

微生物的原生质体融合及应用

辛 明 秀

(北京师范大学生物系, 北京 100875)

马 玉 娥

(河北涞源第一中学, 涞源 102900)

原生质体融合起源于 60 年代。1960 年法国的 Barski^[1] 研究小组在两种不同类型的动物细胞混合培养中发现了自发融合现象。同时日本的 Okada^[2,3] 发现并证明了仙台病毒可诱发体内艾氏腹水癌细胞彼此融合, 从而开始了

细胞融合的探索。1974 年, 匈牙利的 Ferenczy^[4] 采用离心力诱导的方法报道了白地霉 (*Geotrichum candidum*) 营养缺陷型突变株的原生质

1994-12-08 收稿

体的融合。随后人们相继用 NaCl、KCl 和 Ca (NO₃)₂ 等作为诱变剂进行融合,但融合频率都很低。同年 Kao^[5] 发现 PEG 在适量 Ca²⁺ 存在下能有效地诱导植物原生质体融合。从而使这一技术跃上了新的阶段,大大提高了融合频率,使这一技术迅速扩展到动物、植物及微生物的各个领域。在早期的研究中,只是将这一技术作为一种生化的、遗传的研究工具应用于基因重组转移。自 1979 年匈牙利的 Pesti^[6] 首先提出了融合育种提高青霉素产量的报告,从而开创了原生质体融合在实际工作中的应用。作为细胞工程的重要组成部分、高频重组的有效方法和遗传学研究的重要工具,近年来日益受到国内外生物工作者的重视,使这项技术不断丰富和发展。从技术本身方面,已形成了原生质体融合、原生质体诱变和原生质体转化等一系列技术。在融合方法上,除了传统的化学方法外,1980 年 Zimmermann^[7] 等报道了电场诱导细胞融合的新技术,进一步提高了融合频率。1988 年张闻迪^[8] 等又报道了激光诱导动物细胞融合。在融合产物的筛选方法上,除了传统的利用营养缺陷型作为遗传标记选择融合子外,新的选择方法如抗药性选择、灭活原生质体、荧光染色、利用形态差异等逐渐被使用。其它辅助方法如 DNA 含量测定、同功酶电泳、电镜观察、利用毒力差异等也常常与上述一些方法配合使用。在研究目的上,可用来探索一系列重大理论问题及解决许多实际应用问题。在基础理论方面,可用来研究外源 DNA 转化、质粒转移、基因定位^[9]、病毒传递以及核与核、核与质之间的关系等。在实际应用中则主要用于改良菌种特性、提高目的产物的产量、使菌种获得新的性状等。由于原生质体的形成、再生及融合已有许多报道及综述^[10,11],本文主要介绍原生质体融合后融合子的选择方法及融合技术的应用。

1 融合子的选择方法

选择融合子的方法很多,要根据实验目的和实验材料的特殊性加以设计。下面介绍几种常用方法:

1.1 利用营养缺陷型选择融合子

这是一种传统有效而直接的方法,即融合的双亲为营养缺陷型且为不同的缺陷型(单缺或双缺)。双亲缺陷的原生质体融合处理后于基本培养基上选择融合子。原理是:缺陷的单亲的原生质体由于遗传缺陷,丧失了合成某种物质的能力在基本培养基上不能萌发生长,单亲融合的原生质体也不能长出菌落,只有双亲原生质体融合后,缺陷的遗传物质得到互补才能恢复为野生型,在基本培养上才能萌发生长而成为菌落。如米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 3042_{N-2} (Asp⁻ Met⁺) × 3042_{N-19} (Asp⁺ Met⁻) 及啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AH₄ (Asp⁻ Ile⁻) × ZF₁₈ (His⁻ Lys⁻) 融合处理后可在基本培养基上选择融合子。也可以是融合亲本一方为缺陷型而另一方具有抗药性或其它性状。如:构巢曲霉 (*A. nidulans*) (缺陷型,吡啶黄抗性) × 皱褶曲霉 (*A. rugulosus*) (原养型,吡啶黄敏感),融合后在含有一定浓度吡啶黄的基本培养基上选择融合子。总之只要按只让融合子生长而不让亲本生长的原则设计选择方案就行。此法的优点是准确可靠。在排除污染的情况下,在基本培养基上长出的菌落即可初步判为融合子。缺点是会使部分融合子发生遗漏。即实际得到的融合子比实际上发生融合的融合子数量少。原因是虽然有些融合子双亲的遗传物质得到了重组,但由于融合原生质体处于强选择压力下会有部分融合原生质体不能萌发。为了避免遗漏,可先将融合原生质体在完全培养基上诱导一段时间,洗去完全培养基后再转入基本培养基上选择。也有人认为这种方法费时费力,营养缺陷型会使亲本的优良性状丧失或降低。但作者认为:应该把营养缺陷型的获得看作是育种等研究工作的一部分,且只要诱变和选择方法适当,在短期内获得营养缺陷型是不困难的。另外在得到的营养缺陷型中有少数发生正突变,即比出发菌株性状更优良,若能选择出来,即获得了遗传标记又得到了正突变体,这不是两全其美吗。如米曲霉 3042_{N-2} (Asp⁻) 其纤维素酶活比野生型菌株

