

链霉素生产菌——灰色链霉菌 和热灰紫链霉菌的原生质体融合的研究

谭华荣 庄增辉 薛禹谷

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文采用原生质体融合技术, 把链霉素生产菌——灰色链霉菌 No. 45 *Streptomyces griseus* No. 45 (Lin⁺, Rif⁺) 同耐高温的不产生抗生素的热灰紫链霉菌 T272 *Streptomyces thermogriseoviolaceus* T272 (Lin⁺, Rif⁺) 进行了原生质体融合。以抗性为选择标记, 以PEG6000为助融剂, 选出了融合体。制备超薄切片后在电镜下观察了原生质体融合的详细过程。在链霉素生物合成受抑制的高温(37℃)下, 测定了融合体的抑菌活性; 从形态上与两亲株不同的46株融合体中发现6.3%的融合体既有耐高温的特性也有抑菌的活性。

关键词 灰色链霉菌; 热灰紫链霉菌; 原生质体融合

目前利用原生质体融合进行放线菌遗传学和育种方面的研究愈来愈广泛, 原生质体融合为重要抗生素产生菌的遗传育种提供了有效的手段和广阔的前景。通过原生质体融合可以提高抗生素的产量并且有的还能产生新的抗生素^[1-7], 但尚未见到通过原生质体融合能使生产菌株获得耐高温特性方面的报道。

链霉素是临床一种重要的抗生素, 高温季节发酵过程中常出现效价猛跌的现象。为了选育耐高温的菌株, 我们进行了原生质体形成, 再生及融合重组的研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

灰色链霉菌 No. 45 *Streptomyces griseus* No. 45 (S. g. No. 45) 是链霉素生产菌, 来自华北制药厂。热灰紫链霉菌 T272 *Streptomyces thermogriseoviolaceus* T272 (S. t. T 272) 是耐高温而不产生抗生素的菌株, 由本所卢运玉同志赠

送。ATCC 6633 为检测抗生素的指示菌株, 来自中国微生物菌种保藏管理委员会。

(二) 培养基

1. 生长培养基: 完全培养基(CM)按文献[1]配制。
2. 再生培养基: 在R1再生培养基^[8]的基础上补加1.0%的酵母膏, 0.5%的蛋白胨和1/10(V/V)的豌豆液。

(三) 菌丝生长及原生质体制备

1. 菌丝生长: 采用孢子接种到补充有34%的蔗糖的生长培养基中, 灰色链霉菌 No. 45在28℃振荡培养约48h; 热灰紫链霉菌T272在37℃振荡培养约24h。
2. 原生质体制备: 分别离心收集菌体, 原生质体制备方法按文献[8]进行。溶菌酶(上海东风生化试剂厂产品)用量为5 mg/ml, 溶菌温度为32℃, 灰色链霉菌和热灰紫链霉菌溶菌时间分别为60min

本文于1987年12月23日收到。

和240min。

(四) 原生质体电镜观察

融合体的超薄切片制备和电镜观察按文献〔3〕进行。

(五) 融合体的检出

以两亲株(No. 45, T272)所携带的抗性标记(Lin^r 80μg/ml, Rif^r 10 μg/ml)作为选择标志,在补加抗生素的再生平板上,挑接出37℃高温培养后长出的菌落,经五次复测具有双重抗性并在高温下对指示菌株 ATCC 6633 有抑菌活性的即为融合重组体。

(六) 抗性测定

用琼脂挖块法〔2〕对得到的融合体进行了抗菌活性的检测。

结 果 和 讨 论

(一) 原生质体的形成和再生

灰色链霉菌 No. 45 和热灰紫链霉菌 T272 在溶菌酶作用下;随着时间的延长,在相差显微镜下观察到了由菌丝体形成原生质体的过程。灰色链霉菌 No. 45 在32℃水浴保温 60min 后,菌丝体基本上全部形成了原生质体。热灰紫链霉菌 T272 在32℃保温 240min 后大部分菌丝体才形成原生质体。

