

# 天然无抗菌活性链霉菌种间原生质体 融合与活性重组体的分离

林荣团 杨毓芬 李焕娄

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京)

天然无抗菌活性的变青链霉菌1326与链霉菌1254的营养缺陷型变株进行种间原生质体融合, 获得了原亲型融合体, 频率为  $10^{-6}$ — $10^{-5}$ 。融合前双亲株原生质体经  $52^{\circ}\text{C}$  水浴处理 4min, 融合频率有所提高, 约有一半的融合体菌株在琼脂平板上培养后显示有不同程度的抗菌活性, 但绝大多数皆不稳定。从755株融合体中筛选到5株抗菌活性较稳定的菌株, 并对其中三株所产生的抗生素作了初步鉴别。发现一株产生中性脂溶性抗生素, 其余两株所产生的抗生素皆为碱性非典型脂溶性物质。尽管此等产物的理化性质还有待进一步鉴别, 从中发现新化合物的几率是否大于传统的筛选途径, 也还需要更多的筛选实践才能说明, 但为了进一步开发利用微生物资源, 这一途径似值得探讨。

**关键词** 链霉菌; 抗生素; 原生质体融合

Hopwood等推测, 在链霉菌中可能存在着大量的没有表现遗传功能的沉默基因(silent gene), 如果能使这些沉默基因得到表达, 这类微生物就有可能合成更多的次级代谢产物<sup>[1]</sup>。Mortlock则认为微生物新的代谢途径的建立是由于沉默基因的活化<sup>[2]</sup>。近年来有些研究表明, 突变<sup>[2]</sup>、外源DNA片段的克隆<sup>[3,4]</sup>以及种内或种间的杂交<sup>[5,6]</sup>都可能使某些链霉菌产生其原来不能产生的物质, 并认为可能是沉默基因活化的结果。但文献中细胞杂交或融合产生新抗生物质的实验, 所采用的亲本菌株皆是不同抗生素产生菌或其阻断变株。为了便于说明沉默基因活化的可能性, 并探索是否可能利用天然无活性的链霉菌作为新抗生素筛选的来源, 我们选用了两种天然无抗菌活性的链霉菌进行了种间原生质体融合, 并对其重组体菌株所产生的抗生素进行了初步鉴别。

## 材料与 方法

### (一) 菌株

变青链霉菌(*Streptomyces lividans*) 1326由D.A.Hopwood教授赠送, 其变株A<sub>0</sub>为精氨酸营养缺陷型(Arg<sup>-</sup>)。链霉菌1254为本所抗生素室分自土壤样品, 经该室张月琴同志鉴定, 确定为链霉菌与变青链霉菌1326不属于同一个种, 其种的归属待定(未发表资料)。链霉菌1254的变株为I<sub>2</sub>(Met-Thr<sup>-</sup>)和I<sub>15</sub>(Ade<sup>-</sup>)。这两株链霉菌及其缺陷型变株用多种培养基发酵皆未发现抗菌活性。

### (二) 培养基

1. 全完培养基: 伊莫松琼脂<sup>[7]</sup>。
2. 基本培养基: 甘油察氏琼脂<sup>[7]</sup>。

本文于1988年10月4日收到。

3. 高渗培养基：高渗完全培养基与高渗基本培养基系分别在伊莫松琼脂及甘油察氏琼脂中加入  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.37%， $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.51%，蔗糖12.5%。

4. 原生质体高渗缓冲液（%）：三羟甲基氨基甲烷0.31， $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.37， $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.20，蔗糖10，葡萄糖1，pH7.6。

5. 黄豆饼粉发酵培养基（%）：黄豆饼粉2.5，淀粉2，葡萄糖0.5，蛋白胨0.1，NaCl 0.3， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0007， $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0008， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0001， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0002，pH7.0。

6. 玉米浆发酵培养基（%）：玉米浆1，葡萄糖1.5，淀粉1， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.35，NaCl 0.5， $\text{CaCO}_3$  0.5，pH7.0。

### （三）原生质体制备、再生和融合

采用 Hopwood 等的方法<sup>[8]</sup>。原养型融合体的检出采用直接选择法<sup>[9]</sup>。

### （四）原生质体热处理

原生质体悬浮于原生质体高渗缓冲液中，在52℃恒温水浴中处理4min。

### （五）产生抗生素融合体的筛选

将融合体点种于黄豆饼粉及玉米浆二种发酵培养基（各加琼脂2%）平板上，28℃培养7—8天，将菌落连同培养基挖下，以枯草芽孢杆菌为检定菌测定抗菌活性。固体发酵有活性的菌株经纯化后进行液体发酵。

