

酿酒酵母与球形红假单胞菌 原生质体跨界融合研究

王玉水 邹贵华 崔益斌 程树培*

(南京大学环境科学与工程系,污染控制与资源化国家重点实验室 南京 210093)

摘要 测定了球形红假单胞菌原核细胞与酿酒酵母真核细胞的原生质体形成、再生及融合最佳组合条件。以溶菌酶-EDTA反应系统处理球形红假单胞菌 P9479,最适脱壁条件为:溶菌酶浓度 0.5mg/ml,EDTA 浓度为 0.2%,蔗糖浓度 20%,酶作用时间为 40min;此条件下原生质体形率为 78.9%,再生率为 11.2%。用蜗牛酶-巯基乙醇反应系统处理酿酒酵母 Y9407,最适脱壁条件为:蜗牛酶浓度 1.0%,巯基乙醇浓度 0.1%,蔗糖浓度 20%,酶作用时间为 30min;此条件下酵母原生质体形成率为 99.8%,再生率为 9.7%。用聚乙二醇诱导 P9479 与 Y9407 的原生质体发生融合,当聚乙二醇的浓度为 30%,Ca²⁺ 浓度为 50mmol/L,pH 为 6.5,时间为 10min 时,有最高的融合率为 7.6×10^{-6} 。

关键词 酿酒酵母,球形红假单胞菌,跨界融合,最佳条件

球形红假单胞菌是光合细菌(Photosynthetic bacteria,简称 PSB)处理高浓度有机废水中常用的一个种,能在好氧无光或厌氧有光条件下生长,具有反硝化活性高、脱氮除磷效果好的特征^[1,2]。但是球形红假单胞菌菌体小,絮凝性差,不易从处理出水中去除^[3]。酿酒酵母具有良好的絮凝性能可用于处理高浓度有机废水^[4],但其处理效果不如球形红假单胞菌。通过原生质体融合技术,将酿酒酵母与球形红假单胞菌进行融合,获得的融合子有可能综合双亲优势,既有高效净化废水性能,又具有很高的絮凝性能。球形红假单胞菌属于原核界,它对制霉菌素有抗性而对链霉素敏感;酿酒酵母属于真核界,它对链霉素有抗性而对制霉菌素敏感;融合后获得的融合子由于抗性互补,可具有既抗制霉菌素又抗链霉素的性能,此性能可作为融合子的初步筛选标志。

本研究通过正交实验,测定球形红假单胞菌与酿酒酵母原生质体形成、再生以及原生质体融合的最佳条件,并对相关因素影响作用的大小进行了排序分析。

1 材料与方法

1.1 菌种

1.1.1 球形红假单胞菌(*Rhodospseudomonas sphaeroides*):原菌株由中国科学院上海植物生理研究所提供。本研究中以经 15mol/L 甲醛诱变后筛选出的高絮凝菌株 P9479 作为

本课题为国家自然科学基金项目。江苏省自然科学基金项目。

本文于 1995 年 8 月 10 日收到。

* 联系人。

融合亲株之一。

1.1.2 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*): 由广东省东莞糖厂提供, 筛选纯化后作为跨界融合的另一亲株, 编号为 Y9407。

1.2 培养基

1.2.1 基础培养基 (g/L): K_2HPO_4 3.0, KH_2PO_4 1.0, NH_4NO_3 0.5, Na_2SO_3 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.001, $CaCl_2$ 0.0005, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001, 酵母膏 0.1, 葡萄糖 10.0, 乙酸钠 5.0, pH7.0。

1.2.2 固体基础培养基: 液体培养基 + 1.5% 琼脂。

1.2.3 高渗再生培养基: 固体基础培养基 + 17% 蔗糖。以上培养基使用前 0.07MPa 湿热灭菌 20min。

1.2.4 选择培养基: 高渗再生培养基 + 链霉素和制霉菌素各 100u/ml, 链霉素和制霉菌素用蒸馏水配成 10000u/ml 的溶液, 抽滤除菌后加入灭菌后的高渗再生培养基中。

