

文章编号: 1007-4627(2007)03-0234-04

重离子束在微生物诱变育种及生物能源开发中的应用*

李仁民^{1,2}, 王菊芳², 李文建²

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 作为一种新型的辐射诱变源, 重离子束在辐射诱变育种中的优越性已经显现。在此基础上综述了重离子束用于微生物诱变育种的基本原理、独特优点、所取得的成果及研究进展, 并对其在新型生物能源开发中的潜力进行了展望。

关键词: 重离子; 微生物; 诱变育种; 生物能源

中图分类号: Q691 **文献标识码:** A

1 引言

20 世纪初, DeVries(1904)提出了辐射诱发突变的利用, 至今已有上百年的历史。多年来, 传统辐射育种手段主要是基于紫外线、X 射线、 γ 射线和激光等常用的物理诱变源, 由于这些诱变源的反复利用, 许多工业菌株都对其产生了耐受性^[1]。辐射诱变的机理一般被认为是基因重组或染色体发生断裂而导致的基因突变或染色体畸变, 具有不可控性、诱变谱狭窄和诱变能力低等缺点, 因此传统诱变源已展现出其局限性, 若要开发新的具有较好性能的实用突变体, 则须寻找新的诱变源。

重离子辐照诱变育种技术的开展弥补了这一缺点, 为辐照育种研究注入了新的活力。重离子束特别是低能碳、氮离子束对微生物与植物种子有很强的致突变作用, 将其应用于微生物及植物诱变育种研究已取得了巨大的经济与社会效益^[2, 3]。

2 重离子束辐照微生物诱变育种的理论基础

2.1 重离子束的特点及其在辐照育种中的优势

与传统的诱变源相比, 重离子束具有以下重要特点: (1) 传能线密度(LET)大, 能在生物介质中产生高密度的电离、激发、能量和质量沉积, 造成生物介质的损伤, 易于突变体的形成; (2) 能量沉积过程中, 在其射程末端存在一个尖锐的能量损失

峰, 即 Bragg 峰, 使得生物样品的局部受损, 这种局部受损的位置可随离子能量的高低而变化, 是选择可控的, 有利于宏观定点、定位诱变, 实现定向育种^[4]; (3) 损伤后修复效应小, 可产生大量的突变且突变体稳定快; (4) 相对生物学效应(RBE)高, 因此突变体的产生效率高且突变谱广。

重离子束与生物体相互作用时, 在引起受体细胞表面受损穿孔, 细胞膜透性和跨膜电位改变的同时, 导致受体 DNA 损伤, 激活受体细胞的修复机制, 有利于外源基因主动进入受体细胞并与受体 DNA 进行重组和整合^[5], 以提高外源基因导入率, 克服转基因沉默并延长表达时间。同时, 重离子束介导外源基因不必通过与载体重组这一中间环节, 而且可以转导大片段 DNA 甚至全 DNA, 这就简化了步骤, 可以缩短周期和降低成本^[6]。

此外, 重离子参数多样, 采用不同质量数、电荷数和不同能量的重离子束, 对生物体系做不同方式处理, 可获得多种不同需求的突变体, 有利于拓宽突变谱, 提高突变率, 特别是在兰州重离子研究装置(HIRFL)的冷却储存环(CSR)建成出束后, 可供选择的重离子及其能量的范围将更为广阔。

2.2 重离子束诱变育种的基本原理及过程

重离子与生物体系相互作用是一个复杂的过程。从离子注入到终点生物学效应, 经历物理、化

* 收稿日期: 2007-01-23; 修改日期: 2007-05-15

* 基金项目: 中国科学院西部之光资助项目(O606180XB0)

