

阿维链霉菌的诱变育种

陈金辉, 郭伟群, 蔡玉娟, 王天科, 王晓芳, 宋 渊*

中国农业大学生物学院, 北京 100193

摘 要:以阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)76-12 为出发菌株,采用亚硝基胍、吡啶橙、紫外线和氯化锂分别对其孢子和原生质体进行诱变,经抗代谢物理性筛选,获得一系列高产突变株,其中 N-1-2 高产突变株的发酵单位是出发菌株的 2.47 倍。实验中同时获得了只产阿维菌素 a 组分的突变株 G-32、B1a 组分含量高的 Ave8 菌株和产蓝绿色孢子的突变株 UA-G 等。

关键词:阿维菌素;阿维链霉菌;诱变;理性筛选

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2011.02.10

The Mutation Breeding of *Streptomyces avermitilis*

CHEN Jin-hui, GUO Wei-qun, CAI Yu-juan, WANG Tian-ke, WANG Xiao-fang, SONG Yuan*

College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract:Spores and protoplasts of the original strain *Streptomyces avermitilis* 76-12 were treated with nitrosoguanidine (NTG), acridine orange, ultraviolet radiation (UV) and LiCl respectively. Then a series of high yield avermectin producing and stable mutants were obtained through mutation and rational selection. The avermectin productivity of the mutant N-1-2 was 2.47 times of the original strain. Furthermore, several special mutants were obtained. Mutant strain G-32 produced only "a" avermectins; mutant strain Ave8 had higher level of avermectin B1a content than original strain; and mutant strain UA-G developed bluegreen spores.

Key words:avermectin; *streptomyces avermitilis*; mutation; rational screening

阿维菌素(avermeclins)是由阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)产生的一组结构相似的十六元大环内酯齐墩果糖双糖衍生物。阿维链霉菌是 1975 年由日本北里研究所(Kitasato Institute)从日本静冈县伊东市河奈(Kawana)地区的一个土壤样品中分离得到的,1979 年由 Brug 鉴定命名^[1]。阿维链霉菌经过发酵后产生八个组分的阿维菌素,分别为 A1a、A2a、A1b、A2b、B1a、B2a、B1b 和 B2b,这八个组分都有杀虫活性,其中以 B1a 的杀虫活性最强^[2]。阿维菌素是目前最有效的生物杀虫剂之一,具有高效低毒的特点,在医药、农业和畜牧业生产上具有良好的应用价值

和市场前景。有意义的是 2004 年发现阿维菌素还具有显著的抗肿瘤活性,联合用药可显著增加长春胆碱的活性^[3],并可以抑制肿瘤细胞产生的多重耐药性^[4]。虽然阿维菌素在国内已实现产业化,取得了明显的经济和社会效益,但我国阿维菌素的生产与国际水平相比较,发酵单位仍然偏低,因此提高阿维菌素发酵单位,降低生产成本,已经成为急需解决的问题。本实验采用亚硝基胍(NTG)、吡啶橙、紫外线(UV)和氯化锂(LiCl)分别对出发菌株的孢子和原生质体进行了的诱变,通过抗代谢物理性筛选方法对突变株进行筛选,获得了一系列高产稳定的突变株。

收稿日期:2011-05-11; 接受日期:2011-05-25

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAD08B02)资助。

作者简介:陈金辉,硕士研究生,从事抗生素发酵研究。*通讯作者:宋 渊,教授,主要从事微生物次生代谢研究。Tel: 010-62731329; E-mail:syuan@cau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 菌种

阿维链霉菌 76-12, 本实验室保存, 由 ATCC31272 经多次诱变获得。

1.2 培养基

斜面培养基采用 YMS^[5], 种子和发酵培养基参照文献^[6], 高渗液体培养基采用改良 YEME(蔗糖浓度为 25%)^[7], 原生质体再生培养基为 RM14^[7]。

平板培养基除 YMS 培养基以外还有:

MA 培养基(1 L): 淀粉 20 g, 酵母膏 2 g, 麦芽膏 2 g, KNO₃ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ · 3H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 10 mg, CoCl₂ · 6H₂O 5 mg, pH 7.0 ~ 7.2。

MB 培养基(1 L): 可溶性淀粉 30 g, 麦芽膏 2 g, 大豆蛋白胨 2 g, CoCl₂ · 6H₂O 5 mg, pH 7.0 ~ 7.2。

MC 培养基(1 L): 可溶性淀粉 50 g, 麦芽膏 2 g, 大豆蛋白胨 2 g, CoCl₂ · 6H₂O 5 mg, pH 7.0 ~ 7.2。

MD 培养基(1 L): 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, 酵母膏 2.5 g, CoCl₂ · 6H₂O 5 mg, pH 7.0 ~ 7.2。

1.3 诱变方法

1.3.1 亚硝基胍对孢子的诱变处理 萌发孢子悬液的制备与亚硝基胍的诱变处理的方法参照文献^[8], 亚硝基胍浓度为 1 mg/mL。

1.3.2 紫外线和 LiCl 对原生质体的复合诱变处理 原生质体的制备参照文献^[7]。吸取制备好的原生质体悬液, 加入 LiCl 溶液使其浓度最终为 0.4%, 在紫外灯下分别处理 30 s、40 s、60 s 和 90 s(紫外灯功率为 15 W, 照射距离 30 cm)。稀释后涂布于再生培养基上, 避光于 28℃ 培养 7 ~ 10 d 后挑取单菌落。

1.3.3 吡啶橙对孢子的诱变处理 参照文献^[6] 制备孢子悬液, 加入吡啶橙溶液, 使其终浓度为 1 mg/mL, 分别作用 30 min、45 min、60 min、75 min 和 90 min 后离心, 无菌水反复多次洗涤, 稀释后涂布于平板培养基上, 28℃ 培养 7 ~ 10 d 后挑取单菌落。

1.3.4 紫外线和 LiCl 对孢子的复合诱变处理

制备孢子悬液进行紫外线和 LiCl 的复合处理, 方法同 1.3.2。

1.4 筛选方法

1.4.1 平板培养初筛 方法参照文献^[9]。

1.4.2 摇瓶发酵复筛 方法参照文献^[8]。

1.5 抗代谢物理性筛选

1.5.1 筛选抗阿维菌素的突变株 阿维菌素标准品溶于甘油中, 加热使其溶解。将其加入到 YMS 或再生培养基中, 终浓度为 0.5 g/L, 制成平板培养基用于筛选。

1.5.2 筛选抗阿维菌素水解物的突变株 阿维菌素水解物的制备方法参照文献^[10]。将阿维菌素的水解物配成甘油溶液后加入到 YMS 或再生培养基中, 终浓度为 0.5 g/L, 制成平板培养基用于筛选。

1.5.3 筛选抗异亮氨酸的突变株 将异亮氨酸溶液加入到 YMS 培养基或再生培养基中, 终浓度为 0.5 g/L, 制成平板培养基用于筛选。

1.6 阿维菌素的检测

1.6.1 薄层层析法 薄层层析硅胶预制板为 HSG F254 型(烟台市化学工业研究所), 薄层层析展开剂为正己烷: 异丙醇 = 90:10^[9]。

1.6.2 高效液相色谱法 色谱条件参照文献^[8]。

2 结果

2.1 平板初筛方法的比较

为了选择最合适的平板培养初筛方法, 首先对四种不同平板培养基的平板培养初筛方法进行了比较。将出发菌株 76-12 的孢子悬液稀释一定浓度后均匀涂布于 4 种平板培养基, 28℃ 培养 7 d 后观察菌落特征, 同时用薄层层析检测, 比较在不同培养基上的产阿维菌素能力, 结果见表 1。其中在 MC 培养基上产阿维菌素的能力最强, 且出发菌株在 MC 培养基上生长速度快, 产孢丰富, 菌落差异性明显, 所以选择 MC 培养基作为筛选突变株的平板培养初筛培养基。

2.2 抗代谢物理性筛选的效果比较

将出发菌株的孢子经过亚硝基胍诱变, 处理

表1 阿维链霉菌 76-12 在几种培养基上的菌落特征以及产素能力

Table1 The phenotype features and AVM productivity of *S. avermitilis* 76-12 on several culture mediums.

