

洛伐他汀产生菌土曲霉原生质体的制备与再生

蔡晶晶 李季伦

(中国农业大学生物学院)

摘要 报道了产生降血脂药物洛伐他汀(lovastatin)的土曲霉(*Aspergillus terreus*)原生质体的制备与再生条件及原生质体形成过程。结果表明用溶壁酶 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、Zymolyase 20T $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和蜗牛酶 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 配制的混合酶液,可制备出土曲霉原生质体;其最佳酶解温度为 34°C ,作用 5 h,原生质体再生率达 17% 以上。

关键词 土曲霉; 洛伐他汀; 原生质体的制备与再生

分类号 Q93 3; Q939.9.97; Q939.5; R972.1.6

Protoplast Formation and Regeneration in Lovastatin-Producing Fungus *Aspergillus terreus*

Cai Jingjing Li Jilun

(College of Biology, CAU)

Abstract The process of formation and regeneration of mycelial protoplasts from the lovastatin-producing fungus, *Aspergillus terreus*, has been investigated. By using combined lytic enzyme system containing commercial Lyw allzyme, Zymolyase 20T and Snailase, protoplasts preparation were obtained after 5 hours treatment under 34°C , the regeneration frequency is above 17%.

Key words *Aspergillus terreus*; lovastatin; protoplast formation and regeneration

洛伐他汀(lovastatin)是一种有重要医用价值的降胆固醇类药物,开发于 1987 年,与其同系物普伐他汀(pravastatin)和新伐他汀(simvastatin),在该类药物中占主导地位。土曲霉(*Aspergillus terreus*)是洛伐他汀的主要产生菌。已有很多研究深入到该菌产生洛伐他汀的代谢过程^[1]、发酵^[2]、检测^[3]及提取方法,但在基因水平上研究洛伐他汀生物合成的报道还不多。1993 年, Nara 等建立了产生洛伐他汀类似物 compactin 的橘青霉(*Penicillium citrinum*)的转化系统^[4],为从分子水平改造菌种奠定了基础。

由于物理或化学的诱变育种工作量大、盲目性大、偶然性大,人们已经把注意力转向定向的基因改造。探索工业菌株原生质体制备与再生条件是建立各种霉菌转化系统或原生质体融合系统的基础。虽然有关丝状真菌原生质体的研究已进行了 20 多年,并在许多主要真菌中都制备了原生质体并进行了再生。但是由于丝状真菌的细胞壁成分复杂,不同属甚至不同种真菌细胞壁成分都不相同,使得制备原生质体的条件也各不相同。为在土曲霉中建立起有效的遗传操作体系,首先需探索该菌种原生质体制备与再生的条件。

收稿日期: 2000-01-14

蔡晶晶, 北京经济技术开发区永昌北路 3 号 707 国家人类基因组北方研究中心, 100176

本实验采用商品溶壁酶 Zymolyase 20T 及蜗牛酶配制的混合酶液,成功地制备出土曲霉原生质体,确定了最佳酶解温度、时间和再生条件,并观察了原生质体形成的过程。为在此基础上建立该菌种的转化系统做了准备。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 土曲霉 *Aspergillus terreus* F28 为洛伐他汀产生菌,本室保藏。

1.1.2 培养基和溶液 斜面培养基,麦芽膏琼脂^[5];菌丝生长培养基,参照 Kimura K 方法配制^[6];再生培养基为察氏培养基^[5],用 NaCl 0.6 mol·L⁻¹ 配制;渗透压稳定剂^[7],NaCl 0.6 mol·L⁻¹,由 pH 5.8 柠檬酸-磷酸缓冲液配制。再生培养基用 0.06 MPa 20 min 灭菌,其余 0.1 MPa 30 min 灭菌。

1.1.3 酶 溶壁酶,广东省微生物所出品;Zymolyase 20T,日本生化学株氏会社出品;蜗牛酶,中科院生物物理所出品;纤维素酶,上海丽珠东风生物技术有限公司出品。各酶用渗透压稳定剂溶解,过滤除菌后混合成一定浓度的酶液。

1.2 方法

1.2.1 菌丝的培养 取生长 7 d 产孢良好的斜面,用无菌水洗下孢子,制成 $10^7 \sim 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ 孢子悬液,按 1% 接入菌丝生长培养基,28℃,培养 2 d,菌丝体成浅粉色小球状。

1.2.2 原生质体制备 用无菌网筛(200 目)过滤收集菌丝体球,用渗透压稳定剂洗一遍,控干 1 min,转入无菌小瓶中,按 $10 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿菌丝体加入酶液,缓慢震摇以分散菌丝体球,在适当温度下作用至菌丝体球完全酶解,经 4 层无菌显微镜擦镜纸过滤,去除菌丝片断,500 g 离心 10 min 收集原生质体,用渗透压稳定剂洗 2 次,重悬于渗透压稳定剂中。

