

放綫菌的种間基因重組初步报告

刘頤屏 經絳仙 許美云 王惠貞

(上海医药工业研究院, 上海)

自从 Sermonti 和 Spada-Sermonti 在天蓝色鏈霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)^[1] 进行基因重組实验成功以后, 其他放綫菌, 尤其是生产抗菌素的放綫菌, 如土霉菌 (*S. rimosus*)^[2], 新霉菌 (*S. fradiae*)^[3], 紅霉菌 (*S. erythreus*)^[4] 和金霉菌 (*S. aureofaciens*)^[5] 等的基因重組也相继获得了成功, 这不仅有助于放綫菌遗传现象的認識, 而且对抗菌素产量的提高, 起了更大的作用。Alacevic^[6] 在金霉菌、土霉菌和天蓝色鏈霉菌的种間重組实验中也得到了成功, 但是在方法方面和实际应用方面尚缺乏詳細的說明; 至于在生产抗菌素的放綫菌中, 通过种間基因重組或利用种間杂种, 进行新抗菌素的生物合成的实验, 还没有見到报导。

本文叙述金霉素、土霉素、紅霉素和新生霉素等生产用的野生型菌株, 经过誘变因素处理后, 获得了各种营养缺陷型。将不同种的营养缺陷型用各种方法进行杂交以后, 得到了种間杂种, 并且对个别种間杂种的遗传性状的变化现象, 包括形态特征和抗菌素活性, 进行了初步的观察和分析, 发现种間杂种的形态和所产抗菌素的质量起了变化, 証明种間原养型菌株在这些遗传性状方面发生了基因重組。

一、材料与方 法

菌种 杂交所用的金霉菌、土霉菌、紅霉菌和新生霉素 (*S. niveus*) 的营养缺陷型, 都从生产上用的野生型菌株經各种誘变因素处理后篩选所得, 这些菌株的编号、来源和遗传标记, 如表 1 所示, 土霉菌的营养缺陷型 A166-2、A166-12 和 A166-15 为北京抗菌素研究所贈送。

培养基 杂交和分离异核体菌落或篩选原养型种間杂种所用的基本培养基成分, 为葡萄糖 0.5%, 硝酸钠 0.15%, 磷酸氢二铵 0.15%, 硫酸铵 0.15%, 磷酸二氢钾 0.02%, 硫酸镁 0.02%, 硫酸铁 0.002%, pH 7.3; 补給培养基系在基本培养基中加入适量的营养缺陷型所需的氨基酸; 完全培养基系在基本培养基中加水解酪素 0.10%, 以上培养基成分都能适合上述 4 株野生型的生长和发育。种間杂种发酵时用的种子培养基和发酵培养基, 系根据杂交两野生型的原来成分配制。

实验方法

1. 种間杂交系从下列 4 方面进行实验: (1) 用配对两菌株的分生孢子, 在完全培养基斜面上混合接种培养, 待新的分生孢子形成后, 用蒸馏水洗下, 脱脂棉过滤, 制成单孢子悬浮液, 并用离心洗滌两次, 最后在基本培养基平板上进行分离, 每个培养皿上的接种量約为 10^6 — 10^8 孢子。培养温度除配对菌株一方为新生霉素系在 28°C 培养外, 一般皆在 37°C 培养。培养時間約 1—2 星期。(2) 在基本培养基上銜接培养。除接种方法(见图 1)与(1)不同外, 其余条件与方法均与(1)相同。(3) 在液体基本培养基中混合培养。以形成异核菌絲体。系将 10 毫升的液体基本培养基, 装入 20 毫升的試管中, 接种配对两菌株

的分生孢子悬浮液各 0.10—0.15 毫升,生长缓慢的紅霉菌和新生霉菌在接种后,先单独培养 18—24 小时,再接种另一配对菌株,然后静置培养 3 天左右,如发现試管底部有浸沒菌絲形成,即将菌絲取出,用石英砂磨碎,經脫脂棉过滤后,在基本培养基平板上分离培养。(4)直接在基本培养基平板上接种配对两菌株的单孢子悬浮液各 0.10—0.15 毫升,共約 10^6 — 10^7 孢子,接种后即行培养。

