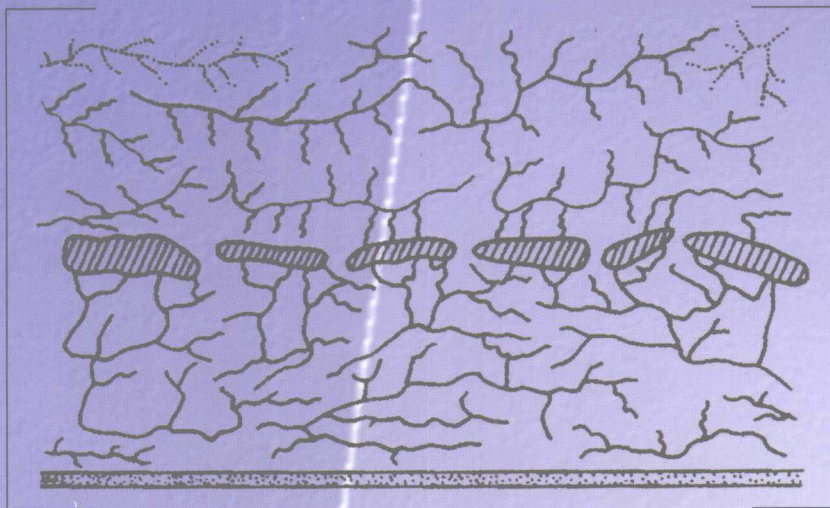


微生物原生质体技术

WEISHENGWU YUANSHEGZHITI JISHU

孙剑秋 臧 威 王志刚 等编著



东北林业大学出版社

微生物原生质体技术

孙剑秋 臧 威 王志刚 等编著

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物原生质体技术/孙剑秋, 臧威, 王志刚等编著. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2008.4

ISBN 978-7-81131-222-5

I. 微… II. ①孙… ②臧… ③王… III. 微生物—原生质体 IV. Q93

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 044598 号

责任编辑: 任 俐

封面设计: 彭 宇



NEFUP

微生物原生质体技术

Weishengwu Yuanshengzhiti Jishu

孙剑秋 臧 威 王志刚 等编著

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路26号)

哈尔滨市工大节能印刷厂印装

开本 787 × 1092 1/16 印张 18 字数 400 千字

2008 年 4 月 第 1 版 2008 年 4 月 第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 978-7-81131-222-5

Q·147 定价: 30.00 元

前 言

微生物原生质体技术 (microbial protoplast technology), 特别是微生物原生质体融合技术, 作为一种重要的基因重组手段, 是现代微生物技术的重要组成部分, 对微生物学基础理论研究与应用研究的发展做出了重大贡献。微生物原生质体技术的建立和发展比动物、植物原生质体技术略晚, 但是发展迅速。近 30 多年来, 在微生物原生质体融合技术逐渐成熟的基础上, 发展形成了原生质体诱变技术、原生质体转化技术、原生质体转染技术、原生质体固定化技术、原生质体再生育种技术等, 并已经形成了一套较为完整的技术体系, 在这套技术体系中微生物原生质体融合处于核心位置。

齐齐哈尔大学生命科学与工程学院从 20 世纪 80 年代初开始微生物原生质体技术方面的研究工作并取得可喜的研究成就。笔者在 20 世纪 90 年代有幸在周东坡教授、平文祥教授指导下, 开始了微生物原生质体技术的探索和实践, 并与他们一起荣获黑龙江省科学技术奖 (自然科学类) 二等奖、黑龙江省科学技术进步二等奖、黑龙江省高校科学技术奖一等奖、黑龙江省自然科学技术学术成果 (论文类) 一等奖、齐齐哈尔市科学技术进步一等奖、齐齐哈尔市自然科学技术优秀学术成果一等奖等多项奖励。

齐齐哈尔大学于 1999 年为研究生开设了“微生物原生质体技术”课程, 为了更好地开展教学工作, 我们在 2006 年着手准备撰写本书。全书共分 5 部分: 微生物原生质体技术概论; 微生物原生质体制备技术; 微生物原生质体再生技术; 微生物原生质体融合技术; 其他微生物原生质体技术。孙剑秋、臧威、王登宇、王鹏、王志刚、蒋本庆分别编写了本书部分内容的初稿, 最后由孙剑秋与臧威对全书进行编排整理、统稿润色和加工完善。本书中汇集了我们多年来在微生物原生质体技术方面的工作经验和科研成果, 并参考了国内外的大量文献资料。内容安排循序渐进、由浅入深, 注重科学性、先进性、系统性, 力求理论联系实际, 使读者能够全面、系统地掌握微生物原生质体技术的基本理论, 并可以用于指导科学实践。

本书的出版资金来源于国家高技术研究发展计划 (863 计划) 子课题、黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助计划、齐齐哈尔市农业攻关及推广计划和黑龙江省新世纪高等教育教学改革工程项目 (2005)、黑龙江省教育科学“十一五”规划课题、黑龙江省学位与研究生教育“十一五”研究课题、齐齐哈尔大学教育科学研究项目重点课题、齐齐哈尔大学教育教学研究项目, 在此一并致谢。

