

链霉菌原生质体种间融合重组的研究

II. RVA18——链霉菌原生质体种间融合重组子的一个新代谢产物

徐小雪 张庭兰 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

RVA18是链霉菌原生质体种间融合(亲株为庆丰链霉菌和吸水链霉菌井冈变种)得到的一株原养型重组子所产生的一个新的代谢产物, 它存在于细胞内, 是一个酸性非水溶性的化合物, 能溶于甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯和环己烷等, 微溶于氯仿。它对革兰氏阳性细菌和一些植物病原真菌有较强的制菌作用, 能引起纹枯病菌的异常分枝。用柱层析和液相色谱相结合的方法提纯后的纯品经紫外、红外、高效液相、核磁共振、质谱等分析证明它是一个理化和生物性质均不同于二亲株产物——井冈霉素和庆丰霉素的新代谢产物。并将RVA18的理化、生物性质和二亲株产物井冈霉素及庆丰霉素作了比较。

关键词 代谢产物; 种间重组子; 分离; 纯化

新抗菌物质的筛选历来注重从自然界中分离, 但时至今日, 从自然界筛到新抗生素的机率变得越来越低。和半合成抗生素研究兴起的同时, 通过遗传重组来获得新抗产生菌的方法也受到了重视, 特别是微生物原生质体融合技术的建立^[1-3], 使重组育种成为一个实际可行的途径。现在已有一些通过原生质体融合重组技术改造菌株产素能力^[5,6]和获得新抗生素的^[7]报道。

我们在前一篇报告中报道了以庆丰霉素产生菌庆丰链霉菌 AS201(HIV⁻)菌株和井冈霉素产生菌吸水链霉菌井冈变种VA4(His⁻)菌株为亲本, 进行原生质体种间融合的结果^[8]。在最低培养基中选择到许多具有新表型的原养型重组子中, 获得一株重组菌 RVA18, 它所产生的抗菌物质(暂以菌号命名, 为 RVA18), 具有与二亲株的产物, 庆丰霉素和井冈霉素不同

的理化和生物特性, 是一个新的代谢产物, 本文报道对 RVA18 的分离提纯和理化、生物性质的研究结果。

材料和方法

(一) 菌株

RVA18产生菌系由庆丰链霉菌 AS201(HIV⁻)菌株和吸水链霉菌井冈变种 VA4(His⁻)菌株的原生质体进行种间融合获得的一株原养型重组子, 编号为 RVA18^[8]。

(二) 培养基

斜面培养基: 同庆丰链霉菌固体斜面

本文于1985年1月10日收到。

缩写符号表示: HIV⁻为异亮氨酸和缬氨酸缺陷型, His为组氨酸缺陷型, J_m为井冈霉素, Q_m为庆丰霉素。

本工作承中国科学院植物生理所焦瑞身、洪孟民教授热情指导, 并审阅文稿, 中国科学院上海有机所姚培莉、徐永珍同志帮助测定红外光谱及质谱, 上海有机材料所李大和同志帮助测定核磁共振, 本所邵大森同志帮助测定高效液相色谱, 在此一并致谢。

培养基^[9]。

RVA18发酵培养基：为井冈霉素发酵培养基，成份如下(%)：淀粉6，葡萄糖3， KH_2PO_4 0.05， NaCl 0.1，蚕蛹粉1，酵母粉1， CaCO_3 0.7， pH 7.2—7.4。

(三) 抗菌活性的测定

RVA18存在于细胞内，以枯草杆菌AS1.140为指示菌，发酵滤液没有明显的抗菌活性，而琼脂块培养或菌丝细胞抽提液则活性较高，抗菌活性的测定是用双层平板贴纸片或牛津小杯法，以相当于一定单位的庆丰霉素的抑菌能力定为RVA18的相对单位。

(四) 发酵

把新鲜的RVA18产生菌斜面孢子（一只茄子瓶），以无菌水做成悬液，分别接种于100瓶发酵摇瓶中（500ml三角瓶盛100ml发酵培养基）于28℃往复式摇床振荡培养五天。培养过程中经常摇动，以免菌丝沉积粘着于瓶壁。

实验结果

(一) 分离和纯化

按图1所示的程序从菌丝细胞中分离RVA18，得到粗制品，进一步按图2所示的程序进行纯化，最后得到白色纯品，供各种化学分析之用。

分离提纯的流程如图1和图2。

(二) 理化性质

RVA18和其二亲株产物井冈霉素、庆丰霉素的理化性质比较列于表1。

RVA18经硅胶柱层析提纯后为一微黄色的油状物，不溶于水，溶于甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、环己烷，微溶于氯仿。RVA18对苯酚- H_2SO_4 试剂反应为阳

