

双向复合磁场在诱变育种中增变作用的研究

杨生玉¹ 卫 军² 刘宇鹏¹ 沈永红¹

(河南大学生命科学学院 开封 475001)¹ (郑州轻工业学院食品与生物工程系 郑州 450002)²

摘要: *Nocardia* sp. HD9611 经双向复合磁场 + UV 复合诱变处理, 与单纯 UV 处理的结果相比, 其诱变致死率和营养缺陷型突变率均有明显提高, 并且经双向复合磁场 + UV 复合诱变处理所筛选出的菌株酶活比单纯 UV 处理的对照菌株平均酶活相对提高 17.2%。

关键词: 双向复合磁场处理, 诺卡氏菌, 紫外线

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0082-05

STUDIES ON THE SYNERGISM OF TWO-WAY COMPOUND MAGNETIC FIELD TREATMENT IN MUTAGENESIS

YANG Sheng-Yu¹ WEI Jun² LIU Yu-Peng¹ SHEN Yong-Hong¹

(College of Life Science, Henan University, Kaifeng, 475001)¹

(The Department of food and Biology Engineering, Zhengzhou Institute of Light Industry, Zhengzhou 450002)²

Abstract: Under the treatment of two-way compound magnetic field + UV, the death rate and the mutation rate of autotrophy of *Nocardia* sp. HD9611 are evidently higher than those only treated with UV. After the treatment of magnetic field + UV, the average enzymatic activity of strains we have isolated have an evident increase of 17.2% when compared with those treated only with UV.

Key words: Two-way compound magnetic field treatment, *Nocardia* sp., Ultraviolet

目前, 在微生物诱变育种中常采用的诱变因子有紫外线 γ 射线 亚硝基胍等物理和化学诱变剂, 但这些常规诱变剂在长期使用后, 其诱变“热点”逐渐趋于钝化^[1]; 通过采用复合处理的办法扩大其基因突变范围, 达到“热点”互补, 并可弥补 DNA 分子对某些因子的不亲和性, 以提高诱变效果, 本文报道了双向复合磁场在复合处理中所起的增变作用^[2,3]。

本试验以 *Nocardia* sp. HD9611 作为出发菌株, 来研究双向复合磁场处理在诱变育种中的增变作用。该菌株通过发酵产生脲水合酶, 以丙烯脲为原料, 在该酶的催化下产生丙烯酰胺。通过研究, 复合因子处理后的菌株较出发菌株酶活提高了 37.9%^[4,5]。

1 材料与方 法

1.1 菌 株

Nocardia sp. HD9611, 由河南大学生命科学学院微生物室提供。

1.2 培 养 基

1.2.1 斜面培养基: 葡萄糖 1g, 酵母膏 0.5g, NaCl 0.1g, K₂HPO₄ 0.2g, 琼脂 1.5g, 蒸馏水 100mL, pH7.2, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20min。

1.2.2 基本培养基 (MM): K₂HPO₄ 1g, KH₂PO₄ 0.05g, (NH₄)₂SO₄ 0.1g, 柠檬酸钠

收稿日期: 2002-11-14, 修回日期: 2003-01-06

0.05g, 蒸馏水 100mL, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 20min。

1.2.3 完全培养基 (CM): 葡萄糖 2g, 酵母膏 0.2g, 尿素 0.7g, K_2HPO_4 0.05g, KH_2PO_4 0.05g, $MgSO_4$ 0.02g, 味精 0.1g, 蒸馏水 100mL, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 20min。

1.2.4 发酵培养基: 葡萄糖 20g, 酵母膏 2g, 尿素 7g, K_2HPO_4 0.5g, KH_2PO_4 0.5g, $MgSO_4$ 0.2g, 味精 1g, 微量元素若干, 加水至 1000mL, pH7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20min。

1.3 培养条件

斜面培养: 27℃, 48h。摇瓶发酵培养: 28℃, 转速 220r/min, 96h。

1.4 实验仪器

磁场处理器 (WQ-002 型, 焦作新新应用技术研究所提供), 气相色谱仪 (GC17A 型, 日本岛津分析仪器公司), 摇瓶柜 (HYG-II 型, 上海欣蕊自动化设备有限公司), 紫外可见分光光度计 (TU-1201 型, 北京通用仪器设备公司)。

