

第七章 微生物遗传与变异

第一节 遗传变异的物质基础

一、证明核酸是遗传变异物质基础的经典实验

(一) 转化实验

1928年，格里菲斯(F·Griffith)，选用肺炎双球菌的两个不同品系做了这个实验。R型：无毒、无荚膜、菌落粗糙；S型：有毒、有荚膜、菌落光滑。

(二) 噬菌体感染实验

1952年，赫希和蔡斯(Hershey和Chase)。

材料：大肠杆菌T₂噬菌体。

实验过程：①制备出带有P³²、S³⁵同位素标记T₂噬菌体；

②标记的T₂噬菌体感染大肠杆菌；

③离心。

直接说明DNA是T₂噬菌体的遗传物质。

(三) 病毒的拆分重建实验

1956年，弗兰克-康勒脱(Frankel-conrat)等人。

材料：烟草花叶病毒：TMV株(甲)：烟草嵌纹斑；HR株(乙)：烟草环形斑

实验过程：

结果说明：RNA是烟草花叶病毒的遗传物质。

二、微生物基因组

(一) 概念：

基因组(genome)：一个物种的单倍体的所有染色体及其所包含的遗传信息的总称。原核生物(如细菌)，多为单倍体(在一般情

况下只有一条染色体)真核微生物,多条染色体,例如啤酒酵母有 16 条染色体。有时为双倍体

(二) 微生物基因组结构特点

1. 原核生物(细菌、古生菌)的基因组

- (1)染色体为双链环状的 DNA 分子(单倍体);
- (2)基因组上遗传信息具有连续性;
- (3)功能相关的结构基因组成操纵子结构;
- (4)结构基因的单拷贝及 rRNA 基因的多拷贝;
- (5)基因组的重复序列少而短。

2、真核微生物(啤酒酵母)的基因组

- (1)典型的真核染色体结构;
- (2)没有明显的操纵子结构;
- (3)有间隔区(即非编码区)和内含子序列;
- (4)重复序列多

(三) 质粒和转座子

质粒(plasmid):一种独立于染色体外,能进行自主复制的细胞质遗传因子,主要存在于各种微生物细胞中。

转座因子(transposable element):位于染色体或质粒上的一段能改变自身位置的 DNA 序列,广泛分布于原核和真核细胞中。

质粒和转座因子是细胞中除染色体以外的另外二类遗传因子。

第二节 基因突变及修复

一、基因突变:一个基因内部遗传结构或 DNA 序列的任何改变。前突可以通过 DNA 复制而成为真正的突变,也可以重新变为原来的结构,这取决于修复作用和其它多种因素。基因突变是重要的生物学现象,它是一切生物变化的根源,连同基因转移、重组一起提供了推动生物进化的遗传多变性。

突变:生物体的遗传物质一核酸中的核苷酸顺序突然发生了稳定可遗传的变化。

基因:一般是指生物体内具有自我复制能力的遗传功能单位它是具有特定核苷酸顺序的核酸区段,一个基因一般有 1000 个核苷酸对。

基因组(genome):一个物种的单倍体的所有染色体及其所包含的遗传信息的总称。

染色体畸变：染色体断裂后引起染色体添加、缺失、重复、移位、倒位使遗传物质发生重新排列，引起突变。

基因突变引起的现象

1. 形态突变型
2. 条件致死突变
3. 生化突变型
4. 抗性突变型
5. 其它突变型

二. 基因突变的规律

1. 非对应性：突变的性状与引起突变的原因间不相对应。

如何证明基因突变的非对应性？三个经典实验：变量实验、涂布实验、影印实验证明突变的性状与引起突变的原因间无直接对应关系！

变量实验 (fluctuation analysis)

Salvador Luria and Max Delbruck (1943)

变量实验结果说明：大肠菌对噬菌体的抗性突变是在细胞分裂过程中随机地自发产生的。

Newcombe 的涂布实验 (1949)

结果说明：抗性突变发生在未接触噬菌体之前。

影印实验 (replica plating)

Joshua Lederberg and Esther Lederberg (1952)

