

庆丰链霉菌的连锁分析

郑幼霞 赵人俊

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

用四点杂交方法对庆丰链霉菌的六个基因位点进行连锁分析, 初步确定了它们在环形连锁图上的排列顺序, 并同天蓝色链霉菌 A3(2)、龟裂链霉菌连锁图上的相应位点作了比较, 它们之间是十分相似的。

关键词 遗传重组; 四点杂交; 连锁分析; 连锁图

自从 Hopwood 等报道了天蓝色链霉菌 A3(2) 第一个遗传分析的定量结果^[1], 并建成了环形连锁图^[2]以来, 他们建立的遗传学实验系统及遗传图的绘制方法已被成功地应用于对其它链霉菌的研究, 在产生抗生素的链霉菌中, 龟裂链霉菌(*S. rimosus*)^[3]、比基尼链霉菌(*S. bikiniensis*)^[4], 首先被选择作为研究的对象, 期望能由此提供凭借遗传操纵来改良菌株的有用资料, 这两个菌株连锁图和天蓝色链霉菌的极为相似。此后对橄榄色链霉菌(*S. olivaceus*)^[5]和淡青链霉菌(*S. glaucescens*)^[6]的研究也得到了基本相同的结果。

庆丰链霉菌是庆丰霉素的产生菌, 它的分类鉴定^[7]及其遗传学特性^[8-10]已经有了一些报道。从 1978 年起, 我们就开始了对庆丰链霉菌遗传重组的研究, 证明在这个菌种中有接合重组系统的存在。本文主要报道利用四点杂交进行连锁分析的结果, 初步确定了六个标记在环形图上的排列顺序, 并和天蓝色链霉菌、龟裂链霉菌的连锁图作了比较。

材料和方法

(一) 菌株

本文所用的庆丰链霉菌衍生突变株列于表 1。

(二) 培养基

完全培养基(CM)和最低培养基(MM)按照以前的报道^[11]。重组子的检出及其基因型鉴别所用的培养基则以 MM 为基础, 适当地补充营养因子(苏氨酸、胱氨酸、脯氨酸分别为 50 μ g/ml, 腺嘌呤为 15 μ g/ml, 泛酸为 5 μ g/ml)或链霉素(20 μ g/ml)。

(三) 8 MOP-近紫外光(365nm)(以下简称 8 MOP-NUV)复合处理的方法

参照 Townsenol 等所介绍的方法^[11]。把光敏诱变剂 8MOP (8-methoxypsoralen, 8-甲氧基骨脂素, 美国 Sigma 化学公司产品)溶解在无水酒精中, 其浓度为 5mg/ml, 避光保存备用。把供诱变用的出发菌株斜面培养物制成孢子悬液(浓度约为 10^8 — 10^9 /ml)2ml, 移到直径为 6cm 的无菌平皿中, 用微量进样器注入 8MOP 酒精溶液, 使其最终浓度为 100 μ g/ml, 经充分混和均匀后静置一小时。然后把该平皿移到 365nm 紫外光灯(上海科艺光学仪器厂生产)下, 垂直距离 9.5cm

本文于 1984 年 8 月 13 日收到。

张益荣同志参加部分工作。

本文所用缩写符号: Ade⁻: 腺嘌呤缺陷, Cys⁻: 胱氨酸缺陷, Pan⁻: 泛酸缺陷, Pro⁻: 脯氨酸缺陷, Str^r: 链霉素抗性, Thr⁻: 苏氨酸缺陷; SQP 1⁺: 带有 SQP1 质粒的菌株, SQP1⁻: 不带有 SQP1 质粒的菌株; 8MOP-NUV, 8-甲氧基骨脂素(8-methoxypsoralen)与近紫外线(365nm)复合处理。

表 1 菌株的描述

Table 1 Description of strains

菌 号 No. of strain	遗 传 标 记 Genetic marker	来 源 Origin
A177	Thr ⁻ SQP1 ⁺	M15 菌株经 NTG 诱变筛选获得 Mutant derived from M15 strain by treating with NTG
A733	Pan ⁻ SQP1 ⁻	Q-100 菌株经 NTG 诱变筛选获得 Mutant derived from Q-100 strain by treating with NTG
NM55	Thr ⁻ Cys ⁻ SQP1 ⁺	A177 菌株经 8MOP-NUV 诱变筛选获得 Mutant derived from A177 strain by treating with 8MOP-NUV
MS30	Pro ⁻ Ade ⁻ Str ^r SQP1 ⁺	A553 菌株经 8MOP-NUV 诱变筛选获得的 Str ^r 变株 Str ^r mutant derived from A553 strain by treating with 8MOP-NUV

