

氦氖激光、紫外复合诱变天麻素产生 菌华根霉 LN-A 的原生质体

韩文霞¹ 刘迪¹ 陈二方² 曹海燕² 詹花² 朱宏莉^{1,2*}

(1. 西北大学生命科学学院 陕西 西安 710069)

(2. 国家微检测工程研究中心 陕西 西安 710069)

摘要: 本文通过研究酶组合、酶浓度、酶作用时间和菌龄等因素对天麻素产生菌华根霉(*Rhizopus chinensis*) LN-A 原生质体制备和再生的影响, 总结出了原生质体制备和再生的最佳条件: 选用对数生长期的菌株, 以蜗牛酶 5 mg/mL + 纤维素酶 5 mg/mL + 溶菌酶 2 mg/mL 30°C 保温处理 2 h, 原生质体形成率达 5.8×10^7 , 原生质体再生率为 5.7%。在此基础上首次利用 He-Ne 激光、紫外线复合诱变天麻素合成菌的原生质体, 当选用 15 mW 的 He-Ne 激光辐射原生质体 20 min, 再用紫外辐照 150 s 时获得了转化率及天麻素得率都明显提高的突变株, 其天麻素得率比出发菌株提高 20% 以上。

关键词: 天麻素, 华根霉, 原生质体制备, 原生质体再生, 诱变

Mutagenesis on Gastrodin Producing Strain *Rhizopus chinensis* LN-A by He-Ne Laser and UV Irradiation

HAN Wen-Xia¹ LIU Di¹ CHEN Er-Fang² CAO Hai-Yan²
ZHAN Hua² ZHU Hong-Li^{1,2*}

(1. Institute of Life Science, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

(2. National engineering research center for miniaturized detection system, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

Abstract: The optimum conditions for preparation and regeneration of *Rhizopus chinensis* LN-A protoplasts were obtained after studying the effects of different factors on them, such as the enzyme composition, concentration and reaction time as well as the different growth phase of the strains. After treating the strains in log phase with concentration of 5 mg/mL snail enzyme, 5 mg/mL cellulose enzyme, 2 mg/mL lysozyme for 2 hours under 30°C, the protoplast formation was up to 5.8×10^7 and regeneration reached 5.7%. On the basis of this, irradiation of He-Ne laser ($\lambda = 632.8$ nm, power = 15 mW) for 20 minutes and UV for 150 seconds were performed on the protoplasts of *Rhizopus chinensis* LN-A. The mutant LN-B was obtained and the final gastrodin yield was up to 28.9%, which was 20% higher than LN-A.

Keywords: Gastrodin, *Rhizopus chinensis* LN-A, Protoplast formation, Protoplast regeneration, Mutagenesis

基金项目: 陕西省科技厅科技攻关计划[No. 2005K16-G7(3)]; 陕西省教育厅专项(No. 2008JK469)

* 通讯作者: Tel: 86-29-88302411; 信箱: zhuyjw1971@nwu.edu.cn

收稿日期: 2009-06-02; 接受日期: 2009-09-10

天麻素(Gastrodin, 化学名为对羟甲基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷, 又称天麻苷)是兰科多年寄生植物天麻(*Gastrodia elata*B1.)的主要有效成分^[1]。通过对天麻素药理和临床应用的研究发现, 天麻素具有镇静、抗惊厥、抗癫痫、镇痛、抗衰老和增强免疫力等功能^[2]; 临床上广泛应用于眩晕症、神经痛、头痛、神经衰弱及癫痫的辅助治疗, 疗效确切而毒副作用极低。近些年来天麻素也被广泛应用于保健食品的开发利用。

当今随着对天麻素应用的广泛研究, 市场对其需求也日益增大。目前天麻素主要是通过植物提取^[3,4]获得。但此法存在含量太低、资源浪费、成本高、破坏生态环境等缺陷; 还有尝试利用化学合成法生产天麻素^[5], 但反应步骤多, 副产物多且反应专一性差又是不可避免的问题。而采用微生物转化法, 通过微生物酶系的还原和糖基化作用对底物对羟甲基苯甲醛进行结构修饰, 将葡萄糖基直接引入其结构中, 从而高效率的获得天麻素, 为天麻素合成提供了一条新途径^[6]。该法相对于前两种方法而言, 具有反应条件温和、无污染、成本低、副产物少等优点, 同时还显示出高度的立体选择性、区域选择性以及基团选择性^[7-9]。

