

# MPMS 诱变结合抗生素抗性 选育多杀菌素高产菌株

王海霞<sup>1,2</sup>, 陈园<sup>2</sup>, 王超<sup>2</sup>, 黎琪<sup>2</sup>, 陈新<sup>1</sup>, 张晓琳<sup>2</sup>

(1. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023;

(2. 国家粮食局科学研究院, 北京 100037)

**摘要:**采用多功能等离子体诱变系统(MPMS)对菌株 ASAGF 13-8-1 进行诱变,并通过链霉素、庆大霉素、利福平、氯霉素四种抗生素抗性筛选多杀菌素高产菌株。利用 96 孔板发酵培养结合生物检测的快速方法进行高产菌株高通量初筛,摇瓶发酵进行复筛。通过 5 轮复筛验证,获得 1 株产量较出发菌株提高 28.68% 且遗传稳定的突变菌 14-2。比较 MPMS 诱变和 MPMS 诱变结合 0.9  $\mu\text{g/mL}$  链霉素、14  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素、400  $\mu\text{g/mL}$  利福平、2  $\mu\text{g/mL}$  氯霉素的四重抗性筛选对出发菌株 ASAGF 13-8-1 的作用效果,结果显示 MPMS 诱变结合抗生素抗性筛选更有利于多杀菌素高产菌株的选育。

**关键词:**刺糖多孢菌;多杀菌素;诱变;抗生素;抗性筛选

**中图分类号:**TS 201.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2017)03-0082-05

## Breeding of spinosad high-producing strains through MPMS mutagenesis combined with antibiotics

WANG Hai-xia<sup>1,2</sup>, CHEN Yuan<sup>2</sup>, WANG Chao<sup>2</sup>, LI Qi<sup>2</sup>, CHEN Xin<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-lin<sup>2</sup>

(1. College of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan Hubei 430023;

2. Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037)

**Abstract:** Spinosad high-producing strains were bred from strains ASAGF13-8-1 mutated by multi-functional plasma mutagenesis system(MPMS), combined with streptomycin, gentamicin, chloramphenicol and rifampicin resistance screening. A fast and high throughput screening method of 96-well plate and bioassay as well as the shake flask culture were employed to primary and secondary screen respectively. One mutant 14-2 have been obtained from isolates of MPMS mutagenesis combined with antibiotic of 0.9  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin, 14  $\mu\text{g/mL}$  gentamicin, 400  $\mu\text{g/mL}$  rifampicin, 2  $\mu\text{g/mL}$  chloramphenicol through five rounds rescreening, and showed spinosad production enhanced by 28.68%, compared to original strain. By comparing the impact of MPMS mutagenesis and MPMS mutagenesis combined with antibiotic combination of Str<sup>0.9</sup>Gen<sup>14</sup>Rif<sup>400</sup>Chl<sup>2</sup> on ASAGF 13-8-1, the results showed MPMS mutagenesis combined with antibiotics help breed of spinosad high-producing strains.

**Key words:** *Saccharopolyspora spinosa*; spinosad; mutagenesis; antibiotic; resistance screening

多杀菌素(spinosad),又名多杀霉素或刺糖菌素,是由土壤放线菌刺糖多孢菌(*saccharopolyspora spinosa*)在有氧发酵条件下生成的胞内次级代谢产物<sup>[1-2]</sup>,是唯一由美国环保署(US Environmental Protection Agency)于1999、2008和2010年先后三次授予

“总统绿色化学品挑战奖”(The US-EPA Presidential Green Chemistry Challenge Award)的杀虫剂,在防治仓储、田间害虫以及动物寄生虫方面具有良好的应用价值和广阔的市场前景<sup>[3]</sup>。多杀菌素不同于与GAGB受体作用的环戊二烯类杀虫剂,它的作用方式新颖独特,对昆虫的作用表现是快速触杀,即刺激神经系统并引起兴奋,导致肌肉的不自主收缩,伴随着颤抖和麻痹并逐渐走向衰竭<sup>[4-5]</sup>。目前,国内适合工业化生产多杀菌素的菌种尚未见报道<sup>[6]</sup>,因此,选育

