



真菌原生质体的分离与融合*

王 俊 英

(中国科学院微生物研究所, 北京)

细胞融合是近年来发展起来的一项微生物育种新技术, 它是通过两种亲株的原生质体融合而达到杂交目的。

微生物细胞壁被人工制备的细胞壁溶解酶去除之后, 裸露且成为球状的原生质即为原生质体。这种原生质体尚存有细胞膜, 在等渗溶液内对渗透压颇为敏感, 并具有代谢功能, 它比完整细胞更容易摄取外来的遗传物质, 如核酸、线粒体等。更令人感兴趣的是: 原生质体能在一定条件下经过诱导彼此融合, 从而形成杂种细胞。因此, 借助于原生质体的融合进行微生物杂交育种, 又开辟了一条遗传育种的新途径。尤其在真菌育种方面已进行很多原生质体分离与融合的研究, 现将有关进展介绍如下。

原生质体的分离

真菌原生质体的分离研究, 近年来发展很快。丝状真菌类的原生质体首先由 M. Musil-kova^[1] 分离得到。此后, 分离者又研究了影响原生质体形成的某些因素^[2]。此外, 还有一些报道, 例如从黑曲霉分生孢子培养的巨大细胞 (giant cell) 获得原生质体等^[3-10]。因而可以认为: 不仅能够由不同真菌菌丝体分离到原生质体, 而且可以由真菌孢子中取得它。

关于原生质体的分离程序一般是:

麦芽汁琼脂斜面 $\xrightarrow{1\% \text{ 吐温 } 80 \text{ 洗涤}}$ 孢子悬浮液
接入培养基中培养 $\xrightarrow{1000g \text{ 离心 } 5 \text{ 分钟}}$ 培养液 \rightarrow 短菌丝
 $\xrightarrow{0.7-1.0M \text{ 蔗糖}}$ 悬浮液 $\xrightarrow{\text{蜗牛酶 } 10\mu g, \text{ CaCl}_2 30mg, 0.7M NaCl}$ 原生质体。

真菌菌丝的结构对于原生质的分离有着重要的影响, 原生质体的分离开始取决于部分或整个菌丝体细胞壁的分解。细胞壁约占菌体干

重的 30%, 它的主要成份是由己糖或氨基己糖构成的多糖类, 包括葡聚糖、甘露聚糖、几丁质、脱乙酰壳多糖等。另外, 还含有蛋白质、脂质、无机盐类和色素等成份^[11]。试验证明, 由于菌的类群不同, 甚至因培养条件的变化, 壁的组成和结构都会有所不同。因此, 随菌种或培养条件的不同, 需要用相应的细胞壁溶解酶进行作用。

溶解真菌细胞壁的酶, 在最早的报告中都是采用蜗牛酶, 而且至今在一些实验中仍然在使用。随着研究工作的进展, 许多研究工作者已开始采用微生物产生的细胞壁溶解酶。常用的有纤维素酶、蛋白酶、几丁质酶和 β -1.3 糖苷酶等。或是单一酶, 或是混合酶共同作用, 这要根据不同菌种对象和采用的作用条件来确定^[12]。

不同溶菌酶对不同真菌细胞壁的溶解作用是不同的, 在原生质体制备过程中, 对溶解酶的作用也进行了研究。Sietsma 等^[13,14] 指出 β -1.3 糖苷酶用于假丝酵母 (*Candida utilis*), β -1.3 糖苷酶和几丁质酶用于黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 纤维素酶和昆布多糖酶用于腐霉 (*Pythium sp.*) 都是适宜的, 而对于裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 来说, 几丁质酶和 S-糖苷酶则是必要的, 有时还要同时加入 R-糖苷酶^[15]。

渗透压稳定剂对原生质体的分离也起着重要作用, 稳定剂的性质和浓度是影响原生质产量的重要因素。蔗糖、甘露糖, 山梨糖以及某些无机盐, 如 KCl、NaCl、CaCl₂ 和 MgSO₄ 等都可以作为渗透压稳定剂。对丝状菌来说以无机盐缓冲液为稳定剂比较适宜, 而酵母则用醇

