

微小根毛霉致病株的原生质体形成条件

韩 黎 陈世平 索继红

(中国人民解放军总医院 北京 100853)

摘要 建立了重要医学真菌——肺微小根毛霉的原生质体生成系统。采用溶细胞酶以及蜗牛酶与纤维素酶联合作用的方式获得了大量原生质体,处于指数生长期、生长旺盛的幼龄菌丝对破壁酶比生长缓慢或老龄菌丝更敏感;作为渗透压稳定剂,无机盐类要好于有机物;原生质体的较适生成温度为 31℃。

关键词 原生质体, 微小根毛霉

分类号 Q939.93

毛霉及根毛霉类丝状真菌广泛存在于自然环境中,是人类接合菌病的重要条件致病菌^[1],其致病机理及流行病学研究,已引起人们的高度重视。掌握毛霉及根毛霉类真菌的原生质体技术是深入研究的关键。探讨肺微小根毛霉^[2]致病株原生质体的形成条件,以期为根毛霉类真菌的基因基础及分子流行病学研究创造条件。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

我国首例肺微小根毛霉致病株,由中国医学真菌保藏管理中心产毒真菌专业实验室提供。经多次传代培养确认性状完全稳定。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖培养基,葡萄糖酵母提取物培养基^[3]。

1.3 主要试剂

溶细胞酶;纤维素酶“R-10”;蜗牛酶;渗透压稳定剂包括氯化钾、氯化钠、硫酸镁、甘露醇、山梨醇、蔗糖;所有酶液用渗透压稳定剂配制,经 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌。

1.4 原生质体制备

点种孢子悬液到铺有透析膜的酵母提取物培养平板上,28℃ 培养 14~18h。将附有幼龄菌丝的透析膜轻轻揭下,称重后反置在盛有酶液的培养皿内。每半小时取样在 Olympus BHS

倒置显微镜下观察原生质体形成情况。酶解结束后,过滤收集,用血球计数器计数,悬浮备用。比较不同酶作用、不同渗透压稳定剂、不同菌龄菌丝以及在不同温度下的酶解效果。

2 结果

2.1 不同因素对微小根毛霉原生质体产生的影响

2.1.1 破壁酶:比较 5mg/ml 溶细胞酶,2% 纤维素酶,2% 蜗牛酶三种单酶及复合酶(2% 蜗牛酶

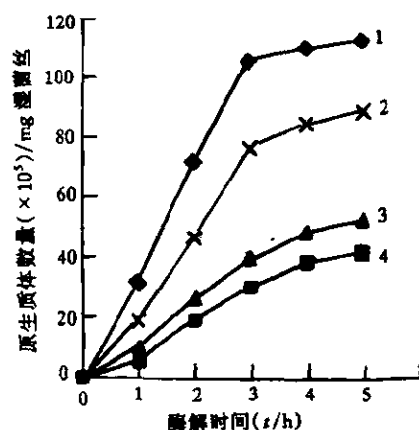


图1 微小根毛霉在 0.6mol/L NaCl 配制的不同酶液中原生质体释放量
1. 溶细胞酶, 2. 纤维素酶+蜗牛酶, 3. 蜗牛酶, 4. 纤维素酶

+2% 纤维素酶)对微小根毛霉原生质体形成的酶解效果。酶解约 4h 后,原生质体的释放速度趋于平缓,达到最高值(图1)。

2.1.2 渗透压稳定剂:分别以 NaCl、KCl、MgSO₄ 及甘露醇,山梨醇,蔗糖作为渗透压稳定剂,利用 5mg/ml 溶细胞酶及复合酶(2% 蜗牛酶 + 2% 纤维素酶)对微小根毛霉进行了酶解实验。作为微小根毛霉原生质体形成的渗透压稳定剂,无机盐类要好于有机醇、糖类。0.6mol/L NaCl 与 0.8mol/L KCl 的缓冲效果基本相仿(图2)。

2.1.3 酶解温度:在选定的酶系统下,微小根毛霉的原生质体生成温度以 31℃ 为宜,温度过高会使原生质体的不稳定,易破裂;过低则不能充分发挥酶的效力。

2.1.4 菌龄:比较了不同生长时期的菌丝在恒定酶系统下的原生质体形成情况。微小根毛霉 16h 菌龄的菌丝释放的原生质体最多。菌龄过长,菌丝细胞壁易发生老化增厚不易于释放原生质体;过短则菌丝体易破裂,释放原生质体数量较少。

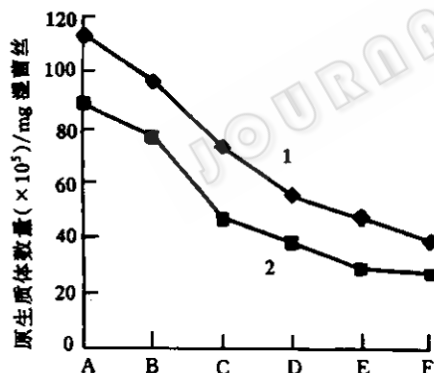


图2 微小根毛霉在不同稳定剂中原生质体释放量

A: 0.6mol/L NaCl; B: 0.8mol/L KCl;

C: 0.7mol/L MgSO₄ D: 1mol/L Sorbitol;

E: 0.6mol/L Mannitol F: 0.8mol/L Sucrose

1.溶细胞酶, 2.蜗牛酶+纤维素酶

2.2 原生质体形成的形态学变化

在 400 倍光镜下,观察菌丝释放原生质体。菌丝经平板酶解 30min 后,原生质体开始形成,大多数是自菌丝的顶端或亚顶端以类似出芽的方式释放。

首先菌丝顶端原生质体聚集,继而胞壁膨胀

突出成球状,逐渐脱离形成原生质体。随着酶解时间的延长,当菌丝酶解成片段(约 1h)后,从打开的菌丝末端或以完全消解菌丝壁的方式形成原生质体(图3)。显微镜下见到的原生质体大小不均(图4)。

