

卡那霉菌原生质体的分离和再生*

刘颐屏** 袁朝辉 陈相富 张之平

(华东师范大学生物系遗传教研室, 上海)

本文报道了卡那霉菌原生质体的分离和再生的条件。实验证明用玻璃纸平板培养法, 培养卡那霉菌菌丝体可以代替常规的摇瓶培养法, 而且操作简单, 培养时间短。在培养菌丝体的琼脂培养基中加入甘氨酸后, 对菌丝体的生长具有抑制作用, 而这种菌丝体对溶菌酶的敏感性与不加甘氨酸培养基中长成的菌丝体对溶菌酶的敏感性基本相同。单独使用溶菌酶就可以分离原生质体, 不用再加裂解酶。用蒸馏水处理原生质体, 不能裂解原生质膜; 0.1% 的 SDS 能完全裂解原生质膜, 而且能保留完整的菌丝细胞, 从而可以准确计算出原生质体悬浮液中残存菌丝细胞数。原生质体的再生和生长, 受再生培养基成份的影响, 非高渗性的卡那霉菌产孢子培养基, 可用作再生培养基, 且能得到较高的再生频率, 同时再生菌落的生长也较旺盛。原生质体在再生过程中, 和分生孢子一样首先萌发芽管, 未发现有如 Okanishi 所述的扩张现象。卡那霉菌原生质体的再生能力在 4℃ 冰箱中能保存 24 小时。

关键词 卡那霉菌; 原生质体

链霉菌原生质体的分离和再生的研究已有不少报道^[1-4], 目前原生质体及原生质体融合技术已经广泛作为研究各种微生物遗传育种的材料和方法^[5-11], 但操作比较复杂和费时, 尤其是分离原生质体和原生质体再生的两个过程, 这就限制了这一新技术在工业微生物育种领域内的推广应用。为了简化上述两个过程, 我们对分离原生质体用的菌丝体的培养条件和方式作了改进, 使操作简便, 时间缩短; 对影响原生质体再生的培养基成份作了比较, 并对原生质体的形成和萌发进行了相差观察。

材料与方 法

(一) 菌种

工业生产卡那霉素用的卡那霉菌 (*Streptomyces kanamyceticus*) 由无锡第一制药厂和靖江葡萄酒厂提供。

(二) 培养基

1. 菌丝体培养基 (PM): 用来培养分离原生质体用的培养基。由于培养方式采用玻璃纸平板培

养, 因此全部菌丝体培养基皆为琼脂培养基。

PM1 组成 (%): 葡萄糖 1.2, 牛肉膏 0.4, 蛋白胨 0.3, NaCl 0.5, 琼脂 2.8, pH7.2; PM2 = PM1 加甘氨酸 1%; PM3 = PM1 加甘氨酸 2%; PM4 = PM1 加甘氨酸 4%。

2. 再生培养基 (RM): 为供原生质体再生成菌落的琼脂培养基。RM_i (即修改后的 R₁M^[12]) 组成 (g): 蔗糖 103, 葡萄糖 10, K₂SO₄ 0.25, MgCl₂·6H₂O 10.12, 水解酪素 0.1, 琼脂 30, 定容至 800 ml。

每 80ml 上述溶液中, 加入经分别灭菌的微量元素溶液 0.2ml [微量元素溶液: KH₂PO₄ (0.5%) 1ml, CaCl₂·2H₂O (3.68%) 8.02ml, TES 缓冲液 10ml, NaOH (1N) 0.5ml]

