

庆大霉素产生菌棘孢小单孢菌原生质体形成、再生及融合重组的研究

郑幼霞 徐小雪

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

杨 珮 杨玲珍 朱皖兰

(上海第四制药厂, 上海)

在含0.3%甘氨酸的液体培养基中培养庆大霉素产生菌——棘孢小单孢菌, 其菌丝形态有明显的改变, 易被溶菌酶消化细胞壁而释放大量原生质体。菌丝的培养龄影响其相应原生质体的再生活性(即再生成菌落的能力)。以72h为最佳, 48及120h菌龄的原生质体再生频率依次相当于72h的40%和10%左右。以PEG4000为融合剂。用直接法检出重组子, 重组频率约为 10^{-6} , 融合重组子中有一些菌株庆大霉素的摇瓶发酵效价在1900u/ml左右, 比对照菌株有很大的提高。

关键词 棘孢小单孢菌; 再生活性; 效价

小单孢菌属于放线菌, 由于它产生一些重要的抗生素如庆大霉素^[1], 西梭霉素^[2]等, 因而受到应有的重视。我国生产庆大霉素已有十多年的历史, 除提供国内使用外, 还远销国际市场, 对庆大霉素产生菌株的改良, 一直采用诱变剂处理, 虽有成效, 但效价提高的幅度和其他一些产生抗生素的放线菌如链霉菌相比, 相差较大, 重组育种可能是一个有效的途径, 小单孢菌的遗传重组有过一些报道^[3], 指出存在着通过接合作用发生重组的遗传体制, 但重组频率比较低。近年来采用聚乙二醇(PEG)诱导放线菌原生质体的融合, 得到了很高的重组频率^[4], Szvoboda也发表了对小单孢菌原生质体形成、再生的初步报道^[5]。我们为了利用原生质体技术来改良棘孢小单孢菌生产庆大霉素的能力, 进行原生质体形成、再生

及融合重组的研究, 并对一部分融合重组子的产素能力进行分析。

材料和方法

(一) 菌株

棘孢小单孢 49-2S, 62R 菌株及它们的多种抗性突变株Tc^r、Em^r等。

(二) 培养基及溶液

1. 斜面培养基 (g/L): 淀粉10, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, KNO₃ 1.0, NaCl 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, pH7.5。

2. 菌丝生长培养基 (g/L): 牛肉膏 1.0, 酵母膏 1.0, 蛋白胨 3.0, 葡萄糖 10, MgSO₄·7H₂O 0.5, KNO₃ 1.0,

本文于1986年5月20日收到。

李蜀生同志参加部分实验。

缩写符号: Tc^r 四环素抗性 Em^r 红霉素抗性

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.3, NaCl 2.0, 天冬素 0.02, pH7.2—7.5。

3. 原生质体再生培养基: 斜面培养基补充蔗糖0.2M, $MgCl_2$ 0.05M。

4. 发酵培养基 (g/L): 黄豆饼粉40, 羽毛液脲15, 淀粉65, 淀粉酶1.0, $CoCl_2$ 100 μ g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 750 μ g, $CaCO_3$ 4.0, pH消前7.0。

(三) 菌丝生长及原生质体制备

将试验菌孢子接种到补充有 0.3% 甘氨酸的生长培养基中, 34℃振荡培养 70h 左右 (至对数生长期), 取出离心收集菌丝体, 原生质体制备方法参考文献[7]。溶菌酶 (上海东风生化试剂厂产品) 用量为 5—10mg/ml, 溶菌温度为 37℃, 保持 1—2 h。

(四) 融合重组及重组子的检出

以二个携带不同抗性标记的菌株作为亲株 (四环素抗性 Tc^r 、抗性水平为 10 μ g/ml、红霉素抗性 Em^r 800 μ g/ml) 制成原生质体进行融合, 融合方法参考文献[7]。融合子的检出采用直接法, 即将融合混合液或经 10 倍稀释后, 取 0.1ml 涂布在兼含二亲株抗性药物的选择平板上, 经 34℃ 培养后长出的菌落, 具有稳定双重抗性的即为重组子。