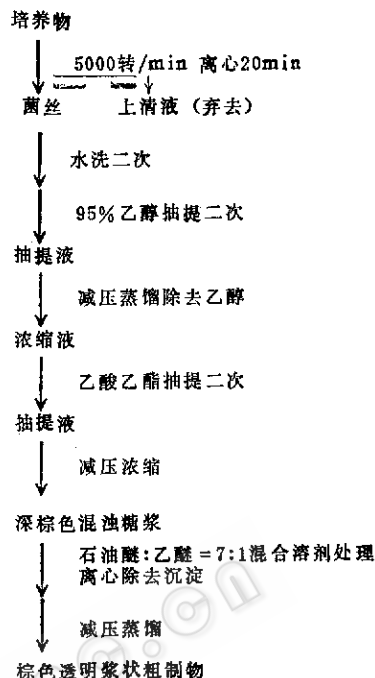


图1 RVA18的分离

Fig.1 Isolation of RVA18

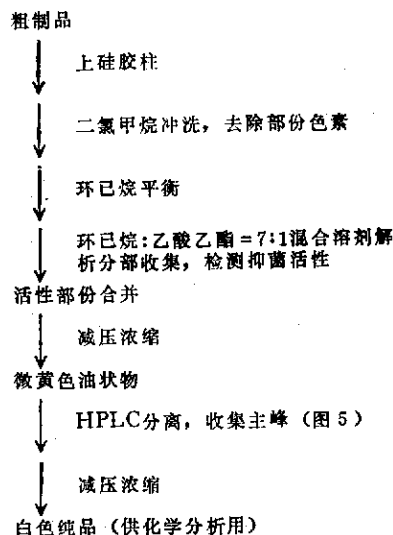


图2 RVA18的纯化

Fig. 2 Purification of RVA18

性，而对茚三酮、双缩脲，过碘酸等试剂的反应为阴性。该物质在高压电场中进行纸电泳，向阳极方向泳动，表明为酸性物质。以Доскочилова的八种溶剂系统进行纸层析，其行为表明该物质属非水溶性

RESULTS

(1) The development of nucleo-cytoplasmic hybrid fish

In these experiments, the normally developed middle blastula of *Ct* fish were selected and their nuclei were transplanted into the enucleated eggs of *Me* fish. The quality of the recipient enucleated eggs is very important for their further development after nuclear transplantation. The main criterion of the egg quality is its maturity situation, which can be identified by fertilizing some eggs taken from the experimental batches with normal *Ct* fish sperms to see whether their fertilization ratio are high or not as we reported in previous paper^[1]. After nuclear transplantation, if the quality of eggs are poor, their early segmentation will be irregular and no normal embryos could be developed. Most of them will die at abnormal blastula or early gastrula stages. If the quality of eggs are good, normal hybrid fish in different ratio could be obtained in various batches. In Table I, the results obtained from seven nuclear-transplantation experiments during the years of 1977, 1978 and 1979 were listed.

As indicated in Table I, the different numbers of adult nucleo-cytoplasmic hybrid fish were obtained in different batches of nuclear-transplanted eggs. Among them, 2 adult hybrid fish (2.5%) were obtained in first batch, 1 (0.07%) in second batch, no adult hybrid fish in third batch (0.0%), 1 in fourth batch (0.08%), 5 in fifth batch (4.8%), 3 in sixth batch (7.5%) and 12 in seventh batch (14.1%). Among 659 nuclear transplanted eggs in seven batches, 24 developed to adult nucleo-cytoplasmic hybrid fish, while 474 arrested at blastula stage (71.9%), 214 at gastrula stage (32.5%) and 42 at larval fish stages (6.2%). The average survival percentage of *CtMe* adult fish is 3.6%. Obviously, although the numbers of adult hybrid fish obtained from different batches of nuclear transplanted eggs are different. However the *CtMe* adult fish could be definitely obtained using the technique of nuclear transplantation.

(2) Morphological characteristics of nuclear-transplanted hybrid fish

According to the taxonomy, ten main different morphological characteristics between 13 *CtMe* fish, 30 *Ct* fish and 14 *Me* fish were observed and comparison of them is listed in Table II.

