

羟胺对粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 的诱变效应*

蔡金科 唐国敏

(中国科学院微生物研究所, 北京)

羟胺 (HA) 引起 *S. pombe* 的失活作用因菌株而异, 实验用两株突变体的失活曲线皆非指数曲线。钠离子对 HA 所处理的细胞不仅没有保护作用, 反而会引起细胞损伤。HA 的两种独立的效应——失活与诱变效应在以 *S. pombe* 为材料的实验里没有观察到。相反, 低浓度 HA (0.01M) 既能引起 *S. pombe* 细胞失活, 又有诱变作用。

HA 对 4 类 19 株 NA-生化突变体的回复诱变材料证明: 有些 NA-生化突变体的突变位点之碱基对为 GC, 另外一些突变体目前则尚难确定, 有待进一步确证。HA 同样诱发 *S. pombe* 野生型菌株产生大量正向突变体。因而它可供作选育生产菌株的诱变剂。

Freese 等首先证明羟胺 (HA) 对噬菌体是一种有效的诱变剂^[1], 他们认为 HA 对 T₄ 噬菌体的诱变作用是由于 HA 对遗传物质 DNA 的 C 的作用而引起的。Schuster 报道 HA 使 TMV 病毒变异的原因是 HA 脱掉 RNA 的 U 及引起 C 的改变^[2]。HA 只引起碱基对转位, 并主要使 $\frac{G}{C} \rightarrow \frac{A}{T}$ ^[3]。故为研究化学诱变分子机制理论的依据之一。

Freese 等发现 HA 对 T₄ 噬菌体有两种独立的效应——失活与诱变作用。其中钠离子的浓度对 HA 所引起的失活作用起着重要影响^[1]。

HA 对动物病毒^[4]、TMV^[2,5]、ΦX-174^[6,7] 的诱变作用已有报道, 对真菌尚未有报告。本文研究了 HA 对粟酒裂殖酵母的诱变与失活作用, 为真菌选育及化学诱变机制研究提供方法及依据。

材料与方 法

1. 菌株

供回复诱变试验用的菌株为 NA-生化突变体¹⁾, 共四类 19 株。其中胆碱缺陷型 7 株; 对氨基苯甲酸缺陷型 2 株; 甲硫氨酸缺陷型 3 株; 腺嘌呤缺陷型 7 株。

供正向诱变试验用的菌株是文献[8]用的实验菌株 AS 2.537-sp. 1 号。

2. 培养基

1) 最低培养基 使用 Schopfer 等^[9]的合成培养基, 组成如下:

葡萄糖	10克	KH ₂ PO ₄	2克
-----	-----	---------------------------------	----

*本文经相望年先生审阅, 并提出了宝贵意见, 敬致谢意。

刘慧平同志参加实验工作。

本文用下述简写: TMV-烟草花叶病毒; G-鸟嘌呤、A-腺嘌呤、C-胞嘧啶、T-胸腺嘧啶、U-尿嘧啶、HA-羟胺 NA-亚硝酸、DNA-脱氧核糖核酸、RNA-核糖核酸。

1) NA-生化突变体——用亚硝酸处理野生型 2.537-sp. 1 号所获得的生化突变体 (详见文献[8])。

本文 1965 年 10 月 21 日收到。

天冬素 2 克 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 克
 $(NH_4)_2SO_4$ 2 克 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.25 克
 泛酸 1 毫克 烟酸 1 毫克
 吡哆醇 1 毫克(可不加) 环己六醇 1 毫克
 硫胺素 1 毫克(可不加) 生物素 1 微克
 水解酪素 1 克(可略去不用)
 水洗洋菜 15 克
 蒸馏水加至 1000 毫升

2) 基础培养基 即从 Schopfer 等的合成培养基中除去维生素, 只用无机盐加天冬素及葡萄糖配成。供测定菌株前培养用。

3) 完全培养基 配法见文献[8]。供筛选变体用。

3. HA 诱变处理方法

1) 回复诱变及失活作用 将在麦芽汁斜面上培养 24 小时的培养物用铂金环移入生理盐水(0.85% w/v)中, 离心, 水洗, 然后用生理盐水做成细胞悬液, 置 30℃ 过夜(约 15 小时), 取出离心, 水洗, 供实验用。实验时将上述静息细胞用 pH 7.5 的水做成细胞悬液, 用血球计计数, 控制最后细胞数目在 1×10^8 个细胞/毫升左右。处理液按下列组合配成:

HA 液 ¹⁾ (pH7.5)	8 毫升
菌液	2 毫升
温度(水浴)	30℃

处理液最终 HA 浓度为 1M, 当实验到达一定时间时, 立即取样用冰水稀释, 离心水洗两次, 用生理盐水做成菌液, 对照菌除不加 HA 外, 其它步骤皆同。

2) 正向诱变 取培养 24 小时的培养物—铂金环于液体最低培养基内(200 毫升锥形瓶盛 25 毫升培养液), 28℃ 摇床培养约 40 小时, 离心水洗, 最后用 pH 7.5 的水做成菌悬液, 按上述步骤用 1M HA 处理 4 小时, 离心水洗, 然后将菌细胞再接入液体最低培养基中, 28℃ 摇床培养 6 小时, 以使其表型显现。再离心水洗两次, 用生理盐水做成菌悬液备用。

4. HA 诱变效应的观察

1) HA 对 *S. pombe* 失活作用的测定 方法见文献[8]。

2) 回复诱变菌株的观察测定 处理后的培养物与定量固体最低合成培养基混合均匀, 取 5

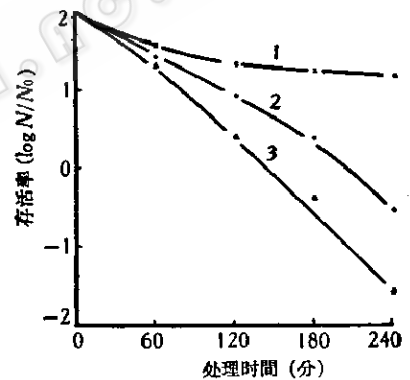
毫升涂敷在每个最低合成培养基平皿上, 30℃ 培养 5—7 天, 计算菌落, 并挑出进行测定, 在最低培养液内生长者即为回复突变体(测定方法见文献[8])。

3) 正向诱变作用的观察测定 取处理后的菌悬液 0.1 毫升, 在缺环己六醇的最低培养基表面均匀涂布, 置 30℃ 培养 7—10 天。然后在平皿上点加完全培养液, 待扩散后移置 30℃ 保温箱内培养。菌落形成后, 用影印法复制, 挑选出可能变异的菌株, 然后按文献[8]方法测定。

结 果

1. HA 对粟酒裂殖酵母的失活作用

HA 对粟酒裂殖酵母的失活作用如图 1 所示。高浓度 HA(1M)引起的细胞失活



1. 0.01M HA pH7.5 菌株: NA-175-1 号

2. 1.0M HA pH7.5 菌株: NA-183-2 号

3. 1.0M HA pH7.5 菌株: NA-175-1 号

图1 羟胺(HA)对粟酒裂殖酵母的失活作用

率比低浓度 HA(0.01M)引起的要强得多。同时 HA 对粟酒裂殖酵母来自同一野生型的不同生化突变体的失活率不同, 说明它们对 HA 的抗性有很大的差异。NA-183-2 号突变体(需胆碱)对 HA 抗性大, 存活曲

1) HA 液 2.5M $NH_4OH \cdot HCl$ + 2M NaOH, 溶解后一般立刻使用, 冰箱保存不得超过 1 周。实验前按以下配法制备处理液——取 5 毫升 HA 液加入 2 毫升 0.38M Na_2HPO_4 , 0.2 毫升 0.1M $MgSO_4$, 用 NaOH 中和至 pH 7.5, 加水达 10 毫升, 按此配法 HA 最终浓度为 1.25M。

线在开始 3 小时内呈指数曲线, 以后迅速直线下降形成折线。而 NA-175-1 号突变体(需腺嘌呤)对 HA 抗性小, 存活曲线呈双击型, 在低浓度 HA 作用下, 存活曲线在开始 1 小时内下降迅速, 以后下降渐缓。这与 Freese 等用噬菌体为材料的实验结果不相符合^[1]。为了进一步查明他们提出的对噬菌体的“HA 的两种独立的效应”规律是否也适用于粟酒裂殖酵母, 我们进行了如下实验: 对照组为不同浓度的 HA 处理菌细胞, 实验组除 HA 浓度与对照组相同外, 还将其钠离子浓度调节到 1.3M, 所得结果列于图 2。实验结果指出, 在两组实验里,

