

金针菇原生质体制备的研究

龚淑俐, 邓放明, 陈力力

(湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 本文比较了酶浓度、菌龄、渗透压稳定剂以及酶解温度和时间等因素对金针菇原生质体得率的影响。试验结果表明: 液体培养 4 d, 固体培养 10 d 的金针菇菌丝, 以 0.5 mol/L KCl 作渗透压稳定剂, 加入 1% 纤维素酶和 1% 溶菌酶在 25 °C 下酶解 1.5 h, 分离原生质体效果最佳, 原生质体产量可达 $(5\sim 7) \times 10^7$ 个/ml 以上。

关键词: 原生质体; 金针菇

中图分类号: S646.1+5; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)04-0054-04

Preparation of Protoplast of *Flammulina Velutipes*

GONG Shu-li, DENG Fang-ming, CHEN Li-li

(College of Food science and technology Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: The effects of some factors on the production of protoplasts of *Flammulina velutipes*, such as enzyme dosage, culture age, osmotic stabilizer, hydrolytic temperature and time, were investigated and the optimum conditions for preparation of protoplasts were also investigated. After 4-day liquid culture and 10-day solid culture, the *Flammulina velutipes* Mycelia was hydrolyzed by 1% cellulase and 1% lysozyme for 1.5 h at 25 °C with 0.5 M KCl as osmotic stabilizer. The maximum yield was achieved to be above $(05\sim 7) \times 10^7$ /ml.

Key words: Protoplast; *Flammulina velutipes*

金针菇 (*Flammulina velutipes*) 是一种著名的食用菌, 含有 18 种氨基酸, 其含量高于一般菇类, 营养极其丰富, 并具有促进儿童智力发育、预防高血压、治疗肝脏及消化道疾病等作用 and 显著的抗癌功能。用金针菇子实体加工制成的保健食品如“金菇露”、“金菇馅饼”等产品, 在国际市场上畅销, 价格也高, 但子实体生产受栽培季节及工艺影响, 生产量有限, 生产成本高, 因而限制了他的进一步发展。为满足国际国内需要, 培育出高产、稳定的金针菇菌种很有必要。而达此目的, 靠传统的育种手段, 已很难解决。

原生质体 (Protoplast) 这个术语最早是由 Hanstein 在 1880 年提出来的, 其含意是指在细胞壁消除后余下的那部分由质膜包裹的裸露的细胞结构^[1]。原生质体虽然失去了细胞壁存在是的原细胞壁形态, 变成了圆球体, 但它仍然具有原生质膜和整体基因组, 仍保持着细胞的生理学、生化学和遗传学的特性和功能, 并能再生和回复成一个具壁细胞。因此已成为生理学和遗传学的研究材料。如进行细胞融合, 遗传转化, 大型质粒 DNA 的探测和物种改良等。另外, 还可利用原生质体分离细胞器, 如线粒体和液泡, 进行亚细

收稿日期: 2006-11-06

作者简介: 龚淑俐, 硕士研究生, 研究方向为食品资源开发与利用

通讯作者: 邓放明教授

胞生理学和细胞膜物质转移研究, 通过原生质体分离和再生的研究也可了解真菌细胞壁的化学组成和构建过程, 所有这些新领域的开辟和发展, 都要依赖于原生质体技术的发展和成熟^[2]。现代的细胞工程技术为培育优良菌株展示了广阔的前景。真菌细胞的原生质体不但是细胞杂交的良好亲本, 而且是遗传工程理想的受体。除去了细胞壁的原生质体能超越细胞的一些不亲和障碍, 为较远缘的真菌细胞杂交提供了融合亲本。本试验筛选出了金针菇原生质体分离的最佳条件, 为后期融合工作打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

所用菌种为金针菇 (*Flammulina velutipes*), 由湖南农业大学食化与微生物实验室提供。

1.1.2 培养基^[3,4]

液体培养基: 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, KH_2PO_4 0.02%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, 蛋白胨 0.1%, VB 1 μg ; 斜面 and 固体培养基: 液体培养基中加入 2% 琼脂。