照射处理一小时, 将处理过的孢子悬液作适当稀释, 取 0.1ml 涂布在 CM 平板上。经 28℃ 培养, 待单孢子菌落长成后, 按以前报道^[12]的方法筛选突变株。

(四) 杂交亲株的准备

进行杂交之前, 两杂交亲株都必须事先经过严格的性状鉴定, 方可作为实验材料。先把两个亲株的斜面培养物在 CM 平板上涂布, 使长成单菌落, 再用丝绒影印法复印到补充有所需营养的 MM 平板上, 来鉴定各个亲株的表型。从中选取单菌落移到斜面上增殖, 作为杂交材料。

(五) 杂交

把用于杂交的亲株斜面培养物, 分别悬浮在 1ml 左右的含吐温 80 生理盐水中, 使成悬液, 然后分别吸取 0.5ml 孢子悬液, 置于同一空试管内, 用吸管作充分混和, 均匀地涂布到茄子瓶斜面上混合培养 6—7 天。

(六) 重组子的检出以及基因型的鉴别

经混合培养成熟的斜面培养物, 混悬在 8ml 左右的含吐温 80 生理盐水中, 经玻璃珠打散, 无菌纱布过滤, 离心, 所得孢子沉淀物再以 2ml 含吐温 80 生理盐水重新悬浮后, 作适度稀释, 取 0.1 ml 稀释液涂布在选择平板上。28℃ 培养 4—5 天, 检查各个平板的菌落数, 并计算重组频率。继续培养 2—3 天后, 再影印到含有相同成分的选择平板上, 来排除杂交中可能产生的异核子。然后从该平板上随机挑取 100 个左右的单菌落孢子点种在含有相同成份的选择培养基上, 培养 6—7 天作

为母平板影印到四种不同的鉴别培养基上。按照各个重组子的表型进行分类统计。

结 果

(一) 标记变种的获得

本实验所用的菌株及其所具有的遗传标记列于表 1。这些变种的获得主要通过以下三种方法:

1. NTG 诱变获得单缺陷变种: 出发菌株的孢子悬液经 NTG 3mg/ml 处理 1 小时筛选得到。方法步骤按以前报道^[12]。

2. 8MOP-NUV 诱变获得双缺陷变种: 以 100μg/ml 8MOP 或波长为 365nm 的近紫外光对庆丰链霉菌 A553 菌株分别处理一小时, 都没有致死, 也没有检出变种。如果以 100μg/ml 8MOP 单独处理一小時后, 再将孢子悬液移置 NUV 下照射一小时作复合诱变处理, 其致死率达 98% 以上, 并产生比较明显的诱变效应, 从而获得双缺陷变种(表 2)。

3. 抗生素抗性变种的获得: 在含有不同浓度的链霉素 (50—200μg/ml) 肉汤摇管中选择抗性突变株。所得链霉素抗性变株的抗性水平, CM 中为 200μg/ml, MM 中为 30μg/ml。

表 2 8MOP-NUV 处理的诱变效应

Table 2 Mutagenic effect of 8MOP-NUV treatment

处 理 Treatment	存 活 率 Survival rate (%)	诱 变 率 Mutagenic rate (%)
8MOP 100μg/ml 处理 1 小时 8MOP 100μg/ml treated for 1h	100	0
NUV(365nm) 照射 1 小时 Irradiation at NUV (365nm) for 1h	100	0
8MOP 处理 1 小时后, NUV(365nm) 照射 1 小时 NUV(365nm) irradiation 1h, after 1h treatment with 8MOP	1.47	0.14

试验菌株: A553 菌株 (Pro⁻)

Tested strain: A553 (Pro⁻)