结果说明：

以上三个实验充分证明了性状的突变与环境因素不相对应这一规律。

2. 自发性：各种性状突变是自发产生的（没有人为诱变因素的作用）。

3. 稀有性：产生突变的频率较低，而某一微生物的某一性状的突变率却是一定的。一般的突变率为 10^{-6} — 10^{-9} 。

4. 独立性：突变发生一般是独立的，各种性状突变的发生彼此独立无关。

5. 诱变性：某些外界的物理或化学因素可显著提高突变频率。这种作用称为诱变，具有诱变作用的因素称为诱变剂。

6. 稳定性：基因突变是稳定、可遗传的。

7. 可逆性：突变后的某一性状可以同样的频率回复到原有性状。

回复突变：突变型的基因变为原来野生型的过程。

三. 突变机制

(一) 自发突变的机制

自发突变：指在没有人工的参与下，微生物群体中可自然的产生少量突变体。这种突变的频率约为 10^{-6} — 10^{-9} 。

原因：1. 碱基本身的互变异构效应

2. 环出效应

(二) 诱发突变的机制

诱变：指化学或物理因素作用于微生物细胞，使其细胞遗传物质 DNA 结构发生改变，从而促进微生物遗传性改变的过程。

诱变剂：指能提高突变率的物理和化学因素。

单点突变：指物理因子引起一个核苷酸碱基发生从而在复制中引起一对核苷酸碱基发生改变。

I. 碱基对的置换：是发生在一定基因内的突变，属于一种微小的损伤，又称点突变。

转换：DNA 链中的一个嘌呤或是一个嘧啶被另一个嘧啶所置换。

颠换：DNA 链中的一个嘌呤被另一个嘧啶或是一个嘧啶被另一个嘌呤所置换。

1. 直接引起碱基置换的作用

诱变剂：亚硝酸、羟胺、烷化剂

亚硝酸引起的碱基转换机制：

2. 间接引起的置换作用

诱变剂：5-溴尿嘧啶、5-氨基尿嘧啶、8-氮鸟嘌呤、2-氨基嘌呤。

5-溴尿嘧啶引起的碱基转换机制：

II 移码突变：指一种诱变剂引起 DNA 分子中的一个或少速几个核苷酸的增加或删除；从而造成突变点以后的全部遗传密码的转录和转译发生错误的一类突变。

诱变剂：主要为吖啶类染料。

作用：啶类结构是一种平面型的三环分子与一对嘧啶—嘌呤相似，可插入到两相邻的 DNA 碱基对之间，造成双螺旋间距离加大，从而引起 DNA 复制是增加或缺失碱基，造成密码移动。

III 染色体畸变：有些理化因素引起染色体的断裂、交换，使染色体结构重新排列，称为染色体畸变。染色体畸变包括：缺失和重复；倒位；易位

IV 物理诱变因素：紫外线、x-射线、 γ -射线

紫外线的诱变作用：最主要的作用是在 260nm 左右。引起 DNA 改变作用功能是：①DNA 链的断裂；②DNA 分子内交联；③胞嘧啶和尿嘧啶的水和作用；④胸腺嘧啶二聚体。

(三) 损坏 DNA 的修复作用：微生物能以多种方式修复损伤的 DNA，主要为：

1. 光复活作用：紫外线照射后在可见光下激活细胞内的光激酶使 DNA 形成而胸腺嘧啶二聚体解聚，而正常复制的相信。

2. 暗修复作用(切补修复)

三. 突变与育种

自发突变育种：使利用自然条件下自发突变产生的少量菌，认为进行选育，比较被动。

诱变育种：利用物理或化学因素人为处理微生物细胞，以提高突变频率的幅度，较为主动。

(一) 营养缺陷型的筛选

野生型：指未经过变异的原始菌株。

原养型：在营养球上的表型与野生型相同的菌株。一般指营养缺陷型经回复突变或遗传重组等途径恢复到野生型的菌株。

1. 筛选中所用的培养基

基本培养基：用[-]表示。

完全培养基：用[+]表示。

补充培养基

2. 筛选的步骤

(二) 营养缺陷型的应用

1. 定量分析各种生长因子

2. 可用于测定微生物的代谢途径

3. 作为细菌杂交的标记

第二节 微生物基因转移和重组

基因重组：凡把两个不同性状个体细胞内的遗传基因转移 到一个个体细胞，并使之产生新的遗传型个体的过程称为基因重组或遗传重组。

基因重组的特点：可使微生物在不发生突变即不发生任何碱基对结构上的变化的情况下也可产生 新的遗传型个体。

重组与杂交的关系：重组是分子水平上的概念；而杂交则是细胞水平上的一个概念。杂交中必然包含着重组；而重组则不只限于杂交一种形式。

重组的方式：在原核微生物中，重组可通过转化、转录、溶源转变、结合等来进行。重组不涉及整个染色体组，而只涉及染色体的一部分（部分染色体重组），重组后的细胞称为局部合子。在真核微生物中，可通过有性生殖和准性生殖进行，重组涉及到整个染色体组，结合形成杂合子。

