

低能 N^+ 离子、紫外线和 ^{60}Co 射线对绛红小单孢菌产庆大霉素的诱变效应初步研究

吴健 苏明杰 戴桂馥 王卫东 张书 李宗伟 王雁萍 秦广雍 霍裕平

(郑州大学离子束生物工程省重点实验室 郑州 450052)

袁天阳 严欣 甘崇洁

(开封制药厂 开封 475003)

摘要 研究了以庆大霉素生产菌绛红小单孢菌为供试菌株,比较了低能 N^+ 离子、紫外线和 ^{60}Co 射线对绛红小单孢菌的剂量存活效应和诱变效果。结果发现, N^+ 离子注入的存活曲线与紫外线、 ^{60}Co 射线辐照不同,即紫外线, ^{60}Co 射线照射绛红小单孢菌的剂量存活曲线均是指数曲线,而 N^+ 离子注入呈复杂下降、上升、再下降的趋势,而且3种辐射在诱变效应上也有很大的差异。在相同死亡率条件下,紫外线诱变率低,但正变多于负变,而 ^{60}Co 射线诱变率高,负变远远多于正变。适当剂量的 N^+ 离子注入表现出诱变率高、正变率高及正变幅度大的特点,效果更像紫外+LiCl 的复合诱变。并确定了 N^+ 离子注入绛红小单孢菌的适宜诱变剂量是在存活率高峰处附近。

关键词 离子注入, 绛红小单孢菌, 紫外线, ^{60}Co 射线, 诱变, 庆大霉素
中图分类号 Q691.5, Q937, 0434.2

庆大霉素是由绛红小单孢菌或棘孢小单孢菌产生的一族多组分的氨基糖苷类抗生素。由于小单孢菌特殊的遗传背景,特别是孢子壁厚,对诱变剂不敏感,使庆大霉素发酵一直处于比较低的水平^[1]。已有研究表明^[2-6],许多诱变措施都能引起菌株较大的形态变异、组份改变或产生新的抗生素,但有关庆大霉素产量提高的报道很少、效价提高的幅度也是极其有限的。因此选择有效的诱变措施,确定适当的诱变剂量是获得优良诱变效果的关键。而重离子辐射具有质量沉积和能量沉积双重作用。因而低能离子注入作为一种新的有效的诱变手段,在农作物和微生物育种中都取得了显著的成绩^[7-10]。但是,关于离子注入的剂量与诱变效果的关系,以及离子注入与经典的物理诱变措施相比有哪些特点未见有研究报道。庆大霉素产量性状是一种数量性状,这种性状是由多基因控制的。如果外界生长条件保持一致,这种产量性状的变化,从本质上来说主要反映了遗传性状的变化。本工作以这一宏观性状为指标,以庆大霉素生产菌绛红小单孢菌为出发菌株,考察并比较了 N^+ 离子注入与紫外线诱变、 ^{60}Co 射线诱变的效果,并确定了 N^+ 离子注入绛红小单孢菌的

适宜诱变剂量范围。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

绛红小单孢菌(*Micromonospora purpurea*)由河南开封制药厂提供。

1.2 鉴定菌

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)

1.3 培养基

参见有关文献配制^[11]

1.4 诱变处理

1.4.1 孢子悬液制备 刮取适量孢子于生理盐水中,振荡打散、过滤、稀释浓度约为 1×10^6 /mL。

1.4.2 诱变 N^+ 离子注入,将上述制备好的单孢子悬液均匀涂布于载玻片上,无菌风吹干后接受离子注入。离子注入处理在本实验室的离子注入机的微生物专用小靶室内进行。离子源是俄罗斯科学院西

国家 95 重大科技攻关项目 (96-538-01-01-09)