1.1.3 酶

溶菌酶 (Lysozyme), 蜗牛酶 (Snailase), 纤维素酶 (Cellulase)。

1.1.4 渗透压稳定剂

0.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L KCl,
0.5 mol/L MgSO₄·7H₂O。

1.2 方法

1.2.1 培养基灭菌法^[5]:

培养基于 121 °C 高压锅中灭菌 30 min

1.2.2 菌丝培养法

1.2.2.1 三角瓶液体培养

菌种活化接种于固体斜面培养, 8 d 后转接于盛 50ml 液体培养基的三角瓶中, 于摇床上振荡培养 4 d (25 °C, 200 r/min)。

1.2.2.2 玻璃纸平板培养

将金针菇的孢子悬液点种于覆有无菌玻璃纸的菌丝培养平板上 25 °C 培养 10 d。

1.2.3 酶液的配制

称取一定量酶, 用无菌渗透压稳定剂溶解, 于低温冰箱保存 (当天配制)。

1.2.4 原生质体的制备

取液体培养 3~4 d 的菌丝, 用无菌滤纸过滤, 并用无菌渗透压稳定剂冲洗 2~3 次, 按 3 g 左右湿菌丝加 10 ml 酶液酶解; 固体培养的菌丝则将附有菌丝的玻璃纸轻轻揭下, 称重后反置于盛有酶液的培养皿内^[6], 每张玻璃纸加 10 ml 酶液酶解。酶解过程中比较酶浓度, 渗透压稳定剂、酶解时间等条件对原生质体释放量的影响。每 20 min 镜检一次。酶解结束后, 用血球计数板计释放的原生质体数^[5]。

1.2.5 原生质体的纯化

酶解液过滤, 3500 r/min 离心 10 min^[7], 去上清液, 沉淀用渗透压稳定剂稀释, 再离心, 重复两次, 以彻底去除酶液。沉淀最后溶于适量的渗透压稳定剂中, 即得到纯净的原生质体悬浮液 (图 1)。

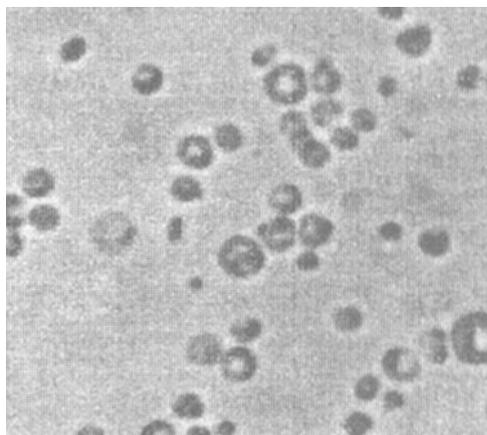


图 1 分离得到的原生质体

2 结果

2.1 原生质体的形成

原生质体的分离依赖于菌丝细胞壁在适当的裂解酶中部分或全部降解的结果 (JF Peberdy, 1979)^[8]。本文分别采用溶菌酶、蜗牛酶、纤维素酶单酶及其组合的混合酶制备金针菇原生质体, 观察到金针菇原生质体形成过程中, 刚开始酶解反应时无原生质体释放, 但出现菌丝断裂, 变粗变短, 菌丝膨大 (图 2)。随着顶端细胞的尖端细胞壁被溶解后, 原生质被膜分解包裹, 并从缺口挤了出来, 由于缺乏壁的保护和表面张力变化, 原生质体变成球形 (图 3)。一般金针菇从一个缺口可释放 1~2 个原生质体。释放过程中可见相邻原生质体发生自然融合现象 (图 4)。约 0.5 h 后, 可观察到一些菌丝侧面产生很多空洞, 原生质体从侧面释放出来。一些菌丝细胞壁横隔溶解而释放出原生质体, 随着酶解时间的延长, 大部分菌丝断裂, 此时可见短菌丝一端或两端释放原生质体。至酶解比较彻底时, 整条菌丝的细胞壁被溶解, 此时, 可见许多原位释放的原生质体。原生质体中液泡非常明显, 占原生质体内容物一半以上的空间, 且原生质体在酶液中会逐渐增大液泡, 从而使体积增大, 显微镜下见到的原生质体大小不匀 (图 5)。

