

不同诱变方法选育高产 G-418 菌株的比较

钟艾玲¹ 田敏^{1,*} 刘艳全² 易欣² 龙燕² 雷叶明¹ 王富强² 刘亚洲¹

(1 抗生素研究与再评价四川省重点实验室, 四川抗菌素工业研究所, 成都大学, 成都 610052; 2 微生物药物生物合成技术国家地方联合工程研究中心, 成都雅途生物技术有限公司, 成都 610041)

摘要: **目的** 选育抗生素 G-418 高产的棘孢小单孢菌突变株, 以提高抗生素 G-418 的产量。**方法** 采用紫外诱变、NTG 诱变、微波诱变、超声诱变的方法对棘孢小单孢菌进行诱变处理, 结合生物活性测定方法, 以发酵单位为主要评价标准进行筛选。**结果** 获得两株 G-418 高产菌株, 其产量比出发菌株分别提高了 102% 和 115%。**结论** 本研究表明紫外诱变可以显著提高 G-418 产生菌的正突变率, 尤其是种子液衰亡期的正突变率最高, 为选育 G-418 棘孢小单孢菌高产菌株奠定了基础。

关键词: 诱变方法; 衰亡期; 选育

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Study on mutation methods to screen high yield G-418 strains

Zhong Ai-ling¹, Tian Min¹, Liu Yan-quan², Yi Xin², Long Yan², Lei Ye-ming¹, Wang Fu-qiang² and Liu Ya-zhou¹

(1 Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610052; 2 National Engineering Research Center for Microbial Drug Biosynthesis, Chengdu Yacht Bio-Technology Co., Ltd., Chengdu 610041)

Abstract Objective The purpose of the study is to breed the mutated *Micromonospora echinoapora* which can increase the antibiotic production of G-418. **Methods** By means of the mutagenesis of UV, NTG, microwave, and ultrasonic, combined with the bioactivity assay, the high-yield mutants were selected based on the titre of G-418. **Results** Two high-yielding strains were obtained with G-418 production increased by 102% and 115%, respectively, compared to the original strain. **Conclusion** This study shows that UV mutagenesis can significantly increase the positive mutation rate of G-418 producing strains, and especially the seed broth in the decline phase had the highest positive mutation rate, which lays a foundation for the breeding of G-418 high-yielding strains of *Micromonospora*.

Key words Mutation methods; Decline phase; Breeding

G-418 又名遗传霉素 (geneticin), 是由小单孢菌产生的结构类似于庆大霉素和新霉素的氨基糖苷类抗生素^[1-2]。它对原核和真核细胞均具有细胞毒性, 能抑制细胞的增值, 诱发细胞凋亡等^[3-4]。目前 G-418 作为高端生化试剂被大量应用于分子生物学研究领域, 同时也可作为抗革兰阴性菌感染新药研究的基础结构物质。

从自然中分离筛选的小单孢菌生物合成 G-418 能力较低^[5-6], 远不能满足工业化生产需求。本研究以 G-418 产生菌棘孢小单孢菌为研究对象, 采用多种不同作用机理的诱变方式, 比较确定对该 G-418 产生菌具有最佳效果的诱变方式和剂量, 并同时筛选出高产 G-418 小单孢菌菌株, 为实现 G-418 工业化生产奠定基础。

收稿日期: 2018-04-26

基金项目: 四川省科技计划应用基础研究项目 (No. 2017JY0256); 四川省医药微生物共享服务平台建设 (No. 2018TJPT004)

作者简介: 钟艾玲, 女, 生于 1993 年, 在读硕士研究生, 主要研究方向为微生物菌种的遗传选育, E-mail: 1034860969@qq.com

* 通讯作者, E-mail: tm65tm@aliyun.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

出发菌株为棘孢小单孢菌 (*Micromonospora echinoapora*), 活性鉴定菌株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

1.1.2 培养基

(1) 固体平板培养基 酵母粉 1.0g, 葡萄糖 1.0g, NaCl 8.5g, 琼脂 20.0g, 加热溶解于水后定容至 1000mL, 调 pH7.0~7.2, 121℃ 灭菌 30min。

