

米曲霉原生质体融合及杂合二倍体的形成

辛明秀* 蒋亚平

(中国科学院武汉病毒研究所, 武昌 430072)

摘要 采用混合酶液处理纤维素酶高产菌株 3042_{N₂} (天冬酰胺缺陷型“*Asn⁻*”)及蛋白酶高产菌株 3042_{N₁₉} (蛋氨酸缺陷型“*Met⁻*”)的营养菌丝, 获得原生质体, 以 PEG 为助融剂进行融合处理, 成功地获得了米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 原生质体的营养互补融合。将异核体菌落的菌丝转接到含有 0.1% 樟脑的新鲜 MM 上, 25℃ 诱导培养 7—15 天, 挑取绿色角变菌落的孢子, 将其转接到 MM 上能迅速生长, 经孢子大小及 DNA 含量测定确定为杂合二倍体, 并进行酶活测定比较。

关键词 米曲霉, 原生质体融合, 异核体, 杂合二倍体

自 Ferenczy^[1] 于 1974 年首次报道了白地霉 (*Geotrichum candidum*) 营养缺陷型突变株的原生质体融合之后, 原生质体融合工作在丝状真菌中广泛开展。日本古屋武^[2] 和牛岛重臣^[3] 及国内邢来君等^[4,5] 在 1983 至 1989 年间分别报道了利用原生质体融合技术改良米曲霉生长特性及蛋白酶活性而进行酱油菌种的育种工作。针对当前国内酱油酿造中菌种的纤维素酶活性较低, 从而影响原料细胞壁的充分分解, 导致原料利用率低。本实验以纤维素酶高产菌株和蛋白酶高产菌株为亲本, 开展了原生质体融合研究, 得到了两项酶活接近亲本的杂合二倍体。

1 材料和方法

1.1 菌种来源及遗传标记

米曲霉 3042 由本室提供。3042_{N₂} (*Asn⁻*) 及 3042_{N₁₉} (*Met⁻*) 均由 3042 经亚硝基胍 (NTG) 诱变后挑选测定获得。

1.2 培养基

1.2.1 基本培养基 (MM): 即查氏培养基^[6]。

1.2.2 完全培养基 (CM): 即土豆培养基^[7]。

1.2.3 菌丝生长培养基: MM 补加 0.5% 酵母膏, 0.5% 蛋白胨, 0.05% 吐温 80, 70μg/ml 天冬酰胺或蛋氨酸。

1.2.4 固体培养基和半固体培养基: 在 MM

和 CM 基础上分别补加 2% 和 0.5% 琼脂。

1.2.5 高渗固体培养基和高渗半固体培养基: 在固体培养基和半固体培养基基础上补加 0.6mol/L NaCl 或山梨醇。

1.3 工具酶

1.3.1 纤维素酶 (Cellulase): “Onozuka” R-10, Japan。蜗牛酶 (Snailase): 中国科学院生物物理研究所。溶菌酶 (Lysozyme): Sigma。溶壁酶 (Lywallzyme): 广东微生物研究所。

1.3.2 混合酶液: 四种工具酶按不同浓度混合成 A、B、C、D、E 5 组 (表 1), 用 PBA (含 0.4mol/L NH₄Cl 的 0.2mol/L 磷酸缓冲液, pH6.0) 配制, 4℃ 冰箱过夜, 经 0.25μm 微孔滤膜除菌, 4℃ 冰箱保存备用。

表 1 酶的配比及浓度

酶	酶的配比及浓度 (mg/ml)				
	A	B	C	D	E
纤维素酶	6	5	5	7	6
蜗牛酶	3	5	3	5	4
溶菌酶	3	2	3	3	3
溶壁酶	0	1	2	2	2

1.4 助融剂

30% PEG (日本进口分装), 0.01mol/L

* 现工作单位北京师范大学生物系
1993-11-16 收稿

CaCl₂, pH7.5, 经0.25μm 微孔滤膜除菌。

1.5 原生质体的形成与再生

将新鲜孢子悬液(4×10⁷/ml)0.1ml 接入盛有50ml 菌丝生长培养基的三角瓶中,32℃,150r/min 恒温摇床培养13小时,菌丝经柠檬酸-磷酸缓冲液(pH7.2)洗涤后置于盛有2ml 混合酶液的离心管中,32℃,150r/min 恒温振荡酶解2小时,酶解液经4层高级擦镜纸过滤,滤液离心(3000r/min,10min)原生质体经0.7mol/L NaCl 离心洗涤两次后重悬于0.7mol/L NaCl 中。

