

综合评述

细菌原生质体技术研究的进展

诸葛健

(发酵工程系)

细菌原生质体技术是指通过细菌细胞原生质体的形成,并以此为对象进行育种操作的系列技术。包括两亲株以上的原生质体间的融合;以一亲株原生质体为受体的DNA转化;以一亲株原生质体为受体,噬菌体为媒介的转染;以及以原生质体为处理对象的诱变等。不同的菌种,不同的条件下进行这些系列的操作,已在工业微生物界引起强烈的兴趣。

在工业微生物育种方面究竟原生质体技术的采用能获得多大程度的突破,目前尚无明确的评价。即使在某一研究中取得较大效果,但是否具有普遍意义仍难肯定。亲株间如DNA同源性的差异,限制性修饰系统的作用以及某些生理原因等,往往使得亲缘关系较远的菌种间仍难以形成稳定的重组体。但对于发展中国家,条件中等的研究单位或企业,无疑是一种值得一试、甚至在某种情况下,有可能获得良好结果的有效途径之一。

本文主要就原生质体技术本身的发展和改进,如细胞的原生质体化、重组过程和再生等,着重于芽孢杆菌、梭菌和棒杆菌等工业用菌进行综述,同时也介绍我国应用领域的研究现状。

1 原生质体的制备和形成

获得有活力,脱壁较为完全的原生质体是原生质体育种技术的关键步骤之一。细菌细胞原生质体化的基本步骤是类似的,但在实际工作中,各种细菌菌种甚至菌株间原生质体化的条件并不相同,有时差异很大。其差别主要是细胞壁组成和结构的差异引起细胞壁对溶菌酶的敏感性不同。为了达到同样程度的脱壁水平,可以采用不同的处理方法。

(1) 待原生质体化细胞的培养过程中添加有关化学物质如甘氨酸、青霉素^[1,2]和D-环丝氨酸^[3,5]等,使壁对溶菌酶的敏感性增加。细菌细胞壁都具有由肽聚糖组成的骨架,溶菌酶能切断N-乙酰葡萄糖胺与N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4键分子联接。甘氨酸的作用主要是它取代细胞壁中肽聚糖中的L-丙氨酸和D-丙氨酸残基,取代了D-丙氨酸,干扰了正常的交叉键合。青霉素能干扰甘氨酸交联桥与回肽侧链上的D-丙氨酸之间的联结,使细菌不能合成完整的具有空间网络结构的细胞壁,使细胞壁结构疏松,便于溶菌酶处理。由于只有G⁺细菌有L-甘氨酸联桥,G⁻细菌无,所以在培养基中加入青霉素只对G⁺细菌形成原生质体有效。D-环丝氨酸的结构与D-丙氨酸相似,可竞争性抑制丙氨酸消旋酶的作用。使L-丙氨酸不

本文1989年2月20日收到。

能转化成D-丙氨酸。细菌因无D-丙氨酸而不能完成N-乙酰胞壁酸五肽的合成, 组建不了细胞壁, 故使用D-环丝氨酸时加入一定渗透压的稳定剂有助于原生质体制备。作者^[1]在用各种方法处理谷氨酸产生菌棒杆菌时, 若原生质体率都达到99%时, 单用溶菌酶处理细胞形成原生质体较困难, 需经36小时处理方达要求。而加2%甘氨酸和0.67U/ml青霉素G予处理, 再用溶菌酶处理, 10小时就达到要求, 效果明显。Isao Karube等也发现甘氨酸的予处理对赖氨酸产生菌黄色短杆菌的原生质体制备有利^[2]。

(2) 下列因素对原生质体化亦有影响, 苏云金杆菌在不含葡萄糖的培养基中培养比在含葡萄糖的培养基中生长对溶菌酶更为敏感^[4], 又发现在快速生长培养基中生长的细胞远较在慢生长培养基中对溶菌酶敏感, 而葡萄糖存在与否并不影响对酶敏感性^[3]。收获细胞时, 在EDTANa₂或蒸馏水中反复洗涤会降低细胞对溶菌酶的敏感性, 冷冻细胞又会进一步降低敏感性, 处于对数生长早期的细胞而未洗涤就直接悬浮于溶菌酶中的迅速生长细胞对溶菌酶表现出最高的敏感性^[3]。此外, 所用的缓冲液, 离子强度及种类及一些化学物质的影响也是可观的^[25,6,7]。

