

多杀菌素生产菌原生质体的制备条件及其再生菌株生理特性

罗玉双, 丁学知, 夏立秋, 王海龙, 黄璠, 唐滢

湖南师范大学生命科学学院 微生物分子生物学湖南省重点实验室, 长沙 410081

摘要: 为了改良多杀菌素生产菌种, 提高多杀菌素产量, 研究了甘氨酸添加浓度、溶菌酶作用时间、温度和浓度对多杀菌素生产菌刺糖多胞菌 *Saccharopolyspora spinosa* SP06081 菌株原生质体制备和再生的影响, 并考察了不同再生培养基和渗透压稳定剂对其再生的影响, 确定了该菌株原生质体制备和再生的最佳条件。同时, 对原生质体再生菌株的形态与多杀菌素产量变化进行了比较研究。结果表明: 菌体在添加 0.2% 的甘氨酸的 TSB 培养基中培养 48 h 收集, 0.1 mg/mL 溶菌酶, 28°C 作用 20 min 制备原生质体, 将原生质体涂布于以蔗糖为渗透压稳定剂的 R2YE 培养基中, 原生质体再生数目最多, 达 10^8 个/mL 以上; 原生质体再生菌株在形态和抗生素产量上产生分化, 29.3% 的再生菌株形态上保持与亲本菌株一致, 具有菌丝松散, 断裂分枝多的特点, 其中 53.2% 的再生菌株多杀菌素产量变异向正方向移动, 最高产量达到 582.0 mg/L, 比亲本菌株提高 85.6%。原生质体再生菌株的形态分化与多杀菌素产量具有重要相关性。

关键词: 刺糖多胞菌, 多杀菌素, 原生质体, 再生菌株, 形态分化

Conditions for protoplast preparation of spinosyn-producing strain and the physiological properties of protoplast-regenerated strains

Yushuang Luo, Xuezhi Ding, Liqiu Xia, Hailong Wang, Fan Huang, and Ying Tang

Key Laboratory of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

Abstract: To improve spinosyn-producing strain and enhance spinosyns yield, we studied the effects of glycine concentration and the operational time, temperature and lysozyme concentration on protoplast preparation of *Saccharopolyspora spinosa* SP06081. We also studied different regeneration media and osmotic stabilizing agents. In addition, we compared the change of morphology and spinosyns yield of the regenerated strains. The results showed that the *Saccharopolyspora spinosa* SP06081 protoplast yield was the highest under these conditions: the collected mycelium from SP06081 grown in Tryptic Soy Broth (TSB) medium with 0.2% glycine for 48 h was treated by 0.1 mg/mL lysozyme at 28°C for 20 min, then plated on the R2YE medium with sucrose as osmotic stabilizer, the number of regeneration protoplast was up to 10^8 /mL. The protoplast-regenerated strains exhibited changes in morphology and antibiotic production, 29.3% protoplast-regenerated strains was characterized by loose mycelium and abundant broken branches as

Received: September 26, 2008; **Accepted:** December 26, 2008

Supported by: National Programs for High Research and Development of China (Nos. 2006AA02Z187, 2006AA10A212), Ph.D Programs Foundation of Ministry of Education of China (No. 20060542006), National Natural Science Foundation of China (Nos. 30870064, 30670052).

Corresponding author: Liqiu Xia. Tel: +86-731-8872298; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

国家“863计划”(Nos. 2006AA02Z187, 2006AA10A212), 教育部博士点基金(No. 20060542006), 国家自然科学基金项目(Nos. 30870064, 30670052)资助。

did their parent. Among them, 58.2% strains presented the trend to positive variation in spinosad yield, with the highest spinosad yield of up to 582.0 mg/L, 85.6% higher than that of their parent. There is significant correlation between the morphological differentiation and antibiotic yield of the protoplast-regenerated strains from spinosyn-producing strain.

Keywords: *Saccharopolyspora spinosa*, spinosyns, protoplast, protoplast-regenerated strains, morphological differentiation

多杀菌素(Spinosyns)是由土壤放线菌刺糖多孢菌(*Saccharopolyspora spinosa*)经有氧发酵后产生的胞内次级代谢产物,其主要活性成份为 Spinosyn A(约占 85%~90%)和 Spinosyn D(约占 10%~15%)^[1]。它是一种新型的高效广谱大环内酯类杀虫剂,因其独特的杀虫机理对昆虫存在快速触杀和摄食毒性^[2],兼具生物农药的安全性与化学农药的快速性,对鳞翅目、缨翅目等害虫有极强的选择性与杀虫活性^[3],而对非靶标生物的毒性很低,对人和其他哺乳动物非常安全^[4],迄今为止没有发现与其他杀虫剂有交叉抗性^[5]。多杀菌素已成为目前国际上最具有发展前景的生物杀虫剂。

