

单亲灭活柠檬酸杆菌与奇球菌原生质体融合

任柏林¹ 谢水波^{1,2*} 刘迎久¹ 刘金香² 唐东山¹

(1. 南华大学污染控制与资源化技术湖南省重点实验室 湖南 衡阳 421001)

(2. 南华大学铀矿冶生物技术国防重点学科实验室 湖南 衡阳 421001)

摘要: 利用单亲灭活原生质体技术对柠檬酸杆菌和奇球菌原生质体进行了融合, 考察了原生质体制备条件与融合中的影响因素。试验表明, 随着溶菌酶浓度, 酶解时间的增加和温度的上升, 原生质体的形成率呈上升趋势, 而再生率则逐渐下降。另外, 正交试验结果表明, 在 PEG (6000) 浓度 40%、融合时间 10 min、融合温度 42°C、pH 值为 8 的条件下促融, 最大融合频率可达 2.74×10^{-7} 。筛选出来的融合子传代 10 次, 性状稳定。进一步研究发现融合子在铀浓度为 85 mg/L 时, 比柠檬酸杆菌耐受性好; 融合子和亲本吸附比较试验中, 融合子总体吸附性能比柠檬酸杆菌略高。研究结果为耐辐射基因工程菌的构建提供了基础。

关键词: 奇球菌, 柠檬酸杆菌, 融合子

Protoplast Fusion Between Single Inactivated *Citrobacter freundii* and *Deinococcus radiodurans*

REN Bai-Lin¹ XIE Shui-Bo^{1,2*} LIU Ying-Jiu¹ LIU Jin-Xiang²
TANG Dong-Shan¹

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Pollution Control and Resources Technology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

(2. Key Discipline Laboratory for National Defence for Biotechnology in Uranium Mining and Hydrometallurgy, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Single inactivated protoplast fusion technique was adopted in the fusion of *Citrobacter freundii* and *Deinococcus radiodurans*, the condition of protoplast preparation and influence factor of fusion process were examined in this paper. With the lysozyme concentration, enzymolysis time increased and temperature rose, an upward trend of protoplast formation rate was showed, while regeneration rate was found gradually decreased in the test. In addition, the results of orthogonal experiment on fusion factors indicated that the optimal fusion condition was 40% PEG (6000) which induced protoplast for 10 minutes at 42°C, pH 8, and the highest fusion rate reached to 2.74×10^{-7} . The screened fusants had been stably transferred for ten generations. Furthermore, the tolerance to uranium for fusant was greater than that of *Citrobacter freundii* under the concentration of 85 mg/L, and biosorption capa-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 10775065); 湖南省高校创新平台开放基金项目(No. 09K076); 湖南省重点学科基金资助项目(No. 湘教通[2006]180 号)

* 通讯作者: Tel: 86-734-8282141; ✉: xiesbmr@263.net

收稿日期: 2010-01-11; 接受日期: 2010-03-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

bility of fusant was better than that of parental strains appreciably in the comparison experiment. This works lay foundation for constructing radioresistant engineering strains.

Keywords: *Deinococcus radiodurans*, *Citrobacter freundii*, Fusant

原生质体融合(Protoplast fusion)亦称细胞融合,是将双亲株细胞分别通过酶解脱壁,使之形成原生质体,然后在高渗的条件下混合,利用物理、化学或生物助融手段,使双亲株的原生质体间发生相互凝集,使细胞质、核融合,发生基因组间的交换重组,在适宜的条件下再生出细胞壁来,从而获得带有双亲性状、遗传性能稳定的融合子(Fusant)的过程^[1-3]。单亲灭活是将某一亲株灭活,使其只能作为遗传物质的供体,从而可根据另一亲株的特性设计选择条件,从而选择融合子。

奇球菌(*Deinococcus radiodurans*)是迄今为止发现的最抗辐射的微生物之一,对电离辐射、紫外线、干燥、强氧化剂和一些化学诱变剂显示出惊人的抗性,其独特抗性主要归功于高效而准确的DNA修复系统^[4-5]。柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)是一种对重金属^[6]等有高吸附性能的细菌,死菌体对铀的最大吸附量高达 9000 mg/g,是同类细菌的几十倍,可以作为高效生物吸附剂。本研究通过原生质体的融合,将上述双亲的基因组重组,得到融合子,为研究耐辐射融合菌株的构建及其在重金属、核素污染生物修复方面的应用提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 奇球菌(*Deinococcus radiodurans*, AS 1.633)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*, AS 1.1732)购自中国工业微生物菌种保藏中心。

