

微生物诱变育种方法的研究进展

季宇彬 朱兴杰 徐昶儒 李文兰

【摘要】: 本文综述了国内外微生物诱变育种领域的研究新进展,对生物学效应及诱变微生物的机理进行了总结,并从物理诱变、化学诱变及复合诱变三个方面对微生物诱变育种的研究进展进行了概述。

【关键词】: 微生物; 诱变育种; 机制;

目前,微生物在解决人类的粮食、能源、健康、资源和环境保护等问题中正显露出越来越重要且不可替代的独特作用。微生物育种的目的就是要人为地使某些代谢产物朝人们所希望的方向加以引导,或者促使细胞内发生基因的重新组合优化遗传性状,获得所需要的高产、优质和低能的菌种。为达到这一目的,必须对微生物作诱变处理。本文对微生物诱变育种的物理、化学及复合方法进行了综述。

1 物理诱变

物理诱变有紫外线、激光、微波、X 射线、 γ 射线、 α 射线、 β 射线和快中子等,其中对微生物诱变效果较好、应用较广泛的有紫外线、微波、X 射线和 γ 射线。

1.1 紫外线

紫外诱变技术是诱变优良菌株的常规育种方法。由于其设备简单,诱变效率高,操作安全简便等特点而被广泛应用。DNA 和 RNA 的嘌呤和嘧啶有很强的紫外光吸收能力,最大的吸收峰在 260 nm。紫外辐射能作用于 DNA,因此在 260 nm 的紫外辐射是最有效的致死剂。紫外线被吸收后引起突变的原因,一般认为是:有的是 DNA 与蛋白质交联^[1],有的是胞嘧啶与尿嘧啶之间的水合作用,有的是 DNA 分子内或分子间发生交联反应,如使 DNA 分子中相邻的嘧啶碱基形成嘧啶二聚体,二聚体的出现会减弱双链间氢键的作用,并引起双链结构扭曲变形,阻碍碱基间的正常配对,从而有可能引起突变或死亡,同时二聚体的形成还会妨碍双链的解开,因而影响 DNA 的正常复制和转录,从而使子代 DNA 形成缺口,碱基错误插入该缺口,造成新链的碱基序列与母链不同而引起突

作者简介:朱兴杰,男,研究生在读,研究方向:环境毒理学

通讯作者:汲晨锋,(E-mail) chnzhxj@163.com

1.哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心,哈尔滨 150076;

2.哈尔滨商业大学药物研究所博士后科研工作站,哈尔滨 150076;

3.抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心,黑龙江 哈尔滨 150076

• 496 •

变。紫外辐射还可以引起转换、颠换、移码突变或缺失等^[2]。其中形成嘧啶二聚体是产生突变的主要原因，嘧啶二聚体不仅可以由单链上相邻的两个胸腺嘧啶反应后形成，也可以由双链相应的两个胸腺嘧啶之间产生。此外，紫外诱变在核酸中往往造成比较单一的损伤，所以在 DNA 的损伤与修复研究中也有一定的意义^[3]。

1.2 微波

微波作为一种高频电磁波，能刺激水、蛋白质、核苷酸、脂肪和碳水化合物等极性分子快速震动。在 2450MHz 频率作用下，水分子能在 1s 内来回震动 24.5×10^8 次。这种震动能引起摩擦，因此可以使得单孢子悬液内 DNA 分子间强烈摩擦，胞内 DNA 分子氢键和碱基堆积化学力受损，使得 DNA 结构发生变化，从而发生遗传变异；微波具有传导作用和极强的穿透力，在引起细胞壁分子间强烈震动和摩擦时，改变其通透性，使细胞内含物迅速向胞外渗透^[4]。在试验中，究竟是微波辐射直接作用于微生物 DNA 引起变异，还是其穿透力使细胞壁通透性增加，导致核质变换而引起突变，目前尚不明了，有待进一步研究。

一般认为诱变致死率只与诱变剂量有关，而在微波诱变发现中孢子悬液水浴辐照处理 180s 致死率达 95%以上^[5]，由此认为致死率不仅受辐照剂量的影响，而且受瞬时强烈热效应的影响，直接辐射处理时，微波引起分子间强烈震动和摩擦产生热能，导致微生物在未接受到足够损伤造成突变的照射量之前，由于蛋白质变性，酶失活，孢子死亡，致死率增大。这种瞬时强烈热效应的影响已被一些实验证明。