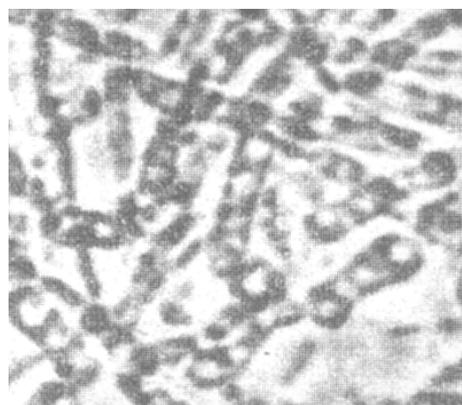


图 2 菌丝在酶解早期变粗缩短膨大的现象

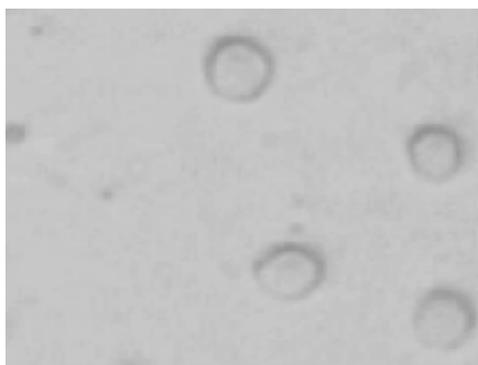


图 3 酶解过程中原生质体变成球形

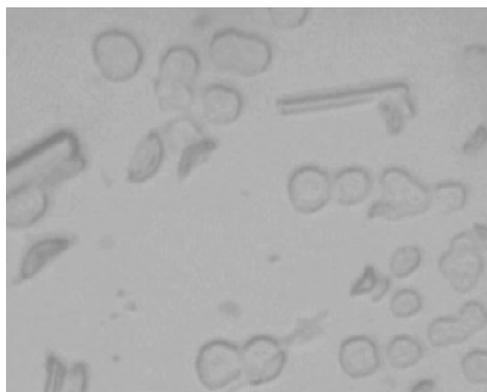


图4 原生质体自然融合现象

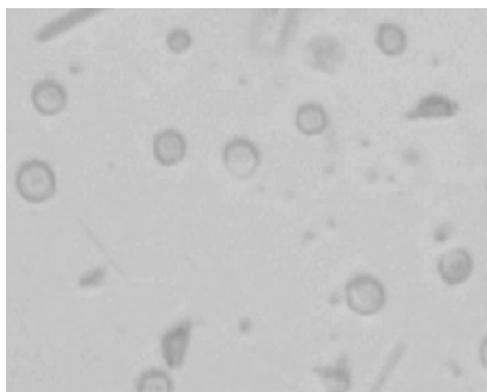


图5 显微镜下原生质体大小不匀

2.2 菌龄对原生质体释放量的影响

菌龄对原生质体释放的影响很明显,幼嫩菌丝所得原生质体产量较高,超过一定菌龄的菌丝就很难制取原生质体。但在一定的时间范围内,菌龄对原生质体产量影响不大,这时用来酶解的菌丝量明显影响原生质体产量。

2.3 酶系组合对原生质体释放量的影响

用不同的酶来制备原生质体,发现1%纤维素酶与1%溶菌酶的混合酶的效果最佳(见表1)。

表1 采用不同酶制备金针菇原生质体的效果 单位: 10^7 个/ml

酶	原生质体产量
蜗牛酶	2.08
纤维素酶	2.12
溶菌酶	3.78
1%蜗牛酶+1%纤维素酶	3.24
0.5%蜗牛酶+1%纤维素酶+0.5%溶菌酶	1.76
1%纤维素酶+1%溶菌酶	6.68