1.5 诱变因子和处理方法^[6,7]

1.5.1 UV 处理: 用无菌生理盐水将斜面培养 48h 的菌体洗下制成菌悬液, 取菌悬液 5mL 加入直径 9cm 的无菌培养皿中, 打开皿盖在 15W 紫外灯下 30cm 处照射不同时间, 照射时用磁力搅拌器进行搅拌。

1.5.2 双向复合磁场处理: 取菌悬液 5mL 加入直径 9cm 的无菌培养皿中, 用 WQ002 型微生物处理器进行处理: 磁场 1, $S1 \leq 18W$; 磁场 2, $S2 \leq 20W$; 场强 0.1T, 右档, 3 档, 处理 15min。

1.5.3 UV、双向复合磁场复合处理: 将菌悬液先按 1.5.1 进行 UV 处理, 然后再按 1.5.2 进行双向复合磁场处理; 或先按 1.5.2 双向复合磁场处理, 然后再按 1.5.1 进行 UV 处理。用以上两因子对试验菌株进行复合处理, 并比较两因子的不同处理顺序对处理结果的影响。

1.5.4 营养缺陷型的检出: 将经以上方法处理后的菌液进行适当稀释后接种在 C.M. 上, 27℃ 培养 48h, 用影印法分别接种到 M M、C M 上进行培养, 分别测算出营养缺陷型突变率。

1.6 突变株的筛选

用摇瓶发酵法以脲水合酶的酶活为筛选依据; 挑取 CM 平板上的菌株接种在发酵培养基中进行发酵培养, 每个菌株 3 瓶, 发酵完成后测定发酵液中脲水合酶的酶活, 筛选出平均酶活最高的菌株, 经多次传代培养同时进行摇瓶发酵检测脲水合酶的酶活性, 并对该菌株进行遗传稳定性检测。

1.6.1 酶活测定^[8,9]: 将 10mL 发酵液离心后收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次, 重新加入生理盐水至 10mL, 制成菌悬液, 在 50mL 三角瓶中加入 1mL 菌悬液和 19mL 0.025N 磷酸缓冲液, 25℃ 恒温振荡 5min, 用精密移液管加入 1mL 丙烯腈, 计时振荡 5min 进行反应, 反应结束后加入 4N 的盐酸溶液 200 μ L 终止水合反应; 将反应液离心后取上清液于样品瓶中, 在样品瓶中加入 4.0% 乙酰胺 1mL 作为内标物, 混匀; 用气相色谱法测定其中丙烯酰胺含量。规定在 1min 内催化丙烯腈生成 1 μ mol 丙烯酰胺的酶量定义为一个脲水合酶活力单位。

1.6.2 丙烯酰胺含量的测定: 将样品稀释到一定浓度, 然后采用气相色谱法测定其含

量。色谱柱：30m × 0.53mm 毛细管柱；固定液：OB - 225 (50% - Cyanopropylphenyl) Metylpolysiloxan；汽化室温度：240℃；氢焰温：240℃；氮气流量：20mL/min；空气流量：650 mL/min；灵敏度1,000；程序升温；进样量：0.5μL；内标法测定。

