

嗜热脂肪芽孢杆菌与北京棒状杆菌细胞融合初探

童望宇 张克旭 贾士儒

(天津轻工业学院,天津)

摘要 对两种不同属间的细菌,嗜热脂肪芽孢杆菌与北京棒状杆菌原生质体的形成、再生及融合进行了研究。初步确定了适应此两种出发菌株的破壁、再生及融合的最佳条件。在此条件下,其破壁率均可达98%以上;LT1菌与LT2菌的再生率分别可达32%与51%;融合率可达 2.55×10^{-7} 。试验结果表明,此两种不同属间的细菌细胞融合是完全可能的。 10^{-7} 以上的融合率应用于工业遗传育种是完全可行的。

关键词 嗜热脂肪芽孢杆菌;北京棒状杆菌;细胞融合

本实验所用的两亲株是不同属间的细菌。LT1为嗜热脂肪芽孢杆菌,具有链霉素抗性,其回复突变率小于 10^{-8} ,具耐高温和产 α -淀粉酶的特点。LT2为北京棒状杆菌,具有AEC抗性,AHV抗性,及高丝氨酸缺陷型的遗传标记,其回复突变率均为 10^{-8} 以下,同时还具有产赖氨酸能力。

关于北京棒状杆菌的细胞融合研究报道较少^[1],而嗜热脂肪芽孢杆菌的细胞融合,迄今为止,未见报道,特别是将两种不同属间的细菌进行融合,目前我国研究报道极少。本文仅就上述两菌株的融合率与主要影响因素的关系报道如下。

材料与方 法

(一) 菌株

LT1:嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*),遗传标记:Sm^r,Amy⁺。

LT2:北京棒状杆菌(*Corynebacterium pekinense*),遗传标记:AEC^r,AHV^r,Hom⁻。

LT3:融合子遗传标记:Sm^r,AEC^r。

(二) 培养基与试剂

1. 液体培养基:氯化钠5g,葡萄糖5g,牛肉膏5g,酵母膏5g,蛋白胨10g,pH7.0—7.2,自来水1000ml,1kg/cm²灭菌20分钟。

2. 固体培养基:在液体培养基中加20g琼脂。

3. 再生培养基,1000ml固体培养基中加入:丁二酸钠135g,MgCl₂2g,EDTA1.9g,灭菌后加DNase5mg。

4. 鉴定培养基:再生培养基1000ml灭菌后加入AEC5g,Sm0.5g。

5. 高渗溶液:丁二酸钠135g,MgCl₂2g,EDTA1.9g,DNase5mg,pH7.0—7.2,自来水1000ml,1kg/cm²灭菌20分钟。

6. 蛋清溶菌酶液(5mg/ml,125mg/ml):在灭菌后的1000ml高渗溶液中分别加入5g、12.5g蛋清溶菌酶,尔后用G2漏斗过滤,4℃保藏。

7. 40% PEG溶液:在1000ml高渗溶液中加入PEG-6000,400g,pH7.0—7.2,1kg/cm²灭菌20分钟。

8. 磷酸钙溶液:KH₂PO₄5.4g,1kg/cm²灭菌20分钟;CaCl₂·H₂O294g,1kg/cm²灭菌20分钟。使用前等量混合。

9. 青霉素G钾盐40单位/ml溶液:取40万单位/g的青霉素G钾盐用无菌水配制成40单位/ml溶液,G2漏斗过滤,4℃保藏。

10. 种子培养基:葡萄糖130g,K₂HPO₄1g,MgSO₄·7H₂O0.5g,玉米浆20ml,(NH₄)₂SO₄40g,CaCO₃(分消)40g,自来水1000ml,pH6.7,1kg/cm²灭菌15分钟。

11. 发酵培养基:葡萄糖130g,K₂HPO₄1g,MgSO₄·7H₂O0.5g,玉米浆20ml,豆饼水

解液 15ml, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40g, CaCO_3 (分消) 40g, 自来水 1000ml, pH7.2, $1\text{kg}/\text{cm}^3$ 灭菌 15 分钟。

(三) 实验方法

1. 菌体生长曲线的测定: 按文献[2]方法

2. 菌体培养:

LT1: 将保藏菌种转入固体培养基斜面, 于 55°C 培养 24 小时, 然后从斜面上取 2 环于 20ml 液体培养基中, 于 55°C , 120r/min 振荡前培养 14 小时。再取 0.4ml 前培养液于 20ml 液体培养基中, 于 55°C , 120r/min 振荡培养 7 小时(至对数末期)。

