

# 原生质体融合技术在遗传育种中的应用

张子栋, 常胜合\*, 董湘熔, 杨飞飞, 李宗伟, 王雁萍, 秦广雍  
(郑州大学 河南省离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052)

**摘要:** 综述了原生质体的制备与再生因素、原生质体融合的促融方法、选择性遗传标记方法以及原生质体融合技术在遗传育种中的应用, 并且展望了原生质体融合育种的发展前景。

**关键词:** 原生质体; 原生质体融合; 遗传育种

**中图分类号:** Q813.2   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1004-3268(2010)06-0156-04

原生质体融合育种(protooplast fusion)是20世纪60年代发展起来的基因重组技术。通过2个遗传性状不同的亲株原生质体融合从而达到杂交的目的。1960年,法国的Barsi研究小组在进行2种不同动物细胞混合时发现了自发融合现象,同时日本的Dkada发现仙台病毒可诱发内艾氏腹水病细胞彼此融合,从而开始了细胞融合的探索。1974年,匈牙利的Ferecny等<sup>[1]</sup>采用离心力诱导的方法实现了白地霉(*Crotrichum candidum*)营养缺陷型突变株原生质体的融合;随后人们相继用NaCl、KCl和Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>等作为诱变剂进行融合,但融合率比较低。1978年,国际工业微生物遗传学讨论会提出了原生质体的融合问题,使这一技术迅速扩展到了育种领域。1979年,匈牙利的Pesti等<sup>[2]</sup>首先提出了运用融合育种技术提高青霉素产量的报告,从而开创了原生质体融合技术在遗传育种中的应用,综述如下。

## 1 原生质体的制备与再生技术

微生物细胞一般是有细胞壁的,进行该项技术的第一步就是制备原生质体。当前去除细胞壁的方法主要有机械法、非酶法和酶法。采用前2种方法制备的原生质体效果差,活性低,仅适用于某些特定菌株,因此,并未得到推广。在实际工作中,最有效和最常用的是酶法。该法时间短,效果好。使用的酶主要为蜗牛酶或溶菌酶,具体根据所用微生物的种类而定。彭智华等<sup>[3]</sup>在对野生大杯蕈(*Clitocybe maxima*)进行原生质体制备的过程中,将2种以上

的酶液混合使用能提高去壁效果。陈海昌等<sup>[4]</sup>证明,在一定范围内,酶作用的时间、浓度都与原生质体的形成率呈正相关,而与再生率呈负相关。林红雨等<sup>[5]</sup>采用酶解10min后补加EDTA的方法,改变酶解环境中的离子强度和渗透压,可以提高原生质体形成率。Costeron等<sup>[6]</sup>报道,在高渗Tris溶液中添加115%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等原生质体扩张剂,有助于制备原生质体;添加0.02mol/L镁离子,有利于原生质体的稳定。

## 2 原生质体融合的促融方法

由于在自然条件下,原生质体发生融合的频率非常低,所以在实际育种过程中要采用一定的方法进行人为地促融合。

### 2.1 化学法

用化学融合剂促进原生质体融合。化学试剂中最常用的是PEG结合高Ca<sup>2+</sup>、pH诱导法。优点:不需要特别的仪器设备,操作简便。缺点:原生质体聚集成团的大小不易控制,且PEG本身对原生质体具有一定的毒性,可能影响原生质体的再生,另外融合率不高。

### 2.2 物理法

用物理的手段(如电场、激光、超声波、磁声等)使亲本的原生质体发生融合。最常用的主要有电处理融合法、激光诱导融合法以及在电融合技术上改进的方法等。优点:电融合条件可控,融合率高,无毒。缺点:设备条件要求高,费用较高。

收稿日期: 2009-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(10505018); 农业部核技术农业应用项目(200803034)