### （六）抗生素的初步鉴别

发酵液离心，上清液用正丁醇提取或X-5大孔树脂吸附后再经80%丙酮洗脱。粗提液进行8个溶媒系统<sup>[7]</sup>纸层析、高压电泳（3000V，30min）和抗菌谱测定。

### （七）重组体形态及培养特征观察

形态和培养特征观察采用 Shirling 等推荐的国际链霉菌规划培养基和方法<sup>[10]</sup>。光学显微镜下形态观察采用埋片

法、电镜样品制备用直接贴印法<sup>[7]</sup>。

## 结 果

### （一）种间原生质体融合

链霉菌1254与变青链霉菌1326的不同营养缺陷型变株间进行原生质体融合，都获得了原养型融合体，频率为 $10^{-6}$ — $10^{-5}$ （表1）。

### （二）短时间热处理对种间融合频率的影响

为了暂时抑制限制性核酸内切酶的作用<sup>[11]</sup>，提高种间原生质体融合频率，在融合前对双亲株的原生质体进行短时间热处理。经热处理后可使融合频率提高到4—32倍（表1）。

表1 链霉菌1254与变青链霉菌1326变株的种间原生质体融合

Table 1 Interspecific protoplast fusion between mutants of *Streptomyces* sp.1254 and *Str. lividans* 1326

融合亲本 Parental strain	回复突变率 Reversion frequency	融合频率 Fusion frequency	
		不处理 Non-treated	处理 52℃ 4min
$A_6 \times I_{15}$	$1.3 \times 10^{-8}$ $< 10^{-8}$	$1.2 \times 10^{-5}$	$4.9 \times 10^{-5}$
$A_6 \times I_2$	$4.8 \times 10^{-8}$ $< 10^{-8}$	$4.0 \times 10^{-6}$	$1.3 \times 10^{-4}$

三次实验结果的平均值

Values given are the averages of three experiments

### （三）种间融合体遗传稳定性测定

从不经热处理或经热处理的  $A_6 \times I_2$  的融合体中各随机挑选7个原养型融合体进行遗传分离试验，结果表明热处理或不经热处理对种间融合体的遗传稳定性影响不大。在所分析的14个菌落中，有7个菌株原养型性状稳定，可能是单倍重组体；另外7个融合体经分离后既有原养型菌落，也分离出二亲株类型的营养缺陷型菌落，可能是不稳定的杂合二倍体或杂合系

表 2 原养型融合体的遗传分离  
Table 2 Genetic segregation of prototrophic fusants

融合体编号 Fusant No.	测定菌落总数 Total number of colonies detected	原养型 Prototroph		A <sub>6</sub> 型 (Arg <sup>-</sup> ) A <sub>6</sub> Phenotype		I <sub>2</sub> 型 (Met <sup>-</sup> Thr <sup>-</sup> ) I <sub>2</sub> phenotype	
		菌落数 Number of colony	%	菌落数 Number of colony	%	菌落数 Number of colony	%
1	93	93		0		0	
2	93	20	21.5	31	33.3	42	45.2
3	93	92	98.9	1	1.1	0	
4	90	84	93.3	6	6.7	0	
5	90	90		0		0	
6	90	57	63.3	0		33	36.7
7	90	90		0		0	
H1*	100	62	62	38	38	0	
H2*	93	3	3.2	66	71.0	24	25.8
H3*	90	65	72.2	25	27.8	0	
H4*	60	60		0		0	
H5*	60	60		0		0	
H6*	90	90		0		0	
H7*	90	90		0		0	

\*: 来自热处理融合体

Fusants isolated from heat-pretreated fusion

(表 2)。

#### (四) 产生抗生素的种间融合体的筛选

对 775 株种间融合体进行固体发酵, 有 366 株融合体对枯草芽孢杆菌 63501 有不同程度的抗菌活性, 但绝大部分融合体产生抗生素的能力不稳定, 随着传代次数的增加产生抗生素的能力逐渐消失。经过多次传代平板单菌落分离后进行液体发酵, 只获得了 5 株产生抗生素性状较稳定的原养型重组体。而从 240 株 A<sub>6</sub>, 180 株 I<sub>2</sub> 和 150 株 I<sub>15</sub> 的原生质体再生菌落中都没有发现有抗菌活性的菌株。

#### (五) 重组体产生的抗生素的初步鉴别

在 5 株产生抗生素性状稳定的原养型重组体中, 对其中三株 (F<sub>15</sub>, F<sub>79</sub> 和 F<sub>301</sub>) 的产物进行了初步鉴别。采用二级发酵法, F<sub>15</sub> 用黄豆饼粉培养基, F<sub>79</sub> 和 F<sub>301</sub> 用玉米浆培养基为种子和发酵培养

