

质粒在红霉素产生菌 NRRL 2338 中的可能作用

王 以 光

(中国医学科学院抗菌素研究所, 北京)

用溴化乙啶或吡啶橙等诱变剂处理红霉素产生菌 *Str. erythreus* NRRL 2338 原株得到了八株无活性变株, 运用在固体或液体培养基上共合成的方法, 对它们在红霉素生物合成的阻断部位进行了分类, 对这些变株所积累的中间物, 用薄层层析的方法进行了分析研究, 发现有一株变株失去了质粒, 不产生气生菌丝及孢子, 对红霉素敏感, 对这些变株的遗传学及质粒特征的研究表明, 质粒可能参与红霉菌的孢子形成及色素产生, 并可能与红霉素生物合成的某些阶段有关。

关键词: 红霉素产生菌; 质粒; 阻断变株; 共合成

自 1981 年本人在美国威斯康星大学 J. Davies 教授实验室从红霉素产生菌 *Str. erythreus* NRRL 2338 菌株中发现质粒以来^[1], 我们对质粒在红霉素生物合成中可能参与的作用做了进一步研究。为此我们对 *Str. erythreus* NRRL 2338 原株进行诱变处理, 得到八株无活性变株, 通过互补共合成的方法及中间积累产物的鉴定分析, 对这些无活性变株在红霉素生物合成中的阻断部位进行了研究, 同时对这些无活性变株及原株中质粒情况与培养特征进行了分析比较, 初步看出质粒在红霉素产生菌中的可能作用。

材 料 与 方 法

(一) 菌种和固体培养基

见参考文献[1]

(二) 液体培养基

1. TSB 培养基: 见参考文献[1]

2. 发酵培养基组成(%): 蔗糖 6.9, KNO₃ 1, 琥珀酸 0.236, KH₂PO₄ 0.27, MgSO₄·7H₂O 0.12, ZnCl₂ 0.00104, MnCl₂·4H₂O 0.00062, CuCl₂·2H₂O 0.000053, CoCl₂ 0.000053, FeSO₄·7H₂O 0.0025, CaCl₂·2H₂O 0.00138, pH6.0—6.5。

(三) 生物检定培养基组成(%)

蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.3, 肉膏 0.15 NaCl 0.35, 葡萄糖 0.1, 磷酸氢二钾 0.368, 磷酸二氢钾 0.132。

(四) 无活性变株的获得

主要使用质粒消除剂溴化乙啶或吡啶橙, 或用紫外线及 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG) 进行诱变处理, 得到无活性变株的频率一般为 0.1%—0.91%, 这些无活性变株有的变成光秃型, 即不产生气生菌丝, 同时也不产生色素, 有的并无培养特征上的变化。

在使用溴化乙啶或吡啶橙时, 将溴化乙啶或吡啶橙在试管中用 TSB 液体培养基进行稀释, 然后在每管中滴入经稀释至一定浓度的 *Str. erythreus* 的孢子悬液, 30℃ 培养后, 将微有生长的一管菌丝用超声波仪 (MSE Soniprep 150) 打碎, 取 0.1ml 涂布于琼脂培养基上, 30℃ 培养 7 天后, 将单个菌落分别挑到置有钢管的琼脂培养基上(见图 1), 培养 5—7 天, 30℃, 将每个钢管中的琼脂块放在含有八叠检定菌的检定培养基上,

本文于 1982 年 12 月 21 日收到。

本报告中部分实验工作, 是本人在美国威斯康辛大学 J. Davies 教授实验室, 由 C. R. Hutchinson 教授参加指导并合作完成。红霉素生物合成中的中间体标准品由美国 C. R. Hutchinson 教授提供。

本所新秀英同志协助找到无活性变株 A₀, 沈阳药学院 78 届毕业生冯婉玉同学, 协助完成部分实验工作, 北京大学分校 82 年毕业生刘秀岩同学, 协助进行质粒接合转移试验。特此致谢。

37℃ 培养过夜,无抑菌圈的钢管内的菌落即为无活性变株,取出经纯化和传代,再在固体琼脂培养基上及液体培养基上复试。

也可用含有 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 吡啶橙的固体培养基,将 *Str. erythreus* 孢子悬液经适当稀释后,直接涂布,待长出菌落后,挑到上述带钢管的培养基中,培养,测活。