作者简介: 张子栋(1986-),男,河南淮阳人,在读硕士研究生,研究方向:离子束生物工程。E-mail: zhangzidong1986@163.com

\*通讯作者: 常胜合(1974-),男,河南唐河人,副教授,博士,主要从事微生物基因功能方面的研究。

### 2.3 生物法

紫外灭活的病毒膜片能使细胞间产生凝聚和融合。病毒制备困难,操作复杂,试验重复性差,融合率很低,适用于动物细胞融合。

## 3 遗传标记的选择与融合子的检出

遗传标记的选择实际上是融合子检出的重要环节,也是融合子检出的标记。

### 3.1 营养缺陷型标记

营养缺陷型标记是传统有效的标记方法。融合的双亲株带有不同缺陷型标记,融合后采用基本培养基可以很容易检出融合子。DAIMH等<sup>[7]</sup>以大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株W4183(A<sup>g</sup>-)与菌株Fu20-1(Leu<sup>-</sup>)为亲本进行融合,在不加A<sup>g</sup>、Leu的M9培养基上得到融合子,融合率达到0.05%~0.7%。

### 3.2 抗药性标记

抗药性是由细菌遗传物质决定的重要特性,不同种类的细菌或细菌的不同菌株对某种药物的抗性存在差异,利用这种差异即可对融合子进行选择。金玉娟等<sup>[8]</sup>采用原生质体融合技术对带有链霉素抗性标记的芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)B12-13-2和带有红霉素抗性标记的欧文氏菌(*Erwinia sp.*)E26-2-3进行融合,得到了稳定融合菌株。

### 3.3 灭活标记

灭活原生质体融合是细菌原生质体融合技术的重大发展。在原生质体融合前,对单亲或双亲原生质体进行灭活标记,使其丧失再生的能力,与另一亲株融合后,融合子损伤互补存活。在这个系统中,被灭活的原生质体实际上起遗传物质的载体作用。常用灭活方法如热灭活、紫外灭活以及化学药剂灭活等。陈五岭等<sup>[9]</sup>将双亲株分别进行紫外灭活和热灭活标记,对选育广谱高效的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)灭活原生质体融合条件做了比较深入的研究。

### 3.4 荧光染色标记

荧光标记是使双亲株带有不同的荧光色素,融合后在荧光显微镜下观察、操作,直接挑选出带有2种荧光色素的融合细胞。黎永学等<sup>[10]</sup>将培养至对数生长期的双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)融合后对融合子进行荧光原位杂交法检测,表明此种方法便于筛选出融合子。

### 3.5 碳源利用标记

利用亲株对各种碳源利用的差异,结合其他特性分离筛选融合子。对于大肠杆菌和枯草芽孢杆菌来说,前者为G<sup>-</sup>,不产芽孢,不能利用淀粉;后者则为G<sup>+</sup>,产芽孢,能利用淀粉,可以利用这些特性进行融合细胞的筛选<sup>[11]</sup>。

### 3.6 特殊生理特征标记

圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)可以在无氮培养基上生长,将这一特性与另外一种细菌的抗药性或缺陷型等标记联合使用,在含药的无氮培养基上可以筛选到融合子。王怡平等<sup>[12]</sup>在研究球形红假单胞菌(*Rhodopseudomonas sphaeroides*)与荚膜红假单胞菌(*Rhodopseudomonas capsulate*)的原生质体融合时,以双亲株碳源利用的差异作为选择标记,成功筛选到利用硫化物能力较强的融合菌株F-A33。

### 3.7 分子标记

融合子是双亲株融合的产物,必然带有双亲的分子标记,因此,DNA水平上的分子标记是鉴别融合子最可靠的指标。1987年,Chenw等<sup>[13]</sup>在变形梭杆菌(*Fusobacterium varium*)与粪肠球菌(*Enterococcus faecium*)的融合中,用2个亲株的总DNA酶切片段经<sup>32</sup>P标记后做成2个探针,将亲株和融合子间及亲株间的DNA进行Southern斑点杂交,证明2个亲株与融合子有明显的同源性,而2个亲株之间则没有同源性。

### 3.8 其他遗传标记

除上面几种方法可以比较准确地筛选出融合子外,还有一些辅助性方法用于融合子的检测。(1)通过一些生化指标来选择融合子,通常测定的生化项目有DNA含量、氨基酸含量、酸性磷酸酶、同工酶等。(2)利用形态差异选择融合子,这一方法要求所采用的菌株具有可供肉眼直接观察的形态学差异。