(2) 生物活性检定培养基 I^[7] 蛋白胨 5.0g, 牛肉膏 3.0g, 磷酸氢二钾 3.0g, 琼脂 20.0g, 加热溶解后定容至 1000mL, 调 pH7.0~7.2, 121℃ 灭菌 30min。

(3) 种子培养基 酵母浸粉 10.0g, 葡萄糖 1.0g, 可溶性淀粉 30.0g, 加热溶解于水后定容至 1000mL, 调 pH7.0~7.2, 121℃ 灭菌 30min。

(4) 发酵培养基 淀粉 40.0g, 葡萄糖 16.0g, 蛋白胨 8.0g, NH₄NO₃ 3.0g, 酵母粉 6.0g, 0.5%CoCl₂·6H₂O 溶液 250μL, 玉米粉 6.0g, 轻质 CaCO₃ 3.0g, 加热溶解于水后定容至 1000mL, 调 pH7.0~7.2, 121℃ 灭菌 30min。

1.2 方法

1.2.1 棘孢小单孢菌孢子菌悬液的制备

取培养 5d 的棘孢小单孢菌新鲜斜面, 用 10mL 生理盐水洗下, 将孢子液转入另一只带有玻璃珠的三角瓶中, 34℃, 220r/min, 震荡 30min, 过滤, 制成孢子浓度 10⁷~10⁸CFU/mL 的孢子悬液。

1.2.2 UV 诱变条件确定

移取 5.0mL 制备好的孢子悬液于直径 9cm 培养皿中, 培养皿置于已预热 30min 的紫外箱, 并放置在功率为 15W 的紫外灯 (波长 265nm)、照射距离为 30cm 下, 照射时间分别为 0、10、30、60、90 和 180s。每次诱变设置 3 个平行。处理后的孢子悬液稀释后涂布于固体平板培养基, 34℃ 恒温避光培养 7~10d, 计数菌落。

1.2.3 NTG 诱变条件确定

移取 NTG 溶液与孢子悬液等体积混匀, 使 NTG 终浓度为 2.0mg/mL, 分别震荡处理 10、30 和 60min。然后加入 100% 硫代硫酸钠解毒处理 10min。未使用诱变剂处理的孢子悬液与处理后的孢子悬液稀释后涂布于固体平板培养基, 34℃ 恒温避光培养 7~10d, 计数菌落。

1.2.4 微波诱变条件确定

将制备好的孢子悬液分装至 5 支试管中, 插入冰块中, 置于 2450MHz, 750W 家用微波炉中, 中等功率强度照射时间分别为 10、30、60 和 90s。未使用诱变剂处理的孢子悬液与处理后的孢子悬液稀释后涂布于固体平板培养基, 34℃ 恒温培养 7~10d, 计数菌落。

1.2.5 超声诱变条件确定

将制备好的孢子悬液分装至 4 支试管中, 置于频率为 50Hz 超声波仪 (KH2200 型) 中分别处理 10s、30s、60s 和 120s。未使用诱变剂处理的孢子悬液与处理后的孢子悬液稀释后涂布于固体平板培养基, 34℃ 恒温避光培养 7~10d, 计数菌落。

1.2.6 不同生长时间种子孢子悬液紫外诱变条件确定

将斜面菌种接种至种子瓶培养 (34℃、220r/min), 移取发芽期、生长对数期、衰亡期 3 个阶段的种子培养液至带有玻璃珠的三角瓶中, 220r/min 震荡 30min, 过滤。参照“1.2.2”项条件进行紫外诱变。将各生长期种子未经紫外诱变处理种子悬液及处理后种子悬液稀释后涂布于固体平板培养基, 34℃ 恒温避光培养 7~10d, 计数菌落。

1.2.7 致死率计算

$$\text{致死率 \%} = \frac{\text{诱变前菌落数} - \text{诱变后菌落}}{\text{诱变前菌落数}} \times 100\%$$

1.2.8 发酵培养

将挑出的菌株接斜面培养, 待孢子成熟后, 取适量接入装有 25mL/250mL 种子培养基的种子瓶中, 34℃、220r/min 摇瓶培养 30h, 以 10% 的接种量, 接入 30mL/250mL 发酵瓶, 34℃、220r/min 培养 7d。