对多杀菌素生物合成与调控的分子机理研究表明,多杀菌素生物合成基因大部分成簇集中排列在刺糖多孢菌染色体基因组中,涉及 23 个基因,整个基因簇分子量为 74 kb^[6]。因此利用传统的 DNA 重组技术在分子水平上对基因簇进行克隆、修饰、突变和表达相对困难而进展缓慢。由于多杀菌素合成途径中的某些基因功能还未完全明确,尤其对整个合成途径的调控还未知,对多杀菌素结构改造的研究也只是刚刚开始^[7],并且这些应用研究的成果均已申请了专利保护。近年来,国内一些学者已开始多杀菌素生产菌种的选育研究^[8,9],但目前还没有形成工业化生产,开发具有自主知识产权的多杀菌素新农药产品是我国急待解决的问题。抗生素原生质体技术是近几十年迅速发展的细胞生物工程育种技术,已形成原生质体诱变、原生质体再生等一系列抗生素生产菌种选育技术,利用这些技术不仅可以改善菌种的遗传性状、提高抗生素的产量和改变抗生素的组分,而且可以综合不同菌株的代谢途径,产生新的抗生素^[10-12]。原生质体制备和再生是各项原生质体技术得以应用的基础和前提,本研究对本实验室选育保藏的多杀菌素生产菌 *S. spinosa* SP06081 (CCTCC:M208034)原生质体的制备和再生条件进行了优化,并在此基础上对原生质体再生菌株形态变异与其多杀菌素产量变化的相关性进行

了比较研究,旨在为进一步选育优良的多杀菌素生产菌种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

刺糖多孢菌 *S. spinosa* SP06081(CCTCC:M208034)由本室自甘蔗地土壤中分离选育。

1.2 培养基及培养条件

种子活化培养基 TSB、再生培养基 R2YE、R5、R6、YEM 按照 Kieser 等方法配制^[13]。发酵培养基(g/L):葡萄糖 100,豆饼粉 6,棉子粉 32,豆油 25,玉米粉 8,碳酸钙 4,酵母粉 1,微量元素溶液(g/L,氯化钴 0.3,硫酸锌 1.4,硫酸亚铁 3.8,硫酸镍 0.5) 2.5 mL,消前 pH 7.0。摇瓶种子:培养温度 30°C,装量 20 mL/150 mL 三角瓶,摇床转速 220 r/min,培养时间 48 h;摇瓶发酵:培养温度 30°C,装量 20 mL/300 mL 三角瓶,摇床转速 240 r/min,培养时间 10 d。

1.3 溶液

P 缓冲液(用于配制酶液及洗涤和悬浮原生质体):按照 Kieser 等方法配制^[13]。

溶菌酶溶液:采用活力单位为 20 000 UI/mg 溶菌酶,用 P 缓冲液配制成 10 mg/mL 母液。-20°C 贮存备用,用时根据需要做适当稀释。

1.4 原生质体的制备与再生^[13]

1.4.1 原生质体制备条件的优化

从-80°C 菌种保藏管接种 100 μ L *S. spinosa* SP06081 菌液于 TSB 中活化 48 h,按 10%接种量转接入含不同甘氨酸浓度的 TSB 中,30°C 培养 48 h,镜检观察菌丝形态及生长情况,以确定合适的甘氨酸添加浓度。6000 r/min 离心收集 4 mL 菌液(约 0.2 g 湿菌体),10% 蔗糖溶液重悬洗涤菌丝体沉淀 2 次,6000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。首先以 0.5 mg/mL 溶菌酶溶液,在不同温度(28°C、30°C、32°C)条件下水浴酶解,酶解时间 30 min,每 10 min 上下轻柔颠倒酶解管 1 次,脱脂棉过滤,4°C、

3000 r/min 冷冻离心 7 min, 弃上清。预冷的 P 缓冲液(4°C)洗涤原生质体 2 次后重悬于 0.5 mL P 缓冲液中, 取 100 μ L 按 10 倍梯度稀释成不同浓度后相差显微镜下血球计数板计数, 记为 A, 并涂再生平板, 确定最佳的酶解温度。在最佳的酶解温度下, 采用二次正交回归设计, 在不同的酶解浓度(0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL)与酶解时间(20 min、40 min、60 min)下制备 SP06081 原生质体, 用 DPS 软件分析其交互作用, 确定最佳的酶解浓度和时间。以上实验每组处理设 2 个平行, 每次实验重复 3 次。

1.4.2 原生质体的再生

将制备好的原生质体悬浮液分别用 P 缓冲液和无菌水溶液做适当稀释, 于 R5 再生培养平板上涂布 100 μ L, 30°C 培养 5~7 d; 观察再生菌落, 同时进行再生菌数计数, 分别记为 B 和 C。