第一作者:吴健,男,1961年2月出生,1985年毕业于中国农业大学硕士,微生物专业,副研究员,在读博士生

收稿日期:初稿 2001-12-18,修回 2002-07-24

伯利亚分院强电研究所制造的Titan脉冲式全元素离子源。束流为200mA,频率为25Hz,脉冲宽度为400 μ s,真空度约为 3×10^{-2} Pa— 5×10^{-2} Pa。注入能量为30keV, N⁺注入剂量依次为 $1.0 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ 、 $5.0 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ 、 $1.0 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 、 $2.5 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 、 $5.0 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 、 $7.5 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 、 $1.0 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 、 $2.5 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 。离子注入后,用浸有无菌水的无菌脱脂棉球将经诱变处理的孢子洗脱到加有玻璃珠的无菌水中,用振荡器打匀。

1.4.3 紫外线诱变 紫外灯功率是15W,照射距离30cm。吸取5mL单孢子悬液加入直径9cm的培养皿中,置于磁力搅拌器上,边搅拌边照射。照射时间分别为0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0min。紫外线与LiCl的复合处理是向照射后的孢子液中加入等体积的1%的LiCl。

1.4.4 射线诱变 分别吸取1.5mL单孢子悬液加入10mL 指形管中接受辐射。辐射源由河南省科学院同位素研究所提供,照射剂量分别为0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5kGy,剂量率为900rad/min。

1.5 筛选和测定

1.5.1 培养条件 分离平板于34 $^{\circ}$ C培养14d,斜面于37 $^{\circ}$ C培养8d。培养好的斜面于4 $^{\circ}$ C冰箱冷藏15d以上进摇瓶发酵,条件为30—250mL,34 $^{\circ}$ C,220r/min,发酵周期为116h。

1.5.2 统计与测定 所有实验组与对照组的存活菌数采用活菌记数法统计。N⁺离子注入每个剂量的存活率是相对于该剂量只接受相同时间的真空处理而言。紫外线、射线诱变的存活率是分别相对于未接受照射而言。每个剂量点重复3次,取平均值

作为该剂量点的存活率。产量变化率采取对照和处理均同时随机挑取30个单菌落进行发酵测定庆大霉素产量的方法计算。在实验同时的对照处理中,产量波动均在15%以下。因此,参照文献[12]—[14],将效价比出发株提高15%者称为正变,降低15%者为负变。

2 结果和分析

2.1 N⁺注入剂量对绛红小单孢菌(Micromonospora Purpurea)存活率和诱变效果的影响

在30keV能量下,不同剂量N⁺注入绛红小单孢菌得到如图1所示的存活曲线。从图1中可以看出,存活率并不是随着注入剂量的增加逐渐下降,而是 $1 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ 、 $5 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ 、 $1 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 3个低剂量处理的存活率非常低,随着注入剂量的增高,存活率迅速上升,当注入剂量为 5×10^{15} N⁺/cm²时,存活率最高达11.7%。随着注入剂量的进一步增加,存活率逐渐降低。为了进一步探讨这种特殊的剂量存活效应对产量变异的影响,作了关于产量变异的统计,在存活率高峰处以及其两侧的结果见表1。

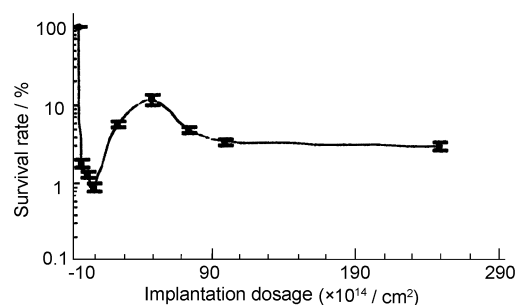


Fig.1 Survival curve of *Micromonospora purpurea* by implanting N⁺.

Tab.1 The induction effects of N⁺ implanting on *Micromonospora purpurea*

| Dose N ⁺ /cm ² | Survival negative rate % | Mutation rate % | Positive mutation rate % | Negative mutation rate % | The highest positive mutation % | The highest mutation rate % |
|--------------------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 1×10^{15} | 0.9 | 20.0 | 11.4 | 8.6 | 28.3 | 36.6 |
| 5×10^{15} | 11.7 | 17.5 | 10.0 | 7.5 | 36.0 | 42.0 |
| 1×10^{16} | 3.4 | 31.8 | 13.6 | 18.2 | 33.6 | 26.7 |