* 本文蒙蔡金科先生审阅并提出宝贵意见, 谨致谢意。

和糖稳定较好。M. Musilkova 等人^[1]在分离黑曲霉原生质体时采用了 CaCl_2 和 NaCl , 而 Peberdy^[16] 指出: 在分离青霉菌的原生质体时应采用 KCl 。Vries 和 Wessels^[17] 指出: 用 NaCl 、 KCl 、甘露醇和山梨醇做稳定剂时, *S. commune* 的原生质体往往出现下沉现象, 而在蔗糖溶液中, 原生质体分布均匀且保持悬浮状态。

渗透压稳定剂对溶解酶还有一定的激活作用。据报道, 链霉菌用于大刀链孢 (*Fusarium culmorum*) 原生质体分离时, 用果糖、山梨糖、甘露糖、 NaCl 和 KCl 作稳定剂, 原生质体的分离时间只需要 30—45 分钟, 而用木糖、蔗糖和麦芽糖时, 则需 3 小时才能获得原生质体。

研究证明, 培养基组分、菌龄、培养温度等对原生质的分离也有不同程度的影响。不同条件下原生质体的产量差别很大, 得到的原生质体的稳定性也不相同。从菌龄考虑, 指数生长期利于原生质体的分离, 指数后期和静止期影响分离原生质的产量, 或因出现色素而抑制酶的作用^[2,17]。此外, 用硫醇对菌体进行预处理, 可以增加原生质体的产量^[18,19,20], 有些净化剂对原生质体的分离也有增效作用。

在大多数的真菌中, 原生质体的产生过程先是菌丝体局部膨胀, 随后通过尖端或次顶点的小孔释放出来, 起初直径大约为 $2.1\text{--}5.5\mu$, 原生质体有很小的泡囊及高密度的糖蛋白体、线粒体、核和内质网。3 小时后达到 13.7μ , 原生质体内出现各有差异的空泡和低浓度的核糖体小颗粒, 通常含有无机盐类^[21]。这种被称为“前期”和“后期”的原生质体, 它们的核内容各不相同, 前者无液泡, 原生质体内平均有 2—3 个核。后者有液泡, 原生质体内有 1—2 个核^[22]。在合适的条件下可以观察到原生质体的再生现象, 由于材料不同, 再生率一般可在 20—80%。

原生质体的融合

动物和植物原生质体融合技术的巨大进展, 促进了真菌原生质体融合的研究^[23]。微生物原生质体的融合常用营养缺陷型突变株, 在融合剂的诱导下进行。原生质体的诱导融合有

用离心、振动等机械力的方法, 但目前已较少使用。作为化学诱导剂主要有各种盐类 (NaNO_3 , KNO_3 , NaCl , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , MgCl_2 , BaCl_2 , AlCl_3 等)、多聚化合物(多聚赖氨酸、多聚鸟氨酸、聚乙二醇等), 还有 ADP、ATP、CAMP、免疫血清、卵磷脂、动物胶、溶菌酶等。较为有效而又被经常使用的融合剂是聚乙二醇。

Ferenczy. L 等人^[24,25]先后用白地霉 (*Geotrichum candidum*)、曲霉和青霉的营养缺陷型进行了原生质体融合的研究, 虽然在试验中用 KCl 作稳定剂和对钙离子浓度以及 pH 进行控制, 但其融合频率只有 2.5×10^{-3} 。到 1975 年, 由于他们选择了聚乙二醇作诱导剂, 使融合频率得到了显著提高。用黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、构巢曲霉 (*Asp. nidulans*)、黑曲霉 (*Asp. niger*)、常见青霉 (*Penicillium frequentans*) 和 *P. vauvangeri* 的不同营养缺陷型的突变体所作的互补融合中, 其融合频率达到了 2.5%。以下介绍 Ferenczy 的融合试验:

试验采用构巢曲霉的赖氨酸缺陷型和蛋氨酸缺陷型突变株, 所用培养基组份为 (%): 酵母膏 0.5, 葡萄糖 1, 琼脂 2, 调 pH6, 灭菌后分装于培养皿中, 另取一片玻璃纸放在培养皿中的培养基表面上, 把两种曲霉营养缺陷型突变体的孢子悬浮液分别用吸管滴于纸上, 在 30°C 培养, 待生长好后, 将带有菌落的玻璃纸从培养基上取出, 放到含有 0.6M KCl 的渗透压稳定的酶液中。

