

梅岭霉素高产菌株链霉素抗性基因突变株筛选

涂国全* 刘 姝 黎循航

(江西农业大学生物工程系 南昌 330045)

摘要:通过链霉素对梅岭霉素(Meilingmycin)产生菌南昌链霉菌 NS-41-80 菌株孢子致死浓度的测定,采用诱变剂 EMS 4 种不同剂量对菌株孢子进行诱变处理,然后涂布在含链霉素致死浓度的高氏平板上,获得了大量的链霉素抗性基因(*str*)突变株。并进一步筛选到梅岭霉素高产菌株 80-5.11-221,在摇瓶条件下,只产梅岭霉素不产南昌霉素,梅岭霉素活性单位达 1,521 $\mu\text{g/mL}$,比 NS-41-80 的摇瓶发酵单位 855 $\mu\text{g/mL}$ 提高了 77.9%,该菌株连续传 6 代进行摇瓶发酵,其 F_2 代和 F_3 代发酵单位稳定, F_4 代至 F_6 代随着代数增加,梅岭霉素发酵单位急速下降。通过 EMS 诱变剂量分别与抗药性突变率和 *str* 突变株产梅岭霉素产量的产势统计分析表明,菌株抗药性突变与产量突变密切相关。产量突变的 EMS 剂量高于 *str* 突变剂量,从而建立了梅岭霉素产生菌链霉素抗性基因突变筛选方法。

关键词:南昌链霉菌,梅岭霉素,链霉素抗性基因突变筛选

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0033-05

ACQUISITION OF STREPTOMYCIN-RESISTANT (*STR*) MUTANTS SCREENS HIGH-YIELD MEILINGMYCIN STRAIN IN *STREPTOMYCES NANCHANGENSIS*

TU Guo-Quan LIU Shu LI Xun-Hang

(Department of Bioengineering, JAU, Nanchang 330045)

Abstract: After testing the resistance of Streptomycin to the strain NS-41-80 which is the Meilingmycin producer-*Streptomyces nanchangensis*, a lot of streptomycin-resistant (*str*) mutants were screened after the spores regenerated on the lethal media when they were treated with 4 different dosage of super-mutagen EMS. We have obtained the high-yield strain 80-5.11-221 from these *str* mutants which only produces Meilingmycin and no Nanchangmycin in the rotation-flask experiments. The productivity of 80-5.11-221 is 1521 $\mu\text{g/mL}$ 77.9% higher than CK's 855 $\mu\text{g/mL}$. After the shake flask fermentation experiment of 80-5.11-221 for six generations, the productivity of F_2 and F_3 is stable and the productivity of F_4 , F_5 , F_6 decreases hastily with the increment of generations. It was showed that the chemical-resistance mutation of the strains had closely relation with yield mutation and the EMS dosage of the yield mutation was higher than the resistance-chemical mutation's through the statistical analysis between the dosage of mutation and the chemical-resistance mutational frequency, the variate capacity of the mutants' yield. A model of the resistance-chemical mutational labelling rational selection of the strain producing Meilingmycin was established.

Key word: *Streptomyces nanchangensis*, Meilingmycin, The screening of streptomycin-resistance mutants

江西农业大学微生物教研室从校园油茶根际土壤中分离筛选到一株产杀虫抗生素的链霉菌新种——南昌链霉菌(*Streptomyces nanchangensis*)^[1], 通过与中国科学院上海药物研究所合作研究证实,南昌链霉菌发酵产物中能产生多种杀虫活性物质,经 TLC 薄层层析检测,其中 A、B、C、D 4 个组份有较强的杀虫活性。分离提纯了 B 组份,经 HPLC 高效液相色谱检测表明,发现 B 组份本身是一多组份的复合物,其中有 B_1 、 B_2 、 B_3 、 B_4 的 TLC 行为非常接近,分离提纯 B_1 组份经 ^1H 核磁共振谱、 ^{13}C 核磁共振谱、 ^1H - ^1H 二维相关谱、 ^1H - ^{13}C 二维相关谱、质谱的分析和结构推导,确定了 B_1 是一种十六元大环内酯类化合物,它的母核与当今世界著名的广谱驱虫抗生素——阿维菌素(Aver-