1.3 试剂

1.3.1 磷酸-柠檬酸缓冲液 (P 缓冲液): $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 29.5g, 柠檬酸 1.85g, 用蒸馏水定容 500ml, pH 7.0。

1.3.2 Tris-HCl 缓冲液 (T 缓冲液): 25ml 0.2mmol/L Tris + 27.5ml 0.1mmol/L HCl, 加蒸馏水稀释至 100ml, pH 8.0。

1.3.3 SMM 缓冲液: 蔗糖 0.5mmol/L, $MgCl_2$ 0.02mmol/L, 顺丁烯二酸 0.02mmol/L, pH 6.5。

1.3.4 巯基乙醇 (C.P.)

1.3.5 EDTA 溶液: EDTA 溶于 P 缓冲液中。

1.3.6 蔗糖溶液: 蔗糖 (A.R.) 溶于 P 或 T 缓冲液中。

1.3.7 聚乙二醇 (PEG, MW = 6000) 溶液: PEG 溶于 SMM 缓冲液中。以上试剂使用前 0.07MPa 湿热灭菌 20min。

1.3.8 蜗牛酶: 北京百泰生物技术公司产品 (1g 装, 批号 940606), 溶于 P 缓冲液中, pH 4.8, 使用前抽滤除菌。

1.3.9 溶菌酶: 上海华美生物技术公司产品 (1g 装, 批号 920303), 溶于 T 缓冲液中, pH 8.0, 使用前抽滤除菌。

1.4 原生质体制备

1.4.1 球形红假单胞菌原生质体制备: 球形红假单胞菌原生质体制备最适条件研究参照 Rensburg^[5] 原生质体制备法, 取蔗糖浓度 (蔗糖溶于 T 缓冲液中)、溶菌酶浓度、EDTA 浓度和酶反应时间四个因素, 各因素分为 3 个水平, 正交实验安排见表 1。

1.4.2 酿酒酵母原生质体制备: 酿酒酵母原生质体制备最适条件研究参照陈海昌^[5] 原生质体制备方法, 取蔗糖浓度 (蔗糖溶于 P 缓冲液中)、蜗牛酶浓度、巯基乙醇浓度和酶反应时间 4 个因素, 各因素分为 3 个水平, 正交实验安排见表 2。

1.5 原生质体形成率、再生率计算^[7]

$$\text{原生质体形成率} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

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

A: 未经酶处理的菌液在固体基础培养基平板上, 30℃ 培养 7d 生长的菌落数

B: 经酶处理后的菌液在固体基础培养基平板上, 30℃ 培养 7d 生长的菌落数

C: 经酶处理后的菌液在高渗再生培养基平板上, 30℃ 培养 7d 生长的菌落数

1.6 原生质体融合及融合子检出

原生质体融合最佳条件研究参照文献[8]取 PEG6000 浓度、反应温度、CaCl₂ 浓度和作用时间 4 个因素, 各因素分为 3 个水平, 正交实验安排见表 3。

取 P9479 与 Y9407 的原生质体制备液各 0.5ml, 混匀, 10000r/min 离心 5min, 弃去上清液, 用 SMM 缓冲液洗涤双亲原生质体混合物 2 次后悬浮在 0.2ml SMM 液中, 按照表 3 正交实验安排分别加入不同浓度的 PEG6000 和 CaCl₂, 在不同温度的水浴中反应不同的时间。实验终止后 10000r/min 离心 5min 除去 PEG, 将沉淀用 SMM 缓冲液洗涤 3 次后悬浮在 1ml SMM 液中。将菌液涂布到选择培养基平板上, 30℃ 培养 7d 后计菌落数。同时将双亲原生质体混合物用 SMM 缓冲液稀释 10⁵~10⁷ 倍, 分别涂布高渗再生培养基和固体基础培养基平板, 30℃ 培养 7d 后计菌落数。

$$\text{原生质体融合率} = \frac{D}{E-F} \times 100\%$$

D: 选择培养基平板上 30℃ 培养 7 天后生长的菌落数

E: 两亲株原生质体在高渗再生培养基平板上, 30℃ 培养 7 天后的菌落数

F: 两亲株原生质体在固体基础培养基平板上, 30℃ 培养 7 天后的菌落数

2 结果与讨论

2.1 球形红假单胞菌 P9479 原生质体形成率、再生率正交实验结果

表 1 P9479 原生质体形成率、再生率正交实验测定结果

Table 1 The orthogonal design and test results of the protoplasts formation and regeneration rates for *R. sphaeroides*

