

三角酵母二倍体菌株的选育

李维泉* 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

由三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*) 原生质体融合, 获得了 35 株原养型融合子。通过对其中四株进行详细分析表明, 融合子细胞体积和 DNA 含量为两亲株之和, 苏木精染色显示单核, 这些结果证明融合子为亲株的二倍体。此外, 融合子的生长速度、D-氨基酸氧化酶以及细胞蛋白质含量均明显高于亲株。电镜形态观察进一步证明融合子细胞大于亲株。

关键词 三角酵母; 二倍体

原生质体融合方法由于其技术和操作简便, 直接和高效, 因此在遗传学及改造菌种方面得到迅速发展和应用。在酵母菌方面, 到目前为止已经进行了一系列种内、种间和属间的原生质体融合研究^[1-3]。通过融合得到的融合子具有双亲或新的生物学特性, 表明原生质体融合可以有效地进行 DNA 重组, 是研究酵母遗传的有效手段。

本文主要报道三角酵母二倍体的选育。经原生质体融合获得的融合子在细胞体积、DNA 含量、生长速度和蛋白质含量都发生了变化。并且 D-氨基酸氧化酶酶活较亲株高, 因此具有一定的开发和应用价值。

材料和方法

(一) 菌株

三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*) 来源见前文^[4]。营养缺陷标记为: TV101 (Met⁻), TV102 (Met⁻ V_{B6}), TV103 (His⁻)。

(二) 培养基

按前文报道配制^[4]。

(三) 原生质体制备、再生和融合

按前文报道操作进行^[4]。

(四) 融合子的细胞学分析

1. 融合子的检出: 将前文得到的原养型菌落转接在另一基本培养基平板上, 反复转代 5 次以上, 选择稳定生长的菌落, 在显微镜下选择细胞体积明显大于亲株的菌落为可疑融合子。

2. 融合子体积测定: 按文献[5]进行。

3. 融合子的核酸染色: 按文献[6]进行。

4. 融合子 DNA 含量测定: DNA 抽提和测定参照 Stewart 方法^[7]和徐浩等^[8]方法进行。

(五) 融合子的生理生化分析

1. 融合子的生长速度和生物量测定: 按文献[9]进行。

2. 融合子的蛋白质含量测定: 参照 Lowry 等(1951)方法^[10]和 Stewart^[7]方法进行。

3. D-氨基酸氧化酶酶活测定: 测定参照 Friedemann^[11]和伍克勤与焦瑞身^[12]的方法进行。

将 1ml (约 20mg/ml) 细胞悬液在冰浴上预冷, 加入预冷至 -20℃ 的丙酮 5ml,

本文于 1990 年 1 月 10 日收到。

* 现在地址: 云南省微生物研究所。

充分混合均匀,离心去上清液,加入 3ml 预冷至 0℃ 的乙醚洗涤一次,离心去除上层乙醚,低温干燥即得干粉。然后加入 4 ml、0.1mol/L pH8.3 的焦磷酸缓冲溶液,充分混合均匀,取 0.5ml 酶悬液,滴加 1 滴 FAD (约 0.05ml, 1.3×10^{-3} mg/ml),保温预热后,加入 0.5ml D-丙氨酸(1mg/ml),混合后置于 37℃ 恒温水浴振荡器上振荡 10 分钟,加入 1ml 10% 三氯乙酸终止反应,离心去除细胞残渣,加入 1ml 0.1% 的 2,4-二硝基苯胼,于 25℃ 保温放置 10 分钟以上,加入 2ml 乙酸乙酯抽提,移取乙酸乙酯层,再用 2ml 乙酸乙酯重复萃取一次,合并两次乙酸乙酯抽提液,加入 2ml 10% Na_2CO_3 重抽提,移取 Na_2CO_3 液层,再同样重复操作一次,合并两次抽提液。取 2ml 抽提液,加入 2ml 2mol/L NaOH,振荡混匀,溶液显紫色,用岛津 120-2 型分光光度计在波长 $\lambda_{450\text{nm}}$ 处测定其 OD 值。在上述条件下,每分钟产生 $1\mu\text{mol}$ 的丙酮酸需要的酶量定为一个酶活力单位。

