

灰色链霉菌中存在质粒及其和链霉素生物合成的关系

薛禹谷 董可宁 李敏 祝英芳

(中国科学院微生物研究所,北京)

杨乃权

(华北制药厂,石家庄)

灰色链霉菌 No 45-706 (Val⁻) 经 36℃ 处理后, 100% 的菌落都不能形成气生菌丝, 在 28℃ 经多次传代培养, 气生菌丝生长受抑制的突变株的出现最终频率为 9.0%, 而同时氨基酸缺陷型 (Val⁻) 回复突变率是 6.63×10^{-8} 。

高温突变株 No 45-3 (bald) 经自发和 NTG 诱发突变, 均未得到气生菌丝回复生长的菌落, 但当用 NTG 处理菌株 No 45-706 (Val⁻) 时, 却得到了 1.26×10^{-8} 的缬氨酸营养缺陷回复突变率。

获得的 98 株高温突变株全部失去了生物合成链霉素的能力。

No 45 菌株对青霉素敏感, 但高温突变株 No 45-3 (bald) 却对青霉素有抗性。

上述结果表明灰色链霉菌中存在质粒, 它控制气生菌丝的形成和链霉素的生物合成。此外, 也可能和对青霉素的敏感性有关。

从六十年代初才有一些关于链霉菌质粒的研究工作的报道, 例如某些抗菌素的生物合成^[1-6]、气生菌丝^[3,5]和基质菌丝^[3]的产生、致育性^[7-10]、黑色素的产生^[5]和对自身所产的抗菌素的抗性^[11]均受质粒控制。M. Okanishi 曾报道^[5,6]利用高温消除马铃薯疮痂病链霉菌 (*S. scabies*)、委内瑞拉链霉菌 (*S. venezuelae*) 和春日链霉菌 (*S. kasugaensis*) 的质粒, 证明了这些菌的气生菌丝的形成和抗菌素的生物合成均受质粒控制。但至今未见高温消除链霉素产生菌——灰色链霉菌质粒方面的报道。而链霉素发酵生产受温度影响较大, 因此, 高温对链霉素生物合成的影响是一个值得探究的问题。

本文用灰色链霉菌生长的最高温度 (36℃) 处理灰色链霉菌, 获得了气生菌丝受抑制的突变株, 这些突变株全部丧失了

生物合成链霉素的能力, 通过对这些突变株的遗传学研究, 证明了灰色链霉菌中存在质粒, 它控制气生菌丝的形成, 也控制链霉素的生物合成。此外, 也可能和对青霉素的敏感性有关。

材料和方 法

(一) 菌株

灰色链霉菌 (*S. griseus*) No 45, 链霉素产生菌 (华北制药厂提供); 灰色链霉菌 (*S. griseus*) No 45-706, 由 No 45 经 UV 诱变处理获得的缬氨酸缺陷型 (Val⁻) 的链霉素产生菌 (华北制药厂提供); 灰色链霉菌 (*S. griseus*) No 45-3, No 45-33, 由 No 45 经 36℃ 处理后获得的气生菌丝抑制的不产链霉素的突变株。

(二) 培养基

1. 基本培养基 (MM) 成份 (%):

本文于 1978 年 4 月 20 日收到。

葡萄糖 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.15, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.15, KH_2PO_4 0.02, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002, 水洗琼脂 2.2, 蒸馏水配制, 自然 pH (约 7.0—7.2)。

2. 完全培养基(CM)成份(%):

葡萄糖 1, 蛋白胨 0.5, NaCl 0.5 豌豆浸出液* 按 18 毫克氮/100 毫升计算, 琼脂 2.2, 自来水配制, 灭菌前 pH 7.0—7.2。

3. 种子培养基(SM)的成份(%):

葡萄糖 4, 黄豆饼粉 3.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6, CaCO_3 0.6, NaCl 0.25, KH_2PO_4 0.06, 自来水配制 pH 约 6.5, 250 毫升三角瓶装 40 毫升培养基。

4. 发酵培养基(FM)成份(%):

葡萄糖 5.0, 黄豆饼粉 3.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.7, CaCO_3 0.7, NaCl 0.25, KH_2PO_4 0.065 自来水配制, pH 约 6.5。250 毫升三角瓶装 30 毫升培养基。自来水配制, pH 约 6.5。250 毫升三角瓶装 30 毫升培养基。

上述四种培养基均在 0.7 公斤/厘米²蒸汽压灭菌 30 分钟。

(三) 培养和发酵条件

除特殊注明外, 平皿分离时, 在 28°C 培养 8 天, 斜面在 28°C 培养 6 天, 种子摇瓶和发酵摇瓶培养温度均为 28°C, 旋转式摇床振荡培养, 转速 200—220 转/分钟, 种子生长 72 小时后, 以 5% 接种量接入发酵摇瓶, 培养 120 小时, 取样测生物效价。

