

激光诱变玫瑰孢链霉菌结合链霉素抗性筛选法选育达托霉素高产菌株

卢文玉 闻建平* 范晶华 曹博翔 孙冰

(天津大学化工学院生物工程系 天津 300072)

摘要: 将经过 20 mW 激光辐照 20 min 的达托霉素 (Daptomycin) 生产菌株—玫瑰孢链霉菌 (*Streptomyces roseosporus*) D-38 的孢子悬液倾注在含有 1.9 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的高氏一号培养平板上。通过链霉素抗性法筛选获得了 10% 正变率的突变株, 其中突变株 LC-54 摇瓶发酵单位为 81.2 mg/L, 比出发菌株提高了 39%。

关键词: 玫瑰孢链霉菌, 链霉素抗性, 达托霉素, He-Ne 激光

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0114-04

Screening of High Daptomycin-producing Strain by He-Ne Laser Irradiation and Streptomycin Resistance Screening Method

LU Wen-Yu WEN Jian-Ping* FAN Jing-Hua CAO Bo-Xiang SUN Bing

(Department of Bioengineering, School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300222)

Abstract: The spores suspension of *Streptomyces roseosporus* D-38 irritated with 20mW He-Ne laser for 20 min were incubated on G1 medium plates containing 1.9 $\mu\text{g/mL}$ of streptomycin. Ten percent of mutants increased the potency of daptomycin by streptomycin-resistance method, including the mutant LC-54, which could produce daptomycin 81.2 mg/L, which was 39% higher than that of the beginning strain by flask fermentation.

Key words: *Streptomyces roseosporus*, Streptomycin resistance, Daptomycin, He-Ne laser

目前, 被公认的病原菌最后一道防线的万古霉素, 在世界范围内产生了越来越多的抗药菌, 开发新型抗生素意义重大。

达托霉素是由玫瑰孢链霉菌发酵产生的由一个十碳烷侧链与一个由 13 个氨基酸残基组成的环状 β -氨基酸肽链 N-末端的色氨酸连接而成的酸性脂肽类抗生素^[1]。2003 年被美国 FDA 批准上市。由于其独特的结构和作用机制, 在临床上与万古霉素相比表现出广谱、药效快、给药小、副反应小等优点, 是目前世界上公认的万古霉素等现用抗生素的最佳替代品^[2]。

国内有关达托霉素的研究刚刚起步, 由于达托霉素生产菌的发酵效价低, 难以实现产业化, 因此选育高产菌成为当前研究工作的主要目标。

目前在抗生素高产菌株的选育中, 传统的化学、物理诱变仍然是普遍应用而且十分有效的方法。然而由于传统诱变方法所产生的突变是随机的, 突变无方向性, 导致目标菌株的筛选工作量大, 直接影响了诱变育种的工作效率。我们在进行达托霉素高产菌株的选育时, 根据抗生素产生菌抗性基因与抗生素合成基因以及调控基因紧密连

* 通讯作者 Tel: 86-22-27890492, E-mail: jpwen@tju.edu.cn

收稿日期: 2005-08-21, 修回日期: 2005-11-13

锁而容易发生共突变的理论^[3]，利用链霉素抗性筛选法作为诱变育种的辅助筛选手段，采用激光诱变，大大增加了育种的方向性，加快了菌种选育进程，提高了筛选效率。本文报道这一研究成果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种：出发菌株玫瑰孢链霉菌 D-38 和敏感菌株八叠球菌 (*Sarcina*) A-3 均由本研究室保存。

1.1.2 培养基：生产菌斜面培养基：可溶性淀粉 20 g，K₂HPO₄ 0.5 g，KNO₃ 1 g，Fe₂ (SO₄)₃ 0.01 g，MgSO₄ · 7H₂O 1 g，NaCl 0.5 g，琼脂粉 20 g，定容至 1L，pH7.5。平板分离培养基：同斜面培养基。种子培养基：葡萄糖 5 g，糊精 15 g，蛋白胨 5 g，酵母粉 5 g，花生饼粉 5 g，K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g，MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g，CaCO₃ 0.2 g，定容至 1L，pH7.5。发酵培养基：可溶性淀粉 10 g，糊精 10 g，胰蛋白胨 10 g，K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g，MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g，CaCO₃ 0.2 g，琼脂粉 15 g，定容至 1L，pH7.5。敏感菌斜面保存培养基：蛋白胨 10 g；酵母浸粉 5 g；NaCl 10 g，琼脂 20 g，定容至 1L，pH 7.0。以上培养基灭菌条件均为 1 × 10⁵ Pa，15 ~ 20 min。