(五) 质粒检测方法

按参考文献[1]。

(六) 互补共合成方法

1. 固体培养法: 主要参照 V. Delic 方法^[2], 本实验中做了一些改良, 将欲测试的菌株互相配对涂布在 TSB 培养基上, 中间间隔 1—2mm 左右, 置 30℃ 培养 5 天后, 将每个菌株的对应部分切条(3×20mm 左右), 放置在含有八叠菌的检定培养基上(注意切条的方向不要颠倒置换), 37℃ 培养过夜后, 根据抑菌圈的部位来判断在互补共合成中是供体还是受体。

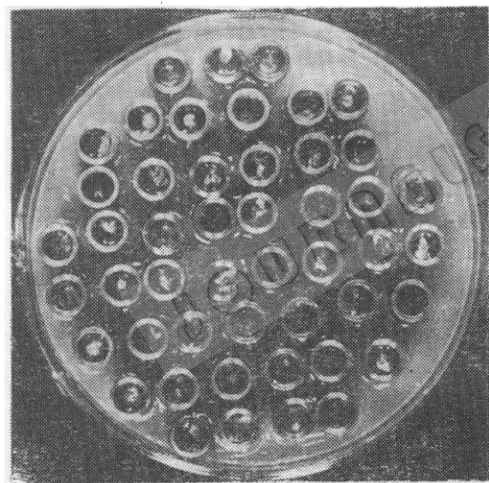


图1 钢管琼脂培养法从单个菌落检测无活性变株

Fig. 1 Agar block method for detection of antibiotic non-producing mutant from single colony (agar blocks are made in small stain-less steel tubes)

2. 液体培养法

(1) 将初步认为可能是供体和受体的菌种, 分别接种到 TSB 液体培养基中, 28℃ 培养 2 天后, 取等量受体及供体菌种的种子液 2.5ml, 混合接种到发酵培养基中, 28℃ 培养 5—7 天, 进行测活及提取。

(2) 受体及供体菌的种子液, 分别接种到发

酵培养基中, 28℃ 培养 3 天后, 无菌过滤, 将每个菌株的滤液各 15ml 混合放入 250ml 三角瓶中, 在 28℃ 摇床上培养 2 天, 测活, 提取。

(3) 按(2)方法, 受体菌及供体菌在发酵培养基中培养 3 天后, 取供体的滤液 30ml, 接种入 5ml 的受体菌的发酵液, 在 28℃ 摇床继续培养 3 天, 测活提取。

(七) 提取及薄层层析

将发酵液与等体积的 10% ZnSO_4 及 1/2 体积的 0.5N NaOH 混合, 对发酵液进行预处理, 将滤液调 pH 至 6.5 或 9.8, 加等体积乙酸乙酯进行提取, 弃去水相, 用无水硫酸钠吸去溶媒相的水份, 减压蒸馏, 浓缩液进行薄层层析。

薄层用上海硅胶 G, 粒度 < 260 筛孔, 展开剂: 氯仿: 95% 乙醇 (10:1), 显色使用 Nelson 试剂^[3]。

结果与讨论

(一) 无活性变株在红霉素生物合成途径中阻断部位的相互关系

根据两个无活性变株在固体培养基上共同培养时产生红霉素的情况, 可以确定它们之间的相互关系, 如图 2 所示, 左侧为受体, 右侧为供体。

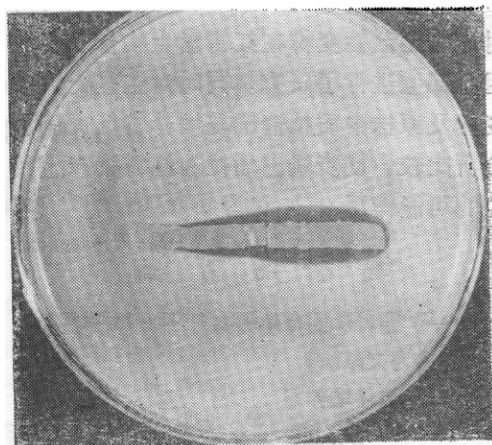


图2 红霉素阻断变株在平板琼脂上的互补共合成
Fig. 2 Cosynthesis between two blocked mutants in erythromycin biosynthesis on agar plate
Left: coarrestor; right: secretor
左: 受体; 右: 供体

