

He-Ne 激光在异种间原生质体融合中的应用*

朱振华 胡欣荣 陈五岭** 陈 亮

(西北大学生命科学学院,西安 710069)

摘 要 用 632.8nm 12mW 的氦氖激光及聚乙二醇(PEG)复合诱导融合枯草芽孢杆菌与黑曲霉原生质体. 为了提高枯草芽孢杆菌的糖化酶产酶能力,对两亲本在融合中采用不同的激光照射时间,选育出的融合子与枯草芽孢杆菌亲本相比,糖化酶酶活提高了 2 倍,并通过酯酶同工酶谱分析对融合子进行了鉴定,结果表明:融合子遗传性状与亲本相比发生了显著变化,通过传代培养,融合子具有良好的遗传稳定性.

关键词 He-Ne 激光;原生质体融合;黑曲霉;枯草芽孢杆菌

中图分类号 Q932

文献标识码 A

文章编号 1004-4213(2007)01-0144-4

0 引言

激光作为一种工具,已为遗传学研究以及诱变育种进行了一些有效的工作. 一定剂量的激光照射生物体,能量被遗传物质及生物分子直接或间接吸收之后,引起分子激发光解离、分离及生物分子的自由基反应等,从而导致 DNA 分子或染色体发生畸变,使生物性状产生突变,这对改良生物品种,提高品质是非常有益的. 目前国内外科学工作者对激光诱变育种的研究也比较多,但在其应用于不同种间原生质融合的研究还较少.

枯草芽孢杆菌的蛋白酶活力高,糖化酶活力较低,但其培养具有安全性好、对设备条件要求低、耗能低、菌体细胞繁殖量高的特点,在生产中已得到广泛的应用. 糖化酶是工业生产中广泛应用的三种酶之一,黑曲霉是糖化酶的高产菌株,但蛋白酶活力较低,其霉菌的性质在许多生产领域中无法使用. 本实验的目的是采用激光和 PEG 复合诱导枯草芽孢杆菌和黑曲霉原生质体融合,选育出蛋白酶和糖化酶活力均高的枯草芽孢杆菌,从而满足生产上快速、低成本的要求. 本文初步研究了激光和 PEG 复合诱导两种原生质体融合的条件,探索了不同种间原生质体融合的可行性,并通过酯酶同工酶谱技术分析,证实了融合子与双亲菌株相比,其遗传物质发生了遗传重组,其产糖化酶能力显著提高.

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

黑曲霉 UV-11(*Aspergillus niger*),枯草芽孢杆菌 MC7 (*Bacillus subtilis*)

二者为出发菌株,均由本实验室提供.

1.2 培养基

完全培养基(YEPD):蛋白胨 2%,酵母膏 1%,葡萄糖 2%,pH 6.0. MC7 培养基:LB (Luria-Bertari)液体培养基^[1]. MC7 高渗培养基:LB 液体培养基用 MC7 高渗液配制. MC7 再生培养基:MC7 高渗培养基加 0.8%琼脂(上层),MC7 高渗培养基加 2%琼脂(下层).

1.3 试剂

黑曲霉高渗稳定液:0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 pH 6.2 加 0.7 mol/L NaCl. MC7 高渗稳定液: SMM 溶液^[2]. PEG(polyethylene glycol) 溶液:在 MC7 高渗稳定液中加入 40%PEG6000,pH 7.0. 溶壁酶:广东省微生物所出品,用黑曲霉高渗稳定液配制 1.5 mg/mL. 溶菌酶:上海奥伯生物工程公司出品,酶活力 >10000 u/mg,用 SMM 高渗液配制 5 mg/mL.

1.4 主要仪器

He-Ne 激光器:腔长 1 m,外腔式准单模激光,波长 632.8 nm,照射时使用功率为 12 mW,光斑直径 1.5 mm.

1.5 方法

1.5.1 原生质体的制备

MC7 原生质体的制备:按文献^[3]进行. 黑曲霉原生质体的制备:按文献^[4]进行.

1.5.2 双亲原生质体的灭活

MC7 原生质体悬液以 15 W 紫外灯垂直距离 20 cm 照射灭活,黑曲霉原生质体于 70℃水浴灭活.

1.5.3 用 PEG 及激光诱导融合双亲株原生质体

取浓度为 10^7 个/mL 的双亲株灭活原生质体悬液各 1 mL,混匀后离心收集(4000 rpm×10 min),弃去上清液,加入 40%PEG6000 溶液 1 mL,50℃保温激光照射一定时间后,取融合液涂布 MC7 再生培养基,以细菌形态检出,30℃培养 5~8 d 后计数再生菌落,计算融合频率.

