

# 圈卷产色链霉菌分化及其特性的研究<sup>\*</sup>

谭华荣 吴 畏 田宇清 杨海花 宋幼新

董可宁 黄喜平 宋大康

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

链霉菌分化的分子生物学研究是一个饶有兴趣并富有挑战性的世界前沿研究课题。在原核生物的分化研究中,主要以枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)作为模式系统,但枯草杆菌的生命周期尤其是分化过程远比链霉菌简单,不象链霉菌有基质菌丝、气生菌丝、菌丝螺旋和孢子分隔那样的发育分化过程<sup>[1]</sup>。在真核生物中也有分化研究的报道<sup>[2]</sup>,如构巢曲霉、酵母等。由于真核生物的基因结构比原核生物复杂得多,弄清分化中基因调控的关系就更加困难。因此,选用链霉菌作分化研究的材料有其独一无二的优越性。

国际上有关链霉菌的分子生物学研究,近年来主要以链霉菌的抗生素生物合成基因和链霉菌的分化基因两个大的方面作为研究的热点和主攻方向,并展开了一些开拓性的研究。链霉菌分化基因的分子生物学研究只有近十年的研究历史。国际上英国 John Innes 研究所的 Hopwood 和 Chater 教授实验室率先研究<sup>[3-5]</sup>,在国内除本文作者实验室近年已开展该项研究外<sup>[6-8]</sup>仍属空白。产生不同抗生素的所有链霉菌都具有复杂的发育分化过程,这在时空上去研究基因的表达调控提供了一个有利的条件,并对人为地控制分化过程,弄清分化与抗生素生物合成的关系以及对于发育生物学的研究等都具有重大的意义。

我们以从东北土壤中筛选到的尼可霉素(Nikkomycin)产生菌——圈卷产色链霉菌为材料,开展该菌株分化的分子生物学研究。研究发现经诱变后得到的一些形态阻断突变株,虽然在表型上类似英国 John Innes 研究所 Hopwood 实验室得到的天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)A3(2)的白色和光秃型突变株,但研究表明天蓝色链霉菌的所有白色阻断突变株与所产生的四种抗生素无直接关系<sup>[9]</sup>。而我们得到的白色突变株在不能形成孢子的同时也失去了产生尼可霉素的能力。说明在圈卷产色链霉菌中参与分化的白基因与抗生素生物合成的基因可能密切相关。为弄清分化基因间的关系,尤其是与抗生素生物合成关系,圈卷产色链霉菌将是一个更为合适的材料。本文报道这方面的初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种及质粒

圈卷产色链霉菌(*S. ansochromogenes*)和尼可霉素检测指示菌 *Alternia longiper* 由宋幼新教授提供,变铅青链霉菌(*S. lividans*)TK54,天蓝色链霉菌 A3(2)及质粒 pIJ702、pIJ4083、pIJ4498、pAK203、pIJ486 均由本课题组保存。

### 1.2 培养基

1.2.1 原生质体再生培养基(R2YE)、基本培养基(MM)(用于培养 TK54)以及液体培养基(YEME)均按文献<sup>[10]</sup>配制。

1.2.2 用于培养圈卷产色链霉菌及其突变株的基本培养基:葡萄糖 1%,L-天冬素 0.125%, $K_2HPO_4$  0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.001%,琼脂 1%,pH 7.2-7.4。

• 中国科学院“八五”重点基金资助项目。

本文于 1993 年 7 月 16 日收到。

1.2.3 尼可霉素检测用培养基:下层:1%水琼脂。上层:土豆汁,葡萄糖1%、琼脂0.8%, pH、5.5—6.0。

### 1.3 NTG 诱变

将100 $\mu$ l 圈卷产色链霉菌孢子悬液接种于30ml YEME 培养液中,28℃摇瓶(250r/min)培养6小时,离心收集萌发孢子,悬浮于0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)配制的终浓度为0.5mg/ml 的 NTG 溶液中。28℃,30分钟。致死率60%。离心,收集孢子,悬浮于无菌水中并做梯度稀释,涂布于 MM 培养基。28℃培养10天后观察表型,挑出形态分化异常的单菌落作进一步纯化。

