

基于深孔板培养高通量筛选 rakicidin B1 高产菌的研究

周剑 江红 林凤*

(福建省微生物研究所, 福建省新药(微生物)筛选重点实验室, 福州 350007)

摘要: 目的 获得 rakicidin B1 的高产突变菌株。方法 建立深孔板发酵 rakicidin B1 的方法, 结合常压室温等离子体技术 (ARTP) 及核糖体工程对 rakicidin B1 的产生菌进行高通量诱变选育。结果 获得一株高产突变菌株 R36-27, 其摇瓶发酵产量达到 490mg/L 左右, 较出发菌株提高了 237.9%; 经遗传稳定性考察验证了该菌株稳定性较好。结论 采用 ARTP 为诱变源, 以庆大霉素抗性为选择压力, 结合深孔板高通量筛选, 可以快速有效地获得高产菌株。

关键词: 常温等离子体; 核糖体工程; 高通量筛选; 深孔板; Rakicidin

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Studies on high throughput screening for high rakicidin B1-producing strains with deep-well plates

Zhou Jian, Jiang Hong and Lin Feng

(Fujian Key Laboratory of Screening for Novel Microbial Products, Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou 350007)

Abstract Objective To obtain high-yield and genetic stable mutants of Rakicidin B1 production. **Methods** The atmospheric and room temperature plasma (ARTP), the ribosome engineering and high-throughput screening (HTS) were comprehensively applied in the screening of high-yield strains of rakicidin B1. **Results** Finally, a mutant R36-27 with gentamicin resistance was selected by high-throughput screening. In the shaking flask culture, the mutant R36-27 was hereditarily stabilized and its yield of rakicidin B1 increased to 490mg/L compared to 144mg/L produced by the original strain, namely, increased by 237.9%. **Conclusion** This study shows that the screening high-yield strains can be enhanced effectively by combining the atmospheric and room temperature plasma (ARTP), the ribosome engineering and high-throughput screen methods (HTS).

Key words Atmospheric and room temperature plasma (ARTP); Ribosome engineering; High-throughput screening; Deep-well plate; Rakicidin

Rakicidins 是微生物来源的 15 元环脂肽化合物, 其结构中含 1 个极为罕见的 4-氨基-2,4-戊二烯酸辛酰胺^[1-2]。目前已分离的 rakicidins 类化合物主要含有 rakicidin A、A1、B、B1 及 H、I、J 等^[3-6]。研究表明 rakicidins 类化合物具有广谱抗肿瘤细胞、乏氧选择性抗肿瘤细胞、抗临床致病艰难梭菌及抗耐万古霉素肠球菌等活性^[7-9]。现有研究中关于 rakicidins 类化

合物的微生物发酵的研究报道较少, McBrien 等^[1]报道了 rakicidins 类化合物的摇瓶发酵及分离纯化工艺, 其发酵液中的主要组分多为 rakicidin A, rakicidin B 的含量比较低。化合物 rakicidin B1 是本课题组首先发现的, 经研究发现具有较好的生理活性^[3]。如果要开发出具有自主知识产权海洋来源的微生物药物, 就必须筛选出 rakicidin B1 的高产菌株。

收稿日期: 2019-10-17

基金项目: 国家重点研发计划 (No. 2018YFC0311004); 国家“十三五”重大新药创制项目 (No. 2018ZX09711001-007-007); 福建省属公益类科研院所基本科研专项 (No. 2019R11020006-6)

作者简介: 周剑, 男, 生于 1980 年, 副研究员, 主要从事微生物药物研究, E-mail: zjian503@163.com

* 通讯作者, E-mail: life8810@aliyun.com

近年来,常压室温等离子诱变技术(ARTP)在微生物菌种选育方面应用越来越广泛,并已成功运用到细菌、放线菌、真菌、微藻等微生物的菌种遗传改良方面^[10-13]。ARTP诱变技术对微生物DNA突变谱系明显高于其它理化诱变方法^[14]。核糖体工程是指利用庆大霉素、链霉素、利福平等抗生素与微生物核糖体或RNA聚合酶的相互作用,向微生物核糖体组分引入特定类型突变,调控代谢系统,从而影响次级代谢产物表达^[15-16]。利用核糖体工程可以有助于快速、简便地筛选出对应的突变株,进而改进其环境耐受性,提高其次级代谢的产量或产生新的天然产物^[17]。高通量筛选技术具有高效、自动、微量、微型、低成本等优点,已经广泛应用于工业微生物菌种选育、酶活性优化、药理活性筛选等工作中,极大地提高工作效率^[18-20]。

