

文章编号: 1007-4627(2011)04-0485-04

$^{12}\text{C}^{6+}$ 离子对阿维链霉菌累进辐照诱变效应研究*

王曙阳¹, 陈积红¹, 薄永恒², 王丽华³, 李文建¹, 梁剑平¹, 刘敬¹, 马晓琪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, 甘肃 兰州 730070;

3. 西北民族大学, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 选用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对阿维链霉菌诱变选育高产菌株与原始菌株进行辐照诱变, 研究其累进辐照效应。实验结果表明, 在辐照剂量为 10 Gy 时, 原始菌株比诱变高产菌株存活率高, 抗辐射能力强; 辐照剂量高于 30 Gy 时, 诱变高产菌株比原始菌株存活率高, 抗辐射能力强。原始菌株正突变率最高的辐照剂量为 50 Gy, 致死率 99.43%, 正突变率最高, 达 34.2%; 对诱变高产菌株辐照剂量为 30 Gy, 致死率 94.97%, 正突变率最高, 达 23.5%。累进辐照效应降低了最佳辐照剂量。

关键词: 辐照诱变; 累进辐照; 效应; 存活率; 正突变率

中图分类号: R146 **文献标志码:** A

1 引言

阿维链霉菌是 1975 年由日本北里研究所从日本静冈县伊东市河奈的一个土壤样品中分离到的。1976 年, 经美国 Merck 公司进一步鉴定, 发现该菌为链霉菌属的一个新种, 并定名为阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*)^[1], 其发酵产物定名为阿维菌素 (Avermectins, 简称 AVM)。阿维菌素是一种强力、高效、广谱抗寄生虫药物, 它是至今发现的最有效的杀寄生虫剂、杀螨剂和杀昆虫剂之一^[2], 在农药中的地位类似人抗生素中的青霉素。其共有 8 个组分, 分别为 A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a 和 B2b, 其中 B1a 的活性最高和杀虫活性最强, 而毒性最小, 所以阿维菌素效价主要指 B1a 的含量。目前, 对菌种改良主要集中在提高 B1a 的含量^[3]。

近几年来, 沈阳药科大学生物技术与生物制药实验室采用 NTG、DES、紫外线、 ^{60}Co 、 γ 射线和 52-氟尿嘧啶等诱变手段对阿维链霉菌的原始菌株进行了多次诱变处理, 产量有了明显提高^[4]。任超等^[5]用紫外线 (UV)、诱变剂氯化锂 (LiCl) 和亚硝基胍 (NTG) 并结合甲硫氨酸 (Met) 诱导等手段, 使 B1a 明显提高, 达到 2533.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。中国科学院

近代物理研究所首次采用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对阿维链霉菌进行辐照诱变选育, 使 B1a 含量显著提高^[6]。王曙阳等^[7-11]利用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束诱变方法, 通过平板培养基及斜面培养基的正突变菌株筛选, 发酵培养基和技术条件参数优化等, 获得发酵效价大于 5200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的高产菌株 2 株, B1a 组分摇瓶发酵单位较出发菌株 (4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 提高了 30%。

重离子束辐照诱变是一种独特的物理诱变方法。重离子束具有参数多样、LET 大和 RBE 高等特性, 利用它可提高突变率、拓宽突变谱和缩短育种周期, 成为近年来辐射育种的一种新方法。中国科学院近代物理研究所生物物理研究室利用重离子束在高产庆大霉素^[12]、耐酒精酵母^[13]、高效价阿维链霉菌诱变选育取得一些结果^[7], 肯定了重离子束在微生物育种中的有效作用^[14]。本文采用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对阿维链霉菌诱变选育出的高产菌株 (诱变菌株) 与原始菌株辐照诱变, 进行重离子累进辐照效应研究。

2 材料与方法

2.1 菌种

阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 原始

* 收稿日期: 2011-03-01; 修改日期: 2011-04-02

* 基金项目: 中国科学院西部之光人才培养计划项目 (O906050XB0); 兰州市科技计划项目 (2009-2-13); 甘肃省自然科学基金资助项目 (099RJYA013)

作者简介: 王曙阳 (1974—), 女, 甘肃正宁人, 从事辐射生物学相关研究; E-mail: wangsy@impcas.ac.cn

菌株 ZJAV-A-1, 诱变高产阿维链霉菌株 ZJAV-Y1-203, 摇瓶发酵单位 4600 μg/mL(由中国科学院近代物理研究所生物物理室微生物实验室辐照选育)。

