

文章编号: 1007-4627(2011)02-0215-04

重离子束对北里链霉菌的诱变效应*

刘敬¹, 陈积红¹, 胡伟², 王曙阳¹, 李文建^{1, #}

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 考察不同剂量重离子束对北里链霉菌的致死及诱变效应, 可确定最有利于筛选高产菌株的重离子束辐照剂量。利用不同剂量的重离子束辐照北里链霉菌孢子, 统计了存活率、致死率、正负突变率。结果发现, 在 5 Gy 重离子辐照时北里链霉菌出现较高致死率, 其后随剂量升高, 致死率变化较平缓。各辐照剂量下正负突变率相比较, 40 Gy 时正突变率最高, 负突变率相对较低, 存活率为 0.92%。因此确定 40 Gy 是对北里链霉菌高产菌株筛选最有利的辐照剂量。

关键词: 重离子; 剂量; 诱变; 北里链霉菌

中图分类号: Q691.5

文献标识码: A

1 引言

吉它霉素(kitasamycin)又名柱晶白霉素(leucomycin), 是从北里链霉菌(*Streptomyces kitasatoensis*)中分离出来的十六元大环内酯类广谱抗生素, 其抗菌谱与红霉素相似, 对革兰氏阳性菌和阴性菌、立克次氏体、螺旋体和大型病毒等均有较强的抑制作用^[1]。因为对部分大环内酯类耐药菌(如耐青霉素 G、红霉素、氯霉素及四环素等的金黄色葡萄球菌)也有效, 所以公认吉它霉素的疗效优于红霉素^[2-3], 且不会引起肝功能障碍, 细胞形成耐药也比较慢, 目前广泛应用于医药和兽药行业。

利用重离子束辐照诱变植物、微生物, 进行品种改良, 已有几十年的发展历史了, 技术逐渐成熟稳定^[4-5]。针对具体的微生物菌种, 在诱变筛选初期, 首先要考量该菌种对重离子束的能量、剂量等因素的敏感性。本研究利用兰州重离子加速器提供的中能¹²C⁶⁺重离子束对吉它霉素生产菌北里链霉菌进行了梯度辐照实验, 考察不同剂量重离子束对北里链霉菌的致死及诱变效应, 并讨论了重离子辐照北里链霉菌最佳剂量的选择策略。

2 材料与方法

2.1 菌种

北里链霉菌菌种由中国科学院近代物理研究所生物物理研究室提供。检测菌枯草芽孢杆菌 63501 购自中国兽医药品监察所。

2.2 培养基

北里链霉菌固体培养基: 可溶性淀粉、酵母浸膏、KH₂PO₄、MgSO₄ 和琼脂。枯草芽孢杆菌孢子悬液及检测培养基平板的制备均参照《中国兽药典》2000 版^[6]。

2.3 重离子辐照诱变及存活率统计

取培养 7 d 的成熟北里链霉菌斜面, 用 10 ml 无菌水洗下孢子, 加玻璃珠震荡 1 h 后 4 层无菌纱布过滤制成单孢子悬液。将悬液移入直径 30 mm 的小皿中, 以能量为 100 MeV/u、传能线密度 $LET = 28.12 \text{ keV}/\mu\text{m}$ 的¹²C⁶⁺重离子束对北里链霉菌进行了辐照诱变。照射剂量设计为 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 和 100 Gy。将受辐照的单孢子悬液梯度稀释后均匀涂布于北里链霉菌平板培养基上, 培养 5 d 待单菌落比较饱满又不是太大时统计菌落数。

* 收稿日期: 2010-08-25; 修改日期: 2010-11-02

* 基金项目: 兰州市城关区科技攻关计划(08-3-5)

作者简介: 刘敬(1976-), 女(汉族), 博士, 助理研究员, 从事微生物诱变育种研究; E-mail: liuj@impcas.ac.cn

通讯联系人: 李文建, E-mail: wjli@impcas.ac.cn

2.4 抑菌实验及正负突变统计

将各剂量重离子束辐照后的北里链霉菌孢子悬液稀释涂平板, 培养 3 d 后, 长出单菌落。将单菌落打成琼脂块, 放在空培养皿中在恒温恒湿的温室 28 °C 培养 3 d。将琼脂块摆放在含 0.5% 枯草孢子悬液的检测平板上, 36 °C 培养箱内培养 17 h 后用游标卡尺测抑菌圈直径。受照菌株中抑菌圈直径高于对照株抑菌圈直径最大值记为正突变, 低于对照株抑菌圈直径最小值的记为负突变。并以此为标准统计正负突变率。

3 实验结果

3.1 重离子辐照剂量对北里链霉菌存活率的影响

实验结果显示(图 1), 北里链霉菌对重离子束辐照较为敏感, 在 5 Gy 辐照时即表现出较高的死亡率(达 91.36%), 其后随剂量升高, 死亡率变化较平缓。存活率的变化与死亡率相对应, 在 5 Gy 辐照时存活率降至 8.64%, 其后随辐照剂量升高, 存活率缓慢降低。