(四) 孢子悬浮液的制备

1. No 45 孢子悬浮液: 经培养 6 天的 No 45 的 CM 斜面一支加灭菌生理盐水或 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 8—10 毫升, 用接种环轻轻刮下表面的孢子, 放入锥形瓶中, 以灭菌的玻璃珠打散, 经新华中速滤纸过滤, 收集滤液即得孢子悬浮液。

2. No 45-706 孢子悬浮液: 用棉花包裹的接种针, 灭菌后, 稍稍沾湿, 轻轻擦下培养 6 天斜面表面的分生孢子, 洗荡在无菌水里, 2500 转/分钟离心 15 分钟, 洗涤二次, 为了增加孢子数, 一次常用 2—4 支斜面。

3. No 45-3 菌体悬浮液: 每支培养 6 天的斜面加无菌水 5 毫升左右, 用接种环轻轻刮下表面

菌体, 置于装有灭菌玻璃珠的锥形瓶中打散, 不过滤, 收集备用。

(五) 不同温度处理

以适当稀释度的孢子悬浮液 0.1 毫升涂皿, 分别置于 28、29、30、31、32、36°C 和 37°C 的不同温度下培养 8 天, 经试验, 36°C 是 No 45 和 No 45-706 能够生长的最高温度。

(六) N-甲基-N-亚硝基-N'-硝基胍 (NTG) 处理

NTG 由华北制药厂合成, 用 pH7.2 的磷酸缓冲液配成浓度为 200—1000 微克/毫升, 在 28°C 振荡处理孢子和菌体断片 2 小时 30 分钟。

(七) 杯碟法测链霉素效价

检定菌株: 枯草杆菌 ATCC No 6633。

检定菌生长培养基成份(%) : 蛋白胨 0.5, 牛肉膏 0.1, 琼脂 2.2, 肉汤(肉:水=1:2) 20, 蒸馏水 80, 灭菌后 pH 7.8—8.0, 茄子瓶装量 80—100 毫升。

检测培养基成份(%) : 蛋白胨 0.5, 牛肉膏 0.15, Na_2HPO_4 0.15, KH_2PO_4 0.05, 琼脂 2.2, 灭菌后 pH 7.8—8.0

(八) 对抗菌素及重金属离子抗性的测定

将 No 45 和 No 45-3 的孢子或菌体悬浮液分别涂布在含有不同浓度梯度的抗菌素或重金属离子的平皿上, 28°C 培养 3—6 天, 按生长情况进行分析。

结果和讨论

(一) 36°C 高温处理对灰色链霉菌 No 45 和 No 45-706 的存活率、气生菌丝的形成和形态的影响

36°C 处理灰色链霉菌 No 45, 存活率达 89.9%, 影响不大, 但 36°C 处理对菌落

* 豌豆浸出液制备方法: 选取籽粒饱满的白色豌豆 300 克, 用水洗 2—3 次, 加水 1000 毫升, 用 2N H_2SO_4 调至 pH3.8—4.0, 加氯仿 10 毫升防腐, 置 37°C 连续浸泡 10—12 天。中间补加 5 毫升氯仿, 而且每天摇动一次, 浸泡完毕, 取样测定。若氮含量达到 120—150 毫克%时, 则可过滤, 将清液于沸水浴煮 20—25 分钟, 搅拌除去氯仿, 再过滤得豌豆浸液, 0.7 公斤/厘米²蒸汽压灭菌 30 分钟后, 备用。

形态的影响却十分明显, 气生菌丝的形成部分或全部受到抑制, 我们把经 36°C 处理 No 45 后长出的全部菌落点种到 CM 平皿上, 置正常温度 28°C 培养, 以此来排除

36°C 的生理效应, 只有在 28°C 连续几代培养后气生菌丝仍然受抑制的菌株, 才是遗传稳定的气生菌丝受抑制的突变株, 结果见表 1 和图版 I。

表 1 36°C 处理对灰色链霉菌 No 45 和 No 45-706 (Val⁻) 的存活率, 气生菌丝形成及形态的影响

温度(°C)	存活率(%)	气生菌丝形成情况		菌落直径(毫米)	菌落形态
		当代正常(%)	抑制*(%)		
28	100	100	0	5	白色, 梅花形, 规则, 放射沟清楚, 气生菌丝饱满, 孢子丰满, 菌落中心突起, 菌落结构紧密, 用接种环不易挑起。
36	No 45 87.9	0	9.03	2.5	浅咖啡色扁平皱形, 紧贴培养基表面, 菌落结构疏松, 用接种环易挑起。
	No 45-706 79.8	0	9.00	2.5	

