

文章编号: 1001-3679(2007)06-0733-04

链霉菌 702 原生质体的制备和再生条件研究

熊姗姗, 孙宇辉, 涂国全*

(江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 为了确定链霉菌 702 菌株原生质体制备和再生较优组合条件, 以链霉菌 702 菌株为试验材料, 试验设计以单因素和多因素多水平的正交试验。在单因素试验结果中探索该菌的对数生长期为 35 h~50 h 在菌丝体培养基中添加 1.0% 甘氨酸有利于该菌原生质体制备和再生; 正交试验分别以影响该菌原生质体制备和再生的菌丝体培养时间、溶菌酶使用浓度、酶解温度和酶解时间的四因素三水平的 $I_9(3^4)$ 正交试验, 试验表明: 链霉菌 702 菌株原生质体制备和再生较优组合为 $A_2B_2C_3D_1$ 即菌丝体培养时间为 43 h 溶菌酶浓度为 2.0 mg/mL 酶解温度为 37℃, 酶解时间 60 min 原生质体的制备率和再生率分别达到 96.5% 和 27.8%。本试验为该菌进一步进行原生质体诱变打下良好的基础。

关键词: 链霉菌 702 原生质体; 制备与再生; 综合评分法

中图分类号: Q935

文献标识码: A

Studies on Condition of Formation and Regeneration of Protoplasts from Streptomyces 702

XIONG Shanwei SUN Yuhui TU Guoquan

(Department of Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Jiangxi Nanchang 330045, PRC)

Abstract: The better composition condition of the factors that affected the formation and regeneration of protoplasts from Streptomyces 702 were investigated. The experimental material was Streptomyces 702. And single factor and multifactor orthogonal experiment were used in this experiment. From single factor experiment the result proved that the logarithmic phase of this Streptomyces was 35 h~50 h. Furthermore, it was propitious to form and regenerate the protoplasts of Streptomyces 702 that 1.0% of glycine was added in mycelium substrate. The $I_9(3^4)$ orthogonal experiment was mycelium cultured time, lysozyme concentration, enzymolysis temperature and time. By using range analysis, variance analysis and aggregative score we analyse the outcome of the test. The results indicated that the better assembly condition of formation and regeneration of protoplasts from Streptomyces 702 was $A_2B_2C_3D_1$ (mycelium cultured for 43 h, 2 mg/mL of lysozyme concentration, enzymolysis at 37℃ for 60 min). The protoplasts rate of forming and regenerating was 96.5% and 27.8%. It laid good foundation for further mutagenesis of the protoplasts.

Key words: Streptomyces 702; Protoplasts; Formation and regeneration; Aggregative score

收稿日期: 2007-08-25 修订日期: 2007-11-05

作者简介: 熊姗姗 (1983-) 女, 江西南昌人, 在读硕士研究生, 研究方向: 工业微生物菌种选育。

基金项目: 江西省自然科学基金 (No. 050010), 广东省科技攻关项目 (No. 2006B13001004)。

*通讯作者: 涂国全, 男, 教授, 硕士生导师, E-mail: tuguoquan@263.net

0 前言

江西农业大学生物工程系应用微生物研究室在以棉花枯萎病为靶目标开展农抗产生菌的分离筛选研究中,从土壤中分离筛选到一株链霉菌,简称为链霉菌 702^[1]。链霉菌 702对纹枯病菌、赤霉病菌和赤星病菌的 DNA/RNA的合成有显著的抑制作用;对供试菌蛋白质、细胞壁多糖的合成和几丁质酶活性基本无影响;对供试菌所产的胞外酶活性有抑制作用;能引起细胞膜结构的改变,导致细胞膜渗透性的改变,使生物大分子物质泄漏并造成细胞代谢紊乱,导致一系列的细胞结构变化。链霉菌 702所产抗真菌活性物质对 7种霉菌、酵母菌的最低抑菌浓度以及对 13种植物病原真菌的 EC₅₀、EC₉₀^[2],证明了链霉菌 702所产抗真菌活性物质具有很强的抑菌活性,有望开发成新型的杀菌剂。

对链霉菌的原生质体进行诱变或融合可较大地提高菌种的生产能力和稳定性^[3],研究原生质体制备和再生条件则是该技术的前提条件。本文研究了影响链霉菌 702原生质体形成和再生的一系列因素,为今后进行链霉菌 702原生质体诱变或融合奠定一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 链霉菌 702 42-23 菌株,经自然选育出的菌株。

