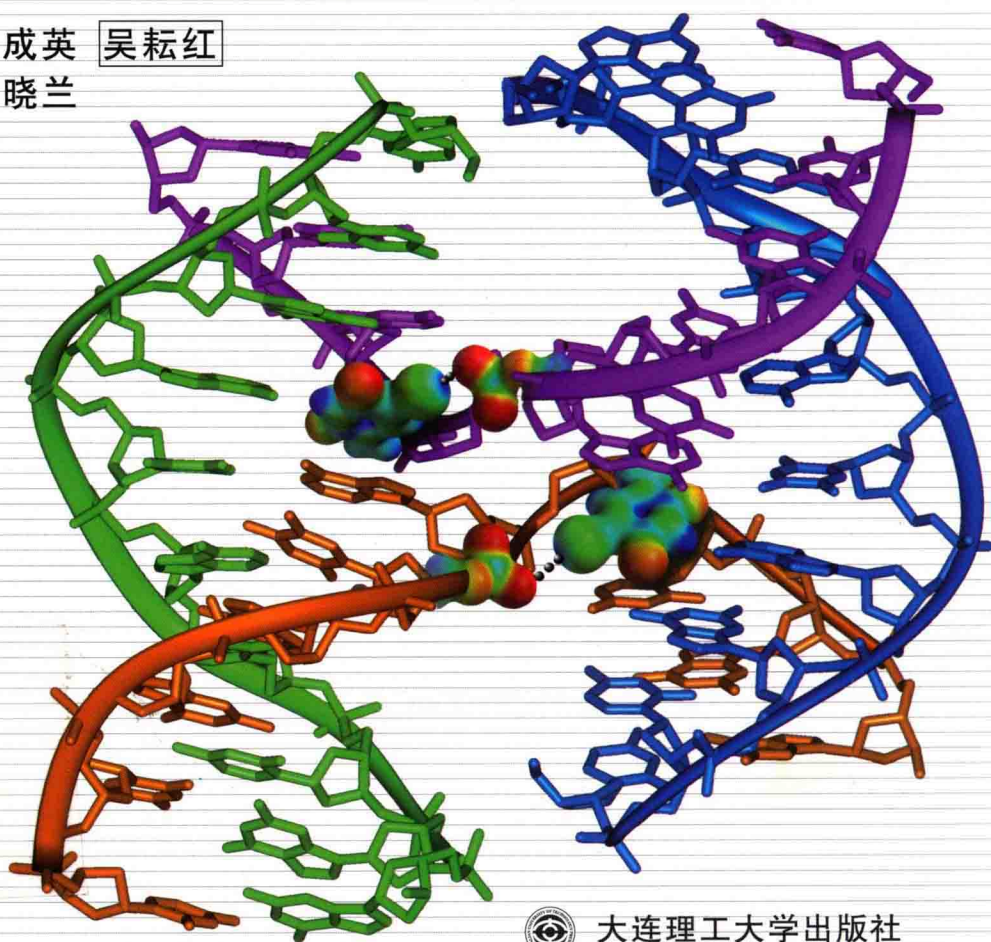


高等教育生物工程专业规划教材

生物工程 实验原理 与技术

SHENGWU GONGCHENG
SHIYAN YUANLI YU JISHU

● 主编 江成英 吴耘红
主审 刘晓兰



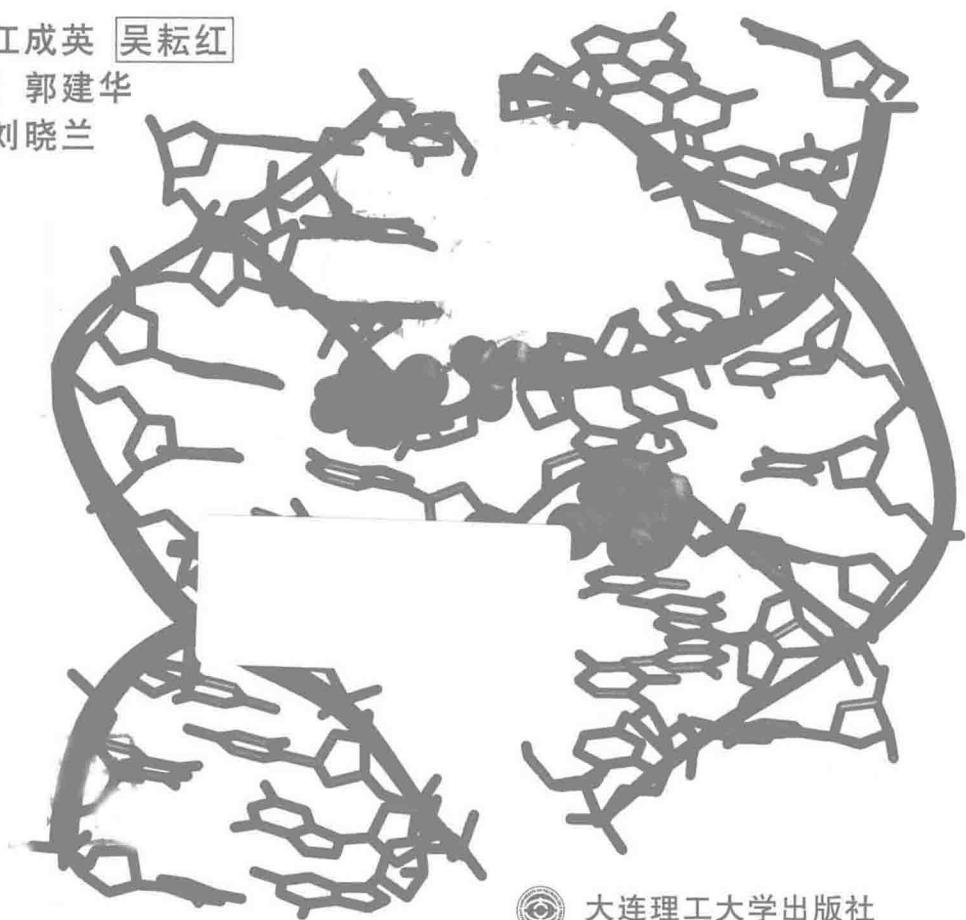
大连理工大学出版社

高等教育生物工程专业规划教材

生物工程 实验原理 与技术

SHENGWU GONGCHENG
SHIYAN YUANLI YU JISHU

● 主编 江成英 吴耘红
副主编 郭建华
主审 刘晓兰



大连理工大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物工程实验原理与技术 / 江成英, 吴耘红主编.
— 大连: 大连理工大学出版社, 2013. 8
高等教育生物工程专业规划教材
ISBN 978-7-5611-6911-7

I. ①生… II. ①江… ②吴… III. ①生物工程—实
验—高等学校—教材 IV. ①Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 084737 号

大连理工大学出版社出版

地址: 大连市软件园路 80 号 邮政编码: 116023

发行: 0411-84708842 邮购: 0411-84703636 传真: 0411-84701466

E-mail: dutp@dutp.cn URL: <http://www.dutp.cn>

大连美跃彩色印刷有限公司印刷 大连理工大学出版社发行

幅面尺寸: 185mm×260mm 印张: 22.25 字数: 510 千字
印数: 1~100

2013 年 8 月第 1 版 2013 年 8 月第 1 次印刷

责任编辑: 陈 畅

责任校对: 杨春华

封面设计: 张 莹

ISBN 978-7-5611-6911-7

定 价: 45.00 元

前 言

