

抗菌素产生菌 的 杂交育种

贺秉坤 刘颐屏 合编



化学工业出版社

抗菌素产生菌的杂交育种

贺秉坤 刘颐屏 合编

化学工业出版社

本书系统地介绍了抗菌素产生菌杂交育种的遗传学基础理论，并结合实际育种工作，分章介绍细菌、放线菌和青霉菌的杂交育种的实验原理和操作技术。对链霉菌的质体和基因工程，以及青霉菌的控制育种和原生质体融合分章作了介绍，以便菌种选育工作者对这些新兴科学有所了解。

本书主要供抗菌素育种工作者学习参考，同时对从事工业微生物遗传育种工作的科技人员和有关专业的高等院校师生也有参考价值。

抗菌素产生菌的杂交育种

贺秉坤 刘颐屏 合编

化学工业出版社 出版

(北京和平里七区十六号楼)

化学工业出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

开本 $787 \times 1092^{1/32}$ 印张 $7^{1/2}$ 字数163千字印数1-2,900

1980年4月北京第1版1980年4月北京第1次印刷

书号15063·3157定价0.78元

引 言

抗菌素是由生物（微生物、植物和动物）在其生命活动过程中所产生的一类有机化合物，具有选择性地抑制其它细菌或动植物细胞生长的能力。这类天然有机化合物，有些可以由化学合成或制成半合成衍生物。

微生物中的细菌、放线菌和霉菌是产生抗菌素的主要生物来源。产抗菌素的细菌主要是假单孢菌和芽孢杆菌。细菌产生的抗菌素有多粘菌素、枯草菌素、杆菌肽等。放线菌产生的抗菌素最多，如链霉素、卡那霉素、四环素类（四环素、金霉素、土霉素）、红霉素、制霉菌素等。世界上第一个被发现的至今仍具有良好疗效的抗菌素——青霉素，是霉菌中的产黄青霉菌产生的，霉菌产生的其它抗菌素还有灰黄霉素、头孢霉素（先锋霉素）和烟霉素等。

微生物的代谢产物概括起来可以分为初级代谢产物和次级代谢产物两类。初级代谢产物是指微生物生长和繁殖所必需的物质，次级代谢产物是指由微生物产生，但不是微生物的生长和繁殖所必需的一类物质，它是以初级代谢产物为原料进一步代谢合成的。目前认为，抗菌素是微生物的次级代谢产物。产黄青霉菌（*P. chrysogenum*）的遗传研究证明，青霉素的产生受细胞核控制。比基尼链霉菌（*Strep. Kikimniensis var zorbonensis*）的遗传研究证明，在其基因图上有与祖尔巴霉素（zorbamycin）等抗菌素生物合成有关系的三个基因。近几年，抗菌素产生菌的遗传研究证明，春日霉

素(春雷霉素)、金丝菌素、土霉素、次甲霉素 A (methylenomycin A, 由天蓝色链霉菌产生) 和氯霉素等的生物合成, 至少部分受质体 (染色体外 DNA) 控制。所以, 抗菌素的生物合成和初级代谢产物一样, 是受基因控制的, 也就是说, 合成抗菌素的遗传物质基础是脱氧核糖核酸 (DNA)。

从自然界直接分离出来的野生菌株, 其合成抗菌素的能力一般都很低, 不符合工业化生产的要求。另外, 在抗菌素工业生产中已经使用的生产菌株, 也需要不断改进其生物合成特性, 以利于提高其产生抗菌素的能力。为此, 必须进行菌种选育, 这是多快好省地发展抗菌素工业的重要关键之一。以往, 菌种选育的主要方法, 是自然选育和用诱变剂处理生产菌株, 从中分离和筛选抗菌素单位产量高的变异株用于生产。目前, 抗菌素工业生产上使用的青、链霉素等抗菌素产生菌, 就是经过不断诱变处理和纯化获得的, 其抗菌素产生能力比野生菌株有成百倍的提高。诱变育种的方法, 对抗菌素工业的发展起了重要的作用, 至今它仍是世界各国选育高产抗菌素菌种的主要手段。但也应看到, 为了适应抗菌素工业进一步发展的要求, 必须迅速提高菌种选育的效率和效果, 同时也必须研究和使用的其它新的育种途径。

