

新西兰青霉(*Penicillium novae-zeelandiae*) 原生质体的制备与再生研究

王海磊, 张永梅, 刘 磊, 闫 越

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘 要:利用酶对新西兰青霉菌的菌丝进行酶解获得原生质体,探究了影响原生质体制备和再生的因素,包括酶种类、酶浓度、菌丝培养时间、酶解时间和温度、pH、二硫苏糖醇(DTT)预处理等.结果显示最佳酶解条件为:菌丝体培养48 h,用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT预处理0.5 h,以 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠作为稳定剂,31℃条件下经Lywallzyme($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)酶解4 h,原生质体数量达到 $4.75 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$,再生率为18.0%.

关键词:新西兰青霉;原生质体;再生率;溶壁酶

中图分类号:Q939.9

文献标志码:A

对丝状真菌的分子遗传学研究是当前微生物学的一个重要研究领域^[1].1973年,EL Tatum实验室首次将外源DNA成功导入丝状真菌^[2],自此,很多的丝状真菌被成功地转化,包括工业真菌如黑曲霉(*Aspergillus niger*),产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)和顶头孢霉(*Cephalosporium acremonium*);植物致病菌如玉蜀黍黑粉菌(*Ustilago maydis*);昆虫致病菌如球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)和绿僵菌(*Metarrhizium anisopliae*);食用真菌如裂褶菌(*Schizophyllum commune*)和灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)等^[3].丝状真菌的转化有效地提升或改变了其生理代谢功能,以满足人们的需要,但由于丝状真菌为多细胞,与单细胞微生物如细菌相比,一个有效的转化系统的建立是其遗传转化能否实现的关键.传统的转化方法包括PEG介导的原生质体转化法、电转化法、基因枪法、限制性内切酶介导的整合、根瘤农杆菌介导的转化法等.其中原生质体转化法操作简便,所需设备简单,是一种基本且使用最广泛的方法.但在此法中,如何高效获得大量原生质体是基因转化的关键^[4-5].自然界中许多丝状真菌的原生质体制备极其困难,有的甚至无法制备,导致原生质体转化法的转化率极低^[6].此外,每种真菌制备原生质体时需要不同的、特定的酶系统和消化条件,原生质体的产量在种与种之间也是不同的.因此,探索丝状真菌原生质体的制备方法,对于其转化系统的建立非常重要.

本实验室前期发现新西兰青霉(*Penicillium novae-zeelandiae* HSD07B)具有很强的红色素产生能力^[7],但该红色素的生物代谢通路及所涉及的酶在分子水平上的调控机制仍不清楚.要探索青霉红色素的产生机制,需要对涉及红色素产生的相关基因的功能进行研究,而前提是要建立该青霉的遗传转化系统.目前文献中有关该菌原生质体制备的信息较少.因此,本文系统研究了*P. novae-zeelandiae* HSD07B原生质体的制备方法,并对影响其原生质体制备、再生率的生化参数进行优化,为该青霉菌遗传转化系统的建立提供技术支撑.

收稿日期:2015-07-20;修回日期:2015-10-20.

基金项目:国家自然科学基金(U1404301).

作者简介:闫 越(1992—),女,河南信阳人,河南师范大学硕士研究生,研究方向为应用微生物,E-mail:1451308038@qq.com.

通信作者:王海磊(1978—),男,河南睢县人,河南师范大学教授,博士,主要从事应用与资源微生物方面的研究,E-mail:whl@henannu.edu.cn.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

新西兰青霉(*P. novae-zeelandiae* HSD07B)河南师范大学生命科学学院 AEM 实验室筛选保藏。

1.1.2 培养基

真菌生长培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)^[8],马铃薯液体培养基(未加琼脂的 PDA),原生质体再生培养基(PDA 中加入 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇)。

1.1.4 试剂与酶

溶壁酶(Lywallzyme)购自广东省微生物研究所,蜗牛酶和纤维素酶均购自郑州久是生物技术有限公司(商品编号分别为 S8280-1 和 C8260);氯化钠,磷酸氢二钠,磷酸二氢钠,甘露醇,二硫苏糖醇(DTT)等均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养条件

用固体斜面进行传代,于 29°C 培养 3 d 即长出绿色孢子。将蒸馏水加入试管斜面中,制成孢子悬液,取 3 mL 悬液于装有 100 mL 马铃薯液体培养基的 250 mL 三角瓶中,在转速为 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度为 29°C 条件下培养 48 h 即可获得大量菌丝。

