

维吉霉素产生菌株 X-435 的诱变育种*

陈 睦 王选一 张月琴**

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医药生物技术研究所 北京 100050)

摘要 链霉菌菌株 X-435 是从北京郊区采集的土样中分离得到的 1 株维吉霉素产生菌。为了提高维吉霉素的产量,采用紫外线对出发菌株 X-435 进行紫外线诱变处理,诱变处理后在高氏培养基上产生 3 种菌落形态,确定草帽型的菌落为阳性突变株的菌落形态,经过筛选获得效价高于出发菌株近 20 倍的突变株 F5-25-u-28,且传代 5 代后稳定性较好。

关键词 链霉菌,维吉霉素,诱变,效价

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1090-03

Studies on Mutagenesis of Virginiamycin Producing Strain X-435*

CHEN Mu WANG Xuan-Yi ZHANG Yue-Qin**

(Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Institute of Medicinal Biotechnology, Beijing 100050)

Abstract: *Streptomyces* sp. X-435 isolated from a soil sample collected in the suburbs of Beijing was proved to be a produce Virginiamycin. To improve the productivity of the Virginiamycin of *Streptomyces* sp. X-435, the spores of strain X-435 were treated with UV. The three types of colony, strawhat, wrinkled, blad, were isolated on Goose's medium plates after mutation. Among them, the colonies of strawhat type exhibited positive mutation and were picked up as objects of screening. After five generation of mutation, the mutant F5-25-u-28 was selected which potency of Virginiamycin was about 20times higher than that of the beginning strain by flask fermentation and was also genetic stable.

Key words: *Streptomyces*, Virginiamycin, Mutation, Titer

维吉霉素(Virginiamycin)为脂肽类抗生素,最早是从弗吉尼亚链霉菌(*Streptomyces virginiae*)的发酵产物中分离得到的,之后,从其它一些链霉菌菌种中分离到一系列维吉霉素的同系物^[1]。维吉霉素主要抗 G⁺ 细菌,与其它抗生素不产生交叉耐药,而且在动物肠道内不被吸收,毒性很小。维吉霉素为畜禽专用抗生素,因此不会产生人畜共用抗生素的潜在危害。作为饲料添加剂,维吉霉素不仅可防治猪痢疾等细菌性疾病的发生,而且还能增进食欲,刺激动物生长,提高畜禽的增重速率^[2]。

链霉菌菌株 X-435 是本所从北京郊区采集的土样中分离得到的 1 株维吉霉素产生菌^[3]。为提高维吉霉素的产量,我们采用紫外诱变技术,对菌株 X-435 进行诱变处理,通过初筛和复筛获得效价比原株提高 20 倍的 1 株变株 25-u-28,经多次传代,其效

价基本稳定,说明所用的紫外诱变方法可有效地改良维吉霉素产生菌。并发现菌株 X-435 经紫外处理后在高氏平版上出现的 3 种菌落形态,草帽型、皱褶型和光秃型,其中草帽型菌落为正突变型,因此,将该形态菌落作为初筛菌株的挑选对象,提高了高产菌株的筛选速率。

1 材料和方法

1.1 维吉霉素产生菌 X-435

X-435 为本所从北京地区土样中分离得到,由本所药用微生物菌种保藏中心保存。

1.2 生物活性检定菌

效价测定所用检定菌八叠球菌 2665(*Sarcina lutea* 2665)为本室保存。

*“九五”国家重点攻关计划专题《高效、低毒、新型兽用抗生素》(No. 96-C01-02-03)

** 通讯作者 Tel: 010-63017304, E-mail: ZYQ-0525@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-03-12, 修回日期:2007-07-11

1.3 维吉霉素标准品

维吉霉素标准品购自中国药品生物制品检定所。

1.4 培养基

1.4.1 斜面 and 分离培养基 :高氏合成 1 号培养基 (g/L):可溶性淀粉 20.0, KNO₃ 1.0, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, FeSO₂ 0.01, 琼脂 15.0, 蒸馏水 1L, pH 7.2~7.4。

