

氦氖激光对棘孢小单孢菌诱变育种的研究

黄凌燕 刘秀珍 葛忠良

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

Studies on the mutation breeding of micromonospora echinospora using He-Ne laser

HUANG Lingyan, LIU Xiuzhen, GE Zhongliang

(Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

Abstract For increasing the production of Gentamicins, a He-Ne laser was used to mutate the protoplast of *Micromonospora echinospora*. The strain a was obtained through experiments which could produce more Gentamicins than the original one.

Key words Gentamicins, mutation breeding, protoplast regeneration, He-Ne laser

小单孢菌是具有巨大潜力的抗生素产生菌,可产生包括氨基甙类、大环内脂类、多肽类等多种抗生素。庆大霉素是氨基甙类第二代产品。在获得优质高产的氨基甙类抗生素产生菌的选育中,目前仍是以诱变为主。但是常规方法中都是对孢子及菌丝进行诱变,正突变率较低,不易筛选到产量增高的菌株,因而有必要进行改进。本实验采用氦氖激光辐照小单孢菌的原生质体,获得了提高产量的菌株,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌株

棘孢小单孢菌 *Micromonospora echinospora*, 短小芽胞杆菌 *Bacillus pumilus*。

1.2 培养基

(1) 斜面培养基(g/l): 淀粉 0.8, 磷酸氢二钾 0.05, 硫酸镁 0.05, 氯化钠 0.05, 天冬素 0.002, 硝酸钾 0.1, 麦麸 2, 琼脂 1.5, 碳酸钙 0.1, PH 7.6~7.8。

(2) 原生质体再生培养基: 斜面培养基补充蔗糖 0.2 mol, 氯化镁 0.05 mol。

(3) 菌丝培养基(g/l): 牛肉膏 1.0, 酵母膏 1.0, 蛋白胨 3.0, 葡萄糖 10, 硫酸镁 0.5, 硝酸钾 1.0, 磷酸氢二钾 0.3, 氯化镁 2.0, 天冬素 0.02, PH 7.2~7.5。

(4) 发酵培养基(g/l): 淀粉 5.5, 黄豆粉 4, 葡萄糖 0.5, 碳酸钙 0.5, 硫酸铵 0.05, 硝酸

钾 0.05, 氯化钴 0.6, 蛋白胨 0.3, 油 1 滴。

(5) 生物效价测定培养基(g/l): 牛肉膏 0.3, 蛋白胨 0.5, 磷酸氢二钾 0.3, 琼脂 1.95; PH 7.8~8.0。

1.3 培养条件

(1) 斜面培养, 37 °C 温箱中培养 10 天;

(2) 菌种发酵, 从成熟的小单孢菌斜面上定量取下菌种, 接种入发酵培养基中, 32 °C 180 rpm 培养 7 天。

1.4 效价测定

用琼脂扩散法测定效价, 检定菌为短小芽胞杆菌。

1.5 棘孢小单孢菌原生质体制备

参考文献[1,2]。

1.6 辐照方法及筛选

用本所 He-Ne 激光器辐照, 光束直径为 2.5 mm, 波长为 633 nm, 输出功率为 20 mW。取 8 份孢子及原生质体悬液, 在 20 mW 输出功率密度下分别照射 0, 4, 8, 32, 60, 120, 240 和 480 s。取上述照射后的样品, 稀释, 取适量涂平皿, 37 °C 培养, 10 天后从各皿中将长出的单个菌落传代培养(20~30 个菌落), 成熟后, 摇瓶振荡培养, 测效价以筛选阳性株。

$$\text{诱变效应评价: 突变率 \%} = \frac{\text{平皿突变菌落数(个)}}{\text{平皿菌落总数(个)}} \times 100\%$$

1.7 电镜观察

用 FL-4000 型透射电镜($\times 7 \times 10^4$)观察。

2 实验结果

2.1 He-Ne 激光对棘孢小单孢菌的致死作用

按材料和方法所述对棘孢小单孢菌孢子及原生质体进行处理, 剂量取决于辐照时间, 在 $4.5 \sim 3.1 \times 10^6 \text{ J/m}^2$ 能量密度范围内, 激光辐射并不能使活菌数减少。

