

蛋白酶产生菌种间原生质体融合的研究

诸葛健 周立平 王萍 汤斌

(无锡轻工业学院, 无锡)

Bacillus 属中的一些种是生产蛋白酶的重要菌株。采用 2500u/ml 溶菌酶制备的两种芽孢杆菌原生质体在 30% 聚乙二醇 (MW6000) 的作用下,成功地获得了枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和地衣状芽孢杆菌 (*Bacillus lichensformis*) 的种间融合重组子。融合频率为 7.47×10^{-4} — 2.26×10^{-3} 。经过四代的移接验证,融合子的稳定率达到 12—20%。结果表明,两种产蛋白酶的芽孢杆菌融合后,营养缺陷和抗药特性方面可以互补;菌落形态发生某些变化;生产性能有较大的改进。

关键词 融合;地衣状芽孢杆菌;枯草芽孢杆菌;蛋白酶

自 Schaeffer 等^[1]和 Fodor 等^[2]相继发表有关细菌原生质体融合成功的报道以来,有关这方面的研究工作已广泛地开展^[3-7]。但成功的研究多为种内试验菌株间的融合。从工业微生物育种的角度考虑,希望亲缘关系较远的实用菌株间能够融合,从而可选育良种。为此我们将生产上用的两株芽孢杆菌,通过种间原生质体融合来探索生产用菌的育种方法。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌株: 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis* AS 1.398) 是我院发酵厂提供的中性蛋白酶生产菌种,地衣状芽孢杆菌 (*B. lichensformis* AS 1.807) 是无锡酶制剂厂提供的碱性蛋白酶生产菌种,两株都是野生型,对利福平和链霉素敏感。

2. 培养基: (1) 完全培养基(CM)组成(%): 蛋白胨 1, 牛肉膏 6, 葡萄糖 0.5, NaCl 0.5, pH 7.0—7.2。配制固体培养基时加琼脂 1.5%, 1 kg/cm² 灭菌 20 分钟。(2) 基本培养基(MM)组成(%): 葡萄糖 0.5, K₂HPO₄ 1.4, KH₂PO₄ 0.6, 柠檬酸三钠 0.1, (NH₄)₂SO₄ 0.2, MgSO₄ · 7H₂O 0.02, pH 7.0—7.2, 琼脂粉 1.5, 0.7 kg/cm² 灭菌 20 分钟。(3) 高渗培养基: 在固体 CM 和 MM 中添加 0.5M 蔗糖或 0.3M NaCl 和 20mM MgCl₂ · 6H₂O。

6H₂O。

3. 制备原生质体或原生质体稀液用缓冲液: SMM 缓冲液: 0.5M 顺丁烯二酸 20mM MgCl₂ · 6H₂O, 用 NaOH 调到 pH6.7, 0.7 kg/cm² 灭菌 20 分钟。NSM 缓冲液: 0.55M NaCl, 0.2M 琥珀酸钠, 20mM MgCl₂ · 6H₂O pH6.7, 0.7kg/cm² 灭菌 20 分钟。

(二) 方法

1. 直接亲本标记的获得: 按李明凤等^[4]方法,采用紫外线为诱变剂进行诱变,筛选营养缺陷型和抗药性菌株,并经十代以上传代验证,将稳定的突变株作为融合的直接亲本。

2. 原生质体的制备: 将二亲本株分别接入完全培养基中,32℃摇瓶培养 20 小时。离心收集菌体,悬浮于 0.55M NaCl 溶液中。经 4000 转/分离心 15 分钟,洗涤 2—3 次后,弃去上清液,将菌体悬浮于 SMM (或 NSM) 缓冲液中,并使菌液比原始的浓缩约 5 倍。加入 SMM (或 NSM) 液配制的溶菌酶(上海市禽类蛋品公司禽蛋工厂 1979 年产品,10,000 u/mg),置恒温水浴内溶解细胞壁,定时取样镜检并用计数板计数。至杆状菌体基本形成球形的原生质体后,以 4000—6000 转/分离心两次,每次 15 分钟,搅匀原生质体液。另