1.1.2 培养基 (1)菌丝体培养基—S培养基^[3]:葡萄糖 10 g、蛋白胨 4 g、酵母膏 4 g、MgSO₄·7H₂O 5 g、KH₂PO₄ 2 g、K₂HPO₄ 4 g、加水至 800 mL,20 mL装量灭菌,灭菌培养基中加入适量体积 20%的甘氨酸和无菌水(二者共 5 mL);(2)R₂软琼脂^[3]:蔗糖 103 g、MgCl₂·6H₂O 10.12 g、CaCl₂·2H₂O(2.22%) 100 mL、TES缓冲液 100 mL(0.25 M、PH=7.2),琼脂 0.65%,加蒸馏水至 1 000 mL;(3)R₃培养基^[3]:蔗糖 103 g、K₂SO₄ 0.25 g、MgCl₂·6H₂O 10.12 g、葡萄糖 10 g、水解酪蛋白 0.1 g、微量元素溶液 2 mL、酵母膏 5 g、TES缓冲液 100 mL(0.25 M、PH=7.2),加蒸馏水至 1 000 mL,称取 3 g琼脂粉于 500 mL三角瓶中,加入 200 mL上述溶液,121℃灭菌。使用前将培养基融化,每瓶加入已灭菌的 KH₂PO₄(0.5%) 2 mL、CaCl₂·2H₂O(5 mol/L) 0.8 mL、NaOH(1 N) 1.4

mL,将 R₃平板预先在操作台上吹 2 h~4 h使其失重 15%~20%;(4)孢子斜面培养基: PDA

1.1.3 主要试剂 溶菌酶(用 P缓冲液配制适当浓度,过滤除菌)。

1.1.4 溶液 (1)P缓冲液^[3]:蔗糖 103 g、K₂SO₄ 0.25 g、MgCl₂·6H₂O 2.02 g、微量元素溶液 2 mL,加蒸馏水至 800 mL,每个 250 mL三角瓶中加入上述溶液 80 mL,121℃灭菌 20 min,使用前,每瓶加入 KH₂PO₄(0.5%) 1 mL、CaCl₂·2H₂O(3.68%) 10 mL、TES(0.25 mol/L、PH=7.2) 10 mL;(2)10%蔗糖溶液:称取 103 g蔗糖,溶于 700 mL蒸馏水中,待完全溶解后定容至 1 000 mL,分装,121℃灭菌 20 min;(3)0.01% SDS 称取 10 mg SDS溶于 100 mL蒸馏水中,121℃灭菌 30 min;(4)微量元素溶液^[3]:ZnCl₂ 40 mg、FeCl₃·6H₂O 200 mg、CuCl₂·2H₂O 10 mg、MnCl₂·4H₂O 10 mg、Na₂B₄O₇·10H₂O 10 mg、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 10 mg,蒸馏水定容至 1 000 mL;(5)TES溶液(0.25 M、PH=7.2)^[4]:称取 Tris(三羟基甲烷) 15.175 g溶于 450 mL蒸馏水中,用浓盐酸精确调 PH=7.2,然后准确定容到 500 mL;(6)甘氨酸溶液:用无菌水配制成适当浓度,过滤除菌。

1.2 方法

1.2.1 菌丝体的培养和收集 将培养 5 d~7 d的斜面孢子接种于菌丝体培养基中,30℃振荡培养(200 r/min)48 h,将菌液倒入离心管中,3 000 r/min离心收集菌丝体,用蔗糖溶液洗涤 1次,P缓冲液洗涤 2次^[5]。

1.2.2 原生质体制备 在上述已洗涤的湿菌丝体中加入适当浓度的溶菌酶溶液,混合均匀,置 30℃水浴保温进行酶解,每隔 15 min用无菌破口移液管轻轻吹打,使溶菌酶与菌丝充分作用,酶解 1 h后加入 5 mL P缓冲液,先低速(500 r/min)离心 3 min,除去未酶解的菌丝体。将上清液转移至另一离心管中,3 000 r/min离心沉淀原生质体^[7],弃上清,将原生质体悬浮于 10 mL P缓冲液中。

