm) 下选出 46 株荧光相对较强的培养物在 24 孔板上作 Van Urk 蓝色反应分析。挑选 9 株呈深蓝色反应的菌株作 HPLC 分析, 其结果与 24 孔板法有明显的相关性。在麦角隐亭产率上, No. 45 最佳 (来自 NTG 80min 剂量组), No. 18、No. 26 次之 (来自 NTG 40min 剂量组)。50mL-管摇床培养与 24 孔板法相结合, 有效地提高了筛选速度和成功率。

关键词: 麦角菌, NTG 诱变株, 50mL-管摇床培养, 24 孔板检测, 筛选

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)03-0192-03

50mL-TUBE SHAKING CULTURE AND 24 WELL-PLATE ASSAY FOR THE SCREENING OF ERGOT MUTANTS

ZHU Ping WANG Quan ZHU Hui-Xin HE Hui-Xia

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050)

Abstract: Protoplasts of *Claviceps purpurea* were treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) for 20, 40, 60 and 80min, respectively. Eighty regenerated monoclonies of the NTG treated protoplasts were picked up and inoculated individually in the 50mL-tube containing 10mL of liquid medium, and cultivated on a rotating shaker at 24℃, 220r/min for 12 days. Forty-six isolates which showed stronger fluorescence under UV light (at 254nm) were assayed on the 24 well-plate for their Van Urk blue color reactions. Nine isolates which gave darker blue color were further analyzed by HPLC. The results of HPLC were correspondent with those of the 24 well-plate assay. Three isolates showed relatively higher yields of ergocryptine and the best one was the No. 45, isolated from the 80min dosage group; the other two isolates (No. 18, No. 26) belonged to the 40min dosage group. It was demonstrated that 50mL-tube shaking culture combining with the 24 well-plate assay could increase the screening speed and successful chance.

Key words: *Claviceps purpurea*, NTG induced mutants, 50mL-tube shaking culture, 24 well-plate assay, Screening

麦角碱类药物在临床上主要用于治疗神经内分泌、脑血管系统的疾病 (如老年性痴呆) 以及妇科产后止血, 其原料主要来自麦角菌的生物合成。有关麦角碱生物合成的研究已经取得了较大的进展, 包括近年来一些重要合成酶基

因的克隆^[1~3], 为用基因工程手段进行理性化育种创造了条件。但是, 目前包括麦角菌在内的大多数工业微生物其菌种改良的首选方法仍是

收稿日期: 1999-03-24, 修回日期: 1999-06-07

诱变育种;而筛选工作则一直贯穿于微生物工业化生产的始终,灵活巧妙的筛选方法常常可以取得事半功倍的效果。对于在实验室条件下不易产生分生孢子的麦角菌 *Claviceps purpurea* 我们曾成功地用其原生质体进行了诱变育种^[4]。本文在提高筛选效率上进行了探索,即:将试管摇床培养、24 孔板和常规总碱测定方法(Van Urk 蓝色反应)三者结合起来,筛选麦角菌原生质体 NTG 诱变后麦角隐亭高产突变株,并以 HPLC 方法加以确证。

1 材料与方法

1.1 菌种

麦角菌 [*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.] 94221 为我室保存菌种,作为本实验的初发菌株。

1.2 培养基

1.2.1 液体初筛培养基(g/L):蔗糖 150,柠檬酸 30,酵母膏 0.1, KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.125, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0035, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003, pH5.0~5.4(NH_4OH 调)。

1.2.2 斜面培养基、原生质体再生培养基同文献 [5]。

1.3 实验方法

1.3.1 原生质体制备与再生参见文献 [6]。

1.3.2 NTG 诱变方法:精密称取 NTG,溶于磷酸缓冲液(0.2mol/L, pH6.0)中,使 NTG 浓度为 2mg/mL。分别吸取若干份浓度为 1.31×10^8 个原生质体/mL 的悬液 2mL,参考文献 [4] 各加入 0.55mL 磷酸缓冲液、0.45mL NTG 溶液,使 NTG 终浓度为 0.3mg/mL;对照用 0.45mL 磷酸缓冲液代之。混匀后于 30℃、180r/min 分别处理 20min、40min、60min、80min。用 0.7mol/L KCl 溶液稀释、离心洗涤终止诱变。洗涤后的原生质体经 0.7mol/L KCl 溶液适当稀释后各取 0.1mL 涂布到再生培养基上,26℃ 培养 6~10d。

1.3.3 单菌落试管摇床培养方法:取 50mL 离心管,每管分装 10mL 液体初筛培养基,随机挑取诱变处理后长出的单菌落接种其中。初筛菌

落数各 20 个,以 7 个未经 NTG 处理而再生的单菌落作为对照,摇床培养 12d(24℃、220r/min)后,在 254nm 紫外灯下目测选择荧光较强者进行 24 孔板筛选。

1.3.4 24 孔板筛选方法:在 24 孔板上按文献 [7](略加修改)进行麦角总碱的检测:每孔加培养液 0.2mL,0.1mol/L 硫酸 0.6mL、对二甲氨基苯甲醛试剂(Van Urk 试剂)1.3mL,混匀后置暗处 30min 进行显色反应。选取蓝色反应较强者作 HPLC 分析^[5]。

