



吕苗苗,杨光耀,田平雅,等.阿维菌素生产菌的复合诱变[J].黑龙江农业科学,2021(2):61-65.

阿维菌素生产菌的复合诱变

吕苗苗,杨光耀,田平雅,张会萍,牛春,张萍

(宁夏泰瑞制药股份有限公司,宁夏银川 750101)

摘要:为筛选阿维菌素高产菌株,提高阿维链霉菌的发酵单位,降低生产成本,本试验主要采用紫外诱变结合不同类型抗生素的双重筛选方法对出发菌株 AW-8 进行诱变选育。结果表明:共筛选出具有链霉素单抗高产菌株 16 株,正突变率为 10.7%;筛选出具有利福平单抗高产菌株 27 株,正突变率为 14.2%;筛选出具有链霉素和利福平双抗高产菌株 6 株,正突变率为 5%;经遗传稳定性验证,获得 1 株具有链霉素和利福平双抗高产稳产菌株 R4,比单一抗性菌株 W7 的效价高 8.53%,比出发菌株 AW-8 的效价高 20.92%。该方法是一种便捷有效的选育方式。

关键词:阿维菌素;阿维链霉菌;紫外诱变;抗性筛选

阿维菌素(Avermectin)是由阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)产生的一组结构相似的十六元环大环内酯类抗生素。最初由日本学者大村智和美国默克公司研究组在日本静冈土壤中发现并分离,经鉴定其为一个新种,并且发现其发酵液对动物寄生虫及多种农业害虫有极强的消灭效果^[1]。阿维菌素的天然发酵产物共有 8 个组分:A1a、A1b、A2a、A2b、B1a、B1b、B2a 和 B2b。其中 B1a 组分的杀虫活性最高,毒性最小^[2]。阿维菌素作为一种绿色生物农药,由于其作用机制与一般杀虫剂不同,对常用农药产生耐药性和抗药性的害虫具有良好的防治效果。而其衍生产品伊维菌素还可降低河盲症和淋巴丝虫病的发病率,同时还能有效对抗其他寄生虫病,治疗效果显著,具有良好的应用价值和广阔的市场前景。然而我国阿维菌素原料药的生产存在能耗高、污染大、发酵产量低等问题^[3],严重影响企业的生产发展。因此,筛选阿维菌素高产菌株,提高阿维链霉菌的发酵单位,降低生产成本,成为急需解决的问题。

在阿维链霉菌的菌种选育中,传统的诱变筛选方法是对菌株进行各种物理或化学诱变剂的处理,再定向筛选产量提高的菌株。其中包括常压室温等离子体(ARTP)、N⁺离子注入、紫外线、 γ 射线等物理诱变以及溴化乙锭(EB)、甲基磺酸乙酯(EMS)、LiCl 等化学诱变。其中,紫外诱变可

使 DNA 分子形成嘧啶二聚体,引起碱基转换、颠换、移码突变或缺失等,因此,能够快速获得多种突变株。而在分子育种中有关于抗生素产生菌抗性基因与抗生素合成的结构基因、调控基因紧密连锁,从而容易发生共突变的理论^[4],采用抗生素抗性筛选能够直接影响微生物生产抗生素的调控系统,在微生物获得耐药性的同时,其核糖体结构可能发生某种改变,这些改变可直接提高抗生素生产菌的生产能力。因此,利用抗生素生产菌产抗能力与其抗性突变之间的相关性进行筛选,可以在很大程度上减少抗生素高产菌筛选的盲目性和不确定性,极大地提高目标菌株的筛选效率。Siddique 等^[5]在紫外诱变高产菌 DSM 41445 5 UV45(m)3 基础上又利用人工神经网络和响应面法分别对培养条件中的 NaCl、KCl 和 pH 进行优化,对酵母粉、MgSO₄·7H₂O 以及培养温度进行优化,B1b 组分产量提高 37.9 和 50.0 倍。田萍萍等^[3]使用 ARTP 诱变技术结合平板抗性筛选法,高通量筛选出的高产阿维菌素菌株产量提高 27%。罗林根等^[6]通过核糖体工程技术,采用链霉素对须糖多孢菌(*Saccharopolyspora pogona*)进行抗性选育,筛选获得一株高产丁烯基多杀菌素突变菌株 S13,突变株气生菌丝显著增厚,产孢速率与孢子丰满度得到明显提高。Xie 等^[7]证实通过引入利福平抗性,可显著提高 *Pseudomonas protegens* Pf-5 的次级代谢产物的产量。Ochi 等^[8-18]通过对 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 菌株连续引入链霉素、庆大霉素和利福平抗性突变,最终将放线紫红素产量比出发菌株提升了 48 倍。

