

原生质体法获取致病性烟曲霉菌干扰时间窗的实验研究

车成业, 李娜, 牟莹莹, 徐强, 姜楠, 胡丽婷, 林静, 王青, 赵桂秋

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目 (No. 81170825); 中国青岛市科技发展计划资助项目 [No. 11-2-3-1-(5)-nsh]
作者单位: (266003) 中国山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院眼科
作者简介: 车成业, 在读博士研究生, 研究方向: 角膜病与白内障。
通讯作者: 赵桂秋, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 角膜病、白内障与眼科病理。 zhaoguiqiu@tom.com
收稿日期: 2011-08-15 **修回日期:** 2011-11-07

Experiment to locate interference time window of pathogenic *Aspergillus fumigatus* by protoplast method

Cheng-Ye Che, Na Li, Ying-Ying Mu, Qiang Xu, Nan Jiang, Li-Ting Hu, Jing Lin, Qing Wang, Gui-Qiu Zhao

Foundation items: National Natural Science Foundation (No. 81170825); Qingdao Municipal Science and Technology Development Program, China [No. 11-2-3-1-(5)-nsh]
Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Correspondence to: Gui-Qiu Zhao. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. zhaoguiqiu@tom.com
Received: 2011-08-15 Accepted: 2011-11-07

Abstract

• **AIM:** To product protoplasts of pathogenic *Aspergillus fumigatus*, and to observe biological properties of protoplasts from stripped the cell wall to return to full form.
• **METHODS:** 1mol/L sorbitol was used as the osmotic stabilizer to product complex enzyme including 1g/dL snailase, 1g/dL cellulase and 0.1g/dL lysing enzyme. Complex enzyme was confected with 5×10^9 /L *Aspergillus fumigatus* conidia liquid by volume ratio of 1:1 to digest 2 hours in gas bath thermostatic oscillator at 30°C and 80r/min. The activity of protoplasts was detected by the neutral red solution.
• **RESULTS:** The average generation capacity of *Aspergillus fumigatus* conidia protoplasts was 2.84×10^9 /L. After digestion the activity of protoplasts at 0, 6, 12, 18, 24 hours were 86.6%, 77.4%, 73.9%, 70.6%, 66.2%. The regeneration

phenomenon of protoplasts began at 18 hours after the digestion, and basically completed within 36-48 hours.

• **CONCLUSION:** The generation rate of *Aspergillus fumigatus* protoplasts was 56.8% with complex enzyme. The time window that we can interfere was at least 18 hours. Protoplasts could maintain a high activity in 24 hours.

• **KEYWORDS:** *Aspergillus fumigatus*; protoplast; interference time window

Che CY, Li N, Mu YY, *et al.* Experiment to locate interference time window of pathogenic *Aspergillus fumigatus* by protoplast method. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(12):2073-2075

摘要

目的: 制备致病性烟曲霉菌原生质体, 并观察原生质体从细胞壁剥离到恢复为完整形态这一时间窗内的生物学性状。

方法: 1mol/L 山梨醇为渗透压稳定剂配制浓度为 1g/dL 蜗牛酶、1g/dL 纤维素酶及 0.1g/dL 溶壁酶复合裂解酶液, 与浓度为 5×10^9 个/L 的烟曲霉菌分生孢子液按体积比 1:1 配比, 30°C 下以 80r/min 酶解 2h, 使用 3-氨基-7-甲氨基-2-甲基吩嗪盐酸盐溶液检测原生质体活力。

结果: 烟曲霉菌分生孢子原生质体的平均生成量为 2.84×10^9 个/L, 完成酶解后 0, 6, 12, 18, 24h 活力分别为 86.6%, 77.4%, 73.9%, 70.6%, 66.2%, 原生质体最早在完成酶解 18h 后出现再生现象, 36 ~ 48h 内有活性的原生质体基本完成再生。

