

螯合剂对原生质体融合的影响

王建华

(中国农业科学院饲料研究所 北京 100081)

赵学慧

(华中农业大学食品微生物学研究室 武汉 430070)

自从 Kao^[1]发现聚乙二醇(PEG)能高效介导植物原生质体融合以来,至今它仍不失其作为植物、微生物原生质体促融合剂的垄断地位,但其强渗透伤害和化学毒性也十分明显。虽 70 年代末就开始成功应用电介导原生质体融合方法^[2],但由于对设备的依赖而难以推广。因此寻找既能高效介导原生质体融合,而又不具有上述弊端的新的促融合剂对于完善原生质体技术具有重要意义。曾有报道认为^[3]在脱壁酶液中加入 10mmol/L EDTA 能增加酿酒酵母和解脂复膜孢酵母细胞的原生质体释放量,但另有报道称^[4]在脱壁酶液中加入 250mmol/L EDTA 反而使黑曲霉和烟曲霉原生质体释放量大为减少,二者均未提及 EDTA 影响原生质体释放量的机理,此外笔者至今并未查到有关螯合剂对原生质体再生、融合效应的报道。根据金属离子螯合剂与原生质体膜的结构与化学特性,推断螯合剂能够积极干预原生质体的再生与融合,原生质体由于失去细胞壁的保护而使膜脂分子的流动性加大,很不稳定,螯合剂具有多个结合键位因而就有可能同时“锚”在一个或两个原生质体膜表面从而起到保护原生质体或促进原生质体融合的作用。本文专门研究了螯合剂对曲霉原生质体稳定性、再生和融合的效应,以求证实上述推断。

1 材料与方 法

1.1 菌株

融合用双亲为黑曲霉(*Aspergillus niger* V. Tiegh)M70 和米曲霉(*Aspergillus oryzae* Ahlb.)M4, 两菌株均为华中农业大学食品微生物学研究室保藏菌株。

1.2 原生质体制备方法

详见文献[5, 6]。

1.3 原生质体灭活

原生质体灭活方法详见文献[5, 6],对融合双亲原生质体用 0.05mol/L 碘乙酸作致死灭活处理,黑曲霉和米曲霉致死灭活时间分别为 20min 和 16min。

1.4 螯合剂种类、保温时间

选用乙二胺四乙酸(EDTA)和乙二醇双乙胺醚(EGTA)两种螯合剂作为新的促融合剂,处理浓度为 0(CK)、5、10mmol/L,处理时间为 0、3、6、9、15h,螯合剂均由 0.65mol/L NaCl 溶液配制,并于 115℃ 灭菌 20min。30% PEG 体系^[7]作为促融合剂对照。

1.5 原生质体再生与融合

原生质体再生与融合方法详见文献[5, 6],但每次试验均设再生对照平板(CK1),先以无菌水悬浮原生质体 3min 后作适当稀释并置再生平板,32℃ 下培养 40h 后计再生菌落数。灭活原生质体融合时须设单亲(自身)互补融合对照自身平板(CK2),参与融合的双亲原生质体密度均为 $6 \sim 10 \times 10^6$ 个/ml,融

合条件 100r/min, 10min, 32℃。融合结束后用 0.65mol/L NaCl 无菌溶液稀释 8 倍, 置融合子再生平板, 32℃ 下培养 40h 计再生融合子菌落。由于双亲均为致死灭活, 故融合子再生平板上的再生菌落均是融合子, 而不须其它选择标记。依如下公式计算再生率(Rf/%)和融合指数(FI/%):

$$Rf = (\text{再生菌落数} - \text{CK1 再生菌落数}) / \text{原生质体总数} \times 100\%$$

$$FI = (\text{再生融合子菌落总数} - \text{CK2 再生菌落数}) \times 2 / \text{用于融合的原生质体总数} \times 100\%$$

所有培养基接种前均以 115℃ 灭菌 20min, 2000r/min 离心 10min, 各处理均重复 4 次。

2 结果与讨论

2.1 整合剂处理时间对原生质体稳定性的影响

整合剂处理可以有效地提高原生质体在高渗悬浮液中的稳定性(见表 1), 这种效应随处理时间延长而愈明显。从表 1 资料可知 EDTA 和 EGTA 处理 3h 后, 黑曲霉原生质体数量比对照约高出 4.0% 和 154%, 处理至 15h 时, 这种差异高达 0.8 和 3.0 倍, EGTA 比 EDTA 效果更好, 这种促效与整合剂浓度关系不大。整合剂对原生质体稳定性的促效在米曲霉原生质体中也同样存在(表 1)。这种促效的机理可能在于: 原生质体膜表外在蛋白上金属离子结合, 使膜脂流动性降低、稳定性增强。此外, 在原生质体悬浮液中加入 CaCl_2 并未提高整合剂的促效。

