

细菌的原生质体融合*

诸葛健

(发酵工程系)

原生质体融合作为一种新的基因重组手段是在1978年第三届国际工业微生物遗传学讨论会首先提出来的^[1]。作为生物工程学中改造生物本性的遗传改良手段,它具有基因工程需做的某些内容,而在手法上比基因工程容易,因此国内外微生物学家正在开展基础研究和应用研究。下面试作一个概括的叙述。

一、原生质体融合的几个特点

1. 杂交频度高

由于原生质体是将微生物细胞之间进行遗传物质交换的主要屏障之一的细胞壁消化掉的类似球形的活体,在融合时又加入了融合促进剂,所以频度明显高于常规的杂交方法。细菌种内融合频度已达 10^{-6} — 10^{-3} ,种间也达 10^{-6} — 10^{-4} 。

2. 接受合型或致育性的限制较少

二亲株中任何一株都可能起受体或供体的作用,因此有利于不同种属间细菌的杂交。已报道^[2,3,4,20],在 *Bacillus* (枯草芽孢杆菌), *Streptococcus* (链球菌), *Brevibacterium* (短杆菌), *Staphylococcus* (葡萄球菌)等革氏阳性菌和 *E. coli* (大肠杆菌), *Providencia* (天命菌), *Mycobacterium* (分枝杆菌), *Zymomonas* (发酵单孢菌)等革氏阴性菌中广泛进行了原生质体融合的研究。其中研究得最多的是 *Bacillus*。种间融合成功的报道有: *Bacillus amyloliquefaciens* (解淀粉芽孢杆菌) × *B. subtilis*, *B. licheniformis* (地衣形芽孢杆菌) × *B. subtilis*, *B. megaterium* (巨大芽孢杆菌) × *B. subtilis*, *B. pumilus* (短小芽孢杆菌) × *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* (金黄色葡萄球菌) × *S. epidermidis* (表皮葡萄球菌)等。

3. 遗传物质的传递较完整

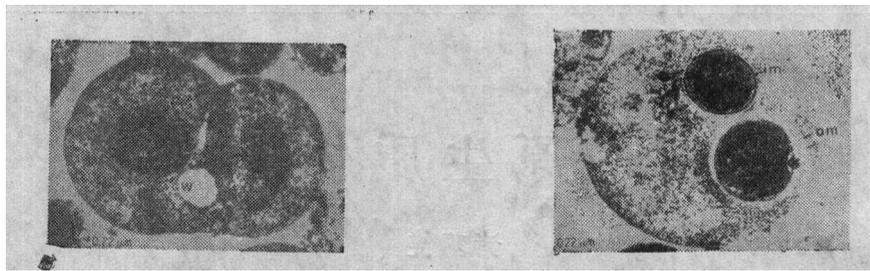
原生质体的融合是二亲株细胞和细胞核进行类似合二而一的过程。既有质配又有核配或基因交换。这样就具有将二个或更多个完整的基因组组合到一起的机会,在工业微生物中代谢产物的产量往往随产物的结构基因的拷贝数的增加而增加,通过融合增加拷贝数也是一条可以考虑的途径。图1是表示二株具芽孢的杆菌原生质体,通过融合达到质配将二个芽孢合并到一个细胞内的过程。

4. 存在着二株以上亲株同时参与融合形成融合子的可能性

由于加入了融合促进剂,使众多的原生质体聚集粘合成簇,大大增加多个原生质体融合的可能性。图2、3是采用电镜拍摄的照片,可以清楚地看到原生质体的簇状聚集及一个原生质

* 本文是1984年全国原生质体融合学术讨论会的大会邀请报告,发表时由作者稍加修改。

本文1984年1月25日收到



A. 细胞膜吻合消失

B. 二个芽胞已在一个细胞内

图1 具有芽胞杆菌的原生质体融合过程^[5]

体与其它二个原生质体形成二条融合沟的状况。这种融合就有可能将几株菌的特性汇集一起，而这正是工业微生物育种求之不得的。



图2 原生质体的成簇聚集粘合^[11]

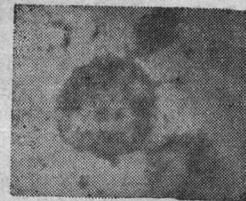


图3 三个原生质体的同时融合^[11]

5. 提高菌株产量的潜力较大

由于影响菌株产量的因素是多方面的，涉及的基因位点显然较多，它不仅涉及到有关代谢途径上的有关结构基因，调节基因，还涉及到提供初级代谢产物或辅助因子的基因，控制代谢途径的基因，渗透障壁控制基因等。但诱变育种时，一次或数次诱变是不能同时引起这些基因都起正突变的，甚至会起抵消作用，这就限制了诱变育种产量提高的速度。若能如图

4所示，将各经5次诱变的二变株进行种内原生质体融合，就有可能将各次诱变所积累的提高产量的潜力有效发挥出来。该法可获1024种基因型融合子。这种通过对多样化的基因型筛选获得高产株的机率较之单纯诱变育种要高。

