

# 荧光标记金针菇原生质体融合

成亚利 朱宝成 李亮亮 燕克勤 李庆余

(河北大学生物系 保定 071002)

**摘要** 以金针菇(*Flammulina velutipes*)为材料,经异硫氰酸荧光素(FITC)标记的金针菇单核 W<sub>19</sub> 菌株的原生质体与未经标记的单核 Y<sub>7</sub> 菌株的原生质体在聚乙二醇(PEG)的诱导下进行融合,利用显微操纵仪直接挑取一个带有荧光而另一个不具荧光的原生质体对,培养后,根据融合形成的双核菌丝具有“锁状连合”这一形态学特征选择、鉴定融合菌株,酯酶同工酶电泳分析结果表明,融合菌株具双亲互补酶带。经测定,多数融合菌株菌丝生长速度和生物量较亲株高,且出菇正常。

**关键词** 金针菇,原生质体,荧光标记,融合,同工酶

原生质体融合由于亲本需要遗传标记而限制了其应用范围,通常所用的营养缺陷型或抗药性标记方法,不仅繁琐,工作量大,而且遗传标记过程会引起亲本一些生产性状的改变,由此得到的具遗传标记的亲株很难保持原有的优良生产性状。朱宝成等进行了紫孢侧耳与糙皮侧耳间的灭活原生质体融合<sup>[1]</sup>,燕克勤等利用电击法实现了紫孢侧耳的原生质体转化<sup>[2]</sup>,在一定程度上减少了依赖遗传标记而带来的不利影响,但仍不能完全解决上述问题。本实验采用荧光标记原生质体融合技术对金针菇原生质体进行了融合研究,得到了融合菌株。此方法简便、直接,无需亲株带有选择性遗传标记,即能得到融合体,具有较大的优越性。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

金针菇(*Flammulina velutipes*)金杂 19 菌株,生长速度快,子实体黄色,其单核菌丝编号为 Y<sub>7</sub>;088 菌株,子实体白色,但生长速度慢,其单核菌丝编号为 W<sub>19</sub>。

### 1.2 培养基及试剂

**1.2.1 菌丝生长培养基(%)**:马铃薯浸汁 20,葡萄糖 2,酵母浸膏 0.1,蛋白胨 0.4。固体培养基中加入 2% 琼脂。

**1.2.2 再生培养基(%)**:马铃薯浸汁 20,葡萄糖 2,蛋白胨 0.4, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.01,蔗糖 20.5,琼脂 2, pH 6.0。

**1.2.3 原生质体洗涤液**:pH 5.8, 0.2mol/L 的磷酸缓冲液中加 0.4mol/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O。

**1.2.4 酶**:溶壁酶:广东微生物研究所制。蜗牛酶:中科院生物物理研究所制。使用浓度是 1.0% 溶壁酶加 0.5% 蜗牛酶,原生质体洗涤液配制, G<sub>6</sub> 漏斗抽滤除菌。

**1.2.5 融合剂**:聚乙二醇(PEG, M. W. 6000) 40%, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.01mol/L, pH 9.0。

**1.2.6 荧光染液**:0.5% 异硫氰酸荧光素(FITC) 95% 乙醇配制。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 菌丝体的培养**:将 Y<sub>7</sub> 和 W<sub>19</sub> 菌株分别接于液体培养基中,静置培养,每天摇动 2 次,培养 5d 后用于原生质体的制备。

**1.3.2 原生质体的制备**:将培养好的菌丝体滤出,用无菌水和原生质体洗涤液各洗一次,用无菌滤纸吸去水分,置于小三角瓶中加适量酶液,酶解 90min。用塞有脱脂棉的小玻璃漏斗过滤,离心(2000r/min, 12min),弃去上清液,沉淀用

