

ICS 07.080  
A 21



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 38580—2020

## 微生物诱变育种技术规范

Technical specification for mutagenesis breeding of microorganisms

2020-03-31 发布

2020-03-31 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：清华大学、洛阳华清天木生物科技有限公司、中国标准化研究院。

本标准主要起草人：张翀、邢新会、李梅、剪兴金、王立言、郭肖杰、张乐乐、马爱进。





# 微生物诱变育种技术规范

## 1 范围

本标准规定了微生物诱变育种要求和证实方法。

本标准适用于细菌、放线菌、酵母和霉菌等微生物的紫外、等离子体和化学诱变育种。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 15193.19 食品安全国家标准 致突变物、致畸物和致癌物的处理方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**菌种 strains**

面向工业、农业、食品、医药等用途,在发酵过程中发挥生理代谢作用的微生物。

### 3.2

**诱变 mutagenesis**

通过人为的措施诱导遗传物质产生突变的方法。

### 3.3

**微生物诱变育种 mutagenesis breeding of microorganisms**

以人工诱变手段诱发微生物遗传物质发生突变,并从突变群体中筛选出所需要的突变株,进而培育成新品种的育种方法。

## 4 要求

### 4.1 人员

试验人员应熟悉基本微生物操作,在开展相关试验前应充分了解使用微生物、诱变剂存在的风险和安全操作规范,试验过程中做好相应防护。

### 4.2 设施与环境

具有能开展基本微生物试验的实验室或车间,配备相关水、电、气等基础设施;实验室生物安全等级需满足所诱变微生物的要求。

### 4.3 诱变材料

#### 4.3.1 总则

诱变材料应遵循以下原则:



## GB/T 38580—2020

- a) 单个、分散的细胞,宜呈悬浮状态;
- b) 细胞核越少越好,最好是单核;
- c) 按照菌种类型选择合适的培养条件,保证菌种具有旺盛的活力;
- d) 诱变材料制作过程应在超净工作台中进行,所加试剂和溶液应提前进行灭菌或过滤除菌操作。

#### 4.3.2 菌悬液

将菌种接种至合适的培养基中,培养至对数生长期,离心收集菌体,用无菌生理盐水洗涤两次,再用适量生理盐水重悬使菌体浓度调整到  $1 \times 10^6$  CFU/mL $\sim 1 \times 10^8$  CFU/mL。

#### 4.3.3 孢子悬浮液

将菌种接种至固体平板或斜面上培养至产生大量孢子;用生理盐水洗脱并离心收集。用生理盐水洗涤两次,再用适量生理盐水重悬并通过机械振荡使其充分分散;过滤除掉菌丝体。最后用生理盐水悬浮得到均匀的孢子悬浮液,并将其浓度调整到  $1 \times 10^6$  CFU/mL $\sim 1 \times 10^8$  CFU/mL。

#### 4.3.4 菌丝悬浮液

将菌种接种到合适的培养基中培养至产生大量生长旺盛的菌丝,取一定量菌液并离心收集。用生理盐水洗涤两次,再用适量生理盐水重悬并通过机械振荡使菌丝断裂,过滤除去未断裂的菌丝。最后用生理盐水悬浮得到均匀的菌丝悬浮液,并将其浓度调整到  $1 \times 10^6$  CFU/mL $\sim 1 \times 10^8$  CFU/mL。

#### 4.3.5 原生质体悬浮液

将菌种接种到合适的培养基上,培养获得大量新鲜菌丝或孢子,收集菌丝或孢子。用渗透压稳定剂洗涤两次并重悬,向重悬液中加入一定量破壁酶,在最适条件下酶解,定时取样于显微镜下观察原生质体释放情况。酶解完成后过滤除去未酶解的菌丝,离心收集原生质体,用渗透压稳定剂洗涤原生质体三次,并将其浓度调整到  $1 \times 10^6$  CFU/mL $\sim 1 \times 10^8$  CFU/mL。

### 4.4 诱变育种操作

#### 4.4.1 紫外诱变

紫外诱变育种操作要求如下:

- a) 参数设定:宜选择如下参数,紫外线波长 260 nm,紫外灯功率 10 W $\sim 30$  W,照射距离 10 cm $\sim 30$  cm。细菌、原生质体、链霉菌孢子悬浮液照射时间宜选择 10 s $\sim 90$  s,酵母、霉菌孢子悬浮液照射时间宜选择 1 min $\sim 10$  min。对于不同的微生物样品和诱变要求应优化选择合适的参数。
- b) 提前 20 min $\sim 30$  min 开紫外灯。
- c) 诱变材料应置于带无菌搅拌子的玻璃平皿中,边照射边搅拌。
- d) 每个样品需设三个重复,取相同的诱变材料作为阴性对照,不照射紫外光。
- e) 诱变后所有步骤应在暗室红光灯下操作。
- f) 处理完成后的材料和阴性对照应避光冰浴 1 h $\sim 2$  h。
- g) 诱变后样品材料和阴性对照应进行梯度稀释,吸取合适稀释度的菌液涂布固体平板,避光培养至产生单菌落。
- h) 应统计诱变和阴性对照平板菌落数,计算诱变致死率。

#### 4.4.2 常压室温等离子体诱变

常压室温等离子体诱变育种操作要求如下:



- a) 参数设定:宜选择如下参数,照射功率 100 W~120 W,照射距离 2 mm,工作气体流量 10 L/min。细菌、原生质体、链霉菌孢子悬浮液照射时间宜选择 30 s~5 min,酵母、霉菌孢子悬浮液照射时间宜选择 1 min~6 min。
- b) 每个样品应设三个重复,取相同的诱变材料作为阴性对照,阴性对照不照射等离子体。
- c) 照射结束后,应立即把照射过样品放入准备好的预先加入培养基的无菌离心管中,混合均匀。
- d) 处理完成后的材料和阴性对照应做梯度稀释,选择稀释度合适的菌液涂布固体平板,培养至产生单菌落。
- e) 应统计诱变和阴性对照平板菌落数,计算诱变致死率。

#### 4.4.3 化学诱变

化学诱变要求如下:

- a) 化学诱变剂的选择:宜根据诱变材料和诱变要求选择合适的化学诱变剂,常用的化学诱变剂及其配制方法参见附录 A 和附录 B。
- b) 化学诱变剂浓度:不同微生物常用诱变剂浓度及处理时间参见附录 C。
- c) 在诱变材料中分别加入不同浓度梯度的诱变剂工作液,混匀后处理不同时间。如需要应再加入反应终止液终止反应,离心,弃掉上清,用无菌去离子水洗涤诱变处理过的菌体。
- d) 每个诱变剂量组或每个处理时间组应设三个重复,阴性对照组不加入化学诱变剂,以加入等量无菌水代替。
- e) 处理完成后的材料和阴性对照应做梯度稀释,选择稀释度合适的菌液涂布固体平板,培养至产生单菌落。
- f) 应统计诱变和阴性对照平板菌落数,计算诱变致死率。
- g) 化学诱变剂使用后应按 GB 15193.19 的方法进行处理。

### 5 证实方法

诱变结果以致死率表示,致死率按式(1)计算:

$$LR = \frac{C_C - C_T}{C_T} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

LR ——致死率;

$C_C$  ——阴性对照平板菌落数;

$C_T$  ——试验组平板菌落数。



附 录 A  
(资料性附录)

化学诱变剂种类、作用机制及常用化学诱变剂

化学诱变剂的种类、作用机制及常用化学诱变剂见表 A.1。

表 A.1

化学诱变剂种类	作用机制	常用诱变剂
碱基类似物	代替 DNA 中的正常碱基	5-溴尿嘧啶(5-BU)
		5-氟尿嘧啶(5-FU)
		6-氮杂尿嘧啶(6-NU)
		2-氨基嘌呤(2-AP)
		6-巯基嘌呤(6-MP)
		8-氮鸟嘌呤(8-NG)
烷化剂	对 DNA 分子中碱基的烷基化修饰	亚硝基乙基脲
		亚硝基胍
		硫酸二乙酯
		硫酸(磺酸)酯类
		甲基磺酸甲酯
		甲基磺酸乙酯
移码诱变剂	移码突变	吖啶橙
		原黄素
氧化类诱变剂	DNA 碱基氧化损伤	亚硝酸(及其盐)
金属离子	机制尚不清楚	锰离子



**附 录 B**  
(资料性附录)  
常用化学诱变剂配制方法

**B.1 亚硝基胍(NTG)**

配制方法如下:

- pH 6.0 磷酸缓冲液:分别配制 0.2 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  溶液、0.2 mol/L 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  溶液,前者取出 12.3 mL,后者取出 87.7 mL,两者混合即得 pH 6.0 的磷酸缓冲液。
- 1 mg/mL 亚硝基胍溶液:称取 50 mg 亚硝基胍,用 5 mL 丙酮溶解,4 °C 保存。用之前向其中加入 45 mL pH 6.0 磷酸缓冲液,振荡使其充分溶解,过滤除菌。
- 诱变终止剂:0.07 mol/L pH 8.6 磷酸氢二钠缓冲液。取磷酸二氢钠 2.507 g,溶于 100 mL 无菌水中,过滤除菌。

