

三角酵母原生质体的形成、再生和融合

李维泉* 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

三角酵母由于其胞内酶 D-氨基酸氧化酶活力较高, 具有一定的应用价值。关于这种酶的开发和利用国内外均有报道^[1-4]。本文报告利用原生质体融合法来进行三角酵母菌种选育, 以期获得 D-氨基酸氧化酶活力较高的菌株。

材料和方法

(一) 菌株

三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*) 野生原养型菌株系瑞典 Lund 大学生物化学中心 P. Brodelius 博士赠送。经 NTG 和 LiCl 复合诱变获得营养缺陷标记的菌株 TV₁₀₁(Met⁻)、TV₁₀₂(Met⁻V_{B6}⁻) 和 TV₁₀₃(His⁻)。

(二) 培养基

1. 完全培养基 (YEPD): 参照文献[5]。pH 5.8。

2. 基本培养基 (MM): 参照文献[6]。用 3% (NH₄)₂SO₄ 代替甲硫氨酸作氮源, 加 2% 琼脂, pH5.8。

3. 完全高渗透压培养基: 蔗糖高渗透压培养基 (YEPDS) 为 YEPD 加 0.6mol/L 蔗糖。YEPDM 为加 1.0mol/L 甘露醇。YEPDO 为加 0.8mol/L 山梨醇。YEPDK 为加 0.6mol/L KCl。pH 均为 5.8。

4. 融合子选择培养基 (RFM): 上层培养基: 基本培养基 (MM) 加 0.6mol/L 蔗糖、0.2% 酵母 RNA、2.5% 琼脂。下层培养基: 基本培养基加 1.5% 琼脂。pH5.8。

5. 原生质体渗透压稳定化缓冲溶液: 蔗糖 0.6mol/L 或 1.0mol/L 甘露醇加 2% MgSO₄·7H₂O 和 0.05mol/L Tris·HCl 缓冲溶液, pH7.0。

上述培养基经 0.8kg/cm² 灭菌 20 分钟。蜗牛酶液和融合诱导剂 (PEG + CaCl₂) 配制后, 经 0.45μm 细菌滤膜过滤除菌。

(三) 原生质体的制备和再生

1. 三角酵母原生质体的制备: 按 Svoboda 等方法进行^[7]。

2. 三角酵母原生质体再生: 按 Ota(1972)方法操作^[8]。

(四) 原生质体融合

按 Ferenczy^[9] 和 Evans^[10] 方法进行。

结果和讨论

(一) 三角酵母原生质体形成和再生

1. 细胞菌龄对原生质体形成量和再生率的影响(图 1): 在酶浓度 1%, 温度 30℃, 酶解 1 小时, 细胞处于对数生长期 24 小时较易形成原生质体。32 小时的细胞, 其再生率最高为 8.2%。随菌龄增大, 原生质体形成量和再生率都呈下降趋势。

2. 巯基乙醇浓度对三角酵母原生质体形成量和再生率的影响 (图 2): 在三角酵母的原生质体形成过程中, 巯基乙醇浓度从 0—0.4% 的范围内, 随着巯基乙醇浓度增加, 三角酵母原生质体形成量增多, 但再生率却随浓度的增加而降低。

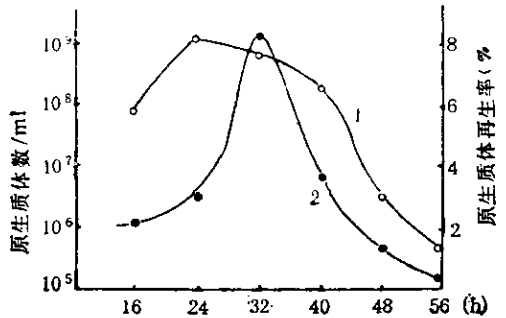


图 1 菌株培养时间对原生质体形成和再生率的影响
1. 原生质体形成量 2. 原生质体再生率

3. 酶浓度及其作用时间对原生质体形成量和再生率的影响: 随着酶浓度和酶解时间的增加均能提高原生质体形成量。但当酶浓度大到一定程度, 原生质体的再生率就下降。同样, 酶解时间过

