

文章编号:1673-1689(2006)04-0116-05

黑曲霉原生质体的制备、再生及转化条件

姚婷婷, 王正祥*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 为了建立原生质体介导的黑曲霉转化系统,研究了菌龄、酶系统、渗透压稳定剂、酶解时间对葡萄糖淀粉酶生产菌株黑曲霉 CICIM F0410 原生质体形成与再生的影响。结果表明,培养 4 d 的幼嫩菌丝体最适于制备原生质体;综合考虑原生质体形成与再生的情况,作者选用 1 mol/L 山梨醇为最适渗透压稳定剂,1 g/dL 蜗牛酶-1 g/dL 纤维素酶-0.1 g/dL 溶壁酶为最适裂解酶组合,30 ℃酶解 2.5~3 h,最适合的原生质体的再生培养基为含 0.6 mol/L MgSO_4 的 TZ 培养基。在 PEG 和 CaCl_2 存在条件下,以潮霉素 B 为选择性标记,质粒 pBC-Hygro 转化原生质体,每微克 DNA 可获得 4~5 个转化子。

关键词: 黑曲霉;原生质体;制备;再生;转化

中图分类号:Q 786

文献标识码: A

Preparation, Regeneration and Transformation of *Aspergillus niger* Protoplasts

YAO Ting-ting, WANG Zheng-xiang*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: To establish protoplast-mediated genetic transformation system of *Aspergillus niger*, the conditions for its protoplast preparation and regeneration of the mycelium incubation time, various enzymes and osmotic stabilizers were examined. The results showed that the mycelia incubated for 4 days were most suitable for protoplast release. 1 mol/L sorbitol was the most effective osmotic stabilizer and the mixture solution of 1 % snailase/1% cellulose/0.1% lysing enzyme was most favorable for protoplast preparation. The suitable incubation temperature and time for the release of protoplast was 30℃ and 2.5~3 h. For the regeneration of the protoplast prepared freshly, the TZ medium containing 0.6 mol/L MgSO_4 was the best. PEG and CaCl_2 mediated protoplast transformation of *A. niger* with pBC-Hygro was performed and 4~5 stable transformats per microgram DNA were obtained.

Key words: *Aspergillus niger*; protoplast; preparation; regeneration; transformation

黑曲霉(*Aspergillus niger*)不仅是重要的工业生产菌株,而且作为外源基因的表达系统具有优于

收稿日期:2005-09-02; 修回日期:2006-03-04.

基金项目:国家“863”计划项目(2003AA241160);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0497).

作者简介:姚婷婷(1983-),女,江苏如皋人,微生物专业硕士研究生;* 通讯作者.

大肠杆菌(*Escherichia coli*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的特点,因此采用分子生物学手段改造和利用黑曲霉具有十分重要的研究及应用价值。其中,外源基因转化系统的建立是进行黑曲霉基因工程改造最关键的步骤。目前研究的方法主要有:原生质体-PEG法、醋酸锂转化法、农杆菌介导的转化^[1]、电转化法^[2]等,其中原生质体-PEG法是丝状真菌转化中普遍使用的方法,并且已在若干实验菌株中成功实践。

丝状真菌原生质体的研究自 Emerson^[3]首次报导得到粗糙脉孢菌的类原生质体结构以来,已经取得了长足的进步。真菌原生质体广泛应用于原生质体融合育种,质粒、线粒体等外源基因的原生质体转化,细胞壁的重建以及生理生化研究等方面。因而,无论在理论上还是应用上,原生质体的研究均引起人们的浓厚兴趣。近年来,真菌原生质体的研究对象已从实验室模式种逐渐转向具有工业价值的生产菌株,以期获得更好的经济效益^[4]。作者以葡萄糖淀粉酶生产菌株黑曲霉 CICIM F0410 为对象,研究了其原生质体制备、再生及转化的条件,为进一步对其进行基因改造打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

黑曲霉(*Aspergillus niger*) CICIM F0410 (GA040517)为葡萄糖淀粉酶工业生产菌株,由江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心保藏。