原生质体形成数=A-C, 原生质体再生数=B-C, 原生质体再生率=B-C/A-C, 原生质体纯度=B-C/B。

1.4.3 不同渗透压稳定剂再生平板的制备

以 R5 为基础培养基, 分别用 0.3 mol/L 的 D-甘露醇、NaCl、MgSO₄ 替换其中的渗透压稳定剂蔗糖, 配制不同渗透压稳定剂再生平板。

1.5 *S. spinosa* SP06081 再生菌株形态观察与抗生素产量检测

1.5.1 再生菌株形态观察

随机挑取原生质体再生单菌落, 接种于 2 mL TSB 装量的 12 mL 培养管中, 30°C 培养 48 h, 相差显微镜检验, 与亲本菌株比较观察其形态变化, 同时-80°C 菌种保藏。

1.5.2 再生菌株抗生素产量检测

S. spinosa SP06081 再生菌株在 TSB 中活化 48 h 后, 转接发酵摇瓶, 初筛每株发酵 1 瓶, 复筛每株发酵 3 瓶。

发酵液生物活性初测: 按标准生测方法配制饲料^[14], 发酵液用生测饲料稀释 200 倍, 采用 24 孔培养板对菌体发酵液进行生物活性测定, 供试昆虫为初孵棉铃虫(本室培养), 每个样品接初孵幼虫 48 条, 30°C 培养 48 h, 计数致死率, 以亲本菌株作对照。

高效液相色谱(HPLC)检测抗生素产量: 采用甲醇与发酵液 1:1 比例, 30°C 浸提 8~10 h 获得多杀菌素抽提物, 经 AKTA purifier10 高效液相色谱仪纯化

分析, 色谱柱为 AQ12S05-1546WT (150 \times 4.6 mm I.D. S-5 μ m, 12 nm), 流动相: 甲醇/乙腈/2% 醋酸铵 (V/V/V)= 45/45/10, 流速 1.5 mL/min, 紫外检测波长 250 nm。

2 结果与分析

2.1 *S. spinosa* SP06081 菌株的生长曲线

不同生长时期的 *S. spinosa* SP06081 菌丝体对溶菌酶的敏感性不同, 原生质体的形成与再生差异较大。由于对数期菌丝各部分的差异小, 所制备的原生质体内含物及细胞器缺损少, 修复能力高, 再生效果好, 一般采用对数生长期菌丝体制备原生质体^[15,16]。从图 1 可看出: SP06081 培养 24 h 后进入对数生长期, 60 h 后趋于平稳, 80~120 h 间又有一个继续增长期, 随后进入稳定期。考虑到菌体对数生长后期, 培养液中产生大量孢子及菌丝碎片会影响到原生质体的制备纯度, 因此, 选择培养 48 h 的对数生长期菌丝体制备原生质体。

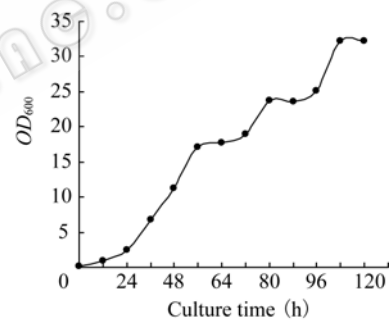


图 1 *S. spinosa* SP06081 菌株生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *S. spinosa* SP06081.

2.2 *S. spinosa* SP06081 对甘氨酸的敏感程度及原生质体制备

在培养基中添加一定浓度的甘氨酸, 可影响放线菌(革兰氏阳性菌)的细胞壁结构, 破坏细胞壁肽聚糖短肽间的交联, 引起细胞壁结构的不完整, 增强菌丝体对溶菌酶的敏感性, 利于破壁。但过高的甘氨酸浓度不仅会影响到菌体的正常生长而得不到足够的菌丝体, 而且会影响到原生质体的再生。在 TSB 中分别添加 0.1%、0.2%、0.3% 的甘氨酸, *S. spinosa* SP06081 菌体培养 48 h 后相差显微镜观察发现, 0.2% 的添加量不影响 SP06081 菌体的正常生长, 但断裂分支状菌丝体增多; 当添加量增加到 0.3% 时, 菌丝生长严重受阻, 碎断扭曲变形, 菌

体培养液稀薄(图 2)。实验还表明在添加 0.2% 的甘氨酸 TSB 中培养 48 h 菌丝体对溶菌酶十分敏感, 制备的原生质体纯度高达 90%以上(图 3), 因此选择 0.2%甘氨酸添加浓度制备原生质体。

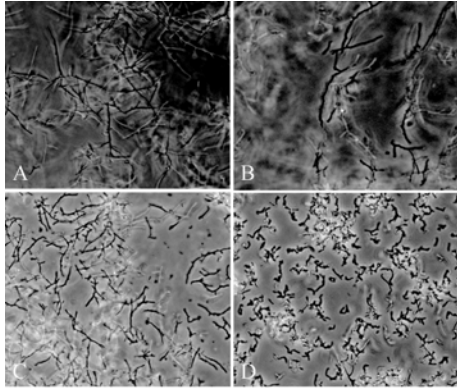


图 2 *S. spinosa* SP06081 菌株对甘氨酸作用的敏感性($\times 400$)
Fig. 2 Sensitivity of *S. spinosa* SP06081 to glycine ($\times 400$). (A) Mycelium grown in TSB medium with no glycine for 48 h. (B, C, D) Mycelium grown in TSB medium with 0.1%, 0.2%, 0.3% glycine respectively for 48 h.