(五) 发酵及效价测定

发酵采用二级形式, 即将孢子接种入种子培养基, 旋转培养 32h 左右, 再转接至发酵培养基, 34℃ 旋转培养 120h。发酵液用杯碟法对短小芽孢杆菌作生物效价测定。

结果和讨论

(一) 原生质体化——甘氨酸的作用

生长在正常培养液中的棘孢小单孢菌丝体, 很难用溶菌酶消化细胞壁, 即使溶

菌酶的浓度很高, 溶菌时间很长, 也不能得到足够量的原生质体, 但如果在培养液中添加适量的甘氨酸, 使菌丝生长受到一定的抑制, 如此长成的菌丝体, 其细胞壁较易被溶菌酶溶解。我们试验了加不同量甘氨酸 (0.3—0.8%) 对 49-2S 菌株生长的影响, 观察到浓度低于 0.3%, 对菌丝生长表现一定的促进, 浓度高于 0.5%, 菌丝生长基本上受到抑制, 在浓度为 0.3—0.4% 时, 菌丝生长受到部分抑制, 但从图 1 的生长曲线看来, 其作用只是在于减低菌丝生长的速率, 推迟进入对数生长期的时间。以添加 0.3% 的情况来看, 大约比对照推迟了 20h, 但到达生长终点时, 其菌丝量却并不少于对照, 这对于提供足够量菌丝体以制备原生质体是较为适宜的。而这样得到的菌丝, 就较易被溶菌酶溶解而释放出大量的原生质体 (图 2)。

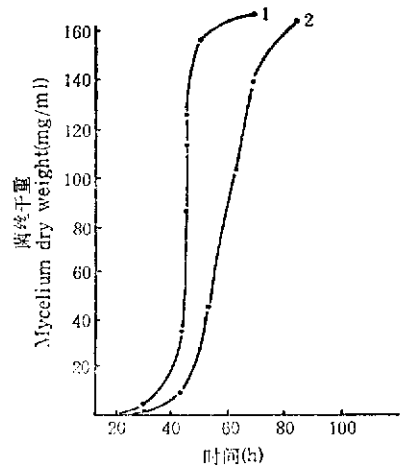


图 1 甘氨酸对生长的影响
Fig.1 The effect of glycine on growth
1. 不加甘氨酸 Without glycine
2. 加 0.3% 甘氨酸 With 0.3% glycine

我们观察了在加和不加甘氨酸的培养液中生长的菌丝形态, 显微镜下显示甘氨酸诱导菌丝产生一种特征性的形态变化, 如图 3 所示, 正常菌丝生长舒展, 而甘氨

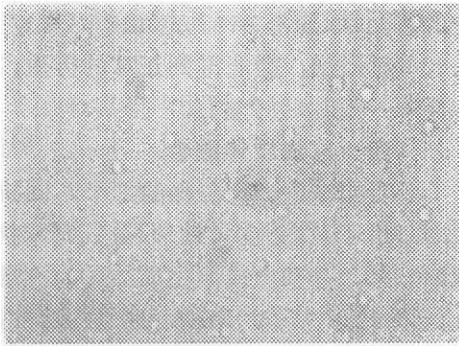


图2 棘孢小单孢菌的原生质体
Fig.2 Protoplasts of *M. echinospora*

酸阻碍菌丝的发育, 促成卷曲现象, 并可看到菌丝内细胞质的凝集, 这和Szveboda对*M. inyoensis* 的研究中所看到的情况相类似^[5]。

(二) 原生质体的再生活性

不同生理时期的菌丝做成的原生质体制剂, 虽然都可在显微镜下看到含有大量的球状体, 但菌丝溶解的速度及其相应原生质体的再生活性却有明显的差异。一般说来链霉菌以对数期的菌丝体为佳^[8], 棘



图3 甘氨酸对菌丝形态的影响
Fig.3 The effect of glycine on mycelia morphology
A. 不加甘氨酸 Without glycine B. 加0.3% 甘氨酸 With 0.3% glycine