(3) 自溶酶的应用 制备细菌原生质体时, 主要采用溶菌酶, 这种酶对G⁺细菌较为有效, 但对于G⁻细菌和部分G⁺细菌的细胞壁消化效果有时不佳。虽然此时可作用类似EDTA的表面活性剂, 或多种酶的组合, 但总有部分细菌对溶菌酶具有抗性^[8,6], 其抗性机制尚不清, 但一般多与细菌细胞壁的特殊结构有关。肽聚糖的修饰和限制肽聚糖接触性的可亲和细胞壁组分的存在如磷壁酸和糖醛酸磷壁酸或壁表面蛋白质组分是引起细菌溶菌酶抗性的主要因素。Temeyer^[3]在制备苏云金杆菌原生质体时发现, 纯化的苏云金杆菌的细胞壁对溶菌酶、溶葡萄菌素、几丁酶、胰蛋白酶和枯草芽孢杆菌酶具有抗性。解决对溶菌酶抗性的途径, 除了探索最佳生长条件和酶处理条件外, 可对细菌自溶酶的开发应用展开研究许多细菌能分泌自溶酶。当将这些细菌培养一段时间后, 细菌就会自引分泌一些胞外蛋白酶, 能破坏自身的细胞结构, 在低渗条件下引起自溶。若控制培养基的渗透压就可用来制备原生质体。特别是对溶菌酶抗性的菌株已有一些成功的例子^[9,7,13,3,11]。在苏云金芽孢杆菌研究中, 这种自我消化细胞壁的条件是37℃于50毫克分子Tris HCl, pH7.5, 含10毫克分子MgCl₂, 1毫克分子CaCl₂, 1毫克分子MnCl₂, 0.1毫克分子CoCl₂, 1毫克分子二硫苏糖醇, BSA(1毫克/毫升)和350~500毫克分子蔗糖, 加入苏云金杆菌自溶酶的外源制备物。此时原生质体形成速度和形成率都增加。另外在高浓度溶菌酶处理细胞时若影响了再生率, 采用自溶酶也是合适的。

杆菌细菌的原生质体释放一般是从杆菌的一端进行的, 但棒杆菌的“八”字形排列的细胞的原生质体释放是从棒状细胞裂殖断裂的一端开始, 释放的原生质体融合成球状而释放, 作者根据显微摄影的详细观察^[12]提出了原细胞鞘与融合的原生质体一起构成了“海鸥”状的释放模式^[1]。

2 原生质体的重组技术

原生质体的重组技术目前最常见的是融合, 其次为转化。它们的特点是都加入了重组促进剂。最初Fodor等^[13]报道初生态的磷酸钙可用于诱导原生质体融合, 后来才为聚乙二醇(PEG)所代替。作为植物原生质体融合的促进剂。Kao等^[14,15,16]发现分子量1000与6000之间的系列聚合度的PEG都有效, 而且较高浓度(50%w/v)较之低浓度(25%)更为有效。聚合

度1540和4000的PEG在相同重量浓度时是等效的。在融合过程中适当的钙离子浓度是必要的。当一加入PEG,原生质体间就发生强烈的粘聚,融合就能较长时间发生,所以PEG的实际处理时间很短。

除PEG本身的因素外,它还受各种离子浓度的影响^[17]。二价和一价阳离子对PEG诱导融合作用的影响较大,已确定融合时钙离子的浓度以0.01克分子为最佳,而钾、钠离子会降低融合频度,这可解是由于 K^+ 、 Na^+ 优先结合到质膜上,从而降低了 Ca^{++} 的刺激作用。

近年来已成功地电融合技术应用于动、植物和真核微生物的原生质体融合^[18,19,22,23]。电融合的理论基础首先是通过电泳使两细胞膜紧紧靠近,由于电场的作用、蛋白质移动产生无蛋白质脂层区,在紧紧靠近的膜区域电击穿导致壁孔形成,两个相对的脂层间形成脂分子桥,之后胞囊形成,两细胞间胞质相通,融合细胞形成^[20]。电融合技术用于细菌原生质体融合已有成功报道^[21]:将乳酸菌原生质体先悬于乳合浓度的PEG($<20\%$)中,然后通以直流电。在试验中发现PEG具有保护直流电场对原生质体的裂解作用。直流电场的高强度电压达72千伏/厘米。丙酮丁醇核状芽孢杆菌原生质体电融合也十分有前途。