微生物转化的一个关键问题是高效转化菌株的获得。目前在菌种选育方面, 国内外报道较少, 而且多以菌体细胞为作用对象, 采用紫外线或各种化学手段进行诱变^[10], 而以原生质体作为诱变对象获得转化合成天麻素的高效菌株尚未见相关报道。以菌体细胞作为诱变对象容易造成遗传的不稳定性和筛选的困难。原生质体的生理状况较为稳定, 相对于菌体细胞由于缺乏了细胞壁的保护, 因此对于各种诱变剂更为敏感, 且更易发生变异, 并能在较短时间内大幅度提高菌株的生产性能, 从而筛选出遗传性能稳定的高产诱变株。其已在抗生素、酶制剂、有机酸及维生素等高产菌株的选育中得到日益广泛的应用^[11]。

目前关于华根霉原生质体的制备和再生, 国内外还未见相关报道。因此本文研究了不同因素对天麻素产生菌华根霉(*Rhizopus chinensis*)LN-A 原生质体形成与再生的影响, 获得了原生质体制备和再生的最佳条件, 同时由于 He-Ne 激光诱变具有能量密度高、靶点小、单色性和方向性好、诱变当代即可出现遗传性突变等特点, 我们将 He-Ne 激光与传统

紫外诱变结合起来, 复合诱变转化菌的原生质体, 以期获得转化率和天麻素得率均有提高的突变株, 为进一步提高天麻素产量及大工业生产奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

菌株 *Rhizopus chinensis* LN-A 为本实验室选育菌, 是从 50 株菌中筛选出的具有转化合成天麻素能力的菌株^[12]。

1.2 培养基

1.2.1 土豆培养基(PDA): 土豆 200 g, 葡萄糖 20 g, 水 1000 mL, pH 自然, 固体培养基另加琼脂 20 g。

1.2.2 酵母汁培养基: 葡萄糖 10 g, 酵母膏 10 g, 蛋白胨 5 g, NaCl 5 g, K_2HPO_4 5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.0。固体培养基另加琼脂 20 g。

1.2.3 高渗培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 20 g, 酵母膏 20 g, 甘露醇 0.3 mol/L, 琼脂 12 g, pH 6.3, 蒸馏水 1000 mL。

1.2.4 低渗培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 20 g, 酵母膏 20 g, 琼脂 12 g, pH 6.3, 蒸馏水 1000 mL。

1.2.5 渗透压稳定剂: pH 6.0, 0.8 mol/L 山梨糖 + 0.8 mol/L 甘露醇 + 0.6 mol/L NaCl。

1.3 菌株生长曲线的测定

丝状真菌生长曲线的绘制一般采用菌丝称重法来测量。将菌种接于土豆液体培养基中, 28°C、160 r/min 摇床培养。每隔 12 h 取样离心(4500 r/min, 15 min)分离菌体, 测量菌体湿重。测量后将菌体冷冻保存。待全部菌体湿重测量完成后将所有菌置于烘干箱内烘干脱水(70°C, 15 h), 测量菌体干重, 设 3 组平行, 以培养时间为横坐标, 以菌体干重为纵坐标绘制生长曲线。

1.4 原生质体制备与再生^[13]

1.4.1 酶液的配制: 采用渗透压稳定液配制酶液, 酶液组成为纤维素酶 + 蜗牛酶 + 溶菌酶, 制备好的酶液要用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌。

1.4.2 菌体培养: 将 *Rhizopus chinensis* LN-A 菌在土豆斜面培养基上活化, 将已活化的菌株取一环接入装有酵母汁培养液的锥形瓶中(60 mL/250 mL), 28°C 静置培养 30 h~36 h。将经过培养的菌丝体用 4000 r/min 离心 10 min, 再用无菌水洗涤 2 次。最后再用渗透压稳定剂冲洗 1 次, 供制备原生质体时使用。