本书可以作为高等院校生物科学、生物技术、生物工程等相关专业本科生和微生物学、发酵工程、生物化学与分子生物学等相关专业研究生的教学用书, 也可以作为微生物学领域教学人员和科研人员的参考用书。

编著者

2008 年 3 月 7 日于齐齐哈尔

目 录

1 微生物原生质体技术概论	(1)
1.1 微生物原生质体的概念	(1)
1.2 微生物原生质体技术的形成与发展	(1)
1.3 我国微生物原生质体技术的代表性成就	(5)
1.4 微生物原生质体技术与相关学科的关系	(7)
1.5 本书纲要	(8)
2 微生物原生质体制备技术	(9)
2.1 微生物原生质体分离方法和一般程序	(9)
2.2 细菌原生质体制备	(11)
2.3 放线菌原生质体制备	(16)
2.4 酵母菌原生质体制备	(18)
2.5 霉菌原生质体制备	(22)
2.6 蕈菌原生质体制备	(27)
2.7 利用孢子制备原生质体的问题	(30)
2.8 微生物原生质体制备率计算	(31)
2.9 影响微生物原生质体制备的因素	(32)
2.10 微生物原生质体的形成与释放	(75)
2.11 微生物原生质体的纯化	(78)
2.12 微生物原生质体的染色检测	(79)
3 微生物原生质体再生技术	(83)
3.1 细菌原生质体再生	(83)
3.2 放线菌原生质体再生	(84)
3.3 酵母菌原生质体再生	(85)
3.4 霉菌原生质体再生	(86)
3.5 蕈菌原生质体再生	(87)
3.6 微生物原生质体再生率计算	(89)
3.7 影响微生物原生质体再生的因素	(90)
3.8 微生物原生质体再生过程	(121)
4 微生物原生质体融合技术	(127)
4.1 细菌原生质体融合技术	(128)
4.2 放线菌原生质体融合技术	(133)
4.3 酵母菌原生质体融合技术	(137)
4.4 霉菌原生质体融合技术	(140)
4.5 蕈菌原生质体融合技术	(143)

4.6	微生物原生质体融合频率的计算	(145)
4.7	影响微生物原生质体融合的因素	(146)
4.8	融合子的检出和鉴定	(164)
4.9	融合子的遗传稳定性	(202)
4.10	优良融合子的筛选	(203)
4.11	微生物原生质体融合技术的优越性	(204)
4.12	微生物原生质体融合技术的应用	(205)
5	其他微生物原生质体技术	(214)
5.1	微生物原生质体诱变技术	(214)
5.2	微生物原生质体转化技术	(226)
5.3	微生物原生质体转染技术	(242)
5.4	微生物原生质体固定化技术	(245)
5.5	微生物原生质体再生育种技术	(254)
参考文献		(260)

1 微生物原生质体技术概论

目前人们已经认识到,微生物技术可以带动整个生物产业的发展。为什么说微生物经济能够充当生物产业发展的“火车头”呢?原因是多方面的。

人类对微生物的利用相当广泛,涉及食品工业、医药卫生、轻工业、化工能源、农业、环境保护、细菌冶金等领域。微生物资源比其他资源有着更大的可再生性,在解决21世纪人类面临的人口健康、资源紧缺、环境污染、粮食危机、生态破坏等严重挑战方面,微生物技术的重要作用无可替代。现代生物技术中的一些重要研究手段如基因克隆、基因表达、基因重组、各种工具酶的提取和制备、诱变育种、定向培育等,都是通过对微生物的研究才取得突破性成就的,微生物技术的发展对其他生物技术的发展产生了重要影响,并在现代生物技术领域中一直处于领先地位。微生物经济作为生物产业发展的“火车头”,投入少、产出多、见效快、应用广泛,可以催生大批高新产业。

微生物原生质体技术(microbial protoplast technology),特别是微生物原生质体融合技术,作为一种重要的基因重组手段,是现代微生物技术的重要组成部分,对微生物学基础理论研究与应用研究的发展做出了重大贡献。微生物原生质体技术的建立和发展,对于现代微生物技术水平的提升具有积极意义。

1.1 微生物原生质体的概念

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(高东,1996),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,换言之原生质体就是除去细胞壁的被细胞膜包围的“裸露细胞”(张志光,2003)。

现代微生物学中,原生质体是指在人为条件下,用物理或化学方法除去微生物细胞壁后得到的主要由一层细胞膜包裹着的圆球状渗透敏感细胞,一般由革兰氏阳性菌或放线菌、酵母菌、霉菌、蕈菌等形成。而革兰氏阴性菌去壁后形成与其他微生物原生质体不同的球状体(sphaeroplast),也叫原生质球,是指革兰氏阴性菌在人为条件下,用溶菌酶破坏细胞壁或用青霉素抑制新生细胞壁合成后,得到的残留有部分细胞壁的原生质体(沈萍,2006)。