RM_i = RM_i 加牛肉膏 0.4%, 蛋白胨 0.3%。

RM_i = RM_i 加灭菌过的 L-脯氨酸 (20%) 1.5ml (即 R₁M^[13])。

RM_i = PM_i。

本文于 1982 年 8 月 23 日收到。

* 本试验承无锡第一制药厂和靖江葡萄酒厂提供实验菌种; 本校原生动物研究室顾福康同志协助拍摄部份相差显微照片, 特此一并致谢。

** 现在地址: 上海第三制药厂抗菌素研究所。

(三) 高渗溶液

用来离心洗涤原生质体悬浮液或配制酶溶液,其配制同 RM₁,但不加琼脂。

(四) 溶菌酶

上海市禽蛋公司禽蛋二厂出品,酶活力10000 ± 2000 单位。用高渗溶液配制成 2mg/ml 酶溶液,用蔡氏漏斗过滤除菌。

(五) 菌丝体的培养

先将菌丝体培养基(各种 PM)浇注成平板,每只培养皿(内径 9cm)约加 10ml,待凝固后,贴上面积与培养皿相仿的、经过灭菌的玻璃纸(贴时尽量避免玻璃纸与平板表面之间产生气泡)。用 1 ml 无菌吸管吸取卡那霉菌单孢子悬浮液(用新长好的斜面孢子制备,孢子浓度约为 10⁷/ml),点种于玻璃纸上,每张玻璃纸上约点 40—50 处,总接种量约 0.1—0.15 ml,点种后把培养皿正面朝上放入培养箱中,29℃ 培养 20 小时。

(六) 原生质体的分离

将培养 20 小时的培养皿从培养箱中取出后,首先检查玻璃纸表面有无杂菌污染,然后用无菌镊子揭起长好菌丝体的玻璃纸,放入(菌丝体朝下)盛有高渗溶液(5—10ml)的培养皿中,轻轻飘洗玻璃纸,使菌丝体充分洗落在高渗溶液中,每个培养皿可洗玻璃纸1—5张,然后加入溶菌酶溶液,使酶的最终浓度达到 1mg/ml。每皿最终的溶液总体积不超过 16 ml,最后放入 30℃ 培养箱中酶解细胞壁,酶解过程中,随时轻摇培养皿,使酶解作用充分。1 小时后取出培养皿,先将酶解液用脱脂棉过滤,除去酶解液中的残余菌丝体,将滤液移入离心管,用高渗液离心洗涤,去上清液三次(每次离心 20 分钟,2000 转/分),以洗净溶菌酶,终止酶解作用,最后加适量高渗溶液使之成为纯原生质体悬浮液。

在酶解过程中,为了观察原生质体从菌丝细胞释放过程,定时取样,用相差显微镜观察及照相。纯原生质体悬浮液的浓度用血球计数板计数。

(七) 原生质体的再生

先根据原生质体悬浮液的镜检浓度,然后用高渗溶液将原液稀释至 10⁻³ 和 10⁻⁴,分别接种于上述各种再生培养基中,每只培养皿的接种量为 0.2 ml,用玻璃三角推棒轻轻涂布。正面朝上

并水平地放在培养箱中,29℃ 培养一星期,取出计算生长菌落数。

(八) 原生质膜的裂解

为了准确计算纯原生质体悬浮液中原生质体数和残存菌丝数,以便准确计算原生质体再生频率,分别用蒸馏水和 SDS 水溶液处理原生质体,裂解原生质膜。先将纯原生质体悬浮液 1ml 加到 9ml 蒸馏水中,同时又将纯原生质体悬浮液 1ml 加到 9ml SDS 水溶液中,使 SDS 的最终浓度达到 0.1%。两者同时放入 30℃ 培养箱中保温 5 小时后,分别涂布于再生培养基上,29℃ 培养一星期,取出计算生长的菌落数。

观察时间和计数方法:原生质体在再生培养基上再生过程中,长出的菌落数随培养时间的延长而增加。因此规定培养后第 3、5 和 7 天观察菌落数量和菌落生长并记录一次。

$$\text{再生频率}(\%) = \frac{\text{纯原生质体再生菌落数/ml}}{\text{镜检原生质体数/ml}} \times 100$$

(纯原生质体再生菌落数

$$= \text{原生质膜裂解前再生菌落数/ml} \\ - \text{原生质膜裂解后再生菌落数/ml})$$

(九) 原生质体再生观察

先在 RM 培养基表面贴上 1cm² 的小块玻璃纸若干片,再用适当浓度的原生质体悬浮液点种在小玻璃纸上,放入 29℃ 培养箱中培养,在不同时间取出小玻璃纸,用 4% 甲醛溶液固定、制片,相差显微镜观察。