基。三株重组体发酵液粗提物对枯草芽孢杆菌 63501, 金黄色葡萄球菌 209P 和志贺氏痢疾杆菌 302 都有抗菌活性。其纸层图谱, 高压电泳及抗菌活性的比较 (表 3) 表明, 重组体 F<sub>15</sub> 产生的抗生素与重组体 F<sub>79</sub> 和 F<sub>301</sub> 的产物不同; 而 F<sub>79</sub> 和 F<sub>301</sub> 产生的抗生物质则很相似。

#### (六) 重组体的形态与培养特征

重组体 F<sub>15</sub> 的孢子丝, 孢子形态和培养特征 (结果未列出) 皆与链霉菌 1254 相似。重组体 F<sub>79</sub> 和 F<sub>301</sub> 则与变青链霉菌相近, 但在甘油察氏琼脂上不产生蓝色色素 (表 3)。重组体 F<sub>79</sub> 孢子表面为瘤状 (图 1) 而 F<sub>301</sub> 和变青链霉菌 1326 孢子表面却是光滑的 (图 2)。

## 讨 论

天然无抗菌活性的链霉菌间进行种间原生质体融合获得能产生抗生素的重组体

表 3 重组体与亲株的比较

Table 3 Comparison of recombinants and parental strains

菌株 Strain 项目 Item	变青链霉菌 1326 <i>Streptomyces lividans</i> 1326	链霉菌 1254 <i>Streptomyces</i> sp. 1254	重组体 Recombinants		
			F15	F79	F301
抗菌活性 Antimicrobial activity, <i>Proteus vulgaris</i> OX19 <i>Paecilomyces</i> sp. PV2	- -	-	+ -	- +	- +
抗生素类型 Type of antibiotics			中性脂溶性 Fat-soluble neutral	碱性脂溶性 Fat-soluble basic	碱性脂溶性 Fat-soluble basic
孢子丝形态 Sporophore	螺旋 Spiral	直 Straight	直 Straight	螺旋 Spiral	螺旋 Spiral
孢子表面结构 Surface of spore	光滑 Smooth	光滑 Smooth	光滑 Smooth	瘤状 Warty	光滑 Smooth
可溶性色素* Soluble pigment	蓝 Blue	无 None	无 None	无 None	无 None basic

\* 在甘油察氏琼脂上

Growth on Czapek agar plate

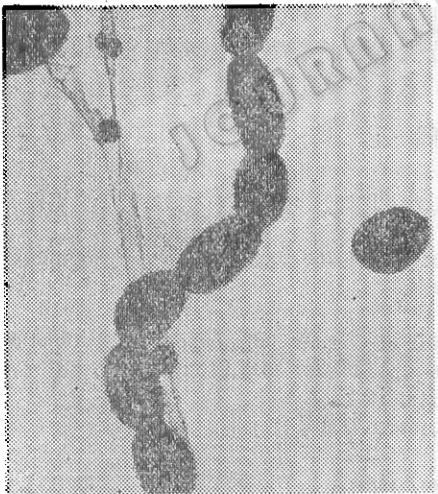


图 1 重组体F79的孢子

Fig 1 Spores of recombinant F79 (×10400)

还未见有文献报道。我们以天然无抗菌活性的变青链霉菌1326和链霉菌1254为亲株进行种间原生质体融合,获得了有抗菌活性的原养型重组体。初步实验结果表明,来自同一对亲株的不同重组体产生的

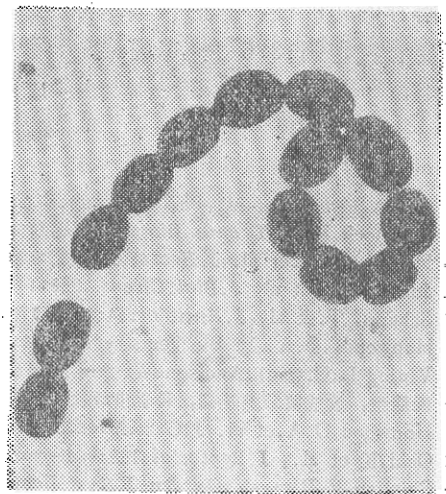


图 2 变青链霉菌1326的孢子

Fig 2 Spores of *Str. lividans* 1326 (×10400)

抗生素其理化性质可能有明显的差别。尽管由于这些抗生素的理化性质和化学结构尚未进行深入研究而难于说明这种方法获得的新化合物的几率比常规筛选是否要大一些,但天然无抗菌活性链霉菌种间原生

