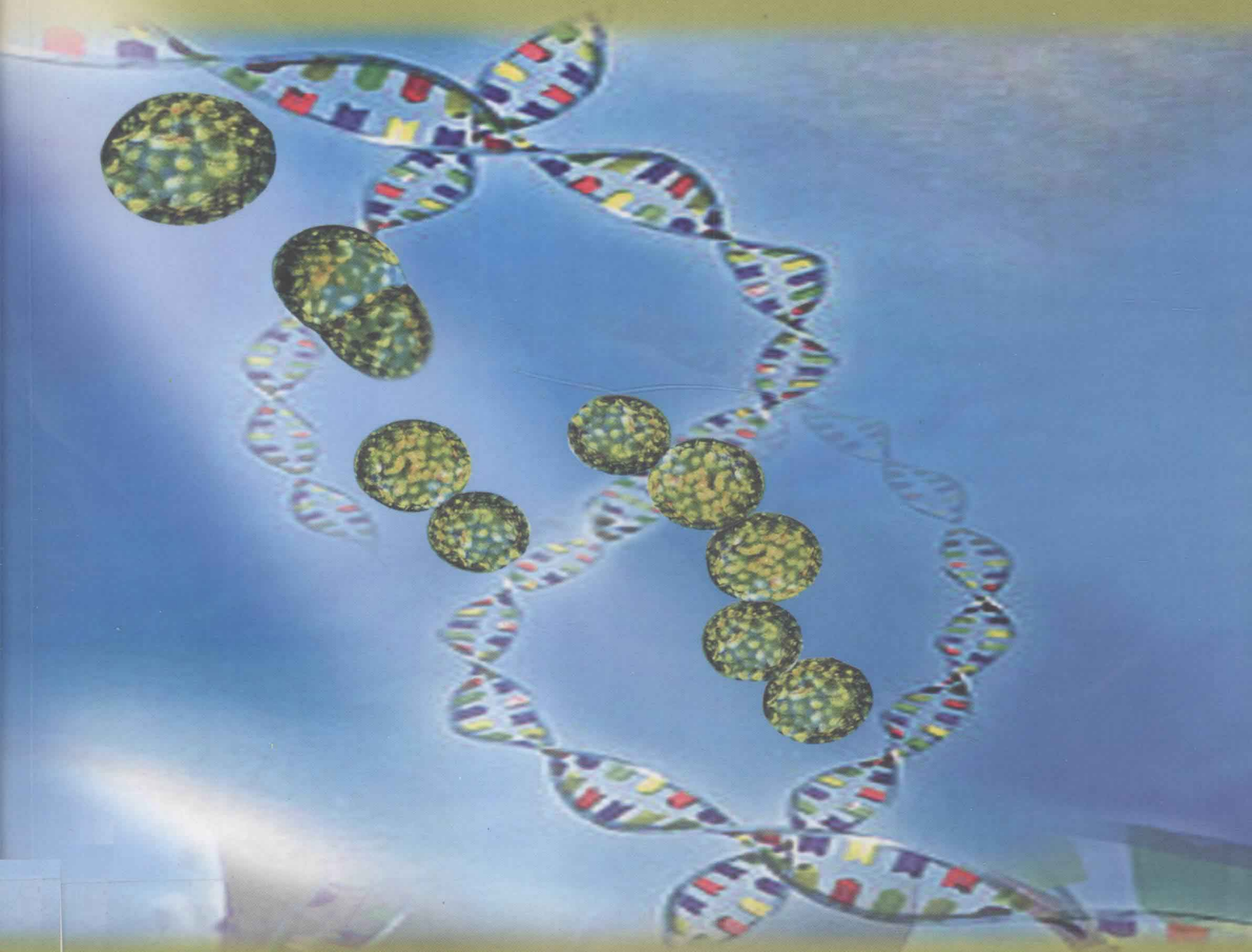


微生物原生质体融合 与基因组重排

周东坡 平文祥 著



 中国科学技术出版社

暨生物圈地層學協會

第 25 屆年會

2004 年 11 月 12-14 日



微生物原生质体融合 与基因组重排

周东坡 平文祥 著

中国科学技术出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物原生质体融合与基因组重排/周东坡, 平文祥著.
—北京: 中国科学技术出版社, 2010. 7