收稿日期:2020-10-30

第一作者:吕苗苗(1991—),女,硕士,从事微生物发酵研究;
E-mail:1548473096@qq.com。

本试验主要采用紫外诱变结合不同类型抗生素的双重筛选方法对生产菌株 AW-8 进行改造,先筛选出单抗高产菌株,在此基础上进行双抗筛选,最终获得高产稳产的突变株,为生产阿维菌素提供支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 阿维菌素 AW-8(来自宁夏泰益欣生物科技有限公司)。

1.1.2 培养基 分离培养基:葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、琼脂条;斜面培养基:牛肉膏、葡萄糖、磷酸氢二钾、琼脂条;种子瓶培养基:玉米淀粉、花生饼粉、黄豆饼粉、酵母膏;发酵培养基:玉米淀粉、黄豆饼粉、硫酸铵、轻质碳酸钙、钼酸钠、氯化钴、硫酸锰。121 ℃灭菌 30 min。

1.1.3 试剂及设备 链霉素和利福平(大连美仑生物有限公司);BSA3202S-CW 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);PHS-3C 酸度计(上海精密科学仪器有限公司);XDW25/96 型旋转摇瓶机(乐山长征制药机械有限公司);超净工作台(无锡市荣丰净化空调设备厂);DHZ-2001B 恒温恒湿培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);AS3120A 型超声波清洗机(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(日本岛津公司)。

1.2 方 法

1.2.1 单孢子悬液的制备 取一支制备好的斜面,用铲子挑取适量放于装有玻璃珠的三角瓶中,均匀打碎,再用 4 层纱布过滤至离心管中,血球计数板计数,制成 105 个·mL⁻¹的单孢子悬液。

1.2.2 最小抑菌浓度的确定 分别制备含链霉素 1.5,2.5,3.5,4.5 和 5.5 μg·mL⁻¹的单一抗性培养基和含利福平 0.5,1.0,1.5,2.0 和 2.5 μg·mL⁻¹的单一抗性培养基,空孵 1 d,取制备好的单孢子悬液 100 μL,均匀涂布于培养皿中,置于 28 ℃培养箱培养 7 d,定期观察并统计单菌落形态与数量。

1.2.3 紫外诱变致死率曲线的绘制 取 100 μL 单孢子悬液均匀涂布于培养皿中,置于超净工作台 15 W 紫外灯下 30 cm 处,在黑暗条件下紫外照射 10,20,30,40,50,60,70 和 80 s,每个处理 3 个平行,于 28 ℃培养箱黑暗条件下培养 7 d,培

养结束后观察并记录菌落形态与致死率。

1.2.4 链霉素抗性突变株的复合选育 紫外诱变结合链霉素抗性突变株的筛选。制备含 1.0×MIC、2.0×MIC……7.0×MIC 浓度的链霉素抗性培养基备用,取 100 μL 单孢子悬液均匀涂布于培养皿中,在超净工作台上进行黑暗环境下紫外线照射,每个处理 3 个平行,置于培养箱中,28 ℃黑暗培养 7 d。挑取不同形态的单抗突变株于斜面培养基中 28 ℃培养,制备成单菌落斜面。