1.2.9 抗菌活性测定

发酵液经 2500r/min 离心 10min, 取上清液, 管碟法^[7]测定抗生素的活性, 根据抑菌圈直径大小分析抗生素的效价。

2 结果

2.1 UV 诱变条件选择

使用功率为 15W 的紫外灯管、照射距离为 30cm, 对孢子菌悬液进行 0~180s 的时间处理。将照射不同时间的孢子悬液进行稀释后涂布于平板上, 34℃ 培养, 计菌落数, 由此得出紫外照射不同时间的致死率, 为了确保菌体能够最大程度的正向突变, 在诱变研究中, 工业诱变育种过程中通常将紫外致死率控制在 80% 左右^[8]。本研究中, 产 G-418 小单孢菌孢子悬液经不同时间紫外线照射的致死率和正突变率如图 1 所示。

由图 1 可知, 随着照射时间的不断增加, 菌株

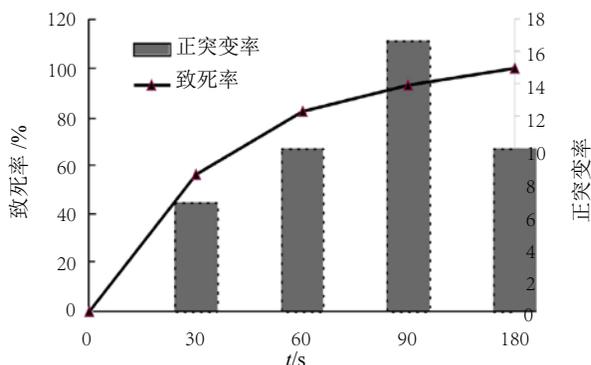


图 1 紫外诱变时间对致死率、正突变率的影响

Fig. 1 Effect of UV irradiation time on spore lethal rate and positive mutation rate

的致死率也不断升高, 当 UV 照射 180s 时, 致死率趋于 100%。本研究表明: 当照射时间为 90s 时, 菌株的致死率达 90%, 此时的正突变率最高, 为 16.7%, 因此选择 90s 作为紫外诱变时间。

2.2 NTG 诱变条件选择

采用相同 NTG 浓度 (2.0mg/mL), 对菌株进行 0~60min 不同时间处理, 其致死率随时间的变化如图 2 所示。由图 2 可知, NTG 在 2.0mg/mL 的浓度下, 诱变时间为 60min 时, 致死率达到 87.5%, 当 NTG 作用时间为 30min 时, 菌株的致死率为 61.3%, 其正突变率最高为 36.7%, 所以选择作用时间为 30min 作为 NTG 诱变条件。

2.3 微波诱变条件选择

在一定频率下, 主要影响微波诱变效果的因素是微波的辐照时间^[9]。选用输出功率 900W, 额定频率 2450MHz 的微波, 对小单孢菌的孢子悬浮液进行辐照处理, 辐照时间为 10、30、60 和 90s。辐照处理后, 孢子的致死率如图 3 所示。由图 3 可知, 随着微波照射时间增加, 菌株的致死率逐渐增高, 在照射时间为 90s 时, 菌株的死亡率接近 100%, 在照射时间

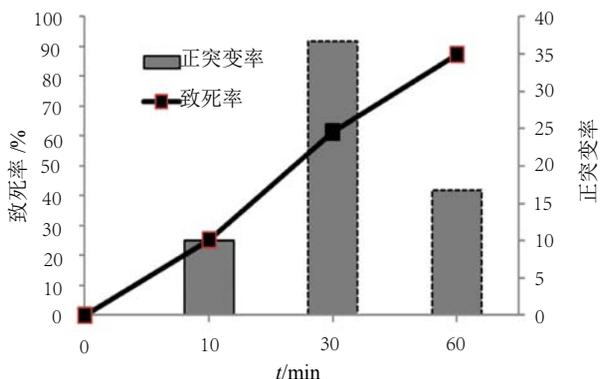


图 2 NTG 诱变时间对菌株的致死率、正突变率的影响

Fig. 2 Effects of NTG mutagenic time on spore lethal rate and positive mutation rate