菌丝通过细胞壁溶解酶作用后, 用 G_2 玻璃漏斗过滤, 除去菌丝, 再用稳定剂重复离心, 将酶洗去, 即为原生质体悬液。然后将两种突变株的原生质体悬液按 1:1 混合 (大约每毫升浓度为 10^7 个), 并在直径为 1 厘米的离心管中离心, 用吸管吸去上清液, 即可供融合。

取一定量离心后的混合原生质体, 分装入不同试管中, 用含有 $10\mu\text{M}$ CaCl_2 的不同浓度的聚乙二醇 1 毫升悬浮, 然后用力搅拌几秒钟, 每隔一定时间间歇取样。样品加入含有渗透压稳定剂的基础培养基中摇匀, 倒入培养皿, 保温培养, 用不加聚乙二醇的作为对照, 测定不同浓

度聚乙二醇对原生质体再生及融合率的影响。

结果表明, 聚乙二醇浓度在 25—30% 时, 能够导致原生质体的高频率融合。按原生质体聚合形成的菌落单位数计算, 互补作用几乎达到 40%, 按参加融合的原生质体总数计算, 互补率为 2.6% (见表 1)。

表 1 聚乙二醇浓度与原生质体融合率的关系

聚乙二醇浓度(%)	存活率(%)	融合率(%)
10	0.7	0
15	4.0	1.5
20	38.7	10.7
25	96.2	38.0
30	100.0	38.7
35	97.0	33.7

融合之后的互补菌体接种到渗透压稳定的基础培养基中培养, 得到的异核体可显示出特有的形态。一般情况下, 由这些菌落产生的分生孢子表现出亲代菌株的营养要求, 需赖氨酸的后代比需蛋氨酸的要多, 互补的菌丝体均能在基础培养基上很好生长。

为提高融合频率, 需要注意控制如下一些影响融合的因素: (1)原生质体应尽可能年轻, (2)原生质体尽可能纯净, (3)添加适宜的渗透压稳定剂, (4)两种突变株原生质体按 1:1 混合, (5)每毫升原生质体的最适量为 10^7 。

除上述的种内不同营养突变体的融合杂交外, 在亲缘关系较近的种间的融合杂交育种, 也于近年内取得了很大进展。Kevei 等人在 1977 年^[28,29], 用构巢曲霉和 *Asp. rugulosus* 进行种间融合, 所得异核体表现了亲本双方的营养要求, 菌落形状规则, 形成分生孢子, 再行接种后依然能长出旺盛菌落。通过 DNA 测定和分离的性质看出, 杂种是以双倍体形式存在的。此外, Peberdy 等人^[30]作了产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 和蓝棕青霉 (*Penicillium cyaneofulvum*) 的原生质体融合, 分离到的营养缺陷型大多数是双倍体和非整倍体, 认为融合作用和营养缺陷型的营养互补现象可能是由种间的非整倍体产生的。

在属间进行原生质体融合也有报道, 以热

带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 和肋状复膜孢子酵母 (*Saccharomycopsis fibuligera*) 取得^[31]了融合的成功, 但是融合率低, 只有 10^{-5} 左右。从分离子的主要性状看, 有些象双亲之一, 有些介于双亲之间, 还有一些是单核并显示出不同程度的不稳定性。

由于微生物生长周期短, 有较长时间的单倍体期, 可以在很短时间内生长出大量相对同步化的种群。因此, 利用微生物的原生质体作为遗传育种的研究材料是很有益的。原生质体融合能使线粒体转移, 并使线粒体 DNA 发生重组, 由此获得杂种的重组体^[32], 不仅为遗传学和分类学研究提供了新的途径, 而且在培育具有新特征菌株以及改良一般生产菌株方面存在着巨大潜力。有人用原生质体融合技术, 所取得的头孢霉的重组体, 使头孢霉素的产量提高 40%^[33]。