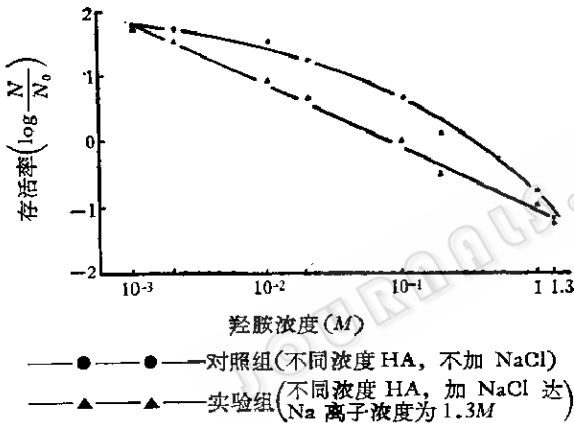


图2 不同浓度羟胺(HA)对粟酒裂殖酵母 NA-175-1 号突变体的失活作用

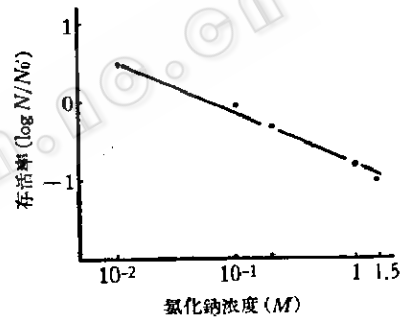
HA 对粟酒裂殖酵母的失活作用随其浓度增高而加强, 显然看不出用 DNA^[10,11]、噬菌体^[2]及细菌^[12]为实验材料时所显示的, 低浓度 HA 比高浓度 HA 引起的失活作用较强的现象。Freese 等认为钠离子对 HA 处理细胞有保护作用^[14]。在我们的实验中, 加氯化钠的实验组其细胞失活率反而增强。为进一步查明在 HA 引起粟酒裂殖酵母失活过程中, 钠离子所起的影响, 进行了如下实验: 将 *S. pombe* 细胞用含有不同浓度钠离子与等浓度 HA 的混合液(0.01M, Freese 等认为在该浓度时, 噬菌体失活率最高)于 30℃ 处理一定时间, 测定各存活

率以资比较, 结果列于表 1 及图 3。

表1 钠离子对 HA引起粟酒裂殖酵母失活过程的影响

HA浓度(M)	加入的 Na 离子浓度(M)	存活率* (log N/N_0)
0.01	0.00	0.50
0.01	0.01	0.50
0.01	0.1	-0.02
0.01	0.5	-0.30
0.01	1.0	-0.75
0.01	1.5	-0.99
—	0.5	1.52
—	1.5	-0.10
—	—	2.00

* 实验数据为六次实验的平均值。



(HA 浓度为 0.01M, pH 7.5, 温度 30℃, 处理 4 小时)

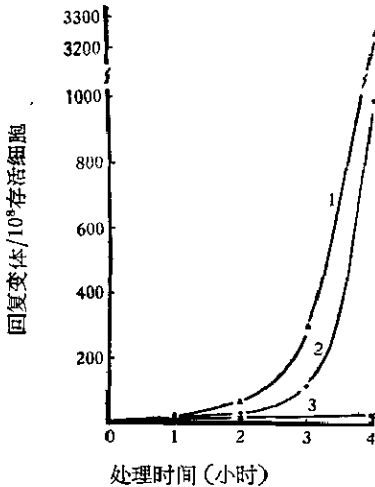
图3 不同浓度钠离子对HA引起 NA-175-1 号突变体失活过程的影响

钠离子对 HA 导致粟酒裂殖酵母的失活作用有很大影响, 等浓度 HA 液中加入不同浓度氯化钠引起的失活率不一样。发现失活作用与加入的氯化钠浓度成比例关系(图 3)。实验进一步指出, 钠离子本身能引起细胞的生理损伤而致死(表 1)。因此可以得出这样的结论: 在 HA 引起 *S. pombe* 的失活过程中, 钠离子的浓度有很大影响, 处理细胞的失活率与 HA 浓度成正比关系, 并随钠离子浓度的增高而加强。

2. HA 对粟酒裂殖酵母的诱变作用

1) HA 对粟酒裂殖酵母 NA-生化突变体的回复诱变。NA-生化突变体的静息

单元细胞用 HA 处理,经一定时间取样,并立刻在最低培养基上涂布,置 30℃ 培养 4—5 天。由平板上挑出菌落,按文献[8]方法进行测定,实验结果如图 4 所示。



