

• 实验研究 •

小单孢菌M-90的诱变育种

王耀伟 应 杰 (中国药科大学, 南京 210009)

摘要 试验了紫外线、硫酸二乙酯、亚硝基胍、 Co^{60} 及紫外线、氯化锂复合处理等各种物理、化学诱变剂对小单孢菌M-90的诱变效应。结果表明, 硫酸二乙酯和亚硝基胍对小单孢菌M-90的诱变效果最好。经复筛从中得到了效价分别是亲株2.1和2.5倍的高产株。某些高产株经传代培养后, 效价不变。说明这些高产株具有遗传稳定性。

关键词 小单孢菌 诱变育种 诱变剂

1 材料和方法

1.1 菌株

亲株: 野生玫瑰绛红小单孢菌M-90

指示菌: 藤黄八叠球菌

1.2 培养基

斜面培养基: 高氏淀粉培养基。

摇瓶种子培养基(%): 蛋白胨 0.5, 黄豆饼粉 2.0, 可溶性淀粉 3.0, 玉米粉 1.0, 葡萄糖 0.5, KH_2PO_4 0.4, MgSO_4 0.05, NaCl 0.1, 饱和 NaOH 调 pH 7.2~7.5后加 CaCO_3 至 pH 0.5。

摇瓶发酵培养基(%): 蛋白胨 0.5, 黄豆饼粉 2.5, 可溶性淀粉 3.5, 玉米粉 1.5, 葡萄糖 0.5, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.05, NaCl 0.2, FeSO_4 0.001, 调 pH 7.2~7.5后加 CaCO_3 至 pH 0.6。

1.3 诱变处理方法^[1]

紫外线处理: 取菌龄 8 d 的斜面孢子制备单孢子悬液, 再取菌龄 4~5 d 的斜面菌丝制备菌丝悬液, 用 15 W、波长为 2537 Å 的紫外灯, 30 cm 照射不同的时间。

γ 射线(Co^{60})处理: 取不同菌液分别以 6 万和 10 万伦琴的剂量照射。

紫外线和 LiCl (UV + LiCl) 复合处理: 将经不同剂量 UV 处理的孢子液稀释后吸取 0.1 ml 涂布于含 0.3~0.9% LiCl 的培养基上。

硫酸二乙酯(DES)处理: 将孢子悬液用 Soniprep 150 型超声波发生器以 14 microns 的强

度处理 7 min, 然后加入 2% (V/V) 的 DES, 置 37°C 恒温振荡器上作用不同时间。

亚硝基胍(NTG)处理: 取 0.5 ml 孢子液加入 2 ml 1 mg/ml 的 NTG 中, 37°C 作用不同时间。

1.4 分析

效价测定: 发酵液中加入 4% (W/V) ZnSO_4 , 调 pH 至 8.5~9.0, 抽滤。用微生物二剂量法测定效价^[4]。

组分测定: 发酵液在碱性条件下加入 4% ZnSO_4 , 除去杂蛋白, 抽滤, 滤液调 pH 至 10~11, 用醋酸丁酯提取, 减压浓缩, 在硅胶薄层板上点样, 用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (4:1) 展开, 碘熏显迹。

1.5 筛选^[2-3]

1.5.1 琼脂挖块法初筛;

1.5.2 摇瓶复筛, 选择产抗多、周期短的菌株。

2 结果与讨论

2.1 紫外线诱变效应

小单孢菌对紫外线的敏感性较差。本实验中, M-90 孢子悬液经 UV 照射 2 min, 存活率 0.47%, M-90 菌丝悬液经 UV 照射 1 min, 存活率 0.42%, 而文献^[5]上报道, 绛红小单孢菌经 UV 照射 5 min, 存活率 1.21%。可见小单孢菌 M-90 对紫外线较敏感(见表一)。

