

南昌霉素高产菌株的链霉素抗性基因突变诱变筛选研究*

涂国全** 魏赛金 刘 姝 黎循航

(江西农业大学生物工程系 南昌 330045)

摘要: 通过链霉素对南昌霉素(Nanchangmycin)产生菌 NS-41-80 菌株孢子的致死浓度测定基础上, 采用诱变剂甲基磺酸乙酯(EMS)的不同诱变剂量对菌株孢子进行诱变处理, 诱变处理的孢子涂布在含链霉素($10\mu\text{g/mL}$)致死浓度的高氏平板上, 获得了大量的链霉素抗性基因(*str*)突变株。然后从3,000株链霉素抗性基因(*str*)突变株中通过初筛获得比诱变出发菌株产素能力提高20%以上的菌株202株。再进一步通过摇瓶复筛, 获得比出发菌株产素能力分别提高100%、200%和300%高产菌株为48株, 7株和1株, 分别为复筛菌和初筛菌株的23.76%和1.60%; 3.46%和0.23%; 0.5%和0.03%。将产素能力提高240%以上5个菌株连同出发菌株连续3批次进行摇瓶发酵结果, 5个突变株的产素能力均比出发菌株的产素能力提高57%~96.4%, 其中突变株80-5.3-165菌株摇瓶发酵单位达 $6,000\mu\text{g/mL}$ 以上, 3批次摇瓶平均发酵单位达 $5,855\mu\text{g/mL}$ 。建立了南昌霉素高产菌株的链霉素抗性基因突变诱变快速高效的筛选方法。

关键词: 南昌霉素, 南昌链霉菌, 链霉素抗性基因突变筛选

中图分类号: Q939.92 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2002)05-0010-04

A STUDY ON THE STREPTOMYCIN-RESISTANT (*STR*) MUTATIONAL SCREENING OF HIGH-YIELD NANCHANGMYCIN STRAIN

TU Guo-Guan WEI Sai-Jin LIU Shu LI Xun-Hang

(Department of Bioengineering, JAU, Nanchang 330045)

Abstract: After testing the resistance of streptomycin to NS-41-80 *Streptomyces Nanchangensis* NS-41-80, the spores treated with 4 different dosage of super-mutagen EMS were regenerated on the lethal media, thus 3,000 streptomycin-resistant (*str*) *str* mutants were obtained. Then 202 spore mutants were screened through the pre-screening experiments and their yields are beyond 20% higher than the original strain's respectively. In the re-screening experiments 48, 7 and 1 mutants were obtained whose yields are 100%, 200% and 300% higher than the original strain's respectively and take the percentage of 23.76% and 1.60%, 3.46% and 0.23% and 0.5% and 0.03% of the number of the pre-screened strains and the rescreened strains respectively. Then 5 mutants were fermented whose yields are above 240% higher and the original strain through the continuous 3 batches fermentation, the yields are 57%~96.4% more than the original strain's. Among them the yield of 80-5.3-165 is upwards of $6,000\mu\text{g/mL}$ and its norm is $5,855\mu\text{g/mL}$. And a model of the streptomycin-resistance mutational screening of the strain producing Nanchangmycin was established.

Key words: *Streptomyces Nanchangensis*, Nanchangmycin, The screening of streptomycin-resistance mutants

南昌霉素是从南昌链霉菌发酵代谢产物中分离提取的一种具有杀虫活性的物质, 经结构鉴定是一类多醚类抗生素, 命名为南昌霉素(Nanchangmycin, 简称为N.A)^[1], 对鸡球虫病有特效^[2]。

进行南昌霉素(N.A)高产菌种选育时, 我们突破了常规的诱变随机筛选方法, 而

* 山东胜利股份有限公司资助项目

** 联系人 Tel: (0791) 3813466, E-mail: tuguoquan@263.net

收稿日期: 2001-05-31, 修回日期: 2001-07-14

是应用分子育种中关于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连锁^[3]而易发生共突变 (co-mutation) 理论^[4], 在对诱变出发菌株的孢子进行链霉素抗性基因致死测定的基础上, 采用化学诱变剂甲基磺酸乙酯 (EMS) 进行诱变处理, 使诱变孢子的 DNA 产生高频率突变, 然后将突变孢子涂布在含有链霉素致死浓度的培养基平板上培养, 获得链霉素抗性基因 (*str*) 突变株来筛选南昌霉素高产菌株, 本文报道这一研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 南昌链霉菌 (*Streptomyces nanchangensis*)^[5] NS-41-80 菌株: 本室自行保存。

1.1.2 培养基: ①斜面、平板和茄子瓶培养基: 高氏培养基^[6]。②种子培养基和摇瓶发酵培养基: 均为本实验室自行设计筛选的培养基。

1.1.3 链霉素 (*Streptomycin*): 大连医药集团大连制药厂生产。

1.1.4 诱变剂: 甲基磺酸乙酯 (EMS): 上海试剂一厂生产。

1.2 方法

1.2.1 孢子抗药性测定: 将制备好的出发菌株 NS-41-80 的孢子溶液分别涂布在含有链霉素的浓度不同的高氏平板上, 32℃ 下培养 7~10d, 观察不同平板上的菌落数, 并记录未长菌落的链霉素最低作用浓度, 即为出发菌株链霉素抗性基因的致死浓度。

