

棒状杆菌原生质体的形成、再生以及融合的初步探讨

乔宝义 徐浩

(中国科学院微生物研究所,北京)

Corynebacterium 属中的一些种是生产氨基酸的重要菌株。它们对蛋清溶菌酶和其他几种酶均不敏感。作者用 0.4—0.8u/ml 青霉素 G 处理对数期菌体,可明显增加对蛋清溶菌酶的敏感性。继而用 0.5—1.0mg/ml 的蛋清溶菌酶,于 37℃, 12—15 小时保温,渗透压敏感细胞可达 99% 以上。在丁二酸钠高渗完全培养皿上,原生质体再生率可达 20%。*C. pekinense* AS 1.563 与 *C. crenatum* 82 原生质体融合率为 3×10^{-7} 每对原生质体。融合菌株不稳定呈现出不同程度的分离现象。对融合菌株发酵产物——氨基酸进行了纸层析,70% 的融合株同时产生两亲株所产的氨基酸,10% 菌株不产生两亲株所产的氨基酸。通过光学显微镜和电镜技术,观察了原生质体的形成、再生和原生质体聚集现象。

原生质体的形成和再生有益于转化作用、转染作用的遗传学研究,又能既简便又迅速地鉴别质粒的存在及其性质。特别重要的是能增加体细胞的融合率。近来,人工诱导体细胞融合的研究得到很大的重视,为育种工作提供了新方法^[3-6,8]。然而微生物融合的关键步骤是细胞壁的去,形成活的原生质体。不同的细菌细胞壁对蛋清溶菌酶的敏感性是不同的^[3,6-10]。我们以北京棒状杆菌为主要材料详细地探索了原生质体的形成和再生的条件,并初步摸索了融合的可能性。

材料和方 法

(一) 材料

1. 菌种:北京棒状杆菌(*Corynebacterium pekinense* AS 1.563), Hser⁻, 赖氨酸产生菌,其野生株为 AS 1.299。钝齿棒状杆菌(*Corynebacterium crenatum* 82), Ilcu⁻, 缬氨酸产生菌,其野生株为 AS 1.542。

2. 培养基:(1) LB 培养基组分(%):葡萄糖, 0.05; 蛋白胨, 1; 酵母浸汁, 0.3; 牛肉膏, 0.5; MgSO₄·7H₂O, 0.02; (固体培养基加 1.2% 琼脂粉) pH7.0。12 磅 30 分灭菌。(2) 合成固体培养基, 每升加: 葡萄糖 10g; (NH₄)₂SO₄, 3g;

KH₂PO₄ 1g; MgSO₄·7H₂O 0.5g; MnSO₄·4—6H₂O 1mg; FeSO₄·4—6H₂O 1mg; 生物素 50μg; 维生素 B₁, 200μg; pH7.0。8 磅 30 分钟灭菌。按需要,可加氨基酸如异亮氨酸 100μg/ml; 高丝氨酸 100μg/ml (可用蛋氨酸 50μg/ml 和苏氨酸 100μg/ml 代替)或高渗盐类或糖。(3) 合成发酵培养基组分(%):葡萄糖, 10; K₂HPO₄, 0.1; MgSO₄·7H₂O 0.04; Fe²⁺, Mn²⁺, 2ppm; 生物素, 2μg/l; 维生素 B₁, 200μg/l; 尿素, 1.0; pH7.0。8 磅 30 分钟灭菌。按需要,加氨基酸(3ml 发酵液中加入 0.05 ml 1% 量的氨基酸)。(4) 完全培养基:普通牛肉汁培养液加 1.2% 洋菜粉。

3. 有关溶液:(1) DF 稀释液;0.25 M 蔗糖; 0.25 M 丁二酸钠;0.001 M EDTA; 0.02 M K₂HPO₄; 0.11 M KH₂PO₄;0.01 M MgCl₂; pH7.0。灭菌待用。(2) 新生磷酸钙^[13]; KH₂PO₄ 0.54g; CaCl₂·H₂O 29.4g 分别溶于 100ml 水中分别灭菌,用时等体积混合。(3) PEG 溶液; 40% PEG 6000 溶于 DF 稀释液中,灭菌待用。(4) 蛋清溶菌酶液;先将青霉素 G 钾盐(华北制药厂产,40 万单位)配成 4000 u/ml 的母液,无菌过滤,再用无菌水稀释成 80u/ml, 60u/ml, 40u/ml 浓度待用。

本文于 1982 年 1 月 20 日收到。

本文摘要在 1980 年 9 月在北戴河召开的“微生物遗传学和微生物分子遗传学”会议上发表过。82 号菌由唐任天同志提供,照片由初照晰等同志摄制,陈琦同志对本工作给予帮助在此一并致谢。

(二) 方法:

1. 菌体培养: 将菌种从肉汁斜面中接入 10ml 普通肉汁培养液 (或 LB 培养液) 中, 过夜培养, 取 1ml 转接到 100ml 新鲜肉汁培养液中培养 3 小时, 均于 30℃ 摇床培养。随后按所需的最终浓度加入青霉素, 继续培养至所需要的时间。

2. 原生质体的形成: 将青霉素处理过的培养液离心, 弃上清, 用 DF 液洗二次, 加入溶菌酶, 37℃ 保温, 镜检, 测光密度并计数培养。

3. 原生质体形成率和再生率的计算:

