

啤酒酵母和产朊假丝酵母属间原生质体融合子的筛选

袁志明

(中科院武汉病毒研究所, 武汉)

摘要 利用不可逆生化抑制剂碘乙酸抑制一亲株细胞的生理活性和利用两亲株细胞间生理性状的差异性, 进行啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 原生质体融合子的筛选, 属间原生质体融合率为 3.47×10^{-4} 。经菌落形态比较, 碳化合物的同化和发酵, DNA 含量测定, 酶型分析, 细胞核染色, 产孢试验和自然的核分离实验证明, 融合子分三种类型: 87.21% 产朊假丝酵母型; 9.02% 啤酒酵母型; 3.77% 真正核融合子型。

关键词 原生质体融合; 啤酒酵母; 产朊假丝酵母; 生化抑制剂

近年来, 人们对利用原生质体融合技术对酵母菌遗传育种进行了广泛的研究, 获得了一些稳定的种间和属间融合子。但在原生质体的融合实验中, 两亲株的原生质体在 PEG 和 Ca^{++} 的作用下, 只有少数细胞会发生融合形成异核体, 最终经核融合导致融合子的形成, 因此必须选择适当的方法将融合子从众多的亲本细胞中筛选出来。目前采用营养缺陷型互补, 线粒体基因标记及采用紫外线或高温杀死一亲本细胞的方法作为选择融合子的标记。这些方法有的虽被广泛采用, 但缺点很多。营养缺陷型的筛选不仅费时、困难, 而且自发回复突变往往会影响结果, 甚至导致工业生产菌株的生产性能明显下降, 严重阻碍了原生质体融合产物在工业生产上的应用。因此必须找到其它适当、有效的方法进行原生质体融合子的筛选。

Wright^[1] 首次采用不可逆生化抑制剂处理细胞不可逆抑制细胞的生理活性作为动物细胞融合的选择性标记获得成功。以后, Nehls^[2] 又将此法引入到植物原生质体的融合中。在酵母原生质体融合中也作了这方面的研究, 获得了真正的核融合子^[3]。本文进一步探讨了用不可逆生化抑制剂碘乙酸不可逆抑制某一亲株细胞酶活性和两亲株细胞间生理性状的差异作为酵母菌属间原生质体融合的筛选系统的可行性, 为进行酵母原生质体融合提供一种有效方

法。

材料与方法

(一) 菌种

融合实验中的两亲本菌株 *Saccharomyces cerevisiae* 396 和 *Candida utilis* AS 2. 1180 由云南微生物研究所提供。

(二) 培养基

1. 固体完全培养基 (YPD): 蛋白胨 2%, 葡萄糖 2%, 酵母膏 1%, 琼脂 2%, pH6.5。
2. 液体完全培养基: 同 YPD, 不加琼脂。
3. 高渗完全培养基 (YPDS): YPD+17% 蔗糖。
4. 基础培养基 (MM, %): 葡萄糖 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07, NaNO_3 0.4, NaCl 0.05, CaNO_3 0.04, KH_2PO_4 0.1, K_2HPO_4 0.01, 微量元素液 1 (硫酸素、吡哆醇、辛酸各 40mg, 生物素 0.2mg, 肌醇 2g, 蒸馏水 1 升), 水洗琼脂 2, pH6.5。
5. 高渗基础培养基 (MMS): MM+17% 蔗糖。

(三) 原生质体形成和再生

活化的 *S. cerevisiae* 396 和 *C. utilis* AS 2. 1180 斜面菌种分别接种在 YPD 液中, 30℃ 摇床 (200r/min) 培养 20 小时, 再按 10% 量分别转接到新鲜的 YPD 液中, 摇床培养 5

小时,取10ml菌液离心,洗涤,收集菌体,悬浮于2ml处理液(1%蜗牛酶,0.1%巯基乙醇,1% EDTA,0.8mol/L KCl; pH5.4)中,30℃处理不同时间,TGL·16G离心机离心(2000r/min, 5min),用0.8mol/L KCl洗涤三次,收集原生质体备用。

