

真菌原生质体融合技术的新进展

张爱文 吴正铠 刘维真

(中国农业科学院生物防治研究所,北京)

原生质体融合具有许多常规杂交方法所无法比拟的独到之处,生物学研究手段的不断革新,使原生质体融合技术正在逐步完善。近几年来,在原生质体融合的基础研究及应用研究领域中,都有相当大的进展。

真菌原生质体融合的第一篇报道,是以白地霉(*Geotrichum candidum* Link)营养缺陷型突变株为材料,采用离心方法进行原生质体融合^[1]。随后,人们又利用一些化学试剂如: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 KCl 、 NaCl 作为融合诱导剂,促进原生质体融合^[2,3],但融合率都没超过 10^{-3} 水平。自从发现 PEG 的助融合性以来,原生质体融合技术便跃入了新阶段,从而使融合率提高 1000 倍以上。1980 年, Zimmermann 等人报道了电场诱导细胞融合的新技术^[4]。以后的几年里,人们把这项新的融合手段从动、植物扩展到微生物的原生质体融合中^[5,6]。导致了原生质体融合技术的新突破。

原生质体融合后,重组子的选择方法,是使原生质体融合技术得以应用的关键。近年来,选择方法已不仅仅囿于传统的营养缺陷型互补选择,新的选择方法如抗药性标记^[7]、致死供体^[8]、荧光染色^[9,10]、毒力测定^[11]、DNA 含量测定^[12]等不断出现,并逐渐为人们所重视。

(一) 原生质体融合

Ferenczy 等人首先发表了通过离心进行真菌原生质体再生、融合的报道^[1]。经过离心将两种原生质体紧密地贴合到一起以获得融合子。这种融合方法比较原始,而且融合率极低。

化学因子诱导的原生质体融合,最成功并且至今为人们所经常使用的是以 PEG 作为融合剂。对于所有种类的真菌而言,PEG 诱导的融合条件基本一致: PEG 分子量为 4000—6000,浓度 25—40%,pH 7—9,在 Ca^{2+} 存在的情况下(10—100mmol)融合率可以进一步提高。考虑到 PEG 诱导融合后产生的两菌株营养缺陷型互补,应注意以下几方面工作: 1. 原生质体尽可能幼嫩,这样用于原生质体融合的时间会缩短,从而提高融合率。2. 原生质体要尽可能的纯,因菌丝残体、各种粒子、大分子或小分子物质与 PEG 的反应会大大降低融合效果。3. 高渗稳定剂的最适浓度。4. 用于融合的两菌株原生质体的浓度一般为 10^7 ,每毫升 PEG 溶液中两个变异株的原生质体总量比为 1:1。

电融合技术是 80 年代兴起的一项有效促成原生质体融合的新手段。概括地说,融合过程首先是原生

质体在电场中极化成偶极子,并沿电力线排列成串,然后,在加直流脉冲后,原生质体膜被击穿,从而导致融合的发生。提高融合率主要应强调: 1. 选择最佳交变电场的频率和幅度及击穿电脉冲的时程和幅度。2. 选择适当的融合液配方,加入一定量的水解酶,降低溶液的电导率。3. 选择适当的原生质体悬浮密度。电融合的独特之处在于,融合过程可以在显微镜的监视下进行,并可以镜下挑出已融合的原生质体;电融合为一个空间定向、时间同步的可控过程;它不会象化学诱导剂那样产生任何毒害细胞的作用。

(二) 原生质体融合产物的选择

真菌原生质体融合的第一步是细胞壁或细胞质融合形成异核体,然后核融合形成杂合二倍体,然而,真正稳定的杂合二倍体是极少数的,大多数异核体会产生亲型的分离子。因而,原生质体融合发生后,关键的问题是如何选出具有新的优良性状的融合子——稳定的重组体。

1. 利用营养缺陷型作为遗传标记物进行融合子的选择。营养缺陷型标记选择是常规而准确的选择手段。它的理论依据是: 将亲本菌株诱变处理后产生对某些营养物质合成途径受阻的突变型。这种营养缺陷型在基本培养基上不能生长,只有营养缺陷型得到互补后才可恢复正常生长。营养缺陷型选择又分为两种: (1) 直接法: 把融合液涂到基本培养基或缺乏双亲生长所必需营养的再生培养基上,直接从中选出融合子。(2) 间接法: 让亲型和融合子都再生,待长出菌丝或者孢子后,再把它们复制到各种选择性培养基上,检出重组子。相比之下,直接法工作量小,但可能遗漏较多的融合株,而间接法比较复杂,但可以减少遗漏。

