

应用原生质体融合技术选育农抗 120 高产菌株的研究*

朱昌雄 谢德龄 倪楚芳 高惠江

(中国科学院生防室, 北京)

随着工业微生物育种在理论和技术上的进展, 原生质体融合技术在抗生素育种工作中越来越受到重视。应用原生质体融合技术培育出新抗生素或提高抗生素产量, 在国内外已有成功报道^[1-4]。

农抗 120 是刺孢吸水链霉菌产生的一种碱性水溶性核苷类抗生素, 其对作物真菌病害具有广谱抗性, 对瓜果蔬菜类白粉病、炭疽病、枯萎病等均有良好的防治效果, 并已大面积应用。本文报道用原生质体融合方法选育出农抗 120 高产菌株的部分结果。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌株: 本实验所用菌株 TF-120 对硫酸链霉素 (Sm) 100 μ g/ml 敏感, 耐农抗 120 (120) 5000 μ g/ml 以上; KT-739 对 120 5000 μ g/ml 敏感, 耐 Sm 100 μ g/ml。

2. 培养基: 斜面孢子培养基 (CM) 及有机液体培养基 (LM) 见文献[5]; 原生质体形成培养基 (PI) 及再生培养基 (R₁) 见文献[6]; 再生高渗培养基 (HCM): CM + 0.3mol/L 蔗糖, 0.05 mol/L MgCl₂·6H₂O, 0.02mol/L CaCl₂·2H₂O。

(二) 方法

1. 原生质体的制备和再生方法参考文献 [6, 7]。

2. 原生质体诱导融合方法参考文献 [3, 6]。

3. 融合子的检出及其非选择性检测: 融合子用抗性标记直接检出, 对检出的融合子连续传代, 以检测其稳定性, 并观察融合子与亲株的菌落特性、孢子颜色及有效组分之间的差异。

结 果

(一) 原生质体的形成与再生

我们对溶菌酶的用量、保温时间对原生质体释放的影响进行试验。保温 60min, 溶菌酶量为

3mg/ml 时, 原生质体释放量达到最高, 随时间延长, 原生质体数目有下降趋势。

刺孢吸水链霉菌原生质体在 R₁ (补充所需营养) 和 HCM 培养基中的再生频率相近, TF-120 为 19.4%, KT-739 为 16.7%, 但后者形成菌落速度比前者早两天。另将原生质体涂布在 HCM 上后, 再倒上一层软琼脂的 HCM, 再生频率提高到 22.4%。

在原生质体制备过程中还观察到省去蔗糖溶液洗涤, 直接用 PI 培养基洗涤二次后酶解, 原生质体的再生频率能提高 4—5%。

(二) 不同分子量的 PEG 对诱导原生质体融合频率的影响

用分子量 1000、4000、6000 的 PEG 分别处理二个出发菌株的混合原生质体诱导融合, 结果以 PEG1000 对刺孢吸水链霉菌原生质体的诱导效果为佳, 融合频率可达到 1.3%。

(三) 融合子的稳定性测定

将在含 Sm 和 120 的再生培养基上生长的菌落, 分别影印或逐个检出于同时含和不含有 Sm 及 120 的 CM 上, 连续传六代, 以检查融合子的稳定性, 观察结果表明, 只有 13.7% 的融合子稳定, 87.3% 的出现分离现象。

(四) 融合子的非选择性表型分析

对 TF-120 × KT-739 原生质体融合所产生的融合子 (第七代) 与两亲株进行了某些非选择性遗传特性的对比和分析: 从表 1 结果可见, 在孢子颜色、抗性标记及有效组份等方面, 除含亲株型外, 还出现了新类型, 表明二个亲株的基因组在融合交换过程中发生了新的组合或是两基因并存后分离的结果。其中融合子 FR32 产生的有效物质含量比亲株 TF-120 高 30%, 比 KT-739 高 120% 左右。

