

玫红穗状霉原生质体形成条件的研究

蒋倩婷^{1,2,3}, 李泰辉², 宋 斌²

(1 中国科学院 华南植物园, 广东 广州 510650; 2 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070; 3 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要:研究了菌龄、酶的配比、酶解时间及渗透压稳定剂等多种因素对玫红穗状霉 *Spicellum roseum* 原生质体形成的影响。结果表明,制备玫红穗状霉原生质体的最佳条件为:菌龄 30 h,用 10 mg/mL 纤维素酶 + 10 mg/mL 蜗牛酶 + 5 mg/mL 溶壁酶的混合液酶解,以 0.7 mol/L 的 KCl 作渗透压稳定剂,30 °C 酶解 3 h。

关键词:玫红穗状霉; 原生质体; 形成条件; 酶解

中图分类号:Q936

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2011)02-0067-03

The Preparation Conditions of *Spicellum roseum* Protoplast

JIANG Qian-ting^{1,2,3}, LI Tai-hui², SONG Bin²

(1 South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2 Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China;

3 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The preparation conditions of *Spicellum roseum* protoplast including incubation time, enzyme system, enzymolysis time and osmotic stabilizer were studied. The optimal preparation conditions of *S. roseum* protoplast were 30 h mycelium growth, 10 mg/mL cellulase, 10 mg/mL snailase and 5 mg/mL ly-wallzyme, 3 h reaction at 30 °C and 0.7 mol/L KCl as osmotic stabilizer.

Key words: *Spicellum roseum*; protoplast; preparation condition; enzymatic hydrolysis

Bachmann 等^[1]首次利用酶解破壁法从粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa* 菌丝体获得原生质体,此后,其他真菌的原生质体制备和再生的研究陆续开展起来,极大地加深了人们对真菌细胞结构和生理功能的认识^[2]。目前,原生质体技术已广泛应用于丝状真菌的遗传育种领域,尤其是原生质体诱变、融合及转化等技术已成为重要的菌种选育方法,已成功获得多种优良菌株^[3-5]。玫红穗状霉 *Spicellum roseum* Nicot et Roquebert 是一种粉红色的小型真菌,是由广东省微生物研究所于 2008 年在研究金针菇病害的过程中发现并分离得到的我国的一个新记录种^[6],国内外对其研究很少。Silman 等^[7-8]对玫红穗状霉产 CM-Case 的能力进行了研究,并优化了其产酶条件。Silman 等^[7]的研究表明:与里氏木霉 *Trichoderma reesei* 相比,玫红穗状霉最终能够产生等量的纤维素酶,且产酶活力更稳定,是一个非常有潜力的纤维素酶高

产菌;它以其生长迅速、极易形成孢子且能迅速穿透 5 层牛皮纸袋等优点被认为是一种能产生高活力纤维素酶的菌株。目前,国内外鲜见关于玫红穗状霉原生质体制备的报道,本文对玫红穗状霉原生质体的形成条件进行了研究,为下一步该菌种原生质体的利用如诱变育种或融合等方面奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

玫红穗状霉 *Spicellum roseum* GIM 3.476 由广东省微生物研究所真菌资源研究组分离得到,保藏于广东省微生物菌种保藏中心。

葡萄糖、硫酸镁、磷酸二氢钾、氯化钠、羧甲基纤维素钠、氯化钾,均为分析纯;琼脂,酵母粉,蛋白胨为生化试剂级。

收稿日期:2010-08-17

作者简介:蒋倩婷(1985—),女,硕士研究生;通信作者:李泰辉(1959—),男,教授,博士,E-mail:mycolab@263.net

基金项目:广东省自然科学基金(8251007002000002);中国科学院知识创新项目(KSCX2-YW-G-074-04)

1.2 培养基

1.2.1 综合 PDA 培养基 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 硫酸镁 1.5 g, 磷酸二氢钾 3 g, 琼脂 20 g, 加水定容至 1 L, pH 7.0.

1.2.2 菌丝生长培养基 羧甲基纤维素钠 1 g, 酵母粉 1 g, 蛋白胨 1 g, 氯化钠 0.5 g, 磷酸二氢钾 0.1 g, 定容至 100 mL, pH 自然.