1.4.3 原生质体制备: 在制备好的菌丝体里按 1 g 湿菌丝体加入 5 mL 的酶液量进行计算加入酶液, 30°C 水浴酶解 3 h, 隔一定时间摇动, 使菌丝体悬浮, 充分酶解并避免原生质体聚积成团。定时取样 (0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h), 并设 3 组平行。取样的时候从 0.5 h 开始, 用 4 层滤纸过滤菌丝体和其他杂质, 用真空抽滤机迅速抽滤含有原生质体的液体。抽滤完的液体再用高速冷冻离心机离心(4°C、8000 r/min, 10 min), 倒掉上清液保留沉淀。用渗透压稳定液将沉淀洗涤 2 次, 制备成原生质体悬浮液。显微镜观察原生质体形成情况; 用血球计数器进行原生质体计数, 并计算原生质体的制备率。

1.4.4 原生质体再生: 将上述制备的原生质体悬浮液用渗透压稳定液做适当的稀释后, 然后在高渗培养基和低渗培养基上分别加入 0.1 mL 悬浮液涂布, 28°C 培养 24 h~48 h。

1.4.5 原生质体再生率的计算: 将酶处理后的菌体分别经 2 个过程处理: a) 用无菌水稀释, 在低渗培养基平板上培养计数(采用混合平板法或涂布法, 每稀释度重复 3 个平板), 生长的菌落数为未形成原生质体的抗低渗透压的原菌数(B); b) 用渗透压稳定剂系列稀释, 在高渗培养基平板上培养计数(每稀释度作 3 个平皿), 28°C 倒置培养 24 h~48 h, 所长出的菌落数为原生质体再生的菌数和从未形成原生质体的原菌数之和(A)。

$$\text{原生质体再生率}=(A-B)/C$$

其中 A 为高渗培养基上长出来的菌落数, B 为低渗培养基上长出来的菌落数, C 为稀释后 0.1 mL 悬浮液中的原生质体数。

1.5 He-Ne 激光、紫外线对 *Rhizopus chinensis* LN-A 原生质体的复合诱变^[14,15]

将制备好的原生质体液(原生质体含量约 10^7 个/mL) 0.2 mL 装入无菌小试管中照射, He-Ne 激光($\lambda = 632.8$ nm)的输出功率为 20 mW, 扩束光斑直径 0.3 cm, 输出电流 11 mA, 照射距离 30 cm, 照射剂量分别为: 10 min、15 min、20 min、25 min、30 min, 另设对照(CK) 0 min。再将辐照后的原生质体悬液分别涂布在高渗培养基上, 用紫外线照射 150 s, 平行设立对照组, 避光培养 48 h。

1.6 突变株的筛选^[12]

初筛方法: 将照射过的菌落移入土豆液体培养基, 28°C 摇床培养(160 r/min)48 h, 离心弃上清液, 收集菌体并用无菌生理盐水洗涤 3 次。取适量菌体

接入含糖无菌水中(2%葡萄糖), 再加入 2.3 mg/mL 底物(对羟基苯甲醛无水乙醇溶液)进行转化。平行设两组对照: 含糖无菌水+底物; 含糖无菌水+菌体。

定时取样与底物和天麻素标准品对照点样。色谱条件: 氯仿-甲醇 8:2, 显色剂为 10%的磷钼酸乙醇溶液^[16]。根据薄层层析结果, 选出有转化作用的菌进行复筛。

复筛方法: 将初筛选出的菌株接入含糖无菌水中, 加入底物进行转化, 转化结束后, 转化液减压浓缩并用等量的正丁醇萃取 3 次, 合并后回收正丁醇, 残渣加色谱纯甲醇溶解定容, 离心除去不溶物, 取上清液进行 HPLC 测定以求得底物转化率及天麻素得率。色谱条件^[17]: 色谱柱: 5 μm Micro RaK-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, Rainbow); 检测波长: 220 nm; 流动相: 乙腈-0.05%磷酸溶液(3:97); 流速: 1.0 mL/min。

