

文章编号: 1007-4627(2010)04-0082-05

阿佛曼链霉菌的 ^{12}C 离子辐照效应及高产菌株选育*

王曙阳¹, 陈积红¹, 李文建¹, 刘敬¹, 曹云飞², 薄永恒², 马晓琪¹, 梁剑平¹

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 选用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照诱变阿维菌素 B1a 产生菌 ZJAV-A1, 研究其诱变效应。实验结果表明, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照剂量 50 Gy 时致死率 97%, 正突变率最高可达到 34.2%。通过 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子诱变处理, 结合平板培养基及斜面培养基的正突变菌株筛选, 最终获得一株稳定性良好, 阿维菌素 B1a 组分产量稳定在 4460—4588 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间, 较出发菌株提高 11.1%—14.7% 的突变株 ZJAV-Y1-203。

关键词: 辐照诱变; 阿维菌素 B1; 效价; 高产菌株

中图分类号: Q691

文献标识码: A

1 引言

阿维菌素 (*Avermectins*) 为阿佛曼链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 生长代谢产物, 是一种强力、高效、广谱抗寄生虫药物。它是至今发现的最有效的杀寄生虫剂、杀螨剂和杀昆虫剂之一^[1], 与传统农、兽药相比, 具有高效、广谱、适口性好、有效期长、不易产生抗药性、易降解、无残留等特点, 且不易产生耐药性, 与其他杀虫药无交叉抗性; 在土壤中降解快、光解迅速; 对作物安全, 不易产生药害; 被认为是一种最有应用前途的农用抗生素之一。经结构鉴定, 它具有驱虫活性的物质, 是一组结构相似的 16 元大环内酯类抗生素, 共由 8 个组分组成, 分别被命名为 A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a 及 B2b, 该组化合物被统称为阿维菌素^[2]。其中, 小 a 组分 A1a, A2a, B1a 和 B2a 是 4 个大量组份, 含量在 80% 以上, 其余 4 个小 b 组份为少量组份, 含量在 20% 以下, 其组分作用效果以 B1 组分最佳, 杀虫活性最高, 而毒性最小。B1 中 B1a 的活性又远远高于 B1b, 所以阿维菌素效价主要指 B1a 的含量。目前, 影响其发展的主要原因是其生产菌种发酵效价提升缓慢, 甚至长期得不到突破性进展^[3]。

近几年来, 沈阳药科大学生物技术与生物制药实验室采用 NTG、DES、紫外线、Co60、 γ 射线、5-氟尿嘧啶等诱变手段对阿维链霉菌的原始菌株进行了多次诱变处理, 产量有了明显提高^[4]。任超等^[5]用紫外线 (UV)、诱变剂氯化锂 (LiCl)、亚硝基胍 (NTG) 并结合甲硫氨酸 (Met) 诱导等手段, 使 B1a 显著提高, 达到 2533.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。但总体来看, 菌种效价远不能满足工业生产 B1a 含量在 4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上的需要, 需开辟新的诱变选育方法。

重离子束辐照诱变是一种独特的物理诱变方法。重离子束具有参数多样、LET 大和 RBE 高等特性, 利用它可提高突变率、拓宽突变谱和缩短育种周期, 成为近年来辐射育种的一种新方法。本文采用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对阿佛曼链霉菌进行辐照诱变处理, 进行平板培养基及斜面培养基的正突变菌株筛选, 有效地获得 B1a 组分显著提高的菌株两株。经 HPLC 测定, B1a 组分摇瓶发酵单位较出发菌株提高 30%。

2 材料与方法

2.1 菌种

阿佛曼链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) ZJAV-A1。

* 收稿日期: 2009-05-27; 修改日期: 2009-07-03

* 基金项目: 中国科学院西部之光人才培养计划项目 (O906050XB0); 中国科学院近代物理研究所所长基金资助项目 (0806220SZO); 中国科学院院地合作项目 (0806290YDO)

作者简介: 王曙阳 (1974—), 女 (汉族), 甘肃正宁人, 从事辐射生物学相关研究; E-mail: wangsy@impcas.ac.cn

2.2 仪器及试剂

美国瓦里安公司 Prostar 210 型高效液相色谱仪；旋转摇瓶机，型号 SPH-311D；离心机 Anke TDL8；pH 计 PHS-3C 型，上海雷磁仪器厂；电子精密天平 FA2004 0.1 mg 无水甲醇（分析纯），无水甲醇（HPLC 纯）；在兰州重离子研究装置（HIRFL）垂直辐射生物终端用¹²C⁶⁺进行辐照。

2.3 培养基和培养条件

2.3.1 斜面、平板培养基及培养条件

可溶性淀粉、氯化钠、硫酸铵、硫酸镁、碳酸钙、磷酸氢二钾、琼脂，蒸馏水配制，pH 值取自然值。沙土管菌种、分离纯化后的菌种或斜面保藏菌种接种于上述培养基，参照（培养基配比参照参考文献[3]），于（28±0.6）℃，40%左右湿度条件下培养 6 d。

