

# 高山被孢霉高产 ARA 的原生质体融合子筛选

潘森, 孙立洁, 陈祥松, 袁丽霞, 吴金勇, 姚建铭

(中国科学院合肥物质科学研究院等离子体物理研究所, 合肥 230031)

**摘要:**利用原生质体融合技术,对两株单一优良性状差异显著的高山被孢霉菌株 F24 和 G12 进行原生质体融合,再采用双灭活或流式细胞分选法筛选优良性状相结合的高产菌株,对双亲菌株原生质体的制备、融合和再生的相关条件进行了研究,并对双灭活和流式细胞分选的具体方法进行了研究.经研究发现,采用培养 16 h 的高山被孢霉菌丝于混合酶液(蜗牛酶  $15.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、纤维素酶  $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、溶菌酶  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和几丁质酶  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 中  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  酶解 4 h 为原生质体制备的最佳条件.并探究得出两种融合子筛选方法的最佳方案,成功筛选出融合子,进一步再生培养验证 ARA 产量,最终挑选出一株 ARA 产量达  $6.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的高产菌株.以前尚未发现此方法在高山被孢霉上的应用,为高山被孢霉育种提供了一种有效的手段.

**关键词:**高山被孢霉;花生四烯酸;原生质体融合;双灭活;流式细胞

**中图分类号:**Q815

**文献标志码:**A

花生四烯酸(arachidonic acid,简称AA或ARA),是一种二十碳不饱和脂肪酸,在人体许多生理过程中起着重要作用,具有酯化胆固醇、抑制血小板聚集、降低血液黏度、调节白细胞功能、提高免疫力和促进婴幼儿大脑发育等功能<sup>[1-2]</sup>.卫生部于1994年正式批准,可在婴幼儿配方食品中添加ARA,1999年正式批准ARA作为新型营养强化剂.随着人们对健康、美容、保健意识的增强,ARA作为一种重要的功能性油脂,在食品、药品和化妆品等领域的需求正逐步增长,市场前景广阔.近年来,利用高山被孢霉发酵法生产ARA因其产品中ARA含量高且油脂组成合理等特点,一直作为工业生产的主要方式<sup>[3]</sup>.

菌种选育是提高花生四烯酸产量的首要关键因素之一,传统的育种方式中自然选育方法简单但很难得到优良菌株;诱变育种突变方向不定筛选工作量大;基因工程育种需了解亲本的详细遗传背景、操作复杂.而利用原生质体融合技术因突破了种属间的不亲和障碍,实现远源杂交,不需要了解双亲菌株详细的遗传背景,操作简单,可定向选育具备双亲优良性状的菌株等优势<sup>[4]</sup>而成为微生物菌种选育研究热点<sup>[5]</sup>.1979年匈牙利的Pesti首先发表了融合育种提高青霉素产量的报告,从而开创了原生质体融合在实际工作中的应用<sup>[6]</sup>.

本文采用双灭活法和流式细胞分选两种方法对融合子进行筛选.双灭活法原理是对双亲原生质体采用不同处理方式(如热、紫外、化学试剂等)使之失去再生能力,经细胞融合后致死伤的部位互补可以形成再生的融合体.其中热灭活和紫外灭活应用较多,关于热灭活的作用部位,有人认为是细胞质中的酶蛋白,还有人认为是细胞质中的核糖体及rRNA.紫外灭活的作用部位一般认为是DNA的损伤<sup>[7]</sup>.此筛选方法简便、有效、很大程度减少了工作量<sup>[8]</sup>.流式细胞术是一项集多种技术于一体的新型高科技细胞分析技术,通过激光光源激发细胞上所标记的荧光物质的强度和颜色以及散射光的强度可以得到细胞内部各种各样的生物信息并进行分选<sup>[9]</sup>.本研究中首次采用了流式细胞用以筛选真菌原生质体融合子,分别采用不同荧光染料细胞膜红色荧光探针(DiL)和细胞膜绿色荧光探针(DiO)标记双亲原生质体,融合后利用流式细胞仪分选带两种荧

收稿日期:2016-10-28;修回日期:2016-12-28.

基金项目:国家高技术研究发展计划(2014AA021703);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2013]693号).

作者简介:潘森(1992-),女,黑龙江哈尔滨人,中国科学技术大学在读硕士研究生,研究方向为微生物育种及发酵工艺研究,E-mail:729885864@qq.com.

通信作者:孙立洁,E-mail:ljsun@ipp.ac.cn;姚建铭,jmyao@ipp.ac.cn.

