

应用等离子体辐射技术选育 柔红霉素产生菌——天兰淡红链霉菌

蒋世春 吴建平 白 骅
(浙江海正药业股份有限公司 台州 318000)

摘要 报道了抗肿瘤抗生素柔红霉素产生菌——天兰淡红链霉菌激光株经能量为 60—85keV, 辐射剂量为 $9.6\times10^9-1.5\times10^{11}/\text{cm}^2$, (辐射时间 5—20s) 的 N^+ 等离子体诱变处理后, 拟合了该菌致死率 (D) 与辐射剂量 (M) 的关系式 $D=1-Ke^{-MP}$ (k, P 为相关系数), 该式符合辐射生物学中的单击曲线。经摇瓶筛选后, 获得 1 株高产柔红霉素突变株 137, 在生产罐上应用, 其柔红霉素效价较亲株提高了 25.8%。

关键词 N^+ 等离子体, 柔红霉素产生菌, 天兰淡红链霉菌, 致死率, 高产菌株
中图分类号 R978.1⁺2

辐射技术应用于生物工程已取得了丰硕的成果^[1,2], 特别是具有高传能线密度线性能量传递(LET)等离子体辐射技术应用于药物微生物选育, 已引起了各国微生物学家的高度重视。该项育种新技术是将 N^+ 、 H^+ 、 Ar^+ 等离子在特定的靶室内, 以脉冲连续或间断辐射生物体, 这些离子辐射时直接在生物分子上沉积能量, 引起基因突变, 从而达到诱变育种的目的。采用该方法诱变具有突变频率高, 突变谱广, 生理损伤小等优点, 为生物科学的发展开辟了一条新途径, 本文报道了应用 N^+ 等离子体辐射技术选育柔红霉素产生菌——天兰淡红链霉菌的实验结果以及获得 1 株高产菌株的应用结果。

1 材料和方法

1.1 出发菌株

出发菌株为柔红霉素产生菌——天兰淡红链霉菌(*S. Coeruleorubidus*) HB1482—170 激光株。

1.2 培养基

- 1.2.1 斜面孢子与平皿分离培养基 葡萄糖 10g, 天门冬酰胺 0.5g, K_2HPO_4 0.5g, 琼脂 25g, 加水至 1000mL, 出发菌株 为 pH6.5。
- 1.2.2 种子培养基 玉米粉 40g, 葡萄糖 10g, 麸皮粉 10g, 麸质粉 5g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, K_2HPO_4 0.1g, CaCO_3 4g, 加水至 1000mL, pH6.5。
- 1.2.3 发酵培养基 玉米粉 70g, 麸皮粉 10g, 麸质粉 10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, K_2HPO_4 1g, CaCO_3 8g, 加水至 1000mL, pH6.5。

1.3 培养条件

①斜面与平皿: 均 $30\pm1^\circ\text{C}$, 培养 14—16d。②种子: $30\pm1^\circ\text{C}$, 220r/min 摇床振荡培养 40—48h。③发酵: 接种量 10%, $30\pm1^\circ\text{C}$, 220r/min. 摇床振荡培养约 120h, 发酵终止, 测效价。

第一作者: 蒋世春, 男, 1963 年 11 月出生, 毕业于浙江省轻工业专科学校, 现从事抗肿瘤药物微生物技术工作, 工程师、执业药师 微生物学专业
收稿日期: 初稿 2000—07—06, 修回 2000—09—01

1.4 诱变处理方法

- 1.4.1 微生物样品的制备 出发菌株斜面加生理盐水(0.85% NaCl)约 10mL,刮下孢子,然后倾倒入装有玻璃珠的三角瓶内,于摇床振摇 15min,取出过滤,得到单孢子悬浮液,然后取数个无菌平皿($\phi 90\text{mm}$),每只平皿加单孢子悬浮液 1mL,在净化工作台上吹干备用。
- 1.4.2 N^+ 等离子体诱变处理 N^+ 等离子体辐射能量 65—80keV,辐射剂量依次为 9.6×10^9 、 5.8×10^{10} 、 $1.5\times 10^{11}/\text{cm}^2$ (处理时间 5—20s),对照样品放在靶室内。
- 1.4.3 样品、稀释、分离培养及筛选 经 N^+ 等离子体辐射后残存的孢子及对照样品分别适当稀释,涂皿,培养($30\pm 1^\circ\text{C}$, 14—16d),待成熟后,随机挑单菌落接斜面培养,然后进摇瓶筛选试验,测柔红霉素效价。

