

T/SPPHN

湖南省植物保护学会团体标准

T/SPPHN 003-2025

远缘杂交和基因组重排技术改良生防微
生物技术规程

Code for evaluation of distant hybridization and genome shuffling technology
in the improvement of biocontrol microorganisms

2025-04-22 发布

2025-04-22 实施

湖南省植物保护学会 发布

前 言

本文件是根据GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第一部分：标准的结构和起草规则》的要求编制而成。

本文件由湖南省植物保护研究所提出。

本文件由湖南省植物保护学会归口。

本文件起草单位为湖南省植物保护研究所、宁波大学、南宁汉和生物科技股份有限公司、湖南新长山农业发展股份有限公司、湖南省农业科学院、云南农业大学、全国农业技术推广服务中心、沈阳农业大学。

本文件主要起草人：刘勇、张德咏、张松柏、张卓、梁承、史晓斌、苏品、罗香文、杜晓华、张宇、葛体达、刘晓艳、余义发、张建华、李凡、刘慧、吴元华。

远缘杂交和基因组重排技术改良生防微生物技术规程

1 范围

本文件规定了远缘杂交和基因组重排技术改良生防微生物技术规程的术语和定义、试剂与试材、仪器与设备等技术要求。

本文件适用于通过人工方法将不同种间属间甚至亲缘关系更远的细胞，通过无性方式融合（合并）成的杂合细胞，并通过对整个微生物基因组的重排选育具有目标性状菌株的新型生防微生物育种技术的规范。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的引用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

DB1302/T 523 《平菇原生质体再生复壮技术规程》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 出发生防微生物菌株

待改良的原始微生物菌株。

3.2 原生质体

脱去细胞壁的植物、真菌或细菌细胞。

3.3 原生质体再生菌株

经过原生质体再生获得的遗传性状稳定的菌株。

3.4 原生质体融合

细胞通过介导和培养，在离体条件下用人工方法将不同的细胞通过无性方式融合（合并）成一个核或多核的杂合细胞。

3.5 融合菌株的选育

从同源融合子、异源融合子以及未发生融合的双亲原生质体中筛选出所需的异源融合子。

3.6 融合菌株的鉴别

根据菌落表型、拮抗试验、核像观察、生物学手段及目标试验等筛选传代稳定的融合子。

3.7 基因组重排技术

基于原生质体融合技术，将原生质体多轮递归融合以增加细胞之间基因的转移频率。

4 试剂与培养基

4.1 1 mol/L Tris-HCl

10.34 g Tris-HCl和4.17 g Tris-OH 溶解在50 mL ddH₂O中（pH值7.8）。

4.2 溶液 A

0.10 g MgCl₂ 和 11.98 g 蔗糖溶于 25 mLddH₂O 中，加入 500 μL 1 mol/L 的 Tris-HCl（pH 值 7.8），并将体积调节至 50 mL。

4.3 溶液 B

0.05 g MgCl₂ 和 13.69 g 蔗糖溶于 25 mL ddH₂O 中，加入 500 μL 1 mol/L 的 Tris-HCl（pH 值 7.8），并将体积调节至 50 mL。

4.4 蔗糖溶液

将 13.69 g 蔗糖溶解在 50 mLddH₂O 中。

4.5 EDTA 溶液

将 0.70 g EDTA-2Na 溶解到 15 mL ddH₂O 中，终浓度为 372.20 g/mol（pH 值 8.0）。

4.6 SMM 缓冲液

34.23 g 蔗糖、0.46 g C₄H₄O₄ 和 0.38 g MgCl₂ 溶解在 100 mLddH₂O 中（pH 值 6.5）。

4.7 PEG 缓冲液

SMM 中包含40%（V/V）PEG6000，10 mmol/L CaCl₂和5%（V/V）DMSO。

4.8 溶菌酶

将 0.015 g 溶菌酶溶解在 3 mLddH₂O 中，终浓度为 5 mg/mL。

注：4.1-4.7 溶液过滤除菌，常温保存，4.8 溶液过滤除菌，-20℃保存。

4.9 Dnase I

市售，-20℃保存。

4.10 LB 液体培养基

细菌培养用胰蛋白胨10 g/L，细菌培养用酵母提取物5 g/L，NaCl 10g/L，高压蒸汽灭菌15 min。

4.11 LB 固体培养基

基础配方同 LB 液体培养基，另加细菌培养用琼脂 8 g/L，高压蒸汽灭菌 15 min。

4.12 LB 高渗培养基

基础配方同LB液体培养基，另加蔗糖0.5 mol/L，高压蒸汽灭菌15 min。

4.13 光合细菌液体培养基

(NH₄)₂SO₄ 0.5 g/L, CH₃COONa 0.5 g/L, K₂HPO₄约1 g/L(根据实际情况将pH值调到7时的用量为准), FeSO₄ 0.05 g/L, H₃BO₄ 0.05 g/L, NaMoO₄ 0.05 g/L, 酵母提取物1.5 g/L，高压蒸汽灭菌30 min。

