

热效应在微生物诱变育种中的应用

高兴强 黄运红 戴 菲 付学琴 龙中儿*

(江西师范大学生命科学学院 江西 南昌 330022)

摘要: 本文综述了微生物诱变育种中的热效应机理及其应用研究进展。热在微生物诱变育种中具有热诱变效应和热筛选效应, 热诱变效应通过热引起DNA中G-C碱基对的置换实现, 热筛选效应可以从其他诱变剂诱变的菌体中获得更高的正向突变率。

关键词: 热诱变效应, 热筛选效应, 诱变育种

The Application of Heating Effect in Breeding of Microorganism

GAO Xing-Qiang HUANG Yun-Hong DAI Fei FU Xue-Qin LONG Zhong-Er*

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China)

Abstract: Advances in mechanism and application of the heating effect in breeding of microorganism are reviewed in this paper. Heat produces mutagenesis effect and screening effect. Heating mutagenesis effect is occurred through the substitution of G-C base pair induced by heat, and heating screening effect produces higher forward mutation rate induced by other mutagens.

Keywords: Heating mutagenesis effect, Heating screening effect, Mutagenesis breeding

在微生物育种工作中, 诱变育种以其操作简便, 诱变手段多样, 且收效明显而成为实验室及生产上最为常用的目的菌株选育方式, 特别是对遗传背景不很清楚的对象, 诱变育种更是育种方法的首选。目前, 国内外常用的诱变方法有物理诱变方法和化学诱变方法。但常用的物理诱变方法通常需要专用设备, 且正突变率较低, 筛选工作量大。而化学诱变剂(如一些烷化剂EMS、NTG等)大多是致癌剂或剧毒药品, 使用时须十分谨慎。不断探索新的诱变育种方法具有重要意义^[1]。自研究者发现热对微生物的诱变效应以来^[2,3], 热效应广泛应用于微生物的诱变育种实践中, 包括热诱变效应和热筛选效应。本

文综述了该领域的研究成果。

1 热诱变效应

1.1 热诱变机理

尽管热处理使大肠杆菌的耐热突变频率增高、基因的不稳定性增加的现象^[3]早已被发现, 有关热诱变的机理还不清楚。目前, 有关热诱变机理研究的成果主要是以大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)T₄噬菌体为材料获得的^[4~6], 一般认为, 热对微生物的诱变作用是通过热引起DNA中G-C碱基对的置换实现的, 但有关置换的具体机制研究却得到了明显不同的结果。

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目(No. 2008GZN0058)

* 通讯作者: Longzhonger@163.com

收稿日期: 2009-03-03; 接受日期: 2009-05-12 © 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Baltz 等^[4]于 1976 年发现, 热处理使 T4 噬菌体中胞嘧啶 C(5-羟甲基胞嘧啶)脱氨基形成 U(尿嘧啶), 而未经校正的尿嘧啶会在下一轮复制过程中和 A(腺嘌呤)配对, 形成 U-A 碱基对, 在第二次复制中则由于 A 和 T(胸腺嘧啶)配对, 实现 G-C A-T 的转换, 且该转换频率受溶液的 pH 值和离子强度的影响。

随后的研究又发现热处理 T4 噬菌体引起 G-C 碱基对的颠换, 这种途径的突变位点依然是 G-C 碱基对, 但首先发生变化的碱基却是 G。由于热的作用 G 的糖苷结合位点从 N9 移到 N2 变为 G*, G* 在复制过程中有时会被作为一种嘧啶, 分别与 G 和 A 配对。G* 与 G 配对时形成 G*-G 碱基对, 在下一轮的复制中则形成 C-G 碱基对, 实现 G-C C-G 的颠换^[5]。G* 还可以与 A 配对, 形成 G*-A 错配, 然后在下一轮复制过程中形成 T-A 碱基对, 实现 G-C 到 T-A 的颠换^[6]。

1.2 热诱变效应在微生物育种中的应用

1.2.1 单一热效应的诱变育种: 单一热效应的诱变育种, 其热诱变育种的程序与其他诱变剂的诱变过程基本相同, 即首先制备细菌或孢子悬液, 然后进行诱变处理, 再选用合适的筛选方法筛选到目标菌株。所不同之处在于诱变过程, 热诱变过程仅仅以适当浓度的菌或孢子悬液置于一定温度的水浴锅内处理一定时间即可, 所需设备简单, 操作方便安全, 且热效应明显, 可控性好, 相较其他物理诱变方法经济实用。