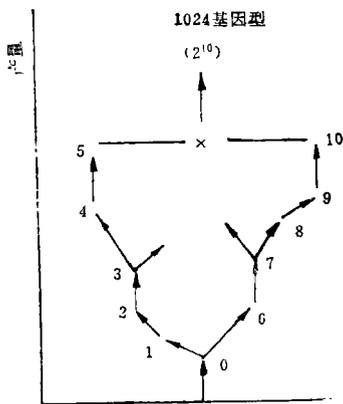


图5 经多次诱变结合原生质体融合提高菌株生产性能的图解^[1]

6. 有助于建立工业微生物的转化体系

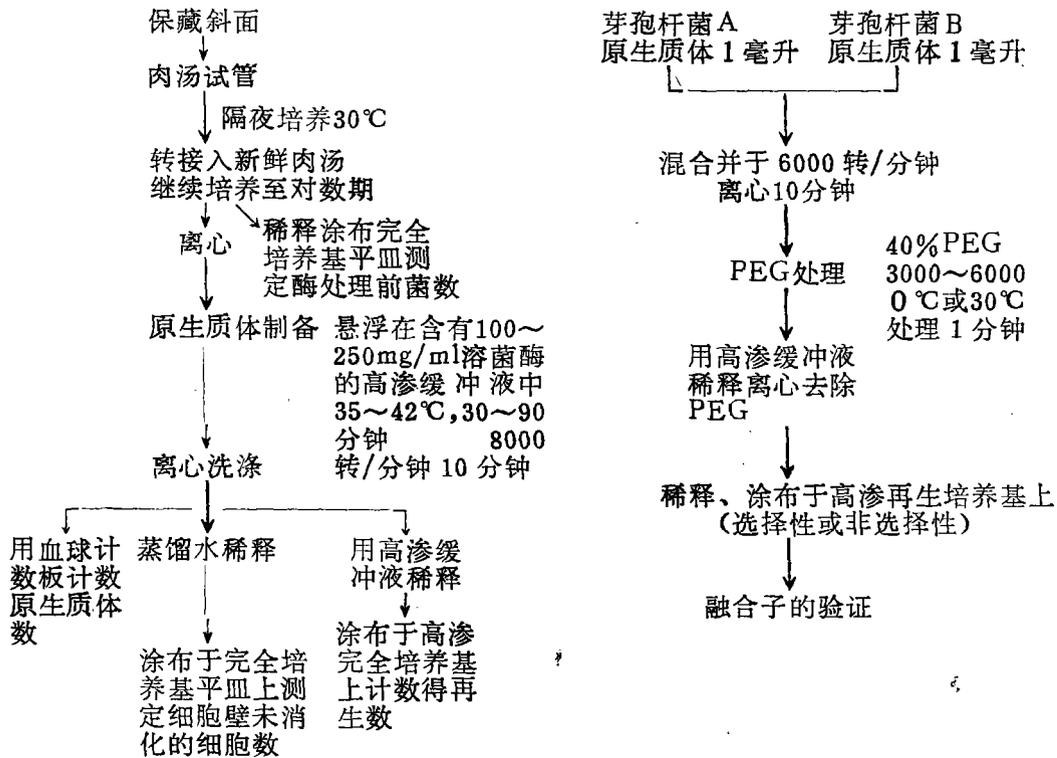
由于原生质体已经去除了细胞壁，采用氯化钙和温度的刺激方法可以大大提高细胞对DNA的通透性，而且采用聚乙二醇(PEG)处理可大大提高转化频度。作者以此进行蛋白酶产生菌种间原生质体的转化时其重组频度较融合要高100—1000倍^[6]。此外Chang等还发现以原生质体作为受体转化高峰与受体的感受态没有关系^[7]。由于至今一些有重要工业价值的微生物的转化体系尚未完善建

立，所以采用原生质体技术，将这些菌株改造作为基因工程的受体菌，就会推动工业微生物的育种的发展。

除转化外，原生质体的感染技术也是一个值得注意的领域 [2,8,9]。

二、融合步骤的要点

以芽孢杆菌为例图解如下 [10]：



三、原生质体的制备

1. 革氏阳性菌

枯草芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌广泛被用于原生质体的融合研究，其中枯草芽孢杆菌在发酵工业中具有广泛用途。这二种阳性菌的细胞壁能为单一的溶菌酶消化。图6为正常的芽孢杆菌形态，图7为其原生质体。

原生质体的释放往往是从杆菌的一端开始，这是溶菌酶最先消化的位点，然后原生质从



图6 正常的芽孢杆菌细胞 [11]

图7 芽孢杆菌的原生质体 [11]

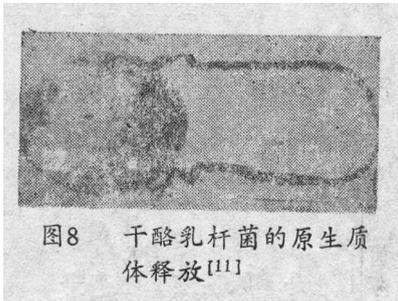


图8 干酪乳杆菌的原生质体释放^[11]

该处释出(图8)。

由于各种阳性菌的细胞壁成分和结构并不完全相同,因此它们对溶酶的敏感度不同。例如 *Streptococcus lactis* (乳链球菌), 仅用溶菌酶不能充分消化细胞壁, 它的原生质体需用溶菌酶和细菌 α -淀粉酶在含有3毫克分子氧化镁和20%蔗糖的 Tris-HCl 缓冲液中处理才能得到。此时低渗压抗性细胞已少于 9×10^{-5} 。对于 *Brevibacterium flavum* (黄

