

文章编号: 1673-1689(2006)05-0020-05

产紫杉醇内生真菌 *Fusarium maire* 的 原生质体制备和再生

徐峰, 陶文沂*, 程龙, 郭立佳

(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:通过正交设计等实验方法,详细的研究了培养基成分、酶系组成、菌龄、渗透压缓冲剂、pH、酶解温度、时间和再生培养方式等多种因素对 *Fusarium maire* 原生质体制备和再生的影响。实验结果表明:将 *Fusarium maire* 通过先静止 2 d 再以 180 r/min 震荡 2 d 后,以 0.6 mol/L 的 KCl 配制的 pH 为 5 的复合酶(3 mg/dL 溶壁酶、2.5 mg/dL 蜗牛酶、1 mg/dL 溶菌酶和 0.5 mg/dL 纤维素酶)中,32 °C 恒温酶解 4 h,原生质体制备产量达 3.2×10^7 个/mL,纯化后的原生质体在 25 °C,以 0.6 mol/L 的蔗糖配制的 YCM 再生培养基上单层培养,其再生率达 8.9%。为今后的通过原生质体融合和诱变研究,构建紫杉醇工程菌奠定了基础。

关键词:原生质体;内生真菌;紫杉醇

中图分类号:Q 813

文献标识码:A

Formation and Regeneration of Protoplasts of Taxol-Producing Endophytic Fungus *Fusarium maire*

XU Feng, TAO Wen-Yi*, CHENG Long, GUO Li-Jia

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

Abstract: A fast and reliable method to obtain protoplasts from *Fusarium maire* which could produce taxol was reported. After 2 days of still culture and 2 days of shaking-culture at 25 °C, the mycelials was treated with a combination of lywallzyme(3 mg/dL), snailase(2.5 mg/dL), lysozyme(1 mg/dL) and cellulase(0.5 mg/dL) in pH 5 and 0.6 mol/L KCl used as the osmotic stabilizer. The high protoplast yield of 3.2×10^7 /mL was obtained in 4 h at 32 °C. The conditions of protoplast regeneration were also investigated. The protoplasts were purified and regenerated on the solid YCM at 25 °C, using 0.6 mol/L sucrose as the osmotic stabilizer. A high regeneration rate was reached at 8.9%.

Key words: protoplast; endophytic fungus; taxol

紫杉醇最早是于 1971 年, Wani^[1]等从短枝红豆杉(*Taxus brevifolia*)树皮中分离得到的单体二萜

收稿日期: 2005-11-09; 修回日期: 2006-03-04.

基金项目: 国家自然科学基金项目(NBSFC30470016).

作者简介: 徐峰(1980-)男, 江苏无锡人, 微生物与生化药学硕士研究生. * 通讯作者.

类生物碱化合物,被命名为紫杉醇(Taxol)。随后, Schiff等证实紫杉醇具有独特的抗癌机制,1992年被美国食品与药物管理局(FDA)批准作为抗晚期癌症的新药上市。目前紫杉醇主要是从红豆杉的树皮中提取,而红豆杉的生长缓慢,资源缺乏^[2]。从1993年开始,国外学者 Stierle A^[3], Strobel GA^[4], Li JY^[5]等均报道了从红豆杉树皮及其他植物中分离到了多种可产紫杉醇的内生真菌。国内学者周东坡^[6]、邱德有^[7]等也相继报道分离到产紫杉醇及其类似物的报道,其产量由每升几十纳克到上百微克。

2003年,本实验室研究人员从南方红豆杉树皮中分离到一株内生真菌 *Fusarium maire*,产量约20~30 μg/L。考虑到其良好的应用前景,首先对其进行原生质体的制备和再生研究,为进一步的原生质体诱变育种和融合创造条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 本文采用的一株红豆杉内生真菌 *Fusarium maire* 编号 y1117,由作者所在实验室提供。

