

# N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍对短小芽孢杆菌 AS 1.271 菌株的诱变作用

徐婉学 刘惠平 庄增辉

(中国科学院微生物研究所,北京)

1. MNNG 在 pH 6 时较为稳定,在碱性条件下分解极为迅速,较易受光照作用而分解。

2. MNNG 诱发短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) AS 1.271 菌株获得最高突变率的适宜条件是:菌龄为对数生长期的早期,采用 0.05 M pH 6 的 TM 缓冲液,所用剂量为 1000 微克/毫升,于 30°C 处理 45 分钟,在这样的处理条件下,营养缺陷型突变菌株可达 20% 左右。

3. 在所获得的 1775 株突变菌株中,有 947 株经过营养缺陷型的鉴定,其中有核酸碱基、氨基酸、维生素的单一和双重营养缺陷型突变体,核酸碱基缺陷型中,腺嘌呤缺陷型较多,氨基酸缺陷型中以组氨酸、谷氨酸、蛋氨酸、精氨酸等缺陷型所占的比例较大。

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(简称 MNNG)是一种高效的诱变剂,其诱变活性在 1960 年由 Mandell 等<sup>[1]</sup>发现,1965 年 Adelberg 等<sup>[2]</sup>曾以它为诱变剂对大肠杆菌 K<sub>12</sub> 的致死和突变条件进行了研究,随后许多工作者研究了 MNNG 对细胞、放线菌、酵母菌等微生物的诱变效应和遗传学效应<sup>[3,4]</sup>。近年来关于用 MNNG 直接处理 DNA,通过转化诱发细菌变异的研究也有报道<sup>[5]</sup>。国内自文化大革命以来微生物育种工作蓬勃开展,由于 MNNG 具有致死率较低和突变率较高的特点,其应用也愈来愈广。关于 MNNG 的诱变机理,据目前所知主要是它与核酸碱基起作用,引起正在复制着的 DNA 发生变化,从而导致生物体的变异。所以应用它来诱变获得某些核苷酸或氨基酸之类的营养缺陷型菌株是有利的。根据我们早先的工作,已知短小芽孢杆菌 AS 1.271 菌株的某些营养缺陷型菌株是能积聚核苷和核苷酸类物质的,同时有关 MNNG 对该菌的诱变效应的研究目前也未见报道,因此,本文选用该菌为材料,以 MNNG 为诱变剂,对其致死条件和

诱变效应作了系统的比较和研究,试图为探讨突变的分子机理提供一些菌种和资料,同时也为选育产核苷酸类物质积累菌种。

## 材料与方法

### (一) 菌种

短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) AS 1.271 菌株。由本所菌种保藏组提供,实验前菌种经过单菌分离和鉴定。

### (二) 培养基

见前报<sup>[6]</sup>。

### (三) 营养缺陷型的鉴定方法

参考 Holliday<sup>[7]</sup>,植村定治郎<sup>[8]</sup>等的方法。

### (四) 诱变剂

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍由西安化学试剂厂参考 McKag<sup>[9]</sup>等的方法合成。

### (五) 诱变处理

挑取短小芽孢杆菌单菌落接种到完全培养液中,于 30°C 静置过夜(前培养),次日以 10% 的接种量接入完全培养液中,30°C 振荡培养至对数生长期,菌体经离心洗涤后悬浮于 0.05 M 的三羟

本文于 1976 年 6 月 21 日收到。

甲基氨基甲烷-顺丁烯二酸缓冲液(简称 TM 缓冲液)中,使菌液浓度在  $5 \times 10^8$ /毫升左右。MNNG 处理液的浓度、缓冲液的 pH 值、处理的温度和时间均根据不同试验要求而定。诱变处理在黑暗条件下进行。以冰浴终止反应,迅速稀释后涂布于完全培养基上,置  $30^\circ\text{C}$  培养 24—48 小时之后计算存活率并选出营养缺陷型突变体。

MNNG 在不同 pH 条件下分解作用的测定:

