

原生质体电融合构建酵母多倍体的研究*

曾云中 左小明 吴雪昌 张冬妮 陈士怡

(杭州大学生物科学与技术系 杭州 310028)

摘 要 为考察将 STA 基因导入酿酒酵母的可能性和研究糖化酵母在不同核倍性下 STA 基因的表达效应,从酿酒酵母 HU-TY-1A 及糖化酵母 5101-7C、5206-1B、5301-14D 出发,通过原生质体电融合技术,构建了 11 株核倍性分别为 $2n$ 、 $4n$ 、 $5n$ 及 $8n$ 的酵母多倍体。所用电融合参数为: 交变电场强度 200v/cm , 频率 1MHz ; 电脉冲强度 9kv/cm , 宽度 $40\mu\text{sec}$, 脉冲数 2 个, 间隔 10sec , 波形为方波。在糖化酵母单一亲株融合组合中, 融合株检出采用菌落形态作为初检指标取得一定效果。其它融合组合则采用遗传标记检出更为可靠。所得融合率约为 $5 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-1}$ 。所有融合株经 15 代以上传代培养, 遗传稳定。

关键词 糖化酵母, 酿酒酵母, 原生质体, 电融合, 融合株, 多倍体

目前已知, 在糖化酵母 (*Saccharomyces diastaticus*) 的核基因组中, 有三个等效异位基因 STA1、STA2 及 STA3 编码着淀粉糖化酶 (extracellular amyloglucosidase 或 glucoamylase) 的合成^[1,2]。已发表的相关育种工作, 多数是从这三个基因的表达剂量效应 (dosage effect) 入手而取得一定成果^[3-5], 但尚未见到有较为深入的关于该基因核多倍性 (二倍以上) 表达效应的研究报道。本文意欲通过酵母原生质体电融合技术, 避开 MAT 杂合 (α/a) 对 STA 基因表达的不利影响^[6], 筛选获得糖化酵母的融合多倍体, 以便进一步研究核多倍性时 STA 基因不同组合所表现出的表达效应。

本实验室曾从优良酒精生产菌株 K 氏酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*) 出发, 选育获得一株具有耐高温、耐高渗等一系列优良生产特性的酿酒酵母二倍体 HU-TY-1^[7-9], 再经诱导产孢、单孢分离又获得该菌株的单倍体 HU-TY-1A^[10]。本文也意欲以这一单倍体为亲株, 与所得 STA 基因表达相对较强的糖化酵母多倍体进行种间融合, 以考察将 STA 基因导入 HU-TY-1A 的可能性。

1 材料和方法

1.1 菌株

所用菌株列于表 1, 均为 MAT_a。其中 HU-TY-1A 不能利用淀粉和山梨醇作为碳源。

1.2 培养基

1.2.1 含葡萄糖完全培养基 (YEPD): 参照文献[11]。

* 浙江省自然科学基金及国家自然科学基金资助项目。

参加本文工作的还有朱晓平、李卫旗。

本文于 1994 年 1 月 28 日收到。

1.2.2 含淀粉完全培养基 (YEPS): 参照文献[12]。

1.2.3 含葡萄糖高渗完全培养基 (YPDS): 在 YEPD 基础上, 添加 1.2mol/L 山梨醇^[13]。

1.2.4 含淀粉高渗完全培养基 (YPSS): 在 YEPS 基础上, 添加 1.2mol/L 山梨醇。

1.2.5 含葡萄糖基本培养基 (SD): 参照文献[11]。

1.2.6 含淀粉基本培养基 (SS): 参照文献[12]。

1.2.7 含葡萄糖高渗基本培养基 (SDS): 在 SD 基础上, 添加 1.2mol/L 山梨醇。

1.2.8 含淀粉高渗基本培养基 (SSS): 在 SS 基础上, 添加 1.2mol/L 山梨醇。

遗传标记鉴定培养基则根据所用菌株的营养要求, 在适当的基本培养基上添加相应的氨基酸成份。其中 L-盐酸组氨酸 (His)、L-盐酸精氨酸 (Arg) 和 L-甲硫氨酸 (Met) 的添加量分别为 20 μ g/ml, L-亮氨酸 (Leu) 的添加量为 30 μ g/ml^[14]。

