

诺卡氏菌原生质体融合重组研究

贺敏霞 史济平 褚志义

(上海医科大学药学院生物合成药化教研室, 上海)

本文报道 *Nocardia* sp.48 (Str^r Rif^s) 和 *Nocardia* sp.189 (Str^s Rif^r) 原生质体融合结果。42% PEG6000 获最高融合频率。经一定时间的表型延迟后检出抗性互补的融合子。用电子显微镜观察了原生质体融合过程。融合子形态多样, 耐双药性状稳定。有四株融合子产生亲本没有的甾体转化中间体, 三株融合子产生亲本没有的抗生物质, 还得到一株甾体转化活力明显高于亲本的融合子。

关键词 原生质体融合; 重组; 诺卡氏菌

诺卡氏菌 sp. 为甾体转化菌, 可以降解甾醇, 形成重要的激素药物中间体 ADD (雄甾1,4-二烯-3,17-双酮)。我们期望通过原生质体融合来实现基因的重组和交换, 以获得优良菌种和具有新的遗传性状的菌株。

在研究了 *Nocardia* sp. 原生质体分离及再生的条件之后, 进一步进行原生质体融合重组研究, 得到了较高重组频率, 并获得甾体转化率明显高于亲本的融合子和产生新转化产物和新抗生物质的融合重组子。本文报道这些研究结果。

材料与方 法

(一) 菌株及遗传标记

采用抗生素梯度平皿分离耐药菌, 得到耐链霉素菌株 *Nocardia* sp.48 (7200 γ /ml), 它对利福平敏感, 并能降解胆甾醇形成 ADD。另得到耐利福平菌株 *Nocardia* sp.189 (150 γ /ml), 它对链霉素敏感, 其降解胆甾醇形成 ADD 的活力较低。这两株耐药菌经多次传代, 耐药性保持不变, 遗传标记分别为 N.sp.48 (Str^r Rif^s); N.sp.189 (Str^s Rif^r), 作为融合的两

亲本。

(二) 培养基

1. 菌体生长培养基 (%) : 酵母浸出粉 0.75, 牛肉膏 0.25, 葡萄糖 0.5, 蔗糖 0.25, 蛋白胨 0.5, pH7.2。

2. 原生质体渗透压稳定液, 即 P 稳定液^[1]

3. Rc 再生培养基 (%) : 蔗糖 10.3, 酵母膏 0.75, 牛肉膏 0.25, 蛋白胨 0.75, 葡萄糖 0.5, 琼脂 2, pH7.2, Tris-HCl 缓冲液 (0.25mol/L, pH7.2) 10ml。

4. 发酵培养基 (%) : 葡萄糖 1.5, 蔗糖 1, 鱼蛋白胨 1, 大豆蛋白胨 1, KNO₃ 0.1, KH₂PO₄ 0.02, CaCO₃ 0.2, pH7.2。

5. 细菌鉴定培养基 (%) : 蛋白胨 1, 牛肉膏 0.5, K₂HPO₄ 0.3, 琼脂 2, pH7.8。

(三) 酶及特殊试剂

溶菌酶: 41200u/mg SIGMA 公司; 蛋白酶 B.P: 100 万 u/mg 江苏无锡酶制剂厂; 消色肽酶: 100 万 u/mg 日本和光纯药工业株式会社; 牛血清白蛋白: 中科院上

本文于 1988 年 9 月 19 日收到。

海生物化学研究所, 聚乙二醇: PEG 1000, PEG 4000, PEG 6000分别为Merck公司、上海化学试剂分装厂(日本进口)、上海化学试剂采购供应站产品。

(四) 原生质体的制备和再生

参照文献[2]。

(五) 原生质体融合

两亲株原生质体($>10^7$)等体积混和, 离心沉淀(3000r/min, 15min), 在振荡器上使原生质体均匀分散于残留的一点P稳定液中, 加PEG溶液, 振荡器中轻轻混匀, 34℃保温5min, 加P稳定液稀释, 离心(2000r/min, 10min), P稳定液洗2次, 涂布再生培养基, 表型延迟48h左右, 加含有抗生素的软琼脂上层培养基5ml, 培养至菌落长出, 计数。

融合频率(%) =

$$\frac{\text{融合子数}}{\text{融合后原生质体长成的菌落数}} \times 100\%$$

融合子数: 即为融合后在选择性再生培养基上长出的菌落数。融合后原生质体长成的菌落数: 即取融合后的原生质体, 分别用P稳定液和0.1%SDS溶液稀释涂再生培养基, 长出的菌落数之差。