## 4 原生质体融合技术在遗传育种中的应用

### 4.1 抗菌物质产生菌的选育

蒋文泓等<sup>[14]</sup>以禽多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)5:A弱毒菌株与禽大肠杆菌O<sub>2</sub>弱毒菌株作亲本进行原生质体融合,成功获得3株具有双亲耐药性和双亲菌体血清型的融合菌株,为进一步研制细菌多联高效弱毒疫苗开辟了新途径。石海波等<sup>[15]</sup>将副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei* HD1.7)与小白链霉菌(*Streptomyces albulus*)进行原生质体融合,获得了产生广谱高效肽类天然防腐

剂的融合菌株。

#### 4.2 益生菌的选育

王成涛等<sup>[16]</sup>将芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)T12-1与嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)ST及嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)C3进行原生质体融合,获得2株高效降解胆固醇的乳酸菌融合子S-T13-37和C-T24-8,可明显降低蛋黄乳、鲜肉糜和鲜鸡肝糜中的胆固醇含量,且具有乳酸菌发酵食品的风味特征。张莉滢等<sup>[17]</sup>通过原生质体融合技术能改良双歧杆菌的严格厌氧特性,有利于对双歧杆菌的开发和应用。吕兵等<sup>[18]</sup>利用原生质体融合技术将专性厌氧的短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)和典型的上面发酵的啤酒酵母进行原生质体细胞融合,成功筛选出兼具两亲本生物学性状、较稳定的融合子BSF1和BSF2,改善了双歧杆菌的耐氧性。

#### 4.3 脱胶工程菌的选育

金玉娟等<sup>[19]</sup>采用原生质体融合技术对G<sup>+</sup>的链霉素抗性红霉素敏感的芽孢杆菌B12-13-2和G<sup>-</sup>的红霉素抗性链霉素敏感的欧文氏菌E26-2-3进行多批次原生质体融合,从稳定的284株融合子筛选到6株脱胶能力强的融合菌株,降低了脱胶成本,使生物脱胶实现产业化,避免了由化学脱胶工艺而引起的严重环境污染。

#### 4.4 解磷、固氮工程菌的选育

韦革宏等<sup>[20]</sup>利用原生质体融合技术,成功地获得了豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosum*)US-DA2370和新疆中华根瘤菌(*Sinorhizobium xinjiangnesis*)CCBAU110的属间融合菌株,可分别在双亲寄主植物上结瘤。张广志等<sup>[21]</sup>利用原生质体融合技术将具有较高固氮活性的褐球固氮菌(*Azotobacter Chroococcum*)A41与具有解磷、抑病活性荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)P32融合获得同时具备固氮、解磷、抑病等活性的多功能菌株。

#### 4.5 在污水工程菌构建上的应用

许燕滨等<sup>[22]</sup>采用原生质体融合技术,将2株具有含氮有机化合物降解特性的假单胞菌T21和诺卡氏菌RB21融合构建成一株高效降解含氮有机化合物工程菌,应用于造纸漂白废水,融合菌去除CODCr和TCL的能力比混合菌分别提高了72.05%和190%。周德明<sup>[23]</sup>采用原生质体融合技术将球形红假单胞菌和酿酒酵母构建成为高效降解工程菌,工程菌用于废水处理的比降解率明显提高。程树培等<sup>[24]</sup>将光合细菌与酵母菌进行原生质体融

合,用于连续发酵豆制品废水处理。

#### 4.6 在其他微生物育种方面的应用

袁娟萍等<sup>[25]</sup>以原生质体融合技术构建广谱抗噬菌体菌株。肖在勤等<sup>[26]</sup>将热灭活的凤尾菇原生质体与金针菇原生质体融合,选出双亲细胞质和细胞核都融合的无锁状联合菌株,经融合核分裂技术处理后,融合核分裂成为具有锁状联合的双核菌株。通过原生质体融合技术还可对耐热机制进行研究。如有一株耐高温酵母一旦经EB诱变失去线粒体变为小菌落后,即失去耐高温特性,说明耐热性与线粒体有关系,因而应用原生质体技术对耐热性的转移和对耐热机制进行研究将是一条可行的途径。