以上培养基加入 2% 的纯化琼脂即为固体培养基, 用于制备斜面和平板。所有培养基均经高压蒸汽灭菌 (0.06mPa, 113 $^{\circ}$ C, 30min)。

1.3 原生质体制备

制备方法按文献[13]及[15]稍加改进。首先, 将待制备的菌株活化培养后, 接种 YEPD 中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 15—20h, 离心 (4000r/min, 10min, 下同) 收集菌体, 用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (CPB pH 6.0) 离心洗涤, 吸取相当于 10⁶ 细胞的菌悬液, 加含 0.01—0.05mol/L β -巯基乙醇及 50mmol/L EDTA-Na₂ 的 CPB, 置 30 $^{\circ}$ C 水浴中保温 30min, 用含 1.2mol/L 山梨醇的 CPB 离心洗涤, 加 2% 蜗牛酶, 30 $^{\circ}$ C 水浴中处理 60—

表 1 所用菌株

Table 1 The strains used in this work

菌株 Strain	用途 Used as	相关表型(基因型) Relevant phenotype(genotype)	来源 Source
<i>S. cerevisiae</i>			
HU-TY-1A	Parent	Sta ⁻	This lab.
<i>S. diastaticus</i>			
5101-7C	Parent	Sta ⁺ (STA1) Arg ⁻ (arg4)	H. Tamaki (Japan)
5206-1B	Parent	Sta ⁺ (STA2) Arg ⁻ (arg4)	H. Tamaki (Japan)
5301-14D	Parent	Sta ⁺ (STA3) Leu ⁻ (leu1) Met ⁻ (met1) His ⁻ (his1)	H. Tamaki (Japan)
CCF-54	Fusant and parent	Sta ⁺ Arg ⁻	This lab.
BBF-2	Fusant and parent	Sta ⁺ Arg ⁻	This lab.
DDF-18	Fusant and parent	Sta ⁺ Leu ⁻ Met ⁻ His ⁻	This lab.
4CF-121	Fusant and parent	Sta ⁺ Arg ⁻	This lab.
4BF-11	Fusant and parent	Sta ⁺ Arg ⁻	This lab.
4DF-8	Fusant and parent	Sta ⁺	This lab.
4CDF-4	Fusant	Sta ⁺	This lab.
4BDF-53	Fusant	Sta ⁺	This lab.
8CF-21	Fusant	Sta ⁺ Arg ⁻	This lab.
<i>S. diastaticus</i> × <i>S. cerevisiae</i>			
5CHF-32	Fusant	Sta ⁺	This lab.
5BHF-22	Fusant	Sta ⁺	This lab.

90min, 离心收集原生质体, 用 1.2mol/L 山梨醇溶液充分洗涤, 悬浮于 1ml 1.2mol/L 山梨醇(含 0.1mmol/L 氯化钙)溶液中备用。

1.4 原生质体电融合及再生

按照 Halfmann 等人所报道方法^[3]略加修改。电融合参数根据显微镜跟踪观察及平板活菌计数结果加以调整。融合小室为本实验室自制, 构造示意图见图 1。电极材料