1.2.3 原生质体再生培养基 参照杨谦等^[9]的培养基, 稍做改进: 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 10 g, 酵母膏 10 g, 氯化钾 52.85 g, 琼脂 16 g, 水定容至 1 L, pH 6.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min.

1.3 酶制剂及其配制

1.3.1 酶制剂 纤维素酶 (Cellulase, MBCHEM, 进口分装); 蜗牛酶 (Snailase, 福建金田生物科技有限公司); 溶壁酶 (Lywallzyme, 广东省微生物研究所).

1.3.2 酶液的配制 用渗透压稳定剂 (由 0.2 mol/L pH 5.8 的磷酸缓冲液配成) 配制质量浓度为 10 mg/mL 纤维素酶、10 mg/mL 蜗牛酶、5 mg/mL 溶壁酶、10 mg/mL 溶壁酶、20 mg/mL 纤维素酶、20 mg/mL 蜗牛酶, 在无菌条件下, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用.

1.4 方法

1.4.1 生长曲线的绘制 将玫红穗状霉孢子悬浮液接种于菌丝生长培养基中, 在 25 $^{\circ}$ C 120 r/min 的条件下恒温振荡培养. 接种后, 随机取不同生长期的菌丝各 20 mL, 5 000 r/min 离心 5 min, 用无菌的 pH 5.8 的磷酸缓冲液冲洗 3 次, 在 100 $^{\circ}$ C 下烘干至恒质量, 称干质量. 以培养时间为横坐标, 以菌丝干质量为纵坐标, 得玫红穗状霉的生长曲线.

1.4.2 菌丝的获得 在长有玫红穗状霉孢子的 PDA 斜面试管中注入 10 mL 无菌水, 将孢子冲洗下来, 倒入装有玻璃珠和无菌水的三角瓶中, 充分振荡, 用血球计数板镜检, 制成 1.0×10^6 mL⁻¹ 的孢子悬液. 取 10 mL 接种于 50 mL 的菌丝生长培养基中, 25 $^{\circ}$ C 摇床培养 28 ~ 32 h. 取 10 mL 菌液, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用无菌水和 0.7 mol/L 的渗透压稳定剂洗涤菌丝各 2 次, 制得菌丝备用.

1.4.3 酶解 取 1 g 湿菌丝置于已灭菌的 50 mL 三角瓶中, 加入 5 mL 酶解液, 于 30 $^{\circ}$ C、60 r/min 水浴摇床中酶解 3 h, 每隔 1 h 取少量菌液, 在显微镜下观察原生质体的获得情况.

1.4.4 原生质体的分离和纯化 参照文献[10]的方法, 稍做改进: 酶解结束后, 用吸管轻轻吹打, 然后用布式漏斗和 4 层擦镜纸过滤, 滤去未被酶解的菌丝残片, 离心去除酶解液. 再用渗透压稳定剂洗涤 2 次. 每次洗涤后, 都在 4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 10 min,

去除上清液. 最后悬浮于 5 mL 渗透压稳定剂中. 用血球计数板在显微镜下观察计数, 调整原生质体的浓度为 1.0×10^6 mL⁻¹, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存.

1.4.5 原生质体的再生 原生质体悬浮液分别用渗透压稳定剂和无菌水作 10 倍梯度系列稀释, 每个稀释度取 0.2 mL 于再生培养基中, 充分摇匀, 待凝固后, 将培养皿置于 30 $^{\circ}$ C 下, 倒置培养 4 ~ 5 d, 观察菌落生长, 计算再生率^[10-11]. 再生率 = (渗透压稳定剂稀释长出的菌落数 - 无菌水稀释长出的菌落数) / 培养基中加入的原生质体数 $\times 100\%$.

