

文章编号:1674-2869(2018)06-0601-05

# 柄蓝状菌原生质体的制备与再生条件优化

张荟蓉<sup>1</sup>,周志义<sup>2</sup>,耿安利<sup>\*3</sup>

1. 武汉工程大学化学与环境工程学院,湖北 武汉 430205;
2. 武汉工程大学化工与制药工程学院,湖北 武汉 430205;
3. 新加坡义安理工学院,新加坡 999002

**摘要:**为了建立以聚乙二醇/氯化钙(PEG/CaCl<sub>2</sub>)原生质体介导的柄蓝状菌(*Talaromyces Stipitatus*)高效的遗传转化系统,分别从材料选择,真菌菌龄,不同的渗透压稳定剂,酶的不同种类配比,酶的浓度,酶解时间及不同再生方式对柄蓝状菌 EMM 原生质的制备与再生条件进行优化。结果表明:以柄蓝状菌 EMM 接种生长 48 h 的菌丝为制备材料,1 mol/L MgSO<sub>4</sub>作为渗透压稳定剂,菌丝在温度为 30 ℃,浓度为 50 mg/mL 的裂解酶溶液中酶解 3 h,得到的原生质体先用再生培养基孵化培养 12 h,然后再与 PDA 培养基混合铺板,以上组合条件下原生质体的释放量可达  $8.73 \times 10^8$  /mL,再生率可达 17.7%。

**关键词:**柄蓝状菌;PEG/CaCl<sub>2</sub>转化;原生质体;再生条件

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2018.06.003

## Optimized Conditions for Preparation and Regeneration of Protoplasts from *Talaromyces Stipitatus*

ZHANG Huirong<sup>1</sup>, ZHOU Zhiyi<sup>2</sup>, GENG Anli<sup>\*3</sup>

1. School of Chemical and Environmental Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China;
2. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China;
3. Ngee Ann Polytechnic, Singapore 999002

**Abstract:** To establish a high efficient genetic transformation system mediated by the polyethylene glycol/calcium chloride (PEG/CaCl<sub>2</sub>) protoplast for *Talaromyces Stipitatus* (*T. Stipitatus*), the preparation and regeneration conditions of EMM protoplasts from *T. Stipitatus* were optimized such as materials, fungal age, different osmotic pressure stabilizers, different enzyme type ratios, enzyme concentration, enzymolysis time and the regeneration mode. The results show that when the protoplasts are prepared with age of 48 h mycelia from *T. Stipitatus* EMM as preparation materials, 1 mol/L MgSO<sub>4</sub> as the osmotic stabilizer in mass concentration of 50 mg/mL lyase digested for 3 h at 30 ℃, the protoplasts are cultured in the regeneration medium for 12 h and finally plated with PDA medium, the release amount of protoplasts is  $8.73 \times 10^8$  /mL with 17.7% of the regeneration rate.

**Keywords:** *Talaromyces Stipitatus*; PEG/CaCl<sub>2</sub> transformation; protoplasts; regeneration

近年来,丝状真菌在工业酶方面的研究得到了广泛应用。柄蓝状菌 EMM 是丝状真菌中一株经过诱变的高产纤维素酶菌株,是由本实验室自

主分离得到,其纤维素与半纤维素的产量已经可以达到工业水平<sup>[1]</sup>。为了更进一步提高纤维素酶的产量,从分子水平上分析菌株的特性,转化系统

收稿日期:2017-06-04

基金项目:新加坡国立研究基金会项目(NRF20100TH-TRD001-003)

作者简介:张荟蓉,硕士研究生。E-mail: zhanghuirong15@yahoo.com

\*通讯作者:耿安利,博士,教授。E-mail: geng\_anli@np.edu.sg

引文格式:张荟蓉,周志义,耿安利. 柄蓝状菌原生质体的制备与再生条件优化[J]. 武汉工程大学学报,2018,40(6): 601-605.

