

龟裂链霉菌原生质体的形成和再生

王金发 陆军 武文 蔡敬民 李能树

(安徽大学生物系,合肥)

周渝梅

(淮南第二制药厂,安徽淮南)

微生物原生质体形成、再生和融合技术已广泛用于遗传学研究和工业微生物杂交育种。1978年, Batlz^[5]进行了弗氏链霉菌和灰褐链霉菌的原生质体融合,得到了稳定的重组体;1982年 Thomson等^[10]通过原生质体转化,将载有抗性 & 营养基因的重组 DNA 片段在链霉菌中进行了克隆。近年来,我国在这方面的研究也取得了一些进展^[1,2]。

无论是用链霉菌的原生质体作为克隆基因的受体还是用原生质体融合技术来获得具有优良性状的重组体,都必须制备足够量的纯净的原生质体,并能使其高频再生成细胞。由于微生物种间的生理特性差异很大,因而各不同种链霉菌的原生质体形成及再生的条件也不尽相同。本文对工业生产用土霉素产生菌龟裂链霉菌的菌丝体培养、原生质体形成和再生条件等进行了研究,结果如下。

材料和方 法

(一) 菌种 龟裂链霉菌 (*Streptomyces rimous*), 由淮南第二制药厂提供。

(二) 培养基和高渗溶液

1. 孢子培养基 麸皮 7%, 琼脂 2%。
2. 菌丝体培养基 (PM) PM₁ = S 培养基^[7] + 0.5% 甘氨酸; PM₂ = S + 1% 甘氨酸; PM₃ = S + 2% 甘氨酸; PM₄ = S + 4% 甘氨酸。

3. 平板分离培养基^[3]

4. 再生培养基 (RM) 所有的再生全部

采用 R₃^[10] 培养基。双层法下层为 1.8% 琼脂, 上层为 0.6% 的琼脂糖。再生对照培养基则不加琥珀酸钠和硫酸镁。

5. 高渗溶液 P₃^[10] 用于洗涤悬浮菌丝体及配制溶菌酶, PWP^[10] 用于洗涤悬浮原生质体。

(三) 菌丝体培养 摇瓶培养法参照文献^[7]的方法, 玻璃纸平板培养法参照文献^[4]的方法。

(四) 原生质体的分离和纯化 将摇瓶培养的菌丝体经离心沉淀后, 用 0.35M 的蔗糖溶液洗涤 2—3 次, 再用 P₃ 缓冲液洗涤 1 次, 洗涤后的菌丝体用适量的 P₃ 缓冲液重悬后用于酶解。对于玻璃纸培养的菌丝体, 先用灭菌镊子将玻璃纸轻轻揭起, 放入盛有 10 毫升 P₃ 缓冲液的培养皿中漂洗, 每皿 5 张, 尔后用灭菌吸管将菌丝体悬液移入灭菌空三角瓶中。

根据菌丝体悬液的体积和镜检时菌丝体的形态, 加入新鲜配制并经抽滤除菌的溶菌酶贮备液, 使终浓度为 2—4 毫克/毫升, 放入 37℃ 培养箱中进行酶解。在酶解过程中应间歇摇动以使酶解充分, 并定时取样, 在相差显微镜下进行原生质体的形态观察、计数及拍照。待大部分菌丝体释放出原生质体后, 可用低速离心^[9] 或过滤法^[7] 除去残存的菌丝体, 并用 PWP 缓冲液

Wang Jinfa et al.: Formation and Regeneration
Streptomeces Rimous Protoplasts

本文于 1985 年 9 月 25 日收到。

洗涤离心原生质体 3 次, 以除去溶菌酶。最后用少量 PWP 缓冲液重悬原生质体, 并进行镜检和血球计数。

(五) 原生质体的再生 根据血球计数值, 用 PWP 缓冲液将原生质体稀释至适当浓度, 用双层法或单层法进行再生培养。再生培养基应提前 24 小时浇注平板, 或浇注凝固后于 50℃ 烘干 1 小时后使用。接种量为 0.1 毫升。同时取 1 毫升原生质体悬液加入到 9 毫升灭菌蒸馏水中, 37℃ 处理 5 小时后稀释至适当浓度, 涂布在除去渗透压稳定剂的 R₃ 培养基上作为对照。上述接种平板于 34℃ 培养 2—5 天后用菌落计数器进行计数, 并按下式计算再生率:

$$\text{再生率}(\%) = \frac{A - B}{R} \times 100$$

式中 A 是高渗 R₃ 上长出的菌落数/毫升, B 是水处理后在低渗 R₃ 上长出的菌落数/毫升, R 是原生质体的血球计数值/毫升。

(六) SDS 处理孢子、菌丝体和原生质体

1. 处理孢子 分别取 1 毫升新鲜斜面孢子悬液 (3×10^8 /毫升), 加入到不同浓度的 9 毫升 SDS 溶液中, 37℃ 处理 2—5 小时, 洗涤或不洗涤稀释后涂布于分离培养基平板上, 34℃ 培养 3—7 天后计算菌落数。

2. 处理菌丝体 将玻璃纸培养的菌丝体洗下后, 用 0.1% 的 SDS 溶液 37℃ 处理 5 小时, 直接涂布于分离培养基上, 37℃ 培养 3—7 天后计数。

3. 处理原生质体 同再生中的水对照。以上实验均同时用水作对照。

结果和讨论

(一) 菌丝体的玻璃纸平板培养

玻璃纸平板培养法已用于制备真菌^[4]和卡那链霉菌^[2]的菌丝体, 但培养时间一般都在 20—24 小时。在我们的实验中, 以 10^8 /毫升的孢子浓度接种, 则只需 4—10 小时即可得到幼嫩的菌丝体 (图 1)。时间长了, 则会长成坚硬的菌落, 说明龟裂链霉菌在玻璃纸平板上生长速度相当快。

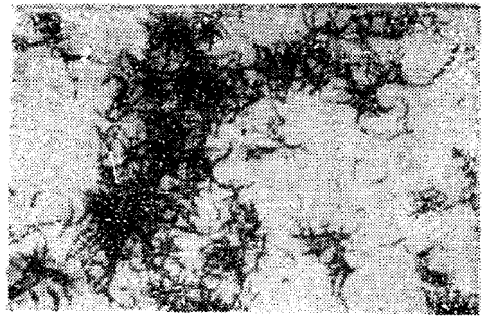


图 1 玻璃纸平板培养的菌丝体 (PM₁, 4 小时)

(二) 甘氨酸对菌丝体生长的影响

据报道^[8], 甘氨酸对一些链霉菌的菌丝体生长具有一定的抑制作用。在我们的实验中, 甘氨酸对龟裂链霉菌同样有抑制作用, 随着甘氨酸浓度的增加, 受抑制的程度加剧, 玻璃纸平板悬滴中出现菌丝的时间推迟。

至于甘氨酸的作用, Hammes 等^[6]认为, 至少在某些细菌中, 甘氨酸取代了细胞壁肽多糖中 D-丙氨酸残基, 因而干扰了交联。龟裂链霉菌在分类上属于革兰氏阳性细菌, 其细胞壁成份主要是肽多糖, 因而推测甘氨酸的作用也可能是在细胞壁合成中替代了 D-丙氨酸, 影响了细胞壁之间的交联和刚性, 从而使菌丝体的生