有关融合亲本的选择也异常重要。一般亲缘关系越近,融合频度越高,稳定性越好。所以最初的研究工作多集中在种内,但种内融合远不能满足工业菌种改良的目的,现在的研究已发展到种间:属间甚至科间^[7,24,36]。就工业菌种而言,所选亲本希望具有相似或相同的生物合成某一产物的途径或者融合后相互修饰产生一种新的生物合成途径^[26],或者融合亲本带有一些特殊的性质如改变对底物的利用、改变对环境的耐受性、耐高温、高渗透压、耐毒性,增加凝聚性,增大细胞体,赋予杀伤性质以及提高生长速度等^[27,28,29,30,31]。

G^+ 和 G^- 细菌的原生质体转化有不少成功的报道。在枯草芽孢杆菌转化系统中,用30%PEG6000短时处理可得到很高的转化频度。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,作者^[24]以枯草芽孢杆菌为供体转化地衣形芽孢杆菌的原生质体,转化频度达 $10^{-5} \sim 10^{-2}$,大于它们原生质体融合频度100~10000倍,且多种特性实现转移。由于培养受体细胞的要求较低,受体细胞易处于感受态,所以作者认为原生质体转化较原生质体融合技术更适于工业微生物的育种。

3 再生

原生质体融合或转化后的重组子要成为一个无性繁殖系,首先必须再生,所以它是原生质体技术最后的关键一步。影响再生的因素很多,但原生质体化时酶处理的浓度、温度和时间影响颇大,枯草芽孢杆菌原生质体再生试验中^[32]发现细胞生长和溶菌酶处理时的温度间差异会增加细菌的再生数,PEG处理5分钟以上可明显降低再生率。由于在利于早期生长的完全或丰富培养基上再生,二倍体原生质体被诱导产生一个细胞壁,二倍体细胞于两条染色体复制之前分裂,使得遗传重组机会下降,因此Gabor等^[32]建议选择性地调节融合重组子的再生环境,如在MM而不在CM上,可稳定二倍体的形成和增加下一步的重组频度。对于像质粒等染色体外的遗传物质的交换则不希望有核的融合,这可在CM或丰富培养基上再生。苏云金芽孢杆菌等分泌自溶酶的细菌原生质体再生是较为困难的,这与它能分泌自溶酶有关,若在高渗缓冲液中加入苯甲基碳酰氯可利于原生质体再生^[32]。BSA,明胶可诱导原生质体的再生^[34,35]。在一种外加了3%聚乙烯吡咯烷酮的高渗半合成培养基上,枯草芽孢杆

菌的原生质体再生率达到了92~100%^[35]。而琼脂含量越高,再生率越低^[35]。另夹层法比涂布法的再生频率也高得多^[11]。

4 我国原生质体技术的研究概况

就微生物范畴而言,我国的原生质体技术的研究起步是早的。据不完全统计,从1981年起至1988年全国主要学术刊物上这类研究报告约50篇,其中以细菌为研究对象的最多。在这些研究中,真正属于工业微生物育种范围的约占三分之一,就产品来分有抗生素,酶制剂,氨基酸,农药与农抗等。可以说,我国几乎在微生物及工业微生物的许多领域都开展了研究

在工业用细菌采用原生质体技术育种方面已有几项成果引起人们的注意。王宪、范云六^[26]用苏云金杆菌以色列变种和苏云金杆菌库斯塔基变种进行了PEG诱导的原生质体融合,用抗药性标记对融合子进行了选择,在198株融合子中,有17株稳定传代10次以上,它们具有两个亲本菌株所具有的一些特性,用SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳研究了稳定融合子的晶体毒素蛋白的带。杀虫试验表明,融合形成的杂种株具有杀蚊子子和鳞翅目幼虫的能力。这为通过原生质体技术选育具有广谱杀虫剂的微生物农药开辟了一条新的可能途径。周东坡等^[36]关于北京棒杆菌与枯草芽孢杆菌科间原生质体融合的研究结果也颇使人兴奋,其结果之一是得到了既能产淀粉酶又能产谷氨酸的融合子,这在简化淀粉水解工艺上将会走出新的途径。其结果之二是从融合子中筛选出了几株在摇瓶产酸水平上几乎提高一倍的高产株,为工业用菌缘杂交作出了榜样。作者和同事自1979年以来即对蛋白酶产生菌地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌进行种间的原生质体技术育种的系列研究。包括原生质体融合^[1]、原生质体转化^[24]、融合子的细胞和原生质体诱变^[37]及显微镜和电镜的系统观察^[12]。首次获得具有工业价值的融合子、转化子和突变株,对推动我国的原生质体技术研究的开展起了一定的作用。