收稿日期:2016-11-28

基金项目:粮食公益性行业科研专项(201313002);农业科技成果转化资金项目(SQ2013EC4490009)

作者简介:王海霞,1988年出生,女,硕士。

通讯作者:张晓琳,女,博士。

多杀菌素高产菌株仍是当前研究工作的主要目标。

等离子束输入是一种近些年发展起来的诱变方法,它是通过离子注入过程中质、能、电多因子作用,使遗传物质分子移位和重组,使突变性状表现出多发性和重复性,从而导致生物体获得较高的突变率<sup>[7]</sup>。多功能等离子体诱变系统(Multifunctional Plasma Mutagenesis System, MPMS)融合了等离子体、紫外和化学诱变技术,极大地提高了微生物的突变频率和突变类型。抗生素抗性筛选是基于微生物对抗生素产生耐药性发展起来的菌株选育改良技术,它具有易操作、无需特殊设备、不需要菌株遗传背景知识且效果显著等特点,已广泛用于产阿维菌素、红霉素、新霉素、放线紫红素、十一烷基灵菌红素等的高产菌株的选育<sup>[8-10]</sup>。

目前,已有学者对等离子体诱变和抗生素抗性筛选技术在选育抗生素高产菌株方向进行了相关研究。林桂真<sup>[11]</sup>等人采用常温室亚等离子体(ARTP)诱变高产去甲金霉素金色链霉菌,获得一株遗传稳定性良好的金色链霉菌突变菌,其去甲金霉素产量较出发菌提高22.5%;张智翔<sup>[12]</sup>等人通过组合不同浓度梯度的达托霉素和链霉素进行抗性筛选玫瑰孢链霉菌,最终筛选到一株高产突变菌,达托霉素发酵单位比出发菌株提高了63.8%。根据已有报道,设计采用MPMS诱变结合多种抗生素的抗性筛选方法选育多杀菌素高产菌株。

本研究旨在通过MPMS诱变结合链霉素(streptomycin, Str)、庆大霉素(gentamicin, Gen)、利福平(rifampicin, Rif)和氯霉素(chloramphenicol, Chl)抗性筛选多杀菌素高产菌,为实现多杀菌素工业化生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

*S. spinosa* ASAGF 13-8-1,由国家粮食局科学研究院发酵生物技术实验室筛选和保藏。

### 1.2 培养基

斜面和平板培养基:葡萄糖5.0 g/L,牛肉膏3.0 g/L,酪蛋白胨0.25 g/L,琼脂15.0 g/L, pH 7.2。

摇瓶种子培养基:葡萄糖15.0 g/L,可溶性淀粉10.0 g/L,豆饼粉3.0 g/L,棉籽蛋白3.0 g/L,大豆蛋白胨25.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.0 g/L, pH 7.2。

摇瓶发酵培养基:葡萄糖60.0 g/L,棉籽蛋白20.0 g/L, NaCl 3.0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g/L, CaCO<sub>3</sub> 1.0 g/L, pH 7.2。

培养基均在121℃灭菌25 min。

### 1.3 试剂和仪器设备

CH<sub>3</sub>CN和CH<sub>3</sub>OH(色谱纯):德国Merck公司;spinosad标准品(纯度为95%):美国Sigma公司;链霉素、庆大霉素、利福平和氯霉素:生工生物工程(上海)股份有限公司。

SEM-X瑞士科耐摇床:瑞士阿道夫科耐公司;HPS-400生化培养箱:哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;Eppendorf AG 22331 Hamburg型离心机:德国Eppendorf公司;Waters 515/2487型高效液相色谱仪:美国Waters公司。