(1) 原菌计数, 将青霉素处理后, 溶菌酶处理前的菌体, 经无菌水系列稀释于普通肉汁培养基上培养, 计算原菌数 (A)。

(2) 将溶菌酶处理后的菌体分别经两个过程处理: 1) 用低渗液 (水) 稀释, 在低渗肉汁平皿上培养计数, 生长的菌落数为未形成原生质体的原菌数 (B)。2) 用高渗溶液稀释, 在高渗肉汁平皿上培养, 所长出的菌落数为原生质体再生的菌数和从未形成原生质体的原菌数之和 (C)。不难看出, 原生质体形成率等于 $\frac{A-B}{A} \times 100\%$, 它们的再生率等于 $\frac{C-A}{A-B} \times 100\%$ 。其中 $A-B$ 为原生质体形成数, $C-A$ 为原生质体再生数。

4. 原生质体融合: 当菌体培养到对数期 (82 号菌培养时间比 AS1.563 长 5 小时左右) 时, 在培养液加入最终浓度为 0.6-0.8u/ml 的青霉素, 继续培养 2.5 小时。各取 5ml, 离心, 弃上清, 用 DF 液洗两次, 弃除 DF 液再加入 1mg/ml 浓度的蛋清溶菌酶, 37℃ 保温 15 小时, 离心, 弃上清, 悬浮于含有 5μg/ml, DNA 酶和 5mM EDTA 的 DF 液中, 总体积为 5ml, 各取 3ml 原生质体, 在试管中充分混合 (余下 2ml 分别作对照处理, 同下)。离心, 弃上清, 加含 5 μg/ml DNA 酶的 40% PEG 6000 至 3ml, 轻轻使之悬浮, 随后加入 0.05 体积的新生磷酸钙 (0.15ml)。保温 30 分钟, 离去上部 PEG, 用 DF 液补充到 3ml。调均后取 0.1ml 接种到高渗基础或 (和) 完全平皿上, 30℃ 培养。

5. 氨基酸纸层析: 层析液为正丁醇: 冰醋酸: 水 (4:1:2), 点样量为 5μl, 室温展层。对照标准液为 10% 缬氨酸, 1% 赖氨酸, 发酵 3-4 天, 发酵液过滤或离心, 茚三酮显色, 比较氨基酸

层析谱。

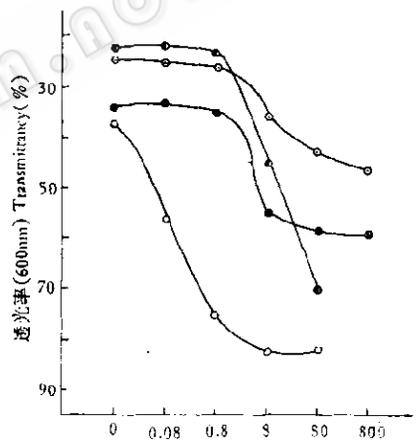
6. 观察方法: 用相差显微镜对原生质体形成和再生进行常规观察。电镜技术通过超薄切片技术观察原生体的超微结构, 样品用高渗戊二醛和高渗锇酸溶液固定后, 采用常规脱水块染、包埋过程, 用 LKB-4800III 型超薄切片机切片, 醋酸双氧铀-柠檬酸铅复染。H500 型透射电镜 75KV 观察。

结 果

(一) 原生质体的形成和再生

1. *C. pekinense* AS1.563 对青霉素 G 的敏感性

在 3 小时培养的菌液中分别加入最终浓度为 0.08、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、8、80、800u/ml 青霉素。不加青霉素组为对照, 2



青霉素浓度 Penicillin (u/ml)

图 1 *C. pekinense* 经不同浓度青霉素处理后对蛋清溶菌酶、蜗牛酶和纤维素酶敏感性的改变

Fig. 1 Variation in the sensitivity of *C. pekinense* cells pre-treated with different concentration of penicillin to egg white-lysozyme, snail-enzyme and cellulase

● 经不同浓度青霉素处理后未经任何酶作用 Without any enzyme treatment ○ 对蛋清酶 (1mg/ml) 敏感性的改变 Treatment with egg white-lysozyme ◐ 对蜗牛酶 (2mg/ml) 敏感性的改变 Treatment with snail-enzyme ◑ 对纤维素酶 (1mg/ml) 敏感性的改变 Treatment with cellulase CK 未经青霉素预处理 Without treatment with penicillin

表 1 不同浓度的青霉素对菌体生长的影响

Table 1 Effect of different concentration of penicillin on the growth

青霉素 Penicillin (u/ml)	0	0.08	0.10	0.20	0.40	0.60	0.80	8.00	80.0	800
菌落 Colony (cell/ml × 10 ⁸)	1.775	1.895	1.907	1.907	1.920	1.660	1.400	0.313	0.253	0.106
吸光度 A ₆₀₀	0.42	0.42	0.41	0.41	0.41	0.41	0.40	0.25	0.25	0.24

小时培养后比较光密度和培养计数变化, 结果见表 1。从表 1 可看到青霉素浓度从 0.08 到 0.8u/ml 对 AS1.563 无抑制作用, 0.8u/ml 浓度开始有抑制趋势, 8.0u/ml 浓度以上抑制作用明显。