1.2.3 原生质体再生 将原生质体适当稀释,涂于再生培养基上,28℃,培养 7 d。再生率 = $(B - C) / A \times 100\%$ 。其中: A 为镜检原生质体数; B 为用渗透压稳定剂稀释原生质体在再生培养基上的再生菌落数; C 为无菌水稀释原生质体在低渗培养基上的再生菌落数。

2 结果

2.1 酶系统的选择

比较溶壁酶 Zymolyase 20T、蜗牛酶和纤维素酶对酶解土曲霉细胞壁的效果,在单酶作用下释放原生质体的能力依次为溶壁酶 > 蜗牛酶 = Zymolyase 20T > 纤维素酶。其中溶壁酶效率最高,蜗牛酶其次,Zymolyase 20T 的作用为将长菌丝断裂为小片断后再释放原生质体,纤维素酶则效果不佳。但是即使使用高浓度的单酶,原生质体的形成数也低于 $10^6 \cdot \text{g}^{-1}$ (湿菌丝体),不如混合酶液的效果好。比较不同浓度的混合酶液 28℃ 酶解菌丝 3 h 原生质体形成与再生情况,以溶壁酶 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + Zymolyase 20T $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 蜗牛酶 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合酶液处理的效果较好,原生质体形成数达到 $3.9 \times 10^7 \cdot \text{g}^{-1}$ (湿菌丝体),再生率达 18.4% (表 1)。

表 1 不同酶系统条件下原生质体的形成数与再生率

酶系统 $\rho/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$			原生质体形成数 个 $\cdot\text{g}^{-1}$ (湿菌丝体)	再生率 $\varphi\%$
溶壁酶	Zymolyase 20T	蜗牛酶		
0	5	5	4.6×10^6	14.5
5	5	0	9.7×10^6	15.9
5	2.5	0	1.3×10^7	15.7
5	2.5	2.5	3.9×10^7	18.4

2.2 最佳酶解温度及时间的确定

土曲霉 *A. terreus* F28 在 25~40 均能酶解释放原生质体, 在酶解 3 h 的条件下, 以 34 释放原生质体数最高, 达 5.2×10^7 个 $\cdot\text{g}^{-1}$ (湿菌丝体), 而且再生率也最高, 达 17.4%; 40 时原生质体的释放数锐减, 而且不易再生(表 2)。在同一温度条件下(34), 随酶解时间的延长, 原生质体释放数逐渐增加, 延长至 12 h, 仍能保持一定的数量, 但是时间延长会使再生效率大大下降, 以 5 h 酶解效果最佳(表 3)。

表 2 酶解温度对原生质体形成与再生的影响

温度 $\theta/$	原生质体形成数 /个 $\cdot\text{g}^{-1}$ (湿菌丝体)	再生率 $\varphi\%$
28	2.8×10^7	16.9
32	2.9×10^7	15.7
34	5.2×10^7	17.4
40	1.5×10^6	7.5

表 3 酶解时间对原生质体形成与再生的影响

时间 t/h	原生质体形成数 /个 $\cdot\text{g}^{-1}$ (湿菌丝体)	再生率 $\varphi\%$
1	2.8×10^6	15.1
2	1.2×10^7	14.3
3	6.3×10^7	17.2
4	8.8×10^7	17.8
5	1.5×10^8	17.5
6	1.6×10^8	15.2
7	1.4×10^8	9.2
8	9.2×10^7	6.7

2.3 原生质体形成的过程

土曲霉在液体培养过程中会由于孢子萌发后菌丝的互相缠绕而形成菌丝球, 在酶解过程中, 最初 1 h, 菌丝球基本完整, 只有外围菌丝在酶的作用下断裂并释放原生质体(图 1-a); 2 h 以后, 酶已深入作用到菌球内部菌丝中, 菌丝球呈溶解状态, 原生质体释放量增大(图 1-b); 4~5 h 后, 菌丝球全部裂解, 原生质体释放量达到最大, 但仍有菌丝片断存在(图 1-c)。去除菌丝碎片后, 可得到纯化的原生质体(图 1-d)。由于原生质体刚释放时体积较小, 以后逐渐增大, 内部出现液泡, 胞质被挤到一侧, 因此在显微镜下可观察到原生质体大小并不均一。

