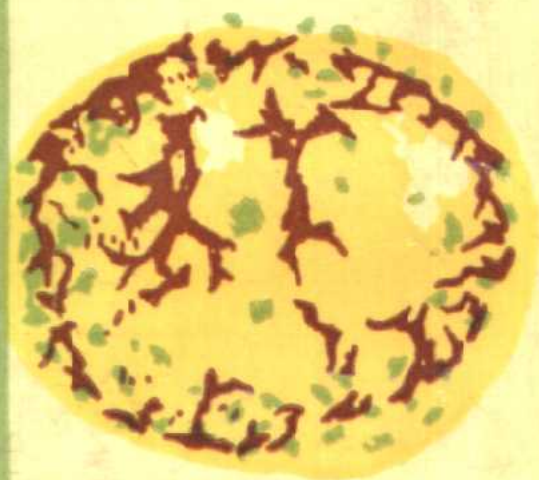
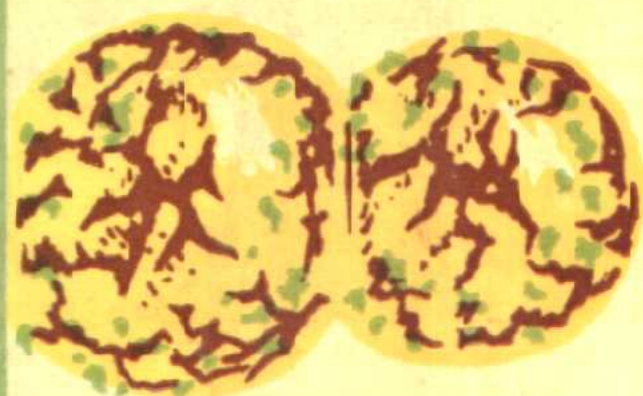


微生物

原生质体融合

周东坡
平文祥 著



黑龙江科学技术出版社

微生物原生质体融合

周东坡
平文祥 著

黑龙江科学技术出版社

责任编辑：迟宪章

封面设计：翟威
周晓明

微生物原生质体融合

周东坡 平文祥 著

黑龙江科学技术出版社出版

(哈尔滨市南岗区建设街35号)

齐齐哈尔轻工学院印刷厂印刷

787×1092毫米 32开本 13.25印张 280千字

1990年12月第1版·1990年12月第1次印刷

印数：1~1000册

定价：6.90元

ISBN 7-5388-1469-8/N·63

**One of the most refreshing aspects of
protoplast research is that there always
seems more to do.**

Cocking, E.C.

序

微生物遗传物质的交换可通过转化、接合与转导，这些过程不同程度地受到细胞壁屏障的影响。应用消除了这个屏障的原生质体，可明显地促进遗传物质的交换，这是众所周知的。所以，近年来原生质体融合应用于遗传育种和重组研究上受到重视。

周东坡、平文祥同志从事原生质体研究较早，并已获得较好科研成果。根据他们的经验和国内外文献报道，对原生质体技术与融合，进行全面的论述写成本专著。相信《微生物原生质体融合》的出版，对生物技术的教学和从事于原生质体研究与融合技术工作的同志都是有益的。

付瑞身
1990.12.31

注：焦瑞身先生系中国微生物学会理事长、《生物工程学报》主编、中国科学院研究员、教授。1989年国际生物工程会议主席。

前 言

微生物原生质体融合的研究，在国内外均是一个崭新的领域。在国际上，1976年对细菌、酵母菌的种内株间原生质体的融合与霉菌种间的原生质体融合首次成功，放线菌的原生质体融合1977年刚刚成功，迄今仅有十几年历史；在国内，1981年这方面的研究初次见报。而目前这方面的研究，无论是国际还是国内，无论在遗传学界还是在微生物学界，均已成为引人入胜的研究课题了。

微生物原生质体融合是生物工程中的一项重要内容，也是现阶段或科学发展的一段历史时期内，最为现实可行、最容易广泛展开、最容易收到实效的生物工程手段。因此，它引起了微生物遗传学家和微生物育种学家们极大的兴趣，也博得了广大微生物学工作者的极大关注。

