

## 黑曲霉原生质体电融合研究

周正红\* 方善康

(山东大学微生物系, 济南 250100)

以NTG和UV分别对生淀粉糖化酶菌株——野生型黑曲霉 N-11, N-16 (*Aspergillus niger*) 进行诱变处理获Lys<sup>-</sup>和Arg<sup>-</sup>两类营养缺陷型。采用纤维素酶和蜗牛酶复合酶处理其菌丝并探讨了酶浓及菌龄等因素对原生质体形成和再生的影响。以BAEKON-2000型基因转移仪将上述营养缺陷型进行原生质体电融合处理。产生高融合率的最佳参数为: 脉冲幅度4.5kV, 脉冲数32, 脉宽62.5μs, 电激时间0.2s, 距离3mm, 周期数10。融合率可达60%。经连续传代7次获得4株稳定的融合子, 经孢子体积, 核DNA含量, 生长速度测定证明上述融合子是种内杂合二倍体。以PFA处理得稳定的单倍体分离子。

**关键词** 黑曲霉; 原生质体; 电融合

70年代末和80年代初, Zimmermann等人率先采用了电融合技术进行细胞融合研究, 通过对几十种植物和微生物原生质体, 动物细胞和脂质体进行了电融合实验<sup>[1,2,3]</sup>, 为建立细胞电融合技术和对融合机制的认识奠定了基础, 它表明电融合是一种具有普遍意义的新方法。

本实验采用美国最近出品的基因转移仪(BAEKON-2000)。目前使用该仪器成功的报道有美国的 Macnail, J.<sup>[16]</sup>利用BAEKON将质粒DNA导入紫色链霉菌*Streptomyces lividans*中。中科院微生物所蔡文启<sup>[8]</sup>等人利用电融合技术成功地产生了黄瓜花叶病毒的单克隆抗体等。

国内外有关电融合在微生物方面的研究虽然取得不少新进展, 所试菌种日益扩大, 但对具有重大工业生产价值的黑曲霉的研究, 至今尚未见报道。为此, 本实验采用BAEKON-2000基因转移仪以黑曲霉(生淀粉糖化酶菌株)为亲本进行原生质体电融合研究。为组建高活力生淀粉糖化酶的菌株提供一种新的方法。

## 材料和方 法

### (一) 菌种来源及遗传标记

*Aspergillus niger* N-11, N-16 两菌株均属生淀粉糖化酶产生菌(本室自淀粉仓库和粮食堆积场采样筛选得到<sup>[20]</sup>)。以UV或NTG处理<sup>[22]</sup>分离纯化并传代7次后, 选取三株稳定突变型为直接亲本菌株: *A. niger* n-16-cc-5 Arg<sup>-</sup>(由*A. niger* n-16经NTG诱变获得), 简称C-5号菌; *A. niger* n-11-(2)Lys<sup>-</sup>和n-11-(3)Arg<sup>-</sup>(由*A. niger* n-11经UV诱变获得)分别简称2号及3号菌。

### (二) 培养基

1. 基本培养基 (MM, g/L) KNO<sub>3</sub>

本文于1991年12月4日收到。

\*现在中科院广州化学研究所工作。广州510650

本文在中科院微生物所实验期间得到梁平彦、陈琦、蔡文启等先生的热情指导和帮助, 姜国扬、张露茜老师帮助调试电融合仪, 本校生物系刘玉璋先生给予亲切指导, 我系本科毕业生李东华参加部分工作, 在此表示衷心感谢。

3.0,  $K_2HPO_4$  1.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5, 葡萄糖10, 加蒸馏水至1000ml, 琼脂20, 为限制菌落的扩展加0.5g去氧胆酸钠。

2. 完全培养基 (CM): 在MM培养基中添加酵母膏5g, 土豆汁200ml (用100g土豆制成)。

3. 菌丝生长液体培养基 (GM): 按文献[23]。

4. 再生培养基 (RCM): 采用双层琼脂法, 以 0.7mol/L KCl 或 0.6mol/L NaCl 制成的土豆高渗培养基, 上层及下层培养基分别含 1% 和 2% 的琼脂。

