

SQP1 质粒上庆丰霉素生物合成基因的变异和重组

赵人俊 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

通过原生质体形成与再生手段可以获得庆丰链霉菌 SQP1 质粒上庆丰霉素生物合成基因发生突变的菌株 (Qm^+q^-)。这些突变株,每两个为一对在斜面上混合培养,使之发生杂交,在所得到的子代菌落中,能检出相当数量回复了庆丰霉素生物合成能力的菌落。推测这些菌落的出现是庆丰霉素合成基因不同突变位点发生遗传重组的结果。

关键词 庆丰链霉菌;原生质体形成与再生;遗传重组

前文报道^[1,2],庆丰链霉菌的质粒 SQP1 决定庆丰霉素生物合成和对庆丰霉素的抗性,并具有感染转移的功能。它可以被吡啶染料、高温处理而消除。Q-100 菌株就是庆丰链霉菌 5[#] 菌株经高温处理得到的质粒消除株 ($SQP1^-$),它既不产生庆丰霉素,同时又失去了对庆丰霉素的抗性 (q^-Qm^+),该菌株与产生庆丰霉素的菌株 ($SQP1^+$) 混合培养后,能以很高的频率重新获得产生庆丰霉素的能力 (q^+) 和对庆丰霉素的抗性 (Qm^+),成为 $SQP1^+$ 菌株。显然,这是由于 SQP1 质粒接合转移的结果。

但是,在以吡啶染料、高温培养或原生质体形成再生细胞之后,丧失庆丰霉素生物合成能力的 q^- 菌株并非都是 Qm^+ ,其中有一定的比例仍然保留着对庆丰霉素抗性的菌株 (Qm^+q^-)^[3]。我们推测这种菌株中, SQP1 质粒并未失落,只是反映决定庆丰霉素合成基因的变异。本文报道的结果进一步证明 SQP1 质粒上合成基因和抗性基因的相互连锁,和变异了的合成基因点突变之间的遗传重组。

材料和方法

(一) 菌株

本研究所用的庆丰链霉菌菌株列于表 1。

(二) 培养基

CM、庆丰霉素效价检定培养基见文献 [1],液体培养基用含有 10.3% 蔗糖的有机培养基^[4],P 培养液见文献 [3],原生质体再生培养基用含 10.3% 蔗糖的 CM。根据实验要求,CM 中补充 2000 $\mu\text{g/ml}$ 庆丰霉素或 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素。

(三) 原生质体的形成与再生^[3]

(四) Qm^+q^- 菌落的检出

挑取在再生平板上由原生质体再生而形成的单菌落,分别点种到含 2000 $\mu\text{g/ml}$ 庆丰霉素的 CM 平板和不含庆丰霉素的 CM 琼脂块上,培养 6—7 天后把琼脂块移贴到庆丰霉素效价检定培养基上,从中检出能在前者生长,而相应的琼脂块菌落不能抑制枯草杆菌 AS 1.140 生长 (即不产生抑菌圈)的菌落,就是 Qm^+q^- 菌落。

(五) 杂交配对

见文献 [4]。杂交配对的子代菌落,用

本文于 1990 年 7 月 16 日收到。

本文所用缩写符号: $SQP1^+$: 带有 SQP1 质粒的菌株; $SQP1^-$: 不带 SQP1 质粒的菌株; q^+ : 具有庆丰霉素的合成能力; q^- : 失去庆丰霉素合成能力; Qm^+ : 抗庆丰霉素; Qm^- : 庆丰霉素敏感; Sm^+ : 抗链霉素; Sm^- : 链霉素敏感。

表 1 菌株的描述

Table 1 Description of strains

菌株 Strains	遗传标记 Genetic marker	来源 Origin
No. 43	野生型 (Qm^+q^+) Wild type	野生型自然分离株 Spontaneous isolate of wild type
M15	野生型 (Qm^+q^+) Wild type	No. 43 菌株经化学诱变处理后得到的高产菌株 High yield mutant derived from No. 43 strain by treating with chemical mutagens
Q-100S	$Sm^+Qm^+q^-$	SQP1 质粒消除株 Strain curing plasmid SQP1
D2 D46 D103	$Qm^+q^-Sm^+$ $Qm^+q^-Sm^+$ $Qm^+q^-Sm^+$	都是 M15 菌株经原生质体形成与再生所得到的不合庆丰霉素的 q^- 变株 q^- variants derived from M15 strain through protoplast formation and regeneration

表 2 原生质体形成再生过程中 Qm^+q^- 变异株的产生Table 2 Qm^+q^- variants produced during protoplast formation and regeneration

出发菌株表型 Phenotype of stard strain	试验菌落数 No. of colonies tested	突变种表型 Phenotype of mutants	变种数 No. of mutants	变异率(%) Ratio of mutation
M15(Qm^+q^+)	1252	Qm^+q^-	109	8.7

