

链霉菌原生质体种间融合——产抗生素的耐温型重组子的选育

齐海燕 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

以庆丰链霉菌 (*SM^r*, 42℃不能生长, 产庆丰霉素, 可抑制细菌生长) 与吸水链霉菌井冈变种 (*SM^s*, 42℃生长良好, 产井冈霉素, 不抑制细菌生长) 为亲株, 在42% PEG1000诱导下进行原生质体融合, 在含 *SM* 100μg/ml, 42℃ 培养的再生平板上直接选择耐温型融合子, 融合率为 10^{-5} — 10^{-4} 左右, 经分离传代后可得到稳定的耐温型的单倍体重组子, 即可在42℃生长, 并且有链霉素抗性和抑制细菌生长的活性。初步测定了四个重组子产生的抗菌物质的性质, 都与亲株产生的庆丰霉素、井冈霉素不同, 其中F1-38、F1-16和FM3-32三个重组子的抗生素在波长274nm处有一个紫外吸收小峰, 而重组子F6-6有二个活性部分, 其一在紫外线下呈荧光, 另一则具有酸碱指示剂特性。

关键词 原生质体融合; 链霉菌; 耐温型重组子

链霉菌原生质体融合技术是1977年Hopwood开始建立的^[1]。由于此技术操作简便, 重组频率高, 所以是一种很有效的遗传育种手段。现在人们已经利用它来改良菌株, 提高抗生素产量^[2-4], 而且能打破种属间界限, 在种属间产生重组子^[5-7], 并有可能产生新的抗生素^[8-10]。

在生产实际中, 一般链霉菌工业菌株的发酵温度较低(28℃左右), 温度升高则生长受阻, 产量大幅度下降; 所以人们往往希望能将生产菌株的发酵温度提高一些, 这样不仅能加快生长速度缩短发酵周期, 减少杂菌污染, 而且可以节约能源, 降低成本。但是生物的耐热性是很复杂的^[11-12], 人们至今不知道控制它的本质是什么, 而且也没有可以用诱变、转化或基因克隆等遗传手段, 使细菌的生活温度得以提高的确凿有力的证据。那么能否以现有生产菌株与耐温菌株作为亲本, 通过原生质体融合的方法, 来选育耐温型的重

组子? 我们认为原生质体融合是以二亲株细胞膜的融合为起点, 经细胞质的全完混合, 到基因组的交换重组, 所以在它的各种类型重组子中, 很有可能筛选出耐温型重组子, 从而组建具有耐高温性状的工业菌株。我们用生长适温28℃的工业菌株庆丰链霉菌与生长适温42℃的吸水链霉菌井冈变种进行原生质体融合, 以期获得较为耐温的, 并产生抗生素的重组子。

材料与方 法

(一) 菌株

庆丰链霉菌 (*Streptomyces qingfengmycetics*)M15S: 链霉素抗性(*SM^r*); 生长适温28℃, 39℃停止生长; 产庆丰霉素, 由本实验室保存。

吸水链霉菌井冈变种 (*Streptomyces hygroscopicus* var. *jinggangensis*)*75;

本文于1988年12月18日收到。

链霉素敏感(SM^r)；生长适温42℃，50℃停止生长；产井冈霉素，由上海市农药研究所赠送。

枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) AS1.140：庆丰霉素生物效价测定用的指示菌。

其他指示菌：金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)，八叠球菌(*S. lutea*)，大肠杆菌(*E. coli*)，白色念珠菌(*C. albicans*)，酵母(*S. sake*)，水稻纹枯病菌(*P. sasakii*)。

(二) 培养基

斜面培养基和有机A液体培养基参考文献[13]；原生质体稳定液P参考文献[14]；再生培养基用斜面培养基补充蔗糖至0.3mol/L；抗生素发酵培养基参考文献[15]。

