

文章编号 :1003-8701(2006)02-0062-04

链霉菌诱变育种方法综述

陈立梅^{1,2},汪旭^{1,2},李启云¹,杨石嶂¹,杨信东²

(1.吉林省农业科学院,吉林 公主岭 136100;2.吉林农业大学农学院,长春 130118)

摘要:主要论述了链霉菌的4种诱变方法,即物理诱变、化学诱变、空间技术诱变和复合诱变。同时对这4种方法的原理及具体操作方法进行了简要的阐述。其中物理诱变中的紫外线诱变方法是一种使用时间长、效果好、设备简单、值得推广的诱变剂。化学诱变方法中的EMS、8-Mop、NTG和LiCl也取得了很好的效果。近年来用宇宙系列生物卫星、科学返回卫星、空间站及航天飞机等空间飞行器,进行搭载微生物材料的空间诱变育种是培养新的生物菌种的一种有效方法。将以上诱变方法结合起来使用,可取得更好的诱变效果。

关键词:链霉菌;育种;诱变

中图分类号:S4822

文献标识码:A

放线菌是产生抗生素活性最大的一类微生物,迄今已在工业、医学、农业上都有利用抗生素成功的实例,而链霉菌又是放线菌中抗生素的主要产生菌,具有广泛的物种多样性和代谢多样性,是重要的资源微生物,但在链霉菌中普遍存在遗传不稳定性,而引起抗生素产量下降。因此,各国学者不断研究提高抗生素产量的方法,以期获得更大产量的抗生素,而提高产量的最重要途径是通过育种改变生产菌种。诱变育种是一种简便易行而且快速的选育方法,因而在抗生素的菌种筛选中应用最广泛。本文就链霉菌诱变育种的几种方法做了简要论述。

1 物理因子诱变方法

1.1 紫外线诱变法

紫外线是一种使用时间长、效果好、设备简单、值得推广的诱变剂,大约有80%的高产抗生素产生菌都曾经用过紫外线这一诱变方法。具体操作方法是:将斜面培养物制备成单孢子悬液或原生质体放在磁力搅拌器上,开紫外灯(30W,距30cm)照射不同的时间后,涂平皿(为防止回复突变,紫外线诱变后的操作应在红灯下进行)进行培养,然后挑取不同形态的单菌落接斜面,进行摇瓶发酵筛选。用此种方法,以土霉素产生菌龟裂链霉菌Lf-2为出发菌株,经过紫外线诱变后,筛选的菌株于出发菌株相比发酵效价提高了17.4%,发酵指数提高了23.9%。黄世文等对淡紫色吸水链霉菌进行紫外线诱变,所获菌株发酵液对水稻纹枯病和恶苗病的抑杀效果比原始菌株明显提高,并且证实用菌悬液涂培养基之后先在28℃培养24h,再在紫外灯下诱变菌株比涂后直接照射和直接照射菌悬液所获得的诱变菌株的生测效果好,这可能是微生物在培养24h后,正处在分裂生长的初始阶段,当受到外部能量作用时较易发生变异。孟勇等以带棒链霉菌为出发菌,经紫外线诱变,筛选到1株抗 20×10^{-3} g/mL的舒巴坦钠突变株my51,my51菌株产克拉维酸的效价达到 834.7×10^{-6} g/mL比出发菌株提高了1.18倍。张雪松以金色链霉菌为出发菌株,经溶菌酶作用制备原生质体,然后以紫外线对原生质体进行诱变处理,获得四环素高产菌株,第20号菌株相对效价为1.284。

收稿日期:2005-12-31

基金项目:本立项受到吉林省农业科学院生物技术中心项目“利用生物技术研制新型、高效、多功能生物农药”(JLPTC2004080)和科技部国家转基因植物研究与产业化专项“转基因杂交大豆育种研究及产业化”(JY03-B-16)的资助。