1.2.3 原生质体的再生 将制得的原生质体悬液用 P缓冲液适度稀释后,取 0.1 mL与 3 mL R₂软琼脂混匀后平铺于 R₃培养基上,培养 4 d后计数。

1.2.4 原生质体的裂解^[4] 将原生质体悬液用 0.1% SDS适度稀释后涂布 PDA平板,培养 4 d后计数。

1.2.5 相关计算^[9] 原生质体形成率 = $(A - B) / A \times 100\%$, A 为用高渗溶液处理后长出的菌落数, B 为用 SDS 溶液处理后长出的菌落数; 再生频率 = $[(E - D) / (C - D)] \times 100\%$, C 为总菌落数, 未经酶处理的菌悬液涂布于平板生长的菌落; D 为酶解后加 SDS 溶液破坏原生质体, 涂布平板后长出的菌落; E 为再生菌落数, 酶解后用高渗液处理后在再生培养基上生长的菌落。

1.2.6 链霉菌 702 发酵液效价测定 (一剂量法^[9,10]) 发酵液效价的标定以 Natamycin 作为对照抗生素, 采用一剂量法在桔青霉指示菌平板上进行抑菌测定, 以对照抗生素浓度为纵坐标, 以校正后的抑菌圈直径为横坐标, 得到对照抗生素的标准曲线和线性回归方程。链霉菌 702 发酵液用无水乙醇稀释浸提, 离心。上清液稀释到一定倍数后, 作为抑菌测定液。按照对照抗生素标准曲线的制备方法求得发酵液的抑菌圈直径平均值的校正值, 再根据相应标准曲线和发酵液样品的稀释倍数, 求得每毫升样品所含的各抗真菌活性物的单位数。

1.2.7 实验结果统计分析 采用 SAS Version 6.12 软件^[11]。

2 结果与分析

2.1 链霉菌 702 生长曲线的测定

为了确定菌株的生长速率, 测定出菌株的生长曲线, 见图 1。从图 1 可知, 链霉菌 702 接入 S 培养基 35 h~50 h 为菌丝生长对数期。由此, 可以确定菌株处于对数生长期的培养时间, 以便制备原生质体时获得培养合适的细胞。

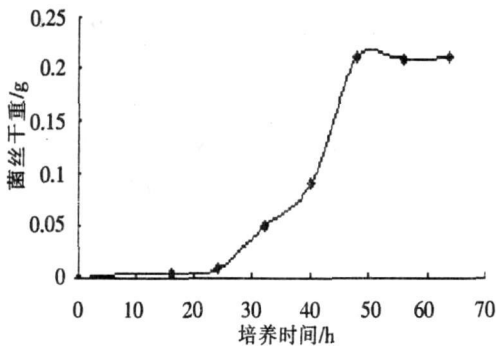


图 1 发菌株的生长曲线

2.2 甘氨酸浓度对原生质体形成及再生的影响

在 S 培养基中加入不同浓度的甘氨酸, 考察菌丝生长状况及原生质体形成与再生情况分别考

察 0、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 甘氨酸浓度对原生质体制备量和再生率的影响, 结果见表 2。由表 2 可知, 随着甘氨酸浓度的增加, 菌丝生长受抑制程度不断增加, 结合原生质体形成和再生情况, 选定甘氨酸浓度为 1%, 原生质体的制备率和在 R₅ 再生培养基上的再生率分别达到 99.81% 和 24.12%。

表 2 不同甘氨酸浓度对原生质体制备的影响

甘氨酸浓度 / %	菌体湿重 / g/50 mL	形成率 / %	再生率 / %
0	10.58	80.11	5.26
0.5	7.99	98.55	12.71
1.0	4.80	99.81	24.12
1.5	0.55	62.20	5.80
2.0	0.20	19.26	0.29

2.3 原生质体制备和再生的条件研究

本实验研究不同菌丝体培养时间、溶菌酶量、酶解时间及温度对原生质体形成与再生的影响, 按照 I₉(3⁴) 进行 9 组不同处理, 试验结果以综合评分法^[12] 进行极差分析, 在综合评分时采用形成率与再生率的乘积, 然后取其开平方值, 形成率与再生率不考虑百分号, 开平方后四舍五入值取整数^[13]。实验方案及实验结果分析如表 3 所示。