质体融合可以获得有抗菌活性的重组体,这一现象如有一定的普遍意义,将有助于扩大微生物这一重要的天然药物资源。因此,我们认为这是一个值得进一步研究的新途径。

各个亲株原生质体再生的菌落中从未测出抗菌活性。在融合实验中分离得到的菌株,大多数无抗菌活性,有抗菌活性者多不稳定,随着传代次数的增加而逐渐消失,只有少数菌株经多次传代和平板单菌落分离后可以稳定下来。这些现象表明,这些菌株产生抗生素的能力可能是在种间原生质体融合后形成的。其形成的机制有两种可能的解释:一是二亲株皆具有此种抗生素的合成途径,但缺少不同酶的活性,二亲株细胞融合后所缺失的酶得以互补而获得了合成此抗生素的能力;另一种解释是原生质体融合使原来未表达的某些酶基因(沉默基因)被活化。为了考查前一种解释的可能性,我们将二亲株的原株(即变青链霉菌1326与链霉菌1254)及其

缺陷型变株(即变株A<sub>0</sub>与变株I<sub>2</sub>, I<sub>15</sub>)分别在黄豆饼粉固体培养基上进行了共合成实验,经28℃10天培养后,以枯草杆菌为检定菌,测定结果为阴性(具体资料未列出),初步说明重组体菌株获得产生抗生素能力的机制可能不是二亲株缺失酶的互补而是由于沉默基因的活化。

链霉菌种间原生质体融合还有其局限性。首先是有些菌种间不能形成稳定的重组体,或融合频率很低。其主要原因之一是链霉菌中广泛存在着限制性核酸内切酶。但短时间热处理可暂时抑制热敏感的核酸内切酶活性,提高种间重组频率<sup>[11]</sup>在我们的实验中,热处理使种间融合率也有所提高。种间融合的另一问题是融合体的遗传不稳定性。从我们的实验结果看,产生抗生素的能力似乎比遗传标记更加不稳定。大部分融合体在传代中原养型性状稳定,抗菌活性却很容易消失。但通过大量筛选与多次传代分离还是有可能获得产生抗生素性状稳定的原养型重组体。

## 参 考 文 献

- [1] Hopwood, D.A. et al.; *Philos Trans. R. Soc. London Ser.*, B 290: 313—328, 1980.
- [2] Mortlock, R.P.; *Trends Biotechnol.*, 4: 65—88, 1986.
- [3] Horinouchi, S. et al.; *J. Bacteriol.*, 155: 1238—1248, 1983.
- [4] Jones, G.H. et al.; *J. Biol. Chem.*, 259: 14158—14164, 1984.
- [5] Schupp, T. et al.; *J. Antibiot.* 34: 965—970, 1981.
- [6] Hopwood, D.A.; In *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics*. Vining L.C. (Ed). Addison-Wesley Publishing, Company, pp. 1—23, 1983.
- [7] 阮继生; *放线菌分类基础*, 科学出版社, 北京, pp. 113—141, 1977.
- [8] Hopwood, D.A. et al.; *J. Gen. Microbiol.*, 126: 21—27, 1981.
- [9] Ochi, K. et al.; *J. Bacteriol.* 139: 984—992, 1979.
- [10] Shirling, E.B. et al.; *Intern. J. Syst. Bact.*, 16: 313—340, 1966.
- [11] Baltz, R.H. et al.; *Experientia Suppl.*, 46: 143—148, 1983.

# PROTOPLAST FUSION BETWEEN NATIVE ANTIBIOTIC- NONPRODUCING *STREPTOMYCES* SPECIES AND ISOLATION OF ACTIVE RECOMBINANTS

Lin Rongtuan Yang Yufen Li Huanlou

(*Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS, Beijing*)

Neither *Streptomyces lividans* 1326 nor *Streptomyces* sp.1254 produces any antimicrobial antibiotics naturally. Protoplast fusion was performed between these species, and the interspecific fusants arose at frequencies of  $10^{-6}$ — $10^{-5}$ . Heat treatment of both parental protoplasts at 52°C for 4 minutes prior to fusion enhanced the fusion frequency to 4—32 times. About 50% of the fusants were genetically unstable, giving the segregants of parent and recombinant types. When the fusants were cultivated on agar plate, about half of them were active against *Bacillus subtilis*, but the antimicrobial activity was unstable. From 775 fusants, only 5 stable antibiotic-producing recombinants were obtained. Preliminary identification of antibiotics synthesized by three of the recombinants showed that recombinant F<sub>15</sub> produced fat soluble neutral antibiotic. However, the antibiotics produced by F<sub>78</sub> and F<sub>301</sub> were fat soluble basic substances. These observations suggest that interspecific protoplast fusion might activate some silent genes of native antibiotic-nonproducing streptomycetes, causing the recombinants to produce antibiotics. Though the products remain to be identified further, this strategy seems to be worth exploring for screening of new antibiotics.

## Key words

*Streptomyces*; antibiotics; protoplast fusion