

顶头孢霉菌(*Cephalosporium acremonium*)

原生质体融合研究

杨燕玲 宋友礼 童 村

(上海医药工业研究院, 上海)

三个不同系谱的顶头孢霉菌原生质体融合研究表明营养互补的原生质体融合能形成平衡异核体, 其融合频率随不同系谱的菌株而异。不同系谱的菌株间融合, 其融合子的CPC效价同亲本的生产能力密切相关。本文报道了从高产菌株STC-2B的姐妹突变株之间的融合获得二株生长速度快、产孢子能力强、CPC效价高的二倍体菌株。

关键词: 顶头孢霉菌; 原生质体融合。

头孢菌素C(CPC)产生菌——顶头孢霉菌(*Cephalosporium acremonium*)是典型的单核细胞, 常规杂交方法形成异核体的机率很低, 采用原生质体融合技术大大地提高了融合频率^[1]。

本文采用二株CPC产生菌和一株不产CPC的三个系谱菌株进行原生质体融合, 并对融合产物的生理特征、抗生素生产能力进行分析比较, 进而研究顶头孢霉菌的遗传重组规律。

材料和方法

(一) 菌种来源及特征

1. *C. acremonium* STC-2B: 上海医药工业研究院试验菌株, 白色雪茄烟状孢子。经诱变获得 $A_2^{Cys^-w}$ 、 $A_3^{Met^-w}$ 、 $A_4^{Leu^-w}$ 、 $A_{17}^{Ly_s^-L-y}$ 。

2. *C. acremonium* C-15: 上海第三制药厂试验菌株, 土黄色雪茄状孢子, 经诱变获得 $A_{30}^{Cys^-y}$ 。

3. *C. acremonium* 3.4008: 中国微生物菌种保藏委员会保藏菌株, 粉红色椭圆形孢子, 经诱变获得 $A_{41}^{Bio^-R}$ 。

(二) 培养基

1. 基本培养基(MM): 见文献[1]。
2. 完全培养基(CM): 见文献[2]。
3. 菌丝生长培养基(PM): 蔗糖2%; 玉米浆2.35%; 醋酸铵0.45%; 灭菌前pH6.8—7.2, 121°C灭菌20min。
4. 再生培养基(RM): 将基本或完全培养基内加入NaCl, 使成0.7M渗透压稳定剂。

5. 母瓶、发酵培养基及培养条件: 见文献[2]。

(三) 酶

1. 东风纤维素酶: 上海东风生化试剂厂出品。本文称为东风纤维素酶。
2. Zymolyase 5000 或 Zymolyase 60000: 日本麒麟啤酒株式会社出品。
3. 玛瑙螺酶: 系广东褐云玛瑙消化

本文于1984年10月19日收到。

液的 -30°C 冷冻干粉。中国科学院生物物理研究所制备。

4. Onzuka R-10 纤维素酶：日本全日生化试剂有限公司出产。

上述酶液均用 0.7M NaCl pH5.8 柠檬酸—磷酸氢二钠溶液配制， $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌。

(四) 二硫苏糖醇 (Dithiothreitol DTT)

用 pH7.3 柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液配成 0.005M DTT， $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜除菌。

(五) 杂交技术

用 0.005M DTT 预处理对数生长末期的菌丝体，以 1% 东风纤维素酶或 0.1% Zymolyase 5000 酶解破壁获得原生质体。原生质体在 pH6.4 0.7M NaCl 培养基上再生。原生质体融合技术见文献 [3]。

