

362-366

6784(15)

第10卷 第4期
1995年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 10 No. 4
Dec. 1995

以原生质体融合技术构建广谱抗噬菌体菌株

裘娟萍 周宁一

(浙江工业大学轻工系, 杭州 310014)

Q939.48

A

摘要 利用15株不同品系的噬菌体作筛子筛选的噬菌体抗性自发突变株只对其相应的筛子噬菌体具抗性, 为窄谱抗株。利用原生质体融合技术把北京棒杆菌7338与钝齿棒杆菌 Ts-Li 进行融合得融合子 ZG88, 通过噬菌体吸附试验, 血清学试验证明 ZG88细胞表面结构发生了较大的改变, 失去了噬菌体的吸附位点, 因此 ZG88是广谱稳定的噬菌体抗性菌株。

关键词 广谱抗噬菌体菌株, 原生质体融合

噬菌体, 抗噬菌体菌株

噬菌体污染是发酵工业的大敌, 特别是味精行业。多年来国内味精厂使用的生产菌种大多系钝齿状棒杆菌 T6-13的各种突变株, 因此都避免不了受 T6-13噬菌体的侵染。噬菌体污染常引起倒罐甚至停产, 不少小厂已因倒罐率高、效益差而破产。不少人曾筛选过噬菌体抗性菌株^[1], 但抗株只对相应的噬菌体具抗性而缺乏普遍使用的价值。由于新噬菌体的出现和回复突变的自发产生, 使抗性突变株不能长期使用。对此我们利用北京棒杆菌7338对 T6-13噬菌体的天然免疫力, 通过7338与 Ts-Li 的原生质体融合获得了稳定的广泛抗 T6-13噬菌体的菌株。

材料与方 法

1. 材料

1.1 菌种 钝齿状棒杆菌(*Corynebacterium creatum*) T6-13; 钝齿状棒杆菌 Ts-Li(Lcu Ile Str^rRif^rPh^r)由本室从 T6-13诱变获得, 以下简称 Ts-Li; 北京棒杆菌(*Corynebacterium pekinese*)7338(Lcu⁺Ile⁺Str^rRif^rPh^r)本室保存, 以下简称7338。

1.2 噬菌体 噬菌体 PTC-1、PTC-2、PLS-1、PLS-2、PST、PSZ-1、PSZ-2、PLX、PFD、PHZ、PXS、LP、PnX-1、PnX-2、PSZ-3等由本室从浙江、上海、江苏、福建、河南等省市味精厂分离。

1.3 培养基 CM 培养基、HCM 培养基、MM 培养基、谷氨酸发酵种子培养基、谷氨酸发酵培养基的制备均见文献^[2]。

1.4 试剂

1.4.1 10000 u/ml 链霉素溶液: 硫酸链霉素用无菌水配制。

1.4.2 4000 u/ml 利福平(Rif)溶液: 甲哌利福霉素用无菌的0.1 mol/L 盐酸溶解后用无菌水配制。

本文于1995年1月19日收到, 3月25日修回

由表1可见,噬菌体抗性自发突变株只对自己相应的噬菌体具抗性。噬菌体要侵染细胞,第一步是吸附。噬菌体具特定的吸附器,细菌细胞表面具特异性的受体。当吸附器与受体在化学结构上互补时,噬菌体才能不可逆地吸附,实现侵染的第一步。因此噬菌体与其宿主具高度的专一性。细菌通过突变使受体的化学性质和结构发生改变,使特定的噬菌体不再吸附而成抗性菌株。表中噬菌体 PLS-1、PLS-2、PST,虽其噬菌斑属不同的类型,但在 T6-13细胞上的吸附位点相同。当该位点发生改变时,突变株同时抗这三种噬菌体。

1.2 噬菌体抗性的稳定性

表1中1号和12号抗株分离各得100个菌落,在传代过程中抗性的丢失率见表2。

表2 抗性突变株的抗性丢失率

Table 2 Resistant loss frequency of mutants

传代数 Times of subculture	被测菌株数 Number of detected strains		抗性菌株数 Number of resistant strains		抗性总丢失率 Resistant loss frequency	
	No. 1	No. 12	No. 1	No. 12	No. 1	No. 12
	1	100	100	100	100	0
2	100	100	100	100	0	0
3	100	100	100	100	0	0
4	100	100	99	98	1%	2%
5	99	98	99	98	1%	2%

自发突变往往是点突变引起的,DNA分子的变化很小,易于回复,所以由自发突变筛得的抗性易丢。噬菌体也能通过突变改变其吸附器的结构,使它能重新侵染抗性突变株。所以靠基因突变选得的抗株难于永久应用。

2 噬菌体的抗性融合株

2.1 融合子 ZG88的获得

原生质体融合再生得173个菌株,传至5代 Str^rRif^r 抗性自然丢失率98%,得3株融合株。再传5代,Str^rRif^r 抗性丢失率为0.3株融合子经摇瓶产量试验,ZG88的产酸能力最强,见表3。

表3 融合子及其亲株的产量试验

Table 3 The productional test of fusants and their parents

菌株 Strains	初糖(%) Original sugar	OD	残糖(%) Residual sugar	谷氨酸(%) Glutamate	转化率(%) Transforming frequency
Ts-Li	12.5	0.79	0.20	2.01	16.30
7338	12.5	0.84	0.11	4.50	36.3
T6-13	12.5	0.87	0.15	6.07	49.1
ZG88	12.5	0.85	0.21	5.87	47.8
ZG88-1	12.5	0.83	0.18	1.34	10.9
ZG88-3	12.5	0.86	0.21	3.15	25.6

