

通过获得链霉素抗性基因突变株筛选小诺霉素高产菌株

涂国全^{1*} 钟承赞² 黄林¹ 黄珞珈² 翁娟²

(江西农业大学生物工程系 南昌 330045)¹ (江西制药有限公司 南昌 330045)²

摘要: 通过链霉素对小诺霉素产生菌 (*Micromonospora purpurea*) 49-12[#] 菌株孢子致死浓度的测定, 采用诱变剂 EMS 3 种不同诱变剂量对菌株的孢子进行诱变处理, 诱变处理的孢子涂布在含链霉素致死浓度的改良高氏平板上, 获得大量的链霉素抗性基因突变株, 然后从链霉素抗性基因突变株进一步筛选小诺霉素高产菌株, 获得小诺霉素菌株 49-12-3 菌株。在摇瓶条件下, 其产小诺霉素生物活性单位比出发菌株 49-12[#] 的摇瓶发酵单位提高了 40% 以上。小诺霉素的组分比由出发菌株的 $C_{2b}:C_{1a}$ 的 5:5 提高到 8:2。 C_{2b} 有效组分提高了 30%; 链霉素抗性基因突变与小诺霉素发酵单位突变之间, 小诺霉素正突变率达到 40%, 负突变率达 26%, 正突变大于负突变。

关键词: 降红小单孢菌, 小诺霉素, 链霉菌抗性基因突变筛选

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0019-04

A Study on the Streptomycin-resistant (STR) Mutational Screening of High-yield Micronomicin Strain

TU Guo-Quan^{1*} ZHONG Cheng-Zan² HUANG Lin¹ HUANG Luo-Jia² WENG Juan²

(Department of Bioengineering, JAU, Nanchang 330045)¹

(The Pharmaceutical Corporation of Jiangxi, Nanchang 330045)²

Abstract: After testing the resistance of streptomycin to *Micromonospora purpurea* No.49-12, a lot of streptomycin-resistant (str) mutants were screened after the spores regenerated on the lethal media when they were treated with 3 different dosage of super-mutagen EMS. We have obtained the high-yield strain 49-12-13 from these str mutants which the productivity is beyond 40% higher than the original strain's in the rotation-flask experiments. The ratio between C_{2b} and C_{1a} in the micronomicin has been increased 5: 5 to 8: 2, the effective component of C_{2b} is 30% more than the original strain's. It was showed that the streptomycin-resistance mutation of the strains had closely relation with the yield mutation of the micronomicin, and the rate of 40% of the positive mutation is larger than the rate of 26% of the negative mutation.

Key words: *Micromonospora purpurea*, Micronomicin, The screening of streptomycin-resistance mutants

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而易发生共突变 (co-mutation) 理论^[1], 在对诱变出发菌株的孢子进行抗链霉素致死浓度测定的基础上, 采用化学诱变剂甲基磺酸乙酯 (EMS) 进行诱变处理, 使诱变的孢子 DNA 产生高频率突变, 将突变的孢子涂布在含链霉素致死浓度的培养基平板上进行培养, 获得链霉素抗性基因 (str) 突变株来筛选小诺霉素高产菌株。本文报道这一初步研究结果。

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

作者还有: 江兵²

收稿日期: 2003-07-22, 修回日期: 2003-09-18

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种：降红小单孢菌 (*Micromonospora purpurea*) 49-12[#]，指示菌：短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 均为江西制药厂自行保存。

1.1.2 培养基：斜面、平板和茄子瓶培养基：改良高氏培养基；生测培养基：牛肉膏蛋白胨培养基、种子培养基和摇瓶培养基均由江西制药厂自行设计筛选的培养基。

1.1.3 链霉素：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 链霉素抗性基因 (*str*) 突变株的制备：(1) 链霉素对 49-12[#] 菌株孢子的致死浓度的测定：将制备好出发菌株的孢子悬液涂布在不同浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 链霉素的改良高氏平板上，37℃培养 9~10 d，观察平板上的菌落数，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上未长出菌落时，后一个浓度即为抗生素对出发菌株的孢子致死浓度。(2) *Str* 突变株的制备：用 pH7.8 磷酸缓冲液配成 0.1 mol/L EMS 浓度为 0、0.004、0.006、0.008 mol/L 4 种不同处理剂量，在 32℃摇床上振荡 3h，用磷酸缓冲液稀释 10 倍中止反应，诱变孢子稀释液分别涂布在含致死浓度的链霉素和不含素的改良高氏培养基平板上，37℃培养 9~10 d，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。