的建立成为其研究的第一步<sup>[2]</sup>。相比于其他受体的转化体系,丝状真菌因为存在细胞壁,会导致在转化时外源基因很难进入<sup>[3]</sup>。针对丝状真菌的转化方法主要有 PEG/CaCl<sub>2</sub>原生质体转化<sup>[4-5]</sup>,电击转化<sup>[6-7]</sup>,农杆菌介导转化<sup>[8-9]</sup>,基因枪转化<sup>[10]</sup>,限制性内切酶介导转化<sup>[11]</sup>,其中 PEG/CaCl<sub>2</sub>原生质体转化法和农杆菌介导转化法是现在丝状真菌使用最多的转化方法<sup>[12]</sup>。农杆菌介导法虽然受体形式多样,转化效率高,但其在转化过程中会在转化体系中引入外源片段<sup>[13]</sup>,并且操作复杂,周期长,转过程容易受影响<sup>[14]</sup>。PEG/CaCl<sub>2</sub>原生质体方法操作简单,转化效率高,整合度高,并且容易得到多拷贝而成为常用的转化方法<sup>[15]</sup>。常见的真菌黑曲霉<sup>[16]</sup>、红曲霉<sup>[17]</sup>,*Trichoderma viride*<sup>[18]</sup>和丝状真菌 AL18<sup>[19]</sup>等均采用原生质体的转化方法,已经建立了良好的转化体系。PEG/CaCl<sub>2</sub>原生质体转化过程中,足够数量且再生能力强的原生质体的制备是最为重要的部分<sup>[20-21]</sup>。因不同真菌的细胞壁构造不同,裂解收集原生质体的方式也会不同,因此不同菌种中制备原生质体的方法也需要不断地探索优化。另外,转化实验中原生质体高效的再生能力也是其成功的核心,再生率的提升表明阳性转化子获得几率的提升,因此会提高转化效率。本课题将分别从材料的选择,真菌菌龄,渗透压稳定剂种类,裂解酶酶种类,裂解酶的浓度,酶解时间及原生质体再生方式,对柄蓝状菌 EMM 原生质的制备与再生进行探索和优化,为后续丝状真菌 EMM 在分子水平方面的研究奠定坚实的基础<sup>[22]</sup>。

1 实验部分

1.1 材 料

1.1.1 菌株 柄蓝状菌(*Talaromyces stipitatus*) EMM 是由分离于新加坡的野生菌 OPC4-1 诱变所得,由本实验室保存。

1.1.2 酶和试剂 裂解酶(Lysing enzymes from *Trichoderma harzianum*, Sigma 公司);蜗牛酶(Snailase, 上海生物工程有限公司)。溶液 1 (10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+1.2 mol/L MgSO<sub>4</sub>, pH 5.8);溶液 2 (0.6 mol/L Sorbitol + 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.0);溶液 3 (1 mol/L Sorbitol+10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5);溶液 4 (1 mol/L Sorbitol + 10 mmol/L Tris-HCl+10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5);溶液 5(质量分数 25% PEG6000 + 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub> + 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)。

1.1.3 培养基 PDA 培养基(Merck 公司);Seed

Medium(10 g/L glucose, 1 ml/L Tween 80, Fermentation Medium);PDB 培养基(Merck 公司);Spore Medium(30 g/L Solka-floc, Wheat Bran 40 g/L, Agar 15 g/L, Fermentation Medium)。

1.2 方 法

1.2.1 孢子的收集 将一定量的 EMM 孢子,接种于孢子培养基 PDA 平板上,30 ℃ 的培养箱中培养 10 d,等长出足够量的孢子后,用 0.9% NaCl 溶液将孢子轻轻洗脱,用双层的孔径 30 μm 尼龙布过滤除去菌丝和培养基等杂质,制备成一定浓度的孢子悬液。

1.2.2 菌丝的收集 从 PDA 平板上挑取一定量的 EMM 菌丝,接种到 250 mL 摇瓶中,摇瓶里含有 50 mL 种子培养基,将摇瓶放置在 28 ℃ 培养箱中,120 r/min 培养 2 d,待长出适量的菌丝后,用双层的孔径 30 μm 尼龙布过滤收集菌丝,并用双蒸水洗涤 2 次,以备使用。

1.2.3 酶解液的配制 缓冲液分别用 1.2 mol/L MgSO<sub>4</sub>, 0.8 mol/L NaCl, 0.8 mol/L 蔗糖(Sucrose),以 1 mol/L 山梨醇(Sorbitol),准备不同浓度的裂解酶(Lysing enzymes from *Trichoderma harzianum*)、蜗牛酶(Snailase)(表 1),0.2 μm 滤膜除菌以备使用,酶解液必须现配现用。

