

## 地中海诺卡氏菌突变株生化互补和力复霉素合成途径的研究

### III. 力复霉素生物合成中间产物的定量生物测定

金志坤 张雪聪 魏中荻 沈美娟 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

本文报道了应用力复霉素突变株共合成关系, 以受体菌琼脂块定量法检定供体菌分泌的中间产物的浓度。多次试验结果证明, 几组有共合成关系的菌株对均可采用这一方法定量测定中间产物浓度。本方法中力复霉素测定范围  $2.5 \mu\text{g/ml}$ — $40 \mu\text{g/ml}$ 。本方法不仅应用于力复霉素合成途径中间体的测定, 也可能适用于其他抗生素的共合成研究。

在研究力复霉素合成途径时, 我们将 69 株非活性菌株 (*rif*<sup>-</sup>) 通过共合成关系, 制成生化互补图, 就是将这些非活性菌株阻断部位排队, 明确了四群非活性菌株的相互关系<sup>[1, 2]</sup>。互补图中类群 I (A-32, H-140, NG-285 等 14 菌株) 只可作为供体菌, 每一菌株分泌的中间产物可由类群 II、III 或 IV 转化为力复霉素, 这一类群阻断在力复霉素合成途径较后面的部位。类群 II (NG-131) 既可作为类群 I 的受体菌, 也可作为类群 III 的供体菌, 显然它们的阻断部位在类群 I 与 III 之间。类群 III (NG-93) 具有将类群 I 和类群 II 分泌的中间产物转化为力复霉素的能力, 因此它的阻断部位必在类群 I 和 II 的前面。类群 IV (NG-271, 65) 只能将类群 I 的中间产物转化为力复霉素, 而不能作为类群 II 或 III 的受体菌, 因此它们的阻断部位至少包括了类群 II、III 两个类型的阻断部位。为了进一步研究中间产物, 必须有定量方法测定中间产物, 由于中间产物结构尚不明确, 而且浓度也低, 无法应用化学或物理方法

来测定它。因此我们根据突变株相互之间的共合成关系, 研究了生物测定中间体的方法。本文报道互补图中几个中间体的生物测定方法, 结果表明这一方法可以应用于有共合成关系的菌对。

### 材料和方法

#### (一) 供体菌发酵上清液的制备

培养基成分和培养条件见前报<sup>[1]</sup>。供体菌斜面培养 7 天后接入种子培养基,  $28^\circ\text{C}$  170 rpm 摇床培养 2 天, 再接入发酵培养基, 在  $28^\circ\text{C}$  170 rpm 摇床培养 5 天, 将发酵液在台式离心机 3,000 转/分离心 10 分钟, 取上清液, 置于容器中充氮气保存, 可用一星期。

#### (二) 受体菌琼脂块的制备

因所用地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) 的变异株均是不产孢子的菌株, 为了制造受体菌琼脂块, 使在平板上菌体生长尽可能均匀, 经过多次试验, 证明下列方法可得到生长均一的平板, 适于制备琼脂块。受体菌斜面在  $28^\circ\text{C}$  培养 7 天后, 用竹针挑取菌苔 ( $1 \times 3 \text{cm}^2$ ), 置于内含细砂和玻璃珠 (10g:40g) 的 250ml 三角瓶中, 加

本文于 1980 年 8 月 20 日收到。

生理盐水 12ml, 使液面不超过玻璃珠, 摇床振荡 5 分钟, 用两层擦镜纸过滤得菌悬液备用。将 Bennet 琼脂在 9cm 平皿中浇底层 15ml, 待凝固后, 以含有 3% 上述受体菌悬液的 Bennet 琼脂 15ml 浇上层平板, 凝固后在 28℃ 培养 6 天后备用。检定所用的琼脂菌块, 是用灭菌的不锈钢打洞器(内径 4mm) 将上述培养好的受体菌平板的上层琼脂打出的菌块。