5. 选择培养基 (RMM): 供融合子生长与再生, 配方与MM相同。

### (三) 主要药品及仪器

蜗牛酶: 中国科学院生物物理所制备; 纤维素酶: 1) 上海东风试剂厂。2) Sigma公司; 对氟苯丙氨酸 SIGMA 公司产, 供作融合单倍体化试剂; 小牛胸腺 DNA 标准样品: 上海生物制药厂产, 供制作DNA标准曲线; BAEKON-2000 基因转移仪: 美国贝康BAEKON 有限公司制造。

### (四) 方法

#### 1. 原生质体的制备及再生

(1) 菌丝培养: 见文献[5]。

(2) 酶液的配制: 见文献[1]。

(3) 原生质体的制备: 见文献[1, 5, 12]。

(4) 干菌丝的制备: 见文献[4, 5]。

(5) 原生质体的再生: 见文献[1]。

$$\text{再生率}(\%) = \frac{\text{RCM生长的菌落数} - \text{水稀释样品的RCM上菌落数}}{\text{显微计数的原生质体数}} \times 100\%$$

2. 原生质体电融合处理: 两类营养缺陷型原生质体浓度为 $10^6$ 个/ml, 按 1:1 混合, 取 100 $\mu$ l 作为融合体积, 并以微量

注射器小心地转移到融合杯中, 电激后取出细胞悬液加到 RMM培养基中作系列稀释, 取适量稀释液分别在固体 (RCM) 和 RMM 培养基上倒平皿, 28 $^{\circ}$ C 培养 3 天后开始数菌落。

$$\text{融合频率}(F_f) = \frac{\text{在RMM上出现的菌落数}}{\text{在RCM上出现的菌落数}} \times 100\%$$

3. 孢子体积的测定: 按文献[2]。

4. 孢子的 DNA 含量测定: 按文献[2, 21]。

5. 生淀粉糖化酶活性的测定: 按文献[9]。

6. 融合子的单倍体分离子诱发及纯化: 按文献[3]。

## 结果和讨论

### (一) 原生质体的制备

1. 酶系统的选择: 本实验采用了纤维素酶和蜗牛酶的混合酶液进行黑曲霉原生质体释放的研究, 以双0.3%, 双0.4%, 双0.5%三种酶浓度处理2号, 3号菌 12h菌龄的菌丝, 结果表明: 2号菌在双0.4%酶浓度时释放原生质体数量最高。(10.06  $\times 10^6$  个/mg干菌丝), 3号菌则在双0.5%酶浓下释放量最高(7.57  $\times 10^6$  个/mg干菌丝)。C-5号菌在双0.5%酶浓下, 释放的原生质体数与2号菌很接近(2号菌和C-5号菌分别为 4.02  $\times 10^6$  和 4.20  $\times 10^6$  个/mg干菌丝)。

2. 菌丝菌龄的选择: 在 0.7mol/L KCl 双0.5%酶浓度下处理11—15h菌龄的菌丝, 结果表明: 2号、3号菌随着菌龄的递增原生质体的获得量呈递减趋势。超过16h菌龄的菌丝细胞壁难以被酶解。在本实验条件下, 11—12h的菌龄为最佳破壁时间, (在11与12h菌龄时, 2号菌的

原生质体数分别是  $11.34 \times 10^6$  和  $5.81 \times 10^6$  个/mg干菌丝。3号菌分别是  $11.78 \times 10^6$  和  $5.50 \times 10^6$  个/mg干菌丝)。

3. 原生质体大小及形态的观察: 在本实验的任何条件下(不同菌龄, 不同酶浓度, 不同的酶系)制备的原生质体, 经显微测量, 直径在  $0.5-4.0 \mu\text{m}$  范围内, 平均为  $2.0 \mu\text{m}$  左右。