* 指具有遗传稳定性的百分比。

(二) 气生菌丝受抑制突变株的遗传稳定性

1. 气生菌丝受抑制突变株的传代稳定性

我们将获得的 98 株气生菌丝受抑制突变株接种在 CM 平皿或斜面上, 连续移种 16 代均在正常温度 28°C 培养, 仍保持其气生菌丝受抑制的性状, 说明这些菌株的气生菌丝受抑制的性状具有遗传稳定性。

2. 气生菌丝受抑制突变株自发回复突变率的测定

一年多来, 我们将气生菌丝受抑制突变株 No 45-3 进行了十多次自然分离, 共分离 1.72×10^{10} 个菌落, 形态统一, 未发现有任何自发回复产生气生菌丝的突变株, 说明它的自发回复突变率至少小于 10^{-10} 。

3. N-甲基-N'-亚硝基-N'-亚硝基胍 (NTG) 诱发回复突变率的测定

气生菌丝受抑制突变株具有传代稳定性, 并且未曾观察到有自发回复突变现象, 为了进一步排除这种变异是否由于染色体

上的点突变引起的可能性, 我们又以对染色体有较强诱变能力的 NTG 处理突变株, 观察是否有回复突变株出现。

经用 250、1000 微克/毫升的不同剂量的 NTG 处理二个气生菌丝受抑制突变株 No 45-3 和 No 45-33, 分别处理了 1.70×10^8 和 3.33×10^8 个菌体断片, 死亡率在 98.74—99.99%。我们分别观察了经 NTG 处理后的 No 45-3 和 No 45-33 存活的菌落, 分别为 1.56×10^6 和 4.3×10^6 个, 未发现气生菌丝能回复生长的菌落, 说明控制气生菌丝形成的基因很可能在质粒上, 高温有可能引起质粒的消除, 质粒一旦消除就不可能自发地或诱发地使已经消除质粒的细胞恢复由质粒基因控制的形成气生菌丝的能力。

(三) 36°C 和 NTG 处理 No 45, No 45-33 和 45-706 (Val⁻) 菌株后, 气生菌丝受抑制的突变频率和缬氨酸营养缺陷回复突变频率的比较

根据现有报道, 营养缺陷的遗传标记是在染色体上, 而气生菌丝的形成, 在某些链霉菌中已证明是受质粒控制的^[3,9]。但

由于某些链霉菌的染色体上也具有光秃型基因(bald)^[12],为了排除气生菌丝受抑制的高温突变株是由于染色体点突变所引起的可能性,我们用 36°C 和 NTG 处理 No 45

和 No 45-706 (Val⁻),观察气生菌丝受抑制的频率和缬氨酸营养缺陷回复突变的频率,结果见表 2 和表 3。

由于染色体 DNA 和质粒 DNA 复制

表 2 36°C 处理 No 45 和 No 45-706 (Val⁻) 后,气生菌丝受抑制的突变株出现频率比较

温度(°C)	菌株	处理孢子数 (1×10^8)	光秃型出现数 (1×10^8)	测定株数	突变株数	突变频率	培养基
36	No 45	1.01	1.01	686	62	9.03%	CM
	No 45-706	2.38	2.38	400	36	9.0%	CM
28	No 45	1.01	0	0	0	$< 9.9 \times 10^{-9}$	CM
	No 45-706	18.9	0	0	0	$< 5.3 \times 10^{-10}$	CM

表 3 36°C 和 NTG 处理引起 No 45-3 不产气生菌丝的回复突变率和 No 45-706 (Val⁻) 的缬氨酸缺陷回复突变率的比较

处理因子	No 45-3 (CM 平皿)			No 45-706 (Val ⁻)(MM平皿)		
	孢子总数 (1×10^8)	回复突变总数	回复突变频率 (1×10^{-9})	孢子总数 (1×10^8)	回复突变总数	回复突变频率 (1×10^{-9})
36°C	1.02	0	$< 9.8 \times 10^{-9}$	6.63	0	< 1.51
NTG	5.00	0	< 2.0	0.535	63	1260

频率的不同,因此高温可选择地影响质粒复制^[13],凡由质粒控制的性状,质粒一经消失,性状便不可能再行恢复。No 45-3(bald)高温突变株如果是受质粒控制的,则用 36°C 和 NTG 进行大量回复突变都得不到气生菌丝受抑制性状的回复突变,而 No 45-706 (Val⁻) 的缬氨酸缺陷是已知受染色体基因控制的性状,NTG 是已知对染色体突变较有效的诱变剂,表 3 表明 Val⁻ → Val⁺ 的回复突变率为 1.26×10^{-6} 左右,符合一般染色体基因的诱变频率范围。

