

酵母菌属间原生质体融合： 构建高产麦角固醇的优良品系

张博润

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 采用属间原生质体融合技术, 对麦角固醇含量较高、细胞生物量低的裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces*) 单倍体 YG-1-14-58 ($a met^- trp^-$) 与细胞生物量较高、麦角固醇含量低的酿酒酵母 (*Saccharomyces*) 单倍体 YG-28-32-135 ($a ade^- his^-$) 进行原生质体融合, 在高渗基本选择培养基上挑选融合子, 并对获得的大量融合子进行了形态、生理生化、遗传稳定性、细胞生物量及麦角固醇含量等分析, 从中选育出高产麦角固醇的优良品系 F-Ⅰ-37 和 F-Ⅰ-102。

关键词 酵母菌, 属间原生质体融合, 麦角固醇, 细胞生物量

麦角固醇(Ergosterol)是维生素 D₂ 的前体, 经紫外线适当照射可得到维生素 D₂。维生素 D₂ 是一种重要的药品, 可防治婴幼儿佝偻病, 可促进孕妇和老年人对钙、磷的吸收, 对矿工和长期从事夜间工作人员的保健有重要作用。维生素 D₂ 亦可用作不同类型、不同层次的食物、饮料、糖果等的添加剂, 能起到防治和保健之功效, 还可作为饲料添加剂, 能明显增加家禽的孵化率和产蛋率。此外, 麦角固醇还是生产药品“可的松”、“激素黄体酮”的原料。

目前国外主要用酵母菌(产量为细胞干重的2.7%左右)、曲霉(产量为细胞干重的2.0%左右)、青霉(产量为细胞干重的1.8%左右)来

生产麦角固醇, 由于他们重视高产菌种选育、影响麦角固醇产生的因素、代谢调控及优化条件等研究^[1-6], 其生产一直处于稳中有升的趋势。

国内主要用酵母菌生产麦角固醇, 产量仅为细胞干重的0.8—1.2%左右, 与国外相比存在较大差距, 麦角固醇的生产远远不能满足市场需要, 每年需从国外进口一定数量的麦角固醇。我们近年对麦角固醇高产菌的选育作了一些研究^[7]。本文报道利用原生质体融合技术构建高产麦角固醇优良品系的研究结果。

1991-08-22 收稿

1 材料和方法

1.1 菌株

裂殖酵母 YG-1 (*Schizosaccharomyces*) 和酿酒酵母 YG-28 (*Saccharomyces*) 分别为本实验室筛选出的菌株^[7]; YG-1-14 (a) 是 YG-1 的单倍体菌株, YG-28-32 (a) 是 YG-28 的单倍体菌株; YG-1-14-58 (a met⁻ trp⁻) 和 YG-28-32-135 (a ade⁻ his⁻) 分别是 YG-1-14 (a) 和 YG-28-32 (a) 经亚硝基胍诱变获得的突变株; A364 (a) 和 ZW-21 (a) 系本实验室保藏菌株。

1.2 试剂^[7-9]

1.3 培养基及细胞培养^[7,8]

1.4 单倍体的分离: 采用常规法进行单倍体分离

1.5 亚硝基胍诱变^[9]

1.6 原生质体的制备、融合、再生及融合子的鉴定^[8,10,11]

1.7 细胞生物量及麦角固醇含量的测定^[7,8]

麦角固醇含量, 从中选出生物量较高的单倍体 YG-28-32 (a) 和麦角固醇含量较高的单倍体 YG-1-14 (a)。

2.2 亚硝基胍诱变

按文献 [9] 所述, 对以上两株单倍体进行诱变, 从大量突变株中选出细胞麦角固醇含量略有提高的 YG-1-14-58 (a met⁻ trp⁻) 及生物量略有提高的 YG-28-32-135 (a ade⁻ his⁻) 作为融合亲株。

2.3 属间原生质体融合

在本实验条件下, YG-1-14-58 和 YG-28-32-135 的原生质体再生率分别为 34.6% 和 32.8%。三次融合实验共获得 153 个融合子, 融合频率约为 1.7×10^{-6} 。

