

原生质体诱变结合复合抗性筛选杆菌肽高产菌株

姚瑶¹, 王明兹², 黄建忠³ (1. 福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心, 福建福州 350108; 2. 福建师范大学生命科学学院, 福建福州 350108; 3. 福建省现代发酵技术工程研究中心, 福建福州 350108)

摘要 [目的] 筛选杆菌肽的高产菌株。[方法] 将原始菌株经活化后制备原生质体, 采用紫外照射 75 s 后再用终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 NTG 诱变通过硫酸链霉素 + 杆菌肽复合抗性平板筛选杆菌肽的高产菌株。[结果] 经过 7 轮诱变, 一共分离了 1 000 个菌株 (筛选过的所有菌株); 最终获得 C-67 号高产菌株, 其杆菌肽效价达到 963.295 7 U/ml, 相比原始菌株提高 22.34%。C-67 连续传代 5 次后, 产量仍稳定, 表明其遗传稳定性较高。[结论] 原生质体诱变结合复合抗性筛选是一种简单高效的微生物育种及筛选方法。

关键词 杆菌肽; 原生质体; UV; NTG; 抗性筛选

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)32-12548-03

Screening of High Bacitracin-producing Strains by Protoplast Mutagenesis Combined with Antibiotics Resistance Plates

YAO Yao et al (Engineering Research Center of Industrial Microbiology of Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108)

Abstract [Objective] To screen high bacitracin-producing strains. [Method] In order to increase the production capacity of bacitracin by strains of high yield of *Bacillus licheniformis*, the protoplasts of the initial strain, *Bacillus licheniformis* FNU-BL6 are mutagenized by UV irradiation for 75 s combined with NTG at a final concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. [Result] The mutagenized protoplasts were spread on the screening plates containing bacitracin and streptomycin sulfate. A high yield strain, C-67, was obtained from the streptomycin sulfate + bacitracin resistant plates. Its bacitracin titer was 963.295 7 U/ml and increased 22.34% to that of the initial strain. Strain C-67 kept a stable product ability in five generations. [Conclusion] Protoplast mutagenesis following the antibiotics resistance screening program was a simple and efficient procedure for microbial breeding and selection.

Key words Bacitracin; Protoplast; UV; NTG; Resistance screening

杆菌肽(bacitracin)是由地衣芽孢杆菌或者枯草芽孢杆菌次级代谢合成的,属于非核糖体肽(NRPS)类抗生素^[1]。其能够有效抑制革兰氏阳性细菌,对部分革兰氏阴性菌也有抑制效果,为一种短肽类广谱抗菌素^[2]。我国农业部 2003 年 318 号公告中正式批准将地衣芽孢杆菌列为饲料级菌株之一^[3]。杆菌肽生产主要通过微生物发酵的方法,因此获得一株具有优良生产特性的高产菌株显得尤为重要。诱变育种仍是当前最重要的遗传育种手段^[4],常采用理化筛选模型快速获得高产突变菌株^[5]。诱变育种筛选过程中会出现样本繁多、筛选盲目、效率低等困难,设计快捷、简便、高效的筛选方法十分重要。抗生素抗性筛选是依据微生物对抗生素的抗性而应用于菌种筛选的一种较高效的筛选方法^[6]。笔者采用对诱变剂更为敏感的杆菌肽产生菌原生质体进行诱变后,再经硫酸链霉素和菌株的自身代谢产物杆菌肽相结合的复合抗性筛选平板筛选突变菌株,以期获得解除产物反馈调节和核糖体变异高产菌株。

1 材料与方 法

1.1 材料 供试菌种:地衣芽孢杆菌 FNU-BL6,由福建师范大学生命科学学院工业微生物教育部工程研究中心保藏。

1.2 方 法

1.2.1 培养基及溶液。①斜面活化培养基。酵母浸膏 25.0 g, NaCl 7 g, 琼脂 20 g, 定容至 1 L, pH 7.5。②液体种子培养基。酵母浸膏 25.0 g, 氯化钠 7 g, 定容至 1 L, pH 7.5。③发酵培养基。豆粕粉 80 g, 玉米淀粉 30 g, 花生饼粉 6 g, 轻质碳

