

# 种间原生质体融合提高巴龙霉素单位产量的研究

邢孔昭 王巽一 李焕姿

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京)

将巴龙霉素产生菌与新霉素产生菌的高产变株进行了种间原生质体融合, 融合频率为 $10^{-4}$ 左右。在410株稳定的原养型重组体中, 产生巴龙霉素者占58%。在200株产生巴龙霉素的种间重组体中, 单位产量在 $1500\mu\text{g/ml}$ 以上的约10%, 获得了比巴龙霉素产生菌原始菌株(单位产量 $300\mu\text{g/ml}$ )单位产量高5—6倍的重组体菌株。核磁共振谱和质谱测定证明, 高单位重组体所产抗生素确为巴龙霉素。结果表明, 为了提高某一抗生素产生菌的单位产量, 使之与另一生物合成途径相似的抗生素产生菌的高产变株进行种间杂交, 是一值得探索的新途径。

**关键词** 抗生素; 巴龙霉素; 原生质体融合

采用什么类型的菌株作为亲株, 是微生物杂交育种中的关键问题之一。在放线菌的杂交育种中, 过去往往采用亲缘关系很近的菌种进行杂交, 获得的重组体菌株遗传变异不大, 可能是其成效不大的重要原因之一。现多选用诱变育种中形成的不同谱系作为亲株进行杂交。甚至有人认为, 二亲株的遗传背景如有较大的差别, 杂交育种的效果可能更好。

根据上述观点, 从现在对抗生素生物合成的认识考虑, 我们认为, 为了提高某一抗生素产生菌的单位产量, 使之与另一生物合成途径十分相似的抗生素产生菌的高产变株进行种间杂交, 可能是一更有效的途径。原生质体融合技术为此提供了一个有用的工具。为了探讨这一设想的可行性, 我们将巴龙霉素产生菌与新霉素产生菌的高产变株进行了种间原生质体融合, 试图提高巴龙霉素的单位产量。

## 材料与方 法

### (一) 菌株

1. 巴龙霉素产生菌与新霉素产生菌及其变株(表1)。

链霉菌385(编号B<sub>40</sub>)为本所保藏菌株<sup>[1]</sup>。弗氏链霉菌N<sub>71-2</sub>由上海第三制药厂提供。

2. 金黄色葡萄球菌链霉素依赖变株209P/SM<sup>+</sup>。该变株也依赖巴龙霉素生长, 对新霉素则不依赖。由本所姚天爵同志提供。

### (二) 培养基

1. 完全培养基: Emerson培养基。

2. 基本培养基: Czapek 甘油培养基。

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Emerson及Czapek 甘油培养基中加入  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

本文于1986年12月16日收到。

本文曾在第五届全国抗生素学术会议上宣读。

实验过程中承蒙本所王文翔同志帮助完成巴龙霉素的提取、精制与光谱分析工作; 姚天爵同志帮助完成巴龙霉素的初步鉴别工作; 李茜同志帮助完成抗生素的生物效价的测定工作, 在此一并致谢。

表1 实验菌株  
Table 1 Strains used in the experiments

菌株 Strain	所产生的抗生素 Antibiotic produced	营养缺陷型变株 Auxotroph	遗传标记 Genetic Marker
链霉菌 385 (编号B <sub>40</sub> ) <i>Streptomyces</i> <i>sp.</i> 385(B <sub>40</sub> )	巴龙霉素 Paromomycin	8AT	Ade <sup>-</sup>
		Bd	Auxotrophx*
弗氏链霉菌 N71-2 <i>Str. fradiae</i> N71-2	新霉素 Neomycin	9AS	Arg <sup>-</sup>
		9HC	His <sup>-</sup>

\* 营养需要未测出 Growth factor did not be detected

0.37%, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.51%, 蔗糖 12.5%, pH7.2。

4. 原生质体高渗缓冲液P<sub>3</sub>与PWP, 同Shirahama所述<sup>[2]</sup>。

5. 初筛发酵培养基(%)：黄豆饼粉1.0, 酵母膏0.5, 葡萄糖2.0, 淀粉2.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>0.3, NaCl 0.3, pH7.2—7.4。

6. 巴龙霉素产生菌种子培养基(%)：黄豆饼粉1.0, 酵母粉0.2, 葡萄糖2.0, 淀粉0.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>0.3, NaCl 0.3, CaCO<sub>3</sub>0.1, pH7.2。

7. 巴龙霉素产生菌发酵培养基(%)：黄豆饼粉2.5, 酵母粉0.3, 玉米粉5.0, 淀粉3.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>0.2, NaCl 0.3, KCl 0.3, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.001, CaCO<sub>3</sub> 0.6, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25, pH7.2。

