

应用原生质体融合技术定向改造林可霉素产生菌的探索

徐京宁 米贯东 唐孝宣

(华东化工学院, 上海)

金色链霉菌 *Streptomyces aureofaciens* (LM^r, CTC^r, 产金霉素) 的原生质体经 U.V. 照射 40min 灭活后, 与林可链霉菌林可变种 *Streptomyces lincolnensis* var *lincolnensis* (LM^r, CTC^r, 产林可霉素), 在 42% PEG (MW6000) 诱导下进行种间原生质体融合, 在含金霉素 50μg/ml 的再生平板上直接选择融合子, 融合率达 9.05×10^{-5} 。从大量融合体中筛选到 4 株产生抗菌物质不同于亲株并较稳定的菌株。对其中一株所产的抗生素作了初步鉴别, 推测其结构与林可霉素相近。另一株的薄层层析 R_F 值与氯林可霉素相近, 尽管此等产物还有待于进一步鉴别, 但这一育种途径值得探讨。

关键词 原生质体融合; 链霉菌; 重组子

金色链霉菌可以使四环素生物合成前体 C₇ 上氯化而产生金霉素。倘若将催化这一氯化过程的酶基因转入林可链霉菌中得到表达, 而次级代谢过程的酶对底物的专一性不强, 能否催化林可霉素与氯结合而产生氯林可霉素。根据这一设想, 用金色链霉菌的原生质体固定化后, 对在高渗条件下, 把林可霉素生物转化为氯林可霉素的可能性做了探索 (详见参考文献 [6])。同时采用单亲株灭活的方法, 将金色链霉菌 (LM^r, CTC^r) 的原生质体用 U V 灭活, 与林可链霉菌的原生质体 (LM^r, CTC^r) 融合, 以期获得直接产生氯林可霉素的重组子。

材料与方 法

(一) 菌种

1. 林可链霉菌林可变种 36* (*S. lincolnensis* var *lincolnensis* 36*); 林可霉素抗性 (LM^r); 产林可霉素, 由本院提供。

2. 金色链霉菌 (*S. aureofaciens*); 金霉素抗性 (CTC^r); 林可霉素抗性 (LM^r); 产金霉素, 由上海医药工业研究院提供。

(二) 培养基

3. S 培养基、P 稳定液、B' 原生质体再生培养基: 见参考文献 [1—2]; 初筛和复筛培养基参考文献 [2]。

(三) 原生质体的制备、再生和融合方法参考文献 [1, 2], 用 40% PEG 6000 促融。

(四) 原生质体的 UV 处理

原生质体悬浮于高渗 P 稳定液中, 在紫外灯下 (2537 Å、垂直距离 30cm) 照射 40min。

(五) 重组子的检出及筛选

U V 处理后的金色链霉菌的原生质体按 1:1 同林可链霉菌 36* 的原生质体混合后, 经 PEG 处理的融合物, 取 0.1ml 涂于含 50μg/ml 金霉素的 B' 再生平板上, 置

本文于 1991 年 10 月 8 日收到。

国家自然科学基金资助项目。

于28℃培养, 10天后计数〔5〕。

种间融合子数 = 含金霉素再生平板上的菌落数

$$\text{融合频率} = \frac{\text{种间融合子数}}{2 \text{ 亲株原生质体再生菌落数}}$$

用牛津杯培养法进行融合子的固体发酵, 方法同文献〔3〕, 固体发酵抗菌活性大于林可链霉菌亲株者经纯化后复筛, 采用一级发酵, 28℃、220rpm 旋转式摇床培养5天。用硅胶G薄层层析测定发酵的产物, 展层剂: 丁酮-丙酮-水(140:40:20)。用籐黄八叠球菌 *Sarcina lutea* 生物显影, 选出产生抗菌物质的 R_f 值同林可霉素相近的菌株。

(六) 融合子产物分析

用草酸将发酵液调 pH2.5—3.5, 过滤, 滤液用NaOH调 pH10.5—11, 用正丁醇萃取, 将萃取液离心分层后, 取上层萃取液经减压浓缩后, 残留物即为粗提样品。用八种溶剂系统的纸层析〔4〕和高压液相色谱(由华北制药厂帮助测试)分离和鉴定粗提物。