在再生培养基上,灰色链霉菌 No. 45 和热灰紫链霉菌 T272 的原生质体的再生频率分别约为35%和20%。

(二) 原生质体融合

把 No. 45 (Lin^r, Rif^r) 和 T272 (Lin^r, Rif^r) 分别制成原生质体等量混合,以40% (W/V) 的 PEG 6000 为助融剂,融合混合物涂布在含有洁霉素和利福平的再生皿上,以抗性为标记直接筛选具有双重抗性 (Lin^r, Rif^r) 的融合重组体。同时把原生质体的融合混合物制备成

超薄切片〔3〕,在电镜下观察到了从细胞质到核物质融合的过程(图1)。

(三) 融合体的鉴定

1. 融合体抑菌活性的测定:链霉素发酵温度为28℃,为选育耐高温的生产菌,采用不同温度(28, 30, 32, 35 和 37℃)下检测融合体的生长及其抑菌的活性,结果见表1。在气生菌丝的颜色类似亲株 T272 的融合体中经35℃培养后,8.8%的融合体对指示菌株 ATCC 6633 有抑菌活性,但37℃培养后都无抑菌活性了。在气生菌丝的颜色类似亲株 No. 45 的融合体中经35℃培养后,42%的融合体对指示菌株有抑菌活性(图2);37℃培养后都无抑菌活性。形态上与两亲株不同即无气生菌丝形成的融合体经35℃培养后,6.3%的融合体对指示菌株有抑菌活性;37℃培养后也有占6.3%的46株融合体不但生长良好,而且也保持对指示菌株有抑菌活性(图3)。T272 原生质体后的83株再生株被测定了,对指示菌 ATCC 6633 无抑菌活性,抗性标记(Rif^r, Lin^r)也无变化;No. 45 原生质体后的112株再生株在37℃培养后,对指示菌 ATCC 6633 都无抑菌活性,抗性标记(Lin^r, Rif^r)没有改变。说明得到的具有耐高温和抑菌活性的融合体无疑是两亲株原生质体融合重组的结果。

2. 融合体的稳定性:得到的融合体经转接五次后,仍能在高温下生长并具有抑菌活性。

(四) 融合体的诱变处理

为了得到高温下产素效价比亲株 No. 45 高的融合体,把融合体 F15 (形态上不同于两亲株,37℃生长良好,并具有抑菌活性的融合体)制备成悬浮液后在紫外线(15W, 距离50cm)下照射2min(致死率约为97%),从皿皿分离检测了540个