培养基	YMS	MA	MB	MC	MD
菌落特征	菌落较大,灰色	菌落大,灰色	菌落凸起,白色	菌落较大,灰色	菌落小,不产孢
产素能力	MC > YMS > MA > MD > MB				

时间为 75 min,致死率为 95.8%,稀释一定浓度后均匀涂布于分别含有阿维菌素、阿维菌素水解物和异亮氨酸(浓度均为 0.5 g/L)的平板培养基上,以不加上述物质的处理为对照,28℃培养 7~10 d 后随机挑取 50 个单菌落,摇瓶发酵后 HPLC 测定发酵单位,计正突变率(相对与未诱变的出发菌株产量提高 10% 以上者被认为是正突变)和最高产量提高率。

比较以上 3 种筛选方法的正突变率和最高产量的提高率,结果如表 2。以阿维菌素作为抗代谢物的正突变率最高,为 32%,同时阿维菌素产量提高率也最高,为 51%。综合比较 3 种筛选方式可以看出筛选阿维菌素抗性突变株的筛选方法优于其他两种方法。

表2 抗代谢物突变株的筛选

Table 2 Screening of antimetabolite mutants.

抗代谢物	正突变率	最高产量提高率
阿维菌素	32%	51%
阿维菌素水解物	24%	26%
异亮氨酸	28%	62%
对照	22%	23%

2.3 阿维菌素高产菌株的选育

2.3.1 亚硝基胍对 76-12 孢子的诱变 用亚硝

基胍处理 76-12 的孢子悬液(浓度为 10^8 个/mL),作用 75 min,致死率为 95.8%,处理后的孢子悬液稀释一定浓度后涂布于添加有阿维菌素的 YMS 平板培养基上。28℃培养 7~10 d,挑取生长旺盛,产孢丰富的灰色菌落到平板初筛培养基(含有 5% 阿维菌素的 MC 培养基)上,28℃培养 7 d 后用 TLC 检测,实验中共筛选了 600 多个单菌落,其中突变株 II-24-3 的发酵单位明显较高(如图 1 所示)。以后经摇瓶发酵复筛,突变株 II-24-3 比出发菌株提高了 96.5%。

2.3.2 紫外线和 LiCl 复合诱变 II-24-3 的原生质体 以突变株 II-24-3 为出发菌株,制备原生质体,浓度为 10^6 个/mL。进行紫外线和 LiCl 复合诱变,作用 50 s,致死率为 93.9%。处理后的原生质体悬液稀释一定浓度后涂布于再生培养基(含有 5% 阿维菌素),避光于 28℃培养 10 d 后挑取单菌落。从 300 多株突变株中,经平板培养初筛和摇瓶发酵复筛得到发酵单位提高了 53.6% 的突变株 B-1-10。但是经过传代培养 B-1-10 的退化现象很严重,产量下降。

2.3.3 吡啶橙对 B-1-10 孢子的诱变 以 B-1-10 为出发菌株,用吡啶橙对其孢子(孢子悬液浓度 10^8 个/mL)进行诱变处理 30 min,致死率为 92.6%。处理后的孢子悬液稀释一定浓度后涂布

