

原生质体融合

- 一 原生质体融合
- 二 原生质体融合的特点
- 三 原生质体融合的过程
- 四 原生质体融合的应用

一 原生质体融合

- **定义：**原生质体融合就是将两个亲株的细胞壁分别通过酶解作用加以剥除，使其在高渗环境中释放出只有原生质膜包被着的球状原生质体。然后将两个亲株的原生质体在高渗条件下混合，由聚乙二醇助融，使它们相互凝集，通过细胞质融合接着发生两次基因组之间的接触、交换、遗传重组，在再生细胞中获得重组体。

一 原生质体融合

- **原理：**两个具有不同基因型的细胞，采用适宜的水解酶剥离细胞壁后，在融合剂作用下，两原生质体接触，融合成为**异核体**，经过繁殖复制进一步核融合，形成杂合二倍体，再经过染色体交换产生重组体，达到基因重组的目的，最后对重组体进行生产性能，生理生化和遗传特性分析。

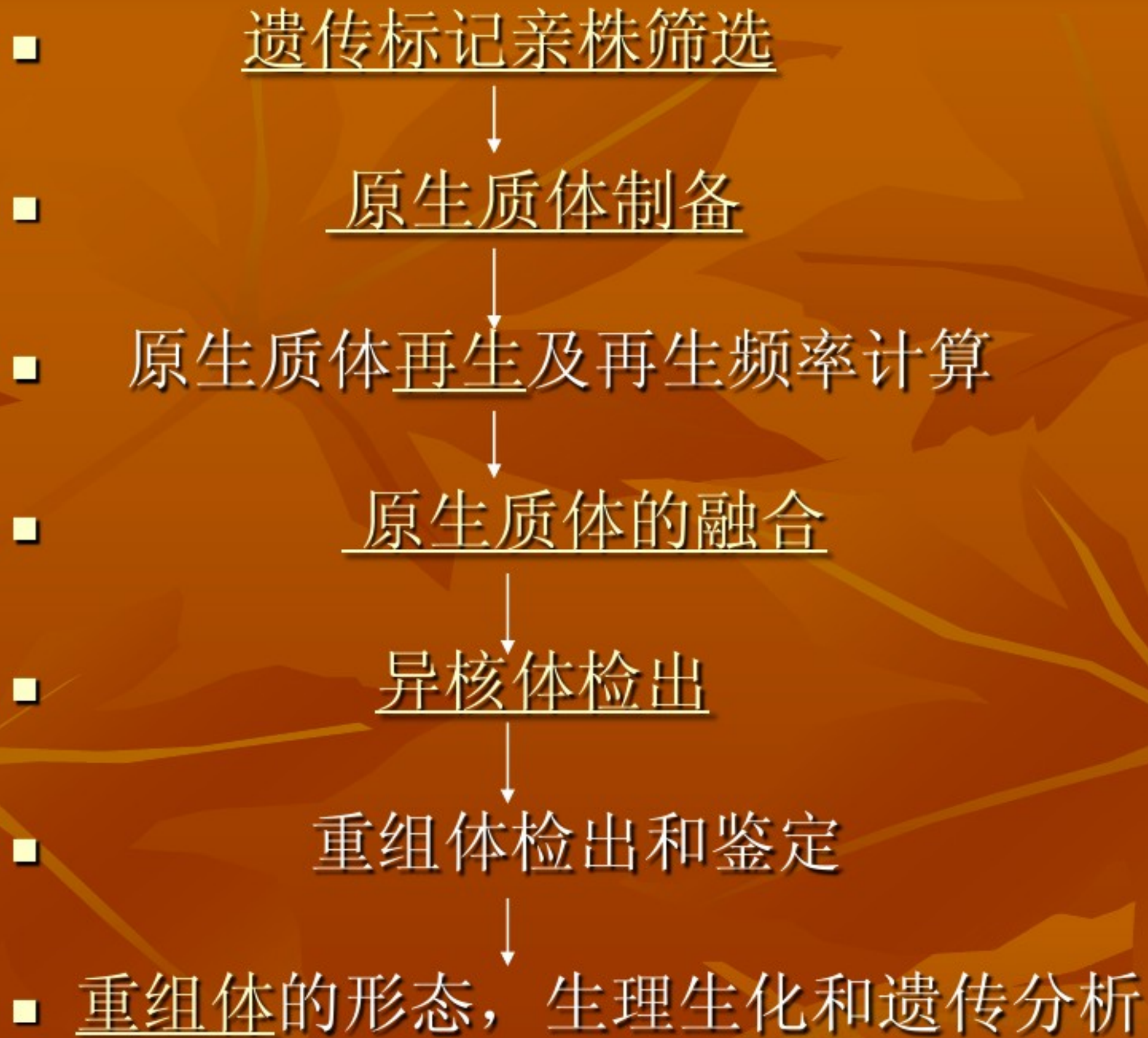
二 原生质体融合的特点

- 1 杂交频率较高
- 由于原生质体没有细胞壁的障碍，而且在原生质体融合时加入融合促进剂PEG，所以微生物原生质体间的杂交频率都明显高于常规杂交方法。
- 2 受接合型或致育性的限制较小
- 由于两亲株中任何一株都可能起受体或供体的作用，因此有利不同种属间微生物的杂交。另外，出于原生质体融合是和致育性没有关系的细胞杂交，所以其受接合型或致育性的限制就比较小。
- 3 重组体种类较多
- 由于原生质体融合后，两个亲株的整套基因组之间发生相互接触，有机会发生多次交换，可以产生各种各样的基因组合而得到多种类型的重组体

- 4 遗传物质的传递更为完整
- 由于原生质体融合是两个亲株的细胞质和细胞核进行类似合二为一的过程，因此，遗传物质的交换更为完整。原核微生物中可以得到将两个或更多个完整的基因组携带到一起。
- 5 可以获得性状优良的重组体
