

化学诱变技术在微生物育种研究中的应用

程 明^{1,2}, 崔承彬^{1*}, 李长伟¹, 田从魁¹, 杜智敏^{2*}

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨医科大学附属二院临床药物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 化学诱变是一种传统而经典的微生物育种技术, 不仅在高产工业菌株选育中得到广泛应用, 而且近来还用于改造野生菌株代谢功能, 以发现新产活性产物。本文简要综述常用化学诱变剂及其作用机制, 以及化学诱变技术在微生物育种领域中的新近应用研究进展。

关键词: 微生物育种; 化学诱变剂; 菌株选育

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1674-0440(2009)06-0412-06

Chemical mutation technique applied in microorganism breeding

CHENG Ming^{1,2}, CUI Cheng-bin¹, LI Chang-wei¹, TIAN Cong-kui¹, DU Zhi-min²

(1. Institute of Toxicology and Pharmacology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. Key Laboratory of College in Heilongjiang Province, Institute of Clinical Pharmacy and Drug, the Second Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: Chemical mutation technique is one of the conventional and classical mutation techniques for microorganism breeding, which is used not only widely in improving industrial strains but also recently in altering metabolic function of wild-type strains to obtain bioactive metabolites newly produced. This paper reviews chemical mutagenic agents in routine use, their action mechanisms, and recent development of chemical mutation technique applied in microorganism breeding.

Key words: microorganism breeding; chemical mutagen; strain improvement

菌种优劣对于微生物药物的工业化生产具有决定性意义。野生菌株往往因产率低而不能直接用于工业生产, 而需要通过菌种改良, 选育高产优良菌株。微生物药物的工业化生产对菌株的这种需求带动了各种育种技术的蓬勃发展, 而育种技术则通过不断提供优良菌株又促进了微生物药物产业的持续发展。

收稿日期: 2009-07-13

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30572279, 30973631)、国家 863 计划 (No. 2007AA09Z411)、国家“重大新药创制”科技重大专项 (No. 2009ZX09103-019, 2009ZX09301-002)、军事医学科学院科研创新基金重大专项 (2008)、中国大洋协会国际海底区域研究开发项目 (No. DYXM-115-02-2-09)

作者简介: 程 明, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 天然药物化学 E-mail: cm96670050@163.com

* 通讯作者: 崔承彬, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 天然药物化学, Tel: 010-66932693, E-mail: cuichb@sohu.com, cuichb@126.com; 杜智敏, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 临床药理学, Tel: 0451-86605353, E-mail: dzm1956@126.com

在育种研究中, 近来还发现有些突变株可代谢产生新产物, 具有可供作药源新菌株资源的潜在应用前景, 使育种技术进一步拓展了新的应用研究发展空间。微生物人工诱变育种技术按诱导突变类型可分为物理诱变、化学诱变和生物诱变三大类^[1]。化学诱变是一种传统而经典的微生物育种技术, 不仅在高产工业菌株选育中得到广泛应用, 而且还用于改造野生菌株的代谢功能, 从而发现新产活性产物。在实际应用中, 化学诱变既有利用某一种化学诱变剂的单一诱变, 也有组合利用化学或其他多种诱变剂的复合诱变, 还有化学诱变联合抗生素抗性筛选等。本文简要综述常用化学诱变剂及其作用机制, 以及化学诱变技术在微生物育种领域中的新近应用研究进展。

1 常用化学诱变剂

1.1 碱基类似物

作为化学诱变剂的碱基类似物主要有嘧啶类似

物和嘌呤类似物两大类。其中,常用嘧啶类似物有 5-溴尿嘧啶(5-BU)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-氮杂尿嘧啶(6-AU)等;嘌呤类似物有 2-氨基嘌呤(2-AP)、6-巯基嘌呤(6-MP)、8-氮鸟嘌呤(8-NG)等^[2]。

1.2 烷化剂

烷化剂类化学诱变剂种类较多,如硫芥(氮芥)类、环氧衍生物类、乙撑亚胺类、硫酸(磺酸)酯类、重氮烷类、亚硝基类等。其中,亚硝基乙基脒、亚硝基胍、硫酸二乙酯、甲基磺酸甲酯、甲基磺酸乙酯等较为常用。