1.5 柔红霉素效价检测法

发酵液加草酸酸化至 pH1.2,然后在 50°C 水浴中保温 1h,再用甲醇适当稀释过滤,滤液用 PHLC 测定柔红霉素效价。色谱条件:色谱柱 C_{18} ,流动相为乙腈:水(1:1),流速 1mL/min。检测波长 254nm,其柔红霉素出峰时间约 15min。

2 结果和讨论

2.1 N^+ 等离子体辐射剂量与致死率的关系

实验结果表明,经 N^+ 等离子体辐射剂量依次为 9.6×10^9 、 5.8×10^{10} 、 $1.5\times 10^{11}\text{cm}^{-2}$ 诱变处理后(处理时间 5—20s),菌株致死率分别为 43.50%、80.90%、97.57%,即随辐射剂量递增,其致死率按指数逐渐上升,拟合了其关系式为

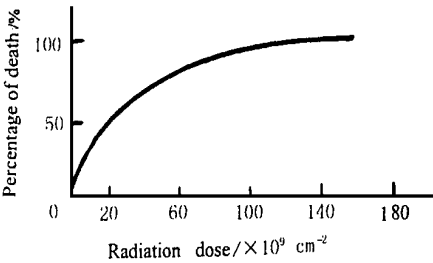


Fig.1 Death - dose curve

$$D=1-Ke^{-MP}$$

式中, D 为致死率(%), P 为被等离子体辐射的孢子敏感系数, M 为等离子体辐射剂量(cm^2), K 为致死效应系数(当 $M=0$ 时, $K=1$)。它符合辐射生物学中的单击曲线,其曲线见图 1。图 1 中的 K 为 0.7005, P 则为 2.241×10^{-11} 。实验还指出,在致死率处于高剂量即在 97.57% 的诱变组中找到一株高产柔红霉素突变株,表明致死率与抗生素产量突变率有一定的相关性。

2.2 N^+ 等离子体辐射对 *S. Coeruleorubidus* 菌落类群比例的影响

S. Coeruleorubidus 分别经 N^+ 等离子体辐射剂量 9.6×10^9 、 5.8×10^{10} 、 $1.5\times 10^{11}/\text{cm}^2$, 诱变处理后(时间 5—20s),正常型菌落比例依次逐渐增大。其中,辐射剂量 $1.5\times 10^{11}/\text{cm}^2$ 诱变组上升比例最大,比对照组增加 23.4%;同时最低产光秃型菌落比例下降幅度也最大,比对照组下降 83.3%;其它杂合菌落(超育型、迟缓型)比例也随剂量增大逐渐下降。另外,经诱变处理后,正常型菌落色素比对照组正常型菌落色素深,呈深玫瑰红,且柔红霉素效价也最高(见

Tab.1 Changes of colony types after mutagenesis

Radiation dose / cm^{-2}	Normal type (High-yielding type)/%	High growth rate type/%	Low growth rate type/%	Bare type (Low-yielding type)/%
9.6×10^9	81	8	6	5
5.86×10^{10}	89	5	3	3
1.5×10^{11}	95	2	2	1
Control	77	9	8	6

