

## 放线菌种间原生质体电融合育种

韩龙雄

(延边农学院, 龙井)

以龟裂链霉菌(*S. rimosus*, OTC<sup>r</sup>, Sm<sup>s</sup>)和灰色链霉菌(*S. griseus*, Sm<sup>r</sup>, OTC<sup>s</sup>)为原始出发菌株,经NTG诱变处理,获得前者(Asp<sup>r</sup>)和后者(Cys<sup>r</sup>)营养缺陷型突变株,制成10<sup>9</sup>个/ml等量原生质体混合液,在岛津细胞融合装置SSH-C<sub>11</sub>融合槽(电极间距为0.5 mm)内,以频率1 MHz、强度800 V/cm的高频交流电场作电介质,电泳15 s形成原生质体珠串,旋即施加电场强度6 kV/cm、短程20 μs的直流高压方形电脉冲触发原生质体融合,在R<sub>3</sub>再生培养基上选取34971个菌落,移植于双抗基本培养基,检出四个双抗原养型融合子。它们具有亲株的优良生物学特性,生长速度较快,产素能力大,抗菌活性高。生物显影结果表明,它还产生两个亲株所不具有的抗菌活性物质。

**关键词** 原生质体电融合;融合子;抗菌活性

原生质体融合由于伴随着染色体融合和细胞质融合,比一般基因重组优越,是一项新的重组育种手段。Yamashita等应用放线菌的原生质体融合,为新抗生素的探索开辟了新领域<sup>[1,2]</sup>。过去,放线菌原生质体融合,多采用聚乙二醇(PEG),它有残存毒性,融合率较低等缺陷。现今开始应用的电融合等物理融合技术,具有操作简单,融合率高,有重现性,可以在光镜下观察到融合过程等优点,因此在国内外普遍受到欢迎。在国外,岡村等已确立放线菌原生质体电融合技术<sup>[3]</sup>,分离出产生新抗生物质的融合子<sup>[4]</sup>。在国内,也有酵母菌原生质体电融合研究的报道<sup>[5,6]</sup>。至于电诱导放线菌原生质体的融合研究,尚未见报道。

本试验以抗革兰氏阳性细菌和阴性细菌、抗酵母菌和抗霉菌的高产广谱抗生素产生菌选育为目的,进行*S. rimosus*和*S. griseus*种间原生质体电融合,本文报道这些实验的部分结果。

## 材料和方法

### (一) 菌株

原始出发菌株为龟裂链霉菌(*S. rimosus*)IFO<sub>12907</sub>和灰色链霉菌(*S. griseus*)IFO<sub>3357</sub>,分别用亚硝基胍(NTG)进行诱变获得营养缺陷型突变株,用作融合亲株。前者对后者所产抗生素轻度敏感,而后者对前者所产抗生素高度敏感。

### (二) 培养基

1. 3% TS培养基(DIFCO制, USA)<sup>[7]</sup>, pH7.2。

2. 1%甘氨酸TS培养基: 3% TS培养基含甘氨酸1%。

3. 完全培养基(%): 酵母膏0.1, 牛肉膏0.1, N、Z氨络物A型(DIFCO制, USA)0.2, 麦芽糖水和物1.0, pH7.3。

本文于1990年5月14日收到。

本研究系笔者1988-1989年学者访问研究期间承日本高知大学农学部长崎龟教授具体指导,实验过程中又承蒙味圆春雄助教、永田信治助手、岡村德光博士协助,在此一并致谢。

4. 基本培养基<sup>[8]</sup>(%)：葡萄糖 1.0, 琥珀酸铵 0.1, NaCl 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, pH7.2。

5. P培养基<sup>[9]</sup>：蔗糖103g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25g, 微量元素溶液 (ZnCl<sub>2</sub> 40mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10mg, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 200 mg, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 10mg, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10mg, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Mo<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 10 mg, H<sub>2</sub>O 1000ml) 2 ml, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2.03g, 纯水 800ml, 消毒后分别单加消毒的0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10ml, 3.68% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 100ml, 0.25mol/L GOOD 氏 TES缓冲液100ml。