注:以上数据是25℃时0.5 mol/L KCl为渗透压稳定剂的条件下酶解1.5 h的结果

2.4 不同酶浓度对原生质体释放量的影响

使用纤维素酶和溶菌酶的混合酶,分别以1%的浓度混合较为适宜。浓度过高,易造成原生质体不稳

定而变形,甚至破裂,产量反而下降也不经济;浓度太低,破壁困难则原生质体产量不足(见表2)。

表2 酶浓度对原生质体产量的影响 单位: 10^7 个/ml

酶浓度	原生质体产量
2.5%纤维素酶+2.5%溶菌酶	0.08
2.0%纤维素酶+2.0%溶菌酶	1.04
1.5%纤维素酶+1.5%溶菌酶	4.06
1.0%纤维素酶+1.0%溶菌酶	6.68
0.5%纤维素酶+0.5%溶菌酶	4.92

注:以上数据是25℃时以0.5 mol/L KCl为渗透压稳定剂的条件下酶解1.5 h所测的结果

2.5 渗透压稳定剂对原生质体产量的影响

本实验设定的渗透压稳定剂浓度0.5 MOL/L是根据文献统计优选出来的。实验分别采用NaCl、KCl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、甘露醇作稳渗液,对金针菇菌丝进行酶解对比实验,结果见表3。从表可见:不同的渗透压稳定对原生质体的释放量有较大的影响,其中以KCl为稳渗剂的效果最好。

表3 不同渗透压稳定剂对原生质体产量的影响 单位: 10^7 个/ml

渗透压稳定剂	NaCl	KCl	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	甘露醇
原生质体产量	2.97	6.68	4.78	0.36

注:以上数据是1%纤维素酶+1%溶菌酶在25℃、酶解1.5 h测结果

2.6 酶解时间对原生质体释放量的影响

在相同酶系下,不同酶解时间内所产生的原生质体量见表4。表中实验结果表明,25℃下,酶解1.5 h获得的原生质体最多,大小也比较均匀。当酶解超过4 h后,显微镜下发现原生质体体积开始明显增大,继而有的原生质体边缘变得十分模糊,8 h后大部分原生质体已完全破裂裂解。

表4 酶解时间对原生质体产量的影响单位: 10^7 个/ml

酶解时间(h)	0.5	1.0	1.5	2.0	3.5
原生质体产量	2.40	4.88	6.68	6.32	5.76

注:以上数据是25℃时0.5 mol/L KCl为渗透压稳定剂的条件下1%纤维素酶+1%溶菌酶的酶解结果

2.7 酶解温度对原生质体释放量的影响

在选定的酶系统下,金针菇的原生质体生成温度以25℃为宜。温度过高,会使原生质体形成不稳定易破裂,过低则不能充分发挥酶的效力。

3 讨论

影响原生质体形成的因素很多,从根本讲,最终都是以影响培养材料的生理状态这个内因而实现的。首先,用于培养菌丝的培养基的成分不同能使原

生质体的获得量表现差异。因为培养基成分会直接影响菌丝细胞壁的构成,从而使细胞壁对酶的敏感性发生相应的变化,影响原生质体的释放^[9,10]。

菌丝体的菌龄对原生质体释放的影响主要也在于壁的成份和结构发生了变化。一般的说,真菌细胞壁含有 80%~90% 的均聚糖和杂多糖(homo-heten polysaccharides),其余为蛋白质,胍多聚糖混合物及少量类脂化合物。非溶性多聚糖微纤维及壳质构成细胞壁骨架,而配糖胍则填充于其实空隙间,具有胶合作用。子囊菌纲和担子菌纲细胞壁的主要成分是 S-葡聚糖,它是一种 β -1,3 配糖键连接的直链多聚糖,多位于细胞壁的外层,易于被碱性抽提液脱去^[1]。因此,制备食用菌的原生质体应采用适当的纤维素酶类。酶解时,首先菌丝顶端见到原生质体释放,因为尖端部分是新合成的壁,成分相对简单,壁也相对薄些。随着菌龄的增加,壁不断沉积色素等物质,阻碍了酶的作用,使壁难以解体释放原生质体^[6,8,9]。