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。

1.2 微生物原生质体技术的形成与发展

微生物原生质体技术已经有近百年的发展历史,但是蓬勃发展并在微生物学研究中被广泛应用的时间并不长,只有三十几年的时间。目前,关于微生物原生质体技术的研究日

臻完善和成熟,已经成为现代微生物学实验方法中的重要技术手段。

1.2.1 微生物原生质体制备阶段 (1919 ~ 1972)

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, Klercker 首次使用研磨等机械方法去除植物 *Stratiotes aloides* 的细胞壁(高东, 1996)。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。

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(孙剑秋, 2002a)。

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, Laschtschenko (1909) 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;革兰氏染色阴性;即使具有鞭毛也无法运动;对相应的噬菌体不敏感;细胞不能分裂等。当然,如果在形成原生质体或球状体以前,已经有噬菌体侵入,那么噬菌体仍然能够正常繁殖,造成宿主细胞裂解;如果在形成原生质体前,细胞正在形成芽孢,那么芽孢也仍然能够正常形成。

1.2.2 微生物原生质体融合技术建立阶段 (1972 ~ 1978)

在人工诱导微生物原生质体融合技术建立之前,人们已经观察到人、动物、植物或微生物的细胞存在自发融合 (spontaneous fusion) 现象。细胞自发融合现象及其病毒诱发细胞融合作用的发现,奠定了细胞融合技术建立的理论基础,对微生物原生质体融合技术的建立具有重要的指导意义。

1.2.2.1 人与动物细胞的自发融合

两个以上的细胞合并成为一个细胞或一个多核细胞称为融合细胞(童第周, 1973)。1838 年 Müller 首先报道了脊椎动物肿瘤细胞中的多核现象,1849 年 Robin 在骨髓中也发现了多核细胞的存在(海利斯, 1975)。Luginbühl (1873) 在天花脓包周围发现了多核细胞,最早报道了病毒能够引起多核细胞的形成。Enders (1954) 研究了动物组织的培养物

中麻疹病毒的诱导效应,发现在动物组织培养过程中病毒可以诱导细胞融合形成多核合胞体 (multinucleated syncytia)。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,也能通过一些病毒随意诱导它们融合,融合细胞能进行正常的细胞分裂或不规则的三极有丝分裂 (海利斯, 1975)。

1.2.2.2 植物细胞的自发融合

1902 年, Kuster 最早报道了植物原生质体自发融合现象 (Gamborg, 1981), Ito (1973) 描述了百合科植物原生质体的自发融合。

1.2.2.3 微生物细胞的自发融合

第一个发现微生物多核细胞现象的是 Bary (1859), 他在研究黏菌 (slime mold, 黏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。Mellon (1925) 最早观察到了细菌原生质体自发融合现象, 若干年后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 (Müller, 1966; Strunk, 1967; Lopez - Belmonte, 1966)。当时的研究成果就已经表明, 微生物细胞自发融合现象具有共同特征: ①自发融合主要发生在原生质体形成的过程中; ②自发融合的频率极低而难以计算; ③双亲株为带有相同遗传背景 (identical genetic backgrounds) 的野生型 (Ferenczy, 1981)。

1.2.2.4 人工诱导微生物原生质体融合技术的建立

早在 1954 年, Enders 就发现麻疹病毒可以诱导动物细胞融合, 形成多核合胞体 (multinucleated syncytia), 1970 年, Power 等使用 0.25 mol/L 硝酸钠作为融合剂首次报道了燕麦 (*Avena sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、小麦 (*Triticum aestivum*) 等植物原生质体融合, 而微生物原生质体人工诱导融合技术的第一次出现是在 1972 年。

最早尝试开展微生物原生质体融合研究的是 Lederberg (图 1-1), 美国遗传学家、细菌遗传学的创始人之一, 1958 年获得诺贝尔生理学或医学奖。在 1958 年, Lederberg 和 Clair 试图实现带有遗传标记的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 原生质体融合, 但是实验没有成功。

微生物原生质体融合技术的奠基人 Ferenczy L. (1930 ~ 2004) (图 1-2) 是匈牙利最著名的微生物学家之一, 匈牙利 Attila József 大学微生物系教授, 匈牙利科学院院士。作为研究微生物原生质体人工诱导融合的先行者, 在国际上享有盛誉。

1972 年, Ferenczy 等通过离心力 (centrifugal force) 诱导酵母状 (yeast-like) 丝状真菌白地霉 (*Geotrichum candidum*) 两株稳定的营养缺陷型互补融合, 开创了微生物原生质体人工诱导融合的先河。这项微生物原生质体技术发展史上具有里程碑意义的成就, 在西班牙召开的“第三届酵母菌原生质体国际研讨会”上首次公开发表 (Ferenczy, 1972), 之后在英国的 Nature 上正式报道 (Ferenczy, 1974)。