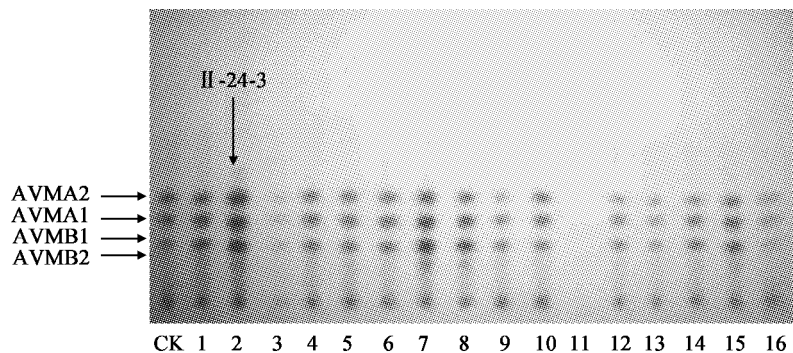


图1 突变株的 TLC 测试结果

Fig.1 The TLC test for mutants' AVM productivity.

CK 为对照菌株 76-12; 1~16 为 NTG 诱变菌株;其中 2 号为诱变株 II-24-3。

于含有 5% 阿维菌素的 MC 培养基上, 28℃ 培养 7~10 d 后挑取单菌落。吡啶橙诱变后出现的突变株白色菌落居多, 通过平板培养初筛和摇瓶发酵复筛, 在 100 个突变株中并没有筛选到产量有明显提高的突变株, 只筛选到一株产单 a 组分的突变株 G-32, 其发酵产物 HPLC 图谱见图 2。

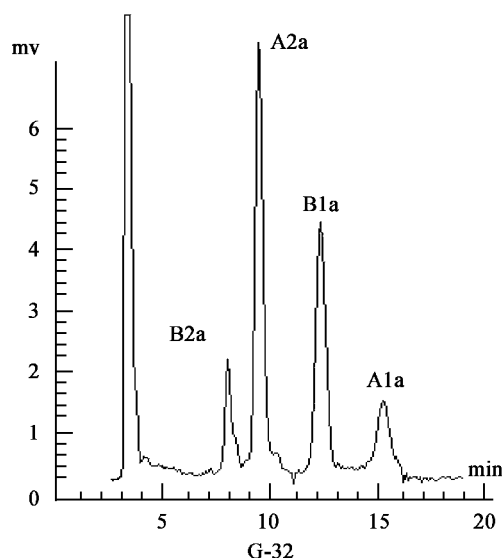


图2 Mutant G-32 发酵产物的 HPLC 图谱
Fig. 2 HPLC chromatograms of the mycelial extracts from mutant G-32.

2.3.4 亚硝基胍对 B-1-10 孢子的诱变 采用与 2.3.1 同样的方法, 对 B-1-10 的孢子进行亚硝基胍诱变处理, 处理后的孢子悬液稀释一定浓度后

涂布于 MC 培养基 (含有 5% 阿维菌素), 28℃ 培养 7~10 d 后挑取单菌落。通过平板培养初筛和摇瓶发酵复筛, 从 200 多突变株中获得 N-1-2 突变株, 其发酵单位是 76-12 菌株的 2.47 倍。此次诱变过程中, 还获得了突变株 Ave-8, Ave-8 的发酵单位是 76-12 的 2.20 倍, 更有意义的是 Ave-8 B1a 组分提高到 44.3%, 比出发菌株 76-12 (B1a 含量为 36.7%) 提高了 7.6%, 其发酵产物的 HPLC 图谱见图 3。

2.3.5 紫外线和 LiCl 对 B-1-10 孢子的复合诱变

B-1-10 刚刚萌发的孢子进行紫外线和 LiCl 复合诱变, 诱变时间为 75 秒, 致死率为 89.4%。处理后的孢子悬液稀释一定浓度后涂布于 MC 培养基 (含有 5% 阿维菌素) 上, 避光于 28℃ 培养 7~10 d 后挑取单菌落。通过平板培养初筛和摇瓶发酵复筛, 从 300 多个突变株中筛选得到 UA-2 和 UA-4 菌株等。其中 UA-2 的发酵单位是 76-12 菌株的 2.35 倍, UA-4 的发酵单位是 76-12 菌株的 2.37 倍, 此次诱变过程中, 还获得了一株绿色孢子突变株 UA-G, UA-G 的发酵单位是 76-12 的 2.06 倍。