表 1 复合酶的不同配比组合		
Tab. 1 Different enzyme ratios of compound enzymes		
分组	裂解酶质量浓度 / (mg / mL)	蜗牛酶质量浓度 / (mg / mL)
A	20	—
B	50	—
C	80	—
D	—	20
E	—	50
F	—	80
G	50	50

1.2.4 原生质体的收集 制备复合酶酶解液,分别配置成不同的浓度,平板上收集 0.2 g 孢子和菌丝,8 000 r/min 离心,用 20 mL 溶液 1 洗涤 2 次,沉淀用 20 mL 复合酶酶解液于 50 mL 的摇瓶中,置于 30 ℃ 的水浴锅中以 80 r/min 的速度震荡裂解,分别培养 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h,用双层的孔径 30 μm 尼龙布过滤收集原生质体。调节离心机温度为 4 ℃,5 000 r/min 离心 10 min,用 20 mL 溶液 2 洗涤 2 次,在相同的离心的条件下,再用 20 mL 溶液 3 洗涤 2 次,最后在冰浴条件下加入适量的溶液 4 悬浮,通过血球计数器计算原生质体的浓度。

1.2.5 原生质体再生条件的探索 将收集到的原生质体用溶液4调节至浓度为 $1\times 10^3$  /mL,用两种方式进行再生培养:方式一为在菌丝生长培养基PDA平板上直接铺板;方式二为在液体再生培养基中培养12 h,然后再与PDA混合涂板,平板均置于30℃培养箱中培养6 d,观察平板上再生菌落的数目;对照组用无菌水代替溶液4调节原生质体至相同浓度,以相同的培养条件进行再生培养,除去孢子和残留菌丝造成的误差。原生质体再生率(%)=[(再生菌落数量-对照菌落数量)/原生质体数量]×100%。

2 结果与讨论

2.1 原生质体的形态

细胞在裂解酶的作用下,首先是细胞壁被酶解破碎,然后原生质体从菌丝的尖端开始析出,再慢慢释放。通常状态下原生质体会呈透明圆形。在普通光学显微镜下,分别观察酶解前的EMM菌丝和酶解过滤后收集的原生质体的形态并拍照,结果如图1。

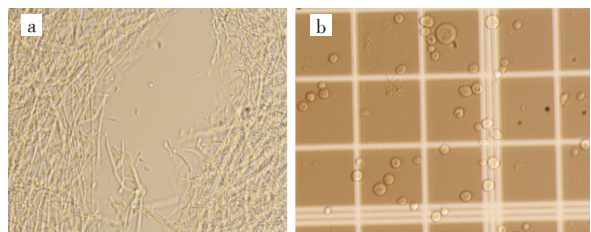


图1 光学显微镜下的EMM:(a)菌丝,(b)原生质体  
Fig. 1 Observation EMM with microscope:  
(a) mycelium, (b) protoplasts

2.2 原生质体材料选择对其制备与再生的影响

选择孢子(Spore)和菌丝(Mycelium)作为原生质体制备材料,比较它们对原生质体制备与再生的影响。如图2(a)所示,菌丝的尖端更容易产生原生质体,选择用EMM菌丝作为原生质体制备材料时原生质体的浓度最高(Protoplast concentration  $6.23\times 10^8$  /mL)且再生率最高(Regeneration rate 15.6%),因此将EMM菌丝作为其制备材料。

