

洁霉素产生菌原生质体的形成、再生和融合

林 莺*

(化工与生化工程系)

摘 要

洁霉素产生菌不论生长在含有甘氨酸的S培养基或不含甘氨酸的S培养基的菌丝中,其细胞壁均可被溶菌酶溶解而释放出原生质体.甘氨酸浓度为1.0%破壁效果最好,溶菌酶的作用浓度以2.5mg/ml为最佳.原生质体在Hb培养基上能够很好地再生.用P培养基配制的40%(w/v)PEG1000溶液,能有效地诱导洁霉素产生菌原生质体融合.融合重组频率达6.7%.

关键词 洁霉素, 原生质体, 溶菌酶

一、前 言

最近几年,人们利用原生质体融合技术已成功地进行了种内、种间、属间的融合杂交^[1],还将质粒、线粒体、病毒等外源DNA引入原生质体,检查其性状表达^[2].Pesti^[5]等首次提出融合育种可提高青霉素的产量.Hamly^[6]利用这项技术,成功地使孢菌素C的产量提高40%.此外,应用该项技术,麦迪霉素产生菌——生米卡链霉菌原生质体融合的重组体的抗生素产生能力超过亲本40%^[7].

洁霉素是由链霉菌-林可链霉菌林可变种产生的抗生素.本文以抗链霉素和抗噬菌体的菌种为材料,进行原生质体的释放、再生和融合的研究,以期筛选获得具有双重抗性的变种,作为进一步研究和提高其生产能力的基础.此外,还就不同溶菌酶量、不同甘氨酸量、不同保温时间对原生质体释放的影响进行了研究.

目前在国内外尚未见过有关这一方面的报道,因此,本文在洁霉素产生菌原生质体的形成、再生及融合方面所作的研究对于进一步提高洁霉素生产能力有积极意义.

二、材料与方法

1. 菌株

如表1所示.

本文1987年9月29日收到.

参加实验工作的有刘卫京、金游扬、樊佩娜.

表1

菌株	遗传标记*	在本氏分离平板上的孢子形态和特征
68	抗噬菌体(P^+SM^+)	孢子不丰满, 呈灰色
84-3, 83-11	抗链霉素(P^+SM^+)	孢子丰满, 呈白色
JM	敏感(P^-SM^-)	孢子丰满, 呈白色

* P^+SM^+ 为抗噬菌体不抗链霉素; P^+SM^- 为抗链霉素不抗噬菌体; P^-SM^+ 为不抗链霉素不抗噬菌体。

2. 试剂

PEG (聚乙二醇) 分子量1000 (上海合成洗涤剂厂); 溶菌酶 (上海禽类蛋品公司禽蛋二厂); 甘氨酸; 林可链霉菌噬菌体。

2. 培养基及溶液

1) S培养基(%): 葡萄糖 1; 蛋白胨 0.4; 酵母膏 0.4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05; KH_2PO_4 0.2; K_2HPO_4 0.4; pH自然。

2) P培养基: 以1000ml为例, 0.3M蔗糖103g; 0.025% K_2SO_4 0.25g; 微量元素 2 ml; 0.01M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.03g; 加水稀释到900ml。

以下三项试剂, 单独灭菌后加入: 0.5% KH_2PO_4 10ml; 2M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 12ml; 0.25 M pH7.2 TES缓冲液100ml。

3) 本氏培养基(%): 酵母膏 0.1; 牛肉膏 0.1; 葡萄糖 1; 蛋白胨 0.2; 琼脂1.8; pH7.0。

4) Hb培养基: 本氏培养基1000ml; 0.3M蔗糖103g; 0.02M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.07g; 2M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10ml。2M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 必须单独灭菌, 使用前加入混匀。

5) 补充链霉素或噬菌体的培养基: 本氏培养基100ml, 链霉素 (50r/ml) 10ml; 本氏培养基100ml, 链霉素 (100r/ml) 5ml; 本氏培养基100ml, 林可链霉菌噬菌体 (10r/ml) 0.8ml。

3. 作用剂

PEG溶液: P培养基100ml中加40g PEG1000的液状物, 即配成40%的PEG溶液。

4. 方法

1) 菌丝和原生质体制备: 在孢子斜面上加入10ml无菌水, 用接种针将斜面上的孢子刮下, 然后移入内装玻璃珠的小三角瓶, 摇10 min, 将孢子打碎。过滤后, 吸1ml滤液于S培养基中, 在 $28 \pm 0.5^\circ C$ 旋转式摇床 (220r/min) 上连续培养48h。然后吸取2ml菌液于含有1.0g/100ml甘氨酸的S培养基中, 继续培养24h后, 吸5ml菌液于离心管中, 离心收集菌丝 (200r/min, 10 min)。用0.3M蔗糖溶液洗涤二次 (4ml/次), 再用P培养基4ml洗涤一次, 加入3ml溶菌酶溶液 (2.5mg/ml), 于 $32^\circ C$ 水浴中保温1.5h。