1.1.2 培养基: 斜面培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉提取物 3.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0, pH 7.0。

完全液体培养基(g/L): 牛肉提取物 3.0, 蛋白胨 10.0, 葡萄糖 10.0, NaCl 5.0, pH 7.0。

完全固体培养基: 完全液体培养基中加入 15.0 g/L 的琼脂。

完全半固体培养基: 完全液体培养基中加入 8.0 g/L 的琼脂。

再生固体培养基(g/L): 牛肉提取物 3.0, 蛋白胨

10.0, 葡萄糖 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0, 蔗糖 171.5, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4.06, pH 7.2。

再生半固体培养基: 再生固体培养基中的琼脂改为 8.0 g/L。

1.1.3 试剂: 高渗磷酸缓冲液(P 液): 0.2 mol/L 磷酸缓冲液, pH 6.2, 0.7 mol/L 甘露醇, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 备用。

原生质体稳定液(SMM): 0.5 mol/L 蔗糖, 20 mmol/L MgCl_2 , 0.02 mol/L 顺丁烯二酸, pH 6.5。 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 备用。

青霉素液: 浓度为 10 U/mL, 生理盐水配制, 过滤除菌。

EDTA 液: 0.36 mol/L, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 备用。

溶菌酶: 1.0、1.5、2.0 g/L, 用 SMM 液配制, 过滤除菌, -20°C 保存。

新生磷酸钙: 1 mol/L CaCl_2 , 0.02 mol/L K_2HPO_4 (分开配制, 使用前等体积混合) 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 备用。

PEG 溶液: PEG (6000)用 SMM 液配制, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 备用。

30% PEG: 3 g PEG 定容至 10 mL, pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0

40% PEG: 4 g PEG 定容至 10 mL, pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0

50% PEG: 5 g PEG 定容至 10 mL, pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0。

1.2 试验设计与方法

1.2.1 原生质体的制备: 将两菌种培养到对数增长期(奇球菌为 30 h, 柠檬酸杆菌为 18 h), 奇球菌中加入青霉素液至终浓度为 0.3 U/mL^[7], 继续培养 2 h, 分别取两菌液 10 mL, 4000 r/min 离心 15 min, P 液洗涤 2 次, 用 SMM 调整菌体浓度为 10^7 个/mL。取 4 mL 柠檬酸杆菌液加入 5 mL 3.0 g/L 的溶菌酶, 37°C 酶解 10 min 后, 加入 1 mL 0.36 mol/L EDTA 溶液, 继续酶解 90 min; 取 5 mL 奇球菌液加入 5 mL

4.0 g/L 的溶菌酶, 37°C 酶解 120 min。酶解后的两菌种 4500 r/min 离心 20 min, 用 SMM 液洗涤 1 次, SMM 液悬浮。将原生质体分别用 SMM 和水稀释, 涂布于再生双层培养基, 30°C 恒温培养, 测定原生质体的再生率。

$$\text{再生率} = \frac{A-B}{C} \times 100\%$$

A: SMM 稀释后再生菌落数;

B: 水稀释后生长的菌落数;

C: 血球计数法测得的总原生质体数。

由于奇球菌在再生培养基上无法生长, 无需灭活。将制备好的柠檬酸杆菌原生质体进行紫外灭活, 取 5 mL 菌液于 9 cm 平皿中, 在紫外灯下灭活 2 h。

1.2.2 原生质体的融合: 取 1 mL 奇球菌原生质体和 1 mL 紫外灭活后的柠檬酸杆菌原生质体混合,

5000 r/min 离心 20 min, 加入 0.2 mL 新生磷酸钙和 1.8 mL PEG (6000) 溶液, 混合均匀, 一定温度下作用一定时间后, 立即用 SMM 液将其大量稀释, 5500 r/min 离心 20 min, 收集融合子, 用 SMM 液悬浮, 分别用 SMM 和水稀释, 涂布于再生固体培养基上, 双层培养法 30°C 培养, 计算原生质体的融合率^[7-8]。考察 PEG (6000) 的浓度、pH 值、融合温度、融合时间 4 个因素, 每个因素设立 4 个水平, 通过正交试验, 以融合频率为控制目标, 确定最佳融合条件。其因素水平设置见表 1。

$$\text{融合率} = \frac{2F}{D-E} \times 100\%$$

D: 两种菌体 SMM 稀释后再生菌落数之和;