作者简介:陈立梅(1979-),女,硕士,研究方向:微生物农药。

1.2 激光辐照诱变法

一定量的激光照射生物体,其能量被生物大分子直接或间接吸收以后,可引起分子激发光解离、分解及生物大分子的自由基反应等,从而导致 DNA 分子或染色体发生畸变,使生物性状发生突变,这为选育和改良生物品种,提高生物品质提供了有利条件。

1.2.1 He-Ne 激光诱变法

He-Ne 激光辐照后引起抗生素产量变化的机理尚不太清楚,但是 Kapho 曾通过实验证明在一定的能量密度范围内,波长在 610~850nm 的 He-Ne 激光对细胞内 DNA 合成有刺激作用,即加速细胞内 DNA 合成率。陈五岭等报道 He-Ne 激光对红霉素链霉菌孢子及原生质体的诱变效应。分离到红霉素发酵单位提高 27.2% 的辐照株。研究了 He-Ne 激光对金霉素(Saureofaciens,简称 Sa)孢子的诱变效应。结果表明,小剂量 He-Ne 激光对 Sa 孢子的萌发具有促进作用,大剂量 He-Ne 激光的照射对 Sa 的孢子具有致死作用;激光诱变 Sa 孢子的正变率最高达到 6.6%。采用 He-Ne 激光对金霉素链霉菌原生质体诱变处理,再生菌株产抗能力与其本菌株相比,四环素产量平均提高 9.32%,最高提高 20.6%。He-Ne 激光和聚乙二醇对红霉素链霉菌和龟裂链霉菌灭活原生质体融合,融合子产抗能力与亲本相比,最多提高了 28.04%,且具有良好的遗传稳定性。

1.2.2 铜蒸气激光诱变育种

吴振倡等首次报道铜蒸气激光辐照林肯链霉菌,获得高产菌株,最高发酵单位比对照株提高 15.8%。同样用铜蒸气辐照天蓝淡红链霉菌,获得发酵单位比对照株提高 14.7% 高产株,最高发酵单位曾达国内最高水平。

1.3 微波诱变育种法

微波是一种高频率的电磁波,利用微波进行诱变具有设备简单、操作简便和安全可靠的特点。其诱变原理是能刺激水、蛋白质、核苷酸、脂肪和碳水化合物等极性分子快速震动。在 2 450 MHz 频率作用下,水分子能在 1 s 内 180° 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,孢子内 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。在试验中,究竟是微波辐照直接作用于微生物 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。陈力力采用微波诱变方法对井冈霉素生产菌株进行诱变处理,挑取单个菌落摇瓶初筛、复筛,测定化学效价,获得 4 株平均效价比出发菌株分别高出 17.5、15、20 和 21.7% 的突变株。采用沙土管长时间保存后连续传代 4 次,代间效价差异不明显,遗传性能稳定。

1.4 离子注入诱变育种方法

离子束是一种新的诱变源,离子注入法是近年来微生物育种中较新的一种育种方法。其诱变原理是微生物在核能离子注入后,受到不同程度的损伤,大到整个细胞形态、各种亚细胞结构的变化,小到组成细胞的生物大分子的变形,从而导致基因突变。它对生物体是集能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷中和与交换于一体的联合作用。因此,它与目前其他的诱变源相比,可以获得更高的突变率和更广的突变谱,由于其能量、质量、电量、剂量具有多种组合可能,因而可以在不同的作物及菌种的诱变育种中发挥巨大的作用。例如,向砥等利用离子注入选育高产壮观链霉菌,获得高产菌株,效价较出发菌株提高了 102.3%。桑金隆等通过离子注入诱变选育之江菌素产生菌,筛选到 1 株高产菌株,其效价比出发菌株提高 4 倍多。