1.2.2 *str* 突变株高产菌株的筛选：(1) 摇瓶初筛：将诱变的突变菌落分别挑接在改良高氏斜面上 37℃培养 9~10 d，即成突变株斜面培养体，然后在 250mL 三角瓶装 30 mL 摇瓶发酵培养液，分别接种斜面菌块，32℃、220 r/min 发酵 5d，发酵液用 H_2SO_4 酸化到 pH 1.6~1.7，离心取上清液用磷酸缓冲液稀释。(2) 摇瓶复筛：取初筛入选菌株再进行二级摇瓶发酵复筛。

1.2.3 小诺霉素生物检测法：二剂量法^[2]。

1.2.4 小诺霉素组分比检测：采用硅胶薄板层析板检测，氯仿：甲醇：氨 = 1: 1: 2 展层，碘显色。

2 结果与分析

2.1 链霉素抗性基因 (*str*) 突变株的制备

2.1.1 链霉素对 49-12[#] 菌株孢子致死浓度测定结果：链霉素对 49-12[#] 菌株孢子致死浓度测定结果见表 1。

表 1 链霉素对 49-12[#] 菌株孢子致死浓度测定

链霉素浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	10	16	18	20	22	24	26	28
菌落生长情况	+++	++	++	+	+	-	-	-

注：+ 为有菌落生长，- 为无菌落生长

表 1 结果表明：链霉素对 49-12[#] 菌株孢子的致死浓度为 24 $\mu\text{g/mL}$ ，以此为致死抗药性突变标志。

2.1.2 EMS 对 49-12[#] 菌株孢子诱变：通过 3 种不同浓度的 EMS 对 49-12[#] 菌孢子液的诱变作用，将各种处理浓度的孢子悬液稀释不同倍数后分别涂在含链霉素 (24 $\mu\text{g/mL}$) 改

良高氏平板上和不含链霉素的改良高氏平板上, 37℃培养 9~10 d, 分别作菌落计数, 凡是在含链霉素 (24μg/mL) 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, 其诱变结果见表 2。

表 2 不同浓度 EMS 对 49-12⁺ 菌株孢子的致死率与突变率

EMS 诱变 终浓度 (mol/L)	不含链霉素改良高氏平板			含链霉素 (24μg/mL) 改良高氏平板		
	菌落数 (10 ⁶ 个/mL)	存活率 (%)	存活率的 对数 (log)	致死率 (%)	突变菌落数 (个/mL)	突变率 (%)
0	53	100	2	0	0	0
0.004	46	86.8	1.94	13.2	145	0.000315
0.006	42	80.4	1.90	19.6	182	0.000433
0.008	40	76.6	1.88	23.4	50	0.000125

2.2 小诺霉素高产菌株的初筛结果

2.2.1 小诺霉素 (*Str*) 突变株高产菌株的筛选结果: 从不同浓度 EMS 对 49-12⁺ 菌株孢子诱变后在含链霉素 (24μg/mL) 致死浓度平板上长出来的抗性突变菌落中, 挑取 300 个左右菌落, 分别接入改良高氏斜面培养基中, 37℃培养 9~10 d, 弃去不产孢子及污染菌株斜面, 通过 4 次摇瓶发酵以后, 经生物检测发酵单位, 以诱变出发菌株的发酵单位为 100 来换算突变株的相对发酵单位, 其摇瓶统计结果见表 3。

根据表 3 的统计结果, 分别以相对发酵单位 90~110 为发酵单位为突变型, 相对单位在 90 以下为发酵单位负突变型和相对单位在 110 以上为正突变型, 3 种类型其分布频率分别为 26.82%、33.33% 和 39.85%, 见图 1。

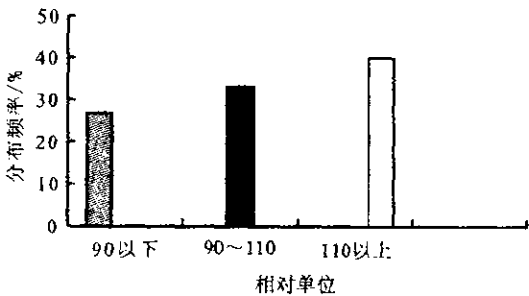


图 1 抗药性基因突变发酵单位正、负和未突变的分布频率

▨ 负突变型, ■ 未突变型, □ 正突变型

根据抗药性基因突变株摇瓶初筛结果, 其小诺霉素发酵单位正突变型大于负突变型, 其摇瓶发酵单位比诱变出发菌株提高了 40%~60% 的菌株数达到 6.51%。

2.2.2 *str* 突变株高产菌株小诺霉素组分比测定: 根据摇瓶初筛结果, 选取比诱变出发菌株的发酵单位提高 30% 的高产突变株 19 株进行小诺霉素组分比测定, 其测定结果见表 4。

