

创新霉素产生菌的抗噬菌体菌株的选育

许菊彦 刘若莹

(中国医学科学院药物研究所,北京)

我所在创新霉素试制的过程中,发现有噬菌体感染的问题,因此进行了抗噬菌体菌株的选育工作^[1]。

一、菌种和培养基

(一) 菌种

济南游动放线菌 (*Actinoplanes tsinanensis*) 原始菌株编号为抗5(以下简称抗5)。

(二) 培养基

1. 培养济南游动放线菌的培养基:

(1) 斜面培养和分离用 Bennett 培养基,其成份为(克/100毫升): 葡萄糖 1.0; 肉膏 0.1; 酵母膏 0.1; 蛋白胨 0.2; 琼脂 2.0; 蒸馏水配制。pH7.0。

(2) 种子培养基成份是(克/100毫升): 淀粉 3.0; 黄豆粉 1.0; 鱼粉 0.5; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1; NH_4NO_3 0.2; K_2HPO_4 0.05; CaCO_3 0.5; CoCl_2 1毫克/升; 深井水配制。自然 pH6.5—6.8。

2. 发酵培养基: 成份(克/100毫升)为淀粉 6.0; 黄豆粉 1.5; 鱼粉 0.5; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5; K_2HPO_4 0.1; CaCO_3 1.0; CoCl_2 1毫克; 深井水配制。自然 pH6.8—7.0。

3. 增殖噬菌体用培养基:

(1) 增殖噬菌体用上述种子培养基。

(2) 测定噬菌斑用 Bennett 培养基。

(3) 稀释噬菌体悬液用 Bennett 培养基(不加琼脂)。

4. 用杯碟法测定创新霉素效价,用痢疾杆菌 302 做测定菌。

二、噬菌体的分离

取发酵至 36—48 小时的菌体全部裂解成碎片的发酵液,通过细菌过滤器过滤,得到无菌

滤液,并用此滤液进行下列试验。

(一) 噬菌斑试验

取在 28℃ 振荡培养 48 小时的菌丝悬液 0.5 毫升,加到 Bennett 培养基平板上,同时加入经适当稀释的上述无菌滤液 0.2 毫升,最后再加入 4 毫升 Bennett 培养基(琼脂为 1%,温度 60℃ 左右)摇匀,待凝固后放入 28℃ 温箱培养。培养至 72 小时,在平板中出现清晰的噬菌斑。

(二) 噬菌体感染试验

将培养好的抗 5 菌株斜面接入种子培养基中,在 28℃ 振荡培养至 48 小时,当肉眼观察生长较粘稠,显微镜观察菌丝发育正常呈网状时,即加入上述无菌滤液 0.5 毫升,继续培养 24 小时,种子瓶肉眼观察显著变稀,显微镜观察看到的主要是菌丝碎片及少数的菌丝断片,继续发酵,菌丝即全部裂解。重复试验的结果证明,发酵液中菌丝的裂解是由于噬菌体感染所致。

三、高效价噬菌体悬液的制备、效价测定和保存

(一) 噬菌体悬液的制备

在振荡培养 48 小时的抗 5 菌株的种子培养液中,加入上述试验用的无菌滤液 0.5 毫升,继续培养到 120 小时,此时抗 5 菌株的菌丝全部裂解。裂解液经细菌过滤器抽滤,即得到噬菌体悬液,称它为抗 5 噬菌体悬液。这样制得的噬菌体悬液效价可达 10^{10} 单位/毫升。取此悬液在电子显微镜下观察,噬菌体具有六角形的头部和尾部。

(二) 噬菌体悬液效价的测定

将制得的噬菌体悬液,按上述噬菌斑试验的方法,测得噬菌体的效价为 3.15×10^{10} 单位/

毫升,此悬液作抗噬菌体菌株的选育用。

(三) 噬菌体悬液的保存

噬菌体悬液在 4℃ 冰箱中保存备用。2 个月内未发现效价降低。

四、抗噬菌体菌株的选育

(一) 选育方法

1. 再生菌丝法: 将生长好的抗 5 菌株的斜面,接入种子培养基,在 28℃ 振荡培养到 48 小时,菌丝生长良好,此时加入噬菌体悬液 0.5 毫升 (3×10^{10} 单位/毫升)继续培养,24 小时后,发酵液开始变稀,48 小时取样用显微镜观察,看到菌丝全部裂解,继续培养至培养的总时间达 144 小时,此时显微镜观察可以看到出现少数短小的菌丝片断。取此菌丝裂解液一小滴,涂布于盛有 Bennett 培养基的平板上,在 28℃ 培养。

2. 双层平板法: 将生长良好的抗 5 菌株的斜面,接种在种子培养基中,经 48 小时培养后,取菌丝液 0.5 毫升,加至 Bennett 培养基的平板上,同时加入 0.2 毫升 (3×10^{10} 单位/毫升)噬菌体悬液,然后再加入 4 毫升上述培养基(琼脂为 1%,温度为 60℃ 左右),均匀铺平,待凝固后置 28℃ 培养。