1.5 $^{60}\text{Co}\lambda$ 射线诱变育种法

魏赛金等采用不同剂量的 $^{60}\text{Co}\lambda$ 射线,对南昌霉素产生菌诱变处理,初筛摇瓶产量正突变率达 21.08%;复筛摇瓶发酵效价比出发菌株提高 50% 以上的有 10 株,占初筛菌株的 5%;连续 4 批摇瓶发酵试验平均产量比出发菌株的产量提高 50% 以上;有 6 个菌株摇瓶产量分别比出发菌株提高 60%,其中 3 株平均摇瓶产量比出发菌株提高 70% 以上。王海彬以阿维链霉菌为出发菌株进行 $^{60}\text{Co}\lambda$ 诱变处理后,筛出缬氨酸缺陷型回复突变株。其摇瓶发酵单位可达到 $1\ 600\ \mu\text{g/mL}$,比出发菌株提高 33%。还有一些其它

的诱变方法,如离子束诱变法、快中子诱变法和通电处理法等,这些诱变方法也取得了很好的诱变效果。

2 化学因子诱变方法

化学诱变主要是导致碱基对的转换、缺失和易位等,如氯化锂诱变,普遍认为是它导致AT-GC碱基对的转换或导致碱基的缺失。甲基黄酸乙酯(EMS)诱导的突变株大多数是点突变,首先是鸟嘌呤的O⁶位置被烷基化,在DNA的复制过程中,烷基化的鸟嘌呤与胸腺嘧啶配对,导致碱基的替换,即G:C变为A:T。化学诱变剂的种类很多,如烷化剂、亚硝基化合物、叠氮化物、碱基类似物、抗生素、羟胺和吖啶等。当前在链霉素诱变育种上应用的主要是甲基磺酸乙酯(EMS)、LiCl、NaHSO₃、亚硝基胍(NTG)、盐酸羟胺、5-脒尿嘧啶(5-BU)、乙烯亚胺(EI)、亚硝酸(NA)和8-甲氧基补骨脂素(8-Mop)等,其中EMS、8-Mop、NTG和LiCl等都取得了很好的效果。如利用共突变理论,采用EMS诱变剂进行诱导处理,使诱变孢子的DNA产生高频率的突变,筛选到高产菌株,使发酵单位比出发菌株提高96.4%。蒋世春报道,经8-甲氧基补骨脂素诱变天蓝淡红链霉菌,获得1株摇瓶产量稳增7.47%的高产株。郎莉莉用同样的方法诱变肉桂地链霉菌,曾获得摇瓶发酵产量增幅达7.5%的高产株,并已在国内应用。

3 空间技术诱变育种

微生物空间生物学效应研究的是空间环境因子(如微重力、强辐射和低真空等)对活的微生物菌体的作用及生物对这种作用所做出的反应变化。因此,运用空间技术进行的微生物诱变育种是培养新的生物菌种的一种有效方法。近年来,人们利用宇宙系列生物卫星、科学返回卫星、空间站及航天飞机等空间飞行器,进行搭载微生物材料的空间诱变育种。通过外层空间特殊的物理化学环境,引起菌种的DNA分子的变异和重组,从而得到生物效价更高的高产菌种。如王璋等将生产微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)链霉菌 wzzf.L-m₁ 的孢子和斜面培养菌体搭载“神舟”四号无人飞船,并在斜面中添加诱变剂亚硝基胍(NTG)。结果筛选到5株性能优异、遗传性状稳定、产酶活力提高了30%以上、能够稳定发酵和生产高于3.5 u/mL的MTG,集中体现了航天飞船搭载的空间诱变育种技术效果。北京、上海所进行4年联合攻关,在“神舟”一号、二号、三号 and 四号上连续进行菌种太空搭载诱变,筛选并获得高发酵单位的HT-7菌株,使产品品质大幅度提高,终于产出了“新泰乐系列产品”。骆爱群等在返回式卫星上进行搭载NIKKO霉素产生菌圈状链霉菌,结果NIKKO霉素产生菌效价提高13%~18%。