将上述原生质体悬液0.2ml 接种于1.8ml 高渗液体CM 中,32℃静置培养4小时后取样制片,于Olympus 显微镜下观察并摄影。取原生质体悬液(3042N₂: 7.2×10⁶/ml, 3042N₁₉: 8.6×10⁶/ml)按十倍比例稀释,取不同稀释度悬液分别接种于高渗CM 和CM,32℃培养3—5天,根据菌落数按下式计算再生率。

$$\text{再生率} = \frac{\text{高渗CM上菌落数} - \text{CM上菌落数}}{\text{显微镜计数的原生质体数}} \times 100\%$$

1.6 原生质体的融合处理^[8]

$$\text{融合频率} = \frac{\text{高渗MM上菌落数} \times \text{稀释倍数}}{\text{高渗CM上菌落数} \times \text{稀释倍数}} \times 100\%$$

1.7 异核体及杂合二倍体的形成^[9]

1.8 孢子体积及DNA含量的测定^[8,10]

小牛胸腺DNA 购于华美生物工程公司。

1.9 酶活测定

酶液提取^[4]及蛋白酶活力测定采用Folin法^[11]。纤维素酶活(CMC)测定采用3,5-二硝基水杨酸法^[12]。

2 结果与讨论

2.1 原生质体的形成与再生

2.1.1 菌龄对原生质体形成的影响:国内杨惠英等^[13]认为:菌丝越幼嫩越有利于酶解。但从表2结果看并非如此,而是在菌丝生长的某个阶段(培养13小时)对混合酶液最为敏感,在此阶段酶解较易获得大量的原生质体。过早过晚都不利于酶解。这可能是因为菌丝生长的不同阶段其细胞壁的结构组成有所不同,从而导致对混合酶液的敏感性不同。

2.1.2 酶浓度及配比对原生质体形成的影响:

根据前人经验,单一酶对丝状真菌原生质体释放效果很差,这是由于其细胞壁结构及组成的复杂性所致。对混合酶液的配比和浓度进行了探索,结果B组较为理想(图1,表1)。许多学者在酶解前用巯基化合物如二硫苏糖醇(DTT)对菌丝体进行预处理,有利于酶解产生大量原生质体。这是由于巯基化合物能松动细胞壁的蛋白质结构,便于酶的水解。本实验在混合酶液中加入5mmol/L DTT,使预处理和酶解两个过程合二为一,省去了预处理过程,既简化了实验程序,又节省时间收到了好的效果。

表2 菌龄对原生质体形成的影响

原生质体量(个/ml) 菌株	菌龄(h)				
	8	12	13	14	16
3042N ₂	3×10 ⁵	5×10 ⁵	8×10 ⁶	6.3×10 ⁶	2.4×10 ⁶
3042N ₁₉	4.5×10 ⁵	6.2×10 ⁶	1×10 ⁷	7.3×10 ⁶	3.2×10 ⁶

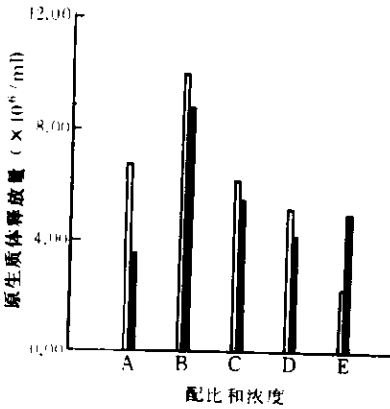


图1 酶的配比及浓度对原生质体形成的影响
□:3042N-19, ■:3042N-2

2.1.3 培养基的组成成分对原生质体形成的影响:在菌丝培养时间(13小时),培养温度及酶浓度一定情况下,菌丝生长培养基培养的菌丝酶解2小时,原生质体释放已接近最大(图2)。而培养基b和c培养的菌丝则需酶解3—4小时,原生质体释放量才达到最大,且量少。这是由于培养基的成分直接影响菌丝细胞壁的构成成分,从而造成了菌丝对混合酶液的敏感性的差异,这与 Peberdy^[14]的报道相一致。

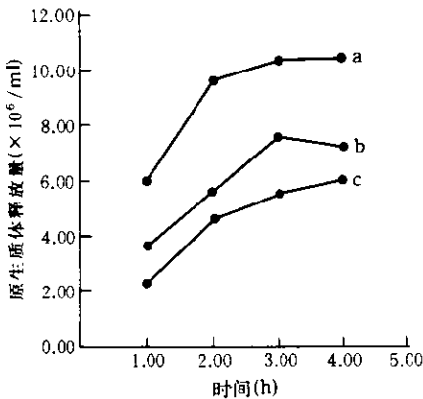


图2 培养基及酶解时间对原生质体形成的影响(3042N-2)

a. 菌丝生长培养基 b. MM+Asn c. 土豆培养基

2.1.4 渗透压稳定剂对原生质体形成的影响:从图3看出:PBA效果最好,0.7 mol/L NaCl和KCl次之,0.8mol/L 山梨醇效果最差。这是因为稳定剂的性质和浓度是维持和控制原生质体数量的重要因素,同时对酶解活性反应具有一定的促进作用。