利用营养缺陷型选择需要注意的是菌株的“遗漏”,在融合处理这种极端的情况下,由于生理压力的影响,有些菌株在营养缺陷型状态下不适于融合试验。克服的办法是: (1) 为再生培养基选择合适的渗透稳定剂。(2) 将融合剂处理过的原生质体涂到铺有玻璃纸的高渗培养基上(一种再生培养基),再生的第一个阶段出现后将玻璃纸移到非高渗的再生培养基中。

应用原生质体技术改良一些具有重要商品性状的真菌菌种,利用营养缺陷型标记,往往会造成一些优良性状的丢失,和所需代谢物产量的下降,诱变处理也会造成一些有害突变的出现。从方法本身讲,营养缺陷型的获得繁琐费时,而且营养缺陷型突变体的产生随

时间的延长而下降。实践中人们采用了一些其它的方法代替和补偿利用营养缺陷型选择存在的不足。

2. 利用抗药性进行融合子的选择: 由于营养缺陷型存在着上述不足, 人们找到了新的方法加以弥补。Bradshaw 等人利用原生质体融合技术对构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 和皱孢曲霉 (*A. rugulosus*) 进行种间杂交异核体选择中, 采用了抗真菌抑制剂进行融合子的筛选。在此过程中, 亲本之一采用野生型菌株, 它对某种真菌抑制剂敏感, 另一亲本则为对这种真菌抑制剂抗性的营养缺陷型菌株^[13]。原生质体融合处理后, 将融合液铺到具有真菌抑制剂的基本培养基上选择融合子, 其简单示意如下:

野生型对某抑制剂敏感 × 营养缺陷型对某抑制剂抗性
(甲亲本) (乙亲本)

恢复营养获得抗性的融合子生长(MM + 抑制剂)
尽管在此仍部分地利用营养缺陷型, 但是亲本之一使用了野生型分离物, 这可以使大量的野生型分离物得以利用, 同时减少了营养缺陷型的使用。利用抗药性标记的方法选择应强调两个关键: ①选择培养基中的抑制剂浓度适当。②带有某种抗性标记的基因必须为“显性”或“半显性”, 以免抗性得不到表达。

3. 利用灭活的原生质体(致死供体)进行融合子的选择: 这种方法与上述方法不同, 利用灭活原生质体融合不需要经过营养缺陷型进行人工标记。尽管这项技术目前在真菌原生质体融合中应用极少, 但已广泛为人们所重视。彭卫宪等已成功地把灭活原生质体融合技术应用到香菇育种工作中^[14]。他们采用巯基酶的专一性抑制剂碘乙酰胺, 使 S 菌株细胞代谢过程中的关键酶失活, 细胞失去生长能力, E 菌株具有巯基酶活性, 但 35℃ 下不能生长。E 菌株细胞的酶能救活 S 菌株的致死损伤, 在 S 菌株生长而 E 菌株不能生长的条件下选择融合子。这种方法只能选择融合复活后的融合子而不能淘汰非融合子。因此, 这种选择方法要结合快速的早期鉴定方法才能更好地发挥作用。

灭活有多种途径, 常用的有热灭活, 大剂量紫外线灭活, 生化制剂灭活等。在真菌中利用热处理灭活一直很难成功, 其主要原因是真菌的原生质体制备中存在着热处理难以致死的菌丝体残片。

4. 以荧光染色法选择融合子: 近几年, 又一项非人工标记原生质体融合子选择法——荧光染色选择已经出现^[15]。日本人、法国人先后在酵母菌(*Yeast*)、担子菌(*Basidiomycete*) 原生质体融合中对融合子的检出采用了荧光染色法, 这种方法首先在双亲原生质体制备过程中, 向酶解液中加入荧光色素使其形成带有荧光色素的原生质体。离心清洗掉多余的染料, 然后进行融合处理。融合的原生质体悬浮液置于带有显微操作器和落射荧光装置的立体型显微镜下, 挑选出融合