2.2 仪器与设备实验条件

旋转摇床机(上海世平实验设备有限公司, 型号 SPH2311D); 无菌细胞培养皿(上海斯坦福生物科技发展有限公司, 规格 35 mm×10 mm); 高效液相色谱仪(美国瓦里安公司, 型号 Prostar 210); 光学显微镜(上海光学仪器六厂, 型号 XSP-8CA); 兰州重离子加速器国家实验室兰州重离子研究装置(HIRFL)垂直辐照生物终端; ¹²C⁶⁺ 离子束。

2.3 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照诱变处理^[7-8]

取 28 °C 恒温恒湿培养 7 d 的阿维链霉菌原始(ZJAV-A-1)和诱变菌株(ZJAV-Y1-203)的新鲜斜面 7 支, 每支加无菌蒸馏水 8 mL, 刮下孢子移入装有玻璃珠的三角摇瓶中, 置于(28±0.6)°C、220~240 rotations/min 旋转式摇床上培养 3 h, 打散孢子, 孢子刚开始萌发。吸取单孢子悬液 2.5 mL, 加入 5 mL 无菌的培养皿中, 用¹²C⁶⁺ 离子束照射, 设定的照射剂量为 10, 30, 40, 45, 50 和 70 Gy。每一剂量设 3 个平行对照。将¹²C⁶⁺ 辐照后的孢子悬液作 10 倍梯度稀释, 准确吸取一个样品的孢子悬液 0.1 mL, 倒在制好的分离平板培养基上, (28±0.6) °C 培养 7 d, 计数。存活率(%)=¹²C⁶⁺ 辐照处理的菌落数/未辐照对照菌落数×100%。

2.4 B1a 组分的定向筛选

将¹²C⁶⁺ 离子处理的单孢子悬液 10 倍稀释, 取

10⁻⁴ 倍的稀释液涂布于分离平板上, 在(28±0.6) °C 下培养 7 d 后, 观察菌落形态、大小变化及产孢子量多少。随机挑取单菌落移接至斜面培养基上, 在 28 °C 下培养 7 d, 然后接种于种子瓶, 培养 26 h 后观察其瓶菌丝体生长情况。选菌丝体生长良好的种子瓶, 按 4% 的接种量接发酵瓶, 对原始菌株、辐照菌株及累进辐照菌株液体培养基中菌丝体进行形态学观察。256 h 后发酵培养结束, 经提取, 并用 HPLC 色谱法检测发酵液中 B1a 的含量。以辐照后 B1a 组分含量高于辐照前菌株 B1a 含量 5% 的为正突变, 低于 5% 的为负突变。正突变率(%)=正突变菌落数/¹²C⁶⁺ 辐照后总菌落数×100%。

3 实验结果

3.1 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照诱变处理结果^[15]

根据 2.3 节所述, ¹²C⁶⁺ 离子束辐照诱变处理方法, 计算出存活菌落数及其致死率(见表 1)。由表 1 可知: ¹²C⁶⁺ 离子束辐照剂量 10 Gy 时, 原始菌株 ZJAV-A-1 的存活率为 26.94%, 高于突变菌株 ZJAV-Y1-203 存活率 20.45%; 而辐照剂量大于 30 Gy 时, 突变菌株 ZJAV-Y1-203 存活率(5.03%)高于原始菌株 ZJAV-A-1(3.44%)。出现这种原因的可能是低剂量时¹²C⁶⁺ 离子的能量沉积所产生的大量自由基导致 DNA 和生物膜等其它生物大分子的损伤, 原始菌株初次接受辐照刺激, 对辐照损伤刺激敏感, 引起的机体损伤修复反应阈值低; 诱变菌株已接受过辐照刺激, 对再次辐照刺激反应敏感性减低, 机体对辐照损伤修复反应阈值升高。在 10Gy 时, 原始菌株所产生的“保护屏障”、“修

表 1 ¹²C⁶⁺ 离子束穿透诱变处理结果*

辐照剂量 /Gy	样本数 (n)	原始菌株 ZJAV2-A-1			突变菌株 ZJAV-Y1-203		
		菌落数(个)	存活率(%)	致死率(%)	菌落数(个)	存活率(%)	致死率(%)
0	3	1800±424.26	100	0	1100±284.84	100	0
10	3	485±21.21	26.94	73.06	225±21.21	20.45	79.55
30	3	62±7.07	3.44	96.36	55.33±13.31	5.03	94.97
40	3	45.6±13.43	2.53	97.47	42.50±8.19	3.86	96.14
45	3	20.33±8.50	1.23	98.77	15.33±5.13	1.39	98.61
50	3	10.33±1.15	0.57	99.43	14.00±4.00	1.27	98.73
70	3	10.00±2.82	0.56	99.44	7.00±2.60	0.65	99.55