由表1可知,在 $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 剂量处产量总变化率明显增大,而且负产量变化率也明显增大,与存活率高峰的 $5 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 剂量相比,诱变效果有一定变化,负产量变化率超过了正产量变化率,但在这两点都获得了高产菌株。另外,在 5×10^{15} — $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 剂量这一区域内,存活率比较高,这

对离子束育种也是很重要的。因为离子束育种处理的量相对较小,高存活率意味着可以得到比较多的可供筛选菌数。在实际育种工作中,大量的高产突变株也主要是在这一区域获得的。而在 $1 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 剂量下,存活率比较低,最大产量正变幅度也较小,不是理想诱变剂量。

2.2 紫外线和 射线对绛红小单孢菌存活率和诱变效果的影响

图 2 和图 3 分别给出了紫外线和 射线处理

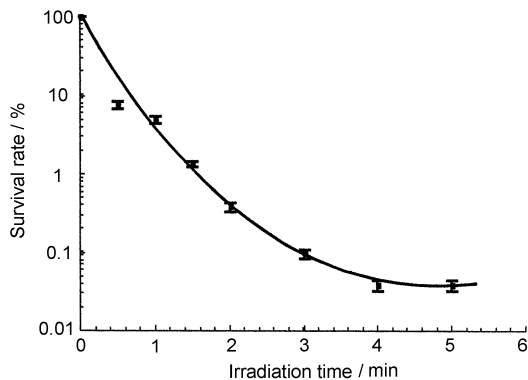


Fig.2 Curve for the survival rate's of *Micromonospora purpurea* by irradiating UV.

绛红小单孢菌的存活曲线。结果表明,虽然紫外线是非电离辐射,而 射线是电离辐射,然而两者的剂量存活曲线都随着剂量的增加而呈现单方向下降趋势,与图 1 所示的结果不同。

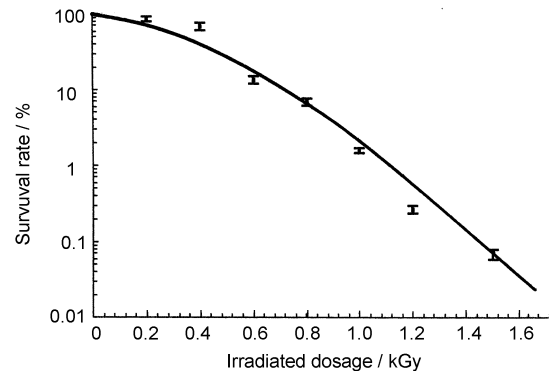


Fig.3 Curve for the survival rate's of *Micromonospora purpurea* by irradiating ^{60}Co .

Tab.2 The induction effects of UV and ^{60}Co on *Micromonospora purpurea*

| Irradiation dose and | Survival rate % | Mutation rate % | Positive mutation rate % | Negative mutation rate % | The highest positive mutation rate % | The highest negative mutation rate % |
|---------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| UV (2min) | 0.38 | 10.3 | 6.9 | 3.4 | 21.9 | 52.0 |
| UV+ LiCl (2min) | 0.96 | 18.8 | 11.1 | 7.7 | 29.7 | 52.0 |
| UV+ LiCl (4min) | 0.0096 | 20.0 | 13.3 | 6.7 | 28.7 | 52.1 |
| ^{60}Co (0.6kGy) | 13.5 | 23.3 | 9.9 | 13.4 | 18.9 | 27.0 |
| ^{60}Co (1.2kGy) | 0.27 | 33.3 | 3.3 | 30.0 | 18.1 | 84.8 |

表 2 为 射线和紫外线对绛红小单孢菌的诱变结果,它表明, 射线处理随着剂量的增大,产量总变化率显著增加。与此同时,产量正变率大幅度降低,产量负变率大幅度上升。紫外线照射 2min 和用 1.2kGy 的 射线处理的存活率相当,但对绛红小单孢菌的诱变效应却有很大的不同。 射线产生的产量总变化率是紫外线的 3 倍,而正变率不及紫外线的 1/2。 射线诱变绛红小单孢菌产生了大量的负变株,而且负变的幅度比紫外线大。降低射线的辐照剂量,提高存活率,仍不能和紫外线诱变处理效果相比。当辐射剂量为 0.6kGy 时,产量总变化率降到 23.3%,负变率仍然高于正变率,正变率虽有所提高,但正变幅度没有提高。紫外线+LiCl 的复合诱变处理效果明显好于单一紫外线的处理。复合诱变不仅提高了产量总变化率,而且还提高了正变率和正变幅度。