由表 1 可见, 当采用菌丝诱变时, 在 25 s 处有较大的正变率; 而采用孢子时, 在 60 s 有最大的正变率。

Tab. 1 The effect of UV on Micromonospora M-90

Primary strain	Time of treatment(s)	Number of colonies	Survival rate(%)	Positive (%)	Negative (%)	Unchanged (%)
Mycelium of NS strain	0	238	100	—	—	—
	15	42	17.65	25.0	37.5	37.5
	25	21	8.82	33.3	16.7	50.0
	30	17	7.14	0	71.4	28.6
	45	2	0.84	0	0	100
	60	1	0.42	0	100	0
Spore of NS strain	0	427	100	—	—	—
	30	73	17.10	14.3	64.3	21.4
	45	69	16.16	33.3	66.7	0
	60	32	7.49	77.9	16.7	5.4
	75	27	6.32	21.4	78.6	0
	90	14	3.28	26.7	53.3	20
	120	2	0.37	29.6	32.2	38.2

经初筛和复筛,用紫外线处理M-90未出现高产株,效果不明显。

M-90孢子悬液经UV分别处理30和40s再与不同剂量的LiCl复合处理,结果见表2。

2.2 紫外线与氯化锂复合诱变效应

Tab. 2 The effect of UV + LiCl on M-90

Primary strain	Time of treatment(s)	LiCl (%)	Number of colonies	Survival rate(%)	Pos (%)	Neg (%)	Unchanged (%)
Spore of NS strain	30	0.3	198	56.1	38.5	30.8	30.7
		0.4	—	94.3	64.3	0	35.7
		0.5	184	92.1	69.2	7.7	23.1
		0.6	30	8.5	20.0	40.4	40.0
		0.7	45	12.8	6.25	56.3	37.5
		0.8	—	64.3	64.3	14.3	21.4
	40	0.9	18	5.1	0	100	0
		0.3	80	22.7	18.2	45.5	36.3
		0.4	96	27.2	0	50.0	50.0
		0.5	47	13.3	12.5	62.5	25.0
		0.6	93	26.4	20.0	80.0	0
		0.7	63	17.9	30.0	50.0	20.0
		0.8	49	13.9	85.7	0	14.3
		0.9	30	8.5	0	100	0

经初筛,未发现抑菌圈很大的菌落,经摇瓶复筛,得到了相对效价为160、162、166、168与187的高产株。说明UV与LiCl复合处理小单孢菌M-90效果良好。

2.3 硫酸二乙酯诱变效应

用硫酸二乙酯(DES)处理前,我们先用超声波发生器预处理孢子悬液,结果比单独用诱变剂处理

效果好。这可能是由于经超声波处理的孢子,其细胞壁受到一定损伤,使孢子对诱变剂敏感。超声波预处理后,再用DES处理30、45、60min者正变率均达100%,而高产率则分别为14.29%、100%、90.91%(见图1)。

由此可见,在诱变剂处理前用超声波预处理效果十分明显。也有文献报道^[6]用发芽孢子诱变效

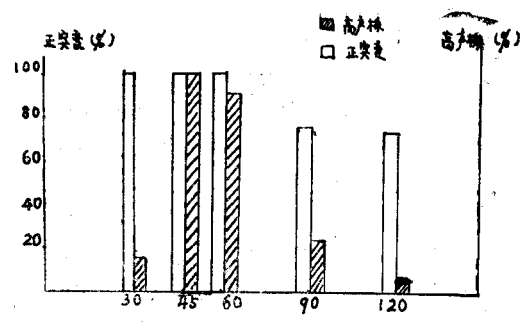


图1 DES处理M-90的结果
果良好, 但用发芽孢子诱变操作复杂易污染, 不如

超声波方便。

2.4 亚硝基胍诱变效应^[1]

结果见表3, 正变率及高产率都比较高。经分离筛选后得到一株效价是亲株2.1倍的高产株(s-15), 经过传代培养, 具有遗传稳定性。

2.5 Co^{60} 诱变效应

文献报道^[7], 用22万伦琴剂量的 γ 射线辐照庆大霉素产生菌时, 致死率可达99.82%。但近年来诱变育种倾向于较低致死率的诱变剂量^[8]。故我们采用6万和10万伦琴的剂量处理M-90, 从初筛结果看, 平均正变率达48.53%, 见表4。

