

快中子、高能电子辐射处理 卡那霉素产生菌的初步结果

唐福生 邢路扬 周红雁

(北京第二制药厂, 北京)

摘要 我们曾多次进行快中子、高能电子辐射处理卡那菌株。实践证明, 当选择适宜的诱变剂量时, 如: 高能电子为 $0.1 \sim 0.2 \text{ KGy}$, 快中子为 $1 \sim 8 \times 10^{12}$ 中子数/ cm^2 , 具有较高的诱变效应。除了选择诱变剂量外, 诱变效应还与菌株的敏感性、处理方法、筛选条件等有关。快中子、高能电子诱发产生的新菌株, 摇瓶效价提高 $10.34 \sim 30.8\%$, 投产后产量提高 $4.07 \sim 5.23\%$ 。

关键词 卡那霉素; 辐射; 诱变。

前言

众所周知, 一个抗生素生产水平的高低, 取决于菌种的优良性状、生产能力以及适应于菌种特性的发酵工艺条件。为了提高卡那霉素生产水平, 我们多次采用快中子^[1]、高能电子^[2]辐射处理卡那霉素产生菌。经过摇瓶初复筛, 获得多株高产菌株, 用于生产后, 取得较明显的经济效益。下面是快中子、高能电子对卡那菌株的辐射工艺及经济效益的试验结果。

材料与 方法

1. 原始菌种

实验用菌种为卡那霉素链霉菌 *Streptomyces Kanamyceticus* 291⁺、89⁺、493⁺。

2. 培养基组成

(1) 产孢子培养基(%) 牛肉膏 0.15, 蛋白胨 0.5, 葡萄糖 0.5, 氯化钠 0.3, 琼脂 2.2, pH 为 7.0~7.2, 以去离子水配制。

(2) 液体种子培养基(%) 黄豆粉 1.2, 葡萄糖 1.1, 氯化钠 0.5, CaCO_3 0.1, pH 为 7.0, 自来水配制。

(3) 发酵培养基(%) ①, 摇瓶一级发酵培养基: 黄豆粉 3.0, 麦芽糖 2.5, 硝酸钠 0.8, ZnSO_4 0.01, 淀粉 2.5, 自来水配制, 不调 pH。②, 发酵培养基: 黄豆粉 3.2, 淀粉 3.5, 玉粉 2, 葡萄糖 0.5, 酵母 0.2, NaNO_3 0.8, 糊精 1.0, 蛋白胨 0.3, ZnSO_4 0.02, 自来水配制, 不调 pH。③, 发酵培养基: 黄豆粉 5.0, 淀粉 6.0, 麦芽糖 4.0, 葡萄糖 0.5, NaNO_3 0.9, ZnSO_4 0.02, 自来水配制, 不调 pH。

3. 培养条件

培养温度 $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 斜面孢子培养 5 天, 分离平板培养 5~7 天, 摇瓶种子挖块接种, 种龄 50~54 h, 发酵接种量 12.5%, 周期 5~6 天。初筛一级发酵挖块接种, 周期 6 天。分别取样测定生物效价和 B 组份含量。

4. 生物效价检定

用枯草杆菌 63501 杯碟法进行检定。

5. 辐射处理方法

(1) 快中子辐射 ①、中子源：400 KeV 高压倍加器产生的 14 MeV 快中子。②、辐射操作：取孢子悬浮液 1~2 ml，装入 3~5 ml 的玻璃瓶中，距中子源不同距离，辐射 3~4 小时。剂量在 50~500 Gy 左右。

(2) 高能电子辐射 ①，电子加速器：能量 3~5 MeV，流强(平均)>20 μ A，频率 500~100 Hz。②，辐射操作：取孢子悬浮液 5 ml 于 10 ml 的小瓶中，置于高能电子的平动床上，距离钛窗口 560 cm 处进行辐射，辐射 10~30 秒钟，剂量在 0.1~0.3 KGy 左右。

结 果

1. 高能电子处理结果

用高能电子辐照处理卡那菌株结果列于表 1 和图 1。

表 1 高能电子处理剂量对菌株死亡率的影响($f=300$ Hz, $I=10$ μ A)

Table 1 Effect of high energy electron dose on the death rate of strain ($f=300$ Hz, $I=10$ μ A)

原始菌株 Original strain	剂 量 Dose (KGy)	死 亡 率 Death rate (%)	摇瓶相对效价 Relative poteng of shake bottle (%)
291*	0.05	18.36	105.02
	0.10	81.93	110.32
	0.15	89.08	
	0.20	89.61	
	0.25	94.64	107.37
	0.30	96.2	
89*	0.05	79.55	106.14
	0.15	87.55	
	0.25	90.0	107.46

从表 1 可见菌株的死亡率随剂量的增加而增加。图 1 表示高能电子辐照处理的高产主峰虽然同对照组相同，但其产量分布变得更宽、更广，变异频率比对照组更大。这说明：高能电子对微生物有较高的诱变效应。