色短杆菌)^[13], 在对数生长期中期, 此时细胞密度近 10^8 /毫升, 加入0.3单位/毫升的青霉素G, 生长不受抑制。经振荡培养1.5小时后, 将细胞离心并悬浮于溶菌酶液中, 再静置30℃, 培养16小时, 就能获得原生质体。显然青霉素能抑制细胞壁的完整合成而有利于溶菌酶的作用。若将细胞培养在一种含有颇高浓度(各种菌不同)甘氨酸的培养液中^[8], 也能引起细胞壁的损伤。这是因为肽聚糖中的D-丙氨酸残基为甘氨酸代替所致。

除了酶的因素外, 菌体生理状态也是重要原因。对于芽孢杆菌多数为对数增殖期。作者认为沿用对数后期为好。

2. 革氏阴性菌

革氏阴性菌与阳性菌细胞壁的结构是不同的, 消化前者的细胞壁困难些。由于单溶菌酶的作用不足以完全脱壁, 所以开始用原生质球(Spheroplast)来称呼革氏阴性菌的部分脱壁的这种细胞。由于这个原因, 阴性菌在原生质体融合方面的研究远落后于阳性菌。但目前已能制备得到真正的原生质体, 只是制备条件必须强化。Weiss^[14,15]采用包括溶菌酶和EDTA处理大肠杆菌细胞, 可使大多数细胞的外壁消化。另外采用甘氨酸—溶菌酶—EDTA法也制备到天命菌的原生质体。也有用含抗生素 Fosformcin 或青霉素的培养基来培养细胞以制备原生质体的方法。

原生质体得率的估量主要是根据原生质体和细胞对低渗压溶液敏感性的不同, 再生前以蒸馏水处理, 然后用平皿计数而获得。

四、原生质体融合最适条件

Fodor等^[19]曾报导了初生态的磷酸钙可用于诱导原生质体融合。但后来由于PEG的发现, 该法才被替代了。Kao等^[16,17,18]可能是最早用PEG作为植物原生质体融合的促进剂的。他得到如下的一些重要结果: ①分子量在1000与6000之间一系列聚合度的PEG都是有效的。②较高浓度(50%W/V)较之较稀浓度(25%)的溶液更为有效。③不同分子重量(1540和4000)的PEG溶液在相同重量浓度是等效的。④适当浓度的钙离子的存在是必要的。⑤PEG溶液一加入, 原生质体间的粘着即强烈地发生, 融合就能较长时间地有效进行, 所以PEG的处理时间很短就足够了。

在研究中还发现15%的二甲亚砜(DMSO)能增强41—47%PEG浓度的诱导融合能力^[2], 所以提出42%PEG1000, 在15%DMSO存在下的处理方法。

在二项最早的芽孢杆菌原生质体融合研究中都采用36%PEG6000的条件^[19,20], 得到含有重组体菌落的频率大于0.5%。在这类菌中还未发现采用其它类似条件的报道。

在L型金黄色葡萄球菌的融合中, 50%浓度的PEG最好, 依次为40%, 30%。其分子

量 6000 的较 4000 和 1000 为好。

在这方面，对革氏阴性菌还未很好研究。

除了 PEG 本身的因素外，它还受各种阳离子浓度的影响。已确定融合时钙离子的浓度以 0.01M 为最佳，而钾、钠离子是会降低融合频度的。融合培养基的 pH 也很重要，有 Ca⁺⁺ 存在下，碱性条件(最高为 pH9) 可得最佳的融合频度；缺乏 Ca⁺⁺，低 pH，融合频度也较高，这可能涉及膜中氢键的键合。K⁺和 Na⁺降低融合效果，可能是由于 K⁺、Na⁺ 优先结合到质膜上，从而降低了 Ca⁺ 的刺激作用 [22]。

具有重要工业意义的枯草芽孢杆菌和地衣形芽孢杆菌已进行较广泛的研究，各菌株间能进行融合(表 1)，从表中可以看到不同菌株间的再生率并不相同，其融合频度也有差异。

表 1 B.subtilis 和 B.licheuiformis 的种内融合 [13]

菌 株	选择标记	再生频度	细菌融合频度	
			以加入的细菌数计	以再生较少的一方的亲株的再生数计
B. licheniformis				
10107 T thr		2.2 × 10 ⁻³		
FD0120 met pepA		9.9 × 10 ⁻⁴		
FD0250 his pepA		1.8 × 10 ⁻³		
[12107T × FD0120]	Thr ⁺ Met ⁺		2.5 × 10 ⁻⁵	9.9 × 10 ⁻²
[FD0120 × FD0250]	Met ⁺ His ⁺		6.6 × 10 ⁻⁶	1.1 × 10 ⁻²
[12107 × FD0250]	His ⁺ Thr ⁺		8.8 × 10 ⁻⁶	2.9 × 10 ⁻²
B. subtilis				
1—18 his β		2.5 × 10 ⁻²		
168s trpc strA		3.4 × 10 ⁻²		
168A trpc strA		1.8 × 10 ⁻³		
[1—18 × 168s]	His ⁺ Trp ⁺		2.4 × 10 ⁻⁵	4.5 × 10 ⁻³
[1—18 × 168sA]	His ⁺ Ade ⁺		1.1 × 10 ⁻⁵	1.2 × 10 ⁻²