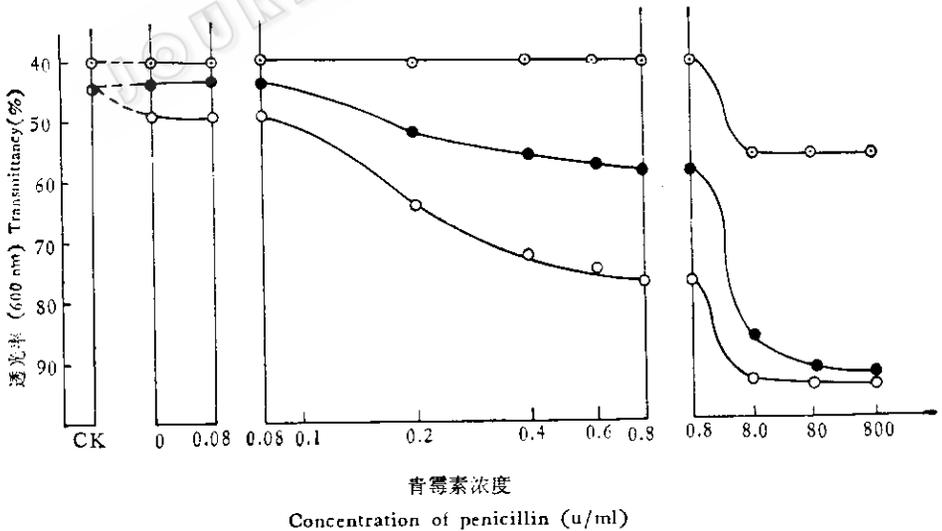
2. *C. pekinense* 经不同浓度青霉素处理对某些酶敏感性

比较了蛋清溶菌酶、蜗牛酶和纤维素酶。其中纤维素酶 (1mg/ml) 无论在任何青霉素浓度作用下, 均无溶菌现象。蜗牛酶, 在 8u/ml 青霉素浓度作用下有明显的溶菌现象, 随着青霉素浓度增加而增加, 而

低于 8u/ml 浓度则无溶菌作用。蛋清溶菌酶, 在不抑制 *C. pekinense* 生长的青霉素浓度作用下该菌对它的敏感性显著提高, 在 0.08—0.8u/ml 青霉素浓度范围内随着浓度的增加敏感性也不断提高; (见图 1, 2) 当青霉素浓度增大到对 *C. pekinense* 有明显抑制的范围内, 其敏感性保持平稳状态。

3. 经不同浓度青霉素处理后 *C. pekinense* 对不同浓度蛋清溶菌酶的敏感性

图 2 表明, 当蛋清溶菌酶浓度由 1mg/ml 降到 0.2 mg/ml 时, 青霉素浓度在 0.2—

图 2 *C. pekinense* 经不同浓度青霉素处理后对不同浓度蛋清溶菌酶的敏感性改变

● 青霉素处理后未经蛋清溶菌酶作用 Without any lysozyme treatment ● 200 μg/ml 蛋清溶菌酶 Treatment with 200 μg/ml of egg white-lysozyme ○ 1 mg/ml 蛋清溶菌酶 Treatment with 1 mg/ml of egg white-lysozyme CK 未经青霉素和溶菌酶作用 Without treatment with penicillin and lysozyme

0.8u/ml 范围内溶菌作用仍存在,也有逐渐提高的趋势,但远不如 1mg/ml 浓度的溶菌能力;在 8.0—800u/ml 浓度范围内接近 1mg/ml 酶浓度的溶菌能力,随着青霉素浓度增加溶菌活性无显著增强。最后选择 0.6—0.8u/ml 为最佳青霉素浓度因为此浓度范围无明显抑制作用,而且明显地增加对蛋清溶菌酶的敏感性。并选定 1mg/ml 为较好蛋清溶菌酶浓度。

4. 青霉素预处理时间对溶菌酶敏感性的影响

在 0.6 和 0.8u/ml 青霉素浓度下,考察了 0.5—3.5 小时之间的预处理时间对增强溶菌酶敏感性的差异。图 3 表明,青霉素浓度为 0.8u/ml 时,1.5—2.0 小时处理效果明显;0.6u/ml 浓度时,3 小时处理效果与前者相当。

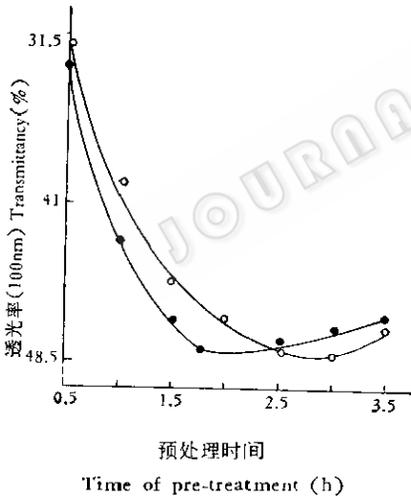


图 3 青霉素预处理时间对溶菌酶敏感性的影响
Fig.3 Effect of penicillin pre-treatment time on the sensitivity of *C. pekinense* cells to egg white-lysozyme
● 0.8u/ml 青霉素 Penicillin
○ 0.6u/ml 青霉素 Penicillin

5. 青霉素浓度对原生质体形成的影响

通过上述试验,初步确定了对溶菌酶敏感性有促进作用的青霉素浓度和作用时

间以及溶菌酶适中浓度,这些条件对原生质体的形成和再生有着密切的关系。图 4 表明,当溶菌酶浓度为 1mg/ml 时,青霉素浓度从 0.08u/ml 开始就有显著的原生质体形成,随着浓度增加形成也越明显,当浓度为 0.6—0.8u/ml 时,原生质体形成率接近 100%。在此应强调,按“方法”所描述的过程求出的原生质体形成率,实际上是渗透压敏感菌形成率,虽然有些菌体受到渗透冲击后表现出渗透压敏感状态,但没有很好地形成原生质体。通过观察也证明了这种现象(图版 I-3, 4a, 5)所以这种方法求出的原生质体形成率比直接观察到的要高。