1.7 LN-B 的遗传稳定性测定

将 LN-B 每月传代 1 次, 连续传代 5 次, 将 5 次传代的斜面同时活化进行转化, 测定每次传代后的转化率。

2 结果与分析

2.1 菌株的生长曲线

由图 1 可以看出 LN-A 在经历一个短暂的延迟期后从 12 h 开始迅速生长达到对数期, 第 96 小时达到生长最高峰, 随后转入稳定期, 曲线渐趋平缓。

2.2 原生质体形成与再生条件的探索

原生质体的制备从本质上讲是各类溶壁酶对细胞壁的酶解生化过程。而原生质体再生, 则是原生质体形成细胞壁, 进而在普通培养基上生长繁殖的

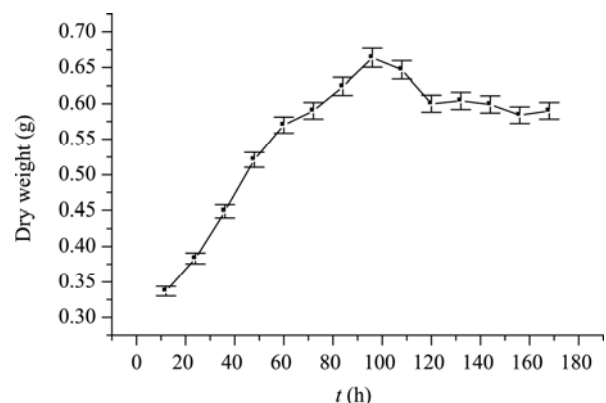


图 1 LN-A 的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of LN-A

Note: Each point and bar represents the mean and standard error in triplicate.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

过程。影响原生质体制备和再生的因素很多,包括菌体预处理、酶浓度、酶的作用时间、菌龄等。

2.2.1 酶液组成及酶浓度对原生质体制备的影响:适宜的酶浓度是影响原生质体制备的重要因素,酶中往往含有对原生质体有害的酶类(如过氧化物酶、核糖核酸酶等),随着酶量的增加,杂酶的浓度也会随之增加,当达到一定浓度时,必然会影响原生质体的活性^[18];其次,酶浓度过大,一方面易使菌体凝集,难于原生质体化;另一方面会使细胞脱壁太彻底,从而失去了再生时合成细胞壁的引物,降低原生质体的再生率。相反酶浓度过小,会使细胞壁脱壁不彻底,影响原生质体的形成率,并进一步降

低原生质体的再生率。

将静置培养至对数期的菌丝体加入不同浓度的酶组合作用 2 h,测定原生质体的形成率和再生率,结果如表 1 所示。

不同浓度的酶组合对 LN-A 原生质体形成率和再生率都有较大的影响,表 1 清楚地显示了原生质体形成率随酶浓度的增加而提高,但再生率则呈下降趋势。当蜗牛酶 5 mg/mL,纤维素酶 5 mg/mL,溶菌酶 2 mg/mL 的时候原生质体再生率是最高的,为 5.7%,它的原生质体形成个数也较多,为 5.1×10^7 个,说明此浓度对于 LN-A 的原生质体形成及再生较适宜,不但原生质体的形成率高,其再生率也较高。

表 1 不同酶组合及酶浓度对 LN-A 原生质体制备率和再生率的影响
Table 1 The effect of different enzyme and their concentration on protoplast formation and regeneration

不同酶组合 Different kinds of enzyme	原生质体制备率(个) Protoplast formation (number)	原生质体再生率(%) Protoplast regeneration (%)
3 mg/mL snail enzyme + 3 mg/mL cellulose enzyme+1 mg/mL lysozyme	3.3×10^7	0.85
4 mg/mL snail enzyme + 4 mg/mL cellulose enzyme+1 mg/mL lysozyme	4.2×10^7	2.10
5 mg/mL snail enzyme + 5 mg/mL cellulose enzyme+2 mg/mL lysozyme	5.1×10^7	5.70
6 mg/mL snail enzyme + 6 mg/mL cellulose enzyme+2 mg/mL lysozyme	5.8×10^7	2.50

2.2.2 酶作用时间对原生质体形成率和再生率的影响:酶浓度及其作用时间对原生质体的形成和释放十分重要,渗透压稳定剂主要起维持质膜系统渗透压的作用,而破壁酶对质膜系统会有一定程度的破坏,因此酶解时间的长短也会严重影响原生质体的再生。如表 1 所示我们已经确定了最佳的酶解浓度。将静置培养至对数期的菌丝体加入蜗牛酶 5 mg/mL + 纤维素酶 5 mg/mL + 溶菌酶 2 mg/mL,分别作用不同时间后测定其原生质体的形成率和再生率,结果如图 2 及图 3 所示。