Tab. 3 The result of treatment with NTG

Primary strain	Time of treatment(h)	Number of colonies	Survival rate (%)	Pos. (%)	Neg. (%)	Unchange (%)	Rate of HYS (%)
Spore of Ns strain	0	843	100	—	—	—	—
	1	365	43.3	53.3	46.7	0	6.7
	2	350	41.5	30.0	45.0	25.0	10.0
	3	72	8.7	33.3	44.5	22.2	11.1
	3.5	—	13.8	25.0	60.0	15.0	20.0
	4	58	6.9	0	100	0	0
	5	—	17.8	0	100	0	0

Tab. 4 The results of treatment with Co^{60}

Primary strain	Dosage of Co^{60}	Survival rate (%)	Positive (%)	Negative (%)	Unchanged (%)	Rate of HYS (%)
Spore of natural strain	$10^5 R$	4.62	44.90	46.94	8.16	2.04
Spore of NTG strain	$6 \times 10^4 R$	6.49	53.06	20.41	26.53	8.16
Spore of DES strain	$6 \times 10^4 R$	9.44	52.27	15.91	31.82	0
Spore of LiCl+UV strain	$6 \times 10^4 R$	9.65	43.90	36.59	19.51	0

3 菌种选育系谱及筛选的高产株情况

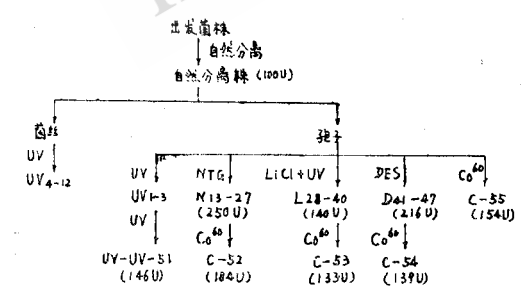


图2 M-90诱变的系谱

4 组分考察

本实验对自然分离株, DES处理的高产株和NTG处理的高产株做了组分考察, 自然分离株和DES处理的高产株有A、B、C三个组分, Rf值分别为0.745、0.573和0.4; 0.751、0.580和0.415, NTG处理的高产株只有A、B两个组分, A组分抗菌活性最强。

5 小结

M-90是一株野生玫瑰红色小单孢菌, 产生一个新的大环内酯类抗生素, 经体外试验证明它对革兰

氏阳性和阴性细菌及绿脓杆菌有抑制作用,初步鉴定为一新的抗生素。因其为野生株,发酵单位低,组份复杂,在本实验中,我们采用了多种物理、化学诱变剂处理,得到了发酵单位较高,组份较纯、遗传较稳定的突变株。

参 考 文 献

- 1 章名春.工业微生物诱变育种.北京:科学出版社,1984.99
- 2 朱建伟,朱为敏.遗传学方法在抗生素生产菌育种中的应用.中国医药工业杂志,1989,20(2):83~88.
- 3 俞文和,杨纪根.抗生素工艺学.沈阳:辽宁科技出版社,1988.117.

- 4 中华人民共和国药典(二部)附录1990,115.
- 5 罗素群,卫福友,陈颖怡.庆大霉素产生菌绛红小单孢菌诱变育种的研究.抗生素副刊,1988,11,1~4.
- 6 管光瑜,廖崇娟,焦军等.庆大霉素产生菌刺孢小单孢菌发芽研究.抗生素,1981,6(1):14~15.
- 7 赵森泉,林晓琳,张传香.庆大霉素 C_1 合成代谢障碍突变菌株8007~187选育.抗生素,1983,8(2):132.
- 8 还连栋. NUV 在8-MOP存在下对庆大霉素产生菌诱变育种的研究.抗生素,1987,12(2):120~125.

收稿日期:1993—05—03