### 1.4 菌株的诱变筛选

#### 1.4.1 孢子液的制备

取一支培养成熟的刺糖多孢菌新鲜斜面,用无菌水洗下孢子,滤除菌丝体,调整孢子浓度为10<sup>8</sup>个/mL,孢子萌发备用。

#### 1.4.2 MPMS诱变

以氮气作为等离子体的工作气体,在功率300 W、平台高度14 mm、等离子体温度<35℃、湿度>10%、气体流量12 slpm、诱变方式A(垂直照射)的条件下,先后将9个平行样,即50 μL萌发好的孢子液,置于无菌金属槽内中心位置,分别进行等离子体照射10、20、30、40、50、60、70、80、90 s后,将孢子液于无菌生理盐水里进行梯度稀释后涂布平板,于29℃生化培养箱中培养10 d,形成单菌落。

#### 1.4.3 最小抑制浓度(MIC)的测定

将高产菌株的孢子悬液涂布于含不同浓度的抗生素平板,置于29℃培养箱中培养8~10 d,抗生素平板设计如表1所示。以不含抗生素平板上的菌落生长情况为对照,显著抑制菌落生长的抗生素最低浓度即为最小抑制浓度(MIC)。

表1 抗生素浓度梯度

| 抗生素                  | 设计水平/(μg/mL) |     |     |     |     |     |
|----------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 链霉素(streptomycin)    | 0.5          | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1   |
| 庆大霉素(gentamicin)     | 10           | 11  | 12  | 13  | 14  | 15  |
| 利福平(rifampicin)      | 200          | 300 | 400 | 500 | 600 | 700 |
| 氯霉素(chloramphenicol) | 1            | 1.5 | 2   | 2.5 | 3   | 3.5 |

#### 1.4.4 抗生素抗性筛选

出发菌株ASAGF 13-8-1通过含有抗生素的平板逐级引入链霉素、庆大霉素、利福平、氯霉素四种抗性,实验流程如图1所示。分离的突变株利用96孔板发酵培养,结合生物检测的快速方法进行高通量初筛,流程如图2所示。

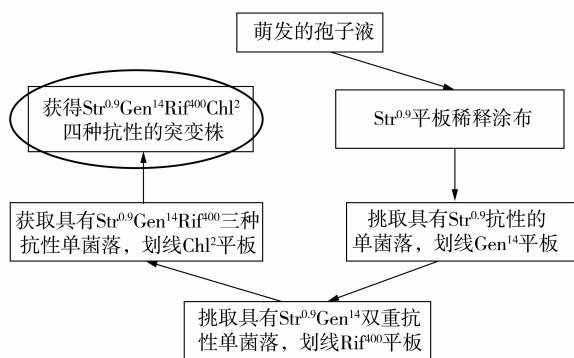


图1 抗生素抗性筛选流程图

注: A<sup>a</sup>中A表示抗生素种类,a表示抗生素的筛选浓度(单位: μg/mL),如 Str<sup>0.9</sup>表示抗性筛选的平板中链霉素含量为0.9 μg/mL。

### 1.5 快速筛选方法<sup>[13]</sup>

利用甲醇提取发酵液中的多杀菌素,经过离心取一定量的上清液于96孔浅孔板中,设置2个重

复,通风橱挥干溶剂后用一定量的蒸馏水溶解,超声波超声2 min,快速加入2龄蚊子幼虫,每孔控制3~5只,在24 h内每隔0.5 h观察一次,记录不同时间段96孔板中蚊子死亡情况。

### 1.6 多杀菌素的 HPLC 检测<sup>[14]</sup>

取一定体积发酵液加入2倍体积的甲醇,振荡30 s后静置30 min,4 000 r/min离心20 min,取上清液进行HPLC分析。分析条件为C18反相柱(ZORBAX EclipseXDB - C18, 4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm),流动相为 V<sub>甲醇</sub>: V<sub>乙腈</sub>: V<sub>水</sub> = 45: 45: 10(含0.05% 乙酸铵),进样量10 μL,流速1.0 mL/min,检测波长244 nm。根据多杀菌素A和D(spinosyn A和spinosyn D,这2种组分的差别在于聚酮环上取代基的不同)组分的积分面积,参照标准品计算其质量浓度,A和D组分之和即为多杀菌素发酵产量。