原生质体保存时间试验:将原生质体悬浮液放入 4℃ 冰箱中,在 0、12 和 24 小时三次取样接种于再生培养基上,在 29℃ 培养箱内培养一星期后,取出计算生长菌落数。

结果与讨论

(一) 卡那霉菌菌丝体的玻璃纸平板培养

采用玻璃纸平板培养法,只需一次接种,培养时间仅为 20 小时,长成的菌丝体不需离心洗涤,立即可以用酶裂解。

(二) 甘氨酸对卡那霉菌菌丝体生长的影响

甘氨酸对不少链霉菌种的菌丝体生长具有一定的抑制作用^[3],对卡那霉菌也是这样。在培养卡那霉菌菌丝体的培养基中加入甘氨酸后,随着甘氨酸浓度的提高,菌丝体生长受抑制的程度也提高(图版 I-1)。甘氨酸对菌丝的形态也有影响,在不加甘氨酸的培养基中,菌丝细而长,在加甘氨酸的培养基中,菌丝短而粗(图版 I-2,3)。Okanishi 等^[4]认为甘氨酸能提高菌丝细胞壁对溶菌酶的敏感性。但是我们的卡那霉菌实验结果表明,在加或不加甘氨酸培养基上长成的菌丝体,对溶菌酶的反应(包括释放原生质体的起始时间和释放量)基本上是相同的。

(三) 卡那霉菌原生质体的形成

在原生质体的形成过程中,Okanishi 等^[4]用溶菌酶和裂解酶共同作用来裂解细胞壁。Hopwood 等^[5]发现单独使用溶菌酶也能起到同样的效果。我们在实验中发现,单独使用溶菌酶来裂解卡那霉菌的菌丝体效果非常好,一般只需 30—40 分钟,最多不超过 1 小时,原生质体就释放完毕。这样迅速形成原生质体的反应,可能与采用玻璃纸平板培养的菌丝体有关。用相差显微镜观察卡那霉菌菌丝体在溶菌酶作用下释放原生质体的过程,发现菌丝细胞内原生质体先是收缩成厚膜孢子状,形成质壁分离(图版 I-4),然后在裂解的菌丝尖端或侧面逐渐释放出原生质体(图版 I-5),当原生质体释放量逐渐增加时,菌丝逐渐消失(图版 I-6、7),最终所得原生质体悬浮液中残存着少数菌丝断片(图版 I-8)。

(四) 卡那霉菌原生质膜的裂解

纯原生质体悬浮液虽经脱脂棉过滤,但并不能完全除去残存的少数菌丝断片。这些菌丝断片基本上都是具有生活力的完整细胞,它们能影响原生质体再生频率的计算,在某些放线菌中,菌丝断片所形成的

菌落能抑制周围原生质体再生成菌落^[6],在原生质体融合过程中,不同的菌丝断片可通过接合的方式进行重组,再生成菌落,从而影响融合频率。因此,要准确计算原生质体的再生频率,必须对原生质体悬浮液进行裂解处理,使原生质体破裂,而留下菌丝断片,然后才能在原生质体的再生过程中,计算出再生培养基上原生质体和非原生质体分别形成的菌落数。我们用常规渗透压试验用的蒸馏水和 0.1% SDS 分别处理卡那霉菌原生质体,结果发现,蒸馏水未能把原生质体裂解,处理后的原生质体的再生频率与用高渗溶液稀释的相仿,而 0.1% SDS 却把全部原生质体都裂解了,从而测得原生质体悬浮液中的残存菌丝量为 0.06%。用 0.1% SDS 处理分生孢子发现它对分生孢子没有毒性,从而证明了 SDS 造成原生质体的消失是由于裂解作用的结果,并非毒性所引起的抑制作用。