光信号的融合子,检测速度快、分选纯度高<sup>[10]</sup>,为融合子的筛选提供了一种有效手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

G12:油脂含量较高,但发酵生物量较低,产孢子能力较弱,不易于传代培养;F24:油脂含量较低,产孢子能力强,发酵生物量稳定,有利于传代培养。G12和F24均由本实验室分离获得,菌种以甘油管保存于-80℃冰箱内,每6个月转存一次。

#### 1.1.2 主要仪器及试剂

蜗牛酶(BR):上海源叶公司;纤维素酶(BR):上海源叶公司;溶菌酶(AR):上海源叶公司;几丁质酶(AR):上海源叶公司;DiI(细胞膜红色荧光探针):碧云天生物技术研究所;DiO(细胞膜绿色荧光探针):碧云天生物技术研究所;台式离心机:Allegra X-30, BECKMAN;恒温恒润摇床:ZWY-A211D,上海智城;气相色谱仪:GC1690,岛津;流式细胞仪:FACSAria III, BD。

#### 1.1.3 培养基

PDA固体培养基:马铃薯20%,葡萄糖2%,琼脂2%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%, $\text{MgSO}_4$  0.025%,pH自然;PDA液体培养基:马铃薯20%,葡萄糖2%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%, $\text{MgSO}_4$  0.025%,pH自然;高渗再生培养基:以 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨醇配制的PDA培养基。

种子培养基:葡萄糖8%、酵母粉2%、pH自然;发酵培养基:葡萄糖8%、酵母粉2%、pH自然。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌丝培养及收集

将PDA斜面上培养6d生长良好的孢子刮下,用无菌水制备孢子悬液,稀释至 $10^8\text{ mL}^{-1}$ ,取1mL孢子悬液接入装液量为50mL/250mL的三角瓶中,于28℃、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养,待培养结束 $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心收集菌丝,并依次使用无菌水与 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨醇渗透压稳定液各洗涤菌丝两次,供制备原生质体用。

#### 1.2.2 酶液的制备

所有酶液均使用 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(pH 6.0)配制,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌后使用。

#### 1.2.3 原生质体制备

于5mL酶液中加入1.2.1中所述湿菌体1g,摇匀,30℃下温育并轻轻振荡进行酶解。每隔1h取酶解液于显微镜下观察细胞酶解程度,待大量原生质体释放即停止酶解反应。用四层高级擦镜纸过滤除去菌丝体碎片,于4℃下 $5000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min,离心后沉淀用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨醇渗透压稳定液悬浮,洗涤两次,血球板进行计数。

原生质体再生率的计算<sup>[11]</sup>:将制得的原生质体浓度稀释到 $10^5\text{ mL}^{-1}$ ,涂布高渗培养基和PDA固体培养基,28℃培养5d后菌落计数,计算原生质体再生率。

原生质体再生率=(在高渗培养基上的菌落数-PDA固体培养基上的菌落数)/显微镜计数的原生质体数 $\times 100\%$ 。

#### 1.2.4 原生质体融合及筛选

##### 1.2.4.1 热灭活筛选融合子

(1)热灭活:将装有原生质体悬液的离心管放入65℃水浴锅内加热,分别加热20min、30min、40min、50min、60min,并每隔5min轻轻摇匀,将不同加热时间处理后的原生质体稀释涂布再生平板,并以未进行加热灭活的原生质体涂布再生平板做对照。平板置于培养间28℃倒置培养,计算不同处理时间下原生质体的致死率,选择致死率达100%的最短处理时间的原生质体作为原生质体融合试验材料。

(2)紫外灭活:将装有原生质体悬液的多个离心管置于15W、垂直距离为5cm的紫外灯下,分别照射10min、20min、30min、40min,取不同处理时间的原生质体稀释后涂布再生平板,并以未经紫外灭活的原生

质体涂布再生平板做对照组. 平板置于培养间 28 ℃ 倒置培养, 计算不同处理时间下原生质体的致死率, 选择致死率达 100% 的最短处理时间的原生质体作为原生质体融合试验材料.

(3) 原生质体融合: 取经紫外灭活的 G12 原生质体悬液和热灭活的 F24 原生质体悬液, 按照 1:1 的比例混合后, 于 4 ℃,  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 后弃上清留沉淀, 向沉淀中加 2 mL 35% PEG 6000, 于 30 ℃ 静置保温 1 h, 离心并用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  山梨醇渗透压稳定液洗涤 2 次并悬浮<sup>[12]</sup>.

(4) 将原生质体融合液涂布再生平板, 于 28 ℃ 倒置培养, 待再生平板上长出的菌落即初步认定为原生质体融合子.

#### 1.2.4.2 流式细胞分选融合子

(1) 配制荧光染料: 分别称取 1 mg DiL (细胞膜红色荧光探针) 和 DiO (细胞膜绿色荧光探针), 使用 10 mL DMSO (二甲亚砜) 进行溶解待用.