原生质体形成率和再生率计算参见谭蓓英等^[4]。

(四) 原生质体融合

新制备的 *C. utilis* 原生质体用0.1%碘乙酸(ID)在30℃下处理40分钟,充分洗涤后,用血球计数计计数原生质体数,按1:1的比例同 *S. cerevisiae* 原生质体混合,离心除上清液,将沉淀悬于1ml 35% PEG 6000 (含20mmol/L CaCl_2 , 0.8mol/L KCl) 中,混匀,30℃处理30—40分钟,用0.8mol/L稀释涂布在MMS上,30℃培养七天,挑取在MMS上长出的菌落。分别以 *S. cerevisiae* 原生质体和用0.1% ID处理过的 *C. utilis* 原生质体涂布在MMS作对照;用未作处理的 *C. utilis* 和 *S. cerevisiae* 原生质体混合物涂布在YPDS上进行融合率的计算。

$$\text{融合率} = \frac{\text{高渗基础培养基上菌落数}}{\text{高渗完全培养基上菌落数}} \times 100\%$$

(五) 融合子的鉴定

1. DNA含量测定:用改良的Schneider法^[5]提取DNA,用二苯胺法测定DNA含量。

2. 酯酶型分析:参照参考文献[6]。

3. 细胞核染色:改进的Nurse法^[7]。即培养24小时的菌体涂布在载玻片上,80℃固定15分钟,水洗,用新鲜Corney固定液(乙醇60ml,氯仿30ml,乙酸10ml)固定15分钟,重新水洗,在含4% Giemsa 染液中染色90分钟,油镜观察并摄影。

实验结果

(一) 原生质体的形成和再生

对数期酵母细胞对蜗牛酶十分敏感,用蜗牛酶处理20分钟,平板菌落计数法计算出原生质体形成率高达80%,但镜检原生质体形成率却只有30%左右,此时大部分细胞是细胞壁被部分分解但对渗透压敏感,保持细胞形态的营养细胞,详细研究结果另文发表。随着酶处理时间的延长,细胞壁被逐渐分解,镜检原生质体形成率也逐渐提高。考虑到我们所分离的原生质体是用于细胞融合研究,所以将酶处理时间延长至40分钟。*S. cerevisiae* 原生质体形成率和再生率分别为97.2%和6.43%,而 *C. utilis* 原生质体形成率和再生率分别为92.4%和4.87%。

另外,增加酶浓度,延长酶处理时间或提高酶处理温度都可以提高原生质体形成率,但原生质体再生率却随之而下降(图1)。用1%蜗牛酶处理 *S. cerevisiae* 两小时,原生质体形成率可达100%,但再生率几乎为零。酶处理时间太长,还会导致原生质体破裂。

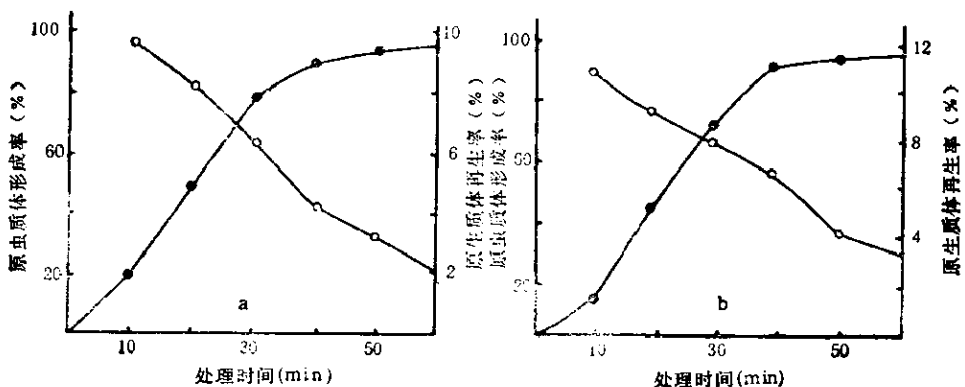


图1 酵母原生质体形成率和再生率之间的关系

—●— 表示原生质体形成率; —○— 表示原生质体再生率
(a: *C. utilis* AS 2.1180; b: *S. cerevisiae* 396)