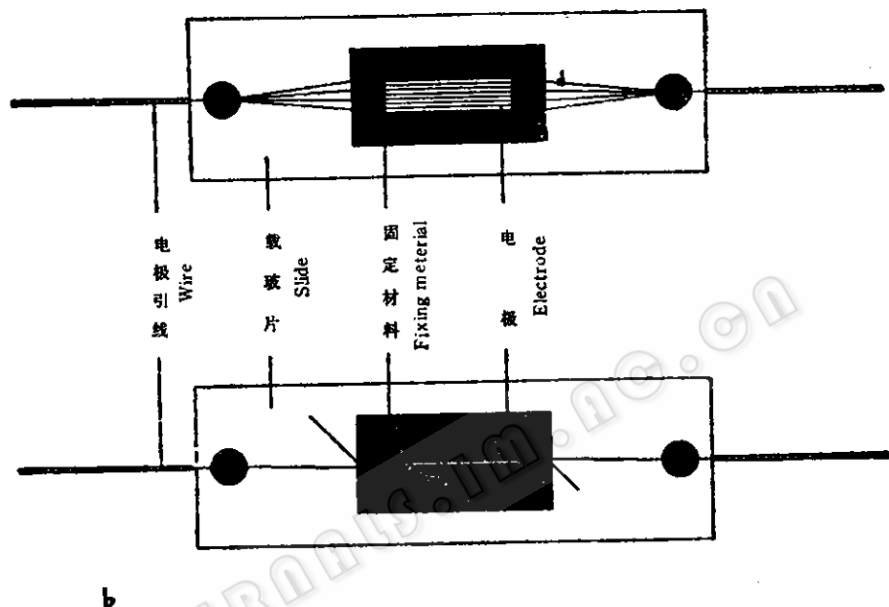


图 1 多电极及双电极融合小室

a: 多电极式, b: 双电极式

Fig. 1 Fusion chambers with polyelectrode and dielectrode

a: Polyelectrode; b: Dielectrode.

为 $\phi 0.35\text{mm}$ 不锈钢针灸针, 电极间距约 0.5mm, 电极有效长度约 20 mm, 固定材料为

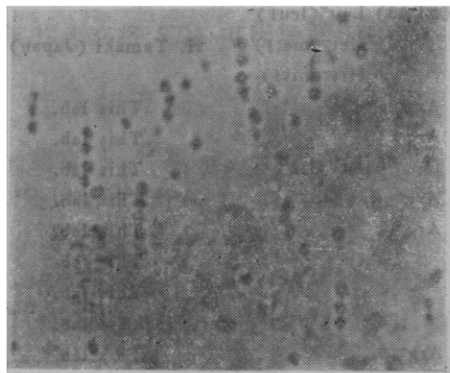


图 2 原生质体电介电泳(示形成的串珠)

Fig. 2 Dielectrophoresis of protoplast (show the pearlchain)

KD-504A 型胶粘剂(国防科技大学监制)。为防止胶粘剂中化学成份对原生质体的可能毒性, 融合小室在使用前用 0.1 mol/L 盐酸溶液及氢氧化钠溶液分别室温浸泡 4h 以上, 并用蒸馏水充分冲洗。临用时再用 70% 乙醇浸泡消毒, 紫外线照射灭菌。所用仪器为 BP-88 II 型多功能细胞电融合仪(杭州大学亨达生物技术公司监制), 仪器各输出参数连续可调。电融合过程在室温中无菌进行。首先, 吸取原生质体悬液 (10^6cell/ml) $30\mu\text{l}$ (双电极室为 $10\mu\text{l}$) 于融合小室中(若为两种亲株间融合, 则先将两种原生质体悬液 1:1 混

合后再吸取),在倒置显微镜观察下,接通低压交变电场(幅度 10v,相当于电极间电场强度约为 200v/cm,频率 1MHz)约 2min 后,正负电极间可观察到原生质体垂直于电极方向的排队现象(图 2)。当原生质体两两接触在显微镜视野中占最大比例时,激发高压方波电脉冲(幅度 45v,相当于电极间强度约为 9kv/cm,脉冲宽度 40μsec,脉冲数 2 个,脉冲间隔 10sec)促使原生质体融合,静置 1—2min 后,关闭电源,再静止稳定 10min 以上,用微量注射器吸出融合悬液,经 1.2mol/L 山梨醇溶液适当稀释,涂布相应的高渗培养基平板,进行融合株再生培养。

1.5 融合株检出

从出发菌株开始,分 3 组进行了 13 个不同组合的原生质体融合。工作程序是,当第 1 组完成从原生质体制备、电融合、再生及融合株检出,直到融合株鉴定分析等全部过程后,在大量淘汰遗传不稳定的融合株和异核体的基础上,可获得少数几株遗传稳定的融合株,从这些融合株中选出较为合适的菌株用作第 2 组的出发菌株。第 3 组则在第 2 组的基础上进行,以此完成全部工作过程。

