

第八章 微生物遗传变异与育种

- Ä 第一节 遗传变异的物质基础
- Ä 第二节 微生物的基因组结构
- Ä 第三节 质粒和转座因子
- Ä 第四节 基因突变及诱变育种
- Ä 第五节 细菌基因转移和重组
- Ä 第六章 真核微生物的遗传学特性
- Ä 第七章 菌种的衰退、复壮与保藏

遗传与变异的概念

遗传：亲代将自身一整套遗传因子传递给下一代的行为和功能，

变异：生物体的遗传物质结构和数量的改变，新性状稳定、可遗传。

遗传型（genotype）：一个生物体所含有的基因的总和。

表型（phenotype）：一个生物体所具有的一切外表特征和内在特性的总和。

饰变（modification）：指生物体由于非遗传因素引起的表型改变，变化发生在转录、转译水平，特点是几乎整个群体中的每一个个体都发生同样的变化，性状变化的幅度小，不遗传，引起饰变的因素消失后，表型即可恢复。

第一节 遗传的物质基础

一、证明遗传物质的三个经典实验

1. 转化实验——遗传物质是DNA
2. 噬菌体感染实验——证明DNA是遗传物质，且其中含有合成蛋白质的遗传信息。
3. 植物病毒重建实验——遗传物质是RNA。

1.肺炎链球菌转化实验

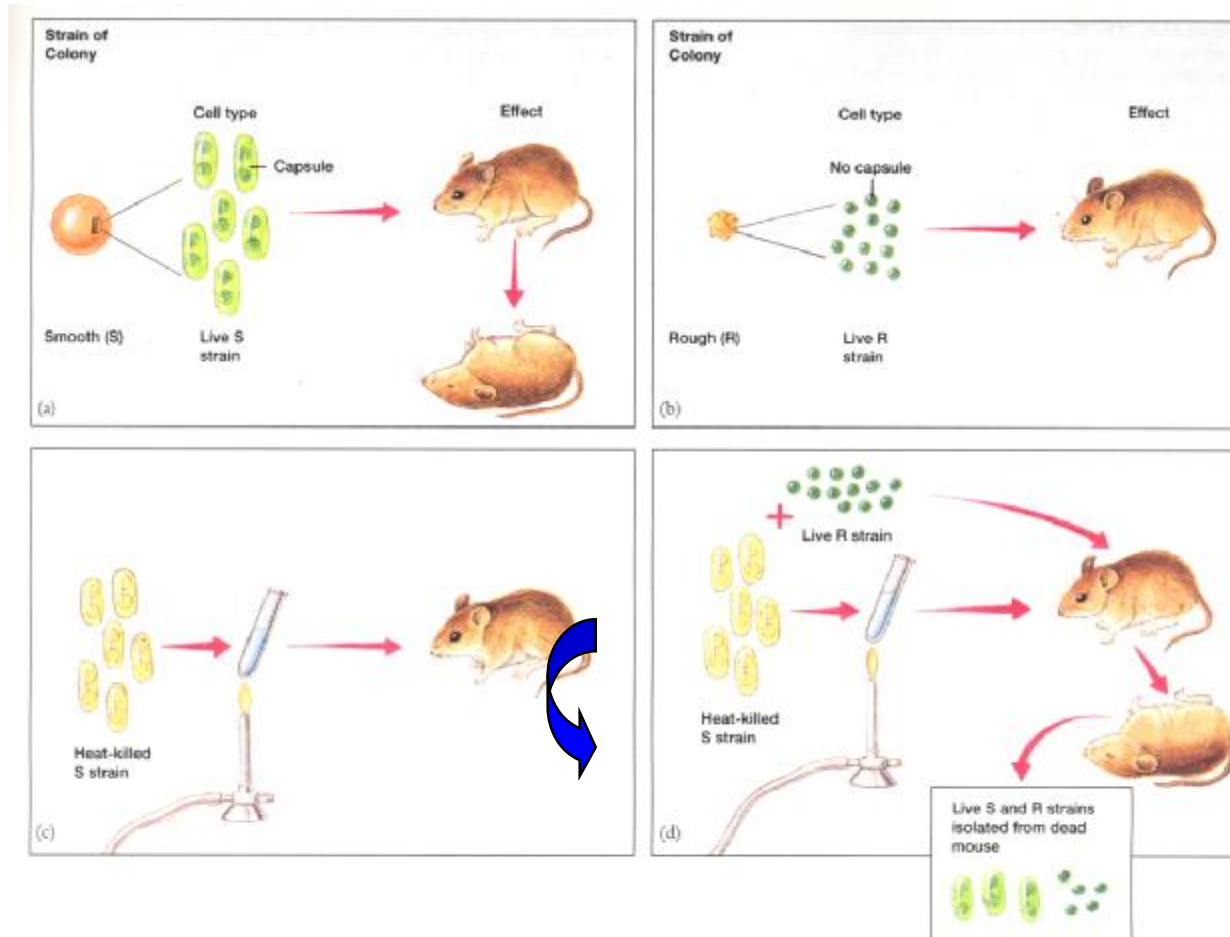


Figure 13.1 Griffith's Transformation Experiments. (a) Mice died of pneumonia when injected with pathogenic strains of *S. pneumoniae*, which have a capsule and form smooth-looking colonies. (b) Mice survived when injected with a nonpathogenic strain of *R. pneumoniae*, which lacks a capsule and forms rough colonies. (c) Injection with heat-killed strains of *S. pneumoniae* had no effect. (d) Injection with a live *R* strain and a heat-killed *S* strain gave the mice pneumonia, and live *S* strain pneumococci could be isolated from the dead mice.

