

酿酒酵母原生质体的融合

张博润 王永红* 刘书锋* 蔡金科

(中国科学院微生物研究所,北京)

原生质体融合技术开始于动植物细胞,特别是 Willin 等^[1]报道了 PEG 有助于高等植物细胞原生质体融合以后,这一技术广泛地应用于植物、微生物原生质体的融合和动物细胞的融合。原生质体的制备、培养、融合和发育为研究细胞分化、膜结构与功能、定向育种等生物学基本问题,以及微生物遗传、生化、基因方面都提供了有效的工具^[4,5]。

原生质体融合技术对那些缺乏或难以完成有性生殖的微生物来讲具有特殊价值。有人报道通过融合可获得热带假丝酵母重组体^[6]和顶头孢霉的异核体,并使头孢霉素 C 产量提高 40% 以上^[7],而通过正常细胞结合和菌丝联结是难以实现的。

国外对酵母菌原生质体融合的研究较多^[8,11,18,19],国内对这方面的工作开展不多^[12,13]。本文主要报道用酿酒酵母原生质体融合手段获得营养互补的融合子。经遗传、生理生化分析证明获得的原核型融合子一般为二倍体。为进一步进行优良的生产菌育种提供了理论依据和有效的途径。

材料和方 法

(一) 菌株

为本实验室保藏菌株, *Saccharomyces cerevisiae* HL458-1C(a *ura*⁻), HIII-2C (a *lys*⁻), A364a (a), 11802-1B (a), NC-7 (a)。

(二) 培养基

1. YEPD 液体培养基 (%)^[2]: 蛋白胨 2, 酵母膏 1, 葡萄糖 2, pH 6.0。

2. YEPD 固体培养基: 在 YEPD 液体培养基中加 2% 琼脂。

3. YEPDS 固体培养基: 在 YEPD 固体培养基中加 1M 山梨醇。

4. YNB 固体培养基^[14]: 大量元素 25ml/L, 微量元素 2.5ml/L, 9种维生素混合液 2.5ml/L, 葡萄糖 2%, 琼脂 2% pH 6.5。

5. YNB 固体上层培养基: 除琼脂是 3% 和加 1M 山梨醇以外, 其余成份与 YNB 固体培养基相同。

6. 生孢子培养基(%): 醋酸钾 0.98、葡萄糖 0.1、酵母膏 0.25、琼脂 2, pH 6.0。

(三) 试剂

1. 0.2M 磷酸盐缓冲液 (简称 PB), 内含 0.8M 山梨醇, pH 5.8。

2. 1% 蜗牛酶-PB 溶液(用 G6 抽滤漏斗抽滤灭菌)。

3. 0.1% β -巯基乙醇-PB 溶液。

4. 35% PEG (分子量为 4,000) — 0.01 M CaCl₂-PB 溶液。

5. 0.4M CaCl₂。

以上培养基和各种溶液(蜗牛酶除外)均为 8 磅 30 分钟蒸汽灭菌。

(四) 实验方法

1. 原生质体的制备: 将 IL 458-1C 和 H 111-2C 菌株在 30ml/250ml YEPD 三角瓶中, 28℃、200r/min 摇床培养 14 小时, 收集对数期的细胞, 各取 3ml 到小离心管中, 3,500r/min 离心 5 分钟, 用 PB 液洗两次后, 加入 3ml 0.1% β -巯基乙醇-PB 溶液, 28℃ 预处理 10 分钟, 离心弃去上清液后, 各加入 3ml 1% 蜗牛酶, 28℃ 水浴摇床处理 40—50 分钟, 取样镜检, 当 90% 以上细胞转变成为原生质体后, 终止酶处理, 离心, 用 PB 液洗两次, 即得原生质体。

