



微生物突变体的富集方法

徐定邦 李文通

(上海新型发酵厂,上海)

自 1948 年 Davis 等开创青霉素富集法以来,有关微生物突变体的富集方法有了很大发展,分离各类突变体的效率提高了几十、几百、甚至几千倍。本文将这些方法的原理,主要操作步骤和近年来应用的发展作一归纳,供参考。

一、抗生素富集法

四十年代初,当青霉素用于临床后不久,人们就发现青霉素只能杀死那些能生长繁殖的细菌,却不能杀死不能生长繁殖的细菌。有人便设想,在含青霉素的基本培养基中,野生型菌株将会被杀死,而营养缺陷型菌株则会被保留,这样,后者即可富集。Davis 等^[1]用大肠杆菌证实了这种设想,创立了青霉素浓缩法,后来人们还使用过其它抗生素。故可统称为抗生素富集法。

方法的主要步骤是先将经诱变处理后的菌在完全培养基(以下简称 CM)或补充了生长因子的基本培养基(以下简称 MM)上培养,使突变体的表型表达,然后进行选择培养,即将长出的细胞离心、洗涤,悬浮于不含某种生长因子的合成培养基中,使原养型和其它营养缺陷型突变体进入对数生长期,而所需的营养缺陷型菌株(即需要合成培养基中未含某种生长因子的)则保持休止状态。然后加入抗生素,作用若干小时,再将处理后的菌液涂布于补加了生长

因子的合成培养基上,长出菌落后影印复制于 MM 上。

1. 青霉素浓缩法: 此法使用最早,几十年来有了许多改进。1975 年 Fitzgerald 等^[2]简化了方法,将诱变后表型表达了菌体直接涂布于含 2000 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素的 MM 上,24 小时后用 4000u/ml 青霉素酶作用 1 小时使青霉素分解,然后复以含 100 $\mu\text{g/ml}$ 某生长因子的培养基琼脂,培养数天后,长出的菌落中,有相当比例的菌落是需该因子的营养缺陷型。

表 1 列出了青霉素与其它药物或抗生素并用以增强富集效果的实例。

另外,改变选择培养条件,用青霉素富集法可以富集其它突变株。如以亚硝酸为碳源可富集缺失亚硝酸还原酶的突变株^[7],有人还用此法富集过缺失光复活性状的大肠杆菌,效率达 3000 倍^[8]。

2. 制霉菌素浓缩法: 1966 年 Snow 等^[9]用制霉菌素富集过腺嘌呤缺陷型的酵母菌,使缺陷型菌株的获得机率提高了一万倍。其处理方法与青霉素浓缩法基本相同。但在诱变及表型表达后,必须将菌体作若干小时的氮饥饿处理(视不同菌,时间长短不同),耗尽菌体内贮备的氮源。然后转入含氮 MM,若干小时后原养型菌株进入对数生长期,再加入制霉菌素。否则营养缺陷型的存活大受影响。

表 1 青霉素与其它药物并用富集突变体

菌 名	青霉素浓度	其它药物浓度	文 献
假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	10u/ml	甘氨酸 3%	[3]
恶臭假单胞菌 (<i>Ps. putida</i>)	1000u/ml	环丝氨酸 0.1mg/ml	[4]
根癌土壤杆菌 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	羧苄青霉素 500 $\mu\text{g/ml}$	卵白溶菌酶 100 $\mu\text{g/ml}$	[5]
乙酸钙不动杆菌 (<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)	青霉素 V 1000 $\mu\text{g/ml}$	万古霉素 500 $\mu\text{g/ml}$	[6]

此法用于富集丝状真菌时,由于丝状真菌在液体完全培养基内进行表型表达培养时会形成菌丝体,需要改变方法。一种方法是用固体 CM 培养,然后洗下孢子进行富集。用这种方法富集构巢曲霉的营养缺陷型、效率达一千倍^[10]。另一方法是将经诱变的孢子涂布于 MM 平板,当原养型孢子萌发后覆盖一层含制霉菌素的 CM,杀伤原养型营养体,而营养缺陷型孢

子在制霉菌素逐渐失效后慢慢萌发并长成菌落。有人用这种方法富集产黄青霉和构巢曲霉的营养缺陷型及缺失纤维素酶的绿色木霉突变株^[11-13]。同样,此法也可用来富集各种突变菌株^[14-17]。