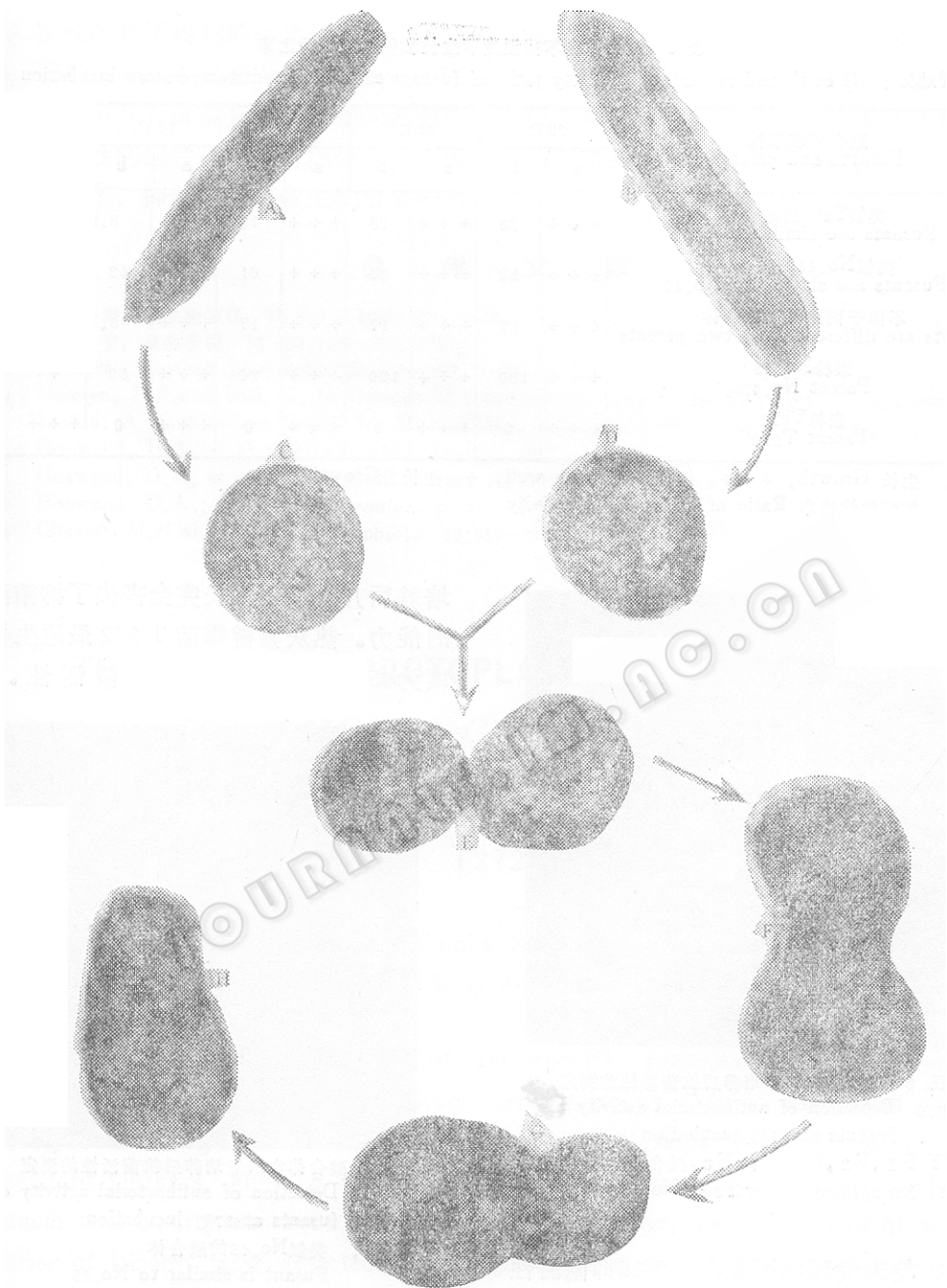


图 1 灰色链霉菌No. 45和热灰紫链霉菌 T272 的原生质体融合过程
Fig.1 The fusion process of protoplasts between *Streptomyces griseus* No. 45 and *Streptomyces thermogriseoviolaceus* T272

- A. No.45的菌丝体 Mycelium of parent S.g.No.45
- B. T272的菌丝体 Mycelium of parent S.t.T272
- C. No.45的原生质体 Protoplast of parent S.g.No.45
- D. T272的原生质体 Protoplast of parent S.T.T272
- E. 原生质体膜接触 Membrances touch between protoplasts
- F. 细胞质融合 Cytoplasm fusion
- G. 核物质相互靠近 Nucleoplasm closes each other H. 核物质融合 Nucleoplasm fusion

表 1 融合体在不同温度下生长和抑菌活性的比率

Table 1 Growth and antibacterial activity ratio of fusants under different temperature incubation

融合体和亲株 Fusants and parents	28℃		30℃		32℃		35℃		37℃	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
类似T272的融合体 Fusants are similar to T ₂₇₂	+++	26	+++	26	+++	18	+++	8.8	+++	0
类似No.45的融合体 Fusants are similar to No.45	+++	83	+++	80	+++	61	+++	42	+++	0
不同于两亲株的融合体 Fusants are different from two parents	+++	17	+++	17	+++	17	+++	6.3	+++	6.3
亲株No.45 Parent No.45	+++	100	+++	100	+++	90	+++	52	+	0
亲株T272 Parent T ₂₇₂	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0	+++	0

a. 生长 Growth, +++: 生长好 Growth well, +: 生长差 Growth poor
b. 抑菌活性比率 Ratio of antibacterial activity