遗传学理论的研究, 为育种科学提供了新的方法。除了自然选择和诱变育种之外, 杂交育种在实践上有着悠久的历史, 并日益广泛地为微生物、动物、植物育种工作者所采用。通过杂交, 基因可以自由地重新组合, 产生具有各种各样新性状的重组体, 增强对诱变因素的敏感性, 扩大变异范围, 这不仅在生物进化上起着重大作用, 而且可以形成对人类有利的新品种, 这是目前育成新品种的一种有效方法。在农业上, 许多优良品种就是通过杂交方法育成的, 例如近年

我国杂交玉米、杂交水稻“硬秆青”、小麦良种“石槐一号”和杂交高粱种子的应用，可获得大面积稳产高产。微生物的杂交现象，很早已经发现，它对遗传理论的建立和发展起了重要的作用。食品工业在四十年代已经采用杂交技术进行面包酵母、酒精酵母和啤酒酵母菌的杂交。抗菌素工业的建立和发展，促进了微生物遗传理论的研究。产黄青霉菌、灰色链霉菌、龟裂链霉菌、金色链霉菌等等都已杂交成功，从而，为抗菌素育种工作提供了新的有效方法。

值得注意的是，随着分子生物学和分子遗传学的发展，近几年一门新的科学——基因工程正在迅速形成。基因工程，就是有目的有意识地进行特定基因的组合或转移。可以预期，基因工程的建立和发展，必将为抗菌素育种开拓新的途径。

杂交育种的基础理论是遗传学，没有遗传学的理论基础，不但不可能有新技术的创造和发明，实验研究的结果也不可能从一个水平跃进到一个新的水平。因此，在实验研究杂交育种之前，应该对遗传学的基础知识有所掌握。为此，我们在本书中先把遗传学的各种原理作一较系统的介绍，这一方面可供平时与遗传学不大接触的读者在阅读本书时参考，另一方面也可供菌种选育工作者在研究本书前复习一下有关的遗传学基础知识。

产抗菌素的细菌、放线菌和霉菌，由于它们分类地位的不同和形态结构、繁殖方法的不同，它们的杂交原理和杂交技术也就有所不同。为了把它们特殊性区别开来，以利实验研究的设计和安排，本书分成三章予以叙述。

链霉菌的质体和基因工程，以及青霉菌的控制育种是目前遗传学研究者和抗菌素菌种选育者正在研究中的新课题，

4

这些比较理想的育种方法，有可能成为今后发展的方向，但是由于研究时间较短，资料较少，大量理论上的和技术上的工作尚待进行。为了引起读者的注意，分别写成两章列于本书之末。

由于某些术语和专有名称尚无统一译名，因恐误译，乃将其英文名附于译名之后的括号内以供参考，也可为进一步阅读外文原著提供方便。

目 录

引言	1
1. 杂交育种概述	5
2. 有关杂交育种的遗传学原理	10
2.1. 生活史	10
2.1.1. 无性循环	12
2.1.2. 有性循环	12
2.1.3. 准性循环	14
2.2. 细胞的分裂	16
2.2.1. 细胞的形态和结构	16
2.2.2. 有丝分裂	18
2.2.3. 减数分裂	20
2.3. 染色体	24
2.3.1. 形态	24
2.3.2. 结构	26
2.3.3. 复制	28
2.4. 基因	30
2.4.1. 基因、等位基因和拟等位基因	31
2.4.2. 顺反子	32
2.4.3. 操纵子	34
2.5. 遗传和变异 (一)	38
2.5.1. 基因型和表型	38
2.5.2. 显性和隐性	40
2.5.3. 分离和重组	41
2.5.4. 连锁和交换	44