LT2: 将保藏菌种转入固体培养基斜面, 于 32°C 培养 24 小时, 然后从斜面上取 2 环于 20ml 液体培养基中, 于 32°C , 120r/min 振荡培养 14 小时。再取 0.4ml 该培养液于 20ml 液体培养基中, 于 32°C , 120r/min 振荡培养 4 小时, 加入 40 单位/ml 的青霉素 G 钾盐至终浓度为 0.8 单位/ml, 连续培养 6 小时(对数末期)。

3. 原生质体的制备: 取上述菌体培养液各 5ml 于不同的离心管中, 4000r/min 离心 10 分钟, 用高渗液洗涤 2 次, 然后将沉淀菌体用高渗溶液稀释成 10^8 个/ml 的菌悬液。取菌悬液 4.6ml, 加入蛋清溶菌酶液 0.4ml。(LT1 为 5mg/ml 的蛋清溶菌酶液, LT2 为 12.5mg/ml 的蛋清溶菌酶液) 于 32°C 进行酶解 (LT1 酶解 1 小时, LT2 酶解 15 小时)。尔后, 于 4000r/min 离心 10 分钟, 除去上清液, 用高渗溶液洗涤沉淀两次, 并定容至 5ml。

4. 原生质体的再生:

取上述溶液逐级稀释至平板适当生长密度, 采用夹层平板法涂布在再生培养基平板上。于 32°C 保温 2—3 天后计数。

5. 原生质体的融合: LT1, LT2 高渗菌悬液各取 3ml, 均匀混合, 于 4000r/min 离心 10 分钟。去掉上清液, 加入 4.8ml 40% 的 PEG-6000 溶液, 并加入 0.2ml 磷酸钙溶液, 均匀混合, 于 32°C 保温 20 分钟。然后于 4000r/min 离心 10 分钟, 去除上清液, 加入 5ml 高渗溶液, 混匀并逐级稀释至平板密度, 采用夹层法涂

布在鉴定培养基平板上。于 32°C 保温 4—6 天计数。

6. 菌体形态及大小的测定: 按文献[3]方法。

7. 赖氨酸发酵: 将 LT2, LT3 接种在固体培养基斜面上, 于 32°C 培养 24h, 尔后, 取 2 环于 20ml 种子培养基, 32°C 下, 120r/min 振荡培养 8h, 取 0.4ml 种子于 20ml 发酵培养基中, 于 32°C , 120r/min 振荡培养 36h, 测定赖氨酸含量。

8. L-赖氨酸的测定: 按文献[14]方法。

结果与讨论

(一) 破壁率与融合率的关系

破壁率的高低体现原生质体化的程度, 而原生质体化程度直接影响原生质体间的相互接触^[4], 因而影响融合率。

结果表明(表 1), 在实验范围内, 随着两亲株破壁率的提高, 融合率明显提高(表 1)。

(二) 聚乙二醇 (PEG) 浓度与融合率的关系

PEG 作为助融剂, 其浓度对融合率有很大影响。关于 PEG 促融合作用的机理, 目前有如下几种观点: ① PEG 以一种分子桥的形式沟通了相邻的质膜^[5]。② PEG 改变了质膜的流动性^[6]。③ PEG 降低了质膜表面势能^[7]。④ PEG 使质膜中相嵌蛋白颗粒凝集, 出现了易于融合的非蛋白颗粒的磷脂双层区域等^[8]。

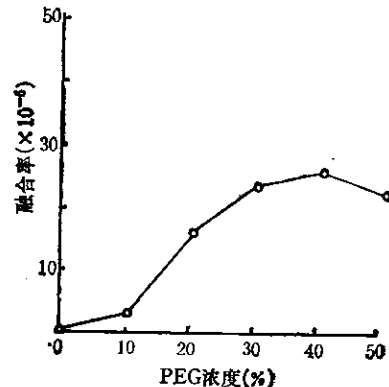


图 1 PEG 浓度对融合率的影响
LT1 破壁前菌数为 1.52×10^8 , LT2 为 3.28×10^8

表1 LT1, LT2 菌破壁率对融合率的影响

LT1 破壁率(%)	30	60	84	92	97	99
LT2 破壁率(%)	51	70	80	95	97	98
融合率	2.0×10^{-7}	1.2×10^{-6}	6.4×10^{-6}	1.02×10^{-5}	2.02×10^{-5}	2.73×10^{-5}

LT1 破壁前菌数为 1.18×10^6 , LT2 为 4.42×10^6 。

图1结果表明:当PEG浓度低于40%时,融合率随着PEG浓度的增加而提高,当PEG浓度为40%时,融合率达最高值 2.52×10^{-5} ,随着PEG浓度的连续上升,融合率呈下降趋势。其原因是当PEG浓度较低时,对细胞脱水不够,因而导致细胞膜之间作用不强烈,而不能紧密接触,致使融合率下降^[9]。当PEG浓度过高时,由于PEG毒性增加,对细胞造成损伤,致使融合率下降。