1.1.2 培养基

斜面培养基(PDA固体培养基):马铃薯200 g(去皮煮汁,过滤取液),葡萄糖20 g,琼脂20 g,水1 L, pH自然。

平板培养基(A)CM培养基:MgSO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1 g,葡萄糖20 g,蛋白胨2 g,酵母膏2 g,琼脂20 g,加水至1 L, pH自然。(B)再生固体培养基:相应的平板培养基中加入相应的渗透压稳定剂。(C)再生半固体培养基:将再生固体培养基中的琼脂浓度降至7 g/L即可。(D)SMY再生固体培养基:蔗糖10 g,麦芽糖10 g,酵母膏4 g,琼脂20 g,渗剂,加水至1 L, pH自然。

液体培养基(A)PDA培养基:马铃薯200 g(去皮煮汁,过滤取液),葡萄糖20 g,水1 L, pH自然。(B)酵母浸膏完全培养基(YCM):在CM培养基中把蛋白胨和酵母膏的量均提高至5 g/L。(C)MCM培养基:在CM培养基中添加微量元素溶液10 ml/L,微量元素溶液每升中含4 mg MgSO₄, 1 mg CuSO₄·5H₂O, 7 mg MnCl₂·4H₂O和10 mg FeSO₄·7H₂O。(D)基础种子培养基(BSM):葡萄糖20 g,硝酸铵3 g, MgSO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g,加水至1 L, pH自然。

1.1.3 酶试剂 溶壁酶(Lywallzyme),纤维素酶(Cellulase),蜗牛酶(Snailase);溶菌酶(Lysozyme)

称取所需质量浓度的酶,采用相应的渗透压稳定缓冲液配制,经0.45 μm微孔滤膜过滤除菌后备用,现用现配。

1.1.4 渗透压稳定剂 0.6 mol/L NaCl, 0.6 mol/L KCl, 0.6 mol/L 甘露醇, 0.6 mol/L 蔗糖。

1.2 方法

1.2.1 菌丝体的培养 先在斜面培养基上活化出发菌株一次,然后在25℃,装液量为300 mL三角瓶中装入50 mL,先静止2 d再180 r/min振摇2~3 d的方式培养。培养好的菌丝体以5 000 r/min,离心20 min,收集菌丝体,用渗透压稳定剂洗涤两次,再转入平底试管。

1.2.2 原生质体制备 取0.25 g湿菌体加入1 mL酶液在平底试管中震荡摇匀,在适宜的温度下酶解,反应期间每隔一段时间吸取少量酶解液镜检观察菌丝变化和原生质体制备情况,用血球计数板计算原生质体数。酶解结束后,加入0.5倍酶液体积的渗透压稳定剂,涡旋混合后,用三层镜头纸过滤除去残存的菌丝体及菌丝片段,滤液以4 000 r/min离心10 min,沉淀的原生质体用渗透压稳定剂洗涤两次后重新悬浮于收集得纯化的原生质体。

1.2.3 原生质体的再生 在经过纯化后的原生质体溶液中加入5 mmol/L CaCl₂·H₂O作为保护剂^[12],按下面2种方式涂平板:

1)单层平板培养法:将原生质体悬液用液体再生培养基进行系列稀释,直接涂布在再生固体培养基皿中,25℃培养3~5 d。

2)双层平板培养法:将原生质体悬液稀释涂布后再倒入5 mL半固体再生培养基,25℃培养3~5 d。

同时,为了消除残余菌丝所形成的再生菌落所带来的误差,要用低渗溶液处理原生质体30 min,稀释涂布在CM培养基上作为对照。

原生质体再生率/% =

$$\frac{(\text{再生平板菌落数} - \text{低渗平板菌落数}) \times \text{稀释倍数}}{\text{涂布体积}(\text{mL}) \times \text{原生质体浓度}(\text{个/mL})} \times 100$$