(2) 原生质体荧光染色: 将两亲本原生质体分别悬浮于 5 mL PB ( $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ , pH6.0) 中, G12 原生质体悬液中加入 1  $\mu\text{L}$  的 DiL 荧光染色剂, F24 原生质体悬液中加入 1  $\mu\text{L}$  的 DiO 荧光染色剂, 于 37 ℃ 避光温育 30 min, 离心去除染色剂, 并用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后悬浮.

(3) 取等量荧光染色的两种原生质体悬液 ( $10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) 于无菌离心管内, 离心去上清, 加入 35% PEG 6000 于摇床震荡 (30 ℃,  $80 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 融合 1 h, 离心去除融合剂并用高渗溶液及缓冲液 PBS 各洗一次, 最后悬浮于约 500 ~ 700  $\mu\text{L}$  的 PBS 中, 并取等量未经染色的两株菌原生质体于同样条件融合作为对照组.

(4) 将样品用细胞过滤网过滤, 去除大颗粒物质.

(5) 流式细胞仪选择激发荧光波长, 确定分选范围进行分选, 分选出同时带两种荧光信号的融合子, 收集于装液量 3 mL 的  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  山梨醇溶液的收集管中.

(6) 将分选出的融合子涂布再生培养基, 于 28 ℃ 培养箱倒置培养.

#### 1.2.5 ARA 高产菌的筛选

挑取融合原生质体菌落, 转接至另一再生平板培养, 待长出菌丝后转接到 PDA 固体培养基进行继续培养, 待孢子大量萌发, 制备孢子悬液, 按照 8% ~ 10% 接种比例接种瓶, 于 28 ℃, 40% ~ 50% 湿度,  $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下培养 3 d, 再以 8% ~ 10% 接种量转接至摇瓶 100 mL/500 mL 发酵培养基于 28 ℃, 40% ~ 50% 湿度,  $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养 11 d, 利用气相色谱仪检测 ARA 产量. 检测方法及步骤:

##### 1.2.5.1 发酵菌体生物量的测定

(1) 摇瓶发酵 11 d 后, 使用布氏漏斗对发酵液进行抽滤.

(2) 抽干得到的菌体放入烘箱 105 ℃ 烘干, 计算干重 W 即为生物量.

##### 1.2.5.2 菌体总油脂的提取和含量计算

(1) 使用研钵将烘干的菌体进行研磨至细小的粉末, 称取上述研磨的粉末 1 ~ 2 g, 取精确值  $W_0$ , 用滤纸包住并系上棉绳, 放入烘箱 105 ℃ 烘至恒重, 称得滤纸包重量  $W_1$ .

(2) 将上述的滤纸包放入索氏提取器内, 用石油醚进行索氏提取 8 ~ 10 h 后取出, 105 ℃ 烘干, 称纸包重量  $W_2$ .

$$\text{菌体总油脂质量分数} = (W_1 - W_2) / W_0.$$

##### 1.2.5.3 油脂中 ARA 的含量测定和计算

(1) 样品处理 (甲酯化)

称取研磨菌渣 0.1 g 左右, 加入 1 mL 0.5% 氢氧化钾甲醇溶液, 于 60 ℃ 水浴 30 min, 每五分钟摇匀一次, 然后加入 1 mL 三氟化硼甲醇溶液, 于 60 ℃ 水浴 30 min, 每 5 min 摇匀一次, 之后加入 2 mL 正己烷混匀后加入 1 mL 饱和氯化钠溶液摇匀, 反应完毕后将反应液  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上层液体进行气相检测.

(2) 气相色谱检测条件

DB-23ms (30.0 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ) 石英毛细管色谱柱, 柱温程序: 90 ℃ 保持 1 min, 之后以 9  $^\circ\text{C}/\text{min}$  升至 240 ℃, 保持 5 min; 载气: 氮气; 流速:  $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样口温度: 250 ℃; 进样模式: 分流进样 (分流比: 10); 进样量: 1  $\mu\text{L}$ ; 检测器温度: 280 ℃.