本文对实验室筛选保藏的海洋小单孢菌 FIM02-523 进行 ARTP 诱变处理,经庆大霉素抗性筛选及深孔板高通量筛选获得 rakicidin B1 高产菌株。

1 材料和方法

1.1 主要仪器设备

S30K 型 pH 仪(瑞士 Mettler 公司); INNOVA-5000 型 双 层 摇 床 (New Brunswick Scientific); Agilent 1260 DAD 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 24/96 深孔板(荷兰 EnzyScreen BV 公司); 三明治盖板(荷兰 EnzyScreen BV 公司); 接种器(荷兰 EnzyScreen BV 公司); 8 通道电动移液枪(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 实验菌株

海洋小单孢菌 FIM02523 本课题组筛选获得并保藏。

1.3 培养基及培养条件

培养基及培养条件见参考文献[7]。

1.4 分析方法

发酵液中 rakicidin B1 效价的测定按文献[21]进行。

1.5 菌种诱变与筛选

1.5.1 最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的确定

取适量浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL 的出发菌株孢子悬液分别涂布于含不同浓度庆大霉素的分离平板中,以不含抗生素平板为对照;于 30℃ 恒温培养 10~15d 左右,观察菌落生长情况。以肉眼能够观察到未长菌落的抗生素最小浓度为庆大霉素对该菌株的 MIC。

1.5.2 ARTP 诱变

ARTP 诱变条件^[13]: 工作功率 120W, 气源

为 Ar, 气流量 10L/min, 照射时间为 0、60、120、180、240、360s。诱变后的菌悬液适当稀释并涂布于分离平板,于 30℃ 恒温培养 15d 左右,用于致死率计算和菌种筛选。

1.5.3 高通量深孔板筛选过程

将经过 ARTP 诱变处理的海洋小单孢菌孢子悬液适当稀释,分别涂布到的分离平板(含最小抑菌浓度),30℃ 恒温培养 15d。将分离平板上长好的单菌落挑种到 24 深孔板中培养(每孔装有 2.0mL 固体培养基),每块板可以培养 24 个菌落。

培养好的新鲜斜面板用孔板接种器转接至对应的 24 深孔板(种子板),盖上三明治盖板后置于 30℃、250r/min、湿度 65% 左右的摇床振荡培养,同时斜面板存于 4℃ 冰箱待用;种子板培养 48h 后按 5.0% 的接种量移种到发酵板(装有 2.5mL 发酵培养基)上,于 30℃、250r/min 振荡培养 4d 左右。

培养好的发酵液按 1:3 的体积比例加入甲醇混匀并超声 20min 后离心。取上清液用于 HPLC 检测发酵液中 rakicidin B1 效价。每块发酵板挑选效价最高的 1~2 株菌株传二代斜面用于复筛。

1.5.4 菌株遗传稳定性实验

将筛选出的高产突变株用斜面连续传代培养 5 代,并进行摇瓶发酵测定 rakicidin B1 的产量,考察高产突变株的遗传稳定性。

2 结果与分析

2.1 深孔板发酵方法建立

取新鲜培养的种子液按 5.0% 接种量接种到发酵培养基中,然后用八通道电动移液枪吸取不同体积发酵液分装到 24 深孔板、96 深孔板中,其中 24 深孔板装液量为 1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0mL; 96 深孔板装液量为 0.25、0.5、0.75 和 1.0mL; 每个装量体积设置 8 个平行样;同时设置摇瓶对照,装液量分别为 40、60、80、100、和 120mL,每组 5 瓶。接种后于 30℃、250r/min 振荡培养 4d。