1.5.4 融合频率的计算

融合率^[5](%) = (融合子数 - 双亲株原生质体存活数) / 双亲株原生质体总数

*陕西省教委基金资助

** Tel:029-88303700 Email:xinxinning@sina.com

收稿日期:2005-10-13

1.5.5 糖化酶活的测定

1.5.5.1 测定方法

从每个不同融合时间再生平板上挑选菌落形态差异较大的各 7 个接种斜面,菌落长成后保存,并转摇瓶测定其糖化酶酶活,测定方法参照^[6]略有改动。

1.5.5.2 标准曲线绘制

标准曲线的制作方法参照文献^[6]。

1.5.5.3 酶活计算方法

糖化酶活力 = $A \times D \times 6 \times 1000 \times 2 \text{ u/g (mL)}$

A:OD 值在标准曲线上对应的酶量,D:酶液稀释倍数,6:反应体积, $\times 2$:换算为每小时的酶活

酶活定义:1 mL 酶液在 50℃,pH4.4 条件下 1 h 分解可溶性淀粉产生 1 mg 葡萄糖,即为一个酶活力单位。

1.5.6 酯酶同工酶谱分析

对糖化酶酶活高的两株菌种采用 10% 浓度分离胶的垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳分析^[7],以岛津薄层色谱扫描仪扫描,与双亲酯酶同工酶谱相比其酶带数、迁移率等特征。

1.5.7 融合子稳定性的测定

将融合株传代十代测定其糖化酶酶活。

2 实验结果

2.1 双亲株原生质体灭活条件的选择

亲株 MC7 原生质体悬液置 15 W 紫外灯下,垂直距离 30 cm,照射 20~60 min,其存活率见表 1,照射 20~40 min 亲株 MC7 原生质体均有不同程度再生,当照射时间到达 60 min 时,原生质体再生率为零。因此,选择紫外灯照射 60 min 对 MC7 原生质体进行灭活。如此长的时间是因为 MC7 为芽孢杆菌,菌悬液中有部分菌已形成芽孢,故在紫外灯下长时间照射才能将形成芽孢的菌杀灭掉。

表 1 亲株 MC7 原生质体灭活条件选择

照射时间/min	0	20	40	60
存活再生率	4.25×10^{-1}	2.14×10^{-4}	1.35×10^{-7}	0

亲株黑曲霉原生质体悬液置 70℃ 水浴里,处理 0~50 min 其存活率见表 2,保温 0~40 min 原生质

体均能再生出菌落,当保温时间到达 50 min 时,原生质体再生率为零。因此,选择 70℃ 水浴保温 50 min 对黑曲霉原生质体进行灭活。

表 2 亲株黑曲霉原生质体灭活条件选择

水浴时间/min	0	10	20	30	40	50
活再生率	3.18×10^{-1}	2.87×10^{-3}	1.68×10^{-5}	1.3×10^{-6}	2×10^{-7}	0

2.2 PEG 及激光诱导原生质体的融合

取浓度为 107 个/mL 双亲灭活原生质体悬液各 1 mL 于若干小试管中,离心收集后加入 40% PEG 溶液 1 mL,分别用激光照射 2、4、6、8、10 min,融合液涂布于再生培养基,30℃ 培养 5~8d 后计数再生菌落数,计算融合频率,见表 3。其中,照射 4 min 时融合频率最高,为 9.16×10^{-5} 。

表 3 PEG 及激光诱导时间对原生质体融合率的影响

照射时间/min	0	2	4	6	8	10
融合率	0	8.39×10^{-6}	9.16×10^{-5}	2.57×10^{-5}	1.37×10^{-5}	6.23×10^{-6}

2.3 融合子与亲本株糖化酶酶活的比较

实验对亲本及融合子的糖化酶酶活进行测定(见表 4),结果表明:随着融合时间的增加,融合子的糖化酶酶活呈先增后减的趋势,当融合时间为

表 4 筛选出的融合子与 MC7 亲本糖化酶酶活比较

菌株号(融合时间/min)	MC7 亲本	7# (2)	11# (4)	12# (4)	20# (6)	28# (8)	33# (10)
糖化酶酶活(u/mL)	124	178	246	239	221	169	142

4 min 时,融合子的糖化酶酶活普遍高于其他融合时间融合子,其中 11# 菌株达到最大值 246 u/mL。这是由于较短时间的激光照射会促进亲本细胞之间的融合,使得融合子的糖化酶酶活有所增加,但随着照射时间的延长,激光对亲本细胞的损伤作用也大大加强,反而降低了亲本细胞的融合率,并使得融合子的糖化酶酶活有所降低^[8]。