图 2 表明, LN-A 菌株原生质体形成率随酶解时间的延长而增加,超过 2 h 曲线趋于平缓,原生质体形成率不再增加。而由图 3 可知原生质体再生率在酶解时间为 2 h 时达到最高,之后则呈下降趋势,综合两方面因素,选用 2 h 为酶作用的最佳时间,在此条件下制备的原生质体再生率最高,且形成率也高。这可能是由于酶液中含有一些蛋白酶,酶解时间过长会对一些早期释放的原生质体膜造成损害从而导致原生质体破裂。

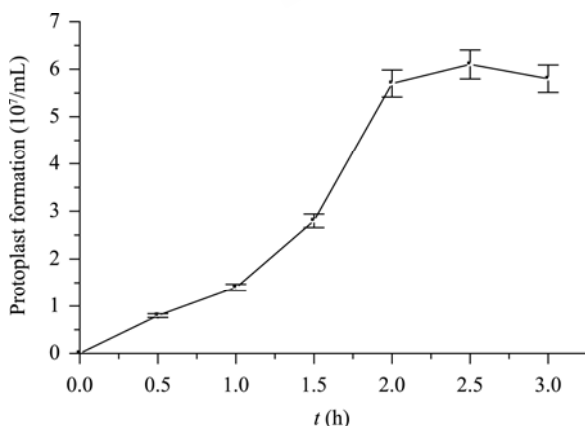


图 2 酶作用时间对原生质体形成率的影响

Fig. 2 The effect of enzyme reaction time on protoplast formation

Note: Each point and bar represents the mean and standard error in triplicate.

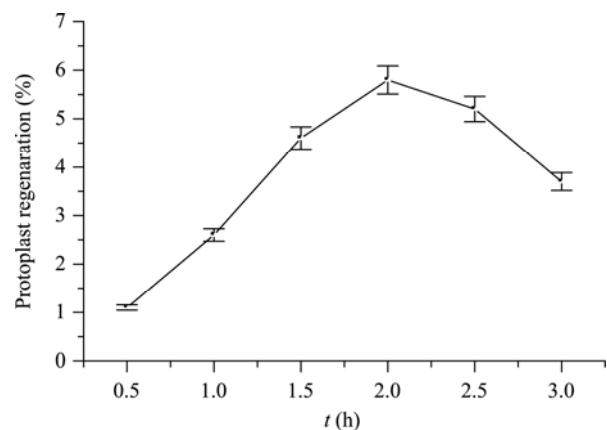


图 3 酶作用时间对原生质体再生率的影响

Fig. 3 The effect of enzyme reaction time on protoplast regeneration

Note: Each point and bar represents the mean and standard error in triplicate.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

2.2.3 菌龄对原生质体形成率和再生率的影响: 分别取静置培养 12 h~48 h 的菌丝体加入蜗牛酶 5 mg/mL+纤维素酶 5 mg/mL+溶菌酶 2 mg/mL 作用 2 h, 测定原生质体的形成率和再生率。

如图 4 和图 5 所示, 菌龄对原生质体的形成和再生也有一定影响。一般而言, 处于对数生长期菌体的形成率和再生率均较高, 这主要是因为对数期菌体的生理状态相对一致, 代谢旺盛、菌体活性高, 对酶的敏感性强, 故更易于原生质体化与再生。

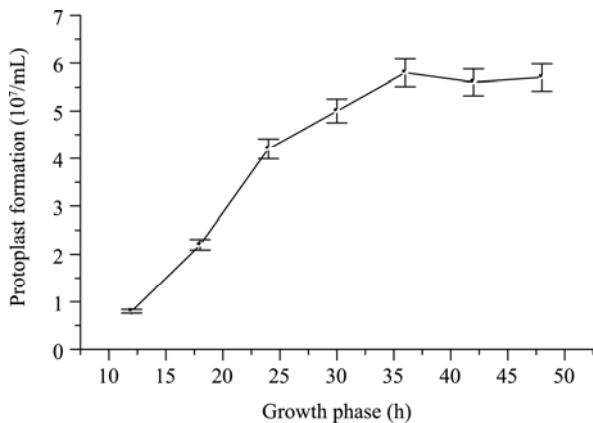


图 4 菌龄对原生质体形成率的影响

Fig. 4 The effect of different growth phase on protoplast formation

Note: Each point and bar represents the mean and standard error in triplicate.