表 1)。表 1 结果表明,在一定范围内,随 N^+ 等离子体辐射剂量的增加,其正常型菌落形态变得越来越纯净,这无疑增加了筛选高产菌株的机率。

2.3 N^+ 等离子体诱变处理对 *S. Coeruleorubidus* 柔红霉素产量的影响

S. Coeruleorubidus 经 N^+ 等离子体辐射剂量分别为 9.6×10^9 、 5.8×10^{10} 、 $1.5 \times 10^{11}/\text{cm}^2$ (时间 5—20s) 处理后,诱变效果见表 2。在一定范围内,随 N^+ 等离子体辐射剂量的递增,产量正突变率、变株最高产量水平及产量提高 10% 以上突变菌株数量均相应增加。另外,应用生物统计学方法对图 2 所示产量分布作参数分析,计算所得各参数见表 3。从表 3 可看出,随 N^+ 等离子体辐射剂量的增加,变势 B 和 $P > 110\%$ 的概率均增加,即诱变剂对出发菌株产量基因诱变作用随之增强,在产量分布图上表现为正突变株数量增加,负突变株数量减少,且正突变幅度增大(见图 2)。另外,稳度 C_t 随着辐射剂量增加明显下降,说明高剂量辐射诱变打破了出发菌株的遗传稳定性,收到了较好的诱变效果。对衡量菌株产量基因群的遗传趋势参数偏度 C_s 也随着诱变剂量递增有一定增加,说明高剂量 N^+ 等离子体辐射处理对菌株产量分布有较强的“正选择力”。综合比较 N^+ 等离子体在不同剂量诱变条件下, B 、 C_t 、 P 、 C_s 4 个参数得出本实验范围内以 $1.5 \times 10^{11}/\text{cm}^2$ 辐射剂量为诱变效果最佳,并且在该诱变组中找到一株最高效价为对照的 119.6% 的柔红霉素高产菌株 137。对诱变株 137 进行生产能力及遗传稳定性考察试验,其柔红霉素效价比对照菌株稳增 25% 以上,且经连续 4 代生产能力考察,其遗传性能稳定,是一株符合工业化生产要求的高产菌株,其结果见表 4。

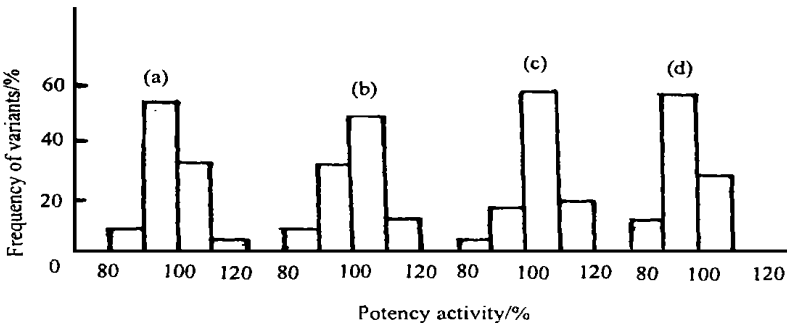


Fig. 2 Distribution of antibiotic production of variants after radiation
(a) Radiation dose $9.6 \times 10^9/\text{cm}^2$, (b) Radiation dose $5.8 \times 10^{10}/\text{cm}^2$,
(c) Radiation dose $1.5 \times 10^{11}/\text{cm}^2$, (d) Control

Tab. 2 Changes of the daunorubicin production by mutagenesis

Radiation dose / cm^{-2}	Positive mutation rate/%	The highest production increase of variants/%	Potency and percentage distribution of variants			
			80%—90%	90%—100%	100%—110%	110%—120%
9.6×10^9	37.8	8.4	10.8	51.4	32.4	5.4
5.8×10^{10}	59.6	13.7	8.1	32.4	48.6	10.8
1.5×10^{11}	78.4	19.6	5.4	16.2	59.5	18.9
Control	29.7	5.6	13.5	56.8	29.7	0

Tab.3 Parameters of the daunorubicin—production distribution

Radiation dose /cm ⁻²	Parameters					
	<i>X</i>	<i>S</i>	<i>C_t</i>	<i>C_s</i>	<i>B</i>	<i>P</i> >110%
9.6×10 ⁹	98.6	12.3	8.02	−0.862	92	0.0125
5.8×10 ¹⁰	101.4	18.4	5.51	−0.654	100.5	0.0272
1.5×10 ¹¹	107.3	22.3	4.81	−0.215	104	0.0405
Control	90.3	8.5	10.62	−0.176	85	0.04371