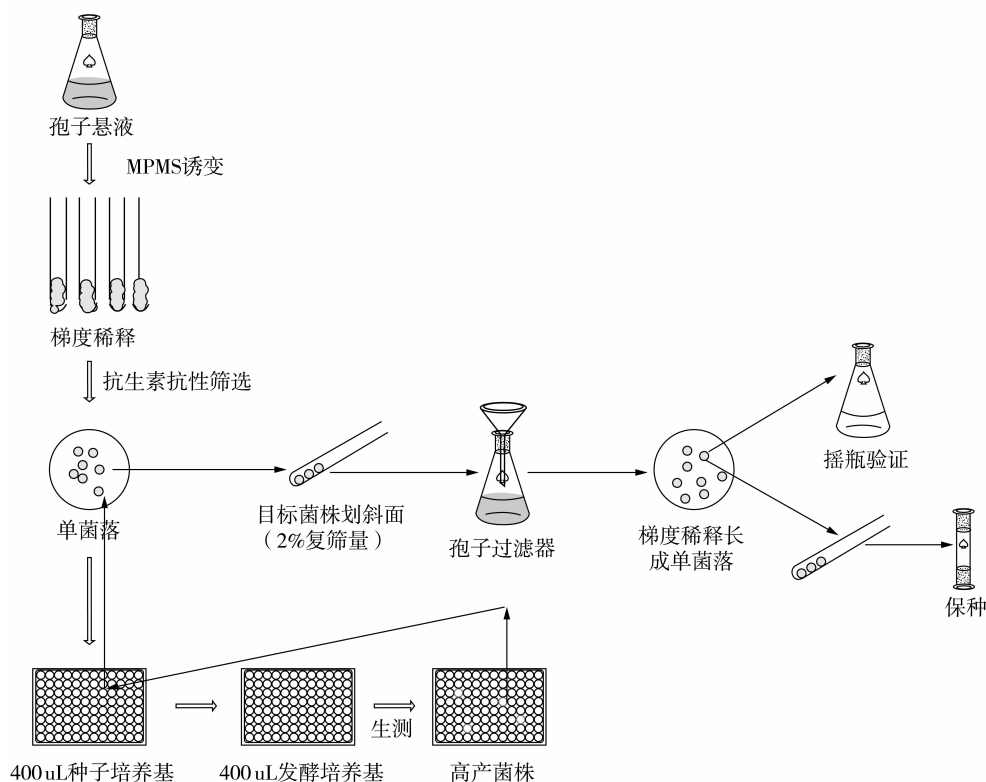


图2 MPMS 诱变结合抗生素抗性筛选多杀菌素突变菌流程图

### 1.7 数据处理

采用 origin 8.6 和 SPSS 19.0 统计学软件进行统计比较处理和显著性分析,多杀菌素产量以平均值 ± 标准偏差 (AVE ± STD) 表示。在系统误差存在的条件下,初筛突变菌发酵产量是出发菌株产量110%以上的菌株统计为正突变菌;突变菌发酵产量是出发菌株产量90%以下的菌株统计为负突变菌。正(负)突变率计算公式为:

正(负)突变率 = 正(负)突变菌株数/初筛总菌

株数 × 100% (1)

## 2 结果与分析

### 2.1 刺糖多孢菌抗性筛选浓度的确定

取一定量的 ASAGF 13-8-1 孢子悬液,涂布于含不同浓度的链霉素、庆大霉素、利福平、氯霉素抗性平板,结果如表2~表5所示,获得四种抗生素对 ASAGF 13-8-1 的最小抑制浓度分别为链霉素0.9 μg/mL,庆大霉素14 μg/mL,利福平600 μg/mL,氯霉素3 μg/mL。

表 2 不同浓度链霉素对 ASAGF13-8-1 菌落生长的抑制作用

| 链霉素/( $\mu\text{g/mL}$ ) | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1 |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| 菌落的生长情况                  | +++ | ++  | ++  | ++  | -   | - |

注：“+”代表菌落数目的多少；“-”代表菌落数量非常稀少，约 0~5 个/平板。余同。

表 3 不同浓度庆大霉素对 ASAGF13-8-1 菌落生长的抑制作用

| 庆大霉素/( $\mu\text{g/mL}$ ) | 10  | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---------------------------|-----|----|----|----|----|----|
| 菌落的生长情况                   | +++ | ++ | ++ | +  | -  | -  |

