### 

GB/T XXXXX—201X

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

微生物诱变育种技术规范

Operation rule for microbial mutagenesis breeding

（征求意见稿）



**国家市场监督管理总局**

**中国国家标准化管理委员会**

发布

发布

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

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：

本标准主要起草人：

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的基本要求、操作步骤。

本标准适用于紫外、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（包括所有的修改版）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 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

突变 mutation

由于化学或物理因素导致的微生物遗传物质发生的永久性改变， 突变可以遗传。

3.2

菌种 strain

用于发酵过程作为活细胞催化剂的微生物，包括细菌、放线菌、酵母菌和霉菌四大类。

3.3

孢子悬浮液 spore suspension

链霉菌或丝状真菌的孢子均匀悬浮液。

3.4

菌丝悬浮液 mycelium suspension

无孢类真菌菌丝通过超声波断裂，得到的长度为1-3个细胞的短菌丝悬浮液。

3.5

原生质体悬浮液 protoplast suspension

大型真菌、霉菌等难以直接诱变的微生物的原生质体均匀悬浮液。

3.6

诱变材料 mutagenic material

直接用于诱变处理的微生物。如对数生长期的菌液、孢子悬浮液、菌丝悬浮液或原生质体悬浮液。

4 基本要求

4.1 环境

要求具有能开展基本微生物实验的实验室或车间，配备相关水、电、气等基础设施；实验环境需保持整洁。

4.2 人员

实验人员应熟悉基本微生物操作，在开展相关实验前应充分了解诱变剂存在的风险和安全操作规范，特别是化学诱变剂存在很高的致癌风险，实验过程中应做好防护，实验结束后应按GB 15193.19的处理方法处理诱变材料。

4.5 诱变材料

4.5.1 诱变材料应是单个的、分散的细胞，最好呈悬浮状态，并且细胞核越少越好，最好是单核。

4.5.2 用于诱变的菌种应该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。

4.5.3 细菌、酵母菌菌种接种至合适的培养基中，培养至对数生长中期，用血球计数板在显微镜下计数，调整菌体浓度到106-108cfu/ml，用于诱变。

4.5.4 霉菌应在固体平板或斜面上培养至产生大量孢子，用无菌生理盐水洗脱孢子，置于无菌并盛有玻璃珠的三角瓶中，在震荡器上震荡使孢子分散，要求孢子分散率在90%以上。用四层无菌擦镜纸过滤除掉菌丝体，得到均匀的孢子悬浮液，用血球计数板在显微镜下计数，调整孢子浓度为106-108 cfu/ml，用于诱变。

4.5.5 有些真菌属于无孢菌群，宜刮取平板上长势旺盛的菌丝，接入摇瓶培养一定时间。吸取一定量菌液，加入装有玻璃珠的生理盐水中，剧烈震荡（如吸取5ml菌液，加入装有40~60粒玻璃珠的生理盐水中，剧烈震荡1h），制成菌丝悬液用于诱变。

4.5.6 孢子诱变效果不明显或不宜获得孢子的丝状真菌或大型真菌宜收集新鲜培养的菌丝或孢子加入一定量过滤除菌的酶液（如1%蜗牛酶和1%纤维素酶混合酶液），在30℃~37℃保温，50 rpm~100 rpm摇床旋转酶解，定时取样于显微镜下观察原生质体释放情况。酶解约3h后用四层无菌擦镜纸过滤去除未酶解的菌丝，3500 rpm离心10 min，弃去上清，沉淀的原生质体用渗透压稳定剂洗涤三次，用血球计数板在纤维镜下计数，用渗透压稳定剂调整原生质体浓度为106-108 cfu/ml，用于诱变。

4.6 诱变条件选择

4.6.1 紫外诱变条件

紫外灯：紫外线诱变处理的有效波长为200～300nm，最适为254nm。可选择功率有10W、15W、20W或30W；

照射距离：10cm到30cm；

照射时间：细菌、原生质体、链霉菌孢子悬浮液：0 s、10 s、20 s、30 s、40 s、50 s、60 s，酵母菌、霉菌孢子悬浮液：0 min、2 min、4 min、6 min、8 min、10 min。

4.6.2 常压室温等离子体诱变条件

照射距离：2 mm；

照射功率：100 W~120 W；

气体流量：10 L/min；

照射时间：细菌为30 s、1 min、2min、3min、4min、5min，真菌为1 min、2 min、3 min、4 min、5 min、6 min。

4.6.3 化学诱变条件

化学诱变需优化的条件包括诱变剂浓度和处理时间。诱变剂配制方法参见附录A，不同微生物适宜的诱变剂浓度及处理时间参见附录B。

4.7 致死率的检测

致死率按式（1）计算：

……………………………………………………………（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

宜选择致死率为70%-90%的诱变条件作为最适条件。

5 操作步骤

5.1 紫外诱变操作程序

在红灯或避光条件下进行。提前20min~30min开紫外灯，以稳定光波。取诱变材料置于带搅拌子的无菌平皿中，开盖置于磁力搅拌器上在紫外光下照射一定时间，每个样品设三个重复。取相同的诱变材料作为阴性对照，不照射紫外光。处理完成后的材料和阴性对照分别稀释到104 cfu/ml、105 cfu/ml 、106 cfu/ml（以诱变材料浓度为初始值计算稀释倍数），吸取50～100 μl涂布固体平板，避光培养至产生单菌落，选择每块平板菌落数为102 cfu数量级的平板统计菌落数，计算致死率。为了避免光修复，诱变后的所有实验步骤在暗室红光灯下操作。