2 结果

2.1 NTG 不同时间处理后原生质体存活率

原生质体对 NTG 非常敏感,20min 时存活率就降到千分之二(表 1)。诱变处理后(尤其是 80min),再生菌落生长亦较缓慢。

表1 NTG不同时间诱变后原生质体存活率				
处理时间	20min	40min	60min	80min
存活率*	2.18×10^{-3}	3.24×10^{-4}	1.97×10^{-5}	2.74×10^{-6}

*存活率=NTG诱变后的再生菌落数÷对照再生菌落数

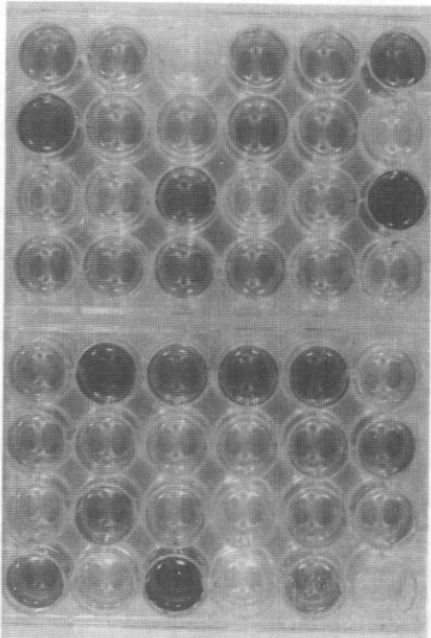


图1 NTG诱变株培养液在24孔板上的 Van Urk蓝色反应
自左上角起从左向右数1~14来自20min组, 15~28来自40min组, 29~39来自60min组, 其余来自80min组, 46、48孔为空白

2.2 50mL-管摇床培养和 24 孔板法筛选结果

经过 12d 的培养,在 254nm 紫外灯下已能大致看出不同菌株之间荧光强弱上的差异,荧光相对较强的菌株均出现在 NTG 处理组,而对照在同样条件下荧光均较弱,根据以往经验荧光强者麦角总碱水平相对较高。选取荧光相对较强的发酵液在 24 孔板上作 Van Urk 蓝色反应检测,结果见图 1。很明显,有 9 个突变株的蓝色反应较深(No.6、No.7、No.15、No.18、No.26、No.27、No.28、No.29、No.45),其中 No.18、No.26 和 No.45 最为显著,而蓝色的深浅反映了不同菌株间产碱水平上的差异。

将上述 9 个菌株的发酵液进一步作 HPLC 分析,筛选麦角隐亭高产变株,初步结果见表 2。说明 24 孔板法与 HPLC 法有较大的相关性,例如相对产率最高的是 No.45,其次是 No.18 和 No.26。

表2 NTG诱变菌株的麦角隐亭相对产率*

菌株编号	相对产率
No.6	246
No.7	281
No.15	96
No.18	354
No.26	355
No.27	86
No.28	120
No.29	144
No.45	513

*相对产率=HPLC峰面积×1/1000

3 讨论

NTG是在诱变育种中经常用到的高效诱变剂之一,条件合适时突变率一般较高,但高产变株的出现仍有一定的随机性。例如本文中的情况,在较低剂量(20min、40min)时产率的正向变异(以荧光强弱、蓝色反应程度为标准)菌株数相对较多(NTG处理40min的剂量最为突出),也确实出现2个相对产率较高的变株(No.18、No.26),但产率提高幅度最大的变株(No.45)却来自 NTG 处理 80min 组。

过去在对麦角菌作诱变处理时一般是把诱变后长出的单菌落接种到固体斜面上,培养一段时间后选择荧光较强的斜面进行摇瓶液体发酵筛选,因而周期相对较长。在抗生素高产变株的初筛过程中常常用固体琼脂块筛选法,此法简便且能加快筛选速度,有的学者已将该方法移植到麦角隐亭产碱菌株的筛选上^[8]。但琼脂块法与液体摇瓶发酵在微环境上相差甚远,因而误差往往比较大。本文试图通过 50mL-管液体摇床培养法尽可能地弥补上述之不足。采用 50mL 试管其微环境类似于摇瓶而体积则减少了许多,可以进行单菌落培养并可以将试管成孔固定在摇床上,增加了单位时间内的筛选数量和获得高产变株的几率。在 24 孔板上应用 Van Urk 蓝色反应法检测麦角碱,简便、直观,适合规模化筛选,进一步提高了初筛的速度。HPLC 检测方法的应用,为获得目的产物高产变株提供了保障。上述菌株的摇瓶发酵复筛与培养条件优化的研究正在进行中,已获得的初步数据与 24 孔板法筛选结果基本一致。

致谢 本研究由浙江海正药业股份有限公司资助。

参 考 文 献

- [1] Tsai H F, Wang H, Gebler J C *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1995, 216(1):119~125.
- [2] Armitz C, Tudzynski P. Curr Gent, 1997, 31:357~360.
- [3] Annis S L, Panaccione D G. Can J Microbiol, 1998, 44:80~86.
- [4] 何惠霞,朱平,李焕姿. 真菌学报,1996,15(3):215~219.
- [5] 朱平,何惠霞,陈世智. 药学报,1997,32(8):629~632.
- [6] 朱平,何惠霞,岳德超. 真菌学报,1992,11(4):272~278.
- [7] 方起程. 药学报,1963,10(12):712~719.
- [8] 钱秀萍,冯慧琴,杨庆尧. 微生物学报,1997,37(1):76~78.