

1967(=2=)

# 微生物诱变育种

《微生物诱变育种》编写组

科学出版社

# 微生物诱变育种

《微生物诱变育种》编写组

(中国科学院微生物研究所)

科学出版社

1973

## 内 容 简 介

本书叙述和讨论了微生物诱变育种的重要性、物质基础、有关问题以及方法和原理等。着重综述了常用诱变因素的基本概念、作用机制和使用方法。

### 微生物诱变育种

《微生物诱变育种》编写组

\*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1973 年 2 月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1973 年 2 月第一次印刷 印张：2 13/16

印数：0001—28,500 字数：60,000

统一书号：13031·78

本社书号：168·13—9

定价：0.23 元

## 毛主席语录

自然科学是人们争取自由的一种武装。人们为着要在社会上得到自由，就要用社会科学来了解社会，改造社会进行社会革命。人们为着要在自然界里得到自由，就要用自然科学来了解自然，克服自然和改造自然，从自然里得到自由。

自由是对必然的理解和改造，但有理解还不行，还必须对客观有改造，对客观弄清楚了，加以改造才能自由。

# 目 录

一、微生物诱变育种的重要性 .....	1
(一) 微生物诱变育种的成就 .....	2
(二) 理论研究和定向育种 .....	3
二、微生物诱变育种的物质基础 .....	6
(一) 脱氧核糖核酸(DNA)和微生物的变异 .....	6
(二) DNA 和微生物诱变育种 .....	7
(三) DNA 的分子结构 .....	7
(四) DNA 的复制和诱变因素 .....	11
三、微生物诱变育种的几个有关问题 .....	13
(一) 出发菌株 .....	13
(二) 诱变因素 .....	14
(三) 剂量选择 .....	15
(四) 外界条件和诱变 .....	17
(五) 诱变效应 .....	18
1. 提高产量的实际效果 .....	18
2. 营养缺陷型的回复突变 .....	18
3. 抗药性变异 .....	19
4. 形态变异 .....	20
四、微生物诱变育种的方法和原理 .....	21
(一) 菌悬液的制备 .....	21
1. 菌龄 .....	21
2. 菌悬液浓度 .....	21
3. 菌悬液的配制方法 .....	22

(二) 诱变因素的基本概念、作用机制和使用方法.....	23
1. 物理诱变因素 .....	23
2. 化学诱变因素 .....	39
3. 其他诱变因素 .....	60
4. 复合诱变因素 .....	61
(三) 变异菌株的筛选.....	64
1. 形态、色素、酶活和拮抗性等变异菌株的筛选 .....	64
2. 营养缺陷型变异菌株的筛选 .....	65
(四) 高产变异菌株的筛选.....	71
<b>主要参考资料 .....</b>	<b>78</b>
<b>附录 .....</b>	<b>80</b>
一、N-甲基-N-亚硝基-N'-硝基胍的制备方法 .....	80
二、亚硝基甲基脒的制备方法 .....	82

## 一、微生物诱变育种的重要性

近年来微生物在生产上被广泛应用，例如抗菌素、维生素、有机酸、有机溶剂、核酸、氨基酸等的制造，很多都采用了微生物法，微生物酶制剂在制革、纺织、制药、食品加工等过程中的应用，正在为工革革新提供新的途径。石油发酵、煤焦油综合利用、湿法冶金、工业污水处理等的研究，已为微生物与重工业的结合展示了广阔的前景。微生物用于农用刺激素、杀虫剂、糖化饲料等的制造已经有了不少新的发现和创造。在我们祖国辽阔的土地上，蕴藏着大量微生物资源，我们一定能够筛选出更多的能合成各种有用产品的菌种，但是工农业生产大好形势的发展不允许我们仅仅停止在从自然界索取菌种的水平上，我们还要有目的的、定向的进行微生物育种工作。另一方面微生物学的发展已从形态描述、生理研究进入了从分子水平上来研究其结构与功能的关系，这也必然会把微生物定向育种的课题提到日程上来，而微生物学、遗传学、生物化学、生物物理学和分子生物学等学科的迅速发展，相互渗透，相互促进，这就使微生物定向育种的可能性日益增加。