作者简介: 李仁民(1982-), 男(汉族), 甘肃正宁人, 硕士研究生, 从事辐照生物学研究; E-mail: lirenmin@126.com

学和生物学 3 个阶段,从微观生物分子损伤到宏观性状的表现,其效应不断被放大。在此过程中离子束将同生物细胞的电子和原子发生相互作用。起初,入射离子的能量较高,主要同生物细胞中的分子和原子发生非弹性碰撞,使生物分子发生电离或激发,产生电离损伤^[7];随着离子能量的不断损失,当能量小于 0.1 MeV/u 时,主要表现为与原子核的弹性碰撞,导致原子移位,留下空位和断键;随着入射离子的进一步前进,离子能量的传递、原子的电离及入射离子的沉积,其与靶分子所交换的能量急剧地被释放出来,由此形成一个电离密度相对较高的能量损失峰,离子迅速慢化、沉积下来,与生物碱基^[8]、氨基酸^[9]以及生物体组织中的某些成分^[10]发生反应,产生新的化合物;同时还引发生物细胞表面的二次粒子和电子溅射,造成细胞表面的穿孔效应,有利于后续离子对细胞的直接刻蚀,最终导致 DNA 损伤和生物体变异^[11, 12]。重离子束对生物体的作用是集动量传递^[13]、能量及质量沉积^[14]、电荷中和与交换^[15]于一体的联合作用。

2.3 辐照剂量选择

经离子束辐照后,微生物群体的存活率随辐照剂量的增加呈现先减小后增加又减小的马鞍型剂量-效应曲线,这是重离子所特有的质量沉积效应的体现。并认为质量沉积产物对菌种的生长和修复产生刺激效应^[16, 17],从而导致菌种的存活率在注入剂量的一定范围上升,然后又下降,形成“马鞍型”曲线,并且菌种的修复出错使得其突变率大大提高,尤以曲线峰值区域的突变率为高,为此选择存活曲线峰值区域所对应的注入剂量为诱变育种的最佳注入剂量。存活率与剂量的关系式如下^[18]:

$$S = \exp\{-P [\alpha D + \beta D^2 - \gamma D^3 \exp(-kD)]\}, \quad (1)$$

式中, S 为微生物群体的存活率(%), D 为辐照剂量(Gy),其他符号参见参考文献^[18]。

大量的研究表明,在群体生物学上重离子束诱变引起的遗传变异效率在 10%—20%^[19],并以存活率在 25%—30%时正突变率为高^[20]。

3 重离子束辐照微生物诱变育种的研究进展

自 1994 年报道了离子注入链霉菌的诱变效应

以来,我国在这一领域的成果不断。尤其是以中国科学院等离子体物理研究所和中国科学院近代物理研究所为首的科研人员,就离子束对微生物体的诱变机理及其生物效应进行了深入的研究探讨,将其应用于工业菌种的改良上,取得了理想的成果。

在抗生素药物方面,颀红梅等^[21]用 $^{40}\text{Ar}^{14+}$ 离子辐照庆大霉素产生菌绛红小单孢菌,所得突变株的正变率为 69.1%,效价从 1 150 mg/l 提高到 3 580 mg/l;陈宇等^[22]用 40—60 keV、剂量 $1 \times 10^{11}—5 \times 10^{14}$ ions/cm² 的 N^+ 离子注入红霉素产生菌,经筛选得到了高产突变菌株,摇瓶发酵后表明其产量提高了 20%;赵洪英等^[23]用 30 keV,剂量 $1.0 \times 10^{15}—5.0 \times 10^{16}$ ions/cm² 的 N^+ 离子注入庆大霉素产生菌成熟孢子后,经筛选得到高产抗生素突变菌株,摇瓶发酵表明其产抗力提高了 27.39%;向砥等^[24]用离子注入选育高产壮观链霉菌,初步实验结果其效价较出发菌株提高了 102.3%。