中国微生物学会分子生物学及生物工程专业委员会基于原生质体技术研究在我国广泛开展这一情况,于1985年召开全国原生质体融合学术讨论会,1988年又召开了全国分子育种学术讨论会,集中全国的有关学者进行了交流和讨论。我国近年来在有关生物、发酵、生物化工等专业的教学上,也注意了将这项新技术列入教学内容,有的学会还举办了学习班。无锡轻工业学院自1983年开始即在研究生和本科高年级举办以原生质体技术为主要内容的工业微生物育种技术的学位课程和选修课。在1985年发酵专业第一期工程师学习班上也将此课程作为工程师知识更新的内容之一^[39]。

5 原生质体技术的发展前景

任何一项新技术都不是完美无缺的,原生质体技术在育种上的应用也是如此。在国际上刚兴起这股热潮时,人们期望过大,有些不切实际的想法。日本学者将其归入遗传工程可能也是将其估计过高。近年来国内外已获得不少可喜的成就,但毕竟未达到理想的境界,人们还在不断完善这项技术。

由于原生质体育种技术在设备与试剂方面要求不太高,实验技术又低于遗传工程,所以应该说这项技术是符合我国国情的。只要坚持不懈,用科学态度正确对待这项技术,相信会有更丰硕的成果涌现。

参考文献

- 1 诸葛健等.微生物学报,1986;26:346~349

- 2 Isao Karube, et al. *J Biotechnol*, 1987; 6: 1~7
- 3 Temeyer K B, et al. *J Gen Microbiol*, 1987; 133: 503~506
- 4 Martin P A W, et al. *J Bact*, 1981; 145: 980~983
- 5 Okanishi M, et al. *J Gen Microbiol*, 1974; 80: 389~400
- 6 陈乃用等. *微生物学报*, 1986; 26: 134~142
- 7 诸葛健等. *微生物学报*, 1984; 24: 74~79
- 8 Araki S, et al. *J Biol Chem*, 1972; 247: 6312~6322
- 9 Kawagishi S, et al. *J Bact*, 1980; 141: 137~143
- 10 Deshpanda, et al. *Biotechnol Lett*, 1987; 9: 49~52
- 11 Hrmova M, et al. *Curr Microbiol*, 1987; 16: 33~38
- 12 诸葛健等. *工业微生物*, 1986; 16: 6~10
- 13 Fodor K, et al. *Proc Nat Acad Sci, USA*, 1976; 73: 2147~2150
- 14 Kao K N, et al. *Planta*, 1974; 115: 355~367
- 15 Hopwood D A, et al. *Nature, London*, 1977; 268: 171~174
- 16 Hopwood D A, et al. *J Gen Microbiol*, 1979; 111: 137~143
- 17 Ferenczy L. *Microbial Protoplast Fusion, in Genetics as a Tool in Microbiology, Symp 31. Cambridge University Press, 1981*
- 18 Neumam E, et al. *Natur Wissenschaften*, 1980; 67: 414~415
- 19 Weber H, et al. *Curr Genet*, 1981; 165~166
- 20 Zimmermann U. *Biochem Biophys Acta*, 1980; 69: 227
- 21 Read W M. *J Gen Appl Microbiol*, 1987; 33: 287~294
- 22 汪和陆等. *生物工程学报*, 1986; 2: 44~51
- 23 张博润等. *生物工程学报*, 1986; 2: 29~34
- 24 诸葛健等. *无锡轻工业学院学报*, 1983; 1: 71~79
- 25 郭兴华等. *微生物学报*, 1982; 22: 263~268
- 26 王宪等. *生物工程学报*, 1987; 3: 29~37
- 27 杜株还等. *生物工程学报*, 1985; 1: 59~62
- 28 Chen Wei, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1987; 53: 542~548
- 29 邢孔昭等. *生物工程学报*, 1988; 4: 48~54
- 30 Pina A, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1986; 51: 995~1003
- 31 日本公开特许. 83-158185
- 32 Gabor M H, et al. *J Bact*, 1979; 137: 1346~1353
- 33 Vyskocil P, et al. *Biotechnol Tech*, 1987; 1: 25~30
- 34 Lee-Wickner L J, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1984; 48: 994~1000
- 35 周东坡等. 北京棒杆菌与枯草杆菌间原性质体融合的研究(内部交流材料)
- 36 诸葛健等. *生物工程学报*, 1986; 2: 68~69
- 37 诸葛健等. *工业微生物*, 1988; 6: 15~18
- 38 诸葛健. *中国调味品*, 1985; 6~10