

金色链霉菌转化系统的优化*

孟 春¹ 郭养浩^{1**} 叶 勤² 石贤爱¹ 陈剑峰¹

(福州大学侨兴轻工业学院 福州 350002)¹ (华东理工大学生物工程学院 上海 200237)²

摘要: 12%的蔗糖浓度、0.5%甘氨酸、溶菌酶酶解 1h, 是金色链霉菌原生质体制备的较优条件。采用麸皮再生培养基替代 R2YE 再生培养基, 原生质体再生率、生长及筛选效果得到明显改善。P-buffer 介导的质粒转化效率高于 T-buffer, 33%的 PEG1000 是质粒转化金色链霉菌原生质的最适浓度。

关键词: 金色链霉菌原生质体, 麸皮培养基, 质粒转化

中图分类号: Q815 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0014-04

OPTIMIZATION OF TRANSFORMATION SYSTEM OF *STREPTOMYCES AUREOFACIENS*

MENG Chun¹, GUO Yang-Hao¹, YE Qin², SHI Xia-Ai¹, CHEN Jian-Feng¹

(Qiao Xing College of Industry, Fuzhou University, Fuzhou 350002)¹

(College of Biotechnology, ECUST, Shanghai 200237)²

Abstract: 12% sucrose, 0.5% glycine and 1 hour enzymolysis of lysozyme were the optimal conditions for preparation of *Streptomyces aureofaciens* protoplast. The effect of protoplast regeneration and screen was enhanced when R2YE medium was replaced by bran medium. P-buffer was better than T-buffer in plasmid transformation process. 33% PEG1000 was the fit concentrations for plasmid transformation.

Key words: Protoplast of *Streptomyces aureofaciens*, Bran medium, Plasmid transformation

链霉菌是一类经济价值极高的微生物, 产生许多非常重要的次级代谢产物如抗生素、生物添加剂等。但链霉菌菌种改进、生产过程的优化工作, 仍处于经验操作水平。随着基因克隆技术的逐步完善和对链霉菌基因表达研究的逐步深入, 已发现链霉菌原生质体经 PEG 处理后可以有有效的吸收外源 DNA, 因而成为重组 DNA 技术中表达异源基因的另一良好宿主, 从而开辟了利用重组克隆技术产生新的抗生素的途径^[1,2]。在重组 DNA 技术的使用过程中, 要使外源 DNA 良好的克隆进宿主原生质体中, 制备优质的宿主原生质体、建立理想的转化条件和转化子的再生成为关键步骤^[3], 由于不同的链霉菌菌株具有各自的特性 (如营养要求不同、菌本身的胞壁结构不同、生长条件不同等), 其原生质体制备条件、转化条件也各不一致。本文针对金色链霉菌的菌株特性, 以质粒 pIJ702 的转化为研究对象, 对影响原生质体制备和质粒转化的因素进行了研究, 同时也为其它链霉菌开展基因工程方面的研究提供参考。

* 福建省科委资助项目 (No. 99-H-46)

福州大学科技发展基金项目 (No. XKJ (QD) - 0130)

** 联系人

作者还有: 温 藤, 陈 春

收稿日期: 2001-04-25, 修回日期: 2001-06-11

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒

金色链霉菌：本教研室保存；质粒 pU702 为厦门大学苏文金教授馈赠。

1.2 试剂及培养基的配置

溶菌酶、P-buffer、T-buffer、YEME 培养基、再生培养基 R2YE 配制见文献 [3]。麸皮再生培养基：麸皮 2.5g，琼脂 2g；磷酸氢二铵 0.05g；硫酸铵 0.2g；葡萄糖 1g，定容至 100mL。原生质体计数：血球计数法。原生质体制备、转化、再生及筛选方法参考文献[3, 4]。

2 结果与讨论

2.1 原生质体制备条件的研究

链霉菌培养基 YEME 中含有 34% 的蔗糖，保持链霉菌菌丝在培养液中的分散状态，保证溶菌酶作用菌丝的方便，但与变铅青等链霉菌不同，金色链霉菌在 YEME 培养基中生长较差。

在培养基中添加不同蔗糖浓度的生长实验表明：过高的蔗糖浓度，抑制了金色链霉菌的生长。进一步的研究表明，金色链霉菌对蔗糖利用速度较快，培养基中 24%、36% 蔗糖浓度过高，在培养过程中造成有机酸大量累计，pH 下降至 5 以下（图 1），造成金色链霉菌生长较差。12% 的蔗糖可保证菌体的正常生长，且菌丝保证一定的分散程度，利于溶菌酶的作用。

在培养基中添加一定浓度的甘氨酸，可影响链霉菌（革兰氏阳性菌）细胞壁的结构，破坏细胞壁肽聚糖短肽间的交联，引起细胞壁结构的不完整，以便于酶解破壁。考虑到酶解时间和甘氨酸浓度对溶酶效率的交互影响，逐选择 3 种酶液浓度 0.2%、0.5%、1%，两种酶解时间 1h、2h，进行正交实验，对培养 48h 的金色链霉菌进行原生质体制备条件优化实验。

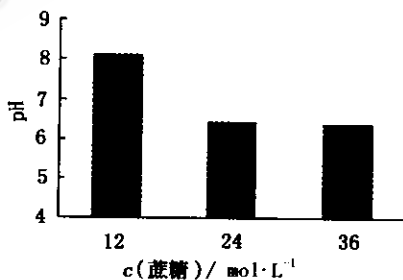


图 1 培养 48h 不同蔗糖浓度的发酵液 pH 值

表 1 不同条件对金色链霉菌原生质体形成的影响

甘氨酸浓度 (%)	酶解时间 (h)	培养 48h 菌体量 (v/v)	原生质体数 (个/mL)
0.2	1	3.2%	0.136×10^5
0.2	2	3.4%	1.5×10^5
0.5	1	5.3%	2.03×10^5
0.5	2	5.5%	0.99×10^5
1	1	2.9%	3250
1	2	3.0%	2100

