

双歧杆菌和酿酒酵母原生质体融合子 筛选方法的探讨

黎永学, 张德纯*, 李代昆

(重庆医科大学临床微生物教研室, 重庆 400016)

摘要:目的: 探讨双歧杆菌(*Bifidobacterium*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)原生质体融合子的筛选方法。方法: 将双歧杆菌和酿酒酵母原生质体进行原生质体融合, 采用10%乳糖中性红培养基进行融合子的初筛, 并分析融合子传代稳定性、生物学特性, 采用双歧杆菌属特异性寡核苷酸探针对本菌和融合子进行了荧光原位杂交检测比较。结果: 结果表明, 筛选得到的融合子具有双歧杆菌的特异性序列和亲本菌的生物学特性。结论: 双歧杆菌和酿酒酵母原生质体融合, 实现了厌氧菌和酵母的跨界融合, 为双歧杆菌生物学功能的开发提供新思路、新途径。

关键词: 双歧杆菌; 酿酒酵母; 原生质体融合; 融合子

Screening of Fusants Derived from Protoplast Fusion of *Bifidobacterium* with *Saccharomyces cerevisiae*

LI Yong-xue, ZHANG De-chun*, LI Dai-kun

(Department of Clinic Microbiology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract : Objective: To study on the screening of fusants derived from protoplast fusion of *Bifidobacterium* with *Saccharomyces cerevisiae*. Method: The fusants were derived from protoplast fusion between *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521 and *Saccharomyces cerevisiae* CICC1856. 10% lactose culture medium was adopted in first screening. The stability of further generations and biology characteristics of the fusants were analyzed. DNA of the fusants and their parents were investigated with fluorescence in situ and hybridization probed with *bifidobacterium* oligonucleotide. Result: The fusants possessed had the special DNA sequence of *Bifidobacterium* and biological characters of both *Bifidobacterium* and *Saccharomyces cerevisiae*. Conclusion: Fusants derived from *Bifidobacterium* and *Saccharomyces cerevisiae* protoplast fusion are examples of making anaerobe and yeast intra-kingdom fusion realize. Its success undoubtedly offers new ways in studying of *bifidobacterium* species' improvement as well as in development and utilization of its biological function in the future.

Key words: *Bifidobacterium*; *Saccharomyces cerevisiae*; protoplast fusion; fusant

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0084-03

原生质体融合 (protoplast fusion)是将双亲株的微生物细胞分别通过酶解脱壁, 使之形成原生质体, 然后在高渗的条件下混合, 并加入物理的或化学的或生物的助融条件, 使双亲株的原生质体间发生相互凝集, 通过细胞质融合, 核融合, 进而发生基因组间的交换重组, 可以在适宜的条件下再生出微生物的细胞壁来。从而获得带有双亲性状的、遗传性能稳定的融合子(fusant)的过程。

双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)是人和动物肠道内最主要的生理性细菌之一, 具有抗感染、抗肿瘤、抗衰老、抗辐射、改善免疫功能等促进作用。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)用于酿造啤酒、酒精、发酵面包及其他饮料。本研究通过原生质体融合技术, 探讨双歧杆菌和酿酒酵母原生质体融合融合子的筛选方法, 为双歧杆菌生物学功能的开发提供新思路、新途径。

收稿日期: 2005-04-25

* 通讯作者

作者简介: 黎永学(1963-), 男, 技师, 硕士, 研究方向为正常菌群及其开发应用的研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*, ATCC29521)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, CICC1856)购自中国食品发酵工业研究所微生物菌种保藏中心。

1.2 培养基

固体完全培养基(CM): 蛋白胨 2.0g, 葡萄糖 2.0g, 酵母膏 1.0g, 蒸馏水 100ml, pH7.2, 琼脂 2.0g, 0.1MPa 灭菌 20min。