### (三) 原生质体制备及再生

采用Okanishi 等的方法<sup>[3]</sup>

### (四) 原生质体融合及原养型融合体的筛选

二亲株原生质体悬液等体积混合, 离心, 弃上清液, 加入40%PEG6000(日本产, 上海试剂总厂分装), 使其充分混合后, 28℃静置3min, 再用原生质体高渗缓冲液稀释, 离心洗涤两次, 经适当稀释后

分离于再生培养基平板上。

融合体的检出采用直接选择法<sup>[4]</sup>与间接选择法<sup>[5]</sup>。

### (五) 原养型融合体稳定性的测定

将通过直接或间接选择法得到的原养型菌落分别制成菌悬液, 过滤, 涂布于Emerson平板上, 培养12天左右, 随机挑选单菌落分别点种于Emerson平板及Czapek甘油补充培养基平板上, 培养后观察其生长情况。

### (六) 融合体所产抗生素的初步鉴别

将稳定的原养型重组体进行一级摇瓶发酵, 28℃振荡培养120h, 用金黄色葡萄球菌链霉素依赖变株209P/SM<sup>+</sup>对发酵液初步鉴别, 使变株209P/SM<sup>+</sup>生长者为巴龙霉素。

### (七) 巴龙霉素重组体发酵及生物效价的测定

将待测菌株再一次分离纯化。斜面培养7至8天。种子培养48h。以10%的接种量转种于发酵培养基。发酵120h。培养温度28℃。效价测定采用标准曲线法及高低倍剂量法<sup>[6]</sup>。以枯草杆菌63501为检定菌。

### (八) 薄层层析

层析板的制备: 称取硅胶G6g, 加水

8ml, 1%羧甲基纤维素钠10ml, 混匀后铺板。

溶媒系统: 正丁醇: 甲醇:  $\text{NH}_4\text{OH}$  = 5:4:4

显剂: 茚三酮或生物显剂。

发酵液过滤后即进行薄层层析。

### (九) 巴龙霉素的提取、精制与鉴定

发酵液用110 ( $\text{NH}_4^+$ 型) 树脂吸附, 0.5N  $\text{NH}_4\text{OH}$ 洗脱, 再经290 ( $\text{OH}^-$ 型)

树脂层析, 最后用Cm-Sephadex C-25精制。

## 结 果

### (一) 种间原生质体融合

巴龙霉素产生菌与新霉素产生菌不同的营养缺陷型变株之间进行原生质体融合, 都获得了原养型融合体, 其频率为 $10^{-4}$ 左右(表2)。

表2 巴龙霉素产生菌与新霉素产生菌种间原生质体融合

Table 2 Interspecific protoplast fusion of paromomycin-producer and neomycin-producer

融合亲本 Parental strain	原生质体再生数 /ml cfu/ml	菌丝残存率 Residual mycelium frequency	回复突变率 Reversion frequency	融合频率 Fusion frequency	
				直接选择 Direct selection	间接选择 Indirect selection
sAT×gAS	$3.0 \times 10^8$ $2.4 \times 10^9$	$6.4 \times 10^{-5}$ $4.2 \times 10^{-8}$	$< 10^{-8}$ $< 10^{-8}$	$1.4 \times 10^{-4}$	$4.6 \times 10^{-4}$
sAT×gHC	$1.3 \times 10^8$ $9.8 \times 10^9$	$1.8 \times 10^{-5}$ $5.9 \times 10^{-9}$	$7.4 \times 10^{-6}$ $4.3 \times 10^{-8}$	$2.2 \times 10^{-4}$	$1.3 \times 10^{-4}$
Bd×gAS	$2.7 \times 10^7$ $3.1 \times 10^9$	$3.2 \times 10^{-5}$ $6.7 \times 10^{-8}$	$< 10^{-7}$ $< 10^{-7}$	$1.4 \times 10^{-4}$	

$$\text{菌丝残存率} = \frac{\text{Emerson平板上菌落数/ml}}{\text{高渗Emerson平板上菌落数/ml}}$$

$$\text{Residual mycelium frequency} = \frac{\text{Number of colonies on Emerson medium plate/ml}}{\text{Number of colonies on regeneration medium plate/ml}}$$

### (二) 种间融合体遗传稳定性的测定

部分(约20—55%)原养型融合体菌落在第一次平板分离时很不稳定, 经两次

分离后, 多数可得稳定的原养型重组体(表3)。

表3 原养型融合体稳定性的测定

Table 3 Stability of prototrophic fusant

融合亲本 Parental strain	测定菌落数 Number of colonies tested	第一次平板分离不稳定融合体 Unstable fusant at 1st plating		第二次平板分离不稳定融合体 Unstable fusant at 2nd plating	
		菌落数 of colonies	Number %	菌落数 of colonies	Number %
sAT×gAS	200	109	54.5	21	10.5
sAT×gHC	50	10	20	3	6.0
Bd×gAS	50	11	22	2	1.0