从表 2 和表 3 中可见到,在 36°C 培养下, No 45-706 (Val⁻) 的气生菌丝受抑制的突变率是 9%,远比染色体上缬氨酸回复突变率 $< 1.51 \times 10^{-9}$ 高得多,两者相差约 10^8 倍,这样大的差异,说明灰色链霉菌中气生菌丝受抑制的突变株可能是受质粒控制的。

(四) 控制气生菌丝生长的基因和控制链霉素生物合成的基因的关系

把经 36°C 高温处理所得 98 株气生菌丝生长受抑制的菌株,全部进行了摇瓶试验,测定了发酵液中链霉素效价。初筛、复筛各重复两次,发现 98 株气生菌丝受抑制突变株全部不产链霉素。而当对照菌 No 45-706, No 45 同时进行发酵试验时,平均效价初筛、复筛均是 8000—10,000 单位左右。表明控制气生菌丝形成和控制链霉素生物合成的部分基因可能在同一质粒上,气生菌丝受抑制的菌株发酵生产链霉素情况见表 4。

(五) No 45 和 No 45-3 对某些抗菌素抗性的测定

我们将 No 45 和 No 45-3 的孢子和菌体悬浮液,分别涂布在含有不同浓度梯度的八种抗菌素平皿上,28°C 培养三天

表 4 气生菌丝受抑制突变株的效价测定

菌 株	测定菌株数	初筛平均效价(单位/毫升)	复筛平均效价(单位/毫升)
No 45 (bald 1-62)	62	0	0
No 45 (对照)	1	9328	9354
No 45-706 (bald 1-36)	36	0	0
No 45-706 (对照)	1	8728	8208

表 5 No 45 和 No 45-3 在几种不同浓度梯度抗菌素平皿上的生长情况

抗菌素种类	平皿内抗菌素浓度梯度(单位/毫升)	生长情况	
		No 45	No 45-3
金霉素	0—75	—	—
新霉素	0—106	—	—
青霉素	0—78	—	+
丝裂霉素	0—333	—	—
四环素	0—100	+	+
氯霉素	0—340	+	+
更生霉素	0—6	+	+
链霉素	0—500	+	+

后观察,结果见表 5。

从表 5 的结果可以看到,灰色链霉菌中控制气生菌丝生长的质粒基因和它自身所产链霉素的抗性基因并无相关性,即对链霉素的抗性基因并不受此同一质粒基因所控制。此外,在存在土霉素、新霉素、丝裂霉素、四环素、氯霉素、更生霉素等的平皿上, No 45 和 No 45-3 均能生长或均不生长,说明控制这些抗菌素的抗性基因不受控制气生菌丝生长的质粒基因所控制。值得注意的是经多次重复表明, No 45 在含有不同浓度的青霉素平皿上,均不生长,但 No 45-3 反而能生长。有可能是控制气生菌丝生长的质粒上的有关基因通过它的代谢产物,对位于染色体上的青霉素抗性结

构基因起了去阻遏作用,当质粒消除后也消除了去阻遏作用,因而使它的抗性得以表现,使得 No 45-3 能在含有青霉素的平皿上生长,所以控制对青霉素抗性的结构基因很可能是在染色体上,但其调节基因却与控制气生菌丝生长的质粒基因有关。

(六) No 45 和 No 45-3 对几种重金属抗性的测定

我们将 No 45 和 No 45-3 的孢子和菌丝悬浮液分别涂布在含有不同浓度的五种重金属的平皿上,28℃培养三天后观察,结果见表 6。

表 6 No 45 和 No 45-3 在分别含有几种不同浓度梯度的重金属离子的平皿上生长情况

重金属离子种类	离子梯度浓度(M)	生长情况	
		No 45	No 45-3
As ³⁺ [Na ₂ AsO ₄ ·12H ₂ O]	0—10 ⁻¹	+*	+
Pb ²⁺ [PbCO ₃]	0—10 ⁻¹	++	++
Hg ²⁺ [Hg(NO ₃) ₂ ·½H ₂ O]	0—10 ⁻¹	+	+
Zn ²⁺ [ZnCl ₂]	0—10 ⁻⁴	+	+
Cd ²⁺ [Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O]	0—10 ⁻⁴	++	++

* “+”少量生长;“++”生长较好。

从表 6 结果可以看到 No 45 和 No 45-3 在所试验重金属离子浓度的范围内,均生长良好,并无差异,说明控制对这些重金属的抗性基因与控制气生菌丝生长的基因并无相关性。