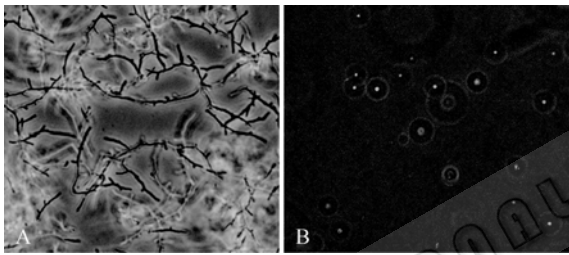


图 3 *S. spinosa* SP06081 原生质体的制备过程($\times 400$)
Fig. 3 Process of protoplast formation of *S. spinosa* SP06081 ($\times 400$). (A) Mycelium before operated by lysozyme. (B) Protoplast after operated by lysozyme.

2.3 溶菌酶作用温度对 *S. spinosa* SP06081 原生质体形成与再生的影响

由图 4 可知, 温度对酶解作用的影响是双重的, 在一定酶解浓度(0.5 mg/mL)和酶解时间(30 min)条件下, 随着温度的升高, 酶解反应加快, 原生质体的形成数稳步上升, 32°C 时最高, 达 4.3×10^9 个/mL, 但原生质体的再生数却相反急剧下降, 28°C 时为 1.3×10^6 个/mL, 温度升到 32°C 时下降到 3.8×10^5 个/mL。这说明 SP06081 对温度十分敏感, 过高的温度可能影响到原生质体本身的 DNA 或酶系统的活性, 导致原生质体再生率下降。由于温度对原生质体的形成没有数量级的影响, 而且比原生质体的再生数高出 3~4 个数量级, 因此选择有最高原生质体再生数的 28°C 作为最佳的酶解温度。

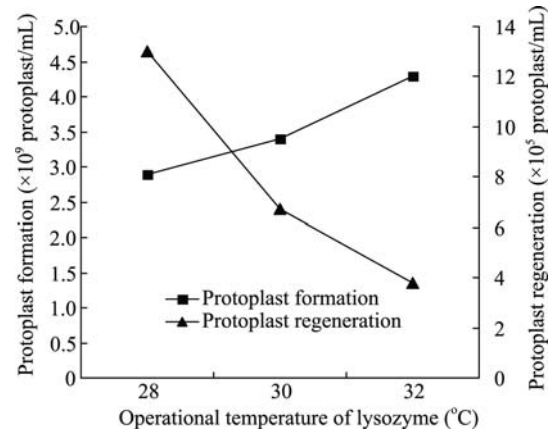


图 4 酶解温度对 *S. spinosa* SP06081 原生质体形成与再生的影响

Fig. 4 Effects of operational temperatures of lysozyme on protoplast formation and regeneration of *S. spinosa* SP06081.

2.4 溶菌酶浓度与作用时间对 *S. spinosa* SP06081 原生质体再生的交互作用

采用二次正交回归设计(表 1、表 2), 28°C 酶解温度条件下, 对不同的酶解浓度(0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL)与酶解时间(20 min、40 min、60 min)下 *S. spinosa* SP06081 原生质体再生进行研究。结果表明, 酶解浓度与酶解时间对原生质体再生有交互作用, 随着酶解浓度与酶解时间的增加原生质体的再生数明显下降(图 5), 这说明 SP06081 对溶菌酶十分敏感, 过高的酶解浓度与过长的酶解时间容易造成酶解过程中菌丝脱壁太彻底, 对脆弱的原生质体造成难以修复的损伤, 不利于原生质体再生。用 DPS 软件对表 2 进行回归分析得到方程: $Y=1.16-0.58X_1-0.31X_2-0.07X_1^2+0.05X_2^2-0.01X_1X_2$ ($R=0.97$, $df(5, 3)$ P 值=0.04), 拟合曲线求最大值得到: 当 $X_1=-1$, $X_2=-1$ 时, Y 有最大值, 与实际结果相符, 即当酶解浓度为 0.1 mg/mL, 酶解时间为 20 min 时, SP06081 原生质体再生数最多, 达到 1.98×10^8 个/mL。

2.5 不同渗透压稳定剂对 *S. spinosa* SP06081 原生质体再生的影响

以 R5 为基础培养基, 分别以 D-甘露醇、NaCl、MgSO₄ 替换其渗透压稳定剂蔗糖, 比较不同渗透压稳定剂对原生质体再生的影响, 结果显示, 以蔗糖为渗透压稳定剂效果最好, 原生质体再生数最高, 达 5.6×10^6 个/mL, 甘露醇次之, 无机盐渗透压稳定剂 NaCl、MgSO₄ 对原生质体再生效果差, 原生质体再生数分别为 7.9×10^5 个/mL 和 0 个/mL。

