

金霉素链霉菌诱变育种的研究

汤建中 王伯平 胡树藩 龚淑贞 李蓉仙

(上海第三制药厂抗菌素研究所, 上海)

目前,在抗菌素生产的育种工作中,使用物理和化学等强烈的诱变因素仍是提高突变频率和扩大变异范围的有效方法。本文报道以金霉素链霉菌为材料,用亚硝基胍做诱变剂进行诱变的结果。

材 料 和 方 法

一、菌株

金霉素链霉菌 (*S. aureofaciens*) 2-4。

二、培养基

1. 斜面培养基(%): 麸皮 3.5, 琼脂 2, pH

自然。

2. 分离培养基(%): 面粉 2, 蛋白胨 0.05, KH_2PO_4 0.08, 琼脂 2, pH 自然。

3. 种子培养基(%): 淀粉 4, 花生粉 2, 酵母粉 0.5, 蛋白胨 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3, MgSO_4 0.025, KH_2PO_4 0.025, NaBr 0.2, CaCO_3 0.4, pH 自然。

4. 发酵培养基(%): 淀粉 10, 花生粉 4, 蛋白胨 1.4, 酵母粉 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25, MgSO_4 0.025, NaBr 0.2, CaCO_3 0.5, 2-巯基苯骈噻唑 0.0015, α -淀粉酶 0.02, pH 自然。

5. 完全培养基(%): 蛋白胨 0.3, 淀粉 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25, KH_2PO_4 0.04, MgSO_4 0.025, 琼脂 2, pH 自然。

6. 基本培养基(%): 葡萄糖 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.1, K_2HPO_4 0.01, NaCl 0.01, 琼脂 2, pH 6.5。

三、培养条件

微生物在斜面及平板上的培养均为 37℃, 培养时间为 4—5 天, 种子及发酵的实验均在 28℃, 每分钟 220—240 转的旋转式摇床上进行。其中种子培养时间为 20 小时左右, 接种量为 8% (体积/体积), 发酵培养时间 8 天, 取样后用比色法测定四环素效价, 在基本培养基和完全培养基上培养 2 天后观察生长情况。

四、营养缺陷型的鉴定采用影印法^[1]。

五、诱变因素和处理方法

称取一定量 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (简称 NTG) 溶于甲酰胺中, 诱变处理时将单孢

子悬浮液, 0.05M 不同 pH 的三羟甲基氨基甲烷-马来酸 (简称 TM) 缓冲液和 NTG 组成诱变反应系统, 在 28℃ 振荡一小时后, 以 2% 硫代硫酸钠中止作用。

实验结果

一、用不同浓度 NTG 处理后的诱变效应

用不同浓度 NTG 处理对金霉素链霉菌诱变效应的结果见表 1。

实验表明, 用不同浓度的 NTG 处理金霉素链霉菌, 其死亡率随着处理浓度的上升而上升, 但从营养缺陷型发生率、形态变异率及正变菌株突变率来看, 以 NTG 浓度在 300—400 微克/毫升范围内最好, 其正变菌株突变率可达 60% 左右。

二、用 NTG 处理不同时间对金霉素链霉菌诱变的影响

当 NTG 处理浓度为 300 微克/毫升时, 进

表 1 NTG 对金霉素链霉菌诱变的影响

结 果 NTG 剂量*	指 标	死 亡 率 (%)	营养缺陷型菌株		形态变异菌株**		正 变 菌 株	
			测 定 数 (株)	发 生 率 (%)	测 定 数 (株)	变 异 率 (%)	测 定 数 (株)	突 变 率 (%)
50		33.4	160	0	81	1.6	28	7.1
100		87.5	165	0.6	65	9.2	30	6.67
200		92.5	587	0.17	587	6.8	33	27.5
300		93.8	266	1.5	266	10.9	31	63.8
400		93.3	265	2.6	265	12.4	35	60
500		96.3	454	0.2	454	8.8	38	28.9

* 单位为 50 微克/毫升。

** 形态变异率的指标以诱变后产生的光秃型、弱型、角变和基质菌丝色素变异的菌落来统计。

表 2 不同处理时间对诱变效果的影响

诱变时间 (分)	死亡率 (%)	营养缺陷型菌株		形态变异菌株		正 变 菌 株	
		测定数(株)	发生率(%)	测定数(株)	变异率(%)	测定数(株)	突变率(%)
15	73.2	145	0	145	28.9	40	5
30	89.5	132	0.75	132	31.2	193	7.7
60	95.95	134	0.74	134	29.4	118	16.1
90	97	128	0.78	128	14.3	213	15.4
120	99.89	136	1.4	136	16.6	44	15.8
150	99.992	118	0.84	118	16.6	32	6.2