3. 其它抗生素富集法: 富集对青霉素、制霉菌素有抗性的菌株,可采用其它抗生素,现择要列表说明之(见表 2)。

表 2 其它抗生素富集法

抗 生 素	浓 度 ($\mu\text{g/ml}$)	菌 种	富 集 效 果	文 献
2-甲氧苄基青霉素	66	蜡状芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	营养缺陷型占存活菌落 80%	[18]
双氢链霉素	400	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	营养缺陷型占 26/385, 对照为 1/1870	[19]
卡那霉素	20	鼻疽放线杆菌 (<i>Actinobacillus mallei</i>)	营养缺陷型占存活菌 13—75%	[20]
两性霉素		啤酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	不利用乳糖突变株占 318/86500, 对照为 9/133500	[21]
萘啶酮酸	20	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	营养缺陷型占 14/566 对照为 0/389	[22]
纺锤菌素	10	多头绒泡菌 (<i>Physarum polycephalum</i>)	温度敏感突变株占 4/193, 对照 0/2000	[23]
D-环丝氨酸	0.33	恶臭假单胞菌 (<i>P. putida</i>)	模拟试验富集 10^4 倍	[24]
放线菌酮	100	裂褶菌 (<i>Schizophyllum commune</i>)	营养缺陷型富集 500 倍	[25]

二、饥饿法

此法又称双重缺陷法。用于挑选以营养缺陷型突变株为出发菌株而发生进一步突变的菌株。由于营养缺陷型菌株在不合其必需生长因子时会死亡,但若同时发生了其它代谢障碍突变,则其不平衡生长反而可能被克服,因而免于死亡,所以可以被富集。现举数例说明之。

1. 肌醇饥饿法: 1959 年 Lester^[26]将经诱变和表型表达的肌醇缺陷型粉红色链孢霉 (*Neurospora crassa*) 培养于 MM 中, 4 天后, 在存活的菌落中, 81% 为需要肌醇和另一种生长因子的双重营养缺陷型。这种方法的主要缺点是出发菌株易回复为原养型, 这就严重影响了富集效果。为此 Henry 等^[27]选择二个基因座位同时发生突变的肌醇缺陷型为出发菌株, 使回复突变为减少, 用这种方法富集突变体的效率可达千倍以上。为了简化操作, 可将诱变后的菌液直接涂布 MM 平板, 一周后覆盖含肌醇和其它生长因子的培养基, 从长出的菌落中可挑选到双缺陷菌株。

2. 脂肪酸饥饿法: 七十年代初发现, 需要饱和或不饱和脂肪酸才能生长的啤酒酵母, 当培养基中不含脂肪酸时, 即迅速死亡。但加入蛋白质合成抑制剂则可减少其死亡率。所以与肌醇饥饿法一样, 可用脂肪酸饥饿法富集突变菌株^[28]。

3. 二氨基庚二酸 (DAP) 合成障碍突变株的获得: DAP 是赖氨酸的前体, 又是细胞壁组成成分之一。在加有赖氨酸的合成培养基中, DAP 合成障碍突变株虽能生长, 但不能合成细胞壁, 因而会自溶死亡。但是, 如果该突变菌株同时发生其它代谢障碍突变, 则因为生长不平衡状态得到克服而不会死亡。这样, 后一类突变株就能被富集。例如以大肠杆菌的 DAP 合成障碍突变株为出发菌株, 在补充赖氨酸的合成培养基中, 由 10^7 个细菌中得到 32 个菌落, 其中 24 个是氨基酸缺陷型^[29]。

三、过滤法

这类方法利用突变株和野生菌株间形态大小的差别富集突变体。

用此法可以富集丝状真菌的营养缺陷型,因为丝状真菌原养型的孢子在 MM 中能发芽长成菌丝体,可被棉花等过滤介质截留,而不能发芽的营养缺陷型孢子则易被过滤,相对地被富集了。但操作时必须控制孢子浓度,过滤次数,过滤时间等,以避免孢子被吸附,缺陷型饥饿死亡和孢子自溶释放出因子。这种方法简单,效果也好。例如用玻璃棉为过滤介质,富集裂褶菌营养缺陷型,营养缺陷型占存活菌的 80%。

用这种方法也可以富集细菌形态突变体。例如,有一种大肠杆菌温度敏感突变株,在高温培养时细胞因分裂障碍而形成伸长细胞。用过滤法可以富集^[30]。

四、离心分离富集法

这类方法利用突变菌株与野生型的细胞比重差异来达到富集突变体的方法。

例如,用酒石酸钾或 Cs_2SO_4 密度梯度离心法可分离出 RNA 含量增高的突变体;用连续 Urogafin 梯度离心分离因发育障碍而细胞异常膨大的芽孢杆菌温度敏感突变体^[31]。