2 结果与讨论

2.1 诱变致死率的比较

分别按照 1.5 中的步骤进行诱变处理，经过 3 种方法处理的实验菌株诱变致死率比较见图 1。

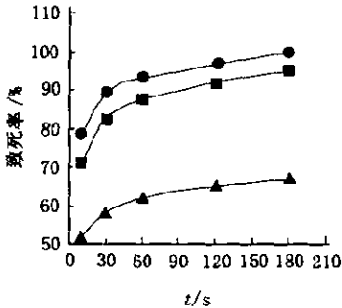


图1 *Norcardia* sp. HD9611 菌株经 3 种因子处理后其致死率的比较

● 双向复合磁场 + UV, ■ UV, ▲ 双向复合磁场

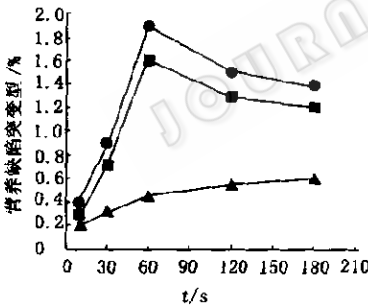


图2 *Norcardia* sp. HD9611 经 3 种因子处理后其营养缺陷型突变率的比较

● 双向复合磁场 + UV, ■ UV, ▲ 双向复合磁场

由图 1 可看出，随着 UV 照射时间的增加，该菌株的致死率也相应增加；在 3 种因子当中，由于双向复合磁场是一温和型的因子，所以在相同时间内，其致死率也最低，但是，双向复合磁场 + UV 复合处理的致死率则明显高于其他 2 种单因子处理的致死率（由于复合磁场在 15min 时，效果最好，所以复合因子处理顺序为：先复合磁场处理 15min，再用 UV 处理）。

2.2 营养缺陷型突变率的比较

按照 1.5.4 中的步骤进行营养缺陷型的检出，该菌株分别经过双向复合磁场处理、UV 处理、双向复合磁场 + UV 复合处理后菌株的营养缺陷型突变率见图 2。

由图 2 可看出，在相同时间内，该菌株经双向复合磁场 + UV 复合处理后的营养缺陷型突变率明显高于其他 2 种单因子处理后的营养缺陷型突变率。在单因子处理中，复合磁场在 15min 时，效果最好，UV 在 60s 时的营养缺陷型突变率最高，所以复合处理的时间顺序为：先用复合磁场处理 15min，再用 UV 处理 60s。

2.3 复合处理的顺序对酶活性的影响

在复合处理中，我们注意到处理顺序对酶活性的影响，我们分别采用先双向复合磁场后 UV 处理和先 UV 后双向复合磁场处理，发现复合处理的顺序对酶活性有一定影响，顺向（双向复合磁场 + UV）处理和逆向处理（UV + 双向复合磁场）都有协同作用，但比较起来，顺向处理效果好，主要表现在高酶活正变株的比例高，顺向处理正变株达 23%，逆向处理正变株为 10%。

2.4 高酶活突变株的筛选

2.4.1 双向复合磁场处理：以 HD9611 菌株为出发菌株，双向复合磁场处理，处理条件见 1.5.2，平行实验 5 次，挑取单菌落，摇瓶发酵后测酶活，筛选出 5 株酶活力最高的菌株结果见表 1。

2.4.2 UV处理:以HD9611菌株为出发菌株,UV处理(时间为1min),平行实验5次,挑取单菌落,摇瓶发酵后测酶活,筛选出5株酶活力最高的菌株结果见表2。

表1 双向复合磁场处理结果对照表

菌株	酶活 (u/mL)	酶活提高率 (%)
出发菌株 HD9611	912	
XHD0073	1055	15.7
XHD0136	1042	14.4
XHD0223	1064	16.7
XHD0281	1047	14.8
XHD0415	1031	13.0

表2 UV处理结果对照表

菌株	酶活 (u/mL)	酶活提高率 (%)
出发菌株 HD9611	912	
YHD0125	1034	13.3
YHD0249	1062	16.4
YHD0387	1015	11.3
YHD0443	1077	18.0
YHD0514	1049	15.0

表3 双向复合磁场+UV处理结果对照表

菌株	酶活 (u/mL)	酶活提高率 (%)
出发菌株 HD9611	912	
ZHD0161	1251	37.1
ZHD0290	1200	31.5
ZHD0311	1258	37.9
ZHD0482	1152	26.3
ZHD0532	1217	33.4

表4 双向复合磁场+UV复合处理所筛选出的新菌株的遗传稳定性

菌株	各代酶活 (u/mL)					
	1	2	3	4	5	6
ZHD0161	1251	1205	1172	1191	1182	1205
ZHD0290	1200	1145	1108	1119	1232	1124
ZHD0311	1258	1211	1175	1179	1186	1197
ZHD0482	1152	1143	1125	1130	1119	1127
ZHD0532	1217	1195	1199	1176	1182	1173