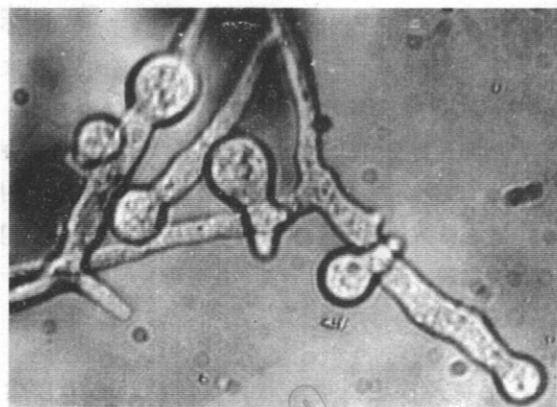


图3 复合酶作用3h后菌丝原位释放原生质体

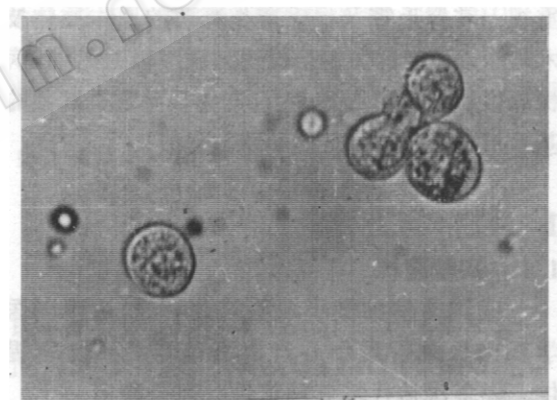


图4 微小根毛霉菌株释放的原生质体

3 讨论

原生质体的分离依赖于菌丝细胞壁在适当的裂解酶中部分或全部降解的结果^[4],同时受渗透压稳定剂、酶解温度、菌丝培养基、菌龄、pH 值等因素的影响。因此,原生质体的分离制备的条件因种而异。微小根毛霉致病株的细胞壁结构复杂,不易形成原生质体。溶细胞酶主要酶切 β -1,3-糖苷键,对丝状真菌的破壁效果较好。另外,混合使用几种酶往往比单独使用一种酶时效要好。但若混合酶浓度过高,也会导

致菌丝体裂成碎片,原生质体产量大大减少。

良好的稳定剂应既能满足微生物的选择要求,又不抑制酶的活性^[5]。作为丝状真菌的渗透压稳定剂,无机盐类的效果一般好于有机类^[6]。这可能与丝状真菌原生质体为保持代谢活性利用醇、糖而改变周围环境,包括 pH、渗透压以至改变稳定性从而影响破壁效果有关。但在一定的有机类稳定剂存在下,某些丝状真菌的原生质体生成效果也相当理想^[7,8]。

生长旺盛的指数生长期菌丝是大量形成原生质体的前提^[9]。16h 菌龄的微小根毛霉菌丝处于指数生长期,生长代谢旺盛,细胞壁易被酶解。另外,随着破壁酶作用时间的延长,微小根毛霉菌丝释放原生质体的方式也由顶端释放转为原位释放。这与 Nohmi 等^[10]、邢来君^[11]观察到的结果一致。

参 考 文 献

[1] Whiteway D E, Virata R L, Wiess L C.

Mucormycosis Arch Intern Med, 1979, 139:944~956.

[2] 陈世平, 冯家熙, 王苗等. 真菌学报, 1990, 9(3): 226~231.

[3] Pan S, Cole G T. Infect Immun, 1992, 60:4872.

[4] Peberdy J F. Enzyme Microbiol Technol, 1980, 2: 23~29.

[5] Hamlyn P F, Bradshaw R E, Mellon F M *et al.* Enzyme Microbiol Technol, 1981, 3(4):321~325.

[6] 梁平彦, 刘宏迪, 肖信发. 植物生理学报, 1981, 7(1): 1~10.

[7] Fraissinet T L, Reymond C P, Fevre M. Curr Genet, 1996, 29(5):496~501.

[8] Nagy A, Vagvolgyi C, Balla E. Curr Genet, 1994, 26: 45~48.

[9] Peberdy J F. In Microbiol and Plant Protoplasts. Academic Press, London, 1976. 39~50.

[10] Nohmi T, Ichi shima E. Agric Biol Chem, 1982, 46(3): 809~810.

[11] 邢来君, 张军, 孙光等. 真菌学报. 1987, 6(4): 242~247.

STUDY ON EXPERIMENTAL CONDITIONS FOR FORMATION OF PROTOPLASTS IN THE PATHOGENIC *RHIZOMUCOR PUSILLUS* FIRST-FOUND IN CHINA

Han Li Chen Shiping Suo jihong

(Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853)

Abstract A protoplasting technique has been developed for the medically important fungus *Rhizomucor pusillus* isolated by Prof. Chen Shi-ping, in order for its genetic research and epidemiological fingerprinting. High yield of protoplast from *R. pusillus* was obtained by using the commercial enzyme, Lyticase and combined enzyme system, the effect of which is much better than using only one enzyme. Actively growing mycelia of *R. pusillus* were more susceptible to protoplasting enzymes than slow-growing or older mycelia. As osmotic stabilizer, (NaCl, KCl) inorganic salts were more effective for the protoplasts formation than organic material. The optimal temperature is 31℃ for the protoplast production of *R. pusillus*.

Key Words *Rhizomucor pusillus*, Protoplast