用于遗传转化的质粒 pBC-Hygro:由作者所在实验室保藏,携带潮霉素 B 抗性基因(hph),限制性酶 *Hind*Ⅲ 酶切线性化。

1.2 培养基

TZ 固体培养基:营养汁粉(日本制药株式会社)0.8 g/dL,酵母提取物(OXOID)0.2 g/dL,蛋白胨(OXOID)0.5 g/dL,氯化钠 0.2 g/dL,淀粉 1 g/dL,琼脂 1.7 g/dL, pH 5.8。

CD 液体培养基:参照文献^[5]配置。

CD 固体培养基:在 CD 液体培养基中加入 1.7 g/dL 的琼脂。

1.3 试剂

溶壁酶(Lysing enzyme)购自 Sigma 公司;纤维素酶、蜗牛酶购自华美生物工程公司。

1.4 原生质体制备

黑曲霉菌株在 TZ 培养基上于 34 ℃ 培养 96 h,挑选标准菌落划线 CD 固体培养基,34 ℃ 培养 96 h,从 CD 平板上取 4 cm² 左右琼脂块放入内含 60

mL CD 液的三角瓶中,34 ℃ 培养 72~144 h,收集菌丝体,1 mol/L 山梨醇溶液洗一次,称取湿重,按质量体积比 1:10 加入裂解酶液,30 ℃,80 r/min 酶解。血球计数板监测原生质体的形成数量,确定酶解时间。将原生质体液过滤,取滤液,3 200 r/min 离心 10 min,弃上清液,分别用预冷的 0.6 mol/L KCl 溶液、S/C 溶液(1 mol/L 山梨醇,50 mmol/L CaCl₂)洗涤沉淀,离心。原生质体沉淀重悬于适量 S/C 溶液,置冰浴备用^[6]。

1.5 原生质体再生

将新鲜制备的原生质体适当稀释,涂布添加 0.6 mol/L MgSO₄ 作为渗透压稳定剂的 TZ 固体培养基,置 34 ℃ 培养 3~4 d,对形成的菌落进行计数(A),为消除由未除尽的菌丝片段再生出的菌落所造成的误差,同时将原生质体涂布于未添加渗透压稳定剂的 TZ 培养基,其再生菌落数作为对照(B),显微镜下观察的原生质体数,计为 C,再生率用下式计算:原生质体再生率=[(A-B)/C]×100%

1.6 原生质体的转化

转化实验前,先将黑曲霉 GA040517 的菌丝体培养液稀释后分别涂布含有 50、80、100、120、150 μg/mL 潮霉素 B 的 TZ 培养基上,34 ℃ 培养,以确定潮霉素 B 对 GA040517 生长的最小抑制浓度^[7]。

将制备好的原生质体离心,弃上清,洗涤,沉淀重悬于预冷的 S/C 溶液,使菌体浓度达到 1~3×10⁶ 个/mL。取 100 μL 原生质体悬液,加入约 1~10 μg 的线性化质粒 pBC-Hygro(10 μL 体系),用枪头轻轻吹吸混匀,加入 50 μL PEG 溶液(25% PEG8000,50 mmol/L CaCl₂,10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5),轻轻颠倒混匀,冰浴 20 min,取出后缓缓加入 1 mL PEG 缓冲液,室温放置 5 min 后加入 2 mL S/C 溶液,轻轻颠倒混匀,将其与含有潮霉素 B(100 μg/mL)的再生培养基混匀后倒平板,34 ℃ 培养 5~6 d。

2 结果与讨论

2.1 原生质体的形成

2.1.1 菌龄对原生质体形成的影响 分别取培养 3、4、5、6 d 的菌丝体制备原生质体,其中渗透压稳定剂采用 0.7 mol/L MgSO₄,裂解酶采用 2 g/dL 纤维素酶+1 g/dL 蜗牛酶。不同生长时期的菌丝体对裂解酶的敏感程度有很大的差异,培养 4 d 的菌丝体酶解 2.5 h 获得原生质体数最高,达到 8.5×10⁵ 个/mL,见图 1。这表明幼嫩菌丝的细胞壁更易被酶降解而释放出原生质体,但不是菌丝体的菌龄