### (三) 转化

将供体上清液适当稀释后用 10 $\mu$ l 微量注射器, 在每一琼脂菌块上注加 2 $\mu$ l, 然后在 28℃ 保温转化过夜。转化时琼脂菌块需放在空平皿中, 平皿搁置于含少量水的铝锅内保湿, 以免琼脂菌块失去水分。

### (四) 检定

检定菌用藤黄八迭球菌, 培养条件见前报<sup>[1]</sup>。将标准力复霉素 SV 10 $\mu$ g/ml 在受体菌琼脂块上注加 2 $\mu$ l, 每个检定平皿中放两块上述含有标准力复霉素 SV 的琼脂菌块作为对照, 放四块已转化的琼脂菌块, 在 37℃ 培养过夜, 测量抑菌圈直径。根据标准曲线, 计算出转化后菌块力复霉素的效价, 即以每毫升溶液所含力复霉素 SV 的微克数表示。

### (五) 标准曲线的制备

将标准力复霉素 SV 配制成 2.5 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 15 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml, 40 $\mu$ g/ml 六种不同浓度, 在空白琼脂块上注加不同浓度的标准力复霉素 SV 各 2 $\mu$ l, 每种浓度做两套平皿, 每

表 1 力复霉素 SV 中间产物的生物测定\*

Table 1 Bioassay of Intermediates of Rifamycin SV

供体+受体 Donor + Receptor	稀释度 (倍数) Dilution	试验 experiment					
		I		II		III	
		效价 Potency ( $\mu$ g/ml)	误差* Error (%)	效价 Potency ( $\mu$ g/ml)	误差 Error (%)	效价 Potency ( $\mu$ g/ml)	误差 Error (%)
A-32 + NG-131	10	120	+2.2	117.5	-2.0		
	12	120		112.8			
H-140 + NG-131	4	67	+5.3	55	-5.5		
	6	50.7		50.7			
NG-285 + NG-131	8	110.4	-11.3	128	+11.3		
	10	100		136			
A-32 + NG-65	6	28.8	-0.8	24.8	+0.8	28.2	0
	12	23.6		23.6		23.6	
	14	20.8		26.0		22.0	
H-140 + NG-65	10	39.0	+1.3	41.0	-1.2	41.0	0
	12	43.8		44.6		41.0	
	14	47.0		40.9		46.2	
NG-285 + NG-65	14	—	-3.3	56.4	-9.4	71.4	+12.0
	16	65.6		49.0		62.4	
	18	46.8		52.6		61.6	

\* 误差以每次试验中各稀释度测出的平均值与两次或三次试验各数据的平均值相比求得。

Percentages of error denote the deviation of the results of one experiment from the average of 2 or 3 experiments.

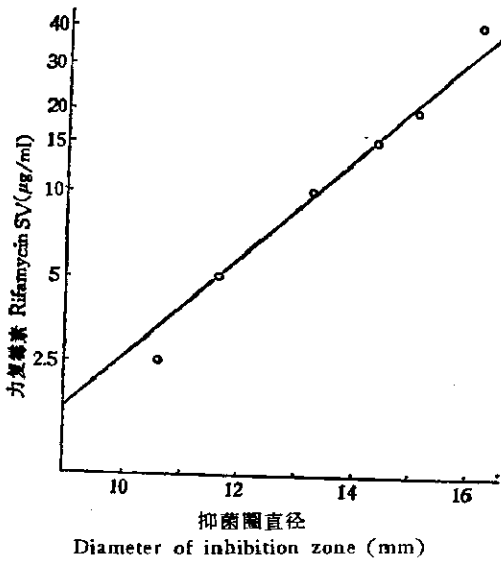


图1 琼脂块法测定力复霉素 SV 活力标准曲线  
Fig. 1 Standard curve for rifamycin SV on agar plugs

个藤黄八选球菌平板上放五个琼脂块(每皿另加两块含标准力复霉素 SV  $10\mu\text{g/ml}$  的琼脂块),在  $37^\circ\text{C}$  培养过夜后测量抑菌圈,画出标准曲线(图1)。