2. 原生质体再生率的测定: 将制备的原生质体恢复到原来的细胞浓度, 约为 1.5×10^7 细

* 系山东大学生物系 79 级学生。

胞/ml。经过适当稀释后涂 YEPD 和 YEPDS 平皿,30℃ 培养 2—3 天计数,并与对照组比较,得出每种菌的再生率。

3. 原生质体融合^[17]: 根据亲株的再生率,以 1:1 比例混合,离心,用 0.4 M CaCl₂ 溶液洗一次,小心加入 4ml 35% PEG-0.01 M CaCl₂-PB 溶液于原生质体沉淀上面,然后轻轻摇动混合,28℃ 处理 1 小时后,分别取 0.1ml 处理液与 50℃ 融化好的 YNB 固体上层培养基混合,迅速倒入已凝固的 YNB 平皿上,或将 0.1ml 处理液涂布于 YNB 平皿上,再倒入 10ml YNB 固体上层培养基覆盖。28℃ 培养 4—6 天,将长出的菌落接种到 YEPD 斜面上。

4. 融合体的鉴定

① 交配型测定: 参照蔡金科等^[2]的方法,将待测菌与标准菌 [本实验以 A 364 a (a) 和 H 802-1B (α) 为交配型测定标准株] 在 YEPD 斜面上交配,4—6 小时后镜检。

② 细胞体积大小的测定^[26]: 用显微镜测微尺测量细胞大小,按公式

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot \frac{a}{2} \left(\frac{b}{2} \right)^2$$

计算,式中 a = 长轴, b = 短轴。

③ 营养要求测定: 将亲株和融合体细胞接种到 1 ml 生理盐水/小试管中饥饿 3—4 小时后,用接种环取样点在 YNB、YNB + ura、YNB + lys 三种平皿上,28℃ 培养 48 小时观察结果。

④ 亲株和融合体的 DNA 含量测定: 按文献^[3]法提取 DNA,按 Giles 等^[27]的方法测定 DNA 含量。

⑤ 异核体的测定: 从融合体中随机挑出 5 株菌,分别接种到 YEPD 上培养 48 小时,然后制成菌悬液,经适当稀释后涂 YEPD 平皿,从平皿上挑出单菌落,分别接种到 YEPD 和 YNB 平皿上,测定其生长情况,以确定获得的融合体是否异核体。

结果和讨论

(一) 融合频率与自发回复突变率的比较

根据实验数据,IL458-1C 的 ura⁻ 缺陷的自发回复突变率是 1.07×10^{-8} , H11-2C 的 lys⁻ 自发回复突变率是 1.1×10^{-9} 。我们以在 YNB 培养基平皿上的原养菌落数与原生质体在 YEPDS 培养基平皿上再生的菌落数之比作为融合频率,融合频率为 $1.5-5 \times 10^{-6}$,比亲株的回复突变率高 100—1,000 倍,足以排除回复突变的可能性。

(二) 融合体的交配型测定

本实验所用的两个亲株都是 a 交配型单倍体菌株,从 YNB 平皿上挑出的融合体也应该是 a 交配型,而自然界存活的酵母菌一般都是二倍体菌株,并且由于是自然交配,所以都是 αα,而不可能是 aα 或 αα 型。在自然界中,单倍体菌株不易存活。因此交配型可以作为一个很稳定的遗传标记。融合体 (aa) 可以与 α 型的标准菌株交配形成哑铃形细胞,而污染的酵母菌 (αα) 与 a 型或 α 型标准株都不能自然交配。在我们的实验中,所得的融合体全都能与 α 型菌株交配,而不与 a 型菌株交配(结果见表 1)。

表 1 亲株及融合体的交配型测定结果

待测菌	标准株	
	H802-1B (α)	A364a (a)
IL458-1C (a)	+	-
H11-2C (a)	+	-
F-I-5	+	-
F-I-12	+	-
F-I-44	+	-
F-I-55	+	-
F-I-66	+	-
F-I-72	+	-
F-I-76	+	-
F-I-86	+	-
F-II-16	+	-
F-II-25	+	-
F-II-59	+	-