3042 提高 1.36 倍。

1.2 利用抗药性选择融合子

微生物的抗药性是其菌种的特性,是由遗传物质决定的。不同种的微生物对某一种药物的抗性存在差异,利用这种差异或与菌种其它特性结合起来即可对融合子进行选择。这种方法首先由 Bradshaw 和 Peberdy^[12] 于 1984 年使用。他们以 *Apergillus nidulans* (营养缺陷型,吡啶黄抗性)和 *A. rugulosus* (原养型,吡啶黄敏感)为亲本,融合处理后在含有 25 μ g/ml 或 50 μ g/ml 吡啶黄的基本培养基上选择异核体(融合子)。国内徐京宁^[13]等应用此方法进行了林可霉素产生菌的定向改造筛选工作。他们将金色链霉菌(*Streptomyces aureofaciens*) (Lm^r, Ctc^r, 产金霉素)的原生质体用紫外线照射 40min 灭活后与林可链霉菌林可变种(*S. lincolnensis* var. *lincolinensis*) (Lm^r, Cts^r, 产林可霉素)原生质体混合并融合处理后在含有 50 μ g/ml 金霉素的再生平板上选择融合子。这种方法也可用于双亲抗药性差异选择融合子。如诺卡氏菌(*Nocardia* sp. 48) (Str^r, Rif^r) \times *N.* sp. 189 (Str^r, Rif^r) 融合处理后在含有四环素和利福霉素的培养基上选择融合子^[14]。应用此方法应注意的是药物的浓度要掌握好。浓度过高会使融合频率降低,浓度过低则会使亲本生长,影响融合子的检出。

1.3 应用灭活原生质体选择融合子

原生质体经紫外线照射、加热或经某些化学药剂的处理,可使其丧失在再生培养基上再生的能力,而只能作为遗传物质的供体。从而只根据另一亲株特性设计选择条件而选择融合子。如近裸香菇(*Lentinus subnudus* Berk)简称 S 株,其最适生长温度为 35 $^{\circ}$ C。另一亲本香菇(*L. edodes*)简称 E 株,最适生长温度 25 $^{\circ}$ C, 35 $^{\circ}$ C 不能生长。将 S 株原生质体悬浮于灭活剂中(0.83% 碘乙酰胺, 0.6mol/L MgSO₄)于 20 $^{\circ}$ C 处理 5min,失活后与 E 株原生质体融合,利用 E 株细胞的酶能救活 S 株细胞的致死损伤于 35 $^{\circ}$ C 选择融合子^[15]。又如用 0.1% 碘乙酸, 30 $^{\circ}$ C 处理产朊假丝酵母(*Candida utilis*)原

生质体 40min 后与啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的原生质体融合后利用形态差异选择融合子^[16]。灭活原生质体的机理认为是:紫外线使菌株的 DNA 发生突变;热的作用可使细胞内有功能蛋白、酶蛋白变性失活,化学药剂的作用可不可逆地抑制细胞代谢过程的关键酶使之失活。这种方法应用于丝状真菌有一定缺点。因为丝状真菌原生质体形成中由于菌丝酶解不彻底往往混有一些菌丝碎片。这些菌丝碎片比原生质体有更强的抗性,当原生质体被灭活时,它们仍不被灭活因而可与融合子一起出现在选择培养基上,从而影响融合子的选择。