(二) 四点杂交分析

参照 Hopwood 等所介绍的方法^[13]对具有四个不同遗传标记的互补菌株对进行杂交。在我们的实验室中主要采用两类标记菌株作为亲本, 即一对双缺陷的互补菌株作为亲本的杂交(杂交 A), 及三标记菌株(两个缺陷标记加上一个抗性标记)和单缺陷菌株为亲本的杂交(杂交 B)。一对亲本杂交时, 先在完全培养基上混合培养, 待孢子成熟后, 用无菌生理盐水洗下, 做成孢子悬液。经适当稀释, 取 0.1ml 均匀涂布在四种补充了不同营养成分的选择培养基上。28℃培养后(约四天)可以看到长出许多菌落, 排除异核子后, 从每一个选择培养基上用竹签随意挑取约 100 个菌落, 顺次点种在与前相同的选择培养基上。孢子成熟后作为母平板, 用丝绒影印到补充有各种不同营养成份的鉴别培养基上, 分别检出重组子代中各种基因型菌落数。由于每一种选择培养基至少可以得到四种重组基因型, 四种培养基总共可得十六种, 其中除了一对为互补的亲株型, 以及相互重复的类型外, 最后可以得到九种不同的重组基因型。在这九种基因型中有两对为互补, 其余五种则各代表五对互补基因型的一种。从随意挑取的约 100 个菌落中, 所包含的每一种基因型菌落数(即表 3 中的 a

栏), 以原来涂布在选择培养基上 0.1ml 杂交混合液中总菌落数为基础, 可以换算得到各种基因型的相对重组频率(即表 3 中的 b 栏), 而每一个特定基因型重组子在不同选择培养基上所得到的相对重组频率十分接近, 因而可以从表中四个 b 栏所列的数字取其平均值而得表中的 c 栏, 再由此推算得到六对标记组合的相对重组频率。

杂交 A 的亲株为 MS30(Pro⁻Ade⁻Thr⁺Cys⁺)×NM55(Pro⁺Ade⁺Thr⁻Cys⁻), 它们经过混合培养进行四点杂交后, 所得到的九种不同重组基因型菌落数(频率)如表 3a 栏所列。可以看到每一种基因型在四个选择培养基上所得到的相对频率十分接近, 差别最大的一种, ++ thr + 为 3—7, 其它类型的差异则更小。按照 Hopwood 在他早期的报道中指出^[14], 两个互补基因型的菌落数应该基本相近。可是在杂交 A 的数据中, 其中一对 pro cys ++ 和 ++ thr ade 的菌落数分别为 3 和 4, 其相对频率均为 1, 而另一对 + cys + ade 和 pro + thr + 的菌落数分别为 112 和 28, 相差四倍。我们推测, 这种现象的出现可能和杂交亲株携带性质粒 SQP1, 因而产生 SQP1⁺ × SQP1⁻极性杂交的结果有关。

从表 3c 栏的七个数据, 可以推算六对标记之间的相对重组频率(表 3 下部),

表 3 杂 交 A

Table 3 Cross A:

MS30(Pro⁻Ade⁻Thr⁺Cys⁺)×NM55(Pro⁺Ade⁺Thr⁻Cys⁻)

重组子子代基因型 Genotype of recombinant progeny				选择培养基 Selective medium*								平均频率 Average frequency
				A		B		C		D		c
				a	b	a	b	a	b	a	b	
pro	+	+	+	111	39					134	54	47
+	cys	+	+					8	8	18	7	8
+	+	thr	+	9	3	37	7					5
+	+	+	ade			84	14	17	18			16
+	+	+	+	12	4	30	5	4	4	8	3	4
pro	+	thr	+	28	10							65
+	cys	+	ade					112	119			
pro	cys	+	+							3	1	
+	+	thr	ade			4	1					1
试验菌落数 No. of colonies tested				160		155		141		160		
单位体积重组子数 No. of recombinants per unit volume					56		27		149		65	

各个标记对之间的相对重组频率

Relative recombination frequencies in each marker-pair

pro-ade	pro-thr	pro-cys	ade-thr	ade-cys	thr-cys
47	8	5	47	47	5
16	16	16	8	5	16
65	4	4	4	4	65
1	65	1	1	65	1
129	93	26	60	121	87

注：a. 从各个培养基中随意挑取的 100 多个菌落中，各种子代类型的数量；

b. 各个选择培养基上单位体积孢子悬液(0.1ml)中各子代类型的相对重组频率，由 a 栏数字换算而来；

c. 为 b 栏数字的平均数。

* 选择培养基：A. 补充脯氨酸和苏氨酸；B. 补充苏氨酸和腺嘌呤；C. 补充腺嘌呤和胱氨酸；D. 补充脯氨酸和胱氨酸

a. No. of colonies of each progeny class in a random sample over 100 colonies from each selective medium

b. Relative recombination frequencies of each progeny class per unit volume of spore suspension (0.1 ml) in each selective medium, derived from the figures in column "a" by scaling

c. Average values for the figures in appropriate column "b"