2.5.5. 交叉和干扰	47
2.6. 遗传和变异 (二)	50
2.6.1. 染色体畸变	51
2.6.2. 基因突变	61
2.7. 遗传和变异 (三)	75
2.7.1. 遗传物质的分子结构和复制	75
2.7.2. 遗传密码的转录和转译	80
2.7.3. 遗传物质的传递和体外重组	93
3. 杂交育种用的标记菌株的筛选	107
3.1. 标记菌株的种类	107
3.2. 营养缺陷型的筛选	108
3.2.1. 营养缺陷型的诱发	109
3.2.2. 营养缺陷型的浓缩	111
3.2.3. 营养缺陷型的检出	112
3.2.4. 营养缺陷型的鉴别	114
3.2.5. 营养缺陷型的纯化和保存	118
3.3. 抗药性菌株及双标记菌株的分离方法	119
3.4. 标记菌株的命名方法与特征	119
4. 细菌的杂交育种	122
4.1. 细菌的形态、细胞结构和繁殖方法	122
4.1.1. 形态和细胞结构	122
4.1.2. 繁殖方法	124
4.2. 细菌杂交的发现	124
4.3. 细菌杂交原理	128
4.3.1. 结合子的形成	128
4.3.2. 重组体的形成	129
4.4. 细菌杂交技术	130
5. 放线菌的杂交育种	132
5.1. 放线菌的形态、细胞结构和繁殖方法	132

5.1.1. 形态和细胞结构	132
5.1.2. 繁殖方法	133
5.2. 放线菌杂交原理	136
5.2.1. 异核现象	136
5.2.2. 接合现象	137
5.2.3. 杂合核的形成	137
5.2.4. 重组体的形成	139
5.3. 放线菌杂交技术	140
5.3.1. 混合培养法	141
5.3.2. 平板杂交法	145
5.3.3. 玻璃纸转移法	145
5.4. 放线菌杂交育种的应用	147
5.4.1. 金霉菌和土霉菌的杂交育种	147
5.4.2. 灰色链霉菌的杂交育种	148
5.5. 放线菌的转化和转导	150
6. 青霉菌的杂交育种	152
6.1. 青霉菌的形态、细胞结构和繁殖方法	152
6.1.1. 形态和细胞结构	152
6.1.2. 繁殖方法	152
6.2. 青霉菌的杂交原理	154
6.2.1. 吻合和异核体的形成	154
6.2.2. 核融合和杂合二倍体的形成	156
6.2.3. 体细胞交换、单倍化和分离子的形成	160
6.3. 青霉菌的杂交技术	165
6.3.1. 异核体的形成和纯化方法	165
6.3.2. 二倍体的诱发和检出方法	171
6.3.3. 分离子的诱发、识别、检出和测定方法	172
6.4. 青霉菌和链霉菌的细胞核、核外遗传物质以及杂交机制的比较	176

6.5. 青霉菌和链霉菌杂交育种实验过程的比较	177
7. 链霉菌的质体和基因工程	181
7.1. 基因工程和质体	181
7.2. 链霉菌质体的发现过程	188
7.2.1. 放线菌的基因重组	188
7.2.2. 放线菌异核体的亲和性	190
7.2.3. 放线菌性的分化	192
7.2.4. 正常致育型、超致育型和原始致育型	195
7.2.5. 新供体型	198
7.2.6. 质体是致育性的控制体系	202
7.2.7. 致育性的相互转变是质体分布状况的改变	206
7.3. 链霉菌质体的基本特性	209
7.3.1. 放线菌质体所控制的其它表型	209
7.3.2. 质体的种间转移	212
7.3.3. 质体能成为转移染色体基因的载体	214
7.4. 链霉菌基因工程的前景	218
8. 青霉菌的控制育种	223
8.1. 控制育种的意义	223
8.2. 控制育种和常规杂交育种的比较	224
8.3. 青霉菌控制育种举例	225
9. 原生质体融合	227
附表 常用染色体座位符号和名称	230
主要参考资料	231

引 言

抗菌素是由生物（微生物、植物和动物）在其生命活动过程中所产生的一类有机化合物，具有选择性地抑制其它细菌或动植物细胞生长的能力。这类天然有机化合物，有些可以由化学合成或制成半合成衍生物。

微生物中的细菌、放线菌和霉菌是产生抗菌素的主要生物来源。产抗菌素的细菌主要是假单孢菌和芽孢杆菌。细菌产生的抗菌素有多粘菌素、枯草菌素、杆菌肽等。放线菌产生的抗菌素最多，如链霉素、卡那霉素、四环素类（四环素、金霉素、土霉素）、红霉素、制霉菌素等。世界上第一个被发现的至今仍具有良好疗效的抗菌素——青霉素，是霉菌中的产黄青霉菌产生的，霉菌产生的其它抗菌素还有灰黄霉素、头孢霉素（先锋霉素）和烟霉素等。