表 3 小诺霉素抗药性突变株初筛相对单位产量分布统计

相对单位	菌株数	分布频率 (%)
30~40	1	0.38
40~50	8	3.07
50~60	9	3.45
60~70	11	4.21
70~80	25	9.58
80~90	33	12.64
90~100	43	16.48
100~110	27	10.34
110~120	42	16.09
120~130	27	10.34
130~140	18	6.70
140~150	14	5.36
150~160	14	1.15
合计	261	100.00

表 4 高产菌株小诺霉素组分比测定

菌株编号	组分比 $C_{2b}:C_{1a}$	摇瓶发酵单位 ($\mu\text{g/mL}$)	相对发酵单位
49-12-1	4:6	1396	130
49-12-3	8:2	1250	140
49-12-15	7:3	1250	140
49-12-18	4.5:5.5	1278	144
49-12-27	6:4	1336	150
49-12-30	5:5	1396	130
49-12-32	6:4	1250	140
49-12-34	5:5	1270	143
49-12-44	6:4	1306	146
49-12-45	5:5	1427	133
49-12-56	4.5:5.5	1306	146
49-12-61	4.5:5.5	1492	139
49-12-63	5:5	1559	145
49-12-71	5:5	1250	140
49-12-73	5:5	1559	145
49-12-76	4.5:5.5	1492	139
49-12-82	3:7	1427	133
49-12-90	5:5	1703	159
49-12-92	5:5	1459	136
49-12-94	5:5	1492	139
49-12* 对照	5:5	(890) (1072)	100

根据表 4 测定 19 个菌株结果, 小诺霉素组分比 $C_{2b}:C_{1a}$ 比对照菌株 49-12* 提高有 5 株, 其中 49-12-3 和 49-12-15 两个菌株的 $C_{2b}:C_{1a}$ 的组分分别达到 8:2 和 7:3, 与对照相同组分的有 9 株, 比对照菌株的组分比降低的有 5 株, 其中 49-12-82 菌株的 $C_{2b}:C_{1a}$ 比为 3:7。

3 讨论

本文采用通过获得链霉素抗性基因 (*str*) 突变株来筛选小诺霉素高产菌株的方法, 在 261 个链霉素抗性基因突变株中的摇瓶筛选中不仅获得了小诺霉素摇瓶发酵单位比出发菌株的发酵单位提高近 60% 3 株, 占初筛菌株的 1.15%, 而且在高产菌株中小诺霉素的组分比 $C_{2b}:C_{1a}$ 比出发菌株的 C_{2b}

组分提高了 30%, $C_{2b}:C_{1a}$ 比达到 8:2, 通过统计分析表明, 链霉素抗性基因突变与产素突变密切相关, 比出发菌株发酵单位提高的正突变大于比出发菌株降低发酵单位的负突变。

本文作者在南昌霉素、梅岭霉素和土霉素的高产菌株的选育研究中均采用通过获得链霉素抗性基因突变株来筛选高产菌株, 均取得非常满意的结果^[4-7]。采用抗药性基因突变诱变筛选方法, 大幅度地淘汰了野生型, 浓缩了突变型, 极大地减少诱变筛选的工作并提高了工作效果。在很大程度上克服了诱变随机筛选的盲目性和不定向性, 使诱变突变株真正成为眼睛看得见, 手摸得着的东西。

本研究仅对 49-12* 菌株抗性突变株的高产菌株进行了摇瓶初筛, 复筛和上罐发酵试验还在进行之中。

参 考 文 献

[1] Chater K F, Bruton C J. EMBOJ, 1985, 4: 1893 ~ 1897.
[2] 周德庆主编. 微生物学实验手册. 上海: 科学技术出版社, 1986.
[3] 涂国全, 刘 姝. 中国抗生素杂志, 2002, 27 (6): 321 ~ 326
[4] 涂国全, 魏赛金, 会学琴, 等. 微生物学通报, 2002, 29 (5): 10 ~ 14.
[5] 涂国全, 刘 姝, 黎循航. 微生物学通报, 2002, 29 (6): 33 ~ 37.
[6] 郭美锦, 涂国全, 曹秀香. 中国抗生素杂志, 200, 25 (4): 260 ~ 262.
[7] 杨东清, 陈冠群, 陈 巍, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (4): 29 ~ 32.