* Selective medium: Supplemented with A. proline and threonine; B. threonine and adenine; C. adenine and cysteine; D. proline and cysteine

可以看到有四对的频率比较高，把它们的平均数 108，算作 50% 重组，那末其余两对的相对重组频率，Pro-cys 与 ade-thr 分别为 12% [(26/108) × 50] 和 28% [(60/108) × 50]，表现为相互之间的连锁。

在补充有不同营养成分的选择培养基中，杂交亲本的四个遗传标记，有两个是选择性标记，另两个(即所补充营养的缺陷标记)则为非选择性的。从非选择性等位基因在重组子代中的分离情况，我们可以对

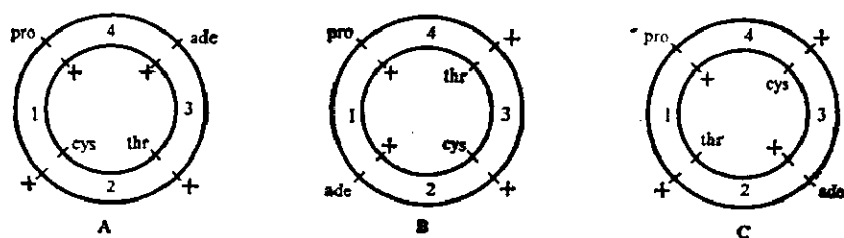


图1 杂交A中四种标记的三种可能的排列顺序

Fig.1 The three possible arrangement sequences of four markers in cross A

A. 模式1

Model 1

B. 模式2

Model 2

C. 模式3

Model 3

这四个标记的排列顺序从三种可能的模式(图1)中确定其中正确的一种。参考范福仁《生物统计学》方法,用表3所列数据排成 2×2 或然率表4,分析选择性及非选择性等位基因的独立性。如果两个非选择性标记相互邻近,那末P值应该很低,因为要发生这一对基因的分离,必定需要进行多次交换。因此从表4的分析可知,ade-

thr, pro-cys 两对基因的P值均小于0.001,应该是相互邻近的位点。而 pro-thr, ade-cys 两对基因的P值较大,必有其他的等位基因介于其间。这个结果不仅证明庆丰链霉菌染色体环形结构,而且也可以确定图1所列的三种基因排列模式中,第一种是正确的。按照这个模式,产生多重交换(1,2,3,4交换)的基因型是 pro cys ++

表4 用 2×2 表分析标记顺序Table 4 Analysis of marker sequences by means of 2×2 tables

选择培养基 A

Selective medium A

(选择性等位基因: cys⁺ ade⁺)(Selective alleles: cys⁺ ade⁺)

	pro ⁺	pro ⁻
thr ⁺	12 (1, 3)	111 (3, 4)
thr ⁻	9 (1, 2)	28 (2, 4)

P = 0.043

选择培养基 C

Selective medium C

(选择性等位基因: pro⁺ thr⁺)(Selective alleles: pro⁺ thr⁺)

	ade ⁺	ade ⁻
cys ⁺	4 (1, 3)	17 (1, 4)
cys ⁻	8 (2, 3)	112 (2, 4)

P = 0.147

选择培养基 B

Selective medium B

(选择性等位基因: pro⁺ cys⁺)(Selective alleles: pro⁺ cys⁺)

	ade ⁺	ade ⁻
thr ⁺	30 (1, 3)	37 (1, 4)
thr ⁻	84 (1, 2)	4 (1,2,3,4)

P < 0.001

选择培养基 D

Selective medium D

(选择性等位基因: ade⁺ thr⁺)(Selective alleles: ade⁺ thr⁺)

	pro ⁺	pro ⁻
cys ⁺	8 (1, 3)	131 (3, 4)
cys ⁻	18 (2, 3)	3 (1,2,3,4)

P < 0.001

注: 根据表3数据, 每一个选择培养基上两个非选择性等位基因的分离。

As the data in table 3, the segregation of the two non-selected alleles in each selective medium.

