

# 林可链霉菌转化系统的建立\*

张惠展 姚 峰 叶 江

(华东理工大学生化工程系微生物教研室 上海 200237)

关键词 林可链霉菌 原生质体再生 转化

分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(1999)01-0080-83

利用基因工程技术改良抗生素生产菌有着广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。值得尝试的是将抗生素生物合成基因片段随机或定向组合导入生产菌中,通过同源重组方式提高生物合成途径中限速步骤相关基因的剂量,以达到提高生产菌发酵单位的目的。此战略被作者称为“基因回转化技术”,并在林可霉素生产菌株林可链霉菌(*Streptomyces lincolnensis*)78-11 的基因工程改良中得到尝试。

基因回转化技术应用首先碰到的问题是抗生素生产菌转化系统的建立,包括原生质体制备、再生、转化的最优化条件。本文报道林可链霉菌转化系统的最优化条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

林可链霉菌 78-11 为抗噬菌体的林可霉素生产菌,本实验室收藏。

pIJ702 系德国乌帕塔尔大学 Piepersberg 教授馈赠。

### 1.2 培养基和试剂

培养基配方见文献[2]。培养基组份如蛋白胨、酵母粉为 Oxoid 产品;TSB 为 Difco 产品;溶菌酶、TES、硫链丝菌素(Thiostrepton)为 Sigma 产品;其他化学试剂为国产分析纯。

### 1.3 原生质体制备及转化

链霉菌原生质体制备、再生及转化参照 Hopwood 等人<sup>[3]</sup>的方法。

## 2 结果

### 2.1 培养基组成对林可链霉菌原生质体再生及转化的影响

表 1 培养基对林可链霉菌 78-11 原生质体再生的影响<sup>a</sup>

培养基	原生质体制备量 <sup>b</sup>	再生率 <sup>c</sup> /%
SM	$1.0 \times 10^6$	12
SM + 34% 蔗糖	$1.3 \times 10^{10}$	15
TSB	$2.0 \times 10^6$	1.0
TBS + 34% 蔗糖	$8.8 \times 10^9$	0.7
YEME	$6.0 \times 10^6$	0.2
YEME + 34% 蔗糖	$1.3 \times 10^9$	1.5
S4	$2.5 \times 10^7$	0.3

a. 稳定期的菌丝体制备原生质体 b. 含 0.5% 甘氨酸的 25mL 培养液 c. 原生质体在 R2YE 培养基上再生。

\* 本项目得到国家自然科学基金和国家教委优秀青年教师基金资助(No. 29476235)。

收稿日期:1997-03-17,修回日期:1998-03-16

四种常规的链霉菌液体培养基对林可链霉菌原生质体制备及再生的影响较大(见表1)。用 SM 培养基培养的林可链霉菌其原生质体具有最高的再生率,含有 34%蔗糖的 SM 培养基对再生率影响不大,但对原生质体的制备极为有利,这在其它培养基中也有类似的趋势。

高浓度蔗糖的存在使链霉菌在整个生长过程中保持精细颗粒,有利于原生质体的制备,从表2中可以看出:作为培养基组份之一的蔗糖对原生质体制备及转化影响较为显著,蔗糖浓度越高,转化率也越高,但各种蔗糖浓度对原生质体的再生率影响不大。

表2 SM培养基中蔗糖浓度对原生质体再生和转化的影响

蔗糖浓度( $\rho$ %)	原生质体制备量 <sup>a</sup>	再生率 <sup>b</sup> /%	转化率/ $\mu\text{gDNA}$
0	$3.1 \times 10^9$	1.4	/
10	$6.2 \times 10^9$	0.9	$6.1 \times 10^3$
17	$1.2 \times 10^{10}$	1.3	$3.8 \times 10^4$
25	$1.3 \times 10^{10}$	2.8	$1.6 \times 10^5$
34	$7.3 \times 10^{10}$	1.1	$1.6 \times 10^5$

a. 来自 25mL 含有 34%蔗糖浓度的培养液,甘氨酸浓度为 0.5%,菌体处于稳定期;b. 原生质体在 R2YE 培养基上再生;c. 25ng pIJ702 转化  $10^9$  个原生质体。

## 2.2 菌龄对林可链霉菌原生质体再生及转化的影响

林可链霉菌在三种培养基中生长的菌龄与原生质体制备、再生及转化的对应结果列在表3中。最佳的再生率和转化率往往在处于稳定期菌龄的菌体中得到,但菌龄对两者的影响并非同步,换句话说,菌龄并不是简单地通过影响再生率而影响转化率。值得注意的是,就转化率而言,SM培养基培养出的林可链霉菌总要比 YEME 培养的高 2-5 倍。