* 联系人 Tel: (0791) 3813466, E-mail: tuguoquan@263.net

收稿日期: 2001-05-31, 修回日期: 2001-07-14

mectins) 相同而侧链结构完全不同, 因而是中国国内发现的一种广谱高效的世界新素, 命名为梅岭霉素 (*Meilingmycin*)^[3] 简称 M.B. 在此我们应用分子育种中关于抗生素产生菌抗性基因与抗生素合成的结构基因和调控基因紧密连锁而易发生共突变 (co-mutation) 理论^[4], 在对诱变出发菌株的孢子进行抗链霉素致死测定的基础上, 采用化学诱变剂甲基磺酸乙酯 (EMS) 进行诱变处理, 使诱变的孢子的 DNA 产生高频率突变, 然后将突变的孢子涂布在含有链霉素致死浓度的培养基平板上进行培养, 获得链霉素抗性基因 (*str*) 突变株来筛选梅岭霉素高产菌株。本文报道这一研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 南昌链霉菌 (*Streptomyces nanchangensis*) NS-41-80 菌株: 由本室通过孢子分离纯化传代获得, 作为研究的出发菌株。

1.1.2 培养基: 斜面、平板和茄子瓶培养基: 高氏培养基; 种子培养基和摇瓶培养基: 均为本实验室自行设计筛选的培养基。

1.1.3 链霉素: 大连医药集团大连制药厂生产。

1.1.4 诱变剂: 甲基磺酸乙酯 (EMS): 上海试剂一厂生产。

1.2 方法

1.2.1 链霉素抗性基因 (*str*) 突变株的制备: (1) 将制备好的出发菌株的孢子溶液涂布在含不同浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 链霉素的高氏平板上, 32℃下培养 7~10d, 观察平板上的菌落数, 并计算链霉素对出发菌株孢子的致死浓度。(2) 用 5 种不同浓度的 EMS 液处理孢子, 在 32℃摇床上振荡 3h, 诱变孢子稀释液分别涂布在含致死浓度的链霉素高氏平板和不含链霉素的高氏平板上, 32℃培养 7~10d, 分别进行不同处理的菌落计数, 凡是在含链霉素致死浓度平板上长出来的菌落均为链霉素抗性基因 (*str*) 突变株。

1.2.2 *str* 突变株高产菌株的筛选: (1) 斜面初筛: 将诱变孢子的突变菌落分别挑接到高氏斜面上 32℃培养 10d 后, 每支斜面分别加 5mL 无水乙醇浸泡过夜, 稀释 HPLC 检查和杀蚕生物活性检测。(2) 摇瓶发酵初筛: 在 250mL 三角瓶装 30mL 发酵培养基, 分别接种斜面菌块, 32℃下 220r/min 发酵 7d 后, 取发酵液 2mL 加 8mL 无水乙醇浸泡 24h, 离心, 取上清液稀释进行 HPLC 检查和杀蚕生物活性检测。(3) 摇瓶复筛: 取初筛入选菌株进行二级摇瓶发酵复筛。

1.2.3 高产菌株的稳定性试验: (1) 从冷冻箱中取出 80-5.11-221 菌株的孢子甘油冻存管, 将冻存孢子转接至高氏试管斜面, 32℃培养 10d 连续传 4 代, 同样条件培养, 然后将 F_1 , F_3 代斜面同时转接高氏茄子瓶斜面扩大培养, 32℃培养 10d, 即为 $F_2 \sim F_6$ 代。(2) 取上述分别培养了 10d 的 $F_2 \sim F_6$ 代茄子瓶培养体, 铲块 (相同大小的菌块) 进行二级发酵。

1.2.4 梅岭霉素检测方法: (1) HPLC 检测: 配制梅岭霉素和南昌霉素标准品, 再用无水乙醇稀释进行 HPLC 检测。以浓度为 x 、以峰面积为 y 之间进行直接回归得标准曲线: $Y = 165438.6195X - 1697946.4301$ $R = 0.99945$ 。样品处理后同样进行检测, 并代入标准曲线方程计算。(2) 生物活性的生物检测: 配制成不同浓度的梅岭霉素标准液, 分别用水稀释为不同的 7 种浓度, 测蚕, 24h 后计算供试家蚕的死亡率。以浓度为 X 与死亡