表 1 实 驗 菌 株 及 其 來 源

菌株编号	来 源	誘变因素	营养缺陷	遗传标记
N ₃ N-3B	<i>S. aureofaciens</i> N-3	NS	半胱氨酸	cys ⁻
N ₃ U-3	<i>S. aureofaciens</i> N-3	UV	精氨酸	Arg ⁻
N ₃ M-38	<i>S. aureofaciens</i> N-3	NM	异亮氨酸	Iso ⁻
N ₃ U-171	<i>S. aureofaciens</i> N-3	UV	酪氨酸	Tyr ⁻
186N-8	<i>S. aureofaciens</i> 536-186	NS	异亮氨酸	Iso ⁻
TN-18	<i>S. rimosus</i> F1001	NS	甲硫氨酸	Met ⁻
A166-2	<i>S. rimosus</i> A-166	UV	烟碱酸	Nic ⁻
A166-12	<i>S. rimosus</i> A-166	UV	甲硫氨酸	Met ⁻
A166-15	<i>S. rimosus</i> A-166	UV	苏氨酸	Thr ⁻
146U-1803	<i>S. erythreus</i> 61-146	UV	甲硫氨酸	Met ⁻
146U-2067	<i>S. erythreus</i> 61-146	UV	亮氨酸	Leu ⁻
146U-331	<i>S. erythreus</i> 61-146	UV	甲硫氨酸	Met ⁻
27-15	<i>S. erythreus</i> 2577	UV	甲硫氨酸	Met ⁻
42U-1	<i>S. Niveus</i> N-42	UV	賴氨酸	Lys ⁻

注: NS: 自然分离; UV: 紫外线; NM: 氮芥。

2. 种間杂种的发酵試驗: 系同时用杂交两野生型的培养基成分及发酵条件并行試驗,发酵时间为 120 小时。

3. 发酵液中抗菌素活性的測定和分析: 种間杂种发酵液抗菌譜的測定,系用紙片法进行实验,先把发酵液离心沉淀,再用无菌滤紙吸取上清少許,附貼在划有測定菌的培养皿上,37℃ 培养 18 小时后,观察抑菌情况。发酵液紙上层析的操作方法和溶剂系統系根据两亲株所产生的抗菌素的层析方法进行实验。

二、結 果

种間的异核現象 当两株不同种和不同营养要求的缺陷型菌株,在基本培养基斜面上进行混和接种和培养后,发现部分配对菌株之間能形成显著的平衡异核体,即在斜面銜接部分产生明显的基质菌絲,甚至产生大量的分生孢子。(图 1) 表 2 系两次重复試驗的結果,从表 2 中可以看出个别菌株,如金霉菌和土霉菌的大部分营养缺陷型間,似比其它菌株更易发生异核現象。同样,将两株缺陷型的单孢子悬浮液,在装有液体基本培养基試管中进行混合接种培养后,也能发现部分配对菌株的試管底部(在接种后 3 天左右)产生明显的沉沒菌絲(异核菌絲体)。(图 2) 将两株缺陷型的单孢子悬浮液混合接种在基本培养基的平板上,也发现部分配对菌株,有原养型菌落的出現。(图 3)

将上述个别配对菌株的銜接部分的分生孢子用蒸餾水洗下后,制成单孢子悬浮液,接种在基本培养基平板上后,有原养型菌落的出現。(图 4) 液体基本培养基中混合接种所形成的异核菌絲体,用石英研磨后,平板分离結果,也产生了原养型菌落,原养型菌落有大小两种类型,大型菌落所产生的分生孢子測得为野生型,而小型菌落所产生的分生孢子