产生抑菌圈的琼脂块上的菌株为受体,在生物合成途径中它的阻断位置偏后,它可以接受另一个阻断在前面的菌株(供体)所提供的中间物,并转化为有活性的终产物。将八株无活性变株相互配对共同培养,所得结果见表 1。

根据以上结果,可将八株无活性变株在红霉素生物合成途径中的阻断部位分为三类:第一类为 E₁₄, E₇, NTG₃₀;第二类为 UV_B, UV_C, C₂;第三类为 A₀。第一类的菌株都能把第二类变株所产生的中间物转化为有活性的红霉素,说明第一类的菌株阻断在前,第二类的菌株阻断在后,第三类 A₀ 不能与第一、二类的菌株相互转化,说明 A₀ 菌株中可能缺乏红霉素生物合成中一系列的酶系。

在第一类无活性变株中以 E₁₄ 为代表,在第二类无活性变株中以 C₂ 为代表,用液

体培养的三种方法进行验证,所得结果见表 2。

薄层层析结果见图版 I-1,第 II 种滤液混合培养方法不能进行转化,说明第一类菌株受体的转化酶可能在胞内。

(二) 无活性变株所积累的中间物的检测及鉴别

我们对 E₁₄, E₇, NTG₃₀, E₆, UV_B, UV_C, C₂ 等无活性变株所积累的中间物,进行提取,并用薄层层析方法与对照样品相比较,结果见图版 I-2,由图版 I-2 中可以看出:第一类无活性变株 E₇, E₁₄, NTG₃₀ 不积累 6-去氧红霉内酯,红霉内酯等化合物,因此它们是在丙酸到内酯环这一途径中被阻断,其所积累的中间物现在还无法鉴别。正如 J. Corcoran^[4] 所指出的,在红霉素生物合成途径中,从丙酸到内酯环这一步的中间过程,还未能搞清楚,主要原因

表 1 阻断变株在固体培养基上共合成红霉素的结果
Table 1 Cosynthesis of erythromycin by blocked mutants on solid medium

共合成 cosynthesis 变株 mutants	mutants 变株	E ₆	E ₇	E ₁₄	UV _B	UV _C	C ₂	NTG ₃₀	A ₀
F ₆		—	+ E ₇	+ E ₁₄	—	—	—	+ NTG ₃₀	—
F ₇			—	—	+ E ₇	+ E ₇	+ E ₇	—	—
E ₁₄				—	+ E ₁₄	+ E ₁₄	+ E ₁₄	—	—
UV _B					—	—	—	+ NTG ₃₀	—
UV _C						—	—	+ NTG ₃₀	—
C ₂							—	+ NTG ₃₀	—
NTG ₃₀								—	—
A ₀									—

(+, -) 代表有无红霉素的产生, EM or no EM produced
(+) 号下方的菌株,为受体, Strain under
(+) is a convertor

表 2 阻断变株在液体培养基上共合成红霉素
Table 2 Cosynthesis of EM by blocked mutants in liquid medium

方法 Method	混合培养方式 Manner of co-incubation	抗菌活性 Antibiotic activity	薄层层析 TLC
I	E ₁₄ 菌丝 Mycelium C ₂ 菌丝 Mycelium	+	与红霉素有相同点 Similar spot with EM
II	E ₁₄ 滤液 Filtrated broth C ₂ 滤液 Filtrated broth	-	无与红霉素相同点 No similar spot with EM
III	E ₁₄ 菌丝 Mycelium C ₂ 滤液 Filtrated broth	+	与红霉素有相同点 Similar spot with EM