### 1.4 抗药性测定

硫链丝菌素(Thio)、潮霉素(Hyg)由 Chater 教授惠赠。Thio, Hyg, Amp, Str, Kan 贮存液浓度均为50mg/ml,于-20℃冰箱保存。

使用抗生素梯度平板检测圈卷产色链霉菌对各种抗生素的抗性水平。浓度梯度为0—10 $\mu$ g/ml。在与梯度平行的方向划线接种孢子悬液,以 TK54为对照,28℃培养3天后观察。

### 1.5 原生质体制备、再生、转化

见文献[10、11]。

### 1.6 圈卷产色链霉菌显微镜观察及制片

见文献[12、13、14]。

### 1.7 质粒提取、酶切、电泳等操作

见文献[10、11]。

### 1.8 接合转移性质粒检测

见文献[15]。

### 1.9 尼可霉素抗菌活性测定

使用琼脂块法。用打孔器在培养7天的平皿中打出直径为8mm 的含有菌体的琼脂块,放在上层加有指示菌的检测培养基上,28℃过夜培养,即可见明显的抑菌圈。

## 2 结果

### 2.1: 突变株形态及生理特征

2.1.1 形态:经 NTG 诱变,从几十株形态异常的单菌落中纯化得到7株稳定的白色突变株(W3, W12, W31, W32, W137, W110, W200)和8株光秃型突变株(B1, B3, B4, B12, B13, B19, B25, B111)。在 MM 上培养10天,与野生型菌株丰富的灰色孢子相比,白色突变株保持白色(图1)。显微镜观察未见孢子形成,而光秃型突变株不能形成气生菌丝。

2.1.2 产抗生素能力:全部光秃型和两株白色突变株(W31, W110)不能产生尼可霉素,另三株白色突变株(W12, W137, W200)产抗生素能力明显降低,其余两株(W3, W32)产抗生素能力与野生型相同(图2)。

### 2.2 圈卷产色链霉菌作为受体系统的研究

2.2.1 原生质体制备、再生及转化:圈卷产色链霉菌在加有34%的蔗糖和0.2%甘氨酸的 YEME 培养基中,28℃摇瓶培养40小时,菌丝体生长丰富且松散。用2mg/ml 溶菌酶28℃处理60分钟,菌丝体完全散开,至80分钟,形成完全散开的球状原生质体,可以获得很高的制备率(95%以上)。以10.3%的蔗糖液做梯度稀释,做显微计数并涂布于 R2YE 平皿,得再生率约20%。以 TK54为转化对照,圈卷产色链霉菌可被来自 TK54的质粒 pIJ702以低频率转化(10个/ $\mu$ g DNA)。从转化子中提取质粒 pIJ702,酶切,电泳,发现 pIJ702仍以高拷贝存在,并且质粒大小和主要酶切位点没有改变。用从转化子中提取的 pIJ702再转化圈卷产色链霉菌,得到较高的转化频率(表1)。同时,用来自天蓝色链霉菌 J1501的质粒 PIJ486, PIJ4498, PIJ4083以及 PAK203转化圈卷产色链霉菌,转化频率均为50个/ $\mu$ g DNA 左右。从以上结果可