(六) 原生质体融合电镜观察的样品制备

经PEG融合处理的原生质体悬液, 离心沉淀(3000r/min, 15min), 弃上清液, 加2.5%戊二醛的P稳定液, 置5℃冰箱放置固定1h, 离心(1500r/min, 10min), 在沉淀中2.5%琼脂P稳定液的混合融状液(50℃—60℃); 冷却静置, 固化后, 切成2mm²左右的小块, 置2.5%戊二醛P稳定液溶液中, 5℃冰箱保存, 送电镜室进一步处理并观察摄片。

(七) 菌株转化产物分析

斜面接种菌体生长培养基, 31℃, 240r/min, 旋转式摇床培养24h, 加底物

胆固醇抑制剂8-羟基喹啉, 继续转化60h, 加乙酸乙酯提取, 浓缩, 2%草酸溶液洗去多余的8-羟基喹啉, 进一步进行薄层层析和气相层析。

1. 薄层层析: 采用硅胶GF 254制备层析板。展开剂: 乙酸乙酯: 氯仿=3:50, 点样层析后于3650Å紫外线分析仪下观察斑点的位置和大小。

2. 气相色谱法: 参见文献[3]。

(八) 亲本及融合子的抗菌活性测定

斜面接种发酵培养基, 31℃, 同上摇床上培养48h, 用消毒纸片沾取发酵液, 贴于含有枯草杆菌或大肠杆菌的鉴定平皿上, 37℃培养14—16h, 观察透明的抑菌圈。

结果与讨论

(一) 聚乙二醇分子量及浓度对原生质体融合的影响

在各种分子量的PEG中, 本文选用了1000, 4000和6000, 比较它们的融合效果, 以分子量6000的效果最好。

PEG的浓度也是影响融合频率的重要因素, 实验表明, 无论是PEG 4000还是PEG 6000, 都是42%浓度最佳, 以42%PEG 6000获得最高融合频率 4.39×10^{-3} 。

(二) 原生质体融合过程的电镜观察

经42%PEG 6000融合处理后的原生质体悬液在电镜下可以观察到融合现象(图版I)。

(三) 融合子的检出及遗传性状分析

N₁ sp. 48 (Str^r Rif^r) 和 N₁ sp. 189 (Str^r Rif^r) 原生质体融合后, 融合子为抗性互补的双耐药菌株 (Str^r Rif^r)。本实验最初采用通常的直接法(即将融合后的原生质体直接涂于双药再生培养基上)未得到融合子。后改用下法, 将融合

后的原生质体先涂不含药的再生培养基，分别生长0h、24h、48h，覆盖5ml含药的上层软琼脂培养基，使抗生素终浓度为150 γ /ml链霉素+100 γ /ml利福平，继续培养。结果表明，只有当原生质体生长48h左右加入含药上层，才能长出抗性互补的融合子。对照实验在同样操作条件下进行，没有出现抗性互补的菌落。（注：对照实验之一为双亲原生质体混合后，不加PEG处理，涂平皿；对照实验之二为双亲原生质体分别直接涂平皿，以后操作同上）。

以上实验说明，双耐药融合子（Str^rRif^r）的检出，需有48h左右的表型延迟期。匈牙利学者Szvoboda在研究小单孢菌原生质体融合时也报道了表型延迟现象，时间需3—7天^[4]。

融合子为同时耐链霉素和利福平的双药菌株，经8次双药斜面传代（链霉素150 γ /ml+利福平100 γ /ml）菌株生长良好，抗性保持不变，说明融合子的耐药性状是稳定的。