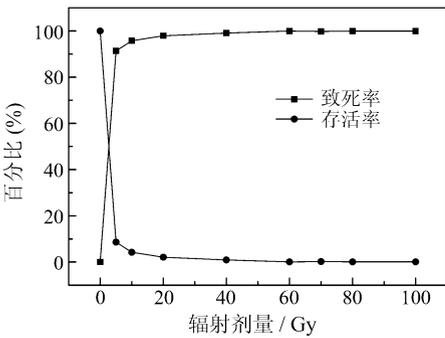


图 1 不同剂量重离子辐照下北里链霉菌的存活率和致死率

3.2 重离子辐照剂量对北里链霉菌正负突变影响

受辐照的北里链霉菌形成的单菌落在检测平板上形成抑菌圈, 各处理的抑菌圈直径平均值没有和辐照剂量形成显著的相关关系(图 2)。但对对照组抑菌圈直径的标准差较小, 而受辐照各组均表现出较大的标准差。这说明, 北里链霉菌在受重离子辐照后其产抗能力存在较对照组高的变异性。而各剂量组的平均产抗水平与对照组的平均水平无显著差异。

各受辐照处理组均表现出较高的负突变率(图

3), 以 20 Gy 处理组负突变率最高。正突变率以 40 Gy 处理组最高, 达到 24.6%, 其余几个处理正突变率均很低, 在 5, 80 和 100 Gy 处理组, 甚至没有得到正突变菌落。

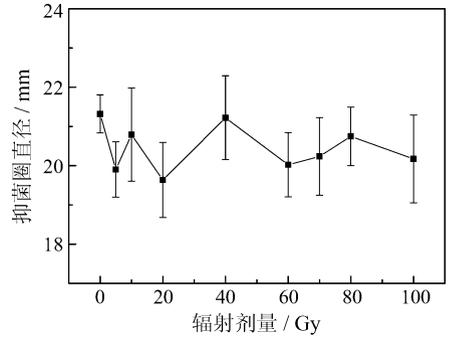


图 2 不同剂量重离子辐照后北里链霉菌单菌落的抑菌圈直径

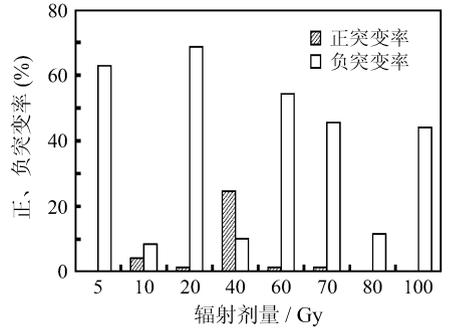


图 3 各剂量重离子辐照后北里链霉菌的正负突变率

3.3 重离子束辐照诱变北里链霉菌的剂量选择

重离子诱变北里链霉菌的最佳剂量选择, 要综合考虑存活率、正负突变率三方面因素确定最佳辐照剂量。存活率过高, 则加大了筛选的工作量, 存活

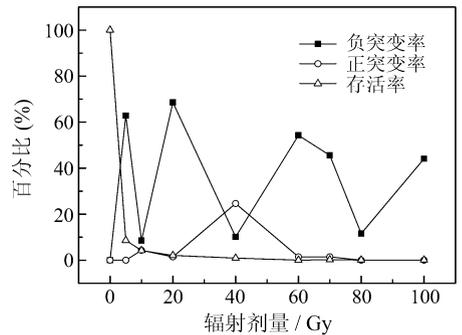


图 4 各剂量重离子辐照后对存活率、正负突变率的综合影响

率过低则样本量不够; 正突变率过低则筛选得到高产正突变株的可能性降低, 所以正突变率越高越

好;负突变率高则在加大工作量的同时降低了工作效率,所以负突变率越低越好。综合三方面因素,我们选择这样的辐照剂量:在这个剂量或剂量范围内,存活率较低同时正突变率高而负突变率低。按照这个策略,从图 4 可见,本实验中 40 Gy 是所需要的最佳辐照诱变剂量。在该剂量条件下,正突变率最高,而负突变率较低,存活率为 0.92%。

4 讨论

在对紫外线、X 射线及乙烯亚胺等诱变效应的研究中发现^[7],正向突变多出现在偏低剂量,而负向突变较多出现在偏高剂量。在本实验中,重离子束为诱变剂,没有出现类似的规律,但很明显的是,正向突变在极高剂量和极低剂量都为 0,负向突变则在各剂量组都大量存在。这种现象是否由重离子束的特殊性引起的,还有待于进一步实验研究。另外,实验是以抑菌效果为检验标准,所以结果只代表吉他霉素产量方面的变异,而不涉及其他性状(比如,形态变异和颜色变异等)。有研究表明^[7],辐照剂量越高,形态变异率越大。这提示我们在设计辐照实验时,应该综合考虑剂量对实验对象及性状指标方面的影响。