2 结果

2.1 原生质体形成研究

2.1.1 原生质体的形成和释放过程 酶反应1 h左右菌丝开始发生变化,部分断裂见图1a;反应2~3 h后,菌丝多呈易断的念珠状见图1b,部分缠绕菌丝呈葡萄串状见图1c,此时原生质体开始大量释放,释放形态以原位释放为主;反应4~5 h后,原生质体浓度升至10⁷个/mL以上,经过纯化后呈分散的小球状,见图1d,直径约2.5~10 μm。

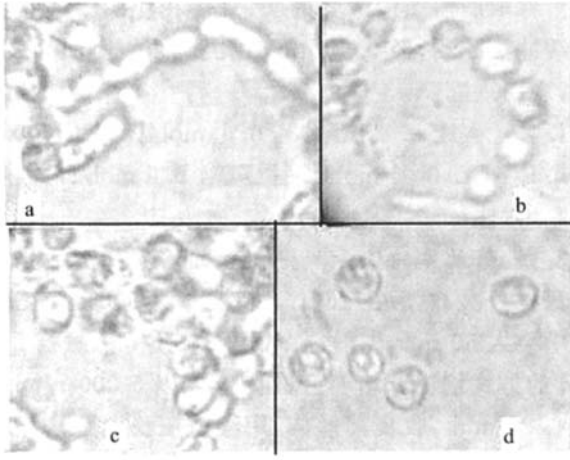


图1 *Fusarium maire* 原生质体的分离

Fig.1 Isolation of *Fusarium maire* protoplast

2.1.2 培养基组成的影响 培养基成分不同,会引起细胞壁的成分发生某种程度的变化,从而使细胞壁对酶的敏感性发生相应的变化,影响原生质体的制备。研究了 *Fusarium maire* 在 PDA 培养基、基础种子培养基、酵母浸膏完全培养基和 MCM 培养基培养后,制备原生质体时产量的变化(见表1)。发现经 PDA 培养基和基础种子培养基均能获得的较好的原生质体产量。

表1 培养基组成的影响

Tab.1 Effect of media on protoplast yield

培养基种类	原生质体产量($\times 10^6$ 个/mL)
PDA 培养基	28 \pm 2.9
基础种子培养基(BSM)	25 \pm 2.2
酵母浸膏完全培养基(YCM)	7 \pm 0.8
MCM 培养基	12 \pm 0.6

2.1.3 预处理的影响 根据文献报道,巯基乙醇能够打断菌丝外分泌蛋白的二硫键,破坏细胞壁外这一蛋白保护层,使菌体的细胞壁对酶的敏感性增强^[8,12]。在酶解前用体积分数 0.5% 巯基乙醇对菌丝进行了预处理 30 min,发现原生质体产量并未有明显提高,这和孙剑秋等^[11]的研究结果一致。

2.1.4 酶系统浓度和组成的影响 由真菌制备原生质体采用单一酶的效果没有复合酶好,不同真菌细胞壁的组成有差异,初步实验发现溶壁酶在制备过程中起关键作用,溶壁酶浓度低于 2 mg/dL 的复合酶系统都较难成功制备原生质体。考虑到各种酶的协同作用^[8],使用正交表 L9(3⁴) 作四因素三水平正交试验,比较了溶壁酶、纤维素酶、蜗牛酶和溶菌酶的效果并做了优化。表2表明4种酶中影响最大的是溶壁酶,其次为蜗牛酶。根据主要因素取最好水平的原则,所以采用 3 mg/dL 溶壁酶、3

mg/dL 蜗牛酶、1.5 mg/dL 溶菌酶和 0.5 mg/dL 纤维素酶组成的酶系统。经过实验,在同等条件下该酶系统能够制备得最大的原生质体产量 3.7×10^7 个/mL。