(二) 碘乙酸对 *C. utilis* 的致死效应

用 0.1% 碘乙酸在 30℃ 处理细胞 40 分钟, 或 0.4% 碘乙酸处理细胞 10 分钟都可以达到完全抑制 *C. utilis* 生长的效果。但较高浓度的碘乙酸处理, 细胞中大部分酶系受抑制, 导致融合实验失败; 在高渗溶液中, 碘乙酸处理时间太长又会影响原生质体的活性和再生^[8], 所以我们采用 0.1% 碘乙酸在 30℃ 处理 40 分钟抑制 *C. utilis* 生长。

(三) 原生质体融合及融合子的筛选

两亲株原生质体用 PEG 6000 和 20m mol/L CaCl₂ 悬浮后, 原生质体立即凝集在一起, 30 分钟后取样观察到原生质体紧密靠在一起, 同时还观察到细胞融合和可能的融合子细胞。按所述方法涂布后, 30℃ 培养 7 天, 对照皿中无任何菌落生长, 而在 MMS 上出现三种菌落: ① 菌落较大、湿润、光滑、淡灰色, 同 *C. utilis* 菌落形态相似, 占 87.21%, 随机挑取 8 株, 记为 SC-F-1—8; ② 菌落较小、湿润、光滑、乳白色, 同 *S. cerevisiae* 菌落形态相似, 占 9.02%, 随机挑取 10 株, 记为 SC-F-11—20; ③ 菌落形态既不同于 *S. cerevisiae*, 也不同于 *C. utilis* 的大菌落, 占 3.77%, 挑取两株, 记为 SC-F-9—10, 经鉴定, 只有这种类型的菌落才是由真正的核融合子形成的。

根据三种菌落出现的机率, 计算出 *C. utilis* 和 *S. cerevisiae* 的属间原生质体融合率为 3.47×10^{-6} , 而以真正核融合子出现机率计

算, 属间原生质体融合率为 1.32×10^{-7} 。

(四) 融合子的鉴定

1. 碳化合物的同化和发酵: 从表 1 可以看出, 融合子对碳化合物的同化和发酵大致可以分三种类型: *C. utilis* 型: SC-F-1, SC-F-4, SC-F-8, 但 SC-F-1 和 SC-F-8 却获得了发酵麦芽糖的能力; *S. cerevisiae* 型: SC-F-17, SC-F-18, SC-F-20 碳化合物同化和发酵特性完全同于 *S. cerevisiae*; SC-F-9 既表现出 *S. cerevisiae* 的特性, 又表现出 *C. utilis* 的特性。

2. 同化硝酸盐试验: 所有的大菌落都能在以硝酸盐为唯一氮源的基础培养基上生长, 而挑取的小菌落再回接在以硝酸盐为唯一氮源的基础培养基上, 却不能在其上生长。

3. 产孢试验: 将筛选到的融合子接种到乙酸盐产孢培养基上, SC-F-1—10 都不能形成子囊孢子, 而 SC-F-10—20 都能象 *S. cerevisiae* 一样形成典型的子囊孢子。

4. DNA 含量测定: 从表 2 可以看出, SC-F-1、SC-F-4、SC-F-8 的 DNA 含量同 *C. utilis* DNA 含量相近, 而 SC-F-17, SC-F-20 的 DNA 含量却同 *S. cerevisiae* 相近, SC-F-9 的 DNA 含量明显高于两亲株, 但并非两亲株 DNA 含量之和。

5. 酯酶型分析: 根据酯酶带的 R_f 值绘出了亲株和融合株的酯酶图谱(图 2)。SC-F-17, SC-F-20 的酯酶带同 *S. cerevisiae* 在 R_f 值