1.2.2 形态观察

挑取经马铃薯液体培养基培养的菌丝体,制片后于光学显微镜下观察。

1.2.3 原生质体制备

小心收集菌丝体于 2 mL 离心管中, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,并用无菌水以同样的方法重复洗涤两次。预处理 0.5 h,离心,按每 0.1 g 菌丝加入 1 mL $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 酶液, 31°C , $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡 4 h,且每半小时取一次样,光学显微镜下镜检酶解液中原生质体并计数。裂解后的菌丝碎片和原生质体的混合物经四层擦镜纸过滤后,可滤去大部分菌丝碎片,滤液经 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 12 min,并用高渗磷酸缓冲液洗涤两次,以除去酶液,之后用 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇的磷酸缓冲液重悬保存。原生质体的计数采用血球计数板法^[8]。

1.2.4 原生质体再生

用高渗缓冲液将原生质体的浓度稀释至 1000 mL^{-1} 。吸取 100 μL 稀释过的原生质体用移液枪均匀地点于平皿底部,将再生培养基倾倒入平皿,于 30°C 培养箱中培养 3—4 d 后计数,每组均设 3 个重复,取平均值。

用磷酸低渗缓冲液同样将原生质体的浓度调至 1000 mL^{-1} ,并静置 1 h,待原生质体涨破,用与上述同样的方法培养。

$$\text{原生质体再生率} = A \times \frac{N_1 - N_2}{N} \times 100\%,$$

(N_1 :再生培养基菌落数; N_2 :低渗培养基菌落数; N :100 μL 稀释前原生质体总数; A :稀释倍数)。

1.2.5 影响原生质体制备及再生的因素优化

本实验探究了酶种类、酶浓度、菌丝培养时间、酶解时间和温度、pH,DTT 预处理等因素的影响。其中酶种类包括蜗牛酶、Lywallzyme、蜗牛酶+纤维素酶混合酶(1:1)、Lywallzyme+蜗牛酶混合酶(1:1);所需优化后酶的质量浓度分别为 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $14 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;菌丝培养时间是 12 h、24 h、36 h、48 h 和 60 h;酶解时间设置为 2 h、3 h、4 h、5 h、6 h 和 7 h;酶解温度分别是 28°C 、 31°C 、 37°C ;pH 分别设为 6.0、7.0 和 8.0;DTT 的浓度分别是 $0.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.06 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.07 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.6 原生质体的释放过程

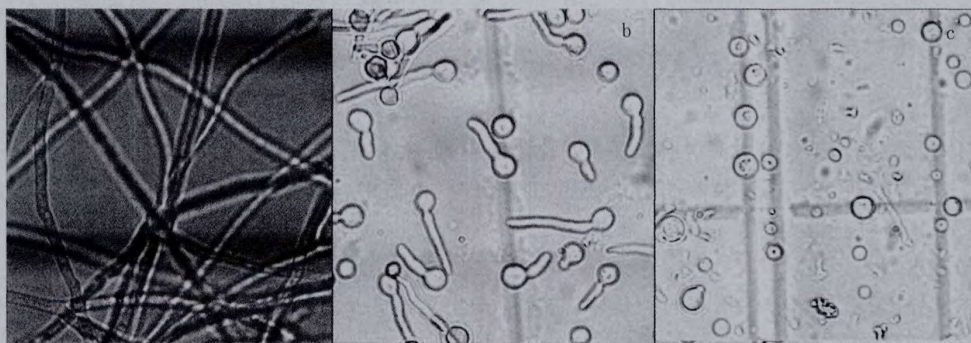
在以上优化条件下,对新西兰青霉的原生质体进行制备,并在不同时间取样,观察原生质体的释放过程,

结果如图 1 所示. 图 1a 是酶解前的菌丝; 图 1b 是酶解 2 h 后开始释放原生质体时的状态; 图 1c 是酶解 4 h 后释放的原生质体.

2 结果与讨论

2.1 酶的种类对原生质体形成及再生的影响

不同的真菌因细胞壁结构的差异需要的酶不同, 因此选择合适的酶对于原生质体的制备尤为重要. 图 2 显示蜗牛酶和蜗牛酶+纤维素酶混合酶所获得的原生质体的产量均低于 Lywallzyme($2.75 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$) 和蜗牛酶+Lywallzyme 混合酶($2.62 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$), Lywallzyme($2.75 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$) 和蜗牛酶+Lywallzyme 混合酶($2.62 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$) 原生质体产量接近, 就成本而言, Lywallzyme 更适合用于制备 *P. novae-zeelandiae* HSD07B 的原生质体.