2.4 突变株的稳定性考察

将 II-24-3、B-1-10、Ave-8、UA-2、UA-4、UA-G 和 N-1-2 突变株进行连续传代培养以考察其产量稳定性, 试验结果见图 4。II-24-3、Ave-8、UA-2、UA-4 和 UA-G 突变株在数次传代后发酵单位稳

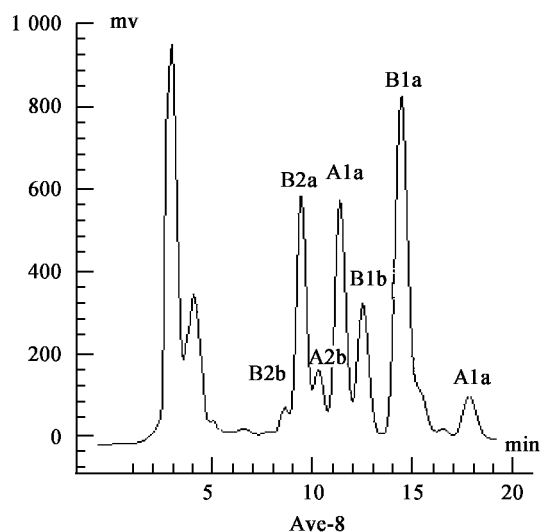
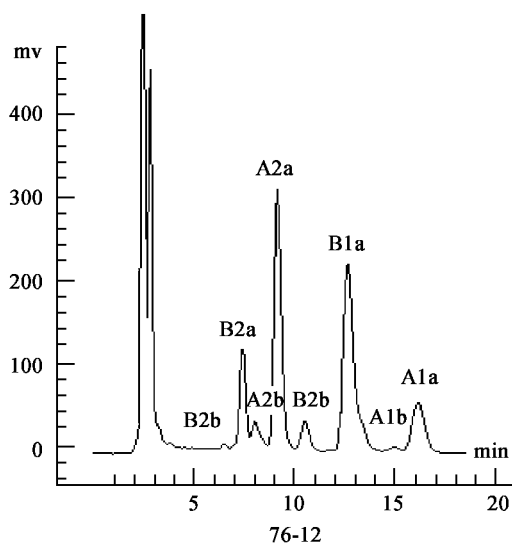


图3 *S. avermitilis* 76-12 和 mutant Ave-8 发酵产物的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of the mycelial extracts from *S. avermitilis* 76-12 and mutant Ave-8.

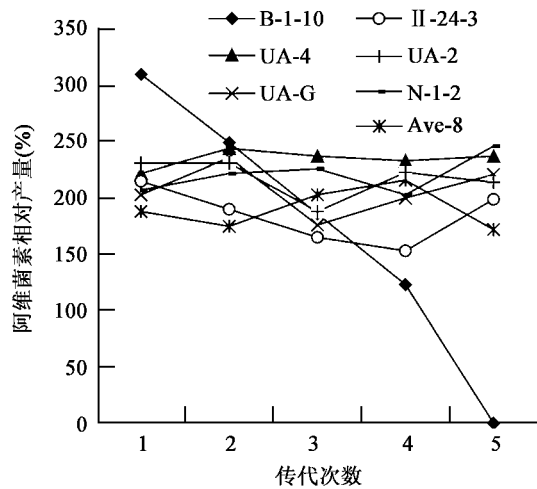


图4 传代次数对于几株突变株发酵产量的影响

Fig.4 Effect of cultivation times on avermectins production of mutants.