1.2.2 链霉素抗性基因 (*str*) 突变株的制备及检测: 用 pH6.0 磷酸缓冲液配成的 0.1mol/L EMS 液与用磷酸缓冲液 (pH6.0) 制成的孢子悬浮液混和配制成最终含 EMS 浓度为 0.05 mol/L、0.03 mol/L、0.02 mol/L、0.01 mol/L、0 mol/L 五种不同处理剂量, 在 32℃ 摇床上 200r/min 振荡 3h 后, 用 pH6.0 磷酸缓冲液稀释 10 倍法中止反应。诱变孢子稀释液分别涂布在含致死浓度的链霉素高氏平板上, 32℃ 培养 10d, 分别计算菌落数。

1.2.3 链霉素抗性基因 (*str*) 高产菌株的筛选: (1) 斜面初筛: 将诱变孢子突变单菌落分别随机挑接不同类型菌落到高氏斜面上 32℃ 培养 10d 后, 然后每支斜面分别加 5mL 无水乙醇浸泡过夜, 稀释进行南昌霉素含量化学检测^[6]。(2) 摇瓶发酵复筛: 在 250mL 三角瓶装 30mL 发酵培养基, 分别接种斜面菌块, 32℃ 下 200r/min 发酵 8d 后, 取发酵液 2mL 加 8mL 无水乙醇浸泡 24h, 离心, 取上清液稀释进行南昌霉素含量化学检测^[6]。

2 结果与分析

2.1 孢子抗药性测定

链霉素对 NS-41-80 菌株的孢子的致死浓度测定结果为 10μg/mL。

2.2 链霉素抗性基因 (*str*) 突变株的制备结果

通过不同浓度的 EMS 对 NS-41-80 菌株孢子液的诱变作用, 将各处理浓度的孢子悬液稀释不同倍数后分别涂布在含链霉素致死浓度 (10μg/mL) 的高氏平板上, 32℃ 培养 7~10d, 分别进行不同处理的菌落计数, 凡是在含链霉素致死浓度平板上长出来的菌落均为链霉素抗性基因 (*str*) 突变株, 获得大量的链霉素抗性基因 (*str*) 突变菌落。

2.3 链霉素抗性基因 (*str*) 突变株的筛选

2.3.1 初筛结果: 从 *str* 突变菌落挑接 3,000 余支高氏斜面, 32℃ 培养 10d, 分别测定其每支斜面产南昌霉素 (N.A) 含量, 相对单位比出发菌株提高 20% 以上的菌株作为初

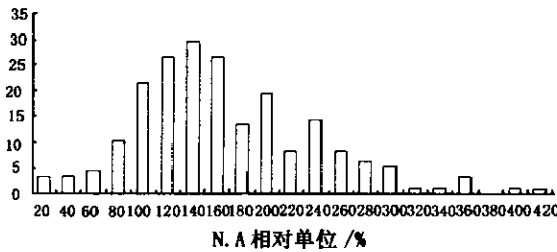


图 1 复筛菌株 N. A 产量的次数分布图

表 1 复筛高产菌株出现频率统计表

比出发菌株 NS-41-80 产素提高百分率	菌株数 (株)	占 202 个复筛菌 株数百分率	占 3,000 株突 变菌株的 百分率
20 以上	135	66.83	4.50
40 以上	106	52.48	3.53
60 以上	80	39.61	2.67
80 以上	67	33.17	2.23
100 以上	48	23.76	1.60
120 以上	40	19.80	1.33
140 以上	26	12.87	0.87
160 以上	18	8.91	0.60
180 以上	12	5.94	0.40
200 以上	7	3.46	0.23
220 以上	6	2.97	0.20
240 以上	5	2.47	0.17
280 以上	2	0.99	0.06
300 以上	1	0.50	0.03

筛入选菌株, 共获得初筛入选菌株 202 余株。

2.3.2 N.A 高产菌株的复筛结果: 初筛入选菌株的摇瓶复筛结果见图 1。根据复筛结果, 高产菌株出现频率统计见表 1。

2.3.3 高产菌株连续 3 批次摇瓶结果: 根据复筛结果选取比出发菌株 NS-41-80 产素提高 240% 的 5 个菌株连续进行 3 批次摇瓶试验, 其试验结果见表 2。根据表 2 的方差分析结果表明, 各供试菌株间差异极显著, 进一步进行差异性多重比较表明, 供试 5 个菌株比出发菌株之间差异极显著, 其平均产素能力比出发菌株分别提高了 96.40%、82.91%、70.36%、69.21% 和 57.11%, 各高产菌株间除了 80-5.3-183 和 80-4.30-77 产素差异不显著外, 其余均达到极显著水平。试验结果获得的最优菌株为 80-5.3-165 菌株。最高发酵单