率的概率单位 P 之间进行直接回归分析得标准曲线: $P = 1.7111 + 64.1553 X$ $R = 0.9277$ 。样品用水稀释后同样方法测查, 并代入标准曲线方程计算。

2 结果与分析

2.1 链霉素抗性基因 (*str*) 突变株的制备结果

2.1.1 NS-41-80 菌株的孢子对链霉素致死浓度的测定结果: NS-41-80 菌株孢子在链霉素含量为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平板上致死率达到 100%, 以此为抗药性致死突变标志。

2.1.2 EMS 不同浓度对 NS-41-80 菌株链霉素基因突变诱变结果: EMS

表 1 EMS 不同浓度对 NS-41-80 孢子的致死率与突变率

EMS 诱变浓度 (mol/L)	存活率 X_i (%)	存活率对数 (log) Y_i	致死率 (%)	突变率 (Y)
0	100	2	0	0
0.01	1.95	0.29	98.05	0.1697
0.02	1.2	0.08	98.8	0.1707
0.03	0.57	-0.24	99.43	0.0440
0.05	0.42	-0.38	99.58	0.0192

不同处理浓度对 NS-41-80 菌株孢子处理后链霉素基因突变诱变效果产生见表 1 和图 1。

根据表 1 和图 1 可知, 0.02 mol/L 的 EMS 对 NS-41-80 菌株致死率达 98.80% 时, 抗药性突变率最高, 因此在本试验供试的 4 种 EMS 浓度对 NS-41-80 菌株的诱变作用的最适剂量为 0.02mol/L。

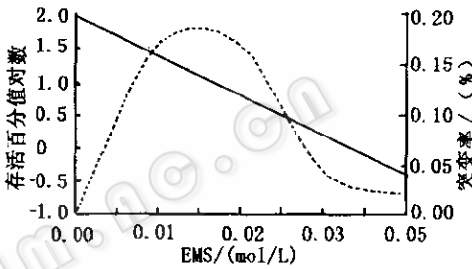


图 1 EMS 对 NS-41-80 菌株的杀菌作用和诱变作用

----- 诱变, ——— 存活

2.2 梅岭霉素高产菌株的筛选

2.2.1 *str* 突变株的初筛: 从每种诱变处理浓度平板上各挑接 50 个左右抗药性突变株菌落于高氏斜面, 32°C 培养 10d, 每支斜面各用 5mL 无水乙醇浸泡, 离心, 取上清液进行 HPLC 检测梅岭霉素的含量。以每个菌株产梅岭霉素相对单位分别进行 EMS 不同浓度对菌株诱变后产素的变势 B 统计分析。其分析结果见表 2 和图 2。

变势 $B = \bar{X} (6/Ct)^{1/6} (1 + Cs/8)^{1/2 [4]}$

表 2 表明, 0.03mol/L EMS 处理产量和变势 B 最大, 表明该浓度对出发菌株的诱变和发散效果好, 平均数也明显高于其它两种处理浓度。从图 2 可以看出 0.03mol/L EMS 处理中出现明显比对照提高 45% ~ 85% 的高产菌株。

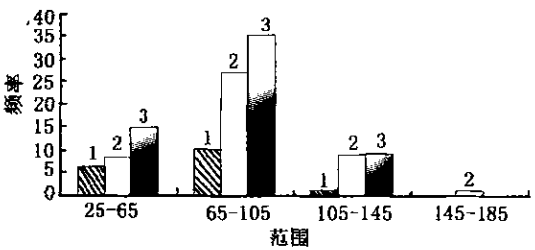


图 2 NS-41-80 菌株的 EMS 诱变产量分布图

1 0.02mol/L, 2 0.03mol/L, 3 0.05mol/L

2.2.2 梅岭霉素 *str* 突变株高产菌种的筛选结果: 从 EMS 不同浓度对菌株孢子诱变后在含链霉素致死浓度的高氏平板上抗药性突变菌落中, 挑接近 1,500 多支菌落斜面, 通过摇瓶发酵以后, 经 HPLC 检测列 23 个菌株结果 (见表 3), 选取只产梅岭霉素的 80-5.11-221