实验结果表明（表 1）：不同浓度的甘氨酸对金色链霉菌生长和原生质体的得率有较大影响。培养基中 0.5% 甘氨酸浓度、酶解 1h，可得到较高的原生质体制备效率。1% 的甘氨酸浓度可能过大规模的干扰了菌体的生长，虽然菌体细胞壁结构易于为溶菌酶破坏，但菌体量得率较低，影响了最终原生质体得率；较

低的甘氨酸浓度（0.2%）可得到较高的菌体得率，但菌丝细胞壁结构较为完整，影响

了溶菌酶的扩散,与0.5%浓度相比,需酶解2h才能达到相当的结果。但酶解时间过长,在37℃的温度条件下,可能严重影响原生质体活性,降低了原生质体的质量。

2.2 金色链霉菌原生质体再生培养基的改进

原生质体再生对培养条件有较高的要求。传统的链霉菌再生培养基采用R2YE培养基。R2YE培养基配制较为复杂,且使用前需提前1~2d准备,以保证固体培养基表面水分充分蒸发,减少由于R2YE培养基表面的冷凝水份引起的原生质体破裂(渗透压效应)。操作程序的增加和时间的延长,增加了操作的困难性和培养基被杂菌污染的几率。同时,实验中发现金色链霉菌原生质体在R2YE培养基上生长较差,培养5d后,平皿上只能形成较小的菌落(平均直径小于0.2mm);且菌落与培养基之间粘接力较小,在覆盖选择性培养基时表面的菌落极易被冲刷至平皿边缘,聚集在一起,无法进行下一步的抗性选择。

本实验在种子培养基的基础上,筛选到一采用麸皮配置的培养基,可保证菌体处于良好的生长状态。与相同的培养条件下,菌体在麸皮培养基上培养20h,即可见细小的菌落,可进行抗性的选择。3d后,处于分散状态的菌落平均直径可达0.6mm,且菌落与培养基结合牢固,实验中未发现菌落被选择性培养基冲刷移动的现象。实验表明,麸皮培养基配制完立即使用与平皿内倒入培养基放置2d后使用相比,二者对原生质体的再生差别较小,原生质体再生率相差不到10%(表2)。这表明麸皮培养基配置完后可立即使用,与R2YE再生培养基相比,大大缩短了培养基的配置预备工作和使用所需时间,同时降低了染菌的几率。

表2 不同再生培养基对原生质体再生的影响

培养基种类	原生质体再生率(%)
麸皮培养基1	27.5
麸皮培养基2	30.5
R2YE1	26.3
R2YE2	13.5

注:1 配制后立即使用,2 放置2d后使用

2.3 金色链霉菌转化条件的优化

在变铅青等链霉菌原生质体转化过程中,采用T-buffer进行转化,可得到较P-buffer高近1倍的转化效果。但本实验中,对金色链霉菌进行转化实验结果表明,采用含25%PEG1000的P-buffer的转化效率高

于T-buffer。这表明不同链霉菌种类之间,质粒转化所需的最适条件存在较大的差别。特别对于经过多次诱变和筛选过程处理所得的生产菌株,其生长代谢的特异性可能更加明显,对其进行质粒转化和基因工程的改造工作可能有更专一和特定的要求,导致每一种菌的最适转化条件存在不一致性。

采用PEG辅助使质粒转化链霉菌原生质体,是链霉菌在分子水平上进行改造的一个关键性步骤。在转化条件的研究中,曾有PEG100、PEG3000、PEG6000等应用的报道,并分别产生了不同的转化效率或存在不同的优缺点。本采用PEG1000和PEG6000进行转化试验,考察不同分子量的PEG对转化效率的影响。

25%PEG1000和25%PEG6000的转化试验表明(见表3),两种分子量相差较大的PEG具有近似的转化结果(PEG1000转化率高于PEG6000约10%)。表明PEG为质粒转

表3 不同浓度PEG1000对转化效率的影响

PEG1000浓度(%)	转化率(%)
25	7.9
33	10
50	6.3

化提供一个适合质粒进入原生质体的环境,其本身分子量的大小可能并不是影响转化因素的关键因素。但PEG6000较PEG1000在相同的浓度下粘度较大,在低于20℃时处于凝固状态,操作过程中存在一定的困难。本研

究采用 PEG1000 进行金色链霉菌转化试验。25%、33%、50% PEG1000 的转化试验表明, 33% 浓度 PEG1000 介导的质粒转化效率最高, 大约为 10%。不同浓度的 PEG 对原生质体的影响可能有一定的区别。同时, PEG 的存在, 可保护质粒免受原生质体释放的核酸酶的降解, PEG 浓度的不同, 对质粒的破坏和对质粒进入细胞的速度可能有一定的影响, 从而导致转化效果随 PEG1000 浓度的不同而有所区别。

参 考 文 献

- [1] Iain S, Hunter. 国外医药抗生素分册, 1988, 9 (4): 241 ~ 251.
- [2] 邓子新, 中国抗生素杂志, 1990, 15 (3): 231 ~ 235.
- [3] 邓子新译, 霍普伍德著. 链霉菌遗传操作实验手册. 湖南: 科学技术出版社, 1988.
- [4] 张惠展著. 基因工程概论. 上海: 华东理工大学出版社, 2000.