



周丽,张萍,牛春,等.筑波链霉菌诱变株的筛选与保藏方法研究[J].黑龙江农业科学,2022(6):84-87,88.

筑波链霉菌诱变株的筛选与保藏方法研究

周丽,张萍,牛春,石彦鹏

(宁夏泰瑞制药股份有限公司,宁夏银川 750002)

摘要:为了获得能稳定遗传的他克莫司生产菌种,供生产使用,本研究采用常压室温等离子体(ARTP)技术对他克莫司出发菌株 TKM20-1 进行诱变筛选,并对菌株保藏方法进行比较。结果表明:筛选获得 1 株可稳定遗传的突变高产菌株 TKM21-15,相较于出发菌株,摇瓶效价提高了 20%;对突变菌株进行 4 种保藏方式研究,确定该菌种可采用沙土管保藏法、冻干管保藏法、甘油管低温保藏法和甘油乳糖管保藏法来保藏,且沙土管保藏法和冻干管保藏法更适用于该菌种。

关键词:常压室温等离子体技术;他克莫司;突变高产菌种;保藏方式

他克莫司(tacrolimus, FK-506)是从筑波链霉菌(*Streptomyces tsukubaensis*)中产生的一种新型二十三元大环内酯聚酮,是一种免疫抑制剂,抑制能力较环孢素 A 强 100 倍^[1]。据统计,每年需要器官移植的患者大约有 30 万,他克莫司作为重要的免疫抑制剂,发挥着不可替代的作用^[2]。他克莫司目前主要通过微生物发酵来大批量生产,因此筛选高单位且稳定的他克莫司生产菌种至关重要。诱变育种因成本低廉、操作简便被广泛运用于生产菌株的构建。目前,国内对他克莫司的研究主要围绕自然筛选、紫外诱变、优化发酵培养基和发酵操作条件等。目的菌株的筛选需要根据它对生存环境的要求,到相应的环境中去筛选寻找;现有研究中高压蒸汽灭菌法、干热灭菌和灼烧灭菌法主要用于微生物的灭菌;稀释涂布平板法和平板划线法是微生物的主要接种方法。常压室温等离子体(ARTP)技术作为近年来新兴的菌种诱变育种技术,具有操作过程安全、操作简单等特点,主要原理是能够在大气压下产生温度为 25~40℃、具有高活性粒子(包括处于激发态的氢原子、氧原子、氮原子、OH 自由基等)浓度的等离子体射流。目前 ARTP 技术已应用于微生物菌种生产制备的多个产抗生素工业品种上,且具有良好的成效^[3]。

本研究以公司保藏的筑波链霉菌 TKM20-1 为出发菌株,采用常压室温等离子体(ARTP)技术进行诱变^[4-5],筛选获得一株能稳定遗传的高产

筑波链霉菌菌株 TKM21-15,并分析其在沙土管保藏法、冻干管保藏(冷冻干燥)法、甘油管低温保藏法和甘油乳糖保藏法下的保藏效果,筛选最佳的菌种保藏方法,以期为公司大量生产他克莫司提供菌种以及数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 筑波链霉菌(*Streptomyces tsukubaensis*),由本公司实验室保存,将其命名为 TKM20-1。

1.1.2 培养基 琼脂斜面 and 分离琼脂培养基(麦芽酵母琼脂培养基):麦芽浸出汁 2.0%,酵母浸出汁 0.5%,葡萄糖 1.0%,琼脂 1.5%,pH 7.2~7.4^[6]。种子培养基:甘油 1.2%,可溶性淀粉 1.1%,葡萄糖 0.5%,酵母粉 0.5%,玉米浆 0.5%,碳酸钙 0.1%,pH 6.5^[6]。

发酵培养基:玉米淀粉 5.0%,干酵母粉 1.0%,玉米浆 1.0%,磷酸氢二钾 0.2%,碳酸钙 0.05%,pH 6.8^[6]。

1.1.3 仪器 ARTP-IIS 等离子诱变仪(江苏无锡,ARTP-M),e2695 型高效液相色谱仪(沃特世,E2695)。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养及孢子悬液制备 取于-80~-60℃下保存 TKM20-1 的试管,吸取 0.1 mL 菌液均匀涂布于斜面培养基上,放置于 28℃、湿度为 25%~35% 的条件下斜面培养 10 d,待 TKM20-1 培养成熟,在研磨器中加入 10 mL 无菌水,用无菌铲子铲下一支试管的菌株斜面,均匀研磨后,过滤,制成单孢子悬液。