结 果

(一) 金色链霉菌原生质体的紫外(U V)处理和种间原生质体融合

本实验的目的是希望获得产生氯林可霉素或者说林可霉素结构上被氯化修饰的抗生素的重组子, 因而要求紫外处理后的金色链霉菌原生质体不具有再生能力, 而作为遗传物质运载体。表1可见, 用U V照射30min以后, 金色链霉菌原生质体再生菌落数为0。

采用照射40min的金色链霉菌(LM', CTC')原生质体同林可链霉菌36*(LM', CTC')的原生质体进行融合, 以40% PEG(M w 6000)促进融合, 直接从含

表1 金色链霉菌原生质体U.V.照射后的存活率
Table 1 Surviving frequency of irradiated U.V. of *S.aureofaciens* protoplasts

U V radiated time(min)	0	10	20	30	40
regenerated colonies	1.0×10^7	100	30	0	0
surviving frequency	1	$< 1 \times 10^{-5}$	$< 3 \times 10^{-6}$	$< 1 \times 10^{-7}$	$< 1 \times 10^{-7}$

values given are the averages of three experiments

50μg/ml 金霉素的再生培养基上获得融合子。融合过程中, 同时进行再生、金霉素抗性突变, U V 照射后复活等对照实验, 种间融合频率达 9.05×10^{-6} 。由于对照平板上没有菌落长出, 因此在融合平板上出现的菌落, 不是自发抗性突变体、原生质体制备-再生过程中导致的变异体, 也不是紫外照射后仍然存活的菌株, 而确实是种间融合子。

(二) 产生目标产物的种间融合子的筛选

对近600株种间融合子进行牛津杯培养法初筛, 所有融合子不具有抑制 *E.coli* 活性, 8%左右的融合子对籐黄八叠球菌的抑菌活性大于林可链霉菌36°。它们经过多次传代、平板单菌落分离后, 进行摇瓶一级发酵复筛, 用硅胶G薄层层析测定发酵液, 以籐黄八叠球菌生物显影, 结果发现有六株融合子发酵产物的 R_f 值不同于林可霉素和金霉素。见图1

不难看出, 新的具有抗菌活性的物质在薄层层析图谱上的位置, 大多数都处于林可霉素的上下, 可能是林可霉素结构发生变化的产物, 其中两株融合产物的 R_f 值接近氯林可霉素。

(三) 融合子稳定性分析

1. 融合子金霉素抗性的分离: 将上述六个融合子挑入斜面培养, 然后分离单菌落。每个融合子挑取一定数量的菌落测

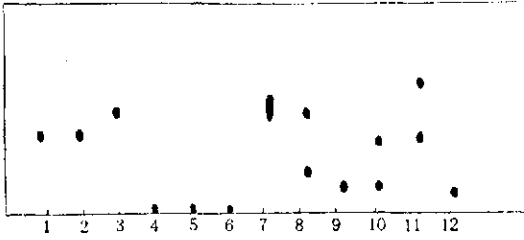


图 1 亲株、融合子发酵产物的薄层层析
Fig.1 Thin layer chromatography of the products of parents and fusants

1. 林可霉素 Lincomycin $R_f = 0.42$;
2. *S.lincolnensis* 发酵液 *S.lincolnensis* fermentation broth $R_f = 0.42$;
3. 氯林可霉素 clindamycin $R_f = 0.54$;
4. 四环素 tetracycline $R_f = 0-0.1$
5. *S.aureofaciens* 发酵液 *S.aureofaciens* fermentation broth $R_f = 0-0.1$;
6. 金霉素 chlorotetracycline $R_f = 0-0.1$
7. 1*重组子发酵液 fermentation broth of 1* fusants $R_f = 0.54$;
8. 2*重组子发酵液 fermentation broth of 2* fusants $R_f = 0.24$ and 0.53 ;
9. 3*重组子发酵液 fermentation broth of 3* fusants $R_f = 0.2$;
10. 4*重组子发酵液 fermentation broth of 4* fusants $R_f = 0.2$ and 0.42 ;
11. 5*重组子发酵液 fermentation broth of 5* fusants $R_f = 0.42$ and 0.78 ;
12. 6*重组子发酵液 fermentation broth of 6* fusants $R_f = 0.14$