杂交所用的营养缺陷型菌株在 28°C 培

养，异核体菌株在 MM 上为非渗漏型，自发突变率 $<10^{-6}$ ，各种类型的杂合二倍体菌株用重组剂处理，观察是否出现分离现象。

(六) DNA 含量测定

见文献 [4]、[5]，采用原生质体测。

(七) 生长速度测定

见文献 [6]。

(八) CPC 效价测定

见文献 [7]。

实 验 结 果

(一) 释放原生质体的酶

顶头孢霉菌原生质体形成、再生和融合过程见图版 I-1-4。

几种商品来源的多糖酶释放原生质体的效果见表 1。

由表 1 可见 Zymolyase 5000 及东风

表 1 几种商品酶释放原生质体的效果

Table 1 Effect of different commercial enzyme for release of protoplasts

酶 制 品 Enzyme	酶 浓 度 Conc. of enzyme (%)	10^6 原生质体数/ml $10^6 \times$ Protoplast yield/ml (mean \pm s, d)	
		DTT 预处理 Pretreatment with DTT.	DTT 不处理 No pretreatment
Onzuka R-10	2	3.69 ± 1.63	0.125 ± 0.2
东风纤维素酶 Dong-Feng Cellulase	1	68.0 ± 28.35	1.94 ± 1.2
玛瑙螺酶 Achatinase	1	10.5 ± 9.7	1.5 ± 0.2
Zymolyase 5000	0.1	204 ± 137	20.7 ± 8.3
Zymolyase 60000	0.1	102 ± 98	—

28°C 酶解 2h Release for 2h at 28°C

纤维素酶比较适合酶解经 DTT 预处理的顶头孢霉菌菌丝体细胞壁。酶解反应 2h 绝大多数菌丝体释放出原生质体 (图版 I-1-3)。从这二种酶的酶解反应过程取样计

数可见 50—80% 的原生质体是酶解反应 1h 后获得的 (图 1)。延长反应时间，原生质体产量增加不显著。将 Zymolyase 5000 与东风纤维素酶以 1:1 混合，酶解

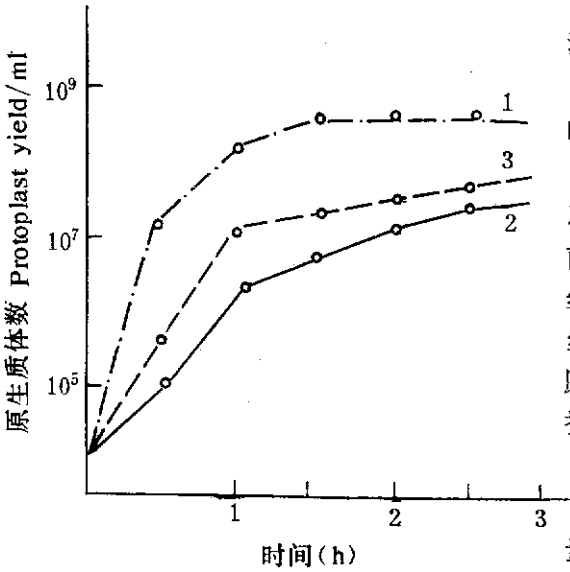


图1 原生质体释放曲线

Fig.1 The course of protoplast release

1. 0.1% Zymolyase 5000
 2. 1% Dong-Feng cellulase
 3. 0.1% Zymolyase 5000 + 1% Dong-Feng cellulase (1:1)
- 0.005M DTT预处理
Pretreatment with 0.005M DTT

活力介于两者之间(图1)。

(二) 菌丝体培养期对原生质体形成的影响

菌丝体的生理状态是决定原生质体形成和释放的重要因素之一。不同培养期的菌丝体对裂解酶的敏感程度不同, 年幼菌丝比年老菌丝敏感。48h的顶头孢霉菌菌丝体原生质体释放量最大, 72h的菌丝体原生质体释放量显著减少, 与Fawcett^[8]报道的结果相似。

(三) 异核体的形成

10^6 — 10^7 营养要求不同的原生质体等量混合, 经PEG处理后分离于高渗的MM上, 28℃培养4—5天, 部分菌株在MM上能再生少量的异核体菌落, 将这些异核体菌落分离于CM上能分离出二种直接亲本型菌落。

