

NTG - LiCl 复合诱变选育链霉菌 702 菌株

涂璇 周云 叶荣华 涂国全*

(江西农业大学 生物科学与工程学院 江西 南昌 330045)

摘要: 为筛选出产新农抗 702 的高产链霉菌 702 突变株。分别以链霉菌 702 菌株为试验材料和以庆大霉素为敏感抗生素, NTG - LiCl 复合诱变链霉菌 702 菌株, 获得抗庆大霉素突变株。NTG 处理 90 min 对菌株的致死率可达 71.56%, 抗药性突变率高达 19.46%, 获得的抗药性突变株经过摇瓶初筛和复筛, 获得高产突变株 13 - 18 - 52 菌株, 产抗新农抗 702 的摇瓶发酵单位达到 1 946 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 比出发菌株发酵单位 1 416 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高了 37.43%。采用抗药性致死突变标志的 NTG - LiCl 复合诱变筛选模型可以获得产新农抗 702 的链霉菌 702 高产菌株。

关键词: NTG; LiCl; 复合诱变; 链霉菌 702; 新农抗 702

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000 - 2286(2010)04 - 0808 - 05

Mutation Screening of *Streptomyces* 702 by NTG and LiCl

TU Xuan ZHOU Yun ,YE Rong-hua , TU Guo-quan *

(Biological Science & Engineering College ,Jiangxi Agricultural University ,Nanchang 330045 ,China)

Abstract: Purpose: To screen out a *Streptomyces* 702 strain of high yield of New Ag - antibiotics 702. Methods: Gentamycin - resistance mutational labelling selection model with *Streptomyces* 702 strain was used as the experimental material and Gentamycin as sensitive antibiotic to screening high - yield mutants. The *Streptomyces* 702 spores was treated by NTG - LiCl composite mutation. Results: The results showed that the gentamycin - resistance mutational frequency of the *streptomyces* 702 treated by NTG - LiCl with 90 minutes was up to 19.46% and the lethal rate was 71.56%. High New Ag - antibiotics 702 - producing mutant 13 - 18 - 52 was isolated in the screening experiments, and its yield of New Ag - antibiotics 702 reached 1946 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which was 37.43% higher than that produced by its parent strain. Conclusion: The *Streptomyces* 702 strain of high New Ag - antibiotics 702 could be obtained by NTG - LiCl composite mutation and resistance - chemical mutational labelling selection model.

Key words: NTG; LiCl; composite mutation; *Streptomyces* 702; new ag - antibiotics 702

江西农业大学生物科学与工程学院应用微生物研究室在以棉花枯萎病菌为靶目标开展农抗生产菌的分离筛选研究中,从土壤中分离筛选到一株链霉菌,编号为 702,其产生的生物活性物质对棉花枯萎病菌有较强的抑菌活性^[1]。而且发酵液中生物活性物质在 pH3 ~ pH12 条件下稳定,耐热性强,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 h, 121 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 h, 其抑菌活性不会减弱^[2-3]。这些初步研究结果已显示了其作为杀菌剂的广阔前景。从该菌的发酵产物中分别分离提取、纯化其抗细菌和抗真菌活性物质单体组分,经紫外、红外、质谱和核磁共振谱测定结果表明,抗细菌活性物质为 9 种氨基酸组成的环肽,分子量 1 269.65 ku

收稿日期: 2009 - 08 - 29 修回日期: 2010 - 06 - 17

基金项目: 江西省科技支撑计划项目(2009BNA07200)

作者简介: 涂璇(1986 -)女,硕士生,主要从事微生物次级代谢产物研究, E-mail: tuxuan1986@163.com; * 通讯作者: 涂国全,教授, E-mail: tuguoquan@263.net。

和分子式 $C_{62}H_{84}N_{12}O_{17}$ 为国内首次发现和鉴定,命名为“红谷霉素”^[4];所产抗真菌活性物质的分子量 694 ku 和分子式 $C_{38}H_{62}O_{11}$,为一种新型大环内酯类抗生素^[5],简称“新农抗 702”。新农抗 702 对霉菌、酵母菌和 14 种植物病原真菌的 EC_{50} 为 0.26 ~ 4.13 mg/L、 EC_{90} 为 1.95 ~ 20.78 mg/L。其中对纹枯病菌和水稻稻瘟病菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 分别为 1.88 ~ 12.51 mg/L 和 7.03 ~ 29.36 mg/L。但是链霉菌 702 产新农抗 702 产量较低,还不能达到工业生产的要求。

