微生物学报 34(1):76--80,1994
Acta Microbiologica Sinica

芽孢杆菌原生质体的形成、再生及种间融合的研究

刘伊强　王雅平　潘乃穗　陈章良
(北京大学生物系　北京 100871)

原生质体融合技术不仅能使遗传基因高频率重组[1],而且可以集双亲优良遗传性状为一体[2]。自 Schaeffer 等人[3,4]成功地进行了微生物原生质体融合以来,这项技术便广为人们所接受[5-7]。枯草芽孢杆菌分泌的抗菌蛋白能抑制多种植物病原菌的生长[8-9],苏云金芽孢杆菌生成的伴孢晶体蛋白可毒杀植物害虫[10-11]。利用原生质体融合技术将这两种芽孢杆菌抑菌杀虫的遗传特性融为一体,选育出防治植物病虫害的新一代生防菌株成为可能,有关这方面的研究国内外尚未见报道。本文报道了抗菌蛋白产生菌 TG26-10 和晶体蛋白产生菌 AS 1.904-17 原生质体的形成、再生及种间融合的影响因素,为进一步筛选目的融合子提供基础。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　菌株:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) TG26 菌株为本室保存,具有产生抑制植物病原菌的抗菌蛋白特性[8,12-13]。苏云金芽孢杆菌太平洋亚种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *pacifieus* Heimpei)AS 1.904 菌株来自中国科学院微生物研究所。通过紫外线和硫酸二乙脂(DSE)复合诱变处理,获得营养缺陷型衍生株 TG26-10 和 AS1.904-17(表 1)。

表 1　亲本株的自发回复突变率

菌　株	表　型	自发回复突变率
TG26-10	Met⁻ Thr⁻	$<1.8\times10^{-9}$
AS 1.904-17	Phe⁻ Val⁻	$<1.9\times10^{-11}$

1.1.2　主要试剂:溶菌酶、聚乙二醇和 DNase 均为华美生物工程公司产品。

1.1.3　培养基:

完全培养基(CM)(%):胰蛋白胨 1,酵母提取物 0.5,牛肉膏 0.5,葡萄糖 0.5,NaCl 0.5,琼脂 1.5,pH7.0－7.2,121℃20 分钟灭菌。

基本培养基(MM)(%):葡萄糖 0.5,K_2HPO_4 1.4,KH_2PO_4 0.6,柠檬酸钠 0.1,$(NH_4)_2SO_4$ 0.2,$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.02,pH7.0－7.2,琼脂 1.5,115℃15 分钟灭菌。

再生培养基:在 CM 培养基中加入 0.5mol/L 甘露醇,0.02mol/L $MgCl_2\cdot6H_2O$,115℃20 分钟灭菌。

再生基本培养基:在 MM 培养基中加入 0.5mol/L 甘露醇,115℃15 分钟灭菌。

1.1.4　溶液:

本文于 1992 年 12 月 18 日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

SMM 高渗透压缓冲液：0.5mol/L 蔗糖，0.02mol/L 顺丁烯二酸，0.02mol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$，pH7.0。

PEG 溶液：在 SMM 高渗液中加入 40% 的 PEG6000，pH7.0。

新生磷酸钙溶液[11]：0.02mol/L KH_2PO_4，1.0mol/L $CaCl_2$ 分别灭菌，用时等体积混合。

溶菌酶溶液：用 SMM 高渗透压缓冲液配制成 20mg/ml 浓度，过滤除菌，-20℃保存。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的形成与再生：将经过活化的亲本菌株分别接种于 CM 液体培养基中，30℃振荡培养过夜，按 1% 接种量转接于新鲜的液体培养基中，继续振荡培养至对数生长期，3000r/min 离心 15 分钟，弃去上清液，悬浮于 SMM 高渗透压缓冲液中。调菌悬液浓度，使 OD_{660} 达 1.0（约 1×10^9 活菌/ml）。加入溶菌酶（TG26-10 反应浓度为 0.5mg/ml，AS 1.904-17 为 0.75mg/ml）和 DNase（反应浓度为 5μg/ml）置 37℃酶解 1 小时后，3500r/min 离心 15 分钟，弃去上清液，悬浮于 SMM 中。经适当稀释后，涂布于再生固体培养基上，30℃培养 24—36 小时，即为原生质体再生及未被酶解的细胞菌落。