2.3 菌龄及渗透压稳定剂对原生质体制备与再生的影响

以不同真菌菌龄(Fungal age)12 h、24 h、36 h、

48 h、60 h、72 h的菌丝作为原生质体制备材料,以不同的渗透压1.2 mol/L  $MgSO_4$ 、0.8 mol/L NaCl、0.8 mol/L Sucrose、1 mol/L Sorbitol作为原生质体制备时的渗透压稳定剂(Osmotic stabilizer),分别比较它们对原生质体制备与再生的影响。结果如图2(b)所示,细胞壁的成分随着菌株的生长而发生了变化,导致酶解效率达到一定程度后开始下降,菌种年龄为48 h时原生质体的数量最多(Protoplast concentration  $7.74\times 10^8$  /mL),原生质体的再生能力会随菌种年龄改变,菌种年龄为60 h时原生质体的再生率最高(Regeneration rate 16.8%),但生成的原生质体的数量明显偏低(Protoplast concentration  $5.27\times 10^8$  /mL),综合考虑原生质体的制备材料选择用48 h菌龄的EMM菌丝;渗透压溶液的选择主要考虑两个因素,第一是能稳定和保护原生质体的生成,第二是对酶的酶解效果有促进作用,如图2(c)所示,虽然1 mol/L Sorbitol作为渗透压稳定剂时原生质体的再生率最高(Regeneration rate 16.3%),但生成原生质体的数量偏少(Protoplast concentration  $4.27\times 10^8$  /mL),而1.2 mol/L  $MgSO_4$ 作为原生质体制备时的渗透压稳定剂(Osmotic stabilizer)时原生质体的数量最多(Protoplast concentration  $6.82\times 10^8$  /mL)且再生率也比较高,综合考虑选择1.2 mol/L  $MgSO_4$ 作为原生质体制备时的渗透压稳定剂。

2.4 酶的种类配比和酶解时间对原生质体制备与再生的影响

以不同酶的种类配比(Enzyme ratio)和酶解时间(Enzymolysis time)分别作为制备原生质体时的酶解条件,比较两种因素对原生质体制备和再生的影响。选择合适的酶解条件时需要考虑两个因素:一是形成原生质体的速度;二是原生质体再生的效率。如图2(d)和2(e)所示,酶的种类配比为B时,原生质体的数量(Protoplast concentration  $8.23\times 10^8$  /mL)和再生率(Regeneration rate 15.8%)最为合适,同时酶解时间达到3 h时原生质体的数量则为最多(Protoplast concentration  $8.52\times 10^8$  /mL)且再生率最高(Regeneration rate 15.2%)。综合分析选择酶的种类配比为B(50 mg/mL的裂解酶),酶解时间为3 h作为原生质体的制备条件。