糖化酵母单一亲株融合后,涂布于 YPDS 或 YPSS 平板,经 30℃培养 72h 以上,计数直径明显大于周围菌落的单菌落,将其接种于 YEPD 斜面;糖化酵母两种亲株间融合后,涂布于 SDS 或 SSS 平板,计数在该两种培养基上能够生长(营养缺陷互补)的单菌落,挑取并接种于 SS 斜面;糖化酵母与酿酒酵母菌株间融合后,则涂布于 SSS 平板,计数能正常生长(营养缺陷互补)的单菌落,并挑取接种于 SS 斜面。经以上接种的菌株,置 30℃培养,每隔 18—24h 转接一次相同斜面。经 15 代以上传代后,用于鉴定与分析。

菌落计数结果用作融合率计算,公式为:

$$U = \frac{D}{C - B}$$

(式中: U 为原生质体融合率;

D 为获得的融合株总数;

C 为原生质体悬液在 YPDS 上的活菌计数;

B 为原生质体悬液在 YEPD 上的活菌计数)

1.6 融合株核倍性测定

取传代稳定的融合株,首先经细胞体积测定、形态观察、Feulgen 染色^[6]及营养要求测定确认非异核体,活化培养后接种 YEPD,30℃振荡培养 60h,离心收集菌体,无菌水充分洗涤,按 Ogur 等的方法^[7]提取核 DNA,用二苯胺显色,用分光光度法测定其含量,并换算成 DNA 的单位细胞含量,以出发菌株 DNA 单位细胞含量为对照,计算融合株的核倍性。

2 结果和讨论

2.1 原生质体电融合

原生质体在低强度交变电场作用下,通过电介电泳(dielectrophoresis)首先形成细胞间的紧密接触,然后在瞬间高压电脉冲作用下,使紧密接触区范围内的细胞膜发生可逆性电击穿(reversible breakdown),从而诱导细胞间相互融合^[8]。本文研究结果表

明,原生质体电融合技术在酵母多倍体的构建上,确实是一个十分有效的手段。

根据 Zimmermann 等提供的原生质体膜电压计算方法^[18]可以算得,在本文最终设定的电融合参数下,当高压电脉冲释放时,原生质体的膜电压约为 3.0—4.8v ($a = 2.19 - 3.52\mu\text{m}$, $E = 9\text{kv/cm}$, $\alpha = 0^\circ$)。研究结果证明,对于本文所用菌株的大多数原生质体而言,该膜电压下,细胞膜可产生可逆性电击穿,有利于原生质体间相互融合。若高于此膜电压则可能导致不可逆性电击穿,而使原生质体解体,融合率下降;细胞解体时所释放含有大量电解质的胞内物质,也会严重干扰电融合的过程^[18,19]。

本文选用山梨醇作为原生质体的渗透压稳定剂。由于其为非电解质,因而在电融合时的原生质体悬液中,除极微量的 Ca^{2+} 外几乎不含其它阳离子。原生质体在这样的环境下,不可避免地会受到一定程度的损伤^[18]。所以在电融合过程中,以不影响融合子在悬液中的稳定性为前提,应尽可能地缩短原生质体在这种环境中的留存时间。

将原生质体悬液的浓度定为 10^6cell/ml 、是因为实际观察结果表明,该浓度的原生质体在交变电场下,形成垂直于电极的两两接触比例相对最高。过高或过低的浓度则可能导致形成原生质体珠串 (pearl chain) 过长或细胞间两两接触的形成速度过缓。

2.2 融合株的获得

研究共获得 11 株不同核倍性的融合株 (表 2)。

表 2 原生质体电融合分组及各组合融合株检出结果
Table 2 The groups of protoplast electrofusion and the fusants obtained