定,但 B-1-10 突变株的发酵单位下降很快,甚至最后已经检测不到产量。

3 讨论

链霉菌普遍存在严重的分化现象和遗传不稳定的特性^[11],阿维菌素的生产菌株阿维链霉菌也经常发生退化^[12]。通过诱变结合合理的筛选方法,对恢复和提高阿维菌素的发酵单位仍然是一个有效的方法。用不同方法对阿维链霉菌进行诱变,结合理性筛选,共筛选了大约 1 600 多个突变株,从中获得了一些产量明显提高的突变株。其中 N-1-2 是出发菌株的 2.47 倍。但是也有一些突变株的高产特性不稳定,如通过紫外线和 LiCl 复合诱变原生质体得到的高产突变株 B-1-10,退化现象十分严重,在数次传代以后几乎丧失了产阿维菌素的能力。

实验中也获得了一些有意义的突变株,如 Ave-8,该突变株的 B1a 组分的含量达到 44.3%。由于在阿维菌素中 B1a 杀虫活性最好,因此这样的突变株是非常有价值的。G-32 是一株只产阿维菌素 a 组分的突变株,与 a 组分合成相关的 X 基因不在阿维菌素生物合成基因簇中,至今也未克隆到,这样的突变株对阿维链霉菌遗传学的研究有一定的意义。UA-G 是一株产蓝绿色孢子的

突变株,据报道,对野生型菌株诱变曾同样获得一株产蓝绿色孢子的突变株,通过培养基的优化后其产量提高了 100 多倍^[13]。虽然我们这次获得的蓝绿孢子突变株的摇瓶发酵单位只提高了 2.06 倍,但进一步的诱变很可能获得高产突变株。

参 考 文 献

- [1] Burg R W, Miller B M, Baker E E, *et al.*. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organisms and fermentation[J]. *Antimicrob. Agents Chem.*, 1979, 15(3): 361-367.
- [2] Egerton J R, Ostlind D A, Blair L S, *et al.*. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B1a component[J]. *Antimicrob. Agents Chem.*, 1979, 15(3): 372-378.
- [3] Drinyaev V A, Mosin V A, Kruglyak E B, *et al.*. Antitumor effect of avermectins[J]. *Eur. J. Pharmacol.*, 2004, 501(1-3): 19-23.
- [4] Korystov Y N, Ermakova N V, Kublik L N, *et al.*. Avermectins inhibit multidrug resistance of tumor cells[J]. *Eur. J. Pharmacol.*, 2004, 93(1-3): 57-64.
- [5] Ikeda H, Kotaki H, Tanaka H, *et al.*. Involvement of glucose catabolism in avermectin production by *Streptomyces avermitilis* [J]. *Antimicrob. Agents Chem.*, 1988, 32(2): 282-284.
- [6] 王晓芳,陈芝,张晓琳,等.阿维链霉菌调节基因 *aveR1*, *aveR2* 缺失对阿维菌素产量的影响[J]. *中国生物防治*, 2005, 21(增刊): 77-82.
- [7] MacNeil D J, Klapko L M. Transformation of *Streptomyces avermitilis* by plasmid DNA[J]. *J. Ind. Microbiol.*, 1987, 2: 209-218.
- [8] 宋渊,曹贵明,陈芝,等.阿维菌素高产菌株的选育及阿维菌素 B1 的鉴定[J]. *生物工程学报*, 2000, 16: 31-35.
- [9] Aikawa M, Lopes-Shikida S A R, Lemos M F, *et al.*. Screening of spontaneous and induced mutants in *Streptomyces avermitilis* enhances avermectin production [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52: 558-562.
- [10] Mrozik H, Eskola P, Arison B H, *et al.*. Avermectin aglycons [J]. *J. Org. Chem.*, 1982, 47: 489-492.
- [11] Volff J N, Alterbuchner J. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome[J]. *Mol. Microbiol.*, 1998, 27: 239-246.
- [12] Novak J, Kopecky J, Kofronova O, *et al.*. Instability of the production of avermectins, sporulation, and pigmentation in *Streptomyces avermitilis* [J]. *Can. J. Microbiol.*, 1993, 39(2): 265-267.
- [13] Campbell W C. Ivermectin and Abamectin [M]. New York: Springer-Verlag, 1990.