

离子注入右旋糖酐生产菌的诱变效应研究*

罗大珍 王宇钢¹ 朱文 赵渭江¹ 马继霞

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

(¹ 北京大学重离子物理研究所 北京 100871)

离子注入作为一项新的生物诱变技术是近年发展起来的, 已引起国内外学者的极大关注^[1~3]。80年代中期, 我国学者已将低能离子注入技术应用于农作物诱变育种研究中, 取得了明显的效果。这对以后的拓宽诱变源、创造广泛的变异类型、选育高产优良的新品种, 具有重大的理论意义和实用价值。

离子注入和其他常规的辐射诱变及化学诱变过程有明显的差异。离子注入生物体时同时存在能量传递、动量交换、离子沉积及电荷积累过程, 而其他的辐射诱变仅仅是利用能量交换; 化学诱变考虑的也只是分子基团的交换。因此离子注入不仅兼有辐射诱变和化学诱变的特点与功能, 而且原则上可通过精确控制离子种类、注入参数, 使注入离子的能量、动量及电荷等根据需要进行组合, 为生物体的诱变提供了新的途径。

到目前为止, 离子注入诱变育种均在真空环境下进行, 一般限于使用干种子或冷冻样品。本研究采用 MeV 能量的离子束, 菌株可以处在溶液状态进行离子注入。我们利用北大重离子所的 4.5MV 静电加速器的专用管线, 试探对北大生命科学学院微生物室自行分离的右旋糖酐生产菌种进行了离子注入诱变育种的研究, 以进一步提高其产量。

右旋糖酐(Dextran)又称葡聚糖, 在医药工业上主要用于血浆体积的扩充剂即代血浆, 其硫酸酯有阻止代谢异常引起的高血脂动脉硬化的作用。在食品工业中可用于饮料、糕点制作中的稳定剂、保湿剂、增稠剂和增量剂; 在石油三次开采、金属选矿等的科研、生产中都有着广泛的用途。

1 材料和方法

1.1 菌种

肠膜状明串珠菌(*L. mesenteroides*), 由北京大学生命科学学院微生物实验室自行分离得到, 并已通过中国科学院微生物研究所的鉴定。

1.2 培养基

1.2.1 分离培养基(%) (W/V): 洋白菜 32, 蔗糖 13, 碳酸钙 0.65, 琼脂 1.5, pH 6.8~7.0;

1.2.2 发酵培养基(%) (W/V): 蔗糖 13, 蛋白胨 0.09, 酵母膏 0.13, K_2HPO_4 0.35, $MgSO_4$ 0.03, pH 7.0。

1.3 试剂

* 核工业科学基金资助项目。

本文作者还有王建勇¹, 李荣娟, 颜莎¹。

本文于1996年1月16日收到。

0.85%生理盐水, 95%乙醇溶液, 5%戊二醛溶液, 1%钨酸溶液, 乙酸异戊酯溶液, 0.1mol/L磷酸盐缓冲液(pH=7.0)。

1.4 仪器

北京大学4.5mV静电加速器; AMRAY1910FE型场发射扫描电子显微镜; 722光栅分光光度计; NDJ-1型旋转粘度计。

1.5 原始菌株的筛选

以静置发酵法, 从保藏的21株菌株中筛选出粗制品产量较高的菌株0161及3096, 由于3096具有产量稳定的优点, 便选其作为离子注入诱变的原始菌株。

1.6 离子注入细菌诱变条件的探索

1.6.1 菌悬液的制备及诱变过程: 取3ml生理盐水, 将培养到对数期的原始菌株斜面上的菌苔洗下, 以4000r/min离心洗涤3次, 再用同体积生理盐水制成菌悬液, 取0.01ml菌悬液置于样品盒中, 上覆25 μ m的Kapton膜, 然后将样品盒水平放入加速器真空靶室内进行离子注入。离子注入分6个剂量组, 注入离子为H⁺(质子), 能量E=2.4meV。作为对照, 另有一组样品也置于加速器的靶室内, 但不接受辐照。

1.6.2 存活曲线的测定: 经过离子注入诱变处理后, 将载有菌株的膜放入无菌水中振荡洗下菌体, 10倍稀释后取0.1ml涂布于分离培养基上, 28℃培养24h, 进行菌落计数, 统计存活率, 作出存活曲线。挑取单菌落接种到斜面培养基上, 25℃培养24h以供筛选。

1.7 诱变菌株的筛选

按文献[5]的方法, 将经过离子注入处理, 已培养24h的斜面菌苔, 用无菌水洗下, 倒入盛有100ml发酵培养基中, 25℃培养72h后, 用粘度计测发酵液的粘度值及用乙醇溶液提取获右旋糖酐粗制品, 称其湿重, 筛选出产量较高的菌株并连续传6代并进行发酵, 以选出产量高, 稳定性好的菌株。

1.8 扫描电镜样品的制备和观察

经离子注入处理的菌株和对照株作扫描试验, 按文献[4]方法, 用50%的戊二醛固定, 离心, 洗涤后用1.0%的钨酸溶液固定, 再用乙醇脱水等步骤。

2 结果和讨论

2.1 原始菌株的筛选

从21株保藏菌株中, 经发酵筛选出产量相对高的7株菌, 又从中挑选出右旋糖酐产量较高且稳定的A3096菌株作为原始菌株。

2.2 离子注入对A3096菌株诱变条件探索

将6个不同处理剂量的菌液及对照株菌液稀释后涂平板25℃24h培养后进行菌落计数。根据以上统计数据以存活率为纵坐标, 剂量为横坐标, 作出了A3096菌株离子注入的存活曲线图见图1。从图1可以看出菌体的损伤程度与注入离子剂量有关, 随着离子注入剂量的增大, 菌株的存活率减少。

