

酵母菌原生质体融合研究进展

张 博 润

(中国科学院微生物研究所, 北京)

自从由酵母菌制备分离原生质体的首篇报道^[1]问世以来, 研究者们对酵母菌原生质体的制备、分离、再生、融合等课题进行了系统的研究。近年来又利用这一技术进行了酵母菌的转化; 种内、种间和属间融合; 核、线粒体等转移的研究; 业已取得可喜的结果, 并探索使用这一技术对工业生产菌株进行改良。本文将对其研究进展作一介绍。

一、酵母菌原生质体的制备、分离和融合

1. 酵母菌原生质体的制备及分离

自 Eddy 等^[1]首次用大蜗牛 (*Helix pomatia*) 消化液作为溶菌酶制备酵母菌原生质体获得成功以来, 至今大多数研究者仍使用这种酶, 此外用从一种金黄色杆菌中分离到的 *zymolyase* 酶制备酵母菌原生质体也有效。非酶法制备酵母菌原生质体的研究不多, 到目前为止只有在粟酒裂殖酵母中获得成功。Berliner 等用加 2-还原-D-葡萄糖和高浓度的 $MgSO_4$ 到培养基中的方法, 可使粟酒裂殖酵母的细胞转变成原生质体, 转化率可达 70%。

2. 酵母菌原生质体的再生和复原

酵母菌原生质体的再生和复原只能在固体培养基上完成。不同种属的酵母菌原生质体, 它们的复原率各不相同, 如在明胶或琼脂固体培养基上, 啤酒酵母的复原率是 50—70%, 而粟酒裂殖酵母可达 90%。

3. 聚乙二醇 (PEG) 诱导酵母菌原生质体融合

自从 Kao 等^[2]发现 PEG 的融合性质以来, 已经确定 PEG 为通用的融合药剂。当加入适量的 PEG 时, 融合率可提高 1,000 倍以上。PEG 在融合过程中的作用, 一般认为是起稳定作用和诱导凝集作用。在酵母菌原生质体融合研究中, 一般使用分子量为 4,000 和 6,000 两种 PEG。

二、酵母菌原生质体融合研究进展

1. 种内和种间原生质体融合研究

近几年来, 人们进行了啤酒酵母、粟酒裂殖酵母、解脂复膜孢酵母、红冬孢酵母、解脂假丝酵母等种内, 乳酸克鲁维酵母×脆壁克鲁维酵母等种间的原生质体融合研究^[3-7]。并已证明通过原生质体融合使同种的酵母菌不受接合型等位基因的影响而形成杂种, 特别是对那些缺乏或难以完成有性生殖或准性生殖的种来说具有重大意义。

2. 属间原生质体融合研究

随着酵母菌种内、种间原生质体融合研究的迅速发展, 人们对酵母菌属间原生质体融合进行了尝试, 到目前为止已对近十个属的酵母菌进行了属间融合。如假丝酵母属×复膜孢酵母属^[8]; 假丝酵母属×酵母属^[9]; 假丝酵母属×毕赤酵母属^[10]; 酵母属×裂殖酵母属^[11]; 复膜孢酵母属×毕赤酵母属^[12]; 克鲁维酵母

蔡金科老师对本文提出宝贵意见, 谨表谢意。

属×酵母属^[13];汉逊酵母属×酵母属^[14];假丝酵母属×酵母属以及毕赤酵母属×酵母属(蔡金科等人,待发表),但融合频率都很低(10^{-3} — 10^{-8})。融合体的遗传分析和生化特征测定表明,得到的融合产物不太稳定,根据一些关键分类特征把融合分离子和亲代菌株进行比较发现,融合分离子中包括有亲代类型,但许多融合分离子介于中间类型,这些分离子菌株的特性不太稳定,能转变成亲代类型中的任何一个。有的研究者认为这些融合分离子菌株的核大概包含一个亲代的全部基因组加上另一亲代的一条或多条染色体。有的研究者认为融合体菌株不稳定的原因可能是由于属之间的遗传多样性,以致在单一核中难以允许两个基因组共同稳定存在。我们相信,酵母菌属间原生质体融合研究为远缘杂交育种提示了一条重要途径。

3. 利用融合技术将分离的核转移进原生质体

Ferenczy 等^[15]基于原生质体融合技术建立了一种核-原生质体融合方法,并在啤酒酵母中获得成功。他们从啤酒酵母稳定的营养缺陷株中分离核,作为核供体,然后将核转移进营养缺陷互补的受体菌原生质体中,转移频率为 10^{-7} — 10^{-8} 。核-原生质体融合的主要步骤见图 1。目前一般认为核摄入的机制是受体菌原生质体融合的过程,相似于 DNA 的转化或线粒体的转