组 别 Group	融 合 Fusion	融 合 率 Fusion rate	融 合 子 Fusant obtained	核 倍 性 Nuclear ploidy
1	5101-7C×5101-7C	7×10^{-4}	CCF-54	2n
	5206-1B×5206-1B	4×10^{-4}	BBF-2	2n
	5301-14D×5301-14D	1×10^{-4}	DDF-18	2n
2	CCF-54×CCF-54	5×10^{-3}	4CF-121	4n
	BBF-2×BBF-2	1×10^{-3}	4BF-11	4n
	DDF-18×DDF-18	5×10^{-4}	4DF-8	4n
	CCF-54×DDF-18	7×10^{-4}	4CDF-4	4n
	BBF-2×DDF-18	9×10^{-4}	4BDF-3	4n
3	4CF-121×4CF-121	8×10^{-4}	8CF-21	8n
	4BF-11×4BF-11	未获 (None)	未获 (None)	—
	4DF-8×4DF-8	未获 (None)	未获 (None)	—
	4CF-121×HU-TY-1A	9×10^{-5}	5CHF-32	5n
	4BF-11×HU-TY-1A	6×10^{-4}	5BHF-22	5n

由于多数融合在单一亲株中进行,无互补的遗传标记可以利用,故取形态指标 (即再生后的大菌落) 作为融合株检出的初步依据。为减少诸如菌体生理状况、培养条件等外界因素影响菌落形态而造成检出假阳性的可能性,本文采用未经电融合过程的同一原生质体悬液,在培养条件完全一致情况下所形成的单菌落平板作为对照。结果发现在对照平板上原生质体再生形成的菌落,虽然有时也会出现大小形态的变化,但这种变化是逐渐而均匀的,不会出现与周围菌落相比明显增大的菌落。而在电融合后的原生质体再生

平板上,则可观察到这种特别的单菌落(图3)。研究结果表明,当融合株的核倍性较低($2n, 4n$)时,挑取这种大菌落作为融合株加以检出,虽然不可避免地会产生假阳性,但若能与细胞体积测定、细胞核染色、细胞 DNA 含量测定及其它有关生理指标测定等相结合,仍可有效地获得融合株。然而当融合株的核倍性较高($8n$)时,融合株检出的这一形态指标(除 $4CF-121 \times 4CF-121$ 外)失去其有效性。说明依据形态指标在获得高倍性融合株方面有其应用的局限性。这一方法在原生质体融合方面的应用,尚未见有类似报道。

融合株 CCF-54、BBF-2、DDF-18、4CF-121、4BF-11 及 8CF-21 经鉴定完整保留了各自单倍体亲株的遗传标记。由 CCF-54、BBF-2 及 DDF-18 进一步所做的两组融合 CCF-54 $\times$ DDF-18 及 BBF-2 $\times$ DDF-18, 仍可利用互补的遗传标记检出融合株,方法较为简便。所涉及菌株的营养缺陷回复突变频率分别为 CCF-54、BBF-2 小于 10^{-8} , DDF-18 小于 10^{-6} ,均小于融合率。 $4CF-121 \times HU-TY-1A$ 和 $4BF-11 \times HU-TY-1A$ 两组融合,则利用 SSS 作为融合株检出的选择培养基。糖化酵母亲株在该培养基上因氨基酸营养缺陷而不能生长,酿酒酵母因培养基不含可利用的碳源也不能正常生长,两者的融合株则因营养缺陷互补而能够正常生长。菌株 4CF-121 及 4BF-11 的营养缺陷回复突变频率小于 10^{-8} , $HU-TY-1A$ Sta^- 向 Sta^+ 的突变频率也小于 10^{-8} ,均远小于融合频率。

不同亲株间融合株的检出,利用遗传标记虽有较好的可靠性,但排除异核体仍需借助细胞核染色、营养要求测定及遗传稳定性测定等手段来加以鉴别。

文中报道的原生质体融合率为参考值。这是因为加入融合小室中的原生质体,由于小室形状的限制,并非全部处在有效电场内,电场外的原生质体再生后生长会使融合率估计偏低;在单一亲株融合的组合中,由于采用了形态指标,很可能出现融合株检出的假阳性,则会使估计偏高;操作中容器壁对原生质体的吸附、电场对原生质体的损伤等等,也会干扰对融合率的精确估计。