1.2.2 原生质体融合：取两亲株原生质体悬浮液各 4ml 混合，3500r/min 离心 15 分钟，弃去上清液，加入 1.8ml 40%PEG6000 溶液和 0.2ml 的新生磷酸钙溶液，混合均匀，37℃保温 10—20 分钟后，用 SMM 高渗透压缓冲液稀释 10 倍后，取 0.1ml 用夹层法培养于再生基本培养基平板上，30℃培养 7—10 天，观察记数。取单亲株及混合后不加 PEG 的原生质体分别作对照试验。

1.2.3 原生质体形成、再生和融合率的计算：参见文献[15]方法进行。

1.2.4 稳定融合子的筛选：将获得的种间融合子用牙签点于 CM 平板上，30℃培养 24 小时后再影印到 MM 平板上，传代 10 次，计算融合子的稳定率。

1.2.5 观察方法：通过电镜观察原生质体融合及融合子的细胞形态。

2 结果和讨论

2.1 原生质体形成和再生

2.1.1 亲本株细胞壁对溶菌酶的敏感性：青霉素在一定浓度范围内增加菌体细胞壁对溶菌酶的敏感性[16]。在本试验中，当亲本株细胞生长处于对数期，在培养液中加入最终浓度为 0—1.0μg/ml 青霉素 G 钾，继续培养 2 小时后，在相同酶解条件下（酶解反应浓度为 1mg/ml，37℃，1 小时），原生质体形成率无显著性差异，均达 99% 以上。说明亲本株细胞壁对溶菌酶较敏感，所以在本试验酶解前可不加青霉素。

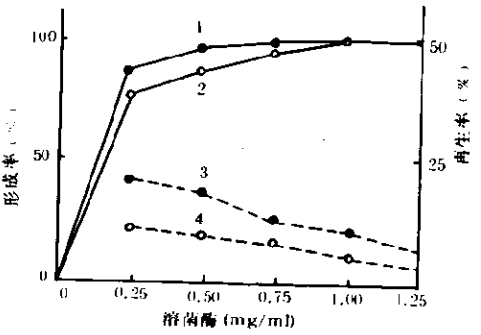

图 1　溶菌酶浓度对原生质体形成率和再生率的影响

1. TG26-10 菌株原生质体形成率
2. AS1.904-17 菌株原生质体形成率
3. TG26-10 菌株原生质体再生率
4. AS1.904-17 菌株原生质体再生率

2.1.2 溶菌酶浓度对原生质体形成率和再生率的影响：原生质体形成率随酶浓度增加而提高，但再生率则呈下降趋势（图 1）。当溶菌酶浓度为 0.5mg/ml 时，TG26-10 菌株的原生质体形成率达 94.1%，再生率为 18.26%；AS 1.904-17 的形成率和再生率分别为 86.2% 和 10.5%。当浓度提高至 0.75mg/ml，两亲株原生质体形成率分别为 98.5% 和 93.9%，再生率分别为 13.5% 和 8.63%。说明 TG26-10 菌株的细胞壁比 AS 1.904-17 对溶菌酶更敏感。因此，TG26-10 菌株的酶解浓度选择为 0.5mg/ml，AS 1.904-17 菌株为 0.75mg/ml。

2.1.3 酶解时间对原生质体形成率和再生率的影响：图 2 结果表明，原生质体形成率随酶解时间延长

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

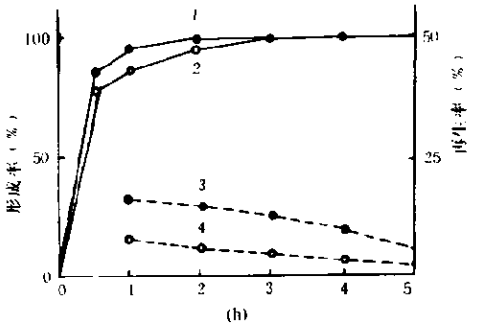

图2 酶解时间对原生质体形成率和再生率的影响

1. TG26-10 菌株原生质体形成率
2. AS 1.904-17 菌株原生质体形成率
3. TG26-10 菌株原生质体再生率
4. AS1.904-17 菌株原生质体再生率

而增加，再生率则下降。因此，酶解时间确定为1小时，此时原生质体再生率相对较高。

2.1.4 高渗透压培养基稳定剂对原生质体再生率的影响：双亲株的原生质体在含有相同浓度(0.5mol/L)稳定剂的完全再生平板上生长结果(表2)显示，甘露醇作为稳定剂两亲株的再生率最高，蔗糖和山梨醇次之，NaCl效果最差。

2.1.5 原生质体贮存时间对融合率的影响：将亲本的原生质体置4℃冰箱贮存后涂平板计算再生率。与未经贮存(0小时)的原生质体再生率相比，随贮存时间的延长，原生质体再生率明显下降。贮存24小时后，TG26-10菌株的原生质体再生率下降83.1%，AS 1.904-17菌株下降91.2%；48小时后，二者的再生率分别下降98.6%和99.0%。说明原生质体不宜过长时间贮存。