由表4可看出经双向复合磁场+UV复合处理所筛选出的菌株具有良好的遗传稳定性,这说明该诱变方法所产生的优良性状是能够稳定遗传的,比较适合于用作生产菌株的诱变选育。

以上结果表明:①双向复合磁场具有增变作用,当将其与UV复合处理 *Nocardia* sp. HD9611 菌株时,诱变致死率和营养缺陷型的诱发率都有所提高。说明其可增加基因突变的频率和提高正向突变,是一种有效的诱变因子。②我们将试验菌所产脲水合酶作为测定指标,当双向复合磁场与UV复合处理时,菌株的酶活较2种单因子分别处理时都有所提高,较单纯UV处理时平均提高了17.2%。③当复合处理顺序不同时,其诱

2.4.3 双向复合磁场+UV处理:以HD9611菌株为出发菌株,经双向复合磁场+UV处理,平行实验5次,挑取单菌落,摇瓶发酵后测酶活,筛选出5株酶活力最高的菌株结果见表3。

由表1、表2、表3可看出,双向复合磁场处理,突变株酶活力最高可提高16.7%,UV诱变处理,突变株酶活力最高可提高18%,采用双向复合磁场+UV复合处理所筛选出来的突变株酶活力最高可提高37.9%,明显高于前两个单因子处理筛选出来的菌株,相比之下平均酶活相对提高率为17.2%。这说明在UV处理时添加磁场作用后对于筛选该诺卡氏菌的高酶活突变株有比较明显的增变作用。

2.4.4 经双向复合磁场+UV复合处理所筛选出的新菌株的遗传稳定性实验:我们对经双向复合磁场+UV复合处理所筛选出来的酶活性最高的菌株进行了遗传稳定性检测,经5次传代和发酵培养,各代发酵实验结果见表4所示。

变结果也不相同。这就说明,两种诱变因子之间相互作用,并对诱变结果产生较大的影响,所以,在进行诱变处理时要注意复合处理的顺序。④通过试验表明,复合处理所产生的基因突变具有良好的遗传稳定性,尤其是产量正变株。

综上所述,我们认为在微生物菌种选育中,常规诱变剂在长期使用后,其诱变“热点”逐渐趋于“钝化”,菌株对于诱变剂的反应处于迟钝状态,复合因子可以弥补一种因子多次诱变容易产生的“热点”饱和,可以弥补DNA分子对某些因子的不亲和性,从而产生增变效应,提高诱变效果,而双向复合磁场是采用交变磁场效应,通过磁场调整转换的方法,产生较明显的生物学效应,尤其是在复合处理中。所以,双向复合磁场可作为一种方便有效的诱变因子用于微生物菌种诱变选育工作中。

参 考 文 献

- [1] Gascon J, Oubina A, Ana P, *et al.* *Current Microbiology*, 1995, 30 (3): 177~182.
- [2] 孟庆云, 张 鹏. *微生物学通报*, 2000, 27 (3): 185~188.
- [3] 王德培, 高大维, 彭志英, 等. *微生物学通报*, 1998, 25 (1): 17~19.
- [4] 马士忠, 刘 冰, 范守荣, 等. *生物学杂志*, 2000, 17 (3): 28~29.
- [5] Nagasawa T, Yamada H. *Pure and applied chemistry*, 1990, 162 (7): 1441~1444.
- [6] 杨生玉, 柳世儒, 谢秉姿, 等. *中国抗生素杂志*, 1990, 15 (6): 412~417.
- [7] 陈红歌, 苗雪霞, 张世敏, 等. *微生物学通报*, 1997, 24 (5): 272~276.
- [8] 王 浩. *微生物学杂志*, 1996, 16 (4): 17~22.
- [9] Asano Y, Yasuda T, Tani Y, *et al.* *Agric boil Chem*, 1982, 41 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>