生物工程是利用生物细胞的特定性状和机能,通过现代化工程技术,生产有用产品或者直接应用于工业化生产的一种技术体系。近年来,现代生物工程技术将传统的发酵技术与基因工程、细胞工程、代谢工程、酶工程、蛋白质工程、生物信息工程等新技术、新方法相结合,获得了迅速发展,其产品涉及社会生活的各个领域。在生物工程专业教学过程,生物工程实验在整个教学体系中占有重要地位,它将生物工程技术的专业理论与实践活动有机结合起来,是实践教学的主要内容之一。通过生物工程实验的教学,能够培养学生理论联系实际、实事求是、动手解决实际问题的能力和作风,进一步提高学生的专业实验技术和技能、自学能力、独立思考能力和创新能力。

本书共分为两大部分,第一部分为实验原理篇,在这部分中详细叙述了生物工程专业实验的理论基础,包括发酵工程、酶工程、基因工程和生物分离纯化技术工程等部分。第二部分是实验操作篇,与第一篇的实验原理相对应,对原理部分的每节内容都设计了2~3个实验操作,便于进行实验教学和扩展学生的阅读面。

本书原由齐齐哈尔大学食品与生物工程学院吴耘红主编,并负责整本书的大纲制定及部分章节的编写。在本书编写过程中吴老师因病离世,感谢她为此书作出的贡献。现由江成英任主编,郭建华任副主编。编写分工如下:第一篇第一章第三节中酱油的生产和食醋的生产、第二章第一节、第三章、第二篇实验7、实验9、实验15、实验16、实验17由江成英编写;第一篇第四章第二节、第二篇实验1、实验4、实验10、实验11、实验12、实验18、实验19、实验20、实验21由郭建华编写;第一篇第一章第一节、第二章第三节、第二篇实验13、实验14由田英华编写;第一篇第一章第二节中啤酒酿造技术、第二篇实验2由李国全编写;第一篇第一章第二节中白酒生产技术和葡萄酒生产技术、第二篇实验3由李琰编写;第一篇第一章第二节中酒精生产技术由彭凯编写;第一篇第一章第三节中腐乳的生产、第二篇实验5、实验6、实验8由刘井权编写;第一篇第一章第四节、第五节由邓永平

2 生物工程实验原理与技术

编写;第一篇第一章第六节由王路编写;第一篇第二章第二节、第四章第一节由邹东恢编写;第一篇第四章第三节、实验 22、实验 23、实验 24 由刘晓兰编写;第一篇第五章由江洁编写。