6. R<sub>3</sub>再生培养基<sup>[10]</sup>：葡萄糖10g, 琥珀酸二钠 5g, 蛋白胨 4g, 酵母膏 4g, KCl 0.5g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.81g, 纯水 700ml, 消毒后分别单加 0.02% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 100ml, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100ml, 0.25mol/L GOOD 氏 TES 缓冲液100ml。采用双层培养法, 底层含普通琼脂 1.6%, 上层含低熔点琼脂糖(日本国产)0.4—0.5%。

7. 发酵培养基(%)：葡萄糖 3.0, 玉米浆1.0, 脱脂饼粉 0.5, NaCl 0.5, NaNO<sub>3</sub> 0.3, CaCO<sub>3</sub> 0.5, pH7.3。

### (三) 营养缺陷型突变株的获得<sup>[8]</sup>

用MS溶液洗刷孢子, 制10<sup>8</sup>—10<sup>9</sup>个/ml菌悬液, 加入溶有NTG的0.05mol/L TM缓冲液(pH9.0), 则NTG最终浓度为1.5mg/ml, 30℃, 保温70min。处理后, 先用5μm、后用0.22μm膜滤器收集孢子, 移植于液体基本培养基中, 30℃, 培养14h, 再用5μm膜滤器除去发芽的孢子, 依同法移植5次浓缩营养缺陷株。然后将浓缩液适当稀释, 涂抹于完全培养基令其形成菌落, 以负片选择法检出营养缺陷株, 最后按生长谱法<sup>[11]</sup>确定氨基酸营养

缺陷型突变株。

此突变株对链霉素(Sm)和土霉素(OTc)的敏感度, 则采用药物试管两倍稀释法测定。

### (四) 原生质体的制备

参照陶西等方法<sup>[9]</sup>进行了改良。将两亲株分别接种于试管TS培养基(内含玻璃珠6粒), 30℃振荡培养2天, 接着按5%接种量移植于甘氨酸TS培养基, 振荡培养20h, 3500rpm离心20min收集菌体, 用P培养基洗2次并悬浮, 加入用P培养基配好的溶菌酶(SIGMA USA)和消色肽酶, 使之最终浓度为2mg/ml, 30℃, *S. rimosus* 70min, *S. griseus* 50 min, 3500rpm离心20min, 弃上清液, 沉淀物用P培养基洗一次, 用0.3mol/L蔗糖溶液洗两次, 过5μm膜滤器收集原生质体, 以10<sup>9</sup>个/ml悬浮于0.3mol/L蔗糖溶液, 以备电融合之用。

### (五) 原生质体的电融合

采用岛津细胞融合装置SSH-1, 按岡村等的电融合法<sup>[4]</sup>, 先将两种原生质体, 以1:1的比例混合, 取其少许注入自制融合小池中(图1), 在镜台上接通主机, 检查原生质体密度、溶液的稳定性和原生质体珠串的形成(图2), 初步确认电融合条件。

取10μl原生质体混合液注入SSH-C<sub>11</sub>电融合槽(电极间距为0.5mm)内, 在800V/cm、1MHz高频交流电场, 电泳5—30s, 形成原生质体珠串, 旋即施加4—8kV/cm强度、短时程20μs方形电脉冲触发原生质体融合。

### (六) 原生质体的再生

按照白滨等方法<sup>[12]</sup>进行, 经电融合的原生质体溶液适当稀释后, 取0.1ml滴入R<sub>3</sub>底层平板上, 迅速铺盖40℃R<sub>3</sub>上层培养基5ml, 超净箱内蒸发掉平板表面水

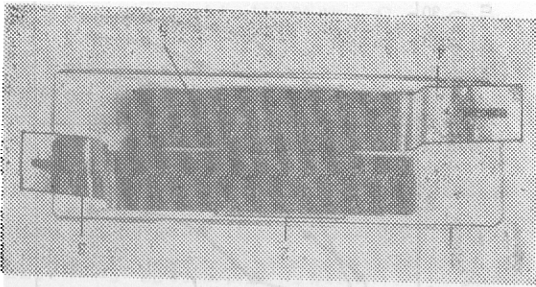


图 1 融合小池 (自制)

Fig.1 Fusion microchamber

1. 载玻片 Slide glass
2. 盖玻片 Cover glass
3. 铝箔电极(+) Aluminum foil electrodes(+)
4. 铝箔电极(-) Aluminum foil electrodes(-)
5. 电极间距 Apart 0.5 mm