ISBN 978-7-5046-5660-5

I. ①微… II. ①周… ②平… III. ①微生物-原生质体
融合②微生物-基因组 IV. ①Q933

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 128865 号

本社图书贴有防伪标志, 未贴为盗版。

责任编辑 杨 艳
责任校对 林 华
责任印制 张建农

中国科学技术出版社出版
北京市海淀区中关村南大街 16 号 邮政编码: 100081
电话: 010-62173865 传真: 010-62179148
<http://www.kjpbooks.com.cn>
中国科学技术出版社发行部发行
北京长宁印刷有限公司印刷

*

开本: 889 毫米×1194 毫米 1/16 印张: 27 字数: 780 千字
2010 年 7 月第 1 版 2010 年 7 月第 1 次印刷
定价: 80.00 元
ISBN 978-7-5046-5660-5/Q·152

(凡购买本社的图书, 如有缺页、倒页、
脱页者, 本社发行部负责调换)

序

正如前美国科学院院长 Handley 于 20 世纪 70 年代末在其所著的《生命科学与人类的未来》一书中论述的那样：“大约 25 年前，由于生物化学、微生物学和遗传学的融合，使得生命科学进入了分子生物学时代。”而 21 世纪则是生命科学时代。

在现代生物技术、现代信息技术、新能源技术、新材料技术等发展腾飞的 21 世纪，人类社会预期在生命科学领域的发展上将会有许多崭新的突破。尤其是现代生物技术本身在此短短的几十年中已经历了三代生物技术发展阶段。如从第一代的细胞工程、基因工程发展到第二代的蛋白质工程，乃至第三代的代谢途径工程；从细胞水平深入至分子水平直至亚分子水平；从以基因芯片、基因组学等为代表的核酸研究发展至以三代抗体工程、蛋白质组学为代表的蛋白质工程研究，直至发展到糖链科学；从一般生物技术发展至海洋生物技术和宇航生物技术等。

微生物原生质体融合始于 20 世纪的 70 年代后期，30 多年来它经历了初创期、发展期、应用完善期三个阶段，其研究水平从纯细胞水平深化至分子水平、亚分子水平直至基因定位与序列分析，其应用范围已涉及各类微生物，其应用领域已步入到了医药、食品、轻工、农牧、环保等诸多行业，并已为社会创造出了重大的经济效益和社会效益，引起了人们的广泛关注。

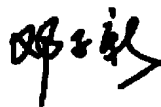
大约 7~8 年前，由于微生物原生质体融合の日臻完善和飞跃发展，一项更新的技术——基因组重排应运而生。该技术是以递推式原生质体融合为依托，与 PCR、蛋白质工程、途径工程相结合，实现生物的超速 DNA 改组或分子育种，其育种的工作量上仅为传统育种的数十分之一甚至数百分之一，其育种速度在几个月内即可完成传统育种 20 年的生物进化过程。所以，基因组重排（或改组）也是一项很有发展潜力和发展前景的新技术，必将在各类微生物的育种实践中发挥重要作用。

本专著的作者博士生导师周东坡、平文祥教授从事微生物原生质体融合的研究工作多年，并已取得了丰富经验，近年来在基因组重排工作中也取得了可喜的研究成果。两位作者总结了多年的研究成果并参阅了大量的国内外文献，精心雕琢，撰写成了本部专著。

本专著体例新颖，特点是系统、完整，具有知识的先进性、科学性和前瞻性，技术层面的描述具体、明了，理论论述深入浅出，重点突出，图文并茂，并特别突出了本学科国内外的发展动态和本行业国内外的发展趋势与成果，是一部优秀的专著，很有参考价值。

我愿意向各位同行和生命科学相关学科的师生、研究生们推荐这部著作。

中国科学院院士



2009 年 11 月

序 二

21 世纪是生命科学时代，人类社会已经悄然地步入了生物技术飞速发展的时代。其主要标志是克隆动物的出现、多种基因工程疫苗的问世、大量单克隆抗体试剂盒、单抗治疗药物的涌现、基因治疗与导向治疗（生物导弹）的风靡、人类基因组计划的完成、蛋白组计划的启动和糖组学的兴起。到目前，不但抗体技术已发展到了第二代和第三代技术，基因工程也发展到了第二代（蛋白质工程）和第三代（途径工程），而且生物技术也正向太空中硕大无比的天体行星和浩瀚无际的海洋发展。