表2 酶系的组成对原生质体制备的影响

Tab.2 Effect of the combination of various enzymes on protoplast yield

序号	溶壁酶/ (mg/ dL)	蜗牛酶/ (mg/ dL)	溶菌酶/ (mg/ dL)	纤维素酶/ (mg/ dL)	原生质体 产量/ ($\times 10^6$ 个/mL)
1	1(2)	1(1.5)	1(1)	1(0.5)	0.24
2	1(2)	2(2)	2(1.5)	2(1)	3.3
3	1(2)	3(2.5)	3(2)	3(1.5)	5.6
4	2(2.5)	1(1.5)	2(1.5)	3(1.5)	11
5	2(2.5)	2(2)	3(2)	1(0.5)	15
6	2(2.5)	3(2.5)	1(1)	2(1)	18
7	3(3)	1(1.5)	3(2)	2(1)	16
8	3(3)	2(2)	1(1)	3(1.5)	21
9	3(3)	3(2.5)	2(1.5)	1(0.5)	27
T ₁	9.14	27.24	39.24	42.24	
T ₂	44	39.3	41.3	37.3	
T ₃	64	50.6	36.6	37.6	
X ₁	3.05	9.08	13.08	14.08	
X ₂	14.67	13.10	13.77	12.43	
X ₃	21.33	16.87	12.20	12.53	
R	18.29	7.79	1.57	1.65	

2.1.5 菌龄及培养方式的影响 由于持续的摇瓶培养容易导致菌丝密集缠绕甚至结球^[9],经过比较采用先静止 2 d 再 180 r/min 摇 2~3 d 的培养方式为最佳。在此培养方式基础上,研究了培养时间对原生质体产量的影响(见表3)。可以发现在静止培养 2 d 后再 180 r/min 振摇 2 d,原生质体产量最大。

表3 培养时间对原生质体制备的影响

Tab.3 Effect of incubating time on protoplast yield

静止 2 d 后培养时间/d	原生质体产量/($\times 10^6$ 个/mL)
1	2.5 \pm 0.6
2	32 \pm 5.1
3	18 \pm 3.5

2.1.6 渗透压稳定剂的影响 合适的渗透压稳定剂对原生质体的释放非常重要。由于渗透压稳定剂的存在,可以使原生质体内部的渗透压与环境渗透压保持平衡,防止原生质体的破裂。在上述条件下,我们比较了不同的渗透压稳定剂(0.6 mol/L)对原生质体制备的影响。图2表明,0.6mol/L 的

KCl 是 *Fusarium maire* 较好的原生质体释放渗透压稳定剂。

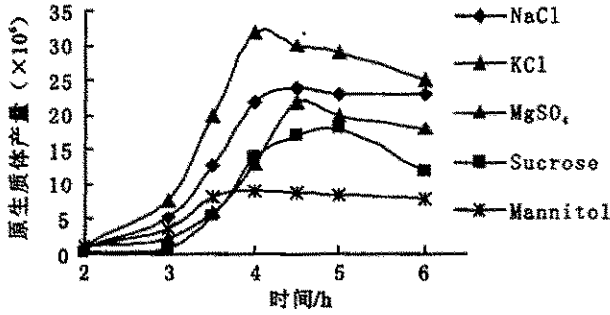


图 2 渗透压稳定剂的影响

Fig. 2 Effects of osmotic stabilizers on protoplast yield

2.1.7 pH 的影响 环境 pH 对酶的活性影响很大,研究了在用复合酶制备原生质体时环境 pH 对原生质体释放的影响。图 3 表明,在研究范围内 pH 值为 5 时,原生质体的产量为最大。

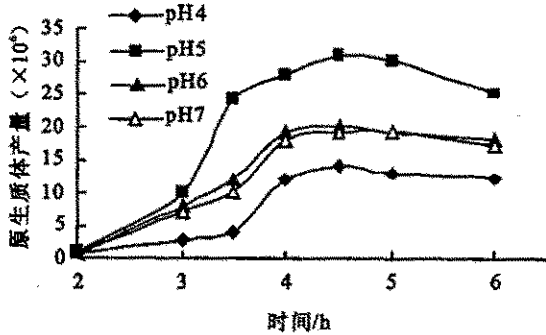


图 3 pH 的影响

Fig. 3 Effects of pH value on protoplast yield

2.1.8 酶解温度的影响 温度对酶解有双重作用。温度的升高一方面可以使反应速度加快,另一方面也可以使酶变性失活。原生质体酶解温度一般控制在 20 ~ 40 °C^[8,10]。作者比较了在 25, 28, 32 和 35 °C 时原生质体的产量,表 4 表明,32 °C 是该酶系统的最佳作用温度。