收稿日期:2022-02-02

第一作者:周丽(1990-),女,硕士,从事生物制药研究。

E-mail:1463465891@qq.com。

1.2.2 菌株诱变 取浓度为 1×10^9 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液 $10\ \mu\text{L}$,置于等离子诱变仪进行诱变处理,电源功率 $115\ \text{W}$,气流量 $10\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,照射距离为 $2\ \text{mm}$,照射时间分别设置为 $0, 10, 20, 30, 50, 70$ 和 $90\ \text{s}$,将等离子诱变后的菌悬液均匀涂布于平板培养基上,在 $28\ ^\circ\text{C}$ 、湿度为 $25\%\sim 35\%$ 条件下培养 $10\ \text{d}$,以未经诱变的菌悬液作为对照。计算致死率,挑取不同的单菌落,进行摇瓶验证。

1.2.3 摇瓶培养 种子瓶培养:取 $1.0\ \text{cm}^2$ 斜面接种于装有 $30\ \text{mL}$ 种子培养基的 $300\ \text{mL}$ 三角瓶中, $28\ ^\circ\text{C}$, $220\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 震荡培养 $48\ \text{h}$ 。

发酵瓶培养:以 10% 的接种量接入 $40\ \text{mL}\cdot(300\ \text{mL}^{-1})$ 的发酵培养基中, $28\ ^\circ\text{C}$, $220\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。震荡培养 $168\ \text{h}$,放瓶,检测摇瓶效价。

1.2.4 发酵液处理与检测 发酵液提取:取发酵液 $5\ \text{mL}$, $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $10\ \text{min}$,收取上清液。加 $5.0\ \text{mL}$ 甲醇于菌丝沉渣,振荡提取 $30\ \text{min}$, $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心收集上清液。

HPLC分析:C18柱($4.6\ \text{mm}\times 250.0\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$);流动相为乙腈:水:磷酸($600:400:1$);流速 $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 $220\ \text{nm}$,柱温 $60\ ^\circ\text{C}$ 。

1.2.5 菌种保藏 沙土管保藏法:将处理好的沙与土以 $1:1$ 比例混匀,分装于小试管内,每管装 $1.5\ \text{g}$ 左右^[7],间歇灭菌 5 次,灭菌后在干燥箱中烘干,并经过无菌检测后备用。在无菌室内用灭菌的铲子将相同大小斜面($1/4$ 支)上生长成熟的孢子铲下,直接与沙土混合并摇匀,用真空泵抽气干燥后放在装有五氧化二磷的干燥器中 $2\sim 8\ ^\circ\text{C}$ 保存。

冻干管保藏法:将新鲜牛奶脱脂后 $110\sim 115\ ^\circ\text{C}$ 灭菌 $12\sim 15\ \text{min}$,经过无菌检测后备用。在无菌室内用灭菌的铲子将相同大小斜面($1/4$ 支)生长成熟的孢子铲下,用脱脂牛奶作为保护剂制成孢子悬浮液,将孢子液分装于安瓿管内,每支 $0.5\ \text{mL}$,在超低温冰箱内速冻。用真空泵抽干,最后将安瓿管真空熔封, $2\sim 8\ ^\circ\text{C}$ 保存。

甘油管低温保藏法:制备 $20\%\sim 30\%$ 甘油,经过无菌检测后备用。在无菌室内用灭菌后的铲子将相同大小斜面($1/4$ 支)生长成熟的孢子铲下,用 $20\%\sim 30\%$ 灭菌甘油制成孢子悬浮液,分装到冷冻管中,每支 $1\ \text{mL}$,先将冷冻管放置无水乙醇中,在 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱内预冷后再放到超低温冰箱, $-86\ ^\circ\text{C}$ 保藏。