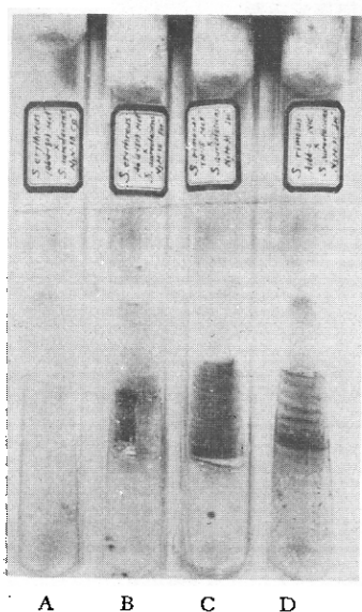


图1 基本培养基斜面衔接培养结果, 斜面中间部分长有营养菌丝及分生孢子, 为两菌株重迭之处。

- A. *S. erythreus* 146U-1803 Met⁻ ×
S. aureofaciens N₈N-3B cys⁻
 B. *S. erythreus* 146U-1803 Met⁻ ×
S. aureofaciens N₈M-38 Iso⁻
 C. *S. rimosus* TN-18 Met⁻ ×
S. aureofaciens N₈M-38 Iso⁻
 D. *S. rimosus* A166-2 Nic⁻ ×
S. aureofaciens N₈M38 Iso⁻

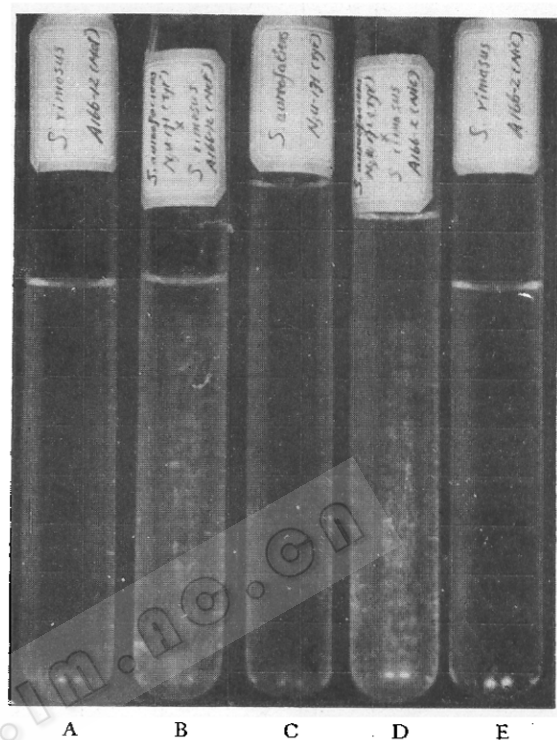


图2 液体基本培养基混合接种培养结果 B. D 两试管内有异核菌丝体 A, C 和 E 试管分别为对照

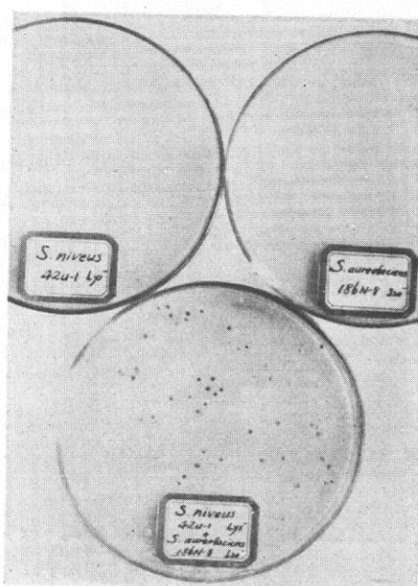


图3 基本培养基平板混合接种培养所产生的原养型菌落

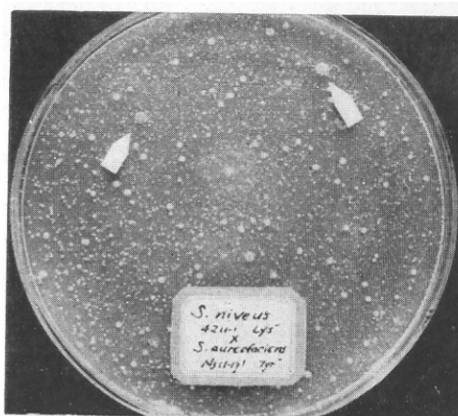


图4 液体基本培养基混合接种所产生的异核菌丝体磨碎后基本培养基平板分离所形成的原养型菌落(白色箭头所指), 小型菌落测定结果则为缺陷型。

表2 基本培养基斜面衔接培养的种间异核现象

菌株编号	42U-1	27-15	146U-331	146U-2067	146U-1803	TN-18	A166-2	A166-12	A166-15	N ₈ N-3B	N ₈ U-3	N ₈ M-38	N ₈ U-171
42U-1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27-15						-	-	-	-	V	V	-	-
146U-331						-	-	-	-	-	-	-	-
146U-2067						A	-	-	-	V	V	-	-
146U-1803						-	-	-	-	V	V	A	-
TN-18										V	-	A	-
A166-2										V	V	A	V
A166-12										-	-	A	-
A166-15										-	-	-	-
N ₈ N-3B													
N ₈ U-3													
N ₈ M-38													
N ₈ U-171													