再生完全培养基: 固体完全培养基加 17% 蔗糖, 0.1MPa 灭菌 20min。

10% 乳糖中性红培养基: 100ml CM 固体完全培养基, 10g 乳糖, 0.5% 中性红 0.5ml, 0.1MPa 灭菌 20min。

1.3 试剂

原生质体稳定液(SMM): 0.5mol/L 蔗糖, 0.02mol/L $MgCl_2$, 0.02mol/L 顺丁烯二酸, pH6.5, 0.1MPa, 20min; 高渗缓冲液: 0.8mol/L 甘露醇, 用 0.1mol/L pH6.0 磷酸缓冲液配制 0.1MPa, 20min; 促融剂: 40% 聚乙二醇(PEG)的 SMM 溶液, 0.1MPa, 20min; 探针: 双歧杆菌属特异性寡核苷酸探针 Bif164 序列为 5' - CATCCGGCATTACCACCC-3' ,5' 端标记 FITC, 宝生物工程(大连)有限公司合成标记; 革兰染液; 细菌生化微量鉴定管 杭州天和微生物试剂有限公司。

1.4 原生质体融合

取制备好的双歧杆菌和酿酒酵母原生质体各 1.0ml, 混合于无菌小试管中, 2500r/min 离心 10min, 弃去上清液, 用高渗缓冲液离心洗涤二次, 除酶。向菌体沉淀中加入 0.2ml SMM 溶液, 混合后加入 1.8ml 40% PEG, 轻轻摇匀, 32℃ 水浴保温 2min, 立即用 SMM 溶液适当稀释(一般为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2})。

1.5 原生质体再生

取融合后的菌液 0.1ml, 放于冷却至 45℃ 左右的 6ml 固体再生基本培养基试管中, 迅速混匀, 倒入带有底层再生培养基的平板上, 每个稀释度做两次重复, 30℃ 培养 96h。

1.6 融合子的筛选

用消毒牙签挑取再生培养基长出的菌落点种在 10% 乳糖中性红培养基平板上, 30℃ 培养 48h。红色菌落可疑为双歧杆菌和酿酒酵母融合子。

1.7 融合子稳定性分析

选择红色菌落在 10% 乳糖中性红培养基上连续传代至第 10 代。将第 10 代细胞培养的斜面培养管放置室温、4℃、-20℃ 保藏。3 个月后用 CM 培养基培养, 其结果显示其中 2 株融合子(BSF1/BSF2)在室温、4℃、-20℃ 条件保藏菌株均存活, 乳糖分解试验阳性。

2 结果与分析

2.1 生物学特性

2.1.1 培养特性

融合子(BSF1/BSF2)、酿酒酵母(CICC1856)和两歧双歧杆菌(ATCC29521)培养特性见表 1。

表 1 亲本菌和融合子培养特性的比较
Table 1 Culture characteristic compare between parental bacteria and fusants

	酿酒酵母	融合子(BSF)	两歧双歧杆菌
最适生长温度(℃)	30	30	37
10% 乳糖中性红	乳白色菌落	粉红色菌落	不生长
CM 培养基	乳白色菌落	橘红色菌落	不生长

2.1.2 染色特性和形态学

亲本菌和融合子染色特性和形态见表 2 和图 1, 图 2, 图 3。

2.1.3 生化结果

亲本菌和融合子生化结果见表 3。

2.2 荧光原位杂交法检测亲本菌和融合子的结果比较

将培养至对数生长期的酿酒酵母、融合子和两歧双

表 2 亲本菌和融合子染色特性和形态的比较
Table 2 Gram characteristic and morphologic compare between parental bacteria and fusants

	菌体形态	革兰染色
两歧双歧杆菌	杆状、呈分叉生长	+
酿酒酵母	圆球形为主	+
融合子	腊肠或椭圆形、胞体略小于酿酒酵母	+

注: “+” 表示革兰染色阳性。

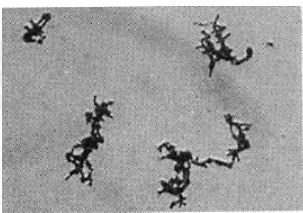


图 1 两歧双歧杆菌(革兰染色)(100 ×)
Fig.1 *Bifidobacterium bifidum* (Gram stain) (100 ×)

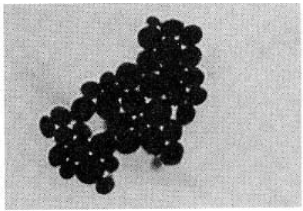


图 2 酿酒酵母(革兰染色)(100 ×)
Fig.2 *Saccharomyces cerevisiae* (Gram stain) (100 ×)

