

简报

# 紫外线和氯化锂对棒状杆菌原生质体的诱变作用

杜珠还 张泉渡\* 华祖尧\*\*

余红 应伟均 陈学旺

(浙江大学生命科学研究室, 杭州)

有关微生物原生质体融合的研究已有不少报道<sup>[1-5]</sup>。这一方法不仅可用于微生物遗传的研究, 也为育种工作开辟了一条新途径。众所周知, 在用原生质体融合方法育种之前, 必先对两个亲本加上遗传标记, 有时要有两个以上标记。此项工作费时费力, 并且对生产菌株标记后往往会影响菌体活力和一些有用的性状。为了克服上述缺点, 我们设想: 如果对原生质体直接进行诱变处理, 则简便易行, 又可能使诱变效果大为提高。本文以北京棒状杆菌为材料, 用两种诱变剂处理原生质体, 观察其对赖氨酸产量的影响, 并以菌体细胞为对照, 探索了这一新方法应用于育种工作的可能性, 获得较为满意的结果。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 菌种: 北京棒状杆菌(*Corynebacterium pekinense* AS 1.563-90, Hser<sup>-</sup>、AHV<sup>+</sup>、AEC<sup>+</sup>。

2. 培养基: (1)用于制备原生质体的全部培养基参照文献[6]; (2)摇瓶发酵培养基组分(%): 葡萄糖12, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, 玉米浆1.0, 糖蜜2.0, 毛发液2.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.0, CaCO<sub>3</sub> 4.5, pH7.0。12磅10分钟灭菌。

3. 有关溶液: (1)DF稀释液: 0.25M

蔗糖, 0.25M丁二酸钠, 0.001M EDTA, 0.02M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.11M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01M MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0。10磅10分钟灭菌; (2)青霉素溶液: 称取青霉素G钾盐(1667u/mg, 上海东风厂出品) 50mg配成1667u/ml母液, 稀释至166.7u/ml备用; (3)蛋清溶菌酶溶液: 称取蛋清溶菌酶50mg(上海东风厂出品) 加入5mlDF液使成10mg/ml溶液。

### (二) 方法

1. 实验用菌株的获得: 以北京棒状杆菌 AS 1.563 Hser<sup>-</sup> 为出发菌株, 经紫外线和紫外线加氯化锂二次诱变获得 AS 1.563 Hser<sup>-</sup>, AHV<sup>+</sup>, AEC<sup>+</sup> 菌株, 编号为 AS 1.563-90。

2. 原生质体的制备: 参照文献[6] 并加以改良的方法。加入青霉素G 的量为 0.7u/ml, 用2mg/ml 浓度蛋清溶菌酶处理对数期细胞, 37℃保温2.5h制备原生质体。

3. 原生质体形成率和再生率的计算: 参照文献[6]。

4. 诱变处理

紫外线诱变: 将溶菌酶处理前的菌液离心, 收集菌体, 悬于原体积盐水中, 加

本文于1984年12月30日收到。

\* 中国科学院上海植物生理研究所

\*\* 上海食品研究所

玻璃珠摇动 15min, 制成菌悬液; 溶菌酶处理后的离心菌体以 DF 液洗二次, 悬于原体积 DF 液中制成原生质体悬液。分别以 15W 紫外灯 (距离 28cm) 照射 1、2、3、4 min。照射后的菌液以生理盐水稀释, 原生质体悬液用 DF 稀释后涂于高渗平板上, 30℃ 培养 2 天, 计算紫外线对菌体和原生质体的致死率。挑取照射 1 min 的原生质体单菌 100 株测定赖氨酸产量。

紫外线和氯化锂复合处理: 取菌悬液和原生质体悬液各 3 ml, 以紫外灯照射 1.5min 后经稀释涂于含 0.3% 氯化锂的高渗平板上, 30℃ 培养 2 天, 挑取单菌测定赖氨酸产量。

5. 赖氨酸定量测定: 将测定菌移接新鲜肉汁斜面, 30℃ 培养 24h, 转接发酵培养基 (16ml/250ml 三角瓶), 往复式摇床 (98次/分, 冲程 74m/m), 31℃ 培

养 3 天。发酵液沉淀 1h (除去  $\text{CaCO}_3$ ) 后, 以赖氨酸脱羧酶测定 L-赖氨酸 HCl 产量。

## 结果与讨论

### (一) 原生质体的形成和再生

以相差显微镜连续观察, 分别比较了不同溶菌酶浓度、温度和酶作用时间对原生质体形成的影响。结果表明, 当溶菌酶浓度为 2mg/ml 时, 37℃ 保温 2.5h 原生质体形成率最高 (图 1)。我们按上述条件制备原生质体, 综合四次实验结果, 原生质体形成率可达 99.6—100%, 原生质体再生率为 1.0—1.8%。原生质体再生率较低的原因, 可能和所用青霉素浓度、高渗培养基成分有关。有实验结果表明, 在一定浓度范围内随着青霉素浓度的增加, 原生质体形成率相应增高, 而再生率则逐渐



图 1 北京棒状杆菌 AS 1,563-90 的菌体细胞和原生质体

A. 菌体细胞 ( $\times 3,750$ );

B. 原生质体 ( $\times 2,400$ )

下降<sup>[6]</sup>。为了得到较高比例的原生质体供诱变用, 采用了较高浓度的青霉素 (0.7u/ml)。另外, 实验所用的高渗培养基系加入 0.5M 蔗糖配制, 在此培养基上原生质体再生率相对较低。