本文于 1990 年 1 月 10 日收到。

* 现在通讯处: 云南省微生物研究所, 昆明。

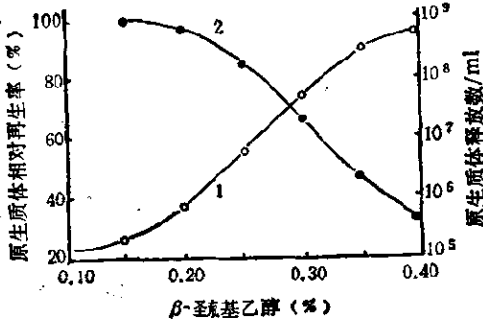


图2 巯基乙醇浓度对原生质体形成量和再生率的影响

1.原生质体形成量 2.原生质体相对再生率

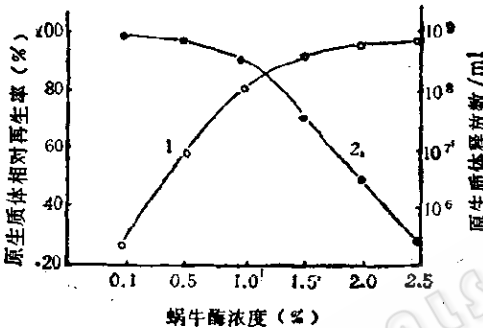


图3 蜗牛酶浓度对原生质体形成量和再生率的影响

1.原生质体形成量 2.原生质体再生率

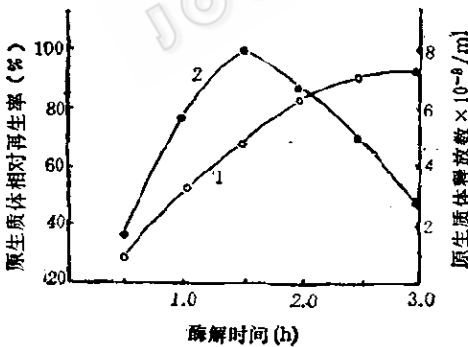


图4 酶解时间对原生质体形成量和再生率的影响

1.原生质体形成量 2.原生质体再生率

长,对原生质体再生也产生不利影响(图3、4)。

4.酶解温度和酶溶液 pH 值对三角酵母原生质体形成量和再生率的影响: 在 30℃ 左右,酶作用效果最好,原生质体的形成和再生率都较好。而低于 28℃ 或高于 32℃,则均呈下降趋势。在

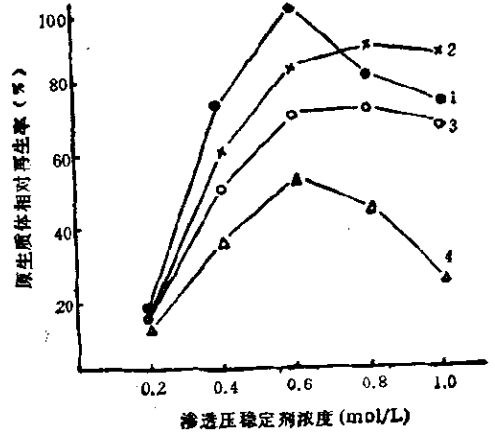


图5 渗透压稳定剂对原生质体再生率的影响

1.蔗糖; 2.甘露醇; 3.山梨醇; 4.KCl。

pH7 时原生质体释放数最大,在 pH6 和 pH8 时,酶浓度 1%,作用 90 分钟,形成的原生质体仅为 pH7 的 10% 左右。而再生的 pH 以 6 为较好。

5.再生基质对三角酵母原生质体再生的影响: (1)培养基: 在完全再生培养基 (YEPDS) 上,再生率最高为 8.2%, 在基本培养基上再生最差为 0.5%,若在其中补充氨基酸或核苷酸,则再生率分别为 1.2% 和 1.8%。因此,选择适当的补充营养,对于原生质体融合产物的再生和筛选是有利的。(2)pH、渗透压稳定剂和温度对原生质体再生率的影响: pH 值低于 5.0 或高于 8.0 对原生质体再生均不利,而 pH5.5—6.5 再生较好。在再生培养基中用四种渗透压稳定剂以不同浓度再生原生质体。结果(图5)表明,蔗糖浓度为 0.6mol/L 时对再生最有利。

