

大肠杆菌 O₂ (Nor^r, Chl^s)、O₇₈ (Chl^r, Nor^s) 原生质体制备和再生的研究^{*}

任 涛 黄青云 欧守杼

(华南农业大学动物医学系, 广州, 510642)

摘要 为进行禽致病性大肠杆菌(*Escherichia coli*) 耐药标记弱毒株 O₂(Nor^r, Chl^s)、O₇₈(Chl^r, Nor^s)的原生质体融合, 培育融合双价弱毒菌株, 采用 EDTA 和溶菌酶处理制备原生质体的方法, 系统地探讨了原生质体制备及再生的条件, 摸索出细菌以酶 6 g/L 作用 25 min 后加上 EDTA(0.01 mol/L)作用 15 min 等为最适工作条件, 成功地获得了 90% 以上的原生质体制备率, 50% ~ 60% 的再生率。

关键词 禽大肠杆菌; 原生质体

中图分类号 S 852.612

微生物原生质体融合技术是 70 年代发展起来的一项微生物育种的新技术, 其关键步骤是出发菌株的标记、原生质体的制备、再生及融合. 该项技术应用在酵母和革兰氏阳性(G⁺)菌研究方面已取得了很多成果, 但在革兰氏阴性(G⁻)菌研究方面的报道还不多见, 其原因主要是 G⁻菌的细胞壁较复杂, 目前对原生质体制备和再生的最适条件了解不多. 为应用原生质体融合技术, 研究禽大肠杆菌(*Escherichia coli*) O₂ 和 O₇₈ 的融合双价弱毒菌株菌苗, 作者已用氟哌酸(Nor)、氯霉素(Chl)诱导培育成功耐药标记弱毒菌株 O₂(Nor^r, Chl^s)和 O₇₈(Chl^r, Nor^s). 本研究的目的是摸索两标记弱毒菌株的原生质体制备和再生的最适条件, 为它们的融合并培育融合双价弱毒菌株作好准备.

1 材料与方 法

1.1 主要材料

1.1.1 菌种 耐药标记禽大肠杆菌(*Escherichia coli*) O₂(Nor^r, Chl^s)和 O₇₈(Chl^r, Nor^s)弱毒菌株, 由黄青云等(1997)培育、提供.

1.1.2 溶菌酶(Lysozyme) 购自于上海丽珠东风生物技术有限公司, 酶活力为 1.0 × 10⁴ U/g.

1.1.3 培养基 按常规制备、保存及使用. 完全培养基(NB): 质量分数为 0.1% 胰蛋白胨(tryptone, 美国进口), 质量分数为 0.2% 酵母抽提物(yeast extract, 美国进口)质量分数为 2.0% 肉汤粉, NB 中加质量分数为 0.5% 葡萄糖, 加质量分数为 1.8% 琼脂琼粉为 NB 平板; 高渗完全培养基(HNB): NB 中添加 0.5 mol/L 蔗糖、0.02 mol/L MgCl₂、0.02 mol/L 顺丁烯二酸、质量分数为 0.1% PEG.

1.1.4 溶液 SMM 缓冲液: 蔗糖 0.5 mol/L, MgCl₂ 0.02 mol/L, 顺丁烯二酸 0.02 mol/L, 用

1997-03-18 收稿 任 涛, 男, 27 岁, 硕士

^{*} 广东省自然科学基金资助项目(1993~1996)

NaOH 调 pH 至 7.5, 10 磅高压灭菌 20 min 后备用; Tris 缓冲液: 0.01 mol/L Tris^oHCl, pH 7.0, pH 8.0; 高渗 Tris 缓冲液: Tris 缓冲液中加蔗糖到 0.5 mol/L, CaCl₂ 至 0.01 mol/L, pH 7.0; 0.1 mol/L 的 EDTA 溶液; 高渗美兰染液: 0.5 g 美兰溶解于 100 mL 的 0.5 mol/L 蔗糖溶液中。