微生物原生质体融合技术的发展即是现代生物技术发展的一个缩影。它始于 20 世纪 70 年代中、后期，原属于细胞工程的研究范畴，但经历 30 年来的发展已逐渐完善和成熟，又创新出递推式的原生质体融合技术——即基因组重排或改组技术。故此，其研究水平已从原来的细胞水平深化至分子水平、亚分子水平甚至核苷酸水平，其育种效率和育种速度可比传统育种提高数十倍甚至数百倍。因此，基因组重排是一项很有发展前途的新技术，今后将在微生物进化与微生物育种中发挥巨大作用。

本专著的作者博士生导师周东坡、平文祥教授在我国属于第一代从事微生物原生质体融合研究工作的学者，近几年又涉足了基因组重排的研究工作，并均已取得了较为卓著的成果。两位著者在总结多年研究经验与成果的基础上，又参阅了大量的国内外文献，精心雕琢，撰写成本部专著。

本专著是特色鲜明、体例新颖、学术性强、理论与实践并重的学术专著，既注重了科学性、前瞻性，又注重了系统性和调理性，重点突出、图文并茂。本书是一部不可多得的高水平学术专著，对微生物学和微生物遗传育种的发展将会起到重要作用。

该专著对从事微生物学和微生物遗传育种学研究的同行及相关专业教师、研究生有很好的参考价值，我愿意将此专著推荐给广大读者。

中国工程院院士

2009 年 11 月

前 言

在现代生物技术、现代信息技术、新能源技术、新材料技术等发展腾飞的 21 世纪，生命科学的发展更为神速，已发展成为了自然科学中的带头学科。在短短几十年中，现代生物技术的发展就经历了三代发展过程。如第一代的细胞工程、基因工程、酶工程、发酵工程、生化工程；第二代的蛋白质工程、抗体工程、糖链工程、生物芯片技术、人类基因组计划；第三代的代谢途径工程、人类后基因组计划与人类的蛋白质组计划、自动生化药物筛选技术、海洋生物技术、宇航生物技术、下游工程技术、基因治疗技术、生物导弹药物技术等。如此种种，使得现代生物技术在各国国民经济的发展中和各国 GTP 总值的贡献率上均发挥着极为重要的作用。因此，经济学家称：“生物经济时代即将到来！”

微生物原生质体融合原属于上述细胞工程的研究内容，始于 20 世纪 70 年代中后期，经 30 多年的发展和完善，已从纯细胞水平深化至分子水平、亚分子水平甚至核苷酸水平；近 7~8 年来，该技术又进一步发展成为基因组重排或称分子育种的新技术，其研究成果已经为各国国民经济的发展起到了巨大作用。

1990 年我们曾出版了第一部《微生物原生质体融合》的专著，至今已过 20 年，本研究领域又有了许多新成果和新进展，尤其基因组改组的新技术已日趋完善。值此，许多好心的同行、学者邀请我们再版此书。故在总结多年科研工作经验的基础上，整理了作者多项国家自然科学基金、科技部攻关项目、教育部攻关项目、省重大攻关项目、重点项目、省自然科学基金与厅局级重点攻关项目的资助项目成果与获奖项目成果，结合大量的国内、外文献，尤其突出了此领域中的新理论、新技术及其最新进展撰写而成本专著。在撰写过程中力求体例新颖、内容丰富，系统完整，结构严谨。既注重了知识的前瞻性、科学性和先进性，又注重了语言的通顺流畅，图文并茂。

本书的撰写问世，应感谢国家基金委、教育部、科技部、黑龙江省科技厅、黑龙江省教育厅、哈尔滨科技局对作者科研项目的资助，感谢黑龙江大学学校领导、研究生处、科技处、人事处、研究生学院领导对本书的亲切关注，感谢中国科学技术