由于生物工程技术发展迅速,很多新技术、新方法不断更新,加上编者水平所限,不足之处在所难免,恳请各位读者批评指正。

编 者

2013 年 8 月

所有意见和建议请发往:dutpbk@163.com

欢迎访问教材服务网站:<http://www.dutpbook.com>

联系电话:0411-84706231 84707604



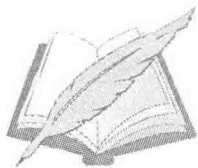
第一篇 实验原理

第一章 发酵工程	3
第一节 微生物遗传育种	3
第二节 酒类生产	21
第三节 调味品生产	90
第四节 有机酸发酵	123
第五节 氨基酸发酵	131
第六节 发酵物料相关参数的检测	135
第二章 酶的生产及生物反应器	166
第一节 酶的生产	166
第二节 生物反应器	177
第三节 固定化酶的应用	182
第三章 重组 DNA 技术	188
第一节 概 述	188
第二节 重组 DNA 技术中的工具酶	189
第三节 重组 DNA 技术中的载体	199
第四节 重组 DNA 技术中的受体细胞	209
第五节 基因重组菌的构建	212
第四章 生物分离纯化	235
第一节 膜过滤原理及技术	235
第二节 电泳技术理论与应用	242
第三节 色谱(层析)原理及方法	268
第五章 实验数据的处理与分析	279
第一节 实验数据的处理	279
第二节 实验数据的误差分析	286
第三节 实验报告的撰写	290

第二篇 实验操作

实验 1	紫外线诱变黑曲霉及果胶酶高产突变株的初筛	297
实验 2	11°P 浅色淡爽型啤酒的酿制	299
实验 3	葡萄酒的酿制	303
实验 4	利用玉米粉发酵酒精	306
实验 5	白醋酿造实验	308
实验 6	果醋酿造实验	309
实验 7	酱油酿造实验	310
实验 8	腐乳酿造实验	311
实验 9	糖化酶的发酵及测定实验	313
实验 10	脂肪酶的提取分离及活力测定	315
实验 11	连续记录法测定过氧化氢酶的活力	317
实验 12	硫酸铵分级沉淀及透析脱盐纯化过氧化氢酶	319
实验 13	糖化酶的固定化和应用实验	321
实验 14	包埋法固定葡萄糖异构酶连续生产果葡糖浆	323
实验 15	目的基因的 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测	326
实验 16	酶切和连接反应	328
实验 17	大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	329
实验 18	超滤、盐析法分离酶制剂	331
实验 19	SDS-PAGE 聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳测定蛋白质分子量	333
实验 20	载体两性等电聚焦电泳(IEF)测量蛋白质等电点	336
实验 21	固相 pH 梯度-SDS 双向凝胶电泳实验	338
实验 22	利用凝胶过滤色谱脱盐	342
实验 23	用离子交换色谱法分离蛋白质	344
实验 24	用疏水相互作用色谱法分离纤溶酶	345

第一篇 实验原理



第一章 发酵工程

第一节 微生物遗传育种

一、微生物诱变育种概述

(一) 工业微生物

工业微生物是指通过规模培养能够获得特定产品或达到特定目标用于发酵工业的微生物。优良的微生物菌种是发酵工业的基础和关键,要使发酵工业产品的产量和质量有所提高,就要选育优质的微生物菌种。工业微生物应满足以下要求:第一,遗传稳定性好,可长期保存;第二,容易产生大量的营养细胞、孢子或其他繁殖体,种子生长迅速、旺盛;第三,必须是纯种,能抵抗杂菌污染;第四,产生产物的时间短,在一定时间内能产出预期数量的产物;第五,对诱变剂敏感,可通过诱变提高菌种性能。

从自然界中分离得到的野生型微生物能适应环境,但不能按人们的意志生产所需要的物质或产量很小,因此必须对野生型微生物进行菌种选育。

(二) 诱变育种

诱变育种是指用物理和化学等因素,人为对出发菌株进行诱变处理,然后运用合理的筛选程序及筛选方法将符合要求的优良变异菌株筛选出来。诱变育种工作包括诱变与筛选两部分。作为工业微生物育种学史上出现较早的方法,诱变育种是工业微生物育种中最有效和最常用的方法之一。

目前发酵工业中所使用的生产菌株,几乎都经过诱变处理。诱变育种主要有以下几方面的作用:提高目标产物产量;改善菌种特性,提高产品质量;提高发酵工艺效率;开发新产品等。

二、诱变剂及其作用机制

凡能诱发生物基因突变,并且突变频率远远超过自发突变率的物理因子或化学物质称为诱变剂,它包括物理诱变剂、化学诱变剂和生物诱变剂三大类。诱变剂是自 1927 年用 X 射线诱发果蝇遗传性状变异而引起科学工作者注意的。在第二次世界大战中,又发