孢小单孢的情况也基本类同。如以49-2S菌株在含0.3%甘氨酸的培养基中生长的不同生育期菌丝体作试验, 结果如图4所示, 菌龄48h, 对数前期的菌丝溶菌最快, 但再生活性却并非最好, 只相当于72h的44%, 72h对数中期的菌丝, 虽然溶菌速度略慢, 其再生活性却是最好的, 120h静止期的菌丝, 不但极难溶菌, 而且再生活性极低, 只相当于72h原生质体再生的10%左右。这一点是值得注意的, 因为一个原生质体再生活性的高低对融合重组的影响很大, 而且只有在大量再生菌落中才有可能鉴别出具有理想性状的个体。

在实验中我们也观察到, 不同菌株

(49-2S, 62R) 以相同方法培养得到的

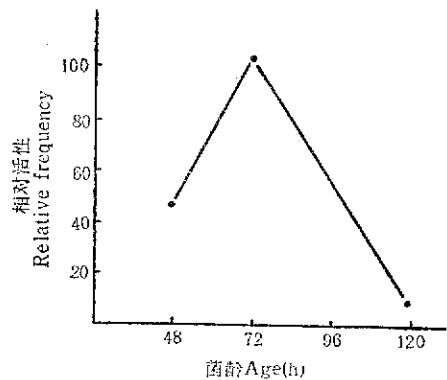


图4 不同菌龄原生质体的再生活性
Fig.4 Protoplast viability of different aged mycelia

菌丝体,用相同的溶菌条件制成的溶解液中,以渗透压冲击的方法测定其所含真正原生质体的比例,相差也很大,49-2S菌株可达98%,而62R则只有50%,推测可能由于不同菌株细胞壁结构有异以致酶解程度也有差别的缘故。

(三) 原生质体稳定液及再生培养基的选择

我们比较了几种成分不同的稳定液及再生培养基,结果表明,Okanishi为链霉菌原生质体设计的P液较为适宜,原生质体形成和再生均在50%以上(表1)。

表 1 不同稳定液中原生质体形成及再生
Table 1 Protoplast formation, regeneration in different buffer

稳定液 Buffer	原生质体形成 Formation (%)		原生质体再生 Regeneration (%)	
	P	60	55.3	62
改良P			62	37.7
SMM	27			5

文献介绍的几种适用于链霉菌、小单孢菌、细菌的再生培养基,都不适宜于棘孢小单孢原生质体的再生,而在该菌株本

身的斜面培养基中补充0.2M蔗糖及0.05M氯化镁,则能得到正常的再生,再生频率一般在50%左右。

(四) 原生质体融合

融合亲株为62R菌株的二个不同抗性株,即四环素抗性(Tc^r)及红霉素抗性(Em^r),分别做成原生质体后,等量相混,以42%(W/V)PEG4000助融,融合混合物涂布在含有四环素及红霉素的再生平板上,直接筛选具有双重抗性的融合重组子,重组子生长速度很慢,一般在20天左右开始出现菌落,一直到一个月菌落逐渐增多。重组子产生频率和涂布在选择平板上的融合混合物浓度有关,如果以浓溶液的0.1ml涂皿,频率较低(约 10^{-7}),作10倍稀释涂皿,频率有所提高(约 10^{-6}),而以100倍稀释后涂皿的频率较高,约在 10^{-4} ,这种情况和其他链霉菌中所观察到的相类似,可能反映未经重组的原生质体能产生一种抑制重组子发育的物质(表2)。由于在未经融合处理的对照平板上,没有菌落生长,因之我们觉得融合频率虽然低,但可以排除自发回复的可能。

表 2 融合重组
Table 2 Fused recombination

原生质体总数 Amount of protoplast	重组子数* Amount of recombinants			重组频率* Recombination frequency		
	0	×10	×100	0	×10	×100
2×10^8	13	17	—	6.5×10^{-7}	8.6×10^{-7}	—
1.1×10^8	6.5	7.9	3.1	5.9×10^{-7}	7.3×10^{-6}	4.6×10^{-4}
2.75×10^8	12	9	—	4.6×10^{-7}	3.2×10^{-6}	—
3.68×10^8	9.5	5	—	2.58×10^{-7}	1.35×10^{-6}	—

