

(14) 147-149, 184

灭活原生质体融合技术选育苏云金杆菌新菌种

——原生质体融合条件的研究[†]

陈五岭 张芳琳[✓] 景建洲 孙连魁

TQ453.5

(西北大学生物学系, 710069, 西安, 第一作者 42 岁, 副教授)

摘要 利用双灭活原生质体融合技术获得了苏云金杆菌新菌株。着重对原生质体制备、再生、灭活及融合的实验条件进行了报道。

关键词 苏云金杆菌; 原生质体融合; 灭活

分类号 Q343.15

微生物杀虫剂

苏云金杆菌(简称 Bt)是一种昆虫病原菌,其制剂是目前世界上产量最大的微生物杀虫剂。由于该制剂对人畜无害,不污染环境,难以产生抗药性,且效果不亚于化学农药等优点,近年来得以迅速发展。Bt 作为杀虫剂应用方面主要不足之处是杀虫谱较窄,具有种的特异性。本文的工作是利用原生质体融合技术,使不同杀虫谱的 Bt 变种杂交,选育广谱高效的 Bt 新菌株。

微生物原生质体融合技术已有多年的实际应用,但有关在 Bt 菌种选育上应用的报道还很少,尤其是本文所采用的对 Bt 亲本菌株的原生质体进行双灭活后再融合的途径,尚未见报道。

所谓“双灭活”就是将两种菌株的原生质体用不同的理化手段进行处理,相应地使其某一小部位的生理结构被损伤而失去活性,但决不是彻底杀死。灭活后的原生质体不能再生,而由损伤部位不同的原生质体相结合形成的融合子,因损伤部位互补则可以再生。由于灭活原生质体融合减少了寻找稳定遗传标记的繁琐工作及由此可能带来的亲株优良性状的丢失,而且使融合子的检出变得直观,提高了筛选效率,因此它是杂交育种的一条有效途径^[1]。本文着重报道 Bt 原生质体双灭活后再融合过程中各项实验条件的选择。

1 材料和方法

1.1 菌株

1[#], 2[#] 菌株均为本实验室收藏的生产用菌株。

1.2 培养基及试剂

(1)普通培养基:牛肉膏 1%; 蛋白胨 0.3%; KH₂PO₄ 0.1%; pH7.0~7.2。

(2)高渗缓冲液 SMK(按 100 mL 计):蔗糖 17.1 g; 顺丁烯二酸 2.3 g。

(3)高渗培养基:SMK 代替蒸馏水按普通培养基配制。

(4)向上述培养基配方中加入 2% 或 0.8% 的琼脂,可得固体培养基或上层培养基。

(5)酶液:溶菌酶(华美生物工程公司 20 000 u/mg)用 SMK 液配制,细菌过滤器过滤。

(6)融合剂:PEG(M. W. 6 000), SMK 液配制。

1.3 实验方法

取活化好的 1[#], 2[#] 菌株各 0.2 mL 分别加入 40 mL 高渗培养液中,振荡培养数小时后加入青霉素

[†] 陕西省科委重点攻关项目资助课题

收稿日期:1997-07-09

再培养数小时终止培养,离心收集菌体。用 SMK 缓冲液洗涤两遍后,加入酶液后于 42℃ 水浴保温,不时摇动。根据镜检情况终止水浴,离心洗涤除去酶液获得原生质体。将其浓度调整在 10^7 个/mL 左右。各取 4 mL~5 mL,分别置于 15W 紫外灯下和热水浴中灭活。将灭活后的原生质体等量混合,离心去上清液,加入预热的融合剂 42℃ 保温数分钟后,离心去除融合剂。加入 SMK 溶液,稀释涂布于双层高渗平板中,30℃ 培养 3 d~4 d。

