

原生质体融合选育高产脂肽 LI-F 多粘类芽胞杆菌及融合菌株表达差异分析

闫冬, 韩金志, 别小妹, 陆兆新, 吕凤霞, 赵海珍, 张充

南京农业大学食品科学与技术学院, 南京 210095

闫冬, 韩金志, 别小妹, 等. 原生质体融合选育高产脂肽 LI-F 多粘类芽胞杆菌及融合菌株表达差异分析. 生物工程学报, 2015, 31(9): 1401–1407.

Yan D, Han JZ, Bie XM, et al. Breeding of high-producing LI-F lipopeptide *Paenibacillus polymyxa* by protoplast fusion and differential expression analysis of fusion strains. Chin J Biotech, 2015, 31(9): 1401–1407.

摘要: 本研究以多粘类芽胞杆菌 JSa-9 前期诱变获得的两株带有营养缺陷型标记的菌株 N1-37(Phe⁻)和 N2-27(His⁻)作为亲本菌株, 采用聚乙二醇作为促融剂, 进行原生质体融合, 筛选出高产 LI-F 类抗菌脂肽的融合菌株。通过 HPLC 对融合菌株和原始菌株产 LI-F 类抗菌脂肽进行定量检测, 并利用实时荧光定量 PCR 对菌株 JSa-9 和融合菌株中 LI-F 类抗菌脂肽合成酶的关键基因 *fusA1*、*fusA2*、*fusC1* 和 *fusC2* 的差异性表达进行分析。结果表明, 经过原生质融合获得一株 LI-F 类抗菌脂肽高产菌株 F5-15。菌株 F5-15 的 LI-F 类抗菌脂肽产量为原始菌株产量的 3.1 倍, LI-F 类抗菌脂肽合成酶的 4 个关键基因在融合菌株 F5-15 中的表达量分别是其在原始菌株 JSa-9 中的 10.48、2.48、2.1 和 11.8 倍。

关键词: 原生质体制备, 原生质体融合, 实时荧光定量 PCR

Breeding of high-producing LI-F lipopeptide *Paenibacillus polymyxa* by protoplast fusion and differential expression analysis of fusion strains

Dong Yan, Jinzhi Han, Xiaomei Bie, Zhaoxin Lu, Fengxia Lü, Haizhen Zhao, and Chong Zhang

College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: Auxotrophic strains of N1-37 (Phe⁻) and N2-27 (His⁻), screened from mutations of *Paenibacillus polymyxa* JSa-9 previously, were used as the parent strains to screen high-producing LI-F antibacterial lipopeptide fusion strain through protoplast fusion with polyethylene glycol as a promote agent. Fusion strain F5-15 was obtained. Then the product of LI-F antibacterial lipopeptide was quantified by HPLC, and the difference of expression of the key genes of lipopeptide synthase between wild

Received: November 19, 2014; **Accepted:** March 9, 2015

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31271828), Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2011BAD23B05).

Corresponding author: Xiaomei Bie. Tel: +86-25-84396570; E-mail: bxm43@njau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31271828), 国家科技支撑计划 (No. 2011BAD23B05) 资助。

strain JSa-9 and the fusion strain was analyzed by real-time PCR. LI-F antibacterial lipopeptide yield of the fusion strain F5-15 was 3.1-fold of the original strain JSa9's, and the expression levels of the target genes were 10.48, 2.48, 2.1 and 11.8 fold of the initial strain JSa-9, respectively.

