

文章编号: 0529-6579 (2000) 01-0118-03

粗糙脉孢霉瓜氨酸需求型突变株的分离^{*}

刘秋云, 李 蕾, 蒋一帆, 罗 桦, 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要: 对粗糙脉孢霉双突变株 *arg-4*, *arg-13* 进行了紫外诱变, 利用过滤富集法分离了不能利用鸟氨酸、能利用瓜氨酸的 3 个突变株. 利用互补实验将分离的约 60 个突变株分成了 4 个互补群, 这可能代表 4 个独立的基因位点.

关键词: 粗糙脉孢霉; 过滤富集法; 鸟氨酸; 瓜氨酸; 互补实验

中图分类号: Q342.2 **文献标识码:** A

粗糙脉孢霉精氨酸的合成代谢主要在线粒体, 部分在细胞质进行, 其分解代谢在细胞质进行^[1]. 鸟氨酸是精氨酸合成与分解代谢的共同中间产物. 线粒体鸟氨酸的来源有两个途径, 其一是在线粒体的合成, 其二是从细胞质至线粒体的过膜转运. 精氨酸通过反馈抑制线粒体鸟氨酸合成和抑制鸟氨酸线粒体过膜转运而调节精氨酸代谢^[2]. 一个参与线粒体碱性氨基酸过膜转运的基因 *arg-13* 已被克隆^[3], 其主要功能认为是参与鸟氨酸转运. *arg-4* 阻断了线粒体鸟氨酸合成^[1]. 双突变株 *arg-4*, *arg-13* 仍能利用鸟氨酸合成精氨酸^[4]. 推测该双突变株残留碱性氨基酸转运功能, 可能由线粒体精氨酸转运酶介导. 为了进一步研究精氨酸代谢调节与线粒体过膜转运, 我们拟分离线粒体精氨酸转运酶突变株. 由于直接分离存在困难, 我们采用了双突变株 *arg-4*, *arg-13* 进行诱变. 不能利用鸟氨酸而能利用瓜氨酸的三突变株将有可能在精氨酸转运酶和其它影响瓜氨酸合成的基因位点存在突变, 如 *arg-2*, *arg-3* 和 *arg-12*^[5]. 采用互补实验和线粒体碱性氨基酸运输鉴定就能找出精氨酸转运酶突变株, 这将为其基因克隆打下基础.

1 材料与方法

1.1 菌种 双突变株 *arg-4*, *arg-13* 为实验室藏.

1.2 培养基^[6]

诱变用培养基: 1X Vogel's Salts (1/5X NH₄NO₃), $\rho=1.5\%$ 蔗糖, 200 mg/L 鸟氨酸.

确定致死率培养基: 1X Vogel's Salts, 100 mg/L 精氨酸, $\rho=0.5\%$ 山梨糖, $\rho=0.005\%$ 葡萄糖, $\rho=1.5\%$ 琼脂.

瓜氨酸基本培养基: 1X Vogel's Salts, 100 mg/L 瓜氨酸, $\rho=0.6\%$ 山梨糖, $\rho=0.006\%$ 葡萄糖, $\rho=1.5\%$ 琼脂.

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (980303); 国家教委回国人员启动基金资助项目

收稿日期: 1999-05-06; 作者简介: 刘秋云 (1963~), 男, 副教授.

鸟氨酸斜面培养基: 1X Vogel's Salts (1/5X NH_4NO_3), $\rho=2\%$ 蔗糖, 200 mg/L 鸟氨酸, $\rho=1.5\%$ 琼脂。

互补实验培养基 (鸟氨酸基本培养基): 1X Vogel's Salts (1/5X NH_4NO_3), 100 mg/mL 鸟氨酸, $\rho=0.6\%$ 山梨糖, $\rho=0.3\%$ 蔗糖, $\rho=1.5\%$ 琼脂。

1.3 确定诱变剂量^[9] 接种双突变株 *arg-4*, *arg-13* 于 100 mL complete salts 固体培养基, 生长 10 d 后, 加 5 mL H_2O , 摇动使孢子脱落, 两层纱布过滤, 取 1.5 mL 孢子液, 计数。孢子总数为 1.2×10^8 。

加入 38.5 mL H_2O 稀释孢子液, 分别加入 5 mL 孢子液至 8 个直径为 6 cm 的无菌培养皿, 置 20 W 紫外灯距离为 30 cm 处。在 20 s, 40 s, 1 min, 1 min 30 s, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min 用 UV 诱变。稀释, 涂布于确定致死率培养基平板, 室温生长 2 d 后确定致死率 (与对照比较)。诱变 40 s ~ 1 min 30 s 之间致死率达 $50\% \sim 70\%$ 。

1.4 紫外诱变 双突变株 *arg-4*, *arg-13* 生长 11 d 后, 紫外诱变 2.4×10^7 孢子 1 min 20 s, 存活率为 10% 。

第2次紫外诱变: 双突变株 *arg-4*, *arg-13* 生长 11 d 后, 紫外诱变 8.4×10^7 孢子 45 s, 存活率为 33% 。

1.5 过滤富集法筛选突变株^[9] 诱变后的孢子液放入诱变培养基 (鸟氨酸液体基本培养基) 25°C 摇瓶过夜。含相应突变的孢子将不能生长。加入适量氨苄青霉素抑制细菌生长。培养 10 h 后用 3 层纱布过滤。此后每隔 2 ~ 4 h 过滤 1 次, 滤掉可见的生长的菌丝。24 h 后逐渐补充新鲜培养基, 4 ~ 6 h 过滤 1 次。直至不能生长为止。72 h 后, 3 000 r/min 离心 2 min, 将诱变孢子涂瓜氨酸基本培养基平板于室温培养 (预涂一个平板以确定孢子浓度)。从平板挑取菌落置入鸟氨酸基本培养基斜面, 室温生长 4 ~ 5 d。不生长的斜面可能含有我们所要筛选的突变株, 予以保留, 再加入瓜氨酸于斜面让其生长。