用酶法破壁制取原生质体,酶的作用无疑是关键的,不同种或者同一种不同分布区域的菌体其细胞壁的结构就可能存在差异而需要不同的酶系统,而且,酶的质量、纯度对原生质体的形成也有着非常大的影响。现已有多种破除真菌细胞壁的酶类,一般用混合酶类比单一酶效果好,原因在于不同酶之间存在作用的互补^[2]。本研究中单独使用蜗牛酶、纤维素酶、溶菌酶效果极差,而用 1% 纤维素酶+1% 溶菌酶的混合酶能达到令人满意的效果。

渗透压稳定剂的种类和 pH 值是影响原生质体释放的重要因素。渗透压稳定剂是裂解酶的作用环境,也是原生质体的存在环境,稳渗剂的性质、浓度一定程度上会促进酶的反应活性,同时也是维持和控制原生质体数量的主要因素^[2]。常用的渗透压稳定剂有无机型和有机型两大类,无机型主要是一些无机盐类,如 KCl、NaCl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 等。有机型有糖类(如葡萄糖、蔗糖等)和糖醇类(如甘露糖醇、山梨糖醇等)。总的看来,对食用菌来说,渗透压稳定剂用无机盐似乎比有机型的要好。这可能与丝状真菌原生质体为保持代谢活性利用醇、糖而改变周围环境,包括 pH、渗透压以至改变稳定性,从而影响破壁效果有关^[11],这与本实验的结果一致。pH 值主要影响酶的活性,一般以 pH 5.4~6.5 较为合适^[12]。

此外,酶解温度、酶解时间等因素对原生质体释放也有很大的影响。温度主要影响酶的活力和菌体的

生理状态,酶解时间过长会导致原生质体数量的减少,主要原因可能是酶继续作用于膜系统使膜破裂所致^[7]。另外在酶解过程中,要间隔一段时间伴以轻微振荡,以利于原生质体与菌丝体分离开来。

4 结语

在分离金针菇原生质体的条件摸索过程中,采用了许多文献总结的经验规律,在最佳作用条件下,原生质体的最高产量为 $(5\sim7)\times 10^7$ 个/ml,足够满足原生质体融合、进一步的深化分析等研究所需。但是本人在实验过程中发现金针菇菌丝在摇瓶培养时易团化,外分泌粘性物质很多,不利于洗涤和酶解。因此采用摇瓶培养的菌丝制备原生质体时,应先使菌团充分散化,使菌丝细胞壁外露,以利于随后的振荡洗涤及各种裂解酶的渗入而起作用。但用玻璃纸平板培养的菌丝制备原生质体效果较好。

参考文献

- [1] 杨洁彬,李淑高.食品微生物学(2版)[M].北京:北京农业大学出版社,2000:97.
- [2] 胡伟,孔繁翔,桑伟莲.菌根真菌—精丝膜伞原生质体分离与再生研究[J].菌物系统,2001,20(4):561-565.
- [3] 朱坚,江玉姬,谢宝贵等.金针菇深层发酵培养基筛选研究[J].食用菌学报,2000,7(2):15-20.
- [4] 江玉姬,谢宝贵,黄毅等.金针菇深层培养条件研究[J].食用菌学报,2000,7(1):32-36.
- [5] 周传云.食品微生物学实验技术[M].湖南农业大学食品科技学院微生物教研室,1999:134.
- [6] 韩黎,陈世平,索继红.微小根毛霉致病株的原生质体形成条件[J].微生物学通报,1999,25(1):27-29.
- [7] 李东屏,张志光,张天晓.草菇、银丝草菇原生质体分离及再生试验[J].湖南微生物学通讯,1991,1:9-14.
- [8] 董宏平,袁生,徐旭士等.轮梗霉原生质体的制备[J].菌物系统,2001,20(4):561-565.
- [9] 辛明秀,蒋亚平.米曲霉原生质体融合及杂合二倍体的形成[J].微生物学通报,1994,21(3):143-148.
- [10] 何社辉,苏晓庆.灭蚊真菌—大链壶菌原生质体形成和再生的研究[J].真菌学报,1995,14(3):196-201.
- [11] 梁平严,刘宏迪,肖信发.植物生理学报,1981,7(1):1-10.
- [12] 吴金男,吴友良.金针菇丝体液体培养研究[J].常熟高专学报,1999,13(2):93-95