

## 氟氏链霉菌离子束注入突变谱的分析

刘晓秋 张国青 钱世钧\*

(中国科学院微生物研究所 传感器国家重点实验室 北京 100080)

**摘 要** 用低能  $N^+$  离子束注入转谷氨酰胺酶产生菌氟氏链霉菌后,通过试验,初步确定了注入的效应曲线,获得了一系列突变菌株。提取原始菌株和突变菌株的 DNA,采用 PCR 反应分段扩增出转谷氨酰胺酶基因进行单链构象多态性分析(SSCP),并将特异性条带克隆测序进行基因突变型的鉴定,分析离子束注入引起链霉菌基因的基因突变类型及特点。结果显示,碱基变异的类型包括转换、颠换和缺失。在检测到的 24 个碱基突变中,主要是碱基的置换(87.5%),碱基缺失的比例比较小(12.5%)。在碱基置换中,转换的频率(58.3%)高于颠换的频率(29.2%)。转换主要以 C→T, A→G 为主,颠换以 G→T, C→G 为主。此外构成 DNA 的 4 种碱基均可以被离子束辐照诱发变异,其中胞嘧啶发生突变的频率较高。

**关键词**: 离子束诱发突变; 氟氏链霉菌; 转谷氨酰胺酶; SSCP

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)02-0265-05

近年来低能离子束作为新的诱变源越来越受到人们的重视。离子束注入对生物体的诱变效应已被广泛证明。低能离子注入的生物效应要比其它的诱变源如 X 射线、 $\lambda$  射线、激光等复杂的多,因为它在对生物体的作用过程中不仅有能量的传递而且还有质量沉积和电荷交换。

低能离子注入不同的生物体后发现其可导致染色体的畸变<sup>[1,2]</sup>,裸露的单链和双链质粒 DNA 的断裂<sup>[3,4]</sup>以及 M13mp 质粒 DNA 碱基的突变<sup>[5]</sup>等。也能对高等生物体的基因组 DNA 造成诱变损伤,如拟南芥<sup>[6]</sup>。谢传晓等<sup>[7]</sup>对离子束注入引起大肠杆菌细胞内碱基的诱变类型及特点进行了报道。本试验主要是研究离子束注入氟氏链霉菌后引起细胞内碱基突变的类型及特点。

聚合酶链反应-单链构象多态性分析(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphisms, PCR-SSCP)是由 Orita 等<sup>[8]</sup>首先建立的。它的基本原理为,经 PCR 扩增的目的片段在变性剂或低离子浓度下经高温处理使之解链并保证在单链状态下,然后在一定浓度的非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,单链 DNA 迁移率主要取决于 DNA 单链所形成的空间构象。相同长度的单链 DNA,因其顺序或单个碱基差异,所形成的空间构象就会不同,其在凝胶中泳动速度不同,从而显示出带型的差异,即多态性。该项

技术已成为一种快速、敏感、筛查已知突变位点,识别未知突变的方法,并广泛应用于多态性的分析。

转谷氨酰胺酶是一种在工业生产中尤其是食品工业中具有广泛应用的酶制剂。微生物来源尤其是链霉菌来源的转谷氨酰胺酶受到了人们的广泛重视。目前工业上应用的转谷氨酰胺酶主要是通过链霉菌发酵生产获得,价格仍然较为昂贵。人们迫切需要通过基因工程等方法能够提高转谷氨酰胺酶的产量及质量。

本试验采用 PCR-SSCP 初筛离子注入引起氟氏链霉菌转谷氨酰胺酶基因的变化,再通过序列测定确定碱基变化情况,以期揭示低能离子束对链霉菌基因诱变效应及碱基突变的类型,有助于了解离子束诱变的分子机理。同时希望找到影响转谷氨酰胺酶活力的关键基因位点,为进一步的基因改造提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和载体** 氟氏链霉菌 *Streptomyces fradiae* (本实验室保存); 大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109, pGEMT 为 Promega 公司产品。