人们对微生物原生质体融合最初的许多重要认识, 如第一次成功的原生质体融合, 以及融合产物的特性分析、获得较高融合频率方法的建立、在基础理论和应用领域进行微生物基因传递的可能性, 都是建立在丝状真菌原生质体融合研究成果的基础上的, 所以在 1972 ~ 1976 年微生物原生质体融合就是指丝状真菌的原生质体融合。



图 1-1 Joshua Lederberg (1925 ~)



图 1-2 Lajos Ferenczy (1930—2004)

其实,最初 Ferenczy 选用带有营养缺陷型遗传标记的白地霉 (*Geotrichum candidum*) 进行人工诱导原生质体融合是一个非常幸运的选择 (a lucky choice), 因为之前白地霉缺陷突变体的有性杂交和准性杂交过程从来没有被人发现过。Ferenczy 对两株白地霉 (*Geotrichum candidum*) 互补融合产物 (融合子) 分析结果表明,融合子营养互补的原因是异核体形成 (heterokaryon formation) 的结果 (Ferenczy, 1981), 在融合细胞中并没有遗传物质的交换和重组。

1974 年,加拿大华人科学家高国楠 (Kao KN) 发现,聚乙二醇 (PEG) 能够有效诱导植物原生质体融合,显著提高融合频率,这项成果是原生质体融合技术研究历史上的重大发现,在此基础上动物、植物、微生物细胞融合技术发展迅速。

1976 年,国际上关于细菌原生质体融合的两篇最早的研究论文在美国科学院院报上同时发表。匈牙利科学院遗传研究所 Fodor 等报道巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的两个双重营养缺陷型原生质体可以在磷酸钙或聚乙二醇的诱导下实现融合,重新形成杆状细胞,在这个过程中出现了重组子。法国 Paris - Sud 大学微生物研究所 Schaeffer 等研究发现,在脱氧核糖核酸酶存在的情况下,枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的两个多重营养缺陷型亲本菌株的原生质体融合后,可以产生原养型菌株,而没有原生质体化的双亲菌株混合后或者原生质体化的单亲平板上,都没有原养型菌株形成,并且提出原养型菌株的出现是原生质体融合后双亲的遗传物质发生基因重组的结果。

1976 年,匈牙利 Attila József 大学 Sipiczki 等关于酵母菌原生质体融合的研究成果在德国召开的“第八届酵母菌遗传学与分子生物学国际会议”上首次报道。他们使用绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 产生的溶壁酶获得了 *Schizosaccharomyces pombe* 两株营养缺陷型的原生质体,通过含有 10 mmol/L CaCl_2 的 30% PEG 4000 诱导融合,融合率达到 0.17%,该成果于 1977 年正式公开发表。1977 年,荷兰 Delft 的 Gist - Brocades N V 研究与发展中心的 Solingen 等利用聚乙二醇 (PEG) 和 Ca^{2+} 的作用,实现了交配型为 a 并带有营养缺陷

型标记的两株啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 原生质体的融合, 得到了交配型为 aa 的二倍体融合细胞, 由于他们的研究成果发表时没有见到 Sipiczki 等 (1976; 1977) 的报道, 所以误以为自己的成果是国际上第一次开展酵母菌原生质体融合的研究。

1977 年, 英国 John Innes 研究所的 Hopwood 等研究了天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)、小小链霉菌 (*S. parvulus*)、变青链霉菌 (*S. lividans*)、灰色链霉菌 (*S. griseus*)、吡啶霉素链霉菌 (*S. acrimycini*) 五种链霉菌种内株间原生质体融合, 得到了较高的遗传重组频率, 比一般杂交产生的重组频率高出 20 ~ 20 000 倍。这是国际上关于放线菌原生质体融合的首篇文献。

1978 年, Hopwood 等在研究天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 原生质体融合时发现, 多个亲株的原生质体可以同时融合在一起, 并得到了 10% ~ 17% 的基因重组频率。这项成果表明了原生质体融合在遗传育种工作中的巨大潜力, 也标志着微生物原生质体融合技术已经发展成熟, 微生物原生质体技术进入到全面发展的新阶段。

1.2.3 微生物原生质体技术的发展成熟阶段 (1978 ~)