表3 林可链霉菌 78-11 的转化<sup>a</sup>

培养基	生长期 <sup>b</sup>	原生质体制备量 <sup>c</sup>		再生率 <sup>d</sup> /%	转化率/ $\mu\text{gDNA}$
		NPC	PC		
SM	I	$3.5 \times 10^5$	$5.2 \times 10^9$	0.8	$8.0 \times 10^3$
	II	$7.0 \times 10^4$	$3.9 \times 10^{10}$	1.8	$1.6 \times 10^4$
	III	$5.0 \times 10^4$	$4.5 \times 10^{10}$	7.0	$1.9 \times 10^5$
	IV	$1.3 \times 10^6$	$1.3 \times 10^{10}$	15.0	$1.4 \times 10^5$
YEME	I	$1.0 \times 10^4$	$3.2 \times 10^9$	1.2	$4.0 \times 10^3$
	II	$2.0 \times 10^4$	$4.9 \times 10^9$	1.2	$4.8 \times 10^3$
	III	$2.6 \times 10^4$	$4.8 \times 10^9$	1.1	$1.2 \times 10^4$
	IV	$3.0 \times 10^4$	$3.3 \times 10^9$	4.9	$3.4 \times 10^4$
SM	I	$1.0 \times 10^3$	$3.1 \times 10^8$	3.7	/
	II	$2.3 \times 10^4$	$1.3 \times 10^{10}$	1.2	$3.8 \times 10^4$

a. 所有的培养基均含有 0.5%的甘氨酸和 34%蔗糖;b. I :对数生长期,II :对数生长期后期,III :稳定期,IV :稳定期;c. NPC :未原生质体化的细胞,PC :原生质体;d. 25ng pIJ702 转化  $10^9$  个原生质体。

## 2.3 原生质体制备对林可链霉菌原生质体再生的影响

原生质体制备条件(如溶菌酶浓度、溶解时间等)对原生质体制备、再生和转化均有影响。表4所列数据表明,用 2mg/mL 浓度的溶菌酶处理菌体 1~1.5h,可得到最高再生率和转化率,较高的溶菌酶浓度及较长的酶处理时间均使原生质体难以转化,这一结果与 Hopwood 等人推荐的变铅青链霉菌原生质体制备条件一致。

表 4 原生质体制备条件对转化率的影响

溶菌酶浓度/(mg/mL)	保温时间/h	原生质体制备 <sup>a</sup>		再生率 <sup>b</sup> /%	转化率/ $\mu\text{gDNA}$
		NPC	PC		
1	0.5	$8.0 \times 10^4$	$7.3 \times 10^9$	6.2	$0.4 \times 10^4$
1	1.0	$7.0 \times 10^4$	$9.1 \times 10^6$	4.7	$1.0 \times 10^4$
1	1.5	$7.0 \times 10^4$	$5.7 \times 10^9$	4.4	$1.4 \times 10^4$
2	0.5	$3.0 \times 10^6$	$5.9 \times 10^9$	6.3	$0.5 \times 10^4$
2	1.0	$3.0 \times 10^4$	$3.7 \times 10^9$	14	$1.0 \times 10^3$
2	1.5	$3.0 \times 10^4$	$3.7 \times 10^9$	16	$1.3 \times 10^4$
5	0.5	$2.0 \times 10^4$	$3.3 \times 10^9$	8.8	$1.1 \times 10^4$
5	1.0	$<3.0 \times 10^4$	$0.8 \times 10^9$	2.3	$1.0 \times 10^2$
5	1.5	$<1.0 \times 10^4$	$0.2 \times 10^8$	3.6	$<8$

a. 原生质体从 10mL 培养液的菌丝体中制备； b.  $6.6 \times 10^8$  原生质体用 25ng pIJ702 转化。

## 2.4 原生质体制备对林可链霉菌原生质体转化的影响

除了培养基组成、菌龄以及原生质体制备方法对原生质体转化率有直接影响外,原生质体再生率与转化率毫无疑问有对应关系,因而通过优化原生质体再生条件提高转化率也是转化系统建立的一个重要方面。作者分别对林可链霉菌原生质体诸多再生条件(如再生培养基组份、再生温度与时间、再生平板含水量等)进行系统研究,结果表明:上述条件对林可链霉菌和变铅青链霉菌原生质体再生的影响是一致的,唯独在 R2YE 再生培养基中的  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  离子浓度对两种链霉菌原生质体的影响较大(表 5)。对于变铅青链霉菌而言,20mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$  和 50mmol/L 的  $\text{MgCl}_2$  是最佳的组合,但林可链霉菌原生质体在此组合条件下的再生率只为其最佳再生率的 20%,原生质体在高浓度(100mmol/L)的  $\text{CaCl}_2$  存在下再生率最高,在此情况下似乎与  $\text{MgCl}_2$  的存在与否无关。