热诱变育种的诱变过程在实际操作过程中可采用恒温或变温处理。如李正群^[7]将林肯霉菌 90-2-196 的孢子液加热诱变, 找出了比较合适的加热温度、时间和菌龄, 使得正突变率达 70%, 且无负突变出现(相较通过紫外线诱变的 25 瓶中有近 1/3 发生了负变)。赵晓祥等^[8]以粪产碱杆菌 B220 作为出发菌株, 通过热诱变获得能够稳定传代的 B22022 突变菌株, 该热诱变菌株在不同 pH、CaCl₂ 添加量、菌液添加量以及不同温度条件下, 与原菌株 B220 相比具有更好的絮凝性能, 且传代稳定、具有广泛的 pH 和温度适应性。而吴明霞等^[9]以兽疫链球菌为出发菌种, 采用变温进行诱变处理, 在适宜诱变条件(温度 10°C 处理 9 min, 温度 50°C 处理 6 min)下, 得到的变温诱变菌株相对于原菌株的透明质酸产量有显著提高, 产量由 1.99 g/L 提高到 2.95 g/L, 增加率为

48%。

同时, 热诱变处理的对象可以是孢子、菌体, 也可以是原生质体。卞小莹等^[10]将装有原生质体悬浮液的离心管置于 60°C 的水浴中诱变处理后筛选得到菌株 H30-7, 对枯草芽孢杆菌的抗菌活性提高了 21.4%, 经转接 10 代后菌株抗菌活性与传代前菌株相比无显著差异, 且对 5 种病原细菌和 5 种植物病原真菌的抗菌活性比原始菌株有显著提高。除此之外, 还可以采用原生质体再生和热诱变相结合的方法。

由此可见, 热诱变过程方便经济, 可控性好, 在实践中也取得了较为理想的效果。目前, 本实验室也利用高热处理一株产核苷类抗生素的炭样小单孢菌孢子液, 从中获得产素正变株 20 余株, 其中一株的产素率提高 30%以上。

1.2.2 热和其他诱变因子的复合诱变育种: 诱变育种过程中, 单一因子的诱变效果有时不是很理想, 复合诱变育种则可以发挥各自的优点, 从而取长补短, 进而达到比较满意的结果。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, 具体方法包括同一诱变剂的重复使用、两种或多种诱变剂的先后使用、以及两种或多种诱变剂的同时使用等^[11]。

1) 热和其他物理因子的复合诱变: 常用的物理诱变剂如紫外线、X-射线、激光和低能离子注入等。

徐建春等^[12]以衣康酸生产菌土曲霉 NLYT234 为出发菌株, 经高温、紫外线先后诱变处理后筛选获得一株性能稳定的衣康酸高产突变株, 经 100 m³ 发酵罐生产验证, 菌种诱变后酸度较以前上升 21%, 糖酸转化率上升 1%以上。将此高产衣康酸突变菌株连续传接 7 代产酸能力基本不变, 稳定性非常好。

2) 微波诱变: 微波辐射属于一种低能电磁辐射, 具有较强生物效应的频率范围在 300 MHz~300 GHz, 对生物体具有热效应和非热效应。其热效应是指它能引起生物体局部温度上升, 从而引起生理生化反应; 非热效应指在微波作用下, 生物体会产生非温度关联的各种生理生化反应。在上述两种效应的综合作用下, 生物体会产生一系列突变效应^[13~15], 因此, 微波诱变是热和其他诱变因子复合诱变的一个特例。在微生物育种实践中, 微波既可以单独作为诱变剂应用, 又可以和其他物理诱变剂或化学诱变剂联合应用。

微波的单独使用:陈力力等^[16]采用微波诱变方法对井冈霉素生产菌株进行诱变处理,获得4株平均效价比出发菌株分别高出17.5%、15%、20%、21.7%的突变株。沙土管保存10个月后,取沙土管孢子接种斜面连续传代4次,测定化学效价,代间效价差异不明显,遗传性能稳定。