### (二) 原生质体的再生

1. 不同菌龄菌丝的原生质体再生能力的比较: 11, 12, 13, 14, 15h 五种菌龄的菌丝经双  $0.5\%$  混酶液制成原生质体, 于固体再生培养基中再生, 菌丝菌龄愈长, 原生质体的再生率愈高。其中2号和3号菌12h菌丝的再生率分别为  $0.22\%$  和  $4.04\%$ , 15h的再生率分别为  $7.77\%$  和  $6.28\%$ 。

2. 不同酶浓度处理形成的原生质体再生能力的比较: 取12h培养物, 分别用双  $0.3\%$ , 双  $0.4\%$ , 双  $0.5\%$  的酶液处理。

实验表明, 酶浓度越高, 原生质体的释放量越大, 其再生率却比低浓度酶处理得到的原生质体明显地低一些。其中2号和3号菌在双  $0.4\%$  酶浓度时的再生率分别为  $5.01\%$  和  $5.30\%$ 。

### (三) 原生质体电融合

BAEKON-2000基因转移仪的融合效率与多种因素有关(见表1)。

1. 脉冲电场幅度对融合子形成的影响: 在表1的实验结果中, 选出了1、2、3、8、9五组实验条件及结果探讨脉冲幅度对融合子形成的影响。结果表明: 1) 随着脉冲幅度的增加, 在基本培养上长出融合子的数量呈下降趋势, 融合率也随之下降; 2) 电融合脉冲幅度可选在  $4.5-6.0 \text{kV}$  范围内, 最佳脉冲幅度为  $4.5 \text{kV}$ ; 3) 脉冲幅度在  $9.0 \text{kV}$  以上, 虽然还有一定数量的融合子长出(有  $10\%$  以上的融合率), 但融合子要经过较长时间才能生长, 且成活率过低。

表1 电融合参数探讨实验结果

Table 1 Effect of electric field parameter on protoplast fusion frequency

No of experiment	Amplitude A(kV)	Number of pulse No	pulse width(us)	Burst time Tb(s)	Cycle	Dial(mm)	Fusion frequency Ff(%)	The period after electrifusion
1	3.0	$2^5(32)$	62.5	0.2	10	3	4.44	2
2	4.5	$2^5(32)$	62.5	0.2	10	3	60.00	2
3	6.0	$2^5(32)$	62.5	0.2	10	3	20.00	4
4	6.0	$2^6(64)$	62.5	0.2	98	2	54.55	6
5	6.0	$2^5(32)$	62.5	0.2	98	8	44.38	5
6	7.5	$2^5(32)$	62.5	0.2	10	5	75.00	5
7	7.5	$2^5(32)$	62.5	0.2	10	4	50.89	6
8	7.5	$2^3(32)$	62.5	0.2	10	3	16.00	9
9	9.0	$2^3(32)$	62.5	0.2	10	3	11.11	11
10	10.0	$2^4(4)$	62.5	0.2	10	3	26.67	8

由 Laplace公式[6,19]给出近似关系式(假设细胞是圆形的):

$$Vm = 1.5rE \cos\theta \quad (1)$$

$E$ : 脉冲幅度;  $Vm$ : 膜电压;  $r$ : 球形细胞半径;  $\theta$ : 膜部位与电场方向夹角。已测出本实验亲本菌株原生质体的平均半径为  $2 \mu\text{m}$ , 根据上述取细胞膜的击穿电压

阈值为1伏, 并取  $\theta = 45^\circ$ , 这时在原生质体两极的圆锥球面内将出现电击穿, 在此情况下, 可计算得外电场强度  $E$  为:

$$E = \frac{Vm}{1.5r \cos 45^\circ} = \frac{1.0}{1.5 \times 2.0 \times 0.707 \times 10^{-4}}$$

$$= 4.714 \text{ kV/cm}$$

(由公式 1 换算得)。

而当  $E = 9 \text{ kV/cm}$  时, 膜电压将为:

$$\begin{aligned} V_m &= 1.5 \times 2.0 \times 10^{-4} \times 9 \times 0.707 \\ &= 1.909 \text{ V} \end{aligned}$$