注: V = 衔接处发生基菌丝。

A = 衔接处发生气生菌丝。

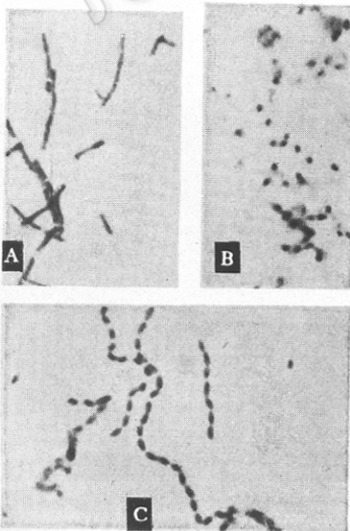


图5 金霉菌 N-3 和紅霉菌 61-146 (A 和 B) 以及种間杂种 (C) 45M₈-4 的分生孢子,革兰氏染色,×1,200

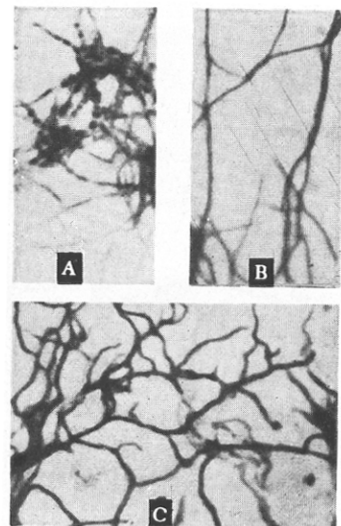


图6 金霉菌 N-3 和紅霉菌 61-146 (A 和 B) 以及种間杂种 (C) 45M₈-4 的沉没菌絲,革兰氏染色,×1,200

表 3 种間原养型菌株的穩定性

菌 株	第 一 次			第 二 次*		
	观察菌落	正 常 型	变 异 型	观察菌落	正 常 型	变 异 型
28M ₂	1532	1531	1	648	634	14
25M ₃	405	405	0	3876	3856	20
				3552	3529	23

* 第二次試驗出发菌株系从第一次分离所得。第一項由 28M₂-5，第二項及第三項分別由 45M₃-1 及 45M₃-4 等三菌株进行分离。

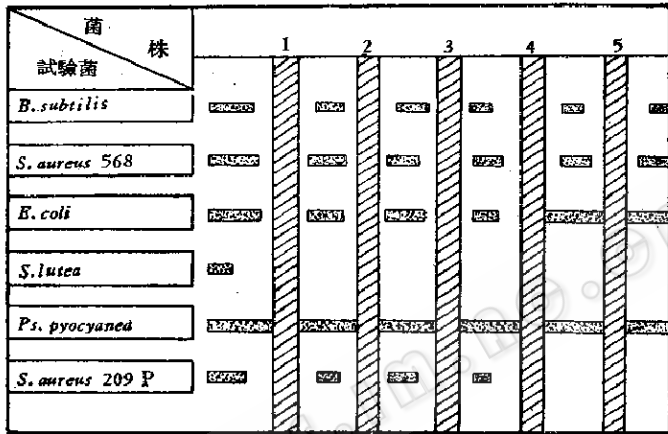


图 7

1: 45M₃-4 2: 45M₃-1 3: 28M₂-5 4: *S. erythreus* 61-146
5: *S. aureofaciens* N-3

则为缺陷型，因此，大型菌落似为种間杂种(二元体)，而小型菌落可能为平衡异核体菌落。同样情况，完全培养基斜面混合培养后所产生的分生孢子的平板分离結果，也出現了原养型菌落，通过以上这些实验，証明种間有形成异核体的可能，而不是简单的互养现象。但是由于以上四种形成异核体过程的方法不同，因此同一配对菌株，能否表现出异核现象，或产生原养型种間杂种，結果也不一样。如新生霉菌 42U-1 与 紅霉菌 146U-2067 在液体混合培养中都能形成异核菌絲体，(图 2) 但銜接培养則不能。