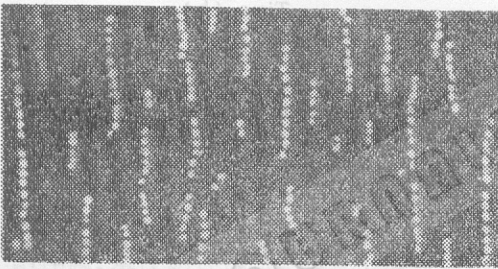


图 2 原生质体珠串

Fig.2 Chains of protoplasts

分, 在30℃培养8—10天。

### (七) 融合子的检出及考察

根据再生菌落的营养要求、抗药性变化和生物显影所示的抗菌活性物的变化进行检出。先将再生菌落影印在基本培养基上, 淘汰营养缺陷型突变株, 把生长的菌落用牙签法再度移植于含双抗基本培养基, 选择双重抗性株, 看作原养性双抗融合子。

将两个亲株和融合子发酵液, 经离心分离上清液和菌丝体。菌丝体用等体积丙酮提取活性物质。抗菌活性测定按杯碟法。生物显影采用硅胶60F<sub>254</sub> (MERCK

制), 展开剂为醋酸乙酯: 异丙醇: 水(65:24:11), 试验菌为 *B. subtilis* ATCC6633。

## 结果和讨论

### (一) 营养缺陷型突变株及其抗药性

两个供试菌种经 NTG 诱变处理, 分别获得 *S. rimosus* 天冬氨酸缺陷型 (Asp<sup>-</sup>) 和 *S. griseus* 半胱氨酸缺陷型 (Cys<sup>-</sup>), 回复突变均为10<sup>-8</sup>以下。两个突变株在培养上, 其特征同原始出发菌株有所区别, 菌落颜色变白, 产孢能力减弱, 抑菌圈偏小, 但所示位置并没有变化, 说明突变株的产素能力稍微减弱, 但产活性物的能力仍无变化。

两个突变株在标准Sm和OTc系列试管中找出的最低抑制菌浓度(即无突变株生长者)是, *S. rimosus* 对Sm 100μg/ml, *S. griseus* 对OTc 25μg/ml。

### (二) 原生质体的电融合

电融合条件为原生质体浓度10<sup>8</sup>个/ml, 800V/cm、1 MHz 高频电场, 形成约由10多个细胞组成的原生质体珠串, 珠串成直链且不颤动; 施加高压方形电脉冲时, 在光镜下能看到40—50%的原生质体对被破坏。实验结果表明, 在高频电场中最佳电泳时间是15s, 固定短时程20μs时, 最佳高压电场强度为6 kV/cm。但须指出, 电泳前必须把原生质体溶液中的P培养基成分用0.3mol/L蔗糖溶液冲洗干净, 否则, 其中各种盐类成分会影响原生质体珠串的稳定性的。

### (三) 融合子及其生物学特性

从R<sub>3</sub>再生培养基上共选取34971个菌落, 用影印法移植于基本培养基, 获得83个原养型菌落, 然后再用无菌牙签逐个点种到双抗基本培养基, 检出9个双重抗性菌落, 看作原养型双抗融合子。这些融合子

的抗药性分别为 Sm200 $\mu$ g/ml 和 OTe 50  $\mu$ g/ml。

融合子在培养特征上和融合亲株有明显区别, 介于两个原始出发菌株之间, 而且不同融合子之间也有些差异。LH-04融合子菌落呈龟裂状、气丝灰褐、基丝褐红, 略产生褐色素。

图3为融合子和两个亲株的生物显影结果。融合子所示抑菌斑点位置和形状, 大致与*S. rimosus*相似, 但是在中间还能发现两个亲株所没有的新的抑菌斑点, 它可能是新的抗菌活性物质。

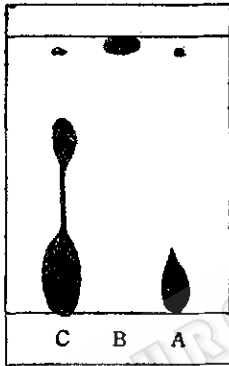


图3 融合子和亲株生物显影  
Fig.3 Bioautograph of the products from Parent strains and fused strain  
A. 亲本Parent *S. rimosus*  
B. 亲本Parent *S. griseus*  
C. 融合子Fusant LH-04