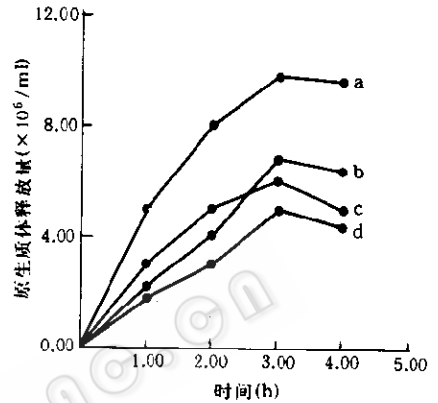


图3 渗透压稳定剂对原生质体形成的影响(3042N-2)
a. PBA b. 0.7mol/L KCl
c. 0.7 mol/L NaCl d. 0.8 mol/L Sorbitol

2.1.5 原生质体的再生及再生率:在液体高渗CM中观察到两种再生方式,即原生质体自一端或两端直接再生菌丝和原生质体先形成酵母出芽状链,再长出菌丝(图版1)。这与 Nohmi^[15]及邢来君^[4]观察米曲霉的结果一致。在固体高渗CM上的再生率 3042N-2为 1.44×10^{-1} , 3042N-19为 1.36×10^{-1} 。丝状真菌再生率较低,可能是因为有些原生质体缺少细胞核或是其它重要的细胞器^[16]。并且酶的浓度、渗透压稳定剂等多种因素都对原生质体的再生有影响。

2.2 原生质体的融合

加入助融剂后,在很短时间内(1—3 min)就可在显微镜下观察到原生质体立即聚集、靠近和接触,同时还可观察到少数特别大的原生质体(直径 $20\mu\text{m}$),是融合后的原生质体。可见原生质体融合在较短时间内即可完成。融合时间超过10分钟,不能得到融合子,这是由于

PEG 对原生质体的毒害作用而影响了原生质体的再生所致。另外,原生质体的纯度对融合也有影响。因为原生质体含有较多的菌丝碎片,加入助融剂后由于菌丝碎片的聚集,会限制和阻碍原生质体的聚集和融合。在融合过程中,既有单个双亲的原生质体融合,也有多个双亲原生质体的融合。关于这两种情况下融合原生质体在萌发过程中其遗传物质如何重组、分离而发育为异核体,有待于进一步研究。

2.3 异核体的形成

表3 融合频率

原生质体对	原生质体数(个/ml)	CM 上再生菌落数	MM 上再生菌落数	融合频率
3042N ₂ (Asn ⁻)	1-5×10 ⁶	1.48×10 ⁴	1.68×10 ²	1.13×10 ⁻²
3C42N ₁₉ (Met ⁻)	1-5×10 ⁶			

2.4 杂合二倍体的获得

在异核体的细胞中,含有来自双亲的细胞核独立存在于一个细胞中,在传代中极易发生分离而重新恢复为亲本类型。只有极少的机会发生核融合而成为一个二倍体的细胞核,可发育为杂合二倍体。体现在形态上:当异核体形成菌落和分生孢子后,菌落表面就有杂合二倍体的斑点或扇形(角变)出现。将该斑点或扇面的分生孢子分离后,可得到杂合二倍体的菌株^[18]。自然情况下核融合的频率极低,Pontecorvo 和 Roper^[19]发现樟脑对异核体中核的融合有促进作用。本实验将异核体菌落的菌丝转接到含有 0.1%樟脑的 MM 上诱导培养 7-15 天(25℃),有的菌落出现绿色孢子角变,将角变孢子转接到新鲜 MM 上,孢子能萌发,生长迅速,培养 2 周后向培养基中分泌大量黄褐色色素。经孢子体积测量和孢子 DNA 含量测定,确定为杂合二倍体,命名为 F₁、F₈、F₂₁ 和 F₆₅。这四株杂合二倍体传 10 代后其菌落形态和酶产量均较稳定。

融合处理后在高渗 MM 上培养 3-7 天,长出的菌落孢子颜色不均一,呈浅、深黄色混杂分布。按照 Pontecorvo 和 Sermoniti^[17]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。所以这些孢子呈混杂状态分布的菌落为异核体(图版 I)。未经融合处理的单亲或混合的双亲原生质体,以及用助融剂处理单亲原生质体后在 MM 上均无菌落出现。说明助融剂能促进营养互补融合。融合频率见表 3。