有人说，微生物原生质体融合只是一种技术，不存在什么理论问题。的确、在某些文学家的眼里，从事微生物原生质体融合育种的学者简直是个创造物种的魔术大师。他们可能随心所欲的创造出大幅度高产的，或者生产周期极短的或者能利用不同的原料的，或者合成新产品的，或者对人类有益的，具有这样或那样新性状的新菌种、新菌株来，以便创造出更大的经济效益，或开发出更多的新产品，为人类造福。在某些微生物学者看来，原生质体融合本身确实存在着许多奥妙无穷的技术环节，令人猜度，望而生畏。而原生质体融合过程又存在许多深奥的理论问题。如生物物理学家会想：原生质体间融合的贯穿力是从何而来？两个原生质体融合后，融合子的子代细胞质量为什么不等于双亲细胞之和？

这是否违背了物质不灭定律？生物化学家又在推测：各类微生物制备原生质体分别要靠哪几种酶？其酶解条件如何？原生质体融合时要靠什么酶起作用？在电融合器与激光融合器下原生质体融合时，是否还需要生物酶参与融合过程？此时酶解条件和速率将发生如何变化？而遗传学家则自然会关注，融合后基因重组的机制如何？融合子的稳定率如何？怎样分离？对融合子的遗传分析有何特点？通过原生质体融合可否对微生物进行基因定位？如何定位？……如此等等、等等。因此微生物原生质体融合既是生物工程中的一种重要技术手段，又包含许多重大的理论问题，有待深入研究。

作者依据近年来国内、外微生物原生质体融合与原生质体技术研究的发展动态，结合本人多年来从事这方面研究的点滴成果和粗浅体会，特撰写本专著，以飨读者。

从微生物原生质体融合意义和发展简史入手，着重介绍各类微生物原生质体融合的基本程序和关键环节。特别是各类不同种微生物原生质体化、再生与融合的技术关键和人们曾选用的最佳条件，融合子检出筛选、育种的方法。尤其对原生质体融合过程中的某些理论问题也做了相应的论述，尤其对融合的基因定位和遗传分析等重大理论问题也做为重点加以探讨。同时也对微生物原生质体融合的前景做了展望。对近几年发展起来的一系列原生质体技术，也做了较为全面的论述。笔者竭诚期望本书可做为从事理论研究和育种工作的同行们以及从事生物技术和微生物学教学的师生们有益的参考。但由于我们的能力和水平有限，加之，做为新兴的这一学术领域发展神速，谬误和弊漏之处在所难免，敬请各位读者批评指正。

作者

1990. 6. 20

目 录

第一章 原生质体融合的发展简史	(1)
第一节 细胞自发融合现象的发现(1839—1892年)	(1)
一 在动物体中多核细胞的发现.....	(1)
二 在微生物中多核合胞体的发现.....	(2)
三 人工组织培养动物细胞自发融合现象的发现	(3)
四 人工组织培养植物细胞自发融合现象的发现	(3)
第二节 原生质体制备阶段(1892—1960年).....	(4)
一 植物原生质体的制备.....	(4)
二 微生物原生质体的制备.....	(4)
第三节 人工诱导原生质体(细胞)融合阶段 (1960—1976年).....	(5)
一 诱导动物细胞融合的由来与发展.....	(5)
二 诱导植物原生质体融合.....	(6)
三 诱导微生物原生质体融合.....	(7)
第四节 原生质体融合技术的发展和应⽤阶段 (1976年).....	(8)
第二章 原生质体融合的意义	(10)
第一节 原生质体融合在生物工程中的地位.....	(10)
第二节 原生质体融合及原生质体技术的理论与实践意 义.....	(13)

第三章 原生质体融合的程序和方法	(31)
第一节 原生质体融合的基本程序和关键步骤 ...	(31)
一 基本程序.....	(31)
(一) 原生质体制备与形成阶段	
(二) 原生质体融合与融合子形成阶段	
(三) 原生质体或融合子再生细胞壁, 形成普通 营养体细胞阶段	
(四) 正变融合子的筛选与保藏阶段	
二 原生质体融合的关键步骤.....	(35)
第二节 原生质体融合的方法	(35)
一 细菌的原生质体融合的方法.....	(36)
(一) 枯草芽孢杆菌的种内株间融合.....	(36)
1 融合出发菌株	
2 培养基和有关溶液	
3 原生质体的制备	
4 原生质体的再生	
5 原生质体的融合	
6 融合子的检出、筛选、传代与鉴定	
(二) 巨大芽孢杆菌的种内株间融合.....	(41)
1 融合出发菌株	
2 培养基和有关溶液	
3 原生质体的制备	
4 原生质体的再生	
5 原生质体的融合	
6 原生质体的裂解	