自Bd×9AS组合中随机挑选12个原养型融合体进行遗传分离实验。结果表明5个菌落原养型性状稳定，应是单倍重组体。另外7个融合体通过平板分离既有原养型菌落，也有两个亲株类型的菌落出现，可能是不稳定的杂合二倍体(表4)。

**(三) 种间重组体产生抗生素的测定**

对410株稳定的原养型种间重组体进行了摇瓶发酵，用209P/SM<sup>+</sup>变株进行初步鉴别，发现有238株产生巴龙霉素，占58%。

对200株产生巴龙霉素的重组体进行了摇瓶二级发酵。约70%的重组体的单位产量高于巴龙霉素产生菌原株B<sub>40</sub>，有9.5%的重组体的单位产量在1500μg/ml以上，为B<sub>40</sub>单位产量的5—6倍。在我们的实验条件下，B<sub>40</sub>的单位产量为300μg/ml(图1-C)

高产巴龙霉素的种间重组体与其原始亲本及直接亲本产抗生素能力的比较见

表5。

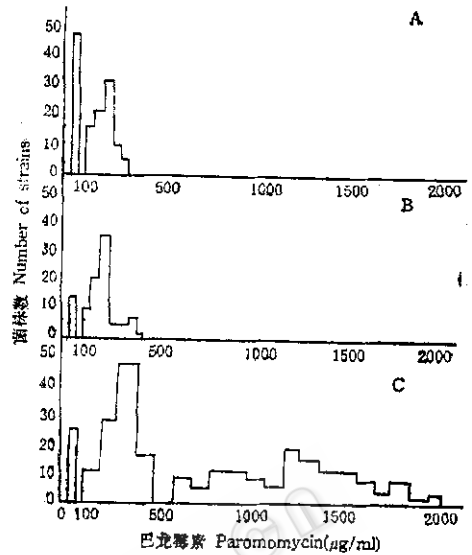


图1 巴龙霉素产量分布图

Fig. 1 Paromomycin production  
 A. 紫外处理 UV treated mutants  
 B. 种内重组体 Intraspecific recombinants  
 C. 种间重组体 Interspecific recombinants

表4 原养型融合体的遗传分离

Table 4 Genetic segregation of Prototrophic fusant

融合体编号 Fusant No.	测定菌落总数 Total Number of colonies detected	原养型 Prototroph		9AS型 9AS phenotype		Bd型 Bd phenotype	
		菌落数 Number of colony	%	菌落数 Number of colony	%	菌落数 Number of colony	%
1	34	18	52.9	14	41.2	2	5.9
2	33	21	63.1	6	18.2	6	18.2
3	37	25	67.5	9	24.3	3	8.1
4	37	24	67.9	8	21.6	5	13.5
5	36	15	41.7	17	47.2	4	11.1
6	40	40	100	0		0	
7	38	8	21.1	11	28.9	19	50
8	40	10	25	6	15	24	60
9	38	38	100	0		0	
10	40	40	100	0		0	
11	40	40	100	0		0	
12	40	40	100	0		0	

**(四) 高产重组体菌株所产抗生素的进一步鉴别**

1, 薄层层析: 将3个高产重组体菌株F<sub>88</sub>、F<sub>110</sub>及F<sub>121</sub>和巴龙霉素产生菌原株B<sub>40</sub>的

表5 高产重组体菌株与其亲株单位产量的比较

Table 5 Comparison of antibiotic productivity of high-yielding recombinants versus their parental strains

菌株 Strain		单位产量 Yield( $\mu\text{g/ml}$ )
巴龙霉素产生菌 Paromomycin-producer	链霉菌385 (编号B <sub>40</sub> ) <i>Streptomyces</i> sp. 385(B <sub>40</sub> )	300
	8AT	100
	Bd	0
新霉素产生菌 Neomycin-producer	弗氏链霉菌N71-2 <i>Str. fradiae</i> N71-2	3000
	9AS	0
	9HC	0
种间重组体 Recombinant	F88(8AT $\times$ 9AS)	1850
	F116(8AT $\times$ 9AS)	2000
	F121(8AT $\times$ 9HC)	1940