表 1 EDTA、EGTA 处理对曲霉原生质体数量的影响*

菌株	整合剂及 浓度/mmol/L	处理时间/h				
		0	3	6	9	15
M70	对照(CK)	2.0833	0.7778 ± 0.0556	0.3889 ± 0.0278	0.2431 ± 0.0347	0.1806 ± 0.0139
	EDTA, 5	2.0833	1.1056 ± 0.1333	0.8472 ± 0.0567	10.0764 ± 0.0990	0.3299 ± 0.0478
	10	2.0833	1.3347 ± 0.1281	1.0088 ± 0.2110	0.8333 ± 0.1531	0.3819 ± 0.0532
	EDTA + CaCl_2					
	10 + 20	2.0833	1.3085 ± 0.0778	0.9861 ± 0.0993	0.9722 ± 0.1112	0.6181 ± 0.0712
	EGTA, 5	2.0833	1.9792 ± 0.2372	1.7708 ± 0.1748	1.1806 ± 0.2083	0.7222 ± 0.0393
	10	2.0833	1.8050 ± 0.1133	1.4213 ± 0.1526	1.0417 ± 0.0694	0.7465 ± 0.1042
	EGTA + CaCl_2					
	10 + 20	2.0833	1.6759 ± 0.2362	1.7014 ± 0.2629	1.3194 ± 0.2083	0.8472 ± 0.1100
M4	对照(CK)	3.7667	0.9087 ± 0.1306	0.4321 ± 0.0672	0.2968 ± 0.0433	0.1041 ± 0.0336
	EDTA, 5	3.7667	2.4683 ± 0.3637	1.9321 ± 0.2022	1.6077 ± 0.1511	1.6942 ± 0.1313
	EGTA, 5	3.7667	2.9613 ± 0.1506	2.3568 ± 0.1935	2.0149 ± 0.2458	1.8333 ± 0.2631

* 表内的数 $\times 10^6$ 为每 ml 液体中原生质体数

2.2 整合剂和光照处理对曲霉原生质体再生率的影响

表 2 资料表明: EDTA 和 EGTA 处理均能极显著地提高原生质体再生率, 且 EGTA 的促效高于 EDTA。对黑曲霉原生质体再生率, EDTA 最大促效(10m mol/L)比对照高 3.2 倍(黑暗下)和 3.5 倍(光照下), 而 EGTA 的最大促效(5m mol/L)也比对照高 3.2 倍(黑暗下)和 3.3 倍(光照下)。光照下处理时, 整合剂对再生率的促效比黑暗下的促效平均高出约 20%, 这种显著差异可能与光质、光波长对细胞发育的影响有关, 而且这种光照对再生的促效在对照中也存在。上述整合剂、光照处理对原生质体再生的促效在米曲霉原生质体再生中也有类似表现(表 2)。整合剂促进原生质体再生的原因可能在于其对原生质体膜结构稳定性与完整性的维持。此与 2.1 中关于原生质体数量的观察结果是相辅相成的。

表 2 螯合剂对曲霉原生质体再生率的影响

菌株	螯合剂及 浓度/m mol/L	黑暗下		与 CK 的差 异	光照下		与 CK 的差 异	光/暗 Rf/ Rf%
		菌落数 (个/皿)	Rf/%		菌落数 (个/皿)	Rf/%		
M70	对照(CK)	18.25 ± 6.55	3.650 ± 1.330	1.00	22.90 ± 0.83	4.580 ± 0.1669	1.00	1.21
	EDTA, 5	44.65 ± 5.13	8.930 ± 1.026	2.45	65.48 ± 7.00	13.098 ± 1.028	2.86	1.17
	10	76.75 ± 9.07	15.350 ± 1.814	4.20	98.00 ± 11.33	19.600 ± 2.333	4.46	1.28
	EGTA, 5	77.28 ± 9.33	15.456 ± 1.866	4.24	94.90 ± 15.75	18.980 ± 1.152	4.31	1.23
	10	69.00 ± 7.35	13.800 ± 1.470	3.78	73.00 ± 2.56	14.600 ± 1.033	3.32	1.06
M4	对照(CK)	10.08 ± 2.06	6.723 ± 2.110	1.00	12.17 ± 3.35	8.117 ± 0.651	1.00	1.21
	EDTA, 5	40.43 ± 8.50	26.756 ± 4.782	3.98	44.64 ± 6.78	29.758 ± 3.377	3.67	1.11
	EGTA, 5	40.05 ± 7.35	30.037 ± 5.677	4.47	50.99 ± 11.53	33.991 ± 4.157	4.19	1.13