1.4 计算公式

- (1) 原生质体形成率 $P = \frac{\text{经酶处理后形成的原生质体数}}{\text{未经酶处理的总菌落数}} \times 100\%$;
- (2) 原生质体再生率 $R_r = \frac{\text{能再生的原生质体数}}{\text{经酶处理后形成的原生质体数}} \times 100\%$;
- (3) 原生质体灭活率 $D_r = 1 - \frac{\text{灭活后在再生平板上长出的菌落数}}{\text{未灭活原生质体再生出的菌落数}} \times 100\%$;
- (4) 融合频率 $F = \frac{\text{融合平板菌落数} - \text{双亲存活菌落数}}{\text{双亲株原生质体总数}} \times 100\%$ 。

2 实验结果与讨论

2.1 青霉素对原生质体形成率(P)的影响

表 1 青霉素浓度对破壁效果的影响

Tab. 1 The Effect of the Concentration of Penicillin on Removing the Cell Wall

青霉素浓度/ $\mu \cdot \text{mL}^{-1}$	1*/%	2*/%
0	28	30
0.4	46	58
0.8	50	67
1.2	47	65
1.6	42	57
2.0	40	50
2.4	36	48

表 2 青霉素加入时间对破壁效果的影响

Tab. 2 The Effect of the Time of Adding Penicillin on Removing the Cell Wall

加入时间/h ^①	1*/%	2*/%
1	— ^②	—
2	—	—
3	43	56
4	46	63
5	50	67
6	41	59

注:①时间从菌种接入培养基算起;

②因青霉素的抑制,菌体未生长。

由表 1,表 2 的结果可知,青霉素对 Bt 的原生质体形成有明显的促进作用,且加入时间以 5 h 时为好。此时刚刚进入对数期,细胞处于生长繁殖最旺盛的时期,大量细胞壁物质被合成,这时加入青霉素可在对数期后期获得大量的细胞壁有缺陷但仍具活力的细胞,增加了菌体对溶菌酶的敏感性,可获得较高的原生质体形成率。由结果可知,青霉素浓度以 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$,加入时间以 5 h 时为最佳。

2.2 菌龄对原生质体形成率(P)及再生率(R_r)的影响

表 3 菌龄对原生质体形成率(P)及再生率(R_r)的影响

Tab. 3 The Effect of Call Ago on the Formation and Regeneration of Protoplasts

菌 龄	1*(P)%	1*(R_r)%	2*(P)%	2*(R_r)%
对数期前期(6 h)	64	10	75	12
对数期中后期(10 h)	60	13	72	15
稳定期(13 h)	22	2	24	8

表 3 显示 1*, 2* 的对数期菌体比稳定期的易于破壁,这是因为稳定期产生大量芽孢,其胞壁结构要比营养体结实,也较复杂^[2],因此释放原生质体较困难。另外稳定期的原生质体存在着很大比例的非活性个体,因而再生率也很小。我们选择对数期中后期的菌体来制备原生质体,是因为这一时期的原生质体再生率高。

2.3 高渗缓冲液(SMK)浓度对原生质体再生的影响(见表 4)

高渗液浓度在原生质体再生过程中是最主要的条件,它起稳定渗透压的作用。据表 4 以 0.5 mol 的

SMK 效果最佳。

2.4 灭活条件(见表 5)

表 4 SMK 浓度对原生质体再生的影响

Tab. 4 The Effect of the Concentration of SMK on the Regeneration of Protoplasts

SMK 浓度 mol	1 [#] 菌落 数/个	2 [#] 菌落 数/个
0.25	— ^①	—
0.375	198	176
0.45	249	402
0.5	383	550
0.55	204	278

注:①不生长

由于 1[#] 对热敏感,我们采用 1[#] 热灭活,2[#] 紫外灭活。结果表明,热灭活高温短时易达到 100% 全灭活,这样为摆脱遗传标记钳制而进行的融合子筛选提供了可靠性。紫外处理时,不易达到 100% 全灭活,但操作方便,短时致死率高,并可把诱变与杂交结合起来,仍不失为有效的方法。实验结果以 1[#] 100℃ 水浴 8 min 和 2[#] 紫外照射 10 min 为佳。