6. 各种高渗培养基对原生质体再生的影响

高渗物质采用丁二酸钠、蔗糖、氯化钠等分别在完全培养基和基础培养基中考察原生质体的再生。在图 4 中已经看出青霉素浓度与原生质体形成有直接的关系,随着 0.08、0.2、0.4、0.6 和 0.8 浓度间隔增加原生质体形成率也随之增高,分别为 77%、87%、95%、99.8% 和 99.8%。那末从图 5 表现出来的再生率逐渐下降的趋势,可以说是随着原生质体形成率的增加造成

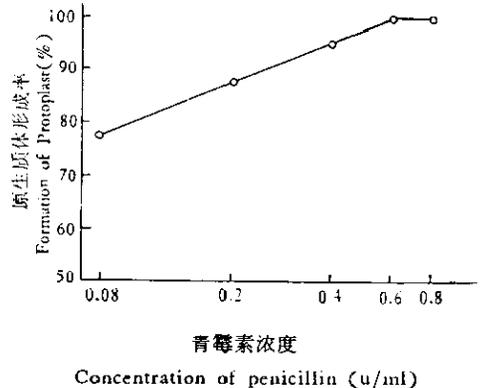


图 4 青霉素预处理浓度对原生质体形成的影响
Fig.4 Effect of different concentration of penicillin pre-treatment on the formation of protoplast

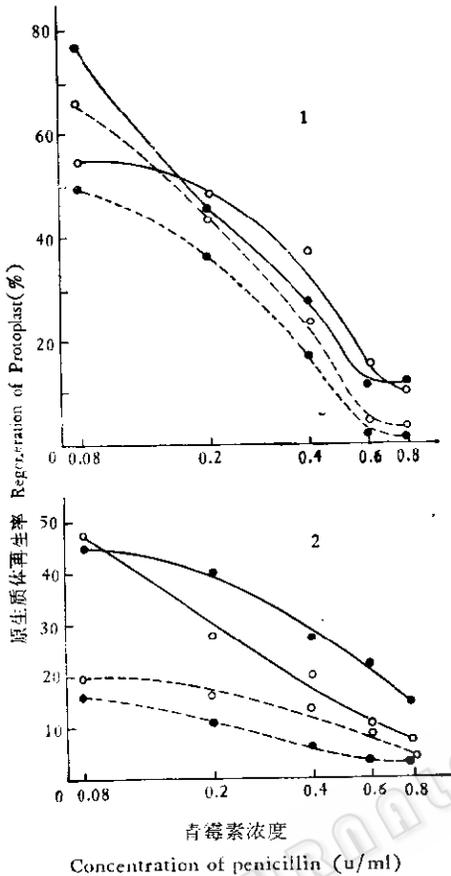


图5 各种高渗培养基、原生质体形成率及青霉素浓度对原生质体再生率的影响

Fig. 5 Effects of different hypertonic media, formation of protoplast as well as pre-treatment penicillin concentration on the regeneration rate of protoplast

- ● 丁二酸钠 Sodium succinate
- ○ 0.25M 丁二酸钠-0.25M 蔗糖 Sodium succinate-0.25M sucrose
- 0.5M 蔗糖 Sucrose
- 0.5M 氯化钠 Sodium chloride
- 1: 基础培养基 Minimal media
- 2: 完全培养基 Complete media

的。但是不能排除青霉素浓度对再生的影响,从图5可看出,0.6和0.8u/ml青霉素浓度所形成的原生质率都接近100%,而0.6u/ml浓度形成的原生质体其再生率要比0.8u/ml浓度的偏高,这说明青霉素浓度对再生有一定的影响。高渗物质对原生质体再生也有明显的影响,其中0.5M丁二酸

钠或0.25M丁二酸钠-0.25M蔗糖构成的高渗培养基,无论是完全培养基还是基础培养基,其再生能力均比蔗糖和氯化钠强。

(二) 原生质体融合

以高渗基础培养基作为选择平板直接选择融合菌株,融合机率为 $3-5 \times 10^{-6}$ 每对原生质体。如果以完全高渗培养基作为再生平板,再以普通选择平板筛选融合株其融合率可达 1×10^{-5} 左右。不管那种方法所得到的融合频率均比亲株回复突变频率高。AS1.563回复突变频率为 2×10^{-8} 以上,82号菌为 1×10^{-8} 以上。所以我们认为棒杆菌类种间通过原生质体融合技术是有可能得到融合株的。下面,对这些融合株的稳定性进行了测定并且对其氨基酸产物进行了层析分析。

1. 融合菌株的稳定性

从四批初发融合菌株中随机选择27株,比较其稳定性。将每一株制成菌悬液分别接入完全培养液和基础培养液中,过夜培养,在完全平板上分离单菌落并复印在基础平板和完全平板上,测定它们的生长情况,结果见表2。

在所选用的27株初发融合株中有几株如1、5、10、12比较稳定,无论是由完全培养液还是由基础培养液得到的单菌落其分离率都相对地低,而大多数菌株分离率都很高。其不稳定原养型的分离子代,分别以不同比例显示出它们亲代所具有的营养缺陷标记。从表2还可看出,不稳定原养型和分离的缺陷型子代组成的菌株,在完全培养基中得到充分的生长,所以表现出比较高的分离率;而在基础培养基中生长受到选择性的限制,只允许原养型菌株生长,所以导致原养型占绝对优势,其分离必定很低。