As indicated in Table II, ten main morphological characteristics, i.e. head in body length, depth in body length, width in body length, dorsal spine, abdominal keel, anal rays, gillraker, pharyngeal teeth, lateral line scales, and number of vertebrae were examined in these kinds of fish. It showed

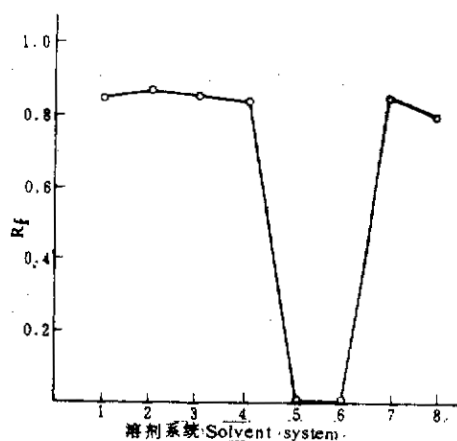


图 3 RVA18的纸层析图谱

Fig. 3 Paper chromatography of RVA18

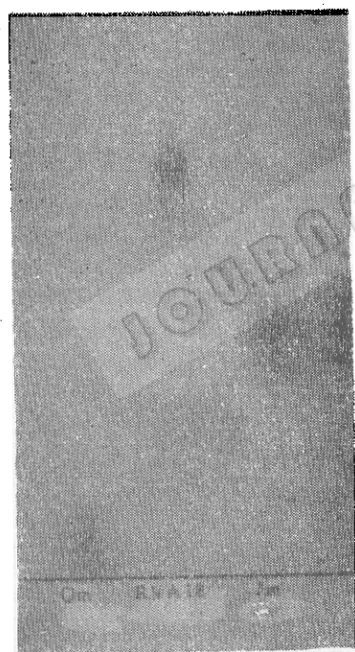


图 4 RVA18的薄层层析

Fig.4 Thin Layer chromatography of RVA18

支持物: 硅胶 G, 展开剂: 甲醇, 化学显影: 10% H_2SO_4

Support: Silica gel G,

Spread reagent: 50% Methanol,

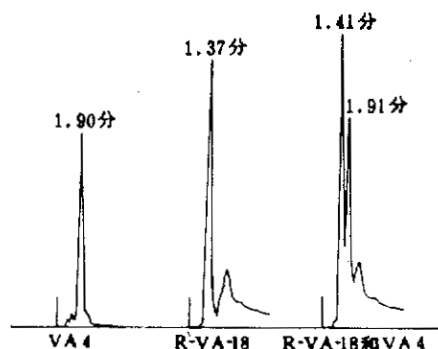
Chemical visualization: Visualized by 10% H_2SO_4 H_2SO_4 

图 5 RVA18 的高效液相色谱

Fig.5 HPLC of RVA18

柱 Column: 2.6×500(22nm). 日立胶Hitachi gel 3010.

溶剂 Solvent: 0.1% NH_4OH + CH_3OH .

流量 Flow rate: 1.0ml/min.

检测 Detector: UV at 240nm.

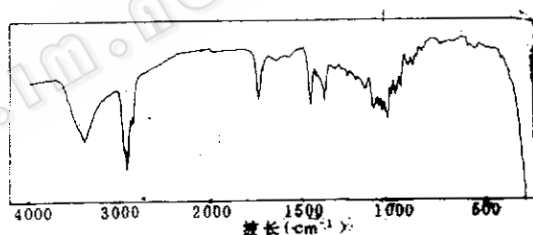


图 6 RVA18 的红外吸收光谱 (KCl 压片)

Fig.6 Infrared absorption spectrum of RVA18 (KCl)

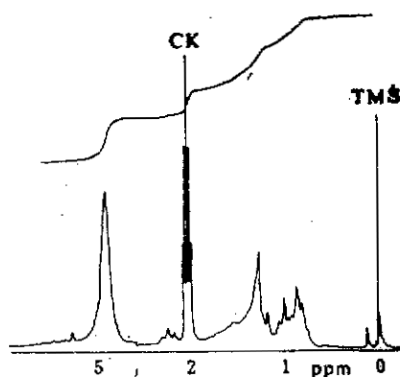


图 7 RVA18的核磁共振谱 (100兆周)

O

溶剂(Solvent): 氘丙酮(CD_3CCD_3), CK为溶剂峰Fig.7 1H -NMR spectrum of RVA18 (100MHz)