* 重组子数目和重组频率是以0.1ml融合液的原液(0)及经10倍(×10)、100倍(×100)稀释涂平板所得到的数据计算出来的

Amount of recombinants and recombination frequencies are calculated from the data of 0.1 ml plated fusion mixture with dilution(×10, ×100) and without dilution(0)

(五) 融合重组子的摇瓶发酵效价

分布

将融合实验中得到的双重抗性重组子分别接种入斜面, 待孢子成熟后, 接种摇瓶进行二级发酵, 以牛津小杯法测定120h发酵液的庆大霉素效价, 对测定过效价的菌株进行分析, 大多数菌株高于亲株的产素水平。低于亲株平均产素能力的菌株约占7%, 高于亲株平均产素能力的大约占93%(图5), 其中有些菌株经二次复筛平均效价为1894u/ml, 比二亲株产素的平均效价(62RTc^r菌株为1308u/ml, 62REm^r为1190u/ml, 平均效价为1249u/ml), 高出约52%, 而个别融合重组子的发酵效价可超过2000u/ml。从摇瓶发酵试验的结果充分显示, 原生质体种内融合对引起棘孢小单孢菌产生庆大霉素能力的正向突变是十分有效的。

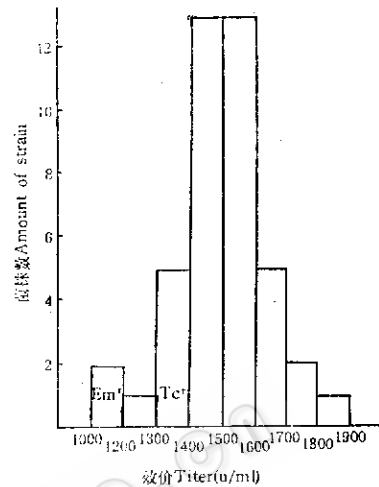


图5 融合重组子摇瓶发酵效价分布
Fig.5 Titer distribution of fused recombinants

配对亲株 Parents
Tc^r 1308u/ml Em^r 1190u/ml

参 考 文 献

- [1] Luedemann, G.M. and Weinstein, M. J., US Patent 3,091,572, 1962.
- [2] Weinstein, M. J. et al., US Patent 3,832,286, 1968.
- [3] Beretta, M. et al., *J. Bact.*, 107:415, 1971.
- [4] Hopwood, D. A. et al., *Nature*, 268:171, 1977.
- [5] Szvoboda G, Y. et al., In "Proc. of The 5th Intern. Protoplast Symp., July 9—14, 1979," edited by Ferenczy, L, Farkas, GL, p.235, Szeged, Hungary.
- [6] Okanishi, M. et al., *J. Gen. Microbiol.*, 80:389, 1974.
- [7] 王洪洲, 郑幼霞: 遗传学报, 9(3):172, 1982.
- [8] 徐小雷等: 实验生物学报, 17(1):25, 1984.

STUDIES ON PROTOPLAST FORMATION,
REGENERATION AND FUSED RECOMBINATION OF
GENTAMYCIN PRODUCER *MICROMONOSPORA*
ECHINOSPORA

Zheng Youxia Xu Xiaoxue

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

Yang Pei Yang Lingzen Zu Wanlan

(Shanghai No.4 Pharmaceutical Plant, Shanghai)

Mycelia of *Micromonospora echinospora* grown on liquid medium containing 0.3% glycine emerge morphological change and become susceptible to lysozyme. Thus cell wall was easily digested and abundant protoplasts are released. Protoplasts obtained from different aged mycelia showed different regeneration viabilities. The optimal age is 72 hours and there is only 40% and 10% relative viability for protoplasts from 48 and 120 hour aged mycelia respectively. PEG4000 was used as fusagent and recombinants with a frequency of about 10^{-8} were selected by direct method. When fermentation was carried out in 750 ml conical flask at 34°C, the highest gentamycin titer of some strains among recombinants is around 1900u/ml which is much higher than that of their parents

Key words

Micromonospora echinospora; regeneration; titer