发酵液进行了薄层层析, 它们的主要成分的比移值与巴龙霉素标准品相同。

2. 光谱测定: 对高产菌株 F<sub>88</sub> 及原株 B<sub>40</sub> 的发酵液进行了提取与精制, 均得白色絮状精制品, 并对之进行了光谱测定。

F<sub>88</sub> 与 B<sub>40</sub> 的精制品的水溶液在紫外光下无吸收峰, 二者的红外光谱吸收峰相同, 皆呈典型的氨基糖甙类抗生素的红外吸收峰。二者的<sup>1</sup>H-核磁共振谱及<sup>13</sup>C-核磁共振谱的化学位移相同(具体数据未列出)。质谱分析表明二者的分子离子峰皆为616(图2, 图3)。

薄层层析及光谱测定结果都证实这些高单位重组体所产抗生素确为巴龙霉素。

#### (五) 巴龙霉素产生菌种内原生质体融合及常规诱变育种

通过原生质体的种内融合提高抗生素的单位产量已有报道。近年, 也发现有的抗生素产生菌通过原生质体的形成及再生, 其抗生素的单位产量有明显提高<sup>[7]</sup>。为了说明种内原生质体融合或原生质体的形成及再生对提高单位产量是否有上述种内原

生质体融合同样的效果, 我们进行了巴龙霉素产生菌的种内融合, 并对所得的87株原养型重组体进行了摇瓶发酵。结果表明, 单位产量高于原株 B<sub>40</sub> 的有12株, 占13.8%, 最高效价为435 $\mu\text{g/ml}$ (图1-B)。

为了与常规的诱变育种相比较, 对巴龙霉素产生菌原株 B<sub>40</sub> 进行了紫外线诱变处理, 存活率为0.11%。对所得的120株变株进行了摇瓶发酵, 单位产量高于 B<sub>40</sub> 的有4株, 占3.3%, 最高效价为353 $\mu\text{g/ml}$ (图1-A)。

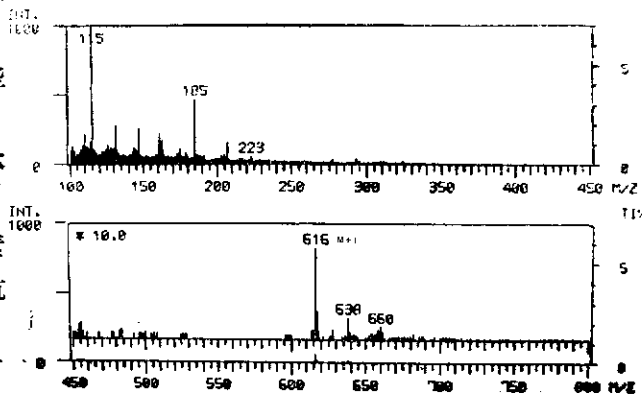


图2 F<sub>88</sub>质谱  
Fig. 2 Mass spectrum of F<sub>88</sub>

通过原生质体的种内融合及紫外线诱变处理仅分别使巴龙霉素的单位产量提高36%和17%，而通过原生质体的种间融合使巴龙霉素的单位产量提高5—6倍。

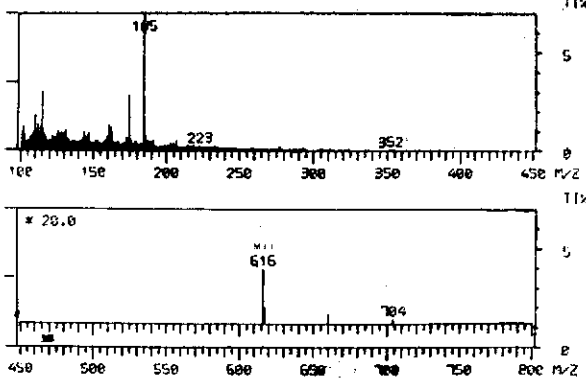


图3 B<sub>40</sub> 质谱  
Fig.3 Mass spectrum of B<sub>40</sub>

## 讨 论

种间重组体巴龙霉素单位产量提高的遗传及生化机制还不了解。考虑到新霉素产生菌是经过长期的诱变育种所获得的高产变株,某些关键酶系的活性或产量可能有较大的提高,而一般次级代谢中酶的底物特异性不高,故可推测,通过融合所得到的高产巴龙霉素重组体中,这些酶系的有关基因得到重组,使巴龙霉素合成途径中某些酶系的活性有所提高或其调控机制发生改变,从而导致其合成途径中某些限制因素被缓解,使巴龙霉素的合成能力大幅度提高。

类似这种思路的工作,文献中只看到了两篇报道。Wesseling等为了提高头霉素C产生菌的单位产量,使之与头霉素A、B产生菌进行属间常规杂交,获得了单位产量提高7—11%的原养型重组体菌株,而将不同谱系的菌株进行种内原生质体融合,却使头霉素C的单位产量提