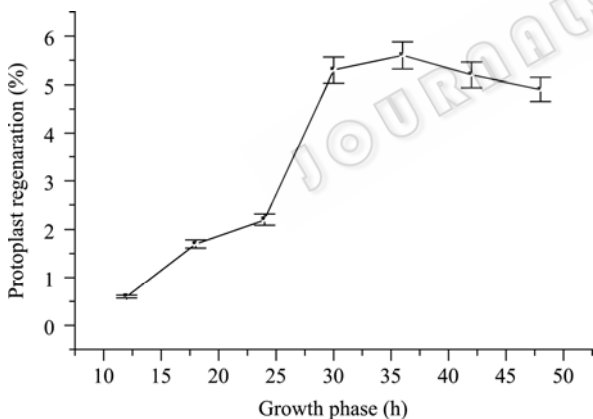


图 5 菌龄对原生质体再生率的影响

Fig. 5 The effect of different growth phase on protoplast regeneration

Note: Each point and bar represents the mean and standard error in triplicate.

2.2.4 不同渗透压稳定液对原生质体再生的影响: 原生质体由于脱去了细胞壁, 对外界环境变得非常敏感, 因而必须在一定浓度的渗透压稳定剂中进行酶解、破壁, 才能形成和保持稳定的原生质体。本次实验用了 2 种不同的渗透压稳定剂, 第 1 种为单

纯的 pH 6.0, 0.6 mol/L NaCl 溶液, 第 2 种为 pH 6.0, 0.8 mol/L 山梨糖 + 0.8 mol/L 甘露醇 + 0.6 mol/L NaCl。第 1 种形成率为 3.3×10^7 , 再生率为 1.9%, 第 2 种形成率为 5.6×10^7 , 再生率为 5.3%。由此可看出后者对原生质体的保护作用较好。

2.2.5 原生质体的显微形态观察: 菌丝在酶的作用下, 经过 10 min~20 min 后就开始释放原生质体, 最初菌丝体顶端膨大, 内容物自顶端伸出, 并逐渐脱离菌丝, 酶解 2 h 到 3 h 之后, 菌丝裂成片断, 细胞模糊, 轻轻摇动锥形瓶可促进原生质体散开。原生质体释放的两种方式, 一种是由细胞一端开口挤出来, 原生质体完全不带胞壁残余物; 另一种方式是细胞壁消解, 原生质体原位释放, 可能有胞壁残丝。刚开始释放的原生质体较小, 后来释放的较大, 所以在显微镜下观察的时候就看到了大小不一的原生质体。如图 6 所示。



图 6 原生质体显微镜下观察结果(10×40)

Fig. 6 The protoplast of LN-A (10×40)

2.3 He-Ne 激光、紫外线对 *Rhizopus chinensis* LN-A 原生质体的复合诱变结果

原生质体与菌体细胞相比缺少了细胞壁的保护, 因此对于各种诱变剂更为敏感, 且更易发生变异, 据资料显示^[19], 当用菌体细胞作诱变对照时, 原生质体的正变株及其产量的正变幅度均大于菌体细胞。

将制备好的 LN-A 的原生质体液(原生质体含量 10^7 个/mL), 用 15 mW 的 He-Ne 激光辐射后, 再用紫外线照射 150 s, 其致死率及正变率见表 2。

由表 2 可看出, He-Ne 激光辐照后再用紫外线照射 150 s, 其致死率明显提高, 且随着激光辐射剂量的增加而呈上升趋势; 当用激光照射 20 min, 再用

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表2 He-Ne激光和紫外线照射LN-A原生质体的致死率及正变率

Table 2 Lethality rate and positive mutation rate after irradiation of He-Ne laser and UV on the protoplast of LN-A

Time of He-Ne laser irradiation (min)	0	10	15	20	25	30
The amount of strain (number)	20	20	20	20	20	20
Lethality rate (%)	86	95	98	99	99.4	99.7
Positive mutation rate (%)	10	20	20	30	25	15

注: 紫外线辐照剂量为 150 s.

Note: UV irradiation lasted for 150 s.

