

# 原生质体在甾体转化研究中的发展和应用

孙 黎 法幼华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

原生质体在生物学上应用始于 1892 年, 由 Klercker 提出质壁分离后切割细胞壁的方法并获得植物的原生质体。几乎与此同时, 就有人开展植物原生质体的融合工作。1937 年 Michel<sup>[1]</sup> 在关于原生质体的综述中曾提到早在 1910 年, 他的老师就进行了制备原生质体与核体的工作。与植物的原生质体技术相比, 微生物原生质体技术起步较晚, 70 年代以前虽有些报道, 但直到 70 年代中期 Kao 和 Michayluk<sup>[2]</sup> 发现了 PEG 对原生质体融合的强促进作用后才得以迅速发展, 在真菌基因核酸转移<sup>[3,4]</sup>, 遗传重组, 转化及酿造和医药工业的菌种改造<sup>[5]</sup> 都得到了广泛的应用。80 年代以来在生物碱的合成<sup>[6]</sup>, 青霉素合成的研究<sup>[7]</sup> 中也开始得到应用。与此同时, 原生质体在甾体转化中的应用揭开了序幕。Sedlacek 等<sup>[8]</sup> 在研究真菌孢子对 Cortisolone 的羟化作用时发现, *Cunninghamella elegans* 孢子的羟化能力只有其菌丝体的一半, 而已发现的 *Aspergillus ochraceus* 及其它几种真菌孢子的羟化活性是其菌丝体的 3—10 倍(单位生物量干重)<sup>[8,9]</sup>, 这一现象

性, 其孢子为单孢子囊孢子, 因而其外壁结构是孢子壁加子囊壁<sup>[11,12]</sup>, 其壁结构(图 1)可以直观的看出 *C. elegans* 孢子的壁结构比正常孢子多了一层子囊壁和一个中间层, 这种结构很有可能降低了甾体底物进入胞内的能力, 因而他们假设: 羟化能力的降低是由于底物难以达到胞内的酶反应位点而导致的, 即加厚的壁结构是羟化能力降低的直接原因。为了验证他们的设想, 在实验中他们选用各种对孢子壁有破坏作用的物质处理孢子后, 用其进行转化并与未处理的孢子进行比较, 实验发现, 经过处理的孢子在外形上变得膨大, 直观上反映出胞壁的松弛。其转化结果表明, 用 KOH、HpE (*Helix pomatia* digestive enzymes) 和 EDTA 处理后的孢子, 其羟化能力分别提高了 2—4 倍, 初步验证了他们的设想(图 2)。