2.3.2 种子培养基及培养条件

淀粉、糊精、豆饼粉、花生饼粉、酵母粉、氯化钴、豆油和酵母膏。自来水配制，pH 值调至 7.3±0.5（培养基配比参照参考文献[3]）。将成熟斜面上的孢子用无菌接种铲挖块接种于种子培养摇瓶中，种子摇瓶装量为 40 ml/250ml 摇瓶，于（28±0.6）℃ 的温度下在 220—240 rotations/min 旋转式摇床上培养 28 h。

2.3.3 发酵培养基及培养条件

淀粉、黄豆饼粉、花生饼粉、酵母粉、磷酸氢二钾和氯化钴等，自来水配制，pH 值调至 7.5±0.5，培养基配比参照参考文献[3]，接种量为 4%，装量为 40 ml/250 ml，于（28±0.6）℃ 的温度下在 242—252 rotations/min 旋转式摇床上培养 9 d。阿维菌素的摇瓶发酵采用二级发酵。

2.4 诱变和筛选方法

2.4.1 ¹²C⁶⁺ 离子诱变处理

取 28℃ 恒温恒湿培养 7 d 的阿佛曼链霉菌新鲜斜面 6 支，每支加无菌蒸馏水 5 ml，刮下孢子，移入装有玻璃珠的三角摇瓶中置摇床上振荡 15 min，打散孢子。吸取单孢子悬液 2 ml，加入 5 ml 无菌的培养皿中，用¹²C⁶⁺离子照射。设定照射剂量分别为 30, 40, 50, 60 和 70 Gy。每一剂量设 3 个平行对照样品。然后将孢子悬液作 10 倍梯度稀释，准确吸取一个样品的孢子悬液 0.2 ml，倒在制好的分离平板培养基上，在（28℃±0.6）℃ 下培养 7 d，

计算致死率，筛选正突变株。以未辐照处理的做对照。

2.4.2 B1a 组分的定向筛选

将¹²C⁶⁺离子处理的单孢子悬液 10 倍稀释，取其 10⁻⁴ 倍的稀释液涂布于分离平板上，在（28±0.6）℃ 下培养 7 d 后，观察菌落形态、大小变化及产孢子量多少。随机挑取单菌落移接至斜面培养基上，在 28℃ 下培养 7 d，然后接种于种子瓶，观察培养 26 h 种子瓶菌丝体生长情况。最后以摇瓶的发酵效价为依据，挑选高 B1a 组分菌株。对筛选出高 B1a 菌株传代培养测效价，进行稳定性研究。

2.5 阿佛曼链霉菌株 B1a 组分生产能力的测定

2.5.1 B1a 组分的提取

取发酵液 3 ml 于离心管中，4000 rotations/min 离心 15 min，弃上清。加入甲醇至 9 ml，于漩涡式混合器上振荡 1 h，4000 rotations/min 离心 15 min，取上清液稀释 10 倍，0.22 μm 样品滤膜过滤器过滤、待测。

2.5.2 HPLC-UV 法 B1a 组分测定

采用 C₁₈ 反相柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm 不锈钢柱，十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，颗粒大小约 5 μm，流动相为无水甲醇和水（85：15），流速 1 ml/min，进样量 20 μl（样品管 20 μl），检测波长 245 nm，AVMB_{1a} 和 AVMB_{1b} 的分离度大于 1.5。准确吸取 20 μl 样品进样，根据样品、对照品 AVMB_{1a} 的峰面积，以及样品的稀释倍数计算发酵液 AVMB_{1a} 含量。

3 结果

3.1 出发菌株 B1a 组分生产能力^[6]

以 ZJAV-A1 作为出发菌株进行自然分离，随机挑取 60 个单菌落传斜面，培养好后上摇瓶发酵，用 HPLC 法测定各菌株 B1a 组分的含量（见表 1）。

表 1 出发菌株 ZJAV-A1 自然分离后 B1a 效价

B1a 效价/(μg/ml)	菌株数
4200—4500	2
3800—4200	30
3000—3800	25
2000—3000	3

出发菌株 ZJAV-A1 经过自然分离后 B1a 效价在 4000 μg/ml 以上的菌株在总菌株中占 54%，表明 50% 以上的菌种能够保持原出发菌株的 B1a 效价。