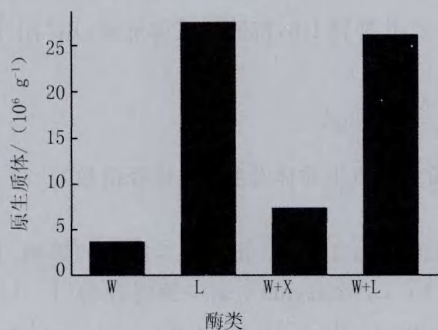


a: 菌丝 (0 h); b: 酶解中的菌丝 (2 h); c: 释放的原生质体 (4 h)

图1 新西兰青霉原生质体的释放过程

2.2 酶液的浓度对原生质体形成及再生的影响

真菌的细胞壁结构十分复杂, 主要由纤维素、几丁质、葡聚糖多聚糖等多糖蛋白质和类脂共同组成, 酶的浓度同样也是影响原生质体制备的重要因素. 酶浓度过高会造成原生质体变形, 影响以后的转化效率^[9] 以及再生率. 由图 3 可知, 随着 Lywallzyme 浓度的增大, 原生质体的释放量呈递增的趋势. 但当酶质量浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 产量不足, 还存在大量未酶解的菌丝. 当酶质量浓度为 $7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 原生质体分别为 $1.38 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$ 、 $2.84 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$, 再生率分别是 16.2%、15.7%, 可见在原生质体产量上后者比前者多出约两倍, 而再生率接近. 因此, 最佳酶质量浓度是 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.



(W: 蜗牛酶; L: lywallzyme; WX: 蜗牛酶+纤维素酶混合酶; WL: 蜗牛酶+Lywallzyme混合酶)
图2 不同酶对原生质体制备的影响

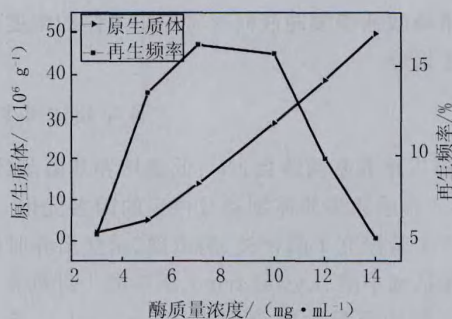


图3 Lywallzyme 浓度对原生质体制备及再生的影响

2.3 酶解温度对原生质体形成及再生的影响

温度对酶的活性尤为重要, 一般情况下, 低温时酶的活性降低, 高温易使酶失活. 本实验中 28°C 和 37°C

下产量接近(图 4),而再生频率前者明显高于后者,这可能是由于高温对细胞损伤太大,导致细胞的一些生理功能不能修复,同时温度较高也会使酶的活性下降. 产量最高的温度是 31 ℃,达到了 $2.24\times 10^7\text{ g}^{-1}$,同时再生率也最高为 18.7%.

2.4 酶解时间对原生质体形成及再生的影响

随着酶解时间的延长,原生质体从破碎的细胞壁释放到周围环境中. 图 5 显示,1 h 之后即有部分菌丝释放出原生质体,2 h 原生质体数就达到了 $8.2\times 10^6\text{ g}^{-1}$. 原生质体的释放与酶解时间呈现出正相关的关系,但再生率却有所下降. 造成原生质体再生率下降的原因可能是酶解时间过长,酶液中的蛋白酶会造成原生质体膜不可逆损伤,破坏了细胞膜的完整性,影响了原生质体膜的稳定性,导致原生质体活力降低甚至破裂^[10]. 在本实验中得出的最佳酶解时间是 4 h,此时,原生质体个数和再生率分别是 $2.00\times 10^7\text{ g}^{-1}$ 和 15.6%.