### (3) ARA 含量计算方法

ARA 百分含量的计算使用的是面积归一法,即 ARA 在气相检测图谱中的峰面积占总峰面积的百分比用以评估 ARA 在总油脂含量中所占百分含量。

## 2 结果和讨论

### 2.1 原生质体制备过程中多因素的影响研究

#### 2.1.1 酶种类及浓度的选择

在 R H Baltz 发表的原生质体制备方法的基础上<sup>[13]</sup>对高山被孢霉的原生质体制备方法进行改进,对酶浓度加以改进,采用蜗牛酶  $15.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、纤维素酶  $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、溶菌酶  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,并用  $0.8 \text{ M}$  NaCl 渗透压稳定剂配制,但考虑高山被孢霉细胞壁中含有几丁质成分,尝试添加几丁质酶对混合酶进行优化。

收集培养 12 h 菌丝,分 2 组进行实验:一组混合酶为蜗牛酶  $15.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、纤维素酶  $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、溶菌酶  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,另一组在第一组混合酶的基础上加入  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的几丁质酶,酶解 3 h 观察计数。使用第一组配方获得的原生质体密度为  $3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,而添加几丁质酶的第二组实验获得原生质体密度为  $4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,可见添加几丁质酶更有助于高山被孢霉原生质体的释放。

#### 2.1.2 菌丝培养的最佳时间

菌龄是影响原生质体制备的重要因素之一,菌龄过长,菌丝细胞壁老化增厚,不易于原生质体释放,而对数生长期以前,菌丝细胞壁结构对降解酶不敏感,释放原生质体数量较少。有研究表明,对数生长期的细胞生长、代谢旺盛,细胞壁对酶解作用最为敏感,由这些细胞分离原生质体其形成率和再生率都较高<sup>[14]</sup>。

根据高山被孢霉的生长曲线,分别收集震荡培养 12 h、16 h、20 h、24 h 菌丝,以蜗牛酶  $15.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、纤维素酶  $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、溶菌酶  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和几丁质酶  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  为混合酶,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下酶解菌丝 3 h 后进行计数,对所获得的原生质体计数后可知,培养 16 h 的菌丝最适合原生质体的制备获得的原生质体数量最多(见图 1)。

#### 2.1.3 酶解时间的选择

为了解最佳酶解时间,以蜗牛酶  $15.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、纤维素酶  $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、溶菌酶  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和几丁质酶  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  为最佳混合酶组合,收集震荡培养 16 h 的菌丝于  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下酶解 1 h、2 h、3 h、4 h 和 5 h。对酶解后的原生质体计数发现,随着酶解时间的延长,原生质体数量呈逐渐增多趋势,但超过 4 h 酶解出现过度现象,部分原生质体破裂,数量迅速减少,因此,酶解 4 h 为最佳酶解时间,收获原生质体数量达到最大值为  $7 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,时间过短或过长都会导致原生质体产量下降并影响其再生率<sup>[15]</sup>。

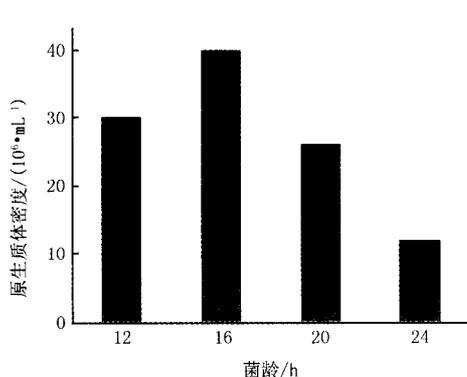


图1 菌龄对原生质体制备的影响

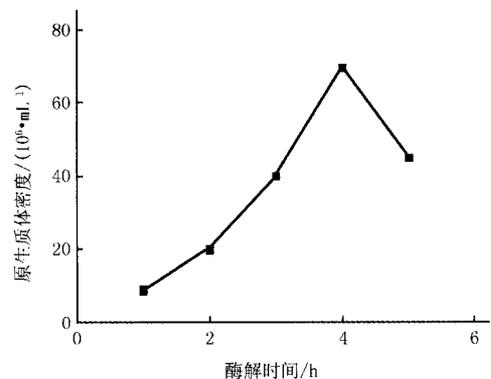


图2 酶解时间对原生质体制备的影响

#### 2.1.4 酶解的最佳温度

不同菌株酶解时的最适温度不同,真菌最适的酶解温度一般在  $28 \sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$ <sup>[16]</sup>。以蜗牛酶  $15.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、纤维素酶  $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、溶菌酶  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和几丁质酶  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  为最佳混合酶组合,收集震

荡培养 16 h 的菌丝,酶解温度分别控制在 28 ℃、30 ℃、32 ℃ 和 34 ℃ 下酶解 4 h,对收获原生质体量计数,比较可知,30℃ 下酶解原生质体形成量最多(图 3)。