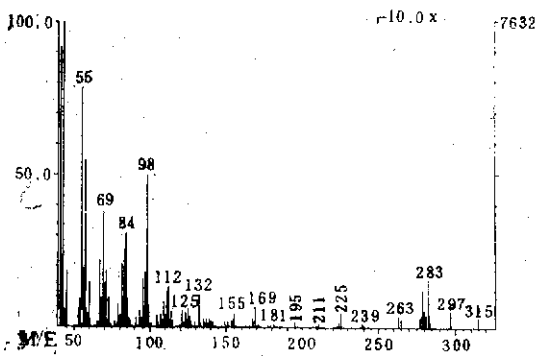


图 8 RVA18的质谱
Fig.8 Mass spectrum (E.I) of RVA18

(三) 生物性质

RVA18 对 细菌，真 菌 有 较 强 的 抗 菌 活 性，尤 其 是 对 革 蓝 氏 阳 性 细 菌 及 一 些 植 物 病 原 真 菌。对 革 蓝 氏 阴 性 细 菌 如 大 肠 杆 菌 及 酵 母 的 活 性 较 低。它 对 一 些 微 生 物 的 最 低 抑 菌 浓 度 及 其 和 二 亲 株 产 物 最 低 抑 制 浓 度 的 比 较 列 于 表 2。

表 2 RVA18、井冈霉素和庆丰霉素的抗菌谱
Table.2 Antimicrobial Spectrum of
RVA18, Jm and Qm

试验菌 Test strain	最低抑制浓度 单位/ml MIC unit/ml		
	RVA18	Jm [14]	Qm [13]
枯草杆菌 <i>B.subtilis</i>	10,	—	40
大肠杆菌 <i>E.coli</i>	200	—	40
八叠球菌 <i>Sarcina lutea</i>	10	—	40
金黄色葡萄球菌 <i>S.aureus</i>	20	—	100
啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	200	—	200
稻瘟病菌 <i>Pyricularia oryzae</i>	50	5	100
水稻纹枯病菌 <i>Pillicularia sasakii</i>	20	0.01	20
黄瓜灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	50	100	NT
黄瓜炭疽病菌 <i>Colletotrichum lagenarium</i>	100	NT	NT

注：— 没有作用 no action, NT 未曾试验 not tested

我们还试验了 RVA18 对 水稻纹枯病菌的抑制作用，并和井冈霉素的作用作了比较，井冈霉素引起纹枯病菌菌丝前端的多级分枝而 RVA18 则 使菌丝聚生成簇，表明它们都能抑制纹枯病菌生长但引起菌丝异常分枝的情况略有差异（图 9）。

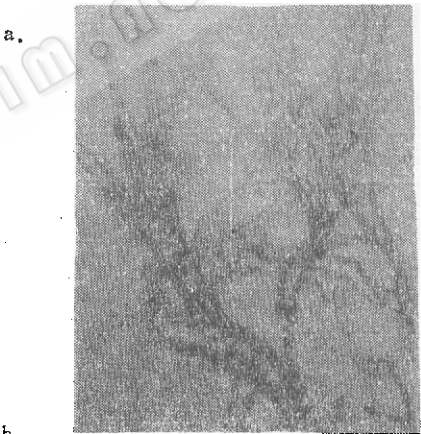
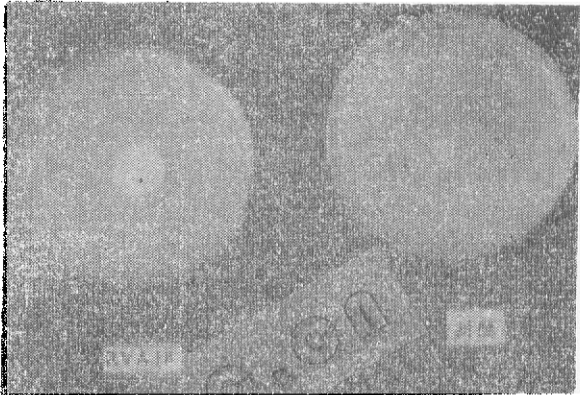


图 9 RVA18 对水稻纹枯病菌的抑制
Fig.9 Inhibition of RVA18 to *Pillicularia sasakii*.
a. RVA18抑制菌丝生长
a. Inhibition of RVA18 to mycelium growth
b. 异常分枝
b. Abnormal branching caused by RVA18