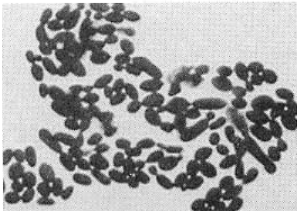


图3 两歧双歧杆菌和酿酒酵母融合子(革兰染色)(100×)

Fig.3 *Bifidobacterium bifidum* and *Saccharomyces cerevisiae* fusant (Gram stain) (100×)

表3 亲本菌和融合子生化结果的比较

Table 3 Biochemistry compare between parental bacteria and fusants

	半乳糖	乳糖	麦芽糖	蔗糖
两歧双歧杆菌	+	+	-	+
酿酒酵母	+	-	+	+
融合子	+	+	+	+

注：“+”表示分解糖类，“-”表示不分解糖类。

歧杆菌进行荧光原位杂交法检测，其结果见表4和图4，图5。

表4 荧光原位杂交法检测亲本菌和融合子的结果比较

Table 4 Fluorescent situ hybridization compare between parental bacteria and fusants

	酿酒酵母	融合子	两歧双歧杆菌
荧光原位杂交	-	+	+

注：“+”表示荧光原位杂交阳性，“-”表示荧光原位杂交阴性。



图4 两歧双歧杆菌和酿酒酵母融合子荧光原位杂交(20×)

Fig.4 Fluorescence situ hybridization of *Bifidobacterium bifidum* and *Saccharomyces cerevisiae* fusant (20×)



图5 双歧杆菌荧光原位杂交(20×)

Fig.5 Fluorescence situ hybridization of *bifidobacterium* (20×)

通过以上筛选和初步鉴定，获得的融合子具有双歧杆菌的特异性序列，具有酿酒酵母和双歧杆菌生物学特性。

3 讨论

3.1 原生质体融合前必须对亲本株进行遗传标记，以便于顺利地筛选到融合子，在融合过程中，可以采用营养缺陷型、抗药性、呼吸缺陷型、荧光染色、温度敏感性、自然的形态和颜色标记等。其中营养缺陷型是常见而准确的选择手段。

3.2 原生质体融合后的关键问题是怎样选择出具有优良性状的融合子(重组子)。在再生培养基上再生出带标记的互补菌落，可以初步判定为融合子。这样检出的融合子中，由于存在部分杂合子、部分二倍体和异核体，所以要对检出的融合子做进一步的鉴定。鉴定工作一般从形态学、生理生化性质、生物量、遗传学(基因型、DNA含量、GC比等)和同工酶等几个方面进行。近年来，也有人通过DNA限制性内切酶酶切片段的比较、核苷酸序列分析、分子杂交、RAPD技术等分子生物学方法来鉴定融合子。

3.3 我们采用酿酒酵母最适培养条件(30℃，有氧培养)进行原生质体的再生，消除双歧杆菌的影响。采用10%乳糖中性红培养基进行融合子的初筛，在10%乳糖中性红培养基上连续传代至第10代，进行融合子传代稳定性分析。通过亲本菌和融合子生物学特性的比较进行初步鉴定，对酿酒酵母、融合子和双歧杆菌进行荧光原位杂交法检测，其结果显示，融合子具有双歧杆菌的特异性序列，其筛选和鉴定方法简单易行。融合子的生物学功能和毒理学试验有待进一步研究。

双歧杆菌和酿酒酵母原生质体融合的成功，实现了厌氧菌和酵母的跨界融合，两歧双歧杆菌和酿酒酵母的跨界融合在国内外还未见报道，为双歧杆菌生物学功能的开发提供新思路、新途径。

参考文献：

[1] Ishii S, Aoyama K, Takiguchi R, et al. Protoplast formation and regeneration in bifidobacteria[J]. Ferment-Bioeng, 1990, 70(5): 345-347.
[2] Petra S, Frits j, jansen, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of bifidobacterium ssp. with genus-specific 16s rRNA-targeted probes and its application in fecal samples[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 3069-3075.
[3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999. 140-145.
[4] 程树培, 崔益斌, 夏伏虎, 等. 光合细菌与酵母跨界融合子降解味精废水性能测定[J]. 环境科学, 1996, 17(3): 5-7.
[5] 李用芳, 李学梅, 杨清香, 等. 面包酵母原生质体的制备、再生及紫外线诱变的初步研究[J]. 生物技术, 2000, 10(2): 23-26.