另外,利用此法还可以分离细胞分裂控制失调的粟酒裂殖酵母温度敏感突变株。该突变株在菌体长到 7—8 μm 时即开始分裂,而亲本原始菌株要长到 14 μm 时才开始分裂,二种细胞比重不同,用 7.5—30% 乳糖梯度离心,即可分离^[32]。

五、利用对高温或低温的抗性进行富集

由于芽孢和营养体对高温的低抗性差异明显,所以将经诱变的芽孢杆菌芽孢培养于 MM 中。当原养型菌株长成营养体后,用沸水加热。存活的芽孢中相当一部分是营养缺陷型菌株。其富集效果优于青霉素富集法。

总状毛霉的孢子对低温有抵抗力,但萌发至芽管期时对低温却十分敏感。Peters 等^[33]将诱变后长出的第二代孢子在 MM 上培养 15 小时,此时原养型孢子进入芽管期,然后置于一 20℃ 12 小时,然后用温水融化。如此反复二

次,存活菌中营养缺陷型占 70%。

六、溶菌酶法

近年来发现,菌体的“年轻”或“年老”,对溶菌酶的敏感性不同。Ferenczy 等^[34]根据此原理,以粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)为材料,证明了用溶菌酶富集突变体的效果。他用蜗牛消化酶处理腺嘌呤缺陷型和原养型的混合培养物,结果存活的几乎完全是腺嘌呤缺陷型。Sipiczki 等^[35]报道,加溶菌酶处理之前用 2-脱氧葡萄糖处理,可增加富集效果。用木霉产生的某种酶代替蜗牛酶也能得到好结果。

七、³H-自杀术

³H 标记的碱基或氨基酸被微生物摄入细胞组份中以后,由于 ³H 的 β 衰变作用而使细胞死亡。由于各种原因而停止合成核酸或蛋白质的突变体,不摄取 ³H 标记的前体,因而不会死亡。Lubin 首先用 ³H-尿嘧啶成功地富集了大肠杆菌营养缺陷型。

这种方法的具体操作与抗生素浓缩法基本相同。但在加入标记化合物作用若干时间后,需将菌体离心,洗涤并悬浮于无氮或无碳培养基中,于 4℃ 保存一周或更长时间,使未摄取标记化合物的细胞既不繁殖又不死亡,而摄取的几乎全部死亡。

这种方法的最大优点是可以比较定向地富集丧失合成某种大分子能力的温度敏感突变株。例如 Wu 等^[36]用这类方法曾富集了丧失脂蛋白合成或装配能力的温度敏感突变株。

八、其它致死合成法

正在生长的细胞因摄取碱基类似物而易死亡,不生长的突变体则因未摄取而存活,由此可被富集。因此,将经诱变的大肠杆菌培养于含 5-溴尿嘧啶的 MM 中,然后置于滤去短波紫外光的高压汞灯下十分钟,原养型菌株因吸收 5-溴尿嘧啶后对长波紫外光敏感、几乎全部死亡。用此法富集突变体的效果可达数千倍。

九、其它

除以上方法外,还有用特殊化合物处理的方法富集突变体。例如,用1.0—3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的4-nitropyridine-N-oxide 处理大肠杆菌,存活菌中有一半以上是脯氨酸缺陷型^[37]。用五氯酚处理萌发后的产黄青霉孢子,滤去菌丝体,存活菌中有近40%的营养缺陷型^[38]。Puhalla 将孢子培养于含3%甘油和1%葡萄糖的琼脂平板,5天后复一层完全培养基,长出的菌落中有30%为尼克酰胺缺陷型,富集效率达1000倍^[39]。Harold 等将经诱变的粪链球菌培养于仅含5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 磷(^{32}P 的剂量为100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)的培养基中,由于缺失磷酸转移酶的突变体不吸收 ^{32}P ,故冷藏一个月后,正常菌体吸收 ^{32}P 而死亡,突变体即被富集^[40]。