位达 6,000 $\mu\text{g/mL}$, 3 批次平均发酵单位 5855 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

(1) 通过采用 10 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素致死标记, 获得了大量链霉素抗性基因突变株, 然后进一步从链霉素抗性基因突变株中筛选到南昌霉素的高产菌株 80-5.3-165。在摇瓶发酵条件下, 该菌株南昌霉素发酵单位 3 批次发酵单位达到 5855 $\mu\text{g/mL}$, 比诱变出发菌株 NS-41-80 原发酵单位提高了 96.40%。

(2) 在本试验的菌种选育中, 用理化因子对出发菌株 NS-41-80 进行诱变处理后筛选出链霉素抗性基因突变株, 然后通过摇瓶筛选出高产菌株 (卡那霉素菌种选育之一应用了这种方法), 达到了淘汰野生型、浓缩突变型的目的, 大大地减轻了初筛工作量, 提高了菌种选育的工作效率, 证明该方法是有效的。

(3) 抗生素的生物合成通常在营养生长和形态分化间的过渡期内进行。一个具有潜在意义的微生物调控系统就是由于营养限制而引起的严紧型化学反应, 并进而引起 RNA 的累积和其它细胞反应而立即停止^[7]。人们认为鸟苷四磷酸和鸟苷五磷酸对这种严紧型反应相当重要。根据对几种链霉菌突变株的分析表明, 鸟苷四磷酸在抗生素合成起始起着主要作用^[8]。

最近根据对 *S. coelicolor*^[9] *relC* 基因缺失突变株的分离和分析, 鸟苷四磷酸的合成和抗生素产生之间的明确相互关系被建立。这种突变株完全丧失了生产抗生素的能力。

表 2 南昌霉素高产菌种 3 次摇瓶发酵产素测定结果

菌株 (A)	摇 瓶 培 养	摇瓶批次 (B)			差异显著性				比 CK 提高 %
		I ($\mu\text{g/mL}$)	II ($\mu\text{g/mL}$)	III ($\mu\text{g/mL}$)	T_i	\bar{X}_i	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$	
80-5.3-165	1	5218	5798	6592	52696	5855	a	A	96.40
	2	5680	5860	5991					
	3	5872	5445	6240					
	T_{ij}	16770	17103	18823					
80-5.11-67	1	6397	5264	5483	49078	5453	b	B	82.91
	2	5857	5350	5189					
	3	5206	5068	5264					
	T_{ij}	17460	15682	15936					
83-5.3-183	1	4519	5566	5810	45708	5079	c	C	70.36
	2	4856	5065	4651					
	3	4647	5329	5270					
	T_{ij}	14022	15955	15731					
80-4.30-77	1	5177	4963	4851	45401	5045	d	CD	69.21
	2	5246	5214	4937					
	3	4953	5018	5042					
	T_{ij}	15376	15195	14830					
80-5.3-116	1	4693	4467	4396	42155	4684	e	E	57.11
	2	4894	4683	4778					
	3	4756	4821	4667					
	T_{ij}	14343	13971	13841					
NS-41-80	1	3397	3069	2966	26831	2981	f	F	0
	2	2254	2865	2897					
	3	3238	3120	3025					
	T_{ij}	8889	9054	8888					
CK	T_j	86860	86960	88049	T = 261869				

有趣的是,试验发现由于 *relC* 基因突变而导致的产素能力下降可以通过引入能赋予链霉素抗性的 *str* 突变而被完全恢复。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。而在本试验中,产量提高 20% 的突变株占挑接菌株的 6.73%, 此结果也证明,通过这个新颖育种途径不仅可以得到高产菌株,而且还可以使以惊人的高频率获得高产菌株成为可能,将为提高抗生素产生提供一个方便有效的方法^[10]。

参 考 文 献

[1] 高勇生, 欧阳谅. 江西农业大学学报, 1986, 8 (4): 126 ~ 130.
[2] 涂国全, 高勇生. 欧阳谅. 卫生研究, 1998, 27: 71 ~ 74.
[3] Chater K F, Bruton C.J. EMBO J, 1985, 4: 1893 ~ 1897.
[4] 顾方舟等主编. 生物技术的现状与未来. 北京: 北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1994.
[5] 欧阳谅, 涂国全, 高勇生. 微生物学报, 1984, 23 (2): 195 ~ 199.
[6] 涂国全, 高勇生. 江西农业大学学报. 1990, 15: 90 ~ 96 .
[7] Cashel M, Ruclld E. American Society for Microbiology, 1987, 1410 ~ 1438.
[8] Ochi K.J Bacteriol, 1987, 169: 3608 ~ 3616.
[9] Kelly K, Sykochi G, Jones J H. Bacteriol, 1991, 173: 2297 ~ 2300.
[10] Yoshike H, Susumu. O. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1998, 42: 2041 ~ 2047.