

· 讲 座 ·

抗生素发酵基础理论讲座

第二讲 产生菌选育原理和技术

浙江省温州制药厂 吴瑞武

通常抗生素发酵产量高低主要决定于菌种的生产能力高低、营养与发酵条件的控制是否能最大程度地发挥菌种的优良性能,因此选育优良的菌种是达到高产、优质、低耗的基础工作,可以收到一本万利的效果。然而,抗生素产生菌合成抗生素不是随机的,而是受到其遗传特性的严格控制和调节。菌种选育就是用人工的方法去破坏或改变菌种这种自主控制系统,引起某些细胞物质代谢障碍,使其无控制地产生人类所需要的产品,为此我们必须弄清菌种遗传特性的本质,从而有的放矢地采取措施来改变其特性,以达到事半功倍之目的。

一、菌种遗传的基本原理:

遗传和变异是生物最基本的属性之一,也是生物延续世代和进化的基础。所谓遗传,是生物亲代的性状又在下一代表现的现象。变异,则是指生物遗传因子发生了改变产生了和亲代不同的性状,这种变异性是可以遗传的。微生物的遗传变异性是菌种选育的理论根据,遗传变异的物质基础是脱氧核糖核酸(或称DNA),就是说DNA是决定生物性状的遗传物质,它大部分存在于细胞核或核质中。1953年美国生物化学家沃森(Watson)和英国物理学家克里克(Crick)划时代地设计出一个核酸分子的模型,表明核酸的分子结构就象一个两边有扶手的、沿着同一垂直的轴绕着转的楼梯,从每一个糖磷酸链朝着对面的嘌呤和嘧啶向内伸出嘧啶和嘌呤并且用氢键互相连接起来。就象是这个双扶手螺

旋楼梯的梯级一样,不过腺嘌呤(A)的相对位置上必定是胸腺嘧啶(T),鸟嘌呤(G)的相对位置上必定是胞嘧啶(C),如果一条DNA单链的碱基排列顺序为A-T-G-C...,那么与其相对应的另一条单链上的碱基顺序必定是T-A-C-G...,就是说A一定和T配对,G一定和C配对,否则遗传特性就可能发生变异,当产生子代时,DNA就要复制,这时两条多核苷酸长链由于氢键断裂而彼此松开拆分为两条单链并各以其原有的核苷酸为模板,按照碱基配对规律(即A配T,C配G)吸收细胞中游离的核苷酸,在DNA合成酶的作用下,各自合成一条与其互补的新链,即又成双链以后分配到子代中,这条双链中有一条链是老的,一条链是新合成的,这被称为半保留复制,这就保证了生物遗传性的相对稳定。在DNA分子上还存在着一段一段的决定生物性状的遗传功能单位,被称为基因,它是具有特定核苷酸的顺序的DNA区段,核苷酸的不同排列顺序代表不同的遗传信息,现已知三个核苷酸的特定排列顺序代表一个氨基酸的遗传信息,我们称这个核苷酸三联体为遗传密码,它是负载遗传信息的基本单位。如以U表示尿嘧啶,在RNA链上UUU代表苯丙氨酸,UUA代表亮氨酸。由上可知,DNA链上的碱基排列发生变化即基因发生突变,那么生物的遗传性状也可能随之发生突变,这就是菌种诱变的原理,到目前为止,几乎所有抗生素的工业生产菌株,均是由诱变选种得到的。

突变, 根据它的遗传变异的情况可分为点突变又称基因突变和区段突变又称染色体畸变(包括缺失、易位、倒位、重复等)。根据突变发生的原因又可分为自发突变和诱发突变。自发突变指没有什么明确因子刺激下自然发生的基因突变, 自然选育就是选取自发突变所产生的优良菌株, 但这种突变发生频率很低(约 $10^{-7} \sim 10^{-8}$), 现知自发突变与细胞内代谢产物如过氧化物, 锰离子等物质起诱变作用有关。诱发突变的效率可能是自发突变的上万倍。发生突变的机制有两种, 一种是 DNA 链中碱基对的置换, 另一种是密码组移动突变即 DNA 链上失去或添加一个或几个碱基所造成的突变, 因为在 DNA 链中碱基增添或失去就会打乱了原来的排列顺序使遗传密码符号发生变化, 因此由它所决定的氨基酸也发生变化, 由此合成的蛋白质也就发生很大变化。生物体的各种生理功能是靠无数的各种蛋白质的活动来实现的, 故蛋白质的变化造成生物性状的变异。与碱基置换型突变相比密码组移动型突变引起了 DNA 上微小的损伤, 在基因机能变化, 失活上具有更高的效率。