- 可以与其他育种方法相结合，将从其他方法获得的优良性状，通过原生质体融合再组合到一个单菌株中。
- 6 可以提高育种（筛选）效率
- 采用温度、药物或紫外线照射等处理钝化一方亲株的原生质体，然后再与另一亲株的原生质体融合，因此就可以在筛选过程中除去一方亲株，从而提高筛选效率。
- 7 有可能采用产量性状较高的菌株作为融合亲株
- 由于遗传标记如营养缺陷型往往影响工业微生物的某些生物合成能力，而进行一般基因重组时又必须采用较多的遗传标记，因此，势必使出发菌株的生产性能下降而影响杂交子代的生产水平。但由于原生质体融合频率较高，所以采用较少标记或不带标记的菌株进行融合，这对改良生产菌株性能来说非常有效。
- 8 有助于建立工业微生物的转化体系

三 原生质体融合的过程





1 标记菌株的筛选

- 用于原生质体融合的亲本需要携带遗传标记，以便于重组体的检出。常用营养缺陷型和抗性作为标记，也可以采用热致死，孢子颜色，菌落形态作为标记。实际时究竟采用哪种遗传标记，要根据实验目的来确定。如果原生质体融合的目的是为了进行遗传分析，那么应该采用带有隐性基因的营养缺陷性或抗性菌株；如果从育种角度进行原生质体融合，由于大多数营养缺陷性菌株都会影响代谢产物的产量，所以在选择营养缺陷性标记时，应尽量避免采用对正常代谢有影响的缺陷性菌株



2 原生质体的制备

- 获得有活力、去壁较为完全的原生质体是原生质体融合育种技术的先决条件。
- 在细菌和放线菌中，制备原生质体主要采用溶菌酶；制备葡萄球菌的原生质体，则需用溶葡萄球菌素处理；制备酵母菌的原生质体时，一般可用蜗牛酶；制备丝状真菌的原生质体时，可用蜗牛酶，在丝状真菌的原生质体制备中很少单独使用一种酶，而是采用两种或三种酶混合处理。
- 另外，影响原生质体制备的因素有许多，主要是菌体的性质，酶的性质以及反应环境