表 5  $\text{CaCl}_2$  和  $\text{MgCl}_2$  的浓度对原生体再生率的影响

$c(\text{CaCl}_2)$ (mmol/L)	$c(\text{MgCl}_2)$ (mmol/L)				
	0	20	50	80	100
0	$<0.01$	$<0.01$	$<0.01$	$<0.01$	$<0.01$
20	0.5	3.7	3.0	0.3	0.2
50	8.5	4.3	7.5	6.3	3.8
80	3.7	15.0	12.1	8.9	11.0
100	13.2	14.0	15.1	14.4	11.3

综上所述,林可链霉菌原生质体制备、再生及转化有其自身特点,其最优化结果是:用于制备原生质体的菌丝体培养采用添加 34%蔗糖和 0.5%甘氨酸的 SM 培养基,菌龄是培养到稳定期,制备时溶菌酶浓度为 2mg/mL,于 32℃ 保温 1.5h,该制备条件下原生质体制备量可达  $8.91 \times 10^{10}/\text{mL}$ ;原生质体再生培养基采用 R2YE,其中的  $\text{CaCl}_2$  浓度为 100mmol/L,此时不用添加  $\text{MgCl}_2$ (这一点与变铅青链霉菌显著不同),再生温度为 28℃,再生率达到 16%,原生质体转化率为  $5.9 \times 10^5/\mu\text{g}$  (pIJ702 DNA)。

## 3 讨论

林可链霉菌转化系统的建立是利用常规遗传手段(如原生质体融合和诱变)及基因回转化战略改良林可霉素生产菌的基础性工作。优良的转化系统使得高产菌的大规模筛选成为可能。与常规的变铅青链霉菌转化系统相比,林可链霉菌也表现出自身的特征。在最佳条件下,用 pIJ702 和 pGM80 转化林可链霉菌原生质体,转化率分别高达  $5.9 \times 10^5/\mu\text{gDNA}$  和  $2.8 \times 10^5/\mu\text{gDNA}$ ,这在整个链霉菌系统中是比较高的。而且,利用常规方法也能方便地从林可链霉菌转化子中抽取纯化重组质粒。所有这些结果都

为利用基因工程技术改良林可霉素生产菌创造了有利条件。

### 参 考 文 献

- [1] Pipersberg W. *Crit Rev Biotechnol*, 1994, 14(3) 251~258.  
 [2] Zhang H Z, Schmidt H, Pipersberg W. *Mol Microbiol*, 1992, 15) 2147~2157.  
 [3] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* Genetic Manipulation of *Streptomyces*, A Laboratory Manual, Norwich England: The John Innes Foundation, 1985.

## ESTABLISHMENT OF TRANSFORMATION SYSTEM OF *STREPTOMYCES LINCOLNENSIS*

Zhang Huizhan Yao Feng Ye Jiang

(Department of Biochemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

**Abstract** Transformation system of *S. lincolnensis* was established to improve lincomycin-producing strains by Gene retransformation Technology. Under optimal conditions,  $10^{11}$  protoplasts were prepared from 25ml SM culture medium, and the regeneration frequency of protoplasts was 16%. The transformation frequency of pIJ702 was up to  $5.5 \times 10^5 / \mu\text{g DNA}$ . The results revealed that gene manipulation in *S. lincolnensis* was facile as that in *S. lividans*.

**Key words** *Streptomyces lincolnensis*, Protoplast regeneration, Transformation

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 29476235)

### 重 要 声 明

凡本刊刊出的稿件,除在本刊出版使用外,还要以《光盘版》等多种形式出版使用,作者如不同意,敬请来稿时声明。

## 《发酵法生产甘油》获部科技进步一等奖

无锡轻工大学诸葛健教授持续 30 年研究的“发酵法生产甘油”最近荣获中国轻工总会 1997 年科技进步一等奖,并获申报国家亿利达科学技术奖提名。该课题组进行了从菌种选育、发酵工艺到产物提取和精制的全系列的研究和设计,并于近几年创建了我国独特的发酵甘油工业和创建了行业协会——中国发酵工业协会发酵甘油专业委员会,主持制定了中华人民共和国发酵甘油的行业标准。1996 年还将该技术输出到美国,并在美国建厂。

(方慧英)