选择性再生培养基上长出的融合子，形态各异，见图1。菌株的形态经三次传

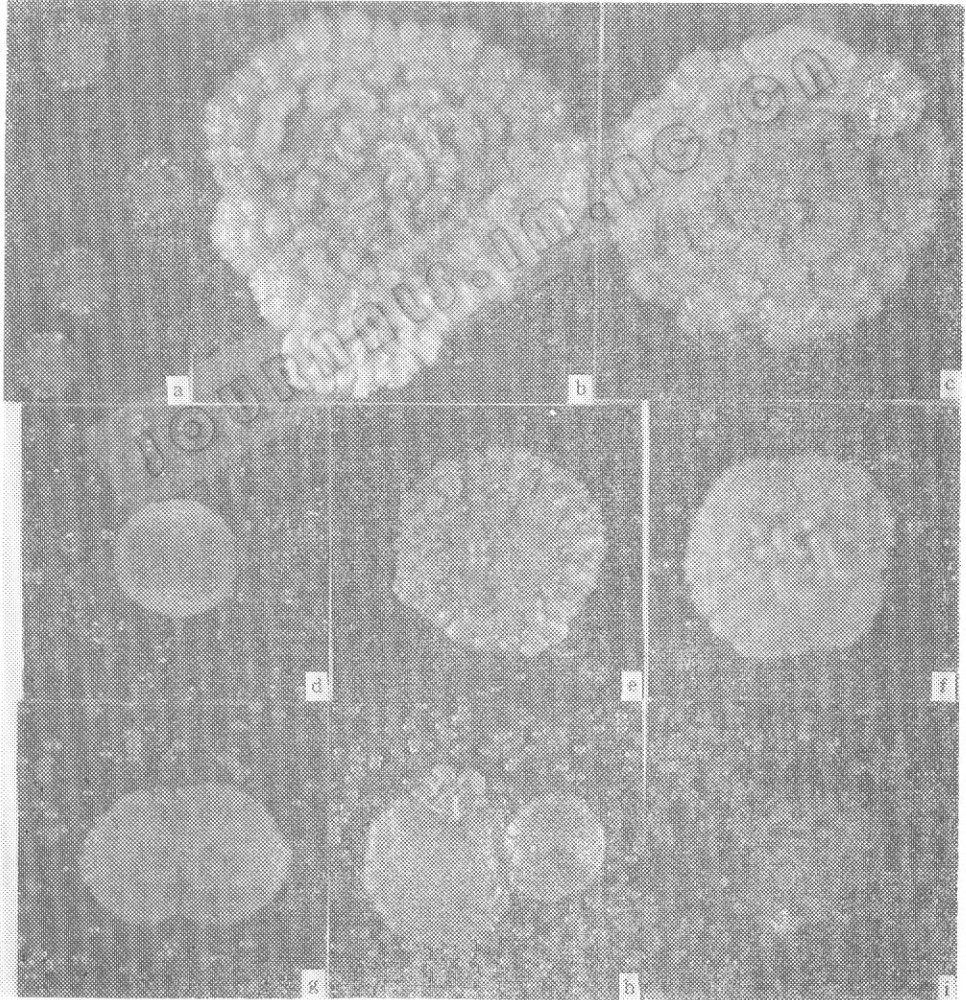


图1 亲本及融合子形态

Fig.1 The morphology of parents and fusants

a. 亲本菌落 Colony of parents; b—j. 融合子菌落 Colony of fusants

代, 稳定。实验表明, 融合子形态改变与其抗生特性、甾体转化能力之间没有直接联系。

(四) 融合子的发酵及甾体转化

诺卡氏菌sp.可以降解胆甾醇, 切除边链, 形成一系列降解产物, 加入适量的选择性酶抑制剂(如8-羟基喹啉), 可以得到累积的中间体ADD(雄甾-1, 4-二烯-3, 17-双酮), 它是制取甾体激素药物的重要化合物。

1. ADD 转化率的提高: 以胆甾醇作为底物投料, 经菌体转化, 用薄层层析和气相层析测定融合子及亲本的 ADD 克分子转化率。测定100个融合子的ADD转化情况, 大部分融合子 ADD 产量类似两亲本或介于两者之间, 有10%融合子产量高于N.sp.48, 其中11*融合子的提高幅度较大, 经气相色谱分析, ADD 克分子转化率为 24.9%, 比亲本 N.sp. 48 高 51.8% (表 1)。

表 1 亲本及融合子的ADD转化率测定
Table 1 The yield of ADD conversion estimated for parents and fusant

| 菌 株 Strains | ADD气相测定值 Value of estimation ADD by gas chromatograph (mg/ml) | ADD克分子转化率 Yield of ADD molar conversion (%) |
|--------------------|---|---|
| 亲本 Parent N.sp.48 | 1.2149 | 16.4 |
| 亲本 Parent N.sp.189 | 0.1172 | 1.58 |
| 融合子 Fusant 11* | 1.8438 | 24.9 |