现化学物质氮芥也能导致细菌性状变异,其效应与 X 射线类似。此后陆续发现许多物理因子与化学物质都具有诱发基因突变的作用。近年来,随着基因工程技术的不断发展,蛋白质工程中点突变的重要技术——基因诱变在菌种选育中得以应用,使生物诱变剂也受到了很大的重视,并取得了可喜的发展。诱变剂能诱发多种功能不同的突变体,在工业微生物育种中发挥了巨大作用。下面简单介绍一下物理诱变剂和化学诱变剂。

(一)物理诱变剂

物理诱变剂通常指物理辐射中的各种射线,包括紫外线、X 射线、 γ 射线、快中子、 α 射线、 β 射线、微波、超声波、电磁波、激光射线和宇宙线等。其中对微生物诱变效果较好、应用较广泛的是紫外线、X 射线、 γ 射线和快中子。

物理辐射可分为电离辐射和非电离辐射。电离辐射中的 X 射线和 γ 射线都是高能电磁波,能发射一定波长的射线。X 射线波长为 0.06~136 nm,由 X 光机产生。 γ 射线波长为 0.006~1.4 nm,其实就是短波的 X 射线,由钴、镅等产生。非电离辐射中的紫外线是一种波长短于紫色光的肉眼看不见的“光线”,波长为 136~390 nm。紫外线穿过物质时,该物质的分子或原子的内层电子能级提高,但并不得到或丢失电子,因此不产生离子,故称非电离辐射。紫外线可由紫外灯管产生,设备简单,操作方便,价格低廉,诱变效果显著,故被认为是一种理想的物理诱变剂。

1. 物理诱变剂的生物学效应

物理诱变剂对微生物的诱变作用主要是由高能辐射导致生物系统损伤,继而发生遗传变异的一系列复杂的连锁反应过程。其作用过程通常可以分为物理、物理-化学、化学和生物学等几个阶段,由辐射引起的生物的基因突变都要经过以上阶段。当用射线处理生物细胞时,细胞首先接受辐射能量,穿过细胞壁、膜,与 DNA 接触,产生一系列的化学反应,从而使生物遗传物质——DNA 发生一系列变化。例如紫外线照射微生物细胞,使 DNA 链上的两个嘧啶碱基产生嘧啶二聚体,碱基不能正常配对。在细菌中紫外线诱变作用主要促使 G:C $\rightarrow$ A:T 的转换;DNA 链发生断裂,有时是单链断裂,有时是双链断裂,在有关酶的作用下,使 DNA 重新排列组合;嘧啶碱基或嘌呤碱基被氧化脱去氨基;碱基分子结构中碳与碳之间的链断裂形成开环现象;辐射能击中单个核苷酸后,使碱基或磷酸酯游离出来;在 DNA 分子的一条单链碱基之间或两条链的碱基之间发生交联作用。

以上由辐射引起 DNA 分子结构变化中最常发生的是 DNA 单链或双链断裂,且单链断裂常多于双链断裂。单链断裂易被修复系统修饰。双链断裂中的一部分也可以通过修复系统修饰,但双链断裂易使染色体发生畸变或使微生物死亡。

辐射引起的生物效应,根据辐射种类和微生物种类不同而有所差异。电离辐射主要引起 DNA 的基因突变和染色体的畸变;非电离辐射主要形成嘧啶二聚体。同一辐射线对不同微生物的效应不一样,这与微生物修复系统的强弱有关。微生物的变异或死亡与辐射剂量成正比。在相同的总辐射剂量的条件下,不论是一次连续照射或分次累加照射,还是高剂量短时间照射或低剂量长时间照射,其诱变效应基本上是相同的。

2. 影响辐射效应的因素

辐射引起生物学效应的强弱既决定于微生物内在遗传因素,也受外界环境条件的影响。

(1) 微生物的遗传背景

不同菌种由于遗传性状各异,对辐射的敏感性各不相同。有研究表明不同品系的大肠杆菌对 X 射线的敏感性差别很大;DNA 中腺嘌呤碱基 A 和胸腺嘧啶碱基 T 的比例越高,该菌对紫外线就越敏感,但对电离辐射则相反。