高了10—15%<sup>[8]</sup>。朱春宝等采用低产的柔红霉素产生菌与高产的四环素产生菌进行种间原生质体融合,使柔红霉素的单位产量提高了87%<sup>[9]</sup>。在我们的实验中,巴龙霉素的单位产量提高了5—6倍。这三例所用的方法皆是与生物合成途径相似的抗生素产生菌进行杂交,但抗生素单位产量的提高却差别甚大。对此还难以作出确切的解释,这却启发我们作以下考虑。在Wesseling等的实验中,虽头霉素A、B的生物合成途径与头霉素C十分相似,但头霉素A、B产生菌似乎并非高产变株。朱春宝等的工作中,四环素产生菌虽为高产菌株,但这两个抗生素的生物合成途径除柔红霉素的道诺霉酮部分与四环素皆来自聚芳环体(Polyketide)途径外,其他方面则差别较大。在巴龙霉素的例子中,二种抗生素的生物合成途径既十分相似,新霉素产生菌又是高产变株,这是否就为巴龙霉素的单位产量的提高提供了条件。因此,我们推想,利用生物合成途径相似的抗产素产生菌进行种间杂交以提高抗生素的单位产量的方法,似应考虑两个条件方能收到较好的效果,即两者的生物合成途径尽量相似,另一亲株是高产变株。

我们这一实验结果是否有其普遍意义,还有待在更多的抗生素产生菌中进行研究。方法本身也存在一些限制。例如,由于DNA同源性的差异,限制修饰系统的作用以及某些生理的原因,在放线菌中,往往不能进行种间杂交或难以形成稳定的重组体,甚至分类学上很近的链霉菌之间也有难以形成种间重组体的报道<sup>[10]</sup>。此外,种间杂交还有可能使抗生素的化学结构及组分发生改变。尽管如此,这一思路在抗生素产生菌的育种工作中仍应是一值得探索的新途径。

## 参 考 文 献

- [1] 抗菌素-生物理化特性编写组;抗菌素生物理化特性, 第一分册, 人民卫生出版社, p. 143, 1977.  
 [2] Shirahama, T. et al., *Agric. Biol., Chem.*, 45:1271, 1982.  
 [3] Okanishi, M. et al. : *J. Gen. Microbiol.*, 80:389, 1974.  
 [4] Ochi, K. et al. : *J. Bacteriol.*, 139 : 984, 1979.  
 [5] Hopwood, D. A. and Wright, H. M. : *Mol. Gen. Genet.*, 162:307, 1978.  
 [6] 中华人民共和国卫生部; 中华人民共和国卫生部抗菌素标准, 人民卫生出版社, 1973.  
 [7] Ikeda, H. et al. : *J. Antibiot.*, 36:283, 1983.  
 [8] Wesseling, A.C. et al. : *Dev. Ind. Microbiol.*, 22:641, 1980.  
 [9] 朱春宝, 杨昭中; 医药工业, 17(5):193, 1986.  
 [10] Hopwood, D. A. et al.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 35:237, 1981.

## IMPROVEMENT OF PAROMOMYCIN PRODUCTIVITY BY INTER SPECIFIC PROTOPLAST FUSION

Xing Kongzhao Wang Xunyi Li Huanlon

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

Considering the similarities between paromomycin and neomycin both in chemical structure and in biosynthetic pathways, we crossed a low-yielding paromomycin producer (*Streptomyces* sp. 385) with a high-yielding variant of neomycin producer (*Str. fradiae* N71-2) by interspecific protoplast fusion in order to improve the paromomycin productivity.

The fusion of protoplasts from different auxotrophs of these two antibiotic producers resulted in the prototrophic fusants at the frequency about  $10^{-4}$ . Most of the fusants were unstable, giving segregants of both parental and recombinant phenotypes. 58% of the stable recombinants produced paromomycin. Among 200 paromomycin-producing recombinants tested, 71.5% of them produced more antibiotic than the original strain 385, which produced 300 $\mu$ g/ml paromomycin. About 10% recombinants had the titre above 1500 $\mu$ g/ml, 5—6 times more than that of the original strain 385.

In the control experiments with intraspecific protoplast fusion and U.V. mutagenesis of *streptomyces* sp. 385, the antibiotic titre was increased only by 36% and 17% respectively.

The results show that interspecific cross between different antibiotic producers with similar biosynthetic pathways might be a new approach to improving antibiotic production, though it remains to be tested with other microorganisms.

### Key words

Antibiotics; paromomycin; protoplast fusion