

张方方, 刘海元, 张晓琼, 等. 4 株石杉碱甲生产菌原生质体制备与再生条件的研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 85–89.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.025

4 株石杉碱甲生产菌原生质体制备与再生条件的研究

张方方¹, 刘海元², 张晓琼¹, 郑雅婷¹, 谌赛男¹, 黄小强¹, 吴水生

(1. 福建中医药大学, 福建福州 350122; 2. 上海医药工业研究院, 上海 200437)

摘要:为高效获得内生真菌 U29、U32、U50、U51 石杉碱甲生产菌株的原生质体和为原生质体融合及基因组改组选育高产石杉碱甲菌株提供参考, 研究了溶解酶的浓度、加酶量、酶解温度、稳定剂等因子对 4 株菌原生质体制备的影响。通过研究获得了菌株原生质体制备的优化条件: 溶壁酶浓度为 3.0%、加酶量为 2.0 mL/100 mg、菌龄为 5 d、酶解时间为 2.5 h、酶解温度为 30 ℃、0.6 mol/mL 氯化钠为稳定剂、CYM 培养基为再生培养基。在此优化条件下, 4 株菌的原生质体的产量均大于 7.0×10^7 个/mL, 再生率可达 20% 以上。

关键词:内生真菌; 溶解酶; 原生质体制备; 原生质体再生

中图分类号: S336 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0085-05

石杉碱甲(huperzine A, HupA) 是 20 世纪 80 年代, 我国学者从药用植物蛇足石杉[*Huperzaserrata* (Thunb.) Trev.] 中分离到的一种石松类倍半萜生物碱, 具有高效、低毒、可逆性的乙酰胆碱酯酶抑制作用, 目前已成为治疗阿尔茨海默病最有效的药物之一^[1-3]。

内生真菌长期生活在植物体内能够产生与宿主植物相同或相似的化学成分^[4]。自从 1996 年 Strobel 等^[5]从短叶红豆杉中分离到 1 株产紫杉醇的内生真菌, 利用内生真菌生产化

合物被人们广泛接受^[6]。笔者从闽泽马尾杉中分离到 1 株产石杉碱甲的内生真菌炭团菌 NX9, 但产量仅为 1.12 μg/L, 经紫外诱变得到 4 株产量较高的石杉碱甲生产菌 U29、U32、U50、U51, 产量分别为 17.10、17.46、19.89、16.85 μg/L, 但该产量仍较低无法实现工业化生产。通过菌种选育获得产量高、遗传稳定性好的菌种是实现利用内生真菌发酵生产石杉碱甲的首要前提。

原生质体育种能够快速、有效地提高菌株中代谢产物的产量, 包括原生质体再生育种、原生质体诱变育种、原生质体融合育种等方法^[7]。Jin 等以 10 株产量较高的多杀菌素产生菌(*Saccharopolyspora spinosa*) 为出发菌株, 进行原生质体融合后获得的融合菌株 *S. spinosa* 4~7, 其多杀菌素产量比出发菌株提高了 200.55% 以上^[8]。2002 年出现的基因组改组技术则是在原生质体融合的基础上通过对正向突变株库进行多亲本的原生质体递推式融合而实现高效的定向育种, 极大地加快了获得高产、稳产的菌株的速度^[9]。制备大量有活性的

收稿日期: 2015-05-14

基金项目: 福建省社会发展引导性项目(编号: 2015Y01010244); 福建省财政厅专项经费[编号: 闽财指(2011)1238]; 福建省大学生创新创业项目(编号: 201310393057)。

作者简介: 张方方(1990—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药生物工程研究。E-mail: 1170563131@qq.com。

通信作者: 吴水生, 从事中药生物工程研究。E-mail: wushuishengwss@163.com。

培养基分别适宜红心脆、早皇后不定芽伸长; 生根培养基均是 1/2MS + 1.0 mg/L IBA。

参考文献:

- [1] 耿守东, 张辉, 廖新福, 等. 早熟厚皮甜瓜早皇后的选育[J]. 中国蔬菜, 2004(4): 28–29.
- [2] 陶兴林, 黄永红, 赵长增, 等. 厚皮甜瓜品种离体培养再生植株能力的基因型差异研究[J]. 果树学报, 2005, 22(3): 252–255.
- [3] 陆璐, 赵长增, 陆婷. 甜瓜“黄蛋子”子叶再生完整植株研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(8): 81–85.
- [4] 王爱玲, 廖新福, 张敏. 早皇后甜瓜无菌系的初步建立[J]. 中国瓜菜, 2012, 25(5): 40–41.
- [5] 王爱玲, 张敏, 廖新福, 等. 甜瓜“黄醉仙”下胚轴再生体系的初步建立[J]. 北方园艺, 2013(12): 100–103.
- [6] 王爱玲, 张敏, 赵荣华, 等. 甜瓜黄醉仙子叶再生体系的初步建立[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(5): 1908–1910.
- [7] 孔祥生, 张妙霞. 甜柿组织培养中玻璃化现象的发生与防治[J]. 北方园艺, 1999(4): 15–16.

- [8] 陶兴林, 黄永红, 陆璐, 等. 2 个甜瓜品种高效再生体系的建立[J]. 西北植物学报, 2005, 25(4): 806–811.
- [9] 乔永旭. 甜瓜再生体系的建立[J]. 北方园艺, 2010(13): 166–168.
- [10] 付秋实, 曹芸运, 谭明明, 等. 薄皮甜瓜离体再生体系的优化[J]. 中国瓜菜, 2014, 27(2): 16–19.
- [11] 于喜艳, 何启伟, 孔庆国. 甜瓜子叶组织培养的研究[J]. 山东农业科学, 2002(2): 22–23.
- [12] 葛屹松, 赵晓琴, 李冠. 新疆甜瓜组培体系的优化及抗病转基因研究[J]. 新疆大学学报: 自然科学版, 2003, 20(1): 55–58.
- [13] 肖守华, 赵善仓, 王崇启, 等. 厚皮甜瓜高效再生体系的建立[J]. 山东农业科学, 2007(4): 35–39.
- [14] 骆开明. 甜瓜再生体系的建立[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(11): 4419–4423.
- [15] 孙天国, 沙伟, 金忠民. 薄皮甜瓜子叶组织培养的研究[J]. 北方园艺, 2005(2): 64–65.
- [16] 马国斌, 王鸣, 郑学勤. 甜瓜组织培养再生体系的比较研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 1999(2): 2–6.

原生质体是原生质体融合及基因组改组育种的前提^[7]。有效的原生质体制备和再生方法是保证原主质体产量和活性的主要途径,原生质体的制备和再生主要受酶的种类与浓度、酶解时间与温度、菌龄、渗透压稳定剂、培养基成分等因素^[10-11]的影响,且由于菌株间存在的差异性,导致原生质体制备和再生的方法存在差异^[12]。优化原生质体制备及再生的最优条件是原生质体育种的重要方法。为此,本试验研究了溶解酶的浓度、加酶量、酶解温度、稳定剂、再生条件等对内生真菌 U29、U32、U50、U51 石杉碱甲生产菌株的原生质体制备效率的影响,旨在筛选出适合产石杉碱甲内生真菌的原生质体制备与再生的最优条件,为原生质体育种及基因组改组育种奠定基础,最终为微生物发酵法生产石杉碱甲且早日实现工业化生产奠定基础,从根本上解决石杉碱甲药源不足的问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 石杉碱甲产生菌 U29、U32、U50、U51:由石杉碱甲产生菌 NX9 诱变所得,实验室保藏。