虽然微生物“种”的特性是相对稳定的，但也不是不能改变的，微生物育种的途径很多，例如自然选择，诱变，杂交，转化，转导等。而其中利用物理、化学等诱变因素来促使微生物变异，改变种的特性，使之符合于生产实践的需要是一种比较常用的简单有效的方法。尤其因为诱变育种速度快，可以在短期内使微生物某些特性得到大幅度的改良，并可不断满足生产发展所提出的新要求，有时用别的育种方法解决不了的

问题,用诱变育种却可得到成功,所以目前在生产上应用得十分广泛。当然,由于变异规律的复杂性,我们不能否认今天还不可能完全控制生物的变异,但是自然现象既是有规律的,那么这些规律迟早必将为我们所掌握,正如毛主席说的那样:**“人们为着要在自然界里得到自由,就要用自然科学来了解自然,克服自然和改造自然,从自然里得到自由。”**又说:**“自由是对必然的理解和改造,但有理解还不行,还必须对客观有改造,对客观弄清楚了,加以改造才能自由。”**所以我们不仅要搞诱变育种,而且还要逐步搞清诱变规律,才能充分发挥诱变育种的威力,而要搞清诱变育种的规律是离不开遗传的,因为遗传和变异是矛盾对立的双方,遗传是相对的,变异是绝对的,遗传中有变异,变异中有遗传,生物是在不断地进化的,在短期内看来是遗传的性状,从长远的观点看来又必然会发生变化,所以说遗传中必然包含着变异,另一方面发生了变异的形态或性状,有的会以相对稳定的状态遗传下去,所以变异中又包含着遗传,认识和掌握这对矛盾是做好育种工作的关键。微生物育种工作者正是注意和利用了这些可遗传的变化,从遗传中选取变异,从变异中选取高产,做了不少工作,诱变获得了不少优良菌株,促进了国民经济的发展,所以无论从现有的成就或将来的展望来看,它的重要性都是很明显的。

### (一) 微生物诱变育种的成就

(1) 提高产量 它在抗菌素生产菌种选育方面最为明显,如1943年从自然界分离得到的青霉素产生菌,当时效价每毫升只有20单位,后经一系列诱变,达到100—200单位,以后用X光处理,提高了产量三倍,又用紫外线处理,提高了产量六倍,到1955年已达8,000单位,目前每毫升早已超过



10,000 单位以上。土霉素产生菌所产生土霉素的单位效价,从开始时的几百单位到现在已提高了好几十倍。“九二〇”(赤霉素)的单位效价从开始时的几百单位经诱变后提高了十几倍。

(2) 改进质量 如最初生产青霉素的菌种,在发酵过程中产生一种黄色色素,这种色素在提炼过程中不能除去,因而影响了质量,经诱变选育后获得了无色素的突变型菌株,从而改进了产品质量。日本曾有报导用钴<sup>60</sup>诱变柠檬生产菌时,产生了转移葡萄糖苷酶,使原产品中的异麦芽糖得到了转化,这样在提取时就不要酸性白土处理,因而可以大大增加了葡萄糖的纯度。

(3) 扩大品种 生产四环素的菌株经过人工诱变所获得的变种,有能产生去甲基四环素的,有能产生去甲基金霉素的;又如产谷氨酸棒杆菌 1299,经紫外线诱变后,有能产生赖氨酸的,也有能产生缬氨酸的。又如产肌苷酸的产氨短杆菌经诱变后有能产肌苷的。

(4) 简化工艺条件等 通过诱变可改变菌种的特性,以适应生产上的设备和条件,并可简化工艺条件,缩短发酵周期,增加设备利用率等。例如土霉素生产中选得了减少泡沫的变异菌株,从而提高了发酵罐的利用率。又如原来以淀粉作碳源的菌株经诱变后可以石油作为碳源等。

## (二) 理論研究和定向育种

微生物诱变育种工作通过以上各方面成就,对国民经济建设起了很大的推动作用。为了更有成效地扩大这些成就,还必须进行理论研究,逐步搞清诱变规律。多年来对诱变的机制和规律的研究取得了一些进展,如在各种物理诱变因素

中普遍认为快中子较为有效,在各种化学诱变因素中,认为乙基磺酸甲烷(EMS)较为有效,也有人称亚硝基烷基脒类为超诱变剂的,用以说明它们的有效性能,国内生产上常用的氮芥、乙烯亚胺、紫外线、X线均有较好诱变效果。