(三) PEG 作用时间与融合率的关系

PEG对细胞有毒,原生质体长时间悬浮于PEG中易造成融合率下降。因此有必要对PEG的作用时间进行探讨。

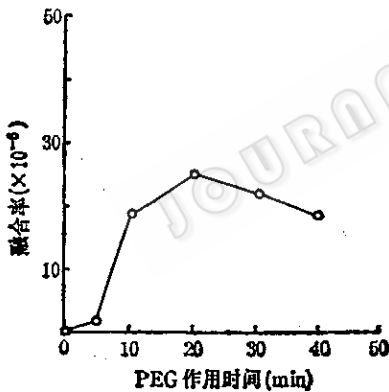


图2 PEG作用时间对融合率的影响

LT1 破壁前菌数为 1.02×10^5 , LT2 为 2.4×10^5

从图2可看出,当PEG作用时间从0增加到20分钟时,融合率从0上升到 2.51×10^{-5} ;而作用时间从20分钟延长到40分钟时,其融合率下降为 1.68×10^{-5} ,这是PEG促融合作用与毒性等因素共同作用的结果。

(四) 融合温度与融合率的关系

关于融合温度对融合率的影响机理还不清楚。图3结果表明,温度从0上升到32℃时,

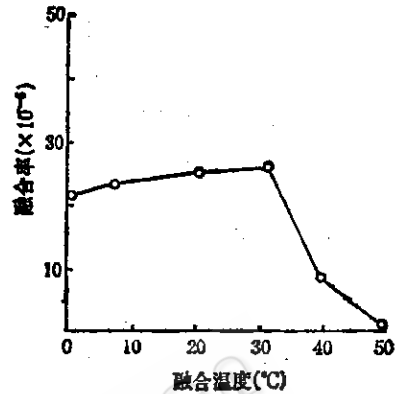


图3 温度对融合率的影响

LT1 破壁前菌数为 1.28×10^6 , LT2 为 2.28×10^6

融合率缓慢上升;当温度从32℃进一步上升时,融合率急骤下降,说明低温阶段温度对融合率影响不大,而高温阶段融合率明显下降,这可能是因为高温时PEG对原生质体毒性增强的缘故。

(五) Ca^{++} 浓度与融合率的关系

大量报道表明^[10],通过对 Ca^{++} 浓度的控制,可以改变融合率的高低。

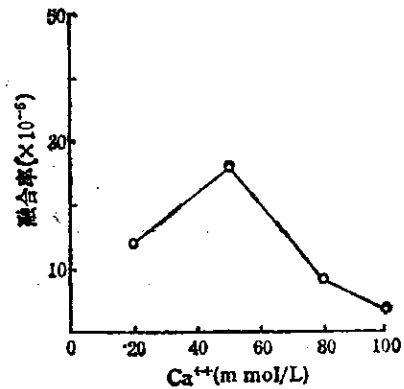


图4 Ca^{++} 浓度对融合率的影响

LT1 破壁前菌数为 1.08×10^5 , LT2 为 2.88×10^5

从图 4 可看出, Ca^{++} 浓度从 20mmol/L 上升到 50mmol/L 时, 融合率从 1.14×10^{-5} 上升到 2.51×10^{-5} 。而 Ca^{++} 从 50 上升到 100mmol/L 时, 融合率从 2.51×10^{-5} 下降为 2.6×10^{-6} 。这可能是在含有氢键的细胞质膜中, Ca^{++} 与 PEG 使邻近的质膜之间形成分子桥, 如果没有 Ca^{++} , 细胞壁内氢键在低 pH 值下形成, K^+ 、 Na^+ 首先与含有氢键的细胞质膜结合, 从而影响融合效果^[41]; 当 Ca^{++} 浓度很高时, 可能使原生质体表面带上电荷, 由于同性相斥, 从而影响原生质体的凝集, 以致使融合率降低。

(六) pH 值与融合率的关系

融合时的 pH 值能改变体系的电性状态, 从而影响原生质体的凝集。有报道指出^[42], 在有 Ca^{++} 存在时, pH 值为 9.0 的碱性条件能刺激产生最大的融合频率, 没有 Ca^{++} 存在时, 则较低的 pH 值有利于进行细胞融合。

图 5 结果表明, 从 pH2.2 上升到 8.5 时, 融合率从 1.4×10^{-6} 上升到 2.8×10^{-5} 。同时可看出, 在实验 pH 范围内, 碱性条件下的融合率明显高于酸性条件。