移,假定在 PEG-Ca⁺⁺ 作用下,核被两个或多个凝聚的原生质体诱捕,而在细胞膜融合过程中核被摄入受体菌原生质体,从而完成核的转移。对标记的或野生型供体分离到的细胞核的转移研究,无论在种内或种间,无论对遗传调控或生物化学过程,如象核-核和核-细胞质关系以及真核生物产物的调节等方面的研究都是有价值的;并可帮助人们设计改良工业菌株的计划。

4. 线粒体-原生质体融合研究

在酵母菌原生质体融合研究广泛深入的基础上 Ferenczy 等利用原生质体融合技术进行了线粒体基因组的转移研究。Spencer 等^[16]用分离的线粒体与工业酵母菌的呼吸缺陷型原生质体融合,使工业用酵母菌小型菌株的线粒体缺失得到恢复,从而提高生物活性,尽管转移频率很低(10^{-8}),但遗传分析和营养测定证实,分离的线粒体的确转移进受体菌的原生质体。线粒体转移进受体菌的原生质体的基本步骤和原理与核转移的基本步骤和原理大体相似。

为了提高线粒体转移频率, Hirsuke 等^[17]发展了 mini-原生质体(即不带核而带有线粒体的小原生质体)融合方法。这一方法的特点是用蜗牛酶处理线粒体供体菌的对数期的细胞,因为在对数期时,酵母菌细胞正处于出芽繁殖阶段,线粒体通过移动进入芽细胞或子细胞的速度比细胞核分裂移动快,所以在此时芽细胞或子细胞中只含有线粒体而不含细胞核。用蜗牛酶处理后,在低速条件下离心除去带核的大原生质体,然后在较高速度条件下离心收集 mini-原生质体,其后在 PEG-Ca⁺⁺ 诱导下与受体菌的原生质体融合,从而产生呼吸完全的细胞。线粒体转移的成功为线粒体生物化学和遗传学的研究提供了重要依据,对基础研究和实际应用都具有重大价值。Spencer 等^[16]曾指出:在小型酵母和哺乳动物肿瘤细胞之间有其相似的地方,这两种细胞都失去线粒体功能,仅通过糖酵解获得能量。Wilkie 几年以前就建立了这种关系。因为通过用线粒体转化以及通过与相同种或不同种的呼吸完全菌株的原生质体融合的方法可以使小型酵母恢复线粒体功能,这似乎可能用肿瘤细胞在体内或体外进行相似的研究。从实用的角度看,这一研究的深入可为研究人类癌症作出应有的贡献。

5. 原生质体电融合技术的发展

Zimmermann 等^[18-21]发明了一种新的原生质体融合技术。它是基于双向高压电泳和细胞膜的电降解的联合作用而建立的。首先用于动、植物细胞融合。这一方法用于酵母菌细胞融合的具体操作是把酶法制备的原生质体溶于原生质体缓冲液中,原生质体浓度为 10^5 原生质体/ml,以 1:1 混合,然后取 20—40 μ l 原生质体悬浮液放到 100 V/cm 的高频交流电场内,在非同类交流电场中形成项链状构型,其后用 1—5kV/cm 脉冲/微秒降解诱发原生质体融合,并可在显微镜

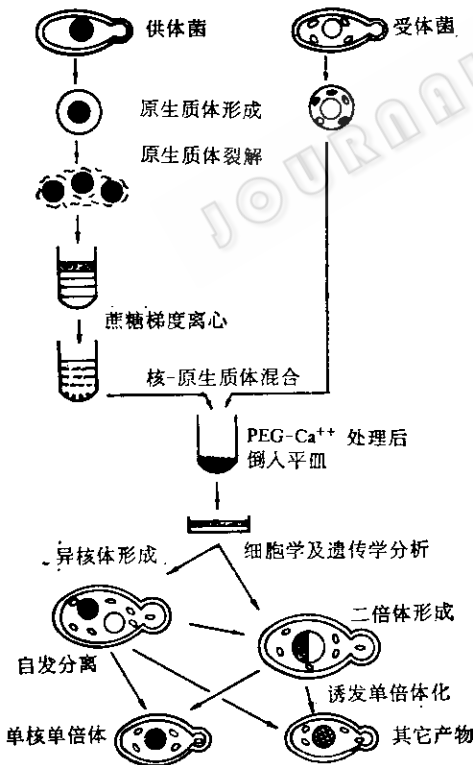


图 1 核转移到酵母原生质体的主要步骤

参 考 文 献

下观察融合现象。电融合技术的主要优点是融合频率比 PEG 诱导的融合频率高,可在显微镜下观察到哪些原生质体(细胞)发生了融合,哪些原生质体(细胞)没有发生融合;同时可在显微镜下用显微操作器挑出已融合了的原生质体(细胞),这一技术已成为遗传工程的潜在手段,它不仅用于动物细胞、植物和酵母菌原生质体的融合,也能用来融合细胞核、线粒体,还能使基因一样大小的分子进入细胞或原生质体。据报导^[12],这一新技术已申请了专利。