1. 1.0M HA, pH 7.5 菌株 NA-175-1 号
2. 1.0M HA, pH 7.5 菌株 NA-183-2 号
3. 0.01M HA, pH 7.5 菌株 NA-175-1 号
图 4 羟胺(HA)对粟酒裂殖酵母的诱变作用

图 4 所示高浓度 HA(1M)对粟酒裂殖酵母的回复诱变频率不呈直线关系。HA 对两株不同类型突变体的诱变频率不一致,对 HA 抗性强的 NA-183-2 号突变体的诱变频率低于抗性弱的 NA-175-1 号突变体。两株突变体在处理 4 小时之后诱变频率仍有继续增高之势。低浓度 HA(0.01M)的诱变作用虽然甚低,但在实验条件下仍可查觉,其诱变频率与处理时间呈直线关系。这结果与 Freese 等所得的实验结论不相符合,我们的结果证明低浓度 HA 对 *S. pombe* 既有失活作用也有诱变作用,但皆很低,高浓度 HA 则失活作用强,诱变作用亦强。HA 的两种独立效应——失活与诱变作用,在粟酒裂殖酵母菌里观察不到。

为进一步研究 HA 对 *S. pombe* 诱变作用的普遍性,选取了四类型 19 株 NA-生化突变体进行回复诱变试验,实验结果列

于表 2。

表 2 HA 对 *S. pombe* 突变体的回复诱变频率*

突变体	表型	自发回复频率 突变体数/10 ⁸ 活细胞	HA 诱变频率 突变体数/10 ⁸ 活细胞
NA 174-1	Cho ⁻	—	520
NA 169-1	Cho ⁻	1.02	850
NA 170-1	Cho ⁻	0.66	250
NA 171-1	Cho ⁻	0.32	46
NA 173-1	Cho ⁻	—	16
NA 183-2	Cho ⁻	0.55	1,000
NA 186-1	Cho ⁻	0.26	1300
NA 179-1	P-ABA ⁻	8.10	20
NA 184-1	P-ABA ⁻	0.92	—**
NA 181	Meth ⁻	7300	58,000
NA 185-1	Meth ⁻	0.84	45,000
NA 201	Meth ⁻	4782	73,000
NA 168-1	Ade ⁻	0.011	3.0
NA 172 1	Ade ⁻	0.53	2,400
NA 175-1	Ade ⁻	0.30	3,200
NA 176-2	Ade ⁻	0.044	1.40
NA 177-1	Ade ⁻	4750	—
NA 178-1	Ade ⁻	0.43	980
NA 182-1	Ade ⁻	0.031	30

* 处理条件: 1M HA, 30℃, 4 小时; 实验数据为 3—6 次平均值。

** 突变体经过 HA(1M)处理多次,未见有回复突变体。

表 2 所示, HA 对 NA-生化突变体回复诱变作用可分两类。一类 NA-生化突变体回复诱变频率较高, 另一类很低或完全没有作用。按照化学诱变理论推论^[3,7], 前一类 HA 引起 DNA 中发生 $\frac{G}{C} \rightarrow \frac{A}{T}$ 的改变, 后一类则较复杂, 有的可能发生 $\frac{A}{T} \rightarrow \frac{G}{C}$ 的改变或其它类型的改变, 尚待进一步确定。

部分回复突变体与野生型菌株及原始 NA-生化突变体进行杂交分析的结果指出, 所有进行测验的回复突变体皆为典型的真正回复突变体。

2) HA对粟酒裂殖酵母的正向诱变
营养细胞经 HA 处理 4 小时后取样, 离心

水洗。在最低培养基中摇床培养使其表型表现,再离心水洗后,涂布在缺环己六醇的最低培养基上,30℃ 培养 7—10 天,点加完全培养液。待菌落形成后,随机挑出菌落或用影印法筛选突变体,测定结果列于表 3。

表 3 HA 对粟酒裂殖酵母的正向诱变

实验号	挑出菌落数	突变体数	突变体百分率 (%) [*]
HA-6	159	46	28.8
HA-7	123	12	9.7
HA-8	119	31	26.1
HA-10	125	32	25.5
HA-12	419	28	6.6
HA-13	58	2	3.4
HA-15	92	30	32.6
HA-17	94	23	24.4
总计	1,189	204	19.6

* 实验数据是野生型细胞经 HA 处理后,用饥饿法筛选出突变体的百分率。

由表 3 所示,HA 对粟酒裂殖酵母有强烈的诱变效应。用这样饥饿法筛选变体所得的突变体百分率较高,平均为 19.6%,最高可达 32%。这些突变体经分别测定结果大部分为氨基酸缺陷型,其次为碱基缺陷型,维生素缺陷型最少,这与文献报道结果相符合^[13]。

讨 论

Freese 等首先证明 HA 对噬菌体的 DNA 的化学作用主要是对 C 起作用^[14]。Brown 等报告了 HA 与 C 及其类似物的化学作用^[15]。Schuster^[2] 和 Schuster 等^[5]指出 HA 对 TMV-RNA 的化学作用是与 U 和 C 起作用。Verwoerd 等^[16]用 HA 部分降解核苷酸及核苷时发现 HA 对 A 没有作用,对 G 及 T 作用很弱,对 C 及 U 作用很强。Howard 等^[7]指出 HA 对 Φ X-174 的作用主要是与 C 起作用。综合上述材料看来,HA 之所以

引起 T 系噬菌体及 RNA 病毒的诱变和失活作用主要是因为和 U 及 C 作用的结果。

Freese 等首先证明 HA 对 T₄ 噬菌体的作用显示出两种独立的效应,并且证明钠离子对处理细胞有保护作用。这个结论在后来用 HA 处理转化 DNA 的实验中又得到了证实^[10,11]。Schuster 用噬菌体为材料也报道了类似的现象^[5]。这种现象在 *E. coli* 的实验中得到了进一步证实^[12],不过低浓度 HA 对 *E. coli* 有诱变作用,而钠离子浓度对 HA 的失活作用没有影响,这一点与 Freese 等的结果不一致。在我们的实验里可以看出,HA 对粟酒裂殖酵母的失活作用规律与前人的结果不同,HA 对 *S. pombe* 的失活作用随其浓度增高而迅速增强。在相同浓度的钠离子与不等浓度 HA 处理 *S. pombe* 的实验中,裂殖酵母菌的失活率比对照组反而高(图 2)。在相等低浓度 HA (0.01M) 中加入不等量氯化钠的一组实验进一步证明,钠离子本身不但没有保护作用,反而会引起细胞的生理损伤而致死(图 3,表 1),失活作用与加入的盐浓度呈正比关系。如图 2 所示,实验组的失活作用比对照组强是 HA 与盐两者共同作用的结果。HA 引起的 TMV-RNA、转化 DNA 的失活曲线为单击型,可以认为转化 DNA 及 TMV-RNA 的失活是由于一对碱基的改变所引起的。Freese 等用 T₄ 噬菌体为材料所得到的失活曲线为非指数曲线^[1]。Schuster 等用 T₄/05 噬菌体为材料在最低失活情况下发现失活曲线为双击型^[5]。用 *E. coli* 为材料所得的亦非指数曲线^[12]。HA 引起 *S. pombe* 的失活作用很复杂。图 1 所示,由同一野生型得来的不同生化突变体对 HA 的抗性不一样,NA-183-2 突变体对 HA 的抗性大于 NA-175-1 突变体的抗性,两者的失活曲线皆为非指数曲线,所以裂殖酵母菌的失活的原因

很复杂。HA 的失活作用尚未完全清楚，有人认为主要是引起了 DNA 或 RNA 碱基改变所致^[11]，亦有人说 HA 对蛋白质的改变亦有关系^[17]。根据我们的实验结果，我们认为 HA 的失活作用除与核酸作用有关外，还与蛋白质作用有关^[12,18]。

HA 对噬菌体^[1,5]，TMV⁻⁽²⁾，转化 DNA^[10,11] 及 TMV-RNA^[18] 的诱变作用已有肯定结果。但 HA 对细菌的回复诱变则有不同结论。Eisenstark 等报道 HA 对 *Salmonella typhimurium* Cys C 区没有回复诱变作用^[19]，Lie 指出 HA 对 *E. coli* 有强烈的诱变作用。在真菌遗传方面未见有报道 HA 对真菌的诱发变异的材料。据 HA 对 *S. pombe* 的 NA-生化突变体的回复诱变结果，可以初步确定，某些高回复诱变频率的突变体之突变位点的碱基对，按 Freese^[3] 及 Howard^[7] 等实验结果推论，是应属 GC 对，另外一类型低回复诱变频率突变体及 HA 完全没有诱变作用的突变体之突变位点尚待进一步确定。

HA 不仅诱发 *S. pombe* 回复诱变，亦有强烈的正向诱变作用。正向突变体百分率可达 32%。可做选择具有所需特性的突变体的诱变剂用。

参 考 文 献

- [1] Freese, E., Bautz-Freese, E. and Bautz, E.: *J. Mol. Biol.*, **3**:133—143, 1961.
- [2] Schuster, H.: *J. Mol. Biol.*, **3**:447—457, 1961.
- [3] Freese, E.: In *Molecular Genetics*, Taylor, J. H. ed., 1:207—269, Academic Press, New York, 1963.
- [4] Franklin, R. M., and Wecker, E.: *Nature*, **184**:343—345, 1959.
- [5] Schuster, H. and Vielmetter, W.: *J. Chimie Physique*, **58**:1005—1010, 1961.
- [6] Tessman, I., Poddar, R. K. and Kumar, S.: *J. Mol. Biol.*, **9**:352—363, 1964.
- [7] Howard, B. D. and Tessman, I.: *J. Mol. Biol.*, **9**:364—371, 1964.
- [8] 蔡金科、唐国敏：微生物学报，**10**:477—487, 1964。
- [9] Schopfer, W. H., Posternak, Th. et Wustenfend, D.: *Arch. Mikrobiol.*, **44**:113—151, 1962.
- [10] Freese, E. and Strack, H. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, **48**:1796—1803, 1962.
- [11] Bautz-Freese, E. and Freese, E.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, **52**:1289—1297, 1964.
- [12] Lie, S.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **62**:575—580, 1964.
- [13] Megnet, R.: *Experientia*, **20**:320—321, 1964.
- [14] Freese, E., Bautz-Freese, E. and Bautz, E.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, **47**:845—855, 1961.
- [15] Brown, D. M., and Schell, P.: *J. Mol. Biol.*, **3**:709—710, 1961.
- [16] Verwoerd, D. W., Kohlhage, H. and Zilling, W.: *Nature*, **192**:1038—1040, 1961.
- [17] Kozloff, L. M., Lute, M. and Henderson, K.: *J. Biol. Chem.*, **228**:511—528, 1957.
- [18] Schuster, H., and Wittmann, H. G.: *Virology*, **19**:421—430, 1963.
- [19] Eisenstark, A., and Rones, J. L.: *Genetics*, **49**:343—355, 1964.
- [20] Yanofsky, C., Helsinki, D. R. and Malling, B. D.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **26**:11—24, 1961.

МУТАГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ГИДРОКСИЛАМИНА НА ДРОЖЖИ *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Цай Цзинь-ко и Тан Го-минь

(Институт микробиологии АН Китая, Пекин)

Известно, что гидроксилламин (НА) обладает сильным мутагенным действием на бактериофаги, вирусы и бактерии *E. coli*, но на грибы пока не известно. В настоящей работе дается экспериментальный материал по исследованию влияния мутагена НА на дрожжи *Schizosaccharomyces pombe*.

Установлено, что инактивирующее действие НА на различные ауксотрофные мутанты *Schizosaccharomyces pombe* не одинаково. Кривая выживаемости у мутантов (*ade⁻* и *cho⁻*) показывалась в виде не линейной формы. Данными по изучению инактивирующего действия НА на *Schizosaccharomyces pombe* не подтверждены закономерности, постулированные Фризом, для фагов—сильное инактивирующее действие низких (0,01 М) концентраций НА и слабое действие высоких концентраций (1 М) при рН. 7,5. 1 М НА оказывал заметный мутагенный и инактивирующий эффект. При понижении концентраций НА до 0,01 М также наблюдалось слабое инактивирующее и мутаген-

ное действие НА. Концентрация NaCl в реакционной смеси оказывала сильное влияние на инактивирующее действие НА.

Результаты по изучению эффективности индукции возвратных мутаций у 19 мутантных штаммов *Schizosaccharomyces pombe*, дефектных по аденину, метионину, парааминобензойной кислоте, и холину, индуцированных азотистой кислотой, под влиянием некоторых мутагенов НА, NA, DAP показывали, что у мутантов, характеризующихся высокой индукцибельностью реверсий НА, вызваны простые замены пар оснований ДНК $\frac{G}{C} \rightarrow \frac{A}{T}$.

Под действием НА на клеток дикого типа *Schizosaccharomyces pombe* были получены различные ауксотрофные мутанты. Большинство из них является ауксотрофными в отношении разных аминокислот мутантами. Мутанты, дефектные по пуринам и пуримидинам и витаминам, немного.

Кратко обсуждали механизм действия НА,