2.4 筛选出的融合子与亲本同工酶谱比较

亲本和筛选出的融合株酯酶同工酶谱见图 1。

从融合株与亲本株扫描结果看出,亲本 MC7

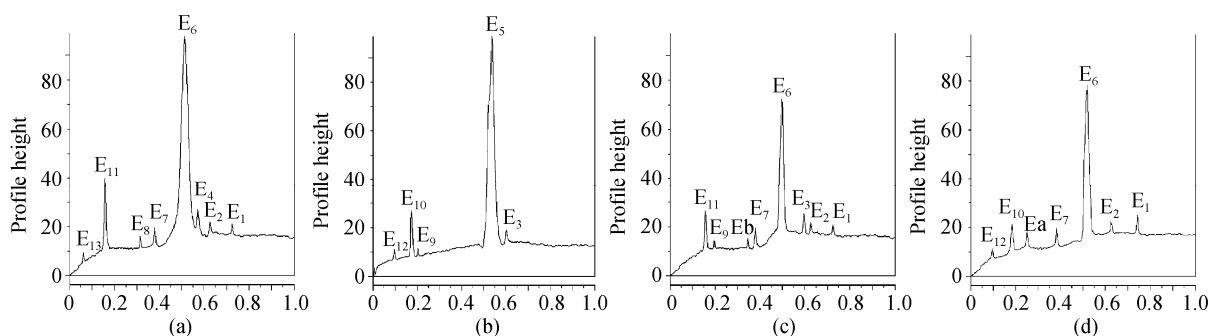


图 1 酯酶同工酶扫描图谱

Fig.1 Esterase isoenzyme scanning pattern

有三条主酶带,即 E_6 、 E_7 和 E_{11} , 它们的迁移率分别为 E_6 (0.553)、 E_7 (0.383)、 E_{11} (0.156), 其中 E_4 染色较深, 活性最高. 亲本黑曲霉也有三条主酶带, 即 E_3 、 E_5 和 E_{10} , 它们的迁移率分别为 E_3 (0.628)、 E_5 (0.542)、 E_{10} (0.171), 其中 E_5 染色较深, 活性最高. 融合株 11 不仅有亲本 MC7 的 E_1 、 E_2 、 E_6 、 E_7 还有亲本黑曲霉的 E_{10} 、 E_{12} 和两亲本都没有的酶带 Ea. 融合株 12 不仅有亲本 MC7 的 E_1 、 E_2 、 E_6 、 E_7 、 E_{11} 还有亲本黑曲霉的 E_3 和 E_9 和两亲本都没有的酶带 Eb. 比较融合子与亲本的图可以看出, 选育出的两株融合子与亲本菌株的酯酶同工酶谱有着明显的差异, 从而可以确定这两株高产菌株是具有两亲本特性的融合子菌株.

2.5 融合子稳定性的测定

通过传代培养, 对融合菌株的遗传稳定性进行了检测. 实验结果表明: 融合菌株经传代培养后, 糖化酶酶活没有显著的变化, 证明具有良好的遗传稳定性见表 5.

表 5 融合子遗传稳定性检测

株号	糖化酶酶活(u/mL)		
	亲本 MC7	11 #	12 #
1	124	246	239
F5	119	243	230
F10	121	242	236

注: 表中数据为三批结果的平均值

3 讨论

从实验结果看来, He-Ne 激光束对灭活原生质融合频率的提高有明显作用, 这是因为激光束照射相邻两个原生质体后, 在细胞膜表面引起可修复性的微损伤, 从而改变细胞膜的通透性, 两个原生质体的遗传物质便可通过此小孔进行混合并重组, 由于细胞连接处小孔的表面曲率很高, 处于高张力状态下的细胞就逐渐由哑铃状变为圆球状, 就形成了融合细胞^[10].

由于细胞融合后融合子的类型多种多样, 而高产菌株选育需要在大量融合菌株中筛选, 因而融合频率的高低就直接影响实验效果. 在本实验条件下, 激光照射 4 min 时原生质体融合频率最高. 其作用机理据推测可能与激光作用细胞质膜产生微孔有关, 照射时间短, 质膜上不能形成结构上的改变而使融合产生; 照射时间延长, 过大的能量密度使质膜产生永久性微孔, 造成细胞内含物外溢而死亡, 从而使融合频率降低^[9].