1.1.2 培养基的配制 (1) PDA 液体培养基:马铃薯 200 g/L;葡萄糖 20 g/L。(2) PDA 固体培养基:马铃薯 200 g/L;葡萄糖 20 g/L;琼脂 15~20 g/L。(3)查氏培养基:蔗糖 30 g/L;硝酸钠 3 g/L;磷酸二氢钾 1 g/L;氯化钾 0.5 g/L;硫酸镁 0.5 g/L;硫酸亚铁 0.001 g/L;琼脂 16 g/L。(4)CYM 培养基:蛋白胨 2 g/L;葡萄糖 20 g/L;酵母膏 2 g/L;硫酸镁 5 g/L;磷酸二氢钾 0.46 g/L;磷酸氢二钾 1 g/L;琼脂 16 g/L。(5) MYG 培养基:麦芽糖 5 g/L;酵母膏 5 g/L;葡萄糖 10 g/L。(6)酵母膏培养基:酵母膏 5 g/L;蔗糖 10 g/L。(7)再生固体培养基:以 0.6 mol/L NaCl 配制的 PDA 培养基、马丁培养基、查氏培养基、CYM 培养基和酵母膏培养基。(8)再生半固体培养基:再生培养基中琼脂减半。所有培养基均以 121 ℃,灭菌 20 min。

1.1.3 试剂 溶壁酶(美国 sigma 公司);氯化钠、蔗糖、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氯化钾、硫酸镁、硫酸亚铁、硝酸钠(国药集团化学试剂有限公司);酵母膏(广东江门生物技术开发中心有限公司);蛋白胨(广西环凯微生物科技有限公司)。

渗透压稳定剂:采用 0.6 mol/L 的 NaCl 溶液。HupA 标准品(纯度 > 98%,长沙中仁生物技术有限公司,批号:2012120301)。

表 1 溶壁酶浓度对菌株 U29、U32、U50、U51 原生质体产量及再生率的影响

溶解酶浓度 (%)	原生质体产量(10 ⁷ 个/mL)				原生质体再生率(%)			
	U29	U32	U50	U51	U29	U32	U50	U51
2.0	2.00	1.80	1.90	2.20	6.00	5.56	5.79	6.36
2.5	3.40	2.80	3.70	3.60	7.12	7.46	7.14	7.33
3.0	6.20	6.00	6.50	6.60	17.10	16.33	16.62	16.97
3.5	6.80	6.00	6.50	6.20	7.41	7.60	7.38	7.55
4.0	4.70	4.00	3.80	4.30	4.47	4.75	4.47	4.65

2.2 加酶量的选择

分别将 100 mg 新鲜菌丝体加入 1.0、2.0、3.0、3.5、4.0 mL 的酶液,溶解酶浓度为 3.0%,研究加酶量对 4 菌株的原生质体产量及再生率的影响。加入的酶液过多或过少都难以得到最大量的原生质体,当加酶量为 2.0 mL/100 mg 时,4

1.1.4 仪器与设备 MJ P-250 型霉菌培养箱(上海精宏实验设备有限公司),BSC-1360 II A2 超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司),超高效液相质谱仪(Waters, Milford, MA, USA), ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 反相柱(Waters, 100 mm×2.1 mm,1.7 μm)。

1.2 方法

1.2.1 菌丝体培养 将菌株 U29、U32、U50、U51 孢子液以 10% (体积比)的接种量接种于含 80 mL PDA 液体培养基的 250 mL三角摇瓶中,于 28 ℃恒温箱中静置培养 5 d,6 层高级擦镜纸过滤,0.6 mol/L NaCl 溶液淋洗 3 次,将菌丝体转移到直径为 6 cm 培养皿中,称质量待用。