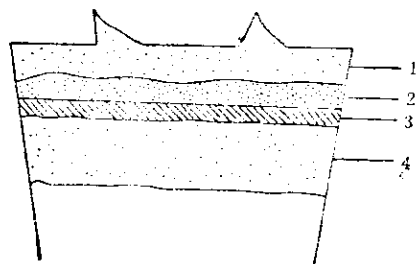


图1 *Cunninghamella* 属真菌孢子壁结构简图

1. 孢子囊壁, 2. 中间层, 3. 孢子外壁, 4. 孢子内壁

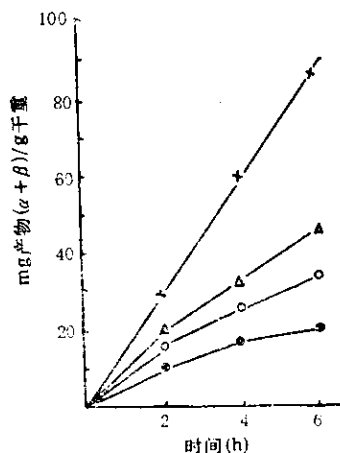


图2 不同方式处理的 *C. elegans* 分生孢子对 11-脱氧皮质醇的羟化作用

+ : KOH 处理, △ : HpE 处理,  
○ : EDTA 处理, ● : 对照

引起了 Jaworki 等<sup>[10]</sup> 的兴趣。他们观察到 *Cunninghamella* 属真菌孢子的产生有其特殊

同时, 实验也证实了孢子壁通透性的增加, 用对呼吸无刺激作用的 EDTA 处理后的孢子,

与未经处理的孢子分别悬浮在 1% 的柠檬酸溶液中,处理后孢子的耗氧提高了将近 2.5 倍,这充分说明柠檬酸这一呼吸刺激物更易进入处理后的孢子,说明处理后孢子的通透性明显提高。另外分别用水、KOH、EDTA 处理孢子,从孢子中渗漏的蛋白质量不同,分别为 3.15mg、16.30mg、26.71mg (/g 干细胞/6h)进一步证明了孢子通透性的改变。综合分析这些实验结果,证明了孢子壁对甾体底物的低渗透性是直接导致转化水平低的原因。从此正式开展了用无壁原生质体转化甾体以获得高水平转化能力的研究。

Dtugoński 等<sup>[13]</sup>于 1983 年提出了制备原生质体用于甾体转化的方法和设想。他们用从 *Trichoderma Viride* CBS 354-33 获得的溶菌酶用溶壁后的 *Hyphoderma roseum* (Fries) 以及 *Cunninghamella elegans* (lender) 的原生质体转化 Cortexolone 和 6 $\alpha$ -fluoro-Cortexolon-16,17-acetonide<sup>[14]</sup>。实验结果表明,在菌丝体浓度为 1.8mg 干重/ml 时,获得原生质体的效率最高,为  $6.44 \times 10^6$  个/mg 细胞干重。同时发现,制备原生质体所用菌丝体的最适菌龄的差别很大,经过 15—24 小时培养的 *H. roseum* (Fries) 菌丝体可获得最高量的原生质体,而用 *C. elegans* 培养菌体时间最好为 7 小时左右。0.8 mol/L MgSO<sub>4</sub> 是获得原生质体的最佳渗透稳定剂,实验结果还表明, *C. elegans* 原生质体具有很高的转化活性。5mg cortexolone 转化 4 小时可获得 1.1mg 的 11 $\alpha$ -羟化产物和 0.4mg 的 11 $\beta$ -羟化产物,但遗憾的是这一实验未与同等条件下的菌丝体转化作平行比较。Sedlaczek 等<sup>[15]</sup>在进一步的实验中,用等干重的原生质体和菌丝体进行对比实验,在 8 小时内,原生质体的羟化能力较菌丝体提高 3 倍 (图 3)。

同时他们发现,尽管其转化能力提高了 3 倍,但其蛋白质含量却十分接近,原生质体为 20.4%,菌丝体为 16.8%,说明其酶含量十分接近。转化能力的大幅度提高并不是由酶量增加所引起,而是由于底物分子更易达到酶反应位点,而提高了转化效率,使整体水平的转化能

力大幅度提高。实验同时也指出,菌丝体以及由其所获得的原生质体具有相同的转化特性,菌丝体的特异性抑制物同样特异性地抑制其原生质体的转化。

原生质体的高转化能力虽然得到了证实,但由于其难于获得,稳定性差,菌丝体再生迅速等问题阻碍了它的应用。Komel 等<sup>[16]</sup>在研究生

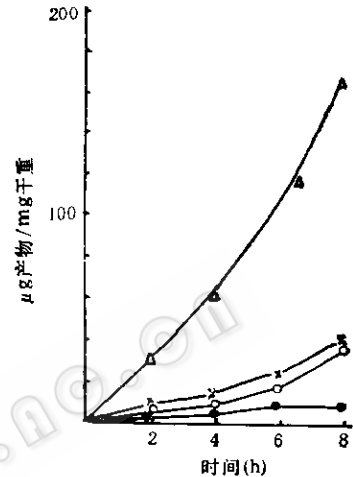


图 3 *C. elegans* 原生质体和菌丝体对 11-脱皮甾醇的羟化作用

△: 原生质体 11 $\alpha$  羟化产物, ×: 菌丝体 11 $\alpha$  羟化产物, ○: 原生质体 11 $\beta$  羟化产物, ●: 菌丝体 11 $\beta$  羟化产物