计算结果表明: 达到击穿膜电压阈值的临界脉冲幅度为  $4.7 \text{ kV}$ , 这和实验所得最佳电融合脉冲幅度 ( $4.5 \text{ kV}$ ) 相近似。Zimmermann<sup>[19,20]</sup> 归纳大量实验数据认为, 属于可逆电击穿范围的膜电压应低于 2 伏。本实验结果所推导出的  $V_m$  为  $1.909 \text{ V}$ , 低于 Zimmermann 的经验值, 故从理论上说本实验采用的  $3-10 \text{ kV}$  仍能获得融合子, 此脉冲幅度是属于可逆电击穿范围内。本实验选定的最佳脉冲幅度与 katenkamp<sup>[18]</sup> 以裸异木霉 *Trichoclerna ressei* 为材料所得结果极为相近, (脉冲幅度  $4.1 \text{ kV}$ , 脉宽  $75 \mu\text{s}$ , 而 Vondrejjs<sup>[17]</sup> 在以裂殖酵母为材料的电融合研究所得最佳电激参数是  $5 \text{ kV}$ ,  $10 \mu\text{s}$ , 也非常接近。

## 2. 电极距离对融合子形成的影响:

从表 1 中 6、7、8 三组实验数据中发现当电极距离分别为 5, 4, 3mm 时(其它参数相同), 随着电极距离的缩短, 融合率也逐渐下降, 生长出融合子的天数却逐渐增长。这可以解释为由于两极间单位距离上相当于增高了脉冲幅度, 而超过最佳电脉冲幅度时, 必然会导致融合子和融合率下降趋势。因此, 如欲获得较高的融合子应该在选择适当电压的基础上再相应地选择适当的极间距离。

## (四) 营养互补原养型融合子的检出及其发育行为观察

电激采用的亲本菌株是 2 号 ( $\text{Lys}^-$ ), 3 号 ( $\text{Arg}^-$ ), C-5 ( $\text{Arg}^-$ )。电激后获得原生质体杂合体, 能够在 MM 上形成菌落。按照 Portecorro 和 Sermond<sup>[12,14]</sup>

提出的标准, 在 MM 上能够营养互补再生的即可确定为异核体。新获得的异核体在 MM 上生长缓慢, 菌落生长 1 周后菌落直径仅为  $1-1.5 \text{ cm}$ , 而未经电击的原始菌株原生质体生长 2—3 天其直径就为  $1-1.5 \text{ cm}$ , 生长 1 周可达  $4-6 \text{ cm}$ , 可能是原生质体细胞膜被可逆电击穿后需要一段恢复过程。在 2 周生长后, 将其转接到新鲜 MM 培养基后生长较快。在 MM 上异核体的生长速度均超过直接亲本菌株, 且接近或略超过原始亲本菌株。

为避免异核体在 CM 上分离为直接亲本菌株, 故电融合之后, 在 MM 上延长培养时间且连续传代 2—3 次, 有利于核融合。经上述处理后选出四株融合子 F I -1, F II -2, B<sub>5</sub> B<sub>6</sub>, 前两株是以 2 号菌与 C-5 号菌为直接亲本融合形成, 后两株的直接亲本是 2 号菌与 3 号菌。

## (五) 融合二倍体的单倍化菌株改良

采用  $0.01 \text{ mol/L}$  对氟苯丙氨酸 (PFA) 的 CM 处理融合子<sup>[11]</sup>, 使其产生稳定的具有新特性及高酶活的单倍体分离子。在含 PFA 的 CM 上, 培养物生长非常缓慢, 需 15 天左右才能长出新孢子。以 2 号菌与 C-5 号菌的融合子为材料经 PFA 二次处理, 获得并纯化 5 株分离子 I -1, I -3, I -4, II -1 及 II -2 (见表 2)。