1.2.2 原生质体的制备、纯化与再生 每 100 mg 菌丝体加 2 mL 酶解液,于适宜温度的恒温摇床中振荡酶解。每 30 min 吸取一定量的酶解液观察,计算原生质体数。酶解完毕后,酶解液用无菌棉花过滤,于 3 700 r/min 离心 10 min,倒掉上清液,用渗透压稳定剂离心洗涤 2 次,收集原生质体重悬于渗透压稳定剂中,血球计数板计数。用渗透压稳定剂稀释原生质体,使之达到一定浓度,然后吸取 0.3 mL 加入含有 4.7 mL 再生半固体培养基的具塞试管中,摇匀后倒入再生固体培养基平板内,于 28 ℃下培养 7 d;同时,再吸取 0.3 mL 原生质体悬液加入已含有 4.7 mL 低渗半固体培养基的具塞试管中,摇匀后倒入 PDA 固体培养基平板,作为对照。观察菌落生长情况,用以下公式计算再生率:再生率=(再生固体培养基上菌落数-低渗固体培养基上菌落数)/原生质体数×100%。分别考察不同的溶解酶浓度、加酶量、菌龄、酶解时间、酶解温度、渗透压稳定剂及浓度、再生培养基对原生质体制备与再生的影响。每个影响因素均平行考察 3 份,结果取平均值,获得石杉碱甲生产菌原生质体形成和再生的最佳条件。

2 结果与分析

2.1 酶浓度的选择

分别采用 2.0%、2.5%、3.0%、3.5% 的溶壁酶酶解菌株 U29、U32、U50、U51 的菌丝体,在其他条件一致的情况下通过计算其原生质体的产量与再生率,考察原生质体制备与再生的最适酶浓度。发现溶壁酶浓度由 2.0% 至 3.0% 时石杉碱甲生产菌的原生质体产量及再生率均增大,虽然溶解酶浓度为 3.5% 时 4 菌株的原生质体产量均较大,但是原生质体的再生率却比 3.0% 时低,因此确定溶解酶的浓度为 3.0% (表 1)。

菌株的原生质体产量及再生率均达到最大(表 2),因此确定最适宜的加酶量为 2.0 mL/100 mg。

2.3 菌龄的选择

将 3.0% 溶壁酶分别加入静止培养 3、4、5、6、7 d 的 U29、U32、U50、U51 菌丝体,加酶量 2.0 mL/100 mg,考察菌龄对原

表 2 加酶量对菌 U29、U32、U50、U51 原生质体产量及再生率的影响

加酶量 (mL/100 mg)	原生质体产量(10^7 个/mL)				原生质体再生率(%)			
	U29	U32	U50	U51	U29	U32	U50	U51
1.0	2.30	2.50	1.90	2.90	8.70	8.40	8.95	8.62
2.0	6.50	6.40	6.20	6.70	18.46	18.28	18.39	16.57
3.0	6.20	6.00	5.90	6.20	9.68	9.67	9.66	9.68
3.5	4.70	4.30	4.10	4.40	8.66	8.95	9.39	8.25
4.0	3.60	4.10	3.90	4.00	6.11	5.90	5.92	5.50

生质体产量和再生率的影响。发现随着菌龄的增加,4 株菌的原生质体产量及再生率均增大,但培养时间过长原生质体

产量及再生率均下降。当培养时间为 5 d 时,原生质体的产量及再生率均最大(表 3),因此确定最佳菌龄为 5 d。

表 3 菌龄对 U29、U32、U50、U51 原生质体制备和再生的影响

菌龄 (d)	原生质体产量(10^7 个/mL)				原生质体再生率(%)			
	U29	U32	U50	U51	U29	U32	U50	U51
3	3.40	3.80	3.00	2.90	6.47	6.58	6.67	6.21
4	5.70	5.40	5.50	5.20	9.07	9.17	9.60	8.46
5	6.70	6.90	7.00	6.60	18.81	17.39	16.57	16.97
6	6.40	6.20	6.00	5.80	7.97	8.06	7.83	7.24
7	5.60	5.20	5.00	4.90	7.14	7.31	7.20	6.73