Keywords: protoplast preparation, protoplast fusion, real-time PCR

LI-F 类抗菌脂肽是一类由多粘类芽胞杆菌通过非核糖体途径合成的缩酚肽类环状多肽。它是由 6 个氨基酸残基和 1 个脂肪酸链 (2-胍基-3-羟基十五烷酸, 简称 GHPD) 组成的环状脂肽类抗生素, 对革兰氏阳性细菌特别是金黄色葡萄球菌具有显著的杀菌活性, 且能有效地抑制串珠镰刀菌、黄曲霉菌等丝状真菌^[1-2]。

原生质体融合技术是通过酶解除去微生物的细胞壁, 形成由半透性质膜包裹着的原生质体, 随后在高渗溶液环境下, 借助促融剂或者诱导剂的作用, 使 2 个或以上的种、属间异源的原生质体互相融合, 并可以再生出细胞壁以及形成完整的细胞^[3]。1974 年, Ferenczy 等^[4]通过离心诱导使白地霉 *Geotrichum candidum* 营养缺陷型菌株发生融合。微生物原生质体融合技术是目前细胞工程领域内研究的一大热点, 已经广泛应用于育种工作中^[5]。

在前期研究中, 以多粘类芽胞杆菌 *Paenibacillus polymyxa* JSa-9 为亲本, 通过亚硝基胍 (NTG) 诱变育种, 获得了两株带有组氨酸营养缺陷型标记的突变菌株 N1-37 和 N2-27, 该两株突变菌株与原始菌株相比较具有高产 LI-F 类抗菌肽的优势。本研究拟将该两株突变株作为亲本菌株, 采用聚乙二醇 (PEG) 作促融剂, 以期筛选出高产 LI-F 类抗菌脂肽的融合菌株。并采用实时荧光定量 PCR 技术对融合菌株与原始菌株中 LI-F 类抗菌肽合成酶关键基因 *fusA1*、*fusA2*、*fusC1*、*fusC2* 在转录水平上的差异性表达进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

多粘类芽胞杆菌 JSa-9、N1-37 (Phe⁻) 和 N2-27 (His⁻), LB 斜面培养基 30 °C 条件下生长 12 h; 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* CMCC(B)26003, LB 斜面培养基 37 °C 条件下生长 12 h; 串珠镰孢菌 *Fusarium moniliforme* ACCC 30174、尖镰孢菌黄瓜专

化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* J.H.Owen, 均在 PDA 斜面培养基上 28 °C 条件下生长 36 h。

1.1.2 主要试剂

溶菌酶 (Lysozyme), Sigma 公司; 聚乙二醇 (PEG) 6 000、顺丁烯二酸及其他试剂, 国药集团; RNA 提取试剂盒、Trizol 试剂, 上海生物工程股份有限公司; 反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect real time), TaKaRa 公司。

1.1.3 培养基与缓冲液

营养琼脂培养基, Landy 培养基, LB 培养基, 基本培养基, 完全培养基, 原生质体高渗再生培养基, 融合子筛选再生基本培养基, SMM 高渗溶液^[6], 溶菌酶液; PEG6 000 溶液: PEG6 000 溶解于不同体积 SMM 高渗溶液配制成不同浓度的 PEG6 000 溶液, 利用 5 mol/L HCl 溶液将 PEC6 000 溶液调至工作 pH。

1.2 原生质体融合方法

1.2.1 原生质体的制备

菌株 N1-37 和 N2-27 培养至对数后期, 参考韩璞等^[7]报道的菌体原生质体制备方法进行制备并计算原生质体形成率。

原生质体形成率 (%) = $(A-B) / A \times 100\%$ 。

其中, A 为总菌落数, 即溶菌酶处理前 NA 固体平板上的菌落数; B 为未原生质体化的菌落数, 即溶菌酶处理后 NA 固体平板上的菌落数。

1.2.2 原生质体的再生

将上述得到的原生质体分别用高渗 SMM 和无菌水梯度稀释, 分别涂布于再生高渗平板和 NA 固体平板。30 °C 恒温培养 1-2 d, 进行菌落计数, 计算原生质体再生率。

再生率 (%) = $(E-D) / (F-D) \times 100$ 。

其中, E 为酶解后的再生菌落数 (CFU/mL); D 为未形成原生质体菌落数, 即未被酶裂解的剩余细胞数 (CFU/mL); F 为酶解前的总菌落数 (CFU/mL)。