紫外辐照 150 s 时, 其正变率最高。分析原因可能是由于: 1) 激光可产生光、热、压力、电磁场等多种效应, 并且具有一定击穿作用, 可使被辐照样内部或表面产生裂隙或损伤, 降低了其对紫外线的阻挡能力。2) 当激光作用于微生物细胞时, 生物分子吸收光子或在其电磁场作用下发生能级跃迁, 能量的增加可使生物分子活跃。细胞处于敏感状态下受到紫外线的照射, 更易于发生突变。

从所得的正变菌中经初筛、复筛, 获得两株突变菌, 其转化液中有与天麻素标准品在相同位置上显相同颜色的斑点(R_f 值 0.37), 而两个平行对照组在天麻素相应位置处无斑点。在此基础上采用 HPLC 分析转化产物, 结果显示在与天麻素标准品相同保留时间处有相同紫外吸收峰。进一步采用 HPLC 测定, 其天麻素得率比出发菌株 LN-A 提高 20% 以上, 如表 3 所示。

2.4 LN-B 斜面传代稳定性的测定结果

经传代测转化率及天麻素得率, 2[#] 菌的变化不大较稳定, 因此最终将其选为诱变菌定名为 LN-B。由表 4 可看出, 经继代 5 次后, 底物的转化率及天麻素得率变化不大, 证明 LN-B 的遗传性比较稳定。

表3 He-Ne激光和紫外线照射LN-A原生质体所筛选的突变株的转化率及天麻素得率

Table 3 The yield of gastrodin and transformation rate of the screened mutant after irradiation of He-Ne laser and UV on the protoplast of LN-A

Strain	1 [#]	2 [#]	LN-A
Time of He-Ne laser irradiation (min)	20	20	25
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde remained (%)	8.2	8.7	9.6
Gastrodin yield (%)	29.1	28.9	23.5

注: 紫外线辐照剂量为 150 s.

Note: UV irradiation lasted for 150 s.

表4 LN-B斜面传代稳定性试验

Table 4 The hereditary stability of LN-B

Batch	1	2	3	4	5
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde remained (%)	8.9	8.5	9.6	8.9	10.3
Gastrodin yield (%)	27.1	28.4	26.5	27.6	26.3

3 结论

影响原生质体形成与再生的因素很多。本试验通过研究酶组合、酶浓度、酶作用时间、菌龄等因素的影响, 总结出了天麻素产生菌 *Rhizopus chinensis* LN-A 原生质体制备和再生的最佳条件: 选用对数生长期的菌株, 以蜗牛酶 5 mg/mL+纤维素酶 5 mg/mL+溶菌酶 2 mg/mL 30°C 保温处理 2 h, 原生质体形成率达 5.8×10^7 , 原生质体再生率为 5.7%。在此基础上首次利用紫外线、He-Ne 激光复合诱变天麻素合成菌的原生质体, 获得了转化率及天麻素得率都明显提高的突变株, 其天麻素得率比出发菌株 LN-A 提高 20% 以上。此项工作为进一步提高天麻素产量及大工业生产奠定了良好的基础, 为优化天麻素的生产工艺, 高效转化合成天麻素提供了有力的技术支持。同时有关华根霉原生质体的制备和再生, 以及采用紫外线、He-Ne 激光复合诱变其原生质体以获得转化合成天麻素的高效菌株均未见相关报道, 因此这方面的探索意义匪浅。

4 讨论

原生质体的形成和再生环节中, 酶的使用剂量是重要一环, 过低酶浓度, 细胞壁脱壁慢而且不完全, 造成原生质体形成率不高。反之浓度过高, 细胞壁酶解快而且彻底, 但是原生质体再生细胞壁比较困难。由于丝状真菌的细胞壁结构主要是由乙酰几丁质和 α -葡聚糖等组成, 所以我们此次试验采用蜗牛酶、纤维素酶、溶菌酶进行破壁实验, 效果较好, 并且找到了适宜的酶组合浓度。

丝状真菌是多细胞生物, 以径向尖端方式生长, 菌丝尖端最为幼嫩, 很容易被酶降解。老的菌丝细胞壁上沉积有不易被酶降解的物质, 从而大大减少了原生质体的形成和释放。因此, 刚萌发的孢子和生长时间短的幼嫩菌丝最适合用于原生质体的制备与再生。此次试验也说明了选用对数生长期前期的菌种适合做原生质体的研究。