2.4 酶解时间的研究

在确定的最佳酶浓度、加酶量及菌龄条件下,分别研究了酶解 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h 后的原生质体产量及再生情况。发现酶解时间过短会导致细胞壁水解不充分,原生质体不

能充分释放,产量较低,但原生质体活性较高,再生率较高;而酶解时间过长导致了原生质体皱缩,损害细胞质膜导致再生率急剧下降^[13]。其中酶解 2.5 h 时 4 株菌的原生质体产量及再生率均达最大(表 4)。因此,确定 2.5 h 为最佳酶解时间。

表 4 酶解时间对 U29、U32、U50、U51 原生质体产量及再生率的影响

酶解时间 (h)	原生质体产量(10^7 个/mL)				原生质体再生率(%)			
	U29	U32	U50	U51	U29	U32	U50	U51
1.5	2.80	2.30	2.70	3.00	8.21	8.26	8.15	7.67
2.0	5.50	5.80	6.00	5.30	13.64	13.19	13.00	12.45
2.5	6.90	7.00	7.20	6.90	17.97	18.00	17.78	19.13
3.0	6.30	6.00	6.20	6.40	9.78	9.53	9.40	9.80
3.5	5.70	5.30	5.20	5.60	7.72	8.11	7.69	7.50

2.5 酶解温度的选择

在上述最佳条件下,分别将 U29、U32、U50、U51 菌丝体置于 26、28、30、32、34 ℃ 的恒温摇床中,在 70 r/min 条件下酶解 2.5 h 后对原生质体产量和再生率进行分析。发现当酶解

温度为 28~30 ℃ 时,原生质体产量与再生率随温度升高而增大,温度高于 30 ℃ 后,4 株菌的原生质体产量与再生率均明显下降(表 5)。因此,确定酶解温度为 30 ℃。

表 5 酶解温度对 U29、U32、U50、U51 原生质体产量和再生率的影响

酶解温度 (℃)	原生质体产量(10^7 个/mL)				原生质体再生率(%)			
	U29	U32	U50	U51	U29	U32	U50	U51
26	4.20	4.50	4.80	5.00	8.10	8.00	8.33	8.20
28	5.70	6.00	6.20	6.40	9.46	9.72	9.94	10.14
30	7.10	7.00	7.20	7.20	18.46	18.57	18.61	19.17
32	5.40	5.70	6.00	5.90	10.89	10.53	9.80	9.56
34	3.50	3.80	4.00	4.30	8.49	8.39	8.25	7.93

2.6 渗透压缓冲剂的选择

在上述最佳条件下,分别研究了氯化钾、氯化钠、蔗糖、甘露醇、硫酸镁、氯化钙等渗透压缓冲剂对菌 U29、U32、U50、U51 原生质体产量及再生率的影响。发现当酶浓度为 3.0%、菌龄为 5 d、酶解时间为 2.5 h、酶解温度为 30 ℃ 时,以氯化钠作为渗透压稳定剂制备 4 株菌的原生质体时,原生质

体产量及再生率均最大,故选用氯化钠为最佳的渗透压稳定剂(表 6)。此外,研究了不同浓度氯化钠对菌 U29、U32、U50、U51 原生质体产量与再生率的影响,发现氯化钠浓度在 0.4~0.6 mol/L 时,4 株菌的原生质体产量及再生率随浓度的增大而增大,当浓度大于 0.6 mol/L 时,产量及再生率均下降(表 7)。因此,最佳氯化钠浓度为 0.6 mol/L。

表 6 渗透压稳定剂对 U29、U32、U50、U51 原生质体产量及再生率的影响

渗透压缓冲剂	原生质体产量 (10 ⁷ 个/mL)				原生质体再生率 (%)			
	U29	U32	U50	U51	U29	U32	U50	U51
氯化钾	5.80	5.50	5.80	5.00	7.24	7.82	7.59	7.40
氯化钠	6.90	6.80	7.00	6.80	19.13	18.24	19.43	17.94
蔗糖	3.40	3.20	2.90	4.00	8.53	8.44	8.28	7.50
甘露醇	3.10	3.60	2.80	3.60	9.29	7.67	8.57	11.00
硫酸镁	3.80	4.00	4.10	4.50	16.32	16.00	14.63	14.67
氯化钙	6.90	7.00	7.10	6.90	9.25	9.74	9.61	8.93