酸钙 6 g, 硫酸铵 1 g, 定容至 1 L, pH 7.5。④LB 培养基。胰化蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 琼脂 20 g, 定容至 1 L。⑤高渗培养基。酵母浸膏 25.0 g, 氯化钠 7 g, 蔗糖 171.145 g, 氯化镁 4.066 g, 顺丁烯二酸 2.321 4 g, 琼脂 20 g, pH 7.0, 定容至 1 L。⑥PBS 缓冲液。Na₂HPO₄ 0.2 mol/L, NaH₂PO₄ 0.2 mol/L, NaCl 0.4 mol/L, pH 6.0。

1.2.2 培养条件。培养温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 斜面培养 24 h 后取出。液体种子、发酵培养基摇床转速 230 r/min, 液体种子培养 24 h, 摇床发酵培养 3 d。

1.2.3 育种流程。出发菌株活化→原生质体制备→诱变→抗性平板初筛→摇瓶发酵→初筛(管碟法活性筛选)→复筛(HPLC)。

1.2.4 原生质体的制备与再生。冷藏菌种斜面活化后,在斜面活化培养基中挑取一环菌体接入液体种子培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后按 2% 接种量在液体种子培养基中加入含 10% 的甘氨酸溶液,培养至对数期。继续培养 12 h 后取菌体 5 ml 于离心管中 6 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 然后用 5 ml 浓度为 5 mg/L 的溶菌酶溶液将菌体打散, 倒入 6 cm 无菌培养皿中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 恒温摇床 65 r/min 处理, 原生质体达到约为 90% 时处理完毕。于 4 000 r/min, 10 min 收集原生质体。用高渗溶液将原生质体洗净, 轻轻将其打散, 调整浓度为 1×10^7 个/ml。

1.2.5 原生质体诱变及抗性筛选。①紫外诱变。将制备好的原生质体悬液置于的 15 W 的紫外灯下照射, 距离 30 cm, 时间分别为 0、15、30、45、60、75 和 90 s, 红光下稀释涂布, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养, 观察其生长情况, 1 d 后取出计菌落数, 绘出紫外线对地衣芽孢杆菌原生质体的致死曲线, 同时选择恰当诱变剂量诱变处理。②NTG 诱变。将制备好的原生质体, 用

作者简介 姚瑶(1987-), 女, 湖北建始人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物发酵。

收稿日期 2013-10-12

浓度为 0、50、100、150、200 和 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 NTG 溶液分别处理 1.0 ml 原生质体菌液,处理 30 min 后,于 4 000 r/min 离心,10 min 后收集原生质体,用 PBS 溶液洗净打散终止 NTG 诱变,然后稀释涂布。计菌落数,绘出 NTG 对地衣芽孢杆菌原生质体的致死曲线,确定最适诱变剂量。③突变株的抗性筛选。制备分别含链霉素和杆菌肽的分离培养基平板,涂布经适当稀释的诱变后原生质体悬液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察和比较链霉素、杆菌肽及各浓度对地衣芽孢杆菌菌体生长的抑制能力,长势较好的即为抗性较强的菌株。最终确定链霉素和杆菌肽对菌株的最小抑制浓度,选择效果较佳的抗性浓度,并分离抗性突变菌株。

1.2.6 摇瓶发酵。将诱变后从上述抗性平板上长出的单菌落分别挑取发酵,3 d 后取发酵液,于 12 000 r/min 离心,取上清液活性进行初筛。

1.2.7 管碟法初筛。选择藤黄微球菌为指示菌,将 2% 水琼脂倒入平板水平,待其凝固后不再移动,将藤黄微球菌液体种子液按 10% 的接种量接入已经融化好的 LB 固体培养基中,迅速摇匀,倒入上述已凝固的水琼脂平板上面,待其凝固后,用无菌镊子将牛津杯顺序放置,取取样和稀释好的待测菌株上清液 100 μl 加入相应编号的牛津杯中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后观察、记录,并比较各样品抑菌圈大小。

1.2.8 杆菌肽发酵效价 HPLC 检测。选择抑菌圈较大的菌株的发酵液进行 HPLC 定量,测定其发酵效价。流动相 A 为:100 ml pH6.0 的 PBS 磷酸盐缓冲液与 300 ml 纯水混合液;流动相 B 为:520 ml 无水甲醇与 40 ml 乙腈混合液;A:B = 35:65 (V/V)。将杆菌肽标准品配置成 200 U/ml 的标准溶液。各供试样品离心后取上清液用浓度 50% 乙醇溶液定容,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤液用于 HPLC 测定。

1.2.9 菌株遗传稳定性试验。将诱变得到的高产菌株进行连续传代,分别发酵后 HPLC 测定杆菌肽的含量,判断高产菌株的遗传稳定性。

2 结果与分析

2.1 诱变剂量选择 通过调整对地衣芽孢杆菌原生质体悬液紫外照射时间,计算再生菌落数获得致死率并绘制致死曲线(图 1)。图 1 表明,紫外照射时间 75 s 左右对其原生质体的致死率大约为 90%,考虑到与 NTG 复合诱变,后续诱变实验中将采用 15 W 的紫外灯,距离 30 cm,照射 75 s 对菌株原生质体进行诱变。

利用不同终浓度的 NTG 溶液诱变地衣芽孢杆菌原生质体悬液各 30 min,绘制出 NTG 对地衣芽孢杆菌原生质体的致死率曲线(图 2)。结果可知,NTG 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,对菌体的致死率达到 90% 左右,后续诱变实验中将选择 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为诱变浓度。

2.2 抗性筛选平板浓度确定 将地衣芽孢杆菌原生质体悬液涂布于分别含有不同浓度的硫酸链霉素和不同浓度的杆菌肽的平板上,记录各浓度平板的菌落生长状况,获得不同浓度硫酸链霉素和杆菌肽对其生长的影响。由表 1 可知,随着平板硫酸链霉素浓度的升高,再生平板上菌株的数量下

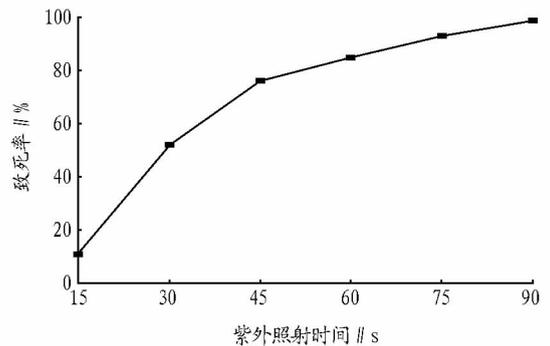


图 1 紫外照射地衣芽孢杆菌原生质体致死率曲线

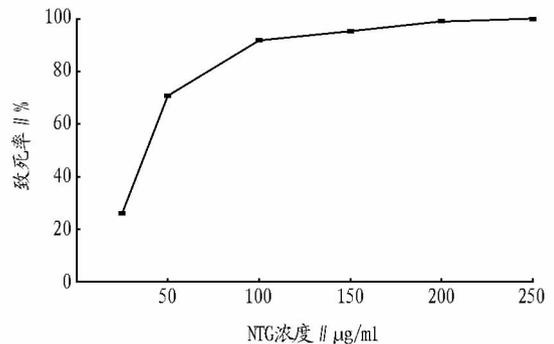


图 2 NTG 处理地衣芽孢杆菌原生质体的致死率曲线

降,当培养基中硫酸链霉素的浓度达到 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,平板上无菌落形成,硫酸链霉素对其最小抑制浓度约为 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。由表 2 可知,较低浓度的杆菌肽对菌体生长没有明显影响,当浓度达到 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,完全抑制其再生,杆菌肽最低抑制浓度约为 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