2 结果与分析

2.1 原生质体形成的最适菌龄

玫红穗状霉的生长曲线如图 1. 菌丝的菌龄对原生质体的形成有很大的影响. 不同生长时期的菌丝对酶的敏感度不同, 处于对数期的菌丝代谢旺盛, 对酶的敏感性高, 易于酶解形成原生质体; 而处于稳定期和衰老期的菌丝, 代谢能力降低, 细胞壁中几丁质含量增加, 难以酶解形成原生质体. 根据玫红穗状霉生长曲线, 确定其对数生长期为 20 ~ 32 h. 取培养了 26、28 和 30 h 的菌丝进行酶解, 其原生质体的产量分别为: $(2.100 \pm 0.950) \times 10^6$ 、 $(3.017 \pm 0.144) \times 10^6$ 和 $(3.383 \pm 1.804) \times 10^6$ mL⁻¹. 经方差分析, 菌龄对原生质体产量没有显著性差异 ($P > 0.05$), 因此, 选用培养 26 ~ 30 h 的菌丝均可用于制备原生质体. 为了获得较大的菌丝量, 本试验选用培养 30 h 的菌丝制备原生质体.

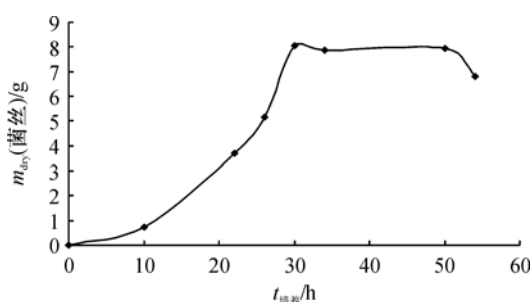


图 1 玫红穗状霉 GIM 3.476 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Spicellum roseum* GIM 3.476

2.2 酶的配比对原生质体产量的影响

有报道表明, 纤维素酶和蜗牛酶的配比通常为 1:1^[9,12], 本试验选用这 2 种酶与溶壁酶的不同配比进行酶解, 结果见图 2. 方差分析表明, 酶的配比对原生质体产量的影响有显著性差异 ($P < 0.05$). 由图 2 可知, 在纤维素酶和蜗牛酶的基础上添加溶壁酶, 原生质体的产量明显增加, 而当采用 10 mg/mL 纤维素酶 + 10 mg/mL 蜗牛酶 + 5 mg/mL 溶壁酶的混合酶液时, 原生质体的产量最高.

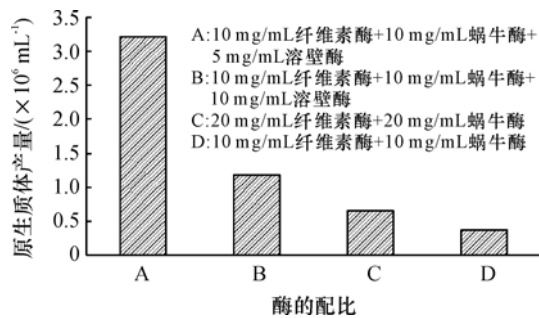


图2 酶的配比对原生质体产量的影响

Fig.2 Effects of enzyme system on the protoplast yield

2.3 酶解时间对原生质体产量及再生的影响

分别酶解1、2、3和4 h,比较原生质体的形成和再生情况(表1)。经方差分析,不同的酶解时间对原生质体产量的影响有统计学意义($P < 0.05$)。由表1可知,在一定时间内,原生质体的产量随酶解时间的延长而增加,但超过一定时间,原生质体的产量反而降低。再生率随着酶解时间的延长而逐渐降低。因此,酶解时间对原生质体形成和再生具有双重影响,综合考虑原生质体的产量和再生率,确定酶解时间为3 h。

表1 酶解时间对原生质体产量和再生率的影响

Tab.1 Effects of enzymolysis time on the protoplast yield and regeneration rate

$t_{\text{酶解}}/\text{h}$	产量/($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)	再生率/%
1	1.367 ± 1.060	16.250 ± 1.250
2	1.500 ± 0.400	13.333 ± 10.408
3	4.733 ± 2.429	8.493 ± 6.301
4	0.917 ± 0.153	3.580 ± 1.722