**1.1.2 培养基** 最适培养基每升含多聚蛋白胨 20g, 甘油 15g, 细菌培养用酵母提取物 2.5g,  $K_2HPO_4$  1g,

基金项目: 中国科学院知识创新项目(KSCX2-SW-324)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-64807428 E-mail: qiansj@sun.im.ac.cn

作者简介: 刘晓秋(1975-),女,辽宁盘锦人,博士研究生,研究方向为酶学。E-mail: xiaoqiuliu@gmail.com

收稿日期: 2006-08-10,接受日期: 2006-09-15,修回日期: 2006-11-22

MgSO<sub>4</sub> 1.5g, 玉米浆 1g, pH 7.5。

**1.1.3 试剂和仪器** DNA 提取试剂盒购于天根生化生物有限公司。氮离子注入装置由中国科学院等离子体物理研究所自行研制。该注入装置由离子源、聚焦系统、质量分析、加速系统、真空系统、靶室和测控系统等基本部分构成。工作原理为:由离子源产生等离子体,其中的离子经引出系统引出,进入质量分析器选择,然后在加速系统中获得能量后,即可进行样品注入。其中真空系统是获得束线的基本保障,聚焦系统是为控制束线而设置的。

## 1.2 离子注入前样品的处理

从平板上挑取单菌落,接种到含有 50mL 最适培养基的 250mL 三角瓶中,30℃ 培养 36h 后,取 20mL 生长良好的菌液转移到灭好菌的 250mL 含有玻璃珠及 20mL 无菌水的三角瓶中,28℃、200r/min 震荡培养 30min。用纱布过滤,分别取滤液 100μL 于不同无菌平皿中涂布均匀,无菌风干。

## 1.3 离子注入处理

在离子注入机上,对氟氏链霉菌进行 N<sup>+</sup> 注入。注入靶室的真空密度为 10<sup>-3</sup> Pa。注入能量 10keV 的氮离子,注入剂量分别为 2.6 × 10<sup>14</sup> ion/cm<sup>2</sup>, 5.2 × 10<sup>14</sup> ion/cm<sup>2</sup>, 7.8 × 10<sup>14</sup> ion/cm<sup>2</sup>, 1.04 × 10<sup>15</sup> ion/cm<sup>2</sup>, 1.3 × 10<sup>15</sup> ion/cm<sup>2</sup>, 1.56 × 10<sup>15</sup> ion/cm<sup>2</sup>, 2.08 × 10<sup>15</sup> ion/cm<sup>2</sup>。统一设置真空处理为对照。

## 1.4 离子注入后的培养

离子注入后立即于超净工作台上在每个平板上分别加入 1mL 的无菌水刮洗平板。进行适当的稀释后,取相同体积的稀释液涂布在最适培养基琼脂平皿上,在 28℃ 培养 2d 后,长出单菌落,计数并计算出相对存活率,存活率 = 各处理计量的单菌落数/真空未接受离子注入处理计量的菌落数。

## 1.5 聚合酶链反应-单链构象多态分析(PCR-SSCP)

**1.5.1 引物设计** 按氟氏链霉菌的转谷氨酰胺酶基因序列(基因登录号为 DQ432028)分段设计引物(由赛百盛生物工程有限公司合成): PaF: 5'-CTGCTCGACGACAGGG-3'; PaR: 5'-CGACGCAACCGT AGGA-3'; PbF: 5'-GAGCAGCGAGAGAACC-3'; PbR: 5'-TCCAGGGCCTTGTTCA-3'; PeF: 5'-GTGATGTGGCCT CCAT-3'; PeR: 5'-GCTTGGAGTAGATCACCG-3'; PdF: 5'-CGTCCAAGATGAAGGC-3'; PdR: 5'-GAACCACC CGTAGTCG-3'; PeF: 5'-AGGTTGGGTCAATTTC-3'; PeR: 5'-TCACGGCCAGCCTTG-3'。