E: 两种菌体水稀释后再生菌落之和;

F: 融合后再生培养基上亮白色菌落的个数。

表 1 因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor			
	温度 Temperature (°C)	时间 Time (min)	pH	PEG 浓度 Concentration of PEG (%)
1	34	5	7	30
2	38	10	8	40
3	42	15	9	50
4	46	20	10	60

1.2.3 融合子的检出与鉴定: 培养 36 h 后, 双层培养基中开始出现亮白色菌落, 与柠檬酸杆菌的灰白色明显不同, 成熟的菌落比柠檬酸杆菌的菌落大, 初步判断为奇球菌与柠檬酸杆菌融合子。对此菌种进行镜检, 用消毒牙签挑取此亮白色菌落反复传代, 绘制生长曲线, 保存此菌种。

1.2.4 融合子和亲本对铀的耐受性比较: 从培养了 12 h 的融合子、40 h 的奇球菌、24 h 的柠檬酸杆菌液体培养基中吸取 1 mL 菌悬液分别接种到含 U(VI) 浓度为 85 mg/L 的液体培养基中, 定时测量其 OD_{600} , 比较它们的耐受性。

1.2.5 融合子和亲本对铀的吸附性能比较: 用八氧化三铀配制 1 g/L 的铀标准溶液。用移液管准确量取一定量的新鲜菌悬液, 加入一定起始浓度的铀标准溶液, 按不同的试验要求振荡 (160 r/min) 吸附一定时间, 离心分离 (8000 r/min、15 min), 上清液用微孔滤膜过滤 (孔径 0.45 μm)。用三氯化钛还原/钼酸铵氧化滴定法测定滤液中残留的铀质量浓度^[9]。分别计

算菌体对铀的吸附率和吸附量, 公式为

$$\text{吸附率 } R (\%) = (C_i - C_j) / C_i \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{吸附量 } q (\text{mg/g}) = (C_i - C_j) / C_b \quad (2)$$

式中 C_i 和 C_j 分别为铀离子的起始和最终质量浓度, mg/L; C_b 为菌体质量浓度, g/L。

2 结果与讨论

2.1 原生质体制备条件与灭活

选用溶菌酶的终浓度为 1.0、1.5、2.0 g/L, 酶解时间为 60、90、120 min, 酶解温度为 32°C、37°C、42°C。奇球菌在对数前期加入青霉素进行预处理, 可以降低细胞表面的肽聚糖结构之间的交联程度, 使细菌不能合成完整的具有空间网络结构的细胞壁, 细胞壁结构疏松, 溶菌酶易发生作用, 增加脱壁效果^[10]。柠檬酸杆菌是 G^- , 其细胞壁外侧有由蛋白质、脂质肽聚糖组成的外膜, 加入 EDTA, 可以螯合细胞壁上稳定的 2 价阳离子, 使溶菌酶便于作用。

随着溶菌酶浓度、酶解时间和温度的上升,原生质体的形成率上升,但细胞去壁越彻底,修复受损的细胞壁就越难,以至难以再生细胞壁,再生率显著下降,这点和相关文献报道相同。综合考察形成率和再生率两个因素,确定奇球菌原生质体的最佳制备条件为:溶菌酶浓度 2.0 mg/L,酶解时间 120 min,酶解温度 37℃,形成率为 86%,形成的原生质体为透明状球体见图 1。柠檬酸杆菌原生质体的最佳制备条件是:溶菌酶浓度 1.5 mg/L,酶解时间 90 min,酶解温度 37℃,形成率为 93%,再生率为 36%,见图 2。紫外灭活 2 h 灭活率为 98%。

2.2 原生质体的融合因素

从表 2 看出,对融合过程影响因素大小为 PEG 的浓度 > 作用时间 > 融合温度 > pH 值,根据 K 值的大小,可以确定最佳的融合条件为 A₃B₂C₂D₂,即为 PEG 浓度 40%,融合时间 10 min,融合温度 42℃,pH 值 8.0,在此条件下进行融合得到的融合率为 2.74 × 10⁻⁷。