近年来微生物诱变育种方面的报导还证实了某些化学诱变因素对某特定碱基容易引起改变,某些物理诱变因素容易使某些位点引起突变,从而多少了解了一些有关诱变的规律性,这就为人工控制诱变提供了线索和依据。

一般说来,目前已初步知道处理某些微生物的最适剂量,以及明确了在微生物的对数生长期是最合适的诱变处理时期。此外,还可以在诱变前后,控制一些处理条件,如水分、温度 pH、氧气等可以使某些突变增多,某些突变减少,可以有助于提高突变效率。

在微生物遗传变异的理论研究方面,近十年来也取得了重大进展。六十年代初,英国学者克里克等在关于细菌病毒化学诱变的实验基础上,提出了“遗传密码”学说,几乎在差不多时候,法国学者雅可勃等人对细菌代谢和遗传作了大量实验研究后,提出了代谢调节控制的“操纵子”学说,这两个学说的提出,对阐明生物学的基本问题——遗传变异,代谢调节有极重要的意义,因此,紧接着世界各国围绕这两个问题开展了大量工作,至今,对生命的基本物质——蛋白质、核酸之间的关系比十年前有了更进一步的认识。最近美国又成功地分离出了遗传物质的基本单位——基因,以后又成功地合成了一个基因(酵母丙氨酸 tRNA 基因)。

近年来,对细菌代谢调节的遗传基础的研究,证实了细菌的代谢调节主要通过反馈抑制和阻遏作用两种途径。代谢物对酶活性的抑制,系通过对酶的变构效应,这种对酶活性的调节并不是由遗传控制的。阻遏作用是通过酶的合成进行调

节,这是由基因控制的。

生产上通过抗代谢拮抗物菌株的筛选而获得提高产量的菌株。

所谓代谢拮抗物是一些和生物体内的氨基酸、维生素、嘌呤、嘧啶等物的分子结构相类似的化合物。由于它们的结构类似,使它们具有抑制细胞生长增殖的作用。选取能抵抗代谢拮抗物的抑制作用的变异菌株,就可以消除阻遏作用的影响,提高有关代谢物的产量。

随着以上这些有关理论的深入研究,将有助于微生物菌种的定向育种、代谢的遗传控制逐步成为现实。

所以一方面微生物诱变育种工作促进了遗传控制的理论研究,它反过来又为育种工作提供理论根据,进一步推动了育种工作,使诱变育种工作在国民经济中所起的作用愈来愈明显,微生物诱变育种工作和有关理论研究的重要性和广阔前途是不言而喻的。

## 二、微生物诱变育种的物质基础

前面已谈到变异是离不开遗传的，而所谓遗传是下一代从上一代获得实现某种性状的潜力，而这种潜力是否表现为具体的性状，则常常决定于生活的环境条件。

毛主席教导我们：“唯物辩证法认为外因是变化的条件，内因是变化的根据，外因通过内因而起作用。”同一内因，在不同的外因作用下可以有不同的表现，而真正的变异则必定是内因发生变化的结果，而引起微生物变异的内因的物质基础又是什么呢？

在微生物中已经证明了细菌和噬菌体的遗传物质是 DNA（脱氧核糖核酸）[只含 RNA（核糖核酸）而没有 DNA 的病毒除外]。细胞质基因的发现说明遗传物质不限于染色体以及构成染色体的核基因，同理证实了 DNA 是遗传物质也并不排斥同一生物中一部分 RNA 也是遗传物质的这一可能性。近年来，一些微生物方面的研究还指出，甚至有报导一部分蛋白质也可能是遗传物质，这就可能为不同的看法提供更多的共同语言。这里谈的物质基础只是从具体资料和论证比较多的 DNA 方面谈的。

### （一）脱氧核糖核酸(DNA)和微生物的变异

在肺炎双球菌中，有的菌株具有荚膜，有的菌株则不具荚膜，这种差异是变异的结果，而每一特性又是相当稳定而可以遗传的性状，如果把具有荚膜的细菌的 DNA 抽提出来，把它

