

卡那霉素产生菌抗噬菌体菌株的选育

孔 泰 顾维旭

(江苏省靖江葡萄糖厂)

在微生物工业生产中,经常会出现噬菌体的危害。在抗菌素生产方面,自1947年首先报道链霉素发酵受噬菌体侵染以后,又发现其它抗菌素如金霉素、氯霉素、红霉素、土霉素、万古霉素的发酵也遭受到噬菌体的侵袭^[1]。

国内卡那霉素的生产,自1973年武汉抗菌素厂首先发现噬菌体的侵袭^[2]后,又有不少卡那霉素生产单位发现了噬菌体的感染。我厂卡那霉素发酵于1975年遭到噬菌体的侵染,从溶菌的发酵液中先后分离出两种不同的噬菌体,分别编号为 K_1 和 K_2 。为了保证正常生产,我们以生产卡那霉素的链霉菌59-29菌株为出发菌株,经三次用 K_1 、 K_2 噬菌体处理,选育出了能抗这两种噬菌体的菌株。抗株用于生产后,未再出现噬菌体危害。抗株产生卡那霉素的水平与亲株相近。

材 料 和 方 法

一、菌种

卡那霉素链霉菌 (*Streptomyces kanamyceticus*) 59-29,系本厂生产用菌种。

二、培养基

(一) 斜面培养基(%)

葡萄糖 1.2, 酵母膏 0.2, 牛肉膏 0.4, 蛋白胨 0.3, 氯化钠 0.5, 琼脂 2.5。自来水配制, pH7.4。

(二) 测定噬菌体用的培养基

底层用培养基: 同斜面培养基。

上层用培养基: 除琼脂改为1%外,其余同斜面培养基。

噬菌体稀释液: 1%蛋白胨溶液, pH7.0。

(三) 液体培养基

组成同斜面培养基, 不加琼脂, 装量 80 毫升/750

毫升摇瓶。

(四) 摇瓶发酵培养基(%)

淀粉 4.5, 黄豆饼粉(冷榨) 2.5, 葡萄糖 0.5, NaNO_3 0.8, CaCO_3 0.2, ZnSO_4 0.01, KH_2PO_4 0.005。自来水配制, pH7.6, 装量 70 毫升/750 毫升摇瓶。

三、噬菌体

将感染噬菌体的发酵液用双层琼脂平板法分离。所得噬菌斑通过单斑连续3—4次的分离,即可得纯化的噬菌体。

裂解液的制备可采用液体裂解法,于液体培养基摇瓶中,挖块接种敏感寄主菌种,振荡培养20小时左右,加入噬菌体原液(10^{10} 单位/毫升)1毫升,继续培养至浑浊的培养液清澈,经无菌滤纸初步过滤后,再用细菌过滤器过滤。在我们的实验条件下,两种方法均能制得含噬菌体为 10^{10} 单位/毫升以上的裂解液。

裂解液效价的测定,采用双层琼脂平板法,通过出现的空斑数推算出噬菌体裂解液效价。

四、抗株的筛选

(一) 处理

曾采用过两种方法对出发菌株进行处理。一是用噬菌体单一处理: 将生长好的斜面制备单孢子悬浮液,按孢子与噬菌体1:100左右的比例同时接入摇瓶液体培养基中,振荡培养,使菌体自溶,并待菌体生长光密度再度上升后,将菌丝用玻璃珠打碎、稀释,用平皿分离,同时每皿加 10^8 单位/毫升以上浓度的裂解液0.1毫升,涂匀后培养5—6天。二是用紫外线与噬菌体复合处理: 紫外灯功率30瓦,波长 $2,537\text{\AA}$ 。将含单孢子悬浮液5毫升的平皿置紫外灯下29厘米处搅拌处理30秒,照射结束后于暗处放置数小时,取未经稀释的处理液与 10^8 单位/毫升以上裂解液各0.1毫升滴于平板上,涂匀,培养5—6天。

(二) 初筛

按上述方法处理后,若在平板上有卡那霉素产生菌的菌落长成,则选取形态正常、有孢子的菌落,将孢子接入斜面,将刮去孢子的剩余菌落接入摇瓶。每支斜面上同时滴入0.1毫升左右的 10^8 单位/毫升以上的裂解液,涂匀,培养4—5天。每个摇瓶加入裂解液0.5毫升,振荡培养120小时后测定卡那霉素生物效价。然后选取斜面生长正常,表面无噬菌斑,相对应之摇瓶不裂解,卡那霉素效价在2,500微克/毫升以上者,进行复筛。