出版社的热情支持、大力合作。对赵凯博士，研究生顿森林、贺伟在、刘金秀、杜巍、皮玉姣、刘辉、李洪波、张新建、刘龙海、王轶男、苑婷婷、张梦云、陈方博、董海莉、于艳颖、肖珊等同学在本书编著过程中进行的资料搜索、整理等基础工作以及最后的排版工作等所付出的辛劳，也在此一并表示真诚的感谢！

本专著共分三篇十三章，其中第一篇微生物原生质体融合，分八章，主要讲了原生质体融合的发展简史、原生质体融合的意义、原生质体融合的程序和方法、细菌的原生质体融合、放线菌的原生质体融合、丝状真菌的原生质体融合、酵母菌的原生质体融合、蕈菌的原生质体融合；第二篇原生质体融合的诸因子分析，分为三章，主要讲了影响原生质体制备的因素、影响原生质体再生的因素、影响原生质体融合的因素；第三篇原生质体技术与基因组重排，分为两章，主要讲了原生质体技术的发展与应用、基因组重排。全书最后列出了主要参考文献，以供读者进一步查阅。

本专著可供从事生命科学相关专业的科研及生产单位的技术人员参考，也可供综合大学、师范院校、理工科大学的生物技术、生物工程、生物制药、生物科学、食品工程、环境工程及农、林、医科大学的相关专业的师生、研究生使用。

由于时间仓促和水平所限，纰漏之处在所难免，恳请各位读者批评指正。

周东坡

2009年12月 于哈尔滨

目 录

第一篇 微生物原生质体融合

第一章 原生质体融合的发展简史	3
第一节 基本概念	3
第二节 细胞自发融合现象的发现	4
第三节 原生质体制备阶段	5
第四节 人工诱导原生质体（细胞）融合阶段	6
第五节 原生质体融合技术的发展和应⤵应用阶段	8
第六节 基因组重排技术阶段	14
第二章 原生质体融合的意义	17
第一节 原生质体融合在生物工程和现代微生物技术中的地位	17
第二节 原生质体融合、原生质体技术、基因组重排的理论意义	19
第三节 原生质体融合技术、基因组重排的实践意义	26
第三章 原生质体融合的程序和方法	30
第一节 微生物原生质体融合的程序	30
第二节 原生质体融合的关键步骤	40
第四章 细菌的原生质体融合	42
第一节 枯草芽孢杆菌的种内株间融合	43
第二节 巨大芽孢杆菌的种内株间融合	46
第三节 枯草芽孢杆菌与棒杆菌的科间原生质体融合	49
第四节 枯草芽孢杆菌与黑曲霉的原生质体激光融合	52
第五节 大肠杆菌（E. coli）的原生质体融合	55
第六节 光合细菌的种间原生质体融合	59

第七节	双歧杆菌与乳杆菌的原生质体融合	59
第八节	根瘤菌属间的原生质体融合	60
附 录		61
第五章	放线菌的原生质体融合	64
第一节	天蓝链霉菌种内株间的融合	64
第二节	小单胞菌种内株间的融合	66
第三节	庆丰链霉菌的原生质体融合	67
第四节	链霉菌的原生质体电融合	68
第五节	链霉菌的原生质体激光融合	69
第六节	弗氏链霉菌的原生质体融合	70
第七节	阿维链霉菌的原生质体融合	71
第八节	诺卡氏菌的原生质体融合	72
附 录		74
第六章	丝状真菌的原生质体融合	76
第一节	产紫杉醇的树状多节孢的原生质体融合	76
第二节	几种霉菌的种内株间融合	84
第三节	木霉 (<i>Trichoderma</i>) 的原生质体融合	94
第四节	红曲霉 (<i>Monascus</i>) 原生质体制备和再生	95
第五节	被孢霉菌 (<i>Mortierella isabellina</i>) 的原生质体制备和再生	96
第六节	白僵霉菌 (<i>Beauveria</i>) 的原生质体制备和再生	97
附 录		98
第七章	酵母菌的原生质体融合	100
第一节	酿酒酵母的原生质体融合	100
第二节	酿酒酵母与假丝酵母的原生质体融合	112
第三节	假丝酵母的种内株间原生质体融合	112
第四节	酿酒酵母与克鲁维酵母的属间融合	112
第五节	红发夫酵母的原生质体融合	113
第六节	酿酒酵母与木霉 (<i>Trichoderma</i>) 属间原生质体融合	114
第七节	酵母菌与光合细菌的界间融合	114
第八章	蕈菌原生质体融合	115
第一节	平菇和双孢菇的原生质体融合	117
第二节	金针菇的原生质体融合	120