- (1) 菌体的前处理 为了使酶的作用效果更好一些，可对菌体作一些前处理，主要是在培养基中加入一些物质，加入这些物质的目的，就是使菌体的细胞壁对酶的敏感性增加。例如：青霉素能干扰甘氨酸交联桥与四肽侧链上的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，结果使细胞壁结构疏松，便于溶菌酶处理。
- (2) 菌体的培养时间 微生物能否较好地形成原生质体与微生物的生理状态有一定的关系。为了使菌体细胞易于原生质体比，一般选择对数生长期的菌体。这时的细胞正在生长，代谢旺盛，细胞壁对酶解作用最为敏感。由其得到的原生质体，形成率高，再生率也很高。

- (1) 酶浓度 对于不同种属的微生物来说，不仅对酶的种类要求不同，就是酶的浓度也有差异。一般地说，酶浓度增加，原生质体的形成率也增加，超过一定范围，则原生质体形成率的提高不明显。酶浓度过低，则不利于原生质体的形成；酶浓度过高，则导致原生质体再生率的降低。因此，有人建议以使原生质体形成率和再生率之积达到最大时的酶浓度作为最佳酶浓度。
- (2) 酶解温度 据报道酶解温度对原生质体再生的影响很大。因此，在选择最佳酶解温度时，除了要考虑酶的最适温度外，还要用原生质体再生率加以校正
- (3) 酶解时间 酶解时间过短，原生质体形成不完全，结果会影响原生质体间的融合；酶解时间过长，原生质体脱壁太完全，原生质体的质膜也易受到损伤，从而影响原生质体的再生，最终也不利于原生质体融合。因此，为了使融合实验得以成功，必须要选择合适的酶解时间才行。

- (1)渗透压稳定剂 等渗透压在原生质体制备中，不仅起到保护原生质体免于膨胀作用，还有助于酶和底物的结合。渗透压稳定剂多采用KCl、NaCl等无机物和甘露醇、山梨醇、蔗糖、丁二酸钠等有机物。菌株不同，最佳稳定剂也有差异，在细菌中多用蔗糖，丁二酸钠、NaCl等；在酵母菌中多用山梨醇、甘露醇等；在霉菌中多用KCl和NaCl等。稳定剂的使用浓度一般均在0.3—0.8mol/L之间。
- 除此以外，破壁时的pH值、培养基成分、培养方式、离子强度和种类等对原生质体的形成也有一定的影响。



3 原生质体的再生

- 酶解去壁后得到的原生质体应具有再生能力，即能重建细胞壁，恢复细胞完整形态并能生长、分裂，这是原生质体融合育种的必要条件。仅有细胞质膜的原生质体对渗透压很敏感、很容易破裂，致使原生质外流而使细胞死亡。所以，再生培养基必须与原生质体内的渗透压相等。这就要在再生培养基中加入具有一定渗透压的基质，即渗透压稳定剂
- 原生质体的再生是一个非常复杂的过程。一些学者研究认为，若原生质体的细胞壁剥去得太彻底，则有助于细胞壁的再生，残留的细胞壁犹如结晶时的“晶种”一样。大量实验也证明，破壁太彻底往往会引起原生质体再生率的大大降低。

- 在进行融合实验前，一般先要对原生质体再生率进行测定，否则就很难确定不能融合或融合频率低是由于双亲原生质体本来就没有活性或再生率很低，还是由于融合条件不适合所致。因此，测定原生质体形成率和再生率不仅可作为检查、改善原生质体形成和再生条件的指标，而且也是分析融合实验结果，改善融合条件的一个重要指标。原生质体再生率的计算公式：
$$\text{原生质体再生率} = \frac{(\text{再生平板菌数} - \text{低渗剩余菌数})}{(\text{破壁前菌数} - \text{低渗剩余菌数})}$$
- 一般地说，原生质体的再生率常常只有百分之几到百分之几十，有的甚至可达100%。如果原生质体不能恢复成原来菌的正常状态，那么微生物的原生质体在遗传操纵工作方面的应用将是不可能的。