一. 原核微生物的基因重组

（一）转化

1928年，Griffith发现肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）的转化现象。

转化：受体细胞直接吸收于来自供体细胞的DNA片断，通过交换把它整合到自己的基因组中，从而获得了供体细胞部分遗传性状的现象。

1. 能够发生转化作用的细菌：目前已知有二十多个种的细菌具有自然转化的能力。

2. 转化必备的条件

（1）可被转化的受体菌：能进行转化作用的细胞必须是感受态细胞。

感受态细胞的特点：

（2）转化因子：是由供体菌提供的DNA片断。转化的DNA必须具有一定分子量。

（3）限制酶系统的情况

（4）受体菌与供体菌染色体的同源性

3. 转化的过程

转化过程的特点：对核酸酶敏感；不需要活的DNA给体细胞；转化是否成功及转化效率的高低主要取决于转化（DNA）给体菌株和转化受体菌株之间的亲源关系；通常情况下质粒的自然转化效率要低得多。

（二）转导

1. 转导实验

1951年，Joshua Lederberg和Norton Zinder为了证实大肠杆菌以外的其它菌种是否也存在接合作用，用二株具不同的多重营养缺陷型的鼠伤寒沙门氏菌进行类似的实验。

转导：利用转导噬菌体(缺陷噬菌体)为媒介，而将供体菌的部分DNA片段转入受体菌中，从而使受体菌获得了供体菌部分遗传性状的现象。

2. 具有转导能力的细菌

3. 转导的条件：供体菌、受体菌；必须由特殊的温和噬菌体为媒介。

4. 转导的类型

(1) 普遍转导：由温和噬菌体错误的包入(而非整合)了供体菌基因组中任何一部分基因(包括核外遗传物质质粒)，当它感染受体时，使后者获得了这部分遗传性状的现象。转导频率为 10^{-5} — 10^{-8} 。

完全普遍转导；流产普遍转导

(2) 局限性转导：指通过某些部分缺陷的温和噬菌体把供体菌的少数特定基因转移到受体噬菌体中的现象。*E. coli* K₁₂ 菌株 λ 温和噬菌体的转导作用。把引起普遍转导的噬菌体称为“完全缺陷噬菌体”；把引起局限转导的噬菌体称为“部分缺陷噬菌体”。

局限转导的特点：转导噬菌体部分缺陷；转导子是缺陷溶源性。

5. 溶源转变：当温和型噬菌体感染其宿主，使之发生溶源化时，因噬菌体基因加入宿主的基因组而使后者获得除免疫性外的新性状的现象。

当宿主缺失这一噬菌体时，通过溶源转变而获得的性状也同时丧失。

(三) 接合：指供体菌和受体菌的完整细胞经直接接触而传递大段DNA(包括质粒)遗传信息的现象。

1. 实验证据

1946年，Joshua Lederberg 和 Edward L. Tatum 细菌的多重营养缺陷型杂交实验。

大肠杆菌的接合作用：

发生接合作用所需的条件

(1) 接合作用需要性状略异的两种菌株

雄性菌株

雌性菌株

(2) 性质粒(F因子)的特性：

F因子在细胞中存在方式：

(3) 两个不同性状的细胞的接合，即利用性纤毛的作用使F⁺细胞和F⁻细胞接合，并传递DNA。

2. 大肠菌接合的类型及过程

- (1) $F^+ \times F^-$ 的接合作用
- (2) $Hfr \times F^-$ 的接合作用
- (3) $F' \times F^-$ 的接合作用

3. 接合、转导、转化的区别：

接合、转导、转化的不同之处在于：接合作用需要供体菌和受体菌直接接触，但不需要体外 DNA 或噬菌体为媒介。

(四) 原生质体融合

通过人为方法，使遗传性状不同的两细胞的原生质体发生融合，并产生重组子的过程称为原生质体融合或细胞融合。一般原理和主要过程：用两个有选择性遗传标记的突变株（缺陷型），在高渗液中用适当脱壁酶脱壁，除去细胞壁。原生质体离心、聚集，加入促融剂 PEG（聚乙二醇）促融合；高渗液中，再生细胞壁；选择培养，检出重组子。

(五) 基因定位和基因组测序

基因定位：通过遗传重组等手段确定不同的基因在染色体上的位置及相对距离，从而获得遗传图谱。

细菌基因转移的三种方式（接合、转导、转化）都可以用来进行细菌基因组作图。

基因组测序：测定待测生物基因组的所有碱基排列顺序，并在此基础上对遗传信息进行研究和分析。

1. 中断杂交技术

大肠杆菌基因组很大（全部转移需要 100 分钟），其遗传图谱须用多株 F 因子整合在不同位置的 Hfr 菌才能完成。

2. 基因连锁

接合作用（中断杂交）作图只能判断相距较远的基因间的相对位置；转导、转化则可用于对相隔很近的基因进行定位；连锁的二基因间的距离与其共转化，或共转导的频率成反比，因此，可根据二个基因被共转化或共转导的频率判断它们在染色体上的相对距离。