表 3 螯合剂对曲霉灭活原生质体融合指数的影响

处理号	螯合剂及浓度	FI/×10 ⁻⁴ %	±PEG%
1	NaCl 0.65mol/L	0.0302	5.95
2	30%PEG	5.0643 ± .3561	100.00
3	EDTA, 5m mol/L	6.3357 ± .8277	125.11
4	2号+3号	6.4110 ± .1053	126.59
5	EGTA, 5m mol/L	8.5639 ± .7639	169.10
6	2号+5号	7.9981 ± .3333	157.93

2.3 螯合剂对灭活原生质体融合率的影响

分析表 3 资料可知:1)螯合剂均能有效地介导种间灭活原生质体之间的融合;2)EGTA 促融合效果明显优于 EDTA,此与前述二者在保持原生质体稳定性和促再生效应方面的差异是一致的,这种促融合效应的差异为 35%左右;3)EDTA 和 EGTA 促融合效果明显优于 PEG;4)PEG 与螯合剂配合均对螯合剂

促融合效果无明显效应。螯合剂维持原生质体稳定性和促融合的机理可能在于:一方面,螯合剂通过与原生质体膜表外在蛋白上二价阳离子结合从而使膜脂流动性减慢、稳定性增强,这种维持稳定性的效果大小与螯合剂和膜表面分子之间结合键位数量的多少呈正比例关系;另一方面,螯合剂通过同时与相邻两原生质体膜蛋白上的二价阳离子结合从而促进融合,这种促融合效果也与螯合剂和两原生质体膜表面分子之间结合键位数量的多少呈正比例关系。显然,在上述过程中,二价阳离子起着很重要的联络中介作用。关于螯合剂对原生质体再生与融合的促进效应为本研究首次发现,尽管螯合剂的上述效应在本研究中具有良好的可重复性,但其适用范围及真正的作用机理均有待更深入的工作。

参 考 文 献

- 1 Kao K N, Michayluk M R. *Planta*, 1974, 115:355~367
- 2 Zimermann U, Scheurich P, Pilwat G *et al.* *Angew Chemistry*, 1981, 93:332~351
- 3 de von Brook M R, Sierra M, de Figueroa L. In: Stewart G G eds., *Current Development in Yeast Research*. Oxford, Pergamon Press. 1981, pp. 171~176
- 4 Thomas K R, Davis B. *Microbios*, 1980, 28:61~80
- 5 王建华, 赵学慧. 华中农业大学学报, 1996, Sup. Sum. 22:63~67
- 6 王建华, 赵学慧. 华中农业大学学报, 1997, 16(5):367~373
- 7 梁平彦, 刘宏迪. 植物生理学报, 1981, 7(1):1~10

A New Kind of Protoplast Fusogen-cation chelates and Their Effects on Protoplast Stability, Regeneration and Fusion Between *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*

Wang Jianhua¹ Zhao Xuehui²

(Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081¹)

(Laboratory of Food Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070²)

Abstract Feasibility of cation chelates ethylene diamine-tetraacetic acid(EDTA) and ethyleneglycolbis(β -aminoethyl ether)-N, N'-tetraacetic acid(EGTA) as a new protoplast fusogen substitute for polyethyleneglycol(PEG) was studied. It was found for the first time that these two chelates could effectively induced fusion of the inactivated protoplasts between *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. Ability of induction fusion of chelates was 25% - 69% higher than that for PEG. Also, it was shown that these two chelates could protected protoplast from injury and damage, and increased highly their regeneration ability. Finally, the mechanism of the chelates EDTA and EGTA on protoplast stability, regeneration, and fusion for *Aspergilli* was deduced.

Key words *Aspergillus*, protoplast fusogen, chelates