甘油乳糖管保藏法:配置甘油乳糖溶液(甘油 10% ,乳糖 20%),在 $120\sim 122\ ^\circ\text{C}$ 下灭菌 $20\sim 30\ \text{min}$,经过无菌检测后备用^[8]。在无菌室内用灭菌后的铲子将相同大小斜面($1/4$ 支)生长成熟的孢子铲下,加入甘油乳糖溶液并分装于甘油管内,每支 $1\ \text{mL}$,然后放置于 $-86\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中保藏。

1.2.6 保藏效果 菌种活化率计数:4种方法存放的孢子在保藏最初用活计数法数出孢子数。将不同方法下的孢子分别在 $0, 90, 180, 270, 360, 450, 540, 630$ 和 $720\ \text{d}$,按照 $1:100\ 000$ 稀释比例,在温度适中的平板培养基上划匀,在培养间 $28\sim 30\ ^\circ\text{C}$ 培养 $8\ \text{d}$ 后计数。计数方法参考兽药典的活菌计数法^[9]。以单菌落数乘以菌液的稀释倍数,即为菌液稀释前的活细胞数。

存活率($\%$)=菌液稀释前的活细胞数/菌体保藏前的活细胞数 $\times 100$

摇瓶效价比较:将不同保藏方法下的孢子分别在保藏 $0, 90, 180, 270, 360, 450, 540, 630$ 和 $720\ \text{d}$ 接种至 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 斜面培养基上,观察斜面生长情况,并置于 $28\ ^\circ\text{C}$ 培养间培养 $10\ \text{d}$,待孢子成熟后接种至种瓶培养基中, $28\ ^\circ\text{C}$ 培养 $48\ \text{h}$ 后按 10% 接种量接种至发酵瓶中, $28\ ^\circ\text{C}$ 培养 $168\ \text{h}$ 后检测摇瓶效价。

2 结果与分析

2.1 等离子体诱变时间确定

由图1可知,随着照射时间的增加,诱变处理时间与致死率之间存在明显的正效应关系,随着照射时间的延长,菌落生长量呈减少趋势。照射时间为 $30\ \text{s}$ 时,致死率达 81.5% ;照射 $50\ \text{s}$ 时,虽致死率较高,但单菌落较少,仅有个别单菌落;照射 $70\ \text{s}$ 以上时,未有单菌落。根据微生物诱变理论,致死率在 $90\%\sim 95\%$ 范围内的正突变率最高。确定 $30\ \text{s}$ 为他克莫司的诱变处理时间。

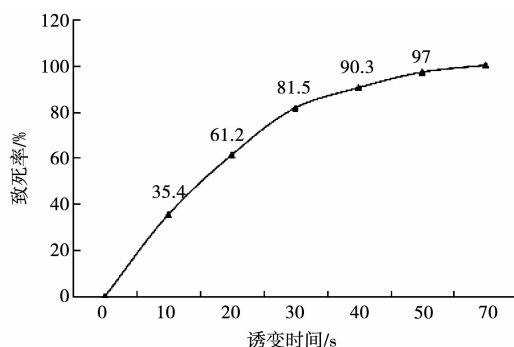


图1 等离子诱变时间对筑波链霉菌致死率的影响

2.2 他克莫司突变株初筛

以 TKM20-1 为出发菌株,将等离子诱变处理 30 s 后的菌悬液进行梯度稀释,涂布于平板培养基上,挑选 47 株单菌落进行摇瓶效价比较。结果显示,只有 4 株摇瓶效价高于出发菌株(摇瓶效价: $313\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$),为 TKM21-6、TKM21-15、TKM21-22 和 TKM21-38,摇瓶效价分别为 349,365,356 和 $350\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,分别比初发菌株摇瓶效价提高了 12.6%、17.7%、14.8%和 12.9%。

2.3 他克莫司突变株复筛

分别将 TKM21-6、TKM21-15、TKM21-22 和 TKM21-38 菌株连续 3 次摇瓶发酵,比对摇瓶效价。结果显示,单菌落菌株 TKM21-15 经过连续 3 批摇瓶发酵后,效价较高,且摇瓶效价稳定,相较于对照出发菌株(摇瓶效价: $313\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$),摇瓶效价提高了 20%(表 1)。