2) 原生质体再生、制备: 将上述原生质体悬液用2000r/min离心10 min, 倾去上清液, 以除去多余的溶菌酶, 用P培养基4ml洗涤一次, 2000r/min离心10 min, 去上清液, 沉下的原生质体加入3ml P培养基, 500r/min离心5 min, 制成原生质体悬液。将上部悬浮液移至另一已灭菌试管, 即得到不含菌丝片断的原生质体。用血球计数板计数。将原生质

体悬浮液用蔗糖溶液适当稀释,吸取0.1ml原生质体悬液涂布于Hb再生培养基平板上,用玻璃三角耙轻轻涂匀,置30℃恒温箱静置培养7天。

$$\text{再生频率}\% = \frac{\text{再生菌落数}}{\text{镜检原生质体数}} \times 100\%.$$

3) 原生质体融合: 吸取0.5ml二亲株(68及83-11)的原生质体悬液于一灭菌的离心管中,加入PEG溶液5ml,搅匀,于32℃水浴保温5min。用2000r/min离心10min,去上清液。尔后用P培养基4ml洗涤一次。加入P培养基3ml制成悬液。用蔗糖溶液适当稀释后,分别吸0.1ml涂布于Hb、B+SM、B+SM+P再生平板上,于30℃培养7天,以待检出重组子。

4) 融合子的检测与证实: 将上述经过7天培养的Hb平板上的菌落挑于加有0.6ml链霉素(100r/ml)和12ml本氏培养基的平板上。待菌落长出后,再挑于加有链霉素的平板上,如此反复几次,目的是提高重组子抗药性的稳定性。然后再挑于加有噬菌体的本氏培养基的平板上,重复几次。最后将加有噬菌体的平板上的菌落接种于高氏斜面培养基上,一个菌落挑一支斜面,置30℃恒温箱培养7天(每个平板都有对照)。

三、实验结果

1. 影响原生质体形成的因素

以83-11菌株为研究对象,就不同溶菌酶量对原生质体形成的影响反复进行实验,结果溶菌酶浓度为2.5mg/ml,破壁效果最好(图1)。

以83-11菌株为研究对象,就不同浓度的甘氨酸对原生质体形成的影响进行多次实验。观察到洁霉菌不论生长在含有1.0%甘氨酸的S培养基或不含甘氨酸的培养基中收集菌丝,其细胞壁均可被溶菌酶溶解,说明洁霉菌细胞壁对溶菌酶是敏感的。实验还观察到,加甘氨酸所得到的原生质体浓度比不加甘氨酸多10倍。甘氨酸浓度为1.0mg/ml,效果最佳(图2)。

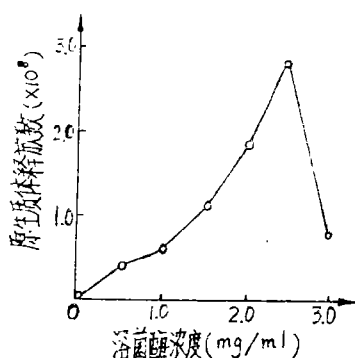


图1 溶菌酶浓度与原生质体释放的关系

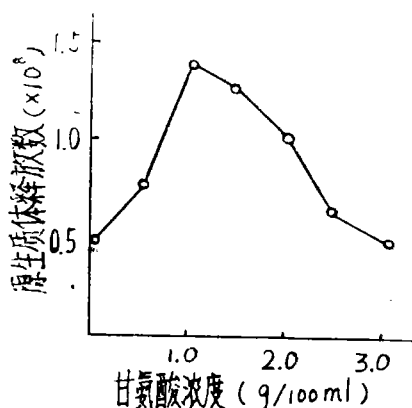


图2 甘氨酸浓度与原生质体释放的关系

以84-3, 68菌株为研究对象, 就不同保温时间对原生质体形成的影响反复进行实验, 84-3菌株保温时间为2 h, 68菌株保温时间为1 h, 形成的原生质体最多(图3)。

2. 再生频率

再生结果如表2所示。

3. 原生质体融合重组体的证实

待斜面上的孢子长出后, 每一支斜面分别挑一个菌落于Hb, B+SM, B+SM+R三个平

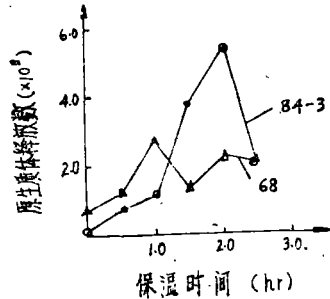


图3 保温时间与原生质体释放的关系

表2 再生结果

菌株	血球计数	平板计数	再生频率(%)*
68	4.0×10^8	1.5×10^7	3.8
84-3	2.66×10^8	$15. \times 10^7$	6.0
83-11	1.08×10^7	4.72×10^5	4.4

$$* \text{再生频率}\% = \frac{\text{再生菌落数}}{\text{镜检原生质体数}} \times 100\% = \frac{\text{平板计数}}{\text{血球计数}} \times 100\%$$

$$= (1.5 \times 10^7 / 4.0 \times 10^8) \times 100\% = 3.8\%$$

板中(一一对应), 以证实其是否重组子。

经30℃培养7天后, 结果如下: Hb平板上对照68, 83-11及JM都长; B+SM平板上对照68及JM不长, 只长83-11; 而B+SM+P平板上对照都不长。因此经过五次传代后认为B+SM+P平板上长出的四个菌落均为重组子。

