

酵母菌原生质体融合技术^{*}

彭帮柱, 岳田利, 袁亚宏, 王丽威
(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 介绍了原生质体融合技术在酵母菌选育中的应用研究概况,对原生质体的制备、再生、融合和筛选等步骤的操作要点、操作方法和技术参数作了详尽的叙述。原生质体融合技术为发酵工业开辟了更加广阔的发展前景。

关键词: 酵母菌; 原生质体融合; 育种

中图分类号: TQ920.1; Q813.6

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2004)01-0101-03

Protoplast Fusion in Yeast

PENG Bang-zhu, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong, WANG Li-wei

(Food Science and Engineering College, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract In this paper, the research view of protoplast fusion technique on the application to the yeast-breeding was related introduced and evaluated, and operating points, methods and technology parameters were also detailed introduced in protoplast preparation, regeneration, fusing and fusant selecting. Protoplast fusion provides a wider prospect for the development of fermentation industry.

Key words Yeast; Protoplast fusion; Breeding

原生质体融合技术 (Protoplast Fusion) 是将遗传性状不同的两个细胞融合为一个新细胞,使两亲株的整套基因相互重新组合的一种技术,属于细胞工程,是现代生化技术的一个分支。原生质体融合技术起源于 20 世纪 50 年代,自 Wall 利用溶菌酶首次得到巨大芽孢杆菌的原生质体后^[1], Eddy 等利用蜗牛酶获得酵母菌原生质体的报道也相继出现。70 年代, Kao 发现聚乙二醇 (PEG) 在钙离子 (Ca^{2+}) 存在的条件下,能促使植物细胞的原生质体融合,并提高融合率^[2]; 此后原生质体融合技术得到了快速的发展,随后酵母菌的属间、种间融合都有报道^[3~6]。20 世纪 80 年代初, Zimmermann 等报道了电诱导细胞融合的新技术^[7],后来又发展了电磁融合法、激光融合法等技术,从而使原生质体融合技术在微生物育种方面形成一个系统的、成熟的实验体系。在 1980 年举行的第六次国际发酵讨论会上,原生质体融合

技术是大会讨论的主要内容之一,认为通过原生质体融合进行基因重组的研究已经成为微生物遗传育种的一种有效的新工具。国内外对原生质体融合技术的研究都比较成熟,一般认为酵母菌原生质体融合技术的关键点有原生质体的制备和再生、原生质体的融合以及融合子的筛选等。

1 原生质体的制备与再生

酵母细胞外围是一层细胞壁,总厚度约为菌体直径的 1/7,主要由葡萄糖、甘露聚糖、蛋白质等组成^[8]。只有去除细胞壁,才能使原生质体游离出来,目前去壁的方法,绝大多数采用酶解法,一般选用终浓度 1%~2% 的蜗牛酶;由于酵母菌原生质体融合后的重组体 (融合子) 容易发生回复突变,利用亲本菌株的单倍体细胞进行融合,能够有效地降低回复突变率。因此,酵母菌原生质体制备一般取对数生长期的单倍体细胞,此时细胞代谢

^{*} 收稿日期: 2002-10-08 修回日期: 2003-10-22
基金项目: 国家西部专项 (2001BA901A19); 国家“十五”科技攻关项目 (2001BA501A5-2.3); 霍英东基金项目 (2002-81065)
作者简介: 彭帮柱 (1978-), 男, 河南信阳人。在读硕士, 主要从事食品生物技术与发酵工程研究。

活跃,生长率高,群体细胞的化学组成、形态及生理特征比较一致^[8]。

1.1 单倍体的制备

一般方法为:将活化的菌种接至产孢前培养基,培养 2~ 3d,再转接至产孢培养基,培养至大量孢子生成时,用无菌的生理盐水制备成孢子悬液,然后酶解破子囊壁,取菌液涂完全培养基平板,然后将平板上的菌落再转接到产孢培养基中培养,染色镜检,凡不能形成子囊孢子的为潜在的单倍体细胞,进而将其点种到产孢培养基,如此反复 2~ 3次,最后不能产孢的为单倍体菌株。