表 1 亲株和融合株对碳化合物的同化和发酵

菌株	碳化合物同化									碳化合物发酵				
	葡萄糖	半乳糖	麦芽糖	纤维二糖	木糖	阿拉伯糖	水杨苷	柠檬酸	果糖	葡萄糖	半乳糖	麦芽糖	鼠李糖	乳糖
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>C. utilis</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
SC-F-1	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
SC-F-4	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
SC-F-8	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
SC-F-9	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
SC-F-17	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
SC-F-18	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
SC-F-20	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-

+: 发酵、生长; -: 不发酵、不生长

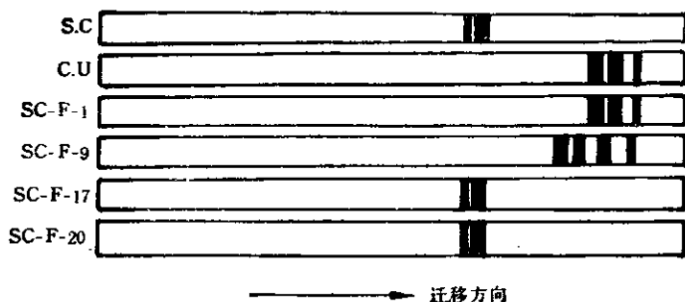


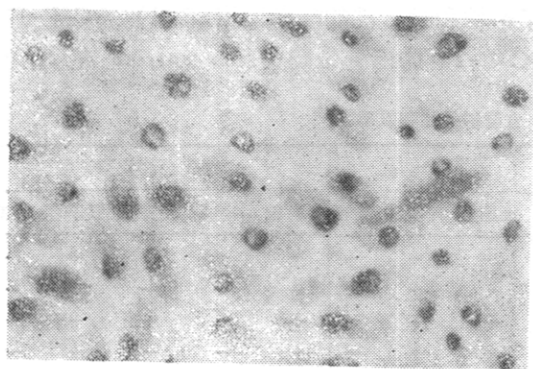
图2 亲株和融合株酯酶型比较

表2 亲株和融合株 DNA 含量分析

菌株	DNA 含量 ($\mu\text{g}/10^8$ 细胞)
<i>S. cerevisiae</i> 396	3.4023
<i>C. utilis</i> AS 2.1183	4.4657
SC-F-1	4.4972
SC-F-4	4.4761
SC-F-8	4.4721
SC-F-9	5.2143
SC-F-17	3.3941
SC-F-20	3.4014

为 64.5, 62.2 处有一主一次两条带; SC-F-1 与 *C. utilis* 酯酶型相同, 在 R_f 值为 83.7、87.0、92.2 处, 有两主一次共三条带; SC-F-9 在 R_f 值为 77.4、81.2、85.6、90.3 处分别有两主两次共四条带, 明显不同于两亲株的酯酶型。

6. 异核子排除: 用 Giemsa 对 SC-F-9 进行细胞核染色, 发现融合子只有一个细胞核, 无双核现象(图 3)。

图3 融合子 SC-F-9 细胞核染色 (2000 \times)

将 SC-F-9 在 YPD 斜面上转接数代后, 再接种到 YPD 液中, 摇床培养 48 小时, 涂布在 YPD 平皿上, 待长出菌落后, 考查了 2161

个菌落的菌落形态, 均未发现两亲株类型的菌落出现, 说明融合子是稳定的。

结合融合子的其它特征, 说明 SC-F-9 融合性状的出现并非由异核体导致, 证明 SC-F-9 是一个真正的核融合子。

讨 论

利用不可逆生化抑制剂碘乙酸抑制一亲株细胞活性的同时, 利用两亲株细胞间生理性状的差异作为酵母属间原生质体融合的选择性标记是可行的。经菌落形态比较、产孢实验、碳化合物的同化和发酵、硝酸盐利用、DNA 含量测定、酯酶型分析和自然的核分离试验证明, 从选择性培养基上筛选的融合子分三种类型。属间原生质体融合率为 3.47×10^{-6} , 同采用其它选择系统所得到的融合率相近^[9-11]。