在利用重离子束对微生物进行诱变育种的实际应用中,不可避免的要涉及到具体的重离子束的参数选择问题。选择合适的重离子参数,不仅能够提高筛选效率、尽快得到目的突变株,还能在最大程度上避免重离子加速器的资源浪费。对最适诱变剂量的选择目前没有统一标准,比较一致的观点是,既能增加变异幅度及突变频度又能促使变异向正突变范围移动的剂量就是合适的剂量^[7-8]。针对不同的菌种,最适诱变手段及相应的最适剂量会有很大差异。

选择对诱变筛选最有效的重离子束参数时需要综合考虑不同辐照条件下菌种的存活率、正负突变率的差异。如前所述,存活率的高低决定了筛选的工作量,正负突变率则不仅影响到筛选的工作量,更能决定得到高产正突变株的几率。因此,利用不同重离子参数辐照菌种的孢子悬液,通过综合考察存活率、正负突变率 3 个参数,选择使菌种的孢子存活率较低、正突变率相对高而负突变率相对低的

重离子束参数进行辐照是最高效的辐照策略。

虽然不同诱变手段对基因组诱发突变存在某些突变热点,针对具体遗传性状的改变仍是随机的。为了改变某一菌株的某种性状,选用什么诱变手段,及如何选择诱变剂量,尚无规律可循,须在实际工作中不断摸索和积累经验,根据高产突变株出现的频率来具体选择合适的诱变手段及合适的诱变剂量。

参考文献 (References):

- [1] Li Mei. Chinese Pharmaceutical Journal, 1993, **28**(9): 254(in Chinese).
(李眉. 中国药学杂志, 1993, **28**(9): 254.)
- [2] Lu Kuiduo, Jin Guizhen. China Morden Medicine, 2010, **17**(2): 63(in Chinese).
(卢奎多, 金桂珍. 中国当代医药, 2010, **17**(2): 63.)
- [3] Yang Ming, Lei Xiaoguang, Peng Mingji. Chinese Journal of Drug Application and Monitoring, 2009, **6**(1): 6(in Chinese).
(阳明, 雷小光, 彭明基. 中国药物应用与监测, 2009, **6**(1): 6.)
- [4] Zhou Changfang, Qin Pei. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2003, **27**(1): 81(in Chinese).
(周长芳, 钦佩. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, **27**(1): 81.)
- [5] Zhou Libin, Li Wenjian, Qu Ying, et al. Nuclear Physics Review, 2008, **25**(2): 165(in Chinese).
(周利斌, 李文建, 曲颖, 等. 原子核物理评论, 2008, **25**(2): 165.)
- [6] Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China. Beijing: China Agriculture Press, 2000, Appendix 69(in Chinese).
(中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典. 北京: 中国农业出版社, 2000, 附录 69.)
- [7] Du Lianxiang Chief Edit. Experimental Technology of Industrial Microbiology. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1992, 168-193.
(杜连祥主编. 工业微生物学实验技术. 天津: 天津科学技术出版社, 1992, 168-193.)
- [8] Zhang Zhiping. Microbial Pharmacology. Beijing: Chemical Industry Press, 2003, 56-75(in Chinese).
(张致平主编. 微生物药理学. 北京: 化学工业出版社, 2003, 56-75.)

Mutation Effect of *Streptomyces kitasatoensis* after Exposure to Heavy Ions Radiation^{*}

LIU Jing¹, CHEN Ji-hong¹, Hu Wei², WANG Shu-yang¹, LI Wen-jian^{1, #}

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2 *College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China*)

Abstract: To define the optimum dose of heavy ion beams for selecting high productive strains, we should study mortality and mutation effects of *Streptomyces kitasatoensis* irradiated by heavy ion beams in different doses. In this research, spores of *Streptomyces kitasatoensis* were irradiated by heavy ion beams with different doses. And survival rate, mortality rate, positive mutation and negative mutation were analyzed statistically. The results showed that high mortality rate appeared from 5 Gy and then the mortality rate curve became gently. Compared the positive and negative mutations in different doses, highest positive mutation was obtained in 40 Gy, while the negative mutation was lower in this dose, and the survival rate was 0.92%. So we defined that optimum dose of heavy ions radiation for *Streptomyces kitasatoensis* selection was 40 Gy in this experiment.

Key words: heavy ion; dose; mutation; *Streptomyces kitasatoensis*

* Received date: 25 Aug. 2010; Revised date: 2 Nov. 2010

* Foundation item: Technologies R&D Programme of Chengguan District Lanzhou(08-3-5)

Corresponding author: Li Wen-jian, E-mail: wjli@impcas.ac.cn