原生质体洗涤液离心洗涤。

**1.3.3 原生质体荧光标记:**将制备好的  $W_{19}$  菌株原生质体悬液加入 FITC 荧光染液,作用浓度为  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ,避光静置 20min,然后离心 ( $2000\text{r}/\text{min}$ ; 12min) 洗涤,弃上清液,沉淀用原生质体洗涤液稀释至一定浓度。或在酶液中加入 FITC,其作用浓度为  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

**1.3.4 原生质体融合:**将标记好的  $W_{19}$  菌株原生质体与未经标记的  $Y_7$  菌株原生质体等浓度混合,加入融合剂,  $25^\circ\text{C}$  下保温 15min,加入适量的原生质体洗涤液稀释,离心 ( $1000\text{r}/\text{min}$ , 5min),再用原生质体洗涤液悬浮。

**1.3.5 融合细胞的挑取和培养:**诱导融合后的原生质体在倒置显微镜下用显微操纵仪挑取一个带有荧光,另一个不带荧光的原生质体对,转于再生培养基中,  $25^\circ\text{C}$  培养。长出菌丝后,转接到固体生长培养基,待长出菌落后,镜检,根据菌丝是否具有“锁状连合”筛选,鉴定融合菌株。

**1.3.6 融合菌株酯酶同工酶凝胶电泳:**采用 BIO-RAD 垂直板电泳系统,样品分离胶浓度为 8.2%, pH 8.9; 浓缩胶浓度为 4.0%, pH 6.7, 点样量  $100\mu\text{l}$ 。电泳结束后,染色,固定,干燥。

**1.3.7 融合菌株生物量的测定:**将等量的亲株和融合菌株菌丝分别接种到液体生长培养基中,  $25^\circ\text{C}$  培养 7d 后,纱布过滤,称重。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光标记原生质体融合

异硫氰酸荧光素 (FITC) 作为荧光染料,可与细胞膜,细胞质结合,但对细胞无毒性,不影响细胞的正常分裂。FITC 可用于多种细胞的荧光标记,标记后的活细胞在紫外光源下激发产生肉眼可见的绿色荧光,以此来区分标记与未标记的细胞。实验表明, FITC 作用浓度为  $10\sim 70\mu\text{g}/\text{ml}$  时,可产生较好的荧光效果。

将经荧光标记的  $W_{19}$  原生质体和未经荧光标记的  $Y_7$  原生质体在 PEG 作用下进行融合,倒置显微镜下观察,在普通光源下找到粘在一起的一对原生质体,再换用紫外光源观察,如果其中一方带有荧光,则其可能为一对双亲株

原生质体,用显微操纵仪吸出,接于再生液体培养基,长出菌丝后转于固体生长培养基,插片镜检,挑选具锁状连合的菌株。异宗配合的担子菌,双核菌丝具明显的锁状连合而单核菌丝没有,因此根据锁状连合初步筛选融合菌株是比较可靠的。

### 2.2 融合菌株酯酶同工酶分析

同工酶的变化已用作遗传变异、鉴定微生物品种属性,研究分类,进化的重要指标。实验中,我们采用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳,对融合菌株及其亲株的酯酶同工酶进行了分析,结果见图 1。融合菌株与双亲株酶带有明显不同。双亲株分别具有 c、d 酶带中的一条而融合菌株同时具有 c、d 两条酶带,证明由锁状连合筛选出的融合菌株确实是双亲株遗传物质融合互补的产物。

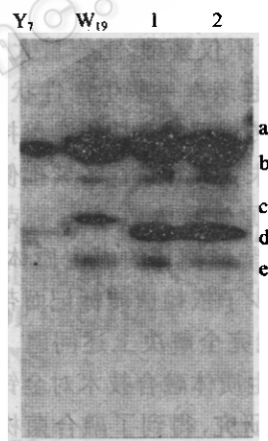


图1 融合菌株及亲株的酯酶同工酶 (EST) 谱  
1~2. 融合菌株

### 2.3 融合菌株生物量的测定

为了观察融合菌株的生长情况,进行了生物量的测定,结果见表 1。从表中可以看出,在相同接种量和相同培养条件下,所有融合菌株的生物量较亲株都有不同程度的提高,如 6 号菌株,增长率为 165%,转接 3 代后,增长率为 136.7%,较亲株表现出强的生长优势。