1.4 利用荧光染色选择融合子

在酶解制备原生质体时向酶解液中加入荧光色素,使双亲原生质体分别带上不同的荧光色素。带上荧光色素的原生质体仍能发生融合并具有再生能力。原生质体融合处理后,在荧光显微镜下观察并通过显微操作,直接挑选出带有两种荧光的原生质体(已融合原生质体)。使用这种方法时,两种荧光染料的区分要明显,两种荧光染料的浓度、处理时间要掌握好。

1.5 用对碳源利用的不同作选择标记选择融合子

利用亲株对木糖的利用不同和对放线菌酮(Actidione, Ac)的抗性不同选择融合子。如酿酒酵母(*S. cerevisiae*) 89-1 为呼吸完整,不能利用木糖,对 Ac 敏感。薛瓦酵母(*S. chevalieri*) Hy₄, 呼吸完整,能利用木糖,抗 100 μ g/mL Ac。将 Hy₄ 用溴化乙啶(EB)诱变,挑选失去线粒体后的小菌落即呼吸缺陷型菌株 Hy₄-RD,因失去线粒体(呼吸缺陷)不能利用木糖,抗 20 μ g/mL Ac。将 89-1 与 Hy₄-RD 双亲的原生质体融合处理后,在含有木糖和 20 μ g/mL Ac 的选择培养基上选择融合子。因为双亲原生质体都不能生长,只有双亲遗传物质重组后(包括 Hy₄-RD 从 89-1 获得线粒体)才能在选择培养基上萌发生长,从而被选择出来。

以上是选择融合子的一些方法。在实际应用中往往是将上述一些方法结合起来使用。如

将营养缺陷型与抗药性, 抗药性与灭活等相结合选择融合子。融合子选出后, 还要通过一些方法对其进行鉴定。常用的方法有: 菌体或孢子形态、大小的比较, DNA 含量的测定比较, 同功酶电泳谱带的比较, 酶活性的测定, 产抗生素、氨基酸、毒素等成分的测定比较, 对营养物质的利用以及超微结构的比较等。另外还要对融合子含染色体的拷贝数及稳定性进行研究, 对融合子的性质进行研究即判断融合子为异核体、二倍体还是单倍体。

2 原生质体融合的应用

2.1 病毒传递

在真菌中, 有的种感染病毒, 有的种不感染病毒。以常规技术可亲亲和菌丝联合传递病毒成功的例子表明, 病毒在菌株间传递是胞质遗传现象。即通过细胞质的交换即可传递病毒。梁平彦^[17]等通过曲霉属种间原生质体融合后病毒传递及遗传重组的研究对这一问题作了极为重要的修正和补充。即: 仅仅胞质交换不能满足病毒在新寄主中复制所需的条件, 核的融合方能使病毒恢复正常。因为核因子(遗传物质)控制着病毒生存和复制, 若融合子得到了核因子, 后代病毒能存在并能增殖, 若无核融合, 只有胞质融合, 核因子未得到交换, 病毒不能存在和复制。他们用黑曲霉(*Aspergillus niger*) (Pro⁻) 孢子棕色, 感染病毒, 和米曲霉 (*A. oryzae*) (Leu⁻) 孢子黄绿色, 无病毒为亲本。两者原生质体融合后发现杂种后代都具有与亲本同样的病毒。大部分来自杂种的后代分离, 包括产生亲代型黑曲霉孢子或者其它颜色孢子或不产生孢子的原养型或营养缺陷型的分离, 都感染病毒。由感染病毒杂种发生分离而来的个别无病毒分离, 无例外均属亲代无病毒类型即米曲霉型。从而表明种间病毒传递并非单纯的胞质遗传, 而受核遗传物质的控制, 真菌病毒的复制对寄主核类型的依赖性更强。同时也说明通过原生质体融合技术确能使双亲遗传物质得到交换与重组。