2.4 融合子的鉴定

2.4.1 融合子的营养要求: 融合亲株 YG-1-14-58 为 met 和 trp 缺陷, YG-28-32-135 为 ade 和 his 缺陷, 它们在 YNB 基本培养基上都不能生长。经原生质体融合后, 由于营养缺陷互补, 所获得的融合子能在 YNB 基本培养基上生长 (表 1)。

2 结果和讨论

2.1 单倍体的分离

采用常规法对 YG-1 和 YG-28 进行单倍体分离, 分别测定单倍体菌株的细胞生物量和

表 1 融合亲株和融合子的营养要求

菌株	培养基						
	YNB	YNB + met	YNB + trp	YNB + ade	YNB + his	YNB + met + trp	YNB + ade + his
亲株							
YG-1-14-58	—	—	—	—	—	+	—
YG-28-32-135	—	—	—	—	—	—	+
融合子							
F- I -1	+	+	+	+	+	+	+
F- I -6	+	+	+	+	+	+	+
F- I -10	+	+	+	+	+	+	+
F- I -25	+	+	+	+	+	+	+
F- I -3	+	+	+	+	+	+	+
F- I -5	+	+	+	+	+	+	+
F- I -37	+	+	+	+	+	+	+
F- II -27	+	+	+	+	+	+	+
F- II -31	+	+	+	+	+	+	+
F- II -102	+	+	+	+	+	+	+

2.4.2 融合子的交配型:本研究使用的两个亲株都是 α 交配型单倍体, 因此获得的融合子为 $\alpha\alpha$ 交配型。自然界存在的酵母菌一般都是二倍体, 由于是自然交配, 所以都是 $\alpha\alpha$ 型, 不可能出现 $\alpha\alpha$ 或 $\alpha\alpha$ 型。而单倍体菌株交配互变的频率很低 (约 10^{-9}), 因此交配型标记可作为稳定的遗传标记, 是鉴定融合子的一个重要指标。 $\alpha\alpha$ 交配型能与 α 型交配形成哑铃形细胞, 而不能与 α 型交配, 因此不能形成哑铃形细胞。测定结果证明, 获得的融合子能与 α 型单倍体菌株 ZW-21 交配, 不与 α 型单倍体菌株 A364a 交配 (表 2)。

表 2 融合亲株及融合子的交配型

菌株	标准菌株	
	A364a (α)	ZW-2 (α)
亲株		
YG-1-14-58	—	+
YG-28-32-135	—	+
融合子		
F-1-1	—	+
F-1-25	—	+
F-1-5	—	+
F-1-37	—	+
F-1-27	—	+
F-1-102	—	+

表 3 亲株及融合子的细胞及大小

菌株	细胞形态	细胞的平均大小			
		平均长轴 \bar{a} (μm)	平均短轴 \bar{b} (μm)	平均体积 \bar{V} (μm^3)	平均轴比 \bar{b}/\bar{a}
亲株					
YG-1-14-58	近球形	4.37	4.25	41	0.97
YG-28-32-135	近球形	4.75	4.59	52	0.97
融合子					
F-1-1	椭圆形	6.12	5.38	92	0.88
F-1-25	椭圆形	6.23	5.44	96	0.87
F-1-5	椭圆形	6.26	5.30	91	0.85
F-1-37	椭圆形	6.19	5.24	88	0.85
F-1-27	椭圆形	6.37	5.49	100	0.86
F-1-102	椭圆形	6.28	5.37	94	0.86

2.4.3 细胞形态及大小的观测:将融合亲株和融合子分别接种于 YEPD 培养基, 28℃ 振荡培养 30h 后取出样镜检和测量细胞的平均大小。分别测量了 50 个左右的细胞。按公式 $\bar{v} = (\pi/6) \cdot \bar{a} \cdot \bar{b}^2$ 计算细胞的体积、平均短轴对平均长轴的比值 (表 3)。镜检结果表明亲株细胞形态近球形, 融合子细胞形态为椭圆形。融合子的细胞体积约为两亲株的细胞体积之和。亲株的平均轴比为 0.97, 接近球形。融合子的平均轴比在 0.85—0.88 之间, 为椭圆形; 镜检结果和计算结果完全吻合。