1.2.3 PEG 诱导原生质体融合

参考严蔚东^[6]报道的芽胞杆菌融合方法进行 PEG 诱导原生质体融合, 菌落计数后计算原生质体融合率^[8]:

$$\text{融合率}(\%) = 2M/N \times 100.$$

其中, M 为融合株数; N 为加入的原生质体数。

根据原生质体的融合率, 研究 PEG 6 000 浓度、PEG6 000 pH、作用时间对原生质体融合的影响。

1.2.4 融合子发酵液的抑菌活性

再生基本培养基平板上挑取单菌落接种于营养琼脂培养基平板, 30 °C 培养 48 h 后, 5 mm 打孔器灭菌后于菌落周围打孔, 挑取琼脂块平贴在指示菌平板上。指示菌培养条件为: 金黄色葡萄球菌接种于 LB 固体培养基, 37 °C 培养 12 h; 串珠镰孢菌和尖镰孢菌接种于 PDA 固体培养基, 28 °C 培养 3 d, 选择产生最大抑菌圈所对应的菌株作为初筛菌株。将初筛菌株接种至 Landy 培养基, 30 °C、180 r/min 条件下培养 72 h, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min。取上清液 50 μL 采用琼脂板打孔加样法, 测定菌液上清的抑菌活性。

1.2.5 融合子产 LI-F 类抗菌脂肽产量测定

融合子 Landy 发酵液 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 按 1 : 1 比例加入乙酸乙酯, 振荡混匀, 于分液漏斗中静置过夜。分取上层有机相, 下层水相以相同的方法进行二次萃取。两次得到的有机相 50~55 °C 旋蒸至干燥, 以发酵液与甲醇 50 : 1 (V/V) 的比例加入甲醇复溶, 离心取上清, 0.45 μm 滤膜过滤后, 经高效液相色谱检测^[9]。

1.2.6 遗传稳定性实验

将筛选的融合子连续传代 10 代并进行液体摇瓶发酵, 提取 LI-F 类抗菌脂肽并进行 HPLC 测定 (方法同 1.2.5), 考察突变菌株的遗传稳定性。

1.3 融合菌株脂肽合成酶基因表达分析

参照 GenBank 多粘类芽胞杆菌 E681^[10] LI-F 类抗菌脂肽合成酶基因 *fusA* 基因序列, 利用 Primer premier 5 软件设计引物序列 (表 1)。

通过 Trizol 法提取菌体 RNA, 将所得到的 RNA 溶液置于 -70 °C 保存或用于后续试验。采用 SYBR ExScript™ RT-PCR Kit (Perfect real time) (TaKaRa) 试剂盒进行荧光定量实验。RT-PCR 程序为: 95 °C

30 s, 预变性; 95 °C 5 s, 变性; 60 °C 30 s, 复性; 40 个循环。

表 1 LI-F 类抗菌肽关键合成基因引物设计

Table 1 The primers design of the key genes of LI-F antimicrobial peptide

Name	Primer sequences (5'-3')
fusA1	F: TGTAGCCTCCAGCGATCTTT
	R: CGTTAGGTGTAAGCGGCATT
fusA2	F: TGAGTATTTAGGGCGGATCG
	R: GCTAGAACAACCGCTTCCTG
fusC1	F: GCGGCATCAGAAGTATCCAT
	R: CGCACATCATCCAAATCAAC
fusC2	F: ACCAGGTGACGATGAACACA
	R: GTCTGCCCGATACCACTT
16S rDNA	F: AAGCAACGCGAAGAACCTTA
	R: CTGTCTCTCTGTCCCGAAG