将表 1 和表 2 的结果进行比较可以看出,仅就存活率而言, $1 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 剂量注入与单用紫外线照射

2min, 紫外线 2min+LiCl 的复合诱变或用 1.2kGy 的 射线处理这三种方法的存活率相当。但是,其产量总变率、正变率、负变率和正变幅度均高于单一紫外处理,而和紫外线+LiCl 的复合诱变效果相当或更好一些。

3 结论

(1) 本研究得到的 N^+ 离子注入绛红小单孢菌的剂量效应存活曲线有别于紫外线照射、 射线辐照的存活曲线。无论是非电离辐射的紫外线,还是电离辐射的 射线,随着剂量的增加,存活率同步下降。然而, N^+ 离子注入绛红小单孢菌的存活曲线呈复杂下降、上升、再下降的图形。关于低能 N^+ 离子注入其他菌株也存在类似存活曲线的报道^[15],所不同的是在实验中存活率的第一次下降不是缓慢的,而是在很低的剂量下出现了存活率的骤降。研究中多次试图通过降低剂量,得到较高的存活率,但没有成功。本研究的结果再一次证明了这种“马鞍型”曲线的存在。

(2) 在 30 keV 能量下,用低能 N^+ 注入绛红小单孢菌提高庆大霉素产量的适宜诱变剂量为存活高峰 $5 \times 10^{15} - 1 \times 10^{16} N^+ / cm^2$ 附近。这种模式是否具有广泛性,它反映了怎样的一种生物机制?还有待进一步研究。近年来许多研究指出^[16],在低剂量条件下照射后 DNA 双键断裂(dsb)情况,并不能代表细胞存活能力的强弱,而在培养修复后,残余 dsb 减少,细胞的存活能力越强。说明,细胞 DNA 的修复能力是细胞生存的关键因素。由此可以推论得到离子束照射下存活曲线的一种解释:在小剂量时未能激活 DNA 修复系统,导致低存活率;当剂量增大至某一阈值后激活 DNA 修复系统,从而使存活率反而上升。随着剂量的增加,错配修复造成的诱变增加,得到较大增产能力的正诱变菌株机率也增加。然而随着剂量的进一步增大, DNA 被破坏占了主导地位,致使存活率下降,这种现象可能是低水平辐射兴奋效应的一种表现形式。

(3) 通过庆大霉素产量的变化可以看出, N^+ 注入绛红小单孢菌有诱变率高、正变率高和正变幅度大的优点。显著优于另外两种物理诱变措施,也优于紫外+LiCl 的复合诱变处理。射线诱变表现出诱变率高,但负变率较高及负变幅度较大的特点,这与离子注入有很大区别。与射线相比,射线因其,故穿透能力强,仅有能量沉积;而 N^+ 离子束传能线密度(LET)高,能在较小的范围内沉积大量的能量、质量和电荷,从而能在生物介质中产生高密度的电离和激发事件^[17,18]。两者造成的后果截然不同,这两种效果的差异,提示了两种电离辐射的差异,更深入的工作有待进行。