第三节	香菇的原生质体融合	123
第四节	灵芝的原生质体融合	126
第五节	侧耳属种间原生质体融合	130
附 录		134

第二篇 原生质体融合的诸因子分析

第九章	影响原生质体制备的因子	139
第一节	酶的种类与浓度	139
第二节	酶解温度和 pH 值	144
第三节	酶解时间	149
第四节	菌体的生理状态	153
第五节	菌体的预处理	158
第六节	洗液与原生质体制备液	165
第七节	菌体的浓度与分散程度	177
第八节	菌体的生长形态	179
第九节	其他因素	183
第十节	原生质体制备效果的检验	183
第十一节	原生质体形成规律	185
第十章	影响原生质体再生的因子	201
第一节	影响原生质体自身活性的因素	201
第二节	再生培养基的选择	246
第三节	再生时的培养温度	275
第四节	操作方法与双层培养法	276
第五节	再生效果的检测	282
第六节	原生质体的再生机制	283
第十一章	影响原生质体融合的因素	292
第一节	聚合剂的种类与促进融合的方式	292
第二节	PEG 的作用机理及优缺点	296
第三节	PEG 诱导融合的过程	297
第四节	影响融合因素	298
第五节	融合子的检出与鉴定	307

第三篇 原生质体技术与基因组重排

第十二章 原生质体技术的发展与应用	319
第一节 原生质体融合技术的发展与应用	319
第二节 其他原生质体技术的应用	337
第十三章 基因组重排 (DNA shuffling)	350
第一节 基因组重排的概述	350
第二节 细菌的基因组重排	355
第三节 用 Genome shuffling 技术选育紫杉醇高产菌株	358
第四节 基因组改组的应用实例	367
参考文献	385

第一篇

微生物原生质体融合

第一章 原生质体融合的发展简史

第一节 基本概念

一、微生物原生质体

自从1919年 Gajda 用蜗牛胃液从酵母细胞分离得到原生质体以来，特别是1953年 Weibull 首次用溶菌酶酶解分离 *Bacillus megaterium* 的原生质体以后，对于微生物原生质体的研究发展迅速。

关于原生质体 (protoplast) 一词，最初是由 Hanstein 用来表示植物细胞壁内的原生质，即指植物细胞通过质壁分离，能够和细胞壁分开的那部分细胞物质，包括细胞膜、细胞质和细胞核，换言之，原生质体对于有壁的细胞来说，就是除去细胞壁的被细胞膜包围的“裸露细胞”。

原生质是有组织的生活物质，是细胞生命活动的物质基础，具有极其复杂而不断更新的化学组成，在不同种类以及不同发育时期的细胞中其化学组成也不相同，但所有的原生质有相似的基本组成成分和特性。

真核细胞原生质体包括细胞膜、细胞质、各种细胞器、细胞骨架系统及胞基质和细胞核等部分，它们彼此密切联系、相互影响而构成一个有机整体，担负着细胞的所有生命活动的原生质体是由原生质特化而来。

就植物和真核微生物细胞而言，即细胞膜内的原生质部分；就动物细胞而言，一个动物细胞就是一小团原生质体。

就细菌而言，原生质体包括狭义原生质体和广义原生质体两种概念。狭义的原生质体 (Special-protoplast) 应定义为 G^+ 细菌经酶解处理，彻底脱掉细胞壁后，剩下细胞膜以内的所有细胞成分，形状为圆球状，此为狭义的原生质体。而 G^- 菌经不完全酶解后，未被彻底脱壁而形成的圆球状体，称为圆球体或球状体 (spheroplast)。

本书所讲的微生物原生质体即广义的原生质体，既包括狭义的原生质体，也包括圆球体或球状体。还包括下面所讲的亚原生质体以及关于酵母菌的巨大原生质体和微小原生质体，以及放线菌或酵母菌或丝状真菌或蕈菌的细胞或菌丝经酶解处理而形成的圆球状体的统称。