人工诱变的方法是应用诱变剂处理菌种, 诱变剂种类很多, 归纳起来可分为物理的、化学的和生物的, 常用的是物理诱变剂和化学诱变剂, 物理诱变剂: 如紫外线, X 线, γ -射线(钴 60), 快中子等, 其中紫外线使用很广泛, 它的生物效应主要是能引起 DNA 产生两类光化产物即水合物和二聚体, 嘧啶类在第 4, 5 位上固定一个水分子即为水合物, 水合物可以影响 DNA 一段螺旋内的氢键发生断裂。二聚体一般在 T-T 之间形成, 致使 DNA 分子变形并且干扰了 DNA 复制时碱基的正常配对而产生突变。紫外线处理时一般采用 15 瓦紫外灯, 以距离和照射时间二个参数来控制剂量, 距离 30—100 厘米, 照射时间通常为 20 秒—1 分钟。X 射线和 γ 射

线都是高能电磁波, 除能引起点突变外, 也可使染色体发生断裂, 结果使染色体发生易位、倒位、缺失、重复及其他类型的畸形变化。快中子的生物效应是由中子穿过物质时把原子核中的质子打出来所造成, 它具有较大的电离密度。用快中子处理红霉素和链霉素菌种都获得很好的效果。化学诱变剂, 它们的种类很多, 按它们对 DNA 作用的机制可分为三类, 第一类是烷化剂, 这类化合物与一个或多个核酸碱基起化学变化, 引起 DNA 复制时碱基配对的置换而导致变异。如亚硝酸(HNO_2)、甲基磺酸乙酯(MES)、亚硝基甲基脒(NMU)、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG 或 NTG)、硫酸二乙酯(DES)等; 第二类是一些碱基类似物。它们是掺入到 DNA 分子中引起变异。如 5-溴尿嘧啶、8-氮鸟嘌呤等; 第三类是密码组移动型诱变剂, 使 DNA 分子上增添或失去一二个碱基, 使碱基突变体的全部遗传密码在转录和翻译时产生错误。如嘧啶黄、甲基氨苄基偶氮硫酸钠(DAPA)等。这些诱变剂中以硫酸二乙酯、氮芥、亚硝基胍(NTG)较为有效, 而 NTG 有超诱变剂之称, 但使用不够安全, 有人用光敏剂 8-甲氧基补骨脂素处理后, 再用长波紫外灯照(3600 Å), 据说效果与亚硝基胍处理相当。

二、诱变育种中应予以重视和探讨的新领域

(一) 微生物细胞中不仅存在着完整的精密调控系统而且还存在着较强大的修复系统, 研究证明由于物理或化学因素造成的微生物 DNA 损伤的修复可能是比较容易的。毫无疑问, 下面几种 DNA 损伤都可得到修复: 单链或双链的破裂; 由紫外线诱导形成胸腺嘧啶二聚体; 碱基对错配以及化学诱变剂所诱导的单链交联等。所以突变的发生主要是菌体中各种修复机制所引起的错误而产生的, 大多数突变主要取决于切补修复、复

制后修复和对 DNA 上直接或间接形成的单链或间接形成的单链缺口起作用的易错误修复系统。因此处理完了并不是事情都做完了,而是要下大功夫选用合适的培养条件来引导菌体逐步稳定和提高其高产性能。

(二) 活细胞的代谢不是恒定不变的,而是经常随着生理状态和环境条件的改变而调节它的速度和方向,而且细胞中各种代谢过程必须互相协调彼此配合保持平衡,才能使其的生命活动有条不紊地进行。诱变使菌株产抗生素的能力大幅度提高必然会造成细胞代谢失去平衡,可以猜想在诱变处理中有些菌体可能产生抗生素的量更大,但它们由于代谢失调得太厉害,因此它们不能存活,只有那些抗生素产量稍有增加而又能勉强维持其生活必需的代谢协调的菌株才生存下来,而被我们选为高产菌株。从这个观点出发可以认为:在菌种选育中倘若在诱变剂处理后,立即转入含有有利于菌体重新调节以维持其最起码的代谢平衡所需的能量和物质为 ATP、氨基酸、生长因子等的培养基中,对那些高产但平衡严重失调的个体进行抢救,这样也许可得到更高产的菌株。