表 5 杂交 B

Table 5 Cross B:

MS30 (Pro⁻Ade⁻Pan⁺Str^r) × A733 (Pro⁺Ade⁺Pan⁻Str^r)

重组子后代基因型				选择培养基 Selective medium*								平均频率
Genotype of recombinant progeny				A		B		C		D		Average frequency
				a	b	a	b	a	b	a	b	
pr ^o	+	+	str	41	15			81	29			22
+	ade	+	str			4	1			28	2	2
+	+	pan	str					0	0	19	2	1
+	+	+	str	0	0	0	0	1	0.4	30	3	1
+	+	+	s	21	7	72	18					13
pro	+	+	s	25	9							
+	ade	pan	str							16	1	5
+	ade	+	s			9	2					
pro	+	pan	str					14	5			4
试验菌落数				87		85		96		93		
No. of colonies tested												
单位体积重组子数				31		21		34		8		
No. of recombinants per unit volume												
由 2×2 表求得 P 值				0.807		<0.001		0.317		1		
P value evaluated from 2×2 tables												

* 选择培养基: A. 补充脯氨酸; B. 补充腺嘌呤; C. 补充脯氨酸、泛酸和链霉素; D. 补充腺嘌呤、泛酸和链霉素

* Selective medium: Supplemented with: A. proline; B. adenine; C. proline, pantothenic acid and streptomycin; D. adenine, pantothenic acid and streptomycin

或 ++ thr ade, 而从表 3 的数据中看到, 得到这对基因型的频率为最低。

进一步用杂交 B: MS30 (Pro⁻ Ade⁻ Pan⁺ Str^r) × A733 (Pro⁺ Ade⁺ Pan⁻ Str^r) 来确定 pan 及 str 两个位点的位置。

从表 5 所列杂交 B 的数据, 按 2 × 2 表计算 P 值来检验每一个选择培养基上非选择性标记的独立性, 数据列于表 5 的最后一行。可见 ade-str 这一对位点的 P 值小于 0.001, 缺乏独立性, 表明它们之间的相互连锁。在杂交 A 中已经表明, ade 与 thr 两位点之间相互连锁, 从而证明它们之间以 str-ade-thr 的排列顺序相互连锁。而 pro-pan 的 P 值为 0.317, ade-pan 的 P 值接近于 1。推测 pan 位点处在 pro 与 ade 之

间, 而接近于 pro 位点。

(三) 庆丰链霉菌的连锁图

按以上所述的作图步骤和原则, 将杂交 A 和 B 所得的结果综合一起加以分析, 我们可以把庆丰链霉菌的六个标记按一定的排列顺序得到基因连锁图 (图 2)。图上

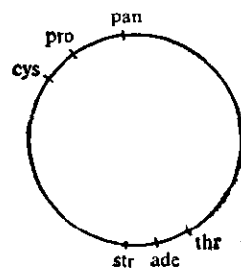


图 2 庆丰链霉菌连锁图

Fig. 2 Linkage map of *S. qingfengmyceticus*

的间隔并不表示确切的图距，但我们可以从杂交数据的遗传分析中了解这些标记的相互关系，如 *pro-cys*、*str-ade-thr* 均为相互邻近的连锁标记，因此它们在杂交子代中是较少分离的。

讨 论

本研究通过四因子杂交，以选择单倍体重组子的方法进行庆丰链霉菌的连锁分析，得到了和天蓝色链霉菌 A3(2)、龟裂链霉菌等基本相同的环形连锁图，把庆丰链霉菌和后两者连锁图上的相应位点进行比较，可以看到三者之间的高度相似性(图 3)。虽然天蓝色链霉菌的遗传图上没有对

菌属在进化过程中基因排列上的稳定性。

当我们从选择培养基上生长的杂交子代中检出单倍体重组子时，常常可以同时检测到一些异核子，它们的数量随杂交亲株互补标记的不同以及选择培养基中补充不同的营养成份而有所变化，一般大约在 10%。我们在以前的工作中已经观察到了庆丰链霉菌在杂交过程中有形成异核子的阶段^[1]。但是，当把它们从选择培养基上移植到相同成分的培养基上时，就不能生长。这样，在鉴定基因型时，虽然工作量较大，但可以把异核子和单倍体重组子区分开来，避免了它对遗传分析的干扰。