定它们对金霉素的抗性，结果见表 2。

有的融合子仍有抗性，但抗性水平却有不同的变化，可能是由于基因组的交换

表 2 融合子金霉素抗性分离

Table 2 Segregation of chlorotetracycline resistant fusants

strain	CTC ^a (µg/ml)	proportion of CTC ^a lever in single colonies (%)				
		0	25	40	50	60
fusants	1*	100	70	42	24	24
	2*	100	62	35	28	22
	3*	100	100	75	71	62
	4*	100	72	59	46	34
	5*	100	18	3	5	0
	6*	100	6	0	0	0
parents	<i>S.lincolnensis</i>	100	0	0	0	0
	<i>S.aureofaciens</i>	100	100	100	100	100

和重组影响了抗性基因的表达水平，有的融合子经分离后大部分子代失去了对金霉素的抗性，推测它们可能是一种不稳定的局部杂合二倍体或局部结合子 (merozygote)。对一些抗性菌株经过 10 次以上传代仍表现稳定的抗药性者视为单倍重组子。

2. 融合子产生抗生素能力的稳定性：将 1*、4* 两个融合子分离的单菌落，接种于高氏一号斜面培养，其后进行一级发酵，并用薄层层析、生物显影测定发酵液中抗菌物质，结果见表 3。

表 3 融合子产抗生素能力的分化
Table 3 Segregation of fusants producing antibiotics

	Results of chromatogram	
	Fusant 1* (48 strains)	Fusant 4* (50 strains)
Strains number of lincomycin produced (%)	16 (33.3)	38 (76)
Strains number of new antibiotic produced (%)	23 (47.9)	38 (76)
Strains number of without antibiotic activity (%)	9 (18.8)	12 (24)

1*融合子产生的抗生素组分的 R_f 值与氯林可霉素相近，见图 1，其分离的单菌落中有 33% 的产林可霉素，48% 产生 R_f 值小于林可霉素的抗生素（同图 1 中的 9）。而 4* 融合子中却有 76% 的单菌落保持原来的产抗生素能力，产生两个 R_f 值不同的具抗菌活性物质。

六株融合子经分离传代，大量筛选，获得四株抗药特性及产抗生素能力稳定遗传五代以上的重组子。

(四) 3^{*}重组子产生的抗生素鉴别

3^{*}重组子产生的抗生素, 经硅胶G薄层层析的 R_f 值为 0.20, 居于林可霉素、金霉素之间, 并不同于林可B.C.S等已知

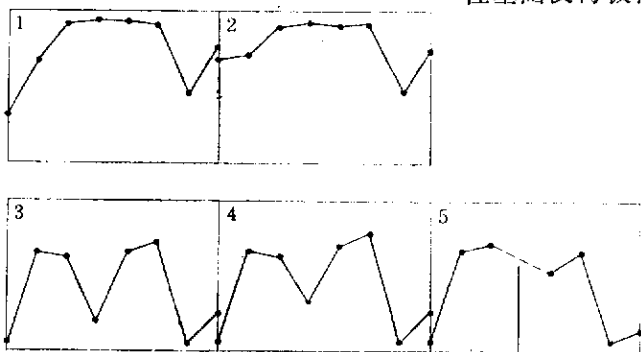


图 2 抗生素的纸层析图谱

Fig.2 Paper chromatogram of antibiotics

1. 3^{*}重组子产生的新抗生素 New antibiotic produced 3^{*} recombinant,
2. 林可霉素 Lincomycin,
3. 四环素 Tetracycline,
4. 土霉素 Oxytetracycline,
5. 金霉素 Chlorotetracycline

采用与提取林可霉素近似的方法, 得到这一抗菌物质的粗品, 其薄层层析图谱如图 3。

该抗菌物质的高压液相色谱见图 4。高压液相色谱分析结果表明, 该抗菌

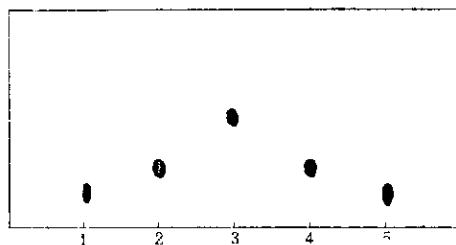


图 3 萃取液中抗菌组份的薄层层析

Fig.3 Thin layer chromatogram of extrated antibiotics

1. 四环素 Tetracyclin
2. 3^{*}重组子发酵液 3^{*} Recombinant fermentation broth,
3. 林可霉素 Lincomycin,
4. 3^{*}重组子发酵液的萃取样品, Sample extrated from 3^{*} Fermentation broth,
5. 金霉素 Chlorotetracycline