1.3 X 射线及 γ 射线等

X 射线和 γ 射线都是高能电磁波，具有很强的穿透能力，只要强度适当可以使生物分子发生电离，从而使生物体遭受破坏性损伤，直接或间接地改变 DNA 结构。其直接效应是脱氧核酸的碱基发生氧化，或脱氧核糖的化学键和糖一磷酸相连接的化学键，DNA 的单链或双链键断裂。间接效应是电离辐射使水或有机分子产生自由基，这些自由基与细胞中的溶质分子起作用，发生化学变化，作用于 DNA 分子而引起缺失和损伤。亚细胞结构损伤引起酶的释放，代谢方向性和协调性的破坏促使原初损伤进一步扩展^[6]。此外，电离辐射还能引起染色体畸变，发生染色体断裂，形成染色体结构的缺失、易位和倒位等。

2 化学诱变

在微生物诱变中，有诱变作用的化学物质很多，主要有烷化剂、亚硝基胍、硫酸二乙酯、氮芥盐酸盐、5-溴尿嘧啶等，这些化学诱变剂对细胞都具有强烈的毒性，一般不能被微生物所利用，作用后使微生物发生变异而起到诱变育种的作用。化学诱变剂往往具有专一性，一种诱变剂对基因的某部位发生作用，对其余部位则影响很少。由于突变

多为基因突变，并且主要是碱基的改变，其中尤以转换为多数，因此各种具有诱发作用的化学物质和碱基接触时能起化学反应，然后通过 DNA 的复制使碱基发生改变。化学诱变剂对 DNA 分子的这种特异效应，不仅有利于控制诱变育种，并且可以用于揭示突变过程遗传物质的变化及研究诱变与致癌的关系。

2.1 烷化剂

烷化剂是最有效，也是用得最广泛的化学诱变剂之一。依靠 NTG 诱发的突变主要是 GC-AT 转换，另外还有小范围切除、移码突变及 GC 对的缺失^[7]。在自然条件下烷化剂容易分解，而在酸性 (PH5.5) 条件下会产生 HNO_2 。虽然 HNO_2 本身就是诱变剂，但在 NTG 有活性时 (PH6~9)，它却无诱变效果。在碱性条件下，NTG 会形成重氮甲烷 (CH_2N_2)，它是引起致死和突变的主要原因。它的效应很可能是 CH_2N_2 对 DNA 的烷化作用引起的^[2]。

2.2 亚硝基胍

亚硝基胍的作用方式主要是诱发 GC—AT 的转换，它能氧化脱去 A、G 和 C 的氨基，使 $\text{A} \rightarrow \text{HX}$ (次黄嘌呤)， $\text{C} \rightarrow \text{U}$ (尿嘧啶)， $\text{G} \rightarrow \text{X}$ (黄嘌呤)。由于所形成的新碱基改变了原来碱基的性质，再复制时就会引起 A:T→G:C 的转换，G:C→A:T 的转换而造成突变。它除有较强的诱变作用外，还能诱发邻近位置基因的并发突变，而且特别容易诱发 DNA 复制叉附近的基因突变，随着复制叉的移动，它的作用位置也随着移动^[8]。

总之，化学诱变剂在微生物育种中的应用较多，有的诱变效果也较为理想。但因其对人体的致畸致癌作用，实际应用中也受到一定的限制。

3 复合诱变

复合因子处理是指两种或两种以上的诱变因子诱发菌体突变。各种诱变因子的作用机制不一样，主要是 DNA 分子上的不同基因位点对各种诱变剂吸收阈值有较大差异，即不同诱变剂对基因作用位点有一定的专一性，有的甚至具有特异性，因此多因子复合处理，可以取长补短，动摇 DNA 分子上多种基因的遗传稳定性，能导致较大的突变，得到更多的突变类型。

3.1 空间诱变

空间诱变育种，就是将航天高技术与传统的物理化学诱变及分子技术等相结合的新的育种技术。经特殊的空间环境条件作用，引起生物体的染色体畸变，进而导致生物体遗传变异。空间环境的主要特征为微重力、空间辐射、超真空和超净环境等^[9]。

3.1.1 微重力

在卫星近地面空间条件下，各种物体都处于微重力状态。当外界微重力信号被细胞膜表面受体分子识别后，可以通过调节真核细菌细胞质膜上 Ca^{2+} 传递转化系统，或者经

过磷酸肌醇信使系统把刺激信号传递给细胞内贮钙体,引起贮钙体内 Ca^{2+} 的释放,使细胞质内 Ca^{2+} 浓度发生改变,从而影响与一些钙受体蛋白的结合,其中最重要的是 Ca^{2+} -CaM (钙调节蛋白)。 Ca^{2+} 、 Ca^{2+} -CaM 能调节细胞体内蛋白质的磷酸化和脱磷酸化作用。因此,它在细胞分裂期微管的组装与去组装、染色体移动、微丝的构建、光合系统的激活等方面起着重要作用,从而影响细胞分裂、细胞运动、细胞间信息传递、光合作用和生长发育等生理生化过程。在微重力条件下,可见激素分布、细胞结构、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 与细胞膜结合状态的明显变化,并且出现细胞核畸变、分裂紊乱、浓缩染色体增加、核小体减少,说明微重力引起遗传物质的改变。有人认为,这些可能是地面微生物菌种繁殖时间延长的原因^[10-13]。