原生质体融合，并非二亲株原生质体必须都要活的，其中另一株原生质体可以是死的(表 2)。这样，只需对活的一株作标记就可以了。

以巨大芽孢杆菌进行的不同处理的融合结果见表 2

表 2 B.megaterium 原生质体不同处理的融合结果 [24]

再生的菌落类型	菌 落 数 (每 毫 升)			
	融合 A	融合 B	融合 C	融合 D
B. megaterium THT	2.3 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸	3.0 × 10 ¹	3.0 × 10 ¹
B. megaterium ALTi	1.1 × 10 ⁸	9.0 × 10 ¹	1.1 × 10 ⁸	9.0 × 10 ¹
原 养 型	2.64 × 10 ⁵	7.60 × 10 ³	8.1 × 10 ³	0
每 10 ⁸ THT 融合得到的原养型数	114,780	3,300	3,530	0

融合A: THT原生质体×ALTi原生质体

融合B: THT原生质体×加过热的ALTi原生质体

融合C: 加过热的THT原生质体×ALTi原生质体

融合D: 加过热的THT原生质体×加过热的ALTi原生质体

可以清楚地看到亲株一方的原生质体虽被加热失活,但仍能与另一活的原生质体融合,但融合频度明显低于两亲株原生质体皆活的情况。当然二株原生质体都被加热,则无融合现象可言,因为连再生也不可能。

关于革氏阴性菌的融合,最近对工业上颇有应用前途的发酵单孢菌进行了原生质体融合,结果得到了高频度的发酵鼠李糖的融合子,呈现“返祖现象”,其它性能也出现互补(表3)。

表3 Zymomonas的融合^[25]

菌	株	基因型				表现型		
		fruA	fruB	sucA	sucB	Fru	Suc	Raf
出发株	Z-6-C	+	+	+	+	+	+	+
直接亲本变株	Z-6-C fru ⁻	-	-	+	+	-	+	-
	Z-6-C suc ⁻	+	+	-	+	+	-	-
融合子		(+)	+	+	+	±	+	+

fruA: 果糖的输送, fruB: 果糖的利用

sucA: 蔗糖渗透酶, sruB: 转化酶

通过枯草杆菌多重营养缺陷型原生质体融合^[20]可以达到营养互补,结果获得不稳定的双倍体,而稳定的融合产物仅仅是单倍体。选择的重组子中,非选择性标记发生了分离。在选择性培养基上生长的原养型形成的频度依赖于所用的缺陷型标记的数量和在染色体上的位点。近来^[8]发现自枯草芽孢杆菌多重缺陷型得到的融合产物中百分之几是双亲型的,即融合子中含有未改变的各自独立的双亲基因组。有趣的是,很大一部分这类双亲细胞可以无性繁殖许多代,在这种“双倍”相期,它们的表型是表现这一个或那一个亲本缺陷型的特征,为非原养型,因此可以假设这类特殊的染色体可以复制,但不表达。

对多重缺陷的大肠杆菌进行融合研究后,初步认为原养型菌落绝大多数是不稳定的,其标记的分离将继续许多代。根据分离的模式和形成菌落的营养要求,可以大体分成^[8]:包含稳定重组体和亲株缺陷型的混合菌落;不稳定原养型和少许不稳定重组体的混合菌落;仅由稳定的原养型细胞组成的菌落。

革氏阳性和阴性细菌种内融合成功的报道已经很多,主要的列表如下。

表4 细菌种内融合研究概况 [2,3,19,21,23]

菌株	再生率(%)	融合条件	测定融合方法	融合频度
<i>B. megaterium</i>	1—10	36% PEG 6000	再生培养基上直接筛选重组体	10^{-5} — 5×10^{-2} /涂布的原生质体
<i>B. subtilis</i>	1—10	36% PEG 6000	非选择性再生平皿影印法选择重组体	10^{-5} — 10^{-4} /涂布的原生质体
<i>B. subtilis</i>	10—75	36% PEG 6000 1450或4000	非选择性再生平皿影印法选择重组体	10^{-4} — 5×10^{-2} /涂布的原生质体
<i>B. subtilis</i>	10—75	36% PEG 6000或1500	分析非选择性再生单菌落中的重组体	高于含有特殊的重组体群单菌落的1%。10%是双亲型(biparents)
<i>B. subtilis</i>	未说明	36% PEG	电镜超薄切片观察	高于30%的单位含有二种或更多个原生质体(多于60%的原生质体处于融合中)
<i>B. subtilis</i>	不确切	36% PEG	根据原噬菌体互补的感染中心	高于原生质体总数的10%
<i>Brevibacterium flavum</i>	30	30% PEG 6000	在选择性培养基上直接筛选	5×10^{-6} /涂布的原生质体
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	未说明	40% PEG 6000	选择性培养基上直接筛选	1.5×10^{-4} /再生菌落数
<i>Staphylococcus aureus</i>	未说明	40% PEG 6000	选择性培养基上直接筛选	1.7×10^{-3} /再生菌落数
<i>E. coli</i>	0.1—1	$\leq 40\%$ PEG 6000	在再生培养基上直接筛选融合子	10^{-3} /再生菌落数
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0.1	30—35% PEG 6000+ 15% DMSO	从非选择性再生平皿上影印法选择融合子	3×10^{-5} /再生菌落数