以上实验表明:链霉素产生菌——灰色链霉菌受高温处理后气生菌丝生长受抑制的频率远远高于受染色体控制的营养缺陷型的回复突变率,而且气生菌丝生长受抑制这个性状具有遗传稳定性,未曾发现任何自发或诱发回复突变,说明这个性状可能是受质粒控制的。

获得的 98 株气生菌丝生长受抑制的突变株全部失去了生物合成链霉素的能力,说明控制气生菌丝生长的基因和控制

链霉素生物合成的部分基因可能位于同一个质粒上,灰色链霉菌对青霉素敏感,但气生菌丝生长受抑制后的突变株反而对青霉素具有抗性,说明对青霉素抗性的结构基因可能位于染色体上,而其调节基因可能与控制气生菌丝生长的基因位于同一质粒上,通过以上结果,可以证明灰色链霉中存在质粒,这一质粒同时也控制链霉素生物合成,此外,也可能和对青霉素的敏感性有关。

参 考 文 献

- [1] Boronin, A. M. et al., *Genetika*, 8: 174, 1972.
- [2] Boronin, A. M. et al.: In Abstracts of the Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, p. 103. (Academic Press, New York and London), 1974.
- [3] Kirby, R. et al.: *Nature*, 254: 265, 1975.
- [4] Noack, D.: Abstracts of the Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. of Industrial Microorganisms. p 104. (Academic Press, New York and London), 1974.
- [5] Okanishi, M. J.: *J. Antibiotics*, Sin A. 23: 45, 1970.
- [6] 冈西正则: 醱酵学会(大阪)昭和50年11月1日报告, 1975.
- [7] Hopwood, D. A. and Wright, H. M.: *J. Gen. Microbiol.*, 79: 331, 1973.
- [8] Vivian, A. and Hopwood, D. A.: *J. Gen. Microbiol.*, 64: 101, 1970.
- [9] Vivian, A.: *J. Gen. Microbiol.*, 69: 353, 1971.
- [10] Vivian, A. and Hopwood, D. A.: *J. Gen. Microbiol.*, 76: 142, 1973.
- [11] Wright, L. F. and Hopwood, D. A.: *J. Gen. Microbiol.*, 95: 96, 1976.
- [12] Novick, R. P.: In Handbook of Microbiology IV. Microbiol Metabolism, Genetics and Immunology, p 537, 1974.
- [13] Terawaki, Y., et al.: *J. Bacteriol.*, 94: 687—690, 1967.

GENETIC EVIDENCE OF THE PRESENCE OF PLASMID IN *STREPTOMYCES GRISEUS* AND ITS RELATIONSHIP WITH THE BIOSYNTHESIS OF STREPTOMYCIN

Xue Yu-gu Dong Ke-ning Li Min Zhu Ying-fang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Yang Nai-quan

(*The North China Pharmaceutical Industry, Shijiazhuang*)

Streptomyces griseus No. 45-706, is a valine auxotroph derived from *S. griseus* No. 45, a streptomycin producer, by UV irradiation. The ability of synthesizing streptomycin of No. 45-706 is about 8,000 to 10,000 units per ml in shakers. When the spores of No. 45-706 were incubated at 36°C for 8 days, there were 100% colonies being unable to form aerial mycelium. The final frequency of aerial mycelium-negative mutants after successive transfers is about 9%. Although high temperature treatment at 36°C can highly induce aerial mycelium-negative mutants, yet the frequency of valine auxotrophic revertants is 1.51×10^{-9} . The aerial mycelium-negative mutants by high temperature treatment of strain No. 45-706 is 10^8 times of that of valine revertants.

Streptomyces griseus mutant No. 45-3 is a bald mutant as it loses the ability to form aerial mycelium. There were no

spontaneous revertants after 16 successive transfers or induced revertants by NTG mutagenesis. The frequency of valine auxotrophic revertants is 1.26×10^{-6} . The response to NTG of strain No. 45-3 (bald) and No. 45-706 is quite different.

All the 98 mutants obtained by high temperature treatment not only are defective in morphogenesis, but also lose the ability of streptomycin synthesis.

Strain No. 45 was sensitive to penicillin originally, while mutant No. 45-3 became resistant to penicillin.

The above-mentioned results indicate that plasmid(s) is present in *Streptomyces griseus* strain No. 45-706. This plasmid(s) not only control the aerial mycelium formation but also streptomycin synthesis, in this actinomycete. Besides, this plasmid(s) might also be involved in the mechanism of sensitivity to penicillin.