激光诱导原生质体融合已发展成为较成熟的一

项技术, 但研究较多为种间的融合, 本实验大胆尝试了不同种间原生质体的融合, 两亲本具有较远的亲缘关系, 故易获得更优良的性状, 本实验证实了这一尝试的可行性, 并获得了具有较高糖化酶酶活的枯草芽孢杆菌, 这对其应用于生产领域有较大的意义.

参考文献

- [1] HUANG Qin-ni, LIU Jia, SONG Xiu-zhen, *et al.* Protoplast fusion between escherichia coli and bacillus subtilis[J]. *Journal of Capital Normal University*, 2002, **23**(31): 55-59. 黄勤妮, 刘佳, 宋秀珍, 等. 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的原生质体融合[J]. 首都师范大学学报, 2002, **23**(31): 55-59.
- [2] SHAMSI Y, DAVOUD N I. Effects of Protoplast Fusion on δ -endotoxin Production in Bacillus thuringiensis Spp. (H14). *Iranian Biomedical Journal*, 1996.
- [3] PIERRE S, BRIGITTE C. Fusion of bacterial protoplasts[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **77**(6): 2151-2155.
- [4] GUO Ai-lian, GUO Ting-wei, ZHU Hong-li, *et al.* He-Ne laser treatment of the protoplast from aspergillus niger S_X[J]. *Acta Photonica Sinica*, 1999, **28**(7): 603-606. 郭爱莲, 郭廷巍, 朱宏莉, 等. He-Ne 激光诱变黑曲霉 S_X 的原生质体[J]. 光子学报, 1999, **28**(7): 603-606.
- [5] CHEN Wu-ling, LUO Wen, YAO Shen-li, *et al.* Effects of He-Ne laser on frequency of interspecific protoplast fusions of streptomyces[J]. *Acta Photonica Sinica*, 1998, **27**(5): 412-417. 陈五岭, 罗雯, 姚胜利, 等. 氦氛激光对链霉菌原生质体种间融合频率的影响[J]. 光子学报, 1998, **27**(5): 412-417.
- [6] SUN Shu-qin, SHAO Dong-mei. Colorimetry-a new method for rapidly determination the activity of glucomn ylase[J]. *Journal of the Hebei Academy of Sciences*, 1997, (2): 35-39. 孙淑琴, 邵冬梅. 比色法快速测定糖化酶活力新方法[J]. 河北省科学院学报, 1997, (2): 35-39.
- [7] WU Shao-bo. Plant Physiology Communication, 1979, (1): 30-33. 吴少伯. 植物组织中蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳[J]. 植物生理学通讯, 1979, (1): 30-33.
- [8] XIANG Yang. Study on the mechanism of laser variation and biological effect[J]. *Optronics Lasers*, 1994, **5**(4): 87-90. 向洋. 激光诱变及生物学作用机制研究[J]. 光电子激光, 1994, **5**(4): 87-90.
- [9] CHEN Yun-lin, LIU Xiao-juan, WEN Jian-ping. Research progress in technique of laser inducing microorganism [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2003, **19**(12): 353-357. 陈云琳, 刘晓娟, 闻建平. 激光诱变微生物技术的研究进展[J]. 生物物理学报, 2003, **19**(12): 353-357.
- [10] CHEN Wu-ling, LUO Hai-feng, ZHANG Xiao-li. Analysis of the hereditary stability of the mutants of lentinus edodes mutated by he-ne laser[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2000, **29**(4): 380-384. 陈五岭, 罗海峰, 张小里. He-Ne 激光诱变的香菇变异株遗传稳定性分析[J]. 光子学报, 2000, **29**(4): 380-384.

Application of He-Ne Laser in Heterogeneous Protoplast Fusion

ZHU Zhen-hua, HU Xin-rong, CHEN Wu-ling, CHEN Liang

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

Received date: 2005-10-13

Abstract In order to improve the glucoamylase activity of *Bacillus subtilis*, protoplast fusion between *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* by 632.8 nm 12 mW He-Ne laser and PEG (polyethylene glycol). The parents strains used different irradiation time. The results showed that glucoamylase activity of the fusant was promoted 2. The fusants were identified by analysing isozyme patterns. The genetic character of fusants were of great difference from these parents strains. After culturing from one generation to another the result shows that And fusants have good hereditary stability.

Key words He-Ne laser; Protoplast fusion; *Aspergillus niger*; *Bacillus subtilis*



ZHU Zhen-hua was born in Shaanxi Province in 1982. She received her B. S. degree in July 2003 from College of life science, Northwest University. She is currently studying for the Master's degree at Northwest University, and her major research direction is protoplast fusion.