除以上研究外,酵母菌原生质体还为遗传操纵开辟了广阔的前景。Hinnen 等^[13]首次证实了酵母菌中的转化。他们采用已掺入酵母 *Leu 2⁺* 基因的嵌合细菌质粒 *Co1 E1*,在 PEG 诱导下,将该质粒摄取到酵母的 *Leu 2⁻* 菌株的原生质体中,实验结果证明这种完整的质粒被整合到酵母染色体的不同位点上,包括 *Leu2* 区域。在类似的研究中,Beggs^[14] 采用一个由 *Co1 E1* 质粒和酵母 *2- μ m* 质粒构建的杂种质粒载体进行转化,酵母 *Leu 2⁺* 基因又一次掺入到载体内并且以高频率转化 *Leu⁻* 菌的原生质体。Gunge 等^[15]利用原生质体融合技术,将 DNA 致死质粒 *pGKI1* 和 *pGKI2* 从乳酸克鲁维酵母转移进啤酒酵母中,这两种 *pGKI* 质粒在新寄主——啤酒酵母细胞中能自主复制和稳定存在,并能与啤酒酵母自身的 *2- μ m* 质粒共存,接受了 *pGKI* 质粒的啤酒酵母细胞表现出与供体菌株相同的致死表型,并成为对乳酸克鲁维酵母致死抗性。当用 EB 处理消除受体菌啤酒酵母细胞中存在的 *pGKI* 质粒时,致死因子和抗性特性也随之消失,根据这些结果,可以肯定致死因子和抗性因子都位于 *pGKI* 质粒上。*pGKI* 质粒属间转移的成功,为阐明酵母菌分子生物学和酵母菌分子遗传学提供了一个重要的依据,为遗传操纵提供了一种有力的工具。

综上所述,酵母菌原生质体融合和转化等方面的近期发展,为遗传操纵、分子生物学和基础理论研究提供了一种重要的工具。在实际应用方面,尽管到目前为止,还处于探索阶段,没有实际应用的正式报导,但是可以预言:由于原生质体融合开拓了种间、属间以及远缘杂交育种的新途径,随着研究的深入发展,很可能从种间融合、属间融合后代获得新颖的产品和改变种的生物学特性,这一研究的深入和完善必将会给工业带来一场革命。

- [1] Eddy, A. A. et al.: *Nature*, **183**: 1101—1104, 1959.
- [2] Kao, K. N. et al.: *Planta*, **115**: 355—367, 1974.
- [3] Legman, R. et al.: *App. Microbiol. and Biotechnol.* **18**(5): 320—322, 1983.
- [4] Maria, R. de van Broock. et al.: *Current Microbiol.*, **8**: 13—16, 1983.
- [5] Stahl, et al.: *M. G. G.*, **160**: 111—113, 1978.
- [6] Dietmar Becher. et al.: *Current Microbiol.*, **9**(5):: 297—300, 1983.
- [7] Whittaker, P. A. et al.: *FEMS. Microbiol. Lett.*, **4**: 31—34, 1978.
- [8] Provost, A. et al.: *FEMS. Microbiol. Lett.*, **6**: 309—312, 1978. ,
- [9] Novak, E. K. et al.: *Fifth International Protoplast Symposium. Szeged, Hungary. Abstractes.* pp. 90, 1979.
- [10] Vallin, C. et al.: *Fifth International Protoplast Symposium. Szeged, Hungary. Abstractes.* pp. 59, 1979.
- [11] Svoboda, A.: *Advances in Protoplast Research.* Edited by Ferenczy, L. and Forkas, G. L. Budapest., pp. 119—123, 1980.
- [12] Spata, L. et al.: In Ferenczy, L., et al. (eds) *Advances in Protoplast Research*, Pergamon Press. Oxford. pp. 131—137, 1980.
- [13] Gunge, N. et al.: *J. Bacteriol.*, **147**(1): 155—160, 1981.
- [14] Yamashita, K. et al.: *FEBS. Lett.* **132**(2): 305—307, 1981.
- [15] Ferenczy, L. et al.: *Current Microbiol.*, **7**: 157—160, 1982.
- [16] Spencer, J. F. T. et al.: *Current Genet.*, **4**: 177—180, 1981.
- [17] Fukuda, H. and Kimura, A.: *FEBS. Lett.*, **113**(1): 58—60, 1980.
- [18] Zimmermann, U. et al.: *Planta.*, **151**: 26—32, 1981.
- [19] Buschl, R. et al.: *FEBS. Lett.*, **150**: 38—42, 1982.
- [20] Halfmann, H. J. et al.: *Current Genet.*, **6**: 25—28, 1982.
- [21] Halfmann, H. J. et al.: *Arch Microbiol.*, **134**(1): 1—5, 1983.
- [22] *Biotechnol Newsatch.*, **3**(10): 7, 1983.
- [23] Hinnen, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**: 1929—1933, 1978.
- [24] Beggs, J. D.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **22**: 87—108, 1978.