2. T2噬菌体感染实验 (A.D.Hershey和M.Chase 1952年)

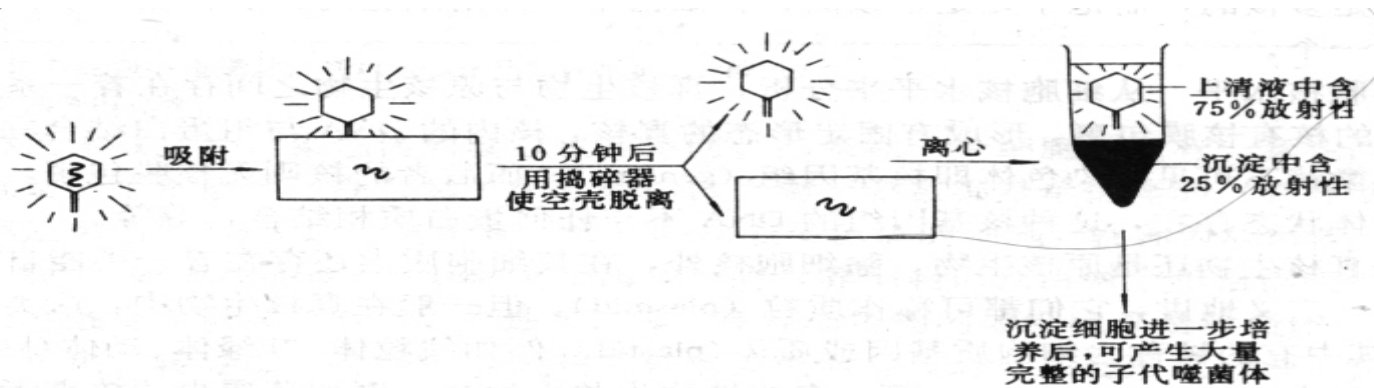


图 8-2 用含 ^{35}S -蛋白质(外壳)的噬菌体作感染实验

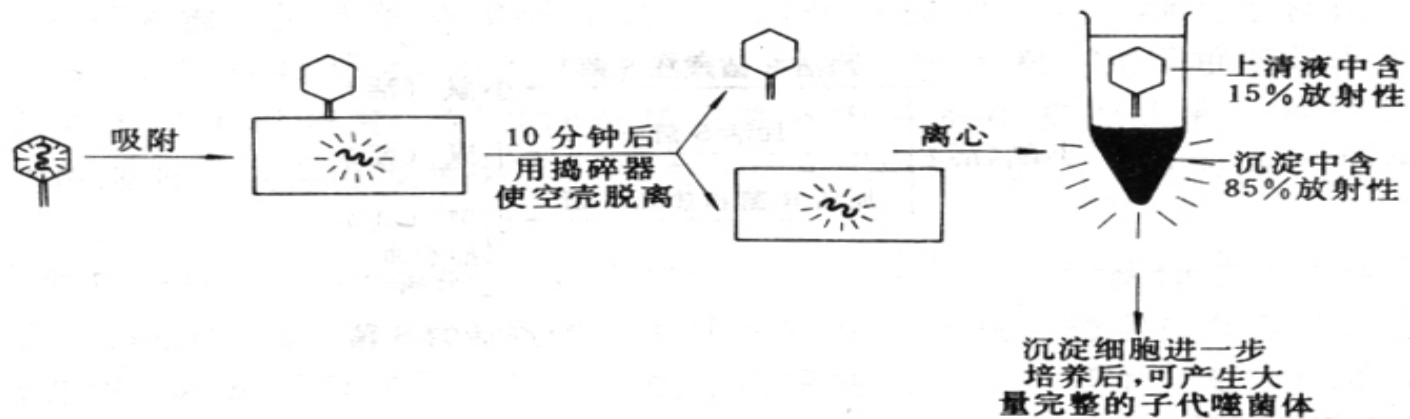


图 8-1 用含 ^{32}P -DNA(核心)的噬菌体作感染实验

3.病毒重建实验(Fraenkel—Conrat 1956年)