3.2 ¹²C⁶⁺ 离子辐照诱变处理结果

按 2.4.1 所述的¹²C⁶⁺ 离子辐照诱变处理方法，计算出存活其致死率(见表 2)。由表 2 可知，

表 2 ¹²C⁶⁺ 离子穿透诱变处理结果*

辐照剂量/Gy	致死率(%)	B1a 含量正突变率(%)
30	21	8
40	67.7	11.1
50	97	34.2
60	99	27
70	99.5	8

* 正突变率指辐照后 B1a 组分高于出发菌株的菌落与辐照后总菌落比值。

¹²C⁶⁺ 离子辐照剂量 50 Gy 时致死率 97%，正突变率最高达到 34.2%。

3.3 突变株与出发菌株的菌落形态比较

在¹²C⁶⁺ 离子最佳辐照剂量(50 Gy)下进行辐照处理的单孢子与出发菌株的单孢子悬液适当稀释后，分别涂布于平板培养基上，培养 6 d 后观察单菌落形态和菌落表面孢子量，记录结果见表 3。除以前观察到的 3 种形态：(1)光秃型(不产抗)、(2)馒头型(产抗能力较差)、(3)草帽型(产抗能力最好)外，还出现一种新的菌落形态，突起菌落有交叉十字裂痕，称十字型(见图 1)。从表 3 可知辐照组比对照组菌落形态、各类型比例有很大变化。如菌落直径，辐照组比对照组平均增大 0.5 mm(游标卡尺测定)，菌落产孢子量也比对照组多。

表 3 ¹²C⁶⁺ 离子辐照诱变菌株与出发菌株菌落形态比较

菌株	出发菌株(ZJAV-A1)	诱变菌株(ZJAV-Y1)
菌落形态	草帽型 75%，光滑型 20%，馒头型 5%	草帽型 65%，光滑型 20%，十字型 15%
直径	2.5±0.32 mm	3±0.38 mm
孢子颜色	灰白色，菌落底部发黄	淡灰色
产孢子量	一般	较大

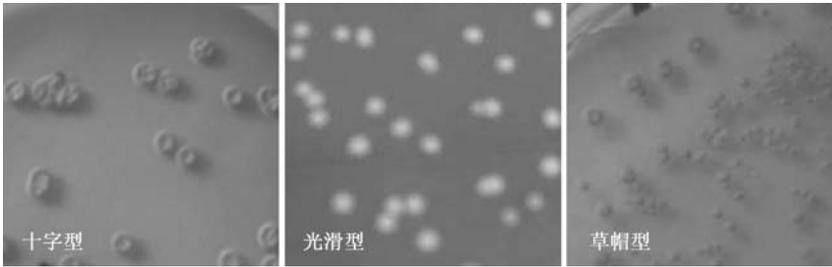


图 1 ¹²C⁶⁺ 离子辐照后 ZJAV-A1 菌株菌落形态观察结果

3.4 高产菌株筛选

随机挑选十字型单菌落和草帽型菌落各 40 个传斜面斜面长好后进行摇瓶发酵，以 HPLC 法测定各菌株，B1a 组分的生产能力见表 4。经辐照处理后，草帽型菌落直径明显增大，平均增大为 0.5 nm，孢子颜色由灰白色变为淡灰色，菌落底部黄色消失，并且产抗能力强，最大正突变率达到 25%。突变的十字型产抗能力明显低于草帽型，约为出发菌种的 B1a 效价的 75%。

挑取辐照处理过典型草帽型孢子丰富的菌落 360 个，传斜面 360 支，接发酵摇瓶种子瓶 240 瓶，转接发酵瓶 240 瓶，通过 11 d 的发酵培养，提取，B1a 含量测试，筛选出发酵效价 5200 μg/ml 以上的菌株 2 株(ZJAV-Y1-203, ZJAV-Y1-148)，发酵效价比原始菌种效价(4000 μg/ml)提高了 30%。

3.5 高产菌株的稳定性研究

将¹²C⁶⁺ 离子辐照方法获得的突变菌株 ZJAV-Y1-203(5329 μg/ml)，ZJAV-Y1-148(5269 μg/ml)

通过斜面传代得到各代子斜面后进行摇瓶发酵, 测定各代菌株产 B1a 组分含量的稳定性。F₁—F₃ 代阿维菌素中 B1a 效价见表 5。ZJAV-Y1-203 的 F₁ 的 B1a 效价为 4990 μg/ml, 效价降低了 4.03%。ZJAV-Y1-203 的 F₂ 的 B1a 效价为 4588 μg/ml, 效价降低了 8.06%, F₃ 的效价降低了 2.7%。而 ZJAV-Y1-148 传三代 B1a 产量下降迅速, 生产上不可行。突变株经 ZJAV-Y1-203 三次传代后, B1a 效价虽有所下降, 但在第二和第四代生产性能相对稳定, 其 B1a 的效价在工业生产中处领先水平。

