

NTG 对庆丰链霉菌诱发产生营养缺陷型突变体的研究

赵人俊 张益棻 郑幼霞

(中国科学院上海植物生理研究所)

我们为了对庆丰链霉菌的遗传研究准备实验材料,应用效果显著的化学诱变剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NTG),对庆丰链霉菌进行诱变处理,筛选各种不同遗传标记的营养缺陷型突变体,并分析了这些变种类型的分布和突变机理。现将我们的研究结果报告如下:

材料与方 法

(一) 诱变出发菌株

1. 庆丰链霉菌 M15 (*Streptomyces qingfengmyceticus* M15),由野生型菌株经一系列诱变处理得到的高产突变株。

2. Q-100,由野生型菌株经高温处理所得到的丧失庆丰霉素生物合成能力的突变株。

(二) 培养基

1. 完全培养基 (CM) 和基本培养基 (GA) 均参照以前的报道^[1],根据实验需要,另外添加补充物。补充物的浓度参照 Sermonti^[8]。

2. 富集摇瓶培养基 (MM)

MM-1 培养基用于 M15 菌株,葡萄糖 10 克, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 克, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 克, NaCl 1 克, CaCO_3 3 克,蒸馏水 1,000 毫升。pH7.2—7.4。

MM-2 培养基用于 Q-100 菌株,甘油 12.5 克,天门冬酰胺 1 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 克, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 毫克, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 毫克, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 毫克, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 毫克, NaCl 1 克, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 克,蒸馏水 1,000 毫升。pH7.2—7.4。

(三) NTG 诱变处理

将培养成熟的斜面孢子,用含 0.05% 吐温 80 的生理盐水洗下,悬浮于装有玻璃珠的无菌小三角瓶中,经旋转式摇床振荡 30 分钟,使孢子均匀分散,然后用四层无菌纱布过滤,以除去菌丝体及孢子团,即得孢子悬浮液,供诱变处理使用。

称取 NTG 晶体(瑞士产品),溶解在适量的 Tris 缓冲液 (pH9.0) 中,再用移液管加入等量的孢子悬浮液,使其达到诱变处理所需要的浓度,而后置于 28°C 培养室中的旋转式或往复式摇床上振荡处理。将处理过的孢子悬浮液,经适当稀释后涂布在补充有水解酪素、嘌呤嘧啶混合物及各种维生素混合物的 CM 平板上。未作诱变处理的孢子悬浮液,亦经适当稀释涂布于 CM 平板上作为对照。28°C 培养 7 天后,检查菌落数,并计算致死率。同时,在 NTG 处理过的菌落中筛选营养缺陷型突变体。

(四) 营养缺陷型突变体的性状鉴定

挑取经 NTG 处理过的单菌,依次点种到事先经过 50°C 温箱烘烤 30 分钟的 CM 和 GA 培养基平板上,每皿点种 45 个。28°C 培养 5—7 天后,选取在 GA 平板上不生长、而 CM 平板上能够正常生长的菌落,再点种在 CM 上制成母平板,28°C 培养后,用丝绒影印法复印到分别补充有水解酪素、嘌呤嘧啶混合物和各种

Zhao Renjun et al.: Studies on Mutagenesis of Auxotrophic Mutants of *Streptomyces qingfengmyceticus* by NTG

维生素混合物的 GA 平板上。这样,就将突变体分类成氨基酸缺陷型、嘌呤嘧啶缺陷型、维生素缺陷型或其它。为了确定每一个突变体的营养要求,我们采用了生长谱法^[8]。应用这个方法可以同时鉴定出单一缺陷或某一些双重缺陷的突变体。

(五) 过滤富集法

经过 NTG 诱变处理的孢子悬浮液,离心,倾去上清液,将孢子洗入富集摇瓶培养液中振荡培养。待到肉眼能观察到菌丝体形成后,每隔 24 小时过滤一次,除去生长的原养型菌丝体,并将滤过液离心,孢子重新悬浮于新鲜培养液中,以避免原养型菌丝体生长时所产生的代谢物引起缺陷型孢子的萌发。如此重复数次后,涂布平板,按上法筛选突变体。

结果和讨论

(一) 影响 NTG 诱变效果的因子

我们对 NTG 诱发庆丰链霉菌 M15 菌株产生营养缺陷型突变进行了研究,表 1 结果表明,随着 NTG 浓度的增加及处理时间的延长,突变率有相应的提高。处理时间 60 分钟,NTG 浓度为 3.0 毫克/毫升时,突变率为 0.5% 左右,2.0 毫克/毫升时只有 0.1% 左右,而 1.0 毫克/毫升时,在试验过的 540 个菌落中,没有检测到突变体。pH 则以 9.0 为宜(表 2)。这是 NTG

表 1 NTG 剂量及处理时间对诱变作用的影响

剂量(毫克/毫升)	处理时间(分)	致死率(%)	试验菌落数	突变体数	诱变率(%)
3	60	99.79	2385	10	0.416
3	30	96.54	2173	5	0.230
2	60	98.90	1350	2	0.146
2	30	90.09	1215	0	0
1	60	96.83	540	0	0

表 2 pH 值对诱变作用的影响

剂量(毫克/毫升)	处理时间(分)	pH 值	致死率(%)	试验菌落数	突变体数	诱变率(%)
3	60	9.0	99.52	720	4	0.55
3	30	9.0	92.70	495	2	0.40
3	60	6.0	99.16	720	2	0.28
3	30	6.0	93.75	630	1	0.16

表 3 培养时间对富集效果的影响

试验菌株	培养天数	试验菌落数	突变体数	频率(%)	效率(倍)
M15 ¹⁾	0	720	4	0.55	—
	3	883	19	2.17	3.9
	4	405	37	9.13	16.6
	5	180	8	4.44	8.0
Q-100 ²⁾	0 ³⁾	791	3	0.38	—
	4	1293	61	4.71	12.4
	6	225	0	0	0