1.2 方法

1.2.1 原生质体制备 将两标记菌株分别接种于 NB 培养液中, 37 °C 振荡培养过夜, 再按 1/10 接种量接种到新鲜的 NB 中, 37 °C 振荡培养 4~5 h (此时细菌繁殖处于对数生长期)。然后分别取 O₂(Nor^r, Chl^f) 和 O₇₈(Chl^f, Nor^s) 菌液各 4 mL, 4 000g 离心 20 min, 菌体用 0.01 mol/L Tris 缓冲液 (pH 7.0) 离心洗涤两次。再用高渗 Tris 缓冲液悬浮, 加入预热的溶菌酶溶液至 0.5~8 g/L, 37 °C 水浴处理 25 min 后, 加入 EDTA 至 0.01 mol/L, 在 37 °C 中保温 15 min, 作用过程中, 定时取 0.2 mL, 加入 2~3 滴高渗美兰染色 3~5 min, 然后观察原生质体的制备情况, 4 000 g 离心 20 min, 去上清液, 细胞用 4 mL SMM 悬浮, 取 2 mL 作原生质体制备率测定和再生试验, 剩下 2 mL 经 4 000 g 离心 20 min 后, 再用 SMM 0.2 mL 悬浮原生质体备用。

1.2.2 原生质体的再生培养 取原生质体制备液各 0.1 mL, 采用表面法分别加入含双抗 (Nor 和 Chl.) 及单抗 (Nor. 和 Chl) 的高渗或低渗各种培养基中, 37 °C 培养 2~3 d。

1.2.3 原生质体的制备率与再生率的测定与计算 按江行娟等 (1981) 的方法进行。

2 结果与讨论

分别用高渗美兰染色镜检法、HNB 平板培养计数法检测、计算, 结果 O₂(Nor^r, Chl^f) 的原生质体制备率为 90.0%~95.5%、再生率为 51.7%; O₇₈(Chl^f, Nor^s) 的原生质体制备率为 80.0%~83.3%、再生率为 60.4%, 详见表 1。这些结果受下列各种因素的影响。

表 1 双亲株原生质体的制备率与再生率

菌株	酶解前活菌数 /(菌数·L ⁻¹)	酶解后 NB 平板上菌数	酶解后 HNB 平板上菌数	原生质体制备率(%)		再生率 (%)
				平皿法	镜检法	
O ₂ (Nor ^r , Chl ^f)	3.1×10 ¹²	1.4×10 ¹¹	1.7×10 ¹²	95.5	90.0	51.7
O ₇₈ (Chl ^f , Nor ^s)	4.9×10 ¹²	8.2×10 ¹¹	3.3×10 ¹²	83.3	80.0	60.4

2.1 细菌的前培养、生长期和菌数

Nanne (1985) 报道, 在原生质体的制备过程中, 先采用不含葡萄糖等成分的前培养基培养, 可明显提高原生质体的制备率。作者实验得到的结果与上述报道一致, 用不经前培养基培养的细菌制备原生质体, 在再生接种平皿上到 10⁻⁵ 数量级才有菌落出现, 而经前培养基培养的细菌制备原生质体, 在 10⁻⁸ 数量级也有菌落出现; 处于对数生长期的细胞壁中肽聚糖的含量最低, 细胞壁对酶的作用最为敏感, 在同等条件下原生质体制备率较高 (Schaeffer et al, 1976)。但对数生长早期的细胞相对较为脆弱, 受酶的过度作用会影响原生质体的再生率 (林炜铁, 1991)。经过测定, O₂(Nor^r, Chl^f)、O₇₈(Nor^s, Chl^f) 的对数生长期在 3~6 h 之间。在试验中, 采用对数生长期 (4~5 h) 的菌体制备原生质体; 制备原生质体的细菌悬液菌数应在 10⁸~10⁹ CFU, 少则很难获得原生质体; 此外作者尚发现, 在整个制备过程中, 原生质体的洗涤与稀释都不能剧烈振荡, 否则会大量破坏原生质体。