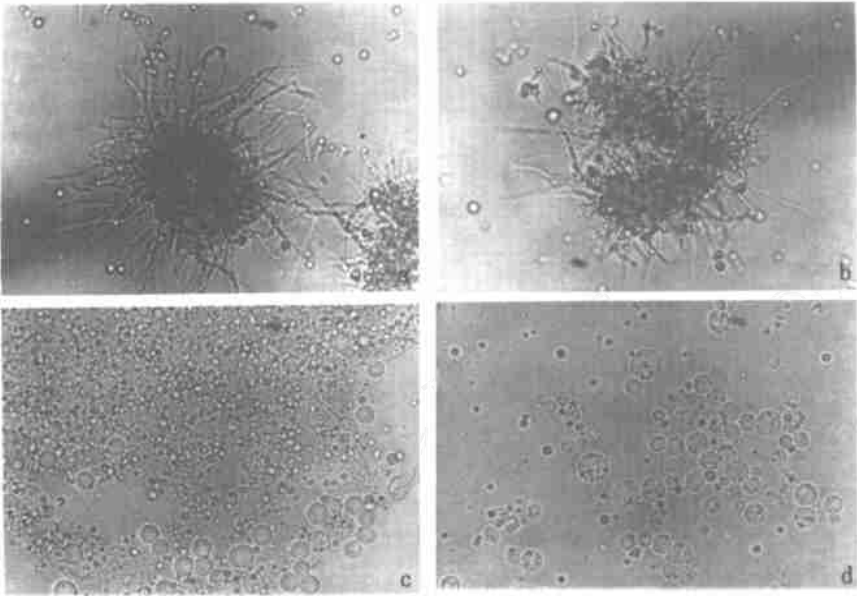


图1 原生质体的形成过程(34)

- a 1 h 的酶解液: 菌丝体球比较完整, 只有外围菌丝被酶解释放原生质体, $\times 40$;
 b 2 h 的酶解液: 菌丝体球开始裂解, $\times 40$;
 c 5 h 的酶解液: 菌丝体球完全裂解, 大量原生质体释放, 仍可见菌丝碎片, $\times 225$;
 d 纯化的原生质体, $\times 225$ 。

3 讨论

曲霉属中有许多重要的工业菌株, 因此受到广泛的关注。Kirimura 等建立了 2 株工业曲霉 *A. terreus* 和 *A. usamii* 原生质体融合系统^[6], 其中报道了对一株衣康酸产生菌土曲霉的原生质体制备与再生的条件, 他采用 Novozyme234, Yatalase 和少量 Zymolyase 20T 组成的混合酶液处理菌丝, 最终获得 $3.9 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 个原生质体, 原养型菌株的再生率为 15% ~ 16%, 蛋氨酸缺陷型突变株的再生率高达 43%。与之相比, 本试验采用了不同的混合酶系统, 并以国产溶壁酶为主, 成功地制备了土曲霉的原生质体, 原生质体数达到 10^8 个 $\cdot \text{g}^{-1}$ (湿菌丝体), 纯化后的原生质体浓度也在 10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 以上, 略优于 Kirimura 的结果, 再生率达到 17% 以上, 与 Kirimura 原养型的结果基本一致。原生质体制备后可直接进行转化或融合实验, 也可在 -70 保存 1 周而再生效率不会降低。

Nielsen 研究发现^[8], 丝状真菌与放线菌在液体培养时会有 3 种成球方式, 即菌丝球来源于单个孢子的萌发或多个孢子聚集萌发或幼嫩菌丝的缠结。土曲霉 *A. terreus* 在液体培养过程中以上述第二种方式形成菌丝球, 酶只能作用于菌丝体球的表面, 释放原生质体的速度较慢, 通常酶解制备丝状真菌原生质体的时间都低于 3 h, 而本实验中要进行 4~5 h。酶解过程中轻微的震荡有利于菌丝体球的裂解与原生质体的释放。如果土曲霉在液体培养时能形成开放菌丝状态, 则可能缩短酶解时间。我们曾试图在液体培养时加入无菌玻璃珠以打散菌丝球,

但得到的培养物为很小的菌丝片断, 无法进行原生质体的制备。

本系李秀玉教授为本实验提供了有益的指导, 李颖副教授赠送 Zymolyase 20T, 特致谢意。

参 考 文 献

- 1 Chan J K, Moore R N, Nakashima T T, et al Biosynthesis of mevinoлин, spectral assignment by double-quantum coherence NMR after high carbon-13 incorporation J Am Chem Soc, 1983, 105: 3334~ 3336
- 2 Bruckland B, Gbewonyo K, Hallada T, et al Production of lovastatin, an inhibitor of cholesterol accumulation in humans In: Demain A L, et al, eds Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture Elsevier Amsterdam, 1989, 161~ 169
- 3 Kysilka R. Detemination of lovastatin (mevinolin) and mevinoлинic acid in fermentation liquids J Chrom, 1993, 630: 415~ 417
- 4 Nara F, Watanabe I, Serizawa N, et al Development of a transformation system for the filamentous, ML-238B (compactin) producing fungus *Penicillium citrinum*. Curr Genet, 1993, 23: 28~ 32
- 5 李影林 培养基手册 长春: 吉林科学技术出版社, 1991
- 6 Kirimura K, Sato T, Nakanishi N, et al Breeding of starch-utilizing and itaconic acid-producing koji molds by interspecific protoplast fusion between *Aspergillus terreus* and *Aspergillus usami* Appl Biotechnol, 1997, 47: 127~ 131
- 7 诸葛健, 王正祥 工业微生物实验技术手册 北京: 中国轻工业出版社, 1994
- 8 Nielsen J. Modelling the morphology of filamentous microorganisms T BECH, 1996, 14: 438~ 443