1.3 移码诱变剂

移码诱变剂系指能够引起 DNA 分子中组成遗传密码的碱基发生移位复制,致使遗传密码发生相应碱基位移重组的一类化学诱变物质,主要为吡啶类杂环化合物,常用的有吡啶橙和原黄素两种(图 1)。

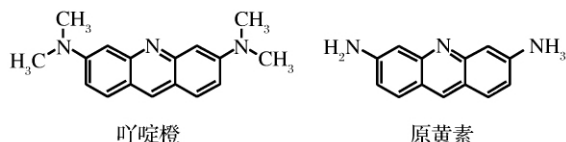


图 1 吡啶橙和原黄素的结构

1.4 其他类诱变剂(或协同诱变剂)

其他类较常用的还有亚硝酸及其盐和部分金属化合物。

2 化学诱变技术在菌株选育中的应用

2.1 单一诱变

单一诱变是指在菌株选育中用一种诱变因子致突变的育种实验方法,在化学诱变育种研究中,当仅用一种诱变剂就能达到所需选育目的时,不失为最简便快捷的育种方法。

碱基类似物诱变剂是在 1959 年佛里兹提出基因突变的碱基置换理论以后发展起来的。近年单用碱基类似物的诱变育种研究并不多见,文献报道多为组合应用其他诱变剂的复合诱变研究。但程世清^[3]采用 5-BU 单一诱变剂,以 1 株产类胡萝卜素的分支杆菌为原始菌,分别对菌体及其原生质体进行了单一诱变育种研究。鉴于色素产生与所培养生产菌的细胞量正相关,以单位体积液体培养液中固形物的量(简称生物量)为指标,初步测评了原始菌及其突变株的产色素能力,结果表明,无论从菌体还是从原生质体均得到了产色素能力获得提高的突变株,菌体突变株和原生质体突变株的生物量与原始

菌株相比分别平均提高了 22.5% 和 16.4%。

自 1944 年奥尔巴克发现氮芥子气的诱变效应以来,烷化剂类诱变剂越来越广泛应用于微生物育种领域。无论是气态的重氮烷还是液态的硫酸二乙酯或固态的亚硝基胍,都能产生较理想的诱变效果,但近年应用较多的是硫酸二乙酯和亚硝基胍。陈新征等^[4]以产 D-核糖的转酮醇酶缺陷型枯草芽孢杆菌 HG02 为出发菌,用硫酸二乙酯进行单一诱变,获得了高产突变株 HG03,其 D-核糖产量比原始菌提高了 81.7%。与硫酸二乙酯相比,亚硝基胍应用更为广泛。在林肯霉素高产菌株复合诱变选育研究中,以林肯链霉菌 9502 株为出发菌,仅经第 1 轮亚硝基胍单一诱变处理,所得突变株 9502-7 的林肯霉素效价就比出发菌提高了 35.4%^[5],而利用亚硝基胍诱变 1 株 L-乳酸产生菌,突变株的乳酸产量超过 90 g · L⁻¹,达原始菌产量的 2 倍^[6]。另外,以丁二酮产生菌 X67 株为出发菌,采用亚硝基胍进行诱变选育,得到高产丁二酮的突变株,其产量比出发菌提高了 12.9 倍,且遗传性质稳定^[7]。在氧化亚铁硫杆菌育种研究中,亚硝基胍诱变使突变株的氧化活性比原始菌提高了 4 倍^[8]。

基于 F. H. C. 克里光等 1961 年提出的移码突变理论,吡啶及其衍生物类凭借对 DNA 遗传密码的移码功能迅即成为移码诱变剂的研究热点。吡啶及其衍生物类可插入到 DNA 分子中,通过复制过程导致遗传密码中碱基移位重组,最终改变突变株的遗传特性^[9]。顾真荣等^[10]利用移码诱变剂吡啶橙,通过诱变枯草芽孢杆菌 G3,不仅使突变株培养物的抗真菌活性获得提高,而且还使突变株生物合成伊枯草菌素 A 的能力得到增强。