(三) 融合体的营养要求

IL458-1C 为 *ura⁻* 缺陷, H111-2C 为 *lys⁻* 缺陷, 它们在 YNB 平皿上都不能生长, 原生质体融合后, 根据营养互补原则, 获得的融合体都应在 YNB 平皿上生长, 测定结果如下(表 2)。

表 2 亲株及融合体的营养要求测定结果

待测菌	培养基			
	YNB	YNB +ura	YNB +lys	YNB +ura +lys
IL458-1C	-	+	-	+
H111-2C	-	-	+	+
F-I-5	+	+	+	+
F-I-12	+	+	+	+
F-I-44	+	+	+	+
F-I-55	+	+	+	+
F-I-72	+	+	+	+
F-I-76	+	+	+	+
F-I-86	+	+	+	+
F-II-16	+	+	+	+
F-II-25	+	+	+	+
F-II-59	+	+	+	+

(四) 融合体的细胞大小测定

用显微镜测微尺分别测量融合体的大小, 按公式 $V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{a}{2}\right) \cdot \left(\frac{b}{2}\right)^2$ 计算。从表 3 和图 1 中可以看到所有融合体的细胞都明显大于亲株细胞, 有的融合体细胞体积大约为亲

表 3 亲株和融合体的细胞大小测定结果

待测菌	结果	项目		
		长 (μm)	宽 (μm)	体积 (μm^3)
IL458-1C		3.13	2.98	14.55
H111-2C		3.46	3.29	19.60
F-I-5		3.86	3.72	27.95
F-I-12		3.82	3.67	27.28
F-I-44		4.26	4.10	37.48
F-I-55		4.68	4.01	39.38
F-I-66		4.11	3.91	32.84
F-I-72		4.17	3.89	33.02
F-I-76		4.12	3.81	31.30
F-I-86		4.44	4.23	41.42
F-II-16		5.12	4.77	61.09
F-II-25		4.26	4.10	37.48
F-II-59		4.17	3.89	33.02

株细胞体积之和; 有的融合体细胞体积大约为亲株细胞体积的三倍。

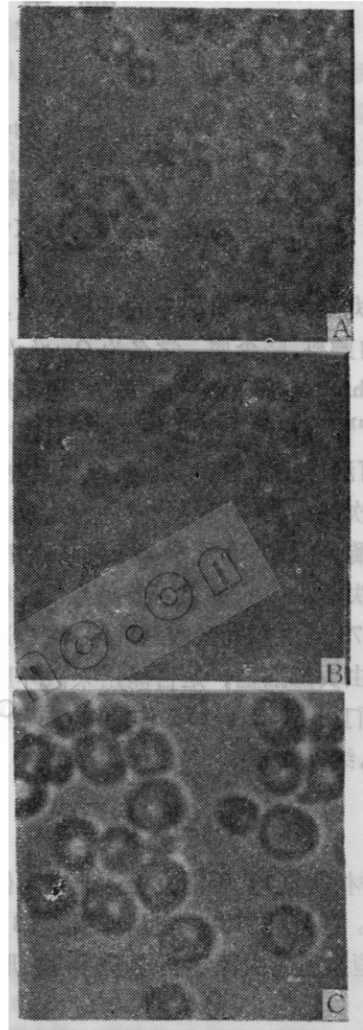


图 1 亲株和融合体的细胞形态观察

A: H111-2C 单倍体细胞

B: IL458-1C 单倍体细胞

C: 融合体 F-I-16 细胞

(五) 融合体 DNA 含量测定

按照文献 [3] 法提取亲株和融合体的 DNA, 用 Giles 等人^[27]的方法测定 DNA 含量, 结果见表 4。从表中可以看出, F-II-16 的 DNA 含量约为亲株 DNA 含量之和, 而 F-I-55 的 DNA 含量约为 H111-2C 的两倍, 仅相当于 IL458-1C 的 DNA 含量, 这可能有三种可能性: ① 可能是 IL458-1C 的回复突变, 但它的细胞体积却明显大于 IL458-1C; ② 可能是