与真菌相反,细菌种间质体融合主要对芽孢杆菌(表5)进行了研究,其他的报道还不多 [23,10]。

表5 芽孢杆菌属种间原生质体的融合和质粒的转移* [23]

菌株	用于融合的细菌数 (个/毫升)	再生率 (%)	融合频度	
			以加入的细菌数计 Ade ⁺ Cm ^r 融合子数	以较少再生亲株再生数计 Ade ⁺ Cm ^r 融合子数
1. <i>B. amylooligofaciens</i> F	1.7×10^8	1.2×10^{-1}		
2. <i>B. subtilis</i> LMHA (PTP-4) ** [1×2]	8.5×10^8	6.9×10^{-1}	4.5×10^{-7}	2.3×10^{-3}
3. <i>B. licheniformis</i> FD0120	8.8×10^8	1.1×10^{-1}		
4. <i>B. subtilis</i> LMHA (PTP-4) [3×4]	3.3×10^8	6.1×10^{-1}	1.5×10^{-5}	1.9×10^{-2}

续表 5

5. <i>B.licheniformis</i> FD0250	5.1×10^8	1.6×10^{-1}		
6. <i>B.subtilis</i> LMHA(PTP-4) [5×6]	2.3×10^8	$32. \times 10^{-1}$	2.6×10^{-5}	3.8×10^{-2}
7. <i>B.megaterium</i> A	2.2×10^7	2.6×10^{-3}		
8. <i>B.subtilis</i> LMHA(PTP-4) [7×8]	2.5×10^8	4.5×10^{-1}	1.0×10^{-6}	5.0×10^{-1}
9. <i>B.pumilus</i> IFD12110	8.4×10^8	3.2×10^{-2}		
10. <i>B.subtilis</i> LMHA(PTP-4) [9×10]	3.1×10^8	3.3×10^{-1}	9.6×10^{-8}	4.4×10^{-4}

*HCP琼脂培养基繁殖菌落, 以含 C_M 的培养基影印法来鉴定

**PTP-4为抗性质粒

作者采用生产中性蛋白酶的 AS1.398 菌株, 经诱变获得 AS1.398—28—6, 具有 $Arg^- Leu^- Rif^r Str^s$ 标记。另一株为生产碱性蛋白酶的 AS1.807, 经诱变得 AS1.807—9—9, 具有 $Thr^- Ade^- Str^r Rif^s$ 标记。表 6 为它们的融合结果。

表 6 *Bacillus* 种间原生质体融合^[10]

菌 株	标 记*	原生质体率 (%)	再生率 (%)	融合频度	稳定的融合子率(%)**
<i>B. subtilis</i> AS 1.398—28—6	$Arg^- Leu^-$ $Rif^r Str^s$	99.9			
×			3.30	2.28×10^{-5}	18.99
<i>B. licheniformis</i> AS 1.807—9—9	$Thr^- Ade^-$ $Str^r Rif^s$	99.9			

* Arg^- 精氨酸缺陷型, Leu^- 亮氨酸缺陷型, Thr^- 苏氨酸缺陷型

Ade^- 腺嘌呤缺陷型, Str^r 链霉素抗性或敏感(200单位/毫升)

Rif^r 利福平抗性或敏感(5单位/毫升)

**连续移植四代分离验证

已查明上述实验里形成的菌落形态差异甚大。从表观上 AS1.398-28-6 菌落有很多深皱折, 色泽较白; AS1.807-9-9 菌落皱折少而呈奶黄, 周围不规则, 生长较迟级; 融合子菌落大而平坦, 色泽灰白, 生长较快。测定了 300 株融合子, 若以 AS1.398 的中性蛋白酶的正常生产水平为 100%, 则融合子的产酶水平在 10—130% 之间(图 9)。已获得产酶水平提高幅度达 30% 具有生产潜力的融合子。

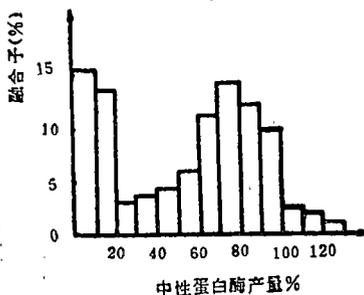


图 9 融合子中性蛋白酶产量的变化及相应比率^[10]

五、原生质体转化

革氏阴性菌和阳性菌原生质体转化都有报道^[7,26,27]。在枯草杆菌的转化系统中, 用 30% PEG6000 短时处

理可以得到很高的转化频度,但在巨大芽孢杆菌中使用同样的方法转化频度比较低。近来报道 20%PEG 存在下染色体 DNA 可使原生质体转化产生重组体,每个标记最高转化频度大约为再生原生质体的 5×10^{-5} ,最适 DNA 浓度为 1—2 微克/毫升。