亚硝酸(盐)作为一种最早被发现的其他类诱变剂,在提高产能以及改善微生物有用性能方面有明显作用。当用亚硝酸单一诱变处理氧化铁硫杆菌时,不但菌株氧化活性提高了 41.3%,而且对黄铜矿的浸出率提高了 13.3%,还使达到浸出终点时间也同时缩短了 5~10 d^[11]。在 L-组氨酸高产菌株选育研究中,原始菌仅经 1 轮亚硝酸钠单一诱变,就使突变株的产能比原始菌提高了 5.08%^[12]。金属化合物本身通常被认为并无明显诱变作用^[2],但在铁离子摄取调节基因 *fur* 有关研究中,曾有报道记载,利用二氯化锰,通过锰诱变成功获得了 Mn²⁺ 抗性 *fur* 基因突变株^[13]。本文认为该文所称锰诱变实际上称作二氯化锰抗性筛选可能更为贴切。

2.2 复合诱变

微生物突变机制复杂,单一诱变往往难以达到预期目的。因此,诱变育种往往采用组合2种或者2种以上化学或其他诱变剂的育种方法,即复合诱变法。这种方法可一定程度上克服诱变的盲目性,提高正向诱变效果,因此越来越趋于被大多育种研究所采纳。

2.2.1 碱基类似物组合其他诱变剂 海藻糖广泛用于食品、化妆品以及医疗卫生领域,国内主要通过酵母菌发酵来生产,因此高产菌株的选育具有重要意义。张丽杰等^[14]以酿酒酵母 HY01 为出发菌,选用2种低毒性化学诱变剂5-BU和盐酸平阳霉素,在确定最佳配比为300:5 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的基础上,通过联用这2种诱变剂进行复合诱变,获得了一定数量的正突变株,其中产能提高最高的1株,发酵物中海藻糖含量达约16%,比出发菌株提高了10%。他们还以HY01株为出发菌,通过3轮紫外诱变,获得了另1株高产株,海藻糖含量高达19.5%,比出发菌株提高了35%,表明对HY01的复合化学诱变效果不如多轮紫外照射诱变。梁亮等^[12]在L-组氨酸高产菌株选育研究中,通过组合使用6-MP平板筛选与紫外-亚硝酸钠复合诱变,筛选获得了高产菌株。

2.2.2 烷化剂组合其他诱变剂 在1,3-丙二醇产生菌诱变育种研究中,李凤梅等^[15]以丁酸梭菌209株为原始出发菌,经2轮硫酸二乙酯诱变,得到了1,3-丙二醇产量提高113%的突变株。在此基础上再经1轮紫外诱变和1轮紫外与亚硝基胍组合诱变,获得了产能进一步提高的突变株,其1,3-丙二醇产量达 $15.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,与原始出发菌(产量 $2.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)相比,提高了6.13倍。硫酸二乙酯还用于纤维素酶高产菌株选育研究中。兰时乐等^[16]以绿色木霉为原始出发菌,通过微波、硫酸二乙酯、氯化锂依次组合3轮筛选,获得了纤维素酶高产突变株,与原始出发菌相比,该突变株的羧甲基纤维素酶活力、滤纸酶活力和棉花糖酶活力分别提高了107%、152.4%和140.5%。

亚硝基胍组合其他诱变剂的复合诱变研究更为多见。李戈等^[17]以链霉菌LA5株为原始出发菌,采用紫外、微波、亚硝基胍、紫外+亚硝基胍、亚硝基胍+紫外等诱变方式,选用其中效果好的复合诱变方法,经对LA5的4轮亚硝基胍+紫外双因子组合复合诱变,筛选得到了1株高产抗生素的突变株,其产能以发酵液抑菌活性为指标比原始出发菌LA5