表 2 EMS 对 NS-41-80 菌株诱变后 *str* 突变株产量分布的参数分析

	0.02mol/L	0.03mol/L	0.05mol/L
平均	74.40	88.27	81.09
标准差	15.41	26.98	26.84
1/Ct	0.21	0.31	0.33
Ct	4.83	3.27	3.02
Cs	0.32	-0.51	-0.31
B	78.65	94.47	89.16

为入选的菌株, HPLC 检测梅岭霉素发酵单位为 $1,457 \mu\text{g/mL}$, 生物活性杀蚕单位为 $1,500 \mu\text{g/mL}$ 。

表3 部分高产菌株 M.B HPLC 结果

菌株编号	M.B. 相对单位 (%)	菌株编号	M.B. 相对单位 (%)	菌株编号	M.B. 相对单位 (%)
NS-41-80 (CK)	100	80-5.11-234	131	80-5.11-238	143
80-5.11-230*	97	80-5.11-262	132	80-5.11-221*	146
80-5.11-222	119	80-5.11-249	134	80-5.11-170	147
80-5.11-121	120	80-5.11-286	135	80-5.11-283	150
80-5.11-151	121	80-5.11-242	137	80-5.11-223	150
80-5.11-243	121	80-5.11-219	138	80-5.11-230	153
80-5.11-229	124	80-5.11-239	138	80-5.11-290	155
80-5.11-240	124	80-5.11-245	138	80-5.11-263	157
80-5.11-241	125	80-5.11-268	141	80-5.11-224	161
80-5.11-126	129	80-5.11-287	142	80-5.11-289	163
80-5.11-142	129	80-5.11-288	143	80-5.11-284	165
80-5.11-256	130				

* 突变只产梅岭霉素 B, 不产南昌霉素 A

2.3 str 突变株高产菌株的稳定性测定结果

2.3.1 高产菌株传代摇瓶试验结果: 80-5.11.221 菌株传代摇瓶试验结果见表4。

表4 80-5.11-221 菌株传代摇瓶试验结果

代 数	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆
HPLC 摇瓶单位 ($\mu\text{g/mL}$)	1521	1457	1066	1008	880
杀蚕活性单位 ($\mu\text{g/mL}$)	(30,000 倍 $\times 0.05$)	(30,000 倍 $\times 0.05$)	(25,000 倍 $\times 0.05$)	(20,000 倍 $\times 0.05$)	(18,000 倍 $\times 0.05$)
	1500	1500	1250	1000	900
比 F ₂ 代降低 (%)	0	4.22	29.88	33.73	42.18

2.3.2 高产菌株发酵产物活性组分的变化分析: 80-5.11-221 菌株摇瓶发酵后各组分测定结果见图3。根据图3, 高产菌株与对照

菌株最明显变化在于该菌株只产梅岭霉素活性组分, 而不产南昌霉素; 其次, 高产菌株梅岭霉素活性单位比对照菌株 NS-41-80 提高 77.9%。

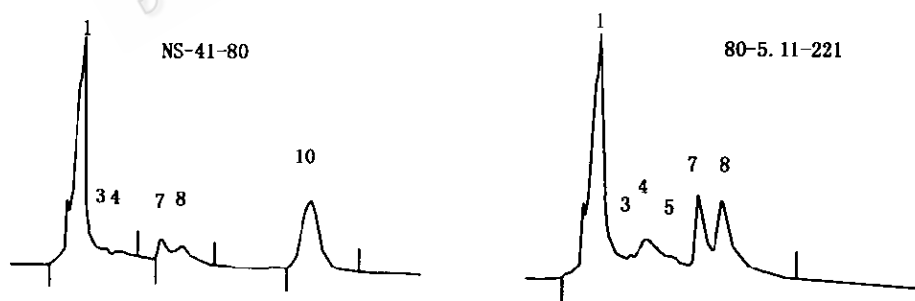


图3 对照菌株与诱变菌株产物组分比较

1~8号峰为梅岭霉素, 10号峰为南昌霉素

3 结果与讨论

(1) 通过采用 $10 \mu\text{g/mL}$ 链霉素致死标记, 获得了大量链霉素抗性基因突变株。然后进一步从链霉素抗性基因突变株中筛选到梅岭霉素的高产菌株 80-5.11-221, 该菌株无论在固体培养和液体发酵条件下, 经 HPLC 检测均不产南昌霉素, 只产梅岭霉素各活性