微波与其他物理诱变因子联合应用:赵丰丽等^[17]通过微波、紫外先后对假丝酵母单孢子悬液进行诱变处理,获得1株油脂高产菌B2。在最佳条件下,菌株的生物量、油脂产量最大提高率分别为38.99%和35.62%。经传代8代性状保持稳定。李永泉、贺筱蓉^[18]采用激光和微波两种物理因子先后对去甲基金霉素生产菌-金霉素链霉菌进行诱变处理,选育到一株产量较高的生产菌HL11,发酵效价从2831 U/mL提高到4683 U/mL,提高了65.4%。所选育的菌株经多次传代,遗传性状非常稳定。李乃强等^[19]对一株宇佐美曲霉进行紫外、微波的逐级诱变,使酸性蛋白酶产量从2800 U/mL提高到7200 U/mL,突变株传代多次,产酶性能保持稳定。

微波与化学诱变剂的联合应用:米运宏,邓梁华等^[20]从原始菌克雷伯氏菌(*Klebsiella*)出发,经过NTG与微波先后诱变处理后,筛选分离得到高产异淀粉酶的菌株NCP-03,酶活力由原来的28 U/mL提高到210 U/mL,比原始菌种产酶活力提高了近7倍。

复合因子较单一因子诱变效果有很大优势。但因目前大多微生物,尤其是抗生素的产生菌的遗传背景不清楚,往往对诱变剂,特别是复合诱变剂的选择使用,带有很大的盲目性。

2 热筛选效应

在微生物诱变育种工作中,热不仅可以作为诱变剂,也可作为从经其他诱变因子诱变后的菌体或孢子液悬浮液中筛选目标突变株的筛选条件,以提高筛选效率,进一步提高诱变育种的效率。热筛选效应在实际使用中也有两种不同的情况。

2.1 作为提高正向突变率的控制条件

由于热影响微生物细胞酶的活性,进而影响突变后细胞的修复过程,同时影响培养基中养分的供给及水分的散失等,因而,在适宜的温度条件下培养经其他诱变因子诱变后的菌体或孢子,可以提高

诱变的正向突变率。如吴雪昌等^[21]将紫外诱变了的产抗生素链霉菌(*Streptomyces* sp.)AP19-1菌株的孢子置于适宜生长的温度27°C与接近抑制生长的胁迫温度33°C下培养,结果表明在33°C下生长获得的子代菌株中,产抗生素的正向突变体所占的比例明显比在27°C下培养的高,但未经诱变的对照菌株,产抗生素的水平不因前期孢子培养温度的不同而变化;缪克排^[22]将紫外诱变的5.11-3菌株孢子悬浮液涂平板,分组置于适宜生长温度36°C、略低于适宜生长温度的33°C,和接近抑制生长的胁迫温度30°C、39°C下培养。结果表明在30°C下培养获得的子代菌株,产金霉素的正向突变子所占的比例和总体产抗水平均明显高于其他温度组;吴婷婷^[23]发现,当紫外诱变后的菌株培养温度接近抑制酵母生长的胁迫温度40°C时,诱变株群体中的正变率有明显提高,且两菌株均在31°C产生了次高的正变株分布值。但是在25°C~40°C培养的未经紫外诱变的对照菌株的相对产酒率无明显差异。

2.2 作为耐高温/低温突变株的筛选条件

为满足生物转化过程的各种实际需要,生产中通常需要选育耐高温或低温的突变菌株。为了获得耐高温/低温突变菌株,需要用相应的高温/低温培养条件从经诱变的群体中的筛选目标菌株,利用了突变的多向性及筛选的定向性这个原理实现“定向”诱变育种。如刘海臣等^[24]将经紫外线诱变后的酵母菌通过高温培养,筛选得到两株能在52°C高温下快速生长的突变株。

3 结论与展望

在微生物的诱变育种工作中,热不仅具有诱变效应,而且在其他诱变剂诱变处理后作为筛选条件,可提高诱变正变率和筛选效率,增强诱变育种中对正向突变率的可控性。相对于其他方法,热诱变方法具有设备简单,操作方便安全,热效应明显,可控性好等特点,因而在微生物的诱变育种工作中具有广阔的前景。当然,目前有关热诱变的机理及其影响因素还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 彭 燕, 李 戈, 陈秀贤, 等. 抗生素产生菌诱变育种的研究进展. 生物技术通报, 2007, 5: 34~38.