从三个不同系谱的菌株配对融合结果(表2)可见原始菌株3.4008诱发的营养

表2 各种类型的营养缺陷型菌株间的融合率

Table 2 Fusion frequency between various auxotrophs

融合配对菌株 Fusion combination	融合率 Fusion frequency (%)	融合配对菌株 Fusion combination	融合率 Fusion frequency (%)
$A_2^{Cys^-w} \times A_3^{Met^-w}$	5.19×10^{-3}	$A_{17}^{Lys^-L-Y} \times A_{30}^{Cys^-Y}$	3.57×10^{-3}
$A_3^{Met^-w} \times A_4^{Leu^-w}$	2.36×10^{-3}	$A_{21}^{Bio^-R} \times A_{17}^{Lys^-L-Y}$	1.04
$A_4^{Leu^-w} \times A_{17}^{Lys^-L-Y}$	1.67×10^{-3}	$A_{41}^{Bio^-R} \times A_3^{Met^-w}$	2.6×10^{-6}

缺陷型 $A_{41}^{Bio^-R}$ 较容易发生异核现象, 高产的STC-2B诱发的营养缺陷型间的融合, 形成异核体的频率较低, 这可能是高产菌株经长期诱变育种后遗传背景复杂造成的。说明异核体的形成是受遗传控制的。

三个不同系谱的菌株配对融合形成的异核体分成二种菌落类型。第一种是高产的STC-2B诱发的营养缺陷型姐妹株间形

成的异核体, 生长速度快、形态结构与原始亲株STC-2B无明显的差异(图版I-5)。黄色低产试验菌株 $A_{30}^{Cys^-Y}$ 与STC-2B的营养缺陷型菌株融合形成的菌落亦同STC-2B相似。第二种是粉红色原始菌株3.4008与高产菌株STC-2B的营养突变株间融合形成的异核体菌落产生粉红色孢子, 菌落结构紧密, 无放射沟, 与融合亲株形态都不同(图版I-6—8)。

(四) 杂合二倍体的形成及其稳定性

将 10^6-10^7 异核体菌落形成的孢子分离于MM平板上,形成少量的原养型菌落,将这些原养型菌落以相同浓度分离在MM和CM平板上,出现二种情况,一种在MM与CM平板上生长菌落数一致的,表现为稳定的原养型,另一种是不稳定的原养型。不稳定的原养型菌株可从 $A_3^{Met^-w} // A_{30}^{Cys^-y}$ 异核体的分离得到证实。

从MM上生长的 $A_3^{Met^-w} // A_{30}^{Cys^-y}$ 异核体菌落随机挑出51株分离于MM和CM平板上,发现9株为不稳定的原养型,其中二株黄白镶嵌的不稳定原养型在MM上不能生长,而在CM上分离出二个直接亲本的基因型(Met^-w 、 Cys^-y),它们是

异核体。有二株黄色不稳定原养型在MM上形成较少的异核体,在CM上形成亲本及非亲本型,我们推断这些非亲本型是经染色体交换或单倍化的结果,因此是杂合子。这种现象在Hamlyn^[11]和Nüesch^[10]的报道中亦有阐述,说明顶头孢霉菌是典型的准性生殖真菌,二倍性是暂时的。

顶头孢霉菌的杂合二倍体获得是困难的,但亦能从稳定的原养型菌落中分离得到,根据杂种的每个核的DNA含量及分生孢子大小确定它的倍性(表3)。由表3可见 D_{23} 、 D_{417} 菌株的分生孢子略大,每个核DNA含量接近二倍,初步断定为杂合二倍体。进一步从它们的生理特性及遗传学分析来证明。