## (六) 融合子及分离子倍性的确定

所选的融合子 F I -1, F II -2, B<sub>5</sub> 及 B<sub>6</sub>。在显微镜下可见其孢子头、孢子穗及其顶囊明显比亲本菌株要大。此四株融合子的孢子在 MM 上生长旺盛, 生长速度较亲本快, 孢子体积较双亲明显增大, DNA 含量接近两亲本之和, (实验结果见表 2)。按古武屋等 1983 年提出的标准, 上述融合子即是细胞核融合的杂合二倍体<sup>[10]</sup>。

此外, 对二株融合子菌株 F I -1 和 F II

表 2 亲本, 融合子及分离子的特性  
Table 2 Properties of parents, hybrids and segregants.

Strains and marker phenotypes		Diameter of colony(cm)*		Conidial size( $\mu^3$ )	DNA contents ( $\mu\text{g}/1 \times 10^8$ conidian)	Raw-starch glucoamylase proccuci (U/ml)	Ploidy
		CM	MM				
Original parents	N-11	3.0×3.5	2.2	22.06	ND	32.00	N
	N-16	4.0×4.5	3.5	21.77	ND	44.00	N
Immedial parents	2(Lys <sup>-</sup> )	3.0×3.3	no growth	29.63	7.64	12.00	N
	3(Arg <sup>-</sup> )	3.8	no growth	24.41	7.51	24.00	N
	C-5(Arg <sup>-</sup> )	4.3	no growth	25.66	6.24	20.00	N
Hybrids	F I -1	5.9	2.5	46.50	13.47	41.33	2N
	F II -1	6.8×6.9	2.8×2.9	52.20	15.55	23.00	2N
	B <sub>5</sub>	4.5×5.0	3.0×3.2	41.90	11.81	53.00	2N
	B <sub>8</sub>	6.8×7.7	3.0×3.2	44.58	13.86	65.33	2N
Segregants	I -1	3.8×3.5	2.4×2.5	25.97	6.65	72.00	N
	I -3	6.4	3.1	27.81	7.11	NO	N
	I -4	7.7	3.5	29.59	7.10	NO	N
	II -1	4.8×6.0	3.1	29.86	6.26	NO	N
	II -2	3.6×4.0	3.0	32.87	7.95	23	N

\* The diameter of colonies was detected on CM at seventh day.

-2采用PFA二次诱发处理分别获得二株分离I-1和II-2,在MM上生长良好,孢子体积和2,3号亲本菌差不多,但此融合子FI-1和FII-2要小,DNA仅为FI-1和FII-2的1/2左右,这表明FI-1和FII-2为单倍体菌株(见表2)。

### (七) 二倍体杂种及其分离酶产量的测定

对二倍体杂种FI-1, FII-2, B<sub>5</sub>, B<sub>8</sub>以及分离子I-1, II-2做了生长速度和生淀粉糖化酶活性的测定,结果见表2,从表2可看出:

1. 经NTG和UV诱变处理后的营养缺陷菌株(直接亲本),其酶活明显低于原始亲本N-11和N-16,几乎为后者酶活的50%左右。

2. 被测的所有二倍体杂种酶活都大

大高于直接亲本,并且接近或超过原始亲本的酶活。(除FII-2外)。

3. 尤其值得注意的是分离子I-1酶活为72U,约比直接亲本2号,C-5号菌高四倍,比原始亲本N-11和N-16约分别高到1.64和2.25倍,(经多次验证),该分离子株的生长速度与原始亲本N-11,N-16几乎无差别。这两点性状有利于无蒸煮生淀粉酒精发酵生产中的麸曲质量的提高。

采用电融合技术所获得二倍体杂子,以及单倍化分离子菌株与原始亲本相比,有的菌株在生长速度和生淀粉糖化酶产量方面却降低,有的菌株恢复到原始亲本的水平。采用长时间在MM培养基上转接培养和PFA诱发单倍体分离子的方法均获得比原始亲本菌株酶活方面高二倍多的优良性状菌株(如B<sub>5</sub>,B<sub>8</sub>和I-1菌株)。

### 参 考 文 献

- [1] 梁平彦等: 植物生理学报, 7(1): 1—10, 1981.  
[2] 梁平彦等: 遗传学报, 8(4): 287—293, 1981.