(六) 三角酵母的透射电镜观察

参照文献[13—14]方法进行。

结果和讨论

(一) 三角酵母的生理特性

三角酵母在补充不同氮源的培养基中,细胞形状有较大的差异。分别用 L-甲硫氨酸, L-脯氨酸, L-羟脯氨酸和 L-丙氨酸等作氮源时,80% 以上的细胞为三角形,其余为椭圆形和少量的四面体;在以其它氨基酸和 $(\text{NH})_4\text{SO}_4$ 作氮源时,70—80% 细胞为椭圆形,其余为三角形和四面体。三角酵母形状的上述特性的机制目前尚不清楚。

(二) 融合产物的细胞学分析

1. 融合子的稳定性及其体积测定: 三角酵母原生质体形成、再生和融合过程见前文^[4]。将在选择性再生培养基上得到的菌落,在基本培养基和完全培养基上多次传代,均能生长,菌株无分离现象,是营养互补的原养型菌株。在显微镜下可看到融合子细胞的体积明显比亲株大。在以 $(\text{NH})_4\text{SO}_4$ 为氮源的培养基中培养细胞,使之变成椭圆形的细胞,测定长、短轴以计算细胞的体积,每一测定为 500 个细胞的平

表 1 三角酵母亲株和融合子细胞大小、体积和 DNA 含量

Table 1 Cell size, volume and DNA content of parental strains and fusants of *T. variabilis*

菌株 Strains	平均长度 Mean length (μ)	平均宽度 Mean width (μ)	平均体积 Mean volume (μ^3)	DNA 含量 DNA/cell ($\mu\text{g}/\text{cell}$) $\times 10^{-8}$	倍数 Ploidy (n)
亲株 Parents					
TV101	7.2 ± 0.4	4.5 ± 0.4	76.3 ± 19.2	1.40	1
TV103	7.4 ± 0.4	4.1 ± 0.4	65.1 ± 17.6	1.50	1
TV102	7.1 ± 0.3	4.3 ± 0.3	69.7 ± 13.2	1.25	1
融合子 Fusants					
F _{A3}	8.8 ± 0.4	5.6 ± 0.3	144.4 ± 27.1	2.74	2
F _{A10}	8.8 ± 0.4	5.6 ± 0.3	144.4 ± 27.1	2.51	2
F _{B1}	8.6 ± 0.4	5.7 ± 0.5	146.3 ± 29.1	2.15	2
F _{B5}	8.6 ± 0.4	5.7 ± 0.5	146.2 ± 29.1	2.15	2

F_{A3}: Fusion of TV101 with TV103;

F_{B5}: Fusion of TV102 with TV103

均值。从计算结果可知, 融合子的平均体积是亲株平均体积之和 (见表 1)。

2. 融合子的 DNA 含量测定: 结果见表 1, 融合子的 DNA 含量约是两亲株 DNA 含量平均值之和, 表明细胞原生质体胞质融合使核也发生了融合, 融合子倍数性是出发亲株的两倍。

1. 融合子的核酸染色: 融合子经苏木精染色后, 在显微镜下可看到细胞核为单一点的, 这表明融合子细胞核是单核, 进一步排除了融合子为异核体的可能。

(三) 融合子生理生化特性分析

3. 融合子的生长速度和生物量测定:

从图 1 知, 融合子 F_{B5} 的生长速度和生物量均比亲株高, 培养 24 小时, 亲株的生物量 TV102, TV103 分别为 2.4 和 0.4 mg/ml 干重, 而融合子 F_{B5} 为 4.2mg/ml (干重); 48 小时, TV102 和 TV103 分别为 6.6 和 2.0mg/ml (干重), F_{B5} 则为 12mg/ml (干重), 约分别是亲株的 2—6

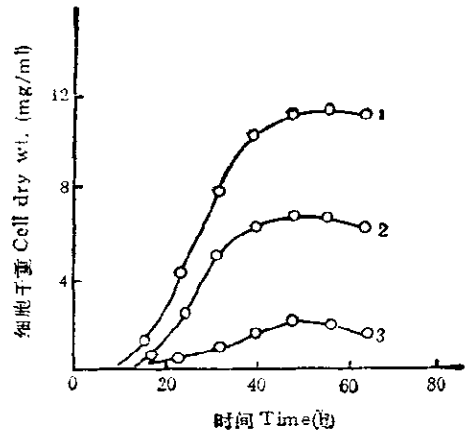


图 1 亲株和融合子的增殖速率比较
Fig.1 Comparison of growth rate of the parental strains and the fusant F_{B5}
1. F_{B5} ; 2. TV102; 3. TV103