所谓亚原生质体 (subprotoplast)，是指在制备丝状真菌原生质体时偶尔可形成无核的小型原生质体，称为亚原生质体。

此外，还有巨大原生质体 (giantprotoplast) 和微小原生质体 (miniprotoplast)。

巨大原生质体：是几个酵母菌的原生质体融合在一起形成的一个大的原生质体，其直径可达 $35\ \mu\text{m}$ ，可能含有1至几个核，称为巨大原生质体。在十几年前 (1992~1996年以来)，科学家们陆续发现，蕈菌在制备其原生质体时，后期偶尔也会出现巨大化的原生质体。有人将此过程称为原生质体的巨大化。

微小原生质体：是酵母菌细胞在形成原生质体时，偶尔有无核的小原生质体，其中只含线粒体等细胞器，其直径很小，称为微小原生质体。

原生质体对渗透压极其敏感，低渗将引起原生质体破裂，一般是将原生质体置于高渗的环境中以维持它的稳定性。另外，原生质体对震荡也很敏感，激烈震荡会使其破裂。故原生质体保藏时，务必防止震荡。

二、微生物原生质体融合

原生质体融合 (protoplast fusion) 是起源于 20 世纪 60 年代的基因重组技术，成为了微生物遗传研究和育种的一种新手段。

所谓原生质体融合，就是将双亲株的微生物细胞分别通过酶解除去遗传物质转移的最大障碍——细胞壁，使之形成原生质体，然后在高渗的条件下混合，并加入物理的或者化学的或者生物的助融条件，使双亲株的原生质体间发生相互凝集，通过细胞质融合，核融合，而后发生基因组间的交换重组，进而可以在适宜的条件下再生出微生物的细胞壁来，从而获得重组子的过程。

三、微生物基因组重排

Genome shuffling 是一项对整个微生物全基因组进行重排的定向育种技术，它把传统微生物诱变育种技术与细胞融合技术结合，通过诱变手段获得若干正向突变株，并采用细胞融合方式使之全基因组发生重组，经过递推式多次融合，使基因组在较大范围内发生交换和重排，将引起正向突变的不同基因重组到同一个细胞株中，最终获得具有多重正向进化标记的目标菌株。

第二节 细胞自发融合现象的发现

一、动物细胞中多核细胞及自发融合现象的发现

早在 19 世纪的病理学研究中，德国生物学家 Johannes Muller 是第一个在脊椎动物中发现多核细胞的人，他在肿瘤中观察到了多核细胞。1849 年 Robin 在骨髓中、1855 年 Rokitansky 在肺结核组织中也相继发现了多核细胞。

在正常组织的研究中，1858 年 Virchow 曾广泛地叙述在各种正常组织中的发炎组织与坏死组织中见到多核细胞。1859 年 De Bary 判断某些这样的多核细胞就是由单核细胞融合而成的。此后，Mitschnikoff 对自然现象中的多核细胞做了很全面的观察，他认为吞噬细胞融合形成多核体是脊椎动物与无脊椎动物所特有的一种细胞防御机制。

1875 年 Lange 观察到脊椎动物（蛙类）血液细胞融合产生变形的细胞。1876 年 Cienkowski、1877 年 Bucke 和 1880 年 Geddes 在无脊椎动物中也发现了细胞融合现象。1960 年法国的 Barski (Karski) 研究小组在两种不同类型的动物细胞混合培养中发现了自发融合现象，从而开始了细胞融合的探讨。到了 20 世纪 60 年代，人们已经清楚培养的细胞既能彼此自然融合，也能通过一些病毒等随意诱导他们融合，融合细胞能进行正常的细胞分裂或不规则的有丝分裂。

二、植物细胞中多核细胞及自发融合现象的发现

用机械方法分离得到植物的原生质体，经人工培养后自发融合现象，最早在 1909 年由 Kuster 观察发现的。

此后，Miller 等观察到：由大豆的培养细胞分离的原生质体有 20% 在分离的过程中产生自然融合。Motoyoshi 在分离玉米培养细胞原生质体时也见到同样现象。Eto 与 Macda 报道，由小孢子母细胞减数分裂的偶线期和粗线期而得到的原生质体中，产生自然融合。