- [3] 梁平彦等, 微生物学报, 22 (3): 248—256, 1982.
- [4] 陈淑等, 真菌学报, 5 (2): 117—123, 1986.
- [5] 曹军卫: 武大校报, (4): 95—101, 1984.
- [6] 汪和陆等, 生物物理学报, 2 (4): 364—371, dec, 1986.
- [7] 汪和陆等, 生物工程学报, 2 (3): 44—51, 1986.
- [8] 蔡文启等: 微生物学报, 29 (6): 444—451, 1989.
- [9] 方善康, 食品与发酵工业, 2: 13—20, 1988.
- [10] 古武屋等, 日本農芸化学会志, 57 (1): 1—8, 1983.
- [11] 牛岛重臣, 日本醸造协会杂志, 79 (10): 721—723, 1984.
- [12] Anne, J. and Peberdy, J. F.: *J. Gen. Microb*, 92: 413—417, 1976.
- [13] Neuman, E. et al.: *Naturwissenschaften*, 67: 414—415, 1980.
- [14] Portecorvo, G. et al.: *Gen. Microb*, 11: 94—104, 1974.
- [15] Macneil, D. J.: *FEMS Microb Lett*, 42: 239—244, 1987.
- [16] Lunch, P. T. et al.: *FEMS Microb Lett*, 59: 225—228, 1989.
- [17] Vondrejs, V. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 166(1): 113—118, 1990.
- [18] Katenkamp, U. et al.: *Bioelectro chemistry and Bioenergetics*, 22: 57—67, 1989.
- [19] Zimmermann, U. et al.: *J. Member. biol.*, 87: 158—174, 1982.
- [20] Zimmermann, U. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 69 (4): 227—277, 1982.
- [21] 康德拉, P.等著《分子生物学方法》科学出版社, 1979.
- [22] 章名春编: 《工业微生物诱变育种》, 科学出版社, 1984.
- [23] Kirmura, K et al.: *J. Ferment. Technol.*, 64 (6): 473—479, 1986.

## Electrofusion of Protoplasts from *Aspergillus niger*

Zhou Zhenhong Fang Shankang

(Department of Microbiology, Shangdong University, jinan 250100)

Wild-type strains of *Aspergillus niger* N-11 and N-16 (Raw-starch-digesting glucoamylase producers) were mutagenized by UV and NTG respectively. *A. niger* auxotrophs No.2 (lys<sup>-</sup>) and No.3 and No.5(Arg<sup>-</sup>) were obtained and used as direct parents.

The auxotrophs were treated by a combined enzyme system containing cellulases and snailases. The effect of factors, including the concentration of enzymes, age of mycelium on the formation and regeneration of protoplasts in these auxotrophs were studied.

This work systematically investigated the condition of electrofusion on the protoplasts of the mutants using BAEKON-2000 Advanced Gene Transfer system, an optimal yield of hybrids able to form colonies on MM/CM was found at  $A = 4.5 \text{ kV/cm}$ ,  $N_p = 32$ ,  $T_p = 62.5 \mu\text{s}$ ,  $T_b = 0.2 \text{ s}$ ,  $C_y = 10$ ,  $D = 3 \text{ mm}$  and  $F_f$  (fusion frequency) = 60% of the fusants selected statistically were stable and most of them show the increase in the active unit of enzyme.

**Key words** *Aspergillus niger*, protoplasts, electrofusion