(三) 原生质体的制备、再生和融合重组

方法参考文献[16]，经溶菌酶处理后得到的二亲株原生质体，用42%PEG1000(w/v)促融。

(四) 重组子的检出

将经PEG处理后的融合物，取0.1ml涂于再生培养基平板上，37℃过夜，然后在表面铺加含链霉素的再生培养基软琼脂(含琼脂0.5%)5ml，使链霉素的最终浓度达100μg/ml，凝固后置42℃培养14天左右，长出的菌落应为链霉素抗性、42℃生长的融合子。同时，将未经融合的二亲株原生质体分别置于同样条件下培养作为对照。

$$\text{融合频率} = \frac{\text{融合子数}}{\text{二亲株原生质体再生菌落数}}$$

(五) 稳定的单倍体重组子的获得

将再生平板上长出的融合子菌落逐个挑在不含药的斜面培养基上，42℃培养3天，孢子在生理盐水中分散成悬液，稀释法分离单菌，然后检验这些单菌的链霉素

抗性，抑制枯草杆菌 AS 1.140 生长的活性和在高温42℃生长的能力。凡具有在42℃生长良好的能力并带有链霉素抗性或抑制枯草杆菌生长活性的单菌，并经数次传代保持不变者，即为稳定的单倍体重组子。

(六) 重组子代谢产物的初步提纯

发酵液在硅胶G薄板上点样，层析展开后，以枯草杆菌AS1.140为指示菌进行生物显影，确定有生物活性的部位，然后在同时展层的薄板上括取相应位置的硅胶，加水抽提，离心去硅胶，再用0.45μm微孔的纤维素酯滤膜过滤上清液以除去硅胶微粒，滤液减压浓缩，即为粗提样品。

结果与讨论

(一) 原生质体种间融合

本实验的目的是希望将28℃发酵产生抗生素的链霉菌，与能在较高温度生长的链霉菌原生质体融合，在融合子中筛选耐温型重组子。我们选用庆丰霉素产生菌庆丰链霉菌 M15S 菌株 (SM^r)，发酵温度28℃，39℃停止生长和吸水链霉菌井冈变种*75菌株 (SM^r)，发酵温度42℃，50℃停止生长，作为亲株，以42%PEG1000诱导原生质体融合，融合液涂布在含SM的再生平板上，置42℃培养数天后，可见有菌落生长。这些菌落具有对SM的抗性和能在42℃生长的特性，它们是二亲株经融合后产生的种间融合子，融合频率在 4.26×10^{-5} — 2.04×10^{-4} ，由于对照平板上没有菌落长出，因此在融合平板上出现的这些菌落，不是自发突变体，也不是原生质体制备-再生过程中导致的变异体，而确实是具有链霉素抗性和高温生长特性的融合子(表1)。测定了在42℃生长的10个融合子对枯草杆菌 AS1.140 生长的

抑制力, 8 个具有抑菌活力。

表 1 *75和M15S的种间原生质体融合
Table 1 Interspecific protoplast fusion of
*75×M15S

| 亲株原生质体总数 Total number of parent proto- plast (ml ⁻¹) | 融合子数 Number of fusants (ml ⁻¹) | 融合频率 Fusion frequency |
|---|---|-----------------------------|
| 2.5×10 ⁶ | 5.1×10 ² | 2.04×10 ⁻⁴ |
| 9.4×10 ⁶ | 4.0×10 ² | 4.26×10 ⁻⁵ |

(二) 融合子分离分析

Hopwood认为^[17], 由于原生质体融合过程中多种方式的基因交换, 使得再生平板上长出的单一菌落的孢子群间并非遗传均一, 常包含不同的基因型; 此外, 再生平板上长出的菌落也常混有异核体, 传代后则分离为两亲株的基因型。因此, 对

再生平板上长出的融合子需经单菌分离、分析后, 才能得到稳定的单倍体重组子。

1. 融合子子代高温生长的能力: 将上述10个融合子挑入斜面在42℃培养, 然后分离单菌, 42℃继续培养。结果表明, 所有单菌生长良好, 一般只需3天左右就长得孢子丰满, 这些单菌经影印法连续传代5次以后, 仍能在42℃良好生长; 并且经28℃培养传代数次后, 还能在42℃良好生长。这说明这些单菌在42℃生长的特性是非常稳定的。检测了一些单菌的生长上限温度, 发现大部分与*75亲株相似, 在50℃左右就停止生长, 但个别单菌的上限温度甚至超过了*75亲株, 如F1-38在53℃停止生长, F6-6在63℃方才停止生长, 57℃时仍生长旺盛(表2)。