微生物的代谢产物概括起来可以分为初级代谢产物和次级代谢产物两类。初级代谢产物是指微生物生长和繁殖所必需的物质，次级代谢产物是指由微生物产生，但不是微生物的生长和繁殖所必需的一类物质，它是以初级代谢产物为原料进一步代谢合成的。目前认为，抗菌素是微生物的次级代谢产物。产黄青霉菌 (*P. chrysogenum*) 的遗传研究证明，青霉素的产生受细胞核控制。比基尼链霉菌 (*Strep. Kikimniensis var zorbonensis*) 的遗传研究证明，在其基因图上有与祖尔巴霉素 (zorbamycin) 等抗菌素生物合成有关系的三个基因。近几年，抗菌素产生菌的遗传研究证明，春日霉

素(春雷霉素)、金丝菌素、土霉素、次甲霉素A(methylenomycin A,由天蓝色链霉菌产生)和氯霉素等的生物合成,至少部分受质体(染色体外DNA)控制。所以,抗菌素的生物合成和初级代谢产物一样,是受基因控制的;也就是说,合成抗菌素的遗传物质基础是脱氧核糖核酸(DNA)。

从自然界直接分离出来的野生菌株,其合成抗菌素的能力一般都很低,不符合工业化生产的要求。另外,在抗菌素工业生产中已经使用的生产菌株,也需要不断改进其生物合成特性,以利于提高其产生抗菌素的能力。为此,必须进行菌种选育,这是多快好省地发展抗菌素工业的重要关键之一。以往,菌种选育的主要方法,是自然选育和用诱变剂处理生产菌株,从中分离和筛选抗菌素单位产量高的变异株用于生产。目前,抗菌素工业生产上使用的青、链霉素等抗菌素产生菌,就是经过不断诱变处理和纯化获得的,其抗菌素产生能力比野生菌株有成百倍的提高。诱变育种的方法,对抗菌素工业的发展起了重要的作用,至今它仍是世界各国选育高产抗菌素菌种的主要手段。但也应看到,为了适应抗菌素工业进一步发展的要求,必须迅速提高菌种选育的效率和效果,同时也必须研究和使用的其它新的育种途径。

遗传学理论的研究,为育种科学提供了新的方法。除了自然选择和诱变育种之外,杂交育种在实践上有着悠久的历史,并日益广泛地为微生物、动物、植物育种工作者所采用。通过杂交,基因可以自由地重新组合,产生具有各种各样新性状的重组体,增强对诱变因素的敏感性,扩大变异范围,这不仅在生物进化上起着重大作用,而且可以形成对人类有利的新品种,这是目前育成新品种的一种有效方法。在农业上,许多优良品种就是通过杂交方法育成的,例如近年

我国杂交玉米、杂交水稻“硬秆青”、小麦良种“石槐一号”和杂交高粱种子的应用，可获得大面积稳产高产。微生物的杂交现象，很早已经发现，它对遗传理论的建立和发展起了重要的作用。食品工业在四十年代已经采用杂交技术进行面包酵母、酒精酵母和啤酒酵母菌的杂交。抗菌素工业的建立和发展，促进了微生物遗传理论的研究。产黄青霉菌、灰色链霉菌、龟裂链霉菌、金色链霉菌等等都已杂交成功，从而，为抗菌素育种工作提供了新的有效方法。

值得注意的是，随着分子生物学和分子遗传学的发展，近几年一门新的科学——基因工程正在迅速形成。基因工程，就是有目的有意识地进行特定基因的组合或转移。可以预期，基因工程的建立和发展，必将为抗菌素育种开拓新的途径。

杂交育种的基础理论是遗传学，没有遗传学的理论基础，不但不可能有新技术的创造和发明，实验研究的结果也不可能从一个水平跃进到一个新的水平。因此，在实验研究杂交育种之前，应该对遗传学的基础知识有所掌握。为此，我们在本书中先把遗传学的各种原理作一较系统的介绍，这一方面可供平时与遗传学不大接触的读者在阅读本书时参考，另一方面也可供菌种选育工作者在研究本书前复习一下有关的遗传学基础知识。