以 pH 3、4、5、6、7、8、9、10 的八种 TM 缓冲液分别配成每毫升含有 500 微克 MNNG 的溶液,置  $30^\circ\text{C}$  恒温水浴中,于不同时间取样,用紫外分光光度计于 400 毫微米处测定 MNNG 分解的百分率。

## 结 果

### (一) MNNG 的分解作用

经测定, MNNG 在可见光范围内的吸收峰为 400 毫微米,在紫外光范围内的吸收峰是 280 毫微米,实验结果与 Delic 等<sup>[10]</sup>所报道的相同。

测定结果表明, MNNG 在缓冲液中的分解作用随着 pH 值的升高而加强,如图 1 所示,在碱性条件下分解极为迅速,尤其在前 15 分钟内分解较快,在 15 分钟取样测定时, MNNG 在 pH 8 的缓冲液中分解了 40%, 在 pH 9 中分解 58%, 在 pH 10 中分解 91%。而在 15 分钟之后,分解作用就大大减缓。MNNG 在中性稍偏酸的条件比较稳定, pH 6 时突变率最高,所以本实验均采用 pH 6 的缓冲液。

MNNG 对光照也较敏感,实验以含 MNNG 500 微克/毫升的 pH 6 的 TM 缓冲溶液,分别放在不同的光照条件下,经 48 小时后用紫外分光光度计测定其分解率,结果表明置冰箱避光保存的未见分解,置室内不避光处(室温  $20^\circ\text{C}$ ) 分解 8.2%, 而置窗台有阳光处一昼夜(48 小时)其分解率竟达 72.2%。所以 MNNG 溶液应在用前临时现配,即便是使用前药液的暂时存

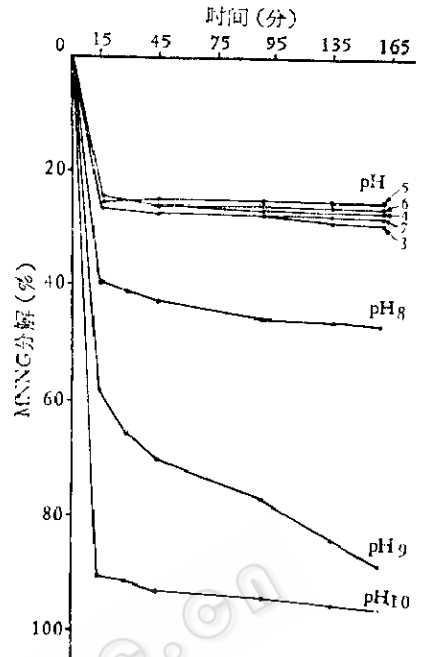


图 1 MNNG 在不同 pH 的缓冲液中的分解作用 (400 毫微米处)

放,也应避光置冰箱中。

### (二) MNNG 的诱变效应与菌龄的关系

由于 MNNG 的诱变效应主要是它与正在复制中的 DNA 起作用,使核酸起甲基化作用,因而导致菌体发生变异,所以在对数生长期进行诱变效果较好,为了在对数期内找一个最合适的处理时间,在该菌对数生长期选了 4 个不同时间进行了比较实验,结果见表 1,结果表明,用经过前培养后再培养 1.5 至 2 小时的菌进行诱变,其突变率分别为 16.4%、19.3%、26.3%;存活率一般在 1% 左右,用培养 3 小时(对数生长期的末期)的菌,其突变率就明显下降。可见该菌经前培养后再培养 2 小时是诱变的适宜时期。

### (三) MNNG 的诱变效果与缓冲液 pH 值的关系

为了探讨 MNNG 的诱变效果与 pH 的关系,分别在 pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 的

表 1 菌龄对 MNNG 诱变效应的影响

培养时间 (小时)	试验 结果	1		2	
		存活率(%)	突变率(%)	存活率(%)	突变率(%)
1.5				0.70	16.4
2		2.98	26.31	1.10	19.3
2.5				0.60	10.0
3		0.80	3.27	0.63	5.9