2.2 不同照射剂量下的正、负突变率

为了解小单孢菌的突变类型及其频率与诱变剂量的关系, 我们分别选取了不同诱变剂量处理后长出的菌落, 进行抗生素效价测定, 结果见图 1。

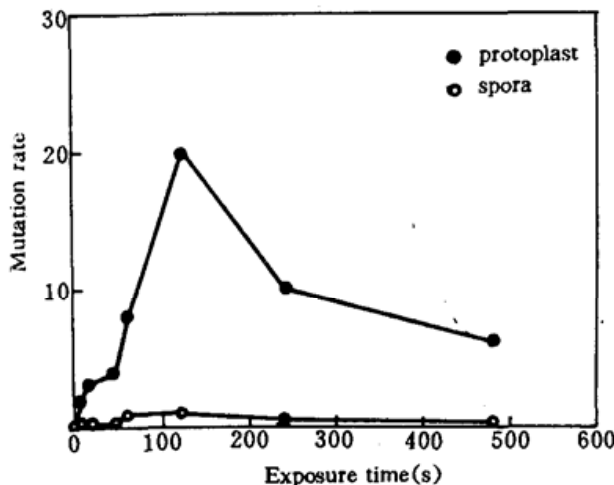


Fig. 1 Relationship between He-Ne laser exposure

dose and mutation rate of spora and protoplast

图中 0 s 的数据是经自然分离后获得的菌株。有两种类型, 一种是庆大霉素效价比亲株增加的正突变类型, 另一种是明显减少的负突变类型。从图中可见, 随着处理时间延长, 正突变类型频率增加, 照射 2 min 时, 对原生质体及孢子处理都可获得最高正突变率, 原生质体最高正突变率为 20%, 而孢子的正突变率为 1%, 说明利用原生质体代替孢子作为诱变育种的材料, 将会进一步提高诱发突变的几率, 从而使诱变育种的效率也会进一步得到提高。

2.3 多次 He-Ne 激光照射的诱变作用

从表 1 中可见, He-Ne 激光对棘孢小单孢菌原生质体影响逐渐加强, 通过微小突变的积累最终出现效价比出发菌株高的菌株。

Table 1 Effect of numbers of He-Ne laser exposure on the productivity of strain

Exposure number	Experiment	Sample	Antibacterial activity
control	3	6	1890±121
1	3	6	2095±88
3	3	6	2250±78
5	3	6	2418±97*

$\bar{X} \pm SD$ * $P < 0.01$

Table 2 Comparison J_1 and J_1A strain colony shape

	Colour of strain colony	Colony diameter (mm)	Colour of spora
J_1	orange	4.5~5	brown, less spora
J_1A	black	1~1.5	black, more spora

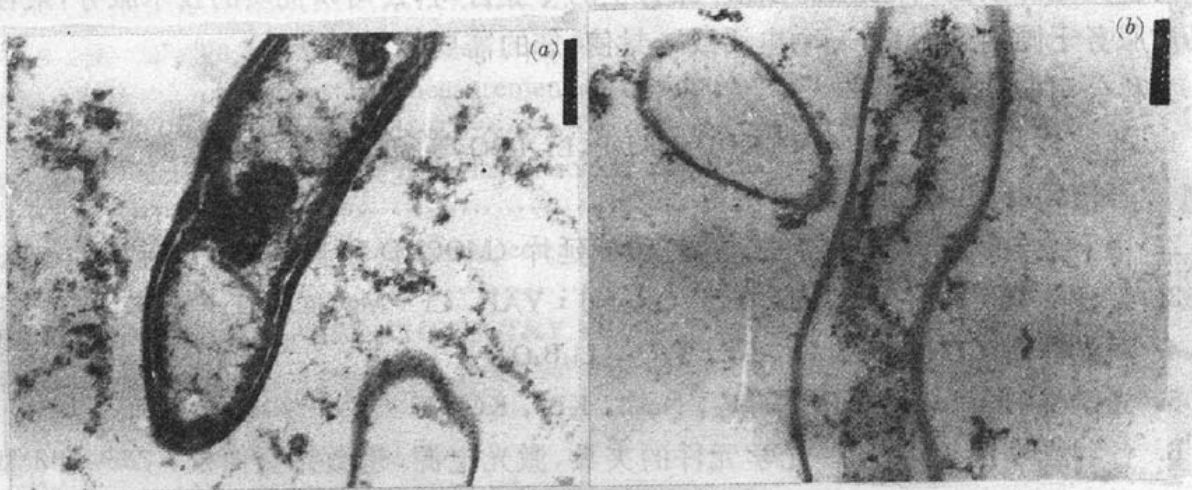


Fig. 2 The microphotograph of a transmission electron microscope of the strain J_1 and mutant J_1A