加入到培养液中,去培养不产荚膜的细菌,就可以使一部分细菌变为具有荚膜,而且产生荚膜这一特性会一代一代遗传下去。肺炎球菌的荚膜是一种多糖,而多糖的合成必然通过酶(蛋白质)的作用,可是从具有荚膜的细菌抽提出来的多醣和蛋白质都不能使原来不具荚膜的细菌变为具有荚膜,可见荚膜的遗传和变异的分子基础是 DNA,这一现象称为转化。

如果把细菌的 DNA 抽提出来,用诱变因素处理以后再培养细菌,会使这些细菌发生变异,这一事实进一步说明 DNA 的结构改变是微生物变异的分子基础,所以也可以说 DNA 是变异的主要物质基础。在病毒(包括噬菌体)中除了 DNA 病毒以外,还有核糖核酸 RNA 病毒,说明在这些微生物中 RNA 起着和 DNA 相同的作用。

## (二) DNA 和微生物誘变育种

DNA 几乎绝大部分存在于细胞核中,核中的 DNA 又集中在染色体上,每一种生物有特定数目的染色体,每一染色体有一定的长度,染色体上面的 DNA 又有特定的分子结构,即碱基的排列次序。微生物的变异,一方面来自 DNA 的分子结构的改变,这是诱变育种工作的根据,另一方面来自染色体搭配的变化或是染色体的某些部分的互相交换,这是杂交育种的根据。

## (三) DNA 的分子结构

DNA 是围绕着同一根轴的由两条多核苷酸长链构成的双螺旋,两条链以碱基对之间的氢键相联(见图 1),两条链的排列次序是反向的,它们均为右手旋转的螺旋,以磷酸+糖相

联成的链为骨架，链间直径为  $20 \text{ \AA}$ 。碱基在螺旋之内，位于轴中心部位，与轴垂直，脱氧核糖的呋喃环又与碱基的环近于垂直，而磷酸根则在螺旋之外。在每  $3.4 \text{ \AA}$  的长轴方向上出现一个核苷酸，每十个核苷酸或  $34 \text{ \AA}$  的距离间重复此结构一次，形成螺旋的一周即  $360^\circ$ ，每个相邻的核苷酸之间相差  $36^\circ$ 。

这个螺旋的结构是由配对的嘌呤和嘧啶之间以二个或三个氢键结合组成的，碱基对是有特异性的，来自两条链的碱基在同一平面上，必须与磷酸-糖链的骨架相适应，若两链上相对应的碱基都是嘌呤环，则所占空间太大，若两链上相对应的碱基都是嘧啶环，则相距太远，无足够力量可以形成氢键，因此碱基对必须由一个嘌呤与一个嘧啶组成，嘌呤的相对位置上一定是嘧啶，嘧啶的相对位置上一定是嘌呤，但腺嘌呤 (A) 和胞嘧啶 (C) 不能形成碱基对，因为在一个氢键位置上会有两个氢原子，而另一个位置上一个氢原子也没有。同理，鸟嘌呤 (G) 与胸腺嘧啶 (T) 之间也不能形成氢键，必须是一个嘌呤的第六位碳原子上如果是一个氨基，那么在它的相对位置上的嘧啶的第六位碳原子上必定是一个酮基，前者如果是一个酮基，那么后者必定是一个氨基，根据这个规律，A 的相对位置上必定是 T，G 的相对位置上必定是 C，这是由于以上所说的分子结构模式和互变异构的可能性决定的，这样一条长链的碱基常为另一条长链中的对应碱基所互补，这一点对了解诱变育种的机制很重要。

整个双螺旋以成千上万个氢键固定起来，两个单链之间的碱基种类受以上这一规律所控制，可是每一单链上的前后碱基的种类则不受限制，例如一个单链中可以是 G—G—T—C 的次序连接，另一链的相应位置上则必是以 C—C—A—G 的次序连接。