(2) 微生物的生理状态

微生物不同的细胞壁结构直接影响对辐射的敏感程度。同一种微生物在不同的生长期(如营养体与芽孢、菌丝与孢子等),对辐射的敏感性也不同。

(3) 可见光

在可见光下,细胞内的光修复系统,可将紫外线辐射产生的生物学效应予以修复,使诱变效果大大降低。

(4) 水分

水分对辐射效应具有重要的影响作用。研究表明,含水的酵母菌比干酵母细胞对辐射的敏感性高;曲霉孢子的含水量降低,对 X 射线的敏感度也随之下降。

(5) 温度

对于电离辐射,较高温度能促进氧与自由基之间相互作用,加速与 DNA 发生化学反应,而且在微生物生长最适的范围内,较高的温度能增强辐射生物学效应。

(6) 空气或氧气

在氧气充足条件下,电离辐射的生物学效应更加显著。

3. 紫外线及其诱变机制

紫外线是一种使用最早、沿用最久、应用广泛、效果明显的物理诱变剂。它的诱变频率高,且不易回复突变,在工业微生物育种史上发挥过极其重要的作用,迄今仍然是微生物育种中最常用和有效的诱变剂之一。紫外线的光谱范围在 40~390 nm,而 DNA 可以吸收的紫外线光谱为 260 nm,因此,能诱发生物突变的紫外线的有效波长范围是 200~300 nm。当紫外线照射微生物细胞时微 DNA 大量吸收 260 nm 光谱引起突变或杀伤作用。一般用来灭菌消毒的 30 W 紫外灯管,光谱分布范围广,较平均,诱变效率较差。而 15 W 紫外灯管,放射出来的紫外线大约有 80% 波长集中在 253.7 nm,因此诱变效应比 30 W 的好。

用于微生物诱变紫外线剂量的表示方法,可分为绝对剂量和相对剂量。绝对剂量单位用 erg/mm^2 表示,需要用一种剂量仪来测定。由于操作比较困难,在诱变育种的实际工作中不常被采用。相对剂量单位用照射时间或杀菌率表示。紫外线处理微生物时,其吸收射线的剂量决定于紫外灯的功率、灯管与被照微生物的距离及照射的时间。在灯的功率和灯管距离都固定的情况下,剂量大小由照射的时间决定,即剂量与照射时间成正比,照射时间越长,剂量就越大。只要控制照射时间,就可控制剂量,因此,照射时间可以作为相对剂量单位。另外,相对剂量单位还可用紫外线的杀菌率表示,用它作剂量单位比用照射时间更切合实际,可以消除由灯管不同或灯管使用时间长短所造成有效波长发射率不同而引起的误差。根据育种工作者长期的研究和实践经验,一般认为杀菌率以 90.0%~99.9% 效果较好。但也有报道为较低的杀菌率有利于正突变菌株的产生,以 70%~80% 或更低的杀菌率为好。

(1) 紫外线的诱变机制

紫外线的生物学效应主要是由于它能引起 DNA 结构变化造成的。DNA 分子强烈吸收紫外线,可引起 DNA 链的断裂、DNA 分子内部和分子间的交联、核酸与蛋白质的交联、嘧啶水合作用以及形成嘧啶二聚体。已证明,胸腺嘧啶二聚体的形成是紫外线改变 DNA 分子结构及生物活性的主要途径。胸腺嘧啶二聚体的形成在理论上具有重要的生物学意义。DNA 两条链间的胸腺嘧啶形成二聚体,会妨碍 DNA 双链正常解开与复制;同一条链相邻胸腺嘧啶形成二聚体,会妨碍碱基正常配对,从而引起生物体基因突变或死亡(图 1-1)。因此紫外线对生物体具有杀菌和诱变双重生物学效应。

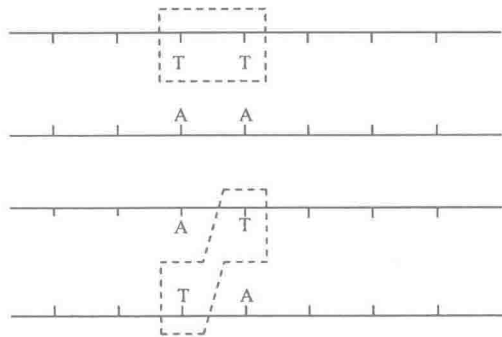


图 1-1 嘧啶二聚体的形成

微生物在正常生长情况下进行 DNA 复制时,首先 DNA 双链解开成为单链,然后两条单链各自与细胞内游离的碱基互补配对形成新链。如果此时双链之间有嘧啶二聚体存在,则因二聚体的交联作用,阻碍双链分开,复制到此处就无法进行下去,造成 DNA 异常。如果在一条单链上出现嘧啶二聚体,则会影响复制过程中碱基的正常配对。例如当 DNA 复制到二聚体位置时,可能停止进行,或者超越这一点继续复制,使子代 DNA 形成缺口,碱基错误插入该缺口,造成新链碱基序列与母链不同引起突变。

(2) DNA 损伤修复

DNA 损伤修复对突变体形成影响甚大。DNA 损伤包括任何一种不正常的 DNA 分子结构。到目前为止,DNA 损伤中研究较多的是由紫外线引起的胸腺嘧啶二聚体。在修复系统中研究较多的是光修复、切补修复、重组修复和 SOS 修复系统,另外,还有聚合酶的校正作用。

① 光修复

一定剂量紫外线照射后的突变体,在可见光下照射适当时间,约有 90% 以上被修复而存活下来。这是由于黑暗下嘧啶二聚体被一种光激活酶结合形成复合物,这种复合物在可见光下,由于光激活酶获得光能而发生解离,从而使二聚体重新分解成单体,DNA 恢复成正常的构型,使突变率下降。在一般的微生物中都存在光修复作用,因此用紫外线进行诱变时,照射和分离均应在红光下进行。