在酶制剂方面,杨立峰等^[25]利用 N^+ 离子注入天冬氨酸转氨酶高产菌株进行诱变选育,在 20 keV 和 15×10^{14} ions/cm² 的注入条件下,得到一株酶高产菌株,其转化苯丙氨酸的产量达 17.10 g/l,比出发菌株提高 23.76%,且遗传稳定性较好;吴庆勋等^[26]通过 N^+ 离子注入米曲霉 WJ0521,筛选得到两株氨肽酶活力提高了 30%的高产菌株 M60-5-13 和 M80-10-7,经多次传代实验表明两菌株遗传稳定性良好,对 M80-10-7 的发酵条件初步优化后,进一步使产酶水平提高了 77.5%。

重离子辐照诱变微生物菌种改良在色素^[27]、油脂^[28]和多糖的生产中取得了比较理想的效果。尤其值得一提的是,袁成凌等^[29]利用低能重离子对花生四烯酸(AA)产生菌进行诱变筛选,得到一株花生四烯酸高产菌株,其中,菌体油脂含量达 33.8%,AA 含量占菌体油脂总含量的 52.36%,比对照组提高了 126.2%,是美国专利水平的 2.5 倍。

4 以重离子束微生物诱变育种为依托的生物能源开发

生物能源即以生物质为前体,通过一定生物、化学手段对其进行加工转换,而得到的新型二次能源,其主要形式有生物柴油和燃料乙醇。生物能源作为一种新型的可再生资源,在增加能源供给的同

时,以其污染小、利用率高、再生性强的特点,备受人们的青睐。

近年来科学家发现,一些产油微生物也能合成油脂,其脂肪酸组成和一般植物油相近,以 C16 和 C18 系脂肪酸为主,如油酸、棕榈酸、亚油酸和硬脂酸,这些脂肪酸经转酯化即可得柴油。另外,最新研究表明,有些微生物油脂发酵能高效利用纤维素和半纤维素水解得到的所有碳水化合物,包括五碳糖和六碳糖^[32],实现“全糖转化利用”。这为微生物生物柴油的生产提供了坚实的理论依据。受中国科学院“西部之光”人才培养项目、中国科学院近代物理研究所所长基金项目等的资助,中国科学院近代物理研究所生物物理课题组在该领域开展了一些探索性的研究工作:主要是以重离子辐照微生物诱变育种技术为依托,利用 HIRFL 产生的重离子束进行产能微生物菌种的改良,筛选油脂含量高和原料利用谱广的超级产油菌株,以用于微生物油脂生产,并通过转酯化生产生物柴油的探索性工作。

此外,在燃料乙醇的产业化研发方面,中国科学院近代物理研究所与“白银中科天添生物科技有限公司”合作,利用重离子辐照微生物育种技术培育出了耐高温、耐酒精的酒精发酵新菌种;同时开展的甜高粱燃料乙醇联产产业化研发项目也取得了实质性的进展。通过重离子辐照诱变育种对甜高粱进行品种改良,筛选出了 4 个优良品系,使其含糖量大幅度提高,达 24% 以上。通过甜高粱榨汁,利用培育出的耐受性酒精酵母新菌种直接发酵,生产燃料乙醇,得到 9% 以上的酒份,使发酵时间大大缩短,仅为粮食(如玉米)生产燃料乙醇发酵时间的 1/4。这项工艺对推广燃料乙醇,节约能源、提高设备利用率和降低建设资金具有重要的现实意义。

随着世界石油资源的日益紧缺,多渠道多角度地思考与开发环境污染小、能源利用率高的新型能源已迫在眉睫。微生物资源丰富、原料来源广泛、可塑性强,若能充分发挥重离子束在微生物诱变育种上的优越性,并以此为依托,结合细胞融合、基因重组等基因工程、代谢工程的方法对微生物菌种进行改良,将在开发新型生物能源、改善环境、解决能源危机方面,发挥巨大的作用。

参考文献 (References):

[1] Chen Yiguang, Li Minggang, Xu Lihua, *et al.* Journal of

Jiangnan Petroleum Institute (Natural Science Edition), 2005, **25**(2): 46(in Chinese).

(陈义光, 李铭刚, 徐丽华等. 长江大学学报(自然科学版), 2005, **25**(2): 46.)