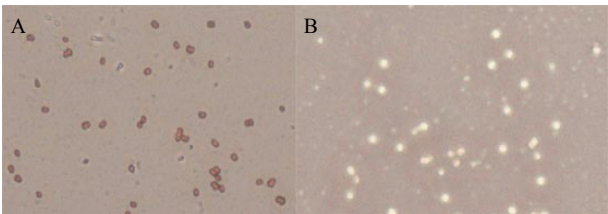


图 1 *D. radiodurans* (A)与其原生质体(B)的结构形态(× 400)
Fig. 1 Configuration of *D. radiodurans* (A) and its protoplast (B) (× 400)

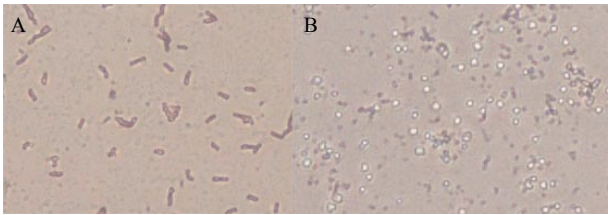


图 2 *Citrobacter freundii* (A)与其原生质体(B)的结构形态(× 400)
Fig. 2 Configuration of *Citrobacter freundii* (A) and its protoplast (B) (× 400)

表 2 原生质体融合因素正交试验结果与极差分析
Table 2 Results of orthogonal experiment on fusion factors of protoplast and range analysis

试验号 Number	因素 Factor				
	温度(A) Temperature (°C)	浓度(B) Concentration (%)	pH (C)	时间(D) Time (min)	融合率 Fusion rate (10 ⁻¹⁰)
1	1	1	1	1	10.400
2	1	2	2	2	983.000
3	1	3	3	3	54.100
4	1	4	4	4	0.153
5	2	1	2	3	40.800
6	2	2	1	4	864.000
7	2	3	4	1	30.600
8	2	4	3	2	9.250
9	3	1	3	4	59.200
10	3	2	4	3	926.000
11	3	3	1	2	67.800
12	3	4	2	1	2.580
13	4	1	4	2	68.500
14	4	2	3	1	442.000
15	4	3	2	4	38.700
16	4	4	1	3	0.231
K1	261.913	44.725	235.608	121.395	
K2	236.162	803.750	266.270	282.137	
K3	263.895	47.800	141.137	255.283	
K4	137.358	3.054	256.313	240.513	
R	126.537	800.696	125.133	160.742	

结果表明, 当使用 40% 的 PEG (6000) 时, 融合率较高; PEG 可以使原生质体的膜电位下降, 其脱水作用扰乱了分散在膜表面的蛋白质和脂质的排列, 提高了膜的流动性, 从而促进融合; PEG 在促进细胞融合的过程中也会对细胞产生毒害, 一般不能超过 15 min, 融合完毕需立即稀释菌液, 并尽快离心洗涤。较高的温度可以加速细胞膜的流动性, pH 值能改变体系的电性状态, Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 形成不溶于水的配合物, 成为细胞间的钙桥, 从而引起融合。在较高的温度, 较高的 pH 值, Ca^{2+} 存在的情况下可以达到最大融合频率。

在融合过程中, 离心的时间、转速以及细菌的培养时间也很重要。融合后的转速太低, 会造成原生质体的流失, 转速过高可能导致刚融合后的原生质体被打散, 造成融合率的显著下降。

2.3 融合子的检出与鉴定

本课题组在研究过程中, 多次试验发现奇球菌在再生培养基上无法生长或长势极差, 所以在再生培养基上生长的菌落只可能是融合子或极少量未灭活的柠檬酸杆菌, 而奇球菌为橘红色, 很容易辨别, 利用这一特点对融合子进行筛选。融合后培养 18 h, 培养基上有灰白色菌落出现, 为柠檬酸杆菌, 见图 2, 呈杆状。36 h 后, 有亮白色菌落出现, 显微镜下观察, 亮白色菌落为一种新的菌种, 呈球形, 和柠檬酸杆菌明显不同, 初步鉴定该菌种为融合子, 见图 3。将亮白色菌落挑出传代 10 次, 发现融合子菌落生长较为稳定, 繁殖速度较快, 培养 12 h 即可达到对数增长期。