在作者^[6]以原生质体融合及转化的系列研究中,以枯草芽孢杆菌为供体转化地衣形芽孢杆菌原的质体,发现转化频度达 10^{-5} — 10^{-2} ,大大高于它们的原生质体融合频度。除营养标记和抗性标记能互补外,产芽孢性能和分泌红色色素性能亦能转移。可以认为转化性能及转入 DNA 片断大小差异较大,而且对受体细胞培养的要求较低,因为原生质体转化与感受态关系不大。根据上述理由,作者认为原生质体转化是较原生质体融合更适于工业微生物的育种。图 10 是在 PEG 存在下以细胞或原生质体为受体细胞转化频度与转化时间的关系。

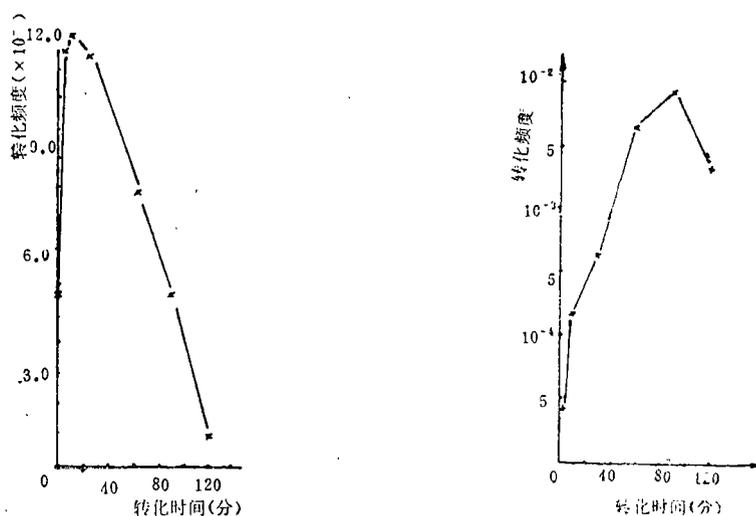


图10 PEG存在下以 *B. subtilis* 为供体转化
B. licheniformis 细胞和原生质体^[6]

受体标记: Thr⁻Ade⁻Str^rRif^r 供体标记: Arg⁻Len⁻Rif^rStr^r
二亲株营养缺陷和抗性回复频率皆小于 10^{-9}

六、再 生

任何一项新的原生质体技术,再生是最大的障碍。虽然能看到某些有价值的规律,但对最适的再生条件即便是亲缘关系非常密切的菌株,营养和其它条件的差异也是明显的。一般再生率为 1%~2% 再生率可用几种形式估量,例如在再生皿上的菌落数,同制备原生质体的培养物中细菌数的比率,或者用血球计数板计算原生质体数。

芽孢杆菌原生质体融合的早期研究,建立了二种再生方法。巨大芽孢杆菌是将原生质体涂布于高渗培养基的软琼脂层中,而枯草杆菌则直接涂布于培养基的表面。这二种菌的再生率为 1~10%。最近对枯草杆菌的最适再生条件已经进行了系统的探索^[2],并达到 100%再生。推荐的方法包括稳定剂的应用(血清白蛋白加到悬液中,明胶加到再生皿中)和温度的选择。

除了选择最佳培养基的成分外,物理条件也很重要,如再生皿的严重脱水,会增加再生率;增加再生培养基的渗透压(蔗糖浓度高于通常的 0.3M),对某些菌株的再生也有利;不同的缓冲液和高渗稳定剂也有不同的影响(表 7)^[10]。此外,再生率还与制备原生质体时

的条件有关,如酶解条件控制不好,会使再生率大大下降。还有如溶菌酶的浓度,反应时间,反应温度,对原生质体再生率和细菌融合频度也有明显的影响(图11)^[23]。在以枯草芽孢杆菌为试验对象的情况下,采用250微克/毫升溶菌酶,42℃进行原生质体制备,15分钟后就成球状,再生率随处理时间延长而下降,但融合频度却在45分钟时为最高。

表7 不同缓冲液和高渗稳定剂对 *Bacillus* 原生质体再生产的影响^[10]

配制酶制剂的缓冲液	高渗透稳定剂	再生率
0.55M NgCl , 0.2M 琥珀酸钠	0.5M 蔗糖	15.8
20mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pH6.7	0.3M NaCl	5.0
0.2M 顺丁烯二酸, 20mM	0.5M 蔗糖	2.1
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH6.7	0.3M NaCl	1.7

- , ▲: *B. subtilis* YS11, *B. subtilis* LMHA 浓布于 HCP + 腺嘌呤再生培养基时再生数
 ▽, ▼: YS11, LMHA 的渗透压耐性菌数
 ■: YS11, LMHA 的腺嘌呤互补个数(融合子数)
 □: 相对于再生个数的融合子数(细胞融合频度)