本文于 1988 年 8 月 26 日收到。

* 本研究是国家自然科学基金资助项目。

表 1 融合子和亲株的非选择性特性比较

菌 株 特 性	融 合 亲 株		融 合 子		
	TF-120	KT-739			
孢子颜色	银 鼠 灰	象 灰	亲株型 FR16 银鼠灰 FR4 象灰 融合分离型 FR38 淡灰 FR29 灰白 融合重组型 FR32 鹤灰至鼠灰 FR14 淡红灰 FR17 猴毛灰		
抗药性	Sm ^r 120 ^r	Sm ^r 120 ^r	亲株型 FR16 Sm ^r 120 ^r FR4 Sm ^r 120 ^r 分离型 FR38 Sm ^r 120 ^r FR29 Sm ^r 120 ^r 重组型 FR32 Sm ^r 120 ^r FR17 Sm ^r 120 ^r		
产 物	120	739	FR32	FR17	FR38
组份数量	3 种	2 种	2 种	5 种	4 种
溶解性	水 溶 性	水 溶 性	水 溶 性	D, E 组份不溶于水, 其他的水溶	第四组份微溶于水, 其他的水溶
主要两组份* A + B 的含量 (μg/ml)	6500—7300	3400—3800	8450—11000	4550—5700	3500—4800

* 管碟法测生物效价

讨 论

我们在原生质体制备过程中省去蔗糖溶液洗的方法与文献[6][8][9]报道有些差异。我们认为农抗 120 产生菌经甘氨酸处理后细胞壁对溶菌酶敏感,易形成原生质体,而 P1 培养基自始至终提供保护的环境,对原生质体再生有利。

TF-120 × KT-739 原生质体融合重组频率较高,且所得到融合子 FR32 产生的两种主要有效成份含量比亲株 TF-120 高出 30% 以上,第 10 代的 FR32 经工厂初试,产量提高 50% 以上(7.5 吨的发酵罐)。这些不仅说明应用原生质体融合技术于微生物育种,比常规育种有很大的优越性,而且获得的高产菌株为扩大农抗 120 的应用面积和范围,提高其经济效益和社会效益,创造了一条更好的途径。

参 考 文 献

- [1] Pigas, J. et al.: *Appl. Environmental Microbiol.*, **44**: 1178, 1982.
- [2] Vournakis, J. N. et al.: *Science*, **219**: 703—709, 1983.
- [3] 郑幼霞等: *生物工程学报*, **1**(3): 32—37, 1985.
- [4] 邢孔昭等: 第五次全国抗生素学术会议论文摘要汇编(上集),中国药学会抗生素学会, p. 173—178, 1985 年,济南。
- [5] 谢德龄等: *抗生素*, p. 169, 1984.
- [6] 庄增辉(译): *微生物学通报*, **12**(4): 175—179, 1985.
- [7] Okanishi, M. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **80**: 389—400, 1974.
- [8] Baltz, R. H.: *J. Gen. Microbiol.*, **107**: 93—102, 1978.
- [9] Hopwood, D. A. et al.: *Nature*, **263**: 171, 1977.

STUDY ON SELECTION OF HIGHER YIELD STRAIN OF AGRICULTURAL ANTIBIOTIC 120 BY PROTOPLAST FUSIONS

Zhu Changxiong Xie Deling

Ni Chufang Gao Huijiang

(Biological Control Laboratory, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Protoplast fusion between two strains, TF-120 (Sm^r120^r) and KT-739 (Sm^r120^r) of *Streptomyces hygrospinosus* var. *beijingensis* were carried out, which was a producer of agricultural antibiotic 120. Their fusions were induced by the addition of PEG (MW 1000) and the fusants displayed variations in spore color, resistance and antibiotic products.

Among the fusants FR32 gave a 30% higher yield of antibiotic than the parent strains.

Key words

Streptomyces hygrospinosus var. *beijingensis*; Agricultural antibiotic 120; Protoplast fusion recombination