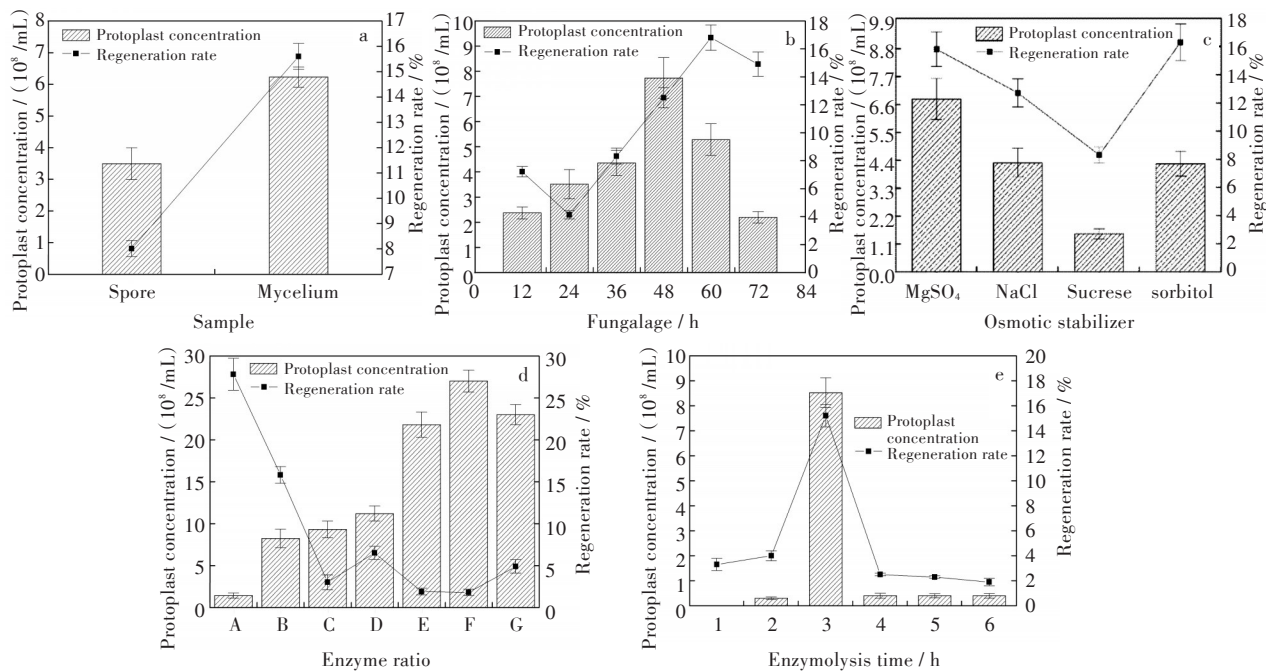


图 2 对 EMM 原生质体生成量与再生率的影响：

(a)制备材料,(b)菌种年龄,(c)渗透压稳定剂,(d)酶的种类配比,(e)酶解时间

Fig. 2 Effects on protoplasts production and regeneration rate of EMM:

(a)preparation materials, (b) fungal age, (c) osmotic stabilize, (d) enzyme ratios, (e) enzymolysis time

2.5 不同再生方式对原生质体再生的影响

方式一为在菌丝生长培养基 PDA 平板上直接铺板(Direct plating);方式二为在液体再生培养基中培养 12 h,然后再与 PDA 混合涂板(After hatching),比较两种方式对原生质体再生率的影响。原生质体若失去细胞壁的支撑与保护,就会变得易破碎和易被感染。如图 3 所示,原生质体先在液体再生培养基中孵育 12 h 恢复细胞壁,再与 PDA 培养基混合铺板提高原生质体的再生率,选择该种方式作为原生质体的再生条件,原生质体的再生率最高(Regeneration rate 17.2%)。图 4 所示,图 4(a)和图 4(b)分别为方式一和方式二条件下原生质体在 PDA 平板上的生长状态,因此选择方式一为原生质体的再生条件。

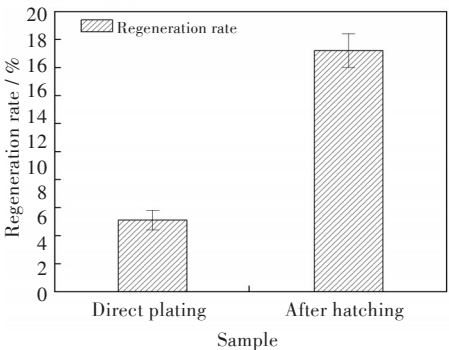


图 3 原生质体再生方式对 EMM 原生质体再生率的影响

Fig. 3 Effects of regeneration methods of protoplasts on protoplasts regeneration rate of EMM

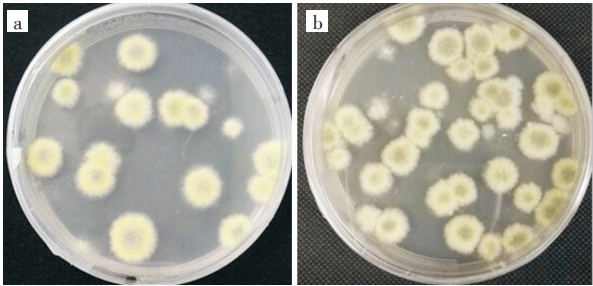


图 4 两种不同的再生方式得到的原生质体在 PDA 平板上的生长状况:(a)直接涂板,(b)先培养后混合涂板

Fig. 4 Growth conditions of protoplasts on PDA plates:  
(a) directing plating, (b) after hatching

3 结 语

原生质体的制备与再生是 PEG/CaCl<sub>2</sub> 介导的真菌转化方法的基础,原生质体的数量与再生能力直接影响转化效率。本文首次成功建立了柄蓝状菌 EMM 以 PEG/CaCl<sub>2</sub> 介导的转化体系,从材料选择,真菌菌龄,渗透压稳定剂种类,裂解酶种类,裂解酶浓度,酶解时间及原生质体的再生方式,对丝状真菌柄蓝状菌 EMM 的原生质制备与再生条件进行探索优化。获得最佳的原生质的制备与再生条件:制备材料为 48 h 的菌丝,渗透压稳定剂为 1 mol/L MgSO<sub>4</sub>,裂解酶浓度为 50 mg/mL,酶解温度为 30 ℃,酶解时间为 3 h,再生方式为先孵化培养再混合倒板。在此条件下原生质体的释放量高达