表 3 杂种倍性的确定

Table 3 Estimate of hybrid ploidy

菌 株 Strain	分生孢子大小 Size of conidium (μm)	核数/原生质体 No. of nuclei Per Protoplast	DNA/ 10^7 原生质体DNA Per 10^7 Protoplast (μg)	DNA/核 DNA Per nucleus (μg)	倍 性 Ploidy
直接亲本 Parent $A_2^{Cys^-w}$	2.8×4.45	1	0.15	0.15×10^{-7}	n
直接亲本 Parent $A_3^{Met^-w}$	2.7×4.2	1	0.24	0.24×10^{-7}	n
杂 种 Hybrid D_{23}	3.3×5.5	1	0.34	0.34×10^{-7}	2n
直接亲本 Parent $A_4^{Leu^-w}$	3.0×4.7	1	0.18	0.18×10^{-7}	n
直接亲本 Parent $A_{17}^{Lys^-L-y}$	2.9×4.4	1	0.225	0.225×10^{-7}	n
杂 种 Hybrid D_{417}	3.4×5.0	1	0.38	0.38×10^{-7}	2n
原始亲本 Wide type STC-2B	3.0×4.6	1	0.24	0.24×10^{-7}	n

(五) 杂合二倍体 D_{23} 、 D_{417} 的生理

特性

1. 杂合二倍体 D_{23} 、 D_{417} 的萌发率及生长速度

杂合二倍体 D_{23} 、 D_{417} 在 P_M 上孢子萌发率及在CM液体或固体培养基上的生长速度及孢子形成量均比原始亲本STC-2B

高(表4)。

2. 杂合二倍体分离诱导

顶头孢霉菌形成杂合二倍体的机率很低,但从稳定的原养型菌落中获得二倍体菌株则是比较稳定的, D_{23} 、 D_{417} 经两代自然分离都不能检出分离子,只有经重组剂PFA处理后才产生双亲的基因型及重组

表 4 二倍体菌株D₂₃、D₄₁₇生理特性
Table 4 Property of diploid strain D₂₃ and D₄₁₇

菌 株 Strain	萌发率 (%) a. Per-cent germination	孢子形成 ^b . Sporulation	CM固体介质上生长速度 (mm/h) Growth rate on CM solid medium	深层培养的生长速度 (g/l) Growth rate in submerged culture
直接亲本 Parent A ₂ Cy1-w	36.24	5.0 × 10 ⁴	0.031	16.45
直接亲本 Parent A ₃ Met-w	64.86	4.6 × 10 ⁴	0.032	17.4
二倍体 Diploid D ₂₃	73.18	5.8 × 10 ⁵	0.051	19.57
直接亲本 Parent A ₄ Leu-w	44.64	6.0 × 10 ⁴	0.024	10.96
直接亲本 Parent A ₁₇ Lys-L-Y	42.9	4.1 × 10 ³	0.018	6.84
二倍体 Diploid D ₄₁₇	76.2	1.26 × 10 ⁵	0.056	18.6
原始亲本 Wide type STC-2B	85.0	7.0 × 10 ⁴	0.044	14.4

a. 在CM液体培养基上28℃培养24h, 计算200个孢子发芽平均值
Average of germination in CM solution of 200 spores 24h, incubation at 28℃.

b. CM平板上培养三星期后, 每个菌落平均孢子数
No. of spores per colony on CM plate after cultivation 3weeks at 28℃.

基因型的分离(图版 I—9)。

3. 杂合二倍体的纯化菌株D₂₃₋₂₄₋₂、D₄₁₇₋₂₋₆的突变率

用各种剂量的紫外线(253nm 30cm 1'、3'、5')照射 STC-2B及二倍体的纯化株D₂₃₋₂₄₋₂、D₄₁₇₋₂₋₆, STC-2B的存活率比二倍体菌株都高, 它对紫外线的敏感度显然不及二倍体菌株。当它们受到相同剂量的紫外线照射后, 二倍体菌株产生的形态变异率较原始菌株 STC-2B 高, 尤以