渗透压稳定剂主要起维持质膜系统渗透压的作用, 降解细胞壁的酶类则会破坏膜质系统使其难以再生, 甚至失活、破裂。当新形成的原生质体被释放到酶液中时, 渗透压稳定剂和裂解酶会对其同时产生保护和伤害作用, 所以原生质体在酶液中存在的时间不宜过长, 否则会影响到其数量和再生。

He-Ne 激光属低功率激光, 它可直接损伤或切割 DNA, 引起染色体结构或染色体数量的变化, 通过细胞分裂将这些变化遗传给下一代; 也可使其能量在染色体及 DNA 分子周围聚集, 引起分子剧烈运动或变化, 从而使 DNA 分子发生突变^[20]。He-Ne 激光的诱变作用与照射时间密切相关。随着照射时间的延长, 致死率不断上升, 而正变率却存在一个先升后降的趋势, 这说明致死率与正变率并非正相关。

参 考 文 献

- [1] 冯孝章, 陈玉武, 杨峻山. 天麻化学成分的研究. 化学学报, 1979, 37(3): 175-181.
- [2] 胡一冰, 崔佳, 韩笑, 等. 中药天麻研究进展. 贵阳中医学院院报, 2001, 23(4): 48-51.
- [3] 王兴, 周明眉. 天麻中有效成分的提取工艺. 华西药理学杂志, 2003, 18(4): 269-270.
- [4] 杨屹, 唐睿, 丁明玉. 大子 L 吸附树脂对天麻素的吸附与分离特性的研究. 分析试验室, 2004, 23(11): 1-4.
- [5] 戴晓畅, 彭啸, 吴松福, 等. 天麻素及其类似酚性糖甙的化学合成工艺研究. 云南民族大学学报(自然科学版), 2004, 13(2): 83-85.
- [6] 朱宏莉, 宋纪蓉, 黄建新, 等. 根霉 LN-1 生物合成天麻素条件研究. 化学工程, 2006, 34(11): 51-54.
- [7] 余伯阳. 中药与天然药物生物技术研究进展与展望. 中国药科大学学报, 2002, 33(5): 359-363.
- [8] Braulio M, Fraga, Laura Alvarez, et al. Biotransformation of the diterpenes epicandicandiol and candicandiol by *Mucor plumbeus*. *Journal of Natural Product*, 2003, 66(3): 327-331.
- [9] Zhan JX, Guo HZ, Dai JG, et al. Microbial transformation of artemisinin by *Cunninghamella echinulata* and *Aspergillus niger*. *Tetrahedron Letters*, 2002, 43(25): 4519-4521.
- [10] 吴振昌. 微生物激光育种学的新进展. 激光生物学报, 2004, 13(1): 3-7.
- [11] 崔大鹏, 石莲英. 原生质体再生与诱变在硫霉素产生菌选育中的应用. 中国抗生素杂志, 1999, 24(4): 265-268.
- [12] 朱宏莉, 宋纪蓉, 黄建新, 等. 微生物转化法合成天麻素. 药学报, 2006, 41(11): 1074-1077.
- [13] N Balasubramanian, G annie, P Srikalaivani, et al. Release and regeneration of protoplast from the fungus *Trichothecium roseum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2003, 49(4): 263-267.
- [14] 杜海英, 于宏伟, 韩军, 等. 原生质体诱变选育乳糖酶高产菌株. 微生物学通报, 2006, 33(6): 48-51.
- [15] 朱宏莉, 郭爱莲, 宋纪蓉, 等. 氦-氖激光诱变细菌细胞及原生质体选育果胶酶高产菌株. 光子学报, 2005, 34(11): 1693-1696.
- [16] 常新全, 丁丽霞. 中药活性成分手册(上). 北京: 学苑出版社, 2002, p.430.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2005, p.39.
- [18] 孙剑秋, 周东坡. 微生物原生质体技术. 生物学通报, 2002, 37(7): 9-11.
- [19] 王卫卫, 任鹏康, 闫明, 等. He-Ne 激光对 -亚麻酸产生菌少根根霉的诱变作用. 光子学报, 2002, 31(2): 157-161.
- [20] 向洋. 激光生物学. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1995, pp.114-121.

栏目介绍

生物实验室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度, 深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果, 交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室, 以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>