- [2] Yu Zengliang. Physics, 1997, **26**(6): 333(in Chinese).
(余增亮. 物理, 1997, **26**(6): 333.)
- [3] Yu Zengliang. IEEE Transactions on Plasma Science, 2000, **28**(1): 128.
- [4] Xie Hongmei, Wang Haohan, Wei Zengquan, *et al.* Nuclear Physics Review, 2001, **18**(3): 174(in Chinese).
(颜红梅, 王浩翰, 卫增泉等. 原子核物理评论, 2001, **18**(3): 174.)
- [5] Wei Zhengquan, Xie Hongmei, Li Wenjian, *et al.* Nuclear Physics Review, 2003, **20**(1): 38(in Chinese).
(卫增泉, 颜红梅, 李文建等. 原子核物理评论, 2003, **20**(1): 38.)
- [6] Wei Zhengquan, Xie Hongmei, Zhou Guangming, *et al.* Collection of Abstracts of the 2nd Technical Conference of Plant Science and Exploiture in Northwest. Urumqi of China. 2001, 113(in Chinese).
(卫增泉, 颜红梅, 周光明等. 西部地区第二届植物科学与开发学术讨论会论文摘要集. 中国乌鲁木齐, 2001, 113.)
- [7] Wei Zengquan, Li Wenjian, Xie Hongmei, *et al.* Acta Laser Biology sinica, 1996, **5**(3): 888(in Chinese).
(卫增泉, 李文建, 颜红梅等. 激光生物学报, 1996, **5**(3): 888.)
- [8] Lu Runlong, Zhu Xueliang, Yu Zengliang, *et al.* Journal of Anhui Agricultural University, 1991, **18**(4): 294(in Chinese).
(鲁润龙, 朱学良, 余增亮等. 安徽农业大学学报, 1991, **18**(4): 294.)
- [9] Yu Zengliang, Shao Chunlin. Radiate Physics Chemistry, 1994, **43**(4): 349.
- [10] Zhang Zhengnan, Deng Jianguo, Wu Xuejin. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 1989, **41**(3): 7(in Chinese).
(张正南, 邓建国, 吴学进. 安徽农业科学, 1989, **41**(3): 7.)
- [11] Song Yun, Zhang Huaiyu, Chang Zhijian. Molecular Plant Breeding, 2004, **2**(2): 301(in Chinese).
(宋云, 张怀渝, 畅志坚. 分子植物育种, 2004, **2**(2): 301.)
- [12] Song Daojun, Yu Xun, Yao Jianming, *et al.* Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1998, **30**(6): 570(in Chinese).
(宋道军, 余汛, 姚建铭等. 生物化学与生物物理学报, 1998, **30**(6): 570.)
- [13] Shao Chunlin, Xu An, Yu Zengliang. High Technology Letters, 1997, **20**(2): 70.
- [14] Song Daojun, Yao Jianming, Shao Chunlin. High Technology Letters, 1999, **22**(3): 129.