### 5 展望

原生质体融合技术能把亲缘关系比较远,甚至毫无关系的生物体细胞融合在一起,为远缘杂交架起了桥梁,是改造细胞遗传物质的有力手段,它不仅打破了有性杂交重组基因创造新种的界限,更重要的是扩大了遗传物质的重组范围,已经成为遗传育种的重要手段,寻找具有更高融合效率的方法有着重要意义。如灭活原生质体融合、离子束细胞融合、非对称细胞融合以及基因重排分子育种等新方法相继提出并应用于微生物育种中,这是原生质体融合技术的新发展。相信随着科技的不断发展,原生质体融合技术在遗传育种中会占有越来越重要的地位。

#### 参考文献:

- [1] Ferenczy L, Kevei F, Zsolt J. Fusion of fungal protoplasts [J]. Nature, 1974, 248: 793-794.
- [2] Pesti M, Ferenczy L. Formation and regeneration of protoplast from phytophthora infestans acta phytopathologica [J]. Acad Sci Hung, 1979(14): 1-5.
- [3] 彭智华, 曾广文. 大杯蕈原生质体菌株筛选的研究 [J]. 园艺学报, 2000, 27(3): 193-197.
- [4] 陈海昌, 唐屹, 张岭花, 等. 原生质体融合技术提高啤酒酵母凝絮性的研究 [J]. 微生物学通报, 1994, 21(4): 213-217.
- [5] 林红雨, 陈策实, 尹光琳. 欧文氏菌和棒杆菌的属间融合研究 [J]. 微生物学通报, 1999, 26(1): 3-6.
- [6] Costerton J W. Nutrition and metabolism of marine bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 1967, 11: 1764-1777.
- [7] Daim H, Ziesman S, Ratchiffe T, et al. Visualization of protoplast fusion and quantitation of recombination in fused protoplasts of auxotrophic strains of *Escherichia coli* [J]. Metab Eng, 2005, 7(1): 5-52.

- [ 8 ] 金玉娟, 刘自镭, 任建平. 芽孢杆菌和欧文氏菌的原生质体融合的研究[ J ]. 微生物学杂志, 2002, 22(3): 10-11.
- [ 9 ] 陈五岭, 张芳琳, 景建洲, 等. 灭活原生质体融合技术选育苏云金杆菌新菌种——原生质体融合条件的研究[ J ]. 西北大学学报, 1998, 28(2): 147-149, 184.
- [ 10 ] 黎永学, 张德纯, 李代昆. 双歧杆菌和酿酒酵母原生质体融合子筛选方法的探讨[ J ]. 食品科学, 2006, 27(2): 84-86.
- [ 11 ] 黄勤妮, 刘佳, 宋秀珍, 等. 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的原生质体融合[ J ]. 首都师范大学学报, 2002, 23(1): 55-59.
- [ 12 ] 王怡平, 荚荣, 陈伟元, 等. 球形红假单胞菌和荚膜红假单胞菌的原生质体融合[ J ]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2): 297-302.
- [ 13 ] Chenw, Ohmiyak, Shimizu S. Intergeneric protoplast fusion between *Fusobacterium varium* and *Enterococcus faecium* for enhancing dehydrodivanillin degradation[ J ]. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53(3): 542-548.
- [ 14 ] 蒋文泓, 黄青云. 禽多杀性巴氏杆菌与大肠杆菌间原生质体融合的研究[ J ]. 畜牧兽医学报, 1999, 30(3): 267-272.
- [ 15 ] 石海波, 雷虹, 张铁丹, 等. 通过抗药性筛选产生广谱高效肽类天然防腐剂的融合菌株[ J ]. 中国食品添加剂, 2006(4): 82-85.
- [ 16 ] 王成涛, 牛天贵, 岳晓禹, 等. 应用原生质体融合技术构建高效降解胆固醇的乳酸菌[ J ]. 食品与发酵工业, 2002, 28(3): 1-5.
- [ 17 ] 张莉滢, 张德纯. 双歧杆菌与乳杆菌原生质体的融合及筛选[ J ]. 生物技术, 2003, 13(4): 14-15.
- [ 18 ] 吕兵, 项建琳. 应用原生质体融合技术改善双歧杆菌的耐氧性[ J ]. 食品科学, 2005, 26(4): 83-86.
- [ 19 ] 金玉娟, 刘自镭, 任建平. 芽孢杆菌和欧文氏菌的原生质体融合的研究[ J ]. 微生物学杂志, 2002, 22(3): 10-11.
- [ 20 ] 韦革宏, 陈文新. 豌豆根瘤菌与新疆中华银瘤菌原生质体的属间融合研究[ J ]. 生物工程学报, 2001, 17(5): 534-538.
- [ 21 ] 张广志, 杨合同, 李纪顺, 等. 褐球固氮菌和荧光假单胞菌原生质体制备条件的研究[ J ]. 山东科学, 2006, 9(6): 15-18.
- [ 22 ] 许燕滨, 江霞. 高效含氮有机化合物降解工程菌的构建研究[ J ]. 重庆环境科学, 2001, 23(2): 46-48, 51.
- [ 23 ] 周德明. 原生质体融合构建高效降解工程菌的研究[ J ]. 中南林学院学报, 2001, 21(2): 42-46.
- [ 24 ] 程树培, 邓良伟. 光合细菌与酵母原生质体融合子连续发酵豆制品废水研究[ J ]. 环境科学学报, 1997, 17(3): 372-377.
- [ 25 ] 裘娟萍, 周宁一. 以原生质体融合技术构建广谱抗噬菌体菌株[ J ]. 中国病毒学, 1995, 10(4): 362-366.
- [ 26 ] 肖在勤, 周俊初. 金针菇与凤尾菇科间原生质体融合研究[ J ]. 食用菌学报, 1998, 5(1): 6-12.