### 2.1.5 缓冲液对原生质体制备及再生的影响

合适的渗透压稳定剂可以提高原生质体产量,通常丝状真菌以无机盐作为稳定剂比较合适,但糖溶液做稳定剂更有利于原生质体再生<sup>[17]</sup>。用上述得出的最佳条件:酶解液为蜗牛酶  $15.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、纤维素酶  $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、溶菌酶  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和几丁质酶  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,收集震荡培养 16 h 的菌丝,于 30 ℃ 条件下酶解 4 h,酶解过程中分别使用  $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 和  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  山梨醇作为缓冲液进行比较,酶解后获得的原生质体数量分别为  $6.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  和  $5.2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,结果表明  $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 更适合做缓冲液有利于原生质体制备。再分别将  $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 和  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  山梨醇作为缓冲液的原生质体涂布再生,结果  $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 和  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  山梨醇为缓冲液制备的原生质体再生率分别为 14% 和 18%,说明 NaCl 缓冲液更有利于原生质体制备,而山梨醇缓冲液更有利于原生质体的再生。

### 2.1.6 高山被孢霉原生质体形态观察

取酶解液于 400 × 显微镜下观察(见图 4),可观察到在酶解液作用下原生质体从菌丝中释放,原生质体的释放主要有两种形式,从菌丝顶端释放(图 4-a)和原位释放(图 4-b)。由于顶端释放相对容易,故酶解前期顶端释放较多,随着酶解进行,菌丝断裂,原位释放的细胞逐渐增加,在显微镜下可见堆成串的原生质体,最终所产生的原生质体在形态上大小并不十分一致(图 4-c)<sup>[18]</sup>。

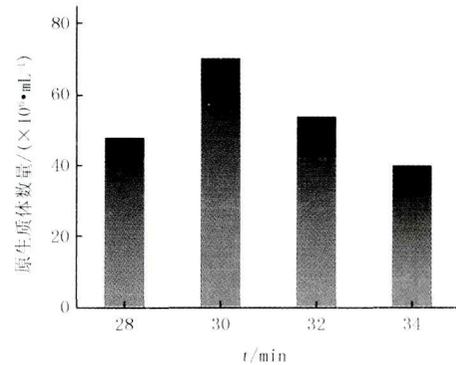
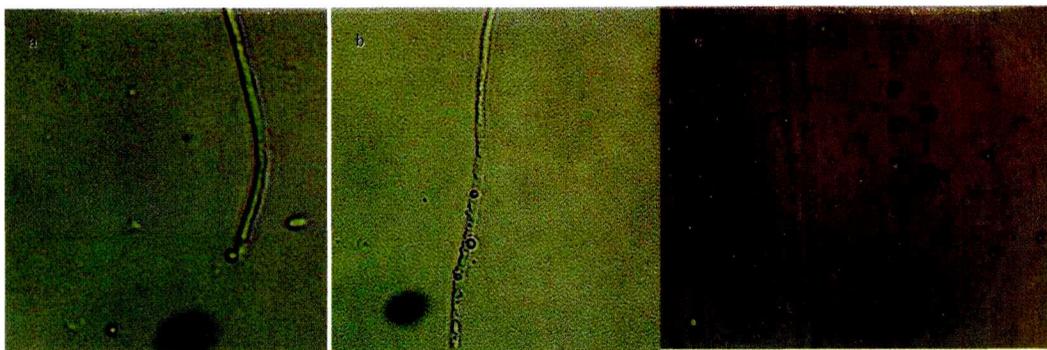


图3 酶解温度对原生质体制备的影响



a: 原生质体顶端释放; b: 原生质体原位释放; c: 原生质体形态

图4 高山被孢霉原生质体的释放与形成(400x显微放大观察)

## 2.2 原生质体融合及筛选

### 2.2.1 双灭活法筛选融合子

#### 2.2.1.1 原生质体的灭活条件

(1) 紫外灭活 G12 原生质体. 取原生质体悬液置于无菌离心管,距离 15 W 紫外灯 5 cm 处照射不同时长,然后将菌悬液涂布再生平板,以未经紫外照射的原生质体悬液涂布再生平板做对照,培养 3 d 后,数再生菌落,计算致死率,所得结果见图 5. 紫外灭活 20 min 时,致死率已达到 100%,再继续延长时间对原生质体再生造成较大负面影响,因此,选择距离紫外灯 5 cm,照射 20 min 进行原生质体灭活实验为最适宜条件。

(2) 热灭活 F24 原生质体. 取原生质体悬液置于无菌离心管,于 65℃ 恒温水浴箱内进行热灭活处理,期间每隔 5 min 轻摇混匀,处理不同时长后将原生质体悬液涂布再生平板,以未经加热处理的原生质体悬液涂布再生平板做对照,培养 3 天后,计算再生菌落数及致死率. 由图 6 可见,热灭活 30 min 后原生质体可达

100%致死率,因此,选择此条件对原生质体进行完全灭活后再进行融合实验.