2 结果与分析

2.1 菌株 N1-37 原生质体制备和再生条件的选择

如表 2 所示, 溶菌酶浓度为 0.1 mg/mL 时再生率明显高于 0.2 mg/mL 试验组。溶菌酶作用 7 min 时, 原生质体再生率最高。结果表明, 采用 0.1 mg/mL 溶菌酶, 37 °C 下处理 7 min 可获得 100% 的原生质体, 再生率分别达到 39.52% 和 31.92%。

2.2 最佳融合条件的选择

影响原生质体融合的因素很多, 根据文献^[11], 初始实验条件定为 pH 9.0, 作用时间 10 min。

根据文献报道^[12], PEG 的浓度在 30%~50% (W/V) 更有利于融合。由表 3 可知, PEG6 000 浓度为 40% 时, 融合率达到最大值。当 PEG6 000 浓度为 30% 时, 浓度较低, 不利于双亲原生质体进行充分接触进而融合。PEG6 000 浓度为 50% 时, 溶液过于粘稠, 同时可能对原生质体产生毒害作用, 影响融合率^[13]。PEG6 000 溶液 pH 为 9.0 时, 融合率高于 pH 7.0 和 pH 8.0 试验组, 与相关文献报道一致^[14]。融合时间从 10 min 到 20 min, 在 15 min 时, 融合率达到最大, 之后开始迅速下降。可能是作用时间延长, PEG 对原生质体产生毒性, 导致部分融合子死亡, 融合率下降。因此, 融合结束后应立即对溶液进行稀释并离心去除 PEG。

综上所述, 进行原生质体融合的最佳条件为: PEG6 000 浓度为 40%, 最佳 pH 值为 9.0, 最佳融合时间为 15 min。

2.3 融合子发酵液抑菌活性及 LI-F 类抗菌肽含量的测定

经过初筛和复筛, 得到一株抗菌物质产量提高

表 2 不同酶浓度和酶解时间的组合对 N1-37、N2-27 原生质体再生率的影响

Table 2 Influence on regeneration of N1-37, N2-27 protoplasts by combination between different enzyme concentration and reaction time

Concentration (mg/mL)	Treating time (min)	Regeneration rate (%)	
		N1-37	N2-27
0.1	5	10.67%±0.56 ^c	10.87%±0.31 ^d
	7	39.52%±0.41 ^h	31.92%±0.48 ^f
	10	29.55%±0.52 ^e	32.40%±0.55 ^f
	15	15.38%±0.55 ^f	16.25%±0.38 ^e
0.2	5	9.73%±0.47 ^d	9.61%±0.42 ^c
	7	7.47%±0.51 ^c	9.48%±0.50 ^c
	10	1.35%±0.64 ^b	3.17%±0.27 ^b
	15	0.61%±0.31 ^a	0.33%±0.25 ^a

Note: marked with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

表 3 不同试验因素对融合率的影响

Table 3 Effect of different experiment factors on fusion rate

Different experiment factors	Fusion rate (%)	
PEG6000 concentration (%)	30	$6.29 \times 10^{-4} \pm 2.51 \times 10^{-5}$ ^a
	40	$7.55 \times 10^{-3} \pm 3.06 \times 10^{-4}$ ^c
	50	$2.61 \times 10^{-3} \pm 2.73 \times 10^{-4}$ ^b
PEG6000 pH	7	$3.31 \times 10^{-3} \pm 3.79 \times 10^{-4}$ ^a
	8	$5.15 \times 10^{-3} \pm 4.52 \times 10^{-4}$ ^b
	9	$7.25 \times 10^{-3} \pm 1.56 \times 10^{-4}$ ^c
	10	$4.31 \times 10^{-3} \pm 3.82 \times 10^{-4}$ ^b
Fusion time (min)	15	$7.82 \times 10^{-3} \pm 4.91 \times 10^{-4}$ ^c
	20	$2.96 \times 10^{-3} \pm 3.85 \times 10^{-4}$ ^a

Note: marked with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

表 4 融合子 F5-15 发酵液对指示菌的抑制效果

Table 4 The inhibitory effect of the broth of the fusion strain F5-15 on indicator strains