处理条件: MNNG 剂量 1000 微克/毫升, 温度 30℃, 处理时间 45 分钟, 缓冲液 pH 6。

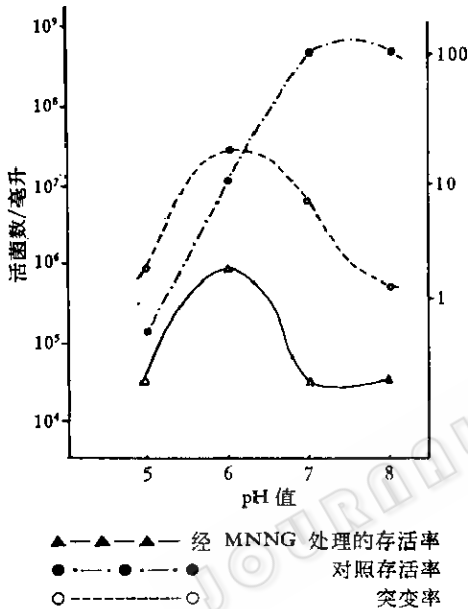


图 2 MNNG 诱变效应与 pH 的关系

处理条件: 温度 30℃, 剂量 1000 微克/毫升, 时间 45 分钟。

0.05 M 的 TM 缓冲液中比较其诱变效果, 如图 2 所示, 在对照实验中, 菌的存活率在酸性缓冲液中比在碱性缓冲液中低, 这说明 AS 1.271 菌株对低 pH 值十分敏感。在诱变处理中, 菌的存活率随着 pH 增高而迅速下降, pH 5 时存活率为 73.4%, 而 pH 8 时的存活率只有 0.005%。在 pH 6 的缓冲液中进行诱变处理, 突变频率最高, 低于或高于 pH 6 时其突变频率都显著降低。MNNG 在 pH 6 的缓冲液中也较稳定, 因此采用 pH 6 的缓冲液对该菌进行诱变是适宜的。

#### (四) MNNG 的诱变效应与剂量的关系

为了找出诱变时 MNNG 的最适浓度, 在 100 至 2,000 微克/毫升剂量范围内进行了诱变效应的比较结果见图 3。菌的存活率随着剂量的增加而下降, 在 100 微克/毫升时其存活率为 82.57%, 当剂量增加到 2,000 微克/毫升时存活率则降至 0.04%。剂量与菌突变率的关系是: MNNG 在 100 微克/毫升至 1,000 微克/毫升范围内, 随着浓度的增加, 菌的突变率由 1.28% 增至 19.98%; 当剂量超过 1,200 微克/毫升时, 突变率就显著下降, 在 1,600 微克/毫升时突变率只有 4.14%。实验表明, MNNG 的剂量在 600—1200 微克/毫升之间对短小芽孢杆

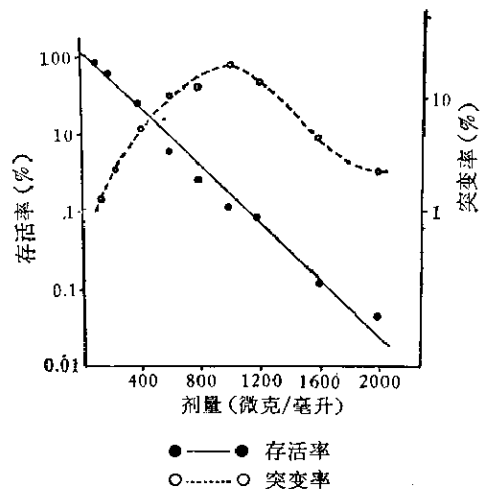


图 3 MNNG 的诱变效应与剂量的关系

处理条件: 温度 30℃, 时间 45 分钟, 缓冲液 pH 6。

菌 AS 1.271 菌株均可获得较好的诱变效果, 菌的突变率一般均在 10% 以上。其中获得最高突变率的剂量是 1,000 微克/毫升, 突变率一般可达 15.52—26.85%, 在这一剂量下, 菌的存活率一般为 1% 左右。所以 MNNG 诱变短小芽孢杆菌 AS 1.271 菌株的适宜剂量应为 1,000 微克/毫升。