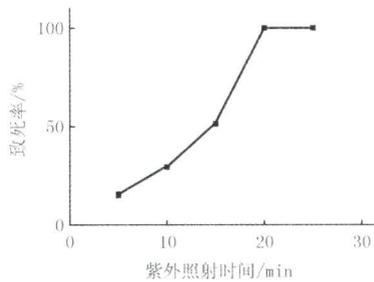


图5 紫外照射时间对G12原生质体致死率的影响

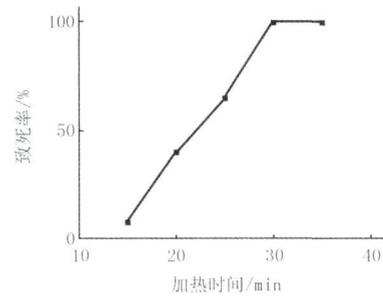
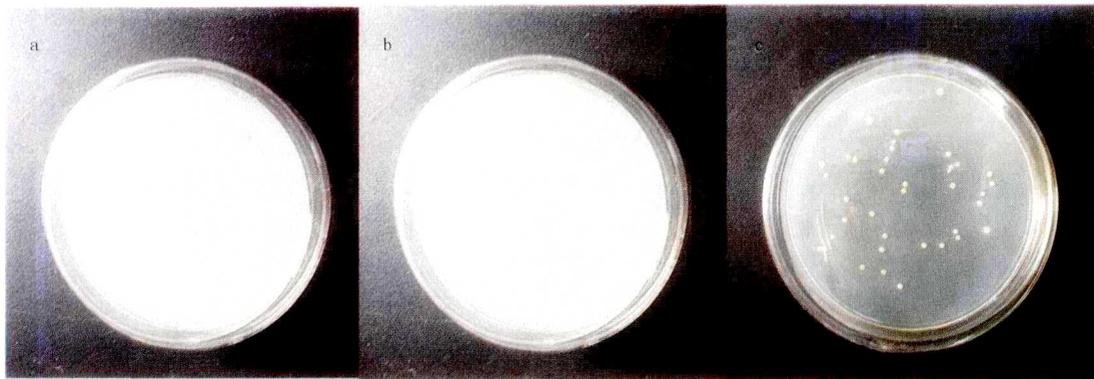


图6 加热时间对F24原生质体致死率的影响

### 2.2.1.2 灭活的原生质体融合及再生

分别将紫外灭活的 G12 原生质体和热灭活的 F24 原生质体涂布再生平板做对照,确定是否 100% 的灭活率,见图 7,再将融合后的原生质体涂布再生平板后置于 28 °C 恒温下倒置培养. 下图分别为热灭活(a)、紫外灭活(b)、融合后原生质体(c)在再生平板上生长 5 d 情况.



a:热灭活F24原生质体再生平板; b:紫外灭活G12原生质体再生平板; c:融合原生质体再生平板

图7 热灭活、紫外灭活及融合后原生质体再生情况

### 2.2.2 流式细胞分选融合子

#### 2.2.2.1 流式细胞仪分选融合子

建立并选定流式细胞分选融合子方案,选择 1 个细胞群,调节确定合适的放大电压<sup>[19]</sup>. 以未染色的融合原生质体作为对照,选定红色荧光信号强的区域 P2,再选定同时绿色荧光信号也强的区域 P3,即融合子,见图 8. 本方法操作简单,准确率高,分选到的融合子占分选细胞总数的 3% ~ 5%.

#### 2.2.2.2 融合子的再生

将分选收集的融合子悬液进行适当稀释后涂布再生平板,28 °C 于恒温培养箱倒置培养. 此方法筛选的融合子的再生速度要比双灭活方法筛选的融合子再生速度快,5 d 即可见再生菌丝,而双灭活筛选的融合子 7 d 才可观察到再生菌丝,原因可能是双灭活方法使得原生质体内部细胞器部分受损,融合互补恢复再生需要更长的时间<sup>[20]</sup>,而经流式细胞仪分选出的融合子活性并未受损,菌丝再生速度快.