组分〔7〕。从八个溶剂系统纸层析图谱(图 2)可以看出这一抗菌组份的纸层析图谱与林可霉素的图谱相近。由此推测它的主要结构与林可霉素相同, 只缺少了某极性基团使得极性变小。

活性物质在380nm无吸收峰, 不具有四环类的四环结构。在210nm有明显吸收峰, 但其保留时间大于林可霉素及氯林可霉素。这一结果证实了我们认为它的主要结构与林可霉素相同的推测。

(五) 3^{*}重组子的形态与培养特征

重组子的菌落形态较其亲本变化明显(详细结果略), 气生菌丝形态和培养特征与林可链霉菌相近, 产孢子量, 水溶性色素与金色链霉菌相似, 总之, 两亲株的性状在重组子中均有表现。但从整体上看, 重组子与林可链霉菌相近, 这可能与金色链霉菌的原生质体在融合前经大剂量的UV灭活有关, 被灭活的原生质体实际上起了遗传物质运载体的作用〔8〕。

讨 论

链霉菌进行种间原生质体融合获得能直接产生半合成抗生素的重组体还未见有

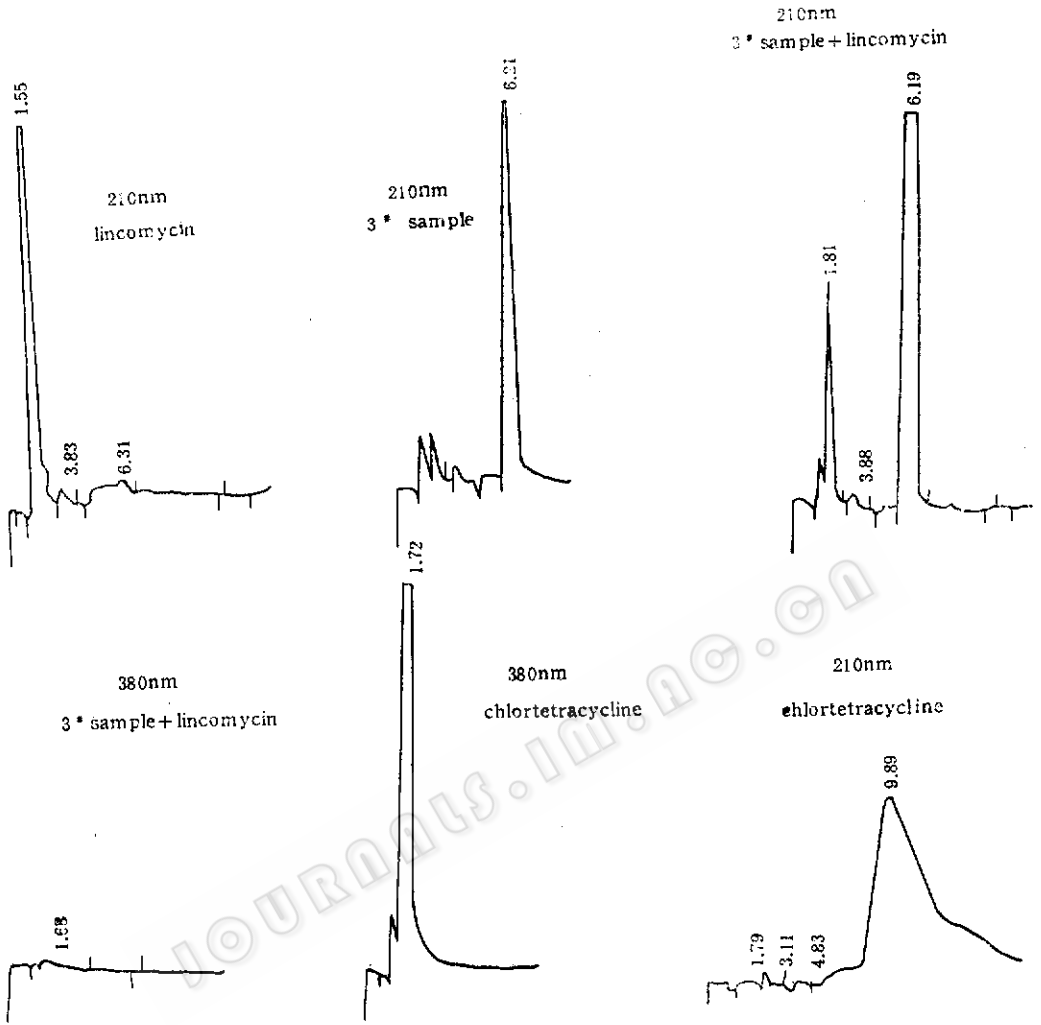


图 4 不同抗菌物质的高压液相色谱

Fig.4 HPLC spectrum of different antibiotics

文献报道。我们的初步实验结果表明，可能获得这种重组体。采用单亲株灭活的原生质体与另一抗生素产生菌的原生质体融合，有可能得到以未经灭活亲株产物的结构为主的新组份，在一定程度上实现定向育种。尤其对那些半合成过程复杂的抗生素来说，如果用此思路来改造菌种，获得直接产生半合成抗生素的菌种，将有利于简化工艺过程，降低生产成本。

林可链霉菌原生质体再生的菌落中从未测出抗 50 μ g/ml 金霉素的菌落，在融合实验中，初筛得到的菌株，未测出抑制

E. coli 的活性，说明没有产谱的金霉素或四环素产生。分离得到的重组体产新抗菌物质能力大多数不稳定，只有少数菌株经多次传代和平板单菌落分离后稳定遗传。这些现象表明，这些菌株产生新抗菌物质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：一是某一亲株的酶基因引入另一亲株，导致新的杂合抗生素的产生；另一种解释是调节基因的重组，使得沉默基因得以活化和表达。我们采用固定化的金色链霉菌原生质体转化林可霉素，也产生类似重组子发

酵产物结构具有抗菌活性的物,初步说明重组子菌株获得产抗生素能力,可能不是沉默基因的活化,而是由于酶合成基因引入另一亲株,得到表达。

链霉菌中广泛存在着限制性核酸内切

酶,因而链霉菌种间原生质体融合需要克服融合体的遗传不稳定性带来的困难。从我们的实验结果看,通过大量筛选与多次传代分离有可能获得产生新抗生素性状稳定的重组体。

参 考 文 献

- [1] Hopwood, D.A.; Genetics as a Tool in Microbiology, eds Glover S.W. and Hopwood, D.A., Cambridge University Press, 187—218, 1981.
- [2] 徐京宁等; 中国抗生素杂志, 14 (3): 192—196, 1989.
- [3] 曹文伟等; 微生物学杂志, 6 (2): 10—14, 1986.
- [4] 张瑞等. 全国第三次抗菌素会议论文集, (第一集) 董村, 张为申主编, 科学出版社, 北京, p. 264, 1965.