本文于 1982 年 1 月 28 日收到。

本院胡金莲,王金芬,江苏省微生物研究所杜姝莲,刘佳同志参加部分技术工作。电镜照片由本院实验室吴亢同志拍摄,在此一并致谢。

吸取一定量此液于无菌蒸馏水中,使原生质体膨胀,然后以无菌蒸馏水适当稀释涂布于 CM 平板,32℃ 培养 20 小时,计数,即得未溶解的细胞数。

3. 原生质体的再生: 取一定量的上述原生质体液至 0.55M NaCl 溶液中,适当稀释后涂布于高渗 CM 平板,32℃ 培养 24 小时,即得细胞壁未溶解而形成菌落的数目和由原生质体再生的菌落数目。

4. 原生质体的融合和融合子的检出: 取等量的两亲株的原生质体,加 SMM 溶液混匀,4000 转/分离心 25 分钟,轻轻倾去上清液,加入 SMM 或 (NSM) 液配成的 30% 聚乙二醇, (MW 6000) 2—4ml,在 40℃ 下搅匀,保温 2—3 分钟,加 SMM 或 (NSM) 液稀释 10 倍,离心去上清液。加 SMM 或 (NSM) 液为原液量的 3—10 倍,吸取适量 (0.1—0.25ml/皿) 至高渗 MM 平板和加有两种抗生素 (链霉素 200u/ml 和利福平 10u/ml) 的高

渗 CM 平板上,涂布。32℃ 培养 20—36 小时后,观察计数,作为初步融合子。另各取单一亲株及混和后不加聚乙二醇的原生质体液分别作对照试验。

5. 融合子的继代培养和验证: 将获得的种间融合子在加有链霉素和利福平的平板上连续传代,在 MM 上检出具有两种抗生素抗性的原养型融合重组子。

6. 原生质体,原生质体再生和融合率的计算: 按江行娟等^[3]方法进行。

结果和讨论

(一) 直接亲本

经诱变处理得到的直接亲本 AS 1.398-28-6 和 AS 1.807-9-9 标记的验证结果列于表 1, 回复突变率均小于 10^{-9} 。

表 1 直接亲本在鉴别培养基上的生长¹⁾

Table 1 Growth of the parental strains on selective media

培养基 Medium	MM	MM +	MM +	MM +	MM +	MM +	MM +	CM	CM +	CM +	CM +
菌株 ²⁾ Strain		Thr	Ade	Thr +	Arg	Leu	Arg +		Str ³⁾	Rif	Str +
AS 1.398-28-6	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
AS 1.807-9-9	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-

1) +: 生长 Growth; -: 不长 Without growth

2) AS 1.398-28-6 为 AS 1.398 的突变株; AS 1.807-9-9 为 AS 1.807 的突变株
AS 1.398-28-6 is a mutant of strain AS 1.398; AS 1.807-9-9 is a mutant of AS 1.807.

3) Str: 链霉素 Streptomycin (200u/ml)
Rif: 利福平 Rifampicin (10u/ml)

(二) 影响溶菌酶溶解细胞壁的几个因素

比较了温度、pH 及菌体培养时间对原生质体形成的影响

1. 温度: 在 25—40℃ 间原生质体形成时间随温度的上升而缩短。考虑到对溶解程度的控制, 避免原生质体高温引致的损伤, 试验中细胞壁溶解的温度一般为 35℃ (图 1)。

2. pH: 当溶菌酶浓度为 1800u/ml, 温度为 30℃, 菌体培养为 20 小时时, pH 在 5.8 至 7.7 范围对细胞壁的溶解速度无明显影响。

3. 菌体培养时间: 实验中观察到细胞生长处于对数后期, 即摇瓶培养 16—20 小时, 细胞壁较易被溶解。考虑到对数后期的细胞大小较均匀, 未产生芽孢, 所以试验中一般均取该生长期的细胞作为原生质体

制备的材料。

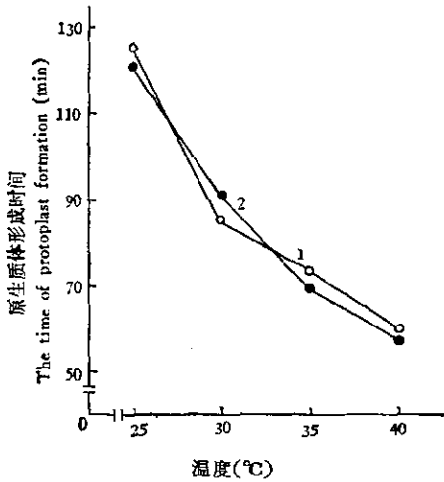


图1 温度对溶菌酶溶解细胞壁的影响

Fig. 1 Effect of temperature on protoplast formation by lysozyme

1. AS 1.398-28-6; 2. AS 1.807-9-9

(三) 不同缓冲液和高渗稳定剂对原生质体再生的影响

采用蔗糖和氯化钠作为高渗稳定剂, 分别在 CM 和 MM 中观察原生质体的再生。同时也观察了 SMM 和 NSM 两种缓冲液作为配制酶液和原生质体稀释液时对原

表 2 不同缓冲液和高渗稳定剂对原生质体再生率的影响

Table 2 Effect of different buffers and hypertonic stabilizers on the protoplast regeneration

配制酶液的缓冲液 Buffer for lysozyme	高渗稳定剂 Hypertonic stabilizer	再生率 Regeneration (%)
NSM	0.5M 蔗糖 Sucrose	15.8
	0.3M NaCl	4.99
SMM	0.5M 蔗糖 Sucrose	2.08
	0.3M NaCl	1.66

生质体再生的影响。表 2 是 AS1.398-28-6 的实验结果。由表 2 看出采用不同的高渗稳定剂和缓冲液对原生质体的再生是有影响的。蔗糖是一种较好的高渗稳定剂。NSM 和 SMM 缓冲液对原生质体的再生影响不同, 有的文献报道采用 SMM 缓冲液^{13,5,61}, 我们的结果认为 NSM 好一些。

(四) 融合结果

融合实验结果列于表 3。种间原生质体融合率达 7.47×10^{-4} — 2.28×10^{-5} 。其

表 3 种间原生质体融合

Table 3 Fusion between interspecific protoplasts

亲株 Parent strains	原生质体形成率 Protoplast formation (%)	再生率 Regeneration (%)	融合率 Fusion (%)	平均融合子数/皿 Fusants/plate		检出融合子数 Total number of fusants
				Hypertonic MM	Hypertonic CM	
AS 1.398-28-6 × AS 1.807-12*	99.99	3.33	7.47×10^{-4}	93	5	624
AS 1.398-28-6 × AS 1.807-9-9	99.96	3.30	2.28×10^{-5}	100	4	1190

* Thr⁻ Str^r Rif^r

中达到营养互补的融合重组较抗性互补的多, 几乎达 20:1。由此可见各种性状的重组机率是不相等的。表中所列原生质体形成率和再生率与目前其它报道的结果无明显

的差别。

(五) 初步的融合物继代培养分离情况的分析

从选择培养基上得到的初步融合产

物, 进行连续四代移植验证结果见表 4。

表 4 融合产物的分离和筛选

Table 4 The segregation and selection of fusants

亲 株 Parent strains	检出融合子数 Total number of fusants	双抗原原型融合子数 Number of drugresistant of prototrophic fusant	稳定的融合子 Stable fusant (%)
AS 1.398-28-6 AS 1.807-12	624	76	12.18
AS 1.398-28-6 AS 1.807	1190	226	18.99

鉴于原生质融合情况较为复杂, 虽然在融合产物选择培养基上已排除同源融合产物, 但仍存在因交叉互养或转化而形成原养型菌落的可能。在进行两亲株互养试验中, 排除了这一可能性。而在两亲株的原生质体不加聚乙二醇的融合试验中, 其融合频率低于加聚乙二醇的 100 倍以上, 从而可间接证实因转化而产生原养型的可能性是极小的。由此说明融合结果中占 81—88% 的初步融合子中不稳定的是属于异核体, 它们会逐步分离成缺陷型亲株类型。余下的 12—19% 在四代移植后是稳定的。

(六) 亲株和融合子形态和生产性状的比较

图 2 表示 300 株种间融合子的中性蛋白酶产量的测定结果。若以 AS1.398 的中性蛋白酶的正常生产水平为 100%, 则融合子的产酶水平变动在 10—130% 之间。正变的菌株量不大, 但提高幅度达 30%, 这是非常可观的, 实验结果说明, 获得的高产融合子是具有生产潜力的。

从形态上观察, 细胞形态的变化不明显(图 3—5) AS 1.398-28-6 细胞较短(图 3), AS 1.807-9-9 细胞较长(图 4), 融合子细胞大小居中(图 5)。但将它们 MM+1% 干酪素培养基上同时点种培养, 形成的菌落(图 6)形态差异甚大。AS 1.398-28-6

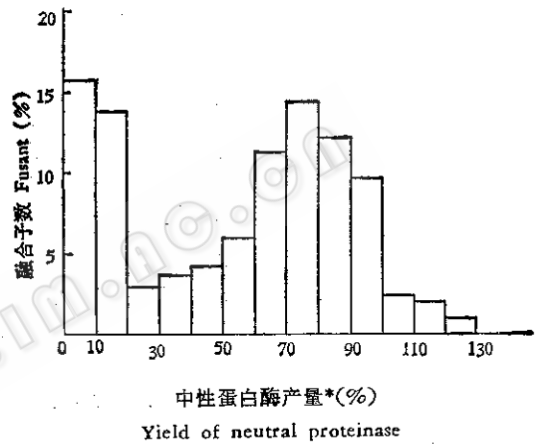


图 2 融合子中性蛋白酶产量的变化及相应菌数
Fig. 2 The yield of neutral proteinase of fusants and the number of responding fusants
* AS 1.398 的中性蛋白酶生产水平为 100%
The yield of neutral proteinase of AS 1.398 is calculated as 100%

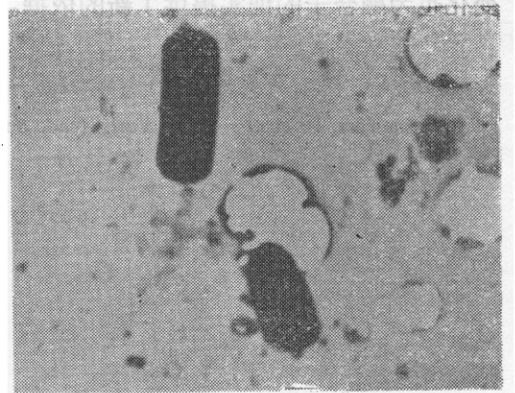


图 3 AS 1.398-28-6 的细胞形态
Fig. 3 Cell morphology of the strain 1.398-28-6
($\times 10,000$)

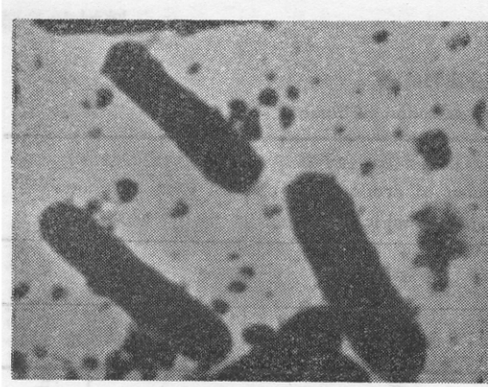


图4 AS 1.807-9-9 的细胞形态

Fig. 4 Cell Morphology of the strain AS 1.807-9-9
($\times 10,000$)

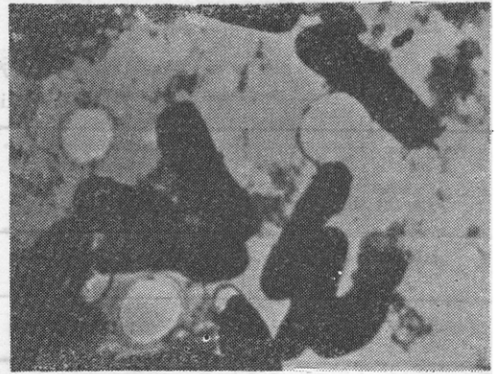


图5 融合子的细胞形态

Fig. 5 Morphology of the fusants
($\times 10,000$)

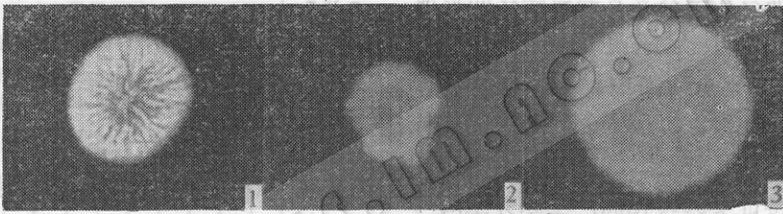


图6 菌落形态

Fig. 6 Colony morphology of three strains

1. AS 1.398-28-6; 2. AS 1.807-9-9; 3. fusant

菌落有很多深皱折，色泽较白；AS 1.807-9-9 菌落皱折少而色呈奶黄，周围不规则，生长较迟缓；融合子菌落大而平坦，色泽灰白，生长较快。因此除营养需要和抗性方面获得互补外，形态上的差异，生产性能的变化也为融合子的证实提供了新的依据。

参 考 文 献

[1] Schaeffer, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, **73**: 2151—2155, 1976.

[2] Fodor, K. & L. Alföldi: *ibid.*, **73**: 2147—2150, 1976.

[3] Hopwood, D. A.: *Genetic of Industrial Microorganisms*, ed. by Sebek, O. K. & A. I. Laskin, London Academic Press, 1978, pp. 1—9.

[4] Kaniko, H. & Sakaguchi: *Agri. Biol. Chem.*, **43**: 1007—1013, 1979.

[5] 江行娟等: *遗传学报*, **8**: 1—7, 1981年。

[6] 李明凤等: *遗传学报*, **8**: 109—115, 1981年。

STUDY ON INTERSPECIFIC PROTOPLAST FUSION BETWEEN *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS LICHENIFORMIS*

Zhu Gejian Zhou Lipin Wang Ping Tang Bin

(Wuxi College of Light Industry, Wuxi)

Interspecific fusants between *Bacillus subtilis* AS 1.398-28-6 and *Bacillus licheniformis* AS 1.807-9-9 have been obtained. The strain AS 1.398 produces neutral proteinase and the strain AS 1.807 produces alkaline proteinase. It is better to prepare the protoplast by using lysozyme 2500 u/ml, pH 6.7—7.0 in SMM or NSM at 35°C. The rates of protoplast formation and protoplast regeneration were 99.9% and 1—4%, respectively. The fusion was carried out in SMM or NSM containing 30% polyethene glycol (MW 6000), and the fusion frequency is

about 7.47×10^{-4} — 2.28×10^{-4} .

These fusants were allowed to grow for 4 generations on selective medium in order to examine their stability and 12—20% of them were stable. The morphology of cells and colonies were different from their parents ones. The production level of some fusants was 30% higher than that of the parent strain.

Key words

Fusion; *Bacillus licheniformis*; *B. subtilis*; Proteinase