C. utilis 原生质体经碘乙酸处理后, 原生质体中某些酶系不可逆失活, 从而导致原生质体不能在选择性再生培养基上再生、繁殖; 而 *S. cerevisiae* 原生质体中缺乏硝酸盐还原酶系统, 也不能在以硝酸盐为唯一氮源的选择性再生培养基上再生、繁殖。两亲株原生质体在 PEG 和 Ca^{2+} 作用下发生凝集, 最后发生融合形成同核体或异核体, 前者因得不到酶的互补而不能在选择培养基上再生、繁殖; 后者则因酶的互补而在选择性培养基上再生、繁殖, 最后在 *C. utilis* 基因的作用下重新合成那些被碘乙酸不可逆抑制的酶。这种异核体只有少数会发生核融合形成真正核融合子 (3.77%), 而大部分异核体则会因细胞核的不亲和性而发生核的分离。但由于 *S. cerevisiae* 不能在选择性培养

基上生长,所以由异核体核分离得到的是 *C. utilis* 类型的菌株(87.21%)。 *S. cerevisiae* 类型融合子的出现可能是由无核的 *C. utilis* 原生质体和有核的 *S. cerevisiae* 原生质体融合形成的。无核的原生质体无细胞核,但却带有细胞质中的全部酶系,由于酶的互补,这种融合子在选择性培养基上再生、繁殖。但通过无核的 *C. utilis* 原生质体带来的硝酸盐还原酶系统得不到补充,最后耗尽,所以在选择性培养基上出现了 *S. cerevisiae* 类型的小菌落(9.02%),这类菌落再转接到选择性培养基上也不能生长。一部分 *C. utilis* 类型的融合子也是通过这一方式形成的。

经细胞核染色和自然核分离实验证明 SC-F-9 融合特性的出现是由核融合导致的,是一株稳定的核融合子,但其 DNA 含量并非两亲株细胞 DNA 含量之和,结合其碳化合物的同化和发酵、酯酶型等性状,我们认为,融合子的遗传物质是以一亲株的遗传物质为主,再加上另一亲本的少数几条染色体的非整倍体化形成的^[12, 13]。

SC-F-1 和 SC-F-8 菌株获得了发酵麦芽糖的能力,可能是在原生质体形成、融合处理或再生中抑制基因突变所致。

这一融合子选择系虽然简便、实用,但有一定的局限性,且选择性不强,不可逆生化抑制剂处理剂量、时间难以掌握,同时,真正核融合的融合率较低,难以对融合子进行精细的遗传学分析都是这一选择系统存在的主要问题。

参 考 文 献

1. Wright WE: *Expt. Cell. Res.*, **112**: 295—307, 1978.
2. Nehis R: *Molec. Gen. Genet.*, **166**: 117—118, 1978a.
3. 袁志明等: 云南大学学报, **11**(1): 60—66, 1989.
4. 谭落英等: 真菌学报, **2**(3): 192—196, 1983.
5. Norris JR: *Method in Microbiology*, Vol. 5B, Academic Pr. London and New York, pp. 322—328, 1970.
6. 张龙翔等: 生化实验方法和技术, 人民教育出版社, 北京, 94—111, 1981.
7. Nurse P: *Molec. Gen. Genet.*, **146**: 167—178, 1976.
8. Anh JS et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 1550—1552, 1983.
9. Pina A et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 995—1003, 1985.
10. Provost A et al.: *FEMS Microbiol. Letters*, **31**: 309—312, 1978.
11. Tamaki H: *Molec. Gen. Genet.*, **187**: 177—179, 1984.
12. Graved DP et al.: *Curr. Genet.*, **8**: 49—55, 1984.
13. Perez C et al.: *Curr. Genet.*, **8**: 575—580, 1984.