链霉素抗性突变株的摇瓶复筛及遗传稳定性验证。取单抗突变株,用接种铲刮取适量孢子,接种子瓶,28 ℃摇床发酵培养 48 h 后转接发酵瓶,264 h 后放瓶。取发酵液 1 mL 加入 9 mL 甲醇,混合均匀后超声 30 min,用滤纸过滤后经 HPLC 检测。取摇瓶效价高的链霉素单抗突变株,刮取适量,制成孢子悬液,均匀涂布在新制备的斜面上,连续 4 次,经摇瓶发酵验证,筛选具有遗传稳定性高的菌株。

1.2.5 利福平抗性突变株的复合选育 紫外诱变结合利福平抗性突变株的筛选方法同 1.2.4;利福平抗性突变株的摇瓶复筛及遗传稳定性验证方法同 1.2.4。

1.2.6 链霉素和利福平双抗突变株的选育 对获得的单抗高产菌株进行 2 次不同抗性的筛选,最终获得同时具备链霉素和利福平双抗的突变株。

双抗突变株的摇瓶复筛及遗传稳定性验证方法同 1.2.4。

2 结果与分析

2.1 最小抑菌浓度的确定

由表 1 可知,随着抗生素浓度的增加,菌株数量明显呈递减趋势,说明这 2 种抗生素对阿维链霉菌具有明显的抑制效果,属于有效抗生素。菌落颜色及菌落形态也有了明显的变化,且菌落生长出现延迟效应(图 1)。菌落颜色由灰色转变为灰白色或者米白色,菌落形态由褶皱的饱满的圆形菌落转变为褶皱凸起的不饱满的或者褶皱凸起的“太阳状”的不饱满或者饱满的菌落。由于孢子生长是受基因调控的,这说明菌株在抗生素的作用下发生了自发突变。同时,确定了链霉素的最小抑菌浓度为 3.5 μg·mL⁻¹;利福平的最小抑菌浓度为 1.5 μg·mL⁻¹。



图 1 单菌落的生长情况

表 1 在不同抗生素浓度作用下菌落生长情况及抑菌率

处理	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	菌落数/个	抑菌率/%
链霉素浓度	1.5	41	62.04
	2.5	4	96.30
	3.5	0	100.00
	4.5	0	100.00
	5.5	0	100.00
利福平	0.5	15	84.21
	1.0	12	87.37
	1.5	0	100.00
	2.0	0	100.00
	2.5	0	100.00

2.2 紫外诱变致死率曲线的绘制

由图 2 可知,阿维链霉菌的致死率与紫外照射时间有很大的关系。随着紫外照射时间的增加,阿维链霉菌的致死率逐步递增。紫外照射 10 s 时阿维链霉菌致死率达到 57.1%;紫外照射 20 s 时致死率达到 75.1%;紫外照射 30 s 时致死率达到 80%;紫外照射 50 s 时致死率达到 92%。经紫外诱变处理后的菌株正突变较多地出现在偏低的剂量,而负突变则较多地出现在偏高剂量。因此,在紫外诱变时常常采用致死率为 70%~80% 的相对剂量,故在本实验中选用紫外诱变时间为 20 s。

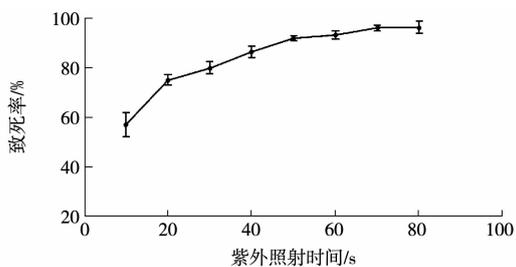


图 2 不同紫外照射时间对阿维链霉菌的致死曲线

2.3 单一抗性突变株的筛选

在紫外诱变结合抗性筛选条件下,选择合适的抗生素浓度范围,提升正突变效率。经过 3 次分离培养,根据菌落生长情况,确定了链霉素筛选浓度条件为 $1.0\sim 5.0\times\text{MIC}$,利福平筛选浓度条件为 $1.0\sim 5.0\times\text{MIC}$ 。挑取单菌落于斜面培养基中,培养 9 d 后选取长势良好的斜面进行摇瓶验证,共筛选链霉素单一抗性突变株 150 株,筛选利福平单一抗性突变株 190 株。