Indicator strain	Diameter of inhibition zone (mm)			
	Wild strain JSa-9	Mutagenesis strain N1-37	Mutagenesis strain N2-27	Fusant strain F5-15
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.03±0.04 ^a	22.23±0.04 ^c	21.13±0.04 ^c	27.76±0.05 ^d
<i>Fusarium moniliforme</i>	14.72±0.08 ^a	18.02±0.04 ^b	17.71±0.04 ^b	21.98±0.03 ^c
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i> J.H.Owen	14.58±0.05 ^a	17.45±0.04 ^b	17.11±0.04 ^b	20.26±0.04 ^c

Note: marked with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

的融合子, 命名为 F5-15, 其发酵液对 3 种指示菌的抑菌效果见图 1 和表 4, 经融合获得融合子 F5-15 发酵液对 3 种指示菌的抑制效果显著高于野生菌株 JSa-9、亲本菌株 N1-37 和 N2-27。

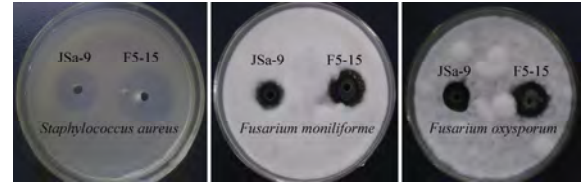


图 1 融合子 F5-15 发酵液对指示菌的抑制效果

Fig. 1 The inhibitory effect of the broth of the fusion strain F5-15 on indicator strains.

将融合子 F5-15 与亲本菌株以及野生型菌株经发酵后提取 LI-F 类抗菌肽。经检测, 以上 4 株菌 LI-F 类抗菌肽产量分别为: 88.251、50.37、123.83 和 273.68 mg/L。由此可见, F5-15 发酵液产 LI-F 类抗菌脂肽的产量为野生菌 JSa-9 的 3.1 倍, 为亲本菌株 N1-37 和 N2-27 的 1.82 倍和 2.21 倍, 具有较高的应用价值。

2.4 融合子 F5-15 传代遗传稳定性实验结果

融合子 F5-15 传 10 代培养的结果如图 2 所示, LI-F 类抗菌脂肽的产量波动较小, 表明经筛选得到的融合菌株具有优良的遗传稳定性, 可作为工业化生产菌株应用。

2.5 反转录合成 cDNA 作为模板扩增目的基因

细菌 RNA 中 70%–80% 为 rRNA, 提取得到的 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果见图 3A, 5S rRNA、16S rRNA 及 23S rRNA 三条带清晰明亮, 可以确定 RNA 的完整性是好的。用 OD_{260}/OD_{280} (Ratio, R) 来确定所提取 RNA 的纯度, 实验测定 $R=1.93$, 说

明所提取的 RNA 纯度较高,可以用于下一步反转录合成 cDNA 模板用。

将所提取的 RNA 进行反转录合成 cDNA, 并将其作为模板对 4 个目的基因进行 PCR 扩增, 电泳图

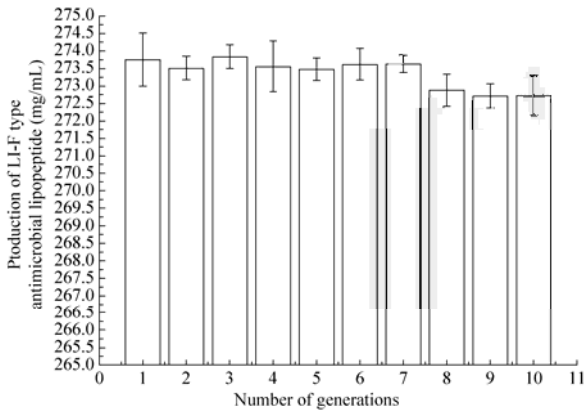


图 2 突变菌株传代稳定性
Fig. 2 Inheritance stability of mutant strains gotten.