## 结果与讨论

在不加菌体的琼脂块上滴加标准力复霉素溶液,放在藤黄八选球菌检定平板上,经多次试验证明抑菌圈大小在  $2.5\mu\text{g/ml}$ — $40\mu\text{g/ml}$  之间的标准曲线重复性较好(见图1)。应用受体菌琼脂块进行检定,关键的因素是菌苔生长必须均匀,在试验方法中已经指出,应用上述方法制作的受体菌平板可以获得良好结果。标准力复霉素 SV 溶液和样品务必滴在琼脂块中央,静置半小时,待其吸收后方能移动,避免液体溢出琼脂块,影响测定结果。为了获得正确的试验结果,调节样品的稀释倍数,以使效价读数尽可能在标准曲线的中间部分。如果读数在标准曲线的两端,计算结果偏差较大。表1表明定量生物测定方法的误差最大范围在  $-11.3\%$ — $+12\%$  之间,而大多数误差分布在  $\pm 5.5\%$  以下,所以和一般

的生物定量测定方法误差相近。造成测定误差的原因除同一般生物定量测定方法原因之外,还可能由于转化时间、温度,琼脂块厚薄、大小以及菌苔不均匀所引起,所以上述条件的掌握是本测定方法必须注意的事项。

多种供体+受体组合的检定结果见表1。供体菌 A-32、H-140、NG-285 的上清液本身没有抑菌圈,受体菌块 NG-65 也没有抑菌圈而 NG-131 菌块有 1—2mm 抑菌圈,但因在检定皿中的  $10\mu\text{g/ml}$  标准力复霉素 SV 也滴在受体菌块上,在检定时可以抵消,并不影响中间体转化能力的测定。另外,这一生物检定方法在本文所涉及的非活性菌株间,有共合成关系的菌株对之间均可以应用。应指出的是根据这一原理设计的中间体定量测定方法在文献中未见报道。不同时间培养的两批 A-32 发酵液和 NG-131 菌块,其共合成能力分别为  $117.6\mu\text{g/ml}$  和  $135\mu\text{g/ml}$ ,说明 A-32 + NG-131 的共合成能力稳定性较好。表1结果也指出同一供体菌分泌的中间体,在用不同受体菌测定时,生物效价不同,如 A-32 + NG-131 与 A-32 + NG-65 效价之比为 5 左右。这可能是由于不同受体菌转化效率不同所引起,从表1结果可以看出 NG-65 转化效率都低于 NG-131;也可能由于各受体菌所转化生成的最终产物的生物活性之间有所差异,而造成生物效价的不同。

此外,琼脂块法不仅可用在测定中间体含量,而且也可用在筛选非活性突变株的互补配对。

## 参 考 文 献

- [1] 焦瑞身等: 植物生理学报, 5 (3): 185—191, 1979.
- [2] 陈津美等: 植物生理学报, 6 (4): 331—335, 1980.

STUDIES ON THE BIOCHEMICAL COMPLEMENTATION OF  
INACTIVE MUTANTS OF *NOCARDIA MEDITERRANEI*  
AND THE BIOSYNTHETIC PATHWAY OF RIFAMYCIN  
III. QUANTITATIVE METHOD FOR THE BIOASSAY OF THE  
INTERMEDIATES OF RIFAMYCIN BIOSYNTHESIS

Jin Zhikun Zhang Xuecong Wei Zhongdi  
Shen Meijuan Jiao Ruishen\*

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

A quantitative assay method, based on the principle of cosynthesis, was developed, in which the fermentation broth of the donor strain was added to agar plugs covered with mycelia of the receptor strain, and after incubation for conversion into active antibiotic, the potency was assayed by placing the agar plugs on *Sarcina lutea* plates. The data from several experiments using different pairs of cosynthesis showed that the intermediates could be assayed with the corres-

ponding receptor strains, showing the validity of the principle of this assay. The useful range of standard curve was from 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of rifamycin SV. The percentage error of the titer obtained from three experiments ranged from -11.3% to +12%, and most of the error was lower than 5.5%. Results from three experiments demonstrated that this assay method gave satisfactory reproducibility for the study of biosynthetic intermediates.

\*J. S. Chiao