② 切补修复

切补修复是在 4 种酶的协同作用下进行 DNA 损伤修复,这 4 种酶都不需要可见光的激活,在黑暗中就可修复,所以也叫做暗修复。参与切补修复的酶可以识别 DNA 链上

嘧啶二聚体的位置。嘧啶二聚体 5'端在限制性内切核酸酶的作用下造成单链断裂,接着在外切核酸酶的作用下,切除嘧啶二聚体,然后在 DNA 聚合酶 I、III 的作用下,以另一条完整的 DNA 单链作模板合成正确的碱基对序列,最后由连接酶完成双链结构。由此说明紫外线照射引起微生物突变体形成是一个复杂的生物学过程。紫外线引起 DNA 结构的改变仅仅使微生物处于亚稳定状态,由亚稳定到稳定突变体的形成需要一定时间和过程,所以在实际诱变工作中要采取某些措施避免以上修复作用,如加入某些物质,提高突变频率。

(3) 紫外线诱变的方法

① 出发菌株的选择

把细菌斜面培养到对数期,霉菌或放线菌则培养到孢子刚成熟。

② 前培养

培养细菌类以肉汤为主,适量加入核酸类物质或酵母膏等制成营养丰富的培养基,同时还可加入抑制修复的物质,如咖啡碱或异烟肼等。将菌体培养到最佳生理状态(对数期),约 16~24 h;霉菌或放线菌培养到绝大部分孢子刚刚萌发。

③ 菌悬液的制备

离心除去培养基,用生理盐水制备菌悬液,加入玻璃珠振荡分散,以无菌滤纸或脱脂棉过滤,形成单细胞,分散程度达 90%~95%。菌悬液浓度要求为:细菌约 10^8 个/mL,放线菌约 $10^7 \sim 10^8$ 个/mL,霉菌约 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL。

④ 紫外线诱变处理

取以上制备好的菌悬液 3 mL 于直径 7 cm 的平底平皿中(直径 9 cm 平皿,约加 5~6 mL)。打开紫外灯预热 20 min,稳定光波。将盛有菌悬液的平皿放到磁力搅拌器上,离灯管一定距离,打开皿盖,暴露紫外光下照射一定时间,边搅拌边照射,力求使细胞均匀吸收紫外线光波。以上照射过程必须在备有黄光或红光的暗室内进行,以免光修复。据国外报道,经紫外线诱变后的菌体(特别是细菌、放线菌)转入到无菌试管内,立即浸入冰水中 1~2 h,在低温条件下,细胞内参与对突变体修复的各种酶类活性受到抑制,使修复难以进行,有利于提高突变率。

⑤ 后培养

根据延迟现象的原理,照射完毕的菌悬液加入到适合正突变体增殖的培养基中,在适宜温度下培养 1.5~2 h。有些微生物在增殖培养基中加入适量的酪素水解物、色氨酸或异烟肼等物质,可以抑制修复,有利于突变体繁殖和减少细胞悬液在贮存过程中死亡,能明显提高突变率。

⑥ 突变株的分离

后培养结束后,从中取一定量培养物,作不同稀释度,涂皿,以未经紫外线照射的菌悬液作对照皿,培养后,挑取菌落,以待筛选。

4. 电离辐射

(1) 电离辐射的种类

常用于微生物诱发突变的电离辐射有快中子、X 射线和 γ 射线等。

①快中子

中子是原子核的组成部分,是不带电荷的粒子。快中子是由中子穿过物质的原子时把原子核中的质子撞击出来而产生的。由于快中子能产生较大的电离密度,能更有效地导致基因突变和染色体畸变,因此对微生物的诱变效果较理想。

②X射线和 γ 射线

X射线和 γ 射线也是常用的微生物诱变辐射源。X射线和 γ 射线引起生物体的死亡和突变是电离辐射效应,它们的波长短,有足够能量从分子中逐出电子使之电离。换言之,电离辐射的杀菌作用不是靠电离辐射直接作用细胞,而是间接通过射线引起环境中水分子和细胞中水分子在吸收能量后导致电离产生的自由基起作用,这些游离基团与细胞中的敏感大分子反应并使之失活。

上述离子常与液体内氧分子作用,产生一些具有强氧化性的过氧化物,如 H_2O_2 与 HO_2 等,从而使细胞内某些主要蛋白质和酶发生变化。如果这些强氧化性基团使酶蛋白的-SH基氧化,就会使细胞受到损伤或死亡。

③激光

激光可通过光、热、压力和电磁场效应的综合作用直接或间接影响生物体,引起DNA改变。紫外线波段的激光和可见光-红外线波段间的激光都有诱变作用,如He-Ne激光和 CO_2 激光。