表 4 酶解温度对原生质体制备的影响

Tab. 4 Effect of digesting temperature on protoplast yield

酶解温度/°C	原生质体产量/(× 10 ⁶ 个/mL)
25	12 ± 2.0
28	22 ± 2.7
32	31 ± 3.3
35	26 ± 2.1

2.1.9 酶解时间的影响 酶解时间和原生质体的质量的密切相关的。时间过短,原生质体形成不完全,时间过长,脱壁太完全,质膜易受损,从而影响再生^[8]。在以上条件下,我们发现随着酶解时间延

长,在 4 ~ 5 h 原生质体量达到最大,见表 5,考虑到对再生率的影响,酶解时间控制在 4 h 左右。

表 5 酶解时间对原生质体制备的影响

Tab. 5 Effect of digesting time on protoplast yield

酶解时间/h	原生质体产量/(× 10 ⁶ 个/mL)
2	3 ± 1.3
3	5 ± 2.8
4	28 ± 3.3
5	25 ± 4.1
6	23 ± 5.0

2.2 原生质体再生研究

原生质体制备的因素除了菌种本身的特性以外主要是制备条件,再生培养基组成和再生培养条件。另外酶浓度和酶解温度也有一定影响^[8]。

2.2.1 再生培养基组成的影响 由于原生质体已经失去细胞壁的保护,不再是一个正常的细胞,在普通培养基平板上也不能正常生长繁殖。因此,本实验研究了在 4 种固体再生培养基中原生质体的再生情况,见表 6,发现 YCM 再生培养基的效果最好,CM 再生培养基效果其次。

表 6 培养基组成对再生的影响

Tab. 6 Effects of media on the regeneration of protoplast

培养基种类	再生率/%
PDA 再生培养基	6.1 ± 2.1
CM 再生培养基	7.2 ± 2.2
YCM 再生培养基	7.8 ± 1.0
SMY 再生培养基	5.0 ± 0.6

2.2.2 再生平板的渗透压稳定剂的影响 原生质体对渗透压很敏感,选择在上述条件下,比较了 0.6 mol/L KCl, NaCl, MgSO₄, 甘露醇和蔗糖 5 种渗透压稳定剂对原生质体再生的影响。表 7 表明,蔗糖和甘露醇对内生真菌 *Fusarium maire* 原生质体的再生有较好的促进作用。

表 7 渗透压稳定剂对再生的影响

Tab. 7 Effects of osmotic stabilizers on the regeneration rate of protoplast

渗透压稳定剂种类	再生率/%
KCl	7.6 ± 2.4
NaCl	5.5 ± 1.8
MgSO ₄	7.2 ± 3.0
Sucrose	8.4 ± 1.9
Mannitol	8.1 ± 1.7

2.2.3 再生培养方式的影响 双层平板培养法可

以较单层培养更好的保护原生质体促进再生^[11]。作者实验比较了单层与双层平板培养法对于内生真菌 *Fusarium maire* 原生质体再生率的影响,表8表明无显著性差别,因此可采用简单方便的双层平板培养法^[10]。