氯化锂是一种碱金属卤化物,其本身并无诱变作用,但在抗生素产生菌的诱变育种中表明与一些诱变因子具有协同作用^[6-7]。据报道,采用氯化锂前处理的诱变效果较好^[8-9]。LiCl 在一定浓度范围内,有利于菌体突变的发生。诱变剂的复合处理常常呈现一定的协同效应,因此,本文在筛选平皿中加入质量浓度 0.1% LiCl,对链霉菌 702 进行复合诱变,通过抗庆大霉素突变株的摇瓶筛选,获得其所产抗真菌生物活性物质的高产突变株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 供试菌种链霉菌 702 (*Streptomyces* 702) 由江西农业大学生物科学与工程学院应用微生物实验室分离筛选获得,甘油冻存管保存;抑菌测定指示菌桔青霉 (*Penicillium citrinum*) 由本实验室保存。

1.1.2 培养基 供试斜面、平板培养基: PDA 培养基;指示菌斜面、平板培养基: PDA 培养基;种子培养基和发酵培养基均为本实验室自行设计筛选的培养基。

1.1.3 抗生素 庆大霉素: 上海华美生物工程公司;纳他霉素(含量 50%): 购自北京东方瑞德生物技术有限公司。

1.1.4 诱变剂 亚硝基胍 (NTG): 购自上海试剂一厂;LiCl (分析纯)。

1.1.5 原料和试剂 玉米粉、玉米淀粉、黄豆饼粉、 KNO_3 (分析纯)、NaCl (分析纯)、 K_2HPO_4 (分析纯)、无水乙醇 (分析纯) 等。

1.1.6 仪器和器皿 250 mL 三角瓶、移液管、培养皿、试管、摇床、微波炉等。

1.2 方法

1.2.1 诱变出发菌株的自然分离 链霉菌 702-H-13 菌株在 PDA 斜面 30 °C 培养 5 ~ 7 d,将其制备成单孢子悬液,10 倍稀释法稀释涂布于 PDA 平板上,30 °C 培养 5 ~ 7 d,待平板上菌落长出 1 ~ 2 d,选取不同形态的单菌落,用打孔器将单菌落打孔形成琼脂块,放入空白平皿内,保持一定湿度 30 °C 培养 1 ~ 2 d,将小室中培养好的单菌落琼脂块置于双层检测平板,30 °C 下培养 24 h,菌落产新农抗 702 抑制指示菌桔青霉生长,产生清晰抑菌圈,测定抑菌圈大小,挑选抑菌圈较大的菌落接于 PDA 斜面,30 °C 培养 5 ~ 7 d,低温保存备用。摇瓶筛选并检测发酵液中新农抗 702 的生物效价。

1.2.2 庆大霉素对出发菌株孢子致死浓度的测定 将制备好的出发菌株孢子悬液涂布于含不同浓度庆大霉素的 PDA 平板上,30 °C 培养 5 ~ 7 d,观察不同平板上的菌落数,并记录不同抗生素作用浓度。凡是在前一个低浓度平板上长出菌落而在后一个较高浓度平板上未长出菌落的,后一浓度即为庆大霉素对出发菌株的孢子的致死浓度。

1.2.3 复合诱变剂量的测定 称取 0.1 g NTG 加助溶剂甲酰胺或丙酮 1 mL,然后加 0.2 M pH6.0 磷酸缓冲液溶液 9 mL,配制成 10 mg/mL 的 NTG 母液溶液。取 1 mL NTG 母液加入制备好的菌株 H-13 孢子悬液 4 mL,配制成 2 mg/mL LNTG 溶液,在 (28 ± 2) °C,180 r/min 条件下分别作用 0,30,60,90,120,150 min。将经 NTG 处理的孢子悬液用冷的生理盐水大量稀释终止反应,取孢子悬液 0.1 mL 涂布于含致死浓度的庆大霉素及质量浓度 0.1% LiCl 的 PDA 平板上和不含庆大霉素的 PDA 平板上,30 °C 培养 3 ~ 4 d,至长出成熟菌落,计算致死率和突变率。

$$\text{致死率} = 1 - \frac{\text{复合诱变处理的孢子液在不含庆大霉素平板上生长的菌落数}}{\text{未经复合诱变处理的孢子液在不含庆大霉素平板上生长的菌落数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{突变率} = \frac{\text{复合诱变处理的孢子液在含庆大霉素平板上生长的菌落数}}{\text{未经复合诱变处理的孢子液在不含庆大霉素平板上生长的菌落数}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.4 抗药性突变株的制备 根据 1.2.3 实验步骤,对菌株 H-13 孢子悬液进行诱变处理 90 min,取诱变后的孢子悬液 0.1 mL 涂布于含质量分数 0.1% LiCl 和致死浓度庆大霉素的 PDA 平板上,30 ℃ 培养 3~4 d,生长出的单菌落即为庆大霉素抗性突变株,计算菌落数并将单菌落挑接于 PDA 斜面上 30 ℃ 培养 5~7 d,待斜面孢子丰满,置于 4 ℃ 冰箱保存。