④离子注入

离子注入是20世纪80年代兴起的一种材料表面处理的高新技术,主要用于金属材料表面的改性。所谓离子注入,就是利用离子注入生物体引起遗传物质改变,导致性状变异,从而达到育种目的。

(2)电离辐射剂量

快中子的剂量单位通常以拉德(rad)($1\text{ rad}=10^{-2}\text{ Gy}$)表示,指1g被照射物质吸收100 erg辐射能量的射线剂量为1 rad。也可以转换为伦琴(R)单位,即快中子照射时产生的离子数与1 R射线所产生的离子数相当的剂量为1 R。在诱变育种中快中子照射的致死率达到50%~85%比较合适,采用的诱变剂量大约在15~30 krad(千拉德)。不同种类菌种最适的剂量范围是不同的。不少报道证实,使用快中子更有利于产生正突变,有的菌正突变率可达50%左右。因此,快中子作为微生物诱变剂得到较为广泛的应用。

X射线和 γ 射线的剂量单位通常以伦琴(R)表示,即 1 cm^3 干燥空气在 $0\text{ }^\circ\text{C}$, $1.013\times 10^5\text{ Pa}$ (760 mmHg气压下)产生 2.08×10^9 离子时所需的能量。各类微生物对X射线和 γ 射线的敏感性不同,在同样的死亡率下,所需的剂量相差颇大。

由于X射线和 γ 射线穿透能力很强,对细胞致死作用比紫外线和一般的化学诱变剂更为强烈,因此它们不适宜像紫外线那样进行反复多次照射。一般常用的剂量掌握在杀菌率90%~99.9%为宜,切忌用高剂量进行处理。据日本报道,通常以菌体生存率 $\frac{1}{1\ 000}$ 的剂量较为理想,要达到这一致死率剂量大约为1万~20万R。

(二)化学诱变剂

化学诱变剂是一类能对DNA起作用,改变其结构,并引起遗传变异的化学物质。化

学诱变剂种类很多,从简单的无机化合物到复杂的有机化合物都能引起诱变效应。化学诱变剂包括碱基类似物、烷化剂、脱氨剂、移码诱变剂等。化学诱变剂往往具有专一性,它们对基因的某部位发生作用,对其余部位则无影响。突变大多为基因突变,并且主要是碱基改变,其中以转换为多数。各种具有诱变作用的化学物质和碱基接触起化学反应,通过DNA的复制使碱基发生改变而起到诱变作用。它们在性质上与物理诱变剂有很大区别,化学诱变剂的作用机制都是与DNA起化学作用,往往导致多种类型的突变型,而辐射则更多偏向于染色体的断裂。化学诱变剂诱变效应和它们的理化特性有很大关系,使用前必须认真了解和掌握。例如这些化合物的稳定性以及影响其稳定性的条件,如温度、光照、pH、化合物的半衰期及与溶剂或增溶剂是否起反应等。此外,化合物的溶解度及其危险性也需要详细了解。

化学诱变剂大多数具有毒性,且90%以上致癌或极具毒性。因此,使用时要格外小心,不能直接用口吸,避免与皮肤接触,不仅要注意自身安全,也要防止污染环境。

化学诱变剂的剂量主要决定于其浓度和处理时间。在进行化学诱变处理时,控制使用剂量要以诱变效应大、副反应小为原则。处理时的温度对诱变效应也有一定影响。从工业微生物育种角度来说,诱变的结果希望产生更多的正向突变,诱变剂的特异性也往往表现在这方面。当用同一种诱变剂同一剂量诱发某种微生物时,出现的各种抗性突变体(抗药物、抗噬菌体等)和各种营养缺陷型类型的频率,相差是惊人的,可达到2~3个级差。

1. 碱基类似物

碱基类似物是一类和天然嘧啶嘌呤等四种碱基分子结构相似的物质,是一种既能诱发正向突变,也能诱发回复突变的诱变剂。用于诱发突变的碱基类似物有5-溴尿嘧啶(5-BU)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-BUdr)、5-碘尿嘧啶(5-IU)等,它们是胸腺嘧啶的结构类似物;2-氨基嘌呤(2-AP)、6-巯基嘌呤(6-MP)是腺嘌呤的结构类似物。最常用的碱基类似物是5-BU和2-AP。将这类诱变剂加入到细菌培养基中,在繁殖过程中可以掺入到细菌DNA分子中,不影响DNA的复制。它们的诱变作用是取代核酸分子中碱基的位置,通过DNA的复制,引起突变,因此也叫掺入诱变剂。这一类诱变剂要求微生物细胞必须处在代谢旺盛期,才能获得最佳的诱变效果。

(1) 碱基类似物的诱变机制

正常的碱基存在同分异构体,碱基类似物也有同分异构现象,它是由电子结构改变引起的,电子结构的改变可以使键的特异性发生偶然错误。互变异构现象在嘧啶分子中以酮式和烯醇式的形式出现,而嘌呤分子中以胺基和亚胺基互为变构的形式出现。一般互变异构现象在碱基类似物中比正常DNA碱基中频率更高。