如果进一步选择,即在完全平板上生长也在基础平板上生长的菌落,再分别于

表 2 从完全培养液和基础培养液分离的单菌落分别复印在基础平板和完全平板上比较它们的生长情况

Table 2 Comparison of number of colonies on complete and minimal plates selected from complete and minimal cultures of 27 primary strains

批 数 Batch	初发菌号 Primary colony No.	完全培养液 Complete liquid		基础培养液 minimal liquid	
		完全平板菌落数 Colonies on complete plate	基础平板菌落数 Colonies on minimal plate	完全平板菌落数 Colonies on complete plate	基础平板菌落数 Colonies on minimal plate
I	1	81	70	83	80
	2	51	6	82	79
	3	60	38	83	79
	4	73	10	83	68
II	5	79	70	83	76
	6	79	19	43	39
	7	76	46	74	72
	8	78	5	73	43
	9	78	36	81	43
III	10	81	70	83	80
	11	51	6	82	79
	12	60	38	83	79
	13	73	10	83	68
	14	79	70	83	76
	15	79	19	43	39
	16	76	46	74	72
	17	78	5	73	43
	18	78	36	81	43
IV	19	85	71	97	97
	20	61	20	93	93
	21	57	10	59	59
	22	67	45	42	41
	23	61	4	56	56
	24	105	4	52	18
	25	60	0	55	51
	26	52	2	68	68
	27	57	0	96	80

Procedure: 27 primary strains, which were selected from 4 batches of fusion plates, were suspended in sterile water then inoculated into LB broth and minimal liquid respectively. After incubation at 30°C for 20 hrs, cultures were diluted and plated onto the surface of LB plate. The grown up isolete colonies were replicated onto LB and minimal plates, then scoring the number of colonies on them.

表 3 从完全和基础培养液中分离的单菌落于完全平板和基础平板上均生长的菌株分别经单菌落分离后再将它们复印在基础平板和完全平板上比较它们的生长菌落数

Table 3 Comparison of number of colonies on complete and minimal plates isolated respectively from the above experiment strains which are originated from a common ancestor and they can be grown on complete and minimal plates

完全培养液 Complete cultural liquid					基础培养液 Minimal cultural liquid																		
初发菌号 Primary colonies No.		3				← 初发菌号 Primary colonies No.		12						13		14		15					
菌株号		1	2	3	4	← 菌株号 Strains No.		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	1	2	3	1	2	
完全平板上的 菌落 Colonies from complete plate	完全平板的 菌落数 Colonies on complete plate	62	81	82	80	完全平板上的 菌落 Colonies from complete plate	完全平板的 菌落数 Colonies on complete plate	57	59	44	54	60	65	30	65	57	22	57	22	15	14	9	
	基础平板上的 菌落数 Colonies on minimal plate	62	81	4	41	基础平板上的 菌落 Colonies from complete plate	基础平板上的 菌落数 Colonies on minimal plate	57	32	40	47	52	63	12	64	0	17	36	19	1	14	1	
基础平板上的 菌落 Colonies from minimal plate	完全平板上的 菌落数 Colonies on complete plate	83	71	76	44	基础平板上的 菌落 Colonies from minimal plate	完全平板上的 菌落数 Colonies on complete plate	79	64	59	54	58	58	76	63	57	52						
	基础平板上的 菌落数 Colonies on minimal plate	83	71	76	44	基础平板上的 菌落 Colonies from minimal plate	基础平板上的 菌落数 Colonies on minimal plate	79	64	59	0	58	58	40	63	0	26						

Procedure: Succeed the above experiment, selecting and isolating colonies from a common ancestor which can be grown on both media, then replicating them onto LB and minimal plates respectively, scoring their number.

完全平板上分离单菌落, 同样把它们分别复印到基础平板和完全平板上, 结果如表 3。

通过以上的传代过程, 其子代的稳定性都大大高于初发融合株。从完全培养液得到的四株中有两株变成稳定株(1, 2)。基础培养液得到的十株中有 1 株变成稳定株(1)。从表 3 明显地看到经过基础培养基的选择性限制, 分离率远远低于完全平板诸菌株的分离率。

2. 融合菌株产酸分析

以合成培养液作为融合菌株发酵培养基, 分别考察 fu fu1 fu2 和 fu3 等批融合菌 100 多株。基础培养液补加苏氨酸和蛋

氨酸作为 AS1.563 的发酵培养基, 补加异亮氨酸作为 82 号菌发酵培养基。发酵过程中还把它们野生株 AS1.299、AS1.542 作参考。

通过发酵和层析分析, 我们选择了 71 株, 发酵产物比较稳定, 层析谱重复性高的融合株进行统计, 其中有 51 株既产赖氨酸又产缬氨酸; 7 株两种酸都不产(或微量缬氨酸); 8 株只产缬氨酸; 3 株只产赖氨酸 1 株产其他氨基酸。图 6 是从 71 株中选出的典型代表株的氨基酸层析谱。为了避免由于基础培养基补加氨基酸可能造成的层析谱改变。我们分别在基础培养基内补加 AS1.563 和 82 菌所需要的氨基酸作为