表 2 亲株和一些重组子的最高生长温度

Table 2 The maximum growth temperature of the two parents and some recombinants

| 菌 株 Strains | *75 | M15S | F1-16 | F1-38 | F4-6 | F5-24 | F6-6 | FM2-4 | FM3-32 |
|--|-----|------|-------|-------|------|-------|------|-------|--------|
| 最高生长温度 The maximum growth temperature (°C) | 50 | 39 | 50 | 53 | 47 | 50 | 63 | 50 | 50 |

2. 融合子子代的抑菌活性: 将前述融合子分成的单菌, 每个融合子挑取一定数量的菌落接种在琼脂块上, 分别在28℃、37℃和42℃培养后, 测定它们的抑菌活性, 结果见表3, 说明融合子子代抑制细菌的能力也发生了分离现象, 如融合子1在28℃只有82.5%的单菌有抑菌活力; 并且随着温度的上升, 有抑菌活力的单菌减少了。但对一个单菌来说, 有的单菌在28℃有抑菌活力, 到42℃就丧失了; 有的单菌则相反, 只在42℃培养才有抑菌活力, 28℃培养的反而没有; 也有的单菌无论是在28℃还是在42℃培养, 都具有抑菌活力。这表明在融合过程中基因重组的多样性。测定了一些单菌抑细菌能力的稳定性, 有

些单菌如F8-25等几次传代后, 就失去抑菌活性, 很不稳定; 有些菌株如F1-16、F1-38、FM3-32和F6-6等, 经多次传代抑菌能力仍很稳定。

3. 融合子链霉素抗性的分离: 将融合子的单菌用影印法测定它们对链霉素的抗性, 结果列于表4, 表明融合子的孢子群中发生了链霉素抗性的分离。有的融合子子代仍有抗性, 如融合子1等, 但抗性水平却有不同的变化, 可能是由于基因组的交换和重组影响了抗性基因的表达水平; 有的融合子经分离后全部或部分子代失去了对链霉素的抗性, 前者如融合子7, 说明它只不过是个异核体, 传代分离成两亲株型; 后者如融合子6等, 推测它们可能

表 3 融合子抑制 AS1.140 活性的分离
Table 3 Segregation of anti-AS1.140 activity of fusants

| 融合子 Fusants | 单菌中抑制 AS1.140 的比例 Proportion of anti-AS1.140 in single colonies (%) | | |
|----------------|---|------|------|
| | 28°C | 37°C | 42°C |
| | 1 | 82.5 | 50.0 |
| 3 | 36.4 | NT | 27.3 |
| 4 | 31.7 | NT | 22.2 |
| 5 | 31.3 | 17.8 | 10.9 |
| 6 | 40.0 | 39.7 | 36.7 |
| 8 | 59.9 | 49.1 | 48.4 |
| M1 | 3.3 | 0 | 0 |
| M2 | 66.7 | 30.3 | 20.0 |
| M3 | 83.5 | NT | 60.0 |

NT: 未试验 Not test

是一种不稳定的局部杂合二倍体或局部结合子 (merozygote), 在单倍化过程中发生了部分交换。对一些抗性菌落, 经过 45 次传代仍表现为抗性稳定。

这样, 我们通过原生质体种间融合, 得到了稳定的, 可在高温生长的, 并具有抗菌能力的种间重组子。这些种间重组子, 如 F1-16 F1-38 等菌株, 无论是在 28°C、37°C 或 42°C 生长都产生抑菌物质, FM3-27 则只在 42°C 培养时才具有抑菌活性。

(三) 几个耐温型重组子抗生素的性质

表 4 融合子链霉素抗性的分离
Table 4 Segregation of streptomycin resistance of fusants

| 融合子 Fusants (cultured at 42°C) | 单菌落抗链霉素不同水平的比例 Proportion of SM ^r level in single colonies (%) | | | | |
|--------------------------------------|--|---------|---------|---------|----------|
| | 0µg/ml | 15µg/ml | 25µg/ml | 40µg/ml | 100µg/ml |
| 1 | 100 | 100 | 82 | 80 | 2 |
| 3 | 100 | 100 | NT | NT | 2 |
| 4 | 100 | 100 | 100 | 25 | 0 |
| 5 | 100 | 6.2 | 2.7 | 1.7 | 0 |
| 6 | 100 | 35 | 5 | 0 | 0 |
| 7 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 100 | 35 | 6 | 0 | 0 |
| M1 | 100 | 45 | 4.5 | 3 | 0 |
| M2 | 100 | 100 | 87 | 30 | 5 |
| M3 | 100 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| 亲 株 Parents | | | | | |
| *75 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| M15S ^a | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