(三) 复筛

将初筛得到的斜面每支挖块接种三只摇瓶,每瓶同时加 10^{10} 单位/毫升以上裂解液1毫升,振荡培养120小时及144小时测定卡那霉素生物效价。同时以亲株接摇瓶不加噬菌体作对照。选取发酵单位不低于亲株的抗株,进行1—2次自然分离后埋沙土保藏。

进行初筛和复筛时的培养温度均为27℃。

(四) 测定抗性和检查抗株是否携带噬菌体

将沙土管菌种转接斜面,连续传代至第三代以上,将斜面挖块接入液体插瓶培养基中,同时加入 10^{10} 单位/毫升以上的裂解液1毫升,振荡培养48小时后,培养液离心,测定上清液中噬菌体是否增殖。

同时对该菌用双层琼脂法,滴入 10^8 单位/毫升裂解液0.1毫升,培养至120小时。自48小时后每日检查是否有噬菌斑出现。

若在液体培养基中噬菌体未增殖,平板上亦无噬菌斑,即可认为该菌为抗噬菌体菌株。

抗株是否携带噬菌体,可将抗株斜面与敏感菌斜面挖块同时接入一只摇瓶中,48小时后取发酵液,离心,测定上清液能否形成噬菌斑,若有噬菌斑出现,必须再进行分离,直至不出现噬菌斑为止。一般经过2—3次自然分离后,即可将噬菌体分离掉。

实验结果

一、两种不同的噬菌体

在我们开始获得的卡那霉素溶菌液中,噬菌体 K_1 和 K_2 是同时存在的。但 K_1 的浓度要比 K_2 的浓度高10,000倍以上。分离噬菌体的平皿中充满数百个 K_1 的噬菌斑,也难找到一个 K_2 的噬菌斑, K_1 的噬菌斑比 K_2 出现得快得多,所以当初我们误认为感染的噬菌体是单一的。在对 K_1 的抗株U-3选出后,以U-3菌株为测定菌,才将 K_2 从裂解液中分离出来。经多次的分离纯化,得到 K_1 和 K_2 的纯裂解液。噬菌体 K_1 和 K_2 也

可以从空气及污水中捕获,但也是以 K_1 为多。

噬菌体 K_1 形成的噬菌斑,经连续多次纯化后,大小仍不一致,其斑呈圆形,大的直径5—6毫米,小的直径2—3毫米,全透明,平板培养24小时左右噬菌斑隐约可见,36小时完全清晰(见图1),平板于冰箱放置数天后,噬菌斑无明显扩大,但边缘呈锯齿状。

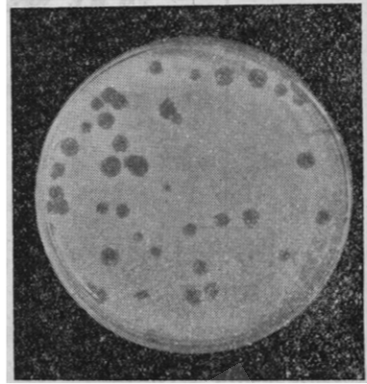


图1 噬菌体 K_1 (培养36小时)

噬菌体 K_2 以卡那霉素链霉菌59-29为测定菌时,噬菌斑的大小较一致,呈星状,直径约1—1.5毫米,半透明,培养40小时左右,方可见斑,约50小时后噬菌斑才完全清楚(见图2)。平板放冰箱久置,噬菌斑略有扩大。

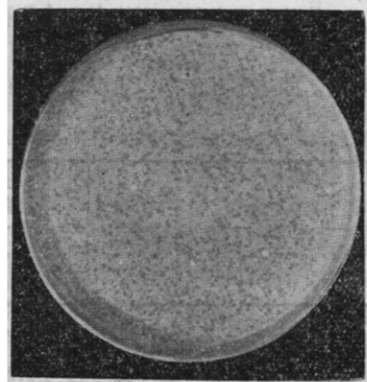


图2 噬菌体 K_2 (培养50小时)