越小,原生质体得率越高,培养 3 d 的菌丝体酶解 2.5 h 原生质体数仅 1.5×10^5 个/mL,原因可能是在菌的不同生长阶段,菌丝体细胞壁的结构组成有所不同导致^[8]。

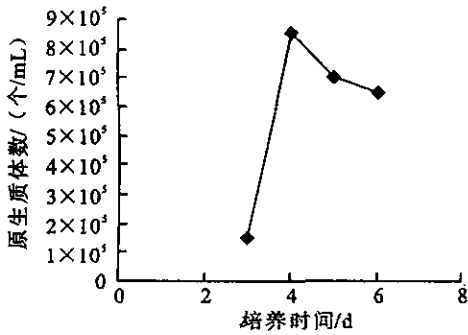


图 1 菌丝体培养时间对原生质体形成的影响

Fig. 1 Effect of mycelium incubation time on the preparation of the protoplasts

2.1.2 渗透压稳定剂对原生质体形成的影响 分别以蔗糖、葡萄糖、山梨醇、KCl、MgSO₄等作为原生质体形成的渗透压稳定剂,采用 1 g/dL 蜗牛酶—0.5 g/dL 纤维素酶—0.1 g/dL 溶壁酶的混合酶制备原生质体,结果见表 1。1.0 mol/L 山梨醇是菌株释放原生质体最佳的渗透压稳定剂,原生质体数达到 7.5×10^5 个/mL,其次是 1 mol/L MgSO₄,原生质体数为 3.0×10^5 mol/L;当浓度增加到 1.2 mol/L 山梨醇时,原生质体数仅为 1.5×10^5 个/mL。这一结果说明,渗透压稳定剂的种类及其浓度的选择对菌丝体原生质体的形成非常重要。

表 1 不同渗透压稳定剂对菌株原生质体形成数量的影响
Tab.1 Effects of different osmotic stabilizers on the released protoplasts of the strain

渗透压稳定剂	原生质体数/ (个/mL)
0.6 mol/L 蔗糖	2.0×10^5
0.6 mol/L 葡萄糖	—
1 mol/L 山梨醇	7.5×10^5
1.2 mol/L 山梨醇	1.5×10^5
0.6 mol/L KCl	2.0×10^5
0.7 mol/L MgSO ₄	1.5×10^5
1 mol / L MgSO ₄	3.0×10^5
裂解液(1mol/L NaCl, 0.4mol/L CaCl ₂)	2.5×10^5

2.1.3 不同裂解酶及浓度对原生质体形成的影响 由于丝状真菌细胞壁成分较为复杂,要获得较高的原生质体得率,需要选择合适的裂解酶,使用微生物产生的酶复合体或者商品酶的混合液比单独使用一种酶效果好^[9]。为此作者采用蜗牛酶、纤维

素酶和溶壁酶,将这 3 种酶进行了不同的组合及浓度配比(渗透压稳定剂采用 1 mol/L 山梨醇),结果发现,纤维素酶的作用比较明显,但由于酶液采用直径 0.45 μm 的无机相膜进行过滤除菌,浓度不宜过高,否则易造成膜孔堵塞,给过滤带来困难。1 g/dL 蜗牛酶—1 g/dL 纤维素酶—0.1 g/dL 溶壁酶的浓度配比获得的原生质体数最高,达到 1.5×10^6 个/mL,见表 2。

表 2 不同酶组合对菌株原生质体形成数量的影响
Tab.2 Influence of different commercial enzyme combinations on the released protoplast of the strain