2.2 核的转移

Ferenczy^[18] 基于原生质体融合技术建立

了一种核与原生质体融合方法, 实现了核的转移。他们首先酶解获得啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) 稳定营养缺陷型菌株的原生质体, 然后使其在低渗溶液中破裂将细胞核释放出来。通过蔗糖密度梯度离心收集细胞核。然后将核与营养缺陷互补的受体菌原生质体混合, 在 PEG 和 Ca²⁺ 存在下进行融合处理。然后在基本培养基上选择融合子, 从而实现了核的转移, 频率为 10⁻⁷—10⁻⁸。这一转移机制可解释为: 在 PEG 和 Ca²⁺ 存在条件下, 受体菌原生质体在聚集融合过程中, 随着细胞膜的融合, 捕获了供体菌的细胞核并将其摄入原生质体中。应用这一技术可研究核与核以及核与质之间的相互关系, 并为育种工作提供了新的模式。

2.3 质粒转移

微生物可通过转化、转导、接合和转染等多种方式传递遗传信息。但有些微生物不具备这些条件。因而对这些微生物来讲其遗传物质的传递研究和育种工作皆受到一定的限制。由于原生质体融合可在种内、种间甚至属间进行, 因而通过原生质体融合有可能将质粒转移到非感受态菌株之中, 为基因转移和育种提供了新的途径。BIBB^[19] 等于 1978 年报道了质粒 DNA 在链霉菌属间的高频转移。江行娟^[20]等对枯草杆菌中通过细胞融合的质粒转移进行了研究。他们以 *B. subtilis* BD₃₃₆ (p^{UB110}) (Try⁻, Thr⁻, Km^r, Nm^r) (两种抗药性来自质粒) 简称 BD₃₃₆ 和 *B. subtilis* G1 (Sm^r) (抗性来源于染色体基因突变) 简称 G1 为融合亲本进行融合。融合后在含有三种抗菌素 (Km, Nm, Sm) 的高渗培养基上选择融合子。在排除了转化和接合的可能性以后, 肯定了质粒的转移。对挑出的 40 株融合子进行了分析。33 株表现为双亲共有的抗药性及 G1 的营养需要, 3 株表现出 G1 的抗药性和营养要求, 4 株表现出 BD₃₃₆ 的抗药性和营养要求。其中 33 株在 37℃ 传 3—4 代和 50℃ 传 4 代后抗药性和营养需要仍保持不变, 排除了异核体的可能。为进一步证实, 从 33 株中取 4 株进行质粒消除, 发现消除质粒后菌落相同于 G1 的形态, 从而说明这种类型的融

合子是 G1 获得 BD₃₃₆ 的质粒 (p^{UC119}) 后丢失了其染色体而形成的。但也不能排除这种可能: 细胞融合后产生稳定的异核体, BD₃₃₆ 的染色体连续几代未表达。

2.4 耐热性研究及菌种筛选

许多种微生物能在 45—65℃ 生存, 有的甚至更高。有种耐热菌可在 98℃ 温泉中生长繁殖。关于微生物耐热性的机理研究得还不是很清楚, 但其耐热性却有很重要的应用价值。在酒精酿造中, 酿酒酵母于 40℃ 时产酒明显下降。为此必须消耗大量能源降低发酵液的温度。方霭祺^[21]等报道了以酿酒酵母 396 (能利用甘蔗糖蜜生产酒精) 和假丝酵母 C6 (45℃ 生长良好) 为亲本, 通过原生质体融合技术, 得到了一株在 40℃ 培养条件下原料利用率为 94.3%, 乙醇产量为 59.7g/L 的属间融合株。王萍^[22]等以多粘芽胞杆菌 (β 淀粉酶高产菌株) 和芽胞杆菌菌株 (产耐热性 β 淀粉酶, 活性低) 进行融合研究, 得到了产酶能力介于两亲株之间, 酶的热稳定性较高的融合株。通过原生质体融合技术还可对耐热机理进行研究。如有一株耐高温酵母一旦经 EB 诱变失去线粒体变为小菌落后, 即失去耐高温特性 (40℃ 生长并产生酒), 说明耐热性与线粒体有关系。因而应用原生质体技术对耐热性的转移和对耐热机理进行研究将是一条途径。