**1.5.2 基因组 DNA 的提取及聚合酶链反应** 基因组 DNA 提取按 Keiser 等<sup>[9]</sup>的方法并与试剂盒的方法结合起来。取 1mL 菌液,10000r/min 离心 1min 收集菌体;用溶菌酶缓冲液(0.3mol/L 蔗糖,25mmol/L pH8.0 Tris-HCl,25mmol/L pH8.0 EDTA)洗涤菌体两次,离心,弃上清;加入 250μL 的溶菌酶缓冲液,充分混匀,加入 50μL 溶菌酶(50mg/mL),37℃ 条件下作用 1h;10000r/min 离心 10min,收集沉淀;加入 200μL 的 GA 溶液,充分混匀;加入 20μL 蛋白酶 K (20mg/mL)作用 2min;加入 220μL GB 溶液,70℃ 条件下作用 10min;加入 220μL 无水乙醇,充分混匀,此时出现少量沉淀;把白色沉淀和溶液一并加入离心柱中,12000r/min 离心 30s,弃液体;加入 500μL 去蛋白缓冲液,12000r/min 离心 30s,弃液体;加入 700μL 漂洗缓冲液,12000r/min 离心 30s,弃液体;加入 500μL 漂洗缓冲液,12000r/min 离心 30s,弃液体;把离心柱在 12000r/min 条件下离心 2min,除去多余的液体;把离心柱放于一个新的 eppendorf 管中,加入 90μL 洗脱缓冲液,室温放置 5min,12000r/min 条件下离心 2min,把离心下来的液体再次放入离心柱中,放置 2min,12000r/min 离心 2min,得到的液体为 DNA 溶液。

以原始菌株和诱变菌株的 DNA 为模板,进行 PCR 反应,分别以 PaF(PbF,PeF,PdF,PeF)和 PaR(PbR,PeR,PdR,PeR)为上下游引物,以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应。反应条件:94℃ 5min,94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 30s,循环 35 次。反应产物采用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。

**1.5.3 单链构象多态性分析(SSCP)** 取 PCR 产物与上样缓冲液(90% 甲酰胺,0.5% 二甲苯青,0.5% 溴酚蓝,20mmol/L pH 8.0 EDTA)混匀,沸水浴 8min,立即-20℃ 冰浴 3min,取混合物上样。电泳条件:中性非变性聚丙烯酰胺凝胶,垂直电泳槽,0.5 × TBE 电泳缓冲液,10℃ 下 13V/cm 恒压电泳,银染显色。染色方法如下:将胶浸入 10% 乙醇固定 6min,1% HNO<sub>3</sub> 氧化 3min,双蒸水漂洗 2 次,每次 1min,0.1% AgNO<sub>3</sub> 染色 10 ~ 15min。双蒸水快速漂洗 1 次。用 2.5% 无水碳酸钠和 0.02% 甲醛水溶液进行显影。显影至条带清晰,双蒸水漂洗 1 次,时间 1min。加入 10% 冰乙酸终止显色 2min,双蒸水漂洗 2min。

## 1.6 测序分析

回收在 SSCP 中发现单链构象改变的 PCR 产物,利用 T-A 配对连接到 pGEMT 载体,测序工作由上海基康生物技术有限公司完成。

## 2 结果

### 2.1 筛选标准的建立

对离子注入后的菌株进行筛选时,人为规定转谷氨酰胺酶活力高于对照 10% 的突变株称为正突变,而低于 10% 的菌株称为负突变,在  $\pm 10\%$  之间作为未突变。

### 2.2 离子束辐照效应曲线

将不同注入剂量的菌膜洗脱后在平板培养基上作存活率比较,得到离子束辐照效应曲线(图 1)。它的存活曲线呈现出特异的双峰。

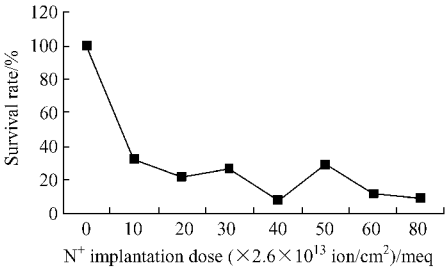


图 1 10keV 能量不同剂量下的存活率  
Fig.1 The survival rate of *Streptomyces fradiae* with various  $N^+$  implanted dose in 10keV energy.