表 1 不同浓度硫酸链霉素对地衣芽孢杆菌原生质体再生的影响

编号	硫酸链霉素浓度	再长情况
	$\mu\text{g}/\text{ml}$	
1	0	+++
2	2	+++
3	3	++
4	4	++
5	5	+
6	6	---
7	7	---

注:+++表示长势良好;++表示长势一般;+表示长势较差,菌落很少;---表示基本无菌落。

表 2 不同浓度杆菌肽对地衣芽孢杆菌原生质体再生的影响

编号	杆菌肽浓度	再生情况
	$\mu\text{g}/\text{ml}$	
1	0	+++
2	5	+++
3	10	+++
4	15	++
5	20	++
6	25	+
7	30	---

注:+++表示长势良好;++表示长势一般;+表示长势较差,菌落很少;---表示基本无菌落。

2.3 诱变与突变菌株筛选 根据上述结果,制备不同浓度的硫酸链霉素+杆菌肽复合抗性平板,将经UV和NTG诱变的原生质体分离到抗性筛选平板,不同组合浓度抗性平板上的抗性菌株生长情况如表3所示。结果表明,经过诱变和复合抗性平板的筛选,得到57株硫酸链霉素+杆菌肽抗性菌株。

将这些抗性菌株摇瓶发酵,管碟法活性初筛(图3)。结果表明,有16株菌株抑菌圈明显大于原始菌株(表4),HPLC测定其杆菌肽效价,其中13株的杆菌肽产量都有不同程度的提高,其中C-67的杆菌肽效价达到963.2957 U/ml,相比原始菌株其效价提高了22.34%。

表3 地衣芽孢杆菌原生质体诱变抗性菌株筛选

链霉素浓度 μg/ml	杆菌肽浓度 μg/ml	抗性菌落数
5	20	17
5	25	20
5	30	9
6	20	2
6	25	4
6	30	4
7	20	1
7	25	0



图3 抗性突变菌株发酵液管碟法活性初筛板

表4 突变菌株抑菌圈和杆菌肽生产能力比较

菌株	抑菌圈直径	杆菌肽效价	提高率
	cm	U/ml	%
原始菌株	2.2	783.392 2	-
S-12	2.5	893.236 5	14.02
S-27	2.6	886.978 2	13.22
S-33	2.6	677.327 7	-
S-37	2.5	831.058 1	6.08
S-58	2.5	809.595 4	3.34
S-72	2.6	795.160 4	1.50
B-36	2.5	825.658 6	5.40
B-44	2.5	823.331 8	5.10
B-55	2.6	879.297 6	12.24
B-78	2.6	815.998 1	4.16
B-90	2.5	896.748 9	14.47
C-30	2.6	837.626 5	6.92
C-65	2.6	833.437 5	6.39
C-67	2.6	963.295 7	22.34
C-72	2.7	891.236 9	13.77
C-90	2.5	809.370 2	3.32

注:S为硫酸链霉素抗性筛选;B为杆菌肽抗性筛选;C为硫酸链霉素和杆菌肽的复合抗性筛选。

2.4 突变株的稳定性试验 选择上述生长情况较好、产量较高的3个菌株,不诱变,在不含抗生素的斜面上连续传代考察菌株的稳定性,并通过转接入摇瓶发酵检测其杆菌肽效价进行验证(表5)。结果可知,经过诱变并抗性筛选出的上述3株突变菌,杆菌肽的产量都有不同程度的提高,其中C-67的遗传稳定性最好。

另外,绘制突变株C-67的代谢及发酵曲线,从其生长发育及代谢角度观察突变株C-67是否稳定突变。图4表明,突变株C-67在0~16h时,杆菌肽产量较低,此时菌体主要处于初级代谢阶段。16h之后,菌体逐渐适应环境,杆菌肽产量直线上升。40h之后,可能由于培养基有限,培养基pH等条件的逐渐改变,以及菌液中已经含有大量抗生素,杆菌肽产量上升趋势逐渐下降,在48h时达到最高。48h之后,杆菌肽产量有非常微小的下降趋势,可能是因为杆菌肽稳定性不高而引起的。