现以5-BU为例来分析碱基类似物的诱变机制。当胸腺嘧啶分子结构中5位碳原子上的甲基被溴(Br)原子取代,就构成了5-BU。在正常的核酸分子中,胸腺嘧啶和腺嘌呤在DNA两条单链的相对位置上互配成对。当细菌在含有5-BU的培养基中生长时,5-BU容易掺入到细胞内部,此时如细胞内缺少胸腺嘧啶,5-BU则掺入到DNA分子中代替胸腺嘧啶。此后在微生物代谢过程中,5-BU不是以酮式状态,就是以烯醇式状态存在。当它以酮式状态出现时,在一条DNA链上的5-BU结构中,6位酮基和另一条链相对位置

上的腺嘌呤 6 位氨基的氢键连接配对。当 DNA 第一次复制时,如果 5-BU 恰好变为烯醇式状态,它就和鸟嘌呤 6 位酮基连接配对。当第二次 DNA 复制时鸟嘌呤又按照一般规律和胞嘧啶配对,结果原来 A:T 碱基对转换为 G:C 碱基对,使 DNA 的分子结构发生改变,从而带来了某种形态或生理生化性状的改变,即发生了变异。这一过程是酮式状态的 5-BU 正常掺入,通过错误复制,使 A:T 转换为 G:C,是一种正向突变。

从上可知,由于 5-BU 分子结构上 5 位 Br 原子的存在,改变了电荷分布,影响酮式和烯醇式平衡。每当出现烯醇式状态时,5-BU 不能和腺嘌呤形成氢键,但可以和相对位置上鸟嘌呤形成氢键,互补配对。把突变的细菌再培养在含有 5-BU 的培养基上,DNA 分子中某一位点上有一对由 A:T 碱基转换的 G:C 碱基,如果它们复制时掺入到 DNA 分子的 5-BU 恰好处在烯醇式状态,就取代了胞嘧啶,此时,5-BU 相对位置上是鸟嘌呤,而不是腺嘌呤。当 DNA 第一次复制时,5-BU 以酮式状态和腺嘌呤互补配对,第二次复制以后,腺嘌呤按常规和胸腺嘧啶互配,使 G:C 碱基又转换成 A:T 碱基。这个过程是由于 5-BU 掺入 DNA 分子,通过正常复制,使 G:C 碱基转换为 A:T 碱基。这就是 5-BU 及某些化学诱变剂具有回复突变的原因。

由于 5-BU 的诱变作用是在 DNA 复制过程中实现的,因此对处在静止或休眠状态的细胞是不适合的。细菌采用对数期的细胞,霉菌、放线菌采用孢子,但要进行前培养,使孢子处于萌发状态,并要加大 5-BU 的浓度,处理过程要进行振荡培养。从以上 5-BU 的互变异构可以看出,它们诱变作用是通过本身分子结构产生酮式-烯醇式的变化来实现的。酮式和烯醇式这种互变异构是普遍存在的,在 DNA 分子中的胸腺嘧啶和鸟嘌呤也同样会发生这种互变异构现象。

2-氨基嘌呤是腺嘌呤结构类似物,它可以和胸腺嘧啶互配,但当它出现亚氨基状态时就和胞嘧啶配对,当然这种机会仅仅是偶然的。2-氨基嘌呤也可以诱发 DNA 分子中 A:T→G:C 或 G:C→A:T 的转换引起突变。

(2) 碱基类似物的诱变处理方法(以 5-BU 为例)

5-BU 和 5-FU 是白色结晶粉末,能溶于水或乙醇。诱变处理方法如下:

① 单独处理

将新鲜斜面的细菌移接到前培养的液体培养基中,培养到对数期,离心除去培养液,加入生理盐水或缓冲液,饥饿培养 8~10 h,以消耗其体内的贮存物质。将 5-BU 或 5-FU 加入到以上经饥饿培养的培养液中,使最后的处理浓度为 25~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,混合均匀,取 0.1~0.2 mL 菌悬液加入到琼脂平板上涂布培养。在适宜温度下,在生长过程中诱变处理。培养后挑取单菌落,进行筛选。如果处理真菌、放线菌孢子,要提高 5-FU 浓度,通常处理浓度为 0.1~1 mg/mL,加到孢子悬液后,振荡培养数小时(一般 6~12 h),以绝大多数孢子刚刚萌发为度,分离于平皿,经适温培养,挑取单个菌落,进行筛选。

② 与辐射线复合处理

据报道,如果菌体先用 5-BU 等碱基类似物进行处理,先掺入到 DNA 分子中,然后用辐射线照射,诱变效果比单独使用辐射线好。因此,碱基类似物也是一种辐射诱变的增敏剂。例如,沙门氏杆菌如先用 10~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 5-BU 处理,同时在培养基内加入磺胺噻唑 1 mg/mL,然后用紫外线照射,可增强对紫外线的敏感性,提高突变率。