为了进一步証实种間原养型菌株的稳定性，从金霉菌 N₃U-3(Arg⁻)和紅霉菌 146U-2067 (Leu⁻) 的杂交中，和从金霉菌 N₃M-38 (Iso⁻) 和紅霉菌 146U-1803 (Met⁻) 的杂交中，各选取了一个原养型菌株进行单孢子連續分离，除发现菌落在形态上有个別变异现象外，(表 3) 在营养要求上并没有分离现象发生，因此，这类原养型菌落(結合以后形态上的观察)，可能为稳定的二元杂合子。

种間杂种的形态特征和抗菌活性 3 个原养型种間杂种，28M₂-5，45M₃-1 和 45M₃-4 (分別由 28M₂ 和 45M₃ 两菌株单孢子分离所得) 的形态特征和抗菌活性，作了初步的观察和分析。

种間杂种的孢子和菌絲形态 以上 3 菌株的分生孢子都呈椭圆形的中間类型，即介于金霉菌野生型 N-3 的长方形孢子与紅霉菌野生型 61-146 的圆形孢子之間，从体积上来看，杂种孢子比两野生型略大，染色也較深，因而似有二元体的可能。(图 5) 振荡培

养的沉沒菌絲形态較接近于紅霉菌,但菌絲前端較弯曲,为杂种的特征。(图 6) 斜面培养的营养菌絲、气生菌絲和可溶性色素顏色也均表現为中間型。

种間杂种的抗菌譜和紙上层析 用以上 3 菌株的发酵液作抗菌譜測定結果, 发现种

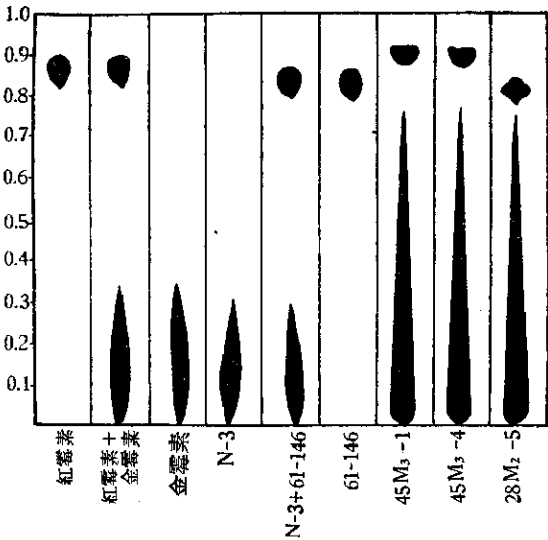


图 8 金霉素、紅霉素标准品和金霉菌紅霉菌发酵液与种間杂种 28M₂-5, 45M₃-1, 45M₃-4 的发酵液的上相紙上层析比較。

溶剂系統: 甲醇:丙酮:水=19:6:75
显影指示菌: *S. lutea*

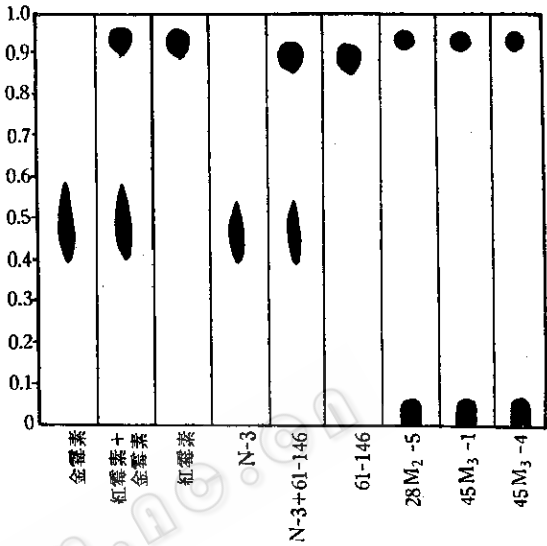


图 9 金霉素、紅霉素标准品和金霉菌、紅霉菌发酵液与种間杂种 28M₂-5, 45M₃-1, 45M₃-4 的发酵液的上相紙上层析比較。

溶剂系統: 正丁醇:冰醋酸:水=4:1:5
显影指示菌: *S. lutea*

表 4 种間雜种和营养缺陷型野生型的抗菌譜比較
(用搖瓶发酵液进行实验)