2.2 酶和 EDTA 的工作浓度与作用时间的选择

表 2 酶与 EDTA 的工作浓度对原生质体制备率(镜检法)的影响

菌 株	酶浓度(作用 25 min)	EDTA 浓度(作用 15 min)	镜检法 (%)
	$/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	
$O_2(Nor^r, Chl^s)$	2	0.01	12
	4	0.01	54
	6	0.01	95
	8	0.01	99
$O_{78}(Chl^r, Nor^s)$	2	0.01	20
	4	0.01	75
	6	0.01	98
	8	0.01	99

表 2 实验结果表明,在一定范围内酶的工作浓度越高,原生质体的制备率就越高.但原生质体制备率太高则又影响再生率,这是因为在过高浓度下制备的原生质体受损伤较大,失去了重新建成原来细胞所必需的因子(庄增辉, 1985).所以最后确定 6 g/L 为酶去除大肠杆菌细胞壁的最适工作浓度.此外作者曾试用不同批号、不同厂家的酶,它们的最适工作浓度有时也有明显差异.

表 3 酶与 EDTA 的作用时间对原生质体制备率的影响

菌 株	加入 6 g/L 酶的作用		酶作用 25 min 后加入 EDTA 作用	
	t_1/min	镜检法制备	t_2/min	镜检法制备(%)
$O_2(Nor^r, Chl^s)$	5	0	3	25
	10	0	6	37
	15	0	9	59
	20	0	12	76
	25	0	15	98

表 3 的实验结果综合表明,6 g/L 的酶作用 25 min 后,加入 0.01 mol/L 的 EDTA 作用 15 min 细菌的原生质体制备率最高.作者在实验中单独用酶或者单独用 EDTA 作用都不能制备原生质体;先用 EDTA 处理后加酶作用的原生质体的制备率比先用酶处理后再加入 EDTA 作用的原生质体制备率要低得多.谢光临等(1988)、王兴龙等(1994)、Birdsell 等(1967)报道了相同的结论,这种结果的原因不明,其详细机理有待进一步研究.

2.3 蔗糖浓度和 pH 值

作者在对高渗缓冲液的筛选中,发现随蔗糖浓度增高,原生质体制备率升高,到 0.5 mol/L 时制备率达到最高,这与 Nanne(1985)的报道一致.作者尚发现 0.5 mol/L 蔗糖不仅是原生质体制备率最高的支持浓度,也是原生质体稳定保存和再生的最佳浓度.在实验中还发现, $O_2(Nor^r, Chl^s)$ 和 $O_{78}(Chl^r, Nor^s)$ 原生质体的制备在 pH 7~9 中较适宜.这与 Fodor(1976)和 Schaeffer(1976)以及 Birdsell 等(1967)报道的革兰氏阳性菌和真菌原生质体制备

在 pH 4~6 较适宜有较大差别。

2.4 镜检法与平皿法检测原生质体制备率的比较

在高渗美兰染色镜检中,原生质体呈球状,直径明显比细菌大,无明显的运动,原细菌则表现出明显的摆动、转动等运动特点,往往由于运动而不清晰。用镜检法可明显区别原生质体与细菌体。

从表1显示,对大肠杆菌原生质体制备率的检测结果,镜检法比平皿法低,作者分析认为平皿法中算出的原生质体实际包括了在制备过程中严重损伤致死的细胞,故镜检法的检测值更为准确。而且方法较简便。

2.5 再生培养基成分及琼脂浓度

原生质体再生的影响因素也很多,作者在前人的培养方法基础上加以改进,在高渗培养基中添加质量分数为0.1% PEG和加构成细胞壁的一些化学成分,例如葡萄、大肠杆菌细胞破碎物等,促进原生质体细胞壁的再生,结果原生质体的再生率有较明显的提高。

在再生培养基中,分别试用质量分数为0.8%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%的琼脂浓度来支持原生质体的再生和菌落生长,发现质量分数为2.0%~2.5%的浓度较适合。质量分数1.0%以下完全不能支持原生质体的生长。这与Joshus等(1957)报道的最小要求质量分数为0.8%琼脂浓度差别较大。

2.6 离子浓度

Nanne(1985)等许多研究者都曾提到,在高渗缓冲液中0.01 mol/L镁离子对原生质体具有稳定作用,但作者在大肠杆菌原生质体制备过程中,加入镁离子效果并不令人满意。从大肠杆菌细胞壁结构、成分和溶菌酶的作用机理上分析试以钙离子取代,结果原生质体制备率明显得到提高。