产抗菌素的细菌、放线菌和霉菌，由于它们分类地位的不同和形态结构、繁殖方法的不同，它们的杂交原理和杂交技术也就有所不同。为了把它们特殊性区别开来，以利实验研究的设计和安排，本书分成三章予以叙述。

链霉菌的质体和基因工程，以及青霉菌的控制育种是目前遗传学研究者和抗菌素菌种选育者正在研究中的新课题，

这些比较理想的育种方法，有可能成为今后发展的方向，但是由于研究时间较短，资料较少，大量理论上的和技术上的工作尚待进行。为了引起读者的注意，分别写成两章列于本书之末。

由于某些术语和专有名称尚无统一译名，因恐误译，乃将其英文名附于译名之后的括号内以供参考；也可为进一步阅读外文原著提供方便。

1. 杂交育种概述

抗菌素优良菌种的选育过去主要采用诱变育种的方法，抗菌素工业生产中使用的高产菌株绝大多数均由诱变育种获得。目前，诱变育种仍然是选育高产抗菌素菌株的主要的有效手段。

可是一个菌种长期使用诱变剂处理之后，其生活能力一般逐渐下降，例如，生长周期延长，孢子量减少，代谢减慢，产量增加缓慢，诱变因子对产量影响的有效性降低等。因此有必要利用杂交的方法作为菌种选育的手段之一。

杂交育种，一般是指将两个基因型不同的菌株通过吻合（或接合）使遗传物质重新组合，从中分离和筛选具有新性状的菌株。

杂交育种的目的在于：第一，通过杂交使不同菌株的遗传物质进行交换和重新组合，从而改变原有菌株的遗传物质基础，获得杂种菌株（重组体）；第二，可以通过杂交把不同菌株的优良经济性状集中于重组体中，克服长期用诱变剂处理造成的菌株生活力下降等缺陷；第三，通过杂交可以扩大变异范围，改变产品的质量和产量，甚至出现新的品种；第四，分析杂交结果，可以总结遗传物质的转移和传递的规律，促进遗传学理论的发展。

杂交育种使用的材料，可概括为出发菌株、培养基、器皿和直接亲本（标记菌株）等几个方面。现扼要说明如下。

出发菌株（原始亲本，original strain），一般为生产

上使用的菌株或有特殊性状的系谱菌株。可以从系谱中挑取相距代数多或系谱的不同分枝的菌株；遗传标记要明显，即最好要挑选孢子颜色或可溶性色素不同的菌株作为出发菌株；同时，还要求出发菌株产量高、孢子丰富、代谢快、发酵液容易过滤等优良性状。

微生物杂交必须使用的琼脂培养基有四种，即基本培养基、完全培养基、有限培养基和补给培养基。

基本培养基(minimal medium——MM)，有人称之为最低培养基，在其上野生型菌株可以生长，缺陷型菌株不能生长。它所含营养单纯而贫乏，只含简单的碳、氮源和无机盐。碳源一般为纯净的葡萄糖或蔗糖；氮源是纯净的无机氮，不含有氨基酸、维生素和核酸碱基之类的物质；此外，还含有一些其它的无机盐。基本培养基所用的原料应为化学纯(CP)。所以，基本培养基(表1-1)仅能满足野生型菌株(原始亲本)生长要求，而不能满足营养缺陷型菌株的生长要求。

配制基本培养基的琼脂需要事先经过特殊处理，去除所含的可溶性杂质。处理的一般方法是，称取琼脂1~2公斤，放入10~20升干净的搪瓷桶中，插入自来水胶管，桶口以双层纱布包扎好，打开自来水阀门，流水冲洗40小时；挤去自来水，加适量蒸馏水洗涤2~3次，37℃晾干(外观呈白色)保存备用。比较复杂的方法是：琼脂在40~50℃温水中洗涤，去除可溶性色素；然后用流水冲洗7天；挤去水分，在酒精中浸泡3天；最后从酒精中捞出，挤去酒精，晾干备用。

完全培养基(complete medium——CM)，也有人称为天然培养基，该培养基既能满足野生型菌株(原始亲本)生长要求，又能满足缺陷型菌株所需要的各种营养物的复杂培养