2.4 渗透压稳定剂对原生质体产量的影响

渗透压稳定剂是酶解液的作用环境,也是原生质体的存在环境。本试验分别采用NaCl、KCl、蔗糖和葡萄糖作为渗透压稳定剂(浓度均为0.7 mol/L)配制酶溶液进行酶解,原生质体产量分别为: $(0.350 \pm 0.265) \times 10^6$ 、 $(2.033 \pm 0.683) \times 10^6$ 、 $(0.200 \pm 0.132) \times 10^6$ 和 $(0.433 \pm 0.076) \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。经方差分析,不同的渗透压稳定剂对原生质体产量的影响有极显著差异($P < 0.01$)。可见,不同的渗透剂对原生质体的形成有明显的影响,其中以KCl为渗透剂时,原生质体的产量最高。

3 讨论与结论

本试验在探讨酶的配比对原生质体产量的影响时,发现溶壁酶的添加对原生质体产量有显著的影响。当采用10 mg/mL 纤维素酶 + 10 mg/mL 蜗牛酶的混合酶时,原生质体产量很低,而添加了5 mg/mL 溶壁酶后,产量显著增加。溶壁酶对脱壁效果的影响并不与其浓度成正比,添加5 mg/mL 溶壁酶时,原生

质体的产量要比添加10 mg/mL 溶壁酶的产量高。不同浓度单一的溶壁酶能否达到与混合酶同样的脱壁效果,还需做进一步的研究。

本试验中,玫红穗状霉原生质体的再生率比较低,可能与所用的再生培养基是以0.7 mol/L的KCl作为渗透压稳定剂(最适合原生质体制备时的渗透压稳定剂)有关,为了提高原生质体的再生率,对其他种类的渗透压稳定剂在不同浓度下对原生质体再生的影响还需继续探讨研究。

本试验摸索出制备玫红穗状霉原生质体的最佳条件为:选用培养30 h的菌丝,用10 mg/mL 纤维素酶 + 10 mg/mL 蜗牛酶 + 5 mg/mL 溶壁酶的混合液酶解3 h,以0.7 mol/L的KCl为渗透压稳定剂,原生质体的得率最高。获得数量较多、质量较好的原生质体是进行原生质体诱变及融合育种的前提。对玫红穗状霉的原生质体直接进行诱变,或者采用原生质体融合技术进行育种,是否会使其产纤维素酶的能力得到大幅度提高,须开展针对性的育种试验才能确定。这将是进一步评价这个产纤维素酶菌株开发潜力的重要内容。

参考文献:

- [1] BACHMANN B J, BONNER D M. Protoplasts from *Neurospora crassa*[J]. Journal of Bacteriology, 1959, 78: 885-887.
- [2] 刘限, 高增贵, 庄敬华, 等. 木霉菌原生质体的制备和再生的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(1): 37-40.
- [3] 吕天晓, 徐凤花, 李世贵, 等. 生防木霉菌原生质体的制备及再生研究[J]. 生物技术通报, 2009(4): 130-134.
- [4] 宋庆涛, 张国珍, 董金皋. 玉米大斑病菌原生质体的制备和再生[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 41-44.
- [5] 章运, 傅力. 沪酿3042米曲霉原生质体制备条件的研究[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2004, 22(6): 519-521.
- [6] 曾宏彬, 李泰辉, 叶运寿, 等. 穗状霉属——中国新记录属[J]. 菌物学报, 2008, 27(3): 459-460.
- [7] SILMAN R W, MCGHEE J E, BOTHAST R J. CMCase production by *Spicellum roseum* in liquid and solid culture[J]. Biotechnology Letters, 1984, 6(2): 115-118.
- [8] SILMAN R W, NELSEN T C, MCGHEE J E, et al. Improved CMCase production by *Spicellum roseum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1989, 58: 65-70.
- [9] 杨谦, 孙冬梅, 张晶. 黄绿木霉原生质体诱变育种研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(4): 62-67.
- [10] 林英, 曹冬煦, 曹松屹, 等. 绿色木霉原生质体形成条件的研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(12): 2328-2329, 2403.
- [11] 赵乐辉, 李颖, 吕淑霞. 木霉T21和T22原生质体制备和再生研究初报[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(1): 96-98.
- [12] 赵晨, 易宗春, 荣龙, 等. 斜卧青霉原生质体制备和再生的研究[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(1): 18-21.

【责任编辑 李晓卉】