表5 稳定性试验结果

传代数	杆菌肽效价//U/ml		
	菌株 B-55	菌株 B-67	菌株 B-72
F1	893.89	927.55	877.63
F2	907.56	945.21	895.90
F3	843.71	883.69	820.47
F4	892.21	902.59	841.29
F5	886.97	921.30	849.06

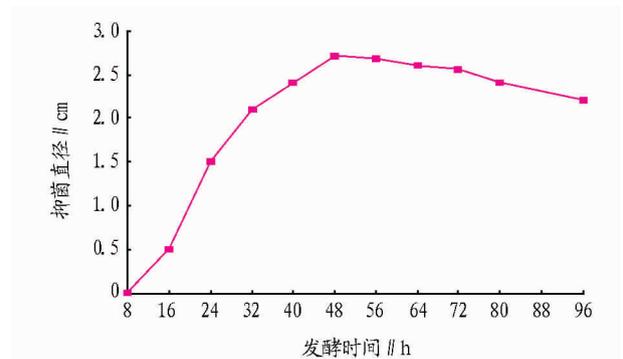


图4 突变株C-67的产物发酵曲线

3 结论与讨论

杆菌肽锌是畜禽专用抗生素,有畜禽吸收量小、排泄迅速、毒副作用小且无配伍禁忌,不产生抗药性等优点,应用范围广泛,特别是在医药和畜牧养殖方面有很高的应用价值。近年来,我国杆菌肽生产虽然得到了迅速发展,但是与国外的水平相差甚多。在微生物育种过程中,如何筛选出诱变后的高产菌株具有很大的随机性,盲目性,因此成为选育高产菌株的一个较大较难题。微生物产生抗生素,并有一套严密的抗性基因、抗生素合成基因以及调控基因,这些基因紧密连锁,诱变结合抗性筛选这些基因共突变菌株,可能获得高产^[5]。试验将诱变育种与复合抗性筛选结合起来,以杆菌肽产生菌地衣芽孢杆菌为出发菌株,筛选到C-67菌株,其杆菌肽效价达到963.2957 U/ml,相对原始菌株产量提高了

(下转第12571页)

8.9%和18.5%。每穗总粒数两个点均表现为处理少于对照,结实率基本持平。产量表现为处理明显高于对照。以实产为例,锦丰和双凤点实际产量分别为9 487.5和9 609.0

kg/hm²,分别比对照增加435.0和501.0 kg/hm²,增率分别为4.8%和5.5%。

表2 不同处理群体茎蘖动态

万苗/hm²

生育时期	锦丰			生育时期	双凤点		
	处理	对照	处理比对照增减		处理	对照	处理比对照增减
06-15	149.55	92.70	56.85	06-14	117.00	97.50	19.50
06-30	174.60	112.80	61.80	06-27	219.00	162.00	57.00
07-05	229.65	157.05	72.60	07-05	451.50	310.50	141.00
07-10	319.50	225.75	93.75	07-10	529.50	363.00	166.50
07-15	363.75	274.95	88.80	07-20	591.00	441.00	150.00
07-20	393.00	315.75	77.25	07-25	469.50	387.00	82.50
07-25	438.60	404.25	34.35	07-30	436.50	369.00	67.50
07-30	491.70	434.85	56.85	08-10	399.00	346.50	52.50
08-05	480.75	382.80	97.95	08-20	378.00	331.50	46.50
08-10	429.60	389.25	40.35				
08-20	360.60	329.70	30.90				

表3 不同栽插行距纹枯病、穴株发病率比较(张家港锦丰试点)