### 2.3 PCR-SSCP 检测结果

提取突变菌株和原始菌株的 DNA,以 DNA 为模板,分别以 PaF, PaR; PbF, PbR; PcF, PcR; PdF, PdR; PeF, PeR 为引物进行 PCR 反应,分段扩增得到转谷氨酰胺酶基因。PCR 产物进行 SSCP 分析(图 2)。

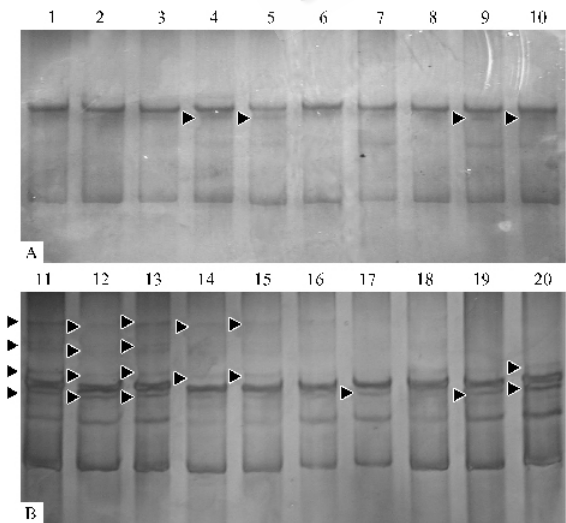


图 2 PCR-SSCP 筛选碱基变异突变体  
Fig.2 Screen the mutants by PCR-SSCP. Lane 1, control; Lane 2, 3, 6, 7, 16 is the mutants without base change on the TGase gene; Lane 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 20 is the mutants with base change on the TGase gene.

### 2.4 测序分析结果

2.4.1 离子束注入引起的碱基变异和氨基酸序列的改变:经过上述方法发现单链构象发生改变

的 PCR 产物,回收连接到 pGEMT 载体进行测序。其造成的基因碱基变异和氨基酸序列的改变如表 1 所示,其中 15, 50, 60, 203, 239, 501 号突变体的酶活较原始菌株高,但存在回复突变的现象。