根据表 2 的试验综合评分结果的极差分析法表明: 链霉菌 702 菌株原生质体制备和再生较优组合为 A₂B₂C₃D₄, 即菌丝体培养时间为 43 h 溶菌酶浓度为 2.0 mg/mL, 酶解温度为 37 °C, 酶解时间 60 min 原生质体的制备率和在 R₅ 再生培养基上的再生率分别达到 96.5% 和 27.8%。

3 小结与讨论

(1) 链霉菌 702 在 S 培养基中的对数生长期为 35 h~50 h。

(2) 培养基中甘氨酸浓度以 1% 为最适浓度。原生质体的制备率和在 R₅ 再生培养基上的再生率分别达到 99.81% 和 24.12%。

(3) 链霉菌 702 菌株原生质体制备和再生较优组合为 A₂B₂C₃D₄, 即菌丝体培养时间为 43 h 溶菌酶浓度为 2.0 mg/mL, 酶解温度为 37 °C, 酶解时间 60 min 原生质体的制备率和在 R₅ 再生培养基上的再生率分别达到 96.5% 和 27.8%。

表 3 原生质体形成条件 $L_9(3^4)$ 正交实验方案及结果

实验号	A 菌丝体 培养时间 / h	B 溶菌酶量 /mg, mL ⁻¹	C 酶解 温度 /°C	D 酶解 时间 /min	形成率 /%	再生率 /%	综合 评分
1	38	1	30	60	98.8	20.2	45
2	38	2	32	90	92.0	12.1	33
3	38	3	37	120	95.2	9.2	30
4	43	1	32	120	99.2	19.0	43
5	43	2	37	60	96.5	27.8	52
6	43	3	30	90	93.0	16.7	39
7	48	1	37	90	95.0	18.9	42
8	48	2	30	120	87.0	14.2	35
9	48	3	32	60	97.2	17.2	41
综合 评分	K_1	36.0	43.3	39.7	46.0	试验较优组合 $A_2 B_2 C_3 D_1$	
	K_2	44.7	40.0	39.0	38.0	理论较优组合 $A_2 B_1 C_3 D_1$	
	K_3	39.3	36.7	41.3	36	试验较优组合与理论较优 组合不完全一致时, 采用	
	R	8.7	6.6	2.3	10.0	试验较优组合 $A_2 B_2 C_3 D_1$	

参考文献:

[1] 李昆太, 黎循航, 涂国全. 702生物防腐剂对细菌霉菌和酵母菌类抑菌效果的初步测定[J]. 江西农业大学学报, 2002 24(5): 599—602

[2] 张慧雯, 薛秀园, 张智平, 等. 链霉菌 702 所产抗真菌活性物质对植物病原真菌的作用机制研究[J]. 江西农业大学, 2007 29(1): 38—42

[3] 周东坡, 平文祥. 微生物原生质体融合[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1990

[4] 董悦涵. 米多霉素产生菌的诱变育种和原生质体的融合研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006

[5] 邱 荔, 孟 春, 郭养浩, 等. 金色链霉菌原生质体的制备[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2001, 29(2): 124—127.

[6] 吴 胜, 夏焕章, 程 衫. 黑暗链霉菌原生质体制备、再生及其 DNA 转化条件的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2001 18(3): 213—216

[7] 谭文辉, 李燕萍, 许 杨. 微生物原生质体制备及再生的影响因素[J]. 现代食品科技, 2006 22(3): 263

[8] 涂国全, 魏赛金, 刘 姝, 等. 南昌霉素高产菌株的链霉素抗性基因突变筛选研究[J]. 江西农业大学学报, 2002 29(5): 10—13

[9] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1997.

[10] 周 启, 王道本. 农用抗生素和微生物杀虫剂[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998

[11] 金丕焕, 苏炳华, 贺 佳. 医用 SAS 统计分析[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2000

[12] 魏明宝, 张甲耀, 王 海, 等. 应用正交实验研究铜绿假单胞菌原生质体制备与再生[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2005 18(2): 169—171, 175

[13] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993

[14] 周华平, 刘文清, 关 荣, 等. 原生质体再生与诱变在林可霉素产生菌选育中的应用[J]. 中国现代实用医学杂志, 2004 3(12): 10—12

—265