原生质体分离及融合技术的发展还为探讨蛋白质的生物合成、酶的体外合成^[34,35]提供了有利条件。从而可以对酶的形成, 细胞膜与细胞壁的产生及功能作进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Musilkeva, M.: *Fol. Microbiol.*, 11(2): 4—472, 1966.
[2] Musilkova, M.: *Fol. Microbiol.*, 13(3): 4—231, 1968.
[3] Deans, S. G. and J. E. Smith: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 69: 92—207, 1977.
[4] Emerson, S. and M. R. Emerson: *Proceed Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 44: 668, 1958.
[5] Bachman, B. H. and D. M. Benner: *J. Bacterial.*, 78: 550, 1959.
[6] Kinsky, S. C.: *J. Bacterial.*, 83: 351, 1962.
[7] Nečas, O.: *Fol. Biol.*, 11: 97—102, 1965.
[8] Garcia-Acha, I., J. R. Aguirre, F. Loper-Belmonte, et al.: *Nature*, 209: 95, 1966.
[9] Aguirre, M. J. R., J. R. Villanueva: *Nature*, 196: 693, 1962.
[10] Aguirre, M. J. R. and I. Garcia-Acha: *Experimentia*, 19: 82, 1963.
[11] 徐浩, 江慧修、钟如: 生物科学参考资料, 第 10 集。
[12] 船津胜、鹤大典: 溶菌酶素, 讲谈社, 1977。
[13] Sietsma, J. H. and D. E. Eveleigh, R. H. Haskins, et al.: *Can. J. Microbiol.*, 13: 4—1711, 1967.
[14] Sietsma, J. H. and J. T. M. Wouters: *Arch. Microbiol.*, 79: 73—263, 1971.
[15] Devries, O. M. H. and J. G. H. Wessels: *J. Gen.*

- Microbiol.*, 76: 319—330, 1973.
- [16] Peberdy, J. F., A. H. Rose, H. J. Rogers, et al.: Microbial and Plants protoplast, *Academic Press*, London, 1976, p. 39.
- [17] Vries, O. M. H. and J. G. H. Wessels: *J. Gen. Microbiol.*, 73: 13—22, 1972.
- [18] Fawcett, P. A. and P. B. Loder: *J. Gen. Microbiol.*, 79: 293—309, 1973.
- [19] Berlner, M. and M. E. Rega, Mycopath, et al.: *Mycol. Appl.*, 137: 81—85, 1969.
- [20] Adriana, M. P., J. H. Dooijeward-kloosteriel, and J. H. Sietsma, et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 74: 9—205, 1973.
- [21] Peberdy, J. F. and R. K. Gibson: *J. Gen. Microbiol.*, 69: 325—330, 1971.
- [22] Anne, J., H. Eyssen and P. De. Somer: *Arch. Microbiol.*, 98: 159—166, 1974.
- [23] 上海植物生理研究所细胞生理研究室: 植物学报, 15 (2): 285—307, 1973.
- [24] Ferenczy, L., F. Kivei and I. Solt: *Nature*, 248: 793, 1974.
- [25] Ferenczy, L., F. Kevei and M. Segedi: *Experientia*, 31: 2—50, 1975.
- [26] Ferenczy, L., F. Kevei and M. Segedi: *Experientia*, 31: 9—1028, 1975.
- [27] Peberdy, J. F., A. H. Rose, H. J. Rogers, et al.: Microbial and Plants Protonlast, *Academic Press*, London, 1976, p. 177.
- [28] Kevei, F. and J. F. Peberdy: *J. Gen. Microbiol.*, 102: 62—255, 1977.
- [29] Ferenczy, L., M. Szedi and F. Kevei: *Experientia*, 33: 6—184, 1977.
- [30] Peberdy, J. F., H. Eyssen, and J. Amme: *M. G. G.*, 157: 4—281, 1977.
- [31] Provost, A., C. Bourguignon, P. Fournier: *Fems. Microbiol.*, 3: 309—12, 1979.
- [32] Peberdy, J. F.: *Anne. Rev. Microbiol.*, 33: 21—39, 1979.
- [33] Peberdy, J. F.: *Enzyme and Microbiol Technology*, 2(1): 23—29, 1980.
- [34] Yasuo Nindmiya, Taiji Imanishi, A'tsuhiko Shinmyo. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 53: 98—189, 1975.
- [35] Yasuo Ninomiya, Taiji Imanishi, A'tsuhiko Shinmyo, et al.: *J. Ferment. Technol.*, 54: 82—374, 1976.