2.4.4 亲株和融合子的 DNA 含量测定:根据原生质体融合机理, 在融合过程中, 首先发生细胞质融合, 然后进行细胞核融合。以上结果证明了获得的融合子的营养互补及融合子的细胞体积比亲株大。为了进一步证明融合子, 测定了亲株及融合子的 DNA 含量^[11], 测定结果 (四次平均值) 见表 4。

从表 4 中清楚看出, 融合子的 DNA 含量约为亲株的两倍。根据细胞的 DNA 含量推断出上述融合子为二倍体, 这与以上细胞形态大小的观测结果相符。

表4 亲株和融合子细胞的DNA含量及倍体性

菌株	DNA (μg) / 细胞 $\times 10^{-5}$	倍体性
亲株		
YG-1-14-58	7.15	n
YG-28-32-135	7.84	n
融合子		
F-I-1	13.93	2n
F-I-25	14.26	2n
F-I-5	14.24	2n
F-I-37	14.18	2n
F-II-27	14.51	2n
F-II-102	14.09	2n

2.4.5 亲株和融合子的细胞生物量及麦角固醇含量分析: 本研究的目的旨在构建细胞生物量和麦角固醇含量都高的优良菌株, 为此测定了实验起始菌株、单倍体菌株、融合亲株和融合子的细胞生物量及麦角固醇含量, 结果见表5。

表5 亲株和融合子的细胞生物量和麦角固醇含量比较

菌株	生物量	麦角固醇含量
	g 湿菌体/100ml 培养基	g/100g 干重细胞
YG-1	0.63	6.01
YG-28	5.82	0.30
YG-1-14	0.41	4.02
YG-28-32	3.88	0.33
YG-1-14-58	0.43	4.25
YG-28-32-135	3.97	0.35
F-I-37	5.05	2.80
F-II-102	5.24	2.73

从表5中清楚看到, 融合子F-I-37和F-II-102具有双亲株的优良特性, 细胞生物量接近实验起始菌株YG-28, 麦角固醇含量高达2.7%以上。

2.4.6 融合子的遗传稳定性测定: 为了证明融合子的遗传稳定性及排出异核体形成的可能性, 对融合子F-I-37和F-II-102进行了遗传稳定性分析。将融合子菌株活化两次后, 制成菌悬液, 适当稀释后涂YEPD平皿, 30℃培养

2d后分别挑选单菌落, 接入1ml生理盐水/小试管中, 饥饿3—4h后, 分别接种到YNB、YNB+Met、YNB+Trp、YNB+Ade、YNB+His、YNB+Met+Trp、YNB+Ade+His七种培养基平皿上, 测定生长情况。结果F-I-37的215株和F-II-102的226株菌全能在七种培养基上生长, 没有出现核基因标记的分离现象。此结果充分证明融合子的基因标记互补不是以异核体方式进行的, 证实融合子F-I-37和F-II-102是稳定的。

综上所述, 我们通过单倍体分离、亚硝基胍诱变、属间原生质体融合技术成功地构建了高产麦角固醇的优良品系(F-I-37和F-II-102), 它们具有双亲株的优良特性, 细胞生物量接近实验起始菌株YG-28, 麦角固醇含量高达2.7%以上, 具有实际应用前景。

参 考 文 献

- [1] Karst F, Lacroute F. MGG, 1977, 154: 269—273.
- [2] Johnson VW, Singh M, Yadav NK. World J Microbiol Biotechnol, 1994, 10 (1): 114.
- [3] Pinto, Lozano R, Nes WR. Biochem Biophys Acta, 1985, 836: 89—95.
- [4] Servouse M, Karst F. J Biochem, 1986, 240: 541—547.
- [5] Newell SY, Arsuffi TL, Fallon RD. App Envir Microbiol, 1988, 54 (7): 1876—1879.
- [6] Kuchta T, Bartova K, Kubinec R. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 189: 85—91.
- [7] 张博润, 蔡金科, 刘永成. 微生物学通报, 1993, 20 (6): 335—338.
- [8] 张博润, 王永红, 刘书峰, 等. 微生物学通报, 1986, 13 (2): 65—67.
- [9] 张博润, 刘书峰, 王永红, 等. 遗传, 1985, 7 (5): 12—13.
- [10] 张博润, 姜书勤, 徐婉学, 等. 生物工程学报, 1986, 2 (4): 29—34.
- [11] Giles KW, Myers A. Nature, 1965, 206: 93.