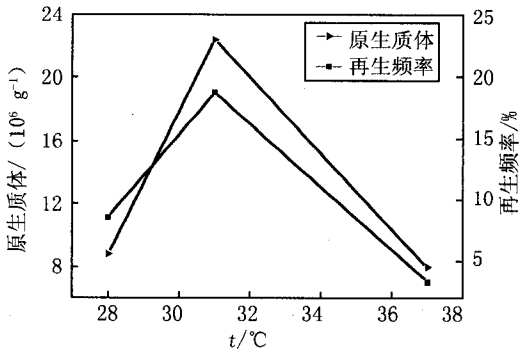


图4 酶解温度对原生质体制备及再生的影响

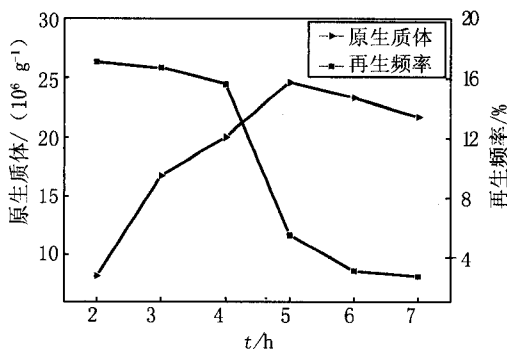


图5 酶解时间对原生质体制备及再生的影响

2.5 菌龄对原生质体形成及再生的影响

在原生质体制备过程中,细胞壁是酶解的底物,而菌体生长状态直接影响到细胞壁的结构、菌体代谢水平和菌体活力等. 因而,菌龄的生长时期是原生质体形成与再生的内因^[11]. 不同菌龄的菌丝体细胞壁组成成分不同,对降解酶的敏感性不同,丝状真菌一般在生长阶段的早期原生质体的产量高,但也不是越嫩越好. 对数生长期以前的菌丝体的细胞壁对溶壁酶不敏感,一般情况下,对数生长期的菌丝体对溶壁酶敏感度增加,有利于原生质体的形成^[12]. 图 6 显示,随着菌丝培养时间的增加,原生质体的产量也在不断升高,而再生率却有下降的趋势,最佳的菌龄为 48 h,此时的原生质体个数和再生率分别是 $1.95\times 10^7\text{ g}^{-1}$ 和 13.7%.

2.6 pH 对原生质体形成及再生的影响

酶解液 pH 不仅影响酶的活力和底物特性,影响原生质体的释放,而且由于丝状真菌细胞表面带负电荷,也会影响脱壁原生质体的稳定性. 图 7 表明,当 pH 为 6.0 和 8.0 时原生质体释放量均不高,pH 为 7.0 时原生质体产量达到最大,为 $1.2\times 10^7\text{ g}^{-1}$,因此,该反应体系的最适 pH 是 7.0.

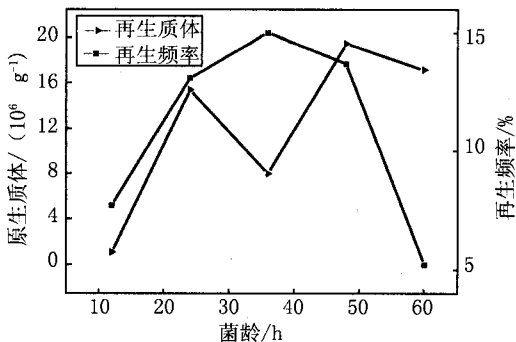


图6 菌龄对原生质体制备及再生的影响

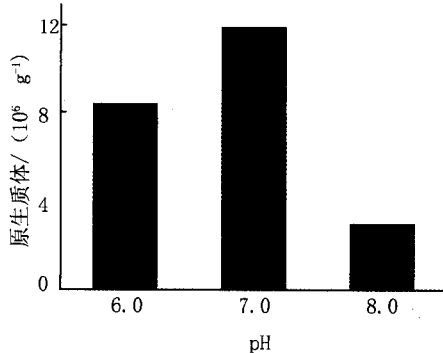


图7 pH对原生质体制备的影响

2.7 DTT 预处理对原生质体形成及再生的影响

在酶解前加入 DTT 预处理,有利于原生质体的形成,这是由于巯基化合物能松动细胞壁的蛋白质结构,便于酶的水解.但另一方面,DTT 对细胞具有毒性,会影响原生质体的再生^[13].因此,预处理时间不宜过长.随着 DTT 量的加大,原生质体产量也在增加.当 DTT 的浓度达到 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,原生质体产量最大,为 $4.75 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$,再生率为 18.0%(图 8).

原生质体的制备、菌体的再生以及原生质体的转化是丝状真菌遗传转化过程中的 3 个方面,而大量原生质体和高再生率是进行分子遗传学研究的必要条件.许多真菌的原生质体通过不同的方法得到分离和再生.但不同真菌的细胞壁结构决定了没有一个固定的方法可应用于所有的种类.因此,不同的真菌,若想获得高水平的原生质体制备率和再生率,其条件都需要重新制定.以上技术参数的获得,为该青霉原生质体的制备提供了技术支撑,为该青霉遗传转化系统的建立打下了坚实的基础.