**B.2 亚硝酸钠(NIT)**

配制方法如下:

- pH 4.5 醋酸缓冲液:称取醋酸钠 18 g,冰醋酸 9.8 mL 于 1 L 烧杯中,加入少量蒸馏水溶解,移入 1 000 mL 容量瓶中定溶,充分混匀过滤除菌,4 °C 保存备用。
- 0.1 mol/L 亚硝酸钠溶液:取亚硝酸钠 0.69 g,溶于 100 mL 无菌水中,过滤除菌。使用时与 pH 4.5 的醋酸缓冲液以 1:2 的体积比混合后使用。
- 诱变终止剂:25%的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液。称取 4 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,溶解于 6 mL 蒸馏水中。放置在 4 °C 冰箱中备用,使用时过滤灭菌。与诱变液的体积比为 1:1。

**B.3 硫酸二乙酯(DES)**

配制方法如下:

- 硫酸二乙酯不溶于水,溶于乙醇或乙醚半衰期短,在 30 °C 条件下半衰期为 1 h,所以需要现用现配。取 0.5 mL DES 溶解于 4.5 mL 无水乙醇中,配制成 10%的储备液,过滤除菌。

**B.4 甲基磺酸乙酯(EMS)**

配制方法如下:

- pH 7.0 的磷酸缓冲液:称取  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  9.39 g 与  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.5 g,加蒸馏水定容至 1 000 mL,过滤,121 °C 灭菌 15 min 或 115 °C 灭菌 30 min;
- 准确称取 5.408 g EMS 粉末于 10 mL 容量瓶中,先加入 6 mL pH 7.0 的磷酸缓冲液溶解,后定容至 10 mL,配成 5.0 mol/L 的母液,4 °C 保藏,临用前过滤除菌。



## 附 录 C

(资料性附录)

## 常用化学诱变剂诱变条件及致死率

常用化学诱变剂诱变条件及致死率见表 C.1。

表 C.1

诱变剂	工作浓度	诱变菌种	诱变时间	致死率	诱变温度
亚硝酸钠(NIT)	0.05 mol/L	产小檗碱内生真菌菌丝悬液	30 min	76.6%	27 ℃
	0.025 mol/L	绿色木霉孢子悬液	10 min	75.4%	室温
	2 mg/mL	茂源链霉菌孢子悬液	30 min	99.9%	30 ℃
	0.025 mol/L	粘帚霉菌孢子悬液	4 min	89.8%	
	0.025 mol/L	白腐真菌孢子悬液	10 min~20 min	85%~95%	25 ℃~26 ℃
	0.05 mol/L	平贝母内生真菌菌丝悬液	20 min	85.7%	室温
	0.025 mol/L	蜡状芽孢杆菌菌悬液	25 min	78.56%	26 ℃
亚硝基胍(NTG)	2 mg/mL	茂源链霉菌孢子悬液	20 min	99.7%	30 ℃
	0.5 mg/mL	蜡状芽孢杆菌菌悬液	40 min	25.93%	28 ℃
	0.4 mg/mL	枯草芽孢杆菌菌悬液	30 min	73.47%	30 ℃
	1 mg/mL	植物乳杆菌菌悬液	40 min	76.54%	30 ℃
	1 mg/mL	放线菌孢子悬液	45 min	85.36%	
硫酸二乙酯(DES)	1%	粗壮脉纹孢菌孢子悬液	60 min	> 99%	30 ℃
	1%	绿色木霉孢子悬液	40 min	80.2%	30 ℃
	0.02%	山东链霉菌菌悬液	60 min	100%	28 ℃



表 C.1（续）

诱变剂	工作浓度	诱变菌种	诱变时间	致死率	诱变温度
硫酸二乙酯 (DES)	0.5 %	嗜热厌氧菌菌 悬液	20 min	65 %	42 ℃
	1 %	蜡状芽孢杆菌菌 悬液	60 min	93.1 %	30 ℃
	1 %	放线菌孢子悬液	45 min	96.13 %	28 ℃
甲基磺酸乙酯 (EMS)	0.4 mol/L	酿酒酵母	60 min	70 % ~ 80 %	20 ℃
氯化锂	1.2 %	乳酸杆菌菌液	3 d	83.2 %	37 ℃
	0.2 %	放线菌孢子悬液	3 d	36.57 %	28 ℃

\_\_\_\_\_