实践结果提示：适宜的剂量能获得菌株最高正变频率。在我们的实验条件下，0.05~0.3 KGy 的剂量能获得 20~40% 的正变频率，剂量超过 0.3 KGy，菌株的死亡率达 100%。因此卡那霉素链霉菌的最佳处理剂量为 0.1~0.2 KGy。

我们把高产位点上的菌株进行复筛，选出了优良菌株 426*，这种高产菌株 426* 初复筛结果及高产优势表达列入表 2 和表 3。

新菌株 426* 于 83 年 11 月试产，12 月正式投产，到 84 年 4 月，连续 6 个月的数据统计，单位提高 5.75%，产量增加 4.07%。

2. 快中子辐射处理结果

快中子辐照处理卡那菌株结果见表 4 和图 2。

表 2 新菌株 426* 摇瓶效价结果

Table 2 The potency results of shake bottle of the newstrain 426*

菌 株 Strin	初 筛 Riddle (%)		复 筛 Sifting (%)			平 均 数 Average percent (%)
	1	2	3	4	5	
426*	113.4	120.8	114.8	96.3	106.4	110.34 /
对照 Contrast	100	100	100	100	100	100

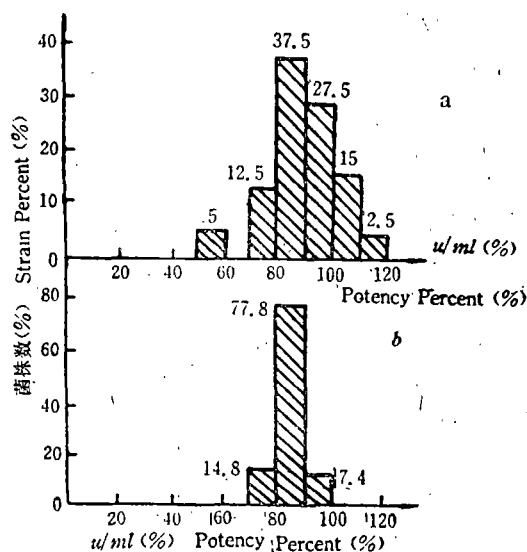
图 1 高能电子处理对卡那菌株的初筛产量分布
a, 高能电子; b, 对照组

Fig. 1 Effect of irradiation on the product distributions of riddle of streptomyces kanamyceticus, a High energy electron, b, Contrast

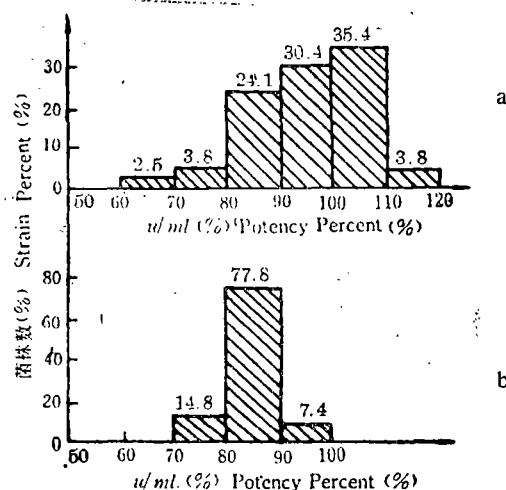
图 2 快中子处理对卡那菌株初筛产量分布
a, 快中子; b, 对照

Fig. 2 Effect of fast neutron irradiation on product distributions of riddle of kanamycin strain a, Fast neutron, b, Contrast

表 3 新菌株 426* 用于工业生产的结果

Table 3 Information of the new strain 426* applied in industrial production

项目 Item	83 年		84 年				平均 (%)
	1	2	1	2	3	4	Average (%)
批次 Batch	3	13	11	14	12	13	66
r/ml% potency percent	115.16	103.93	99.63	99.21	106.74	107.48	105.75
相对总亿 Relative product	107.88	107.25	107.24	98.9	99.32	102.56	104.09

从中可以看出快中子对卡那霉素链霉菌有较高的诱变效应。在我们的试验条件下, 快中子处理卡那霉素链霉菌最适剂量应是 $1 \sim 8 \times 10^{12}$ 中子数/cm², 死亡率应掌握在 76.4~98.5% 为宜。

表 4 快中子辐照剂量对处理卡那菌株结果的影响

Table 4 Effect of fast neutron dose on streptomycetes kanamyceticus

辐射设备 Radiation equipment	原始菌株 Original strain	剂量(中子数/cm ²) Dose	死亡率(%) Death rate	摇瓶提高幅度(%) Growth rate of shake bottle
14 MeV 快中子加速器	493*	$7.52 \times 10^{12} \sim 0.5 \text{ KGy}$	97.2	4~30
		$7.52 \times 10^{12} \sim 0.5 \text{ KGy}$	84.36	8.3~21.8
		1.88×10^{12}	93.62	5.3~20