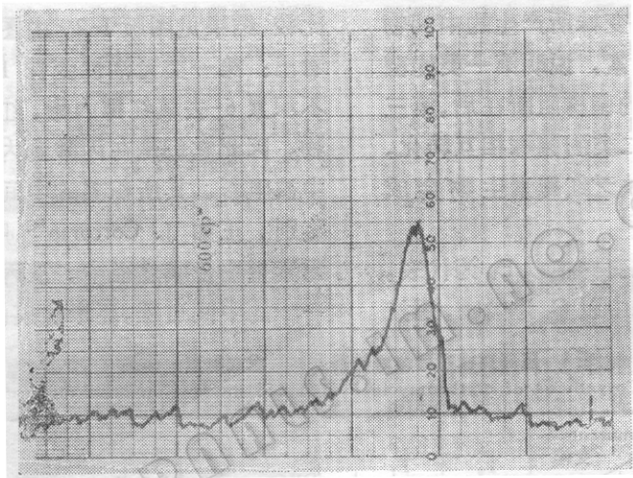


图 3 C₂ 菌株中分离到的 ¹⁴C-红霉内酯薄层放射活性扫描图
Fig. 3 ¹⁴C radioactivity scanning of TLC of erythronolide B isolated from strain C₂
图中放射活性高峰处与薄层板上红霉内酯 B 的位置相当

The position of radioactivity peak is identical with the position of standard erythronotide B

是中间物的分离和检出比较困难。他根据脂肪酸和聚酮类 (Polyketide) 生物合成的相似点, 认为在内酯环形成前的中间物也和脂肪酸合成过程中一样, 是和酶结合在一起的, 要分离出这样的中间物还必需在技术方法上, 进行新的探索和改进。

由图版 1-2 可以看出, 第二类无活性变株 UV_B, UV_C, E₆, C₂ 等均积累红霉内酯。我们曾用 ¹⁴C 标记丙酸对 C₂ 菌株产生的红霉内酯, 进行放射活性测定, 并用放射扫描薄层层析方法 (图 3), 证明 C₂ 所积累的红霉内酯是以 ¹⁴C 标记丙酸而来。C₂

菌株所积累的红霉内酯经 NMR 分析鉴别, 与红霉内酯的标准品完全一致。

A₀ 菌株所积累的中间物, 与其他无活性变株不同, 它主要产生一种在薄层层析板上 R_f 值较高的化合物, 尚待进一步鉴别。

(三) 无活性变株中质粒 DNA 的情况

我们对 A₀, E₇, E₁₄, NTG₃₀, C₂, E₆ 等无活性变株的质粒 DNA 进行了检测, 并与红霉素产生菌 *Str. erythreus* NRRL 2338 原株 PN 及另一能产生红霉素, 但质

粒 DNA 有变化的 A 菌株进行比较。见图版 II-1—3

PN 原株为红霉素产生菌,它含有多种质粒(分子量为 7.4, 8.6, 11.2 约 96Md)^[1],产生孢子及色素,对红霉素抗性。

A₀ 菌株不含有质粒 DNA,不产生孢子及色素,不产生红霉素,对红霉素敏感。

第一类不产生红霉内酯环的无活性变株, E₇, E₁₄, NTG₃₀ 均不含有小分子量的质粒,仍形成孢子及产生色素,对红霉素有抗性。

第二类在红霉内酯阶段的阻断变株 C₂, E₆ 等均含有多种质粒,其质粒情况与原株相比,无本质区别。H. Schrempf 等指出^[5,6],溴化乙啶和吡啶橙等质粒消除剂,往

往能引起 DNA 分子的缺失,插入或重新排列,而在链霉菌中 DNA 分子的这些变化所导致的表型改变,比由于丧失质粒所造成的更为经常,因而可以认为这一类无活性变株的基因变化,可能是在染色体分子上发生的。

A 菌株是用吡啶橙处理原株所得,它仅含有一个 7.4Md 质粒,(图版 II-1 所示, A 行粗带为质粒带,上方的细带为拖尾现象,上面的一条细带是二聚体,曾用酶切证明。)仍产生红霉素,不形成孢子及色素,对红霉素有抗性。

需要指出的是红霉素产生菌多种质粒之间,存在着一定的同源性,(未发表的分子杂交实验)特别是分子量相近的质粒

表 3 红霉素产生菌不同变株的性状
Table 3 Characteristics of different mutants blocked in biosynthesis of erythromycin