表8 培养层数对再生的影响

Tab.8 Effects of layers on the regeneration rate of protoplast

层数	原生质体再生率/%
1	8.2 ± 2.1
2	8.9 ± 3.0

3 讨论

在对产紫杉醇内生真菌 *Fusarium maire* 的原生质体制备和再生研究过程中,吸收了前人的许多经验规律,在尽可能不影响再生率的前提下探索出获得较高原生质体产量的制备条件:将 *Fusarium maire* 通过先静止 2 d 再以 180 r/min 震荡 2 d 后,在以 0.6 mol/L 的 KCl 配制的 pH 为 5 的复合酶(3 mg/dL 溶壁酶、2.5 mg/dL 蜗牛酶、1 mg/dL 溶菌酶和 0.5 mg/dL 纤维素酶)中,32 °C 恒温酶解 4 h,原生质体产量达 3.2×10^7 个/mL;原生质体的再生条件是:纯化后的原生质体加入 5 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 作为保护剂,在 25 °C,以 0.6 mol/L 的蔗糖配制的

YCM 再生培养基上单层培养,其再生率达 8.9%。

在预处理过程中,加入 0.5% 巯基乙醇未有明显影响。原因可能是菌丝预处理后再酶解,在酶解细胞壁的同时,也酶解了与细胞壁内层紧密相连的细胞质膜,以致原生质体的产量反而较直接酶解更低。另外,亦有可能是巯基乙醇浓度偏高或时间过长,有待进一步研究。

同时,考虑到过高的酶浓度对原生质体的再生不利,而正交实验的次要因素可以不取最好水平,因此酶系统作了适当调整,选择 3 mg/dL 溶壁酶、2.5 mg/dL 蜗牛酶、1 mg/dL 溶菌酶和 0.5 mg/dL 纤维素酶。实验亦证明,采用该酶系统后原生质体产量为 3.2×10^7 个/mL。

其他因素方面,虽然有报道在丝状真菌制备原生质体时 0.6 mol/L MgSO_4 作为渗透压稳定剂有不错表现^[12],但实验中发现同浓度的 KCl 在制备时效果更好,原因可能是不同种类的渗透压稳定剂对酶系统与底物的促进作用不同^[8]。

再生培养方面,YCM 和 CM 培养基对提高再生率有较好作用,可能是培养基成分和浓度的不同对原生质体细胞壁再生的促进作用不同所致。仅做了固体培养方面的研究,有关原生质体在液体培养基中再生的形态和再生率的内容将有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents VI: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93: 2325 - 2327.
- [2] 林福呈,刘小红,王洪凯,等. 紫杉醇及其产生菌的研究现状与展望 [J]. *微生物学报*, 2003, 43(4): 534 - 538.
- [3] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxant production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(9): 214 - 216.
- [4] Strobel G A, Ness W M, Ford E, et al. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity [J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, 17: 417 - 423.
- [5] Li J Y, Strobel G, Sidhu R, et al. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum* [J]. *Microbiology*, 1996, 142: 2223 - 2226.
- [6] 邱德有,黄美娟,方晓华. 一种云南红豆杉内生真菌的分离 [J]. *真菌学报*, 1994, 13(4): 314 - 316.
- [7] 周东坡,平文祥,孙剑秋,等. 紫杉醇产生菌分离的研究 [J]. *菌物学杂志*, 2001, 21(1): 18 - 19, 32.
- [8] 陶文沂. 工业微生物生理与遗传育种学 [M]. 北京:中国轻工业出版社,1997, 335 - 344.
- [9] 张长铠,梁岩,秦红敏. 香菇单核菌丝 9101(12)原生质体再生条件的研究 [J]. *微生物学杂志*, 1993, 14(1): 9 - 14.
- [10] 张卉,刘长江. 姬松茸原生质体形成和再生的研究 [J]. *微生物学杂志*, 2003, 23(3): 18 - 19, 23.
- [11] 孙剑秋,于寒颖,张鹏,等. 树状多节孢原生质体的制备和再生 [J]. *应用与环境生物学报*, 2001, 7(4): 375 - 381.
- [12] Peberdy J F. Fungal protoplast: isolation, reversion, and fusion [J]. *Ann Rev Microbiol*, 1979, 33: 21 - 39.

(责任编辑 杨萌)