由表 1 可以看出 24 深孔板发酵数据结果比较接近摇瓶,且数据变异系数较低,说明 24 深孔板可以用于替代摇瓶筛选。装液量 2.5mL 效价和变异系数均比较理想。96 深孔板装液量 0.25mL 时部分效价接近摇瓶,但是波动较大,而且部分孔板出现结球现象,可能由于装液体积太少随着培养时间增加液体挥发以及微量接种无法保证接种量的一致性等因素影响,导致结果不理想。当 96 孔板装液量超过 0.5mL 后可能溶氧不足导致菌体生长不良,产量较低。综合考

表 1 不同装液量体积对 rakicidin B1 发酵单位的影响

Tab. 1 The effect of different volume of fermentation on the yield of rakicidin B1

装液量 /mL	24 深孔板		96 深孔板			摇瓶对照		
	平均发酵单位 / (mg/L)	变异系数 CV	装液量 /mL	平均发酵单位 / (mg/L)	变异系数 CV	装液量 /mL	平均发酵单位 / (mg/L)	变异系数 CV
1.0	154.74	4.80%	0.25	143.43	8.54%	40	123.45	3.21%
1.5	149.72	3.81%	0.5	116.75	4.65%	60	136.87	2.62%
2.0	149.72	3.09%	0.75	88.93	4.68%	80	156.87	2.89%
2.5	163.56	2.77%	1.0	59.53	7.65%	100	106.32	3.11%
3.0	136.85	3.14%	1.25	38.93	5.43%	120	77.33	3.43%

考虑采用 24 深孔板发酵，装液量为 2.5mL。

以 24 深孔板装量 2.5mL 的发酵培养基，考察不同摇床转速对深孔板发酵的影响，对照为常规摇瓶发酵对应转速 250r/min，结果见表 2。

结果表明摇床转速在 250~300r/min 之间 rakicidin B1 发酵效价最高，在后面的筛选实验过程中可以选择 250r/min 的转速作为发酵培养条件。

2.2 庆大霉素抑菌浓度 (MIC) 的确定

取浓度为 10⁶~10⁷CFU/mL 的孢子悬浮液 0.1mL 分别涂布于含不同浓度庆大霉素的分离平板中，结果见表 3。结果表明，平板培养基中添加庆大霉素后，菌落生长变慢，菌落较小。随着庆大霉素浓度的增加，菌株在分离平板上的单菌落逐渐减少，当庆大霉素浓度达到 0.4μg/mL 时，分离平板上无明显单菌落形成，此浓度即为此菌株的 MIC。

2.3 ARTP 诱变剂量的确定

按照“1.6.2”项方法对出发菌株进行 ARTP 处理，诱变后的菌悬液按一定倍数稀释并涂布于固体基础培养基中培养 15d 左右，统计菌落数绘制致死率曲线，结果如图 1。ARTP 处理的致死率和诱变剂量关联性比较好，随着诱变时间的增加致死率也上升。处理时间为 60s 时，致死率为 33% 左右；处理时间

为 180s，致死率达到 77% 左右；处理时间为 240s 时，致死率达到 89% 左右；处理时间超过 300s 时，致死率接近 100%。

综合考虑致死率曲线变化规律及庆大霉素抗性选育需要足够量的菌落数，在诱变后期试验中采用致死率 77% 左右的诱变条件，即辐射处理时间为 180s。

2.4 深孔板高通量筛选

按照“1.6.2”项方法对出发菌株进行 ARTP 辐射处理，处理条件为：离子源功率 120kW，气源为氩气，气流量 10L/min，按照射时间 180s；处理后的菌悬液采用“1.6.3”项方法进行初步筛选。每个 24 孔板中只留 1 株效价最高的菌株传新斜面板，将生长好的斜面板菌株再次用 24 深孔板进行发酵复筛。获得的高产菌种再进行下一轮诱变筛选，经过 3 轮诱变及筛选，共获得 20 株效价提高 100% 以上的突变株，其中提高 50% 以上的 12 株，100% 以上的 5 株，200% 以上的 3 株。

对出发菌株 (Wild type, WT) 及效价提高 200% 的 3 株突变株 (R5-9、R19-5、R36-27) 在摇瓶上进行发

表 2 不同转速对 24 孔板发酵产 rakicidin B1 的影响

Tab. 2 The effect of different rotation speed on the yields of rakicidin B1

转速 / (r/min)	平均效价 / (mg/L)
150	46.29±5.23d
200	94.06±4.43c
250	144.32±3.54ab
300	159.38±3.85a
CK	145.65±4.43b