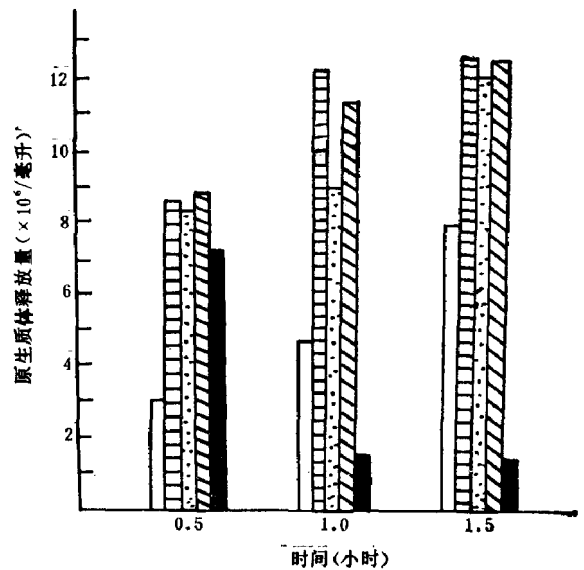


图 2 溶菌酶浓度对原生质体释放的影响

□ 1.8 毫克/毫升溶菌酶; ▨ 2.6 毫克/毫升溶菌酶;
▩ 4.0 毫克/毫升溶菌酶; ▧ 5.6 毫克/毫升溶菌酶;
■ 6.7 毫克/毫升溶菌酶。

长受到影响。

(三) 溶菌酶的量对原生质体释放的影响

Okanishi 等^[7]曾用溶菌酶和裂解酶的混合酶液裂解摇瓶培养的菌丝体 1—2 小时制备原生质体；王洪洲等^[1]单独使用溶菌酶达到同样效果。我们单独使用溶菌酶裂解 PM₁ 玻璃纸平板培养的菌丝体，并比较了溶菌酶的浓度、酶解时间对原生质体释放的影响(图 2)。

图 2 表明，以 2.6 毫克/毫升溶菌酶裂解 1 小时可获得大量原生质体，延长到 1.5 小时，原生质体的产量变化不大。我们将 2.6 毫克/毫升溶菌酶裂解 1 小时的样品经 G₂ 滤斗过滤后得到了纯净的原生质体(图 3)。

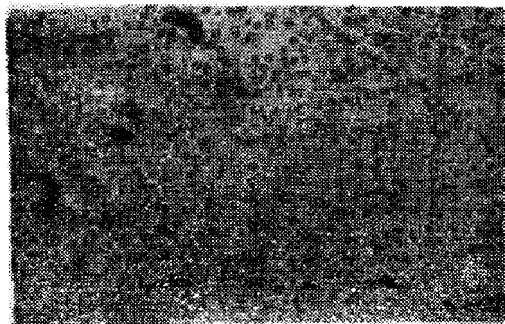


图 3 G₂ 过滤纯化的原生质体 (800×)

(四) 原生质体的再生

对于链霉菌的原生质体再生，通常采用双层法^[9]和单层法^[11]，以双层法为好。在我们的实验中，龟裂链霉菌的原生质体在加或不加上层的再生培养基中都能再生成菌落，而且没有明显的差别；但是渗透压稳定剂琥珀酸钠的浓度对再生率有较大的影响。Shirahama 等^[9]所推荐的浓度是 15%，我们用此浓度再生率只有 0.37%，改用 7.5% 的琥珀酸钠，再生率可达 65%。此外，在原生质体再生时必须注意下层

培养基的表面要干燥，再生培养时温度要低为此，我们均提前 24 小时制备再生平板，培养度降低到 34℃。

(五) SDS 对龟裂链霉菌孢子、菌丝体影响

据报道^[2]，用 0.1% 的 SDS 能完全裂解那链霉菌的原生质膜，而对完整的菌丝细胞有影响，对孢子也没有毒性，这样可以准确计再生率。为了考察这一方法是否也适用于龟裂链霉菌，我们用 0.1% 的 SDS 分别处理龟裂链霉菌的孢子和玻璃纸平板培养的菌丝体，对孢子的杀伤率在 99% 以上，而对菌丝体的伤率高达 100%。若将 SDS 的浓度降低 0.005%，对孢子的杀伤率也在 90% 以上。上述结果表明，SDS 对龟裂链霉菌的孢子和菌体均有很强的毒性，故此不能用 SDS 处理裂链霉菌的原生质体制备物来计算非原生质单位数。

参 考 文 献

- [1] 王洪洲、郑幼霞：1982。遗传学报，9 (3): 17—179。
- [2] 刘颀屏等：1984。微生物学报，24: 156—160。
- [3] 吴振昌：1977。同上，4: 27—28。
- [4] 梁平彦等：1981。植物生理学报，7: 1—10。
- [5] Baltz, R. H.: 1978. *J. Gen. Microbiol.*, 107: 93—
- [6] Hammes, W. et al.: 1973. *J. Bacteriol.*, 116: 102—1053.
- [7] Okanishi, M. et al.: 1974. *J. Gen. Microbiol.*, 389—400.
- [8] Sagara, Y. et al.: 1971. *Jap. J. Microbiol.*, 15: 7—84.
- [9] Shirahama, T. et al.: 1981. *Agric. Biol. Chem.*, 1271—1273.
- [10] Thompspon, C. J. et al.: 1982. *J. Bacteriol.*, 151: 66—677.