1.2 方法

1.2.1 达托霉素产量测量：高效液相色谱法 (HPLC)^[4]。

1.2.2 单孢子悬液制备：出发菌株斜面用无菌水制成孢子悬液，脱脂棉过滤后调整孢子浓度为 10⁶ 个/mL。

1.2.3 出发菌株链霉素最小抑制浓度的测定：将制备好的单孢子悬液分别涂布于含有不同浓度链霉素的平板分离培养基平板上，30℃ 培养 10 d。观察不同平板上的菌落生长情况。未生长菌落的链霉素最低作用浓度为链霉素最小抑制浓度 (MIC)。

1.2.4 激光诱变参数的确定：取浓度为 1.0 × 10⁶ 个/mL 的单孢子悬液 0.1 mL 加入到 3.5 mL 石英槽 (10 mm × 10 mm × 35 mm) 中，激光辐照 (照射距离 23 mm) 一定时间。取 0.1 mL 经诱变的孢子悬液适当稀释后涂布于生物检测培养基平板上，30℃ 避光培养 10 d，挑取生长良好的单菌落保藏。正变率计算方法如下：

正变率 (%) = $\frac{\text{产量提高的突变株数目}}{\text{突变株总数}} \times 100\%$

1.2.5 发酵方法：取 1 mL 浓度为 10⁶ 个/mL 的孢子悬液于装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中，30℃，200 r/min 回转式摇床培养 24 h 至对数生长期。取 2 mL 种子培养液转接入装有 50 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中，30℃，200 r/min 培养 120 h。

2 结果

2.1 链霉素最小抑制浓度的测定

由表 1 可见，链霉素对出发菌株的最小抑制浓度为 1.9 μg/mL。

表 1 链霉素最小抑制浓度的确定

链霉素浓度 (μg/mL)	1.3	1.5	1.7	1.9	2.1	2.3
菌体生长情况	+	+	±	—	—	—

+ 代表生长良好，± 代表微弱生长，- 代表不生长

2.2 激光诱变剂量选择

不同的激光辐照功率和辐照时间对正突变率有明显的影响, 如图 1 所示。由图可见, 辅照功率 20 mW、辅照时间 20 min 时可以获得最大的正突变率 4%, 因此选择该条件作为适宜的激光诱变剂量。

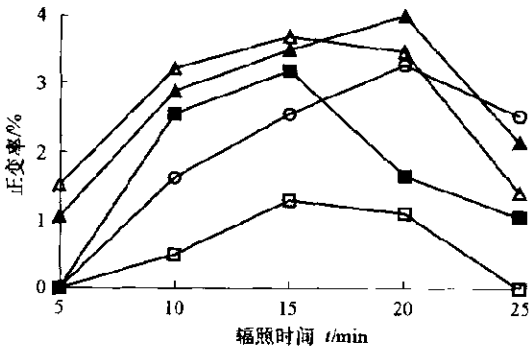


图 1 激光诱变参数对正突变率的影响

□ 5 mW, ■ 10 mW, ○ 15 mW, ▲ 20 mW, △ 25 mW

2.3 链霉素抗性突变株的筛选

在含有 1.9 μg/mL 链霉素的平板分离培养基平板上分离到 118 株链霉素抗性突变菌株, 摇瓶发酵后分别测定其达托霉素产量, 有 12 株菌的达托霉素产量高于出发菌株, 结果见表 2。

表 2 12 株链霉素抗性突变株发酵实验结果

菌株	达托霉素产量 (mg/L)	相对产量水平 (%)
D-38	58.60	100
LC-12	72.66	124
LC-17	69.15	118
LC-29	77.35	132
LC-36	76.77	131
LC-49	73.25	125
LC-54	81.20	139
LC-58	66.80	114
LC-77	73.84	126
LC-80	62.70	107
LC-92	72.08	123
LC-109	79.11	135
LC-115	74.42	127