### 2.4 融合菌株的出菇试验

与亲株相比,融合菌株菌丝生长速度快,菌丝体致密、洁白,现蕾期提前 5~7d。菇形与亲

表1 融合菌株及亲株菌丝生物量

菌株	Y <sub>7</sub>	W <sub>19</sub>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
生物量*(g)	0.20	0.18	0.22	0.21	0.40	0.38	0.28	0.53	0.25	0.39	0.41	0.31
增长率(%)	—	—	10	5	100	90	40	165	25	95	105	55
生物量**(g)	2.10	1.62	2.30	2.52	3.46	2.96	3.31	4.97	2.60	3.41	3.42	3.51
增长率(%)	—	—	9.52	20	64.7	40.9	57.6	136.7	23.8	62.4	62.9	67.1

\* 菌丝体在液体培养基中培养7d后称重

\*\* 菌株转接3代后菌丝体在液体培养基中培养12d后称重

株相似,菌柄细长,菌盖整齐,开伞小。子实体颜色较金杂19菌株浅,介于两亲株之间,呈乳白色。头潮菇产量最好为63.7%,比金杂19菌株提高4.9%。同时融合菌株的遗传性状转接三代后仍比较稳定。

实验中证明有生理活性的原生质体均能与FITC作用产生荧光,而且FITC对原生质体的产量及再生率的影响甚微,经实验证明, W<sub>19</sub>菌株原生质体再生率  $2.4 \times 10^{-3}$ ,若在酶解过程中加入 FITC,原生质体再生率为  $1.9 \times 10^{-3}$ ,可见FITC对细胞的正常生理活动影响很小。

用 FITC 标记一方亲株原生质体,在荧光显微镜下挑取融合细胞 3000 多对,得到 13 个再生菌株,镜检后有 10 株具锁状连合,酯酶同工酶电泳证明了是双亲株融合的产物,融合率(融合菌株数/再生菌落数)为 76.9%,与其他融合

方法相比,效率高而且方法简便。

实验中发现,挑取的原生质体对如何进行再生培养是较关键的一步。

经 FITC 染色后的原生质体避光放置,其荧光可维持 15~20h,但实验中发现,经 PEG 处理后荧光有明显减弱。

荧光标记法在一定程度上解决了亲株需带有选择性遗传标记的困难,而且对亲株的遗传性状没有影响,在显微镜下直接挑选融合细胞,更显示了这一方法的优越性。

## 参 考 文 献

- [1] 《生物工程学报》编辑部编. 生物工程论文集,北京:化学工业出版社,1994,95~99.
- [2] 燕克勤,朱宝成,赵会良等. 生物工程学报,1996,12(1):40~44.

## STUDIES ON FUSION OF FLUORESC EIN-LABELED PROTOPLASTS FROM *FLAMMULINA VELUTIPES*

Cheng Yali Zhu Baocheng Li Liangliang Yan Keqin Li Qingyu

(Department of Biology, Hebei University, Baoding 071002)

**Abstract** This paper studied the fusion of fluorescein-labeled protoplasts of two kinds of *Flammulina velutipes*. The Fluorescein iso-thiocyanate (FITC)-labeled protoplasts of strain W<sub>19</sub> and the non-labeled protoplasts of strain Y<sub>7</sub> could be induced to fuse in the presence of polyethylene glycol (PEG). A pair of stucked protoplasts which only one labeled could be selected directly using micromanipulator. We screened the fusant from the regenerated colonies by the clamp connection of dikaryophyte. Analysing the esterase isozyme, we found the isozyme bands of the fusants were complementary with those of their parents. The growth rate of the mycelia and the biomass of many fusants were superior to those of their parents.

**Key words** *Flammulina velutipes*, Protoplast, Fluorescein-labeled, Fusion, Isozyme