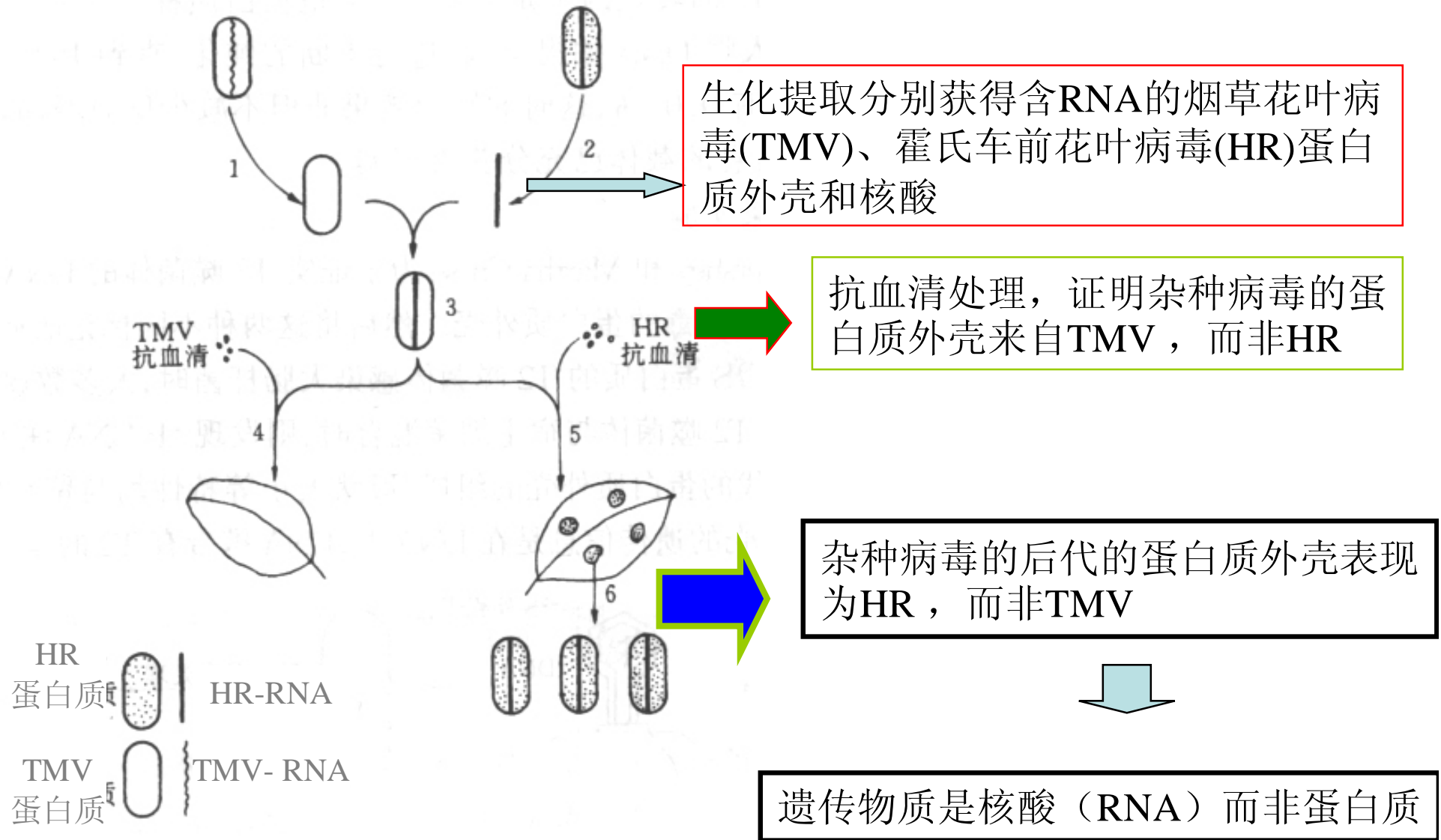


图 8-2 TMV 病毒拆分重建实验

第二节 微生物的基因组

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、微生物基因组结构的特点

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;

第三节 质粒和转座因子

质 粒

定义： 是一类小型共价闭合环状核外DNA，能独立于细胞核进行自主复制。可以通过交换掺入细胞核成为附加体；可以从寄主细胞中消除。

大小： $2\sim 100 \times 10^6 \text{Da}$ ，含有数个到数十个甚至上百个基因。

性质： 质粒是一种复制子，分为严紧型和松弛型，严紧型质粒的复制受细胞核控制，一般一个寄主细胞内有2~3个；松弛型质粒的复制不受细胞核控制，在细胞内的数量可以达到10-15个

功能： 进行细胞间接合并带有一些基因，如产生毒素、抗药性、降解功能等。

重组： 在质粒之间、质粒与染色体之间菌可发生。

质粒的主要类型

质粒所编码
的功能和赋
予宿主的表
型效应

致育因子 (Fertility factor, F因子)

抗性因子 (Resistance factor, R因子)

产细菌素的质粒 (Bacteriocin production plasmid)

毒性质粒 (virulence plasmid)


代谢质粒 (Metabolic plasmid)

隐秘质粒 (cryptic plasmid)

1.F-因子（fertility factor）

- 致育因子/性因子， 62×10^6 Dalton，94.5kb，相当于核染色体DNA2%的环状双链DNA，足以编码94个中等大小多肽，其中1/3基因（tra区）与接合作用有关。
- 存在于肠细菌属、假单胞菌属、嗜血杆菌、奈瑟氏球菌、链球菌等细菌中，决定性别。



 **Figure 14.6 Bacterial Conjugation.** An electron micrograph of two *E. coli* cells undergoing conjugation. The F⁺ cell to the right is connected with the recipient cell to the left by a sex pilus.

2. R（抗生素抗性和重金属抗性）因子 (resistance factor)

- R因子由相连的两个DNA片段组成，即抗性转移因子（resistance transfer factor, RTF）和抗性决定因子（r-determinant），RTF控制质粒copy数及复制，抗性决定因子带有抗生素或重金属的抗性基因。
- R-因子在细胞内的copy数可从1~2个到几十个，分为严紧型和松弛型两种，经氯霉素处理后，松弛型质粒可达2000~3000个/细胞。

3 .Col因子（colicinogenic factor）

- 产大肠杆菌素因子。大肠杆菌素是一种由*E.coli*的某些菌株所分泌的细菌蛋白，具有通过抑制复制、转录、转译或能量代谢等而专一地杀死不含Col因子的近缘的其它肠道细菌。
- 凡带Col因子的菌株，由于质粒本身编码一种免疫蛋白，从而对大肠杆菌素有免疫作用，不受其伤害。