(四) 融合子的生长及产素能力

图4为融合子和亲株在盛有等体积完全培养的振荡摇瓶中, 每隔24h测得的OD<sub>610</sub>nm值和每一样品对试验菌的抑菌大小。

图4表明, 融合子LH-04早期生长较快, 其生长速度与亲本*S. griseus*接近, 培养48h就开始显现抑菌圈, 到72h抑菌圈最大。亲本*S. griseus*在本培养基中生长快, 但产素能力较低, *S. rimosus*则与之相反。

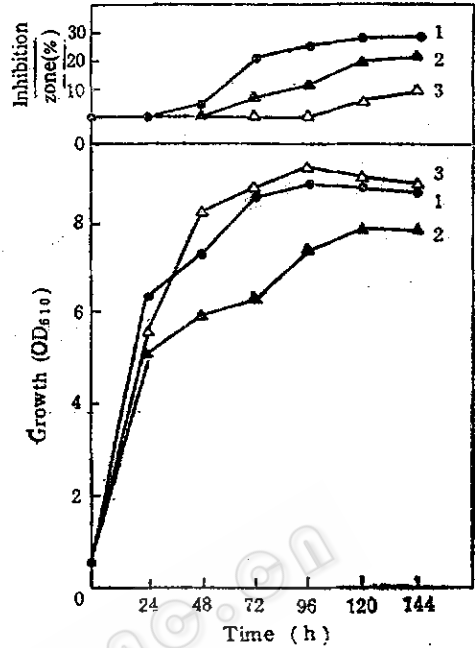


图4 融合子和亲株的生长及产素能力  
Fig.4 growth and antibiotic production of parent strains and fusant  
1. 融合子 Fusant LH-04  
2. 亲本 Parent *S. rimosus*  
3. 亲本 Parent *S. griseus*

(五) 融合子的抗菌活性及抗菌谱

将融合子和两个原始出发菌株分别接入发酵培养基中, 振荡培养6天, 离心取上清液, 过0.2 $\mu$ m膜滤器。精确吸取滤液于盛有5ml肉汤培养基的一系列试管中, 使浓度约成两倍递度。然后, 接种试验菌, 培养24h, 检查发酵滤液对试验菌的最低抑菌浓度。

表1 融合子和亲株的抗菌活性  
Table 1 Antibacterial activity of parent strains and fusant

微生物 Organisms	培养滤液( $\mu$ l/ml培养基) Filtrated cultures( $\mu$ l/ml of medium)							
	400	200	100	50	25	15	10	5
<i>S. rimosus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>S. griseus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
LH strain	+	+	+	+	+	+	-	-

+, 表示抑菌 Inhibition  
-, 表示不抑菌 not Inhibition

表 1 指出, 最低抑菌浓度分别为: *S. rimosus* 100 $\mu$ l/ml 培养基, *S. griseus* 200 $\mu$ l/ml 培养基, 融合子 LH-04 15 $\mu$ l/ml 培养基。为了查明菌丝体中抗菌物质的活性, 精称湿菌体 1 g, 用等量丙酮提取, 杯碟法测定抑菌圈直径, *S. rimosus* 22.5 mm, *S. griseus* 16.5mm, LH-04 strain 22.7mm。说明融合子的抗菌活性明显超过亲株。

表 2 融合子和亲株的抗菌谱

Table 2 Antimicrobial spectra of parent strains and fusant

微生物 Organisms	抑菌圈 Inhibition zone(mm)				
	大肠杆菌 <i>E.coli</i>	桔草芽孢杆菌 <i>B.subtilis</i>	酿酒酵母 <i>S.cerevisiae</i>	爪哇毛霉 <i>M.java-nicus</i>	米曲霉 <i>A.oryzae</i>
<i>S. rimosus</i>	19.0	22.0	26.5	21.5	21.5
<i>S. griseus</i>	14.0	10.0	—	—	—
LH strain	20.5	23.0	30.0	36.5	22.5

—, 不产生抑菌圈 Inhibition zone was not formed

由表 2 可见, 融合子的抗菌谱与 *S. rimosus* 一致, 所产生的抗生素均对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母菌和霉菌显示抗菌作用, 而且其抗菌活性强于两个亲株。