7	DNase处理	
8	结果	
二	放线菌原生质体融合的方法.....	(47)
	(一) 天蓝链霉菌种内株间融合.....	(47)
1	出发菌株	
2	培养基和有关溶液	
3	原生质体制备	
4	原生质体融合	
	(二) 小单孢菌种内株间的融合.....	(52)
1	出发菌株	
2	原生质体的制备	
3	原生质体的再生	
4	原生质体的融合	
二	霉菌原生质体融合的方法.....	(54)
	(一) 曲霉、白地霉、青霉等属原生质体融合的方法.....	(54)
1	出发菌株	
2	培养基	
3	原生质体的制备	
4	原生质体的融合	
	(二) 高产柠檬酸的黑曲霉原生质体融合的方法.....	(56)
1	出发菌株	
2	培养基与有关溶液	
3	菌体培养与原生质体制备	
4	原生质体的纯化	

5	原生质体的再生	
6	原生质体的融合	
7	由融合子形成异核二倍体	
四	酵母菌原生质体融合的方法	(59)
(一)	酿酒酵母与解脂复膜孢酵母属间原生质体融合	(60)
1	出发菌株	
2	培养基与有关溶液	
3	菌体培养和原生质体制备	
4	原生质体融合	
5	融合子的选择	
6	融合子的鉴定	
(二)	酿酒酵母与脆壁克鲁维酵母属间原生质体融合	(62)
1	出发菌株	
2	培养基与有关溶液	
3	孢子的分离	
4	孢子的诱变	
5	富集培养法	
6	原生质体的制备	
7	原生质体融合	
第三节	原生质体融合过程中的诸因子分析	(65)
一	影响原生质体制备的因子	(65)
(一)	酶的种类与酶浓度	(65)
1	酶的种类	(65)
2	酶的浓度	(78)

(二)	酶解的温度和pH值·····	(82)
1	酶解温度·····	(82)
2	制备液的pH值·····	(84)
(三)	酶解的时间·····	(86)
(四)	菌体的生理状况(生长时期)·····	(90)
1	细菌的生长时期	
2	放线菌的生长时期	
3	霉菌的生长时期	
4	酵母菌的生长时期	
(五)	菌体的予处理·····	(96)
1	菌体培养阶段的予处理·····	(96)
2	酶解前菌体的予处理·····	(103)
(六)	洗液与原生质体制备液·····	(107)
1	细菌的洗液与原生原生质体的制备液···	(108)
2	放线菌的洗液与原生质体制备液·····	(116)
3	真菌的洗液与原生质体制备液·····	(118)
(七)	菌体的浓度与分散程度·····	(129)
(八)	菌体的生长形态·····	(133)
(九)	其它因素·····	(133)
1	遗传性	
2	生长速率	
(十)	原生质体制备效果的检验·····	(135)
1	细菌与酵母	
2	放线菌与霉菌	
(十一)	原生质体形成规律·····	(137)
1	细菌原生质体的形成·····	(137)

2	放线菌原生质体的形成与释放·····	(140)
3	霉菌原生质体的形成与释放·····	(146)
二	原生质体再生的因子·····	(147)
	(一) 影响原生质体自身活性的因素·····	(148)
1	菌体的生长时期·····	(148)
2	菌体的予处理·····	(152)
3	酶解条件·····	(162)
	(1) 洗液与原生质体制备液对再生的影响 ·····	(162)
	(2) 酶浓度与酶解时间对再生的影响	(168)
	(3) 酶解温度对再生的影响·····	(175)
4	原生质体的制备状态对再生的影响·····	(178)
5	原生质体的贮存对再生的影响·····	(183)
6	遗传因素·····	(188)
	(二) 再生培养基的选择·····	(198)
1	再生培养基的种类·····	(198)
2	再生培养基中的营养因子分析·····	(217)
3	原生质体保护剂与原生质体的扩张剂··	(219)
4	渗透压稳定剂·····	(229)
5	再生细胞壁的引物与前体物质·····	(237)
	(三) 再生时的培养温度·····	(241)
	(四) 操作方法与再生方式·····	(244)
1	涂布法与双层培养法·····	(244)
2	固体培养法与液体培养法·····	(247)
3	琼脂硬度和再生培养基的脱水·····	(248)
4	原生质体的予培养和原生质体包埋法··	(251)
5	菌落密度·····	(255)