表 1 离子束注入造成 TGase 基因碱基的变异和相应的氨基酸序列的改变

| Table 1 Mutations identified in transglutaminase gene<br>after radiation of N <sup>+</sup> ion |                             |           |            |                 |
|--|-----------------------------|-----------|------------|-----------------|
| No. of mutants   | Codon and amino acid change |           |            |                 |
| 15   | 725                         | 983       |            |                 |
|  | CGC—CAC ,CA                 | A—CCA     |            |                 |
|  | Arg—His ,                   | Gln—Pro   |            |                 |
| 50   | 12                          | 115       | 736        |                 |
|  | GAC—GAT                     | CAG—TAG   | C deletion |                 |
|  | Asp—Asp                     | Gln—Stp   |            |                 |
| 60   | 353                         |           |            |                 |
|  | GAC—GGC                     |           |            |                 |
|  | Asp—Gly                     |           |            |                 |
|  | 13                          | 169       |            |                 |
| 62   | AGG—GGG                     | AGC—AGT , |            |                 |
|  | Arg—Gly                     | Arg—Arg   |            |                 |
| 155  | 336                         |           |            |                 |
|  | ATC—ATT                     |           |            |                 |
|  | Ile—Ile                     |           |            |                 |
| 203  | 674                         |           |            |                 |
|  | C deletion                  |           |            |                 |
| 238  | 7                           |           |            |                 |
|  | GAC—TAC                     |           |            |                 |
|  | Asp—Tyr                     |           |            |                 |
| 239  | 1 ; 2                       |           |            |                 |
|  | CTG—GCG                     |           |            |                 |
|  | Leu—Ala                     |           |            |                 |
| 485  | 3 ,                         | 714 ,     | 723 ,      | 987             |
|  | CTG—CTT                     | AGA—AGG   | CCG—CCA    | C 缺失            |
|  | Leu—Leu                     | Arg—Arg   | Pro—Pro    |                 |
| 501  | 12                          | 115       | 690        | 708 734         |
|  | GAC—GAT                     | CAG—TAG   | GGC—GGG    | AAG—AAA GCC—GGC |
|  | Asp—Asp                     | Gln—Stp   | Gly—Gly    | Lys—Lys Ala—Gly |
| 502  | 117                         |           |            |                 |
|  | CAG—CAT                     |           |            |                 |
|  | Thr—Thr                     |           |            |                 |
| 1130   | 235                         |           |            |                 |
|  | AAA—GAA                     |           |            |                 |
|  | Lys—Glu                     |           |            |                 |

2.4.2 离子束注入氟氏链霉菌后造成碱基突变的类型及特点 转谷氨酰胺酶产生菌在  $N^+$  辐射后,通过 PCR-SSCP 筛选得到的 12 个碱基变异样品中,通过测序验证共检测出 24 个碱基的变异。碱基变异的类型包括转换、颠换和缺失,未检测到碱基的插入和重复。在检测到的 24 个碱基突变中,主要是碱基

的置换(87.5%),碱基缺失的比例比较小(12.5%)。在碱基置换中,转换的频率(58.3%)高于颠换的频率(29.2%)。转换主要以C→T,A→G为主,颠换以G→T,C→G为主。此外构成DNA的4种碱基均可以被离子束辐照诱发变异。胞嘧啶发生突变的频率要高一些(占50%),其次为G(25%)和A(20.8%),T(4.2%)的突变率最低(表2)。

表2 离子束注入诱发转谷氨酰胺酶基因突变的类型及特点

| Table 2 The type and characteristic of mutations in transglutaminase gene after radiation by N <sup>+</sup> ion |                      |             |
|---|----------------------|-------------|
| Type of mutation  | Number of occurrence | Frequency/% |
| Base Substitution   | 21                   | 87.5        |
| Transition  | 14                   | 58.3        |
| A→G   | 4                    | 16.7        |
| G→A   | 3                    | 12.5        |
| C→T   | 6                    | 25          |
| T→C   | 1                    | 4.2         |
| Transversion  | 7                    | 29.2        |
| A→C   | 1                    | 4.2         |
| C→G   | 3                    | 12.5        |
| G→T   | 3                    | 12.5        |
| Base deletion   |                      |             |
| - C   | 3                    | 12.5        |
| Total   | 24                   | 100         |

### 3 讨论

离子注入技术是20世纪80年代兴起的一种材料表面处理技术。离子束诱变常用的离子为N<sup>+</sup>,H<sup>+</sup>,Ar<sup>+</sup>。普遍认为N<sup>+</sup>的诱变效率最高,H<sup>+</sup>次之,Ar<sup>+</sup>的诱变效率最低。因为N为组成DNA碱基的重要元素之一,N<sup>+</sup>离子注入不仅可以直接引起碱基分子结构的变化,还可以参与细胞的重组和修复,产生的诱变突变较多,因此常用于微生物和植物诱变育种。所以本试验采用N<sup>+</sup>离子注入。