4 .Ti（毒性）质粒（tumour inducing plasmid）

- 即诱癌质粒。长200kb，是一种大型质粒。
- 存在于根癌土壤杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）中。赋予宿主引起许多双子叶植物的根癌的特性。
- 当带有Ti质粒的细菌侵入植物细胞中后，在其细胞中溶解，把细菌的DNA释放至植物细胞中。含有复制子的Ti质粒的小片段与植物细胞中的核染色体发生整合，破坏控制细胞分裂的激素调节系统，从而使它转变成癌细胞。

5.降解性（代谢）质粒

- 如假单胞菌属中发现。它们的降解性质粒可为一系列能降解复杂物质的酶编码，从而能利用一般细菌所难以分解的物质做碳源。这些质粒以其所分解的底物命名，例如有分解**CAM**（樟脑）质粒，**XYL**（二甲苯）质粒，**SAL**（水杨酸）质粒，**MDL**（扁桃酸）质粒，**NAP**（奈）质粒和**TOL**（甲苯）质粒等。

6. 隐秘质粒

不显示任何表型效应，只能通过物理的方法检测的质粒。如酵母菌的2um质粒。

转座因子

定义：可在DNA链上改变自身位置的一段DNA序列。

原核生物中的转座子类型

插入（IS）序列

转座子(Tn)

特殊病毒（Mu噬菌体）

转座的遗传效应

- 插入突变
- 产生染色体畸变（复制性转座子）
- 基因的移动和重排

第四节 基因突变及修复

一、基因突变

基因突变：一个基因内部遗传结构或DNA序列的任何改变

突变	{	自发突变	环境因素的影响，DNA复制过程的偶然错误等而导致，一般频率较低，通常为 10^{-6} - 10^{-9} 。
		诱变	某些物理、化学因素对生物体的DNA进行直接作用，突变以较高的频率产生。

(一) 基因突变类型:

1. 碱基变化与遗传信息的改变

- 同义突变: GGG(Gly)---GGA (Gly)
- 错义突变: AGA(Arg)---GGA (Gly)
- 无义突变: UGU(Cys)---UGA (stop)
- 移码突变: AGA(Arg) UGU(Cys) G---AGU(Ser) GUG(Val)
- RNA基因组发生突变的几率是DNA的1000倍。

2. 表型突变

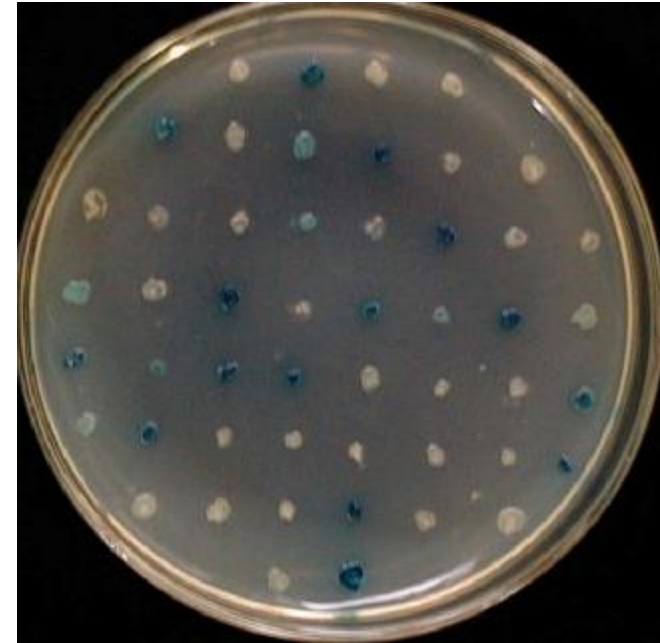
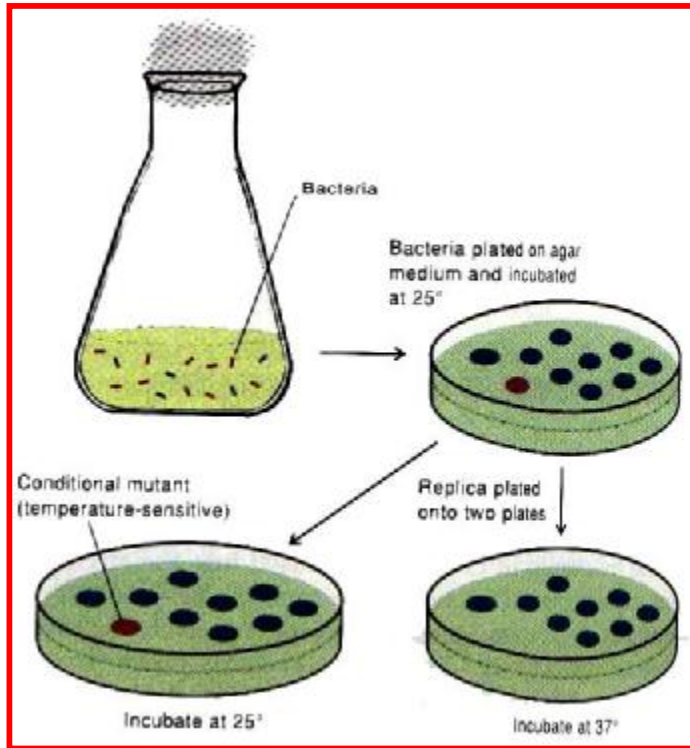
按表型分