2.4 高产菌株的特性

应用 He-Ne 激光连续辐照棘孢小单孢菌的原生质体, 分离得到高产菌株 A, 其产量提高 27.1%, A 菌株的庆大霉素小组份组成比例及 Rf 值与原出发菌株相似。A 菌株不仅在产抗的能力上发生了变化, 其菌株形态也发生了变化, 见表 2。同时对诱变前后菌株进行透射电镜观察可见, 诱变后菌株细胞膜变薄, 代谢活跃, 见图 2。图中 (a) 为诱变前, (b) 为 He-Ne 激光诱变后。

3 讨论

利用波长为 633 nm, 线偏振光的 He-Ne 激光辐照小单孢菌的原生质体, 在照射 2 min 时可获得最高正突变率。并证明, 低能量的 He-Ne 激光对辐照的菌体没有致死作用, 只是影响不同代谢过程的发展, 至于这种影响是有利于菌株的正突变还是不利于这种突变, 显然决定于辐射剂量等实验条件。Kapho 曾通过实验证明在一定的能量密度范围内, 波长在 610~650 nm 的 He-Ne 激光对细胞内 DNA 合成有刺激作用, 即加速细胞内 DNA 合成速率^[3]。这是否是引起诱

变后菌株 A 产量增加的原因, 还需证实。

参 考 文 献

- 1 Okanish *et al.*, *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 389(1974)
- 2 郑幼霞 *et al.*, *生物工程学报*, **3**(2), 115(1987)
- 3 北京光学学会, 激光医用专业委员会编译, *激光医学基础与临床*, 人民卫生出版社, 1989, 261

(收稿日期: 1992 年 10 月 6 日; 收到修改稿日期: 1993 年 2 月 16 日)

力科光电有限公司向国内外用户致意

力科光电有限公司是经营光电产品为主的专业公司, 公司以优质的技术服务, 最佳的品质服务于国内外用户, 一个电话或一封信, 您的需要就得到满足。

力科公司向您提供:

1. 非线性晶体: KTP, ADP, KDP, DKDP, LI, LBO 等和这些晶体制作的二倍频器、三倍频器、四倍频器、Q 开关等;
2. 用于微电子和光电子器件的衬底和外延片 (MOCVD 和 MBE);
3. 激光晶体: Nd: YAG, Nd: YVO₄, Nd: YAP, Cr: Mg₂SiO₄, Ti: Al₂O₃;
4. 声光晶体: LN, PbMoO₄, LT, TeO₂, Li₂B₄O₇;
5. 光学材料: CaF₂, BaF₂, MgF₂, NaCl, KBr, KCl;
6. 各种光学调整架, 各种光学元件的夹具, 激光电源, 超微光摄像机, ZJD-003 型激光打孔机, 激光图像通讯机, TXK 人体死后时间测定仪, 便携式激光痕迹检查仪, 便携式多波段激光痕迹检查仪, 半导体激光报警器;
7. 提供您在济南的各种服务, 如住宿, 车票, 接待。车票请提前四天电告 831365。力科公司将在全国各地招聘业务员, 愿者请来信来电, 待遇从优。
8. 力科公司愿与各界同仁通力合作, 可为厂矿、企业推销产品, 请寄说明书和合作意向。

力科光电有限公司
 济南市七里河路 32 号
 邮 编: 250100
 联系人: 祁建平
 传 真: 0531-837760
 电 话: 0531-831365

上海联系电话: 4701390-207 陈以超
 9534890-262 冯贤平
 传真: (021)9528885
 北京联系电话: 7711177-722 李 港
 传真: 7714088