划划线法或丝绒影印法来检测遗传性状，用琼脂移块法鉴别产生庆丰霉素能力。

结 果

(一) 原生质体形成与再生过程产生 Qm^+q^- 菌株

将庆丰霉素产生菌 M15 菌株(Qm^+q^+)经液体培养的菌体，通过溶菌酶脱壁处理后释放的原生质体，再生成细胞形态后，对再生菌落的表型作鉴定。实验结果(表 2)表明，在原来的 Qm^+q^+ 群体当中，有 8.7% 的菌落成为丧失了庆丰霉素合成能力，但依然保留着对庆丰霉素抗性的变异株(Qm^+q^-)。

我们认为本实验中形成的 q^- 变异株，不同于以前报道的由于 SQP1 质粒的消除所得到的 q^- 菌株^[1]，因为 SQP1 质粒消除株的表型是同时失去庆丰霉素生物合成能力和对庆丰霉素的抗性 (Qm^+q^-)，而不是

Qm^+q^- 。因而这种 Qm^+q^- 菌株的形成不可能是由于 SQP1 质粒的消除所致，很可能是在菌丝体去除细胞壁形成原生质体，并再生成新的细胞形态过程中，诱发 SQP1 质粒上决定庆丰霉素生物合成基因的变异，使其失去抗生素的合成能力，而庆丰霉素抗性基因却未受影响。

(二) SQP1 质粒上，庆丰霉素合成基因和抗性基因的连锁和接合转移

当以庆丰霉素产生菌 (No. 43 菌株， $Qm^+Sm^+q^+$) 为供体和产抗生素的质粒消除株(Q-100S 菌株， $Qm^+q^-Sm^+$) 为受体接合以后，在含链霉素的培养基上进行选择，检出受体菌，再测定其中具有庆丰霉素合成能力和抗性的菌株比率。在两次实验中发现其中分别有 14% 与 32% 为既产庆丰霉素又具有高度抗性的接合转移子，没有一个菌落是两者分离的(表 3)。如果以通过原生质体形成、再生而获得的不产庆

表 3 庆丰霉素合成及抗性在配对中的转移

Table 3 Transfer of $Qm^r q^+$ in mating

供体菌 Donor	受体菌 Recipient	接合子表型 Phenotype of conjugants	转移频率(%) Transfer frequency
No. 43 ($Qm^r q^+ Sm^r$)	Q-100S ($Qm^r q^- Sm^r$)	$Qm^r q^+ Sm^r$	14 32
D2 ($Qm^r q^- Sm^r$)	Q-100S ($Qm^r q^- Sm^r$)	$Qm^r q^- Sm^r$	3.12 20.1
D46 ($Qm^r q^- Sm^r$)	Q-100S ($Qm^r q^- Sm^r$)	$Qm^r q^- Sm^r$	5.63 1.3
D103 ($Qm^r q^- Sm^r$)	Q-100S ($Qm^r q^- Sm^r$)	$Qm^r q^- Sm^r$	3.12 1.7

表 4 $Qm^r q^-$ 菌株之间的遗传重组Table 4 Genetic recombination between $Qm^r q^-$ strains

配对菌株 Mating strains	试验菌落数 No. of colonies tested	q^+ 菌落数 No. of q^+ colonies	频率 Frequency (%)
D2 × D46	320	109	34.06
D2 × D103	320	109	34.06
D46 × D103	320	182	56.88

丰霉素的抗性菌株 (D2、D46 和 D103 菌株, $Qm^r Sm^r q^-$) 为供体, 以 Q-100S 菌株为受体, 接合以后, 同样在含链霉素的平板上检出受体菌, 并进一步在转移接合子中检测对庆丰霉素抗性的菌落, 则其中出现的所有 Qm^r 接合子, 仍然全部为不产庆丰霉素的 q^- 变种。这种转移的频率均在 1% 以上 (表 3)。表明这是 SQP1 质粒接合转移的结果。只是由于供体菌所携带的质粒上决定庆丰霉素合成的基因发生了变异, 而受体菌又是质粒消除株, 因此, 接合子只能是 $Qm^r q^-$ 。进一步表明 SQP1 质粒上, 决定庆丰霉素合成和抗性的基因, 是连锁地随着质粒的转移而传递给子代。

(三) 庆丰霉素合成基因变异株之间的遗传重组

我们用 D2、D46 和 D103 三个菌株 ($Qm^r q^-$) 进行相互之间的混合培养杂交, 从它们的杂交子代菌落中, 都检出了相当数量的回复了庆丰霉素合成能力的重组子菌落 ($Qm^r q^+$, 表 4)。我们推测, 这些 $Qm^r q^+$ 重组子菌落的产生是 $Qm^r q^-$ 变异株