### 2.3 融合子的产量验证

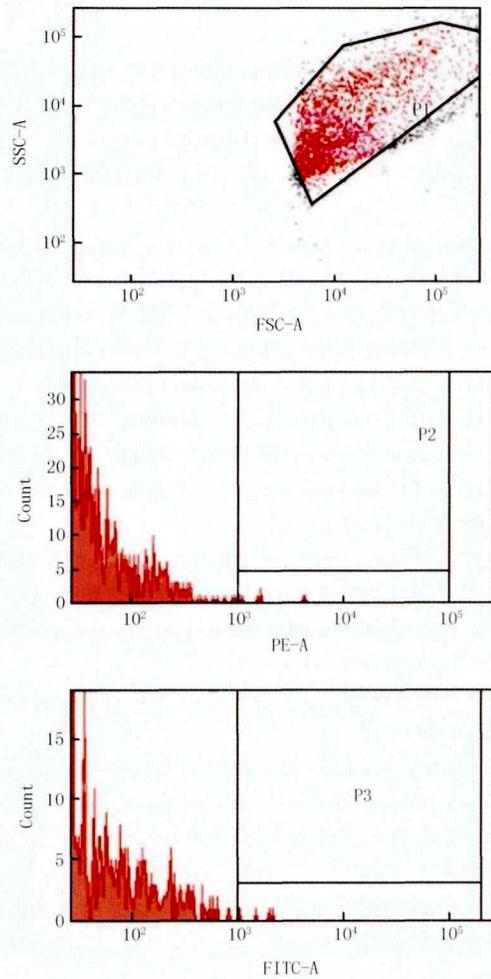
原有菌株 G12 发酵油脂含量较高,但生物量较低,产孢子能力较弱,不易于传代培养,而 F24 菌株油脂含量较低,产孢子能力强,生物量稳定,有利于传代培养. 分别利用双灭活法和流式细胞分选融合子涂布再生平板后挑选多个菌落进行发酵验证,从中筛选出既产孢能力强,生物量高,油脂含量也较高的融合成功菌株,并对其传 5 代进行验证,性状稳定的菌株即为理想菌株. 双灭活法筛选到融合菌株 2 经摇瓶发酵 11 d 产量达  $5.68 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而流式细胞分选得到的融合菌株 1 油脂含量达到 43.28%,AA 含量达 46.25%,最终 AA 产量可达  $6.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,且产孢能力较强,易于接种传代. 表 1 结果为每组实验 5 个平行的平均值.

表1 G12、F24及融合成功菌株的产量对比

菌株	生物量/ (g · L <sup>-1</sup> )	油脂质量 分数/%	AA质量 分数/%	AA质量 浓度/(g · L <sup>-1</sup> )
F24	33.67	35.25	45.44	5.39
G12	29.58	44.85	39.27	5.21
融合菌株1	31.57	43.28	46.25	6.32
融合菌株2	32.81	41.01	42.25	5.68

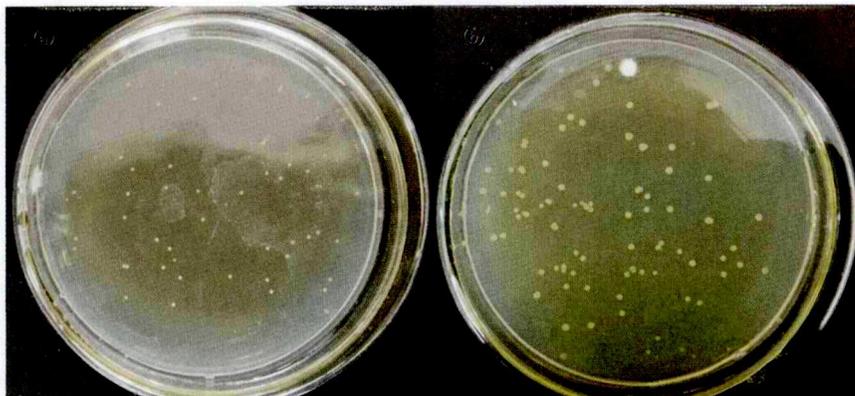
### 3 讨论

本文研究了高山被孢霉原生体制备、融合及融合子筛选中的一系列相关条件,得到了原生质体制备、融合的最佳条件,并分别用双灭活和流式细胞分选法进行融合子筛选,两种方法均可成功筛选融合子. 双灭活方法操作简单,但筛选的融合子需要经历一个受损后的恢复阶段,再生耗时稍长. 流式细胞分选,操作较双灭活法复杂,成本较高,但筛选的准确率高,再生速度快. 且本文通过流式细胞分选筛选到的高产菌株性状更佳,其结合了两亲本菌株的优点,并使ARA产量明显提高高达6.32 g · L<sup>-1</sup>,本研究为高山被孢霉菌种选育提供了一种有效手段,而菌种选育是提高花生四烯酸产量的首要关键因素之一,推动了工业ARA生产水平的进步.



P2: 为红色荧光信号强的原生质体;  
P3: 为P2中绿色荧光信号强的原生质体.

图8 流式细胞分选图谱



(a)再生3 d融合子形态; (b)再生5 d融合子形态.