组别	水平	蔗糖浓度/%	水平	溶菌酶浓度/mg·ml ⁻¹	水平	EDTA 浓度/%	水平	作用时间/min	原生质体形成率/%	原生质体再生率/%	
1	1	10	1	0.5	1	0.1	1	30	51	6.5	
2	1	10	2	1.0	2	0.2	2	40	63	5.1	
3	1	10	3	2.0	3	0.4	3	50	63	1.0	
4	2	20	1	0.5	2	0.2	3	50	70	9.9	
5	2	20	2	1.0	3	0.4	1	30	69	4.7	
6	2	20	3	2.0	1	0.1	2	40	75	7.7	
7	3	30	1	0.5	3	0.4	2	40	57	6.5	
8	3	30	2	1.0	1	0.1	3	50	68	5.8	
9	3	30	3	2.0	2	0.2	1	30	67	6.0	
各水平平均值	水平	形成率/%	再生率/%	形成率/%	再生率/%	形成率/%	再生率/%	形成率/%	再生率/%	形成率/%	再生率/%
	1	59.0	4.5	59.3	7.6	64.7	6.7	62.3	5.1		
	2	71.3	7.4	66.7	5.2	66.7	7.0*	65.0	6.4*		
	3	64.0	6.1	68.3	5.2	63.0	4.3	67.0	5.4		
极差		12.3	2.9	9.0	2.4	3.7	2.7	4.7	1.3		

* 为各因素相应水平原生质体再生率平均值的最高值

根据表 1 中各水平极差数值进行分析, 本研究中影响 P9479 原生质体形成率的因素

顺序为蔗糖浓度(12.3) > 溶菌酶浓度(9) > 作用时间(4.7) > EDTA 浓度(3.7); 而影响 P9479 原生质体再生率的因素顺序为蔗糖浓度(2.9) > EDTA 浓度(2.7) > 溶菌酶浓度(2.4) > 作用时间(1.3)。蔗糖浓度对原生质体形成与再生率的影响均居首位, 反映出 P9479 原生质体对渗透压具有相当的敏感性。

从表 1 中各因素原生质体再生率平均值的最高值所对应的水平可以看出, 制备 P9479 原生质体的最适条件是蔗糖浓度为 20%, 溶菌酶浓度为 0.5mg/ml, EDTA 浓度为 0.2%, 反应时间为 40min。

以上述最适条件制备 P9479 原生质体, 形成率为 78.9%, 再生率为 11.2%, 均高于表 1 中的结果。

2.2 酿酒酵母原生质体形成率、再生率正交实验结果

表 2 Y9407 原生质体形成率、再生率正交实验测定结果

Table 2 The orthogonal design and test results of the protoplasts formation and regeneration rates for *S. cerevisiae*