X : Average of production distribution; *S*: Standard deviation of production distribution;
C_t: *X*/*S* stability of production distribution; *C_s*: The partial of production distribution;
B: Change trend ; *P*>110%: probability of the high—production
strain; with potency increase about 10%

Tab.4 Daunorubicin yield and genomic stability of the mutagenic strain 137

Strain	Potency/ <i>r</i> •mL ⁻¹			Average potency level/%	Generation potency / <i>r</i> •mL ⁻¹			
	1	2	3		<i>F</i> ₁	<i>F</i> ₂	<i>F</i> ₃	<i>F</i> ₄
Mutagenic strain 137	1058	986	1037	128.3	1101	1022	1012	1001
Control strain 170	815	782	806	100	803	816	821	834
Remarks	Data listed here were from triplicate tests							

2.4 高产突变株 137 的获得及其应用

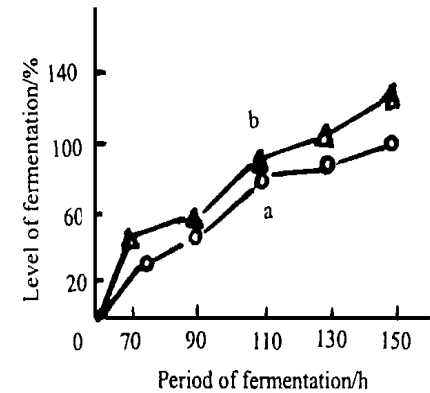


Fig.3 Metabolic map of fermentation
a. Control strain 170, b. Mutagenic strain 137

在 N⁺等离子体诱变处理过的平皿上随机挑正
常型单菌落接斜面,待长成熟后,进摇瓶试验,以未
经诱变为对照组,结果获得一株高产突变株 137,经
复筛试验,遗传稳定性考察见表 4,进罐放大实验。
在生产罐上,其高产性能经久不衰。柔红霉素效价
较亲株提高 25.8%,其菌落形态与对照株接近,但色
素比对照株深,其代谢特征表现为发酵液夹杂大量
中等球状菌丝团,前期糖氮利用快,菌丝增殖速率
大,起步单位高,中后期抗生素分泌能力强,且效价
增幅大(见图 3)。上述结果表明,铜蒸汽激光株经
N⁺等离子体诱变处理后,其抗生素产量尚能进一步
提高,展现了等离子体技术在微生物选育的上广阔
前景。

参 考 文 献

1 JIANG Shichun, BAI Hua· Int Res Integr Trad Chi Westernmed, 1997, 1(1):194—195
2 JIANG Shichun, BAI Hua· Acta Laser Biol Sinica 1998, 7(1):32—33

SELECTION OF DAUNORUBICIN-PRODUCING STRAIN S·COERULEORUBIDUS BY PLASMA RADIATION TECHNOLOGY

JIANG Shichun WU Jianping BAI Hua
(Zhejiang HISUN Pharmaceutical CO·LTD · Taizhou 318000)

ABSTRACT This paper reported the results of mutagenesis by nitrogen plasma radiation with energy from 65 to 80 keV and dose from 9.6×10^9 to $1.5 \times 10^{11}/\text{cm}^2$ in antineoplastic antibiotics daunorubicin-producing S·Coeruleorubidus. The relationship between death rate and radiation dose was formulated by computer and the formula. It was fit to a biological single-hit curve. The obtained high-producing mutagenic strain ¹³⁷ was tested for its production property. The result showed that it could increase the daunorubicin potency by 25.8% in productive tanks of fermentation.

KEYWORDS Plasma radiation, Daunorubicin-producing, S·Coeruleorubidus, Death rate, High-producing strain

CLC R978.1⁺2