表 1 SP06081 原生质体制备考察因素及水平

Table 1 Factors and levels of SP06081 protoplast preparation

| Codings | X ₁ (Lysozyme concentration) (mg/mL) | X ₂ (Operating time of lysozyme) (min) |
|---------|---|---|
| +1 | 0.3 | 60 |
| 0 | 0.2 | 40 |
| -1 | 0.1 | 20 |
| j | 0.1 | 20 |

表 2 SP06081 原生质体制备的 2 因素二次正交回归设计及结果

Table 2 Quadratic orthogonal regression design and the results of SP06081 protoplast preparation

| No. | X ₁ | X ₂ | Y (Regenerated protoplasts number, × 10 ⁸ /mL) |
|-----|----------------|----------------|---|
| 1 | 1 | 1 | 0.09 |
| 2 | 1 | -1 | 0.8 |
| 3 | -1 | 1 | 1.65 |
| 4 | -1 | -1 | 1.98 |
| 5 | -1 | 0 | 1.46 |
| 6 | 1 | 0 | 0.72 |
| 7 | 0 | -1 | 1.62 |
| 8 | 0 | 1 | 0.8 |
| 9 | 0 | 0 | 1.15 |

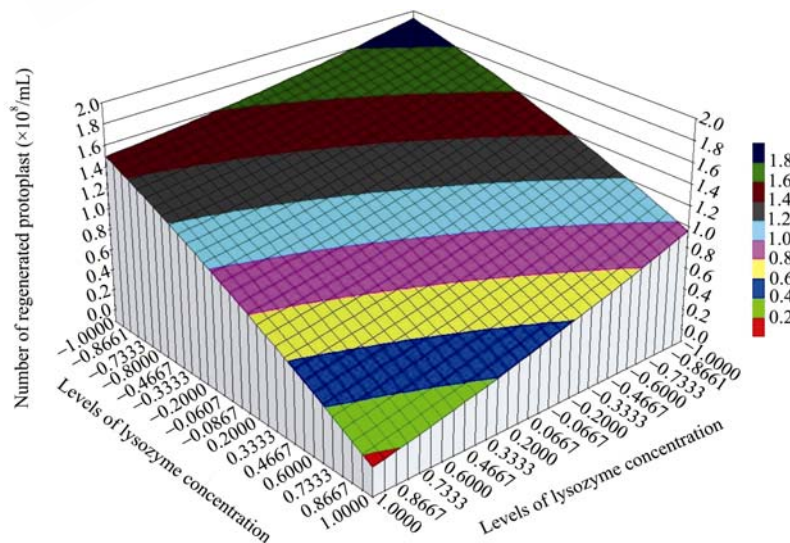
2.6 不同培养基对 *S. spinosa* SP06081 原生质体再生的影响

培养基不同, *S. spinosa* SP06081 原生质体再生存在一定差异。其中以 R2YE 再生数最高, 达 1.05

× 10⁷ 个/mL, 其次为 R5, 再生数为 7.5 × 10⁶ 个/mL, YEM 和 R6 再生效果差, 其中尤以 R6 效果差, 没有得到再生的原生质体。因此 *S. spinosa* SP06081 原生质体再生培养基宜选择 R2YE, 其次为 R5。

2.7 *S. spinosa* SP06081 再生菌株形态分化与多杀菌素产量的变化

与亲本菌株(图 6W)相比, *S. spinosa* SP06081 再生菌株在 R2YE 平板上菌落形态差异不大, 但转入 TSB 液体培养基中培养 48 h 后, 形态明显分化成 3 种类型: A 型, 菌丝紧密成团, 菌液中无单枝断裂菌丝体(图 6A), 菌液较清亮; B 型, 菌丝团较松散, 菌液中有少量断裂分枝(图 6B), 菌液较浓; C 型, 跟亲本菌株一样, 无菌丝团, 菌丝十分松散、断裂分枝丰富(图 6C), 菌液十分浓稠。对不同形态的再生菌株发酵后生物活性测定与 HPLC 检测结果表明, 其杀虫活性和抗生素产量也相应地产生了分化, 其中 A 型再生菌株发酵液 pH 值均在 6.5 以下, 杀虫活性与多杀菌素产量远远低于亲本菌株, 多数菌株虽然还可以检测到一定的杀虫活性, 但 2 mL 发酵液提取后 HPLC 已无法检测到多杀菌素的含量; B 型再生菌株发酵后 pH 值变化在 6.5~8.0 之间, 杀虫活性和多杀菌素产量也明显下降; C 型菌株发酵液 pH 值虽然与 B 型菌株一致, 但其中 53.2% 的菌株多杀菌素产量和杀虫活性比亲本菌株提高了, 最高从原始菌株的 313.6 mg/L 提高到 582.0 mg/L, 提高幅度达 85.6%(表 3)。这说明再生菌株发酵液 pH 值在 6.5 以

图 5 酶解浓度与时间对 *S. spinosa* SP06081 原生质体再生的交互作用Fig. 5 Interaction of lysozyme concentration and operating time on protoplast regeneration of *S. spinosa* SP06081.