3. 遗传图谱：目前对大肠杆菌的染色体已定位了 1000 多个基因。

4. 基因组测序：“全基因组鸟枪测序”（whole genome shotgun sequencing）

5. 基因组序列的注释和意义：借助计算机对基因组序列进行分析

二. 真核微生物的基因重组

(一) 有性生殖

1. 有性生殖：是由两个遗传特性不同的配子或两个单倍体性细胞相互融合并产生新一代。

2. 啤酒酵母的有性杂交：两性别不同的单倍体子囊孢子相结合形成二倍体，在减数分裂使染色体可发生重组，形成杂合子。

(二) 准性生殖和准性杂交

1. 准性生殖：是指没有减数分裂发生而导致基因重组的生殖过程。它普遍存在于一些产生或不产生有性孢子的丝状真菌中——半知菌类。

2. 准性生殖的过程：

3. 准性生殖的特点：融合频率极低；异核体阶段可独立生活；有丝分裂过程发生体细胞重组核单倍体化。

4. 准性杂交：由人工因素促使不产生有性孢子的丝状真菌的菌丝直接接合，并选出杂合二倍体，然后利用某些理化因子处理，从而获得具有双亲优良性状的后代，为准性杂交。转化作用 U 型管实验完全普遍转导流产普遍转导局限转导噬菌体

第四节 微生物与基因工程

基因工程(genetic engineering)或重组 DNA 技术(recombinant DNA technology)：是指对遗传信息的分子操作和施工，即把分离到的或合成的基因经过改造，插入载体中，导入宿主细胞内，使其扩增和表达，从而获得大量基因产物，或者令生物表现出新的性状。

二十世纪生物科学具有划时代意义的巨大事件，推动了生物科学的迅猛发展，并带动了生物技术产业的兴起。

一. 基因工程的基本过程

1. 基因分离：分别提取供体 DNA 和载体 DNA；用专一性很强的限制性核酸内切酶分别切割供体和载体 DNA；

2. 体外重组：在 DNA 连接酶的作用下使具有相同粘性末端的供体 DNA 片段和载体连接，成为重组载体。

3. 重组载体的传递与筛选：用人工转化的方法将重组载体导入受体细胞中，并通过一定的筛选标记筛选得到含有目的外源片段的重组子。

4. 在特定的宿主中表达得到基因工程产品

二. 微生物与基因工程的关系

基因工程所用克隆载体主要是用质粒、病毒、噬菌体改造而成；

基因工程所用工具酶绝大多数是从微生物中分离纯化得到的；

将外源 DNA 导入宿主细胞的人工转化方法，是在微生物自然转化现象的基础上发展起来的；

微生物细胞是基因克隆的重要宿主；
微生物是基因产物的重要表达载体；
基因工程得以建立与发展的理论基础主要来自对微生物的研究；
微生物的多样性，为基因工程提供了极其丰富而独特的基因资源

三. 基因工程的常用技术和方法

1. PCR 原理和应用

(1)原理 (Mullis, 1984): 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)

特点: 在体外模拟细胞内进行的 DNA 复制过程。

变性 (denaturation): 模板 DNA 经热变性, 双链被解开, 成为两条单链。

退火 (annealing): 温度下降, 变性 DNA 复性, 使寡核苷酸引物即与模板 DNA 中所要扩增序列两端的碱基配对。

延伸 (extension): 在适宜条件下 (包括 DNA 聚合酶和核苷酸单体), 引物 3' 端向前延伸, 合成与模板碱基序列完全互补的 DNA 链。重复变性、退火和延伸三步操作, DNA 片段呈 2 的指数增长, 在 1—2 小时内重复 25—30 次循环, 扩增的 DNA 片段拷贝数可增加至 $10^6 \sim 10^7$ 倍。

(2)PCR 技术的关键酶——DNA 聚合酶

Klenow 聚合酶 (大肠杆菌 DNA 聚合酶片段)

Taq DNA 聚合酶 (水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*) 中分离, 1988 年萨奇 (R. K. Saiki))

pfu DNA 聚合酶 (火球菌 (*Pyrococcus Furiosus*) 中分离)

Vent DNA 聚合酶 (*Thermococcus litoralis*)