表 4 不同浓度利福平对 ASAGF13-8-1 菌落生长的抑制作用

| 利福平/( $\mu\text{g/mL}$ ) | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 | 700 |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 菌落的生长情况                  | +++ | ++  | ++  | +   | -   | -   |

表 5 不同浓度氯霉素对 ASAGF13-8-1 菌落生长的抑制作用

| 氯霉素/( $\mu\text{g/mL}$ ) | 1   | 1.5 | 2  | 2.5 | 3 | 3.5 |
|--------------------------|-----|-----|----|-----|---|-----|
| 菌落的生长情况                  | +++ | ++  | ++ | +   | - | -   |

以不含抗生素平板上的菌落形态为对照,利福平和氯霉素对刺糖多孢菌的菌落形态改变较大,当分别达到最小抑制浓度时,菌落小、形态不规则且孢子不丰富,因而本研究未全选用四种抗生素的最小抑制浓度作为筛选浓度,而是选择有一定抑制作用且菌落形态良好的抗生素浓度进行抗性菌株的筛选,如 0.9  $\mu\text{g/mL}$  链霉素、14  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素、400  $\mu\text{g/mL}$  利福平、2  $\mu\text{g/mL}$  氯霉素。

2.2 MPMS 对菌株的诱变效应

2.2.1 MPMS 诱变的致死率曲线

由图 3 可知,刺糖多孢菌的致死率曲线呈 S 型。随着等离子体作用时间的延长,致死率逐渐增加。在处理 90 s 时,致死率达到了最高 86%。为了提高获得高产突变株的机率,实验选取 MPMS 诱变时间为 20、50、80 s 三个不同致死率下的孢子液进行混合涂布抗生素平板,进行高产菌株的选育。

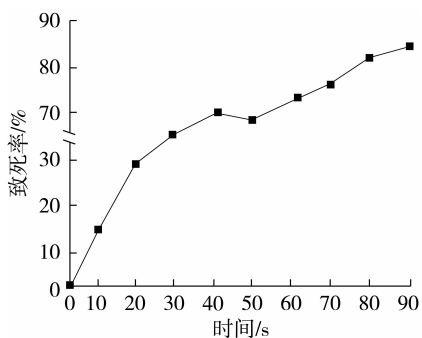


图 3 MPMS 诱变下菌株 ASAGF13-8-1 的致死率曲线

2.2.2 MPMS 诱变对菌株突变率的影响

由图 4 可知,MPMS 诱变时间为 40 s 和 50 s 时,正突变率最高,为 35%,且摇瓶复筛时多杀菌素发酵产量最高的菌株(提高了 131.92%)来源于 50 s 时的诱变条件。

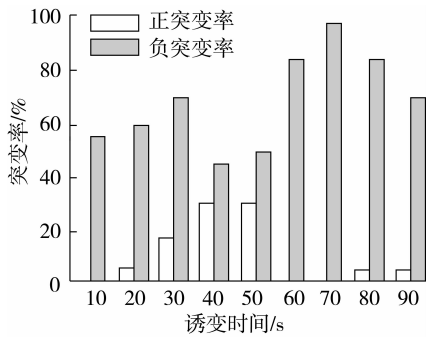


图 4 MPMS 诱变下 ASAGF13-8-1 的正负突变率

2.3 MPMS 诱变结合抗生素抗性筛选对突变株的作用效果

以 ASAGF13-8-1 为出发菌株进行诱变后,共挑取 384 个单菌落于 96 孔板中发酵培养。菌落来源于单一 MPMS 诱变和 MPMS 诱变结合  $\text{Str}^{0.9}\text{Gen}^{14}\text{Rif}^{400}\text{Chl}^2$  抗性筛选,数量各占比 50%。利用 96 孔板发酵培养结合生物检测快速方法进行高通量初筛,再经过摇瓶发酵复筛获得 13 株高产突变菌(如表 6 所示),结果显示 83.3% 的高产突变菌来源于 MPMS 诱变结合  $\text{Str}^{0.9}\text{Gen}^{14}\text{Rif}^{400}\text{Chl}^2$  抗性筛选,仅有 16.7% 来源于单一 MPMS 诱变。