DNA 的分子结构见图 1。

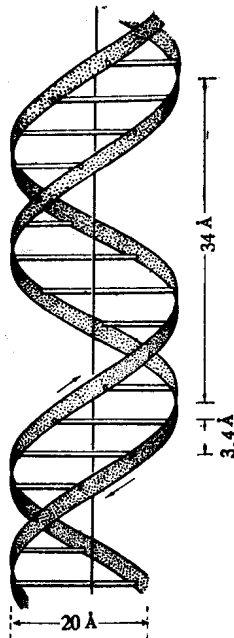


图 1-1 DNA 双螺旋立体结构

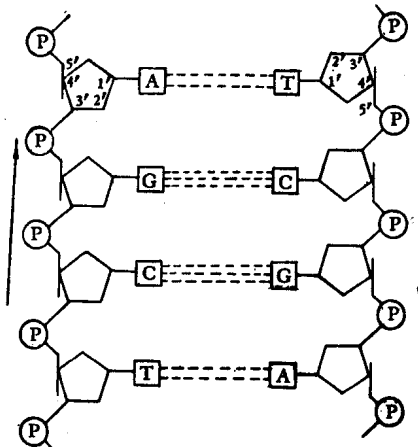
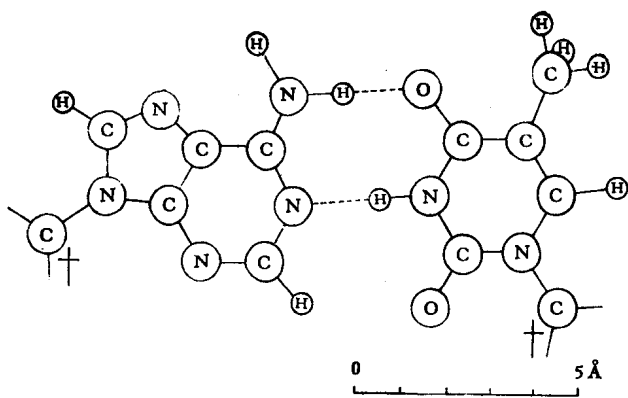
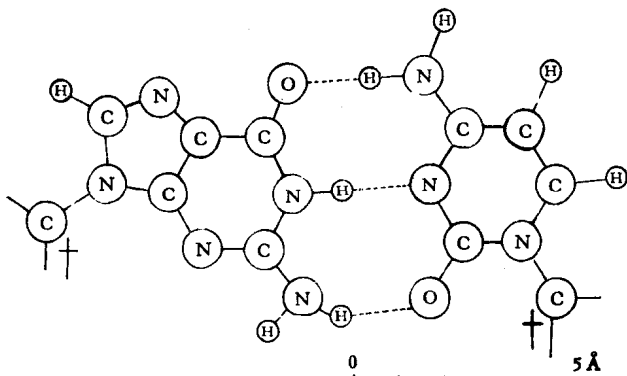


图 1-2 DNA 双螺旋平面结构



腺嘌呤 (A)

胸腺嘧啶 (T)



鸟嘌呤 (G)

胞嘧啶 (C)

图 1-3 腺嘌呤 (A) 和胸腺嘧啶 (T), 鸟嘌呤 (G) 和胞嘧啶 (C) 之间氢键结合图解

图 1 DNA 的分子结构



#### (四) DNA 的复制和诱变因素

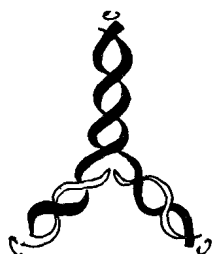
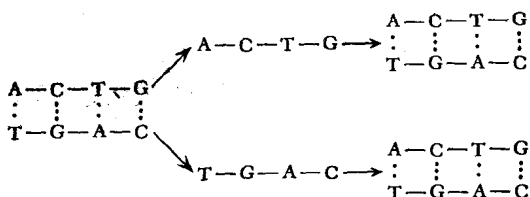


图2 DNA 的复制图解

在 DNA 复制过程中，两条多核苷酸长链由于氢键的断裂，彼此松开，各以原来核苷酸链为样板，根据碱基相互对应的规律，吸收细胞中游离的核苷酸，按照原来链的核苷酸排列次序，各自合成两条新的长链，所以从图 2 可以看到通过复制所形成的两个 DNA 分子在核苷酸的排列次序上一般保持不变。这种 DNA 半保存的复制方式保证了生物遗传性的相对稳定。

各种诱变因素对 DNA 的具体作用机制都不一样，但往往都会引起 DNA 分子结构上的变化，如亚硝酸可使碱基脱氨，各类烷化剂会引起羧基等的烷化，这样就会引起 DNA 复