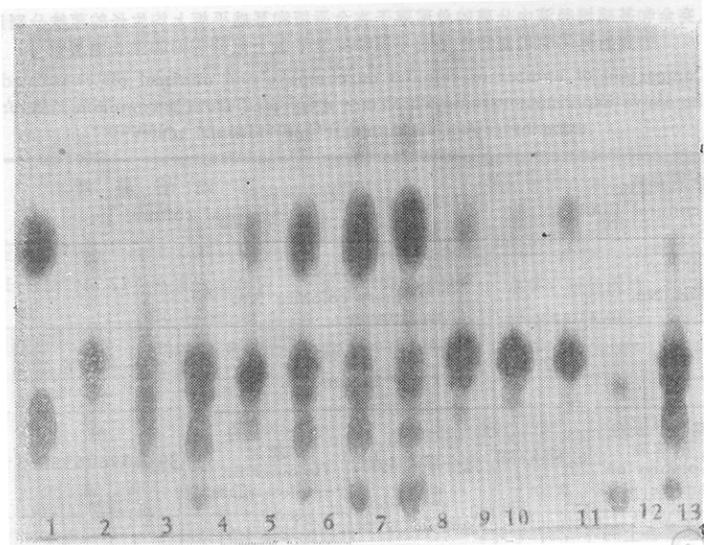


图6 发酵液中氨基酸层析图谱

Fig. 6 Chromatogram of amino acids in fermentation liquid

(1) 标准缬氨酸(上)和赖氨酸(下) (2) AS 1.299 (AS 1.563 的亲株); (3) AS 1.542 (82号菌亲株); (4) AS 1.563 (Hser⁻, 融合菌亲株之一) 产赖氨酸, 与赖氨酸标准样位置相近的层析点; (5) 82号菌 (Ileu⁻, 融合菌另一亲株) 产缬氨酸与缬氨酸标准点位置相同; (6)–(8) 分别为融合株 fu1-3, fu2-2, fu1-9(7) (fu1-9 第七代); 既产缬氨酸又产赖氨酸在 fu1-9(7) 还有与 AS 1.563 一致的脯氨酸点; (9)–(11) 两种酸均不产 (或产微量缬氨酸) 的 fu1-1, fu1-5, fu2-4; (12) fu1-13(7) 具有不同的层析谱; (13) fu2-6 只产赖氨酸。

(1) valine (top) lysine (bottom), (2) AS 1.299 (the parent strain of AS 1.563) (3) AS 1.542 (the parent strain of No. 82) (4) AS 1.563 (Hser⁻, lysine producer, a parent strain for fusion) (5) No. 82 (Ileu⁻, valine producer, a parent strain for fusion) (6)–(8) fusion strains: fu1-3, fu2-2, fu1-9(7) producing both valine and lysine (9)–(11) fusion strains: fu1-1, fu1-5, fu2-4 producing neither valine nor lysine (12) fu1-13(7) (13) fu2-6 producing lysine only

融合株发酵培养基, 比较层析谱的变化。从图7可看出没有任何改变。

(三) 观察结果

AS1.563 和 82 号菌为棒杆状, 多八字形。细胞壁是由电子致密的较薄的外层和较厚的内层以及中间的非电子致密层组成 (图版 I-1a, b 和 2; 图版 II-2a, b)。经 0.6—0.8u/ml 青霉素处理后, 再经溶菌酶作用, 细胞外层薄壁断裂成许多片段; 内层壁内侧结构松散, 有的部位完全溶解呈絮状 (图版 I-7a, b)。在最佳条件下通过培养计算, 渗透压敏感率可达 99% 以上, 但光学显微镜观察只有 70—80% 能形成完整的原生质体 (图版 I-3), 同时可看到有长杆状“菌

体”。经电镜切片证明, 多是细胞壁空壳和将要脱壳的原生质体 (图版 I-4a, b 和 7a)。从图版 I-4a 中可看到原生质球形成的不同程度, 有的完全脱离壁成为游离的原生质体 (图版 I-6); 有的八字形相连的其中一个菌完全脱离, 并连有另一个菌的细胞壁 (图版 I-4b); 有的细胞壁虽然破裂但原生质体尚未挣脱出来 (图版 I-4a 和 7a)。也可看到溶菌过程中不可避免地造成不小比例的原生质体的损伤, 从而推测原生质体再生率低的原因与溶菌过程的损伤有重要关系。不同浓度青霉素处理, 菌体对溶菌酶的敏感通过观察比较是可鉴别的。例如, 0.08u/ml 青霉素处理能稍提高对溶菌酶的

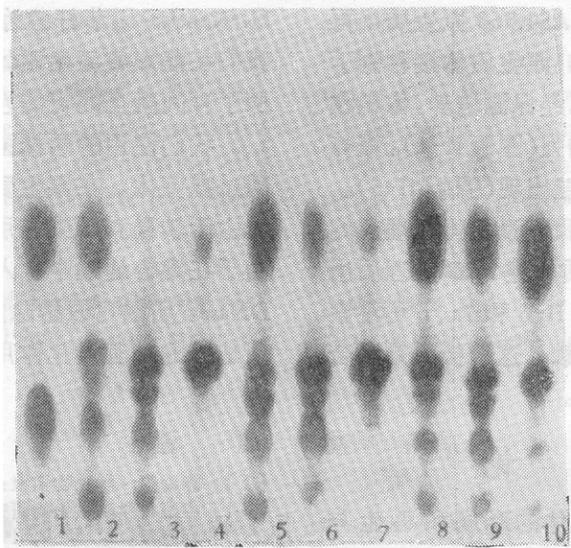


图7 培养基中补加 AS 1.563 所需的氨基酸后发酵液中氨基酸层析图谱

Fig. 7 Chromatogram of amino acid in fermentation liquid after the addition of homoserine