2.5 融合条件

表 6 融合时间对 F 的影响

Tab. 6 The Effect of the Time of Fusion on Fusion Frequency

融合时间/min	$F/\times 10^{-8}$
5	2.1
10	4.2
15	1.9

表 7 PEG 浓度对 F 的影响

Tab. 7 The Effect of the Concentration of PEG on Fusion Frequency

PEG 浓度/%	$F/\times 10^{-8}$
30	1.8
40	4.7
50	2.9

影响融合频率(F)的因素很多,本文主要研究了融合时间及 PEG 浓度对 F 的影响。由表 6,表 7 可知,融合时间以 10 min,PEG 浓度以 40% 为佳,时间过长或 PEG 浓度过高都将因 PEG 对原生质体的毒性^[3]而使 F 降低。时间过短,原生质体虽融合但不稳定,而 PEG 浓度低则其提供的渗透压也低,不利于融合,因此相应的 F 较低。

关于双灭活原生质体获得活的重组体的机制 Hopwood 及 Wright 等认为是细胞致死损伤经过融合得以互补的结果^[4]。

3 结 论

在 1[#],2[#] 菌株的双灭活原生质体融合过程中,主要实验条件为:在培养至 5 h 时加入 0.8 u/mL 的青霉素;原生质体再生时 SMK 浓度为 0.5 mol;融合时 PEG 浓度为 40%,融合时间为 10 min;灭活条件为 1[#] 100℃ 水浴 8 min,2[#] 紫外照射 10 min。

参 考 文 献

- 1 唐孝宣,肖信发,徐东宁. 微生物原生质体融合技术的进展. 工业微生物,1987(6):23~29
- 2 喻子牛主编. 苏云金杆菌. 北京:科学出版社,1991. 57~76

(下转第 184 页)

- 2 林晖,万庆. 投资环境与投资环境信息系统研究. 城市地理信息系统研究与实践. 上海:上海科学技术出版社,1996. 34~43
- 3 Peng Gong. Urban Geographic Information System: Methods and Applications, the Association of Chinese professionals in Geographic Information Systems(Abroad). California: CPGIS-Berkeley, 1996. 39~46

责任编辑 徐象平

Investment Environment Analysis of Three Main Development Areas in Nanjing City Based on Web GIS

He Haiyao¹⁾ Chen Zhongming²⁾ Qian Yadong²⁾

(1)Department of Urban and Resources Science, Nanjing University, 210093, Nanjing; 2)Nanjing Normal University, Institute of Geoinformatics, Nanjing)

Abstract Based on an analysis of the three main development areas of Nanjing city, the article studies the construction of investment development Web Information System based on client-server technique by using Web GIS System technology, and solves the problem of two-way conveyance of data, thus provides a new way of developing and propagating development areas.

Key words investment environment; web GIS; world-wide-web(WWW); system integration

(上接第 149 页)

- 3 陈五岭,景建洲,井申荣等. 链霉菌种间原生质体融合的研究. 西北大学学报(自然科学版),1995,25(5):517~520
- 4 Hopwood D A, Wright H M. Factors affecting frequency in protoplast fusions of *Streptomyces coelicolor*, J. Gen. Microbiol., 1979, 111:137~143

责任编辑 徐象平

The Application of Inactivated Protoplast Fusion to *Bacillus thuringiensis*

— Studies on Conditions of Protoplast Fusion

Chen Wuling Zhang Fanglin Jing Jianzhou Sun Liankui

(Department of Biology, Northwest University, 710069, Xi'an)

Abstract The inactivated protoplast fusion method was carried out to select new *Bacillus thuringiensis* strains. The experimental conditions of this method including protoplast formation, inactivation, fusion and regeneration are emphatically reported here.

Key words *Bacillus thuringiensis*; protoplast fusion; inactivated