本文所报道的杂交实验都至少重复三次，得到基本相符的数据。但在多次其它的杂交实验中，也常常出现一些数据上的偏差。譬如，同一基因型重组子在不同的选择培养基上所出现菌落数不一致；一对互补基因型的重组频率差异较大，产生这些问题的原因可能有以下几个方面：(1)不能排除在某一些杂交标记的组合中，产生一些暂时稳定的异核子，从而影响数据的精确性；(2)由于性质粒 SQP1 参与作用而产生杂交的极性现象。虽然 SQP1 质粒至今未被分离纯化，但其性因子特性已被证实^[10]。从其遗传行为看，它并不象天蓝色链霉菌的性因子 SCP1 那样能整合在染色体的特定位置上(九点钟的位置)作为附加子促进特定基因的高频重组。而 SQP1 质粒只表现出以游离状态存在，随意促进各种标记重组频率的作用；(3)我们发现庆丰链霉菌有一些营养缺陷表型显示出极不稳定的特性，往往产生自发变异(实验数据未报道)，从而造成重组数据不一致。因之杂交亲株在使用前必须作单菌分离，小心鉴别表型，才能使实验获得成功。

本文所描述的庆丰链霉菌连锁图上包括的标记数目虽然还不够多，但可以作为

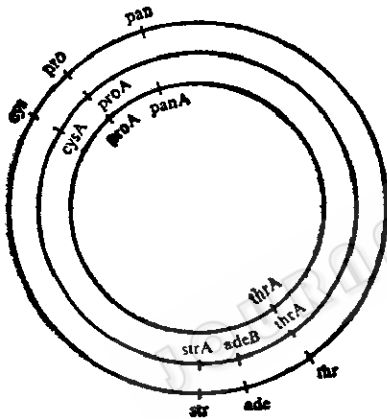


图 3 庆丰链霉菌(外圈)与天蓝色链霉菌 A3(2)(中圈)及龟裂链霉菌(内圈)连锁图的比较

Fig.3 Comparison of the linkage maps of *S. qingfengmycelicus* (outer circle), *S. coelicolor* A3(2)(middle circle) and *S. rimosus* (inner circle)

(天蓝色链霉菌 A3(2)和龟裂链霉菌连锁图上只选择有关的位点标明)

(Only a selection of relevant loci from the linkage maps of *S. coelicolor* A3(2) and *S. rimosus* is shown.)

pan 位点定位，但庆丰链霉菌的 *pan* 位点却和龟裂链霉菌的位点相对应，尽管我们并不能肯定这三种链霉菌的遗传标记之间表型的绝对等同，但是仍然可以看到链霉

进一步扩大标记范围的基础,同时也显示了链霉菌在进化中基因排列的保守性,这些都是令人很感兴趣的。

参 考 文 献

- [1] Hopwood D. A.: *Annual of the New York Academy of Sciences*, **81**: 887—898, 1959.
- [2] Hopwood D. A.: *J. Mol. Biol.*, **12**: 514—516, 1965.
- [3] Friend E. J. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **68**: 187—197, 1971.
- [4] Coats J. H. et al.: *J. Bact.*, **105**: 880—885, 1971.
- [5] Matselyukh, B. P. et al.: *Genet. indust. Microorg. Proc.*, 2nd Symp. London, New York, San Francisco p. 553—564, 1974.
- [6] Baumann R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **81**: 463—474, 1974.
- [7] 上海植物生理研究所微生物室农用抗菌素组: *微生物学报*, **14**: 42—46, 1974.
- [8] 郑幼霞等: *遗传学报*, **7**(2): 111—118, 1980a.
- [9] 郑幼霞等: *遗传学报*, **7**(4): 299—306, 1980b.
- [10] 郑幼霞等: *遗传学报*, **9**(1): 8—13, 1982.
- [11] Townsenol M. E. et al.: *J. Appl. Bact.*, **34**: 799—801, 1971.
- [12] 赵人俊等: *遗传*, **3**(4): 6—8, 1981.
- [13] Hopwood D. A.: *Bact. Rev.*, **31**: 373—401, 1967.
- [14] Hopwood D. A.: *Symposium on Genetics and Breeding of Streptomyces*. (Zagreb: Yugoslav Academy of Sciences and Arts) Dubrovnik, p. 5—18, 1969.
- [15] 王洪洲、郑幼霞: *遗传学报*, **9**(3): 172—179, 1982.

THE LINKAGE ANALYSIS IN *STREPTOMYCES QINGFENGMYCETICUS*

Zheng Youxia Zhao Renjun

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica)

The linkage analysis of six gene loci in *S. qingfengmyceticus* was carried out by the method of a four-factor cross. Their arrangement sequence was tentatively determined on a circular linkage map; moreover, the map is very similar as compared with relevant loci of the map in *S. coelicolor* A3(2) and *S. rimosus*.

Key words

Genetic recombination; Four-factor cross; Linkage analysis; Linkage map