(二) 紫外线对原生质体和菌体细胞的致死作用

原生质体和菌体细胞分别经 15W 紫外灯 (距离 28cm) 照射不同时间, 其致死率如图 2 所示。

由图 2 可见菌体细胞比原生质体对紫外线更为敏感。经紫外线照射 1min, 菌体细胞死亡率为 96.7%, 原生质体为 33%。照射 2min 后, 菌体细胞死亡率达 99.99%,

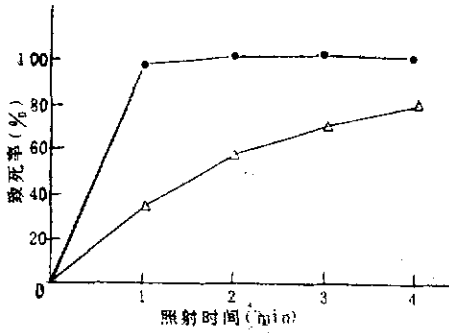


图 2 紫外线照射不同时间对原生质体和菌体细胞的致死率 (%)  
 ·—· 菌体细胞; △—△ 原生质体

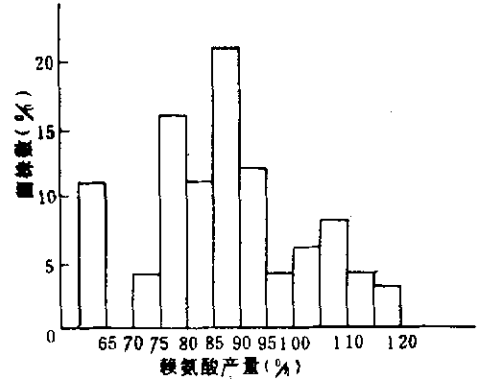


图 3 经紫外线照射后原生质体再生株的产酸量变化  
 AS 1.563-90 的赖氨酸生产水平为 100%

而原生质体只有 57%，相差约 100 倍。这一结果不符合我们原来的设想即原生质体失去了细胞壁的障碍，对紫外线应更为敏感。分析其原因，可能由于原生质体处在高渗溶液中接受照射，高渗溶液对它起了保护作用。下述实验支持了这一推测：将菌体细胞和原生质体分别悬于 DF 液中，用紫外线照射 2min，菌体细胞死亡率降至 92.3%；原生质体则为 57%，二者差距大大缩小。在相同溶液系统中接受紫外照射后，菌体死亡率仍比原生质体略高的原因可能由于原生质体粘连成团，不如菌体细胞分散均匀，因而紫外线对每个原生质体照射不够均等所致，也可能是原生质体内遗传物质对紫外线的反应发生了某种变化所造成的。

**(三) 紫外线对原生质体产量性状的影响**

挑取经紫外线照射 1min 后，由原生质体再生的单菌 100 株测定其赖氨酸产量。测定结果表明：经紫外线照射后的原生质体产酸量发生了变化（见图 3）。如以出发菌株 AS 1.563-90 产酸量为 100% (28.5mg/ml)，则照射后负责菌株超过正变株数。产酸量低于原株 10% 的负变率为

53%，高于原株 10% 的正变率为 7%。正变菌株虽不多，但产酸量提高的幅度达 20%。我们从中选出一株产酸量高于原株 20% (34.2mg/ml) 的菌株。

**(四) 紫外线和氯化锂复合处理对原生质体和菌体细胞产量性状的影响**

选取经紫外线和氯化锂复合处理的原生质体和菌体细胞单菌分离株各 80 株测定其产酸量。图 4 揭示出原生质体和菌体细胞复合处理后赖氨酸产量与菌株数的关系

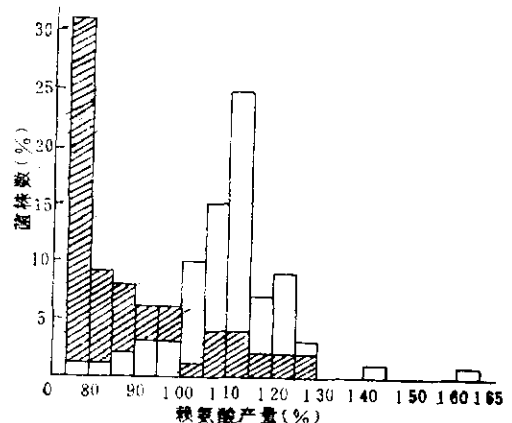


图 4 紫外线和氯化锂处理后原生质体和菌体细胞的赖氨酸产量变化

□ 原生质体; ▨ 菌体细胞

系。由图可见,原生质体的正变株数大大高于菌体细胞,而负变株数大大低于菌体细胞。从产量变化幅度来看,原生质体的正变幅度大于菌体细胞,而负变幅度远远小于菌体细胞。这些都说明,用原生质体进行诱变,可显著提高正变株数和正变幅度,比用细胞直接诱变更易得到高产菌

株,比用原生质体融合的方法育种更为简便,是一种可行的育种新方法。

运用这一新方法,我们从紫外线和氯化锂复合处理的原生质体中选出一株产酸量高于原株65% (L-赖氨酸47.1mg/ml)的菌株,可供工业生产应用。现正进行上罐试验。

### 参 考 文 献

- [1] Schaeffer, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:2151—2155, 1976.
- [2] Fodor, K. and L. Alföldi: *ibid*, 73:2147—2150, 1976.
- [3] KANEKO, H. and K. SAKAQUCHI: *Agric. Biol. Chem.*, 45(5):1009—1013, 1979.
- [4] Hopwood, D. A. et al.: *Nature*, 268:171—174, 1978.
- [5] Coetzee, J. N. et al.: *Journal of General Microbiology*, 114:313—322, 1979.
- [6] 乔宝义, 徐浩: *微生物学报*, 23(1):33—34, 1983.