3.1.2 太空辐射

太空辐射的主要来源有三个方面^[9]:地球磁场捕获高能粒子产生的俘获带辐射、太阳外突发性事件产生的银河宇宙射线(GCR)及太阳爆发产生的太阳粒子(SPE)事件。俘获带主要由质子(内区)及电子(外层带)组成。GCR 中 98%是质子及更重的离子,只有 2%是电子和正电子;在重的部分中,质子占 87%,氦离子占 12%,其他重离子占 1%。GCR 粒子的能量范围可以从 0.3 GeV/u 到 2 GeV/u,其中一半剂量来自能量超过 850 GeV/u 的离子。SPE 是由于太阳磁暴引起太阳爆发,而发射大量的带电粒子,如质子、氦核及更重的离子,这些粒子的能量范围约为 10~15 MeV^[14,15]。

许多实验证明,空间诱变与地面辐射处理发生的变异情况有许多类似之处。辐射敏化剂预处理能增加生物损伤。有人提出重粒子作用模型:当单个重粒子穿过生物体时,会形成大量能量沉积,引起被打击机体的有效损伤。如果这种粒子停留在生物体内,则损伤更大。DNA 和生物膜是核膜是射线作用的靶子。DNA 结构的损伤主要有单、双链断裂,碱基和糖的损伤,DNA 与 DNA、DNA 与蛋白质交联等;其中单、双链断裂较多见。富含胸腺嘧啶的区域最易受到破坏。常见的膜损伤有膜结构的改变、膜结合酶活性和膜受体功能降低,DNA 膜复合体的解离,膜内外电解质平衡的破坏及能量供应的障碍等。DNA 断裂或其他损伤会引起细胞的一系列修复活动。若损伤未被修复或被错误修复,就会表现出遗传变异^[16,17]。

3.1.3 其他诱变因素

实际上,空中搭载材料是处于近地空间各诱变因素的复合在作用之中的,包括宇宙射线、高真空、超真空、卫星发射与着陆时强震动及其他未知因素。其中微重力和空间辐射是主要的诱变因素,并倾向于微重力通过提高生物对诱变剂的敏感性和抑制 DNA 损伤的修复,加剧生物损伤并提高变异率。

3.2 离子注入

离子注入技法是利用离子注入设备生产高能离子束(40-60 keV)并注入生物体引起遗传物质的永久改变。离子注入诱变育种的特点,表明了其是一种物理效应、化学效应,是集化学诱变、物理诱变为一体的综合诱变方法^[18]。但是生物效应是个连续变化的过程,很难截然分开,离子注入的同时向受照射机体内输入能量、离子和电荷,其原初过程极为复杂且有特异性^[19]。

离子注入对生物体的作用是集动量传递、能量、质量沉积和电荷的中和与交换于一体的联合作用的观点^[20-23]。其中,能量沉积起到主要的作用。能量沉积指注入的离子与生物体大分子发生一系列碰撞并逐步失去能量,而生物大分子逐步获得能量进而发生键断裂、原子被击出位、生物大分子留下断键或缺陷的过程;质量沉积指注入的离子与生物大分子形成新的分子;动量传递会在分子中产生级联损伤;电荷交换会引起生物分子电子转移造成损伤,从而使生物体产生死亡、自由基间接损伤、染色体重复、易位、倒位或使DNA分子断裂、碱基缺失等多种生物学效应^[24-27]。

3.3 激光

激光是一种光量子流,又称光微粒。其生物学的效应是光、电、热、压力和磁效应的综合作用^[28]。上述效应累积,使细胞DNA分子吸收、聚积能量并进行能量再分配,使细胞DNA处于一种易于突变的状态,继而发生一系列的诸如断键、聚合、交联等物理和化学变化,导致DNA分子结构的改变即DNA分子的损伤和突变,最终引起突变株生物学属性变化^[29]。如果是控制某种代谢途径的酶系基因水平上的改变,则有可能增加某一特定代谢产物的积累^[30]。相对于传统的紫外诱变手段,激光诱变具有高效、稳定、高选择性、回复突变率低、定向变异率高、辐射损伤轻、当代变异、无污染等优点,并且激光还可促使作物增产、提高植物的光合效率、根尖有丝分裂频率等生物效应发生,而逐渐受到研究人员的关注。