8.73×10<sup>8</sup> /mL,再生率高达17.7%。本实验所获得的原生质体的释放量和再生率均达到了较高的水平,丝状真菌AL18<sup>[18]</sup>的原生质体制备率和再生率仅为1.42×10<sup>7</sup> /mL和3.2%;*Trichoderma viride*<sup>[19]</sup>的原生质体制备率和再生率为4.7×10<sup>7</sup> /mL和14.5%。相比较而言,本实验所建立的最适条件已经完全达到了后续转化实验的要求,为柄蓝状菌的分子水平研究奠定了良好的基础。

参考文献:

[1] 周志义,张佑红,耿安丽. 紫外诱变筛选柄蓝状菌尿嘧啶营养缺陷型菌株[J]. 化学与生物工程, 2016, 33(7): 48-51.

[2] 汪天虹,吴静,邹玉霞. 瑞氏木霉分子生物学研究进展[J]. 菌物系统, 2000, 19(1): 147-152.

[3] BALANCE D J, BUXTON F P, TURNER G. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1983, 112(1): 284-289.

[4] 李刚,王强,刘秋云,等. 利用PEG法建立药用真菌灵芝的转化系统[J]. 菌物学报, 2004, 23(2): 255-261.

[5] FIJII T, IWATA K, MURAKAMI K, et al. Isolation of uracil auxotrophs of the fungus *Acremonium cellulolyticus* and the development of a transformation system with the *pyrF* gene [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2012, 76(2): 245-249.

[6] OLMEDO-MONFIL, ORTÉS-PENAGOS C, HERRERA-ESTRELLA A. Three decades of fungal transformation: key concepts and applications [J]. Methods in Molecular Biology, 2004, 267: 297-313.

[7] CHAKRABORTY B N, PATTERSON N A, KAPOOR M. An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1991, 37(11): 858-863.

[8] 王政逸,王秋华,李德葆. 根瘤土壤杆菌介导的丝状真菌转化[J]. 菌物系统, 2003, 22(2): 339-344.

[9] MICHELSE C, HOOYKAAS P, HONDEL C, et al. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi [J]. Current Genetics, 2005, 48(1): 1-17.

[10] RUIZ-DÍEZ B. Strategies for the transformation of

filamentous fungi [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(2): 189-195.

[11] 王政逸,李德葆. 限制酶介导的插入突变及其在丝状真菌中的应用[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 142-147.

[12] FINCHAM J R. Transformation in fungi [J]. Microbiological and Molecular Biology Reviews, 1989, 53(1): 148-170.

[13] COMPOY S, PÉREZ F, MARTIN J F, et al. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and Agrobacterium-mediated DNA transfer [J]. Current Genetics, 2003, 43(6): 447-452.

[14] MEYER V. Genetic engineering of filamentous fungi: progress, obstacles and future trends [J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(2): 177-185.

[15] BUNDOCK P, DULK-RAS, BEGERSBERGEN A, et al. Trans-kingdom T DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae* [J]. The EMBO Journal, 1995, 14(3): 3206-3214.

[16] 张晓立,郑小梅,满云,等. 黑曲霉柠檬酸工业菌株原生质体制备与转化[J]. 生物技术通报, 2015, 31(3): 171-177.

[17] 周礼红,李国琴,王正祥,等. 红曲霉原生质体的制备、再生及其遗传转化系统[J]. 遗传, 2005, 27(3): 423-428.

[18] 卢明,张月杰. 丝状真菌AL18的原生质体制备和再生条件的优化[J]. 生物技术, 2012, 22(3): 86-89.

[19] YOU Y R, LIU S W, WU Y F, et al. The transformation in *Trichoderma viride* protoplast by restriction enzyme mediated integration (REMI) [J]. Advanced Materials Research, 2012, 518/519/520/521/522/523: 545-548.

[20] 林艳酶,李瑞杰,张慧杰,等. 纤维素酶高产菌株 *Trichoderma atroviride* HP35-3 原生质体制备及转化[J]. 生物技术通报, 2016, 32(9): 225-231.

[21] PATIL N S, JADHAV J P. *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 chitinase: an efficient tool in commercial enzyme cocktail for production and regeneration of protoplasts from various fungi [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2015, 22(2): 232-236.

[22] 周志义. 一株高产纤维素酶的柄蓝状菌 EMM 的基因改造和培养条件优化[D]. 武汉:武汉工程大学, 2016.