1.2 原生质体的制备

将单倍体细胞接种于液体完全培养基中活化,然后离心收集菌体,悬浮于乙二胺四乙酸(EDTA)或巯基乙醇中,振荡处理一段时间,使菌体细胞壁中的交联键松动,对酶的敏感性增加,再离心收集菌体,加入高渗酶液酶解,一般的高渗酶液配比为 1%~ 2% 蜗牛酶+ 17% 的蔗糖或山梨醇。随着酶解时间的延长,菌体去壁程度愈发完全,表现为原生质体形成率逐渐上升,当达到一定时间后,绝大多数的细胞已形成原生质体,再进行酶解会使原生质体的质膜受到损伤,造成原生质体的失活,使再生率下降,因此必须选择合适的酶解时间。

1.3 原生质体的再生

酶解去壁后的原生质体应具有再生能力,这是原生质体融合育种的必要条件。尽管原生质体具有生物活性,但它不是正常的细胞,在普通培养基平板上不能正常的生长、繁殖,必须加入渗透压稳定剂。影响原生质体再生的因素主要有菌种本身的再生特性、原生质体的制备条件和再生条件等。尤其是原生质体制备时的酶浓度和酶解时间对原生质体再生的影响较大^[7]。

1.4 原生质体形成率与再生率的计算

原生质体的形成率与再生率是反映原生质体制备质量的两个重要指标,在进行融合前首先要对原生质体的形成率和再生率进行测定,一般的计算方法为:

形成率= (未经酶处理的总菌数 - 经酶处理后的剩余菌数) / 未经酶处理的总菌数× 100% ,

再生率= (再生完全培养基平板上的总菌数 - 低渗处理后的剩余菌数) / (未经酶处理的总菌数 - 低渗处理后的剩余菌数) × 100% ,

2 原生质体融合

2.1 化学融合法

目前最常用的是 PEG助融法,将两亲本的原生质体等量混合在高渗液中,加入 PEG助融,振荡促使原生质体融合。一般酵母菌原生质体融合时,选用分子量为 4000~ 6000的 PEG,终浓度为 30%~ 40% ,再加入 Ca^{2+} , Mg^{2+} 等阳离子。关于 PEG助融的作用机理一般认为 PEG使原生质体的膜电位下降,然后通过 Ca^{2+} 交联而促进凝集^[9]。由于 PEG具有很强的渗透伤害和化学毒性,据王建华^[10]报道:选用螯合剂乙二胺四乙酸(EDTA)或乙二醇双乙胺醚(EGTA)作为新的促融剂,对原生质体的再生率和融合率均有显著提高,其作用机理可能在于螯合剂通过与原生质体膜蛋白上的二价阳离子结合,从而使膜脂流动性减慢,稳定性增强,从而提高再生率;与相邻两原生质体膜蛋白上的二价阳离子结合,从而提高融合率。由于不同酵母菌的原生质体生理特性不同,对具体的实验对象需要摸索出相应的最佳实验条件。

2.2 电融合法

电融合技术是利用直流或交流电场的作用,迫使两亲本原生质体融合。包括下述过程:细胞在电场中极化成偶极子,沿电力线排列成串珠状;两极间的高压电脉冲击穿紧密接触的细胞质膜,在细胞膨压的作用下完成融合。其优点是:融合频率高,对细胞无化学毒害,可在显微镜下观察融合全过程;还具有空间定向、时间同步可调控的特点。由于对设备的依赖程度较大,电激时间、电压梯度、交变频率等条件不易摸索,自 80年代初发明以来,一直难以推广。在酵母菌原生质体融合中,汪和睦、张博润、程东升等^[11~ 13]曾利用电融合法成功地进行了啤酒酵母的融合。

2.3 激光诱导融合法

利用激光束对相邻两个细胞接触区的原生质膜进行穿孔,使两个细胞的基因进行交换重组。目前利用这种方法诱导动、植物细胞的原生质体融合已有大量报道,但用于酵母菌原生质体融合报道较少。