Withers 与 Cocking 等根据电镜观察指出, 在去除植物细胞壁之前存在的胞间连丝的连接, 这可能是产生原生质体自发融合的原因。

三、微生物中多核合胞体及自发融合现象的发现

1859 年 Bary 第一个发现微生物多核细胞现象, 他在研究粘菌 (*Myxomycetes*) (粘菌的营养阶段为无细胞壁、多核的变形虫状原生质团) 生活史时发现单个的细胞融合后可以产生多核质体 (Multinucleated plasmodia), 并提出多核质体是单核细胞融合形成的。1925 年 Mellon 最早观察到了细菌原生质体自发融合现象, 开始人们还猜测可能是染色标片上的臆象。然而, 随后在 1944 年 Smith 用相差摄影的活体观察证实了融合事件, 1951 年 Stempen & Hutchinson 陆续在拟杆菌属 (*Bacteroides*)、普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 中, 1954 年 Stahelin 炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 中, 也分别用相差显微镜摄影证实了原生质体的形成及其自发融合事件。之后若干年中原生质体自发融合现象在酵母 (*Saccharomyces* sp.)、假丝酵母 (*Candida* sp.)、杂色云芝 (*Polystictus versicolor*)、黄色镰刀菌 (*Fusarium culmorum*) 都有发现。

第三节 原生质体制备阶段

一、植物原生质体的制备

就原生质体技术的发展来看, 植物原生质体技术的研究, 要早于微生物原生质体技术的研究。1892 年, Klereker 首次使用研磨等机械方法去除植物 *Stratiotes aloides* 的细胞壁。但是这种方法容易使原生质体受到损伤, 对后期原生质体再生不利, 而且原生质体的制备量也非常有限。

二、微生物原生质体的制备

不管是进行微生物原生质体融合还是进行原生质体诱变、原生质体转化、原生质体转染、原生质体固定化、原生质体再生育种, 首先都要实现出发菌株的原生质体化。高效的制备原生质体, 是运用微生物原生质体技术的前提和基础。

1914 年, Giaja 报道了大蜗牛胃液对几丁质、酵母菌葡聚糖、纤维素的分解作用, 1919 年, 他首次用蜗牛酶获得了酵母菌的原生质体。酶法制备微生物原生质体, 是微生物原生质体技术的开端。

对溶菌酶的研究是从 Nicolle 在 1907 年发表枯草芽孢杆菌溶解因子的报告开始的。两年后, 1909 年 Laschtschenko 发现鸡蛋清中的酶具有较强的抑菌作用。1922 年, Fleming 发现人的唾液、眼泪、鼻涕有较强的溶菌活性, 并且把其中具有溶菌作用的因子, 称为溶菌酶。1936 年, Meyer 等人用精制的溶菌酶分解溶壁微球菌细胞壁的多糖类成分, 验证了溶菌酶的溶菌现象。到了 20 世纪 50 年代, 有关酶法制备微生物原生质体的研究有了较大的发展。1953 年, Weibull 首次用溶菌酶制备到巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的原生质体。1958 年, Brenner 提出了细菌原生质体的三条标准: ①没有细胞壁; ②失去细胞刚性, 呈球形; ③对于渗透压敏感脆弱。受细菌原生质体研究工作的启发, 1957 年, Eddy 和 Williamson 首次使用大蜗牛酶大量制备到酵母菌的原生质体。1958 年, Emerson 等使用蜗牛酶和半纤维素酶复合酶液酶解粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 菌丝, 获得了大量的原生质体。1956 年 Romano 等报道链霉菌属 (*Streptomyces* sp.) 中一些种的细胞壁可以被溶菌酶溶解, 1958 年 Douglas 首先用溶菌酶从链霉菌菌丝制备出原生质体, 并用对噬菌体吸附及血清学试验证明细胞壁确实溶解, 但是直到 1971 年, Sagara 与 Fukui 等人才获得了较高的链霉菌原生质体制备率。

各种微生物的原生质体具有共同特点: 无完整细胞壁, 细胞呈球状; 对渗透压极其敏感; 革兰氏