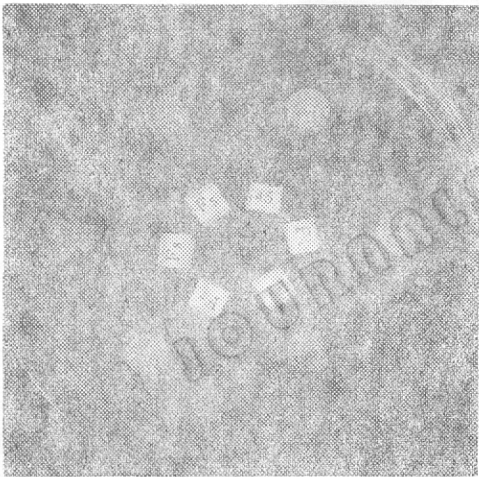


图 2 融合体在35℃培养后抗菌活性的测定
Fig.2 Detection of antibacterial activity of fusants at 35℃ incubation
FY F1, F2, F5, F7, F8: 融合子 Fusants
45: *Streptomyces griseus* No.45

培养后几乎难以生长完全丧失了抑菌活性的能力。热灰紫链霉菌 T 272 最适生长温度为45℃，但不产生任何抑菌活性。在



图 3 融合体在37℃培养后抗菌活性的测定
Fig.3 Detection of antibacterial activity of fusants at 37℃ incubation

1. 类似No.45的融合体
Fusant is similar to No.45
2. 灰色链霉菌No.45
Streptomyces griseus No.45
3. 不同于两亲株的融合体
Fusant is different from two parents
4. 热灰紫链霉菌T272
Streptomyces thermogriseoviolaceus T₂₇₂

菌落，均未发现比原融合体 F15抑菌活性高的诱变株。
上述结果表明我们所得到的融合体，尤其是在形态上有别于两亲株的融合体具有两亲株融合杂种的性状。亲株灰色链霉菌 No. 45 最适生长和发酵温度为 28℃，35℃培养后只有52%的抑菌活性率，37℃

37℃生长条件下得到的融合体不但生长良好,而且有6.3%的融合体仍有抑菌活性;但如温度再提高到40℃,则未能测到有抑菌活性的融合体。这可能是由于在更高的温度下,抑制了链霉素生物合成中有

关的酶所致。从我们得到的实验结果来看,通过原生质体融合可以获得耐高温而仍有抑菌活性的融合体;为改良这类工业生产菌株提供了有益的线索。

参 考 文 献

- [1] 薛禹谷等:微生物学报, 18 (3), 195—201, 1978.
- [2] 薛禹谷等:遗传学报, 13 (5):323—329, 1986.
- [3] Gumpert, J.: *Arch. Microbiol.* 126:263—269, 1980.
- [4] Hamlyn, P.F. and Ball, C.: In *Genetics of Industrial Microorganisms*, Ed. Sebek, O.K., and Laskin, A.I., American Society for Microbiology, Washington, D.C. 185—191, 1979.
- [5] Hopwood, D.A. et al.: *Nature*, 268:171—174, 1977.
- [6] Hopwood, D.A. et al.: *Molec. Gen. Genet.*, 162:307—317, 1978.
- [7] Hopwood, D.A.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 35:237—272, 1981.
- [8] Okanishi, M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 80:389—400.

THE STUDY OF PROTOPLAST FUSION BETWEEN *STREPTOMYCES GRISEUS* No. 45 AND *STREPTOMYCES THERMOGRISEOVIOLACEUS*

T272

Tan Huarong Zhuang Zenghui Xue Yugu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

This paper reports the result of interspecific protoplast fusion between streptomycin producer——*Streptomyces griseus* No. 45 (Lin^r, Rif^r) and *Streptomyces thermogriseoviolaceus* T272 (Lin^r, Rif^r). Fusants were selected by the resistant markers, and the detailed fusion process of cytoplasm and nucleoplasm was clearly observed under electron microscope. The antibacterial activities of fusants were detected. In morphology, 6.3% fusants are different from the two parents after incubation at 37℃, they have got both high temperature endurance and antibacterial activities.

Key words

Streptomyces griseus; *Streptomyces thermogriseoviolaceus*; protoplast fusion