5.2 常压室温等离子体诱变操作程序

用移液枪吸取10 ul诱变材料滴到无菌的小铁片中央，再将铁片置于带盖的无菌平皿中，每次用无菌镊子取一片滴有诱变材料的铁片置于常压室温等离子体下照射一定时间，每个样品设三个重复。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。照射结束后，立即把照射过的小铁片和阴性对照铁片直接放入准备好的预先加入1ml 培养基的无菌EP管中，利用旋涡混合器，使菌株掉落到培养基中。这一过程相当于菌液已经被稀释100倍了。处理完成后的材料和阴性对照稀释到104 cfu/ml、105 cfu/ml 、106 cfu/ml（以诱变材料浓度为初始值计算稀释倍数），吸取50～100 μl涂布固体平板，培养至产生菌落，选择每块平板菌落数为102 cfu数量级的平板计算菌落数，计算致死率。

5.3 化学诱变操作程序

将化学诱变剂，配制成呈一定浓度梯度的工作液。取诱变材料分别加入不同浓度梯度的诱变剂工作液，混匀后反应不同时间，再加入反应终止液终止反应。用无菌去离子水洗涤诱变处理过的菌体。阴性对照不加入化学诱变剂，而是加入等量无菌水代替。每个诱变剂量设三个重复，处理完成后的材料和阴性对照稀释到104 cfu/ml、105 cfu/ml 、106 cfu/ml（以诱变材料浓度为初始值计算稀释倍数），吸取50～100 μl涂布固体平板，培养至产生菌落，选择每块平板菌落数为102 cfu数量级的平板统计菌落数，计算致死率。

附录**A**

（资料性附录）

常用化学诱变剂配制方法

B.1 亚硝基胍（NTG）

pH6.0磷酸缓冲液：分别配制0.2M的Na2HP04·2H20溶液、0.2M的NaH2P04·2H20溶液，前者取出12.3ml，后者取出87.7mL，两者混合即得pH6.0的磷酸缓冲液。

1mg/ml亚硝基胍溶液: 称取50 mg亚硝基胍，用5ml丙酮溶解，4℃保存。用之前向其中加入45ml pH6.0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 pH8.6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）

pH4.5醋酸缓冲液：称取醋酸钠18g，冰醋酸9.8ml于1L烧杯中，加入少量蒸馏水溶解，移入1000ml容量瓶中定溶，充分混匀过滤除菌，4℃保存备用。

0.1 mol/L亚硝酸钠溶液：取亚销酸钠0.69g，溶于100 ml无菌水中，过滤除菌。使用时与pH4.5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Na2S2O3：称取4g Na2S2O3·5H2O，溶解于6ml蒸馏水中。放置在4℃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）

硫酸二乙酯不溶于水，溶于乙醇或乙醚半衰期短，在30℃条件下半衰期为1h，所以需要现用现配。取0.5ml DES溶解于4.5ml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）

pH7.0的磷酸缓冲液：称取K2HPO4·3H2O 9.39g与KH2PO4 3.5g，加蒸馏水定容至1000ml，过滤，121℃，灭菌15min或115℃灭菌30min。

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℃保藏，临用前过滤除菌。

附录C

（资料性附录）

常用化学诱变剂诱工作浓度及致死率

C.1 常用化学诱变剂工作浓度及致死率

**表C.1 常用化学诱变剂工作浓度及致死率**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 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） | 0.05mol/L | 产小檗碱内生真菌菌丝悬液 | 30min | 76.6% | 27℃ |
| 0.025mol/L | 绿色木霉孢子悬液 | 10min | 75.4% | 室温 |
| 2mg/ml | 茂源链霉菌孢子悬液 | 30min | 99.9% | 30℃ |
| 0.025mol/L | 粘帚霉菌孢子悬液 | 4min | 89.8% |  |
| 0.025mol/L | 白腐真菌孢子悬液 | 10min~20min | 85%~95% | 25℃~26℃ |
| 0.05mol/L | 平贝母内生真菌菌丝悬液 | 20min | 85.7% | 室温 |
| 0.025mol/L | 蜡状芽孢杆菌菌悬液 | 25min | 78.56% | 26℃ |
| 亚硝基胍（NTG） | 2mg/ml | 茂源链霉菌孢子悬液 | 20min | 99.7% | 30℃ |
| 0.5mg/ml | 蜡状芽孢杆菌菌悬液 | 40min | 25.93% | 28℃ |
| 0.4mg/ml | 枯草芽孢杆菌菌悬液 | 30min | 73.47% | 30℃ |
| 1mg/ml | 植物乳杆菌菌悬液 | 40min | 76.54 | 30℃ |
| 1mg/ml | 放线菌孢子悬液 | 45min | 85.36% |  |
| 硫酸二乙酯（DES） | 1% | 粗壮脉纹抱菌抱子悬液 | 60min | ＞99% | 30℃ |
| 1% | 绿色木霉孢子悬液 | 40min | 80.2% | 30℃ |
| 0.02% | 山东链霉菌菌悬液 | 60min | 100% | 28℃ |
| 0.5% | 嗜热厌氧菌菌悬液 | 20min | 65% | 42℃ |
| 1% | 蜡状芽孢杆菌菌悬液 | 60min | 93.1% | 30℃ |
| 1% | 放线菌孢子悬液 | 45min | 96.13% | 28℃ |
| 甲基磺酸乙酯（EMS） | 0.4mol/L | 酿酒酵母 | 60min | 70%~80% | 20℃ |
| 氯化锂 | 1.2% | 乳酸杆菌菌液 | 3d | 83.2% | 37℃ |
| 0.2% | 放线菌孢子悬液 | 3d | 36.57% | 28℃ |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_