融合子转化率提高的原因可能是原生质体融合引起了调节基因系统变化或甾体转化限速酶系得到活化, 使胆甾醇的降解能力得到提高。

另外, 我们的实验表明, *Nocardia* sp.如果仅经过原生质体形成、再生过程, 其 ADD 转化活力提高不明显, 所以认为 11*融合子活性的改变主要是融合重组的结果。

2. 产生亲本没有的甾体转化产物: 经分析发现有 4 株融合子产生了新的转化产物, 而亲本作对照时看不到此化合物。此外, 在我们许多次原生质形成和再生实验中也未观察到新转化产物产生。图 2 为薄层层析结果。进一步作气相色谱分析, 出现一个新的峰, 出峰时间为 17min 左右, 图 3 为气相图谱结果。

上述结果可能是原生质体融合重组激活或抑制了某一步甚至几步反应的酶活力, 使甾体降解过程中某一中间体得以积

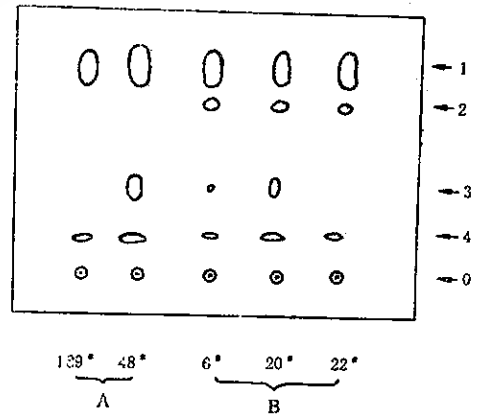


图 2 亲本及融合子的薄层层析结果
Fig.2 The thin-layen chromatograph of parents and fusants

A. 亲株 Parents B. 融合子 Fusants
O. 原点 Original spot 1. 胆甾-4-烯-3 酮
4-cholesten-trion 2. 新斑点 New spot
3. 雄甾1,4-二烯-3,17-双酮 (ADD)
1,4-androstadiene-3,17-dione
4. 3-氧-联降-胆甾-1,4-二烯-22 酸
3-oxibisnorchole-1,4-dien-22-oic acid