2.5 改良菌种

通过原生质体融合技术使两个菌株的遗传物质得到重组, 从而获得兼具两个亲本优良性状的新菌株。如苏云金杆菌以色列变种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) 产生的杀虫毒素主要杀死双翅目昆虫, 而苏云金杆菌库斯塔基变种 (*Bacillus thuringiensis* *kurstaki* HD-1) 产生的毒素蛋白主要杀鳞翅目昆虫。王宪^[23]等应用原生质体融合技术, 得到了即杀鳞翅目昆虫, 又杀双翅目害虫的重组菌株。又如枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) TG26 产生抗菌蛋白, 能抑制同种或不同种属微生物的生长。*B. thuringiensis* subsp. *pacificus* AS1.904 产生伴胞晶体蛋白, 能杀植物害虫。刘伊强^[24]等通

过原生质体融合获得了能表达亲株抗菌蛋白和毒素蛋白的融合株。

啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) 应用于啤酒酿造。在发酵后期, 那些能凝集并形成絮状的酵母称凝集性酵母, 而那些沉淀不好的酵母称为粉状酵母。具有良好凝集性的酵母可使啤酒发酵液澄清速度加快, 降低酵母分离时的能量消耗, 并且还可防止酵母在发酵液中长时间悬浮导致细胞自溶而影响啤酒的风味。啤酒酵母的凝集特性由其本身的遗传特性决定。一般凝集性较好的啤酒酵母往往发酵度偏低。陈海昌^[25]等应用原生质体融合技术选育出的融合子 F⁺P-19, 既具有较高的发酵度又具有较强的凝集性。江慧修^[26]等也报道了凝集性酵母融合株 MWF-29 的啤酒酿造试验研究, 经 7 代 60—120t 生产规模发酵试验, 表明融合株具备了双亲的优点, 发酵力强, 酿酒风味好。

2.6 应用于抗生素的研究

利用原生质体融合技术不但可用于提高抗生素的产量, 同时还可用于融合子产生新的抗生素的研究。贺敏霞^[27]等通过诺卡氏菌原生质体融合重组研究发现有四株融合子产生亲本没有的甾体转化中间体, 三株融合子产生亲本没有的抗生物质, 还得到一株甾体转化活力明显高于亲本的融合子。林荣团^[28]等的工作更容易说明这个问题。他们以天然无抗菌活性的变青链霉菌 1326 与链霉菌 1254 营养缺陷型突变株进行种间原生质体融合。从 755 株融合体中筛选到 5 株抗菌活性较稳定的菌株。对这一现象, Hopwood^[29]解释为: 在链霉菌中可能存在着大量的没有表现遗传功能的沉默基因 (Silent gene), 若能使这些基因得到表达, 这类微生物就有可能合成更多的次级代谢产物。近年来的研究表明: 突变、外源 DNA 片断的插入以及种内或种间的杂交都可能使某些链霉菌产生原来没有的新物质。

2.7 应用于酶的研究

应用原生质体融合技术对酶的研究是相当广泛的。研究最多的是淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶, 主要用于提高菌种的产酶活力, 改变菌种

酶分泌的种类或使产酶菌种获得新的优良性状等。日本 Waseda^[29] 大学应用此技术以柠檬酸生产菌株黑曲霉 (*A. niger*) 和纤维素酶产生菌绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 为亲本, 融合后筛选到一类融合子能在甘蔗渣固体培养基上生长产生柠檬酸。融合子(异核体)兼具了绿色木霉产纤维素酶的能力和黑曲霉产柠檬酸的能力。古屋武^[30]和牛岛重臣^[31]应用原生质体融合技术得到了生长速度快, 蛋白酶活性高的新菌种。S. ushijima^[32]进行了米曲霉 (α - 沉淀酶产生菌) 和酱油曲霉(蛋白酶高产菌种)种间融合育种研究。我们以米曲霉 3042_{N-2} (纤维素酶高产菌株)和 3042_{N-19} (蛋白酶高产菌株)为亲本进行融合育种研究, 得到了兼具两种酶活的新菌株^[33]。

原生质体融合技术由于不受亲缘关系的影响, 遗传信息传递量大, 不需了解双亲详细的遗传背景等优点, 因而便于操作。这一技术为遗传操纵、分子生物学和基础理论研究提供了一种重要工具, 也为遗传育种提供了一种有效手段。随着科学的发展, 这项技术将会不断发展, 显示出越来越重要的作用。

致谢: 本文得到本室代忠新老老师的大力帮助, 特此致谢!