谱如图 3B 所示, cDNA 作为模板扩增出 4 个靶基因条带单一清晰, 说明合成的 cDNA 可以作为模板进行实时荧光定量 PCR 检测。

2.6 样本中靶基因的相对定量

对原始菌株 JSa-9 和融合菌株 F5-15 中的 16S rDNA 和目的基因 *fusA1*、*fusA2*、*fusC1*、*fusC2* 进行实时定量 PCR 扩增, 选取 16S rDNA 作为内参基因用于校对目的进行 $\Delta\Delta CT$ 分析, 结果见表 5。结果显示 *fusA1*、*fusA2*、*fusC1*、*fusC2* 在融合菌株 F5-15 中的表达分别为其在原始菌株 JSa-9 中表达量的 10.48、2.48、2.1 和 11.8 倍。LI-F 类脂肽合成酶基因转录水平的变化与脂肽产量的变化一致。说明原生质体融合导致 LI-F 类脂肽合成的关键酶基因 *fusA1*、*fusA2*、*fusC1*、*fusC2* 在转录水平表达量提高。

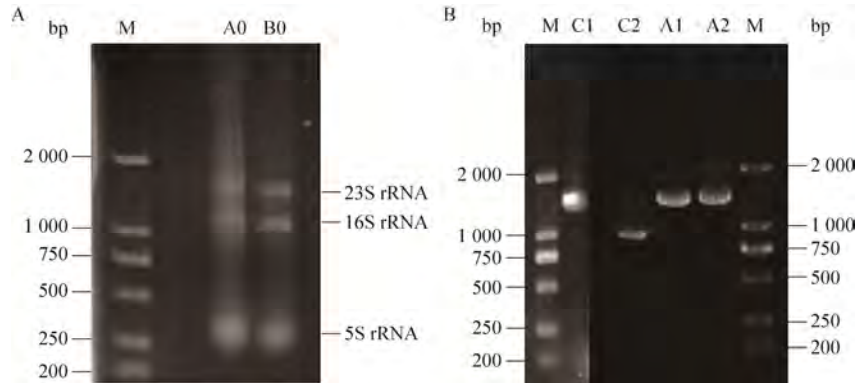


图 3 多粘类芽胞杆菌 RNA (A)和 C2 cDNA 作为模板扩增靶基因序列(B)电泳图谱
Fig. 3 RNA electrophoresis patterns of *Paenibacillus polymyxa* (A) and the electrophoresis patterns of cDNA as a template amplifying the target genes sequence (B). M: marker; A₀: JSa-9; B₀: 5-15; A₁: *fusA1*; A₂: *fusA2*; C₁: *fusC1*; C₂: *fusC2*.

表 4 多粘类芽胞杆菌融合菌株与原始菌株的 $\Delta\Delta CT$ 相对定量分析

Table 4 Delta-delta CT relative quantitation analysis of the fused and initial strains of *Paenibacillus polymyxa*

Replicate name	CT GOI CT		$\Delta\Delta CT$ Delta-delta CT	Relative concent	
	JSa-9	F5-15		JSa-9	F5-15
16S rDNA	17.68±0.49	17.82±0.38	0		
<i>fusA1</i>	24.83±0.61	21.59±0.58	-3.39±0.26	1.00	10.48±0.25
<i>fusA2</i>	34.75±0.55	33.59±0.47	-1.31±0.14	1.00	2.48±0.24
<i>fusC1</i>	30.66±0.63	27.68±0.54	-1.42±0.11	1.00	2.10±0.28
<i>fusC2</i>	34.64±0.44	31.23±0.52	-3.56±0.33	1.00	11.80±0.31

3 讨论

原生质体融合技术在微生物育种中占有重要的地位, 该技术发展于 20 世纪 70 年代, 具有很多优点, 如能够完整地传递遗传物质、有较高的重组频率等, 因此发展迅速、应用广泛, 尤其在提高代谢产物产量和改良菌种遗传性状方面, 发挥着重要作用^[15]。