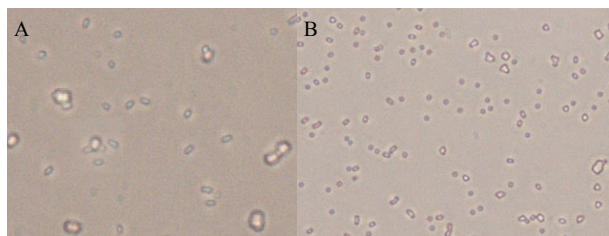


图 3 融合中的原生质体(A)及融合子(B)结构形态($\times 400$)
Fig. 3 Protoplasts in the process of fusion (A) and Configuration of fusant (B) ($\times 400$)

2.4 融合子和亲本对铀的耐受性比较

由图 4 可以看出, 在铀浓度 85 mg/L 的培养基中, 柠檬酸杆菌已不能生长并逐渐死亡, 奇球菌在经过 45 h 的适应期后开始生长, 融合子在经过 22 h

的适应期后开始生长, 并生长良好, 这有力地说明融合子的耐受性有了一定的提高, 在较高的铀浓度中还能生长。

2.5 融合子与亲本吸附性能比较

将融合子、柠檬酸杆菌、奇球菌分别培养 12、18 和 40 h 后, 在 pH 值为 6, 铀起始浓度为 40 mg/L, 不同的菌体浓度下, 吸附 1 h, 比较三者的吸附率和吸附量。

◆ *Deinococcus radiodurans* (Blank) ■ *Citrobacter freundii* (Blank)
✕ *Deinococcus radiodurans* (85 mg/L) ▲ *Fusant* (Blank)
★ *Citrobacter freundii* (85 mg/L) ● *Fusant* (85 mg/L)

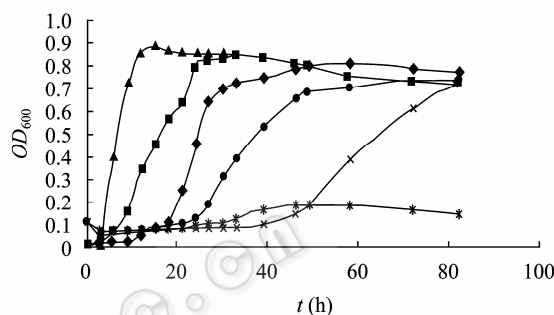


图 4 融合子与亲本耐受性比较(85 mg/L 的铀)
Fig. 4 Comparison of tolerance of fusant and its parental strains (Uranium concentration 85 mg/L)

◆ Biosorption rate of *Citrobacter freundii*
▲ Biosorption rate of *Deinococcus radiodurans*
✕ Biosorption rate of fusant
■ Biosorption capacity of *Citrobacter freundii*
★ Biosorption capacity of *Deinococcus radiodurans*
● Biosorption capacity of fusant

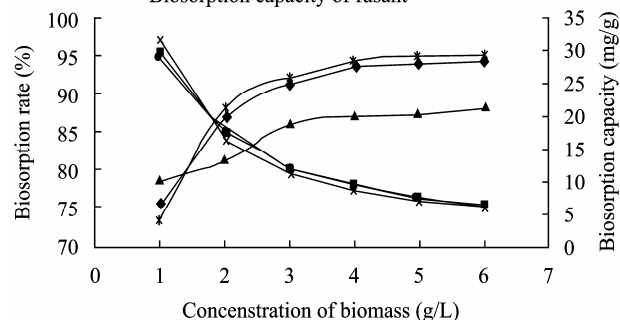


图 5 融合子与亲本菌株吸附性能比较
Fig. 5 Comparison of biosorption capability between fusant and parental strains

由图 5 看出, 融合子在菌体浓度大于 2 g/L 时, 吸附率和吸附量都比同期的奇球菌和柠檬酸杆菌略高, 吸附率比柠檬酸杆菌高出近 0.9%, 吸附量高出 0.1 mg/g。但吸附率和吸附量并没有大幅度的增加,