4 复合诱变育种

采用两种或两种以上的方式进行诱变育种,在链霉菌的诱变育种上已经取得了很好的效果。如贺筱蓉等采用紫外同平板梯度浓度的亚硝基胍、纯铜蒸气混合诱变,筛选到高产菌株效价提高53.2%,其原理可能是激光对理化处理的微生物细胞有修复作用,使正突变率提高。但也有复合诱变使效果降低的例子。如吴振倡等在相同的条件下铜蒸气辐照龟裂链霉菌比其随后又用LiCl复合处理效果好,可能是与LiCl提高了细胞的修复系统的活性有关。现具体介绍几种复合诱变方法的例子:齐秀兰等以妥布霉素产生菌黑暗链霉菌 ATCC17920 为出发菌株经紫外线处理,获得产量较高的稳产菌株UV-59,又对其高温处理,得到1株T-541菌株,再对其进行原生质体制备,分别用UV、UV加LiCl以及亚硝基胍NTG诱变原生质体,获得4株高产菌株其效价比原株提高115%~150%。冀伟等应用统计学对林肯链霉菌诱变育种进行研究,证明UV+5-BU效果明显优于单独的紫外诱变。王金发等用UV+亚硫酸氢钠诱变龟裂链霉菌的原生质体获得1株产率提高58%的菌株。李永泉等利用激光和微波两种物理因子,对去甲基金霉素产生菌-金霉素链霉菌进行诱变处理,筛选得到高产株,使发酵效价提高了65.4%。

5 讨论

由于各种诱变剂对微生物DNA的作用位点和方式不尽相同,因此,反复使用同一诱变因子会出

现钝化现象,可能引起微生物的回复突变,这就要求在链霉菌进行诱变育种时要尽量选用新的诱变因子,才会有较大可能性取得成功。

诱变育种包括诱变和筛选两部分。筛选的工作量相当大,而采用理化因子对出发菌株做诱变处理后筛选出耐药性突变株,然后通过摇瓶复筛出高产菌株,可达到淘汰野生型、浓缩突变型的目的,大大减轻初筛工作量,提高菌种选育的工作效率。

原生质体由于去除外壁障碍,因而对各种诱变剂敏感性较强,往往正突变率高,因而利用原生质体直接诱变经过多种诱变剂处理过的钝化株而言,是一种较有意义的诱变方法。

诱变育种这种传统的育种方式虽然有弊端,但也具有菌种遗传稳定性高、简便、易行和安全等优点,仍然是链霉菌育种不可缺少的育种手段。而基因工程育种是链霉菌育种的发展方向。抗性基因、生物合成基因的克隆能直接大幅度提高抗生素产量;外源 DNA 在链霉菌克隆系统中的表达,大大开拓了人类对微生物的利用范围。迅速发展的重组 DNA 技术自身还在不断完善,从而能克服诸如工程菌不稳定和外源蛋白的分泌等问题。总之,链霉菌育种技术将随着其它相关学科的发展而不断发展与完善。

参考文献:

- [1] 黄世文,等. 淡紫色吸水链霉菌及其紫外诱变菌株用于害物生防研究[J]. 农业生物技术学报,2000,8(1):79-84.
- [2] 徐平,等. 链霉菌分类方法研究进展[J]. 微生物学杂志,2002,22(5):54-58.
- [3] 刘桂杰,等. 紫外诱变育种提高土霉素菌种的生产能力[J]. 中国医药杂志,1997,28(3):118-120.
- [4] 孟勇,等. 克拉微酸高产菌的选育[J]. 四川大学学报,2003,40(3):557-560.
- [5] 张雪松,等. 利用紫外线诱变原生质体筛选四环素高产菌株的研究[J]. 河北大学学报,1997,17(3):39-42.
- [6] 陈五岭,等. 氦氛激光辐照红霉素链霉菌诱变育种的研究[J]. 光子学报,1998,27(6):539-542.
- [7] 北京光学学会激光医用专业委员会编译. 激光医学基础与临床[M]. 北京:人民出版社,1989:261-268.
- [8] 陈五岭,等. 激光对金霉素链霉菌孢子的诱变效应[J]. 西北大学学报,2000,30(5):406-407.
- [9] 陈五岭,等. He-Ne 激光诱变原生质体选育四环素高产菌的研究[J]. 光子学报,1998,27(4):330-333.
- [10] 陈五岭,等. 氦氛激光在红霉素链霉菌和龟裂链霉菌灭活原生质体融合中的应用[J]. 光子学报,1998,27(7):651-655.
- [11] 吴振倡,等. 激光辐照的林肯链霉菌的研究[J]. 激光生物学,1995,4(1):599-601.
- [12] 吴振倡,等. 天兰淡红链霉菌的激光高产株的选育[J]. 激光生物学,1996,5(1):797-799.
- [13] 陈力力,等. 微波诱变选育井冈霉素高产菌[J]. 生物技术,2003,13(5):14-15.
- [14] 余增亮,等. 离子束生物技术引论[M]. 合肥:安徽科学出版社,1998,247.
- [15] 向砥,等. 离子注入选育高产壮观霉素的研究[J]. 激光生物学报,2002,11(4):276-279.
- [16] 桑金龙,等. 离子注入选育之江菌素产生菌[J]. 科技通报,2002,18(1):63-66.
- [17] 魏赛金,等. ^{60}Co 射线对南昌霉素产生菌的诱变选育[J]. 中国抗生素杂志,2002,27(10):580-581.
- [18] 王海彬,等. 阿维菌素 B_{1a} 组分高产菌株的选育[J]. 中国医药工业杂志,2001,32(7):295-297.
- [19] 赵炎生,等. 赤霉素产生菌的激光、化学复合诱变育种研究[J]. 激光生物学报,1997,6(4):1202-1208.
- [20] 赵永亮,等. 玉米化学诱变研究进展[J]. 华北农学报,1996,11(4):24-28.
- [21] 涂国全,等. 梅岭霉素高产菌抗药性突变标志诱变筛选模型的初步研究[J]. 综合生物学通报,2000,15:201-211.
- [22] 涂国全,等. 南昌霉素高产菌株链霉素抗性基因突变株筛选研究[J]. 微生物学通报,2002,29(5):10-13.
- [23] 涂国全,等. 梅岭霉素高产菌株链霉素抗性基因突变株筛选[J]. 微生物学通报,2002,29(6):33-37.
- [24] 蒋世春,等. 8-mop 选育天兰淡红链霉菌高产株[J]. 激光生物学报,2003,12(1):53-55.
- [25] 郎莉莉,等. 8-mop 选育肉桂地链霉菌的研究[J]. 激光生物学报,2003,12(1):56-58.
- [26] 骆爱群,等. NIKKO 霉素产生菌的空间生物学效应研究[J]. 航天医学与医学工程,1998,11(6):411-414.
- [27] 王璋,等. 链霉菌 WZFF.L-M1 搭载“神州”四号飞船的空间育种效果[J]. 食品工业科学,2003,24(8):17-20.
- [28] 贺筱蓉,等. 原生质体诱变选育去甲基金霉素高产菌[J]. 杭州大学学报,1997,24(2):170-177.
- [29] 吴振倡,等. 铜蒸汽激光及其与氯化锂复合选育龟裂链霉菌的研究[J]. 激光生物学,1997,6(2):1068-1070.
- [30] 齐秀兰,等. 妥布霉素诱变育种的研究[J]. 微生物学杂志,1995,15(1):9-13.
- [31] 冀伟,等. 应用统计学对林肯链霉菌诱变育种的研究[J]. 河北师范大学学报,1996,20(1):85-88.
- [32] 王金发,等. 紫外线和亚硫酸氢钠对龟裂链霉菌原生质体的诱变作用[J]. 中国抗生素杂志,1989,14(2):86-88.
- [33] 李永泉,等. 微波诱变和激光诱变相结合选育金霉素链霉菌的研究[J]. 生物工程学报,1998,14(4):445-448.
- [34] 朱非,等. 链霉菌育种进展[J]. 氨基酸和生物资源,1998,20(3):54-57.