本试验中离子束辐照效应曲线呈现特异的双峰,这种特异的存活曲线图不同于紫外线和γ射线等其它射线辐照生物有机体后呈现“肩型”或“直线型”的存活剂量关系。与曾报道过的离子束诱变典型的“马鞍型”曲线也不完全相同<sup>[10,11]</sup>。但人们在用离子束诱变黑曲霉过程中出现过类似曲线<sup>[12]</sup>。尽管“双峰曲线”与“马鞍型”曲线不同,但是它能够反映离子束这种特异的诱变源所具有的独特的诱变效果,即出现反常损伤,这也进一步证实离子束在诱变机理上不同于其它的辐射诱变源<sup>[12]</sup>。离子束注入针对不同生物体所起的作用有所不同,关于其具体机制有待进一步的实验阐明。

本文主要分析离子束注入氟氏链霉菌后引起转

谷氨酰胺酶酶活及相应基因水平的变化。首先用PCR-SSCP方法初筛离子束注入引起转谷氨酰胺酶基因碱基变化的突变体,进一步通过测序确定突变的碱基,分析了离子束注入引起氟氏链霉菌基因突变的类型及特点。碱基变异的类型包括转换、颠换、缺失等。在检测到的24个碱基突变中,主要是碱基的置换(87.5%),碱基缺失的比例比较小(12.5%)。在碱基置换中,转换的频率(58.3%)高于颠换的频率(29.2%)。此外构成DNA的4种碱基均可以被离子束辐照诱发变异,胞嘧啶发生突变的频率要高一些。与杨建波等<sup>[5]</sup>体外诱变M13mp质粒DNA碱基突变的结果类似,但也有不同,主要是颠换类型及比例不同。本试验发生缺失的比例高,而且碱基缺失的类型也不同。通过分析突变位点周边的序列,并没有发现突变热点。

胞嘧啶第四位上的碳发生脱氨作用可转化成尿嘧啶类化合物,并和腺嘌呤错配,从而在下一轮的复制中发生C-T转换。如果被辐照的DNA是双链结构,与胞嘧啶对应的鸟嘌呤可在理化因素的诱导下转变成8-羟基鸟嘌呤,顺式的8-羟基鸟嘌呤能够与鸟嘌呤错配,最终发生C-G颠换。A-G的转换是因为腺嘌呤脱氨基后形成的次黄嘌呤(H)和胞嘧啶错配的结果。这种转换在传统的电离辐射对DNA的直接诱变中出现较少。由于离子束诱变相对于传统的电离辐射(X射线,γ射线)或非电离辐射(紫外线)能够比较有效的诱发C-T,A-G转换。这和离子束直接诱变DNA的情况类似<sup>[5]</sup>。由于C-T,A-G转换都是有基团脱落引起的,再次佐证了离子束辐照引起DNA诱变损伤的重要形式为基团的脱落。

由于离子束是一种荷能的带电粒子,除了具有能量的沉积作用外,还表现有质量的沉积、掺杂以及电荷的交换<sup>[13]</sup>。这些作用的结合,将有可能使生物靶分子(如DNA)产生链的断裂,基团的脱落或与注入的离子发生新的键合取代和置换,从而造成多种多样的碱基损伤和修饰。Yu等<sup>[14]</sup>在研究离子束辐照酪氨酸分子所造成的损伤时发现,注入氮离子发现有取代酪氨酸分子中的=CH—并形成杂环化合物的现象,这给离子束对生物靶分子的掺杂和修饰提供了一个佐证。总之离子束诱发碱基变异的机理很复杂,还有很多不明之处。

离子束注入具有突变率高,突变谱广的优点,容易获得酶活力高的突变菌株。但是回复突变比较普遍,要筛选到稳定的突变株需要的工作量也是巨大的。我们通过PCR-SSCP和测序反应相结合,在分