小菌落类型的突变率比 STC-2B 更为显著(表5)。预计利用纯化的杂合二倍体菌株诱发突变, 其突变率比未经重组的菌株高, 有可能获得有利性状的重组体菌株。

讨 论

三个不同系谱的顶头孢霉菌原生质体融合研究表明营养互补的原生质体融合能形成平衡异核体, 其融合频率随不同系谱的菌株而异(表2)。

从三个不同系谱的菌株融合, 其融合子的抗生素分泌能力分析表明(表6)不能合成CPC的原始亲本3.4008的营养突变株A₄与高产的 STC-2B 诱发的营养缺陷型A₂进行融合, 获得的原养型产生丰富的粉红色孢子, 但不产CPC。低产试验菌株C-15诱发的营养缺陷型A₃₀与高产菌株 STC-2B 的营养缺陷型A₁₇融合, 形成的菌落形态类似 STC-2B, 其CPC产量介于

表 5 二倍体经紫外线照射后的突变率
Table 5 Mutation frequency of diploid after UV radiation

菌 株 Strain	正常型 Normal (%)	变异型 Abnormal (%)	小菌落突变型 Petites (%)
STC-2B	83.66	26.75	1.56
D ₂₃₋₂₄₋₂	61.46	26.75	11.78
D ₄₁₇₋₂₋₆	75.75	17.35	6.9

UV (253nm) 30cm 3min radiation

表 6 杂种的CPC产量
Table 6 CPC Production of hybrid

菌 株 Strain	I	I	平 均 值 mean ($\mu\text{g/ml}$)	百 分 率 Per-cent (%)
原始亲株 STC-2B Wide type STC-2B	5600	5364	5484	100
直接亲株 A_2Cys-w Parent	5582	4730	5156	93.9
直接亲株 A_3Met-w Parent	3842	4968	4405	80.35
二 倍 体 $D_{23-24-2}$ Diploid	6066	6181	6123.5	117.88
直接亲株 A_4Leu-w Parent	4190	4652	4421	80.77
直接亲株 $A_{17}Lys-L-Y$ Parent	2105	2515	2310	42.13
二 倍 体 $D_{417-2-6}$ Diploid	6539	6384	6123.5	111.68
原 始 亲 本 C-15 Wide type	1484	1336	1410	100
直接亲本 $A_{30}Cys-y$ Parent	605	470	537.5	38.12
直接亲本 $A_{17}Lys-w$ Parent	2105	2515	2310	42.13
杂 种 H_{1730} Hybrid	648	528	580	47.30
原 始 亲 本 3.4008 Wide type	0	0	0	—
直接亲本 $A_{41}Bio-R$ Parent	0	0	0	—
直接亲本 A_2Cys-w Parent	5582	4730	5156	93.9
杂 种 H_{412} Hybrid	0	0	0	—

两株直接亲本或接近低产菌株 C-15 的水平, 没有获得接近高产菌株 STC-2B 的水平。高产菌株 STC-2B 的营养缺陷型姐妹株之间融合形成的杂种生长旺盛, CPC 效价大部分接近原始亲本, 个别比原始亲本 STC-2B 高 10—17%。预计将这两株菌株进一步诱发突变和筛选可获得高产的二倍体或单倍重组体菌株。实验结果表明顶头孢霉菌分泌抗生素的能力变化是由核基因突变的结果, 高产突变在二倍体内是隐性的, 没有相加作用^[10]。

带有营养标记的菌株往往是低产的, 因此, 在选择融合亲株时, 应挑选具有某种优良性状(如生长旺盛、产孢子丰富等), 同时抗生素产量接近原始亲本的菌株作为出发菌株, 有可能获得接近或超过原始亲本的重组菌株。

此外, 从表 6 结果表明, 杂种并没有将控制高产和产丰富孢子的基因集中在同一菌株上, 说明原生质体融合技术在基因重组方面具有一定的随机性, 所以, 在提高抗生素产量方面也具有一定程度的