虽然微生物原生质体融合技术的建立比动、植物细胞融合晚得多, 但是自 1978 年以后发展迅速。

从原生质体的制备方法来看, 酶法已经成为微生物原生质体制备的主导方法, 而且形成了成熟的技术路线, 对不同微生物采取不同的制备措施, 提高原生质体的形成率。从原生质体融合的出发菌株来看, 由最初的白地霉 (*Geotrichum candidum*) (Ferenczy, 1974)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) (Fodor, 1976)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (Schaeffer, 1976)、*Schizosaccharomyces pombe* (Sipiczki, 1977)、啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Solingen, 1977)、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)、小小链霉菌 (*S. parvulus*)、变青链霉菌 (*S. lividans*)、灰色链霉菌 (*S. griseus*)、吡啶霉素链霉菌 (*S. acrimycini*) (Hopwood, 1977; 1978), 很快扩展到多种微生物类群。从融合菌株的亲缘关系来看, 由最初的种内株间融合, 逐步扩展到种间、属间、科间甚至界间微生物的原生质体融合。从融合方法和手段来看, 由最初的机械助融, 已经发展到以聚乙二醇 (PEG) 为主的化学诱导融合阶段, 电场诱导融合、激光诱导融合等新方法、新设备的出现, 促进了微生物原生质体融合技术的发展。在原生质体融合基础上, 逐渐发展形成了原生质体诱变技术、原生质体转化技术、原生质体转染技术、原生质体固定化技术、原生质体再生育种技术等, 已经形成了一套较为完整的技术体系, 在这套技术体系中微生物原生质体融合处于核心位置 (高东, 1996)。

随着微生物原生质体研究方法的不断改进, 研究手段的不断更新, 对微生物原生质体的研究不断深入。以微生物原生质体为研究对象的系列微生物技术手段的建立和发展, 使微生物原生质体技术研究进入了一个崭新的阶段。

1.3 我国微生物原生质体技术的代表性成就

我国微生物原生质体技术的研究工作始于 1980 年左右, 经过近 30 年的发展取得了巨大成就, 分子生物学等现代生物技术的成熟促进了微生物原生质体研究手段和研究水平的提升。

1981年,遗传学报发表了复旦大学遗传学研究所江行娟、杨庆云、任大明、冯德鑫、叶银凤、盛祖嘉的文章《枯草杆菌中通过细胞融合的质粒转移》,这是我国学者首次报道微生物原生质体技术研究成果。在成功实现枯草芽孢杆菌种内株间原生质体融合的同时,实现了编码抗卡那霉素基因质粒 p^{UB110} 在细胞间的转移。

1981年,中国科学院微生物研究所梁平彦等比较了渗透压稳定剂、温度、pH值、酶解温育方式、培养基等对产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)两株营养缺陷型原生质体形成和再生的条件,并以聚乙二醇(PEG,相对分子质量为6 000)作为融合剂,实现了产黄青霉原生质体的营养互补融合。

1982年,中国科学院上海植物生理研究所王洪洲等对庆丰链霉菌(*Streptomyces qingfengmyceticus*)原生质体的形成、再生及融合重组的进行研究,发现PEG能有效地诱导庆丰链霉菌原生质体融合重组,重组频率可达 10^{-1} ,和常规杂交相比重组频率可以提高10~1 000倍。

1983年,中国科学院微生物研究所乔宝义等对棒状杆菌原生质体的形成、再生以及融合进行了初步探讨,研究了北京棒状杆菌(*Corynebacterium pekinense*)和钝齿棒状杆菌(*Corynebacterium crenatum*)融合菌株的氨基酸发酵产物,发现70%的融合株同时产生两亲株的氨基酸,这是我国学者首次将微生物原生质体技术和方法与微生物遗传育种联系起来。

1983年,中国科学院微生物研究所谭蓓英等研究了生长时期、酶的种类和浓度、酶解时间、预处理(β -巯基乙醇)、渗透压稳定剂等对毕氏酵母(*Pichia* sp.)营养缺陷株原生质体形成和再生的影响。这是我国第一篇关于酵母菌原生质体技术的文献。

1984年,北京大学林稚兰等研究了多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)原生质体形成、再生与转化。多黏芽孢杆菌完整菌体不能作为质粒DNA的转化受体,但其质粒消除菌株制成的原生质体,可接受多黏芽孢杆菌的 p^{DZ502} 及枯草杆菌的 p^{UB110} 质粒DNA转化。这是我国第一篇关于微生物原生质体转化的报道。

1984年,中国医学科学院抗菌素研究所李焕娄等把新霉素产生菌弗氏链霉菌(*Streptomyces fradae*)的原生质体分别用热或UV灭活的单亲株或双亲株经PEG融合,获得了重组体菌株,为工业微生物杂交育种摆脱遗传标记提出了新的可能性。这是我国第一篇关于灭活原生质体融合的文章。

1990年,齐齐哈尔师范学院周东坡等出版了我国微生物原生质体技术研究领域第一本专著《微生物原生质体融合》,着重介绍了微生物原生质体融合的基本程序和关键环节,论述了原生质体融合过程中的理论问题,并对微生物原生质体融合的前景作了展望。

1993年,北京大学刘伊强等选用抗菌蛋白产生菌枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和晶体蛋白产生菌苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis* subsp. *pacifeus*)的营养缺陷型衍生株,在聚乙二醇的诱导下进行原生质体种间融合,获得了可以表达亲本抗菌蛋白和毒素蛋白、表现双亲遗传性状的种间融合菌株,而且融合重组菌株具有抑制多种植物病原菌和毒杀鳞翅目幼虫的能力。

1995年,杭州大学李桃生等通过原生质体融合技术将二倍体酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoides*)与单倍体糖化酵母(*Saccharomyces diastaticus*)构建成遗传上稳定的种间三倍体融合杂种细胞。遗传分析表明,通过遗传标记互补选择法获得的种间三倍