倍。

2. 融合子的蛋白质含量测定: 结果见表 2。融合子的蛋白质含量均比亲株有所提高 (约 11—46%)。

表 2 三角酵母亲株和融合子蛋白质含量和 D-氨基酸氧化酶活力

Table 2 Protein content and D-AAO activity of parental strains and fusants of *T. variabilis*

菌株 Strain	TV101	TV102	TV103	F_{A3}	F_{B5}
细胞干重 Cell dry wt.(mg)	1.03	1.81	3.13	2.0	1.82
蛋白质含量 Protein (μ g/mg cell dry wt.)	248	231	185.7	270	237
D-氨基酸氧化酶活力 D-AAO activity (u/g acetone powder)	29.1	13.3	9.3	51	47.3
D-氨基酸氧化酶比活 D-AAO specific activity (u/mg protein)	0.125	0.057	0.050	0.188	0.199

3. 融合子的 D-氨基酸氧化酶活力测定: 收集培养 40 小时的菌体, 制成丙酮干粉, 悬于 pH8.3 的焦磷酸缓冲溶液中, 用 DNP 法测其酶活力, 结果见表 2。融合子的 D-氨基酸氧化酶酶活力较亲株有较大

提高, 其比活高出原菌株 2—3 倍。

(四) 三角酵母的透射电镜观察

三角酵母由于其细胞壁较厚, 且渗透性差, 细胞内各组成难以很好固定。显微镜观察结果见图 2。图 2 中 a 和 b 为三角

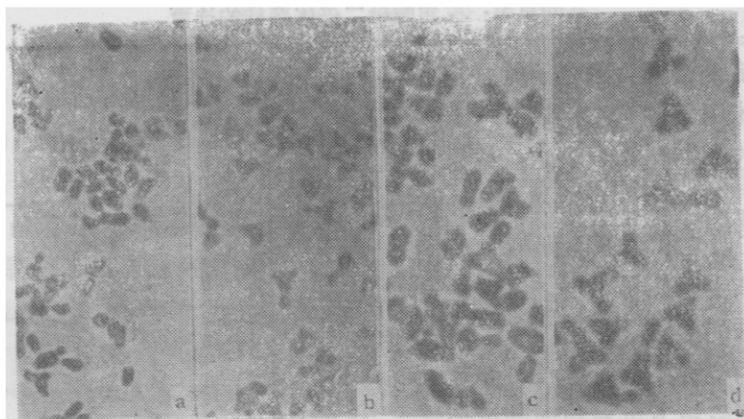


图2 三角酵母亲株和 F_{A3} 的显微照片

a,b. 三角酵母亲株 TV101 的椭圆和三角形状及大小($\times 1000$)

c,d. 三角酵母融合子 F_{A3} 的椭圆和三角形状及大小($\times 1000$)

Fig.2 Photomicrographs of parental strains and F_{A3} of *T. variabilis*

a,b. Ellipsoidal and triangular forms and sizes of parental strains of *T. variabilis* TV101($\times 1000$)

c,d. Ellipsoidal and triangular forms and sizes of *T. variabilis* fusant F_{A3} ($\times 1000$)