表3 NTG在不同pH的缓冲液中诱变的结果

产量突变频率(%)		初筛菌株的效价为出发菌株的百分比(以出发菌株效价为100%)							
诱变条件及pH		60以下	60-70	70-80	80-90	90-100	100-110	110-120	120-130
NTG 300 微克/毫升 28℃ 振荡 一小时	5.0	1.8		3.6	40	38.2	9.1	7.3	3.4
	6.0	6.9	3.4	6.9	3.4	20.8	41.4	13.8	
	7.0	5.0	2.5	12.5	20	47.5	10	2.5	
	8.0			13	52.2	30.5	4.3		
	9.0			3.4	24.1	58.7	13.8		
自然分离					10	33.3	50	6.7	

表4 NTG在不同pH的TM缓冲液中对诱变效应的影响

诱变条件及pH (诱变条件同表3)	死亡率 (%)	营养缺陷型菌株		形态变异菌株		正变菌株	
		测定数(株)	发生率(%)	测定数(株)	变异率(%)	测定数(株)	突变率(%)
6.0	75.7	233	3.0	310	7.4	54	46.2
7.0	88.6	250	4.0	267	11.7	59	33.9
8.0	96.5	203	6.4	140	24.3	61	29.5

表5 NTG在不同剂量及pH时对金霉素链霉菌诱变

诱变因素及pH		死亡率 (%)	营养缺陷型菌株		正变菌株	
			测定数(株)	发生率(%)	测定数(株)	突变率(%)
NTG 100 微克/毫升 28℃, 振荡一小时	6.0	26.9	138	0.72	30	60.0
	7.0	35.4	157	0.63	41	12.2
	8.0	41.5	146	2.05	39	18.0
NTG 300 微克/毫升 28℃, 振荡一小时	6.0	78.7	184	5.4	38	57.8
	7.0	93.12	195	5.64	38	8.0
	8.0	99.89	189	6.87	36	11.1

行不同时间诱变处理的结果见表2。

从实验结果看出, NTG在处理时间上, 以60分为宜。

三、NTG在不同pH的TM缓冲液中的诱变效应

1. NTG在不同pH的TM缓冲液中对抗菌素产量的影响: NTG在不同pH的TM缓冲液中对菌进行诱变后, 初筛突变株的产量分布见表3。

结果表明, 当NTG在一定剂量和作用时间下, 从产量突变范围看, 在pH 6的条件下产量变异幅度较大, 正变菌株突变频率最高, 可达

58.6%。

2. NTG在不同pH的TM缓冲液中诱变后与致死率, 正变菌株突变率、营养缺陷型发生率以及形态变异率间的关系: 结果见表4。

结果表明, 在不同条件下, 营养缺陷型发生率和形态变异率随着作用的pH上升而提高, 正变菌株突变频率则随着作用的pH上升而下降, 而致死率随着pH的上升而上升。

3. NTG在不同剂量和不同pH条件下诱变链霉菌与致死率, 正变菌株突变率和营养缺陷型发生率间的关系: 结果见表5。

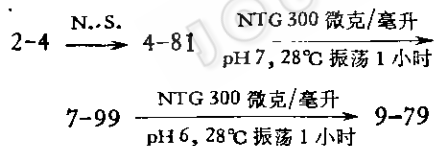
结果表明, NTG的作用剂量无论高或低,

当在不同 pH 条件下作用时,在致死率、正变菌株突变率和营养缺陷型发生率间同样存在着上述关系。

四、金霉素链霉菌 9-79 突变株的选育

1. 从原生产菌株 2-4 的自然分离中获得的 4-81 菌株经 NTG 300 微克/毫升、pH 7 TM 缓冲液中于 28℃ 振荡一小时后得到的 7-99 突变株再经过 NTG 300 微克/毫升、pH 6 TM 缓冲液中于 28℃ 振荡一小时后获得的 9-79 突变株,其产量比 2-4 菌株提高 14%,经多次实验后仍很稳定。投入生产后,发酵水平比 2-4 菌株有很明显的提高。9-79 菌株和 2-4 菌株经摇瓶初,复筛选后,9-79 菌株比 2-4 菌株产抗菌素效价平均提高 8.1%。

2. 金霉素链霉菌 9-79 突变株选育的过程:



讨 论

我们将 NTG 在 pH 6 的条件下对金霉素链

霉菌进行诱变时,正变菌株的突变率一般可达 50% 左右,大大超过了其它试验的 pH 值正变菌株的突变率。而 NTG 在 pH 8 的条件下作用时,由于其分解物对金霉素链霉菌产生强烈的致死作用,同时对诱发形态突变型和生化突变型菌株的频率比 pH 偏酸性条件下作用时有很大提高。另外,在 NTG 的诱变效应中,无论在那一种 pH 的条件下,我们都采用了较高的剂量,致死率一般都在 90% 以上,而引起的变异幅度也较大,我们在得到的高产突变株 7-99 和 9-79 菌株中,使用 NTG 的剂量使致死率都达到 90% 左右,并且在获得的生化突变型菌株的类型也较多,除了大部分为精氨酸缺陷型外,还有其它几种氨基酸缺陷型和维生素缺陷型,这些可能是由于经 NTG 诱变后引起的遗传性状突变范围广的缘故。

参 考 文 献

- [1] Lederberg, J. and E. M. Lederberg: *J. Bact.*, **63**: 399. 1952.