盲目性。有必要采用控制育种, 定向选育高产菌株, 提高育种效率。

实验证实了顶头孢霉菌原生质体融合技术在更新遗传物质和扩增基因的育种方

面具有很大的潜力。对抗生素产生菌的遗传学研究提供了有效的工具, 具有实践和理论意义。

参 考 文 献

- [1] Hamlyn, P.F., and C.Ball: In *genetics of Industrial Microorganisms*, pp.185—191, 1979.
- [2] 张永昌等: 抗生素, 4: 4—6, 1979.
- [3] Anne, J. and J.F.Peberdy: *J. Gen. Microbiol.*, 92:413—417, 1976.
- [4] 梁平彦等: 遗传学报, 8:287—293, 1980.
- [5] Richard G.M.: *Analytical Biochemistry*, 57:369—376, 1974.
- [6] Ball, C., et al.: Hamlyn GB (31) 16528, 1978.
- [7] Claridge, C.A., et al.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 19:131—134, 1969.
- [8] Fawcett, P.A., et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 79:293—309, 1973.
- [9] Nüesch, J., et al.: In *Genetic of Industrial Microorganism.*, pp.309—334, 1973.
- [10] Hopwood, D.A., and M.J.Merrick: *Bacteriol. Rev.*, 41:595—635, 1977.

STUDIES ON THE PROTOPLASTIC FUSION IN *CEPHALOSPORIUM ACREMONIUM*

Yang yanlin Sung yuli Tung Tsun

(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry)

Balanced heterokaryons of *C. acremonium* were formed by fusion of nutritionally complement protoplasts.

The fusion frequencies were about 0.1—0.001% and changed with different lineal strains.

Heterozygotes were rarely recovered and were very unstable on CM plates. The results showed that diploidization in *C. acremonium* was transient and often followed by rapid chromosome segregation. The antibiotic productivity of the hybrid strain was associated with the parental nuclear markers and production became increased due to the nuclear mutation.

Key Words

Cephalosporium acremonium; Protoplast fusion

图 版 说 明

1. 酶解 1 h 的原生质体 (相差显微镜 45×12.5)。2. 酶解 2 h 的原生质体 (相差显微镜 45×12.5)。3. 聚合前的原生质体悬浮液 (相差显微镜 45×12.5)。4. 聚合后 16h (28°C) 形成异核体菌丝 (相差显微镜 45×12.5)。5. $A_4^{Leu^-}$ 和 $A_{17}^{Lys^-Leu^-}$ 在 MM 上形成的异核体。6. 直接亲本 $A_{41}^{Bio^-R}$ 在 CM 上。7. 直接亲本 $A_2^{Cys^-}$ 在 CM 上。8. 异核体 $A_2^{Cys^-} // A_{41}^{Bio^-R}$ 在 MM 上。9. D_{23} 在含有 0.3% PFA CM 培养基上形成的分离分子。

1. Protoplasts after 1 h incubation of Zymolyase 5000 (phase-contrast microscopy 45×12.5).
 2. Protoplasts after 2 h incubation of Zymolyase 5000, (Phase-contrast microscopy 45×12.5).
 3. Protoplast suspension before aggregation (phase-contrast microscopy 45×12.5) 4. Heterokaryonic hyphae after aggregation. (phase-contrast microscopy 45×12.5) 5. Heterokaryon on MM between A_4 and A_{17} . 6. parent strain $A_{41}^{Bio^-R}$ on CM. 7. Parent strain $A_2^{Cys^-}$ on CM. 8. Heterokaryon $A_2^{Cys^-} // A_{41}^{Bio^-R}$ on MM. 9. Segregants of D_{23} on CM containing 0.3% PFA.

杨燕玲等：顶头孢霉菌原生质体融合研究

Yang Yanlin et al.: Studies on the protoplasmic fusion in *Cephalosporium acremonium*