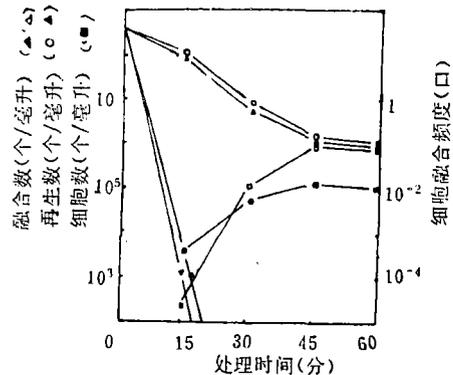


图11 42℃时溶菌酶(250微克/毫升)处理 *B. subtilis* 时,再生率和细胞融合频度的动力学^[23]

参 考 文 献

- [1] D.A.Hopwood (1979): The many faces of recombination, *Genetics of Industrial Microorganisms* (ed. by O. K. Sebek), American Society for Microbiology, p.1—20.
 [2] D.A.Hopwood (1981): Genetic studies with bacterial protoplasts, *Ann. Rev. Microbiol.*, 35: 237—72.
 [3] F. Gotz et al., (1981): Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in *Staphylococci*, *J.Bact.*, 143: 74—81.
 [4] K.Esser et al., (1981): Hybridization, *Biotechnology Vol. 1*, (ed. by H.G. Rehm and G.Reed), Verlag Chemie GmbH, p.305—29.
 [5] P.S.Chaeffer et al., (1978): Fusion of bacterial protoplasts, *Methods in Cell Biology XX* (ed. by D.M.Prescott): p.149—58.

- [6] 诸葛健等“蛋白酶产生菌种间原生质体的转化”,《无锡轻工业学院学报》1983第1期
- [7] C.Chang et al., (1979): High frequency transformation of *B.subtilis* protoplasts by plasmid DNA, *Mol. Gen. Genet.*, 168: 111—5.
- [8] L.Ferency(1981): *Microbial protoplast fusion*, *Genetics as a Tool in Microbiology*(ed. by S. W. Glover and D. A. Hopwood), Cambridge Uni. Press, p.1—47.
- [9] H.Toyama et al.,(1983): Protoplast-transfection of *Streptomyces chartrensis* SF 1623 with Actinophage r5 DNA, *Agri.Biol. Chem.*, 47: 1859—64.
- [10] 诸葛健等“蛋白酶产生菌种间原生质体融合的研究”,《微生物学报》,1984年第24期
- [11] 诸葛健等,“微生物原生质体融合的电子显微镜观察”,(待发表)
- [12] K.I.I. Thorne, et al.,(1972): The occurrence of bactoprenol in the mesosome and plasma membranes of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*, *J.Gen. Microbiol.*, 70: 87—98.
- [13] H.Kaneko, et al.,(1979): Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*, *Agri. Biol. Chem.*, 43: 1007—13.
- [14] R.L.Weiss(1976): Protoplast formation in *E.coli*, *J.Bact.*, 128: 668—70.
- [15] R.L.Weiss(1978): Methods for protoplast formation in *E. coli*, *Methods in Cell Biology*, Vol. 20(ed. by D.M.Prescott), p.141—7.
- [16] K.N.Kao, et al.,(1974): A method for high-frequency intergenetic fusion of plant protoplasts, *Planta*, 115: 355—67.
- [17] D. A. Hopwood, et al.,(1977): Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*, *Nature*, London, 268: 171—4.
- [18] D.A.Hopwood, et al.,(1979): Factors affecting recombinant frequency in protoplast of *S. coelicolor*, *J. Gen. Microbiol.*, 111: 137—43.
- [19] K.Fodor, et al.,(1976): Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 73: 2147—50.
- [20] C.Scheaffer, et al.,(1976): Fusion of bacterial protoplast, *Pro. Nat. Acad. Sci., USA*, 73: 2151—5.
- [21] J.N.Coetsee et al.,(1979): Genetic recombination in fused spheroplasts of *provience alcalifaciens*, *J. Gen. Microbiol.*, 114: 313—22.
- [22] 微生物的细胞融合技术和它的应用 p.129—132 (掘津教授来院讲学资料)
- [23] 关口顺一,“细菌的细胞融合技术”,微生物的细胞融合技术和它的应用, p.133—146 (掘津教授来院讲学资料)
- [24] K.Fodor et al.,(1978): PEG-induced fusion of heat-inactivated and living protoplasts of *B.megaterium*, *J.Bact.*, 135: 68—70.
- [25] 外村健三,“エタノール发酵性细菌 *Zymomonas* の育种”,日本农芸化学会,昭59大会,东京,讲演要旨集,1984
- [26] 江行娟等“枯草杆菌中通过细胞融合的质粒转移”,《遗传学报》,1981第8期。
- [27] Levi-Meyrueis et al.,(1980): PEG-induced transformation of *B. subtilis* protoplasts by bacterial chromosomal DNA, *Mol. Gen. Genet.*, 179: 589—94.