表 1 他克莫司突变株摇瓶发酵效价

单位: ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
菌种号	第一批	第二批	第三批	平均值
TKM21-6	330	331	341	334
TKM21-15	369	376	384	376
TKM21-22	340	325	326	330
TKM21-38	320	325	311	318
TKM20-1(对照)	310	314	316	313

表 3 不同保藏方法对菌体存活率的影响

保藏方法	指标	0 d	90 d	180 d	270 d	360 d	450 d	540 d	630 d	720 d
沙土管	活细胞数/个	53	50	48	45	42	41	40	40	39
	存活率/%	96.4	90.9	87.3	81.8	76.4	74.5	72.7	72.7	70.9
冻干管	活细胞数/个	54	53	50	48	45	42	42	42	41
	存活率/%	98.2	96.4	90.9	87.3	81.8	76.4	76.4	76.4	74.5
甘油管低温	活细胞数/个	48	46	43	40	38	36	35	35	34
	存活率/%	87.2	83.6	78.2	72.7	69.1	65.4	63.6	63.6	61.8
甘油乳糖管	活细胞数/个	45	42	40	38	35	33	32	30	30
	存活率/%	81.8	76.4	72.7	69.1	63.6	60.0	58.2	54.5	54.4

2.6 不同保藏方法对摇瓶效价的影响

由于随保藏时间延长孢子存活率下降且孢子自身状态变差,孢子接种至发酵瓶后的摇瓶效价同样会随着时间慢慢降低,4 种保藏方法存放的孢子摇瓶效价下降幅度均较低,下降趋势基本相

2.4 遗传稳定性验证

将突变菌株 TKM21-15 连续传代 4 次,第 5 代进行斜面培养同时进行摇瓶发酵,验证其遗传稳定性。结果如表 2 所示,突变株 TKM21-15 从 F_1 到 F_5 代,种子瓶培养 48 h 时,种子液菌浓度均为 10%以上,pH 为 7.3~7.4,摇瓶效价为 $375\sim 380\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,表明该菌种可稳定遗传,适合大规模生产。

表 2 突变株 TKM21-15 的遗传稳定性

测定指标	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5
种子液 pH	7.34	7.35	7.34	7.35	7.34
种子液菌浓度/%	14	15	13	14	13
摇瓶效价/ ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)	377	379	380	376	375

2.5 不同保藏方法对菌体存活率的影响

采用沙土管保藏法和冻干管保藏(冷冻干燥)法保藏突变菌株 TKM21-15,在抽干操作过程中会经过较高的负压,在负压的作用下比较弱的孢子将会死亡。

由表 3 可知,4 种保藏法存放的孢子在保藏最初期孢子存活率相对较高,在最初 450 d 中随着时间的延长孢子存活率呈下降趋势,450 d 以后孢子的存活率呈平行趋势。而沙土管和冻干管保藏法较甘油管低温和甘油乳糖管保藏法孢子存活率高,表明他克莫司产生菌更适合沙土管和冻干管保藏法。

同,但是相对而言,采用沙土管和冻干管保藏的菌种,摇瓶效价下降较小,在 720 d 时,采用甘油管低温和甘油乳糖管保藏的菌种,摇瓶效价分别下降 3.6%和 3.7%(图 2)。但总体来说,保存该菌种时 4 种保藏方式均可采用。

由图 2 可知,4 种保藏法存放的孢子在保藏最初期孢子的摇瓶效价相对较高,在最初 360 d 中随着时间的延长其摇瓶效价呈下降趋势,450 d 以后摇瓶效价呈平行趋势。而沙土管和冻干管保藏法的摇瓶效价较甘油管低温保藏法和甘油乳糖管保藏法更高。

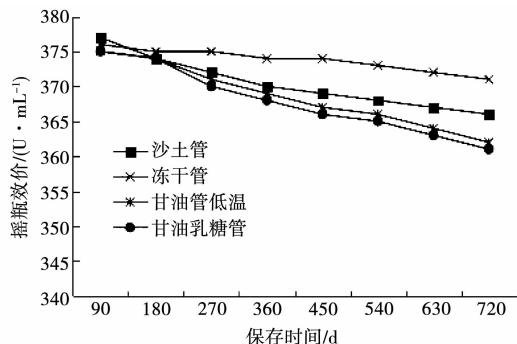


图 2 不同保藏方法对摇瓶效价的影响

3 讨论

本研究采用 ARTP 技术对他克莫司产生菌进行诱变处理,以 30 s 为选择照射时间,从初筛的 47 株菌株中得到 4 株高产的诱变菌株,其中 TKM21-15 较出发菌株提高了 20%,且连续传 5 代稳定。该菌株具有良好的遗传稳定性,可用于他克莫司工业化生产。