比较 MPMS 诱变和 MPMS 诱变结合  $\text{Str}^{0.9}\text{Gen}^{14}\text{Rif}^{400}\text{Chl}^2$  抗性筛选两种筛选条件对 ASAGF13-8-1 的作用效果,结果如图 5 所示,单一 MPMS 诱变比 MPMS 诱变结合  $\text{Str}^{0.9}\text{Gen}^{14}\text{Rif}^{400}\text{Chl}^2$  抗性筛选获得的突变菌正突变率高,负突变率基本保持同一水平。本次诱变筛选获得的遗传稳定的高产突变菌 14-2 来源于 MPMS 诱变结合  $\text{Str}^{0.9}\text{Gen}^{14}\text{Rif}^{400}\text{Chl}^2$  抗性筛选,可见正突变率与高产性状、性状稳定性并没有相关性,但快速高效的诱变筛选条件有利于高产突变菌的获得。

表 6 高产突变菌摇瓶发酵多杀菌素产量

| 菌株编号        | 复筛最高发酵产量相对值/%     |
|-------------|-------------------|
| 14-6        | 121.34 $\pm$ 2.35 |
| 11-9        | 119.26 $\pm$ 5.80 |
| 13-2        | 116.93 $\pm$ 9.61 |
| 12-1        | 116.21 $\pm$ 7.68 |
| 14-2        | 116.09 $\pm$ 8.60 |
| 14-4        | 115.57 $\pm$ 6.00 |
| 12-2        | 112.30 $\pm$ 5.99 |
| 13-8        | 111.90 $\pm$ 2.66 |
| 13-6        | 111.77 $\pm$ 6.87 |
| 11-10       | 111.49 $\pm$ 6.68 |
| 86-3        | 114.37 $\pm$ 3.86 |
| 86-7        | 114.41 $\pm$ 1.74 |
| 13-8        | 111.90 $\pm$ 2.66 |
| ASAGF13-8-1 | 100.00            |

注:菌株编号除 86-3 和 86-7 代表筛选条件“MPMS 诱变”外,其余菌株编号均代表筛选条件“MPMS 诱变结合  $\text{Str}^{0.9}\text{Gen}^{14}\text{Rif}^{400}\text{Chl}^2$  抗性筛选”。

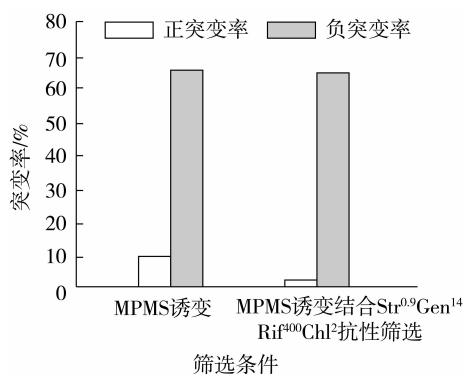


图5 不同筛选条件下的正负突变率

## 2.4 高产突变株的遗传稳定性

由于突变体在传代中可能出现表型延迟现象,导致筛选到的高产菌株转接后发酵产量降低,因此,对筛选到的13株高产突变菌进行遗传稳定性验证。经过连续转接5次,获得多杀菌素发酵产量较出发菌株平均提高28.68%的1株突变菌14-2,该菌株来源于MPMS诱变结合Str<sup>0.9</sup>Gen<sup>14</sup>Rif<sup>400</sup>Chl<sup>2</sup>抗性筛选,结果如图6所示。转接2次、3次、4次的多杀菌素发酵产量较转接1次分别下降1.07%、2.08%、1.12%,转接5次较转接1次提高1.36%,但总体变化幅度在10%以内。结果表明,MPMS诱变结合Str<sup>0.9</sup>Gen<sup>14</sup>Rif<sup>400</sup>Chl<sup>2</sup>抗性筛选获得1株遗传稳定的高产突变菌。