1.2.5 抗药性突变株高产菌株的筛选 初筛:将突变株接入 PDA 斜面进行培养保存,同时将这些菌株挑菌块分别接种于 40 mL 发酵培养基中,30 ℃,200 r/min 回转式摇床振荡培养 144 h 后,取样用无水乙醇浸提 24 h,并进行生物活性检测。复筛:通过活性比较,选出活性比较高的菌株作为初筛入选菌株进行二级摇瓶发酵复筛,并进行生物活性检测。

1.2.6 链霉菌 702 所产新农抗 702 生物效价测定 - 剂量法

发酵液效价的标定以 Natamycin 作为对照抗生素,采用——剂量法^[10-11]在桔青霉指示菌平板上进行抑菌测(表 1)。以对照抗生素浓度为纵坐标,以校正后的抑菌圈直径为横坐标,得到对照抗生素的标准曲线和线性回归方程,如图 1 所示。链霉菌 702 发酵液用无水乙醇稀释浸提、离心。上清液稀释到一定倍数后,作为抑菌测定液,按照对照抗生素标准曲线的制备方法求得发酵液的抑菌圈直径平均值的校正值,再根据相应标准曲线和发酵液样品的稀释倍数,求得每毫升样品所含新农抗 702 的效价。

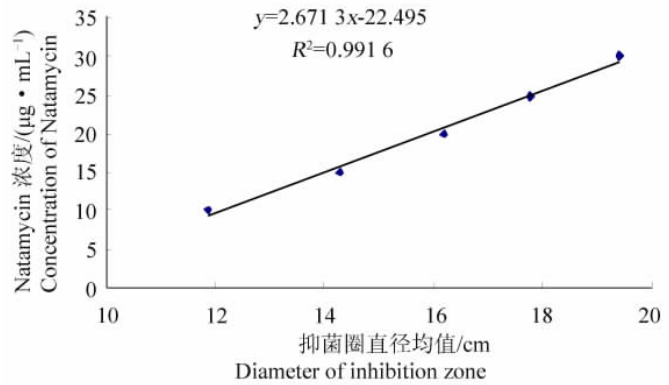


图 1 Natamycin 标准曲线的测定

Fig. 1 The standards curves of formaldehyde concentration of Natamycin

表 1 Natamycin 标准曲线的测定

Tab. 1 The determination of Natamycin standards curve

Natamycin 浓度/(µg · mL ⁻¹) Concentration of Natamycin	10	15	20	25	30
抑菌圈直径均值/mm Diameter of inhibition zone	11.87	14.29	16.20	17.77	19.41

2 结果与分析

2.1 出发菌株的自然分离

对链霉菌 H-13 单孢子悬液进行稀释并涂布于 PDA 平板上,30 ℃ 培养 3~4 d 生长出单菌落,挑接了不同类型的菌落 166 个,以桔青霉为指示菌,测定其抑菌圈,按抑菌圈直径进行分布频率统计,绘制频率分布图,如图 2 所示。从中挑取抑菌圈较大的 25 个菌株进行摇瓶筛选,结果选出编号 H-13-18 菌株效价为 1 416 µg/mL 作为诱变出发菌株。

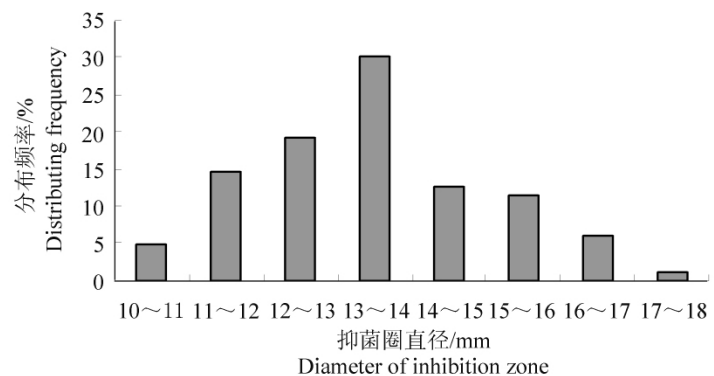


图 2 菌株 H-13 自然选育抑菌圈的频率分布

Fig. 2 The frequency of inhabitation zone of strain H-13 natural selection

2.2 庆大霉素对菌株 13-18 孢子的致死浓度测定

由表 2 可知,庆大霉素对 13-18 菌株孢子的致死浓度为 4 µg/mL,以此为菌株 13-18 抗药性致死突变标志。

表 2 庆大霉素对菌株 13 - 18 孢子的致死浓度测定
Tab. 2 The gentamycin lethal concentration test of strain 13 - 18 spores