- [5] Hopwood, D.A. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 126: 21—27, 1981.
- [6] 米贵东; 华东化工学院硕士研究生论文, p16—20, 1980.
- [7] Argoudelis, A.D. et al., *J. Antibiotics*, 23 (1): 1—8, 1970.
- [8] Anne, J. et al., *Arch. Microbiol.*, 98: 159—166, 1974.

Utilization of the Protoplast Fusion Technique to Alter Lincomycin Producing Microorganism

Xu Jingning Mi Guandong Tang Xiaoxuan
(Research Institute of Biochemical Engineering, East China
University of Chemical Technology, Shanghai)

The results of interspecific recombination through protoplast fusion between *S. lincolnensis* var *lincolnensis* No. 36 (LM^r, CTC^r) producing lincomycin and *S. aureofaciens* (LM^r, CTC^r) producing chlorotetracycline were reported. A heavy dose of UV radiation was used to inactivate the protoplasts of the *S. aureofaciens*. The UV inactivated protoplasts were fused with the viable protoplasts of *S. lincolnensis* var *lincolnensis* No. 36. The frequency of protoplast fusion was 9.05×10^{-6} (with PEG 6000).

The fermentation product of fusant No. 2 show new chromatographic spot similar to that of clindamycin. A new antibiotic substance produced by recombinant No. 3, which is different from lincomycin and chlorotetracycline is obtained. The product of recombinant No. 3, with antimicrobial activity show a peak at 210 nm wave length; It suggests that its basic structure might be similar to that of lincomycin.

Key words

Streptomyces; protoplast fusion; recombinant