提高了34.5%。在头孢菌素C产生菌的菌株改良研究中,Ellaiah等^[18]通过紫外和亚硝基胍复合诱变也得到1株头孢菌素C产量比原始菌提高2.4倍的高产突变株。李淑彬等^[19]以抗真菌抗生素土曲霉酸(terreic acid)产生菌黄柄曲霉179株为原始出发菌,组合利用亚硝基胍、紫外等诱变剂和自产抗生素土曲霉酸,通过人工诱变与自产抗生素抗性筛选相结合的多轮复合诱变进行了高产菌株的选育研究。以抗菌活性为指标,通过对原始出发菌179株的第1轮亚硝基胍诱变结合土曲霉酸抗性筛选,获得了11株抗菌活性明显提高的土曲霉酸抗性突变株(正变率68.7%),其中突变株179-2活性提高最为显著,相对效价提高至原始出发菌的176%。第2轮以突变株179-2为出发菌,经过紫外诱变加土曲霉酸抗性筛选,得到26株抗性突变株,正突变率达65.4%,其中突变株179-19的效果最好,相对效价提高至原始出发菌的245%。第3轮以179-19为出发菌,通过亚硝基胍加紫外双因子复合诱变结合土曲霉酸抗性筛选,共获得了22株抗性突变株,其中获得抗菌活性提高的正突变株12株(正突变率54.5%),其中179-29、179-32和179-49等3株突变株活性提高最为显著,相对效价分别提高至原始出发菌的326%、342%和383%。在第3轮诱变筛选中正突变率有所下降,研究者认为,可能是由于第3轮亚硝基胍加紫外线处理后,对DNA损伤太大或仅引起抗性基因发生改变,使抗性增大而产量基因未发生改变所致^[19]。曾有报道指出,经紫外诱变得到的DNA修复基因发生突变的酵母突变株对紫外线高度敏感,同时对甲基磺酸甲酯、亚硝酸、过氧化氢等也变得敏感^[20]。在上述研究^[19]中,突变株179-19系对179-2经第2轮紫外诱变所得,有可能已发生了对紫外线和亚硝基胍变得敏感的类型基因突变,因此在第3轮诱变中,大多突变株有可能仅发生了对亚硝基胍和紫外线敏感的抗性相关基因突变,而非产能相关基因发生突变。赵玉巧等^[21]以海水中分离得到的1株生产DHA的酒香酵母为原始出发菌,用紫外和硫酸二乙酯进行了复合诱变育种。首先分别进行了第1轮紫外诱变和硫酸二乙酯诱变,筛选获得了供第2轮复合诱变的突变株,其中紫外诱变株3株、硫酸二乙酯诱变株2株。在第2轮复合诱变中,以这些突变株为出发菌,对紫外诱变株进行硫酸二乙酯诱变、对硫酸二乙酯诱变株进行紫外诱变,从而获得了相应复合诱变突变株。菌体中

油脂含量和油脂中 DHA 含量测定结果表明:原始出发菌油脂含量为 10.5%,油脂中 DHA 含量为 41.3%;第 1 轮诱变效果最好的是 1 株硫酸二乙酯诱变株,油脂含量达 43.8%,油脂中 DHA 含量稍降为 37.6%;第 2 轮复合诱变中产能提高最高的是 1 株经第 1 轮硫酸二乙酯诱变后再经第 2 轮紫外诱变所获突变株,油脂含量高达 50.4%,油脂中 DHA 含量达 42.8%。

2.2.3 移码诱变剂组合物理诱变 在利迪链菌素高产菌株选育研究中,郭卫寰等^[22]通过紫外-吡啶橙复合诱变取得了很好效果。

2.2.4 其他类诱变剂(或协同诱变剂)组合物理诱变 在微生物法重金属废水处理中,选育对重金属具有高度抗性和高效去除作用的优良菌株至关重要。尹华等^[23]以 1 株产朊假丝酵母为原始菌,开展了铬离子去除优良菌株的选育研究,通过对原生质体的紫外、亚硝酸、紫外加亚硝酸等复合诱变,筛选得到了 2 株对铬离子具有高度抗性和高效去除作用的突变株。经反复继代驯化,这两株的铬离子去除率均稳定至约 95%。在 *L*-组氨酸高产菌株选育研究中^[12],紫外加亚硝酸钠的复合诱变效果比亚硝酸钠或紫外单一诱变效果都好,以产量提高最显著的突变株与原始菌相比,亚硝酸钠诱变使产量提高了 5.08%,紫外诱变提高了 1.9%,而复合诱变则提高了 7.14%。