上时, 抗生素产量与发酵液 pH 值之间没有严格的相关性。

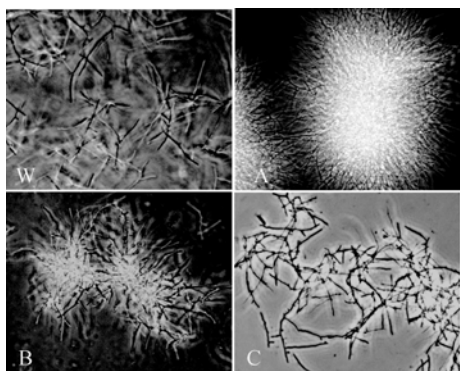


图 6 *S. spinosa* SP06081 原生质体再生菌株 TSB 活化 48 h 后形态分化(×400)

Fig. 6 Morphological differentiation of *S. spinosa* SP06081 regenerated strains after cultivation in TSB medium for 48 h (×400). (W) Parental strain. (A, B, C) Different type protoplast-regenerated strains.

3 小结与讨论

3.1 影响 *S. spinosa* SP06081 原生质体制备的主要因素

一般认为, 菌丝培养时间与方式、溶菌酶浓度、酶解时间、酶解温度对原生质体的制备和再生有较大的影响^[16]。本研究在了解 *S. spinosa* SP06081 生长曲线的基础上, 选择添加 0.2% 甘氨酸的 TSB 培养 48 h 对数生长期菌丝体作为原生质体制备材料, 在此基础上, 对酶解浓度、温度、时间及渗透压稳定剂和再生培养基对 *S. spinosa* SP06081 原生质体再生的条件进行了优化。结果表明, 菌丝体用 0.1 mg/mL 溶菌酶, 在 28°C 作用 20 min 制备原生质体, 涂布于以蔗糖为渗透压稳定剂的 R2YE 培养基中, 原生质体再生数目最多, 达 10^8 个/mL 以上。但在 *S. spinosa*

SP06081 原生质体制备条件优化实验中, 原生质体的形成数一般可达 10^9 个/mL, 比再生数高出一个数量级, 这可能是由于丝状菌丝体原生质体分离时产生了较多的无核原生质体从而影响到再生率。因此, 为了更直观地反映原生质体制备效果, 在实验中以原生质体再生数作为考察指标。比较其培养基成分间的差异, 分析培养基 R2YE 和 R5 再生数较多的原因, 可能是其中含有一定量水解酪蛋白和丰富且微量的盐类, 有学者认为水解酪蛋白的存在易于被用来合成细菌细胞壁肽聚糖中的短肽链, 因而有利于细胞壁的再生, 此外丰富的盐类可能成为细胞中多种酶的辅因子, 促进细胞相应酶的活性, 有利于原生质体的再生, 且这些盐类含量甚微不会影响细胞内外的离子浓度因而不会对细胞膜造成伤害。另外培养基中酵母膏可能含有某些生长因子和微量元素也起到了促进再生的作用^[17]。本研究建立的多杀菌素生产菌株原生质体制备方法为以后原生质体诱变育种及原生质体融合远缘杂交等遗传育种奠定了技术基础。

3.2 *S. spinosa* SP06081 原生质体再生菌株形态分化与多杀菌素产量变化的相关性

随着对抗生素产生菌原生质体研究的进行, 人们发现, 原生质体再生过程并非仅仅是细胞壁脱去与再生的变化, 可能对菌体的遗传也有深刻的影响。本研究首次对多杀菌素生产菌原生质体再生菌株的形态分化与多杀菌素产量的相关性进行比较研究的抗生素产量和杀虫活性大大降低; 仅 29.3% 的再生菌株保留了亲本菌株的形态特征, 其中 53.2% 的再生菌株产量大幅度升高, 最高产量达到 582.0 mg/L, 比亲本菌株提高 85.6%。形态变异大的再生菌株多杀菌素产量下降可能是由于形态调控基

表 3 *S. spinosa* SP06081 亲本菌株与原生质体再生菌株发酵 pH 值与多杀菌素产量比较

Table 3 Comparison of the value of pH and the spinosyns yield of parental and protoplast-regenerated strains (*S. spinosa* SP06081) after fermentation

| Type of strains | W | A | B | C |
|---|-------------|----------|------------|-------------|
| Percent (%) | — | 19.5 | 51.2 | 29.3 |
| pH value of fermentation | 7.0 | 5.5–6.5 | 6.5–8.0 | 6.5–8.0 |
| Insect bioassay (48 h lethal rate, %) | 91.7–100 | 4.2–60.4 | 58.3–75.0 | 89.8–100 |
| HPLC analysis of spinosad production (mg/L) | 303.4–313.6 | ND–116.9 | 61.7–137.8 | 161.0–582.0 |
| Positive variation rate (%) | — | 0 | 0 | 53.2 |

ND: not detectable.