优质菌种在相关产业中起着至关重要的作用,菌种质量的高低影响到优质菌种的延续。建立正确的、有效的菌种保藏方法,不仅可以有效保藏菌种的优良性状,保持其活力和产量,而且对于种质资源的保存和后续利用都有极其重要的作用。沙土管保藏法多用于能产生孢子的微生物如霉菌、放线菌,因此在抗生素工业生产中应用最广,效果亦好,可保存 2 年左右,但应用于营养细胞效果不佳^[10]。冷冻干燥保存的菌种存活时间长、效果好,一般菌种可保存 5 年以上,有的可保藏 15 年以上不发生变异。还具有体积小、不易污染、便于运输等优点,是一种应用最为广泛的菌种保藏方法^[11],所以在本研究中,沙土管保藏法和冻干管保藏(冷冻干燥)法更适宜于该菌种。甘油管低温保藏法是利用微生物在甘油中生长和代谢受到抑制的原理达到保藏目的^[12-13]。在微生物领域,不管是基础科研工作还是生物技术的应用研究,都需要正确的菌种保藏方法和技术,以保证菌种的质量和活力。故本研究采用沙土管保藏法、冻干管保藏法、甘油管低温保藏法和甘油乳糖

管保藏法将突变菌株 TKM21-15 进行保藏研究,得出该菌种在上述保藏方法下均可存活,但沙土管保藏法和冻干管保藏法更适宜于该菌种。研究结果可为后期他克莫司生产菌提供理论支撑和新的研究思路。

4 结论

本研究采用常压室温等离子体(ARTP)技术对他克莫司出发菌株 TKM20-1 进行诱变,获得 1 株可稳定遗传的突变高产菌株 TKM21-15,相较于出发菌株,摇瓶效价提高了 20%;并研究对突变菌株进行了保藏方法筛选,确定沙土管保藏法和冻干管保藏法更适用于该菌种。

参考文献:

- [1] CHEN D, ZHANG Q, ZHANG Q, et al. Improvement of FK506 production in streptomyces tsukubaensis by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(15): 5093-5103.
- [2] 任林英, 张祝兰, 唐文力, 等. 常压室温等离子体诱变选育替考拉宁高产菌株[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(1): 46-50.
- [3] 张艳芳, 孟广超, 王选年. ARTP 技术选育米曲霉蛋白酶高产菌株[J]. 中国调味品, 2021, 46(12): 31-34, 41.
- [4] LI H P, WANG L Y, LI G, et al. Manipulation of lipase activity by the helium radio frequency, atmospheric pressure glow discharge plasma jet[J]. Plasma Processes & Polymers, 2011, 8(3): 224-229.
- [5] RATNAM B, RAO S S, MENDU D R, et al. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of ethanol from palmyra jaggery using response surface methodology[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005, 21(4): 399-404.
- [6] 郑军荣, 卓锦明, 郑卫, 等. 几种不同抗生素对他克莫司产生菌的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2011(8): 581-585.
- [7] 李玲, 陈林, 杨文革, 等. 一株他克莫司产生菌的筛选及鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3): 416-420.
- [8] 米翠平, 黄周阳. 工业生产中菌种的常用保藏方法[J]. 山东化工, 2017, 46(2): 76, 78.
- [9] 吴窃画, 李正华, 谈书华. 一种简单准确的微生物活菌计数方法[J]. 生物技术, 2013(2): 65-69.
- [10] 许丽娟, 刘红, 魏小武. 微生物菌种的保藏方法[J]. 现代农业科技, 2008(16): 99, 101.
- [11] 王晓兰, 屈勇刚. 兽医微生物菌种简易保藏方法[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005(3): 60-61.
- [12] 兽医微生物菌种资源标准化整理整合及共享试点项目组. 兽医微生物菌种资源描述规范及技术规程[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008.
- [13] 赵新海, 张庆华, 王艳华. 一种长期保藏微生物菌种的方法: CN101121919A[P]. 2008.