(三) 在处理后的筛选中不仅要选取高产菌株,而且要收集不产抗生素的突变株(又称 O 变株)。Demain, M 等认为抑制不产抗生素的突变株使其回复生产,可能是一个重大的战略措施。如 Dulancy 等将一株不产金霉素的绿色链霉菌的营养缺陷型回复突变为原养型,使金霉素产量比原来的原养型提高了 6 倍。

(四) 抗生素的合成是由众多的功能不同的酶(蛋白质)的催化下完成的,而蛋白质合成的调节是由三种不同基因的相互作用引起的,其中两种称为结构基因和操纵基因(在它们之间还存在着发起基因),结构基因和操纵基因构成操纵子,第三种基因称为调节基因。结构基因包藏着有关某一酶结构的

信息,调节基因主要是和蛋白质合成的速率有关。结构基因发生突变只影响某一种酶的活力,但某些点突变却能造成调节机制的失效,从而使代谢途径中所有的酶的形成速率普遍提高,这种酶变成为组成酶,即它们的浓度不受诱导物或阻遏物的影响,这就可能使产量大幅度提高。因此,通过诱变筛选消除调节机制突变型的前景是无途广阔和光明的。

由于大多数抗生素足以正常的初级代谢产物如氨基酸或核苷酸等作为基础材料而合成的,而某些抗生素的合成途径与氨基酸代谢途径分享同一中间体,那么这一中间体合成越多抗生素的产量也越高。因此这些初级代谢途径对其终产物(氨基酸等)的调节即会对抗生素的合成产生反馈抑制或阻遏作用,而且抗生素也能反馈阻遏产生菌自己产生的抗生素。此外,环境条件对抗生素产生也能起调节作用如碳、氮源分解调节、磷酸盐调节等。故筛选消除调节机制的突变株如抗代谢类似物突变株——抗反馈突变株、抗前体及其类似物的突变株、对自产抗生素的耐药突变株等等具有事半功倍的效果。消除反馈调节的方法有:① 修改反馈敏感酶的结构,即在一次营养缺陷突变中解除它的活性,接着用另一回复突变取代营养缺陷突变,这样重新获得的活性常常是由于有一种氨基酸取代的酶,它保留了触媒的活性但对反馈调节不敏感;② 选育营养缺陷型突变株,使合成途径中的某一步骤发生缺陷合成不能完成,最终产物不能积累到引起反馈调节的浓度;③ 改变细胞膜透性使最终产物的浓度很低不能反馈抑制。

(五) 突变合成:突变合成是七十年代新兴的一种定向寻找新的高效抗生素的技术。此法利用一种特养型突变株,由于它缺失合成其亲株所产抗生素分子的某一组分的

(下转第44页)

(上接第41页)

能力,只有在培养液中加入它所缺失的组分才能合成这种抗生素,如新霉素产生菌的一株特养型突变株不能合成新霉素分子中的2-脱氧链霉胺基,只有当培养基中添加外源的2-脱氧链霉胺后才能产生新霉素,但当添加入2-脱氧链霉胺的类似物时,它也将其组合到抗生素分子中,结果产生了多种新的抗生素。此法为新抗的筛选开辟了很有希望的新途径,值得进一步探讨和开拓。

三、菌种选育的新技术简介

近年来菌种育种的技术有了极大地发展,主要有基因转移、重组和扩增。即通过抗生素产生菌的遗传物质即基因的重组(包括转化、转导和接合)得到重组体、二倍体或多倍体杂种来达到有用基因的转移和扩增,

以导致抗生素增产或产生新的抗生素。原生质体融合技术很有发展前途,它不仅大大提高了重组频率而且还打破了种属间不亲和的介限,甚至不同种生物之间的原生质体也能融合。张筱玉等曾用原生质体融合技术育得红霉素的优良菌株64—74[#]。基因扩增的另一种新技术是以质粒重组或用噬菌体导入特殊有用基因,这些基因可在受体细胞内进行独立自主复制或插入染色体上同染色体一起复制。使受体菌获得新的性能。转座子是在染色体上或质粒上具有可易位的抗药性因子,可作为重组DNA和遗传操作技术转化体筛选的极好工具,同时还可作为定向突变,增加代谢产物产量等等。这些技术应用于育种,将会获得惊人的成果,正待我们去努力开发。