### (五) MNNG 诱变效应与处理时间的关系

短小芽孢杆菌 AS 1.271 菌株的存活率随着处理时间的延长而逐渐降低, 如图 4 所示, 处理 15 分钟时菌的存活率为 8.8%, 处理 75 分钟其存活率则降低至 0.03%, 处理时间在 15 分钟至 45 分钟之间, 菌的突变率增加较快, 处理 15 分钟时, 突变率仅为 4.69%, 而处理 45 分钟时, 菌的突变率为 20.7%, 有时甚至可以达到 30.7%; 处理时间超过 45 分钟时突变率反而下降, 处理 60 分钟与处理 30 分钟时的突变率很近似, 一般在 10% 左右, 但菌的

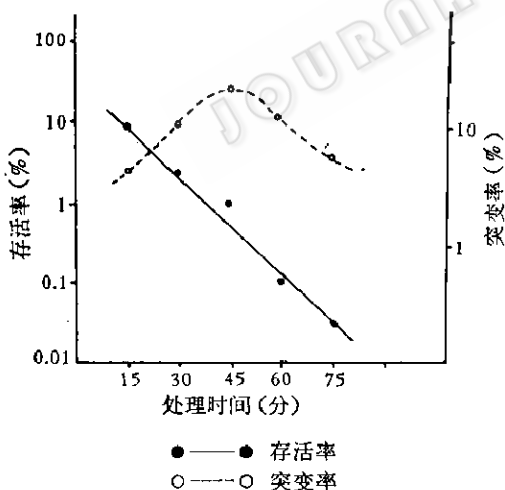


图 4 MNNG 诱变效应与处理时间的关系  
处理条件: 温度 30°C, 剂量 1000 微克/毫升,  
缓冲液 pH 6。

存活率后者较前者约减少 20 倍之多。所以, 处理时间以 45 分钟为宜。

### (六) MNNG 诱变效应与温度的关系

实验分别在 15、20、25、30、35、40°C 6 种不同温度条件下进行诱变处理, 结果如图 5 所示。菌的存活率随着温度的升高而逐渐降低, 在 15°C 时存活率为 48.95%, 40°C 时存活率只有 0.3%。处理温度在 15°C 至 35°C 之间, 菌的突变率随着温

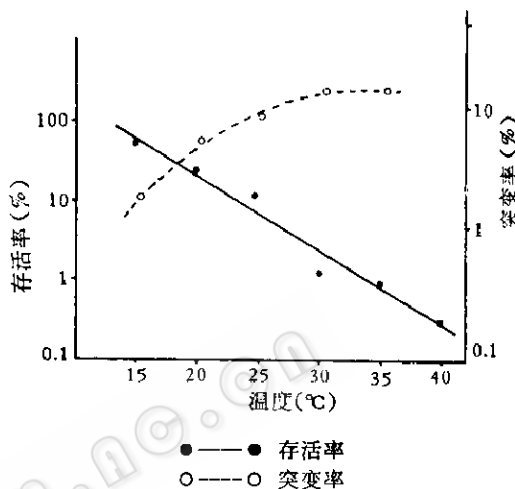


图 5 MNNG 诱变效应与温度的关系  
处理条件: 剂量 1000 微克/毫升, 缓冲液  
pH 6, 处理时间 45 分钟。

度升高而增加, 在 25°C 时, 突变率为 8—10%, 在 30°C 与 35°C 时, 突变率和存活率变化不大, 但当温度为 40°C 时, 菌的存活率和突变率都显著降低, 因此在 30°C 条件下进行诱变比较适宜。

### (七) 营养缺陷型菌株的鉴定

对 947 株突变菌株进行了营养缺陷型的测定, 结果表明, MNNG 对短小芽孢杆菌 AS 1.271 菌株所诱发的突变类型很多, 其中多数是氨基酸缺陷型, 碱基缺陷型次之, 维生素缺陷型和双重营养缺陷型为数极少。