讨 论

从以上所列的结果表明，RVA18 不论从理化性质，包括溶解性、酸碱性、高效液相色谱、红外光谱、核磁共振、质谱

分析等方面,以及生物性质如抗菌活性都不同于其二亲株所产生的抗生素庆丰霉素及井冈霉素,表明 RVA18 是一个链霉菌种间融合重组子所产生的新的代谢产物,也证明这个重组子(即RVA18的产生菌)具有二亲株的细胞质融合和基因组交换的结果所建成的一个新的遗传背景。就这一点而言不论在理论上研究原生质体融合引起微生物的遗传变异,或在实践上培育一个新的工业良种都有重要的意义。日本 Yamashita 等将链霉菌产生菌灰色链霉菌和 Istamycin 产生菌 *S. tenjimariensis* 进行种间原生质体融合而得到一个新抗生素^[7],是利用原生质体种间重组培养新抗产生菌的第一个实际例子。RVA18 是否是化学结构上全新的化合物,有待作进一步的研究,

而且我们现在还不可能对产生这个新代谢产物的遗传机理作出解释,但是我们认为,链霉菌种间原生质体融合技术在组建产新抗生素的杂种菌株及提高工业菌株产量中是值得注意的。

RVA18 对于革兰氏阳性细菌的抗菌活力较庆丰霉素为强,而对植物病原真菌也有较广的抑制范围(表2),也能引起水稻纹枯病菌的异常分枝(图9)。由于它的二亲株所产的抗菌素都是农用抗生素,井冈霉素主要用于防治水稻纹枯病,庆丰霉素主要用于防治水稻稻瘟病及麦子、蔬菜、花卉等的白粉病。因此,这样二个亲株融合重组的后代所产生的 RVA18,根据它的抗菌谱来看,也很可能具有实际应用于防治农作物病害的可能性。

参 考 文 献

- [1] Ferenczy, L. et al., *Experimentia*, 31:1028, 1975.
- [2] Fodor, K. and L. Alföldi, *PNAS.*, 73: 2147, 1976.
- [3] Svoboda, A., *J. Gen. Microbiol.*, 109: 169, 1978.
- [4] Hopwood, D.A. et al., *Nature*, 268: 171, 1977.
- [5] Ochi, K., *J. Bact.*, 150:592, 1982.
- [6] Fukagawa, Y. et al., in "Trends in Antibiotic Research", Umezawa, H. et al., Ed. Japan Antibiotics res. Assoc. Tokyo, 1982, p.248.
- [7] Yamashita, F. et al., *Abst. 4th Genetics of Industrial Microorganisms*, Kyoto, June 6—11, 1982, p.108.
- [8] 郑幼震等, *生物工程学报*, 1(3):32—37, 1985.
- [9] 郑幼震等, *遗传学报*, 7(2):111, 1980.
- [10] 上海农药研究所, 农用抗生素组, *微生物学报*, 15(3):223, 1975.
- [11] 上海植物生理研究所, 微生物室农抗组, *微生物学报*, 15(2):101, 1975.
- [12] 张瑞等, 全国第三次抗菌素学术会议论文集(第一集), 童村、张为申主编, 科学出版社, 北京, 264页, 1965年.
- [13] 上海植物生理研究所, 微生物室农抗组, *微生物学报*, 14(1):42, 1974.
- [14] 上海农药研究所, 农用抗生素组, *微生物学报*, 15(2):110, 1975.

STUDIES ON INTERSPECIFIC RECOMBINATION OF *STREPTOMYCES* THROUGH PROTOPLAST FUSION

II. RVA18—A NEW METABOLITE OF AN INTERSPECIFIC RECOMBINANT

Xu Xiaoxue Zhang Tinglan Zheng Youxia

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

RVA18 is a new metabolite of an interspecific recombinant, called strain RVA18, obtained by protoplast fusion between *S. qingfengmyceticus* and *S. hygroscopicus* var. *jinggangensis*. It is an acidic, water insoluble intracellular compound, but soluble in alcohol, acetone, ethylacetate and cyclohexane, slightly soluble in chloroform. It is a compound with antimicrobial activity, especially active against gram positive bacteria and some plant pathogenic fungi. It can induce abnormal branching hyphae for *Pillicularia sasakii*, a pathogen of sheath blight of rice plant.

After isolation and purification with column chromatography and high performance liquid chromatography, pure sample was analysed by UV (with end absorption), IR (with peak at 2920, 1740, 1450, 1370 cm^{-1}), NMR (four singlets at 1.04, 1.294, 1.208, 1.524 ppm), HPLC (with retention time 1.37 min.) etc., these results showed that physico-chemical and biological characters of RVA18 are quite different from those of the products of the two parents, qingfengmycin and jinggangmycin.

It is considered that interspecific recombination of *Streptomyces* through protoplast fusion may become a valuable way for constructing a hybrid producing new antibiotic.

Key words

Metabolite; interspecific recombinant; isolation; purification