物碱的合成时运用了原生质体的固定化技术,固定化后的原生质体其稳定性显著增加,且再生菌丝体的时间也由三天推迟到十二天。这一结果使原生质体的实际应用成为可能。同样也为类似的甾体转化提供了方法。Dtugoński<sup>[17]</sup>用脲藻酸钠包埋 *C. elegans* 原生质体转化 Reichstein's substance S, 转化产物为其 11 $\alpha$ -和 11 $\beta$ -衍生物,通过对比实验证明固定化后的原生质体不仅转化寿命较长而且其活力也高于未固定化的原生质体,但实验同时发现阻止原生质体再生的高浓度的 CaCl<sub>2</sub> (0.6mol/L),同时又是其转化的强抑制物,因而必须寻找一种能抑制原生质体再生而又尽可能少的抑制转化的物质。Dtugoński 等<sup>[18]</sup>通过进一步的实验找到了 2-deoxyglucose 和 polyoxins 这两种细胞壁合成的抑制物。尽管固定化后的原生质体在添

加这两种抑制物后转化活性仍低于未固定化的原生质体,但在 155—247 小时内,无菌丝体再生现象,且其转化活性十分稳定。但要完全消除对转化作用的抑制,仍需进一步的研究。

除了直接应用于甾体转化外,原生质体技术也被运用到转化机理的研究上。Długoski 等<sup>[19]</sup>利用原生质体进行了细胞色素 C 的含量测定研究。同时,原生质体融合技术被作为一种菌种改良技术应用到甾体转化研究上。

Jekkel<sup>[20]</sup> 利用在含有万古霉素和甘氨酸的培养液培养菌体,然后再用溶菌酶处理制备获得了 *Mycobacterium* sp. NCAIM00349 和 *Mycobacterium phlei* NACIM00029 的原生质体,通过原生质体的融合重组,其重组率高达 2—6%,用重组后的菌株转化  $\beta$ -Sitosterol 和 Campesterol 的混合物 (2:1),发现绝大多数菌株的转化产物比例发生了变化,其中一株菌还产生了两种新的降解产物。因而可以利用此法改良菌株提高所需中间体的比例或制备新的中间体。

原生质体技术在甾体转化研究中的应用已初见成效,随着研究工作的进一步发展,其应用阻碍将逐步得到克服并使之成为甾体转化的重要手段。

## 参 考 文 献

1. Michel W: *Arch. Exp. zellforsch. Besonders Geweb-zuecht.*, 20: 230—252, 1937.
2. Kao K N and M R Michayluk: *Planta*, 115: 355—367, 1974.
3. Ferenczy L and F Kevei, et al.: *Experientia.*, 31: 50—52, 1975.
4. Ferenczy L and F Kevei, et al.: *Experientia.*, 31: 1028—1029, 1975.
5. Makins JF, Holt G.: *J Chem. Technol. Biotechnol.*, 32: 347—353, 1982.
6. Keller U, Zocher R, et al.: *J Gen. Microbiol.*, 118: 485—494, 1980.
7. Sedlacek L et al.: *European Microbiol. Biotechnol.*, 13: 155—160, 1981.
8. Vezina C, Singh K.: *The Filamentous Fungi*. Vol 1. E. Arnold Ltd. London, P. 158, 1975.
9. Vezina C et al.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 10: 221—268, 1968.
10. Jawouski A et al.: *Eur. J Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 63—69, 1982.
11. Smith JE: *The Filamentous Fungi*, Vol 3., E Arnold Ltd, London P. 158, 1978.
12. Khan SR.: *J Gen. Microbiol.*, 90: 115—124, 1975.
13. Długoski J et al.: 6th International Protoplast symposium Basel. Poster Proceedings. P. 346, 1983.
14. Długoski J et al.: *Can. J. Microbiol.*, 30: 57—62, 1983.
15. Sedlacek J et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 166—169, 1984.
16. Komel R et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 106, 1985.
17. Długoski J et al.: *Acta. Microbiologica Polonica.*, 37: (1): 53—60, 1988.
18. Długoski J et al.: 4th Symposium on Biochemical Aspects of steroid Research, December 5—10, P. 32—33, 1988.
19. Długoski J et al.: 4th Symposium on Biochemical Aspects of Steroid Research. December 5—10, P. 56, 1988.
20. Jekkel A et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 135: 1727—1733, 1989.