在已测定的 947 株突变体中, 如表 2 所示, 氨基酸缺陷型占 79.3%, 核酸碱基缺陷型占 3.27%。对 68 株核酸碱基缺陷型的鉴定结果表明(见表 3), 其中以腺嘌呤缺陷型占多数, 它在核酸碱基缺陷型中占 67.6%, 其次是尿嘧啶缺陷型, 占 13.23%,

表 2 947 株突变体中氨基酸和碱基缺陷型的数量

测定菌株数	氨基酸缺陷型		碱基缺陷型		维生素及其它缺陷型	
	菌株数	(%)	菌株数	(%)	菌株数	(%)
205 (时间试验所得菌)	153	74.6	6	2.92	46	22.43
311 (剂量试验所得菌)	264	84.8	11	3.53	36	11.57
213 (温度试验所得菌)	161	75.5	6	2.81	46	21.59
108 (菌龄试验所得菌)	68	62.9	4	3.73	36	33.33
110 (pH 试验所得菌)	105	95.2	4	3.63	0	0
总计 947	751	79.3	31	3.27	164	17.31

表 3 68 株核酸碱基缺陷型中各类碱基缺陷型菌株所占的比例

核酸碱基缺陷类型	菌株数	占碱基营养缺陷型菌株总数的百分比
腺 嘌呤	46	67.6
尿 嘧 啶	9	13.23
胞 嘧 啶	3	4.41
鸟 嘌呤	4	5.88
双 缺 或 其 它	6	8.82

表 4 346 株氨基酸缺陷型中各类氨基酸缺陷型所占比例

氨基酸缺陷类型	菌株数	氨基酸缺陷类型	菌株数
苯丙氨酸	1	缬氨酸	6
组氨酸	64	甲硫氨酸	59
亮氨酸	21	脯氨酸	2
赖氨酸	27	丙氨酸	1
甘氨酸	7	胱氨酸	6
苏氨酸	29	半胱氨酸	1
异亮氨酸	5	组氨酸或赖氨酸	1
精氨酸	37	组氨酸或苏氨酸	1
丝氨酸	17	甲硫氨酸或缬氨酸	9
谷氨酸	41	谷氨酸或甲硫氨酸	1
色氨酸	7	(双缺)异亮氨酸,缬氨酸	3

其它嘌呤和嘧啶缺陷型则较少, 没有得到胸腺嘧啶缺陷型<sup>[17]</sup>。在氨基酸缺陷型中, 如表 4 所示, 以组氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸、精氨酸等缺陷型所占比例较大, 其它的类型则较少。

### 讨 论

实验结果表明 MNNG 在 pH 6 的 TM 缓冲液中较稳定, 在其它酸性或碱性条件下都易于分解, 而且它的分解产物也具有

诱变作用, 这将使对诱变效应的分析复杂化。本实验的目的是研究 MNNG 本身的诱变效应, 并且在预备实验中已观察到 pH 6 的诱变效果比较好, 所以均用 pH 6 的缓冲液进行处理。实验证明用这一 pH 值缓冲液, 突变率的确是高的, 这与 Adelberg<sup>[2]</sup> 等用 MNNG 诱发大肠杆菌 K<sub>12</sub> 产生突变菌株和抗缬氨酸回复突变菌株的结果一致。当然由于菌种的不同, 对处理时的 pH 值的要求也不同, 如 Drazic<sup>[11]</sup> 等用

MNNG 处理西藏高克氏菌 (*Gaffkya tibiscia*), Delić<sup>[30]</sup> 等用 MNNG 处理天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*), 所采用的最适 pH 都是 9, 但 Zimmermann<sup>[32]</sup> 等报道用 MNNG 诱导啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的腺嘌呤缺陷型菌株回变时, 所采用的最适 pH 却是 4。不论在 pH 4 或 pH 9 的条件下, MNNG 都起了分解作用, 此时的诱变效应就比较复杂, 本实验是在保持 MNNG 较稳定的条件下进行的。