表 7 不同浓度 NaCl 渗透压缓冲液对 U29、U32、U50、U51 原生质体产量和再生率的影响

氯化钠浓度 (mol/L)	原生质体产量 (10 ⁷ 个/mL)				原生质体再生率 (%)			
	U29	U32	U50	U51	U29	U32	U50	U51
0.4	5.20	5.30	5.60	5.00	8.85	8.68	7.50	8.00
0.5	6.50	6.30	6.10	6.00	10.49	10.48	10.10	9.53
0.6	7.30	7.20	7.50	7.20	19.45	20.00	19.20	19.72
0.8	6.50	6.10	6.00	5.80	10.40	10.66	9.75	9.64
1.0	4.60	4.60	4.00	4.80	8.04	7.83	7.50	7.29

2.7 再生培养基的选择

采用上面研究所得最优条件制备 4 株菌的原生质体,然后分别将其接种到 PDA、CYM、MYG、沙氏、酵母膏等再生培养基进行培养。发现不同培养基其再生率明显不同,以 CYM 再生培养基培养 U29、U32、U50、U51 原生质体时,再生率最高(图 1)。因此,确定最佳的再生培养基为 CYM 培养基。

2.8 原生质体的观察

4 株菌菌丝体经溶壁酶在 30 ℃ 作用下,恒温振荡处理约 30 min 后开始释放出原生质体,原生质体形状基本一致,多呈球形、透亮,同时可观察到大量菌丝片段(图 2)。酶解 1.5 ~ 2.0 h 后,菌丝体几乎全被酶解,只剩下一些细小分散的残余

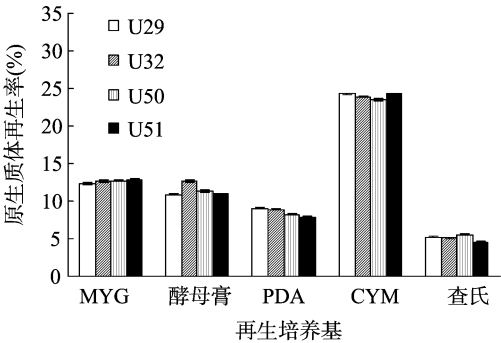


图1 不同培养基对 U29、U32、U50、U51 原生质体再生率的影响

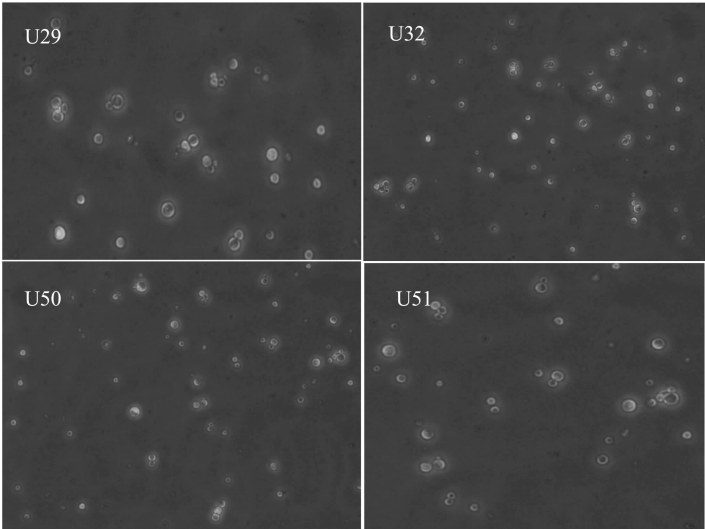


图2 U29、U32、U50、U51 原生质体(40×10)