(1) 标准缬氨酸(上)和赖氨酸(下); (2) fu2; (3) AS1.563; (4) fu1-1; (5) fu1-2; (6) fu1-4; (7) fu1-5; (8) fu1-6; (9) fu2-1 (10) fu2-2。其中 fu1-2; fu1-1; fu1-5 和 fu2-1, 与图1层析谱相同
(1) valine (top) lysine (bottom), (2) fu2; (3) AS 1.563; (4) fu1-1; (5) fu1-2; (6) fu1-4
(7) fu1-5; (8) fu1-6; (9) fu2-1; (10) fu2-2. chromatogram of fu1-2, fu1-1, fu1-5 same as the above chromatogram (see Fig. 6)

敏感性,从图版 I-5 看出,细胞有一定程度

0.08 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 8 80 800 0

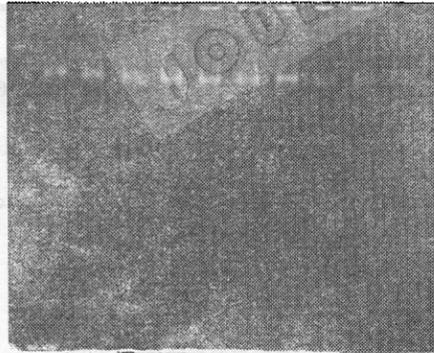


图8 原生质体琼脂糖凝胶电泳

Fig.8 Agarose-electropherogram of protoplast of *C. pekinense*

0 到 800 分别指青霉素浓度 (u/ml), 于溶菌酶高渗液保温处理后加入 SDS, 依次上样, 上样量为 20 μ l, 胶浓度 1%。通过不同浓度青霉素对核酸释放的影响这一事实, 从而间接地证明了青霉素对蛋清溶菌酶敏感性的改变是有直接关系的。

The figures (0-800) indicate the concentration of penicillin (u/ml); the quantity of nuclear acid released showing the effect of penicillin concentration on the formation of protoplast.

的变形, 但壁没有明显的溶解从而说明细胞壁的坚固性降低, 对渗透压冲击变得敏感。图版 II-3 是经渗透冲击技术制作的电镜照片, 细胞壁破裂, 细胞质溢出, 细胞膜与壁分离, 核酸物质释放(箭头指处)。这种渗透冲击敏感现象的存在, 随着青霉素的浓度不同是有差异的。这可通过原生质体所释放的核酸物质的琼脂糖凝胶电泳得到证明, 从图 8 很明显地看出, 随着青霉素浓度的增高(由 0.08 到 0.8u/ml), 核酸释放量也随着增加; 8u/ml 青霉素浓度, 核酸释放量开始有减少的趋势; 80—800u/ml 核酸量极低; 不经青霉素处理只经溶菌酶作用核酸释放量也极低, 即使在上样槽中也未看到菌体释放核酸的迹象, 同样在 0.08、0.1、0.2u/ml 浓度也如此。这结果与形态观察和求得的原生质体形成率是一致的。

图版 II-1 是 82 号菌原生质体的照片, 在 0.6u/ml 青霉素条件下对溶菌酶表现敏

感。图版 II-4 和 5 是 AS1.563 原生质体再生的光学显微镜照片, 原生质体接种到丁二酸钠洋菜培养基后, 经保温培养, 体积收缩, 原生质反差明显增强(图版 II-4)。培养 48 小时后有明显细胞壁出现(图版 II-5)。

在融合观察中, 我们没有得到理想的镜头, 只观察到原生质体经 PEG 处理后出现的聚集现象。图版 II-6 和 7a、b 可观察到原生质体之间的接触。这种接触是融合过程中很关键的一步。

讨 论

1. 82 号菌原生质体的形成和再生与 AS1.563 基本相似。但稍有不同, (1) 菌体培养时间比 AS1.563 长 5 小时; (2) 溶菌酶 0.5mg/ml 浓度即可形成原生质体。

2. 棒状杆菌和它们相似的属没有遗传传递系统, 我国台湾省微生物学者王西华等^[1]曾采用一些手段迫使它们产生接合作用以期得到重组体, 但未成功, 无论有纤毛的还是没有纤毛的菌种均如此。我们所使用的两个菌种中已知 AS1.563 有纤毛^[1], 经“强迫性”试验, 同样未出现接合作用, 甚至它们之间的供养现象也未曾出现。所以人们为这类菌寻找新的遗传手段以达到获得基因重组体颇感兴趣。王西华的试验室目前正在进行棒杆菌原生质体的融合工作,

H. Kaneko 以节杆菌为材料已取得结果^[3]。我们在能形成原生质体的有利条件下, 试探了种间融合的可能性。

我们使用的两株菌在试验过程中未出现过噬菌体, 在原生质体形成后, 不会出现由于转导和转染作用造成的重组。又由于在融合处理中加入了 5 μ g/ml 浓度的 DNase, 所以可以排除原生质体释放 DNA 所造成的相互转化作用。

参 考 文 献

- [1] 陈琦等: 微生物学报, 13(1): 1—6, 1973.
- [2] 中国科学院微生物研究所, 杭州味精厂: 微生物通报, 1: 5—9, 1974.
- [3] Kaneko, H. and K. Sakauchi: *Agric. Biol. Chem.*, 45(5): 1009—1013, 1979.
- [4] Schaeffer, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(6): 2151—2155, 1976.
- [5] Fodor, K. and L. Alföldi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(6): 2147—2150, 1976.
- [6] Hopwood, D. A. et al.: *Nature*, 268: 171—174, 1978.
- [7] Cross, D. C. et al.: *Journal of general Microbiology*, 115(5): 479—490, 1979.
- [8] Coetzee, J. N. et al.: *Journal of general Microbiology*, 114: 313—322, 1979.
- [9] Chassy, B. M.: *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 68(2): 603, 1976.
- [10] Fodor, K. et al.: *J. Bacteriol.*, 135(1): 68—70, 1978.
- [11] Wang H. H. et al.: *Chinese J. Microbiology*, 12(1): 70—80, 1979.

THE FORMATION, REGENERATION AND FUSION OF CORYNEBACTERIUM PROTOPLASTS

Qiao Baoyi Xu Hao

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Some strains of *Corynebacterium* sp. as the potent amino acid producers are of industrial importance. Their cell walls are insensitive to egg-white lysozyme and other lytic

enzymes. Cells obtained from the mid-exponential growth phase cultures treated with 0.4—0.8 u/ml of penicillin G for 2—3.5 hours gave no growth inhibition. But their

sensitivity to egg-white lysozyme was promoted. When cultivating the cells with 0.5—1.0 mg/ml egg-white lysozyme at 37°C for 12—15 hours, the yield of osmotic sensitive cell was about 99%. The regeneration efficiency showed that the complete hypertonic medium containing 0.5 M sodium succinate and minimal medium containing 0.25 M sodium succinate-0.25 M sucrose gave the best yield of about 15—20%. Under a specified

conditions, i. e. 0.6—0.8 u/ml of penicillin G for 2 hours, 1mg/ml of egg-white lysozyme at 37°C for 15 hours, fusion was carried out according to Fodor and Alföldi's method modified by the authors. Frequency of fusion is 3×10^{-6} per protoplast pair. Amino acids in the fermentation liquids of fusion strains were analyzed. Formation and regeneration of protoplasts and their aggregation were studied by optical and electron microscopy.

图 版 说 明

图版 I

1a. 北京棒状杆菌 AS 1.563 菌体(15,000×); 1b. 1a 的局部放大, 可观察到细胞壁的层次(60,000×); 2. AS1.563 菌体 (1,500×); 3. AS 1.563 原生质体 (1,500×); 4a. 经 0.8u/ml 青霉素处理后, 原生质体形成的各种程度(7,000×); 4b. 4a 局部放大, “八”字形排列的两个菌体中一个完全形成原生质体与另一细胞壁空壳相连(27,000×); 5. 经 0.08u/ml 青霉素预处理, 未形成原生质体但细胞膨胀呈椭圆形(7,000×); 6. 完整的原生质体, 双膜包围(55,000×); 7a. 释放过程中的原生质体 (36,000×); 7b. 7a 局部放大, 细胞壁外层断成碎片, 内层松散, 壁呈模糊状态(箭头) (72,000×)。

注: 除 2 和 3 为相差显微镜照片外其他均为超薄切片电镜照片。

1a. whole cells of *Corynebacterium pekinense* AS 1.563; 1b. an enlarge part of 1a of 1a; 2. whole cells of AS 1.563; 3. protoplasts of AS 1.563; 4a. protoplasts of AS 1.563 showing chaotic appearances caused by 0.8 u/ml of penicillin treatment; 4b. an enlarge part of 4a showing regular “V” form. One of them forming protoplast and connecting with “ghost” from other; 5. showing cells swelling and turning to ellipse forms but do not form protoplasts after 0.08u/ml penicillin treatment; 6. whole protoplast enclosed by membrane; 7a. release proceeding for protoplasts of AS 1.563; 7b. an enlarge part of 7a showing its outer layer of cell wall fragmentation, inner layer of cell wall appearing blur partially.

Note: 1, 4, 5, 6 and 7 electron micrographs of thin section; 2 and 3 phase-contrast micrographs

图版 II

1. 82号菌原生质体(15,000×) 2a. 82号菌切片(10,000×) 2b. 2a 的局部放大可见细胞壁(CW)和细胞膜层次; 菌体附着有 PEG (55,000×) 3. AS1.563 经低浓度青霉素处理, 溶菌酶作用未形成原生质体但细胞壁已对渗透冲击敏感, 细胞壁破裂, 细胞膜(CM)崩溃, 细胞质和核酸被释放(箭头指处, 12,000×) 4. 原生质体接种到再生培养基上, 原生质体缩小, 反差增强(1,500×) 5. 原生质体再生出细胞壁(1,500×) 6. 原生质体经 PEG 诱导出现聚集现象(18,000×) 7a. 多个原生质体经 PEG 诱导聚集在一起(15000×) 7b. 7a 局部放大, 原生质膜之间有接触, 原生质体包围有 PEG(48,000×)

注: 4 和 5 为相差显微镜照片, 除 3 是金属投影制备外, 其他均为超薄切片电镜照片。

1. protoplasts of *C. crenatum* No. 82; 2a. whole cell of No. 82; 2b. an enlarge part of 2a showing its cell wall (CW) and cell membrane (CM); 3. after low concentration of penicillin (0.08u/ml) treatment cells of AS 1.563 turning sensitive to osmotic shock, cell wall and membrane broken, protoplasm and nucleic acid released; 4. after protoplasts cultured on regeneration media, which volume decreased and refraction of light increased; 5. protoplasts regenerated cell walls; 6—7. protoplasts aggregated by PEG.

Note 1, 2, 3, 6 and 7 electron micrographs of thin sections, except 3 which is prepared by metal-shadowed method; 4 and 5 are phase-contrast micrographs.