组分。在摇瓶发酵条件下,该菌株梅岭霉素活性单位达到 $1521\mu\text{g/mL}$,比诱变出发菌株 NS-41-80 原发酵单位 $855\mu\text{g/mL}$ 提高了 77.9%。

(2) 80-5.11-221 菌株经连续传 6 代后分别进行摇瓶发酵试验, F_2 和 F_3 代摇瓶发酵梅岭霉素活性单位均达到 $1,457\mu\text{g/mL}$ 以上, F_4 到 F_6 代随着传代有一定的递减,梅岭霉素的发酵单位降低。由于工业生产上一般采用 F_2 和 F_3 代菌种,因此该菌株具有工业生产价值。

(3) 通过 EMS 不同诱变剂量分别与抗药性突变率和链霉菌抗性基因突变株梅岭霉素产量的产势统计分析表明,菌株的抗药性突变与产量突变是密切相关的。产量突变的 EMS 诱变剂量高于链霉素抗性基因突变的诱变剂量。

(4) 在本试验的菌种选育中,用理化因子对出发菌株 NS-41-80 进行诱变处理后筛选出链霉素抗性基因突变株,然后通过摇瓶筛选出高产菌株(卡那霉素菌种选育之一应用了这种方法^[5]),达到了淘汰野生型、浓缩突变型的目的,大大地减轻了初筛工作量,提高了菌种选育的工作效率。同样,我们从链霉菌抗性基因突变株中也筛选到南昌霉素的高产菌株。证明该方法是有效的。

(5) 抗生素的生物合成通常在营养生长和形态分化间的过渡期内进行。一个具有潜在意义的微生物调控系统就是由于营养限制而引起的严紧型化学反应,并进而引起 RNA 的累积和其它细胞反应而立即停止^[6]。人们认为鸟苷四磷酸和鸟苷五磷酸对这种严紧型反应相当重要。根据对几种链霉菌突变株的分析表明,鸟苷四磷酸在抗生素合成起始起着主要作用^[7,8]。最近根据对 *S. coelicolor*^[9] *relC* 基因缺失突变株的分离和分析,鸟苷四磷酸的合成和抗生素产生之间的明确相互关系被建立。这种突变株完全丧失了生产抗生素的能力。有趣的是,试验发现由于 *relC* 基因突变而导致的产素能力下降可以通过引入能赋予链霉素抗性的 *str* 突变而被完全恢复。采用特定的 *str* 突变使任何一种微生物的抗生素产率都会有一个显著的增加。通过这个新颖育种途径不仅可以得到高产菌株,而且还可以使以惊人的高频率获得高产菌株成为可能,将为提高抗生素产生提供一个方便有效的方法^[10]。

致谢 在本研究中, HPLC 的检测得到了郭成志高级工程师的指导和帮助,特致感谢!

参考文献

- [1] 欧阳谅,涂国全,高勇生. 微生物学报, 1984, 23 (2): 195~199.
- [2] 高勇生,欧阳谅. 江西农业大学学报, 1986, 8 (4): 126~130.
- [3] 欧阳谅,涂国全,高勇生,等. 江西农业大学学报, 1993, 15 (4): 148~153.
- [4] 刘垂于. 微生物学报, 1980, 20 (2): 166~172.
- [5] 杜润洋. 抗生素, 1983, 1: 24.
- [6] Cashel M, Rudd E. American Society for Microbiology, 1987, 1410~1438.
- [7] Ochi K. J Bacteriol, 1987, 169: 3608~3616.
- [8] Ochi K. J Gen Microbiol, 1990, 136: 2405~2412.
- [9] Kelly K S, Ochi K, Jones G H. J Bacteriol, 1991, 173: 2297~2300.
- [10] Yoshiko H, Susumu O. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 1998, 42: 2041~2047.