(五) 再生培养基成份对再生频率和再生菌落生长的影响

一般实验结果表明,再生培养基成份不仅影响再生频率,而且还影响菌落的生长,但是我们的实验结果表明,再生培养基成份对卡那霉菌再生频率影响不显著,而对再生菌落生长的影响则较明显。表 1 所示,来自两种菌丝体培养基的原生质体在五种不同的再生培养基上的再生频率。从表中可以看出,产生原生质体用的菌丝体的培养基成份,对再生频率有一定影响。Baltz (1978)^[7]报道新霉菌 (*S. fradiae*) 原生质体再生成菌落,一般需 3—4 天。我们发现卡那霉菌原生质体形成菌落所需的时间较短,在 RM₂、RM₄ 和 RM₅ 三种培养基上只需 2 天就可肉眼见到。在 RM₁ 和 RM₃ 上则需 3 天。同时再生培养基成份对菌落大小和菌落表面孢子多少也有影响,上述 RM₂ 上长成的菌落最大,RM₁ 最小;RM₄ 上

菌落长孢子最多, RM₄ 上菌落不长孢子。我们的实验结果还表明, 卡那霉菌原生质体在非高渗的完全培养基 (即 RM₄) 上, 再生效果很好, 从而可以看出卡那霉菌原生质体在常渗透压中是不易裂解的。因此, 用蒸馏水代替高渗溶液来分离和再生卡那霉菌原生质体可能是与高渗溶液具有同样的效果。

表 1 培养基成份与原生质体再生频率的关系
Table 1 Relationship between medium composition and regeneration frequencies

再生频率 Regeneration frequencies (%)	菌丝体培养基 Mycelial media	PM1	PM2
再生培养基 Regeneration media			
	RM1	4.62	3.40
	RM2	4.12	3.19
	RM3	4.12	3.55
	RM4	4.86	3.82
	RM5	3.98	3.46

表 2 原生质体的保存时间与再生频率
Table 2 Preservation of protoplasts and regeneration frequencies

保存时间 Preservation time (h)	0	12	24
再生频率 Regeneration frequencies (%)	4.12	3.71	3.54

(六) 原生质体再生的观察

Okanishi 等 (1974)^[4]曾报道灰色链霉菌 (*S. griseus*) 的原生质体在再生培养基上再生的过程, 先形成一个直径约 40 μm 的膨大体, 然后再在其周围长出菌丝。我们对卡那霉菌原生质体的再生过程用相差显微镜作了连续观察, 发现原生质体先由

一个暗黑色的均匀球状体逐渐变成透明, 同时在明亮的球状体周围形成一道黑色轮廓线, 即细胞壁, 然后在细胞壁上产生芽状突起, 以后的演化与分生孢子的发芽生长一样, 没有见到原生质体的膨大现象。

(七) 原生质体的保存时间

原生质体的保存时间随菌种和保存条件而异。真菌的原生质体可以保存两天^[12], 放线菌中的小小链霉菌 (*S. parvulus*) 和抗生链霉菌 (*S. antibioticus*) 保存 12 小时后, 再生能力损失达 98—99%^[9]。在我们的实验中, 保存于 4℃ 冰箱中的卡那霉菌原生质体再生能力的降低有一个时间过程, 如表 2 所示, 0—24 小时内影响不显著, 48 小时以后绝大部分丧失了再生能力。