菌 株 \ 試 驗 菌	<i>S. aureus</i> 209P	<i>PS.</i> <i>pyocyanea</i>	<i>S. lutea</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> 568	<i>B. subtilis</i>
<i>S. aureofaciens</i> N-3	—	+	—	+	+	—
<i>S. erythreus</i> 61-146	—	+	—	+	—	—
28M ₂ -5	—	+	—	—	—	—
45M ₃ -1	—	+	—	—	—	—
45M ₃ -5	—	+	—	—	—	—
<i>S. aureofaciens</i> N-3 ⁺ <i>S. erythreus</i> 61-146	—	+	—	+	—	—
<i>S. aureofaciens</i> N ₈ M-38	—	+	—	+	+	—
<i>S. aureofaciens</i> N ₈ U-3	—	+	—	+	+	—
<i>S. erythreus</i> 146U-1803	—	+	—	+	—	—
<i>S. erythreus</i> 146U-2067	—	+	—	+	—	—
<i>S. aureofaciens</i> N ₈ M-38 ⁺ <i>S. erythreus</i> 146U-1803	—	+	—	+	—	—
<i>S. aureofaciens</i> N ₈ U-3 ⁺ <i>S. erythreus</i> 146U-2067	—	+	—	+	—	—

間杂种不仅具有杂交两营养缺陷型和两野生型的抗菌能力，并且还有新的抑菌作用。(图 7) 而新的抑菌作用,也不是由于两种抗菌素的协同作用,(表 4) 很可能是一种新的抗菌物质。杂种发酵液的紙上层析結果,发现含有两种抗菌物质,在紅霉素层析系統一种近似金霉素,另一种近似紅霉素。(图 8) 但在金霉素层析系統前一种又不似金霉素。(图 9)

三、討 論

在不同种放綫菌之間形成异核体的試驗的最早的报导是 Breandle 和 Szybalski^[7]。关于 *S. coelicolor*, *S. venezuelae* 和 *S. griseus* 等的工作,但是他們沒有得到成功的結果。Breandle^[8] 对 *S. fradiae*, *S. venezuelae*, *S. griseus* 和 *S. coelicolor* 又进行了試驗,但是还是沒有得到成功。我們发现在这次試驗所用的菌株中,在完全培养基上进行相互拮抗試驗时,发现种內沒有拮抗現象表現,而某些种間有显著的相互拮抗現象,(表 5) 显然,

表 5 不同种的营养缺陷型間的相互拮抗現象

菌 株	42U-1	27-15	146U-331	146U-2067	146U-1803	TN-18	A166-2	A166-12	A166-15	N ₈ N-3B	N ₈ U-3	N ₈ M-38	N ₈ U-171
42U-1		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27-15	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
146U-331	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
146U-2067	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
146U-1803	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
TN-18	+	-	-	-	-		+	+	+	+	+	+	+
A166-2	+	-	-	-	-	+		+	+	+	+	+	+
A166-12	-	-	-	-	-	+	+		+	+	+	+	+
A166-15	-	-	-	-	-	+	+	+		+	+	+	+
N ₈ N-3B	+	-	-	-	-	+	+	+	+		+	+	+
N ₈ U-3	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+		+	+
N ₈ M-38	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+		+
N ₈ U-171	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	

注：从对称的黑綫框中可以看出种內无相互拮抗現象。

这是由于放綫菌在完全培养基上形成拮抗性物质的緣故,因此,对敏感性的菌种來說,生长就被抑制,这或許就是种間杂交不能形成异核体的原因之一。另一个原因,可能是培养基的成分和接种次序等不能同时适应配对两个种的要求。当然,选择性标记基因的距离的远近,也是原因之一。例如不同突变型的金霉菌与同一紅霉菌变异型銜接培养結果,形成异核体的适合性就不同,(表 2) 因此,用大家适宜的基体培养基作为杂交的基質,适当改变配对两个种的接种次序,以及混合培养的方式,即使是具有相互拮抗性的菌种,也