1.6 互补实验^[9] 粗糙脉孢霉为单倍体, 但菌丝与大孢子含有 1 个以上的核, 不同的细胞可以融合而形成含有不同核的异核体。虽然十几个异核体不相容位点的等位基因差异可以干扰异核体生成, 但突变株均属诱变获得, 具有相同的遗传背景, 故可形成稳定的异核体。如果 2 个突变株不能互补, 则表明它们属同一互补群 (基因位点)。

将突变株置精氨酸培养基生长 7 d 后, 制成孢子悬液, 各 $3\ \mu\text{L}$ 两两混合于鸟氨酸基本培养基平板, 于室温观察生长。

1.7 *arg-12* 酶试验 菌株在 Vogel's 基本培养基 (200 mg/L 精氨酸) 30°C 生长 2 d, 生长缓慢者生长 3 d。每天摇瓶 2 次以淹没生长。2 d 后, 在酶测前极短时间内对菌丝块进行通透处理。首先, 0.15 mL 甲苯-乙醇混合液 ($V/V=1/4$) 加到试管里, 摇动。取出菌丝块, 挤压, 置于 1 mL 35°C 反应混合物。反应混合物含 4.5 mmol/L 鸟氨酸, 4.5 mmol/L 氨甲酰磷酸二锂, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0。因为氨甲酰磷酸不够稳定, 反应混合物在使用前配制。15 min 后, 移走菌丝块。加入 0.5 mL 颜色试剂。颜色试剂含 7 份浓磷酸/浓硫酸 ($V/V=3/1$) : 1 份 $\varphi=3\%$ 丁二酮-一脒。反应物混匀, 60°C 保温 30 min, 桃红和粉红为阳性, 无色或浅粉红为阴性。

2 结果与讨论

诱变剂量的确定与诱变实验用 20 W 紫外灯距离 30 cm 处理 40 s ~ 1 min 比较合适, 存活率可达 30% 。

从第 1 次诱变后生长的瓜氨酸基本培养基平板上挑取了 240 个菌落, 筛选到 17 个突变株. 第 2 次挑取了 777 个菌落, 筛选到了 66 个突变株.

对部分突变株进行了互补实验, 得到 4 个可能互补群:

互补群 1: a17	4 个突变株	互补群 3: a32	1 个突变株
互补群 2: a27	15 个突变株	互补群 4: a37	5 个突变株

arg-12 酶活性测定, 均显示桃红和粉红, 负对照 *arg-12^s* 无色. *arg-12^s* 为一渗漏突变, 仅含 2% 的鸟氨酸氨甲酰磷酸转移酶活性^[5]. 故 4 个互补群无一为 *arg-12* 位点突变.

诱变实验表明在本实验条件下, 40 min 处理较为合适. 粗糙脉孢霉大孢子一般含有 2 个或 2 个以上的核. 选用适当的诱变剂量使多余的核产生致死突变, 剩下的 1 个核产生所需要的突变. 由于诱变菌种为双突变株, 生长会较野生型略慢一些, 过滤富集时采用了 72 h, 以除掉缓慢的生长. 分离的瓜氨酸需求型突变株得率约为挑取菌落的 8%, 属正常范围. 互补实验表明有 4 个互补群. 尽管存在基因内互补, 但一般比较少见. 大部分一般属于基因间互补. *arg-12* 酶活鉴定表明不存在在该位点的突变, 可能因为含有 *arg-12* 的 3 突变株缺陷过于严重, 即使提供瓜氨酸时也生长缓慢. 分离到的 4 个互补群可能含有 *arg-2*、*arg-3* 和线粒体精氨酸转运酶的突变, 还可能含有使线粒体内膜转运酶定位的转位酶突变. 我们将进行线粒体碱性氨基酸运输实验, 以分离线粒体精氨酸转运酶突变株.

参考文献:

- [1] DAVIS R H. Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiol Revs. 1986. 50(3): 280~313.
- [2] DAVIS R H, WEISS R L. Novel mechanisms controlling arginine metabolism in *Neurospora*[J]. Trends Biochem Sci, 1988. 13: 101~104.
- [3] LIU Q Y, DUNLAP J C. Isolation and analysis of the *arg-13* gene of *Neurospora crassa*[J]. Genetics. 1996, 143: 1163~1174.
- [4] 刘秋云, DUNLAP J C. *arg-13* is implicated in mitochondrial ornithine transport in *Neurospora crassa*[J]. 实验生物学报, 1998, 31(4): 347~352.
- [5] PERKINS D D, RADFORD A, NEWMYER D et al. Chromosomal loci of *Neurospora crassa*[J]. Microbiol Rev, 1982. 46: 426~570.
- [6] DAVIS R H, DeSERRES D. Genetic and microbial research techniques for *Neurospora crassa*[J]. Methods Enzymol, 1970. 27A: 79~143.

Isolation of Citrulline Requiring Mutants from *Neurospora crassa*

LIU Qiu-yun^{*}, LI Lei, JIANG Yi-fan, LUO Xi, LI Bao-jian

Abstract: UV mutagenesis was performed on *Neurospora* double mutant *arg-4*, *arg-13*. Triple mutant capable of utilizing citrulline but unable to utilize ornithine have been isolated via filter enrichment method. Through complementation tests, 60 mutants are divided into 4 complementation groups, which might represent 4 independent genetic loci.

Keywords: *Neurospora crassa*; filter enrichment; ornithine; citrulline; complementation test

^{*} Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China