酶	原生质体数/ (个/mL)
1%纤维素酶+1%蜗牛酶	2.8×10^5
2%纤维素酶+1%蜗牛酶	5×10^5
1%溶菌酶 11%蜗牛酶+ 0.1%纤维素酶+0.3%溶菌酶	2×10^5
1%蜗牛酶+0.1%纤维素酶+ 0.1%溶菌酶	3.8×10^5
1%蜗牛酶+0.5%纤维素酶+ 0.1%溶菌酶	7×10^5
1%蜗牛酶+1%纤维素酶+ 0.1%溶菌酶	15×10^5

2.1.4 酶作用时间对原生质形成的影响 选用培养 4 d 的菌丝体制备原生质体,酶解 5 h,定时取样。结果表明,随着酶解时间的延长,原生质体数逐渐增加,3 h 达到最高,为 1.0×10^6 个/mL,见图 2。延长酶解时间,原生质体数没有继续增加,这可能是由于裂解酶对一些早期释放的原生质体膜有破坏作用,影响了原生质体膜的稳定性。因此,酶解时间不宜超过 3 h,酶解完毕后,应尽快将酶液除去。

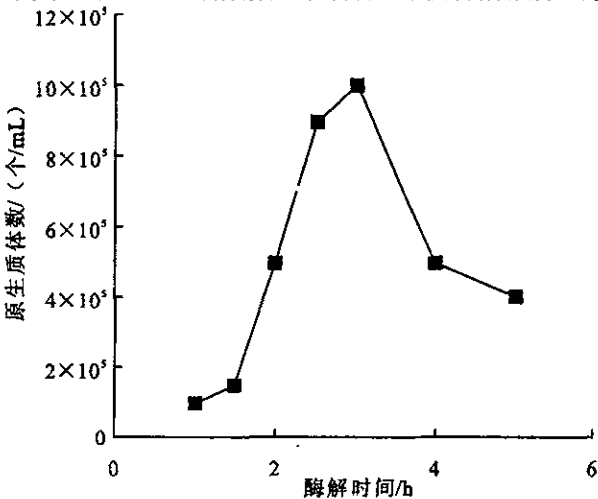


图 2 裂解酶酶解时间对原生质体形成的影响

Fig. 2 Effect of enzyme time on the preparation of the protoplasts

2.2 原生质体的再生

2.2.1 酶作用时间对原生质体再生率的影响 裂解酶对质膜系统会有一定程度的破坏,因此酶解时间的长短会严重影响原生质体的再生。将菌丝体分别酶解 1,1.5,2,2.5,3,3.5,4 h 后涂布再生培养基,结果见图 3。酶解 2~3 h 原生质体再生率差别不大,2.5 h 时最高,为 15%,低于 2 h 或高于 3 h 均有较大幅度降低。

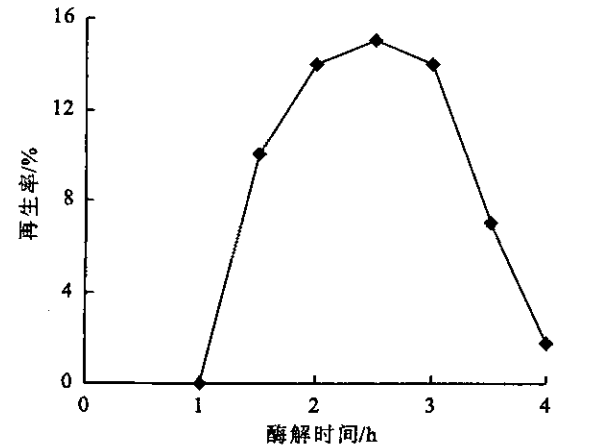


图 3 不同酶解时间对再生率的影响

Fig. 3 Effects of enzyme time on the regeneration of the protoplasts

2.2.2 不同渗透压稳定剂对原生质体再生率的影响 渗透压稳定剂的种类和浓度是维持和控制原生质体数量的关键因素,它不仅可以维持渗透压平衡,同时对裂解酶的活性反应具有一定的促进效应^[10],但是要注意它可能会加重原生质体的损伤或抑制细胞壁的合成^[11]。以蔗糖、葡萄糖、山梨醇、