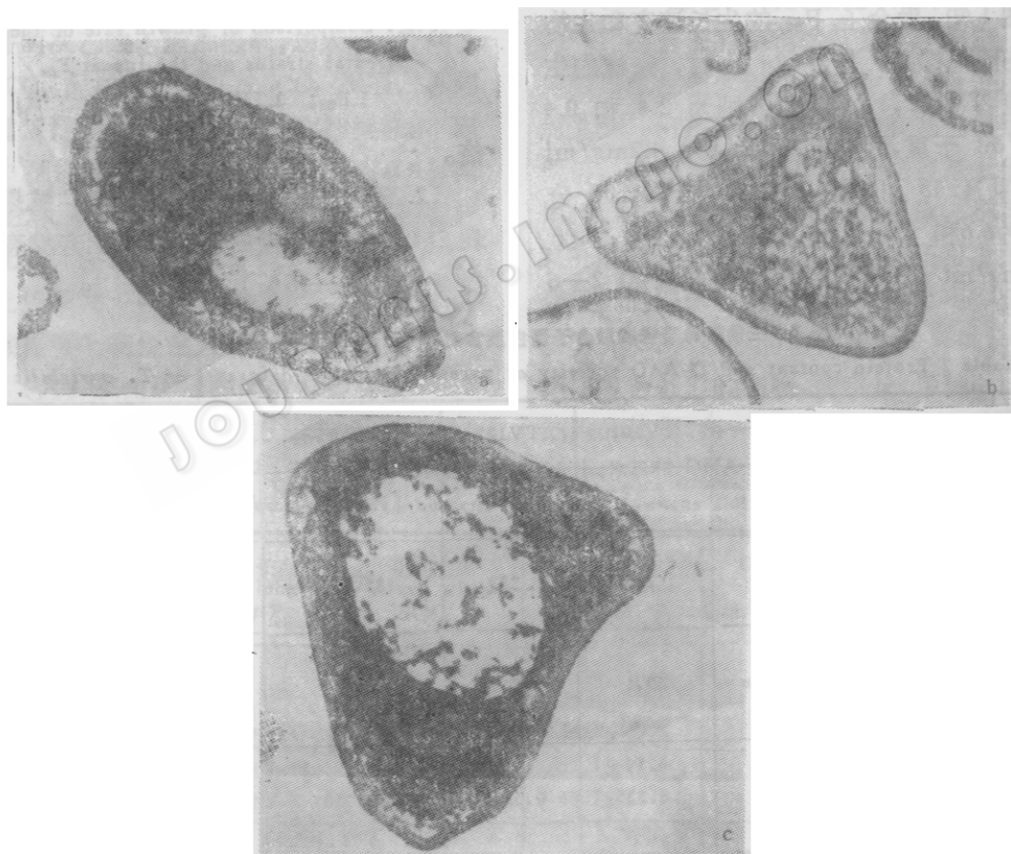


图3 三角酵母亲株和融合子 F_{A3} 的电镜照片

a,b. 三角酵母 TV101 椭圆和三角形状及大小的电镜照片($\times 10000$)

c. 三角酵母融合子 F_{A3} 三角形状及大小的电镜照片($\times 10000$)

Fig.3 Electron micrographs of parental strains and F_{A3} of *T. variabilis*

a,b. Electron micrographs of ellipsoidal and triangular forms and sizes of *T. variabilis* TV101($\times 10000$)

c. Electron micrograph of triangular form and size of F_{A3} of *T. variabilis* ($\times 10000$)

酵母亲株的两种外形, 三角形和椭圆形及大小。c 和 d 为三角酵母经原生质体融合得到的融合子的形状和大小, 可比较出融合子明显比亲株细胞体积大。图 3 为亲株和融合子的电镜观察, 其中 a 和 b 为亲株的两种形态, c 为融合子的三角形细胞, 其体积比 a 和 b 大。

参 考 文 献

- [1] Arima, K. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **173**: 271, 1979.
- [2] Legman, D.P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**(3-4): 193-202, 1985.
- [3] Groves, D.P. et al.: *Current Genetics*, **8**: 49-55, 1984.
- [4] 李维泉等: 微生物学报, **31**(3): 251-253, 1991.
- [5] Sipiczki, M. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **151**: 77-81, 1977b.
- [6] 周德庆: 微生物学实验手册, 第 26-27 页, 上海科学技术出版社, 上海, 1986 年。
- [7] Stewart, P.R. *Methods in Cell Biology*, **7**: 111-145, 1975.
- [8] 徐 浩等: 微生物学报, **10**(2): 204, 1964.
- [9] 楼纯菊等: 真菌学报, **4**(2): 118-124, 1984.
- [10] Lowry, O.H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
- [11] Friedemann, T. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, **147**: 415-442, 1943.
- [12] 任克勤: 生物工程学报, **1**(1): 51-58, 1985.
- [13] Roggenkamp, R. et al.: *FEBS Letters*, **41**(2): 283-286, 1974.
- [14] Wilfred, N.A.: *Yeast Cell Envelopes*, **2**: 105-124, (ed. Arnold, W.N.) CRC. Boca-Raton, Elorida, 1981.

THE BREEDING OF DIPLOID STRAINS OF *TRIGONOPSIS VARIABILIS* BY PROTOPLAST FUSION

Li Weiquan Jiao Ruishen

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

Fusion products were prototrophic strains with high stability. The cell size and DNA content were about the sum of cells of the two parent strains. Protein content of fusion products was higher than that of parents by 11-46%. The nucleus of fusion products was uninucleated as seen by hemato-

xylin nuclear staining. Growth rate, biomass and D-amino acid oxidase activity of mutants were higher or much higher than that of the parents.

Key words

Trigonopsis variabilis; Diploid