结论: 采用复合酶法可以获得生成率达 56.8% 的烟曲霉菌原生质体, 恢复为完整形态前的可干扰时间窗至少为 18h, 原生质体可以在 24h 内保持较高活力。

关键词: 烟曲霉菌; 原生质体; 干扰时间窗

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.12.004

车成业, 李娜, 牟莹莹, 等. 原生质体法获取致病性烟曲霉菌干扰时间窗的实验研究. 国际眼科杂志 2011;11(12):2073-2075

0 引言

真菌性角膜炎是我国常见的致盲性眼病之一, 发病率已上升到感染性角膜病的首位^[1], 传统药物及手术治疗效果欠佳^[2], 临床急需新的有效治疗方法。RNA 干扰 (RNAi) 技术目前已被广泛用于新基因筛选、基因功能研究以及基因治疗等多个领域。该方法具有高度的特异性和高效性^[3], 可以特异性选择真菌基因为干扰对象, 避免了干扰人类细胞面临的伦理学问题, 有望成为治疗真菌性角膜炎

的有效方法。但是由于真菌存在完整的几丁质-多糖细胞壁,实施 RNAi 较哺乳动物细胞困难的多^[4],传统的电转化法、微量注射法等虽然行之有效,却难以用于活体研究^[5],成为基因治疗真菌性角膜炎研究的瓶颈。真菌原生质体的使用已经在农业、微生物以及遗传等学界获得广泛认可,成为真菌基因干扰新的有效手段^[6]。本实验拟采用酶法制备烟曲霉菌的原生质体,并观察原生质体从细胞壁剥离到恢复为完整形态这一时间窗内的生物学性状,为进一步研究基因治疗真菌性角膜炎奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 标准烟曲霉菌株(*Aspergillus fumigatus* 3.772)由中国普通微生物菌种保藏管理中心提供。溶壁酶及纤维素酶购自 Sigma 公司,蜗牛酶购自华美生物工程公司,其它常规试剂均购自上海生工。

1.2 方法

1.2.1 烟曲霉菌培养 将菌株接种于 Sabouraud 培养基(含 0.5g/L 氯霉素),30℃ 下培养 48h,用取菌环挑取单个菌落转接于马铃薯葡萄糖液体培养基,37℃ 300r/min 摇菌过夜,粗棉纱过滤收集分生孢子,离心后弃上清,以无菌生理盐水稀释,调整接种浓度至 5×10^9 个/L。

1.2.2 裂解酶液的配制 选用 1mol/L 山梨醇为渗透压稳定剂,配制浓度为 1g/dL 蜗牛酶、1g/dL 纤维素酶及 0.1g/dL 溶壁酶复合裂解酶液^[7],0.2 μ m 微孔滤膜过滤除菌后 4℃ 保存。

1.2.3 原生质体的制备 将浓度为 5×10^9 个/L 的烟曲霉菌液加入 16 孔板中,每孔 1mL,按体积比 1:1 加入裂解酶液,设置气浴恒温振荡培养箱为 30℃,80r/min,酶解 2h。红细胞计数板计数原生质体的形成数量。所有实验重复 3 次。

1.2.4 原生质体的活力测定 在完成酶解后 0,6,12,18,24h,使用浓度为 1g/L 3-氨基-7-甲氨基-2-甲基吩嗪盐酸盐溶液染色原生质体 2min,倒置显微镜下呈红色的为已死亡的原生质体,未着色的为活原生质体,以活原生质体所占比例代表原生质体活力。

2 结果

2.1 原生质体时间窗内的生物学性状 倒置显微镜下观察烟曲霉菌分生孢子梗顶端膨大成为顶囊,略呈球形,顶囊表面长满一层或两层辐射状初生小梗与次生小梗,最上层小梗顶端着生成串的球形分生孢子(图 1)。孢子壁被裂解酶破坏后,原生质体细胞膜首先凸出膨大,并逐渐向细胞壁外移行(图 2)。脱离孢子细胞壁的原生质体呈球形,直径约为孢子的 1/3 ~ 1/2,中央有巨大液泡(图 3)。烟曲霉菌分生孢子原生质体最早在 18h 出现再生现象,再生时先产生一个突出物,随后突出物逐渐增大并延伸成一条旋绕的无隔菌丝(图 4),继续发展成有隔的正常菌丝(图 5)。36 ~ 48h 内有活性的原生质体基本完成再生。