4. 融合重组频率

一次实验结果如表3所示。

表3

全体后代总数	双抗重组子	重组体后代总数	重组频率(%)*
90	10	6	6.7

$$* \text{重组频率}\% = \frac{\text{重组体后代总数}}{\text{全体后代总数}} \times 100\% = \left(\frac{6}{90} \right) \times 100\% = 6.7\%$$

四、讨 论

1. 甘氨酸浓度与原生质体释放的关系

实验结果表明, 洁霉菌不论生长在含甘氨酸或不含甘氨酸的S培养基中的菌丝, 其细胞壁都能被溶菌酶溶解, 说明洁霉菌细胞壁对溶菌酶是敏感的。甘氨酸可提高对洁霉菌细胞壁作用的敏感性。甘氨酸浓度为1.0g/100ml效果最佳, 一定浓度的甘氨酸对细胞壁的合成起抑制作用。

2. 溶菌酶浓度与原生质体释放的关系

实验结果溶菌酶浓度为2.5mg/ml, 释放的原生质体最多, 由于在此浓度下, 酶的活力最高, 因此作用效果最好。

3. 保温时间与原生质体释放的关系

84-3保温时间为2h, 原生质体形成的效果最佳。随着保温时间的延长, 原生质体浓度略有下降。虽然保温是在高渗条件下进行, 但由于原生质体损伤而导致膜破裂, 因此延长保温时间, 破壁效果反而降低。

68保温时间为1h, 效果最好。图3曲线上有二个峰, 保温时间为2h, 结果与1h相差无几, 因此考虑采用1h的保温时间。

4. 影响再生频率的因素

原生质体再生的必要条件为高渗, 原生质体呈球形特别脆弱, 对渗透压、振荡、离心、通气等很敏感。Hb再生培养基中含有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子及蔗糖等, 可维持稳定的渗透压, 因此能使原生质体较好地再生出正常细胞来。但原生质体再生频率偏低, 这是由于血球计数板计得的数字中包含一些实际上不能再生成菌落的小球状体。一般认为这些小球状体是那些不包含染色体的单位, 不能再生成细胞。

5. 重组子的鉴别

在检测及证实重组子的过程中, 观察到在B+SM+P平板上长出的菌落并非都是原类型重组子, 将此平板上的菌落经过传代后再次挑到B+SM+P平板上, 只有一部分长出来, 另一部分可能是原生质体在聚合状态下长成的异核体, 在后一平板上发生分离, 因此不长。

双抗标记在一个菌株出现, 可确定其为重组子。

84-3菌株与68菌株的融合重组子, 经过四次传代, 在证实重组子的平板上得不到重组子。其原因可能与84-3菌株的抗药性有关。84-3抗药性为50r/ml, 重组子不易获得此抗性, 因此不能得到具有双重抗性的重组子。而83-11抗药性为5r/ml, 重组子较易获得此抗性。

本文得到唐光燕、荆昌年老师的指导, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Ochi, K. et al, *J. Antibiotics*, 31, (1978), 1143—1148.
- [2] Gadfray, O. et al, *Can. J. Microbiol.*, 24, (1978), 994—997.
- [3] Fodn, K. et al, *J. Bact.*, 135, (1987), 68—70.
- [4] 江行娟等, 枯草杆菌中通过细胞融合的质粒转移, 遗传学报, 1(1981), 1—10.
- [5] Pesti, M. et al, *Fifth International Protoplasts Symposium Programa and Abstracts*, (1979), 4.
- [6] Hamly, P. F. et al, *Genet. Indue. Microbiol.*, 3(1979), 185—191.
- [7] 袁丽蓉等, 麦迪霉素产生菌——生米卡链霉菌原生质体融合的研究, 抗生素, 6(1983), 380—387.
- [8] 王洪洲等, 庆丰链霉菌原生质体的形成、再生及融合重组的研究, 遗传学报, 9, 3(1982), 172—179.
- [9] 郑幼霞, 微生物遗传育种新技术——原生质体融合, 应用微生物, 4(1983), 1—5.

The Formation, Regeneration and Recombination of Protoplasts from Lincomycinum Productive Strain

Ljn Ying

Abstract

This paper studies the formation, regeneration and recombination of protoplasts from the mycelia of lincomycinum productive strain which grown on S medium containing glycine or not. The cell wall of mycelia can be solved by lysozyme and thus protoplasts liberated. 1.0% glycine in S medium and 2.5mg/ml lysozyme are the optimum concentration for its liberation. The protoplasts regenerate very well on Hb medium. The protoplasts recombine effectively by fusion in 40% (w/v) PEG 1,000 solution prepared with P medium, with a recombination ratio of 6.7%.

Key words lincomycinum, protoplast, lysozyme