注: 文中缩写说明:

Asp ⁻ 天冬酰胺	Pro ⁻ 脯氨酸	Lm ^r 林可霉素
Met ⁻ 蛋氨酸	Leu ⁻ 亮氨酸	Ctc ^r 金霉素
Ile ⁻ 异亮氨酸	Try ⁻ 色氨酸	Str ^r 或 Sm ^r 四环素
His ⁻ 组氨酸	Thr ⁻ 苏氨酸	Rif ^r 利福霉素
Lys ⁻ 赖氨酸	Km ^r 卡那霉素	Nm ^r 新霉素
"-" 号表示缺陷	"r" 表示抗注	"S" 表示敏感

参 考 文 献

- [1] Barski G, C R Hebd. Seances Acad sci, 1960, 251: 1825—1827.
- [2] Okada Y. Exp cell, 1962, 26:98—107.
- [3] Okada Y. Exp cell, 1965, 40:154—158.
- [4] L Ferenczy. Nature (lond), 1974, 248: 793.
- [5] 郑幼熊. 应用微生物, 1983, 4: 1—5.
- [6] M Pesti, E Konszky, J Polga, et al. Fifth international protoplast symposium, 1979, 54.
- [7] Zimmermann V. Bioelectrochem Bioenerg, 1980, 7: 555—574.
- [8] 张闻迪, 赵白, 王秋等. 生物工程学报, 1988, 4(4): 298—303.
- [9] R H Baltz, J Gen Microbiol, 1978, 107:93—102.
- [10] 邢来君, 张军, 孙光等. 真菌学报, 1987, 6(4): 242—247.
- [11] 张爱文. 微生物学通报, 1990, 17(5): 298—300.
- [12] R E Bradshaw, J F Peberdy. J Microbiol Methods, 1984 3:27—32.
- [13] 徐京宁, 米贵东, 唐孝宜. 生物工程学报, 1992, 8(3): 237—242.
- [14] 贺敏霞, 史济平, 褚志文. 生物工程学报, 1989, 5(4): 303—308.
- [15] 彭卫宪. 真菌学报, 1987, 6(3): 184—192.
- [16] 袁志明. 微生物学通报, 1991, 18(5): 271—275.
- [17] 梁平彦, 陈开英. 遗传学报, 1987, 14(2): 127—134.
- [18] L Ferenczy. current microbiol, 1982, 7:157—160.
- [19] M J BiBB, J M Ward, D A Hopwood. Nature, 1978, 274: 398—400.
- [20] 江行娟, 杨庆云, 任大明, 等. 遗传学报, 1981, 8(1): 1—7.
- [21] 方儒棋. 生物工程学报, 1990, 6(3): 224—229.
- [22] 王萍, 檀耀辉. 生物工程学报, 1988, 4(3): 180—185.
- [23] 王宪, 范云六. 生物工程学报, 1987, 3(1): 29—37.
- [24] 刘伊强, 王雅平, 潘乃, 等. 遗传学报, 1993, 20(6): 524—530.
- [25] 陈海昌, 唐屹, 张岭花, 等. 微生物学通报, 1994, 21(4): 213—217.
- [26] 江慧修, 张金岭, 戈琳等. 微生物学通报, 1992, 19(1): 21—23.
- [27] 林荣团, 杨毓芬, 李焕葵. 生物工程学报, 1990, 6(2): 134—139.
- [28] D A Hopwood, K F Chater. Philos Trans R soc, London, 1980. B290:313—328.
- [29] K Kirimura, Y Itohiya, Y Matsuo, et al. Agric Biol Chem, 1990, 54 (5):1281—1283.
- [30] 古屋武, 石毛雅夫, 内田一生, 等. 日本农芸化学会志, 1983, 57(1): 1—3.
- [31] 牛岛重臣. 日本酿造协会杂志, 1984, 79(10): 721—723.
- [32] S USHIJIMA, T NAKADA, K UCHIDA. Agric Biol Chem, 1987, 51 (10):2781—2786.
- [33] 辛明秀, 蒋亚平. 微生物学通报, 1994, 21(3): 143—148.