NT 未试验 Not test

a. 37°C 培养 Cultured at 37°C

将 4 个具有抑菌活性的耐温型重组子 F1-16、F1-38、FM3-32 和 F6-6 接种于庆丰霉素发酵培养基中, 37°C 摇瓶发酵, 发酵液用适用于庆丰霉素和井冈霉素提取的强酸性离子交换树脂 732 或 Dowex-50 进行

交换, 结果都不成功。这说明重组子产生的抗生素有某些不同于亲株的特性。用高压纸电泳和 Доскочилова 的 8 个溶剂系统进行纸层析^[18], 初步检测抗生素的酸碱性和溶解性。由图 1 和图 2 的结果可见,

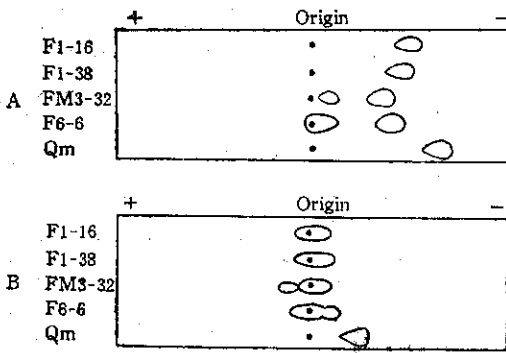


图1 抗生素的纸电泳图谱

Fig. 1 Paper electrophoretogram of antibiotics
 Voltage: 700V
 Medium: A. acetate buffer (0.05mol/L, pH3.6)
 B. boric acid buffer (0.05mol/L, pH8.6)
 Biography Indicator: *B. subtilis* AS1.140

F1-16、F1-38和FM3-32的抗生素和两亲株的抗生素一样，为碱性水溶性抗生素。F6-6的抗生素则与亲株很不相同，活性有二部分：一部分具酸碱指示剂特性，即遇酸变红、在酸性条件下溶于丁正醇等有机溶剂，遇碱变蓝，并从有机相分出而进入水相，推测可能为大环内酯类或其他大

分子有机化合物抗生素^[18]，另一部分在紫外线下呈蓝色荧光，但在0.1mol/L HCl中的紫外吸收图谱呈末端吸收(图3)。F1-16、F1-38和FM3-32的抗生素在274nm处有一个小的吸收峰，274nm的吸收峰是庆丰霉素的特征吸收峰，因为庆丰霉素分子内有胞嘧啶的结构，推测F1-16、F1-38和FM3-32的抗生素虽然和庆丰霉素的性质不尽相同，但可能在它们的分子中有类似胞嘧啶核苷的结构。它们的峰位低可能与抗生素含量低有关。表5的结果表明，这4个重组子产生的抗生素均为广谱抗生素，而FM3-32的抗生素的抗菌范围则和庆丰霉素相同。

以上的结果证明，用原生质体融合的方法获得的部分单倍体重组子，不仅能在42℃或更高的温度生活，且能在较高的温度发酵产生抗生素，这为将低温型工业生产菌株改良为耐高温型，提供一点参考。