经过摇瓶验证,筛选出链霉素高产菌株 16 株,正突变率为 10.7%,筛选出利福平高产菌株 27 株,正突变率为 14.2%。由表 2 可知,其中链霉素高产菌株高于对照(出发菌株 AW-8: $6\ 051\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)5% 以上的有 5 株,利福平高产菌株高于对照 5% 以上的有 8 株。

表 2 单抗高产菌株摇瓶验证

链霉素 高产菌	效价/ ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)	效价增 长率/%	利福平 高产菌	效价/ ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)	效价增 长率/%
A1	6798	12.35	W1	6379	5.43
A2	6662	10.09	W2	6936	14.63
A3	6608	9.21	W3	6641	9.76
A4	6586	8.85	W4	6432	6.29
A5	6386	5.54	W5	6493	7.31
—	—	—	W6	6447	6.54
—	—	—	W7	6842	13.07
—	—	—	W8	6604	9.13

2.4 单一抗性突变株的稳定性验证

选取 A1、A2、W2 和 W7 共 4 株高产菌连续传 5 代进行稳定性验证(图 3)。其中 A1 和 A2 的 5 代效价均出现骤减现象,说明其稳定性较差,在传代培养过程中菌株容易出现退化,不适合生产需要;W2 的 5 代效价衰减速度低,但相较 W7 而言效价偏低,W7 的 5 代效价虽出现降低,但幅度不大,且平均高于出发菌株 10% 以上。

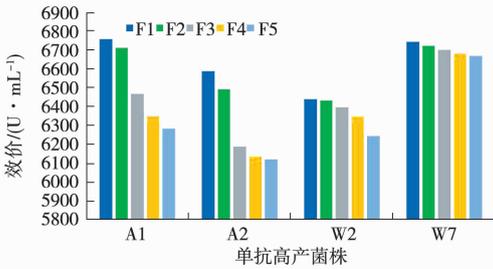


图3 单抗高产菌株的稳定性验证

2.5 双抗突变株的筛选

制备含有 $1.0 \times \text{MIC}$ 、 $2.0 \times \text{MIC}$ …… $7.0 \times \text{MIC}$ 浓度的链霉素和利福平的抗性培养皿备用,以利福平高产菌株 W7 为出发菌株,以链霉素为筛选标记进行双抗筛选。由表 3 可知,经摇瓶筛选获得 6 株效价增加的突变株,正突变率为 5%。

表3 双抗高产菌株摇瓶验证

菌株编号	效价/(U·mL ⁻¹)	效价增长率/%
W7	6742	-
R1	7144	5.96
R2	6936	2.88
R3	6906	2.43
R4	7317	8.53
R5	7278	7.95
R6	6945	3.01

2.6 双抗突变株的稳定性验证

选取 R1、R4 和 R5 共 3 株高产菌连续传 5 代进行稳定性验证(图 4)。其中 R1 的 5 代效价出现骤减现象,说明其稳定性较差,不适合生产需要;R4 和 R5 的 5 代效价均出现缓慢下降,但是 R4 的效价均高于 R5,且高于单抗菌株 W7 的效价 5% 以上(8.53%),比出发菌株 AW-8 的效价高 20.92%。