* 致死率=(1-辐照后生长的菌落数/未经照射生长的菌落数)×100%。

复作用”强于诱变菌株，其存活率高于诱变菌株。随着离子剂量的增加，诱变菌株所产生的“保护屏障”和“修复作用”增强，对再次辐照刺激的耐受性增强，所以在辐照剂量大于30 Gy时，辐照菌株存活率高于原始菌株。

3.2 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照后对 B1a 正突变率的影响

将 ZJAV-A-1 和 ZJAV-Y1-203 不同 $^{12}\text{C}^{6+}$ 剂量辐照孢子悬液，适当稀释后分别涂布于平板培养基上进行培养，每一辐照剂量随机挑选典型草帽型单菌落 30 个传斜面，斜面长好后进行摇瓶发酵，以 HPLC 法测定各菌株 B1a 组分的生产能力，菌株发酵单位比对照提高 5% 的菌株为正突变，计算不同辐照剂量下正突变率。原始菌株在辐照剂量为 50 Gy 时，正突变率最高，可达到 34.2%；诱变菌株在辐照剂量为 30 Gy，正突变率最高，为 23.5%。累进辐照效应使 B1a 组分正突变率最佳的辐照剂量降低(见图 1)。

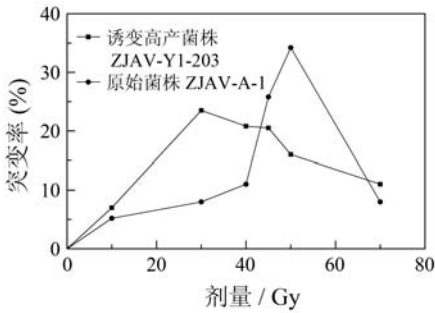


图 1 辐照剂量与正突变率关系

4 讨论

通过对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照和累进辐照阿维菌素产生菌阿维链霉菌诱变效应的研究发现， $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照诱变菌株已接受过辐照刺激，对辐照刺激反应敏感性减低，机体对辐照损伤修复反应阈值升高，在 10 Gy 时原始菌株所产生的“保护屏障”和“修复作用”强于诱变菌株，其存活率高于诱变菌株。诱变菌株已接受过 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照刺激，对辐照刺激有耐受性，抗辐照刺激能力增强，所以在辐照剂量大于 30 Gy 时，诱变菌株存活率高于原始菌株。

原始菌株最佳辐照剂量为 50 Gy，正突变率最高可达到 34.2%；诱变高产菌株最佳辐照剂量为 30 Gy，正突变率最高为 23.5%。累进辐照效应使

最佳辐照剂量降低。出现这种原因的可能是诱变菌株已接受离子辐照刺激，能量沉积，菌株处于较高能量水平，接受较低能量刺激即可引起菌株突变，所以累进辐照效应使最佳辐照剂量降低。

参考文献 (References):