(下转第 73 页)

表4 亲株和融合体的 DNA 含量测定结果

待测菌	项目 结果	细胞数	DNA 总含量 (μg)	DNA 含量/每 个细胞
IL458-1C H111-2C		2.88 $\times 10^{11}$	121.6	42.2 $\times 10^{-4}$
		2.88 $\times 10^{11}$	76.8	2.67 $\times 10^{-10}$
F-I-55 F-II-16		2.88 $\times 10^{11}$	124.8	4.26 $\times 10^{-10}$
		2.88 $\times 10^{11}$	170.8	5.93 $\times 10^{-10}$

亲 H111-2C 株的两个细胞的融合产物,但如果是这样的话,它则仍然是 *ura*⁻ 缺陷型,而我们几次测定结果都证明它是 *Ura* 原养型;③可能是带有 *URA* 基因的 DNA 片段进入 H111-2C 的原生质体所形成的产物,与报道类似^[20]。

(六) 异核体的排除

为了排除异核体形成的可能性,我们从获得的融合体中随机挑出五株菌, F-I-5、F-I-12、F-I-72、F-II-16、F-II-59。分别接种到 YEPD 斜面上, 30℃ 培养 24 小时, 然后作成菌悬液, 适当稀释后涂 YEPD 平皿, 随机挑菌落到 1ml/小试管生理盐水中, 饥饿 3—4 小时后, 用接种环分别点样到 YNB 和 YEPD 平皿上, 30℃ 培养 48 小时, 结果所测的 F-I-5 的 205 株、F-I-12 的 247 株、F-I-72 的 178 株、F-II-

16 的 322 株、F-II-59 的 256 株菌全部能在 YNB 和 YEPD 上生长, 未出现核基因标记的分离现象。这一结果证明融合体的基因互补不是由异核体方式进行的, 其融合体是稳定的。

参 考 文 献

- [1] Willin, et al.: *L. Pflanzen Physiol.*, 74: 64—80, 1974.
- [2] 蔡金科等: 遗传学报, 5(1): 9—18, 1978.
- [3] 蔡金科等: 微生物学报, 25(2): 124—128, 1985.
- [4] 张博润: 微生物通报, 11(4): 181—183, 1984.
- [5] Hirotsuke, et al.: *FEBS Letters.*, 113(1): 58—61, 1980.
- [6] Peberdy, J. F.: *Enzyme Microb. Technol.*, 2(1): 23—29, 1980.
- [7] Boggs, J. D.: *Nature.*, 275: 104—109, 1978.
- [8] Morgan, A. J. et al.: *Microbio' Letter.*, 4: 103—107, 1978.
- [9] Kevei, F. et al.: *Gen. Microbiol.*, 102: 235—262, 1977.
- [10] Peberdy, J. F., et al.: *M. G. G.*, 157: 281—284, 1977.
- [11] Anne, J. et al.: *FEMS Microbiol Letter.*, 4: 87—90, 1978.
- [12] 谭蓓英, 王花: 真菌学报, 2(2): 110—118, 1983.
- [13] 谭蓓英等: 真菌学报, 2(3): 192—196, 1983.
- [14] Phaff, H. J. et al.: *The Life of Yeasts*, Ed. p. 166—167, 1978.
- [15] Sipiczki, M. et al.: *M. G. G.*, 151: 77—81, 1977.
- [16] Anne, J. et al.: *Arch. Microbiol.*, 98: 159—166, 1974.
- [17] Giles, et al.: *Nature.*, 206: 93, 1965.
- [18] Klinner, U. et al.: *Z. allg. Mikrobiol.*, 24: 533—537, 1984b.
- [19] Klinner, U. et al.: *J. Basic. Microbiol.*, 25(4): 233—241, 1985.
- [20] Tamki, H.: *M. G. G.*, 187: 177—179, 1982.