物,并有大量的原生质体形成。

3 讨论

3.1 酶浓度及加酶量对原生质体产量及再生率的影响

真菌细胞壁组分复杂,不同培养条件和不同菌龄细胞壁

的结构和成分差异很大,而且酶解真菌细胞壁的过程还涉及到多个影响因素,本研究通过研究溶壁酶浓度、加酶量、菌龄、培养时间等因子对 4 株石杉碱甲生产菌原生质体制备的影响,获得了制备 4 株菌原生质体的最优条件。

真菌细胞壁的主要成分包括几丁质、糖原、蛋白质、半纤

纤维素等。在形成原生质体的过程中,细胞壁被溶解酶酶解出孔洞,原生质体从这些孔洞中溢到周围的稳渗剂中。因此,细胞壁溶解酶在真菌制备原生质体的反应系统中起直接作用^[14]。吴正钢等研究发现采用单一酶制备原生质体,消除细胞壁不完全只能形成少量的原生质体^[15],但本研究通过考察单一溶壁酶不同浓度对 4 株菌原生质体形成与再生的影响,研究发现溶壁酶的浓度应适当,过低或过高的酶浓度都不利于原生质体的形成与再生。低浓度的溶壁酶酶解作用不彻底,不利于原生质体的生成,过高浓度降低了原生质体的数量和活性,致使形成量与再生率都有明显下降。当酶浓度为 3.0% 时,原生质体的产量均大于 6.0×10^7 个/mL,再生率均大于 16%,比采用复合酶系制备原生质体的产量及再生率高^[14-15],不仅简化了试验步骤而且节约成本。

加酶量对提高原生质体的产量及再生率的影响也较大,过大或过小都难以得到最大量的原生质体。加酶量过少酶解不彻底,菌丝中的原生质体无法得到充分的释放,且影响原生质体的活性,降低再生率。

3.2 菌龄对原生质体制备及再生率的影响

真菌生理状态是决定原生质体产量及再生率的主要因素之一,不同的生长时期,真菌生理状态不同,细胞壁的结构、菌体活力及代谢水平也不相同。因此,菌龄是明显影响原生质体释放频率的主要因素。丝状真菌以年轻的菌丝用来分离原生质体最佳,尤其是生长对数期的菌体。本研究通过绘制 4 株菌的生长曲线,发现 4 株菌的对数生长期均为 3~7 d,幼龄菌丝和老龄菌丝均不利于酶解。菌龄过长,细胞壁发生老化增厚,不易释放原生质体,菌龄过短则菌丝体易破裂^[16]。研究还发现 3~5 d 的菌体随着培养时间的增加,原生质体产量及再生率均提高,当菌龄为 5 d 时,原生质体产量及再生率均达最大值,随后逐渐降低。

3.3 酶解温度对原生质体制备及再生率的影响

不同的酶具有不同的最适温度,酶解温度直接影响酶的活性。只有在最适的酶解温度下,酶的活性才最高,酶促反应速率才最大。此外,酶解温度还影响真菌的生理状态、菌丝体细胞壁结构性疏散及原生质体的活力。通常,真菌的最适酶解温度为 25~35 ℃,当温度在 30 ℃ 时,4 株菌原生质体的产量及再生率均达最大值,表明 30 ℃ 为溶壁酶作用 4 株菌细胞壁的最适温度。

3.4 不同渗透压稳定剂对原生质体制备及再生的影响

渗透压稳定剂既能维持原生质体内外渗透压的平衡,维持原生质体的形态,防止破裂或皱缩,影响原生质体活力,对酶的活性也有一定的促进作用,是影响原生质体制备与再生的重要因素。研究发现 6 种常用稳定剂中,以 0.6 mol/L 氯化钠为渗透压稳定剂时,4 株菌的原生质体制备效果最好,可能由于氯化钠等有助于酶与底物结合,对酶反应起促进作用^[17]。