氯化锂本身并无直接致突变作用^[2,24],但当与其他诱变剂联用时,往往会产生很好的协同诱导突变作用。氯化锂在育种研究中通常多与紫外联用。紫杉醇产生菌 NCEU-1^[24]源自东北红豆杉的 1 株内生真菌,是通过紫外、甲基磺酸乙酯、钴 60、亚硝基胍等一系列诱变筛选得到的突变衍生株,产能已达 $314.07 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。赵凯等^[24]以 NCEU-1 为出发菌,经对其原生质体进行紫外-氯化锂复合诱变,使其紫杉醇产能进一步提高至 $418.24 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在核糖霉素产生菌核糖苷链霉菌育种研究中,陈志高等^[25]对菌丝体和原生质体分别进行了紫外诱变和紫外-氯化锂复合诱变,结果表明,无论菌丝体还是原生质体,紫外-氯化锂复合诱变的正突变率都远高于紫外单一诱变,而且用原生质体进行紫外-氯化锂复合诱变比用菌丝体直接诱变更易得到高产菌株。通过原生质体的复合诱变,他们筛选得到了 2 株产能分别达到原菌株 17% 和 15.3% 的突变株,已应用于企业生产,并成为生产核糖霉素的主力菌株。在 1,3-丙二醇产生菌诱变研究中,王宝光等^[26]通过对出发菌

依次进行离子束照射和紫外-氯化锂复合诱变,也取得了良好效果。

2.3 化学诱变联合抗生素抗性筛选

提高抗生素产生菌对自产抗生素的抗性,是选育抗生素高产菌株的一个重要环节,在人工诱变育种研究中往往结合自产抗生素抗性筛选来实现,如用于上述土曲霉酸高产菌株育种研究^[19]。在紫杉醇产生菌育种研究中,虽然相关机制尚未阐明,但经过紫外-氯化锂复合诱变结合制霉菌素抗性筛选,发现所获突变株的紫杉醇产能与其对制霉菌素的抗性强弱呈正相关^[23]。近来研究表明,微生物对作用于核糖体的抗生素所产生的某些抗性突变会直接影响其次级代谢功能,从而改变产物水平和代谢能力,致使突变株的产能获得大幅提高^[27,28],或者赋予突变株新生次级产物的代谢生产能力^[28~30]。相关抗生素抗性筛选技术被广泛应用于微生物菌株选育中^[28]。在利迪链菌素高产菌株选育研究中,郭卫寰等^[22]利用 5 种相关抗生素,研究比较了自发突变抗性筛选和人工诱变抗性筛选的效果,结果表明,紫外-吡啶橙复合诱变结合抗生素抗性筛选,无论是从突变几率上还是从正突变率上,效果均远好于自发突变抗性筛选。另外,本课题组在拓展药源微生物新菌株资源相关课题研究中,曾以无抗肿瘤活性海洋来源放线菌 L35-1 株为出发菌,通过硫酸二乙酯诱变-链霉素抗性筛选、硫酸二乙酯诱变-新霉素抗性筛选、亚硝基胍诱变-新霉素抗性筛选,成功获取了 2 株具有显著抗肿瘤活性的突变株^[31]。近来,通过硫酸二乙酯诱变-卡那霉素抗性筛选和硫酸二乙酯诱变-庆大霉素抗性筛选,本课题组从 L35-1 株又新获得了 18 株抗肿瘤活性突变株,并从其中 2 株活性突变株发酵物中分离鉴定了 6 个 L35-1 发酵物中没有的抗肿瘤活性化合物。这些结果表明,化学诱变结合抗生素抗性筛选,既可用于提高产能,又可用于改造无活性菌株的代谢功能,从而寻找发现新产活性产物。