(二) 三角酵母原生质体的 PEG 诱导融合

1.三角酵母原生质体的 PEG 诱导融合: 将两株带不同遗传标记的原生质体等量混合,PEG 融合处理,在选择培养基上再生,28℃ 培养 7—10 天形成菌落。再生 MM 培养基上传代 5—10 次,生长良好,表明营养互补是稳定的。在显微镜下观察,其细胞明显地大于亲株。筛选到的融合子为: TV₁₀₁ × TV₁₀₂, 15 个菌落 TV₁₀₂ × TV₁₀₁, 20 个菌落。其融合率见表 1。

2.融合条件对融合率的影响: (1) PEG/CaCl₂ 实验中使用了 40% PEG4000 和 35% PEG 6000,效果基本一致。实验还表明 CaCl₂ 是必需的,以 0.05mol/L 效果较好。(2)PEG 处理时间、

表 1 经 PEG 诱导融合和回复突变率

亲 株	遗传表型	自发回复突变率 (%)	再生回复突变率 (%)	自身融合率 (%)	亲株配对	融合率 (%)
TV ₁₀₁	Met ⁻	$<8 \times 10^{-6}$	$<10^{-6}$	$<10^{-4}$	TV ₁₀₁ × TV ₁₀₃	5×10^{-7}
TV ₁₀₂	Met ⁻ V ₉₄ ⁻	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$	$<10^{-6}$		
TV ₁₀₃	His ⁻	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$	$<10^{-6}$	TV ₁₀₂ × TV ₁₀₃	1.3×10^{-4}

pH 值和温度: 实验中 PEG 处理从 15 分钟到 2 小时, 以 30 分钟左右为佳。PEG 诱导剂 pH 8—9, 30—32℃ 为宜。

参 考 文 献

- [1] 任克勤等: 生物工程学报, 1(1): 51—58, 1985.
- [2] Sz wajcer, E. et al.: *Biotechnol. Letters*, 7(1): 1—7, 1985.
- [3] Eva, M. K. et al.: *ibid.*, 7(1): 9—14, 1985.
- [4] 焦瑞身等: 微生物学报, 26(3): 242—249, 1986.
- [5] Takano, I. et al.: *Genetics*, 91: 245—254, 1979.
- [6] Seentheshanmuganathan, S. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 27: 451—464, 1962.
- [7] Svoboda, A. et al.: *Folia Microbiol. (Praha)*, 15: 199, 1970.
- [8] Ota, F.: *Jap. J. Microbiol.*, 16: 359, 1972.
- [9] Ferenczy, L. et al.: *Experientia*, 32: 1156—58, 1976.
- [10] Evans, C. T. et al.: *Arch. Microbiol.*, 148: 77—82, 1987.

PROTOPLAST FORMATION, REGENERATION AND FUSION OF *TRIGONOPSIS VARIABILIS*

Li Weiquan Jiao Ruisheng

(Shanghai Institute of Plant Physiology of Academic Sinica, Shanghai)

Three auxotrophic mutants of *T. variabilis* have been selected after mutation with NTG and LiCl: TV₁₀₁, Met⁻; TV₁₀₂, Met⁻ V₉₄⁻; TV₁₀₃, His⁻. The regeneration efficiency of protoplasts was closely connected with the conditions of protoplast formation. The conditions used for protoplast formation were as follows: culture incubated for 32 hrs; Tris buffer 0.05mol/L, pH7.0; mercaptoethanol 0.25%; snail enzyme 1%; treated for 1.5hrs; 28—30°C. The conditions for regeneration were: pH 5.5—6.5, sucrose 0.6mol/L used as

osmotic stabilizer. In complete medium added with 0.6mol/L sucrose, the percentage of regeneration amounted to 8.2%; while in minimum medium with 0.6mol/L sucrose, it was only 0.5%. 35% PEG6000 and 40% PEG4000 showed similar effects to protoplast fusion. The fusion frequency of the two recombinations TV₁₀₁ × TV₁₀₃ and TV₁₀₂ × TV₁₀₃ are 5.0×10^{-7} and 1.3×10^{-6} respectively.

Key words

Trigonopsis variabilis; Protoplast fusion