参考文献

- 1 还连栋. 抗生素, 1986, 11(4): 368-375
HAI L D. J Antibiot, 1986, 11(4): 368-375
- 2 赵敏,范瑾,胡小玲等. 抗生素, 1984, 9(2): 90-93
ZHAO M, FAN J, HU X L et al. Antibiot, 1984, 9(2): 90-93
- 3 Odakura Y. J Antibiotics, 1983, 36(2): 125-130
- 4 郑榕. 中国抗生素杂志, 1994, 19(6): 415-420
ZHENG R. J Chinese Antibiot, 1994, 19(6): 415-420
- 5 赵敏, 范瑾, 柏建新等. 中国抗生素杂志, 1997, 22(1): 12-15
ZHAO M, FAN J, BO J X et al. J Chinese Antibiot, 1997, 22(1): 12-15
- 6 杨丽. 青岛化工学院学报, 1999, 20(1): 48-51
YANG L. J Qingdao Inst Chemical Technol, 1999, 20(1): 48-51
- 7 邬振祥, 李素梅, 伊国香等. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3): 321-325
WU Z X, LI S M, YI G X et al. J Anhui Agricul Univ, 1994, 21(3): 321-325
- 8 郑冬宫, 方其英, 黄德祥等. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3): 315-317
ZHENG D G, FANG Q Y, HUANG D X et al. J Anhui Agricul Univ, 1994, 21(33): 315-317
- 9 罗大珍, 王宇钢, 朱文等. 微生物学报, 1997, 37(4): 312-315
LUO D Z, WANG Y G, ZHU W et al. Acta Microbiol Sin, 1997, 37(4): 312-315
- 10 颜红梅, 卫增泉, 李文建等. 中国抗生素杂志, 1998, 23(464): 462-463
XIE H M, WIE Z Q, LI W J et al. J Chin Antibiot, 1998, 23(464): 462-463
- 11 戴桂馥, 吴健, 李宗伟等. 郑州大学学报(自然科学版), 1999, 31(2): 65-69
DAI G F, WU J, LI Z W et al. J Zhengzhou Univ (Nucl Sci), 1999, 31(2): 65-69
- 12 余增亮. 离子束生物技术引论, 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996. 248-249
YU Z L. Introduction Ion Beam Biotechnology, Publishing House Anhui Science Technology. 1996, 248-249
- 13 褚志义. 生物合成药理学, 北京: 化学化工出版社, 1999. 93-101
ZHU Z Y. Biosynthetic Materia Medica, Chemical Ind Publ House. 1999, 93-101
- 14 朱法科, 林炜铁, 鲍时翔等. 工业微生物, 1999, 29(6): 1-4
ZHU F K, LIN W T, BAO S X et al. J Ind Microbiol, 1999, 29(6): 1-4
- 15 宋道军, 姚建铭, 邵春林等. 核技术, 1999, 22(3): 129-132
SONG D J, YAO J M, SHAO C L et al. Nucl Tech, 1999, 22(3): 129-132
- 16 郑秀龙. 放射医学核医学分册, 1999, 22(3): 129-132
ZHENG X L. Radiol Med Sci, 1999, 22(3), 129-132
- 17 Alpen E L. Radiation Biophysics Prentics Hall, 1990
- 18 Tobias C A Radiat Revs, 104 (Suppl), S77-95, 1985

PRELIMINARY STUDY ON THE EFFECTS OF LOW ENERGY N⁺ IONS, UV AND ⁶⁰Co- ON THE GENTAMYCIN
YIELD OF MICROMONOSPORA PURPUREA

WU Jian SU Mingjie DAI Guifu WANG Weidong ZHANG Shu LI Zongwei WANG Yanping
QIN Guangyong HUO Yuping

(Henan Provincial Key Lab. of Ion Beam Biotechnology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

YUAN Tianyang YAN Xin GAN Chongjie

(Kaifen Pharmaceutical Factory, Kaifen 475003)

ABSTRACT The effect of 30 keV N⁺ ions, UV and ⁶⁰Co -rays on the survival and the gentamycin yield of *Micromonospora purpurea* were investigated. A saddle-like survival curve was found *Micromonospora purpurea* treated with N⁺ ions, whereas the curves of those irradiated by UV and ⁶⁰Co -rays were exponential. Comparisons of the induction indexes indicated that the N irradiation was more advantageous than UV and the -rays. Based on the experiments, it is concluded that induction doses of $0.5 \sim 1 \times 10^{16} / \text{cm}^2$, i.e. the doses correlating to the peaks of the survival curve, are suitable for high yield of gentamycin.

KEYWORDS Ion implantation, *Micromonospora purpurea*, UV, ⁶⁰Co, Mutation, Gentamycin

CLC Q691.5, Q937, O434.2