在不用诱变剂处理时, 短小芽孢杆菌 AS 1.271 菌株在低 pH 值的缓冲液中不易存活, 但当用 MNNG 诱变处理时, 其存活率反而随着 pH 值的增高而显著下降, 这可能是因为碱性条件下 MNNG 的分解作用很强, 分解产物对该菌有强烈的致死作用, 而在酸性条件下 MNNG 的分解产物对菌的致死作用较弱, 因而当 pH 低时菌的存活率反而比 pH 值高的存活率高得多。这恰恰说明 AS 1.271 菌株不仅在低的 pH 值时存活率低, 同时对 MNNG 在碱性条件下的分解产物更加易于致死。

关于 MNNG 在碱性条件下分解形成重氮甲烷的问题曾有过报道。近年来 Chattop<sup>[33]</sup> 等报道, MNNG 在 pH 4.0、pH 8.0 时根本不产生重氮甲烷。本文结果可以肯定 MNNG 在碱性条件下分解作用很快, 可能其分解产物对 AS 1.271 菌株有强烈的致死作用。

为了获得大量的突变菌株, 用 MNNG 处理短小芽孢杆菌 AS 1.271 菌株的最适剂量为 1000 微克/毫升。但必须指出, 诱发最高突变率的剂量不一定是诱变育种的最适剂量, 在育种工作中, 往往用偏低的剂量时, 可获得较多的正变菌株, 而用偏高的剂量负变较多, 因此一般倾向于采用较低的剂量, 如上海工微所<sup>[44]</sup> 报道, 用 MNNG 诱变谷氨酸产生菌时, 用量为 350 微克/毫

升时, 其突变率为 50%。又如 Mayer<sup>[15]</sup> 等报道, 诱发啤酒酵母菌变异时仅仅 5 微克/毫升的剂量就获得了 18.1% 的突变率。由于 MNNG 具有高效的诱变作用, 所以育种工作中, 采用低剂量时, 突变率也不一定就低, 同时, 鉴于亚硝基胍对人具有致癌作用, 因此从防止它对环境的污染和使用时的安全出发, 尽可能采用低剂量也是必要的。不过对于多核细胞来讲, 情况可能并非如此。

实验观察到, 突变率的高低与诱变后的菌落形态之间有一定的相关性。即经过诱变之后, 凡是菌落形态出现明显的大小差异时 (如图 6 所示) 突变率就比较高, 反之如果菌落形态与未经诱变处理的菌落形态大小基本一致 (如图 7), 那么诱变效果往往不佳, 甚致毫无效果, 因此通过诱变后菌落形态的观察, 有助于判断诱变是否成功。上述菌落形态的现象, 在一些其它菌的诱变实验中也是存在的, 这可能是由于突变引起了菌体生长势的不同所致。但是在普遍现象之中也还存在着特殊性, 在几次实验中发现 40℃ 条件下诱变短小芽孢杆菌 AS 1.271 时, 虽然菌落形态的大小差异明显, 貌似诱变效果很好, 但是经过测定其突变率却非常低, 平均只有 0.68%, 甚致有时突变率等于零, 关于这种特殊现象的原因目前未作进一步的研究。

关于温度实验, Kasabara<sup>[16]</sup> 等曾报道, 用 MNNG 处理, 可可链霉菌 (*Streptomyces cacaoi*) 时, 其诱变效应与温度变化有明显的依赖关系, 但是在我们的实验中, 在 15℃ 至 40℃ 的温度范围内, 没有观察到这种依赖关系, 所以 MNNG 的诱变效应随着菌种不同, 菌的生物学特性不同, 它对温度条件的反应也是不同的。