李丹丹,盛云燕,战英策,等.园艺植物育种学课程思政内涵建设的探索与实践[J].黑龙江农业科学,2022(6):88-92.

园艺植物育种学课程思政内涵建设的探索与实践

李丹丹,盛云燕,战英策,廉 华,张 帆

(黑龙江八一农垦大学 园艺园林学院,黑龙江 大庆 163319)

摘要:为培养符合时代发展要求的创新复合型农业人才,将思政教育融入到专业课堂中,实现“三全育人”,本文以园艺植物育种学课程思政改革为例,从园艺专业育种人才培养及农业高校课程思政教学的现状入手,论述了园艺专业教育中融入思政教育的重要性和必要性。结合园艺植物育种学课程思政的教学实践与体会,重点从课程体系建设、教学方法及师资队伍建设等方面进行了课程思政内涵建设的探索。在新时代背景下,农业院校在教授学生农业专业知识、技能的同时也要培养其具有“三农”情怀。经过近几年的园艺植物育种学课程思政教育体系建设、师资队伍建设和具体教学实践,黑龙江八一农垦大学园艺育种人才培养效果得到很大提升,不仅激发了学生的学习热情,而且提高了本课程思政教育的水平和深度。

关键词:课程思政;高等农科院校;园艺植物育种学;探索与实践

立德树人,是中国特色社会主义高校教育的立身之本,“课程思政”是实现“三全育人”的有效途径,是育人的关键,将爱国主义情怀、工匠精神及社会主义核心价值观转化成价值引领,与专业课程巧妙融合。习近平总书记在學校思想政治理论课教师座谈会及全国高校思想政治工作会议上都强调思想政治理论课改革创新的重要性,要把思政教

育贯穿到高等教育的全过程,这为我国各高校进行课程思政教育提供了前期基础^[1]。2020年,中华人民共和国教育部发布的《高等学校课程思政建设指导纲要》要求,专业课教育要根据不同学科的特色和优势,深入挖掘本专业知识体系中蕴含的思政元素,科学合理地拓展专业课程的深度和广度,增加专业课程的人文性与知识性,提升专业教育的引领性和开放度^[2]。为此,各高校应注重把思政教育贯穿到整个专业教育、教学的全过程,坚持以立德树人为中心,以专业课程为基本载体,将思政元素有机融入专业课堂中,达到“润物细无声”的育人效果。我国高等教育是教育系统的最高层次,这关乎到我国高水平人才培养及以科技

收稿日期:2022-02-21

基金项目:黑龙江八一农垦大学教学研究课题(NDJY2127);黑龙江省教育厅2020年一般研究项目(SJGY20200490);黑龙江省教育科学规划重点课题(GJB1422194);黑龙江省教育厅研究项目(SJGZ20200125)。

第一作者:李丹丹(1981—),女,博士,副教授,从事蔬菜遗传育种研究。E-mail:lidandan342@126.com。

Breeding and Preservation Method of Mutant Strain of *Streptomyces tsukubaensis*

ZHOU Li,ZHANG Ping,NIU Chun,SHI Yan-peng

(Ningxia Tairui Pharmaceutical Limited Company,Yinchuan 750002,China)

Abstract:In order to obtain a stable genetic strain of tacrolimus for large-scale production,in this study,the atmospheric pressure room temperature plasma (ARTP) technology was used to mutagenize and select the tacrolimus starting strain TKM20-1,and strain preservation methods were compared.The results showed that a stable hereditary mutant high yielding strain TKM21-15 was obtained.Compared with the starting strain,the shake flask titer was obtained,increased by 20%.The mutant strain was studied in four preservation methods.It was determined that this strain can be preserved in sand soil tubes,freeze-dried tubes,glycerol cryogenic tubes and glycerol-lactose tubes.However,the sand tube preservation method and the freeze-drying tube preservation method are more suitable for this strain.

Keywords:atmospheric pressure and room temperature plasma technology;tacrolimus;mutant high-yield strain;depository