为 60s 时, 致死率为 95.8%, 菌株的正突变率最高为 20%, 因此选择 60s 为最佳辐照时间。

2.4 超声诱变条件选择

在一定的温度下, 超声波的作用时间是影响突变效率的主要因素^[10], 选用频率为 50Hz 的超声波置于冰水中处理 0~2min, 孢子的致死率如图 4 所示。

由图 4 可知, 随着处理时间增加, 超声诱变致死率逐渐增高, 在照射时间为 60s 时, 菌株致死率为 90%, 其正突变率最高为 16.7%, 因此选择 60s 为诱变最佳作用时间。

2.5 诱变菌株筛选

挑取各诱变剂处理后的单菌落至斜面培养, 斜面成熟后接入种子瓶培养 30h, 后转种至发酵瓶, 发酵周期为 7d。放瓶时取发酵液离心, 离心上清液稀释一定的倍数, 采用管碟法, 以枯草芽孢杆菌为试验菌, 以原始菌株为参照, 发酵单位高于原始菌株的诱变菌株为正突变菌株, 各诱变剂诱变结果如表 1。由表 1 可知, NTG 诱变的正突变率高于其他诱变方法, 高达 36.7%, 超声诱变和紫外诱变的正突变率较低, 为 16.7%, 但 NTG 处理后菌株的发酵单位较原始菌株仅提高 36%, 紫外诱变处理孢子后正突变幅度最大, 发

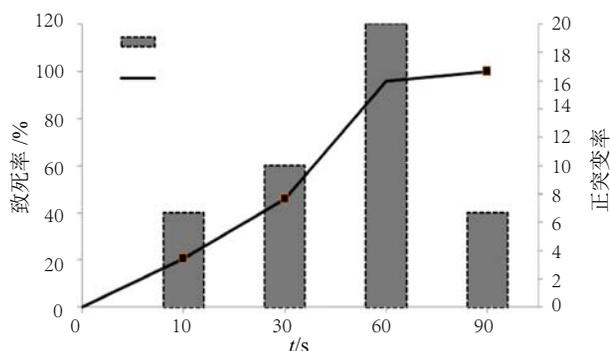


图 3 微波辐照时间对菌株致死率、正突变率的影响

Fig. 3 Effects of microwave irradiation time on spore lethal rate and positive mutation rate

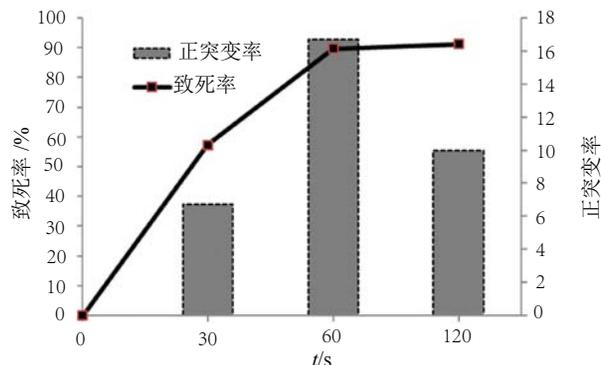


图 4 超声诱变时间对菌株致死率、正突变率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic mutagenic time on spore lethal rate and positive mutation rate

表 1 不同诱变处理方式结果

Tab. 1 Result of different mutagenic

诱变方法	UV 诱变	NTG 诱变	微波诱变	超声诱变
正突变率 /%	16.7	36.7	20	16.7
突变株最高单位 /($\mu\text{g/mL}$)	963	650	902	761
突变幅度 /%	102	36	89	60

醇单位可提高 102%。

2.6 紫外线对不同生长时期菌种的诱变结果

2.6.1 种子生长曲线的绘制

将斜面成熟后的菌丝接入种子瓶中，220r/min，34℃培养。定时对种子培养液中的生物量、残糖、pH 进行测定并涂片观察菌丝状态，绘制种子生长曲线，结果如图 5。根据种子生长曲线及菌丝生长形态，得到菌株的生长特点，0~15h 为萌芽期，15~42h 为对数生长期，42~44h 为稳定期，44~55h 为种子衰亡期，可以看出其稳定期较短，考虑具体实验，选择萌芽期、