可能是融合后基因重组引起引物结合位点改变的结果,或者融合子从原菌株获得的遗传信息不完全所致。

3 结论

本试验中得到的柠檬酸杆菌原生质体制备最佳条件为:溶菌酶浓度 1.5 mg/L,酶解时间 90 min,酶解温度 37°C。此条件下的原生质体形成率为 93%,再生率为 36%;奇球菌原生质体的最佳制备条件为:溶菌酶浓度 2.0 mg/L,酶解时间 120 min,酶解温度 37°C,形成率为 86%。

融合正交试验表明:最佳融合条件为 PEG 浓度 40%,融合时间 10 min,融合温度 42°C, pH 值 8,其中 PEG 的浓度是主要影响因素,在最佳融合条件下的融合率为 2.74×10^{-7} 。

融合子对铀具有明显的耐受性,在同一条件下,相比亲本柠檬酸杆菌,融合子的耐受性有了一定的提高。

在 pH 值为 6、铀起始浓度为 40 mg/L、吸附时间 1 h 条件下,融合子比亲本柠檬酸杆菌吸附率高出 0.9%,吸附量高出 0.1 mg/g。

试验研究表明,利用 PEG (6000)融合剂在高钙环境下对单亲灭活的柠檬酸杆菌与奇球菌原生质体进行融合是可行的,为进一步研究融合子的耐辐射性和高吸附性能提供基础方法,为构建耐辐射超富集核素基因工程菌的研究提供了技术基础。

参 考 文 献

- [1] 罗立新. 细胞融合技术与应用. 北京: 化学工业出版社, 2003: 70-89.
- [2] 黎永学, 张德纯, 李代昆. 双歧杆菌和酿酒酵母原生质体融合子筛选方法的探讨. 食品科学, 2006, 27(2): 84-86.
- [3] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2005: 63-85.
- [4] Battista JR, Earr AM, Park MJ. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation. *Trends Microbiol*, 1999(7): 362-365.

- [5] Mattimore V, Battista JR. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of Bacteriology*, 1996(177): 5232-5237.
- [6] 柏云, 张景, 冯易君. 生物吸附法处理含铀废水研究进展. 四川环境, 2003, 22(2): 9-13.
- [7] 周海霞. 灭活原生质体融合选育 α -ALDC 高产菌株. 河北大学硕士学位论文, 2004.
- [8] 胡欣荣. 利用原生质体融合技术选育高纤维素酶活枯草芽孢杆菌的研究. 西华大学硕士学位论文, 2006.
- [9] EJ 267.3—1984 铀矿石中铀的测定.
- [10] 金玉娟, 刘自谔, 任建平. 芽孢杆菌和欧文氏菌的原生质体融合的研究. 微生物学杂志, 2002, 22(3): 10-11.
- [11] 王芬, 由媛, 全丽. 双亲灭活的原生质体融合株啤酒酵母 DR9-2 的构建及其特性的研究. 酿酒, 2007, 34(5): 72-74.
- [12] Khattab AA, Bazaraa WA. Screening mutagenesis and protoplast fusion of *aspergillus niger* for the enhancement of extracellular glucose oxidase production. *Ind Microbiol Biotechnol*, 2005(32): 289-294.
- [13] 刘伊强, 王雅平. 芽孢杆菌原生质体的形成、再生及种间融合的研究. 微生物学报, 1994, 34(1): 76-80.
- [14] 霍乃蕊, 韩克光. 细胞融合技术的发展及应用. 激光生物学报, 2006, 15(2): 209-213.
- [15] Yong Zhang, Shumei Lin, Yujing Zhu. Protoplast fusion between *Geotrichum candidum* and *phanerochaete chrysosporium* to produce fusants for corn stover fermentation. *Biotechnol Lett*, 2006(28): 1351-1359.
- [16] Sivakumar U, Kalaichelvan G, Ramasamy K. Protoplast fusion in *Streptomyces* sp. for increased production of laccase and associated ligninolytic enzymes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2004(20): 563-568.
- [17] Shuibao Xie, Lian Hu, Xiaojian Zhang, et al. Study on Biosorption Efficiency and Mechanism of Uranium by *Bacillus subtilis*: Progress in Environmental Science and Technology Vol. I. Beijing: Science Press & Sciece Press USA Inc, 2007: 293-298.
- [18] Shuibao Xie, Jing Yang, Chao Chen, et al. Study on biosorption kinetic and thermodynamics of uranium by *citrobacter freudii*. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2008(99): 126-133.