以看出,圈卷产色链霉菌对外源 DNA 有一定的限制修饰作用。筛选限制修饰缺陷突变株的工作正在进行之中。

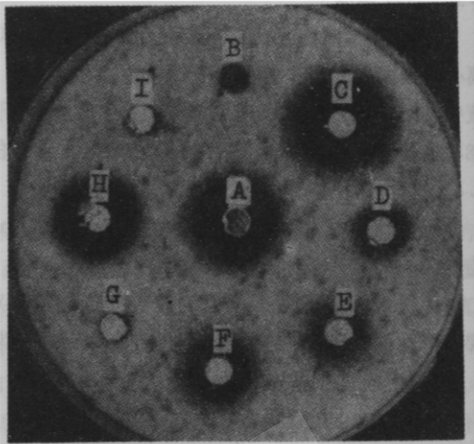
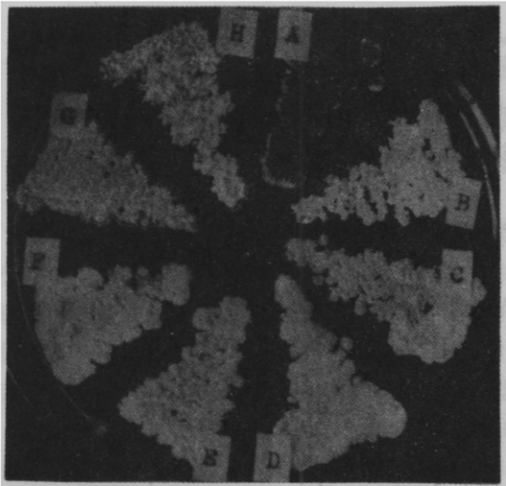


图1 圈卷产色链霉菌白色突变株的表型  
A. 野生型; B—H. 白色突变株 (B=W3, C=W12, D=W31, E=W32, F=W110, G=W137, H=W200)。

图2 圈卷产色链霉菌白色突变株产生尼可霉素的测定  
A. 野生型; B. 光秃型突变株 (B1); C—I. 白色突变株 (C=W3, D=W200, E=W12, F=W137, G=W110, H=W32, I=W31)。

表1 pIJ702转化圈卷产色链霉菌的转化频率

质粒	转化频率 (个/μg DNA) TK54 <i>S. ansochromogenes</i>	
pIJ702 (TK54)	$5 \times 10^4$	10
pIJ702 ( <i>S. ansochromogenes</i> )	$1 \times 10^4$	$7 \times 10^3$

2.2.2 圈卷产色链霉菌质粒提取:使用多种提取质粒的方法从圈卷产色链霉菌中多次提取质粒,均未成功。以天蓝色链霉菌 A3 (2) 在 TK54 的菌苔上形成清晰麻点 (Pock) 的实验为对照,进行了圈卷产色链霉菌质粒接合转移形成麻点的实验,未能观察到麻点的形成。初步认为圈卷产色链霉菌没有质粒。

2.2.3 抗药性测定:以 TK54 为对照,利用梯度平板法检测了圈卷产色链霉菌对常用抗生素的抗性 (表2)。

3 讨论

与天蓝色链霉菌的一系列形态分化阻断突变株相比,来自圈卷产色链霉菌的部分白色突变株在不能形成孢子的同时,也失去了产生抗生素的能力。排除多位点突变的可能性 (低致死率诱变),这可能反映出圈卷产色链霉菌与天蓝色链霉菌在形态分化与抗生素生物合成调控上的不同之处,这种推测将在以后的互补克隆实验中得到判断。圈卷产色链霉菌的白基因同时参与形态和生理分化调控过程的这种特性,类似于灰色链霉菌中编码 A 因子 (A-factor) 的基因<sup>[16]</sup>。这将在是一个在整体上研究细胞分化过程的良好材料。

表2 圈卷产色链霉菌对几种抗生素的抗性水平

菌 株	抗 生 素 抗性水平 ( $\mu\text{g/ml}$ )	硫链丝 菌素 (Thio)	链霉素 (Str)	氨基青 霉素 (Amp)	潮霉素 (Hyg)	卡那霉素 (Kan)
<i>S. lividans</i>						
TK54		<1	>10	>10	<2	<1
<i>S. ansochromogenes</i>		<2	<2	<7	<1	<1

注: 抗生素梯度为0—10 $\mu\text{g/ml}$ 。

在探索圈卷产色链霉菌作为基因工程受体的可能性时, 我们同样遇到了野生型菌株对外源 DNA 的限制修饰问题。用来自 TK54 的质粒 pIJ702 很难转化成功, 尝试用来自天蓝色链霉菌 J1501 的质粒, 发现转化频率虽比来自 TK54 的质粒略高, 但与经圈卷产色链霉菌修饰过的质粒转化频率相比, 仍然要低两个数量级以上。这显示出圈卷产色链霉菌可能具有一定的限制修饰作用, 同时说明, J1501 的限制修饰系统比 TK54 更接近于圈卷产色链霉菌。