(五)	再生效果的检测·····	(259)
1	细菌与酵母菌的再生率公式	
2	放线菌的再生率公式	
3	霉菌的再生率公式	
(六)	原生质体的再生机制·····	(262)
三	原生质体融合·····	(268)
(一)	聚合剂的种类及促进融合的方式···	(268)
1	生物聚合剂	
2	物理聚合方式	
3	化学聚合剂	
(二)	PEG的作用机理及优缺点·····	(271)
1	PEG的优点	
2	PEG的缺点	
3	PEG的作用机理	
(三)	PEG诱导融合的过程·····	(272)
1	脱水凝聚	
2	收缩变形	
3	蛋白移位	
4	脂类分子互相作用	
5	脂类分子重排,形成细胞质桥	
(四)	影响融合的因素·····	(273)
1	PEG的分子量和浓度·····	(273)
2	PEG的作用时间·····	(283)
3	融合时的温度·····	(285)
4	原生质体融合液与再生培养基融的离子种类、 浓度、pH值·····	(288)
5	双亲组合及原生质体比例·····	(290)

6 其它因素	(291)
第四节 融合子的检出与鉴定	(292)
一 融合子的检出	(293)
(一) 直接检出法	
(二) 间接检出法	
二 融合效果的检验.....	(295)
(一) 直接选择法公式	
(二) 间接选择法公式	
三 融合子的稳定性测定.....	(296)
四 重组子的鉴定.....	(297)
(一) 形态学方面	
(二) 生理生化方面	
(三) 生物量测定	
(四) 遗传学鉴定	
1 基因型鉴定	
2 DNA含量测定	
3 GC比的测定	
4 DNA的限制性核酸内切酶酶解片段的比较	
5 核苷酸序列分析与分子杂交试验。	
五 高产融合子的筛选.....	(299)
(一) 初筛	
(二) 复筛	
第四章 原生质体技术的发展与应用.....	(301)
第一节 原生质体融合技术的发展与应用.....	(301)
一 原生质体融合技术的发展.....	(301)

(一)	灭活原生质体融合.....	(301)
(二)	电融合与电化学融合.....	(304)
(三)	通过原生质体融合转移细胞器.....	(308)
(四)	通过原生质体融合转移细胞核.....	(311)
(五)	通过原生质体融合转移病毒.....	(312)
(六)	通过原生质体融合转移质粒.....	(312)
(七)	通过原生质体融合将微生物原生质体 (或 细胞) 引入植物或真菌原生质体...	(313)
二	原生质体融合技术的应用.....	(317)
(一)	原生质体融合在育种中的应用.....	(317)
1	原生质体融合提高产量.....	(317)
(1)	氨基酸高产菌株的选育	
(2)	有机酸高产菌株的选育	
(3)	抗生素高产菌株的选育	
(4)	各种酶高产菌株的选育	
(5)	维生素高产菌株的选育	
(6)	核苷酸高产菌株的选育	
(7)	乙醇高产菌株的选育	
2	原生质体融合可综合双亲株的优良性状(323)	
(1)	氨基酸生产方面	
(2)	抗生素生产方面	
(3)	酶生产方面	
(4)	酱油酿造方面	
(5)	酿酒方面	
(6)	抗污染方面	
(7)	增加细胞内有用物质与扩大体积方面	

(8)	增加杀虫谱方面	
3	去除不利性状·····	(329)
4	合成新产物·····	(330)
(二)	通过原生质体融合进行遗传分析··	(333)
第二节	其它原生质体技术的应用·····	(336)
一	原生质体的转化·····	(339)
(一)	染色体DNA的转化·····	(336)
(二)	染色体DNA片段或线状DNA的转化	(337)
(三)	质粒DNA的高频转化及线状、单链质粒 DNA的转化·····	(338)
(四)	重组质粒的转化·····	(342)
二	原生质体的转染·····	(343)
三	应用脂质体进行原生质体的转化与转染··	(344)
(一)	染色体DNA的转化	
(二)	质粒DNA的转化与噬菌体DNA的转染	
四	原生质体的诱变·····	(347)
五	原生质体再生育种·····	(348)
六	利用原生质体生产某些物质·····	(350)
七	原生质体的固定化·····	(352)
八	原生质体应用于生理生化及遗传学研究··	(353)
(一)	应用原生质体检测抗生素·····	(353)
(二)	应用原生质体研究细胞壁的合成··	(354)
(三)	应用原生质体进行酶的定位·····	(355)
(四)	原生质体技术在遗传学中的应用··	(355)