注：表中同列数据后不同字母表示差异显著 (P < 0.05)

表 3 不同庆大霉素浓度对小单孢菌 FIM02523 生长的影响

Tab. 3 Effect of gentamicin concentration on the growth of strain FIM-02523

庆大霉素 / (μg/mL)	0	0.10	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
生长情况	++++	++++	+++	+	-	-	-

注：“++++”为菌落生长极好；“+++”为菌落生长好；“++”为菌落生长一般；“+”为菌落生长很少；“-”为无菌落生长

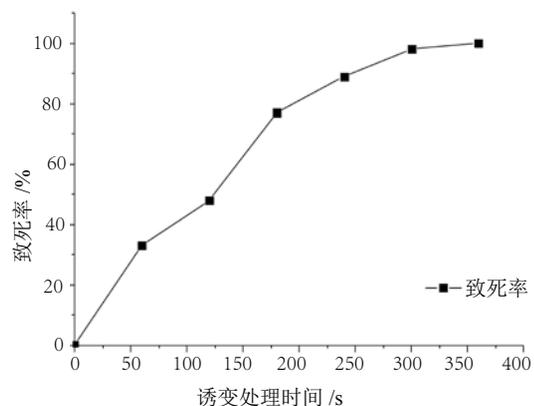


图 1 海洋小单孢菌 FIM02523 的 ARTP 诱变致死率曲线

Fig. 1 The lethal rate of *Micromonospora* FIM02523 treated by ARTP

表 4 24 深孔板和摇瓶培养复筛高产突变株的发酵效价对比

Tab. 4 Rakicidin B1 production by *Marine micromonospora* grown in 24 deep-well plates or in shaking flasks

菌株	深孔板发酵平均效价 / (mg/L)	摇瓶发酵 / (mg/L)
WT	138.56±3.54	143.02±3.93
R5-9	489.32±3.32	497.23±5.38
R19-5	465.54±6.21	477.32±3.54
R36-27	488.76±4.98	495.42±4.54

表 5 突变株遗传稳定性考察

Tab. 5 Genetic stability analysis for high productive mutants to produce rakicidin B1

传代	平均发酵效价/(mg/L)		
	R5-9	R19-5	R36-27
F1	485.2	468.8	484.2
F2	482.1	462.3	498.3
F3	472.2	472.1	483.5
F4	475.1	464.9	489.5
F5	469.9	469.2	490.8

酵验证(每株菌设置3个平行实验)结果如表4。

由表4可以看出不同菌株在摇瓶和24深孔板发酵培养时 rakicidin B1 的发酵单位变化趋势基本一致,也验证了24深孔板可用于海洋小单孢菌发酵产生 rakicidin B1 的发酵培养及菌株筛选。

2.5 遗传稳定性

选择产量最高的3株菌进行传代和遗传稳定性实验,结果见表5。由表5可以看出高产突变株 R5-9、R19-5、R36-27 遗传稳定性均较好,其中菌株 R36-27 最高比出发菌株效价提高约237.9%,效价达到490mg/L左右,可以将其作为后续诱变和发酵工艺优化的菌株,其余两株菌作为备选菌株暂时保藏。

3 讨论

优良的菌种是实现海洋来源微生物药物产业化的根本,而在海洋来源的微生物菌株选育中,高突变率的诱变手段及高通量的筛选方法更是至关重要。本文首次将ARTP诱变技术、庆大霉素抗性选育及高通量筛选技术综合应用于海洋来源的小单孢菌产 rakicidin B1 的高产菌株选育。建立基于深孔板发酵 rakicidin B1 高产菌种的高通量筛选方法,与传统摇瓶筛选方法相比,该方法操作简便,缩短了菌株筛选周期,加大了菌株初筛数量,可高效、低成本、快速筛选海洋来源小单孢菌 rakicidin B1 的高产菌株。

筛选获得的高产菌株 R36-27 效价由出发菌株的144mg/L提高到490mg/L左右,提高了237.9%,且遗传稳定性良好。表明了核糖体工程技术(庆大霉素抗性)、ARTP诱变技术及高通量筛选技术综合应用