因是多效性调控基因,既引起形态变异,也调控次生代谢。也可能是由于刺糖多孢菌属好氧菌,发酵过程中松散型菌丝体比紧密型菌丝体具有更好的通气状况,从而导致调控其次生代谢产物的某些酶的表达时间延长或表达量增强,使多杀菌素产量提高。Rajnisz A 等^[18]对 4 种红霉素生产菌株的原生质体再生菌株特性比较研究结果表明: *S. erythrea* NRRL2338 和 *S. erythrea* PZH2577R 原生质体再生菌株在平板菌落大小、气生菌丝颜色、产孢量上产生较大分化的菌株失去了红霉素生产能力;而保留了亲本菌株形态特征的 *S. erythrea* PZH2577R 原生质体再生菌株抗生素产量显著提高,这与本研究结果一致。本研究发现 *S. spinosa* SP06081 原生质体再生后平板菌落形态变化不大,但 TSB 活化 48 h 后在形态与多杀菌素生产能力产生较大的变异,这可能由以下因素引起: 1) 拟核数目的变化。放线菌因具多拟核以及许多性状受质粒控制的特性而具有高度的遗传不稳定性,原生质体分离时,一个菌丝细胞分离成几个原生质体,遗传基因如拟核、质粒等数目随机分配,导致再生菌株形态、生理功能或生化特性的一些变化。2) 细胞壁的去附和再生对生物个体在遗传上带来某种程度的扰乱,很可能丧失一部分细胞中的物质,导致细胞基本代谢途径,基因表达的变异。*S. spinosa* SP06081 中是否存在调控细胞形态与抗生素合成的线性大质粒及其变异的遗传分子机制有待进一步研究。*S. spinosa* SP06081 原生质体再生后总体的正变率可达 15.6%,正变幅度最高达 85.6%,贺玉平等^[9]采用 UV 辐射以 *S. spinosa* C121 为出发菌株进行诱变育种研究结果表明,C121UV 辐射后正变率在 9.3%~29.8%之间,正变幅度最高达 77.83%,筛选到菌株 PU131,进一步采用等质子束辐射、⁶⁰Co- γ 射线等诱变处理,循环筛选到比出发菌株提高 174%的多杀菌素生产菌株 ⁶⁰Co329。由于原生质体比孢子和菌丝体对外界环境更加敏感,如能结合理化诱变、理性筛选^[8],有望进一步改良 *S. spinosa* SP06081 菌种,提高多杀菌素产量。

REFERENCES

[1] Waldron C, Madduri K, Crawford K. A cluster of genes for the biosynthesis of spinosyns, novel macrolide insect control agents produced by *Saccharopolyspora spinosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, **78**: 385–390.

- [2] Millar NS, Denholm I. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert Neurosci*, 2007, **7**(1): 53–66.
- [3] Semiz G, Cetin H, Isik K, et al. Effectiveness of a naturally derived insecticide, spinosad, against the pine processionary moth *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams (Lepidoptera: Thaumetopoeidae) under laboratory conditions. *Pest Manag Sci*, 2006, **62**: 452–455.
- [4] Holt KM, Opit GP, Nechols JR, et al. Testing for non-target effects of spinosad on two spotted spider mites and their predator *Phytoseiulus persimilis* under greenhouse conditions. *Exp Appl Acarol*, 2006, **38**: 141–149.
- [5] Mota-Sanchez D, Hollingworth RM, Grafius EJ, et al. Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say)(Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Manag Sci*, 2006, **62**: 30–37.
- [6] Waldron C, Matsushima P, Rosteck PR, et al. Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. *Chem Biol*, 2001, **8**: 487–499.
- [7] Sheehan LS, Lill RE, Wilkinson B, et al. Engineering of the spinosyn PKS: directing starter unit incorporation. *J Nat Prod*, 2006, **69**: 1702–1710.
- [8] Jin ZH, Wu J, Zhang Y, et al. Improvement of spinosad producing *Saccharopolyspora spinosa* by rational screening. *J Zhejiang Univ Sci A*, 2006, **7**: 366–370.
- [9] He YP, Dai JY, Dai P, et al. Screening and breeding of production strains of spinosad. *Chin J Biol Control*, 2006, **22**(1): 37–39.
贺玉平, 戴经元, 代鹏, 等. 多杀菌素高产菌株的选育. *中国生物防治*, 2006, **22**(1): 37–39.
- [10] Wang XH, Ni WQ, Liu H. Screening high-yield strains of *Streptomyces erythreus* by UV mutagenesis. *J Chin Pharm Univ*, 2000, **31**(4): 301–303.
王筱虹, 倪文琴, 刘寒. 原生质体紫外诱变技术筛选红霉素高产菌株的研究. *中国药科大学学报*, 2000, **31**(4): 301–303.
- [11] Matsushima P, Baltz RH. Transformation of *Saccharopolyspora spinosa* protoplasts with plasmid DNA modified *in vitro* to avoid host restriction. *Microbiol*, 1994, **140**: 139–143.
- [12] Beltrametti F, Barucco D, Rossi R, et al. Protoplast fusion and gene recombination in the uncommon actinomycete *planobispora rosea* producing GE2270. *J Antibiot*, 2007, **60**(7): 447–454.
- [13] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical Streptomyces Genetics. *John Innes Foundation, Norwich, UK*, 2000.
- [14] Zeng XH, Zhang HY, Yu ZL, et al. Bioassay method of evaluating the toxicity of *Bacillus thuringiensis* against