的原生质体。融合子的确定主要依据: 通过特定波长的激发光, 以分光镜及滤波器观察, 观察时有三种情况出现: (1) 个体上同时观察到双亲染色的两种荧光色素, 即可判断为融合子。(2) 个体上只表现双亲中一种染色的荧光色素, 即可以认为是没有融合的原生质体。(3) 个体上不发出荧光色素, 这可能是失活原生质体所致。

利用荧光染色技术进行融合子检测方法应注意强调: (1) 选择对原生质体形成、再生无影响的荧光色素, 同时用于双亲染色的荧光物质颜色分辨上有明显的差别。(2) 各种荧光色素在使用前要确定合适的有效浓度范围。(3) 色素的有效处理时间不能超过 24 小时。

5. 融合子的其它选择方法: 除上面四种方法可以准确地选出融合子外, 实践中还有一些辅助性方法用于融合子的检测。虽然依靠它们单独定论是否为融合子证据不够充分, 但它们各自都从不同侧面反映了融合的发生, 因而常被用作非人工标记鉴别融合子的辅助性方法。

(1) 对昆虫的毒力测定进行融合子的选择:

至今还未见利用毒力变化进行原生质体融合子检测的报道, 但是在金龟子绿僵菌 (*Metarrhizium anisopliae*) 等虫生真菌中有人在常规育种时, 利用杂交双亲的毒力与后代毒力的不同进行后代的选择。由此推断, 它可以作为一项原生质体融合子的选择指标。

(2) 利用形态差异选择融合子: 通过形态差异进行融合子选择, 迄今仅见一篇报道^[16]。这项选择首先要求所采用的菌株具有可供肉眼直接观察的形态学差异。目前只有在青霉的育种过程中采用了这个方法。

(3) 利用一些生化指标选择融合子: 通常测定的生化项目(指检测融合子): 有 DNA 含量、氨基酸含量、酸性磷酸酶、同工酶和电泳等。DNA 含量的测定有两种方法: ①提取 DNA 后, 以紫外分光光度计测定其含量。②直接以显微分光光度计测定孢子或菌丝中核的 DNA 含量, 以往的试验结果多数得到这样的结论: 融合子的 DNA 含量高于任何一个亲本的 DNA 含量, 但却少于双亲 DNA 含量之和。一般情况下, 氨基酸多进行融合子与双亲含量百分比比较。对于曲霉 (*Aspergillus*) 和金龟子绿僵菌有的则以电泳测定亲本和融合子酸性磷酸酶同工酶和酯酶同工酶酶谱, 并得知: 融合子与亲本的酶谱存在着一定的差异 (Kevei, unpublished results)。

(4) 电镜观察检测原生质体融合: 对于这一手段, Ferenczy 和 Sovoboda 等人认为: 主要应利用超薄切片电镜下观察融合体超微结构的变化。

原生质体融合技术的实际应用, 其关键环节是准确地选出真正的重组子, 而这个选择往往是上述几种

方法相互配合使用,从各个侧面提供遗传物质融合的依据。

参 考 文 献

1. Ferenczy L et al.: *Nature Lond*, 248: 793, 1974.
2. Binding H Weberh H J: *Molec Gen Genet*, 135: 273, 1974.
3. Ferenczy L et al.: *Experientia*, 31: 50—52, 1975.
4. Zimmermann V et al.: *Bioelectrochem Bioenerg*, 7: 555—574, 1980.
5. Fikua M et al.: *FEMS Microbiol IETT*, 27(1): 123—127, 1985.
6. Haltmann H et al.: *Arch Microbiol*, 134(1): 1—5, 1989.
7. Suntory: *Oriental Yeast/J6* 0188-059:09.03.84-JP, 043827.
8. Bortori A et al.: *Appl Microbiol Biotechnol*, 24(2): 414—416, 1986.
9. Gillis-Van Maele A et al.: *France Bios*, 16(5): 14, 1986.
10. Takara-Shuzo/J6 009-281: 26.06.84-JP-130019(16.01.86) 26.06.84.as 130019.86-058345/09.
11. Biba G J L et al.: *J Invert Pathol*, 46: 20—25, 1985.
12. Klinner et al.: *J Basic Microbiol*, 25(4): 233—241, 1985.
13. Bradshaw R E Peberdy J F: *J Microbiol Methods*, 3: 27—32, 1984.
14. 彭卫宪等: *真菌学报*, 5(2): 117—123, 1987.
15. Lein J: *Over-production of Microbiol Metabolites Se-venoaks: Butterworhts* 1986.