- [15] Shao Chunlin, Yu Zengliang. *Nuclear Techniques*, 1996, **19**(6): 321(in Chinese).
(邵春林, 余增亮. 核技术, 1996, **19**(6): 321.)
- [16] Shao Chunlin, Yu Zengliang. *Nuclear Techniques*, 1996, **19**(6): 321(in Chinese).
(邵春林, 余增亮. 核技术, 1996, **19**(6): 321.)
- [17] Song Daojun, Yao Jianming, Shao Chunlin, *et al.* *Nuclear Techniques*, 1999, **22**(3): 129(in Chinese).
(宋道军, 姚建铭, 邵春林等. 核技术, 1999, **22**(3): 129.)
- [18] Shao Chunlin, Yu Zengliang. *Nuclear Techniques*, 1997, **20**(7): 423(in Chinese).
(邵春林, 余增亮. 核技术, 1997, **20**(7): 423.)
- [19] Wu Ding, Lu Guihong. *China Brewing*, 2002, (7): 31(in Chinese).
(吴定, 路桂红. 中国酿造, 2002, (7): 31.)
- [20] Zhang Mingchun. *Mutated Breeding of Industry Microorganism*. Beijing: Science Press, 1999, 206(in Chinese).
(章明春. 工业微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1999, 206.)
- [21] Xie Hongmei, Wei Zhengquan, Li Wenjian, *et al.* *Chinese Journal of Antibiotics*, 1998, **23**(6): 462(in Chinese).
(颀红梅, 卫增泉, 李文建等. 中国抗生素杂志, 1998, **23**(6): 462.)
- [22] Chen Yu, Zhang Zixin, Zhang Feng, *et al.* *Chinese Journal of Antibiotics*, 1997, **22**(6): 410(in Chinese).
(陈宇, 林梓鑫, 张峰等. 中国抗生素杂志, 1997, **22**(6): 410.)
- [23] Zhao Hongying, Li Yan. *Journal of Tianjin Institute of Technology*, 2001, **17**(1): 14(in Chinese).
(赵洪英, 李彦. 天津理工学院学报, 2001, **17**(1): 14.)
- [24] Xiang Di, Li Jiong, Yao Jianming, *et al.* *Acta Laser Biology Sinica*, 2002, **11**(4): 276.
- [25] Yang Lifeng, Yu Long, Zhang Ning. *Chemistry & Bioengineering*, 2005, (1): 16(in Chinese).
(杨立峰, 虞龙, 张宁. 化学与生物工程, 2005, (1): 16.)
- [26] Wu Qingxun, Gu Haixian, Zhao Guang'ao. *Food and Fermentation Industries*, 2006, **32**(1): 15(in Chinese).
(吴庆勋, 谷海先, 赵光鳌. 食品与发酵工业, 2006, **32**(1): 15.)
- [27] Li Hongyu, Li Chenghua, Ding Xinchun, *et al.* *Food and Fermentation Industries*, 2001, **27**(19): 34(in Chinese).
(李红玉, 李成华, 丁新春等. 食品与发酵工业, 2001, **27**(19): 34.)
- [28] Yuan Chengling, Wang Ji, Yao Jianming, *et al.* *Message of High Techniques*, 2003, (6): 22(in Chinese).
(袁成凌, 王纪, 姚建铭等. 高技术通讯, 2003, (6): 22.)
- [29] Yuan Chengling, Wang Ji, Yao Jianming, *et al.* *J Radiat Res Radiat Process*, 2003, **21**(4): 237(in Chinese).
(袁成凌, 姚建铭, 王纪等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, **21**(4): 237.)
- [30] Tyson K S. NREL Technical Report, 1998, **580**: 24.
- [31] Gerpen J V. NREL Technical Report, 2004, **510**: 36.
- [32] Li Yonghong, Liu Bo, Sun Yan, *et al.* *China Biotechnology*, 2005, **25**(12): 39(in Chinese).
(李永红, 刘波, 孙艳. 中国生物工程杂志, 2005, **25**(12): 39.)

Application of Heavy Ion Beams to Microbial Mutation Breeding and Exploitation of Biological Energy^{*}

LI Ren-min^{1, 2, 1)}, WANG Ju-fang¹, LI Wen-jian¹

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China*;

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: As a new radiation source, heavy ion beams have demonstrated the outstanding advantage in mutation breeding. Based on this background, the basic principal and unique peculiarity of heavy ion beams, the achievement and the progress in the research of microbial mutation breeding are reviewed in the paper. The potential application of heavy ion beams to new biological energy is also prospected.

Key words: heavy ion; microbial mutation breeding; biological energy

* **Received date:** 23 Jan. 2007; **Revised date:** 15 May 2007

* **Foundation item:** Western Light Talents Training Program of Chinese Academy of Sciences(O606180XB0)

1) E-mail: lirenmin@126.com