仅从营养缺陷型的类型分析, 不同诱变条件下的诱变效果未见明显差异。至于

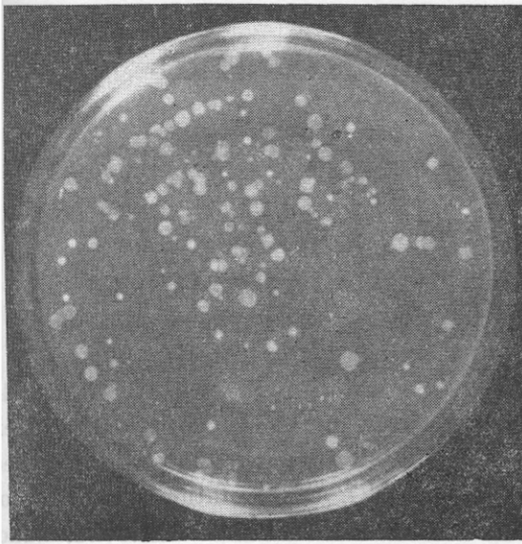


图6 经过诱变的菌落形态



图7 未经诱变的菌落形态

不同的诱变条件所获得的相同的营养缺陷菌株之间是否存在不同位点的诱变效应,这是今后值得探讨的。

实验未获得胸腺嘧啶缺陷型,这是由于未作特殊的分离筛选<sup>[17]</sup>,并不是表明MNNG不能诱发这一类营养缺陷型。

### 参 考 资 料

[1] Mandell, J. and Greenberg: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3: 575—577, 1960.  
 [2] Adelberg, E. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18: 788—795, 1965.  
 [3] Randazzo, R. et al.: *J. Bacteriol.*, 113: No. 1, 500—501, 1973.  
 [4] Malling, H. V. et al.: *Molec. gen. Genet.*, 106: 195—207, 1970.  
 [5] Kinball, R. F. et al.: *Mutation Res.*,

14 (2): 137—146, 1972.  
 [6] 徐功巧等: *微生物学报*, 16 (4): 304, 1976.  
 [7] Holliday, R.: *Nature*, 178: 987, 1956.  
 [8] 植村定治郎, 相田浩: *酵母と微生物 I*, 103 页, 朝仓书店, 1970。  
 [9] McKay, A. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (3): 3028, 1947.  
 [10] Delic, V. et al.: *Mutation Res.*, 9 (2): 162—182, 1970.  
 [11] Dazic, M. et al.: *J. Bacteriol.* 104 No. 1, 585—587, 1970.  
 [12] Zimmermann, F. K.: *Z. Vererbungsleh.*, 97: 68—71, 1965.  
 [13] Chattoo, B. B. et al.: *Mutation Res.* 23: 41—49, 1974.  
 [14] 上海市工业微生物研究所核苷酸组: *微生物育种学术讨论会文集*, 108 页, 科学出版社, 1975。  
 [15] Mayer, V. W. et al.: *Mutation Res.*, 9: 193—198, 1970.  
 [16] Kasahara, H. S. Udaka: *Agr. Biol. Chem.*, 35 (2): 226—232, 1971.  
 [17] Okada, T. et al.: *Nature*, 188: 340, 1960.

## MUTAGENIC EFFECT OF N-METHYL-NITRO-NITROSOGUANIDINE(MNNG) FOR *BACILLUS PUMILUS* AS 1.271

Xu Wanxue, Liu Huiping, Zhuang Zenghui

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

1. At pH 6 MNNG is stable but it decomposes rather rapidly under alkaline conditions. It is very sensitive to light irradiation, under which decomposition occurs.

2. The relationship between survival rate and mutation rate in *B. pumilus* strain AS 1.271 with various dosages of MNNG treatments, and the optimal conditions for the maximal mutation rate around 20% were established: The age of culture being immediately prior to logarithmic growth, in 0.05 M TM buffer pH 6, with 1000 mg/ml MNNG at 30°C

by 45 min.

3. Out of 1775 mutant strains 947 were tested for their nutritional deficiency. It was found that when treated with MNNG, the mutation spectrum of strain AS 1.271 is rather broad, auxotrophs deficient in either nucleotide bases, amino acids, or vitamins, and auxotrophs with double deficiencies. Adenine deficiency was most prevalent among base deficiencies, while histidine, glutamic acid, methionine, and arginine deficiencies were most prevalent among amino acid deficiencies.