

## 第八章 发酵工程制药

### 8.2 优良菌种的选育

#### 一、课程目标

##### 1) 知识学习目标

掌握微生物诱变育种的一般步骤，熟悉常用的菌种保藏方法，并能根据实际情况选择合适的菌种保藏方法，基因工程菌的保藏和斜面培养，防止菌种退化。

##### 2) 思政育人

在讲解微生物菌种的选育时告诉学生并非所有的微生物都适合发酵工业使用，只有品质特性优良的微生物才能被选育出来用于发酵生产，通过播放“马云寄语青年”的视频，引导学生努力学好知识，提高技能，积极进取，成为优秀的一员，将来报效祖国，并引发对自己未来的思考和认识。

#### 二、思政案例

课程思政教学实例一：马云寄语青年

#### 三、课程组织

**导入：**第二节优良菌种的选育工业发酵的关键，得有好菌种，好菌种应具备的特性包括 高产，培养条件容易调节控制，培养液杂质少，并能稳定遗传、不退化。菌种选育的目的，也就是筛选到具有这些优良特性的菌株。菌种选育包括自然选育、诱变育种、杂交育种、分子育种等方法。

##### 知识点 1 讲解：常用的选育方法

###### 1) 自然选育

**自然选育：**就是不经人工处理，利用菌种的天然突变进行菌种筛选的过程。碱基对发生自然突变的机率概率极低，而且生产用的菌株都是选育过的，容易负突变。自然选育高水平菌株，进行传代保存，称为复壮，也是工厂需要每年做的工作。

###### 2) 选育方法、诱变育种

**诱变育种：**就是用各种物理、化学的因素人工诱发基因突变，提高菌种的突变频率，从中筛选出具有优良特性的变异菌株。诱变育种也是目前常用的，尤其是对于链霉菌、霉菌，



效果较好。

常用的物理诱变剂有：紫外线(UV)、等离子体、X-射线、 $\gamma$ -射线等。常用的化学诱变剂有硫酸二乙酯、亚硝基胍、5-氟尿嘧啶、亚硝酸等。复合诱变较单一诱变的效果要好。我就经常选用紫外线+亚硝酸的复合诱变，效果不错。紫外线：作用于 DNA 的嘧啶碱基，亚硝酸：作用于 DNA 的嘌呤碱基。紫外+亚硝酸复合诱变：突变谱宽，效果好。

大家注意一点：诱变剂剂量选择非常关键，直接决定正向突变率的高低。单因子诱变：可以选择 90%的高致死率；复合诱变是双因子：建议选择 80%左右，稍低的致死率，正变菌株多。复合诱变+抗性，是三重因子，对细胞伤害非常大：倾向于 70-75%致死率，低剂量处理，遗传更稳定。如果第一次筛选效果不好，正变率低，那就需要重新调低诱变剂量，重新筛选。

下面介绍诱变育种的一般步骤：首先选择合适的出发菌株→制备单孢子菌悬液→进行诱变处理→然后涂平板，培养，挑选单菌落传斜面→进行摇瓶发酵考查，从初筛结果中，挑选高水平的少数几个菌株，重复传斜面、摇瓶发酵考查→必须经过复筛，连续三代遗传稳定、产物水平高的菌株→进行保藏和扩大试验。

### 3) 原生质体融合

选育方法是、原生质体融合，属于杂交育种原生质体融合就是：用脱壁酶处理将微生物细胞壁除去，制成原生质体，再用聚乙二醇促进原生质体发生融合，获得异核体或重组子。实质是：两个亲株基因组直接融合、交换、重组，挑选具有双亲优良性状的子代。考虑到实验过程需要除去细胞壁，原生质体融合适合于无孢子菌。

### 4) 分子育种

下面学习第四种选育方法、分子育种，也就是利用基因工程技术改良菌种比较早的是，DNA 重组技术：取得供体细胞 DNA 上的基因，体外重组于载体 DNA 上，再转入受体细胞，使其表达和遗传。

**常用方法是：**依据生物合成途径，进行分子水平的定点改造。扩增关键酶基因，剔除反馈抑制基因或分支途径基因。

**分子育种一般步骤**包括：目的基因的准备(也就是酶切)，第二步是 PCR 扩增，然后进行转化，最后电泳检验。

随着近十年基因编辑技术的快速发展，合成生物学引入工程模块理论，菌种的同源表达，甚至于异源表达，都取得了一定成果，例如：一个链霉菌的合成基因可以整体导入酵母菌，更加有效地合成产物。这方面大家可以多看看文献。

常用的四种菌种选育方法学习完了，大家可以根据菌种特性、科研条件，进行选择。

## 知识点 2 讲解：菌种保藏方法

常用的菌种保藏方法有：

1. 斜面低温法：培养好的斜面，放置于 4 度冰箱，一般保存 1-4 周。

2. 液体石蜡法：4℃冰箱直立保藏 2-10 年，适于霉菌、酵母菌、放线菌、好氧性细菌。
3. 沙土管法：4℃冰箱保存，1-3 年保存期。适用于霉菌、放线菌和形成芽孢的细菌的保藏。
4. 超低温冰箱冻结法，也就是冷冻甘油管，-80℃超低温冰箱保存 1-2 年，适用于所有微生物，因制做简单方便，是目前最常用的菌种保存方法。
5. 真空冷冻干燥法，就是冻干管。4℃冰箱，保存 3-5 年。适用于一切微生物。就是制做有点费事。
6. 液氮保存法：-196℃，温差太大，-40~-80℃之间最好加一次预冻，可保存 5-10 年。
7. 基因工程菌的保藏：加入抗性基因对应的抗生素，防止菌种退化。

**总结** 同学们，今天我们学习了微生物诱变育种的一般步骤，如何选择诱变剂剂量才能筛选效果好，熟悉常用的菌种保藏方法，并能根据实际情况选择合适的菌种保藏方法，基因工程菌的保藏和斜面培养，如何防止菌种退化，今天我们就学习到里，谢谢大家！