1) NTG 剂量 3 毫克/毫升,处理 1 小时, pH9.0;

2) NTG 剂量 3 毫克/毫升,处理 0.5 小时, pH9.0;

3) NTG 3 毫克/毫升,处理 1 小时, pH9.0。

表 4 NTG 诱发的营养缺陷类型的分布

营养缺陷型类别	M15 突变体数	Q-100 突变体数	合计
氨基酸缺陷型	62	21	83
组氨酸	15	2	17
亮氨酸	5	3	8
赖氨酸	6	3	9
甲硫氨酸	16	7	23
脯氨酸	6	3	9
其他	14	3	17
嘌呤嘧啶缺陷型	13	23	36
维生素缺陷型	1	1	2

在碱性条件下,形成重氮甲烷(diazomethane, CH₂N₂),对 DNA 起烷化作用^[3]所致。

(二) 过滤富集法

我们对 M15 和 Q-100 两个菌株经 NTG 处理后,应用过滤富集法收到了满意的效果。表 3 说明它对于提高筛选营养缺陷型突变体的效率是一种行之有效的方法。M15 菌株由未经富集培养的 0.55%,提高到经过 4 天富集培养的 9.13%,提高效率 16.6 倍;Q-100 菌株由原来的 0.38%,提高到 4.71%,经过 4 天的富集培养,提高效率 12.4 倍。诱变处理后经过富集培养,达到了一次诱变处理可以得到较多的营养缺陷型突变体,并且所得突变体的品种类型也由于挑得突变体的机率增加,而相应地增多。

(三) NTG 诱发的营养缺陷类型的分布

以 NTG 处理庆丰链霉菌所得到的营养缺陷型突变体,经过生长谱法鉴定,已经判明性状的有 121 株,其中由 M15 菌株诱变获得 76 株,

由 Q-100 菌株诱变获得 45 株(表 4)。它们大部分为氨基酸缺陷型,占 68.6%,其余为嘌呤嘧啶缺陷型(占 29.8%)和维生素缺陷型(占 1.6%)。在氨基酸缺陷型中,甲硫氨酸及组氨酸缺陷型的比例较高,似乎 NTG 对于这两个基因位点的作用有一定的专一性,表现出类似于“热点”的现象^[2,5]。

NTG 一次处理所诱发的营养缺陷型突变,大多数为单一缺陷,同时我们也鉴别出少量双重缺陷突变体。如同时需要补充甲硫氨酸、苏氨酸(Mth⁻)或异亮氨酸,缬氨酸(Ilv⁻),这说明 NTG 可以一次引起两个基因位点的突变,也可能是 NTG 诱发的点突变阻断了这两对氨基酸代谢途径分叉点共同前体的合成。

(四) NTG 诱发的突变为染色体点突变

为了测定 NTG 对庆丰链霉菌诱发的缺陷型突变是否为点突变,我们随意挑选了一些缺陷突变体来测定自发回复突变率,结果如表 5 所示。一般回复突变频率范围在 10^{-7} — 10^{-10} 之间。由此我们相信,所测定的那些突变体的营养缺陷是点突变的结果。而 A201 (Ilv⁻) 及 A249 (Mth⁻) 回复突变频率的数据表明,这两个氨基酸双重缺陷突变体,不论选择那一个缺陷标记的回复,都只能出现原养型回复突变体。我们推测,这两个双缺陷突变体,很可能是 NTG 诱发的点突变分别阻断了异亮氨酸-缬氨酸、苏氨酸-甲硫氨酸这两对氨基酸代谢途径分叉点

共同前体合成的缘故^[4,6,7]。

表 5 营养缺陷型突变体的自发回复突变率

菌株号	出发菌株	缺陷标记	试验孢子数	自发回复菌落数	回复突变率
A54	Q-100	Met ⁻	2.0×10^7	6	3.0×10^{-7}
A69	Q-100	Ura ⁻	6.8×10^7	7	1.0×10^{-7}
A82	Q-100	Cys ⁻	3.1×10^8	16	5.2×10^{-8}
A177	M15	Thr ⁻	2.2×10^9	267	1.2×10^{-7}
A201	M15	Ilv ⁻	4.5×10^8	Ile 40 Val 60	8.9×10^{-8} 1.3×10^{-7}
A249	M15	Mth ⁻	1.1×10^9 1.1×10^9	Met 2 Thr 3	1.8×10^{-9} 2.7×10^{-9}
A289	M15	Tyr ⁻	1.3×10^{10}	9	6.8×10^{-10}
A544	Q-100	Pro ⁻	1.9×10^8	53	2.7×10^{-7}

参 考 文 献

- [1] 郑幼霞等: 1980. 遗传学报, 7(2):111—118.
- [2] Benzer, S.: 1961. *Proceedings of the Nature Academy of Sciences of the USA*, 47(3): 403—405.
- [3] Cerda-olmeds and E. Hanawalt: 1968. *MGG*, 101: 191—202.
- [4] Gottschalk, G.: 1979. *Bacterial Metabolism*, New York, Springer-Verlag, pp. 143—155.
- [5] Ishikawa, T.: 1962. *Genetics*, 47(9): 1147—1161.
- [6] Radhkrishnan, A. N. and E. E. Senn: 1960. *Journal of Biological Chemistry*, 235(8): 2316—2321.
- [7] Ramakrishnan, T. and E. A. Adelberg: 1965. *Journal of Bacteriology*, 89(3): 654—660.
- [8] Sermoniti, G.: 1969. *Genetics of Antibiotic-producing Microorganisms*, London: Wiley-Interscience, pp. 55—72.