组别	水平	蔗糖浓度/%	水平	蜗牛酶浓度/ /mg·ml ⁻¹	水平	巯基乙醇 浓度/%	水平	作用时间 /min	原生质体 形成率/%	原生质体 再生率/%	
1	1	10	1	0.5	1	0.1	1	30	94.5	8.7	
2	1	10	2	1.0	2	0.2	2	40	97.1	7.1	
3	1	10	3	2.0	3	0.3	3	50	97.5	4.5	
4	2	20	1	0.5	2	0.2	3	50	97.5	8.2	
5	2	20	2	1.0	3	0.3	1	30	98.7	8.0	
6	2	20	3	2.0	1	0.1	2	40	98.6	8.7	
7	3	30	1	0.5	3	0.3	2	40	97.0	7.3	
8	3	30	2	1.0	1	0.1	3	50	98.1	8.4	
9	3	30	3	2.0	2	0.2	1	30	97.9	7.7	
各水平	水平	形成率/%	再生率/%	形成率/%	再生率/%	形成率/%	再生率/%	形成率/%	再生率/%	形成率/%	再生率/%
平均值	1	96.4	6.8	96.3	8.0	97.0	8.6	97.0	8.1		
	2	98.3	8.3	98.0	7.8	97.5	7.7	97.6	7.7		
	3	97.7	7.8	98.0	7.0	97.7	6.6	97.7	7.0		
极差		1.9	1.5	1.7	1.0	0.7	2.0	0.7	1.1		

* 为各因素相应水平原生质体再生率平均值的最高值

根据表 2 中的极差数值分析, 本研究中影响 Y9407 原生质体形成率的因素顺序为蜗牛酶浓度(1.7) > 蔗糖浓度(1.3) > 巯基乙醇浓度(0.7) = 作用时间(0.7); 影响 Y9407 原生质体再生率的因素顺序为巯基乙醇浓度(2.0) > 蔗糖浓度(1.5) > 作用时间(1.1) > 蜗牛酶浓度(1.0)。可以看出, 蜗牛酶浓度对 Y9407 的原生质体的形成率的影响居首位, 蔗糖浓度居第二位。而对 Y9407 原生质体再生率的影响中巯基乙醇浓度居首位, 蔗糖浓度仍居第二位, 说明 Y9407 原生质体对渗透压的敏感性不同于 P9479, 蜗牛酶浓度和巯基乙醇浓度对其原生质体形成与再生有重要影响。

从表 2 中各因素原生质体再生率平均值的最高值所对应的水平可以看出, 制备 Y9407 原生质体的最适条件是蔗糖浓度为 20%, 蜗牛酶浓度为 1.0%, 巯基乙醇浓度为 0.1%, 反应时间为 30min。

以上述最适条件制备 Y9407 原生质体,形成率为 99.8%,再生率为 9.7%,结果均高于表 2 中的相应值。

2.3 P9479 与 Y9407 原生质体融合正交实验结果

表 3 P9479 与 Y9407 原生质体融合率正交实验测定结果

Table 3 The orthogonal design and test results of protoplasts fusion between *R. sphaeroides* and *S. cerevisiae*

组别	水平	CaCl ₂ 浓度/min	水平	PEG 浓度 / %	水平	温度/℃	水平	作用时间 /min	原生质体融合率($\times 10^{-6}$)
1	1	10	1	30	1	20	1	10	1.64
2	1	10	2	35	2	30	2	15	1.51
3	1	10	3	40	3	40	3	20	0.82
4	2	30	1	30	2	30	3	20	4.25
5	2	30	2	35	3	40	1	10	3.15
6	2	30	3	40	1	20	2	15	1.10
7	3	50	1	30	3	40	2	15	5.00
8	3	50	2	35	1	20	3	20	1.64
9	3	50	3	40	2	30	1	10	6.58
各水平 - 水平									
融合率	1	1.32	3.63*	1.46	3.79*				
平均值	2	2.83	2.10	4.11	2.54				
($\times 10^{-6}$)	3	4.41	2.83	2.99	2.23				
极差($\times 10^{-6}$)		3.09	1.63	2.65	1.56				

* 为各因素相应水平原生质体融合率平均值的最高值。

根据表 3 中各水平极差分析,本研究中影响 P9479 和 Y9407 双亲原生质体融合率的因素顺序为钙离子浓度(3.09) > 温度(2.65) > PEG 浓度(1.63) > 作用时间(1.56)。本研究的结果表明,增加钙离子的浓度可以显著地提高双亲原生质体融合率。据报导钙离子有助于增加细胞膜的通透性^[9],因此,细胞膜的通透性对原生质体融合有显著影响。