2.2 ZG88对噬菌体抗性的稳定性

ZG88的100个单菌落,经5代试验,对噬菌体抗性标记的总丢失率为0。在1988—1990年二年多时间里,定期在 MM + Rif + Str + phage 的平板上分离鉴定,ZG88的遗传标记丢失率均为

0,这说明 ZG88是稳定的融合子。

2.3 ZG88对噬菌体的抗谱

表1中15个不同品系的噬菌体均无裂解 ZG88的现象。

2.4 噬菌体对 ZG88的吸附试验

噬菌体与菌体混合,待吸附入侵后立即离心,测定上清液中噬菌体的效价,结果见表4。

表4 噬菌体对 ZG88及其亲株的吸附
Table 4 Adsorption of phage to ZG88 and its parent strains

菌株 Strain	菌体浓度(个/ml) Cell concentration	上清液中噬菌体效价 Phage assay in supernatant
Ts-Li	2.5×10^{10}	8.9×10^{10}
7338	2.7×10^{10}	1.6×10^{10}
ZG88	2.3×10^{10}	1.2×10^{10}

表4说明噬菌体不能吸附到 ZG88和7338细胞上。这证明 ZG88细胞表面没有 T6-13噬菌体的吸附位点。

2.5 ZG88细胞表面结构的血清学鉴定

对 ZG88及其双亲进行血清学反应的结果见表5。

表5 ZG88及其双亲间的交叉凝集反应
Table 5 Cross agglutination test of ZG88 with parent strains

抗血清 Antisera	菌株 strain		
	Ts-Li	7338	ZG88
Ts-Li	+	-	+
7338	-	+	+
ZG88	+	+	+

表5表明7338与 Ts-Li 之间无交叉凝集反应,说明它们之间无共同的抗原存在;而 ZG88与7338、Ts-Li 具共同的抗原成分,这证明了 ZG88确系 Ts-Li 和7338的融合子,同时也证明了 ZG88的细胞表面结构发生了巨大的改变。

经原生质体融合获得的抗性融合株因基因组发生了较大的改变,其细胞表面结构也发生了大幅度的改变,因此对噬菌体抗性不易丢失,抗谱也广泛。

2.6 ZG88的溶原性测定

溶原菌对本身产生的或外来同源的噬菌体具免疫性,故常被误认为抗性菌株。ZG88经紫外线诱发裂解,无噬菌斑出现,说明 ZG88是真正的抗株。

2.7 ZG88带噬菌体的发酵结果

ZG88和 T6-13在噬菌体攻击下的发酵试验结果见表6。

表6 噬菌体攻击的发酵试验

Table 6 Fermentation test with phage

样品 Specimen	菌 株 strains									
	T6-13					ZG88				
	OD	pH	Glu	残 糖 Residual sugar		OD	pH	Glu	残 糖 Residual sugar	
不加噬菌体的种子液 Seed medium	0.55	7.0				0.56	7.1			
加噬菌体的种子液 Seed medium with phages	0.02	8.0				0.56	7.0			
不加噬菌体的发酵液 Fermentative medium	0.87	7.2	6.07%	0.17%		0.86	7.1	5.71%	0.20%	
加噬菌体的发酵液 Fermentative medium with phages	0.03	8.0	0	12.00%		0.88	7.2	5.69%	0.21%	

从表6可见,噬菌体的超量存在,对ZG88没有影响,ZG88能正常生长繁殖,产酸水平也与不加噬菌体的对照组一致。糖酸转化率达47.5%以上。ZG88在36吨发酵罐上生产十批,发酵34小时平均产酸5.2%,糖酸转化率42.6%,残糖0.8%。根据我们的工作和赵广铃的研究结果^[6]可见,用原生质体融合技术可以将双亲的优良性状集为一体,可望获得稳定的高产抗株。

参 考 文 献

- 1 赵广铃,郑善良,王瑛华. L-谷氨酸产生菌 FM-242的诱变选育. 工业微生物, 1992, 22(4), 1—5
- 2 阮法华, 蔡娟萍, 周宁, 等. 氨基酸产生菌融合子产量分布的研究. 浙江工学院学报, 1989, (3), 72—77
- 3 乔宝义, 徐浩. 棒状杆菌原生质体的形成、再生以及融合的初步探讨. 微生物学报, 1983, 23(1), 33—43
- 4 余茂效, 司福东. 噬菌体实验技术. 北京: 科学出版社, 1991, 48—50
- 5 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验. 第二版, 北京: 高等教育出版社, 1989, 220—224
- 6 赵广铃, 郑善良, 苑小林. L-谷氨酸产生菌原生质体融合的研究. 工业微生物, 1993, 23(4), 5—10

A Broad Spectrum Antiphage Strain Constituted with Protoplast Fusion Technology

Qiu Juanping Zhou Ningyi

(Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

Antiphage mutants selected by 15 phage strains have resistant only to its relevant phage, so it is narrow-spectrum antiphage strain. The fusant ZG88 is obtained with protoplast fusion between *Corynebacterium pekinense* 7338 and *Corynebacterium crenatum* Ts-Li. Its serologic reaction and phage attach test show that it has changed so much in cell surface structures as to lose the position of adsorption. So ZG88 is a broad spectrum and steady antiphage strain.

Key words Broad spectrum, Antiphage strain, Protoplast fusion