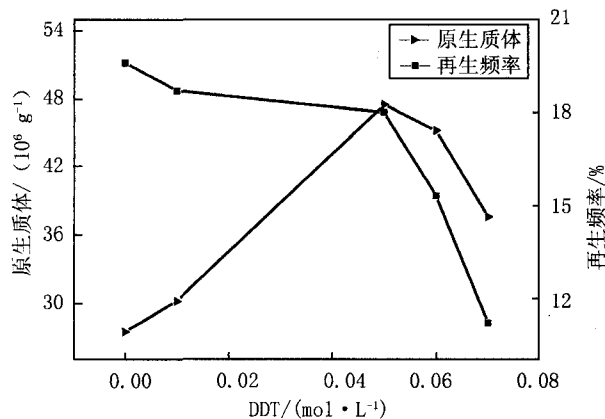


图8 预处理DTT对原生质体制备及再生的影响

3 结 论

本文对新西兰青霉原生质体制备过程中所涉及的溶壁酶种类、酶浓度、酶解时间、温度、pH、菌龄、预处理等条件进行优化,结果发现菌丝体培养 48 h, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT 预处理 0.5 h,以 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠作为稳定剂,在 pH 为 7.0 时,经 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Lywallzyme 在 31°C 下酶解 4 h 后,原生质体的产量最大为 $4.75 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$,再生率为 18.0%.

参 考 文 献

- [1] Jiang D W, Zhu W, Wang Y C, et al. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies [J]. Biotechnol Adv, 2013, 31:1562-1574.
- [2] Mishra N C, Tatum E L. Non-Mendelian inheritance of DNA-mediated inositol independence in *Neurospora* [J]. P Natl Acad Sci USA, 1973, 70:3875-3879.
- [3] Ruiz-Diez B. Strategies for the transformation of filamentous fungi [J]. J Appl Microbiol, 2002, 92:189-195.
- [4] Patil N S, Patil S M, Govindwar S P and Jadhav J P. Molecular characterization of intergeneric hybrid between *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma harzianum* by protoplast fusion [J]. J Appl Microbiol, 2014, 118:390-398.
- [5] Liu H, Wang P, Hu Y H, et al. Construction of an RNAi expression vector and transformation into *Penicillium chrysogenum* [J]. Ann Microbiol, 2014, 64:113-120.
- [6] 孙传宝,朱春宝,朱宝泉,等.利用根瘤农杆菌 LBA4404Ti 质粒介导高效转化产黄青霉及克隆 *vgb* 基因 [J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27 (2):87-91.
- [7] Wang H L, Li P, Liu Y F, et al. Overproduction of a potential red pigment by a specific self-immobilization biomembrane-surface liquid culture of *penicillium novae-zeelandiae* [J]. Bioproc Biosyst Eng, 2012, 35(8):1407-1416.
- [8] 刘国生.微生物学实验技术 [M]. 北京:科学出版社, 2011.
- [9] 曹文琴,郭顺星,徐锦堂,等.灵芝原生质体制备、再生及融合的研究 [J]. 菌物系统, 1998, 17(1):51-56.

- [10] 朱宝成,王俊刚,成亚利,等.果胶酶生产菌原生质体再生及诱变育种[J].微生物学通报,1994,21(1):15-18.
- [11] Nombela C. Microbial cell wall synthesis and autolysis [M]. The Netherlands:Elsevier Science Publishers BV,1984,91,227.
- [12] 孙传宝,朱春宝,许文思.产黄青霉原生质体制备和再生影响因素分析[J].中国抗生素杂志,2001,26(4):241-243.
- [13] 辛明秀,蒋亚平.米曲霉原生质体融合及杂合二倍体的形成[J].微生物学通报,1994,21(3):143-147.

Formation and Regeneration of *Penicillium novae-zeelandiae* HSD07B Protoplasts and Influence Factors

WANG Hailei, ZHANG Yongmei, LIU Lei, YAN Yue

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Protoplasts of *Penicillium novae-zeelandiae* HSD07B have been successfully obtained by using lywallzyme on the mycelium. In order to achieve a high transformation frequency by producing these protoplasts, factors that affecting the preparation and regeneration were investigated which included the enzyme type, the enzyme concentration, the incubation time, the enzymolysis time, the enzymolysis temperature, pH and the preprocessing. After research, the maximum yield of protoplasts could be produced when mycelia was cultured for 48 h, pretreated by dithiothreitol (DTT) for 0.5 h, and then digested for about 4 h at 31 °C in a buffer containing 10 mg · mL⁻¹ Lywallzyme. The amount of protoplasts could reach $4.75 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$ and the final regeneration rate was 18.0%.

Keywords: *Penicillium novae-zeelandiae* HSD07B; protoplast; regeneration; Lywallzyme