从几个耐高温型重组子中，我们没有探测到庆丰霉素的产生菌，但却有一些菌株产生性质各不相同的抗菌物质，这是二亲

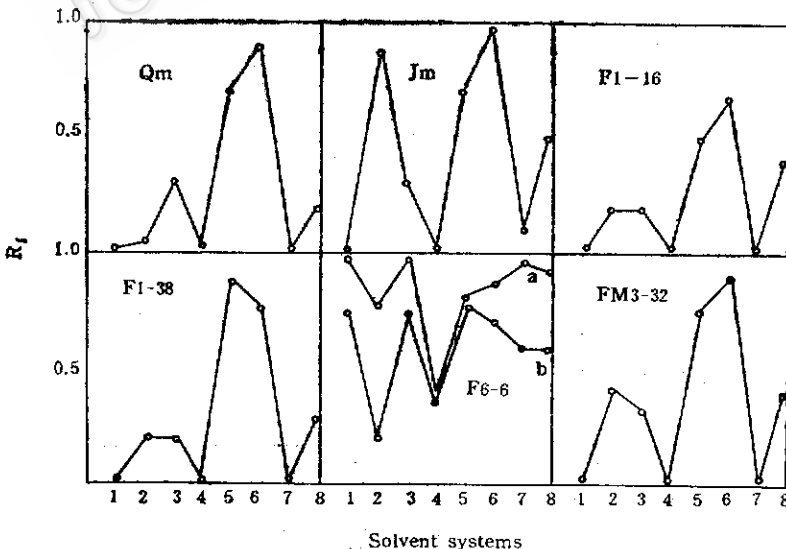


图2 抗生素的纸层析图谱

Fig. 2 Paper chromatogram of antibiotics
 Qm: 庆丰霉素 Qingfengmycin; Jm: 井冈霉素 Jinggangmycin

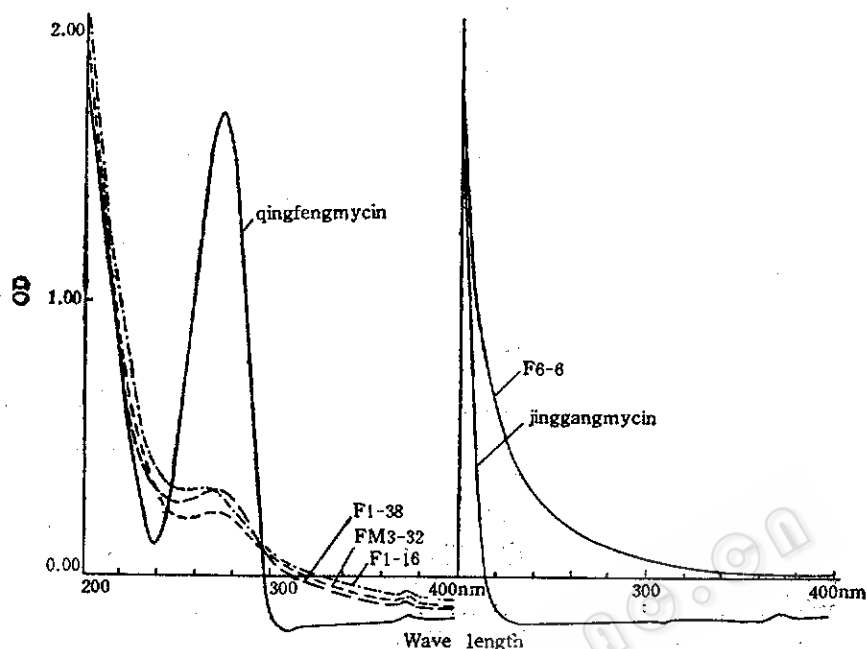


图3 抗生素在 0.1mol/L HCl 中的紫外吸收谱
Fig. 3 UV spectrum of antibiotics in 0.1mol/L HCl

表5 亲株和重组子的抗菌谱
Table 5 Antimicrobial spectrum of parents and recombinants

| 试验菌株 Test strains | F1-16 | F1-38 | FM3-32 | F6-6 | Qm | Jm |
|-----------------------------|-------|-------|--------|------|----|----|
| 枯草杆菌 <i>B. subtilis</i> | + | + | + | + | + | - |
| 金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> | + | + | + | + | + | - |
| 八叠球菌 <i>S. lutea</i> | + | + | + | + | + | - |
| 大肠杆菌 <i>E. coli</i> | + | + | + | - | + | - |
| 水稻纹枯病菌 <i>P. sasakii</i> | + | + | + | - | + | + |
| 白色念珠菌 <i>C. albicans</i> | - | - | + | + | + | - |
| 酵母 <i>S. sake</i> | + | - | + | + | + | - |

“+” 有作用 Action; “-” 无作用 No Action

株基因组通过遗传重组的必然结果; 我们还来不及鉴定这些抗生素所有的实际应用价值, 但其中如 F6-6 这样的菌株, 吸引

我们对它的产物作进一步探索的兴趣。

(四) 重组子的分类和命名

对重组子的分类, 现在还没有确定的

准则,一般只是给它一个编号,以此识别而已。我们观察了本文的几株耐温种间重组子的培养特征,按照 Waksman、Красильницков、Гоузе 及阎逊初等对放线菌分类系统作为基本准则,根据它们的形态特征与培养特征(结果从略),对它们的分类学地位作了初步的探讨。