NaCl、MgSO₄为渗透压稳定剂,分别加入 TZ 培养基,终浓度除山梨醇为 1 mol/L 外,其余 4 种均为 0.6 mol/L,结果见图 4。在以 0.6 mol/L MgSO₄为渗透压稳定剂的再生培养基上,原生质体的再生率最高,其次是 1 mol/L 山梨醇。

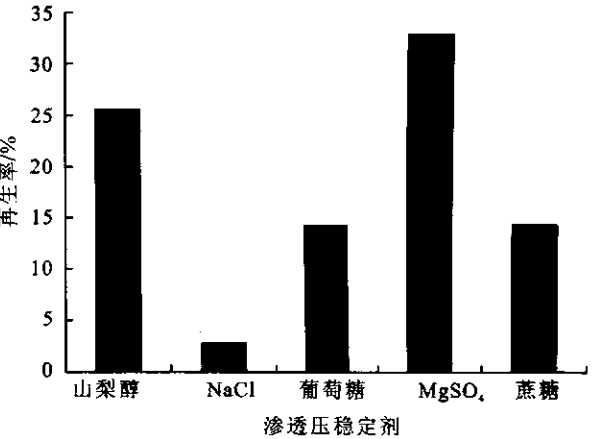


图 4 不同渗透压稳定剂对原生质体再生的影响

Fig. 4 Effects of different osmotic stabilizers on the regeneration of the protoplasts

2.3 原生质体释放的形态学观察

在 400 倍光镜下,观察菌丝体释放原生质体的过程,菌丝体在酶解 30 min 时已经开始释放原生质体(图 5A)。由菌丝顶端开始逐渐膨大,内容物由此逸出并脱离菌丝,形成原生质体。酶解 2 h 后,大部分菌丝被酶解成为片段,周围释放出原生质体,此时原生质体从菌丝顶端及侧面的细胞壁破口处脱出形成,释放(图 5B)。最终酶解结束时,视野中的菌丝体只剩下短小的片段,大量原生质体形成(图 5C)。

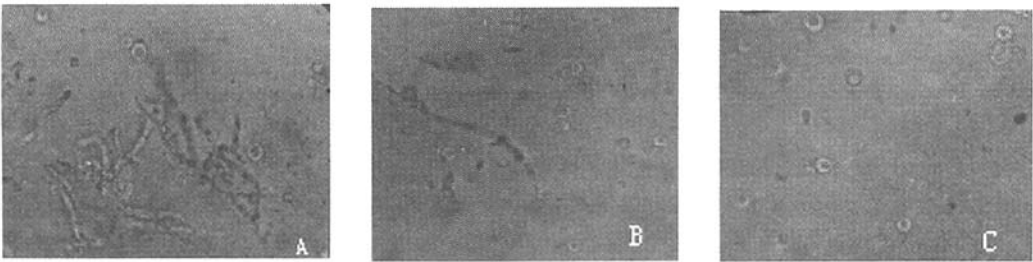


图 5 原生质体形成的过程

Fig. 5 Process of the release of the protoplasts

2.4 原生质体转化

将菌丝培养液分别涂布含有不同浓度潮霉素 B 的 TZ 平板上,结果发现:80 μg/mL 时仅有几个零星菌落生长;100 μg/mL 时,未观察到菌落生长。因此,确定潮霉素 B 对黑曲霉 GA040517 生长的最小抑制浓度为 100 μg/mL。

用带有潮霉素 B 抗性的质粒 pBC-Hgro 转化黑曲霉 GA040517,转化率为每微克质粒 DNA 4~5 个转化子。随机挑取 10 个转化子转接含 150 μg/mL 潮霉素 B 的 TZ 培养基,所有转化子均能良好生长,出发菌株作对照不生长。