菌株 Strain	处理方法 Treatment	积累物 Intermediate	质粒 Plasmid	孢子 Sporulation	色素 Pigment	红霉素抗性* Resistance to EM
E ₇	UV + EB	未知 Unknown	11.2Md	+	+	R
E ₁₄	UV + EB	未知 Unknown	11.2Md	+	+	R
NTG ₃₀	NTG	未知 Unknown	11.2Md	+	+	R
C ₂	EB	红霉内酯 B Erythronotide	多种 B Several	+	+	R
E ₆	UV + NTG	红霉内酯 B Erythronotide	多种 B Several	+	+	R
CP ₂	Pr-C ₂	红霉内酯 B Erythronotide	缺 7.4Md lack of 7.4Md	+	+	R
A	A ₀	红霉素 EM	7.4Md	—	—	R
A ₀	A ₀	未知 Unknown	无 No	—	—	S
PN	原株 Parent strain	红霉素 EM	多种 Several	+	+	R

注: UV 紫外线
EB 溴化乙啶 Ethidium bromide
PG-C₂ C₂ 菌株原生质体再生 Protoplast regeneration of C₂ strain
AO 吡啶橙 Acridine orange
★R 耐红霉素 5mg/ml 以上 Resistant to EM in conc. above 5mg/ml
S 对红霉素 0.5mg/ml 敏感 Sensitive to EM in conc. of 0.5mg/ml.

DNA (如 7.4Md 和 8.6Md) 在不同菌株中含量比例常有变化, 我们曾得到一株由 C_2 菌株原生质体再生而形成的 CP_2 菌株, 它不含有 7.4Md 质粒, 但有 8.6Md 的质粒(图版 II-2), 仍保留 C_2 菌株积累红霉内酯的特性, 因此我们认为, 7.4Md 和 8.6Md 质粒可能是相关质粒, 部分分子组合或分离的结果。

综合这些菌株的培养特征, 产生红霉素, 对红霉素抗性等特点, 及所含质粒 DNA 的情况(见表 3) 初步认为质粒可能参与红霉素二级代谢过程, 并与红霉素的抗性有关, 大分子量的质粒可能参与红霉素产生菌的孢子形成及色素产生, 小分子量的质粒可能与红霉内酯环的合成有关。

用含有 7.4Md 质粒的 A 菌株及含有 11.2Md 质粒的 NTG_{30} -F^R 菌株(带有 Fusidic acid 耐药标记) 进行质粒接合转移试

验, A 菌株获得 11.2Md 的质粒, 而成为有孢子的红霉素产生菌, 其频率为 1.33—4.77%, 而 NTG_{30} 无活性产孢子菌株获得 7.4Md 的质粒, 而成为有孢子的红霉素产生菌, 其频率为 0.54—1%, 而染色体的重组频率为 10^{-5} — 10^{-7} %。

参 考 文 献

- [1] Wang Yiguang et al.: *The J. of Antibiotics*, 35(3): 335—342, 1982.
- [2] V. Delic: *J. Gen. Microbiol.*, 55: 103, 1969.
- [3] Nelson: *J. Biol. Chem.*, 153: 375, 1944.
- [4] Corcoran, J. W.: In "Antibiotics IV. Biosynthesis", Springer-Verlag, New York, 1981, pp. 132—174.
- [5] Schrempf, H. et al.: In "Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance" K. N. Timmis and A. Puhler editors, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979, pp 259—268.
- [6] Schrempf, H.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32: 292—295, 1982.

POSSIBLE ROLE OF PLASMIDS IN ERYTHROMYCIN PRODUCING STRAIN *STR. ERYTHREUS* NRRL 2338*

Wang Yiguang

(Institute of antibiotics, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

Eight variants have been obtained by treatment of wild type strain of *str. erythreus* NRRL 2338 with ethidium bromide or acridine orange. The variants have been classified based upon the blocked step in biosynthesis of erythromycin by cosynthesis analysis on solid agar plate or in liquid medium. The intermediates which were accumulated in these variants were studied by thin-layer chromatography. One variant was plasmidless strain, did not produce aerial mycelium or spores and was very sensitive to erythromycin. Genetical and plasmid profile studies of 11.2 Md may be involved in sporulation and

small plasmid with a molecular weight of 7.4 Md or 8.6 Md may be connected with gene required for lactone formation of erythromycin.

Key words

Erythromycin producing strain; plasmid; blocked mutant; cosynthesis

*Some variants were obtained in University of Wisconsin in Prof. J. Davies lab under the support of Prof. C. R. Hutchinson as a advisor on Julian's sabbatical leave. I am grateful to Prof. C. R. Hutchinson for kind supply of intermediates reference of erythromycin.