## (上接第 113 页)

- [ 7 ] Wayne C Zipperer. Species composition and structure of regenerated and remnant forest patches within an urban landscape[ J ]. *Urban Ecosystems*, 2002, 6: 271-290.
- [ 8 ] 毛学文, 施文甫, 王弋博. 火炬树腺毛的形态结构和发育的研究[ J ]. 西北植物学报, 1997, 17(6): 137-139.
- [ 9 ] 喻晓丽, 邱雪颖, 宋丽萍. 水分胁迫对火炬树幼苗生长和生理特性的影响[ J ]. 林业科学, 2007, 43(11): 57-61.
- [ 10 ] 张川红, 郑勇奇, 李继磊, 等. 北京地区火炬树的萌芽繁殖扩散[ J ]. 生态学报, 2005, 25(5): 978-985.
- [ 11 ] 刘全儒, 于明, 周云龙. 北京地区外来入侵植物的初步研究[ J ]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 2002, 38(3): 399-404.
- [ 12 ] 段新玲, 任东岁, 赵树珍. 火炬树的组织培养及植株再生[ J ]. 植物生理学通讯, 2000, 36(6): 535.
- [ 13 ] 刘玉华, 史纪安, 贾志宽, 等. 旱作条件下紫花苜蓿光合蒸腾日变化与环境因子的关系[ J ]. 应用生态学报, 2006, 17(10): 1811-1814.
- [ 14 ] 朱教君, 康宏樟, 李智辉, 等. 水分胁迫对不同年龄沙地樟子松幼苗存活与光合特性影响[ J ]. 生态学报, 2005, 25(10): 2527-2532.
- [ 15 ] 郭卫华, 李波, 黄永梅, 等. 不同程度的水分胁迫对中间锦鸡儿幼苗气体交换特征的影响[ J ]. 生态学报, 2004, 24(12): 2716-2722.
- [ 16 ] Farquhar G D, Sharkey T D. Stomata conductance and photosynthesis[ J ]. *Ann Rev Physiol*, 1982, 33: 317-345.
- [ 17 ] 许大全. 光合作用气孔限制分析中的一些问题[ J ]. 植物生理学通讯, 1997, 33(4): 241-244.
- [ 18 ] 刘金祥, 麦嘉玲. CO<sub>2</sub> 浓度增强对沿阶草光合特性的影响[ J ]. 中国草地, 2004, 26(3): 13-18.