如图 2 所示: 快中子使卡那霉素链霉菌的初筛产量分布图幅度变广, 生产主峰向正变方向移动, 正变率大幅度提高, 在适宜的条件下, 以 8×10^{12} 中子数/cm² 的快中子处理卡那菌株, 用牙签随机挑选 108 个菌落, 点种在基本培养基上, 结果出现一株不长。经氨基酸组合表反复鉴定证明是丙氨酸和半胱氨酸的缺陷型, 其诱变频率为 0.9%^[1]。

快中子处理卡那菌株后, 经摇瓶初复筛, 获得多株高产菌株, 其摇瓶效价提高 4.8~30.8%

表 5 新菌株摇瓶效价结果

Table 5 Potency results of shak bottle of new strain

新菌株 New strain	初筛(%) Riddle (%)	复筛(%) Sifting				平均数(%) Average percent(%)
	1	2	3	4	5	
604	125.5	98.95	98.57	96.17	107.67	105.37
633	115.8	94.6	117.1	99.25	97.54	104.8
687	118.8	132.4	141.2			130.8
698	131.8	119.5	111.6			120.97
932	114.4	132.4	136.1	109.8	116.2	121.8
对照 Contrast	100	100	100	100	100	100

新菌株 687*、698*、932* 都可作为主要生产菌用于生产。新菌株投产后, 发挥了稳产高产的优势。84 年 1~9 月发酵单位比 83 年同期增长 2.34%, 产量增加 5.23%。

卡那霉素链霉菌的辐射诱变育种的实践证明, 高能电子、快中子作为微生物诱变育种的诱变因子, 具有较高的诱变效应。为了取得最佳的诱变效果, 选择适宜的诱变剂量是必要的。但是也应看到, 由于菌种对诱变因子的敏感性不同, 以及诱变剂量, 筛选条件等, 快中子、高能电子对卡那菌株的辐射处理的效果有明显的差别。多年的生产实践证明经快中子、高能电子诱发产生的突变株, 投产后能提高产量 4.07~5.23%。因此用快中子、高能电子处理卡那菌株能获得高产菌株, 可以用于工业生产。

参 考 文 献

- [1] 唐福生, 张培灵, 张萌芬, 微生物学通报, 10(6), 157~159 (1983).
[2] 张培灵, 唐福生, 张萌芬, 王炳林, 王培德, 北京医药工业, 3, 6(1984).

(稿件收到日期: 1986 年 7 月 3 日)

(下转第 37 页)

- [18] 郑秀荣, 赵芳, 刘巧年, 高建国, 生物化学与生物物理学报, 15, 17~23 (1983).
[19] A. M. Ueno, E. M. Goldin, A. B. Cox and J. T. Lett, Radiat. Res., 79, 377~389 (1979).
[20] P. M. Kanter and H. S. Schwartz, Int. J. Radiat. Biol., 38, 483~493 (1980).

(稿件收到日期: 1986年8月6日)

COMPARISON STUDY OF DNA SYNTHESIS, SINGLE STRAND BREAKS AND REPAIR IN T AND B LYMPHOCYTES AFTER ^{60}Co GAMMA-RAYS IRRADIATION

Yin Jianlin Su Liaoyuan Liu Keliand

(Division of Radiological Injury, Suzhou Medical College Suzhou)

ABSTRACT The synthesis of DNA in T, B lymphocytes was investigated by the determination of ^3H -TdR incorporation after Gamma-irradiation. The DNA ssb (single strand breaks) and repair in lymphocytes were measured by alkaline elution. The DNA synthesis in B lymphocytes was much lower than that in T lymphocytes. No significant difference in DNA ssb was found between T and B lymphocytes, but a less efficient process of repair was observed in B lymphocytes. So it was conceived that B lymphocytes were more sensitive to Gamma-irradiation than T lymphocytes and DNA synthesis might be related with the repair of DNA ssb.

KEY WORDS DNA synthesis; DNA ssb; DNA repair; T lymphocytes; B lymphocytes; Radiosensitivity; Alkaline elution.

(上接第64页)

PRIMARY RESULTS IN IRRADIATING STREPTOMYCES KANAMYCETICUS WITH FAST NEUTRON AND HIGH ENERGY ELECTRON

Tan Fusheng Xin Luyong Zhou Hongyan

(Beijing Second Pharmaceutical Factory, Beijing)

ABSTRACT We carried out irradiation of kanamycin strain with fast neutron and high energy electron for many times. Our practice proved, when the selected mutagenic doses were suitable, for example, 0.10~0.20 kGy for high energy electron and $1\sim 8\times 10^{12}$ No. of neutron/cm² for fast neutron, there were more high mutagenic effects. Besides the suitable mutagenic doses, the mutagenic effects were in connection with strain sensitivity, irradiation method, selection condition etc. By electron irradiation mutagenic treatment of kanamycin strain, a new kind strain was obtained. Its potency of shak bottle has been increased 10.34~30.8% and the production yield has been increased 4.07~5.23%.

KEY WORDS Kamaycin; Irradiation; Mutagenesis.