析离子束注入引起链霉菌基因突变的类型和特点的同时,了解了一些转谷氨酰胺酶活力高的突变体其相应的碱基的变化,为后续采用分子生物学的手段如基因定点突变等方法改造基因、提高酶活力、得到稳定突变株提供了依据。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Yu ZL. Ion beam application in genetic modification. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2000, **28**(1):128-132.
- [ 2 ] Wu LF, Yu ZL. Radiobiological effects of a low-energy ion beam on wheat. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2001, **40**:53-57.
- [ 3 ] 杜严华,黄晟海,谭 铮,等.低能重离子对 DNA 单链断裂的定量测定及剂量效应曲线的分析.科学通报,1999, **44**(1):56-61.
- [ 4 ] 李 莉,杨剑波,李 俊,等.离子束辐照对 pUC18 质粒 DNA 结构和功能影响的初步研究.安徽农业科学,1994, **22**(3):300-303.
- [ 5 ] 杨剑波,吴李君,李 莉,等.离子束辐照 M13mp18 DNA (RFI)诱导 LacZ 突变的序列分析.中国科学(B 辑),1995, **25**(12):1273-1278.
- [ 6 ] 常风启,刘选明,李银心,等.低能  $N^+$  辐照拟南芥诱导基因组碱基变异分析.中国科学(C 辑),2003, **33**(2):117-124.
- [ 7 ] 谢传晓,姚建铭,潘仁瑞,等.大肠杆菌离子束诱变及 *rpoB* 基因两个新的利福平抗性位点鉴定.微生物学报,2003, **43**(6):732-739.
- [ 8 ] Orita M, Tawahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(8):2766-2770.
- [ 9 ] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical Streptomyces Genetics. Norwich, UK: The John Innes Foundation, 2000.
- [ 10 ] 甄卫军,李 茜,张石峰,等.低能  $N^+$  离子注入谷氨酸产生菌诱变选育初步研究.食品与发酵工业,2002, **28**(1):20-23.
- [ 11 ] 虞 龙,许 安,王 记,等.低能离子注入在  $V_c$  高产菌株选育中的作用.激光生物学报,1999, **8**(3):217-220.
- [ 12 ] 李市场,白爱枝,姚建铭.低能离子注入木聚糖酶产生菌黑曲霉(*Aspergillus niger*)育种中参数的优化.激光生物学报,2003, **12**(5):378-381.
- [ 13 ] 余增亮.离子束生物技术引论.合肥:安徽科学技术出版社,1998.
- [ 14 ] Yu ZL, Shao CL. Dose-effect of the tyrosine sample implanted by a low energy  $N^+$  ion beam. *Radiat Phys Chem*, 1994, **43**(4):349-351.

## Mutation spectrum analysis of transglutaminase gene in *Streptomyces fradiae* after irradiation by $N^+$ ion

LIU Xiao-qiu, ZHANG Guo-qing, QIAN Shi-jun\*

(State Key Laboratories of Transducer Technology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** : A series of mutants of transglutaminase (TGase) gene from *Streptomyces fradiae* strains were obtained by low energy  $N^+$  ion beam irradiation, and the irradiation dose response curve was also investigated. Both the wild type and the mutants of TGase were compared by PCR-SSCP, and specific fragments were sequenced. Then the types of TGase gene mutation induced by  $N^+$  were characterized. The results show that the types of DNA base mutation included the transition, the transversion and the deletion. In all of the 24 bases of mutants, the base replacement occupies about 87.5% of the total mutants with only a small portion of gene deletion (12.5%). Interestingly, the frequency of the base transition (58.3%) is obviously higher than that of the base transversion (29.2%) among the base replacements. The base substitutions induced by  $N^+$  ion beam irradiation are C→T transition, A→G transition, G→T transversion, C→G transversion. Furthermore, mutations can be induced in all of the four DNA bases by low energy  $N^+$  ion beam irradiation, and cytosine shows the highest frequency of mutation.

**Keywords** : ion beam mutation; *Streptomyces fradiae*; transglutaminase; SSCP