于 rakicidin B1 高产菌的筛选,是有效的、可行的。

参考文献

- [1] McBrien K D, Berry R L, Lowe S E, *et al.* Rakicidins, new cytotoxic lipopeptides from *Micromonospora sp.* fermentation, isolation and characterization[J]. *J Antibiot*, 1995, 48(12): 1446-1452.
- [2] 江红,林如,郑卫,等.海洋青铜小单孢菌 FIM02-523 产生的脂肽类化合物 FW523 的分离鉴别和生物学活性[J].中国抗生素杂志,2006,31(5): 267-270.
- [3] 林风,王传喜,江宏磊,等.海洋小单孢菌产生的抗肿瘤新化合物 rakicidin B1(英文)[J].中国抗生素杂志,2016,41(7): 510-515.
- [4] Hu J F, Wunderlich D, Sattler I, *et al.* Rakicidin C, A new cyclic depsipeptide from *Streptomyces sp.*[J]. *Eur J Org Chem*, 2000, 2000(19): 3353-3356.
- [5] Igarashi Y, Shimasaki R, Miyanaga S, *et al.* Rakicidin D, an inhibitor of tumor cell invasion from marine-derived *Streptomyces sp.*[J]. *J Antibiot*, 2010, 63(9): 563-565.
- [6] Chen L, Zhao W, Jiang H L, *et al.* Rakicidins G-I, cyclic depsipeptides from marine *Micromonospora chalcone* FIM 02-523.[J]. *Tetrahedron*, 2018, (74): 4151-4154.
- [7] 江红,林如.海洋小单孢菌来源的轻快菌素 B FW523-3 的体外抗肿瘤活性[J].中国抗生素杂志,2008,33(9): 531-535.
- [8] 林风,陈晓明,周剑,等.海洋小单孢菌产生的缩肽类化合物 rakicidins 抗肿瘤活性研究[J].中国抗生素杂志,2016,41(7): 516-523.
- [9] 林风,陈丽,赵薇,等.缩肽类化合物 rakicidins 体内外抗艰难梭菌活性研究[J].中国抗生素杂志,2017,42(5): 343-347.
- [10] Li G, Li H P, Wang L Y, *et al.* Genetic effects of radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges with helium[J]. *Appl Phys Lett*, 2008, 22(92). <https://doi.org/10.1063/1.2938692>.
- [11] Zhang X, Zhang X F, Li H P, *et al.* Atmospheric room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(12): 5387-5396.
- [12] 向荣华,詹晓北,朱莉,等.常压室温等离子体诱变绿色产色链霉菌及阿维拉霉素高产菌选育[J].中国抗生素杂志,2015,40(10): 732-737.
- [13] 周剑,张引.达托霉素产生菌前体物耐受选育及其流加补料发酵[J].中国抗生素杂志,2018,43(7): 817-823.
- [14] 邢新会.食品微生物育种新技术—常压室温等离子体微生物基因组快速突变技术的开发难点和育种优势[J].乳业科学与技术,2013,36(1): 2-3.
- [15] 谢庶洁,肖静,徐俊,等.微生物核糖体工程研究进展[J].微生物学报,2009,49(8): 981-986.
- [16] 傅路,裘娟萍.核糖体工程改良微生物菌种特性的研究进展[J].科技通报,2012,28(11): 77-83.
- [17] 蔡成平,王远山,郑裕国.核糖体工程与微生物次级代谢产物合成[J].生物技术通报,2012,(9): 51-58.
- [18] 韩闯,杨盛昌.高通量筛选技术及其应用[J].生物技术通报,2005,(2): 22-25.
- [19] 田江涛,李敏超,杭海峰,等.紫外分光光度法快速测定庆大霉素 C1a 含量在高通量筛选中的应用[J].中国抗生素杂志,2019,44(1): 59-67.
- [20] 王丽丽,张春晓,刘晓红,等.青霉素高产菌株高通量检测和筛选方法的研究[J].中国抗生素杂志,2011,36(3): 183-186.
- [21] 周剑,江宏磊,赵薇,等.HPLC 测定发酵液中 Rakicidin