2.2 原生质体生成率和活力 烟曲霉菌分生孢子原生质体的平均生成量为 2.84×10^9 个/L,单孔生成率在 50.3% ~ 63.9% (平均 56.8%)。完成酶解后 0,6,12,18,24h,检测原生质体的平均活力分别为 86.6%,77.4%,73.9%,70.6%,66.2%。

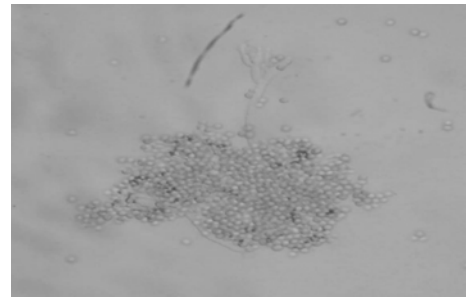


图 1 烟曲霉菌“孢子穗”结构(×100)。

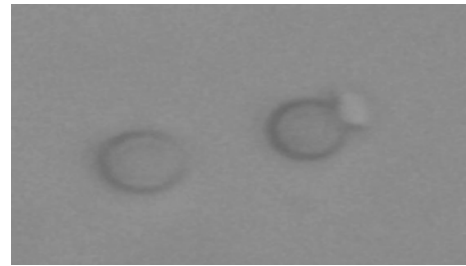


图 2 原生质体凸出膨大向壁外移行(×400)。

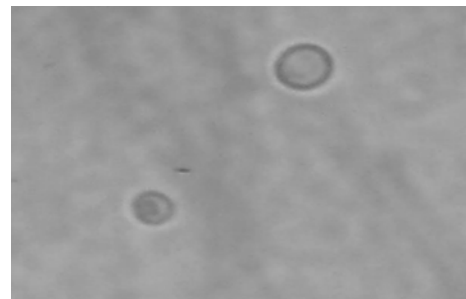


图 3 原生质体呈球形,中央有大液泡(×400)。



图 4 原生质体再生时产生 1 个突出物(×400)。

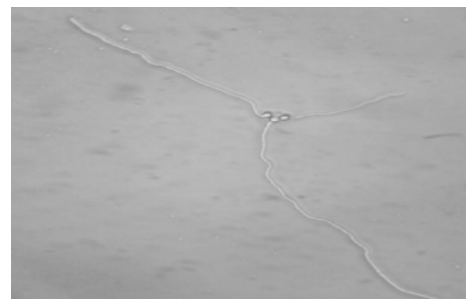


图 5 原生质体再生成有隔的正常菌丝(×100)。

3 讨论

我国的真菌性角膜炎致病菌种以丝状真菌中的镰刀菌和曲霉菌为主^[8]。2005 年, Nierman 等^[9]首次公布了通过基因测序获得的烟曲霉菌的全基因序列,从而为在基因水平上开展烟曲霉菌致病机制及治疗方法的研究创造了有利的条件。与原核生物相比较,由于真菌细胞壁的复杂

性和没有适合应用的自主复制的质粒等原因,外源基因进入丝状真菌并通过重组整合染色体的频率不高,因此丝状真菌的干扰效率较低。目前常用的转染方法如电转化法、醋酸锂转化法、农杆菌介导的转化法和限制酶介导的转化法等已经广泛应用于工农业研究中,却无法在医学研究中开展。

真菌原生质体的使用已经在农业、微生物以及遗传等学界获得广泛认可,成为真菌基因干扰新的有效手段^[10]。Weibull 等于 1953 年首先利用真菌原生质体研究真菌的生物学性状^[11]。使用各种理化方法将真菌细胞壁剥离后由细胞膜包围的部分为原生质体,其细胞结构和功能与完整细胞相类似,并可以在一定条件下再生细胞壁而复原为完整形态。从细胞壁剥离到恢复这一时间窗内,外界大分子如外源 DNA 等容易进入细胞内^[12]。目前这一时间窗已成为多学科关注的对象。