金的微生物浸出和回收

黄 淑 惠

(中国科学院微生物研究所,北京)

金是最稳定的元素之一。它常和银,铜以及其他微量元素结合。在化合物中,常见一价和三价金。金的三价化合物较稳定。在碱性条件下,一价金离子可与含有氧和硫的配位基形成可溶于水的复合物,该复合物在岩石圈的表面层易流动。在一定的条件下,金的溶解、迁移和沉淀是由微生物的作用产生的。金在自然界的复杂循环过程中,微生物起着重要的作用。由于微生物和金有密切的关系,在黄金工业中,人们有可能多方面的利用微生物。例如:加拿大温哥华基因探针有限公司研制了探测金矿的微生物探测器^[1];加拿大、南非和美国已用微生物预处理难浸含砷金矿,提高了金的浸出率^[2]。本文仅就国外用微生物从矿石中直接浸出和从溶液中回收金的研究现状作一简要介绍。

(一) 用微生物浸出金

一个世纪以来,90%的提金厂都采用氰化物从脉金矿石中浸出金。由于氰化物剧毒,人们一直在寻找无毒的浸金剂,研究微生物浸金即是一条途径。此外,对于那些用常规氰化法不宜处理的表外矿、砂矿、贫矿和尾矿也开展了微生物堆浸金的研究。60年代初,法国人巴列斯(Pare's)用细菌浸出红土矿样中的金,1965年获得了专利^[3]。在 pH8 条件下,经 280 昼夜半工业性试验,提金率达 82%。Korobushkina 等^[4]用细菌浸出细粒浸染金的研究结果表明,巨大芽孢杆菌 20 (*Bacillus megatherium* 20),肠膜芽孢杆菌 30 (*B. mesentericus niger* 30) 及液化假单胞杆菌 9 (*Pseudomonas liquefaciens* 9) 等细菌,经 2—3 个月

浸出,其浸出液中金的浓度达到 1.5—2.15mg/L。分析这些细菌的代谢产物发现,其培养液中存在大量的氨基酸。总氨基酸的量超过 2%,主要有天门冬氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸等,它们能和金发生络合作用。经过用各个氨基酸单独浸金能力的比较发现,下列氨基酸有着较强的浸金作用。苯丙氨酸的浸出液中含金 33.1mg/L,天门冬氨酸浸出液中含金 31.8mg/L,甘氨酸为 18.1mg/L,丝氨酸为 24.5mg/L,组氨酸为 20.7mg/L。用紫外诱变获得的菌株比原始菌株浸金能力增加了 3—5 倍,原因在于诱变菌株的代谢产物中积累了更多的氨基酸。在适宜的条件下,培养液中氨基酸的含量可达到 11.9—14.6g/L,研究影响细菌浸金作用的主要因素表明,培养液中氨基酸的浓度为 3—5g/L 时浸金作用的效果最好。此外,添加氧化剂也是重要的因素。不添加氧化剂而仅用氨基酸,不能从直径 0.07 毫米砂金中浸出金。在浸出细粒浸染金时,添加氧化剂比不添加者,浸出液中含金量增加了 3—6 倍。所使用的氧化剂种类及用量对浸金效果也有明显影响。

Полькин 等^[5]曾用柠檬酸的生产菌——黑曲霉菌丝体的碱水解产物作为浸金剂。试料为石英-碳酸盐 and 砂-粘土矿样,液固比 2:1,分三段浸出,经 20 昼夜可浸出 72.1% 的金。该作者认为用蛋白质的水解产物堆浸贫矿石中细粒浸染金,是有希望的处理方法之一。基本流程见图 1。

据 1987 年 4 月 13 日苏联塔斯社报道,苏联科学家对自然界广泛存在的四类微生物的浸金能力进行了比