3 结论

综合本研究结果,已系统掌握禽大肠杆菌原生体制备和再生的各项参数,为下一步成功进行原生质体融合打下了可靠的基础,也为其它G⁻菌的原生质体融合研究提供了经验,并获得以下结论。

(1)本研究确定了细菌以酶6 g/L作用25 min后加上0.01 mol/L EDTA作用15 min等为原生质体制备的最适工作条件,并成功地获得了90.0%以上的原生质体制备率。

(2)本研究确定了原生质再生培养基的蔗糖浓度、pH值、离子浓度等因素的最佳值,成功地获得了50.0%的原生质体再生率。

参 考 文 献

- 江行娟,杨庆云,任大明,等. 1981. 枯草杆菌中通过细胞融合的质粒转移. 遗传学报, (1): 1~7
- 王兴龙,刘玉斌,冯来坤. 1994. 多杀性巴氏杆菌X73与P1059株原生质体融合株的构建. 中国兽医学报, 14(2): 177~180
- 谢光临,杨明久. 1988. 大肠杆菌与绿脓杆菌原生质球融合的研究. 微生物学杂志, 8(2): 7~10
- 林炜铁. 1991. 酵母细胞原生质体拆合技术的研究. 华南理工大学学报(自然科学版), 3(1): 1~8
- 庄增辉. 1985. 原生质体. 微生物学通报, 12(1): 42~43
- 黄青云,陈金顶,欧守杼,等. 1997. 禽大肠杆菌耐药标记弱毒菌株O₂(Nor^r, ChI^r)和O₇₈(ChI^r, Nor^r)的培育. 华南农业大学学报, 18(2): 85~89

- Birdsell D G, Cota — Robles E H. 1967. Production and ultrastructure of lysozyme and Etylenedi-aminetetraacetate—lysozyme spheroplasts of *Escherichia coli*. J Bacteriol (1): 427 ~ 437
- Fodor K, Alföldi L. 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaerium*. Pro Natl Acad Sci USA, 73(9): 2147 ~ 2150
- Nanne N. 1985. Molecular cytology of *Escherichia coli*. London: Academic Pr, 108 ~ 110, 215 ~ 226
- Joshus L, Clari J S. 1957. Protoplasts and L—type growth of *Escherichia coli*. J Bacteriol 75: 143 ~ 159
- Schaeffer P B, Hothkiss R D. 1976. Fusion of bacterial protoplasts. Proc Natl Acad Sci USA, 3(6): 2151 ~ 2155

STUDIES ON SPHEROPLAST FORMATION AND REGENERATION OF *Escherichia coli* O₂(Nor^r, Chl^s) AND O₇₈(Chl^r, Nor^s) STRAINS

Ren Tao Huang Qinyun Ou Shoushu

(Dept. Of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

With *Escherichia coli* O₂(Nor^r, Chl^s) and O₇₈(Nor^s, Chl^r) the two most important *E. coli* serotypes in poultry colibacillosis as parental strains, spheroplasts were prepared with EDTA and lysozyme, and all conditions affecting spheroplast formation were studied in detail. The rate of cells converted to spheroplasts 90.0% more, and the regeneration efficiency was 50.0% ~ 60.0%. This fusion technique may be a new way for cultivating high efficiency and divalent divalent vaccines.

Key words *Escherichia coli*; spheroplast

(上接第 23 页)

USE OF UNIFORM DESIGN IN PLANT TISSUE CULTURE

Xu Huasong¹ Tang Wei²

(1 College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642; 2 Dept. of Mathematics, Zhongshan Univ.)

Abstract

To investigate the best combination of hormone and explant during organogenesis of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Wan Li Bao Xin), the upper part of the hypocotyl (about 0.5 cm) of sterilized seedlings grown for 5 days was used as explant and MS added NAA 0.88 mg/L plus BA 0.1 mg/L, and the optimal medium determined by employing uniform design analysis.

Key words uniform design; lettuce; hormone; tissue culture; explant