之间通过混合培养杂交, 使 SQP1 质粒的不同位点上存在变异的庆丰霉素合成基因发生遗传重组的结果。

讨 论

在我们使用一些质粒消除因子, 如吡啶染料、十二烷基磺酸钠 (SDS)、溴化乙锭 (EB) 和高温培养等处理庆丰霉素产生菌时, 其结果除了能得到同时失去庆丰霉素合成能力和抗性的质粒变株外, 还检测到虽然丧失了庆丰霉素合成能力, 却保留着抗性的菌株。我们推测, 这是庆丰霉素合成基因的突变株。因为已经知道在吡啶类、菲啶类染料处理带有质粒的菌株时, 除了使质粒消除外, 还可以因导致 DNA 片段的重排等而诱发突变, 因之我们得到的这些表型为 $Qm^r q^-$ 的菌株, 实际上很可能就是质粒基因的突变株。本实验中, 所用的 $Qm^r q^-$ 菌株是庆丰霉素产生菌通过原生质体形成与再生过程而得到的。Hopwood 等曾经在讨论中认为在判断质粒决定的特殊性状时, 原生质体的形成与细胞再生过

程中引起质粒的消失,较之一些染料的作用有更直接的意义,因为它不诱发突变^[5]。但是,从我们的实验结果看来,恐怕不能排除细胞壁的去和再生对生物个体在遗传结构上带来某种程度的扰乱,因而不可避免地引发突变。

关于 SQP1 质粒上庆丰霉素合成和抗性基因的连锁,前文^[2]已有过报道,本文进一步提供了证据。这里的情况和 Baltz 等关于弗氏链霉菌产生泰乐菌素遗传现象的研究^[6]十分相似, tyl^-tyl^+ 变种 (JS85) 和 tyl^+tyl^+ 菌株接合,前者有 8% 转变成 tyl^+tyl^+ , 而 tyl^-tyl^+ 菌株和 tyl^-tyl^+ 菌株接合,后者可以变成 tyl^+ , 但仍然是 tyl^- 。据此,他们认为泰乐菌素的合成基因与抗性基因连锁,并由质粒决定。

SQP1 质粒上 $q^- \times q^+$ 的重组频率有多高,虽有表 4 数据,但是我们觉得仍难以确定较为确切的频率。因为混合培养杂交中 Qm^+q^+ 表型的重组子一经产生,就可以充当供体,通过接合作用而发生感染转移,使得 q^+ 菌落增加。故此,表 4 中所示 q^+ 菌落数与其重组频率,很可能是基因的遗传重组与随之而发生的接合作用产物的总和。

由于质粒较易消除,或在经受某种处

理之时,虽不消除却发生基因突变,因为当一个菌株发生由质粒基因编码的表型改变时,就很难确定是由于质粒消除或仅仅是基因突变的结果。Kirby 和 Hopwood^[7]在研究天蓝色链霉菌中决定次甲基霉素合成的 SCP1 质粒时,得到了携带染色体片段 $cys-B$ 基因的 SCP1' 菌株 (即 SCP1- $cysB$ 变株),以 $cys-B$ 为标记,制得一系列不能合成次甲基霉素的阻断变种,以此为材料研究次甲基霉素生物合成途径的生化互补图。本文报道的结果表明,在庆丰链霉菌中,有可能以 Qm^+ 为标记,选择庆丰霉素合成的阻断变种 (Qm^+q^-),以利于进行生物合成途径的研究,并通过遗传重组进行菌种改良。

参 考 文 献

- [1] 郑幼霞等: 遗传学报, 7(2): 111—118, 1980。
- [2] 郑幼霞等: 遗传学报, 7(4): 299—306, 1980。
- [3] Hopwood D. A. et al.: Genetic manipulation of *Streptomyces*—A laboratory manual, p. 12—14, The John Innes Foundation, Norwich, 1985.
- [4] 郑幼霞等: 遗传学报, 9(1): 8—13, 1982。
- [5] Hopwood D. A.: *Ann. Rev. Microbiology*, 35: 237—272, 1981.
- [6] Baltz R. H. et al.: *J. Antibiotics*, 38(9): 1226—1236, 1985.
- [7] Kirby R. et al.: *J. Gen. Microbiology*, 98(1): 239—252, 1977.

MUTATION AND RECOMBINATION OF QINGFENGYMCIN BIOSYNTHESIS GENES IN THE PLASMID SQP1

Zhao Renjun Zheng Youxia

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

This paper reports that a series of mutants occurred on qingfengmycin biosynthesis genes of the plasmid SQP1 in *Streptomyces qingfengmyces*, and these mutants can be obtained through protoplast formation and regeneration. A number of colonies with qingfengmycin biosynthesis ability were detected in the progenies after mixed culture each other of mutants. It suggested that genetic recombination of the

point mutation sites of qingfengmycin biosynthesis genes on SQP1 plasmid resulted in generating these colonies producing qingfengmycin.

Key words

Streptomyces qingfengmyceticus; Protoplast formation and regeneration; Genetic recombination