(二) 抗噬菌体菌株的抗噬菌体性能和抗菌素产量的测定

用上述两种方法培养 10 天后,在平板上都能形成极少数菌落,这些菌落可以初步认为是具有抗噬菌体性能的。经过噬菌体处理而得到的菌落,形态变异率较高。多数菌落直径较小,发育不良,表面多皱褶,有的菌落直径较大,但表面扁平。有一部分菌落形状呈正常型的表面隆起。在以下试验中,我们主要选用正常型菌落。

第一次重复试验: 将已经长好的初选菌株的斜面,分别接种于发酵培养基(500 毫升三角瓶内装培养基 50 毫升)。同时接种二组抗 5 敏感菌株作对照。在 28℃ 振荡培养至 48 小时,当摇瓶中培养物较稠时,除保留一组对照外,在各个发酵瓶中分别加入噬菌体悬液 0.5 毫升继

续培养,24 小时后取样观察。加入噬菌体的对照组,菌丝裂解,发酵液变稀。抗噬菌体菌株中,如菌丝不裂解,能保持正常生长,则继续培养,至发酵总时间达 168 小时,分别测定它们的抗菌素效价。并选取效价较高的一部分菌株,再作第二次重复试验。

第二次重复试验,采用二级发酵,先培养种子(种龄 48 小时,接种量 5%),然后转入发酵,当发酵达 48 小时,每个摇瓶中加入噬菌体悬液 0.5 毫升继续培养,至发酵总时间达 144 小时,测定培养液的抗菌素效价,选取抗菌素效价较高的菌株,用同样的方法进行第三次重复试验,最后得到 5 株变异株,它们的抗噬菌体能力和抗菌素产量见表 1。

表 1 抗噬菌体菌株的抗性和抗菌素产量*

菌株	选育方法	效价 (微克/ 毫升)	抗噬菌体能力	
			发酵瓶内加入噬菌体悬液毫升数	菌丝生长情况
抗 5-R ₁	再生菌丝法	420	0.5	+
		385	0.5	+
抗 5-R ₂	再生菌丝法	510	0.5	+
		498	0.5	+
抗 5-R ₃	再生菌丝法	416	0.5	+
		400	0.5	+
抗 5-R _{1,17}	双层平板法	430	0.5	+
		416	0.5	+
抗 5-R _{1,15}	双层平板法	390	0.5	+
		388	0.5	+
抗 5		0	0.5	-
		0	0.5	-
抗 5(对照)		380	0	+
		372	0	+

* 噬菌体悬液的效价为 3×10^{10} 单位/毫升。测定抗菌素效价时间为发酵 144 小时。“+”表示发酵中菌丝生长正常。“-”表示加入噬菌体悬液后菌丝裂解。

表 1 指出,5 株供试菌株,以抗 5-R₁ 效价最高,为了进一步肯定这一新菌株的产抗菌素

表 2 抗噬菌体菌株抗 5-R₁ 与抗 5 菌株的抗菌素产量*

菌株	效价(微克/毫升)		效价的百分比
	144 小时	168 小时	
抗 5	370	343	100
抗 5-R ₁	500	464	135

* 表中数字为每一瓶种子接种到三个发酵瓶中重复三次试验的结果的平均数。

水平,在相同条件下,试验新菌株和抗 5 菌株的产抗菌素水平。结果见表 2。

表 2 结果表明,抗噬菌体菌株抗 5—R₄ 与抗 5 菌株比较,抗菌素产量以抗 5—R₄ 为高。

五、结果与讨论

1. 通过抗噬菌体菌株的选育工作,得到了抗噬菌体的变异株,其中抗 5—R₄ 菌株的抗菌素产量比抗 5 菌株高。

2. 在一般条件下,抗 5 菌株产生的孢囊孢子很稀少,常规育种中应用菌丝断片制成悬液进行诱变处理,根据我们几年来对抗 5 菌株进行选育工作的体会,此方法对其产抗菌素产量的提高,成效不大。而在选育抗噬菌体变异株

的工作中得到的抗 5—R₄ 菌株,其抗菌素产量较抗 5 菌株高 30%。分析这一现象,可能因为菌丝断片通常是多核的,因而难以得到稳定的高产型变异株,而多核的菌丝片断经噬菌体作用后,其中只有能抗噬菌体的个别的细胞核才能进行分裂发育,因而能得到单核的,性状较纯一的高产型变异菌株。因此,不能形成大量孢子的抗 5 菌株,利用相应的噬菌体,或再结合理化因子诱变的方法,来提高菌株的抗菌素产量是值得注意的。

参 考 文 献

- [1] Thiemann J. E. et al.: *J. Antibiotics.*, **22**, 119—125, 1969.