抗生素名称 Name of antibiotics	抗生素浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration of antibiotics	菌落数 / ($\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) Colony forming unit	致死率 / % Lethal rate
庆大霉素 Gentamycin	0	1.60×10^9	0
	1	1.24×10^9	22.50
	2	7.95×10^8	50.31
	3	1.28×10^8	92.06
	4	0	100.00

2.3 NTG 诱变剂量的测定

对 13 - 18 菌株孢子进行不同时间诱变处理 菌落计数并分别计算 NTG - LiCl 复合诱变对孢子的致死率和抗药性致死突变率(表 3)。

表 3 不同时间复合诱变处理对 13 - 18 孢子的致死率与突变率

Tab. 3 The lethal and mutation rate of strain 13 - 18 spores treated by NTG - LiCl in different time

复合诱变处理时间 / min Time of mutagenic treatment	存活率 / % Livability	存活率的对数 Logarithm of livability	致死率 / % Lethal rate	突变率 / % Mutation rate
0	100	2	0	0
30	77.42	1.89	22.58	8.22
60	50.07	1.70	49.93	13.7
90	28.44	1.45	71.56	19.46
120	10.56	1.02	89.44	11.35
150	4.14	0.62	95.86	2.8
180	0	0	100	0

复合诱变对菌株 13 - 18 孢子的致死作用和诱变作用见图 3。从图 3 中可以看出 随着复合诱变处理时间的增加 菌株 13 - 18 的诱变致死率逐渐上升 当剂量达到 180 min 时 致死率达到 100% 处理时间和致死率基本上呈线性关系。诱变统计结果表明 复合诱变处理 90 min 对菌株 13 - 18 孢子的致死率可达 71.56% 突变率高达 19.46% 以此为最佳诱变条件。

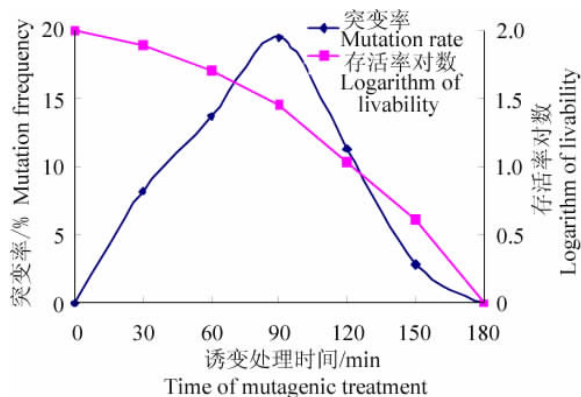


图 3 复合诱变对菌株 13 - 18 孢子的杀菌作用和诱变作用
Fig. 3 The effect of sterilization and mutation of NTG - LiCl on the strain 13 - 18

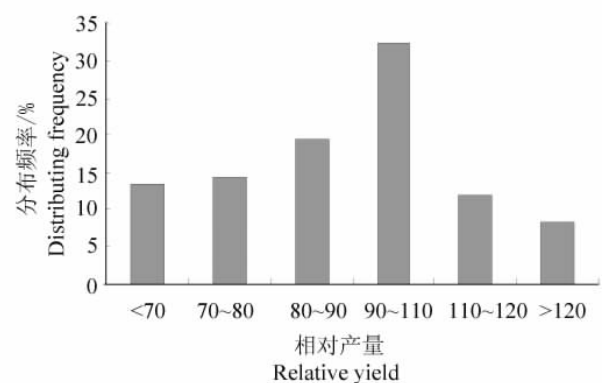


图 4 抗药性突变株相对产量分布频率
Fig. 4 The distributing frequency of the relative yield of gentamycin - resistant mutants

2.4 抗药性突变株的摇瓶初筛结果

在含致死浓度的庆大霉素平板上分离得到 133 株抗性突变菌株 通过摇瓶筛选分别测定各菌株产新农抗 702 的生物效价 以未诱变的出发菌株的摇瓶发酵的平均效价为 100% 分别求出抗药性突变株相对产素单位。抗性突变株产量分布见图 4 分别以相对产素单位 90 ~ 110 为未突变型 相对产素单位在 90 以下为负突变型 相对产素单位在 110 以上为正突变型 其中正突变株约占 20.3%。