在原生质体制备、再生和融合过程中, 有多重因素影响每个环节。相关文献^[16]报道, 在实验过程中大多采用对数生长期或生长中后期的菌株, 此时细胞壁中肽聚糖含量最低, 细胞对溶菌酶作用最敏感, 有利于原生质体的形成。制备原生质体的最大障碍是细胞壁的存在, 通过适当的酶处理, 除去细胞壁是关键步骤之一^[17]。由于不同微生物细胞壁组成成分的差异, 制备原生质体所用酶种类、浓度以及酶解时间大不相同。陈海昌等^[18]认为在一定范围内, 酶浓度和酶解时间都与原生质体的形成率成正相关, 而当提高酶浓度以及酶作用时间时, 原生质体再生率显著下降, 与本研究结果相符合。在融合过程, 受到很多种因素影响, 如 PEG 的分子量、浓度、pH、融合时间等^[19]。融合中 PEG 浓度需要控制在适宜范围之内, 浓度过低会导致原生质体破裂, 浓度过高则对原生质体毒害加大。PEG 融合时间也不宜过长, 否则会导致原生质体失活。

SYBR Green I 方法是一种常用的荧光标记方法。由于 SYBR Green I 能与所有的双链 DNA 相结合, 所以通用性相当好, 并且相对探针来说价格低廉, 因此在科研中使用比较普遍。但是, 也恰恰由于它没有特异性, 只要是和双链结合就会发光, 因此对 PCR 反应中的引物二聚体或者非特异性扩增也会产生荧光, 结果可能会发生假阳性^[20-21]。所以在引物设计时应特别注意, 以避免非特异性扩增的发生。在本研究中采用 SYBR Green I 检测方法, 30 个循环内没有非特异性产物扩增, 35 个循环内无引物二聚体产生, 从而可以确定荧光定量 PCR 反应的有效性。2^{-ΔΔCT} 法分析结果显示该 LI-F 脂肽合成酶基因转录水平的变化与脂肽产量的变化一致。

综上所述, 本文对多粘类芽胞杆菌原生质体的

制备、再生、融合及表达进行了研究。结果表明原生质体融合导致脂肽合成的关键酶基因在转录水平表达量提高, LI-F 类抗菌肽产量增加。这一结果为研究多粘类芽胞杆菌产 LI-F 类脂肽的高产菌株的选育, 以及为其他种类工业微生物菌种改良等方面提供了技术参考。

REFERENCES

- [1] Kurusu K, Ohba K. New peptide antibiotics LI-F03, F04, F05, F07 and F08, produced by *Bacillus polymyxa* I. Isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, 1987, 40(11): 1506-1514.
- [2] Kuroda J, Fukai T, Konishi M, et al. LI-F antibiotics, a family of antifungal cyclic depsipeptides produced by *Bacillus polymyxa* L-1129. *Heterocycles*, 2000, 53(7): 1533-1549.
- [3] Gu YZ, Gao RY. Progress on technique and application of protoplast culture. *Henan Agri*, 2008, 7(14): 51-52 (in Chinese).
谷延泽, 高瑞彦. 原生质体培养技术的发展及应用. *河南农业*, 2008, 7(14): 51-52.
- [4] Ferenczy L, Kevei F, Zsolt J. Fusion of fungal protoplasts. 1974, 248: 793-794.
- [5] Yu JX, Li JH, Pang Y. The study on the technique for protoplast fusion of bacillus. *Biotechnology*, 2000, 10(3): 45-47 (in Chinese).
余建秀, 李建华, 庞义. 芽胞杆菌原生质体融合技术. *生物技术*, 2000, 10(3): 45-47.
- [6] Yan WD. Screening of higher lipopeptides producing strains by inactivated protoplast fusion[D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2009 (in Chinese).
严蔚东. 应用灭活原生质体融合法选育抗菌脂肽高产菌株[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [7] Han P, Tian HT, Yuan SQ. Studies on protoplasts preparation and regeneration condition of *Lactobacillus reuteri*. *J Chin Instit Food Sci Technol*, 2010, 10(1): 10-18 (in Chinese).
韩璞, 田洪涛, 苑社强, 等. 罗伊氏乳杆菌原生质体的制备与再生条件的研究. *中国食品学报*, 2010, 10(1): 10-18.
- [8] Chen H, Hu YH, Qin JZ, et al. Study on conditions of canoderma protoplasts fusion. *Food Sci*, 2007, 28(2): 173-176 (in Chinese).
陈合, 胡云红, 秦俊哲, 等. 灵芝菌原生质体融合条件研究. *食品科学*, 2007, 28(2): 173-176.
- [9] Deng Y, Lu Z, Bi H, et al. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI-F04 and polymyxin B produced by *Paenibacillus polymyxa* strain JSa-9. *Peptides*, 2011, 32(9):