85018

光合细菌产氢研究(三)《无锡轻工业学院学报》1985年,第四卷,

第3期

关键词 光合细菌,固定化,产氢

摘要 Rhodospirillum rubrum NA 08609 固定在琼脂中,当固定化琼脂浓度为1.5~2.0%,初始菌体密度为3.0mg蛋白质/g凝胶时产氢是适宜的。产氢培养基“gB”不需抽真空,在30℃时固定化细菌的产氢速度比悬浮液快,效率比悬浮液高,但是在40℃时则相反。

Rhodospirillum rubrum NA 08609 固定在琼脂,角叉菜聚糖胶、海藻酸钙中,角叉菜聚糖胶固定化生长细胞比琼脂固定化生长细胞及海藻酸固定化细胞凝胶的产氢效率高,(71.8%)但是海藻酸钙固定化细胞凝胶在产氢速度方面较高。(285ul/cm²/h)

作者:毛醒一,三宅淳(日),川村杉生(日)

85017

细菌的原生质体融合《无锡轻工业学院学报》1985年,第四卷,第

3期

关键词 细菌,原生质体,融合

摘要 本文评论了有关细菌原生质体融合研究的进展,并报道了作者的部分研究工作。本文较充分讨论了原生质体融合的基本技术步骤,包括出发株的选择,原生质体的制备,融合,再生,筛选和特性验证。介绍并推荐以育种为目的的该技术的较佳使用条件。

作者:诸葛健

85019

CS-2型温度信息处理机的研制《无锡轻工业学院学报》,1985年,

第四卷,第3期

关键词 温度信息处理机, F值自动计算, 食品罐头中心温度测量
摘要 CS-2型温度信息处理机, 主要工作由专门设计的微机系统与相应的软件以及精密模拟电路担任, 并配以与丹麦新型硅胶补偿线的测温热电偶相容的传感器。主要功能包括罐头食品杀菌工艺中心温度自动测量、杀菌强度F值的自动计算以及定时显示与打印结果。本机曾在1984年全国微机应用成果展览会展出。

作者:唐永炎,毛寿璋,屠纪生

85020

经纱的等效长度及其变化特点《无锡轻工业学院学报》1985年,第四卷,第3期。

关键词 经纱,等效长度,织机上机条件

摘要 本文对织机上机经纱的等效长度进行了分析,以1511织机为例,在回转后梁和固定后梁的不同情况下,对织机上机经纱几何长度和等效长度进行了计算和对比,论述了等效长度变化的特点及其对织造工艺的影响。

作者:吴震世

85019

THE RESEARCH OF TYPE CS-2 TEMPERATURE INFORMATION PROCESSOR «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol. 4, No. 3, 1985

KEYWORDS Temperature information processor, F-Value automatic calculation, measurement for centre temperature of food can.

ABSTRACT This paper introduced Type CS-2 Temperature Information processor developed by authors. The processor operates upon a specially designed microcomputer system and corresponding softwares and precise analog circuitry. This processor is equipped with a new type thermocouple transducer made of silicon rubber compensated conductor used for temperature measurement. The transducer also has the advantage to be interchangeable with the Danish one. The main functions include multi-point center temperature auto-measurement and F-value auto-calculation, also information displaying and printing at scheduled time for sterilization technology in canning factories. In 1984, the instrument was exhibited in the national exhibition of micro-computer applications at Xian.

Authors: Tang Yongyan, Mao Shouzhong, Tu Gisheng

85017

FUSION OF BACTERIAL PROTOPLASTS «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol. 4, No. 3, 1985

KEYWORDS Bacteria, Protoplast, Fusion.

ABSTRACT The paper is a review of the advance of fusion of bacterial protoplasts. A part of author's work is also presented. A detailed discussion has been given on the fundamental procedures in protoplast fusion, including selection of initial strains, preparation of protoplasts, fusion, regeneration, selection and characteristic examination. Recommendations on the optimum condition for efficient application of the techniques for breeding purposes have also been introduced.

Author: Zhuge jian

85020

EQUIVALENT LENGTH OF WARP YARN AND ITS CHANGE «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol. 4, No. 3, 1985

KEYWORDS Warp yarn, Equivalent length, Loom setting.

ABSTRACT Equivalent length of warp yarn in weaving loom was analysed. The geometric length and equivalent length of warp yarn which is setting in loom whether revolving or fixed back-rest in the weaving machine mode 1511 were calculated and contrasted, the article also discussed the different characteristics of the equivalent length and its influence on weaving technology.

Author: Wu Zhenshi

85018

HYDROGEN PRODUCTION BY IMMOBILIZED CELLS OF PHOTOSYNTHETIC BACTERIA «Journal of the Wuxi Institute of Light Industry», Vol. 4, No. 3, 1985

KEYWORDS Photosynthetic bacterium, immobilized cell, Hydrogen production

ABSTRACT When Rhodospseudomonas NA 08609 was immobilized in an agar, the immobilized cell produced hydrogen when the suitable initial cell density of 1.5—2.0%(w/v) of agar and Ca 3.0mg(dry)/g gel was adopted.

Culture medium "gb" for hydrogen production evacuation is unnecessary. The immobilized cells evolve hydrogen with a higher rate and yield than in suspended state at 30°C, but it was much lower than in suspended state at 40°C.

When Rhodospseudomonas NA 08609 was immobilized in agar, Kappa-carra-geenan, Calcium alginate, the hydrogen productivity for immobilized growing cell in "Kappa-Carra-geenan" gel was higher (the yield 71.8%) than that of immobilized growing cell in agar and immobilized cell in calcium alginate. But the immobilized cell in calcium alginate gel beads has a high rate of 285 μl/cm²/h.

Author: Mao Xingyi, Jun MIYAKE, Sugio KAWAMURA