表2 不同稳定剂对原生质体再生率的影响

稳定剂	再生率(%)	
	TG26-10	AS 1.904-17
蔗 糖	16.42	7.13
甘露醇	18.26	8.63
山梨糖醇	14.14	6.12
氯化钠	7.11	6.06

2.2 原生质体的融合

由表3和图2可见，亲株原生质体在40%PEG6000诱导下融合率以融合10—20分钟最高。不同温度对融合率影响较大，37℃的融合率最高，25℃次之，温度过高和过低都不利于原生质体融合。不同分子量的40%PEG诱导效果不同，对亲本株原生质体的诱导融合以PEG6000的效果最好，融合率达3.46×10^{-6}。未经PEG处理的原生质体不发生融合。10%PEG6000与新生磷酸钙配合使用，融合率明显提高，达7.52×10^{-6}。单独使用新生磷酸钙也能诱导融合，但融合率较低。据Kameko, H. 报道，K_2HPO_4和EDTA能促进原生质体融合。从本试验结果看，用含有0.1mol/L K_2HPO_4的10%PEG6000诱导原生质体融合，融合率提高到5.57×10^{-6}，而含5mmol/L EDTA的40%PEG6000诱导原生质体融合，融合率无明显变化。

2.3 融合子的稳定性

从MM再生培养基上随机选取640个融合菌落，经传代10次，仅125个融合子在MM平板上生长，稳定率为19.5%，大部分融合子是不稳定的。这些不稳定的融合子可能是原生质体聚合状态下所形成的异核体，经传代后子代发生分离成为缺陷型亲株。本试验中所选用的亲株自身回复突变率均小于10^{-9}，并且在原生质体形成过程中加入了DNase，所以因亲株自身回复突变或转化而形成的原养型融合子的机率极小。因此也证实了不稳定的融合子为异核体。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表3　不同因素对融合率的影响

时间 (min)	融合率	温度 (℃)	融合率	PEG 分子量	融合率	融合剂	融合率
5	6.24×10^{-7}	4	5.32×10^{-7}	CK	$<10^{-8}$	PEG+$CaCl_2$ +KH_2PO_4	7.52×10^{-6}
10	2.57×10^{-6}	25	2.34×10^{-6}	4000	2.17×10^{-6}	$CaCl_2+KH_2PO_4$	1.61×10^{-7}
20	2.73×10^{-6}	37	3.45×10^{-6}	6000	3.45×10^{-6}	PEG+K_2HPO_4	5.23×10^{-6}
40	1.28×10^{-6}	42	7.24×10^{-7}	8000	9.82×10^{-7}	PEG+EDTA	2.94×10^{-6}

2.4　亲本株和融合子菌落形态和细胞形态

将亲本株和融合子的单菌落点于CM平板上，30℃培养72小时，融合子菌落形态与双亲株明显不同（图3）。亲本株TG26-10菌落淡黄，规则，干燥，无光泽，多皱褶；AS 1.904-17菌落浅黄，规则，有同心环，湿润，表面光泽；融合菌株F36菌落淡黄，不规则，稍湿润，表面微光泽，微皱褶。亲本株和融合子的细胞形态也有明显差异（图4）。TG26-10菌株细胞较短，呈八字型；AS 1.904-17菌株细胞较长，呈链状排列；融合子F36大小介于双亲之间。这种菌落和细胞形态上的差异为筛选融合子提供了参考。