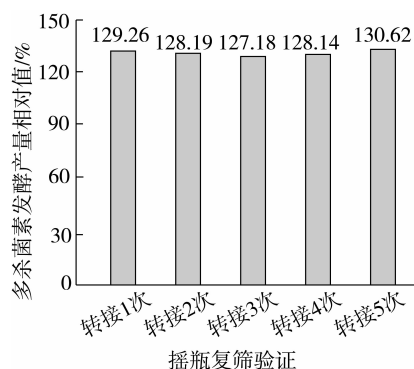


图6 突变菌14-2的遗传稳定性

## 3 结论

以多杀菌素产量为指标考察了两种筛选条件,即MPMS诱变和MPMS诱变结合链霉素、庆大霉素、利福平、氯霉素复合抗性对刺糖多孢菌孢子的诱变效果,共筛选获得13株高产突变菌,通过转接实验验证,获得1株遗传性状稳定的高产突变菌。其中,单一MPMS诱变相比MPMS诱变结合四种抗生素抗性筛选,刺糖多孢菌的正突变率高,负突变率基本不变,但通过摇瓶复筛获得的高产突变菌多数来自于后者筛选条件,且最终筛选获得的高产稳定菌

也来自后者筛选条件,表明突变率与高产性状及其稳定性并无明显的相关性。

本文在传统理化诱变育种方法基础上,拓宽了多杀菌素高产菌株的诱变选育思路,获得较高突变率后再结合抗生素抗性筛选,更有利于获得高产菌株。今后研究中,在高产突变菌选育中尝试不同诱变手段并结合多种抗生素如红霉素、新霉素、林肯霉素等进行筛选,再对多杀菌素高产突变菌的代谢特性进行研究,或可为多杀菌素发酵产量的进一步提高提供技术支持。

## 参考文献:

- [1] You C X, Mei X Z, Rui Y Z, et al. Up-regulated spinosad pathway coupling with the increased concentration of acetyl-CoA and malonyl-CoA contributed to the increase of spinosad in the presence of exogenous fatty acid[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013 (81): 47-53.
- [2] Thompson G D, Michel K H, Yao J S, et al. The discovery of *Saccharopolyspora spinosa* and a new class of insect control products[J]. *Down to earth*, 1997, 52(1): 1-5.
- [3] Chio E H. Spinosyn Insecticides: Part II. Triple Winner Of The US-EPA Presidential Green Chemistry Challenge Award[J]. *Formosan Entomol*, 2011, 31(1): 15-23.
- [4] Salgado V L. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1998, 60(2): 91-102.
- [5] Abd El-Mageed A E M, Elgohary L R A. Impact of spinosad on some enzymatic activities of the cotton leafworm[J]. *Pakistan journal of biological sciences*, 2006, 9(4): 713-716.
- [6] 郭伟群, 邹球龙, 陈园, 等. 多杀菌素高产菌株的诱变选育及代谢曲线初步研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2014, 39(4): 245-248.
- [7] 王以光. 抗生素生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [8] 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.
- [9] 陈宏, 张祝兰, 孙菲, 等. 链霉素抗性突变性筛选新霉素高产菌株[J]. *生物技术通报*, 2014, 12(29): 173-176.
- [10] Feng H H, Qin Z, Ochi K. Activation of Antibiotic Biosynthesis by Specified Mutations in the rpoB Gene (Encoding the RNA Polymerase Subunit) of *Streptomyces lividans*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(14): 3984-3991.
- [11] 林桂真, 叶蕊芳, 程林同, 等. 常压室温等离子体诱变高产去甲金霉素金色链霉菌[J]. *中国医药工业杂志*, 2014, 45(11): 1026-1031.
- [12] 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.
- [13] 陈园. 多杀菌素高产菌株的诱变选育及快速筛选方法的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [14] 熊健, 李能威, 张晓琳, 等. 多杀菌素的高效液相色谱测定[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(6): 704-706.