体融合杂种在产孢过程中标记基因发生了分离和交换。

1999 年,齐齐哈尔师范学院周东坡等以带有遗传标记的啤酒酵母单倍体为出发菌株,通过灭活原生质体融合技术选育出一株口味独特、发酵度高、絮凝性强、遗传性能稳定兼具多种优良性状的啤酒酵母新菌株。该成果荣获黑龙江省科学技术进步二等奖。

2001 年,齐齐哈尔大学孙剑秋等研究了酶系组成、酶解时间、酶解温度、渗透压稳定剂、pH 值、培养基成分、培养方式、预处理、保护剂等因素对紫杉醇(taxol)产生菌树状多节孢(*Nodulisporium sylviforme*)原生质体制备和再生的影响,并以树状多节孢的突变株为出发菌株研究了树状多节孢双亲灭活原生质体融合方法,为通过原生质体融合构建紫杉醇工程菌株奠定了方法学基础(孙剑秋,2002b)。

2002 年,清华大学刘祖同与华中农业大学罗信昌编著的《食用蕈菌生物技术及应用》中包括食用蕈菌原生质体技术一章,对大型真菌原生质体的制备、再生与融合方法、融合子的鉴定及遗传分析等内容进行了比较详尽的论述,并介绍了原生质体融合技术在几种常见食用蕈菌育种中的应用。

2003 年,湖南师范大学张志光编著了《真菌原生质体技术》,这是我国在微生物原生质体技术研究领域正式出版的第二部重要著作,该书系统论述了真菌原生质体制备、再生、融合过程中的方法、原理、机制及其原生质体技术的应用领域,内容丰富、全面。

2004 年,华南理工大学罗立新编著了《细胞融合技术与应用》,在微生物细胞融合技术一章中,对细菌、放线菌、酵母菌、霉菌的细胞融合技术从方法到应用进行了比较详细的综述。

2005 年,四川省农业科学院彭卫红等以无锁状联合的茯苓(*Poria cocos*)次级菌丝和具锁状联合的风尾菇(*Pleurotus sajorcaju*)次级菌丝为亲本制备原生质体,以 PEG 为促融剂,在高钙、高 pH 值条件下,将茯苓(或风尾菇)原生质体热灭活,与风尾菇(或茯苓)原生质体融合,成功实现了大型真菌的日间融合,进一步阐明了运用微生物原生质体技术实现微生物远源杂交育种的可行性。

2007 年,南开大学张学炜等利用亚硝基胍诱变方法筛选了一株深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)潮霉素 B 敏感型菌株。采用 PEG 介导的原生质体转化方法,将含有 *E. coli* 潮霉素 B 抗性标记的 PD4 质粒转入敏感株的原生质体,通过 PCR 方法检测到转化子中潮霉素抗性基因的存在, Southern 杂交发现潮霉素抗性基因已经以 1~2 拷贝数整合到深黄被孢霉染色体上。

1.4 微生物原生质体技术与相关学科的关系

微生物原生质体技术与其他学科的关系主要体现在三个方面。

1.4.1 原生质体技术是新兴的微生物技术

微生物原生质体技术是新兴的微生物技术,作为现代微生物技术的重要组成部分,与传统的生命科学,如微生物学、生物化学、遗传学、细胞生物学等,有着非常密切的联系。

1.4.2 原生质体技术促进了现代生命科学的发展

微生物原生质体技术的产生,有利于研究细胞壁的结构和成分,探索细胞间遗传物质

的传递机制和规律，为功能基因定位等方面的研究提供了新途径。

1.4.3 原生质体技术是现代微生物学研究的基本技术手段

微生物原生质体技术的出现已经有近百年的时间，30 年来随着原生质体融合技术的建立逐渐发展成熟，目前在基因重组、微生物遗传育种等领域应用相当广泛，微生物原生质体技术已经成为微生物学及其现代生命科学研究的重要工具之一（孙剑秋，2002c）。

1.5 本书纲要

本书主要根据作者多年从事微生物原生质体技术研究的成果及其国内外相关文献编著而成，力图全面系统地介绍微生物原生质体技术的基础知识和关键技术、应用领域和发展方向、研究价值和理论贡献。全书分为 5 部分：原生质体技术概论；原生质体制备技术；原生质体再生技术；原生质体融合技术；其他原生质体技术。内容涵盖了以原生质体融合为核心的整套微生物原生质体技术体系。

本书可以作为高等院校生物科学、生物技术、生物工程等相关专业本科生和微生物学、发酵工程、生物化学与分子生物学等相关专业研究生的教学用书，也可以作为微生物学领域教学人员和科研人员的参考用书。

2 微生物原生质体制备技术

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。

原生质体制备就是对微生物细胞进行破壁处理，当细胞壁去除后，得到的原生质体应该具有以下功能特征：一是无细胞壁障碍，可对膜和细胞器进行基础研究；二是具有全能性，在适宜的条件下能够再生形成完整个体；三是可诱导融合或者进行其他遗传操作。