- 形态突变型
 - 细胞形态：如细菌的鞭毛、芽孢或荚膜的有无。
 - 菌落形态：菌落大小、外形光滑(S型)、粗糙(R型)和颜色等
- 生化突变型
 - 营养缺陷型：缺乏合成必须营养物质的突变型, hisC⁻, hisC⁺
 - 抗性突变：菌株对某种药物产生抵抗的突变 Tet^r, Tet^s
 - 抗原性突变（包括细胞内部、表面成分的改变）
- 回复突变：
- 致死性突变型（合成关键性酶的基因发生突变，表现出致死突变）
- 条件致死突变型：如温度敏感型
- 其它突变型：毒力突变、糖发酵突变、产量、产品突变等

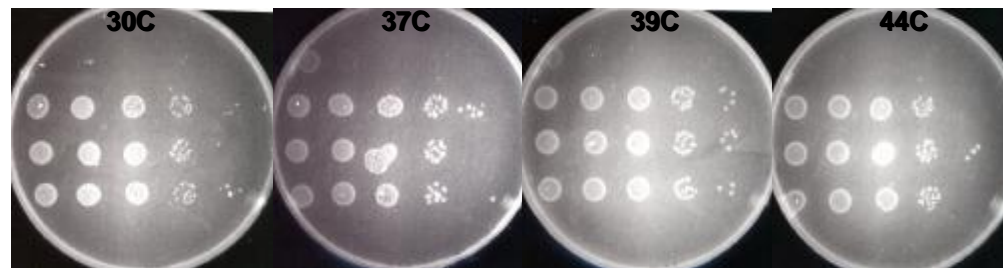
例如：温度敏感型突变

菌落颜色变化

R529C



rpoB3401
LCH320
DJ258
rpoB⁺



R529C

T525R

(二) 基因突变的特点:

- 1) 不对应性: 环境与变异无对应性
- 2) 自发性: 非人为的诱变因素下发生
- 3) 稀有性: 生物体的自发突变率为 $10^{-6} \sim 10^{-9}$
- 4) 独立性: 一个基因的突变对其它基因突变无影响, 同时发生2个突变的几率很低。
- 5) 诱变性: 诱变剂可提高突变率 $10 \sim 10^5$ 倍
- 6) 稳定性: 突变性状稳定、可遗传
- 7) 可逆性: 野生型——突变型叫正向突变, 反之为回复突变或回变。

突变率: 每一细胞在每一世代中发生某一性状突变的几率。

（三）基因突变自发性及不对应性的证明

自发突变(spontaneous mutation)：没有人工诱变因素的参与，生物体的自然突变。

- 变量试验
- 涂布试验
- 平板影印培养试验

1. 变量试验: 1943年, Luria和 Delbrück

结果:

- 1) 抗性细胞的出现, 是在接触噬菌体之前;
- 2) 喷上噬菌体, 仅起淘汰野生型和鉴别抗性株作用;
- 3) 由于甲方高度彷徨, 说明突变是随机的。

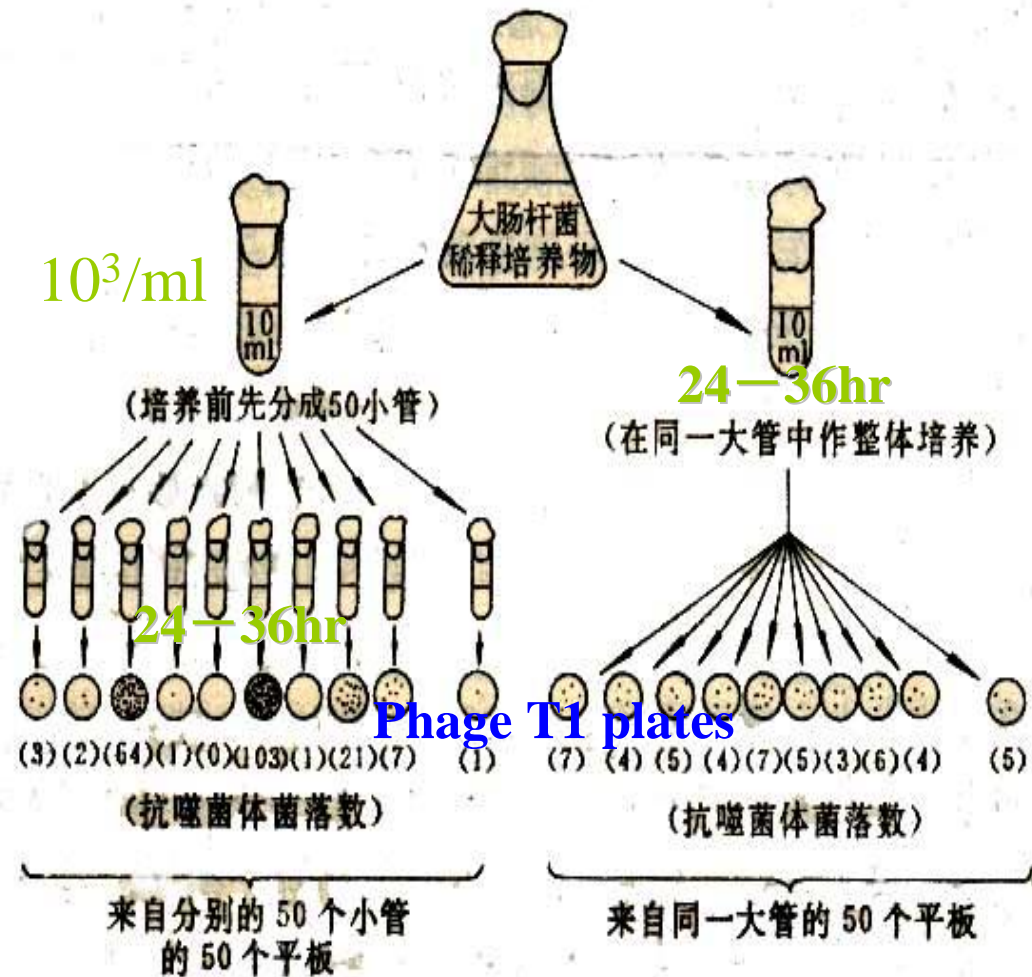


图 8-5 Luria 等的变量试验

2. 涂布试验 (1949年, Newcombe)