3 部分化学诱变剂致基因突变作用机制

3.1 替代 DNA 中的正常碱基

碱基类似物具有与正常碱基相同的分子骨架结构,可替代正常碱基掺入到 DNA 分子中,通过 DNA 复制过程造成碱基错配而发生突变,从而影响遗传特性。

3.2 化学修饰 DNA 中碱基从而影响遗传特性

3.2.1 烷基化 烷化剂类诱变剂主要通过 DNA

分子中碱基的烷基化修饰,破坏正常生物学功能,从而影响遗传特性。这类诱变剂往往具有活泼的烷基化基团,与水反应先形成碳正离子,继而攻击 DNA 碱基中电荷密度高的亲核部位,导致相应部位的烷基化。烷化剂类一般先攻击鸟嘌呤的 N-7 位,其次鸟嘌呤的 N-3 位和腺嘌呤的 N-3 位^[2]。

3.2.2 氧化 有些有氧化活性的诱变剂通过对 DNA 中碱基的氧化损伤发挥致突变作用。譬如,亚硝酸可氧化腺嘌呤,使腺嘌呤经脱氨基氧化后变成次黄嘌呤(图 2)。通常在 DNA 中腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)配对、鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对,而次黄嘌呤则在 DNA 复制中替代 G 与 C 配对(图 2),并通过以后的复制过程使 DNA 中原来的 AT 配对转换成 GC 配对。

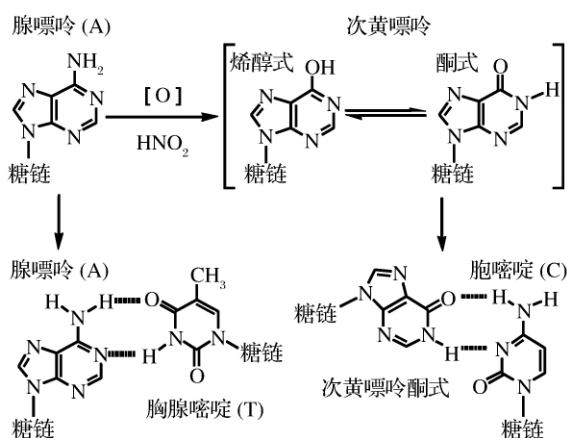


图 2 腺嘌呤氧化与 DNA 复制中的碱基配对变化

3.3 移码突变的可能机制^[9]

移码突变倾向于发生在重复碱基区域(如 CCCC 等)。根据相关机制解释模型^[9],在 DNA 复制过程中局部碱基配对发生在这类重复碱基区域里的复制计数器以外处。重复碱基部位间发生滑移(slippage),将造成留置在双螺旋外未配对而凸起的单个或几个碱基。如果这种突起在 DNA 复制过程中发生在被复制中的模板链上,凸起部分在复制链中将被删除。相反,如果凸起发生在复制初始链上,将会导致复制链中插入额外碱基。嵌入型移码诱变剂可增强 DNA 链间滑移的可能性,同时可稳定所形成的凸起。该模型还被扩展至原黄素及其类似物诱导噬菌体 T4 突变的特例,机理涉及 T4 拓扑酶 II 的 DNA 破损活性。虽然这可解释原黄素个别实验中所见到的突变特征,但应当注意并非所有嵌入型突

变剂都与拓扑酶 II 相互作用。

3.4 金属离子致突变的可能机制

在有关类鼻疽伯克霍尔德菌的铁离子摄取调节基因 *fur* 相关研究中,有文献报道通过金属锰诱变成功筛选获得了 Mn^{2+} 抗性 *fur* 基因突变株^[13]。他们认为, Mn^{2+} 诱变的分子机制并不清楚,但研究结果提示, Mn^{2+} 刺激细胞使胞内蓄积过量的铁离子,而当细胞发生 *fur* 基因突变时会失去严密调控 *fur*-依赖性铁摄取系统的能力,导致产生不蓄积毒性水平铁离子的 *fur* 基因突变体;还有另一种可能是 *fur* 基因对 Mn^{2+} 致突变作用高度敏感所致。经文献调查和分析研究,我们认为 Mn^{2+} 有可能作用于 *fur* 相关级联基因调控系统的某些环节,不能完全排除通过对 *fur* 调控因子的影响导致 *fur* 突变的可能性,但尚未见到直接证实 Mn^{2+} 致突变作用的实验证据。鉴于文献[13]中记载的所有获取 Mn^{2+} 抗性 *fur* 基因突变株的实验均与自发突变抗生素抗性筛选一致,我们更倾向于所获取 *fur* 突变株的基因突变有可能是由自发突变所产生的,高浓度二氧化锰只不过是选择性筛选条件,使获得 Mn^{2+} 抗性的突变株生长而非抗性突变株不能生长。考虑到 Mn^{2+} 是否具有真的致突变作用尚需实验证实,我们认为文献所称锰诱变实际上称作 Mn^{2+} 抗性筛选可能更为贴切。