表 4 十字型和草帽型菌落 B1a 效价比较结果

菌落形态	B1a 效价/(μg/ml)	菌株数
十字型	450—1000	4
	1000—2000	4
	2000—3000	8
	3000—3500	14
	3500—4500	10
草帽型	450—1000	2
	1000—2000	4
	2000—3000	2
	3000—3500	6
	3500—4500	14
	4500—5300	12

表 5 突变株 ZJAV-Y1-203 和 ZJAV-Y1-148 遗传稳定性试验

代数	B1a 效价/(μMg/ml)	
	ZJAV-Y1-203	ZJAV-Y1-148
F ₁	4990	4021
F ₂	4588	3362
F ₃	4460	3020
F ₄	4475	3096

4 结论

¹²C⁶⁺ 离子辐照阿维菌素产生菌阿佛曼链霉菌诱变效应的研究发现, 在最佳辐照剂量(50 Gy)下进行诱变处理, B1a 含量正突变率达 34.2%, 高于

任超^[5]等报道的紫外线、LiCl 复合诱变阿佛曼链霉菌 B1a 正突变率 31.2% 的结果。实践证明, ¹²C⁶⁺ 离子辐照技术能够应用于阿佛曼链霉菌高产菌株的诱变选育。

阿维菌素产生菌的菌落特征很不稳定, 存在严重的自然分化现象。有光秃型、馒头型、草帽型, 辐照后菌落形态出现十字型。通过产抗能力比较, 辐照后草帽型菌落孢子丰富、产抗能力强。十字型菌落产抗能力较差。因此诱变处理后应从平板培养基上挑取典型草帽型产抗能力强的淡灰色孢子进行发酵培养。

通过¹²C⁶⁺ 离子辐照处理, 平板培养基及斜面培养基的正突变菌株筛选, 最终获得一株稳定性良好 ZJAV-Y1-203 菌株, 其产阿维菌素 B1a 组分产量稳定在 4588—4460 μg/ml 之间, 较出发菌株提高 11.1%—14.7%, 将会在实际应用中产生较大经济效益。

参考文献 (References):

- [1] Zhang Liping, Chen Chuan. Journal of Hebei University(Natural Sci), 2002, **22**(2): 189(in Chinese).
- [2] Albers-Schonberg G, Arison B H, Chabala J C, et al. Am Chem Soc, 1981, **103**(14): 4216.
(张利平, 陈川. 河北大学学报(自然科学版), 2002, **22**(2): 189.)
- [3] Zhang Yingying. Breeding of Streptomyces Avermitilis Producing Avermetin (Doctoral Dissertation). Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2006(in Chinese).
(张莹莹. 阿维菌素产生菌的菌种选育[博士论文]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.)
- [4] Xu Li, Zhang Yixuan, Wang Yong, et al. Journal of Anhui Agri Sci, 2007, **35**(2): 3797(in Chinese).
(徐丽, 张怡轩, 王勇. 安徽农业科学, 2007, **35**(2): 3797.)
- [5] Ren Chao, Ma Xiangbo. Biotechnology Bulletin, 2005, **4**: 59 (in Chinese).
(任超, 马翔波. 生物技术通报, 2005, **4**: 59.)
- [6] Li Yanxia, Qiao Jianjun. Industrial Microbiology, 2008, **38**(1): 20(in Chinese).
(李燕霞, 乔建军. 工业微生物, 2008, **38**(1): 20.)

Research on Mutation Breeding of High-producing Strains from *Streptomyces Avermitilis* Irradiated by Ion Beam of $^{12}\text{C}^{6+}$ *

WANG Shu-yang^{1, 1)}, CHE Ji-hong¹, LI Wen-jian¹, LIU Jing¹, CAO Yun-fei²,

BO Yong-heng², MA Xiao-qi¹, LIANG Jian-ping¹

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Mutagenic effect on *avermectin* B1a producing strains of ZJAV-A1 by ion beam of $^{12}\text{C}^{6+}$ has been investigated. The experimental results indicated that the lethality was 97% and the highest rate of orthomutation was 34.2%, when ZJAV-A1 was irradiated by ion beam of 50 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$. After the mutagenesis processing by ion beam of $^{12}\text{C}^{6+}$ and the screening of orthomutation strains by using plating mediums and slant cultures, the mutant ZJAV-Y1-203 was obtained with the *avermectin* B1a yield of 4588—4460 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Compared with the original strain, the titer was improved 11.1%—14.7%.

Key words: irradiation mutagenesis; *avermectin* B1a; tite; high *avermectin* producing strain

* **Received date:** 27 May 2009; **Revised date:** 3 Jul. 2009

* **Foundation item:** Western Light Talents Training Program of Chinese Academy of Sciences(O906050XB0); Director Foundation of Institute of Modern Physics of Chinese Academy of Sciences(0806220SZO); Academy-Locality Cooperation Project of Chinese Academy of Sciences(0806290YDO)

1) E-mail: wangsy@impcas.ac.cn