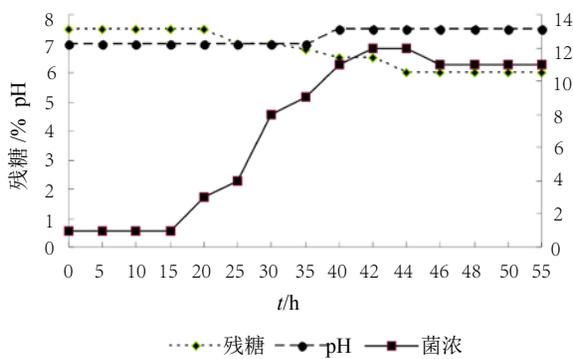


图 5 种子生长曲线

Fig. 5 The growth curve of micromonospora echinoapora seed

对数生长期以及种子衰亡期进行后续实验。

2.6.2 不同生长时期紫外诱变

参照“2.6.1”项结果，对种子萌芽期、对数生长期及衰亡期的种子液进行紫外诱变，分别挑取诱变后在固体平板上生长的单菌落至斜面培养，按照“1.2.8”项方法进行发酵培养，活性评价，筛选结果如表 2。由表 2 可知，菌种在不同生长时期对紫外诱变的效应不同，分别将原始菌株产 G-418 的效价提高了 73%~115%。其中，种子液衰亡期的紫外诱变的正突变率高于其他生长时间，高达 46.7%，且正突变幅度最大，突变菌株最高单位为 1023 $\mu\text{g/mL}$ 。由此可见，选择种子液衰亡期进行紫外诱变，有望获得 G-418 的高产突变菌株。

3 结论

采用紫外诱变、NTG 诱变、微波诱变和超声诱变和不同生长时期种子液的紫外诱变 5 种方法分别

表 2 不同生长期种子 UV 诱变处理正突变率结果

Tab. 2 Result of UV mutagenic at different growth stages on positive mutation rate

诱变方法	不同生长期种子 UV 诱变		
	萌芽期	对数期	衰亡期
正突变率 /%	10	20	46.7
突变株最高单位 /($\mu\text{g/mL}$)	960	824	1023
突变幅度 /%	101	73	115

对产 G-418 小单孢菌进行处理。比较各种诱变剂，虽然 NTG 能够得到较高的正突变率，但突变幅度小，NTG 处理后菌株发酵单位仅提高 36%。紫外线对该 G-418 产生菌具有较好的诱变效应，在经典的菌种选育研究中，采用紫外线作为诱变剂时，处理对象通常是孢子悬液，而本实验采用对衰亡期种子液进行诱变处理，得到了较高的正突变率与产量，当衰亡期种子液经紫外诱变处理 90s 后，其正突变率可达 46.7%，且突变幅度大。本研究最终筛得优良菌株 UV-1 和 UV- 衰亡期 -9，G-418 效价分别比原始菌株提高 102% 和 115%。

参考文献

- [1] Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi J D. Structural origins of gentamicin antibiotic action[J]. *EMBO J*, 1998, 17(22): 6437-6448.
- [2] Weinstein M J, Wagman G H, Testa R T, et al. Antibiotic G-418 and the production thereof: US, 3997403A[P]. 1976-12-14.
- [3] 李嘉琪. G-418 处理核供体细胞对猪克隆胚胎体外发育效率的影响 [D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [4] White D, Chen W. Genetic transformation of *Ascochyta rabiei* using *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Curr Gent*, 2006, 49(4): 272-280.
- [5] Waitz J A, Sabatelli F, Menzel F, et al. Biological activity of antibiotic G-418, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside with activity against *Protozoa* and *Helminths*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1974, 6(5): 579-581.
- [6] Wagman G H, Testa R T, Marquez J A, et al. 1974. Antibiotic G-418, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths: fermentation, isolation, and preliminary characterization[J]. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1974, 6(2): 144-149.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 160-164.
- [8] 夏钱华, 尤朝阳, 张攀, 等. 微波和紫外诱变选育高效石油烃降解菌株 [J]. *水处理技术*, 2017, 43(4): 36-41.
- [9] 李豪, 车振明. 微波诱变微生物育种的研究 [J]. *食品工程*, 2005, (2): 5-6.
- [10] 杨小冲, 陈忠军. 新型物理诱变技术在微生物育种中的应用进展 [J]. *食品工业*, 2017, 38(3): 242-245.