由表 2 可见, 利用链霉素抗性筛选法可以获得较高几率的高产菌株, 大约 10% 左右的抗性突变株产量提高, 高于直接筛选法的 4%。其中, 突变株 LC-54 产量为 81.2 mg/L, 比出发菌株提高了 39%。将高产菌株 LC-54 在固体斜面培养基上连续传代 5 次, 其产孢速度基本一致; 将各代菌种接入种子培养基, 其进入对数生长期的时间和最高生物量基本一致; 达托霉素产量稳定在 79.4 ~ 83.2 mg/L 之间 (3 次实验的平均值), 表明该菌株遗传性能稳定。

3 讨论

低功率 He-Ne 激光诱变技术主要通过光效应和电磁场效应对生物体产生影响。两种效应累积,使细胞 DNA 分子吸收、聚积能量并进行能量再分配,使细胞 DNA 处于一种易于突变的状态,继而发生一系列的诸如断键、聚合、交联等物理和化学变化,导致 DNA 分子结构的改变即 DNA 分子的损伤和突变,最终引起突变株生物性变化。如果是控制某种代谢途径的酶系基因水平上的改变,则有可能增加某一特定代谢产物的积累^[5]。与其它诱变方式相比,激光诱变具有操作简单、安全、变异率高、辐射损伤轻等特点,在微生物育种方面具有良好的应用前景^[6]。本文利用 20 mW 的 He-Ne 激光对出发菌株玫瑰孢链霉菌 D-38 进行诱变,菌株正突变率达到 4%,表明激光诱变作为一种新兴的物理诱变手段,在达托霉素等脂肽类抗生素高产菌株的选育中具有高效性。

通过链霉素抗性筛选法辅助选育高产抗生素菌株已有很成功的范例^[7,8]。链霉菌抗性突变与链霉素产抗水平之间的关联机理引起研究人员的极大兴趣。目前已经证实,鸟苷四磷酸 (ppGpp) 在抗生素在抗生素的合成启动中起着关键作用^[9,10]。Kelly 等^[11]发现 *Streptomyces coelicolor* 的 *relC* 基因缺失突变株丧失了抗生素的合成能力,菌体内积累鸟苷四磷酸 (ppGpp) 的能力明显下降。然而通过引入链霉素抗性突变可以使 *relC* 基因缺失突变株恢复抗生素的生产能力,这表明链霉素抗性基因可能和抗生素结构基因或调控基因存在着一定的连锁关系。进一步的发现证明,链霉素抗性是由于编码核糖体蛋白 S12 的 *rpsL* 基因或其它基因发生突变导致核糖体或核糖体蛋白发生改变而产生^[12,13]。这也从理论上支持了采用链霉素抗性突变筛选方法高频率选育高产菌的可行性。

本文采用链霉素抗性筛选法结合激光诱变,成功选育到达托霉素产量比亲株提高了 39% 的遗传稳定突变株 C-54,极大提高了菌种选育的工作效率。

参考文献

- [1] Leese R A, Borders D B, Curran W V. United States Patent, 2004, 6, 767, 718.
- [2] Johnson A P, Mushtaq S, Warner M. Int J Antimicrob Agents, 2004, 24 (4): 315 ~ 319.
- [3] Chater K F, Bruton C J. EMBO J, 1985, 4 (7): 1893 ~ 1897.
- [4] Borders D B, Francis N D, Fantini A A. United States Patent, 2004, 6, 716, 962.
- [5] 张晓昱, 邓张双, 朱长虹, 等. 激光生物学报, 2005, 14 (2): 129 ~ 133.
- [6] 陈云琳, 刘晓娟, 闻建平. 生物物理学报, 2003, 19 (4): 353 ~ 358.
- [7] Hosoya Y, Okamoto S, Muramatsu H, et al. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42 (7): 2041 ~ 2047.
- [8] Hesketh A, Ochi K. J Antibiot, 1997, 50 (6): 532 ~ 535.
- [9] Ochi K. J bacteriol, 1987, 169 (8): 3608 ~ 3616.
- [10] Ochi K. J Gen Microbiol, 1990, 136 (8): 2405 ~ 2412.
- [11] Kelly K, Sykochi G, Jones J H. J bacteriol, 1991, 173 (7): 2297 ~ 2300.
- [12] Shima J, Hesketh A, Okamoto S, et al. J Bacteriol, 1996, 178 (24): 7276 ~ 7284.
- [13] Meier A, Kirschner P, Bange F C, et al. Antimicrob Agents Chmother, 1994, 38 (2): 228 ~ 233.