- larvae of *Spodoptera exigua*. *Chin J Biol Control*, 1998, **14**(4): 172-175.
- 曾晓慧, 张宏宇, 喻子牛, 等. 苏云金芽孢杆菌对甜菜夜蛾幼虫毒力的生物测定方法. *中国生物防治*, 1998, **14**(4): 172-175.
- [15] Liu ZH, Jiang CL. *Modern Biology & Technology of Actinomycetes*. Beijing: Science Press, 2004.
- 刘志恒, 姜成林. *放线菌现代生物学与生物技术*. 北京: 科学出版社, 2004.
- [16] Shi QQ, Wu SG. *Industrial Microbial Breeding Science*. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 2003.
- 施巧琴, 吴松刚. *工业微生物育种学*. 第2版. 北京: 科学出版社, 2003.
- [17] Liu XM, Gao Y, Zhao J, *et al.* Study on conditions for protoplast production and regeneration of *Bacillus subtilis natto*. *Food Sci*, 2007, **28**(5): 231-236.
- 刘新梅, 高宇, 赵静, 等. 纳豆菌原生质体制备与再生条件的研究. *食品科学*, 2007, **28**(5): 231-236.
- [18] Rajnisz A, Soleck AJ, Kurzatkowski W. Properties of *Saccharopolyspora erythraea* strains after protoplast regeneration. *Folia Microbiol*, 2005, **50**(1): 13-18.



快 讯

美研究发现抗多种流感病毒人单克隆抗体

美国研究人员 2009 年 2 月 22 日发表报告说, 他们发现了能中和多种流感病毒毒株的人单克隆抗体。这些抗体由单个 B 淋巴细胞分泌合成, 可中和的流感病毒包括 H5N1 型高致病性禽流感病毒和季节性流感病毒, 将来在此研究基础上有望开发出高效流感疫苗。研究人员介绍说, 组成流感病毒的血凝素蛋白共有 16 种亚型, 他们发现的人单克隆抗体能中和其中 9 种, 除了目前已知的 4 种禽流感病毒和季节性流感病毒, 还包括造成 1918 年西班牙大流感的 H1N1 型流感病毒。

美国国家过敏和传染病研究所所长安东尼·福奇指出, 这项研究意义重大, 它表明在流感暴发而疫苗尚未生产出来之前, 人单克隆抗体将是重要的抗病毒补充药物。

该研究报告的第一通讯作者、哈佛大学医学院旅美中国学者隋建华博士对记者说, 人类患流感或接种流感疫苗后通常会产生抗体, 但是这些抗体通常仅能中和以前接触过的相同病毒毒株。新发现的人单克隆抗体则具有广泛的中和活性, 并且可在较短的时间内大量制备。这些抗体可与抗病毒药物联合使用以阻止病毒的传播, 预防流感。

据研究人员 22 日发表在英国《自然—结构和分子生物学》(Nature Structural & Molecular Biology) 杂志网络版的报告介绍, 流感病毒有一个隐蔽且序列和结构保守的区域, 该区域位于流感病毒的主要膜蛋白——血凝素蛋白的颈干部位, 人体很少产生针对这一区域的抗体。而他们通过体外方法分离的人单克隆抗体能有效地与这一区域结合, 阻止流感病毒变异, 使其丧失感染人体细胞的能力。

领导这项研究的达纳—法伯癌症研究所副教授韦恩·马拉斯克说, 这些单克隆抗体是人源抗体, 目前已可用来实施更进一步的临床前及临床研究。他认为, 这些人单克隆抗体可在流感季节用来治疗免疫能力低、高龄个体和医疗工作者等高危人群。

研究人员下一步的计划是, 针对流感病毒所在的区域开发疫苗, 这样的疫苗有望使人体获得长期的抗流感病毒能力。

据世界卫生组织统计, 全世界每年有 25 万至 50 万人死于季节性流感。历史上曾发生多次流感大流行, 1918 年发生的西班牙大流感曾导致上千万人死亡。

摘自《新华网》

<http://news.xinhuanet.com>

Journals.im.ac.cn