根据表 3 中各因素原生质体融合率平均值所对应的水平,双亲的最佳融合条件是:Ca²⁺浓度为 50mmol/L,PEG 浓度为 30%,温度为 30℃,融合时间为 10min。

以上述条件进行双亲原生质体融合,测得融合率为 7.6×10^{-6} ,高于表 3 中的结果。

3 结 语

蔗糖浓度为 20%,溶菌酶浓度为 0.5mg/ml,EDTA 浓度为 0.2%,反应时间为 40min 是制备 P9479 原生质的最适条件,此条件下的原生质体形成率为 78.9%,再生率为 11.2%。

蔗糖浓度为 20%,蜗牛酶浓度为 1.0%,巯基乙醇浓度为 0.1%,反应时间为 30min 是制备 Y9407 原生质体的最适条件,这时的原生质体形成率为 99.8%,再生率为 9.7%。

在 PEG6000 与钙离子作用下,P9479 原生质体与 Y9407 原生质体能发生融合,钙离

子浓度为 50mmol/L, PEG 浓度为 30%, 作用温度为 30℃, 反应时间为 10min 是双亲原生质体融合最佳条件, 此条件下的融合率为 7.6×10^{-6} 。

对最佳组合条件中各因素极差的排序分析结果表明, 本研究中选用的各因素具有研究意义, 其测定结果有重要参考价值。

有关该跨界原生质体融合细胞的鉴定、稳定性研究, 已另文报道^[10]。

参 考 文 献

- [1]朱核光, 史家琛, 徐亚同. 上海环境科学, 1995, 14(1): 8~10.
- [2]Shi J L, Xu Y T. Journal of Water Treatment, 1989, 4: 27~36.
- [3]程树培. 南京大学学报, 1994, 30(3): 469~475.
- [4]金新梅, 金世芳, 朱洪颀等. 微生物学报, 1991, 31(3): 240~246.
- [5]Rensburg A J V. J Gen Microbio, 1969, 56: 257~264.
- [6]陈海昌, 刘中山, 马 力. 微生物杂志, 1987, 7(1): 24~26.
- [7]江行娟. 遗传学报, 1981, 8(1): 1~7.
- [8]Kavanagh K, Walsh M, Wittaker P A *et al.*, FEMS, 1991, 81: 283~286.
- [9]Kao K N, Constabel F, Michayluk M R *et al.* Planta, 1974, 126(3): 215~217.
- [10]Cheng S P, Cui Y B, Zhang M *et al.* Journal of Nanjing University(Letters), 1996, 32(2): 342~345.

Protoplast Fusion Between *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodospseudomonas sphaeroides*

Wang Yushui Zou Guihua Cui Yibin Cheng Shupeí

(Department of Environmental Sciences and Engineering, State Key Laboratory of
Pollution Control and Resource Reuse, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract The protoplasts of *S. cerevisiae* and *R. sphaeroides* were fused in the different conditions. The fusants belong to the hybridization product between eukaryote and prokaryote cells. The level of factors for *R. sphaeroides* P9479 to form protoplast were lysozyme 0.5mg/ml, EDTA 0.2%, sucrose 20%, 30℃, pH 8.0 and 40 min reaction time; and snail enzyme 1.0%, sulphydryl ethanol 0.1%, sucrose 20%, 30℃, pH 4.8 and 30 min reaction time for *S. cerevisiae* to form protoplasts. The fusion between *R. sphaeroides* and *S. cerevisiae* protoplasts needed the suitable reaction conditions which were PEG(MW = 6000) 30%, Ca^{2+} 50mmol/L, 30℃ and 10min reaction time. The highest level of protoplast formation and regeneration rates could be obtained which were 78.9% and 11.2% for *R. sphaeroides*, 99.8% and 9.7% for *S. cerevisiae*, and the highest fusion frequency between *R. sphaeroides* and *S. cerevisiae* protoplast was 7.6×10^{-6} .

Key words *R. sphaeroides*, *S. cerevisiae*, protoplast fusion, suitable factors