- 1917–1923.
- [10] Kim JF, Jeong H, Park SY, et al. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681. *J Bacteriol*, 2010, 192(22): 6103–6104.
- [11] Zhou HX. Screening of α -ALDC-higher-producing strains by inactivated protoplast fusion[D]. Baoding: Hebei University, 2004 (in Chinese).
周海霞. 灭活原生质体融合选育 α -ALDC 高产菌株[D]. 保定: 河北大学, 2004.
- [12] Akamatsu T, Taguchi H. Incorporation of the whole chromosomal DNA in protoplast lysates into competent cells of *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65(4): 823–829.
- [13] Jin Z, Xu B, Lin S, et al. Enhanced production of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* by genome shuffling. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 159(3): 655–663.
- [14] Zhou HX, Min ZR, Zhang SF. Protoplast fusion of *Bacillus subtilis* produced α -ALDC. *J Hebei Univ*, 2004, 24(3): 288–292 (in Chinese).
周海霞, 阚振荣, 张双凤. 产 α -ALDC 的枯草芽胞杆菌原生质体融合条件. *河北大学学报*, 2004, 24(3): 288–292.
- [15] Wang DY, Zang W, Sun JQ, et al. Application of bacteria protoplast fusion technique in genetic breeding. *China Brewing*, 2008, 7(4): 1–6 (in Chinese).
王登宇, 臧威, 孙剑秋, 等. 细菌原生质体融合育种技术及其应用进展. *中国酿造*, 2008, 7(4): 1–6.
- [16] Mo JY, Chen XZ, Wang ZX, et al. Preparation, regeneration and genetic transformation of *Bacillus licheniformis* protoplasts. *Biotechnology*, 2009, 19(5): 75–77 (in Chinese).
莫静燕, 陈献忠, 王正祥, 等. 地衣芽胞杆菌原生质体的制备、再生及转化研究. *生物技术*, 2009, 19(5): 75–77.
- [17] Gong J, Zheng H, Wu Z, et al. Genome shuffling: progress and applications for phenotype improvement. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(6): 996–1005.
- [18] Chen HC, Tang Y, Zhang LH, et al. The study on improvement of beer yeast flocculation by the technology of protoplast fusion. *Microbiol China*, 1994, 21(4): 213–217 (in Chinese).
陈海昌, 唐屹, 张岭花, 等. 原生质体融合技术提高啤酒酵母凝絮性的研究. *微生物学通报*, 1994, 21(4): 213–217.
- [19] Hopwood DA, Wright HM. Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Mol General Genetics*, 1978, 162(3): 307–317.
- [20] Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*, 2003, 3(1): 18.
- [21] Simpson DAC, Feeney S, Boyle C, et al. Technical brief: retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis*, 2000, 6: 178–183.

(本文责编 郝丽芳)