4 结语

在微生物育种研究领域,随着相关基础学科的研究发展,利用基因工程、代谢工程等现代生物技术,合理改造代谢途径,构建优良菌株的研究受到关注,成为育种领域一个研究热点和微生物药物工业育种发展的一个重要方向。然而,实施生物技术改造,首先,需要对其遗传背景和次级代谢途径非常清楚,但大多育种研究中这些情况并不都很清楚,其次,由于微生物次级代谢调控系统的复杂性,生物工程对某些单一环节的改造往往还会导致细胞整体水平的负反馈调控。因此,目前通过生物技术改造获取的优良菌株用于工业生产的实例还极少,实际应用的绝大多数工业菌株仍然是通过传统育种技术选育得到的。

化学诱变作为一种经典而传统的育种技术,在育种研究领域仍然具有重要作用和地位,不仅在优良高产工业菌株选育中一直得到广泛应用,近年来还在拓展药源微生物菌株资源相关领域展露出新的应用研究发展空间。化学诱变与其他传统诱变育种

方法一样,具有盲目性和随机性等不足,但也有无需知晓遗传背景和代谢途径、操作简便、不需要价格昂贵的现代高档仪器设备等显著优势。针对传统诱变的这些不足,只要组合使用相关筛选技术,从而能够实现快速筛选目标菌株,化学诱变技术仍可通过优化诱变筛选实验操作程序,在微生物育种研究中进一步发挥不可替代的重要作用。迄今化学诱变育种研究多采用组合 2 种或 2 种以上化学或物理诱变因子的复合诱变方法。在实际实验操作中,有用不同种类的单一诱变剂交替进行 2 轮或多轮诱变的,也有用 2 种诱变剂同时作用或依次作用诱变的,还有化学诱变结合抗生素抗性的筛选等多种方式。但为了筛选获取目的菌株,无论何种诱变方式都要配合进行含量测定或相关活性筛选等工作。因此,在化学诱变育种研究中,如何改进或组合使用适合的相关筛选技术,从而实现快速高效获取目的菌株,值得进一步探讨。这在拓展药源微生物新菌株资源相关研究中显得尤为重要,相信在今后研究中会逐步得到解决。