累。也可能是基因交换重组产生新的结构基因, 使甾体转化酶体系随之发生变化,

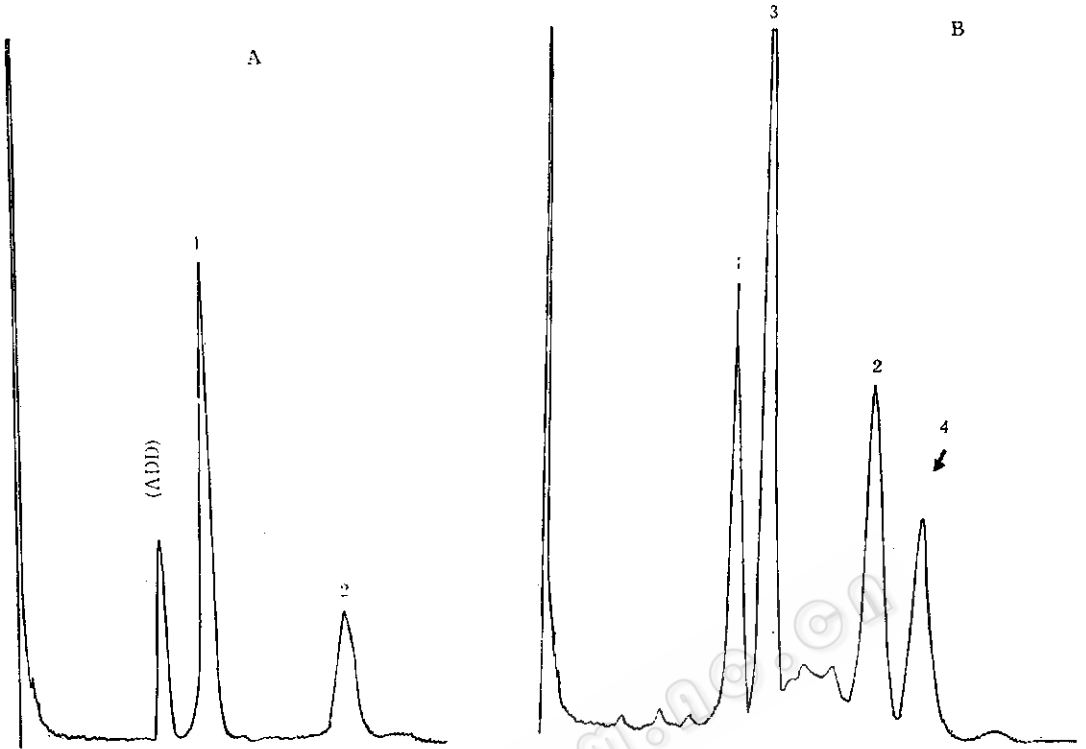


图 3 亲本及融合子的气相图谱

Fig. 3 The gas chromatograph of parent and fusant

A. 亲本 Parent *N. sp.* 48 B. 融合子 Fusant 6*

1. 内标物 Internal standard 2. 胆固醇-4-烯-3酮 4-cholesten-3-one
3. 胆固醇 Cholesterin 4. 新化合物 New compound

产生新的转化产物。

3. 产生亲本没有的抗生物质：本文所用的诺卡氏菌 *sp.* 为甾体转化菌，在通常降解胆固醇产生 ADD 的条件下未发现其有抗性活性。更改培养基成分，用发酵培养基对融合子及亲本的发酵产物进行抗菌活性测定。 G^+ 菌以枯草杆菌作代表， G^- 菌以大肠杆菌作代表。实验结果发现，融合子 18*、25* 具有抗枯草杆菌活性，融合子 8* 具有抗大肠杆菌的活性。亲本菌株 *N. sp.* 48、*N. sp.* 189 作对照同时实验，均未出现抑菌圈。因此，诺卡氏菌 *sp.* 除具有甾体转化活力外，可能还隐藏着产生抗生素的基因。两亲本经过原生质体融合后，诱发了这些原来为“沉默基

因”的表达，或者使某些酶得到修饰，次级代谢途径畅通，从而产生了亲本所没有的抗生物质。

本文研究结果说明，原生质体融合技术为实现基因重组提供了很大方便。它使遗传性状不同的两种细胞融合为一个新的细胞，两亲本的整套基因可以进行全面的或全方位的基因重组交换，使重组频率大大提高。通常出现两种情况：（1）重组子产量大幅度提高；（2）重组子具有新的遗传性状或产生新的代谢产物。我们通过甾体转化菌 *Nocardia sp.* 原生质体融合重组，同时得到了这两种结果，不仅获得了 ADD 转化率显著提高的融合子，且得到了产生亲本没有的抗生物质或甾体转化

产物的融合子, 显示了原生质体融合技术在遗传育种方面的优越性, 在目前基因克

隆技术尚未普及的情况下, 该技术仍将不断得到发展和广泛应用。

参 考 文 献

- [1] Okanishi, et al.: *J. General Microbiology*, 80:389, 1974.
 [2] 贺敏霞等: 上海医科大学学报, 16(3):194, 1989.
 [3] 程务本等: 上海医科大学学报, 14(5):385, 1987.
 [4] Szvoboda, G. et al.: *Proceedings of the 5th International Protoplast Symposium*, July 9-14, 1979.

STUDIES ON RECOMBINATION OF *NOCARDIA* SP. THROUGH PROTOPLAST FUSION

He Minxia Shi Jiping Chu Zhiyi

(Department of Biosynthetic Pharmaceutics, School of Pharmacy,
Shanghai Medical University, Shanghai)

This paper reports the result of recombination by protoplast fusion between *Nocardia* sp.48 (Str^r Rif^s) and *Nocardia* sp.189 (Str^s Rif^r). The maximum recombinant frequency reached 4.39×10^{-3} by treatment of 42% polyethylene glycol 6000. Fusants could grow only if Streptomycin and Rifampin were added to the regeneration medium after waiting the phenotypic lag. The processes of protoplast fusion was observed with electron microscope.

Besides a variety of colony shape, Four fusants produced a new intermediate compound of steroid transformation. Three fusants generated antibiotic substances, which their parents didn't produced. We also obtain a fusant whose steroid converting rate was obviously higher than its parants.

Key words

Protoplast fusion; recombination; *Nocardia*

图 版 说 明

原生质体融合电镜观察的形态

The morphology observed in electron microscope of protoplast fusion

1. 发生融合前 Before fusion (10000×2)
- 2.3. 发生融合、形似葫芦状 The occurrent fusion, gourd-shaped (15000×2)
4. 进一步融合为一个大的原生质球。凹痕迹如箭头所示 And fether fused into a large protoplast. The concave conjunction vestige is indicated as arrow (20000×3)