F1-16、F1-38和FM3-32菌株,虽然它们的孢子、气生菌丝的形态和基丝颜色及可溶性色素发生了一些变化,常常并有亲株的特征而介于中间地位;但在一些固体培养基上生长时,它们的孢子丝自溶,产生明显的吸水斑,这个重要特征表明它们

继承了亲株*75的吸水特征,是吸水链霉菌和庆丰链霉菌的后代,应属于吸水链霉菌,因此被命名为吸水链霉菌并-庆融合变种(*Streptomyces hygrosopicus* var. *jing-qingfusegensis*)。

F6-6菌株,虽然它的孢子形态椭圆,表面光滑,类似于亲株*75,但它却有灰色孢子堆,产生抗细菌抗生素,基内菌丝浅黄色,应属于金色链霉菌类群,是庆丰链霉菌的后代,应属于庆丰链霉菌,因此被命名为庆丰链霉菌庆-并融合变种(*Streptomyces qingfengmyceticus* var. *qing-jingfusegensis*)。

参 考 文 献

- [1] Hopwood, D. A. et al.: *Nature*, 268: 171, 1977.
- [2] Ikeda, H. et al.: *J. Antibiot.*, 36: 283, 1983.
- [3] Valin, C. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 8(5): 343, 1985.
- [4] Seiya, O. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 31(2): 187, 1985.
- [5] Ikeda, H. et al.: *J. Antibiot.*, 37: 1224, 1984.
- [6] 郑幼霞等: *生物工程学报*, 1(3): 32, 1985.
- [7] 朱建伟等: *医药工业*, 18(3): 108, 1987.
- [8] Yamashita, F. et al.: *J. Antibiot.*, 38: 58, 1985.
- [9] Hotta, K. et al.: *J. Antibiot.*, 38: 64, 1985.
- [10] Gomi, S. et al.: *J. Antibiot.*, 37: 1491, 1984.
- [11] 大岛泰郎著: *好热性细菌*, 日本东京大学出版社, 东京, p. 62, 1978.
- [12] Oshima, M. et al.: *Biochemistry of Thermophily*, Edited by Friedman, S.M., Academic Press, INC, New York, p. 233, 1978.
- [13] 郑幼霞等: *遗传学报*, 7(2): 111, 1980.
- [14] Hopwood, D.A. et al.: *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*, The John Innes Foundation, Norwich, p245, 1985.
- [15] 上海植物生理所微生物室农抗组: *微生物学报*, 15(2): 101, 1975.
- [16] 郑幼霞等: *遗传学报*, 9(3): 172, 1982.
- [17] Hopwood, D. A. et al.: *MGG.*, 162: 307, 1978.
- [18] 张 瑞等: *全国第三次抗菌素会议论文集(第一集)*, 寇村, 张为申主编, 科学出版社, 北京, p. 264, 1965.

INTERSPECIFIC PROTOPLAST FUSION IN *STREPTOMYCES* —SELECTION OF THERMOTOLERANT ANTIBIOTIC— PRODUCING RECOMBINANT

Qi Haiyan Zheng Youxia

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

The thermotolerant fusants were obtained after interspecific protoplast fusion between *S. qingfengmyceticus* M15S (SM^r stopping growth at 39°C, producing qingfengmycin with wide antimicrobial spectrum) and *S. hygroscopicus* var. *jinggangensis* *75 (SM^r, growth-well at 42°C, producing jinggangmycin of antifungus) by directly selecting from the regeneration plates containing SM 100µg/ml and incubated at 42°C. The fusion frequency was about 10⁻⁵ - 10⁻⁴. The stable thermotolerant recombinants with antimicrobial activity were obtained. The properties of their products were quite different from that of parents (Qm, Jm). The antimicrobial substance produced by recombinant F6-6 consists of two parts: one has acid-alkalin indicator property; the other is fluorescent under UV light. The products of F1-16, F1-38 and FM3-32 with antimicrobial activity show a peak at 274nm wave length; it suggests that there may be a cytosine moiety in their molecules.

Key words

Protoplast fusion; thermotolerant; *Streptomyces*