- [1] Burg R W, Miller B M, Baker E E, *et al.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1979, 15(3): 361.
- [2] Zhang Liping, Chen Chuan. Journal of Hebei University (Natural Sci), 2002, 22(2): 189(in Chinese). (张丽萍, 陈川. 河北大学学报(自然科学版), 2002, 22(2): 189.)
- [3] Zhang Yingying. Breeding of *Streptomyces Avermitilis* Producing Avermectin[D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2006(in Chinese). (张莹莹. 阿维菌素产生菌的菌种选育[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.)
- [4] Xu Li, Zhang Yixuan, Wang Yong, *et al.* Journal of Anhui Agri Sci, 2007, 35(2): 3797(in Chinese). (徐丽, 张怡轩, 王勇. 安徽农业科学, 2007, 35(2): 3797.)
- [5] Ren Chao, Ma Xiangbo. Biotechnology Bulletin, 2005, 4: 59 (in Chinese). (任超, 马翔波. 生物技术通报, 2005, 4: 59.)
- [6] Wu Faju. Mutagenesis and Screening of *Streptomyces Avermitilis* Producing Avermectin and the Fermentation Condition Optimization[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2007(in Chinese). (武发菊. 阿维菌素高产菌株的诱变选育及发酵条件优化的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.)
- [7] Wang Shuyang, Chen Jihong, Li Wenjian, *et al.* Nuclear Physics Review, 2010, 20(1): 82(in Chinese). (王曙阳, 陈积红, 李文建, 等. 原子核物理评论, 2010, 20(1): 82.)
- [8] Chen Jihong, Wang Shuyang, Li Wenjian, *et al.* Journal of Gansu Agricultural University, 2010, 45(3): 85(in Chinese). (陈积红, 王曙阳, 李文建, 等. 甘肃农业学报, 2010, 45(3): 85.)
- [9] Wang Shuyang, Chen Jihong, Liu Jing, *et al.* Mutagenesis and Screening of High Avermectin Bla Producing Strains from *Streptomyces Avermitilis*//Xiao Guoqing. IMP & HIRFL Annual Report. Beijing: Atomic Energy Press, 2008, 85.
- [10] Wang Shuyang, Chen Jihong, Li Wenjian, *et al.* Research Industrialization of Mutation Breeding of *Streptomyces Avermitilis* Irradiated by Heavy Ion Beam and Fermentation Pilot Production Line Established//Xiao Guoqing. IMP & HIRFL Annual Report. Beijing: Atomic Energy Press, 2009, 126.
- [11] Wang Shuyang, Bo Yongheng, Chen Jihong, *et al.* RAPD

Analysis of High Avermectin B1a Producing Strains Irradiated by Carbon Ion Beam. //Xiao Guoqing. IMP & HIRFL Annual Report. Beijing: Atomic Energy Press, 2009, 124..

- [12] Liu Feng, Fu Wei, Yanhuican. Chinese Journal of Antibiotics, 2003, **28**(9): 517(in Chinese).
(刘峰, 傅玮, 颜辉灿. 中国抗生素杂志, 2003, **28**(9): 517.)
- [13] Li Renmin, Wang Jufang, Li Wenjian, *et al.* Nuclear Physics Review, 2007, **24**(3): 234(in Chinese).

(李仁民, 王菊芳, 李文建. 原子核物理评论, 2007, **24**(3): 234.)

- [14] Li Yanxia, Qiao Jianjun. Industrial Microbiology, 2008, **38**(1): 20(in Chinese).
(李燕霞, 乔建军. 工业微生物, 2008, **38**(1): 20.)
- [15] Zhu Chuanhe, He Yanan, Lu Fuping, *et al.* Nuclear Techniques, 2006, **29**(8): 609(in Chinese).
(朱传合, 贺亚男, 路福平, 等. 核技术, 2006, **29**(8): 609.)

Mutagenic Effect of *Streptomyces Avermitilis* Progressivity Irradiated by Ion Beam of $^{12}\text{C}^{6+}$ *

WANG Shu-yang^{1, 1)}, CHE Ji-hong¹, BO Yong-heng², WANG Li-hua³,
LI Wen-jian¹, LIANG Jian-ping¹, LIU Jing¹, MA Xiao-qi¹

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

2. Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China;

3. Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Mutagenic effect on the mutant high-producing strain ZJAV-Y1-203 and the original strain ZJAV-A1 irradiated by ion beam of $^{12}\text{C}^{6+}$ have been investigated. The experimental results indicated that the original strain has higher survival rate and stronger resistance to radiation than mutant high-producing Strain at dose of 10 Gy. The mutant high-producing strain has higher survival rate and stronger resistance to radiation than the original strain at the dose higher than 30 Gy. The lethality was 97% and the highest rate of orthomutation was 34.2%, when ZJAV-A1 was irradiated by 50 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ beam. The lethality was 94.97% and the highest rate of orthomutation was 23.5% when ZJAV-Y1-203 was irradiated by 30 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ beam. The best radiation dose is decreased by progressivity irradiation.

Key words: irradiation mutagenesis; progressivity irradiation; effect; survival rate; rate of orthomutation

* Received date: 1 Jan. 2011; Revised date: 2 Apr. 2011

* Foundation item: Western Light Talents Training Program of Chinaese Academy of Sciences(O906050XB0); Science and Technology Projects of Lanzhou City(2009-2-13); Natural Science Foundation of Gansu Province(O99RJYA013)

1) E-mail: wangsy@impcas.ac.cn