丝状真菌细胞壁组成复杂,由几丁质、半纤维素、糖原、蛋白质等多种成分构成,原生质体的有效释放依赖于细胞壁成分的完全裂解。常见的去壁方法主要有机械法、非酶分离法和酶法。本实验采用复合酶法获取烟曲霉菌分生孢子原生质体,选用的复合酶液中包括蜗牛酶、纤维素酶及溶壁酶。这三种酶的作用对象均为真菌细胞壁,对哺乳动物细胞膜影响较小,可以进一步应用于动物模型的活体研究或者体外细胞培养的相关研究当中。本实验使用的复合酶浓度采用姚婷婷等^[7]通过实验获取的针对丝状真菌的研究结果,最终生成率达 56.8%,且原生质体 24h 内活力不低于 66.2%。这一生成率可以保证进一步纯化后收获有效量的高活力原生质体,为之后的 RNAi 实验奠定基础。

原生质体制备和再生是与原生质体相关的生物技术的关键环节。高效的生成率打开真菌干扰时间窗,稳定的再生过程则为原生质体的基因干扰技术提供保障。本实验中烟曲霉菌分生孢子原生质体最早在完成酶解 18h 后出现再生现象,36~48h 内有活性的原生质体基本完成再生,提示原生质体法可以为后续实验提供不低于 18h 有效干扰时间窗。值得注意的是,由于原生质体与培养液颜色

背景反差较小,在使用倒置显微镜观察时最好减弱光源强度,或改用蓝色光源以利于观察。

随着转染载体的进一步完善,与原生质体技术相结合后的 RNAi 研究将为揭开真菌性角膜炎的发病机制以及寻找有效的治疗方法提供可行措施。

参考文献

- 1 谢立信. 我国角膜基础和临床研究的现状及发展. 中华眼科杂志 2010;46(10):883-887
- 2 赵桂秋,姜楠,胡丽婷,等. 穿透性角膜移植治疗高危真菌性角膜溃疡 51 例. 中国组织工程研究与临床康复 2009;13(18):3597-3600
- 3 Miller VM, Couvion CM, Davidson BL, et al. Targeting alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res* 2004;32(2):661-668
- 4 曹月青,何正波,王中康,等. 丝状真菌基因功能研究的方法. 应用与环境生物学报 2007;13(2):284-288
- 5 刘伟, Gregory S. MAY, Dimitrios P. KONTOYIANNIS, 等. 烟曲霉角鲨烯环氧化酶基因的克隆. 北京大学学报(医学版) 2004;36(5):476-482
- 6 Fortwendel JR, Panepinto JC, Seitz AE, et al. *Aspergillus fumigatus* rasA and rasB regulate the timing and morphology of asexual development. *Fungal Genet Biol* 2004;41(2):129-139
- 7 姚婷婷,王正祥. 黑曲霉原生质体的制备、再生及转化条件. 食品与生物技术学报 2006;25(4):116-120
- 8 白海青,金梅玲,赵桂秋,等. 镰刀菌和曲霉菌性角膜溃疡的组织病理学特点. 中华眼科杂志 2004;40(5):341-343
- 9 Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2005;438(22):1151-1156
- 10 Fortwendel JR, Panepinto JC, Seitz AE, et al. *Aspergillus fumigatus* rasA and rasB regulate the timing and morphology of asexual development. *Fungal Genet Biol* 2004;41(2):129-139
- 11 Kilaru S, Collins CM, Hartley AJ, et al. Elimination of marker genes from transformed filamentous fungi by unselected transient transfection with a Cre-expressing plasmid. *Fungal Genet Biol* 2009;46(10):721-730
- 12 He ZM, Price MS, Obrian GR, et al. Improved protocols for functional analysis in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. *BMC Microbiol* 2007;26(7):104