早期人们曾探索使用研磨等机械方法和超声波等物理方法来制备原生质体，但制备效果都不理想，目前人们主要运用酶法来制备原生质体。在制备细菌、放线菌的原生质体时，主要使用溶菌酶作为工具酶。但也有例外，1987年，Temeyer等发现苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringiensis*）的细胞壁对溶菌酶、几丁质酶、胰蛋白酶和蛋白酶等具有抗性，却可以被来自于本身的溶壁酶或突变溶菌素（Mutanolysin）降解。对于酵母菌、霉菌、大型真菌（蕈菌）来说，由于细胞壁组成更为复杂，人们多倾向于使用复合酶进行处理，常用的酶有纤维素酶、蜗牛酶、几丁质酶和溶壁酶等。

2.1 微生物原生质体分离方法和一般程序

对于不同种类的微生物来说，由于遗传背景、生长条件、生理状态、细胞壁结构等影响原生质体形成的因素存在差异，因此不同的微生物或同种微生物不同菌株的原生质体制备方法可能存在较大的差别。

2.1.1 微生物原生质体分离方法

2.1.1.1 机械破壁法

机械破壁法是利用细胞破碎器等机械将细胞破碎而获得原生质体。100多年前，就已经有使用机械方法分离植物原生质体的报道（Klercker, 1892; Rechinger, 1893）。植物组织先用高渗培养基处理，直到细胞质和细胞壁发生分离现象，然后用锋利的刀来切割，此时即可以得到游离的原生质体。这种方法分离到的原生质体数量非常少，1个小时仅有几百个，而现在酶解的方法可以在几个小时内释放原生质体达数10亿个。另外用机械方法破壁获得的原生质体，由于破壁不完全往往带有细胞壁的残片以及受机械力的损伤，原生质体质量较差，这种制备原生质体的方法现在已经不再使用。

2.1.1.2 阻碍细胞壁形成法

在微生物培养基内加入一定量可以阻碍细胞壁形成的物质，使细胞壁的合成受阻，从而分离原生质体。例如：青霉素可以与细菌转肽酶的活性中心结合，阻碍肽聚糖合成过程中的转肽作用与肽键、肽桥的形成，进而影响肽聚糖的交联和网状结构的形成，不可逆地抑制细菌细胞壁的合成（周德庆，2002）。山梨糖可以阻碍真菌细胞壁 β -1,3葡聚糖合成，而多氧菌素D则阻碍细胞壁中几丁质的合成，利用加有山梨糖和多氧菌素D两种物

质的高渗培养基培养粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 的菌丝, 7 d 后就可以得到大量的原生质体, 而且这种方法得到的原生质体均匀, 在培养 35 d 内都可以稳定的得到原生质体。用阻碍细胞壁形成法分离原生质体与酶解法相比具有一定优点; ① 原生质体的数量在一定时期内是一定的; ② 原生质体若在 -70°C 冻结, 则大约保存 3 个月仍有活性; ③ 原生质体都是有细胞核的; ④ 原生质体能迅速而且同时再生。但这种方法也有一些缺点: 培养时间长, 在短时间内不可能获得大量的原生质体, 而且这种方法能否应用于所有微生物还不清楚 (张志光, 2003)。

2.1.1.3 酶法

酶法分离原生质体是当前微生物原生质体技术中制备原生质体的最重要方法, 在原生质体研究和应用中被普遍采用。这种方法是利用各种破壁酶溶解微生物单个细胞、菌丝、孢子的细胞壁而分离原生质体 (表 2-1)。酶解法分离原生质体具有以下优点: ① 可以在短时间内分离出大量的原生质体, 2~4 h 获得原生质体的数量可以达到 10^7 个/mL 以上; ② 用渗透压稳定剂如 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、蔗糖、山梨醇等配制酶液和培养基, 使细胞内外的渗透压处在基本一致的状态, 获得的原生质体受伤害小, 不会因失水膨胀而破裂 (张志光, 2003)。

表 2-1 不同类群微生物的一般酶解去壁方法 (参考罗立新, 2004)

微生物种类	细胞壁主要成分	去壁方法
芽孢杆菌	肽聚糖	溶菌酶处理
葡萄球菌		溶葡萄球菌素处理
链霉菌		溶菌酶处理 (菌丝生长时补充 0.5% ~ 5.0% 甘氨酸, 或 10% ~ 34% 蔗糖)
小单胞菌		溶菌酶处理 (菌丝生长时补充 0.2% ~ 0.5% 甘氨酸)
大肠杆菌	肽聚糖和脂多糖	溶菌酶和 EDTA 处理
碱性普罗威登斯菌		溶菌酶和 EDTA 处理
黄色短杆菌		溶菌酶处理 (生长时补充 0.41 mol/L 蔗糖及 0.3u/mL 青霉素)
霉菌	纤维素和几丁质	纤维素酶、真菌中分离的溶壁酶或复合酶
酵母菌	葡聚糖和几丁质	蜗牛酶或复合酶
蕈菌	葡聚糖和几丁质	溶壁酶、Novozym1 234 等