3.5 不同再生培养基对原生质体再生的影响

再生培养基的选择直接影响原生质体的再生率。本研究比较了 PDA、CYM、MYG、酵母等 5 种再生培养基对 4 株菌原生质体再生率的影响,发现 CYM 再生培养基效果最好。可能由于酵母膏、蛋白质、氨基酸、糖类营养物质可能是细胞壁合成的前体物质,或经过代谢转化成细胞壁的前体物质,或促进细胞代谢,参与细胞壁的加速合成。CYM 培养基中同时含

有酵母膏、蛋白质、氨基酸、糖类,丰富的营养物质更有利于细胞壁再生。

4 结论

本试验研究了 4 株石杉碱甲生产菌原生质体制备及再生的条件,获得了原生质体制备及再生的最优体系:溶壁酶浓度为 3.0%、加酶量为 2.0 mL/100 mg、菌龄为 5 d、酶解时间为 2.5 h、酶解温度为 30 ℃、0.6 mol/L 氯化钠为稳定剂、CYM 培养基为再生培养基。在此体系下,4 株菌原生质体的产量均大于 7.0×10^7 个/mL,再生率均超过 20%。本研究为原生质体融合及基因组改组选育高产石杉碱甲菌株奠定了重要基础。

参考文献:

- [1]徐择邻,储宾孟,栾新慧,等. 福定碱(fordine)的结构测定[J]. 军事医学科学院院刊,1985(3):222.
- [2]刘嘉森,俞超美,周有作,等. 石杉碱甲和石杉碱乙的化学研究[J]. 化学学报,1986,44(10):1035-1040.
- [3]Rafii M S, Walsh S, Little J T, et al. A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease[J]. Neurology, 2011, 76(16):1389-1394.
- [4]Li J, Zhao J L, Xu L J, et al. Endophytic fungi from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(5):733-737.
- [5]Strobel G, Yang X, Sears J, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*[J]. Microbiology, 1996, 142(Pt 2):435-440.
- [6]Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4):491-502.
- [7]施巧琴,吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京:科学出版社, 2009:228.
- [8]Jin Z H, Xu B, Lin S Z, et al. Enhanced production of spinosad in *Saccharopolyspora spinosa* by genome shuffling[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 159(3):655-663.
- [9]李义勇,张亚雄. 基因重组技术在工业微生物菌种选育中应用的研究进展[J]. 中国酿造,2009(1):11-14.
- [10]邱静,罗水忠,姜绍通,等. 高产 L-乳酸米根霉的原生质体制备与再生条件研究[J]. 食品科学,2011,32(9):174-178.
- [11]陈文强,邓百万,彭浩,等. 1 株产紫杉醇内生真菌的原生质体制备与再生[J]. 江苏农业科学,2011,39(2):100-102.
- [12]伏建国,强胜,朱云枝. 链格孢菌原生质体的制备与限制性内切酶介导整合(REMI)转化的致病性诱变[J]. 菌物学报,2005, 24(3):407-413.
- [13]郑重道,谢达平,谭周进,等. 影响微生物原生质体融合技术的因素[J]. 湖南农业科学,2006(4):35-38.
- [14]周选围,王子楠,魏雅敏,等. 红豆杉内生真菌发酵培养基和原生质体制备酶系统的筛选[J]. 应用与环境生物学报,2006, 12(2):176-181.
- [15]吴正钢,汪捷,谢薇薇,等. 禾本科内生真菌研究 15:禾本科内生真菌 *Epichloë yangzii* 原生质体的制备与再生[J]. 江苏农业科学,2012,40(2):17-20.
- [16]王卫卫,任鹏康,郭宏星. γ -亚麻酸菌株少根根霉原生质体形成与再生[J]. 西北大学学报:自然科学版,2002,32(4):397-400.
- [17]诸葛斌,诸葛健. 现代发酵微生物实验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:110-111.