- [2] Zamenhof S, Greer S. Heat as an agent producing high frequency of mutations and unstable genes in *Escherichia coli*. *Nature*, 1958, **182**: 611–613.
- [3] Drake JW, McGuire J. Characteristics of mutations appearing spontaneously in extracellular particles of bacteriophage T4. *Genetics*, 1967, **55**(3): 387–398.
- [4] Baltz RH, Bingham PM, Drake JW. Heat mutagenesis in bacteriophage T4: the transition pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, **73**(4): 1269–1273.
- [5] Bingham PM, Baltz RH, Ripley LS, et al. Heat mutagenesis in bacteriophage T4: the transversion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, **73**(11): 4159–4163.
- [6] Kricker MC, Drake JW. Heat mutagenesis in bacteriophage T4: another walk down the transversion pathway. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**(6): 3037–3039.
- [7] 李正群. 热诱变筛选林可霉素高产菌株的探索. 氨基酸和生物资源, 2000, **22**(2): 3–5.
- [8] 赵晓祥, 詹小菁. 微生物絮凝剂的发酵培养和诱变研究. 环境污染与防治, 2007, **29**(12): 900–904.
- [9] 吴明霞, 邓静, 吴华昌, 等. 温度诱变选育透明质酸产生菌. 农产品加工·学刊, 2008, **1**: 13–15.
- [10] 卞小莹, 吴文君, 王群利, 等. 秦岭链霉菌的原生质体再生与诱变育种. 微生物学通报, 2008, **35**(6): 929–933.
- [11] 周德庆. 微生物学教程. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2002, p.217.
- [12] 徐建春, 李霞, 王海英. 发酵法生产衣康酸——高产菌株的选育. 发酵科技通讯, 2008, **37**(1): 30–32.
- [13] 韩丽丽, 刘敏. 诱变方法在微生物育种中的应用. 酿酒, 2008, **35**(3): 16–18.
- [14] Leach WM. Genetic, growth and reproductive effects of microwave radiation. *Bull NY Academic Medicine*, 1980, **55**(2): 249–257.
- [15] Kirschvink Jr. Microwave absorption by magnetite: a possible mechanism for coupling nonthermal levels of radiation to biological systems. *Bioelectromagnetics*, 1996, **17**(3): 187–194.
- [16] 陈力力, 鲁迎新. 微波诱变选育井冈霉素高产菌. 生物技术, **13**(5): 14–15.
- [17] 赵丰丽, 黄翠, 陈睿. 复合诱变对酵母产脂的影响及检测方法的研究. 中国油脂, 2007, **32**(7): 34–37.
- [18] 李永泉, 贺筱蓉. 微波诱变和激光诱变相结合选育金霉素链霉菌的研究. 生物工程学报, 1998, **14**(4): 445–448.
- [19] 李乃强, 潘军华, 张星元, 等. 霉菌酸性蛋白酶高产突变菌株 9169 的选育. 无锡轻工大学学报, 2001, **20**(5): 493–496.
- [20] 米运宏, 邓梁华, 黄静, 等. 微波与 NTG 复合诱变选育 Klebsiella 高产异淀粉酶突变株. 中国食品添加剂, 2008, **2**: 96–99.
- [21] 吴雪昌, 汪志芸, 周婕, 等. 提高产抗生素链霉菌紫外诱变正变率的研究. 遗传, 2004, **26**(4): 499–504.
- [22] 缪克排. 金色链霉菌发酵条件优化及高产菌株选育的新方法. 浙江大学硕士学位论文, 2005, p.4.
- [23] 吴婷婷. 紫外诱变与温度互作提高酒精酵母高产菌株选育效率及其机理探讨. 浙江大学硕士学位论文, 2006, p.4.
- [24] 刘海臣, 冉淦侨, 张兴, 等. 酒糟中超高温耐高酒精度酵母菌株的选育. 酿酒科技, 2007, **5**: 28–31.

稿件书写规范**论文中有关正、斜体的约定**

物种的学名:菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶:前3个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如:*BamH I*、*Msp I*、*Sau3A I*等。

氨基酸和碱基的缩写:氨基酸缩写用3个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。