(七) 亲株、原生质体和融合子形态比较

菌体的大小与形态是细菌分类学上的一个重要依据, 同样其形态与大小也是融合子鉴定的一个有效方法^[43]。

从表 2 中可看出 LT3 与亲株 LT1, LT2

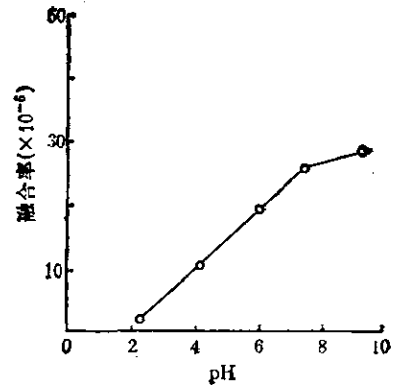


图 5 pH 值对融合率的影响

LT1 破壁前菌数为 1.20×10^8 , LT2 为 4.32×10^8

均有一定差别。

(八) 融合子的遗传稳定性及产酸分析

1. 融合子的遗传稳定性

由于原生质体融合后会产生两种情况, 一种是真正的融合, 即产生杂合双倍体或单倍重组体; 另一种是暂时的融合, 即形成异核体。因此, 当融合子得到后, 应进行几代分离、选择, 以防出现各种形状不断变化的状态。同时, 在融合实验前, 将两个细菌亲株混合培养在选择培养基上, 观察有无混合生长现象, 以确定是否有互补、互养现象存在。各菌株在鉴定培养上生长情况见表 3。

2. 融合子性能测定——赖氨酸发酵

对 LT2 及 LT3 的生产赖氨酸能力进行

表 2 亲株与融合子的形态差异

菌株	细胞大小 (μm)	形态特征
LT1	0.58—0.88 \times 2.80—6.00	均匀整齐杆状菌, 细胞粗细均匀, 两端整齐, 互不相连, 呈自由状态分布
LT2	0.60—1.30 \times 1.50—3.20	典型八字排列, 细胞常呈短杆状或小棒状, 有时微弯曲, 两端钝圆, 不分枝, 细胞排列成单个、成对或“V”字形
LT3	0.64—1.42 \times 1.50—4.40	细胞常呈短杆状或小棒状, 两端钝圆, 不分枝, 以单个、成对及自由状分布

表 3 LT1, LT2, LT3 抗性能力比较

菌号	AEC 浓度 (mg/ml)					Sm 浓度 (mg/ml)					AEC + Sm 浓度 (mg/ml)				
	2	4	6	8	10	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	2+0.2	4+0.4	6+0.6	8+0.8	10+
LT1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
LT2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LT3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表4 LT2 与 LT3 的产酸对照

代次	样品	参比	LT2	LT2	LT2	LT3	LT3	LT3
			(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
第一代	透光率(%)	87	67	65	75	70	60	65
	产酸(%)	1.58	4.09	4.28	3.16	3.69	4.88	4.28
	实际产酸(%)		2.51	2.70	1.58	2.11	3.29	2.70
第十代	透光率(%)	88	65	64	67	63	65	67
	产酸(%)	1.33	4.28	4.42	4.09	4.48	4.28	4.09
	实际产酸(%)		2.95	3.09	2.76	3.15	2.95	2.75

注: 稀释度为 10^4

了分析比较(表4)。

由表3可见,第十代与第一代相较,LT2与LT3相较,产酸水平相当,没有显著差别。

参 考 文 献

- [1] 乔宝义等: 微生物学报, 23(1): 33—42, 1983.
- [2] 周德庆主编: 《微生物学实验手册》, 上海科学技术出版社, p. 85—88, 1984.
- [3] [日]微生物研究法讨论会编, 《微生物学实验法》, 科学出版社, p. 99—100, 1981.
- [4] Mellon, R. R.: *J. Bacteriol.*, 10: 487—501, 1975.
- [5] Kaneko, HSSE, K. Sagaguchi: *Agr. Chem.* 13: 1007—1013, 1979.
- [6] Hopwood, D. A., Wright, H. M.: 1981, *Microbiology*, 1980 In press.
- [7] Ferenczy, L. et al.: *Experiment*, 31: 1028—1030, 1975, 32: 1156—1158, 1976.
- [8] John, F., Peberdy, J. F.: 生物科学动态, 6: 38—43, 1983.
- [9] Maggio, B. et al.: *Bio. Chem.*, 158: 647—650, 1976.
- [10] Boss, W. F. and Mott R. L.: *CA*, 94: 12993e, 1980.
- [11] Anne, J. A.: *Microbial.*, 105: 201—205, 1979.
- [12] Ferenczy, L. et al.: In «Microbial and Plant Protoplast», p. 177—187, 1976.
- [13] Pesti, M. et al.: Programme and Abstract of The Fifth International Protoplast Symposium, p. 54, 1979.
- [14] 北京大学生物系生物化学教研室编: 《生物化学实验指导》, 高等教育出版社, p. 75, 1984.