有形成异核体的可能。

Alacevic^[6]在他的报导中说,重组体菌落有两种类型,一种是小型的菌落,根据本试验结果,也发现有类似的现象,但是进一步分析结果(即将小型菌落进行生长谱测定)这类菌落只表现为一种营养缺陷型,而无另一种营养缺陷型分离,因此,也不可能是不平衡异核体,而大型菌落(图4)则表现为原养型。

从原型菌株的形态特征来看,尤其是孢子形态,原养型的种间杂种似双元杂合子,从所产生的两种抗菌物质来看,则既有双元杂合子的可能,也有单元重组体的可能。放线菌种间杂种的形成,不仅在理论上对放线菌的分类和遗传具有重要的意义,而且对新抗菌素的获得,可能发展成一条新的途径。

四、摘 要

金霉素、土霉素、红霉素和新生霉素的生产菌种,分别经过诱变因素处理后,获得了各种营养缺陷型,将配对两营养缺陷型混合接种在液体基本培养基后,能迅速和清楚地看到异核菌丝体的形成,从而可以更简便和确切地测定种间异核现象的适合性和种间杂种的获得。种间原养型菌株经传代分离后,很少发现选择性标记基因的分离现象。

从金霉菌与红霉菌重组所得的原养型菌株的形态特征和抗菌活性的初步分析结果来看,发现它们在分生孢子,浸没菌丝和斜面培养特征上表现为中间型。抗菌素纸上层析生物显影结果观察到有类似两野生型的两种抗菌物质,并有包括野生型的和较野生型为广的抗菌谱,因而基本上证明了种间原养型菌株,在这些遗传性状方面发生了基因重组,至于新抗菌素的理化性状,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sermenti, G. and Spada-Sermenti, I.: *Nature*, **176**: 121, 1955.
- [2] Alikhanian, S. I. and Mindlin, S. Z.: *Nature*, **180**: 1208, 1957.
- [3] Szybalski, W. and Braendle, D. H.: *Bact. proc.*, **43**, 1956.
- [4] 李焕荣:抗菌素研究(II)抗菌素的生产工艺,童村、张为申主编,上海科学技术出版社,83页,1961.
- [5] 刘頔屏、经粹仙:抗菌素研究(II)抗菌素的生产工艺,童村、张为申主编,上海科学技术出版社,69页,1961.
- [6] Alacevic, M.: *Nature*, **197**: 1323, 1963.
- [7] Braendle, D. M. and Szybalski, W.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **43**: 947, 1957.
- [8] Braendle, D. H., Gardiner, B. and Szybalski, W. J.: *Gen. Microbiol.*, **20**: 442, 1959.

INTERSPECIFIC RECOMBINATION IN *STREPTOMYCES*

LIN YING-PING KING JIANG-SHENG SHEW MAY-WUN

WANG HUI-CHEN

(Institute of Pharmaceutical Research Ministry of Chemical Industry, Shanghai)

The antibiotic-producing strains of *Streptomyces aureofaciens*, *S. rimosus*, *S. erythreus* and *S. niveus* were treated with mutagenic agents separately, and various auxotrophic mutants were obtained. By inoculating two mating mutants together in an aqueous minimal medium, heterokaryotic mycelia were formed readily and clearly visible, interspecific heterokaryotic compatibility and interspecific recombinants were both easily determined and readily obtainable. After regeneration of prototrophic recombinants there were only a few segregations of selective markers recovered.

Results of preliminary observations on the morphology of the prototrophs from the recombination between *S. aureofaciens* and *S. erythreus* indicated that these prototrophs performed an intermediate type in aerial conidia, submerged mycelium and slant cultures. The results of paper chromatography of the antibiotics produced by the interspecific recombinants showed that there were two kinds of antibiotics resembling the parents, but the antibacterial spectrum was more broad than that of the parents, yet it was not due to the synergism of the two antibiotics produced by the parents. Therefore, it is evident that the above genetical features of different species were recombined.