2.5 抗药性突变株的摇瓶复筛结果

根据摇瓶初筛结果选取比出发菌株产素单位提高 15% 以上的 16 株抗药性突变株进行摇瓶复筛, 结果见表 4。菌株 13-18-52 产新农抗 702 的生物效价达到 1 946 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 比出发菌株提高了 37.43%。

表 4 抗药性突变株摇瓶发酵产新农抗 702 检测结果

Tab.4 The New Ag-antibiotics 702 yield of gentamycin-resistant mutants by fermentation

序号 NO.	突变株编号 NO. mutations	发酵单位/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Fermentation titer		平均发酵单位/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Average fermentation titer	相对发酵单位/% Relative fermentation titer
		重复 1 Value 1	重复 2 Value 2		
CK	13-18	1 430	1 401	1 416	100
1	13-18-52	1 938	1 954	1 946	137
2	13-18-36	1 827	1 833	1 830	129
3	13-18-19	1 752	1 733	1 743	123
4	13-18-35	1 701	1 723	1 712	121
5	13-18-89	1 684	1 706	1 695	120
6	13-18-73	1 677	1 689	1 683	119
7	13-18-22	1 624	1 655	1 640	116
8	13-18-77	1 643	1 622	1 633	115
9	13-18-40	1 540	1 529	1 535	108
10	13-18-127	1 512	1 540	1 526	108
11	13-18-59	1 524	1 519	1 522	107
12	13-18-21	1 509	1 521	1 515	106
13	13-18-8	1 427	1 466	1 447	102
14	13-18-113	1 423	1 400	1 412	99
15	13-18-45	1 406	1 390	1 398	98
16	13-18-10	1 304	1 323	1 314	93

3 小 结

(1) 复合诱变的处理时间与链霉菌 702 诱变出发菌株的致死率之间存在明显的剂量效应关系, 随着复合诱变处理时间的延长, 致死率逐渐提高。当复合诱变处理 90 min 时, 致死率可达 71.56%, 突变率高达 19.46%, 因此选择作用 90 min 作为最佳诱变剂量。

(2) 链霉菌产抗生素能力与抗生素抗性基因之间的对应关系是目前抗生素科研领域的一个研究热点。本文中采用 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素致死标记, 获得了链霉菌 702 抗药性突变株, 进一步从庆大霉素抗性突变株中筛选出高产菌株 13-18-52, 其产新农抗 702 摇瓶发酵单位达到了 1 946 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 较诱变出发菌株的摇瓶发酵单位 1 416 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高了 37.43%。

(3) 采用 NTG-LiCl 复合诱变筛选模型可以获得产新农抗 702 的链霉菌 702 高产菌株。

参考文献:

[1]李昆太, 黎循航, 涂国全. 702 生物防腐剂对细菌霉菌和酵母菌类抑菌效果的初步测定 [J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(5): 599-601.

[2]蔡华静, 文英, 涂国全. 链霉菌 702 所产活性物质稳定性测定研究 [J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(6): 929-933.

[3]黎循航, 刘姝, 涂国全. 链霉菌 702 所产生物活性物质抑菌活性的初步研究 [J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(6): 829-832.

[4]钟敏, 童孝田, 孙宇辉, 等. 链霉菌 702 所产抗细菌组分的分离纯化及化学结构鉴定 [J]. 福建农林大学学报, 2007, 36(3): 307-311.

[5]袁敏, 薛秀园, 涂国全. 链霉菌 702 所产抑真菌物质理化性质的初步研究 [J]. 江西农业大学学报, 2005(4): 517-520.

[6]施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003, 125-126.

[7]陈义光. 新型物理诱变方法及其在微生物诱变育种中的应用进展 [J]. 长江大学学报: 自然版, 2005, 2(5): 46-50.

[8]李风梅, 刘长江, 郑艳. 产 1,3-丙二醇菌株丁酸梭菌的诱变育种 [J]. 生物技术, 2005, 15(1): 34-35.

[9]朱国胜, 刘作易, 雷邦星, 等. 被孢霉 γ -亚麻酸高产菌株选育 [J]. 菌物学报, 2005, 24(1): 85-92.

[10]国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部). 北京: 化学工业出版社, 2005, 附录 XI.

[11]Hopwood D A. 链霉菌遗传操作实验手册 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1988: 165-170.