参 考 文 献

- [1] Madigan, M. T(美) Martinko J. M(美), Parker, J(美). 微生物生物学[M]. 北京:科学出版社, 2001:390.
- [2] 曹友声, 刘仲敏. 现代工业微生物学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 1998.
- [3] WANG Fu-zhuan, LIANG Qiu-xia, et al. Applications of mutation and screening in microbiology breeding [J]. Transaction of Luoyang Normal College, 2002, (2): 95-99.
- [4] 冯清平, 微波对微生物诱变生物效应的研究[J]. 甘肃科学学报, 1994, 6(4): 67-69.
- [5] 李永泉, 微波诱变选育木聚糖酶高产菌[J]. 微波学报, 2001, 17(1): 50-53.

- [6] WU De-chang. Radiology [M]. Beijing: Military Medicine Press, 2001 (in Chinese).
- [7] 王付转,梁秋霞,李宗伟,王雁萍,吴健. 诱变和筛选方法在微生物育种中的应用[J]. 洛阳师范学院学报2002,(2):95-99.
- [8] <http://bbioo.com/bio101/2006/7257.htm>.
- [9] 田兴山,张玲华,郭勇,潘木水,周凤珍,邝哲师,黄小光,李国立,孙晓刚. 空间诱变在微生物菌种选育上的研究进展[J]. 生物技术通讯2005,(4):105-108.
- [10] 蒋兴邨. “8885” 返地卫星搭载对水稻遗传性的影响[J]. 科学通报1991,23:1820.
- [11] 刘禄祥. 农作物空间技术育种研究现状与展望[A] 中美农业科技与发展研讨会文集[C]. 北京: 中国农业出版社,1996.221.
- [12] More MJ. Singmal transduction and phosphatidy Linostol turn over in plants[J]. Plant Physiology, 1989,76:118.
- [13] Adamchuk NI. Ultratructural and functional changes of photosynthetic apparatus of Arabidopsis Thaliana (L) heyneh induced by clinorotation [J]. Adv Space Res, 1998,21(819):1131.
- [14] 温贤芳,刘录祥. 我国农业空间诱变育种研究进展[J]. 高科技与产业化, 2001, 6:22.
- [15] 杨垂绪,梅曼彤. 太空放射生物学[M]. 广州:中山大学出版社,1995,7.
- [16] 顾薇玲,彭惠林,杨蕴刘等. 微重力和宇宙射线对某些微生物的影响[J]. 植物生理学报,1989,15(4):397.
- [17] James WC, Thomas KG, Simon PS. Cosmic rays at the energy frontier [M]. New Yor: Microsoft Corporation, 2001,1993.
- [18] 梁慧星. 离子注入技术在微生物诱变育种中的研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(9):2564-2565.
- [19] 汪伟明. 微生物诱变育种技术——离子注入法[J]. 科技信息,2007,20,(20).
- [20] 宋道军,余汛,姚建铭等. 低能离子束对微生物细胞的刻蚀与损伤研究[J]. 生物化学与生物物理学报,1998,30(6):570-574.
- [21] Shao Chunlin, Xu An, Yu Zengliang. Charge exchange effect of ionimplantation to biomolecules [J]. High Technology Letters,1997,20(2):70-73.
- [22] SONG Dao jun, YAO Jian ming, SHAO Chun lin. A possible mechanism of dose related survival of microorganism implanted by N⁺ ions[J]. High Technology Letters,1999,22(3):129-132.
- [23] 卞坡,张艳锋,吴健等. 低能离子注入生物组织原初过程的模拟计算[J]. 郑州大学学报,2001,33(1):45-49.
- [24] 施巧琴,吴松刚. 工业微生物育种学(第二版)[M]. 北京:科学出版社, 2003: 1-4, 76-78.
- [25] Parekh S, Vinci V A, Strobel R J. Improvement of microbial strains and fermentation processes[J]. Apply Microbiol Biotechnol,2000,54:287--301.

- [26] 陈宇,林梓鑫,张峰等.离子注入微生物的生物效应研究[J].中国抗生素杂志,1998,23(6):415-419.
- [27] 雷肇祖,钱志良,章健.工业菌种选育述评[J].工业微生物,2004,34(1):39-51.
- [28] 冯光文,成浩,徐辉,吕长武,吕杰,曾宪贤, 激光诱变技术在生物育种中的应用[J].激光生物学, 2007,5:56-61.
- [29] 向洋.激光诱变及生物学作用机制研究[J].光电子·激光,1994,5(2):87~90
- [30] 胡卫红,陈有为,李绍兰等.CO₂ 激光辐照对酿酒酵母的诱变作用[J].微生物学通报,2000,27(1):36~38.