参 考 文 献

- [1] 贾啸静. 微生物药物产生菌诱变育种方法的应用和进展[J]. 河北省科学院学报, 2006, 23(1): 65-69.
- [2] 章名春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 7.
- [3] 程世清. 产色素菌 T17-2-39 的诱变育种实验[J]. 江苏食品与发酵, 2000, (2): 9-12.
- [4] 陈新征, 吴兆亮, 赵静波, 等. 化学诱变法选育 D-核糖高产菌株工艺研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(2): 107-109.
- [5] 丁琳. 复合诱变选育林肯霉素高产菌株[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(4): 68-70.
- [6] Miura S, Dwiarti L, Arimura T, et al. Enhanced production of L-lactic acid by ammonia-tolerant mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-4196[J]. *J Biosci Bioeng*, 2004, 97(1): 19-23.
- [7] 于鹏, 张兰威, 许倩, 等. 亚硝基胍诱变选育丁二酮高产菌株[J]. 乳业科学与技术, 2006, 29(5): 218-220.
- [8] 蒋金龙, 贾建波. 亚硝基胍诱变处理氧化亚铁硫杆菌的育种研究[J]. 矿产综合利用, 2005, (1): 21-24.
- [9] Ferguson LR, Denny WA. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators[J]. *Mutat Res*, 2007, 623(1/2): 14-23.
- [10] 顾真荣, 陈伟, 程洪斌, 等. 吡啶橙诱变提高枯草芽孢杆菌 G3 抗真菌活性[J]. 植物病理学报, 2008, 38(2): 185-191.
- [11] 徐晓军, 宫磊, 赵丙辰, 等. 氧化铁硫杆菌的亚硝酸化学诱变及对黄铜矿的生物浸出[J]. 有色金属(选矿部分), 2004, (6): 20-24.
- [12] 梁亮, 邱雁临, 许进涛. 紫外线与亚硝酸钠复合诱变选育 L-组氨酸产生菌[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(2): 27-29.
- [13] Loprasert S, Sallabhan R, Whangsuk W, et al. Characterization and mutagenesis of *fur* gene from *Burkholderia pseudomallei*[J]. *Gene*, 2000, 254(1/2): 129-137.
- [14] 张丽杰, 邱进申, 全学军, 等. 诱变选育高产海藻糖的酵母菌株[J]. 生物技术, 2005, 15(1): 31-33.
- [15] 李凤梅, 刘长江, 郑艳, 等. 产 1,3-丙二醇菌株丁酸梭菌的诱变育种[J]. 生物技术, 2005, 15(1): 34-35.
- [16] 兰时乐, 李立恒, 王晶, 等. 微波诱变结合化学诱变选育纤维素酶高产菌的研究[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(1): 22-25.
- [17] 李戈, 余凤玉, 曾会才, 等. 链霉菌 LA5 高产菌株诱变育种研究初报[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 10-13.
- [18] Ellaiah P, Kumar JP, Saisha V, et al. Strain improvement studies on production of cephalosporin C from *Acremonium chrysogenum* ATCC 48272[J]. *Hindustan Antibiot Bull*, 2004, 45-46(1-4): 11-15.
- [19] 李淑彬, 王军, 钟英长. 多轮复合诱变选育抗真菌抗生素高产菌株及其发酵条件研究[J]. 广西科学, 2003, 10(2): 135-138.
- [20] Kozhina TN, Kozhin SA, Latypov VF, et al. RAD29 and RAD31 - new genes from *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, participating in control of DNA repair isolation and genetic study of mutants[J]. *Genetika*, 2000, 36(6): 767-773.
- [21] 赵玉巧, 浦寅芳. 产 DHA 菌株的诱变育种[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(6): 64-67.
- [22] 郭卫寰, 李小兵, 元英进. 复合诱变和抗性筛选选育链霉菌高产菌株[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 831-835.
- [23] 尹华, 卢显妍, 彭辉, 等. 复合诱变原生质体选育重金属去除菌[J]. 环境科学, 2005, 26(4): 147-151.
- [24] 赵凯, 周东坡, 平文祥, 等. 产紫杉醇菌株原生质体诱变育种的研究[J]. 生物工程学报, 2005, 21(5): 848-851.
- [25] 陈志高, 沈建新, 胡叶碧. 紫外线和氯化锂对核糖苷链霉菌原生质体诱变作用的探讨[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(4): 150-152.
- [26] 王宝光, 刘铭, 杜晨宇, 等. 产 1,3-丙二醇菌株的诱变和筛选[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(6): 59-65.
- [27] Ochi K, Okamoto S, Tozawa Y, et al. Ribosome engineering and secondary metabolite production[J]. *Adv Appl Microbiol*, 2004, 56: 155-184.
- [28] 孙玉雯, 崔承彬. 抗生素抗性筛选在微生物菌株选育中的作用[J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(3): 213-217.
- [29] 于志彬, 崔承彬, 朱天骄, 等. 用核糖体工程技术开拓海洋微生物药用资源的研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(5): 87-90.
- [30] 于志彬, 朱天骄, 崔承彬, 等. 用核糖体工程技术二次开发海洋微生物菌株资源的研究[J]. 高技术通讯, 2006, 16(11): 1190-1194.
- [31] 孙玉雯. 抗生素抗性筛选组合技术拓展放线菌药源活性菌株资源的研究[D]. 北京: 军事医学科学院, 2008.