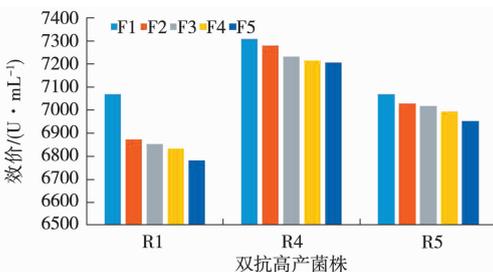


图4 双抗高产菌株的稳定性验证

3 讨论

在诱变育种中,单纯的利用紫外诱变或者抗性选育对菌种的改造存在一定的局限性,而将两者结合起来,可以快速高效的获得目标突变株,因此,这种复合选育技术更贴近实际生产、适应企业生产的需求。Zhu 等^[19]通过 UV 诱变结合核糖体工程技术对黄病毒链霉菌 SB9026 (*Streptomyces flavoviridis* SB9026) 进行改造,成功获得了一株 *Streptomyces flavoviridis* G-4F12 的高产菌株,其 6-脱氧-博来霉素 Z 的发酵产量比原来提高了 7 倍。李芹等^[20]基于抗性筛选的育种方法,首先,通过筛选低浓度链霉素(1~5 MIC)抗性突变株,将 M-Z18 的 ϵ -PL 的摇瓶产量从 $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高到 $2.43 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;随后,再次提升菌株的链霉素耐受性(5~10 MIC),进一步增强菌株的 ϵ -PL 合成能力;最后,获得一株高产突变菌 SS-19,其 ϵ -PL 产量和单位菌体合成能力分别为 $3.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.58 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$,较出发菌 M-Z18 分别提高了 95.63% 和 137.61%,通过逐步引入高浓度链霉素抗性的筛选方法可有效提升小白链霉菌的 ϵ -PL 产量。刘华华等^[21]通过核糖体工程技术成功筛选获得一株耐链霉素抗性的阿维拉霉素高产突变菌株 *S. viridochromogenes* gs 77-54。本研究通过紫外诱变结合链霉素、利福平抗性筛选的育种方法,首先在利福平(安莎霉素类抗生素)抗性条件下筛选出一株具有利福平单抗菌株 W7,摇瓶效价提高 10%,在此基础上,再利用链霉素(氨基糖苷类抗生素)进行筛选,获得一株具有链霉素和利福平双抗高产稳产菌株 R4,比单一抗性菌株 W7 的效价高 5% 以上,比出发菌株 AW-8 的效价高 20% 以上。由此可见,同一类型的抗生素在不同浓度下对菌株的作用不同,适当提高浓度可以提升其代谢能力;而利用不同类型的抗生素对阿维链霉菌菌株进行筛选,也可以提高其产抗水平。

4 结论

本试验通过紫外诱变结合不同类型抗生素双重筛选,获得一株具有链霉素和利福平双抗高产稳产菌株 R4,比单一抗性菌株 W7 的效价高 8.53%,比出发菌株 AW-8 的效价高 20.92%。因此,该方法是一种便捷有效的选育方式。

参考文献:

- [1] Burg R W, Miller B M, Baker E E, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents; producing organism and fermentation[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 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]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1979, 15(3): 372-378.
- [3] 田萍萍, 曹鹏, 常传友, 等. 阿维菌素生产菌的常压室温等离子体诱变育种及培养基优化[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(1): 150-160.
- [4] 孙玉雯, 崔承彬. 抗生素抗性筛选在微生物菌株选育中的作用[J]. *国际药学研究杂志*, 2008, 35(3): 213-217.
- [5] Siddique S, Nelofer R, Syed Q, et al. Optimization for the enhanced production of avermectin B1b from *Streptomyces avermitilis* DSM 41445 using artificial neural network[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2014, 57(5): 677-683.
- [6] 罗林根, 杨燕, 魏慧, 等. 须糖多孢菌 *Saccharopolyspora pogona* 的核糖体工程改造对丁烯基多杀菌素合成的影响[J]. *生物工程学报*, 2016, 32(2): 259-263.
- [7] Xie Y, Liu Z, Zhang G, et al. A rifampicin-resistant (rpo B) mutation in *Pseudomonas protegens* Pf-5 strain leads to improved antifungal activity and elevated production of secondary metabolites [J]. *Research in Microbiology*, 2016, 167(8): 625-629.
- [8] Ochi K, Okamoto S, Tozawa Y, et al. Ribosome engineering and secondary metabolite production[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2004, 56: 155-184.
- [9] 曹晓梅. 阿维菌素高产菌株的定向选育[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [10] 文莹, 张立新. 阿维菌素的中国“智”造[J]. *遗传*, 2018, 40(10): 888-899.
- [11] 李文华, 黄永春, 杨少彬, 等. 核糖体工程技术选育卡伍尔链霉菌高产菌株[J]. *中国农学通报*, 2017, 33(7): 48-53.
- [12] 胡向东, 冯云会, 叶茂, 等. 随机诱变和基因组重排选育阿维拉霉素高产菌[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(7): 1-7.
- [13] 徐瑶, 吴涛, 郭美锦, 等. 氮源对阿维菌素合成的影响及基于二氧化碳释放速率的阿维菌素发酵调控[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(2): 287-294.
- [14] 鲁凤娟, 侯燕燕, 李晓广, 等. 核糖体工程技术选育米尔贝霉素高产菌株[J]. *中国抗生素杂志*, 2018(7): 811-816.
- [15] 程曦, 刘丽虹, 刘进峰, 等. 单菌落效价测定在阿维菌素菌种筛选中的应用研究[J]. *现代农业科技*, 2020(12): 129-130.
- [16] 李淑焮, 薄永恒. 阿维菌素生物合成基因结构研究进展[J]. *山东畜牧兽医*, 2019, 40(7): 72-74.
- [17] 陈金松, 刘梅, 张立新. 从阿维菌素获得诺贝尔奖到中国创造[J]. *微生物学报*, 2016, 56(3): 543-558.
- [18] 蒋顺进. 原生质体 ARTP 诱变选育阿维拉霉素高产菌株[J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43(7): 831-836.
- [19] Zhu X C, Kong J Q, Yang H, et al. Strain improvement by combined UV mutagenesis and ribosome engineering and subsequent fermentation optimization for enhanced 6'-deoxy-bleomycin Z production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102: 1651-1661.
- [20] 李芹, 赵俊杰, 刘永娟, 等. 链霉素抗性选育 ϵ -聚赖氨酸高产菌株[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(3): 150-158, 195.
- [21] 刘华华, 陈宇航, 陈敏. 核糖体工程技术选育阿维拉霉素高产菌株[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(7): 1322-1330.

Compound Mutagenesis of Avermectin Producing Strain

LYU Miao-miao, YANG Guang-yao, TIAN Ping-ya, ZHANG Hui-ping, NIU Chun, ZHANG Ping

(Ningxia Tairui Pharmaceutical Limited Company, Yinchuan 750101, China)

Abstract: In order to screen out avermectin high-yield strains, improve the fermentation unit of *Streptomyces avermectin* and reduce the production cost, the dual screening method of UV mutation combined with different types of antibiotics was used to screen the original strain AW-8. The results showed that, a total of 16 strains with high production of streptomycin monoclonal antibody were screened out, the positive mutation rate was 10.7%; 27 strains with high production of rifampicin monoclonal antibody were screened out, the positive mutation rate was 14.2%; 6 strains with high production of streptomycin and rifampicin double antibody were screened out, the positive mutation rate was 5%. A high and stable streptomycin and rifampicin resistant strain R4 was obtained. The titer of R4 was 8.53% higher than that of W7 and 20.92% higher than that of AW-8. This method is a convenient and effective breeding method.

Keywords: avermectin; *Streptomyces avermitilis*; UV mutagenesis; resistance selection