3 融合子的筛选

原生质体融合后,真正的杂合二倍体是极少数的,大多数异核体会产生亲型分离子,如何有效

地筛选出具有优良性状的融合子是至关重要的。

3.1 利用营养缺陷型作为遗传标记

利用营养缺陷型作为遗传标记是一种传统有效的方法。假设两亲株的遗传标记为营养缺陷型 $A^+ B^-$ 及 $A^- B^+$, 则其重组子的原养型为 $A^+ B^+$, 由于遗传互补, 在高渗基本培养基上能够再生, 从而能够筛选出融合子。在酵母菌原生质体融合中, 利用营养缺陷型作为遗传标记进行筛选的报道相当多, 但营养缺陷型的获得繁琐费时, 而且往往会造成亲本一些优良遗传性状的丢失。

3.2 灭活供体法

亲本之一的原生质体经紫外线、热或化学试剂等处理失活而作为遗传物质的供体, 然后与另一亲本进行融合。利用该方法可以省去一亲株的缺陷型制备, 但融合率较低。周东坡、杨汝德等^[14, 15]曾利用这种方法成功地筛选出了融合子。

3.3 利用荧光染色法选择融合子

既用不同的荧光色素染色双亲原生质体, 使其在特定波长的激光下显现不同的颜色, 然后在荧光显微镜下, 用显微操作器挑出具有双亲两种荧光色的单个细胞, 即为融合子。利用这种方法必须考虑荧光色素对原生质体的影响, 以及两种颜色的分辨率。该方法应用于酵母菌原生质体融合中的报道并不多见。

重组子的选择方法是使原生质体融合技术得以应用的关键。新的选择方法如 DNA 含量测定、免疫测定技术等不断出现, 使原生质体融合技术得到了更广泛的应用。原生质体融合技术没有细胞壁的障碍, 融合后两亲株的整套基因组相互接触, 可发生多次交换, 能产生多种基因组合, 通过有效的筛选方法, 可选出优良菌株。原生质体融合技术较一般的诱变技术定向性强, 效率高, 为现代微生物工业的发展作出了重大的贡献。原生质体融合技术不仅是分子生物学、遗传学基础理论研究的重要手段, 也是工业微生物育种的有效途径。

参考文献:

[1] Advances in Protoplast Research. Proceedings of the 5th International Protoplast Symposium [R]. July 9-14 1979, Szeged Hungary Budapest.

[2] Kao K N, Michayluk M R A. Method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts [J]. Planta, 1974, 115: 355-367.

[3] Spiczki M, Ferenczy L. Protoplast fusion of Schizosaccharomyces pombe auxotrophic mutants of identical mating type [J]. Molecular and General Genetics, 1977, 151: 77-81.

[4] Bortol A, Nudel C, Fraile E, et al. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1986, 24: 414-416.

[5] Adela Bortol. Industrial yeast strain improvement: construction of strains having the killer character and capable of utilizing starch [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1988, 28: 577-579.

[6] 王岳五, 字学锋, 汪和睦, 等. 电诱导酵母属与短梗霉属属间融合的研究 [J]. 真菌学报, 1990, 9(1): 56-63.

[7] Zimmermann U, Scheureich P. High frequency fusion of plants protoplasts by electric field [J]. Planta, 1981, 151: 26-32.

[8] 陈思媛, 肖熙佩. 酵母生物化学 [M]. 济南: 山东科学出版社, 1990: 1.

[9] 张克旭, 陈宁, 张蓓, 等. 代谢控制发酵 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.

[10] 王建华, 赵学慧. 螯合剂对原生质体融合的影响 [J]. 生物工程学报, 1998, 14(1): 112-115.

[11] 汪和睦, 鲁玉瓦, 武延宽, 等. 电场诱导细胞融合 [J]. 生物工程学报, 1986(3): 44-57.

[12] 张博润, 姜书勤, 徐婉学, 等. 电场诱导营养缺陷型酵母原生质体的融合 [J]. 生物工程学报, 1986, 2(4): 29-34.

[13] 程东升, 李国兰. 电诱导细胞融合仪的研制及在真菌原生质体融合中的应用 [J]. 微生物学通报, 1995, 22(3): 14-17.

[14] 周东坡, 平文祥, 孙剑秋, 等. 通过灭活原生质体融合选育啤酒酵母新菌株 [J]. 微生物学报, 1999, 39(5): 454-460.

[15] 杨汝德. 双灭活原生质体融合法选育耐高温高产酒精酵母的研究 [J]. 工业微生物, 1993, 23(1): 9-13.