图9 流式细胞仪筛选出的融合子涂布再生平板后培养3 d和5 d情况

## 参 考 文 献

- [1] 姚昕,秦文,齐春梅,等.花生四烯酸的生理活性及其应用[J].粮油加工与食品机械,2004(5):57-59.
- [2] 袁成凌,姚建铭,余增亮.花生四烯酸及其代谢物的生物学作用[J].中国药物化学杂志,2000,10(1):75-78.
- [3] 常淑梅,彭超,纪晓俊,等.花生四烯酸高产菌株选育研究进展[J].食品与发酵工业,2010(2):158-162.
- [4] Badr-Elden A M, Nower A A, Nasr M I, et al. Isolation and fusion of protoplasts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) [J]. *Sugar Tech*, 2010, 12(1): 53-58.
- [5] Dai M H, Ziesman S, Ratcliffe T, et al. Visualization of protoplast fusion and quantitation of recombination in fused protoplasts of auxotrophic strains of *Escherichia coli* [J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(1): 45-52.
- [6] 江慧修,张金玲,戈玲,等.凝集性酵母融合株 MNF29 的啤酒酿造实验研究[J].微生物学通报,1992,19(1):21-23.
- [7] 朱平,李焕葵.微生物原生质体灭活及其在育种中的应用[J].国外医药:抗生素分册,1990(6):409-413.
- [8] Tan Z J, Yang H J, Lin S, et al. Protoplast fusion technology and microbial breeding [J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2005, 19(1): 75-79.
- [9] Jani L V, Janossy G, Iqbal A, et al. Affordable CD4<sup>+</sup> T cell counts by flow cytometry: II. The use of fixed whole blood in resource-poor settings [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2001, 257(1/2): 145-54.
- [10] Ormerod M G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 265(1/2): 73-80.
- [11] 贾永峰,梁剑光,王永红,等.盐霉素产生菌原生质体的制备与再生[J].中国抗生素杂志,2014,39(3):198-203.
- [12] 葛菁萍,安琦,张玉环,等.灭活原生质体融合选育木糖、葡萄糖共发酵酿酒酵母工程菌[J].菌物学报,2014,33(1):87-96.
- [13] Baltz R H. Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces*, (Volume 21) [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, 22(4/5): 460-471.
- [14] 王海磊,张永梅,刘磊,等.新西兰青霉(*Penicillium novae-zeelandiae*)原生质体的制备与再生研究[J].河南师范大学学报(自然科学版), 2015, 43(6): 112-117.
- [15] Chitnis M V, Deshpande M V. Isolation and regeneration of protoplasts from the yeast and mycelial form of the dimorphic zygomycete *Benjaminiella poitrasii*: Role of chitin metabolism for morphogenesis during regeneration [J]. *Microbiological Research*, 2002, 157(1): 29-37.
- [16] 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):263-265.
- [17] 魏洪美,任锡毅,杨兵,等.竹黄菌原生质体的制备与再生分析[J].基因组学与应用生物学,2016,35(4):918-923.
- [18] 李明春,邢来君.γ-亚麻酸生产菌深黄被孢霉原生质体的形成和再生[J].菌物学报,1997(1):24-29.
- [19] 陈慧毅,褚为靖,张会英,等.实时荧光PCR法与流式细胞两种方法检测HLA-B27的比较[J].中国实验诊断学,2012,16(12):2251-2254.
- [20] Hopwood D A, Wright H M. Protoplast Fusion in *Streptomyces*; Fusions involving ultraviolet-irradiated protoplasts [J]. *Microbiology*, 1981, 126(1): 21-27.

## Screening of Protoplast Fusion of *Mortierella Alpina* with Highyield Arachidonic Acid

Pan Miao, Sun Lijie, Chen Xiangsong, Yuan Lixia, Wu Jinyong, Yao Jianming

(Institute of Plasma Physics Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

**Abstract:** In this study, F24 and G12, two *Mortierella alpina* strains which have obvious different characters were fused for the purpose of selecting advantages combining ARA high yield strains by using protoplast fusion technique combined with two efficient fusants screening methods. The parental protoplasts preparation, fusion, regeneration conditions and methods were studied. And the specific methods of double inactivation or flow cytometry were studied. Through the study, hydrolyzing 16 h-cultured mycelium in the mixture (15 mg/mL glucosylase, 6 mg/mL cellulose solution, 0.5 mg/mL lysozyme and 0.2 mg/mL chitinase) for 4 h at 30 °C is the best condition. Exploring the best conditions of the two fusant screening methods successfully screen out of the fusants. Finally, By further regeneration culture to verify ARA yield, a high-yield strain was obtained which ARA's production was 6.32 g/L. This method has not been used in the *Mortierella alpina* before. It provides an effective method for screening the high-yield ARA strains.

**Keywords:** *Mortierella alpina*; arachidonic acid; protoplast fusion; dual inactivation method; flow cytometry method