除以上诸法外,当需要获得抗性突变株、营养缺陷型回复突变株、诱导酶的组成型突变株等时,直接用平板法或用恒化器富集较为方便。本文不再赘述。

参 考 文 献

- [1] Davis, B. D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**: 4267, 1948.
- [2] Fitzgerald, G. and L. S. Williams: *J. Bact.*, **122**: 345, 1975.
- [3] Liu, Y. T., H. Takahashi and B. Maruo: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**: 205, 1967.
- [4] Ornston, L. N., M. K. Ornston and G. Chou: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**: 179, 1969.
- [5] Klapwijk, P. M., J. R. Dejonge and R. A. Schilperoort: *J. Gen. Microbiol.*, **91**: 177, 1975.
- [6] Ahlquist, E. F., C. A. Fewson and D. A. Ritchie: *J. Gen. Microbiol.*, **91**: 338, 1975.
- [7] Abou-Jaoude, A., M. C. Pascal and F. Casse: *FEMS Microbiol. Letter*, **3**: 235, 1978.
- [8] Sancar, A. and C. S. Rupert: *J. Bact.*, **138**: 779, 1979.
- [9] Snow, R. and J. Junes: *Nature*, **211**: 206, 1966.
- [10] Bal, J. E. Balbin and N. J. Pieniazek: *J. Gen. Microbiol.*, **84**: 111, 1974.
- [11] Macdonald, K. D.: *Genetical Res.*, **11**: 327, 1968.
- [12] Ditchburn, P. and K. D. Macdonald: *J. Gen. Microbiol.*, **67**: 299, 1971.

- [13] Nevalainen, K. M. H. and E. T. Palva: *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**: 11, 1978.
- [14] Sprague, G. F.: *J. Bact.*, **130**: 232, 1977.
- [15] Sprague, G. F., J. E. Cronan: *J. Bact.*, **129**: 1335, 1977.
- [16] Bloch, J. C., F. Perrin and F. Laeroute: *Mol. Gen. Genet.*, **165**: 123, 1978.
- [17] Sarechez, S., A. Cea and M. E. Flores: *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**: 228, 1978.
- [18] Bott, K. F. and D. G. Lundgren: *Can. J. Microbiol.*, **8**: 281, 1962.
- [19] Ishida, T., S. Seto and T. Osawa: *J. Bact.*, **91**: 1387, 1966.
- [20] Evans, D. H.: *Can. J. Microbiol.*, **12**: 641, 1966.
- [21] Thomulka, K. W. and A. G. Moat: *J. Bact.*, **96**: 283, 1968.
- [22] Weiner, R. M., M. J. Voll and T. M. Cook: *Appl. Microbiol.*, **28**: 579, 1974.
- [23] Gorman, J. A. and W. F. Dove: *Mol. Gen. Genet.*, **133**: 345, 1974.
- [24] Carhart, G. and G. Hegeman: *Appl. Microbiol.*, **30**: 1046, 1975.
- [25] Shneyour, Y., J. Stamberg, P. Hundert et al.: *Mut. Res.*, **49**: 195, 1978.
- [26] Lester, H. E. and S. R. Gross: *Science*, **129**: 572, 1959.
- [27] Henry, S. A., T. F. Donahue and M. R. Cullbertson: *Mol. Gen. Genet.*, **143**: 5, 1975.
- [28] Henry, S. A. and B. Horowitz: *Genetics*, **79**: 175, 1975.
- [29] Danchin, A.: *Mol. Gen. Genet.*, **150**: 293, 1977.
- [30] van De Putte, P., J. van Dillewijn and A. Rorsch: *Mut. Res.*, **1**: 121, 1964.
- [31] Galizzi, A., A. G. Siccardi and A. M. Albertini: *J. Bact.*, **121**: 450, 1975.
- [32] Thuriaux, P., P. Nurse and B. Carter: *Mol. Gen. Genet.*, **161**: 215, 1978.
- [33] Peters, J. and P. S. Sypherd: *J. Gen. Microbiol.*, **105**: 77, 1978.
- [34] Ferenczy, L., M. Sipiczke and H. Szegedi: *Nature*, **253**: 46, 1975.
- [35] Sipiczki, M. and L. Ferenczy: *Mut. Res.*, **50**: 163, 1978.
- [36] Wu, H. C. and J. J.-C. Lin: *J. Bact.*, **126**: 147, 1976.
- [37] Hirota, Y., M. Jnuzuka and T. Tomoeda: *J. Bact.*, **91**: 2392, 1966.
- [38] Masurekar, P. S., M. P. Kahgan and A. L. Dainoff: *Appl. Microbiol.*, **24**: 995, 1972.
- [39] Puhalla, J. E.: *J. Gen. Microbiol.*, **94**: 409, 1976.
- [40] Harold, F. M., R. L. Harold and A. Abrams: *J. Biol. Chem.*, **240**: 3145, 1965.