%

组别	08-10		08-20		08-30		09-20	
	穴病率	株病率	穴病率	株病率	穴病率	株病率	穴病率	株病率
处理	3.33	0.27	23.33	18.90	53.33	41.18	56.67	37.78
对照	3.33	0.47	26.67	13.75	40.10	25.52	50.20	25.61

表4 不同栽插行距产量及产量结构

试点	组别	穗数//万穗/hm ²	每穗粒数//粒	结实率//%	千粒重//g	理论产量//kg/hm ²	实收产量//kg/hm ²
锦丰	处理	328.5	130.4	90.1	25.6	9 898.5	9 487.5
	对照	301.5	135.2	89.7	25.4	9 288.0	9 052.5
	处理比对照增减	27.0	-4.8	0.4	0.2	610.5	435.0
	增减幅度%	8.9	-3.6	0.4	0.8	6.6	4.8
双凤	处理	355.5	123.0	89.8	25.7	10 092.0	9 609.0
	对照	300.0	140.1	89.1	25.6	9 586.5	9 108.0
	处理比对照增减	55.5	-17.1	0.7	0.1	505.5	501.0
	增减幅度%	18.5	-12.2	0.8	0.4	4.9	5.5

3 小结与讨论

(1) 常规粳稻机插秧行距从30 cm减为25 cm有利于增产。两年的试验数据表明,两种不同行距栽培均能获得9 000 kg/hm²以上的高产。25 cm栽插行距比30 cm栽插行距具有较明显的增产优势,主要表现在密度、基本苗和成穗数增加,对穗型的影响较小,可显著提高单位面积总颖花量,从而提高单产。不同行距栽插对纹枯病发病有一定影响,25 cm处理田间密度高,纹枯病发病率也相应提高,所以中期需要注重防控纹枯病,提高防治质量和效果。

(2) 目前生产上机插秧行距大多固定在30 cm,虽然可

以利用调节株距来调节密度,但由于受育秧质量、整地及机手操作等因素影响,栽插密度达不到理想要求,从而影响穗数^[1-2]。生产上,适当缩小小行距,有利于增加密度,尤其是对穗数型和穗粒兼顾型的品种,更易保证足穗,达到增穗增产的目的。因此,建议随着现有插秧机的淘汰,逐步用25 cm行距插秧机替代。

参考文献

- [1] 刘强,杨波,段瑞华,等. 淮北稻区不同行距机插秧对产量影响的研究[J]. 现代农业科技,2010(4):83-84.
- [2] 丁正生,丁志芳,朱从海,等. 不同播栽行距对水稻产量、产量构成及茎蘖动态的影响[J]. 农技服务,2012,29(2):130.

(上接第12550页)

22.34%,并且遗传稳定性良好。结果表明,试验所使用的方法简便有效,可以直接将生存能力较差的菌株排除在外,提高了筛选工作的效率。

与原菌株相比,C-67在菌体形态上虽然没有非常明显的变化,但是其生长速度减慢。其原因可能是菌体经过诱变之后,DNA的某些部位产生突变,打破菌体内原有的生理生化状况。另外,在硫酸链霉素-杆菌肽的复合抗性筛选中菌体也可能发生共突变,但其详细的基因分子方面的突变及代谢变化还有待进一步研究。

参考文献

- [1] ZABALA A O,CACHO R A,TANG Y. Protein engineering towards natural product synthesis and diversification[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,2012,39(2):227-241.
- [2] MURPHY T,ROY L,HARROP A,et al. Elicitation effects of oligosaccharides on the transcriptional level of bacitracin ABC transporter genes in *Bacillus licheniformis*[J]. Biotechnology Letters,2008,30(9):1665-1670.
- [3] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽药规范[S]. 北京:中国农业出版社,1992:24-25.
- [4] 孟甜,李玉锋. 现代工业微生物育种技术研究进展[J]. 生命科学仪器,2009(12):3-6.
- [5] 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.
- [6] 张智翔,段然,敬科举,等. 组合抗性筛选法选育达托霉素高产菌株[J]. 中国抗生素杂志,2012,37(3):202-206.