3 讨 论

自 *Neurospora crassa* 转化首次报道后的 20 年来,许多选择标记被应用于各种丝状真菌的转化系统中,大致可将它们分为两类:营养互补选择标记和抗性选择标记^[13]。在营养互补选择标记中应用最为广泛的有 *pyrG*, *argB*, *trpD*, *niaD* 和 *amdS* 等。但工业丝状真菌常常难以找到相应的营养缺陷型作为受体株^[14],这样抗性标记就显示出其优点,即不必知道菌株的基因型亦不必构建便可以直接用作转化受体株。常见的药物抗性标记有:潮霉素抗性基因(*hygB*),博来霉素抗性基因(*ble*),G418 抗性基因(*neo*),腐草霉素抗性基因(*phe*)等。对以抗生素抗性为选择标记的真菌转化系统,受体菌本身对抗生素的敏感性至关重要,就黑曲霉 GA040517 而言,潮霉素能产生较强的抑制效果,并结合考虑到下一步研究中带有潮霉素 B 抗性的质

粒 pBC-Hgro 的使用,故作者选择潮霉素作为转化的选择标记。

制备丝状真菌原生质体一般采用刚萌发的孢子或生长时间短的幼嫩菌丝,因为菌龄过长,菌丝细胞壁会沉积不易被酶降解的物质,不利于原生质体的形成和释放^[15],但对产孢量小的菌种不适于用孢子萌发的方法,可采用玻璃纸培养法或液体培养法。

与原核生物相比较,由于真菌细胞壁的复杂性和没有适合应用的自主复制的质粒等原因,外源基因进入丝状真菌并通过重组整合染色体的频率不高,因此丝状真菌的转化效率一直很低。常用的转化方法有原生质体-PEG 法、电转化法、醋酸锂转化法、农杆菌介导的转化和限制酶介导的转化等。作者在进行黑曲霉 GA040517 原生质体转化时,发现电击转化的效率不及原生质体-PEG 法,转化率的提高还有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Vera M, Dirk M, Till S. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*[J]. **Curr Genet**, 2003, 43: 371—377.

[2] Ozeki K, Kyoya F, Hizume K, et al. Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 1994, 58(12): 2224—2227.

[3] Emerson S, Emerson M R. Production, reproduction and reversion of protoplastlike structure in the osmotic strain of *Neurospora crassa*[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1958, 44 :668—671.

[4] 甘志波,赵学慧. 黑曲霉 ANS-11 原生质体的制备[J]. **湖北农业科学**,1994,4:32—34.

[5] Gherbawy A Y. Effect of gamma irradiation on the production of cell wall degrading enzymes by *Aspergillus niger*[J]. **Int J Food Microbiol**, 1998, 40: 127—131.

[6] 周礼红,李国琴,王正祥,等. 红曲霉原生质体的制备、再生及其遗传转化系统[J]. **遗传**,2005, 27(3):423—428.

[7] Wernars K, Goosen T, Wennekes B M, et al. Cotransformation of *Aspergillus nidulans*: a tool for replacing fungal genes[J]. **Mol Gen Genet**,1987, 209:71—77.

[8] 何慧霞,朱平,李焕娄. α -麦角隐亭产生菌的原生质体诱变育种[J]. **真菌学报**,1996, 15(3): 215—219.

[9] Hamlyn P F, Bradshaw R E, Mellon F M, et al. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes[J]. **Enzyme Microbial Tech**, 1981, 3: 321—325.

[10] 韩黎,陈世平,索继红. 微小根毛霉致病菌的原生质体形成条件[J]. **微生物学通报**,1998,25(1): 27—29.

[11] Mendoza C G. Cell wall structure and protoplast reversion in basidiomycetes[J]. **World J Microbiol Biotechnol**, 1992, 8: 36—38.

[12] 杨炜,黄大年,王金霞,等. 以潮霉素抗性为选择性标记的稻瘟病菌原生质体转化[J]. **遗传学报**,1994, 21(4):305—312.

[13] 陈劲春,尉渤,周代福. 原生质体技术在工业微生物育种中的应用[J]. **工业微生物**,1997,27(4):34—36.

[14] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 528—532, 931—958.

[15] 王赓,杜连祥. 新月弯孢霉原生质体制备及再生条件的研究[J]. **微生物学通报**,1999, 26(1):21—23.

(责任编辑:李春丽)