2.5 亲本及杂合二倍体蛋白酶及纤维素酶活(CMC)的比较

从表 4 可看出:4 株杂合二倍体的 CMC 酶活均低于融合亲本 3042N₂,接近或略高于 3042N₁₉。蛋白酶活均高于 3042N₂,除 F₈ 外均低于 3042N₁₉。可见两项酶活基本上介于融合亲本之间。因此通过原生质体融合使融合亲本的遗传物质得到了重组。4 株融合子的蛋白酶活和 CMC 酶活都高于出发菌株 3042,其中 F₈ 的蛋白酶活是 3042 的 2.42 倍,CMC 酶活是 3042 的 1.18 倍。通过原生质体融合技术提高了酶活性,达到了菌种改良的目的。这些杂合二倍体传代稳定,传 10 代未发生分离。其发酶条件及应用价值有待于进一步研究。

致谢:本工作得到刘捷同志的大力帮助,黄秀梨副教授审阅全文,特此致谢。

参 考 文 献

[1] L. Ferenczy, F. Kevei, J. Zsolt. Nature, 1994. 248: 793.

表4 亲本及融合子的特性

菌株	菌落直径* (cm)	孢子体积 (μm^3)	DNA含量 ($10^{-7}\mu\text{g}/\text{孢子}$)	纤维素(CMC) 酶活(μ/g)	蛋白酶活 (μ/g)	倍性
3042	5.25	20.16	1.93	541.93	1960.8	N
3042 _{N-2}	4.40	21.35	1.90	742.03	2592	N
3042 _{N-19}	4.21	20.51	1.60	591.96	3801.6	N
F ₁	5.14	43.28	3.25	601.2	3542.4	2N
F ₈	5.08	40.63	3.41	641.98	4752	2N
F ₂₁	4.97	39.17	3.36	591.96	2851.2	2N
F ₆₅	5.18	36.72	2.96	591.96	3240	2N

* 菌落直径为在完全培养基上生长7天测定结果

- [2] 古屋武,石毛雅夫,内田一生等.日本农芸化学会志,1983.57(1):1-3.
- [3] 牛岛重臣.日本酿造协会杂志,1984.79(10):721-723.
- [4] 邢来君,张军,孙光,等.真菌学报,1987.6(4):242-247.
- [5] 邢来君,温廷益,罗会文,等.真菌学报,1989.8(3):227-232.
- [6] 武汉大学,复旦大学生物系微生物教研室.微生物学,北京:高等教育出版社,1979.84.
- [7] 范秀荣,李武广,沈萍.微生物学实验,北京:高等教育出版社,1989.262.
- [8] 梁平彦,刘宏迪,陈开英,等.遗传学报,1981.8(4):287-293.
- [9] Kihachiro OGAWA, H Ohara, N Toyama. Agric Biol Chem, 1988. 52(2):337-342.
- [10] 北京大学生物系.生物化学实验指导,北京:高等教育出版社,1979.130.
- [11] 施安辉.中国调味品,1986.6:9-10.
- [12] 郑寿亭.微生物酶及其应用,济南:山东人民出版社,1982.193-194.
- [13] 杨惠英,吴志丹,叶舟,等.遗传,1992.14(1):31-34.
- [14] J F Peberdy. In microbial and plant protoplasts. Academic press London, 39-50.
- [15] Takehiko NOHMI, Eiji ICHISHIMA. Agric Biol Chem, 1982. 46(3):809-810.
- [16] J F Peberdy. J Gen Microbiol, 1971. 69:325.
- [17] Pontecorvo G, G Sermonti. Jour. Gen. Microbiol., 1954. 11:94-104.
- [18] 陈水青,王永华.微生物遗传学导论,上海:复旦大学出版社,1990.102-103.
- [19] Pontecorvo G, Roper J A. J Gen Microbiol, 1953. 8:198.

PROTOPLAST FUSION OF *ASPERGILLUS ORYZAR*

Xin Mingxiu Jiang Yaping

(Wuhan Institute of Virology Academic Sinica, Wuchang)

Abstract *Aspergillus oryzae* 3042 is a widely used strain for the production for soy sauce in our country. In order to improve its enzyme activities of cellulase and protease, we chose 3042_{n-2} (cellulase hyper producer, Asn⁻) and 3042_{n-19} (protease hyper producer, Met⁻) as the parent strains of fusion. The two strains were obtained from 3042 with NTG treated. On the basis of the study on formation and regeneration of protoplasts of the two strains, the protoplast fusion between them were promoted by PEG 6000. The colonies of fusants that first appeared on the MM were heterokaryous. The mycelia of them were incubated on MM containing 0.1% camphor at 25°C for 7—15 days, then green sectors appeared. And measurement of DNA content and size of the conidia, the sectors were proved to be heterozygous diploid. Four strains exhibit higher protease and cellulase activities than that of strain 3042, and intermediate enzyme activities between strains 3042_{N-2} and 3042_{N-19}. One of them exhibit higher protease activity than strain 3042_{N-19}. Further research is needed for the application of the fusants.

Key words *Aspergillus oryzae*; protoplast fusion; heterokaryon; heterozygous diploid