1.4.2 种子培养基和发酵培养基 :鱼粉、甘油培养基 (g/L):鱼粉 1.5, 淀粉 1.5, 甘油 1.5, 棉籽饼粉 0.5, CaCO₃ 0.2, pH6.6。

1.4.3 检定培养基 (g/L) :蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.3, 牛肉膏 0.5, 葡萄糖 0.1, 琼脂 1.5, pH 7.0。

1.5 诱变和筛选方法

1.5.1 孢子液的制备 :在 28℃ 培养 8d~10d 的每支 X-435 大斜面上加入 20mL 无菌生理盐水, 用接种针轻轻刮下孢子, 将孢子液合并倒入盛有玻璃珠的灭菌三角瓶内, 于 28℃, 220r/min 旋转摇床上振荡 30min, 用灭菌的单孢子过滤器过滤, 制得单孢子液。

1.5.2 紫外线诱变 取制备好的 X-435 孢子液 5mL, 移入直径为 90mm 的灭菌培养皿中, 放入无菌磁力棒, 置于紫外诱变箱内的磁力搅拌器上, 紫外灯功率为 30W, 紫外波长为 254nm, 紫外灯与搅拌器台面的距离为 30cm。打开平皿盖, 边搅拌边照射, 照射时间分别为 15s, 30s, 60s, 90s 和 100s, 照射完毕即用黑布包裹平皿, 避免发生光复活作用。从不同照射时间平皿中各取孢子液 1mL 用无菌生理盐水进行稀释, 稀释度为 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 各取不同浓度稀释液 0.1mL 均匀涂布在分离培养基平板上, 于 28℃ 倒置培养 7d~8d。

1.5.3 摇瓶发酵、初筛发酵 :从分离平板上挑取草帽形、浅灰色、大小中等的菌落接种高氏 1 号斜面, 于 28℃ 培养 7d~8d, 从孢子斜面上挖块接种装有 50mL 发酵培养基的 250mL 摇瓶中, 每株菌 1 瓶, 于 28℃ 旋转摇床 220r/min 上培养 72h, 取发酵液样品测活。复筛发酵 选出初筛提高效价的菌株, 斜面挖块接种发酵培养基 (装量 50mL/250mL), 每株菌 3 瓶, 于 28℃ 旋转摇床 220r/min 上培养 72h。

1.5.4 效价测定 :发酵液离心 3000r/min, 10min 后, 取上清液, 采用杯碟法测定效价, 检定菌为八叠球菌 2665。

2 结果

2.1 紫外线诱变的致死率

采用菌落计数法计算紫外诱变处理后的孢子致死率, 结果如表 1。结果表明, X-435 对紫外线比较敏感, 紫外线照射的孢子致死率与照射时间成正比, 照射时间超过 100s 时, 孢子全部死亡。照射 90s 的致死率达 99%。为减少筛选工作量, 本试验选择紫外线处理计量为 90s (见表 1)。

表 1 链霉菌 X-435 的紫外诱变致死率

照射时间(s)	致死率(%)
0	0
15	10
30	74
60	93
90	99
100	100

2.2 紫外线诱变后的菌落形态变化

菌株 X-435 孢子经紫外处理后培养 10d, 在高氏平板上形成的菌落有 3 种形态: 主形态菌落为草帽型 (见图 1), 少数为光秃型 (见图 2) 和皱褶型 (见图 3)。光秃型菌落不长气丝, 草帽型和皱褶型菌落上生长气丝。从每种形态的菌落中随机挑取 30 个进行培养和发酵, 结果发现只有草帽型菌落为正突变型, 大多数效价高于原株的 10% 以上。因此, 确定以草帽型菌落为初筛菌株的挑选对象。

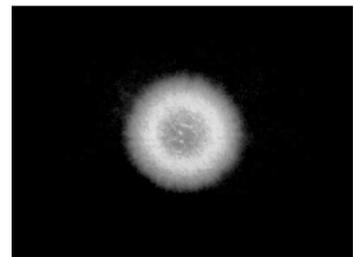


图 1 草帽型菌落(10d)