4.14 光合细菌固体培养基

基础配方同光合细菌液体培养基，另加细菌培养用琼脂13 g/L，高压蒸汽灭菌30 min。

4.15 光合细菌高渗液体培养基

基础配方同光合细菌液体培养基，另加蔗糖0.5 mol/L，高压蒸汽灭菌15 min。

4.16 光合细菌软琼脂培养基

基础配方同光合细菌液体培养基，另加细菌培养用琼脂8g/L和蔗糖0.5 mol/L，高压蒸汽灭菌15 min后加灭活小牛血清200 ml/L。

5 仪器与设备

超净工作台、高压灭菌锅、恒温培养箱、冰箱、超低温冰箱、恒温摇床、台式冷冻离心机、光学显微镜、电子显微镜、紫外分光光度计、pH计、PCR仪、凝胶成像系统。

6 出发菌株

沼泽红假单胞菌 PSB-06由湖南省植物保护研究所分离、鉴定、保存。纯培养物接种于光合细菌生长培养基中，厌氧光照培养，光照强度1 500 lx，温度32℃，培养至OD₆₆₀为 0.9-1.0；苏云金芽孢杆菌 KY-2由湖南省植物保护研究所分离、鉴定、保存。纯培养物接种于LB液体培养基中，30℃振荡培养到OD₆₀₀为0.9~1.0。

7 原生质体的制备

7.1 沼泽红假单胞菌 PSB-06 原生质体的制备

取对数生长期的 PSB-06 纯培养物按 1:10 的比例稀释到30 mL 含有终浓度60 μg/mL 的头孢噻肟钠光合细菌液体培养基中，37℃振荡培养 2.0 h，2 500 r/min 4℃离心4 min弃上清，回收菌体。轻轻加

入 1 mL 0.8 mol/L 的蔗糖，孵育 1 min，清洗菌体。弃上清液，操作过程中不要干扰到菌体。将 150 μ L 的 1 mol/L Tris-Cl、120 μ L 的 5 mg/mL 溶菌酶和 120 μ L 的 0.125 mol/L EDTA 依次加入到单细胞丝中，室温孵育 10 min。向上述溶液中慢慢加入 1 mL 溶液 A，时间要超过 1 min，同时用手轻轻旋转溶液，室温下孵育 4 min。再缓慢加入 7 mL 4°C 的溶液 B，2 500 r/min 4°C 离心 4 min。小心地除去所有上清，沉淀重悬于 1 mL 光合细菌高渗培养基中。在 10×100 倍油镜（根据微生物大小选择相应的显微镜）下观察样品原生质体的形成过程。将一定量菌体稀释在蒸馏水中裂解原生质体，然后在光合细菌固体培养基上连续稀释，统计未形成原生质体的菌体产生的菌落，以此计算原生质体的形成效率。

7.2 芽孢杆菌 KY-1 原生质体的制备

将 OD₆₀₀≈1.0 的芽孢杆菌菌悬浮液 30 mL 5 000 r/min 4°C 离心 10 min，去上清。将菌体重悬在 30 mL SMM 缓冲液中，并加入终浓度 1 mg/mL 的溶菌酶，100 r/min，37°C 震荡培养 1 h。5 000 r/min 4°C 离心 10 min，去上清，沉淀重悬于 1 mL LB 高渗培养基中。在 10×100 倍油镜下观察原生质体的形成过程。将一定量菌体稀释在蒸馏水中裂解原生质体，然后在 LB 固体培养基上连续稀释，统计未形成原生质体的菌体产生的菌落，以此计算原生质体的形成效率。

7.3 原生质体的融合和再生

分别取 0.5 mL 制备成功的 PSB-06 和 KY-2 原生质体，混合后加入 1 U 的 DNase I 消解因菌体裂解而释放的 DNA，从而防止在原生质体形成过程中因吸收裂解菌体释放的 DNA 而产生的转化。将上述混合液在 25°C 下孵育 10 min，3 500 r/min 4°C 离心 20 min，重悬在 0.5 mL PEG 缓冲液中。继续在 25°C 下孵育 5~20 min 后，加入 1 mL SMM 缓冲液，3 500 r/min 4°C 离心 20 min。融合完成后，立即加入 5 倍体积的 SMM 缓冲液稀释、离心、洗涤菌体 2 次。将菌体重悬在光合细菌高渗液体培养基中，梯度稀释后涂布于光合细菌软琼脂培养基上再生。PCR 扩增菌体的 16S rDNA，测序，以鉴定出融合子，然后进行传代培养得到融合菌种。

7.4 基因组重排技术进一步改良融合菌株

7.4.1 融合菌株原生质体的制备

分别取上述融合菌株作为出发菌株，调整浓度为 1×10^6 cell/mL，用终浓度 60 μ g/mL 头孢噻肟钠和使用终浓度为 1.2 mg/mL 溶菌酶处理，室温孵育后离心获得融合菌株原生质体。

7.4.2 融合菌株原生质体灭活

融合菌株随机分为 A、B 两大组。

A 组进行紫外线灭活：融合菌株的原生质体移入 6 cm 的无菌平皿中，于 30 W 的紫外灯下，照射 115 s，原生质体的致死率达 100%。B 组进行菌株热灭活：60°C 恒温水浴中处理 5 min，原生质体的致死率达 100%。

7.4.3 灭活后的融合菌株递归原生质体融合

取等体积上述灭活的两组原生质体混匀，25°C 孵育 30 min，4 000 r/min 4°C 离心 20 min，重悬于 40% (V/V) PEG 6000 和 SMM 缓冲液中进行随机融合。4 000 r/min 4°C 离心后，SMM 溶液洗涤菌体。光合细菌高渗液体培养基重悬后于 30°C 光合细菌软琼脂培养基上再生培养 7~14 d，收集全部再生菌落即为 F₁ 代融合子菌群；然后再将其作为出发菌株，灭活后再融合、再生，所得再生菌株为第二轮融合子菌群，即 F₂ 代。如此反复进行几轮循环原生质体融合、再生，不同融合子代标记为 F₁、F₂、F₃ 等。

7.4.4 目标融合子菌群的鉴定及筛选

挑选融合子菌群中长势较好的菌株16S rDNA，测序及目标筛选试验如促生、抗病等等。

全国团体标准信息平台