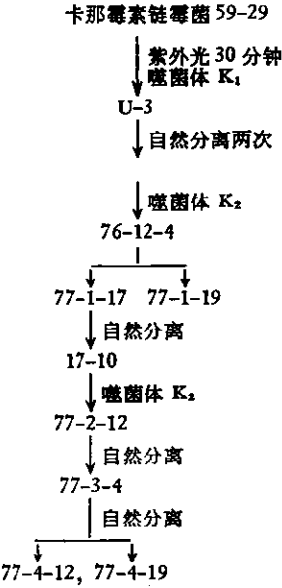
若以U-3为测定菌,出现噬菌斑的时间比链霉菌59-29菌株提早10小时左右。

二、抗噬菌体菌株的获得

以卡那霉素链霉菌59-29为出发菌株,经紫外线和噬菌体复合处理得到U-3菌株,对 K_1 具有抗性。经自然分离两次后,以噬菌体 K_2 处理之,得菌株76-12-4,又经自然分离得77-1-17和77-1-19,这两株菌株保留了对 K_1 的抗性,对 K_2 的抗性稍差,在无 Ca^{++} 存在的液体培养基中不能裂解,但在平板上仍有少量噬菌斑。以77-1-17为出发菌株,在摇瓶培养基中添加0.05%的 $CaCl_2$ 后,继续以 K_2 处理之,得菌株77-2-12,

经两次自然分离得菌株 77-4-12 和 77-4-19, 经抗性试验表明, 这两株菌种对 K_1 和 K_2 都具有较稳定的抗性。不但在液体中不裂解, 而且在平板上也不出现噬菌斑。

抗株选育谱系如下:



对菌株 77-4-12 和 77-4-19 进行了抗性测定, 分别将 K_1 、 K_2 单独及混合加入到接有上述菌种的摇瓶中, 培养 48 小时后, 培养液离心, 对上清液测定, 均未见噬菌体增殖。固体平板上亦未见噬菌斑。由此说明

77-4-12 和 77-4-19 对于噬菌体 K_1 和 K_2 是具有抗性的。

经测定, 菌株 77-4-12 和 77-4-19 体外不携带噬菌体, 初步认为不是溶源性的。

三、抗株的生产能力

取抗株斜面与亲株斜面各 5 支, 每支挖块接种 3 只摇瓶, 振荡培养, 120 小时及 144 小时测定卡那霉素生物效价, 实验结果表明, 选出的抗株产生卡那霉素的能力不低于亲株的水平 (见表 1)。

表 1 抗株与亲株的摇瓶发酵结果比较

菌 株	卡那霉素效价 (微克/毫升)	
	120 小时	144 小时
77-1-17	3364	3539
77-1-19	3309	3458
77-4-12	3116	3387
77-4-19	3062	3552
59-29	3214	3216

注: 上表所列是 15 只摇瓶的平均值, 一级摇瓶发酵, 效价测定采用微生物法, 指示菌为枯草杆菌 (*Bacillus subtilis* 6633)。

今年二月噬菌体危害十分严重时, 曾将抗株 77-1-17 和 77-1-19 投入生产, 使用近三个月, 未再发生噬菌体危害, 发酵水平与亲株相近 (见表 2)。目前已将抗株 77-4-12 和 77-4-19 投入生产, 发酵单位基本正常。

表 2 抗株与亲株生产情况对照表

月 份	发 酵 罐 数	平均单位 (微克/毫升)	发酵最高单位 (微克/毫升)	发酵最低单位 (微克/毫升)	使用 菌 种
1977 年 1 月	21	5,667	7,091	4,176	59-29, 28, * 154*
1977 年 4 月	33	5,717	6,918	4,681	77-1-17, 77-1-19

* 28、154 为我厂原来使用的另两株生产菌种, 对 K_1 、 K_2 的敏感程度与 59-29 一样。

参 考 资 料

[1] 中国科学院微生物研究所噬菌体组: 噬菌体及其防

治, 科学出版社, 1973 年。

[2] 武汉抗菌素厂等: 武汉大学学报, (1): 41—49, 1975。

更 正

本刊 1977 年第三期第 54 页右栏第 6 行末尾“人”应为“人”; 第 33 页左栏倒数第 2 行“以反向……(表1)”, 应为“以反向被动血凝法检出乙型肝炎表面抗原 (表 1)”; 第 6 页左栏第 3 行“氯化钠”应为“氯化钙”。