在上面6种诱变剂量中各挑选出20株进行初筛, 发现离子注入剂量在

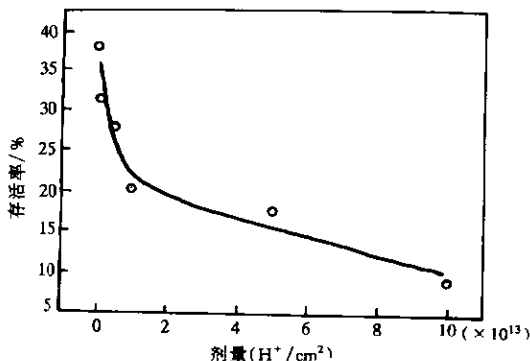


图1 离子注入3096菌株的存活曲线图

$1 \times 10^{12} \text{H}^+/\text{cm}^2 \sim 5 \times 10^{12} \text{H}^+/\text{cm}^2$ 范围内, 即存活率在 20%~30% 的条件下进行诱变处理效果较好, 获得的诱变菌株产量较高。在初筛的 100 株中, 选出右旋糖酐粗制品产量在 0.167g/ml 以上者 6 株进行复筛, 选出 H1122、H5122 二株产量较高的菌株, 其中 H1122 菌株产量比对照高出 36.5%, H5122 菌株产量较对照高出 11.5%。通过连续传代实验, 右旋糖酐产量保持稳定, 说明通过离子注入获得的诱变株产量提高性状是稳定的。

2.3 扫描电镜的观察

从扫描电镜图片(图 2, 3)上可以看出经离子注入处理的菌株表面有沟槽形成, 并有扭曲现象, 而对照的正常菌株表面光滑, 说明在离子注入过程中, 荷能离子通过能量传递导致菌株表面形变造成损伤。至于离子注入对核突变株 DNA 造成的损伤情况还有待于进一步研究。

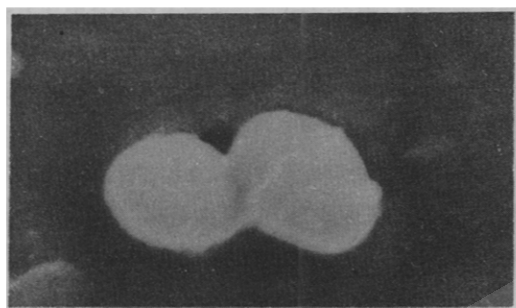


图 2 经离子注入的菌株表面(45200×)

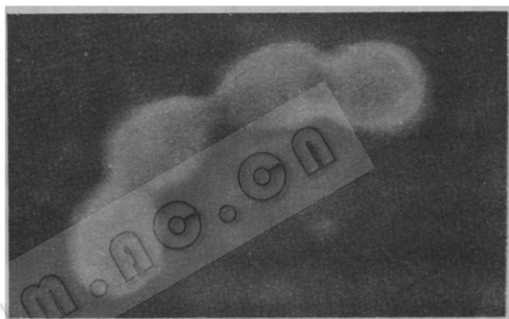


图 3 对照菌株表面光滑(29200×)

参 考 文 献

- [1] Yu Zengliang, Deng Jianguo, He Jianjun *et al.* *Nucl Instr and Meth*, 1991, **B59/60**: 705~708.
- [2] Yu Zengliang. China Nucl Sci Tech Report CNIC-00746, 1993.
- [3] Yu, Zengliang, Yang Jianbo, Wu Yuejin *et al.* *Nucl. Instr. and Meth*, 1993, **B80/81**: 1328~1331.
- [4] 朱丽霞, 高信曾, 陈乃乾编著, 生物学中电子显微镜技术. 北京: 北京大学出版社, 1983.
- [5] 钱存柔, 罗大珍, 孙淑丽, 微生物学报, 1981, **21(1)**: 102~106.

STUDY OF THE MUTAGENIC EFFECT OF THE ENERGETIC ION IMPLANTATION TO THE DEXTRAN PRODUCING STRAIN

Luo Dazhen Wang Yugang¹ Zhu Wen Zhao Weijiang¹ Ma Jixia

(Microbiological laboratory, School of Living Science, Peking University, Beijing 100871)

(¹ Institute of Heavy Ion Physics, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Using ion implantation with H^+ of 2.4 meV produced from 4.5 mV electrostatic accelerator, we studied the mutagenic effect on the dextran producing strain-*Leuconostoc mesenteroides* in aqueous solution. The survival curve of the primary implanted strain was obtained in the ion dose ranging from 5×10^{11} ions/cm² to 1×10^{14} ions/cm². After ion implantation, more than one hundred mutant strains were selected. It was found that the production of dextran with large deviation from the control, about the 90% selected strain, were lower than that of the control, but other 10% were higher. Twenty strains were further screened, two mutant strains were selected. One of its productions was 11.5% and the other was 36.5% higher than that of the control. The production of the dextran anhydride maintained stable after six times of continuous transplantation of the culture. We found that the growth rate of a large part of the implanted strains was slower and the growth period was postponed because of the damage induced by energetic ion bombardment. From the SEM (scanning electronic microscopy) observation, the form of the implanted strains was changed indicating the cell damage was due to the ion induced mutagenic effect.

Key words Ion implantation, Strain damage, Mutation, Dextran producing strain