酶解法制备微生物原生质体的过程中, 由于不同微生物细胞壁组成不相同, 因此制备原生质体的条件也存在着很大的差异, 一些辅助因子的存在有利于微生物原生质体的形成 (表 2-1)。在放线菌生长的培养基中添加甘氨酸, 可以使菌体的细胞壁较容易被酶解, 作用机理可能是甘氨酸渗入细胞壁肽聚糖中代替 D-丙氨酸的位置, 影响细胞壁中各组分子间的交联度。在原核生物生长阶段添加蔗糖也能提高细胞壁对溶菌酶的敏感性, 蔗糖的作用可能是扰乱了菌体的代谢, 最适的蔗糖添加浓度随不同菌种而变化。青霉素能干扰细菌肽聚糖合成中的转肽作用, 使多糖部分不能交联, 从而影响肽聚糖的网状结构的形成, 所以在菌体生长对数期加入适量青霉素, 就能使细胞对溶菌酶更敏感。

2.1.2 分离原生质体一般程序

微生物的细胞壁组成不同、生理阶段不同、生活状态不同, 加上其他因素的影响, 不

同微生物制备原生质体的最佳条件存在着很大差异,但是对所有的微生物来说,分离原生质体的一般程序应该基本相似。

(1) 菌体培养: 可以采用液体培养、固体培养的方法。

(2) 收集菌体: 通过过滤或离心的方法收集菌体,用于原生质体制备。

(3) 洗涤菌体: 使用高渗溶液冲洗或高渗溶液与酶液的混合液冲洗,减少培养基等杂质对原生质体制备过程的影响。

(4) 酶解处理: 保温酶解后,加入大量的渗透压稳定剂稀释反应液,终止酶解作用。

(5) 原生质体收集: 通过离心或过滤,除去多余的去壁酶和未分解的菌丝体片断及其他残余物质。

(6) 原生质体纯化: 通过离心洗涤或过滤,收集大小密度均一的原生质体。

2.2 细菌原生质体制备

细菌(bacteria)是一类细胞细而短(直径约为 $0.5\ \mu\text{m}$,长为 $0.5\sim 5\ \mu\text{m}$)、结构简单、胞壁坚韧,多以二分裂方式繁殖和水生性较强的原核生物,是微生物的重要类群。在自然界分布广、种类多,与人类生产和生活的关系也十分密切。细菌大小随种类不同差别很大,有的在光学显微镜下勉强可见,有的几乎肉眼就可辨认,但多数细菌居于二者之间(周德庆,2002)。

2.2.1 细菌细胞壁与去壁酶

2.2.1.1 细菌细胞壁

细菌细胞壁是位于细胞最外的一层厚实、坚韧的外被,主要成分为肽聚糖,具有固定细胞外形和保护细胞不受损伤等多种生理功能。各种细菌经革兰氏染色法染色后,能区分为两大类,一类最终染成紫色称为革兰氏阳性细菌(Gram positive bacteria, G^+),另一类被染成红色称为革兰氏阴性细菌(Gram negative bacteria, G^-)。细菌细胞壁除了绝大多数以肽聚糖为基本成分外, G^+ 、 G^- 细菌还有各自的特点(图2-1)。

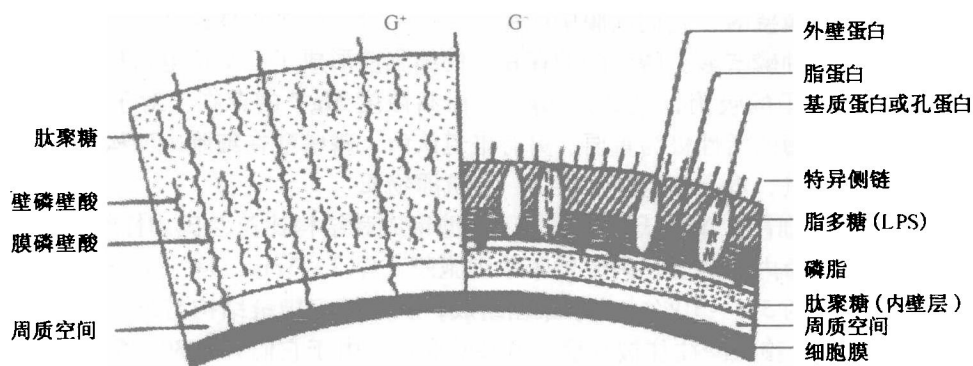


图2-1 革兰氏阳性细菌的和革兰氏阴性细菌细胞壁构造(引自周德庆,2002)

G^+ 细菌细胞壁和 G^- 细菌细胞壁在结构上不同,前者是由内含有磷壁酸的肽聚糖(peptidoglycan, $20\sim 80\text{nm}$)层构成的,而革兰氏阴性细菌的细胞壁则较为复杂,除有一