以往的一些研究表明, 链霉菌大都有比较复杂的染色体外遗传因子。对圈卷产色链霉菌, 我们目前只检测了 CCC 型质粒和可形成麻点 (Pock) 的接合转移性质粒。虽然没有发现质粒, 但还不能否认: (1) 以极低拷贝数存在<sup>[17]</sup>。(2) 线状巨型质粒<sup>[18]</sup>, 这种质粒需要经脉冲场电泳才能发现。(3) 以整合状态存在的质粒。(4) 不能在 TK54 菌苔上形成麻点的接合转移性质粒。在现有工作的基础上, 我们将在以后的工作中对圈卷产色链霉菌内源性质粒做进一步的检测。

## 参 考 文 献

- [1] Chater K F, Hopwood D A. *Streptomyces* Genetics. In: Goodfellow M, Mordarski M, Williams S T ed. *The Biology of Actinomycetes*. Academic Press, 1984. 229—286.
- [2] Adams T H, Poylan M T, Timerlake W E. *Cell*, 1988, **54**: 353—362.
- [3] Méndez C, Chater K F. *J Bacteriol*, 1987, **163**: 5715—5720.
- [4] Chater K F, Bruton C J, Plaskitt K A *et al.* *Cell*, 1989, **59**: 133—143.
- [5] Davis N K, and Chater K F. *Mol Gen Genet*, 1992, **232**: 351—359.
- [6] Tan H, Chater K F. *J Bacteriol*, 1993, **175** (4): 933—940.
- [7] 谭华荣. 微生物学通报, 1993, **20** (6): 348—354.
- [8] 谭华荣. 中国生物工程学会成立大会论文摘要, 1993, 38.
- [9] Chater K F, Sporulation in *Streptomyces*. In: Smith I, Slepecky R A, Setlow P ed. *Regulation of procaryotic development*. American Society for Microbiology. Washington, D. C., 1989. 227—299.
- [10] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* *Genetic manipulation of streptomyces: A Laboratory Manual*. Norwich, England; John Innes Foundation, 1985.
- [11] Tan H, Ph. D. Thesis, University of East Anglia, Norwich, England, 1991.
- [12] Hopwood D A, Wildermuth H, Palmer H M., *J Gen Microbiol*, 1970, **61**: 397—408.
- [13] Chater K F. *J Gen Microbiol*, 1972, **72**: 9—29.
- [14] Chater K F. *J Gen Microbiol*, 1975, **87**: 312—325.
- [15] Bibb M J, Freeman R F, Hopwood D A. *Mol Gen Genet*, 1977, **154**: 155—166.
- [16] Hara O, Horinouchi S, Uozumi T *et al.* *J Gen Microbiol*, 1983, **129**: 2939—2944.
- [17] Bibb M J, Hopwood D A. *J Gen Microbiol*, 1981, **126**: 427—442.
- [18] Omer C A, Cohen S N. *Mol Gen Genet*, 1984, **196**: 429—438.

# STUDIES ON THE DIFFERENTIATION AND PROPERTIES OF *STREPTOMYCES* *ANSOCHROMOGENES*

Tan Huarong Wu Wei Tian Yuqing Yang Haihua  
Song Youxin Dong Kening Huang Xiping Song Dakang  
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** *S. ansochromogenes* is a Nikkomycin producer which isolated from soil in northeast of China. It has typical differentiation properties on glucose-asparagine medium. After pre-germination spores were treated with NTG, seven white mutants (*whi*) were obtained, which could not produce mature grey spores, and also eight bald mutants (*bld*) could not produce aerial mycelium. After several generations, all mutants are stable, *bld* mutants and some of the *whi* mutants could not produce nikkomycin. It shows that the blocked genes function not only in morphological differentiation but also in antibiotic biosynthesis. *S. ansochromogenes* is a suitable material for the study on molecular biology of differentiation, especially, the relationships between morphological differentiation and antibiotic production.

**Key words** *Streptomyces ansochromogenes*, Nikkomycin, Differentiation