研究获得的 11 株不同核倍性的融合株,经 15 代以上传代培养,有关性状遗传稳定,本实验室将对其细胞形态、生理生化指标等作进一步的鉴定与分析。

参 考 文 献

- [1] Erratt J A, Nasim A. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 1987, 5(2): 95—104.
- [2] Tamaki H. *Mol Gen Genet*, 1978, 164: 205—209.
- [3] Vanoni M, Lotti M, Alberghina L. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 1008: 168—176.
- [4] Erratt J A, Stewart G G. *Dev Ind Micro*, 1981, 22: 577—588.
- [5] Sakai T, Koo K, Saitoh K *et al. Agric Biol Chem*, 1986, 50(2): 297—306.
- [6] Yamashita I, Takano Y, Fukui S. *J Bacteriol*, 1985, 164(2): 769—773.
- [7] 曾云中,吴雪昌,朱晓平,等. 杭州大学学报(自然科学版), 1991, 18(4): 468—472.
- [8] 曾云中,吴雪昌,金珊,等. 杭州大学学报(自然科学版), 1992, 19(3): 327—335.
- [9] 吴雪昌,曾云中,朱晓平,等. 耐高温酿酒酵母的选育 III, $HU-TY-1$ 耐高温酿酒酵母选育. 见: 毛树坚等主



图3 原生质体融合后所形成的特殊单菌落

Fig. 3 Special monoclonal colonies of the protoplast after fusion

- 编. 生命科学论文集. 杭州: 杭州大学出版社, 1992. 180—185.
- [10] 曾云中, 张冬妮, 吴雪昌, 等. 生物工程学报, 1992, 8(4): 363—370.
- [11] Pretorius I S, Modens D, Vanoni M *et al.* *Mol Cell Biol*, 1986, 6(9): 3034—3041.
- [12] Okimoto Y, Yoshimoto H, Shima H *et al.* *Agric Biol Chem*, 1989, 53(10): 2797—2800.
- [13] Halfmann H J, Rocken W, Emcis C C *et al.* *Curr Genes*, 1982, 6: 25—28.
- [14] Guthrie C, Fink G R. Guide to yeast genetics and molecular biology. In: Guthrie C, Fink G R. ed. *Methods in enzymology*. San Diego: Academic Press Inc, 1991, 194: 15.
- [15] 李桃生, 陈士怡. 生物工程学报, 1987, 3(2): 121—129.
- [16] 范秀容, 李广武, 沈 萍. 富尔根氏核染色法. 见: 范秀容等编. 微生物学实验, 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1981. 64—65.
- [17] Ogor M, Minckler, Lindegren *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40: 177—184.
- [18] Zimmermann U. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 694, 227—277.
- [19] Broda H G, Schaeffler R, Zimmermann U. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 899: 25—34.

STUDY OF USING PROTOPLAST ELECTROFUSION TECHNIQUE TO CONSTRUCT YEAST POLYPLOIDS

Zeng Yunzhong Zuo Xiaoming Wu Xuechang

Zhang Dongni Chen Shiyi

(Department of Biological Science and Technology, Hangzhou University, Hangzhou 310012)

Abstract In order to investigate the possibility of introducing STA genes into *Saccharomyces cerevisiae* and to study the expression effects of STA genes in different *S. diastaticus* polyploids, *S. cerevisiae* strain HU-TY-1A and *S. diastaticus* strains 5101-7C, 5206-1B, 5301-14D have been used as primary strains to construct yeast polyploids by means of protoplast electrofusion. After dielectrophoresis (200v/cm, 1MHz), the fusions were induced by row high voltage pulses (9kv/cm, 40μsec duration, square wave) applied at an interval of 10sec. In the fusions of mono-parent, the colonymorphic of regenerated cells was applied as primary selecting indicator of fusants. This has proven effective. In other fusions, genetic markers were reliably used as selecting indicators. Therefore, 11 yeast polyploids have been obtained which nuclear ploidies are 2n, 4n, 5n and 8n respectively. The fusion rate obtained is about 5×10^{-3} — 1×10^{-3} . All fusants were genetic stable after growing on certain slant up to 15 generations.

Key words *Saccharomyces diastaticus*, *S. cerevisiae*, Protoplast, Electrofusion, Fusant, Polyploid