参 考 文 献

[1] Douglas, R. J. et al: *J. Microbiol.*, 4: 551—554, 1958.
[2] Bradley, S. G.: *J. Bacteriol.*, 77: 115—116, 1959.
[3] Sagara, Y. et al: *J. Microbiol.*, 15: 73—84, 1971.
[4] Okanishi, M. et al: *J. Gen. Microbiol.*, 80: 389—400, 1974.
[5] Hopwood, D. A. et al: *Nature (London)*, 268: 171—174, 1977.
[6] Hopwood, D. A. and H. M. Wright: *Mol. Gen. Genet.*, 162: 307—317, 1978.
[7] Baltz, R. H.: *J. Gen. Microbiol.*, 107: 93—102, 1978.
[8] Godfrey, O. et al: *J. Microbiol.*, 24: 994—997, 1978.
[9] Ochi, K. et al: *J. Bacteriol.*, 139: 984—992, 1979.
[10] Hopwood, D. A. and H. M. Wright: *J. Gen. Microbiol.*, 111: 137—143, 1979.
[11] Peberdy, J. F.: *Enzyme. Microb. Technol.*, 2: 23—29, 1980.
[12] Peberdy, J. E.: *Rev. Microbiol.*, 33: 21—39, 1979.

ISOLATION AND REGENERATION OF *STREPTOMYCES KANAMYCETICUS* PROTOPLASTS

Liu Yiping* Yuan Chaozhai Chen Xiangfu Zhang Zhiping

(Teaching and Research Section of Genetics, Department of Biology,
East China Normal University, Shanghai)

Cultural conditions for isolating protoplasts of *Streptomyces kanamyceticus* were studied. Cellophane plate culture method in Producing mycelia of *S. kanamyceticus* for isolating protoplasts was found to be easy to operate and save time, it might be used to instead of conventional shaking flask culture method. Mycelia growth in the PM with glycine were somewhat inhibited, it was not much more sensitive to lysozyme than mycelia from the medium without glycine. In lysing cell wall lysozyme was very effective and no more lytic enzymes were needed. Distilled water was useless for osmotic shock of *S. kanamyceticus* protoplasts, but 0.1% S. D. S. was highly effective in lysing the membrane of protoplasts and remaining the integrated cells or residual mycelial fragments, therefore the correct frequency of non-proto-

plast forming unit could be calculated. Both regeneration and growth rates of *S. kanamyceticus* protoplasts were influenced by the composition of regenerating medium. Non-hypertonic complete medium used as conventional conidial formation was discovered as the most suitable medium for regeneration and growth. During germination of *S. kanamyceticus* protoplasts no enlargement phenomenon as described by Okanishi was observed, but as same as conidial germination. The protoplast suspension could keep its normal viability within 24 hours at 4°C.

Key words

Streptomyces kanamyceticus; protoplast

*Present address: Institute of Antibiotics Research, The Third Pharmaceutical Plant, Shanghai

图 版 说 明

1. 甘氨酸对菌丝生长的影响
 - a. PM1 培养基上生长的菌丝 b. PM2 培养基上生长的菌丝 c. PM3 培养基上生长的菌丝
 - d. PM4 培养基上生长的菌丝
2. 生长于 PM1 培养基上的菌丝(没有甘氨酸)
3. 生长于 PM2 培养基上的菌丝(有甘氨酸)
4. 菌丝体中原生质体的收缩 5. 菌丝顶端开始释放原生质体
6. 原生质体释放中期尚可见到有完整菌丝 7. 原生质体释放后期,菌丝体基本消失
8. 原生质体及个别菌丝残片(800×)
1. Effects of glycine on mycelial growth on cellophane plats
 - a. Growth of mycelia on PM1 b. Growth of mycelia on PM2
 - c. Growth of mycelia on PM3 d. Growth of mycelia on PM 4
2. Growth of mycelia on PM 1 (without glycine)
3. Growth of mycelia on PM2 (with glycine)
4. Concetration of proplast in mycelium
5. Releasing of protoplasts from mycelial tips
6. In the middle stage of lysis many intergrated mycelia were remained
7. At the end of lysis almost all mycelia have been digested.
8. Protoplasts including residual mycelial fragments