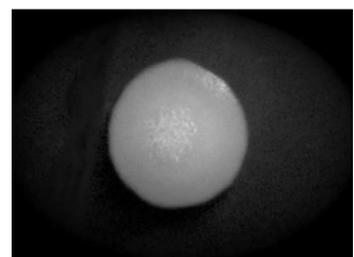


图 2 光秃型菌落(15d)

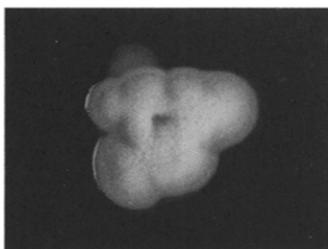


图3 皱褶型菌落(10d)

2.3 25-U-28 变株的选育系谱

菌株 X-435 孢子液经紫外线处理,培养后,随机挑选 200 个草帽型菌落接种斜面,培养 10d 后进行初筛发酵。将效价较高的 20 株变株进行复筛发酵,选出效价最高的菌株作为下一代诱变的出发株。出发菌株 X-435 的 5 代选育系谱为:第 1 代:F1-U-19,第 2 代:F2-19-U-88,第 3 代:F3-88-U-4,第 4 代:F4-4-U-25,第 5 代:F5-25-U-28。变株 F5-25-U-28 的效价较原株提高近 20 倍,活性比较见表 2。

表2 原株与突变株 25-U-28 的效价比较

	原株 x-435	变株 F5-25-U-28
发酵效价 $\mu\text{g/mL}$	21	402

2.4 突变菌株的遗传稳定性

将突变株 F5-25-U-28 进行 4 次斜面传代,得到各子代斜面菌株后,同批进行摇瓶发酵,测定各代菌株的效价。连续 4 代的发酵液效价均在 $400\mu\text{g/mL}$ 以上,结果见表 3。

表3 突变株 25-U-28 的遗传稳定性试验

各代变株	F1	F2	F3	F4
发酵效价 $\mu\text{g/mL}$	410	410	415	418

3 讨论

到目前为止,在微生物药物产生菌的诱变育种中,紫外线辐射是最常用的诱变方法,也是最有成效的方法之一,80%左右的抗生素高产菌株是通过紫外诱变得到的^[4]。其它物理诱变因子如快中子、 γ 射线、高能电子流 β 射线等往往受设备条件的限制,难以普及。本实验应用紫外诱变方法,通过 5 代处理,筛选了 1000 多株菌,将野生菌株 x-435 的维吉霉素产量提高了近 20 倍,说明,该方法可有效地筛出维吉霉素高效价菌株。理论上只有通过 4 代以上的培育,优秀的遗传性状才能稳定下来,且生产适应性强^[5]。本研究考察了突变株 F5-25-U-28 的遗传稳定性,经多次传代效价基本不变,进一步证明所用的诱变筛选方法对维吉霉素产生菌的育种是可行的。

在抗生素产生菌的诱变过程中,某些抗生素合成相关基因的突变使抗生素产量提高的同时也会引起菌株形态特征的变化,因此,变株的菌落形态常常作为高产菌株的初筛指标。在本实验中发现,紫外诱变后,x-435 出现 3 种菌落形态,其中,只有浅灰色草帽型的菌落为正突变,光秃型和皱褶型菌落均无活性。因此,将草帽型菌落作为初筛挑选目标,减少了筛选工作量,提高了初筛的效率。

参考文献

- [1] Cocito C. *Microbiol Rev.* 1979,43:145.
- [2] 赵红娟,张月琴. *饲料工业*,1998,19(5):46~47.
- [3] 赵红娟,张月琴. *中国抗生素杂志*,2000,25(2):87~90.
- [4] 陈代杰,朱宝泉. *工业微生物菌种选育与发酵控制技术*. 上海:上海科学技术文献出版社,1995,pp.67~155.
- [5] 刘颖屏. *抗生素菌种选育的理论和实践*. 北京:中国医药科技出版社,1992,pp.19~24.