

大腸桿菌 K12 的甲硫氨酸缺陷型 在微生物測定中的应用

陈 中 孚*

(复旦大学遗传学研究所)

甲硫氨酸是人体必需的氨基酸之一,也是一种治疗肝炎和解毒的藥物。这类氨基酸的簡捷、灵敏而专一的定量測定方法有生产上的实践意义。

高俊德等^[1,2] (1956, 1958)曾将原来用于測定維生素 B₁₂ 的大腸杆菌变种 44110—1 来进行甲硫氨酸的測定,但由于这个变种在营养要求上专一性不高,所以对維生素 B₁₂ 和甲硫氨酸的測定來說都不是最理想的材料。本文所报导的是应用大腸杆菌另一变种来进行甲硫氨酸微生物測定的实验結果。

一、材料与方 法

菌株 *E. coli* K12M⁻1—10, 这个菌株是从經過紫外綫处理并参照 Davis^[3] (1949) 的青霉素篩选方法而从大腸杆菌 K12 中得到的一个营养缺陷型。它的自发回复突变型的頻度非常低($<10^{-10}$)。实验証明在液体培养基中加入維生素 B₁₂ (每毫升中加入 0.4 微克, 0.04 微克)、对氨基苯丙酸 (10 微克/10 毫升)、胱氨酸 (500 微克/10 毫升)、硫代甘醇鈉 (1 毫克/10 毫升)、硫代硫酸鈉 (3 毫克/10 毫升) 等与甲硫氨酸代謝密切有关的物質对定量測定的結果沒有影响。应用生长譜方法还証实除甲硫氨酸外的其他氨基酸对这个菌株的生长也沒有影响。这些特性符合于甲硫氨酸生物測定的要求。

培养基 定量比浊及杯碟法所用的培养基配成 50 倍于实际所用的浓度保存于冰箱中,其中成分是 NaNH₄HPO₄ · H₂O 17.5 克; K₂HPO₄ 50 克; 柠檬酸 10 克; MgSO₄ · 7H₂O 1 克; 加蒸餾水至 100 毫升^[4]。配制定量比浊測定甲硫氨酸的培养基时,先将上述溶液稀释 25 倍,配成 2 倍浓度的培养液;另配 5% 的葡萄糖溶液及蒸餾水,分別消毒。配制杯碟法所用的培养基时,将上述溶液稀释 50 倍,加入葡萄糖至最后浓度为 0.5%,每 100 毫升中加入琼脂 2 克。高压灭菌条件为 8 磅 15 分钟。

菌种保存于冰箱中的完全培养基斜面上,完全培养基的成分为:上述杯碟法測定用的培养基中另加水解蛋白素 0.5% 和酵母浸出汁 0.2%。

測定方法 定量比浊以及标准曲綫的繪制方法均参照高俊德等 (1958)^[1]。定量比浊測定是在 Klett-Summerson 光电比色計上进行的,所用的 42 号滤色片的光譜范围約在 400—465 毫微米之間。杯碟法測定和校正方法同一般維生素 B₁₂ 的測定方法^[1]。文中所列的均为代表性数据,所有实验均重复了三次以上。

本文 1962 年 8 月 22 日收到。

* 蒙盛祖嘉教授热情指导,敬致謝意。

所测定的药品有 *L*-甲硫氨酸 (*L*-Methionine, Finomvegyszergyár Budapest-Hungary), 蛋氨酸(即甲硫氨酸)注射液(地方国营北京市制药厂,批号 600623, 检号 69, 原标定量为 0.05 克/2 毫升), 水解蛋白素(公私合营上海生化制药厂,批号 591021)。

二、实验结果

(一) 甲硫氨酸的标准曲线。

定量比浊所测得的 *L*-甲硫氨酸的标准曲线见图 1;

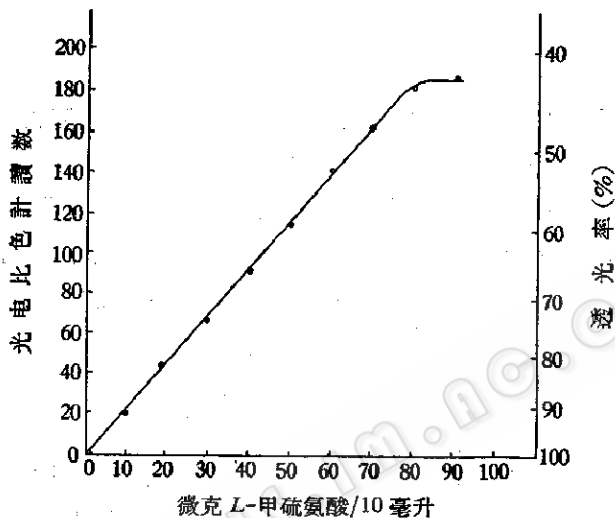


图 1 用比浊法测得甲硫氨酸的标准曲线(曲线经目测繪得)

(二) 以蛋氨酸注射液为样品,用比浊法测定其中 *L*-甲硫氨酸的含量,结果见表 1。

表 1 蛋氨酸注射液中 *L*-甲硫氨酸含量测定的结果

样 品 稀 释 倍 数	大 肠 杆 菌 的 生 长 情 形		测得 <i>L</i> -甲硫氨酸的含量 (微克/10 毫升)
	讀 数	透 光 率	
250	192	41.5	> 80.0
500	118.0	58.3	51.0
1000	58.0	76.5	25.0
2000	30.0	87.3	13.0

将表 1 所测得之结果分别乘上稀释倍数, 算出原来蛋氨酸注射液中 *L*-甲硫氨酸含量为: 51.0, 50.0, 52.0 毫克/2 毫升, 平均为 51.0 毫克/2 毫升。三种稀释所测得之误差范围为 $\pm 1.96\%$ 。所测得的结果为原标定量的 102.0%。

(三) 在样品中加入一定量 *L*-甲硫氨酸的回收试验结果, 见表 2。

表 2 甲硫氨酸标准品的回收试验(比浊法)

每管中加入已经稀释 1000 倍的蛋氨酸注射 液样品溶液(毫升)	加入 <i>L</i> -甲硫氨酸 (微克)	大肠杆菌的生长情形		测得 <i>L</i> -甲硫氨酸 总含量 (微克)	回 收 率 (%)
		讀 数	透 光 率		
1	0.00	58.0	76.6	25.0	
1	20.0	106.0	61.4	46.0	102.2
1	40.0	148.0	50.5	64.0	98.5

从表 2 結果来看,标准品的回收率在 $\pm 2.2\%$ 以内。

(四) 一般在測定有色天然物質中的甲硫氨酸含量时用比浊法比較不方便。在这种情况下可以应用灵敏度較差的杯碟法来进行甲硫氨酸的測定,图 2 为經校正后的标准曲綫。

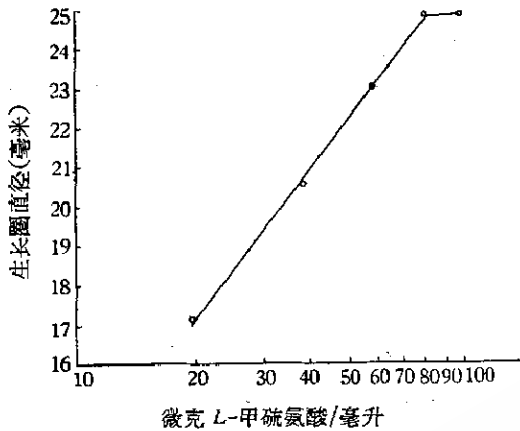


图 2 用杯碟法測定 L-甲硫氨酸的标准曲綫
(曲綫的直綫部分用迴归方程式計算求得)

(五) 蛋氨酸注射液、水解蛋白素中 L-甲硫氨酸含量的測定結果,見表 3。

表 3 蛋氨酸注射液、水解蛋白素中 L-甲硫氨酸含量的測定結果

測定样品	稀 释 倍 数	生长圈直径 (毫米)	测得 L-甲硫氨酸 的含量(微克)	原来样品中 L-甲硫氨酸的含量
甲硫氨酸注射液	500 倍	22.2	51.05	51.05 毫克/2 毫升
	250 倍	25.0	>80.0	
水 解 蛋 白 素	40 毫克/毫升	19.5	31.45	0.786 毫克/克水解蛋白素
	80 毫克/毫升	23.6	62.00	0.775 毫克/克水解蛋白素

(六) 在蛋氨酸注射液中加入一定量的 L-甲硫氨酸的回收試驗結果,見表 4。

表 4 甲硫氨酸标准品的回收試驗(杯碟法)

蛋氨酸注射液的 稀释倍数	加入 L-甲硫氨酸結晶, 使其中加入的标准品最 后浓度为 (微克/毫升)	生长圈直径 (毫米)	测得 L-甲硫氨酸总 含量(微克/毫升)	回 收 率 (%)
500	—	22.2	51.05	94.8
500	20	23.9	70.0	
500	40	24.7	>80.0	

三、討 論

可以作为微生物測定的菌株很多,但是应用营养要求簡單的大腸杆菌来进行微生物測定有不少可取之处,特别是可以通过一定的选择方法^[3]就能很容易选得所期望的生化缺陷型来进行微生物測定。

比浊法中当每毫升中 L-甲硫氨酸的含量相差 1 微克时比色計上的讀数相差 20 格左

右。实验中同一浓度培养物的读数相差在 3 格左右,如果以相差 4 格计算,那么可测的最低浓度为 0.2 微克/毫升。在比色计中 5 毫升的溶液即能测定,所以比浊法测定范围是在 1—40 微克/5 毫升。

四、摘 要

通过紫外线照射和青霉素处理,从 *E. coli* K12 中获得了一个甲硫氨酸营养缺陷型 M⁻1—10。作为生物测定的材料,这一突变型的特点是遗传性稳定,营养要求专一,特别是对于维生素 B₁₂ 没有反应。甲硫氨酸的测定范围为 1—40 γ /5 毫升,杯碟法的测定范围为 20—80 微克/毫升。定量测定的误差都在 $\pm 5\%$ 范围以内。

参 考 文 献

- [1] 高俊德等:大肠菌变种 44110—1 用于蛋氨酸微生物测定法的研究,微生物学报,6: 182—185, 1958。
- [2] 高俊德等:大肠菌变种用于维生素 B₁₂ 微生物测定的研究,药学报,4: 209—215, 1956。
- [3] Davis, B. D.: The isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by means of penicillin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 35: 1—10, 1949.
- [4] Vogel, H. J., and Bonner, D. M.: A convenient growth medium for *E. coli* and some other microorganisms (medium E.), *Microbiol. Genetics Bulletin* 13: 43—44, 1956.

MICROBIOLOGICAL ASSAY OF METHIONINE BY MEANS OF A MUTANT OF *E. COLI* K12

CHEN CHUNG-FU

(Institute of Genetics, Fudan University)

A methionine-requiring mutant M⁻1—10 was obtained from *E. coli* K12 through ultraviolet irradiation followed by penicillin treatment. The merit of this mutant in microbiological assay was found to be its genetic stability and high specificity in nutrient requirement, especially shown by its lack of reaction towards vitamin B₁₂. The range for methionine assay is 1—40 micrograms/5 ml. in turbidimetrical method, and 20—80 micrograms/ml. in agar diffusion method, the error of quantitative determination being all within the range of $\pm 5\%$.