上述实验结果表明, 岡村等设计的放线菌原生质体电融合条件是可行的。以 800V/cm、1 MHz 高频交流电场, 可以

形成原生质体珠串, 6 kV/cm 强度方形电脉冲能触发原生质体融合。目前, 放线菌原生质体融合育种技术逐渐向实用化发展<sup>[1,2,4,13]</sup>。山下指出, 多重抗药性融合子会产生亲株所没有的新抗生素。果然, 我们选育的双重抗药性融合子不仅保留着两个亲株的优良生物学特性, 而且还产生两个亲株所没有的抗菌活性物质。虽然目前还不知晓这新抗菌活性物质的性质, 但这些结果可以说明, 原生质体融合的遗传重组形式是多种多样的, 而且电场诱导原生质体融合也是一种有效手段。据文献, 新抗菌活性物质的产生可能是隐藏的“沉默基因”, 在融合过程中被诱发而表达, 或者产素合成代谢途径被混成, 导致异常合成系, 从而产生具有抗菌活性的前体物质。因此, 本试验所获融合子的遗传基因和抗菌活性物质的证据尚待深入研究。

总之, 放线菌种间原生质体电融合技术, 只要掌握好电融合条件, 如细胞浓度、高频交流电场电压、细胞电介质电泳时间、直流电脉冲电压、幅度和时间等, 可在改良工业菌株, 提高抗生素产量, 增强抗菌活性, 并获得新产素杂种菌株方面实际应用。

## 参 考 文 献

- [1] Yamashita, F. et al.; *J. Antibiot.*, 38:58—63, 1985.
- [2] Hotta, K. et al.; *J. Antibiot.*, 38:64—69, 1985.
- [3] Okamura, T. et al.; *Agric. Biol. Chem.*, 52:1433—1438, 1988.
- [4] Okamura, T. et al.; *J. Ferment. Bioeng.*, 67:221—225, 1989.
- [5] 汪和盛等; *生物工程学报*, 2(3):44—51, 1986.
- [6] 张博涵等; *生物工程学报*, 2(4):29—34, 1986.
- [7] Baltz, R. H. et al.; *J. Gen. Microbiol.*, 107:93—102, 1978.
- [8] 石川辰夫编; *微生物遗传学实验法*, pp. 301—303, 共立出版, 东京, 1985.
- [9] Okanishi, M. et al.; *J. Gen. Microbiol.*, 80:389—400, 1974.
- [10] 岡西昌则; *遗传子组换元实用化技术第三集*, pp. 127—132, フジテケノ シズテム, 东京, 1981.
- [11] 东京大学农芸化学、教室编; *实验农芸化学*, pp. 267—270, 朝仓书店, 东京, 1980.
- [12] Shirahama, T. et al.; *Agric. Biol. Chem.*, 45:1271—1273, 1981.
- [13] Gomi, S. et al.; *J. Antibiot.*, 37:1491—1494, 1984.

## Interspecific Hybridization of *Streptomyces* by Electrofusion

Han Longxiong

(Yan Bian Agricultural College, Long jing)

Interspecific electrofusion between protoplasts of *Streptomyces rimosus* Asp<sup>-</sup>Otc<sup>r</sup> and *S. griseus* Cys<sup>-</sup>Sm<sup>r</sup>, derived from *S. rimosus* IFO 12907 and *S. griseus* IFO 3357, respectively, by nitrosoguanidine treatment, was done. After the fusion treatment, protoplasts were regenerated on the R<sub>3</sub> medium. The colonies appeared on the regeneration plates were selected successively for prototrophy and resistance to both oxytetracycline and streptomycin, and finally 9 out of 34 971 regenerants were isolated as a fusant. The phenotypes of the fusants resemble those of the parent strains. One of the fusants, designated as LH strain grows faster and accumulates more microbicide(s) in the culture medium than its parent strains do. The microbicide(s) acts on a wide range of microorganisms such as Gram-positive and Gram negative bacteria, streptomycetes, yeasts, and fungi. Component of the microbicide(s) has not been clarified, but the presence of an antibiotic, which is distinguishable from the products of the parent strains by bioautographic analysis, was suggested.

### Key words

Electrofusion of protoplasts; fusant; antimicrobial activity