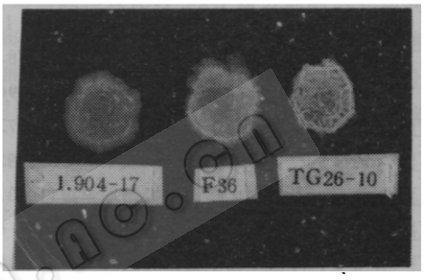

图3　亲本株和融合子的菌落形态

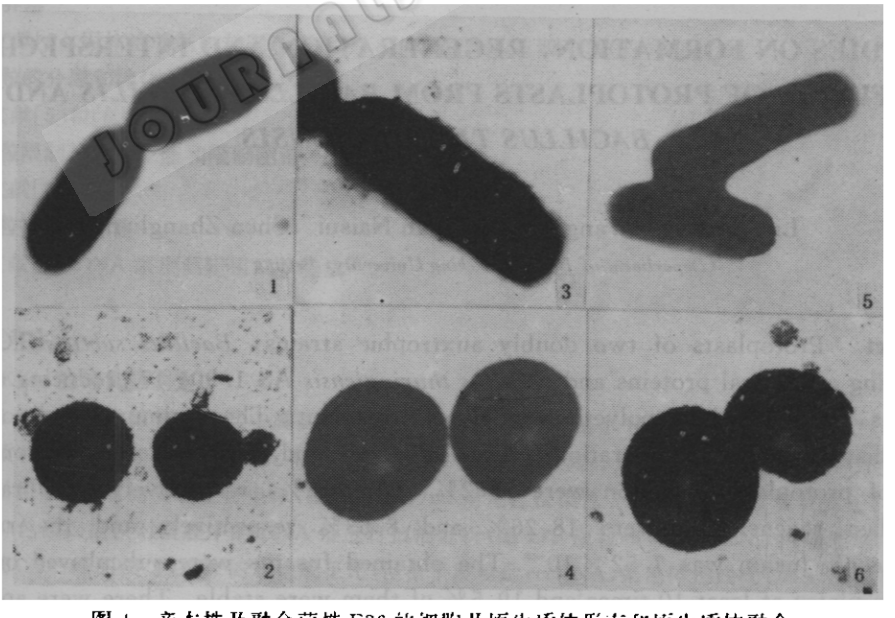

图4　亲本株及融合菌株F36的细胞及原生质体形态和原生质体融合

1. TG26-10菌体（12000×）；　2. TG26-10原生质体（12000×）；
3. AS 1.904-17菌体（12000×）；　4. AS 1.904-17原生质体（12000×）；
5. 融合子F36菌体（12000×）；　6. 双亲株原生质体融合（12000×）。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

从上述试验结果看，双亲株原生质体的种间融合率达到 7.52×10^{-6}，形成的稳定融合子在细胞形态和菌落形态上均与亲本株不同，但有些又表现出双亲的部分特征，如产生抗菌蛋白和伴胞晶体蛋白。这表明通过原生质体融合技术可以定向筛选表现双亲遗传性状的融合子。有关目的融合子的筛选、生化鉴定及抑菌杀虫效应的研究结果将在另文报告。

参 考 文 献

[1] Peberdy J F. *Enzyme Micro Technol.* 1980, **2**:23—29.

[2] Pathak S G *et al.* *Applied Microbiology*, 1971, **22**:366—371.

[3] Schaeffer P *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **73**:(6):2151—2155.

[4] Hopwood P A *et al.* *Nature*, 1977, **266**:171.

[5] Fodor K, Alfold L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(6):2147—2150.

[6] Masahiko K *et al.* *Agric Biol Chem*, 1986, **50**(2):339—346.

[7] Coetzee J N *et al.* *J General Microbiology*, 1979, **114**:,313—322.

[8] 王雅平，等. 植物学报，1993, **35**(3):222—288.

[9] Reeves P. *Bacteriological Reviews*, 1965, **29**(3):25.

[10] 王宪，等. 生物工程学报，1987, 3(1):29—37.

[11] Norris J R. *J Appl Bacteriol*, 1970, **33**:192—206.

[12] 王雅平，等. 生物化学与生物物理学报，1993, 25(4):391—397.

[13] 王雅平，等. 生物防治通报，1993, **9**(2):63—68.

[14] 乔宝义，等. 微生物学报，1983, 23(1):33—43.

[15] 江行娟，等. 遗传学报，1981, 8(1):1—7.

[16] Harumi K *et al.* *Agric Biol Chem*, 1979, 43(5):1007—1013.

STUDIES ON FORMATION, REGENERATION AND INTERSPECIFIC FUSION OF PROTOPLASTS FROM *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS THURINGIENSIS*

Liu Yiqiang Wang Yaping Pan Naisui Chen Zhangliang

(*Department of Biology, Peking University, Beijing* 100871)

Abstract Protoplasts of two doubly auxtrophic strains, *Bacillus subtilis* TG26-10 producing antifungal proteins and *Bacillus thuringiensis* AS 1.904-17 producing crystal proteins, were fused by polyethylene glycol treatment. The optimum conditions for protoplast formation, regeneration and fusion were found. Under these conditions, the rates of protoplast formation were 94.2% and 93.9%, respectively, the rates of protoplast regeneration were 18.26% and 8.63% respectively and the rate of interspecific fusion was 7.52×10^{-6}. The obtained fusants were subcultived on MM medium plates at least 10 times and 19.5% of them were stable. There were apparent differences between parental strains and fusants in colony and cell morphology.

Key words *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, Protoplast fusion

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn