

亚硝基甲基脲对短小芽孢杆菌 AS 1.271 的诱变作用

徐功巧 赵根楠 薛禹谷

(中国科学院微生物研究所,北京)

确定了亚硝基甲基脲诱发短小芽孢杆菌 AS 1.271 的最适条件。在 pH7.0 的 tris-maleic 缓冲液中,以 1000 微克/毫升的剂量处理生长对数期的菌体。30°C 处理 1 小时可获得较高比例的营养缺陷型菌株。经测定,氨基酸缺陷型菌株占全部营养缺陷型菌株的 71.4%; 核酸碱基缺陷型菌株占 11%。

许多作者报道了亚硝基甲基脲 (NMU) 在植物^[1,2,3]、动物^[4,5]、动物细胞培养物^[6]、微生物^[2,7,8,9,10]和转化 DNA^[11] 中诱变效果较高。有关此化合物对短小芽孢杆菌的诱变试验还未见报道,为进行这项工作,我们首先确定这一化合物诱发短小芽孢杆菌的最适处理条件。

研究微生物的突变,一般采用回复突变体系,而生产实际中往往需要选育一些特定类型的生化突变型菌株,用以积累某些重要代谢产物。因此,我们以诱发营养缺陷型作为诱变效果的指标,并对营养缺陷型菌株的营养要求进行了部分测定。这样既获得了一批营养缺陷型菌株,供筛选生产菌株之用,又可为进一步研究突变机制积累试验用菌和资料。

材料和方 法

(一) 菌种 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilis*) AS 1.271 野生型,由本所保藏组提供。

(二) 诱变剂 NMU,由本所三室合成^[12]。

(三) 培养基 完全培养基 [(+) 培养基] (%) : 葡萄糖 0.5, 牛肉膏 0.3, 酵母膏 0.3, 蛋白胨 1, MgSO₄·7H₂O 0.02; pH7.0, 121°C 灭菌 30 分钟。作固体或斜面培养基时另加琼脂 2%。

基本培养基 [(-) 培养基] (%) : 葡萄糖 1, K₂HPO₄ 0.2, (NH₄)₂SO₄ 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.05;

生物素 5 毫克/升,琼脂 2, pH 7.0, 112°C 灭菌 20 分钟。

测定营养缺陷型的补充培养基:

1. 混合氨基酸补充培养基 ((aa) 培养基): 在(-)培养基中加入水解酪素 0.3%, 胱氨酸(每 100 毫升 5 毫克), 色氨酸(每 100 毫升 1 毫克)。

2. 各种组合的氨基酸补充培养基: [(-) 培养基] 中加入各种组合的氨基酸(见氨基酸缺陷型分类测定)。

3. 混合碱基补充培养基 ((B) 培养基): [(-) 培养基] 中加入混合核酸碱基 [腺嘌呤 (A)、鸟嘌呤 (G)、次黄嘌呤 (HX)、胞嘧啶 (C)、尿嘧啶 (U)、胸腺嘧啶 (T) 各 20 毫克/升]。

4. 单种碱基补充培养基: [(-) 培养基] 中分别加入上述各种核酸碱基 20 毫克/升。

(四) 缓冲液 三羟甲基氨基甲烷-顺丁烯二酸 (tris-maleic) 母液与 NaOH 母液按一定配比混合,制备所需的 pH 0.05M tris-maleic 缓冲液^[13]。

(五) 菌悬液制备 AS 1.271 菌平皿划线分离,挑一单菌落于 20 毫升完全培养液内,30°C 培养 14—16 小时,按 1:10 的比例接种到新鲜完全培养液,此时菌液浓度约为 10⁷/毫升。30°C 振荡培养两个半小时,当菌液浓度增殖到 1—5×10⁸/毫升时,离心,去上清液,用 pH7.0 缓冲液洗涤 1 次,再离心,然后按适当浓缩比例用 pH7.0 缓冲液悬浮,制备成菌悬液待处理。诱变处理时菌液浓

本文于 1976 年 6 月 21 日收到。

度为 10^4 /毫升左右。

(六) 诱变处理方法 临处理前迅速用 pH 7.0 的缓冲液将 NMU* 溶解, 配成 3—4 毫克/毫升溶液。取一定体积加到菌悬液内, 使最终浓度达到所需的处理剂量。对照管为 pH7.0 缓冲液。(在 pH 条件试验中, 菌悬液和 NMU 溶液分别用 pH 5、6、7、8、9 的缓冲液配制)。静置恒温水浴内, 处理一定时间后置于冰浴并迅速用生理盐水稀释, 直接涂布到 (+) 平皿上, 30°C 温箱培养 1—2 天, 待菌落全部长好后, 菌落计数, 计算存活率。

(七) 营养缺陷型的确定和测定 将平皿上的菌落用牙签分别在 (+) 和 (-) 平皿上划线, 30°C 培养 48 小时后检查生长情况, 确定营养缺陷型菌株。

1. 营养缺陷型菌株的营养缺陷类型的测定:

将已确定的营养缺陷型菌落, 按一定位置接种到 (+) 培养基上。30°C 培养过夜, 顺序影印到 (-)、[aa]、[B]、[+] 等 4 种培养基上, 48 小时后检查结果。

2. 氨基酸缺陷型的分类测定: 按《微生物诱变育种》^[11]一书所述方法进行。

3. 碱基缺陷型的分类测定: 生长在 (+) 培养基上的碱基缺陷型菌株在各种类型的单种碱基补充培养基和 (-) 培养基上影印, 48 小时后观察生长情况。

结 果

一、NMU 的诱变最适条件

(一) 菌龄 首先观察了处于不同生长期的菌体对 NMU 诱变作用的反应。从表 1 可以看到, 相同处理条件下, 由于菌体所处生长期不同, 诱变效应差别很大。处理对数期的菌, 诱发营养缺陷型比例为 17%, 而处理恒定期前期的菌, 诱发营养缺陷型比例仅 8%, 可见用 NMU 处理对数期的菌体可以得到较好的效果。

(二) pH 在 pH5—9 范围内, 对短小芽孢杆菌 AS 1.271 的致死作用, 经计算作图, 呈二级抛物曲线关系 (见图 1)。最适

表 1 NMU 对不同生长期的 A. S. 1.271 菌体的诱变作用*

菌 龄	处 理	测菌落数	缺陷型数	缺陷型(%)
对数期	对 照	1178	0	0
	NMU	1459	250	17.14
恒定前期	对 照	755	0	0
	NMU	1473	120	8.15

* 处理条件: 1000 微克/毫升, 30°C, 60 分钟, pH7.0。

生长 pH 为中性或中性偏碱。过酸或过碱 pH 则有较强的致死作用, 为有效地测定不同 pH 条件下药物的诱变效应, 我们采用 pH5—9 作试验范围。

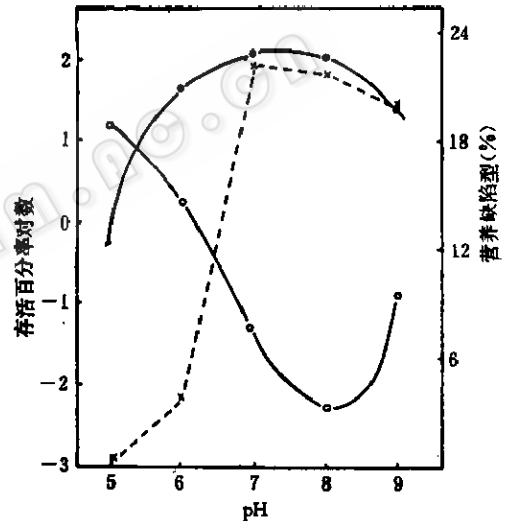


图 1 不同 pH 条件下 NMU 对 AS 1.271 存活率和诱变作用的影响

1000 微克/毫升 NMU, 30°C 处理 30 分钟。

— · — · — pH 对存活的影响

— · — · — 在不同 pH 条件下 NMU 对存活影响

— × — — × — 在不同 pH 条件下 NMU 的诱变作用

在不同 pH 条件下, NMU 对 AS 1.271 存活率的影响是: 从 pH5 开始随着 pH 上升存活率不断下降, pH8 左右存活率降到最低值, 为对照的 0.005%, 当 pH9 时存活率又有所回升。NMU 的诱变效应从 pH5 开始随 pH 上升而增强: pH5 时几乎没有

* 此化合物极不稳定, 须低温、暗处保存, 临用时现配制, 并避免加热。

诱变效应, pH6时效应较低,营养缺陷型比例仅 3.7%, pH7 时诱变效应突增,诱发营养缺陷型比例为 22%,是 pH6 时的 6 倍。pH8 时诱变效应继续维持在较高的水平上, pH 上升到 9 时虽然诱变效应有所下降,但仍在 20% 左右。说明,中性或中性偏碱的 pH 条件下 NMU 诱发 AS 1.271 营养缺陷型有较好的效果。以后的实验中我们采用 pH7.0。

(三) 剂量 在 pH7.0 的条件下,我们试验了 0—1600 微克/毫升范围内剂量与诱变效应的关系。从图 2 可以看出

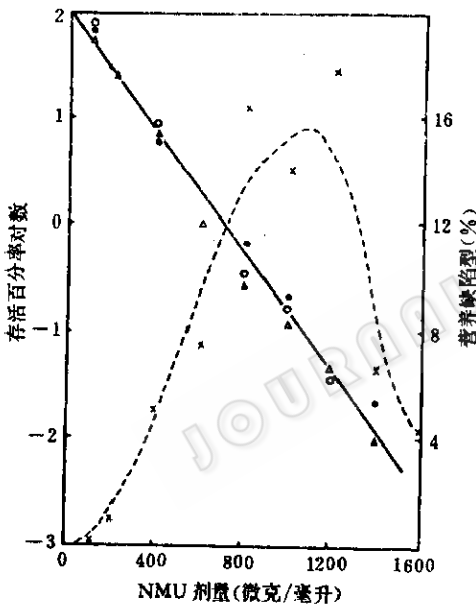


图 2 不同剂量的 NMU 对 AS 1.271 存活率和诱变效应的影响 (据 3 次试验结果) pH7.0, 30°C, 处理 60 分钟。

—— 存活
---x--- 诱变效应

AS 1.271 的存活率随 NMU 剂量的增加呈指数下降。同时诱变效应在 0—800 微克/毫升剂量范围内随剂量增加而加强,当剂量为 800 微克/毫升时,有较高的诱变效应,诱发的营养缺陷比例达 16%。以后随剂量的增加虽然诱变效果有些波动,但还是保持在较高的水平上。然而当剂量增

加到 1200 微克/毫升时,则诱变效果随剂量增加显著降低。结果表明,在 800—1200 微克/毫升剂量范围内 NMU 的诱变效果达到较高水平。在以下试验中取 1000 微克/毫升为处理剂量。

(四) 处理时间 在 pH7.0, 剂量 1000 微克/毫升条件下,进一步探讨了 NMU 的处理时间与诱变效果的关系。从图 3 看到,随着处理时间延长 AS 1.271 的存活率呈指数下降。诱变作用在 1 个小时内随处理时间延长不断增强;曲线趋势表明:0—30 分钟内诱变效果提高的幅度较 30 分钟后提高的幅度要小得多。处理时间超过 1 小时,则诱变效果明显下降。结果表明, NMU 处理时间为 60 分钟时能达到较好的诱变效果。

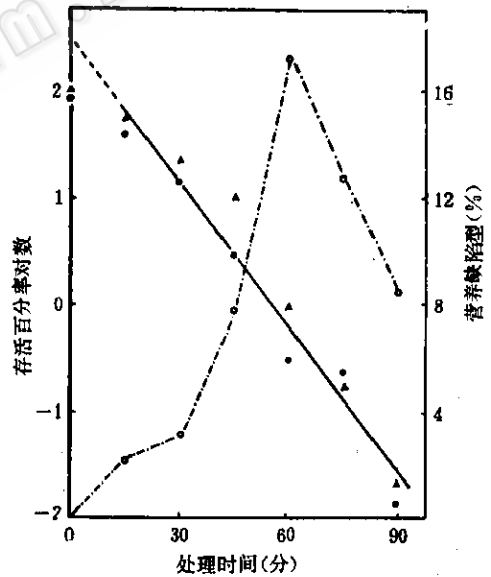


图 3 不同处理时间条件下 NMU 对 AS 1.271 的存活率影响和诱变效应
1000 微克/毫升, 30°C, pH 7.0。

—— 存活
---x--- 诱变作用

(五) 温度 在上述最适 pH、剂量和处理时间条件下,发现处理温度为 15°C 时 NMU 对 AS 1.271 的致死作用较小,存

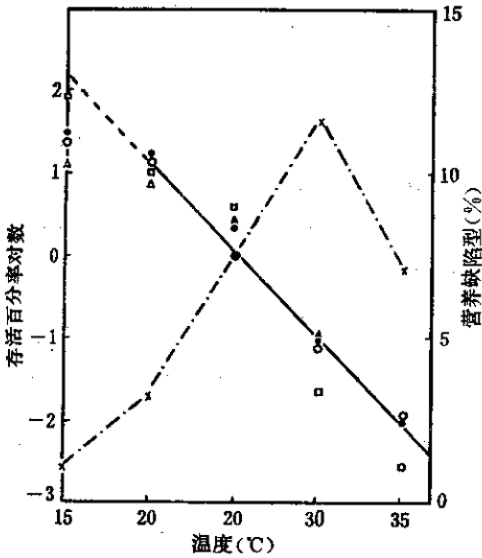


图4 不同温度条件下, NMU 对 AS 1.271 存活率的影响和诱变效应(4次试验结果)
1000微克/毫升 NMU, pH7.0, 60分钟。

——·—— 存活
- - - - - 诱变

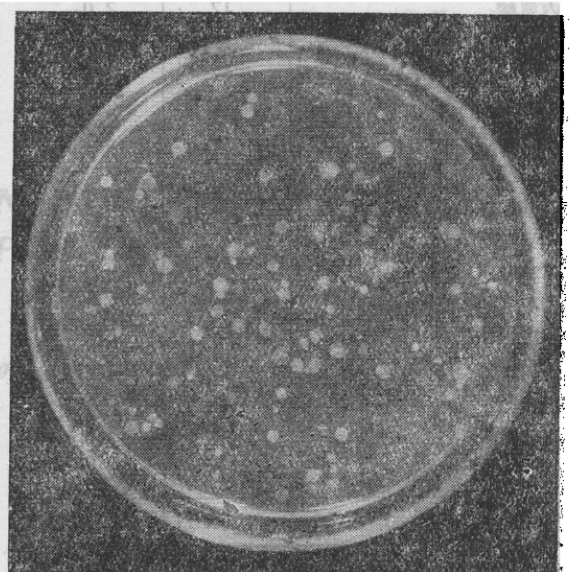
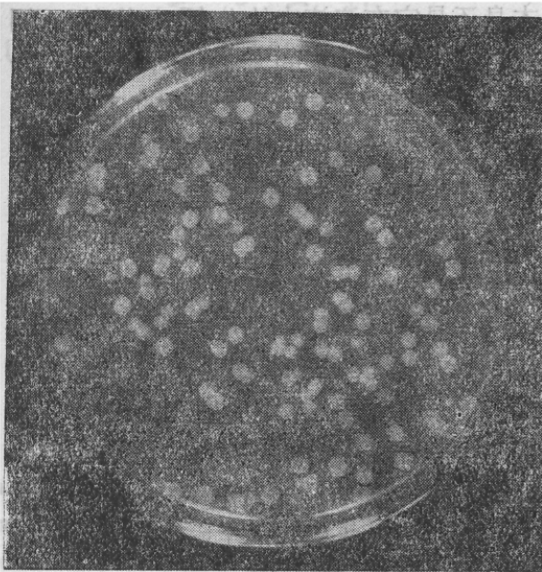
活率为对照的 50% 左右, 20°C 以上, 随温度升高存活率呈指数降低(见图4)。NMU 的诱变作用在 15°C 时也较弱。随着温度升高诱变效果也相应增强。30°C 时效果较好, 当温度继续上升时诱变效果则迅速下降。

通过菌体生长期、pH、温度、剂量、时间等一系列条件实验, 用 NMU 诱发短小芽孢杆菌 AS 1.271 的对数生长期菌体, 在 pH7.0 的 tris-maleic 缓冲液中, 剂量 1000 微克/毫升, 30°C 条件下处理 1 小时, 能够获得较多的营养缺陷型。所诱发的营养缺陷型占总测定菌落数比例平均为 16%, 有时超过 20%。

由图 5 可见, 经 NMU 诱变处理后的菌落形态发生了显著变化, 经处理后, AS 1.271 菌落出现明显大小差别, 而且一部分菌落表面不象对照菌落那样粗糙, 皱折, 而是光滑的。我们分别在大小两类菌落中测定营养缺陷型比例。得到的结果是小菌落中缺陷型所占比例较高, 约是大菌落中缺陷型数的 4 倍。

二、NMU 诱发的营养缺陷型测定

根据菌株对氨基酸和核酸碱基的营养要求, 测定了实验中获得的大批营养缺陷型菌株。在 NMU 诱发短小芽孢杆菌



经 NMU (1000 毫微克/毫升, pH7.0, 30°C, 60 分钟) 处理后的 AS 1.271 菌落

图5 对照 AS 1.271 菌落

AS 1.271 获得的营养缺陷型中,以氨基酸缺陷型所占比例较大,为 71.4%;碱基缺陷型占 11% (见表 2)。

表 2 NMU 诱发的 AS 1.271 营养缺陷型菌株的测定结果

缺陷型分类	株数	(%)
氨基酸缺陷型	1084	71.4
碱基缺陷型	167	11
其它缺陷型	268	17.6
总计	1519	100

NMU 诱发的氨基酸缺陷型种类较多,包括有 20 种主要氨基酸的缺陷型;同时需要两种氨基酸的缺陷型及相互可替代的氨

表 3 NMU 诱发的 AS 1.271 氨基酸缺陷型菌株测定结果

氨基酸缺陷型类型	株数	(%)
天门冬氨酸	2	0.3
脯氨酸	3	0.49
(丝、色)氨酸	4	0.65
氨酸、谷酰胺	7	1.1
天门冬酰胺	7	1.1
丝氨酸	7	1.1
酪氨酸	7	1.1
半胱氨酸	7	1.1
甘氨酸	10	1.6
苯丙氨酸	11	1.8
丙氨酸	12	2.0
甲硫、苏氨酸双缺	13	2.1
缬氨酸	17	2.8
谷氨酸	18	2.9
亮氨酸	19	3.1
赖氨酸	20	3.2
(半胱、甲、硫脯、天冬酰胺)氨酸	25	4.1
异亮氨酸	27	4.4
苏氨酸	29	4.7
异亮、缬氨酸双缺	29	4.7
甲硫氨酸	59	9.6
色氨酸	59	9.6
组氨酸	61	9.9
精氨酸	73	12.0
其它	90	14.6
总计	616	100

注: () 内表示这些氨基酸可互相替代。

“其它”指未知及其它未列入表内的双缺、互相替代氨基酸缺陷型。

氨基酸缺陷型。NMU 对甲硫氨酸、色氨酸、组氨酸、精氨酸缺陷型的诱发有较好的效果 (见表 3)。核酸碱基缺陷型菌株的测定结果见表 4。其中腺嘌呤缺陷型 (包括精确与非精确两类) 和尿嘧啶缺陷型占比例较大。用我们的诱变方法没有获得胸腺嘧啶和胞嘧啶缺陷型。

表 4 NMU 诱发的 AS 1.271 碱基缺陷型菌株的测定结果

碱基缺陷型类型	株数	(%)
腺嘌呤缺陷型	18	22.5
非精确腺嘌呤缺陷型	36	45.0
鸟嘌呤缺陷型	3	3.8
尿嘧啶缺陷型	17	21.3
胸腺嘧啶缺陷型	0	0
胞嘧啶缺陷型	0	0
未知	6	7.5
总计	80	100.1

讨 论

NMU 的化学性能很不稳定。烷基亚硝基类化合物在溶液中的降解作用研究表明, NMU 接触高浓度氢离子引起本身急剧降解^[15]。由此提出行使诱变机能的是药物本身还是它在溶液中的分解产物这一问题? 对于这个问题的看法很不一致^[2,10,16,17,18]。这涉及对 NMU 的诱变机理的不同解释。在找寻最适 pH 条件试验中, 不同的作者用不同的菌获得的结果不一致。一些作者报道 NMU 在酸性条件下有较好的诱变效果, 如 Zimmerma^[18] 等报道酵母 ad₆₋₄₅ 回复体系中 pH2 时得到较好的诱变效果; Туманов^[7] 在放线菌诱变工作中, 发现在 pH4—6 范围内得到较高的诱变率。而某些作者则使用中性 pH^[2]。我们采用的短小芽孢杆菌 AS 1.271 生长的最适 pH 为中性。虽然我们选取了对菌体杀伤力较小的 tris-maleic 缓冲液, 但 pH5 时, 它对 AS 1.271 的致死作用仍比较大, 达

99.9%—99.99%, 如采用过低 pH 必然不利于诱变进行, 所以仅选取 pH5—9 作试验范围。结果表明, pH5—7 间随着 pH 的升高 NMU 的诱变效应明显增强, pH 上升到 8、9 时诱变效应还保持在较高的水平上。所以, 认为中性 pH 条件下进行 NMU 诱变能够得到较好效果。

一般认为 NMU 作为诱变剂的特点是诱变效果好和致死率低。Marquardt 等^[9]在酵母中用 100 毫克分子浓度 (相当于 10 毫克/毫升) NMU, pH7.5, 处理 1 小时, 存活率 79%, 回复率为 64×10^{-6} 。Туманов 等^[7]在放线菌中用 0.085M 剂量处理 6—12 小时, 存活率 10% 左右, 突变型占 60% 左右。在我们的实验中, 用 0.1 毫克/毫升剂量的 NMU 处理 AS 1.271, 可以使存活较高 (50% 以上), 但这时几乎不起诱变作用。如果用 1 毫克/毫升剂量, 诱变效应可以达到较高水平, 但此时存活率仅 0.1% 左右。从我们的结果来看, 当 NMU 显示出高效能诱变作用时, 对菌有相当高的致死作用。

参 考 资 料

[1] Franssen, M. and Moutschen, J.: *Mutation Res.*, 16: 141—150, 1972.

- [2] Marguardt, H. et al.: *Z. Vererbungsl.*, 95: 82—96, 1964.
- [3] Velezníky, J. and Gichner, T.: *Mutation Res.*, 10: 43—52, 1970.
- [4] Рапопорт, И. А.: *Докл. АН СССР.*, 146(6): 1418—1421, 1962.
- [5] Рапопорт, И. А.: *Докл. АН СССР.*, 148(3): 696—699, 1963.
- [6] Shapiro, N. I. et al.: *Mutation Res.*, 16: 89—101, 1972.
- [7] Туманов, Л. Л. и Др.: Супермутagens, АН СССР, Институт Химической Физики, Изв. «Наука», Москва, 34—41, 1966.
- [8] Loveless, A. and Hampton, C. L.: *Mutation Res.*, 7: 1—12, 1969.
- [9] Marguardt, H. et al.: *Die Naturwissenschaften*, 50: 625, 1963.
- [10] Neale, S.: *Mutation Res.*, 14: 155—164, 1972.
- [11] Bresler, S. E. et al.: *Mutation Res.*, 15: 101—112, 1972.
- [12] Blatt, A. H. (ed.) (南京大学化学系有机化学教研组译): 有机合成, 第 2 集, 第 314—315 页, 科学出版社, 1964.
- [13] Gomori, G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 68: 354—358, 1948.
- [14] «微生物诱变育种» 编写组: 微生物诱变育种, 第 69—71 页, 科学出版社, 1973.
- [15] Garretl, E. R. et al.: *J. Pharm. Sci.*, 54: 119—123, 1965.
- [16] Cardá-Olmedo, E. and Hanawalt, P. C.: *Molec. Gen. Genet.*, 101: 191—202, 1968.
- [17] McCalla, D. R. et al.: *Can. J. Biochem. Physiol.*, 46: 807—811, 1968.
- [18] Zimmermann, F. K. et al.: *Z. Vererbungsl.*, 97: 68—71, 1965.

MUTAGENIC EFFECT OF N-NITROSO-METHYL-UREA FOR *BACILLUS PUMILIS* AS 1.271

Xu Gongqiao, Zhao Gennan, Xue Yugu

(The Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A fairly good yield of auxotrophic mutants (average amount 16%, maximum amount 22% of the total number of the colonies tested) can be obtained by incubating logarithmic phase cells of *Bacillus pumilus* AS 1.271 with 1 mg/ml of N-

nitroso-methyl-urea (NMU) in 0.05 M tris-maleic buffer (pH 7.0) at 30°C for an hour. Amino acid auxotrophs accounted for 71.4%, and purine and pyrimidine bases auxotrophs 11% of the total induced auxotrophs.