4 原生质体的融合

- 仅仅将原生质体等量地混合在一起，融合频率仍然很低，只有加入表面活性剂聚乙二醇(PEG)，融合频率才会提高，常用的PEG是相对分子量为4000和6000的两种。
- 在原生质体融合过程中，除了要加入PEG外，还要加入钙镁等阳离子，它们对融合也有促进作用。在有钙离子存在的条件下融合时pH值为碱性能刺激产生最大的融合频率，这是因为PH能够改变体系的电性状态，从而影响原生质体的融合。
- 由于PEG既是融合剂又是渗透压稳定剂，浓度低于20%会使原生质体破裂而失去稳定性，浓度过高又会引起原生质体收缩而降低融合频率，因此，融合时PEG的最终浓度常采用30%—40%。由于PEG一加入，原生质体间的粘着即强烈地发生，融合就能较长时间有效地进行，所以PEG的处理时间不得太长。此外，PEG在高浓度下有毒，因此也要求融合时间不宜过长。。
- 有人指出，先用紫外线照射原生质体，再进行融合可以大大增加融合频率

- 另外，利用物理因子也可以促进细胞融合，主要是电融合技术。电融合是以空间定向，时间同步的可控方式来实现原生质体的融合，从而改变了化学融合(指用PEG融合)的随机过程。同时，其融合频率高，操作简便、快速，对细胞损伤较小，并可以在显微镜下进行。



5. 融合子的选择

- 原生质体融合后，重组子即融合子的选择方法是使原生质体融合技术得以应用的关键。按照schaeffer的观点，有两个遗传标记互补就可以确定其为融合子。因此，就可以通过那些选择性遗传标记，在选择培养基上挑出融合子。但是，由于原生质体融合后会产生两种情况，一种是真正的融合，即产生杂合二倍体或单倍重组体；另一种是暂时的融合，形成异核体。两者均可以在选择培养基上生长，一般前者较稳定。而后一种则是不稳定的，会分离成亲本类型，有的甚至可以以异核状态移接几代。因此，要获得真正融合子，必须在融合原生质体再生后，进行几代自然分离、选择，才能加以确定。
- 常用的融合子筛选方法有两种：直接法,间接法和钝化选择法

(1)直接法 原生质体融合后直接分离到MM或SM上，即可直接检出融合细胞。其优点是只需一步就可得到重组体，而大多数重组体是稳定的，缺点是难以检出那些表型延迟而基因已重组的融合体。

(2)间接法 把融合产物分离到CM上，使原生质体再生，融合和非融合的原生质体都能生长，再分离到SM上。其优点是能促使细胞更好地再生，表型延迟重组体容易检出。缺点是需要两步才能检出重组体，需要相当大的人力和物力，而且得到的重组体不大稳定。

直接法和间接法都要用营养缺陷性标记，所得重组体不一定能提高目的产物的产量。

(3)钝化选择法 钝化选择法是指灭活原生质体和具活性原生质体融合，把亲株中的一方（野生型）原生质体在 50°C 热处理2-3小时，使融合前原生质体代谢途径中的某些酶钝化不能再生，再与另一方（双缺陷性）原生质体融合，并分离到mm上，灭活除用加热方法外，还可以用紫外或药物处理。



6 实用性菌株的筛选

- 微生物原生质融合是一种新的基因重组技术，它具有定向育种的含义。但是，融合后所产生的融合子类型仍然是各种各样的。性能不同，产量不同的情况仍然存在，因此必要的人工筛选仍然很重要，主要是遗传稳定性等的实验。



四 原生质体融合育种的应用

- 陈宁等以球形芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌H4为亲株(前者对淡色库蚊有高毒力, 后者对粘虫、玉米螟有高毒力), 在2—3 mg/ml溶菌酶浓度下, 42° C酶解45分钟, 获得了原生质体, 其原生质体形成率和再生率分别为91.2%、37.6%及93.3%、31.2%, 然后将获得的原生质体以1:1比例混合, 加入40%的PEG于42° C保温5min, 结果获得了既杀双翅目又杀鳞翅目幼虫的融合子。

- 在链霉菌原生质体融合育种方面
- 邢孔照等以巴龙霉素产生菌和新留素产生菌的高产变种营养缺陷型为亲株进行融合，产生原养型重组体的频率为 10^{-4} 。其中有58%产生巴龙霉素，并从中获得了产量比原始菌株(300ug/ml)提高5—6倍的融合子。
- 杨昭中等以四环素产生菌金色链霉菌和正定霉素产生菌天蓝淡红链霉菌正定变种为亲株进行融合，以自身抗生素抗性为标记选择种间融合子，从而获得了一株正定霉素产量较亲株提高了2.6倍的融合子。