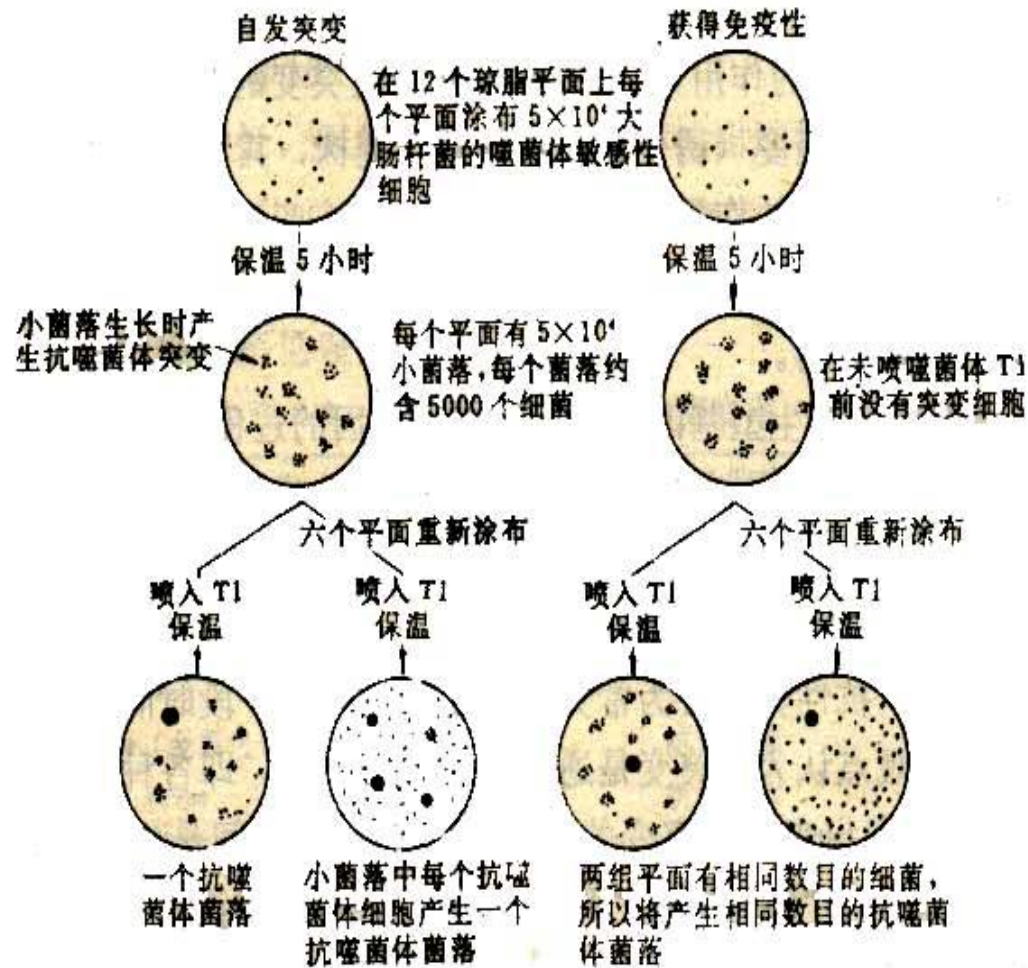


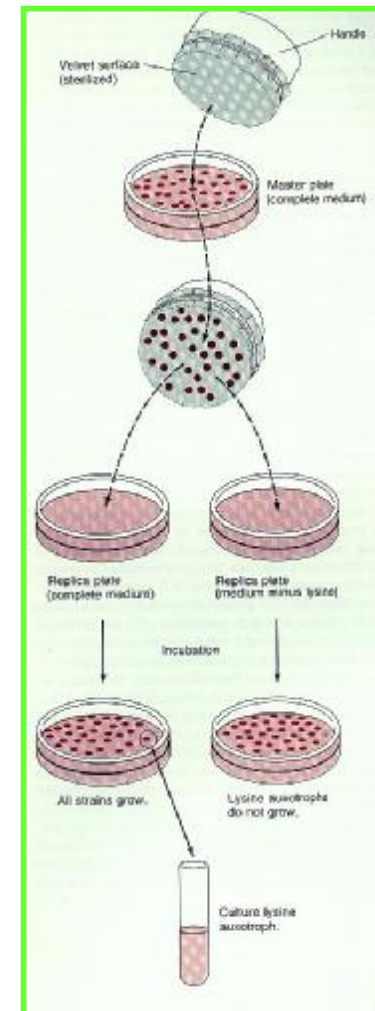
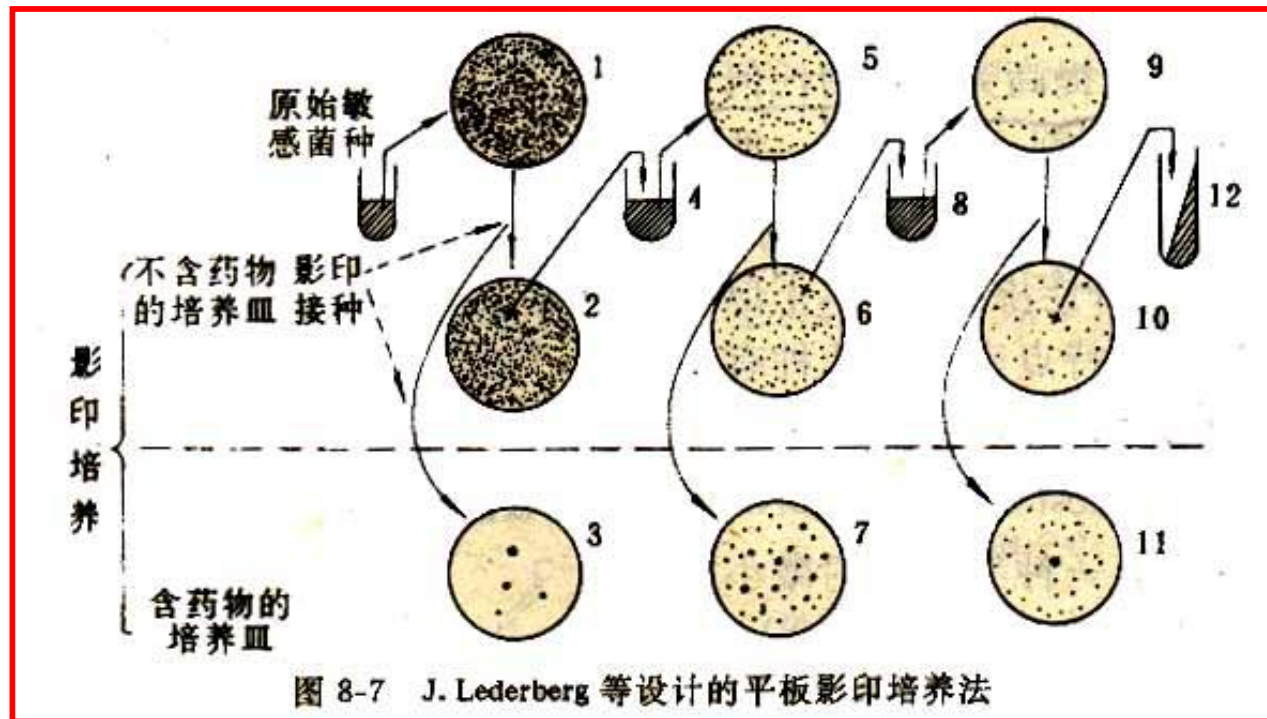
图 8-6 Newcombe 的涂布试验

结论:

- 1、突变与噬菌体无关;
- 2、涂布使抗性菌株均匀分布;
- 3、抗性突变可在任何时间发生, 与噬菌体存在无关。

3. 平板影印 (replica plating) (1952, Lederberg夫妇)

一种能达到在一系列培养皿的相同位置上出现相同遗传型菌落的接种培养方法。1次接8个。



实验表明：从未接触链霉素 (str) 的菌株可发生抗性突变，分离可得到纯的 str^r 菌株。

二、突变与育种

(一) 自发突变与生产育种

- 1.生产选育：群体培养中个别的变异个体表现出生长优势，发现突变种后，随时分离、纯化。
- 2.定向培育：用特定的环境长期处理某一微生物群体,同时不断对其移种、传代，以达到积累和选择合适的自发突变体的一种育种方法。

(二) 诱变育种

1. 概念:

诱变育种是用物理或化学的诱变剂使诱变对象内的遗传物质（DNA）的分子结构发生改变，引起性状变异并通过筛选获得符合要求的变异菌株的一种育种方法。

2. 诱变剂:

1) 概念: 凡能提高基因突变频率的理化因素。

2) 种类:

物理因子 (physical agents)

化学因子(chemical agents)

转座子(transposable elements)

∅ 物理诱变剂: U.V、 α 、 γ 、快中子、超声波等。

∅ 化学诱变剂:

3. 诱变的主要环节

1) 诱变剂的选择:

a. 了解诱变剂的性质、作用机理和使用方法

b. 处理方式:

单一因子处理:

复合因子处理: 两种以上因素

先后使用

同时使用

单一因子重复使用

c. 处理剂量: 测致死率。 方法

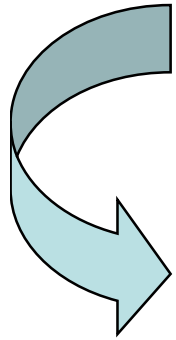
平板菌落计数法

纸片法

一般杀菌率为70%左右。

三、诱变剂与致癌物质——Ames试验

很多种化学物质，能以各种机制导致DNA的突变



- a) 利用各种诱变剂获得各类遗传突变，进行诱变育种；
- b) 对有害微生物进行控制；
- c) 危害人类自身的健康

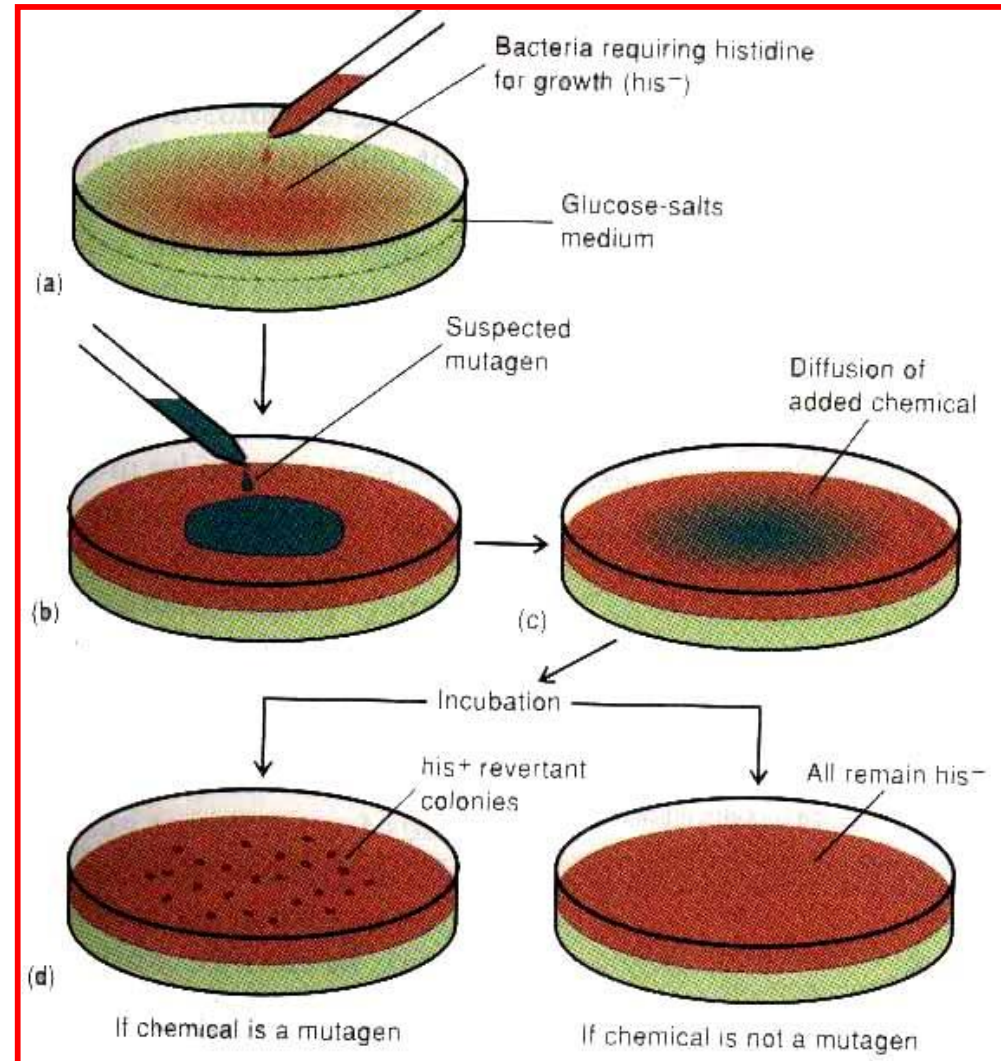
Ames试验:

是由美国加利福尼亚大学的Bruce Ames教授于1966年发明。

原理: 检测鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 组氨酸营养缺陷型菌株 (*his⁻*) 的回复突变率,

回复突变 (reverse mutation 或 back mutation): 突变体失去的野生型性状, 可以通过第二次突变得得到恢复, 这种第二次突变称为回复突变。

抑制突变: 由于第二次突变抑制了第一次突变所造成的缺陷。



四、营养缺陷型的筛选

(一) 概念:

1. 三种遗传型个体

营养缺陷型 (auxotroph) : 经诱变产生的一些合成能力出现缺陷, 而必须在培养基内加入相应有机养分才能正常生长的变异菌株。

如: lys^- ; his^- ;

野生型(wild type): 自然界分离到的任何微生物, 在其发生营养缺陷突变前的原始菌株, 为该微生物的野生型。如: lys^+ ; his^+ ;

原养型 (prototroph) : 指auxo突变菌株回复突变或重组后产生的菌株, 与野生型的表型相同。

营养缺陷型的表示方法

基因型：所需营养物的前三个英文小写斜体字母表示：*hisC*

（组氨酸缺陷型，其中的大写字母C同一表型中不同基因的突变）

表型：同上，但第一个字母大写，且不用斜体：HisC

在具体使用时多用*hisC⁻*和*hisC⁺*，分别表示缺陷型和野生型。

2、筛选用的培养基

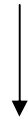
基本培养基（minimal medium,MM）[-]：满足野生型菌株营养要求最低成分的组合。

完全培养基（complete medium,CM）[+]：满足一切营养缺陷型生长的天然或半组合培养基。

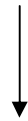
补充培养基（supplemented medium,SM）[x]：在基本培养基中有针对性地加入一或几种营养成分以满足相应营养缺陷型生长的组合培养基。

(二) 筛选方法

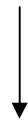
诱变处理



营养缺陷型的浓缩



营养缺陷型的检出



营养缺陷型的鉴定

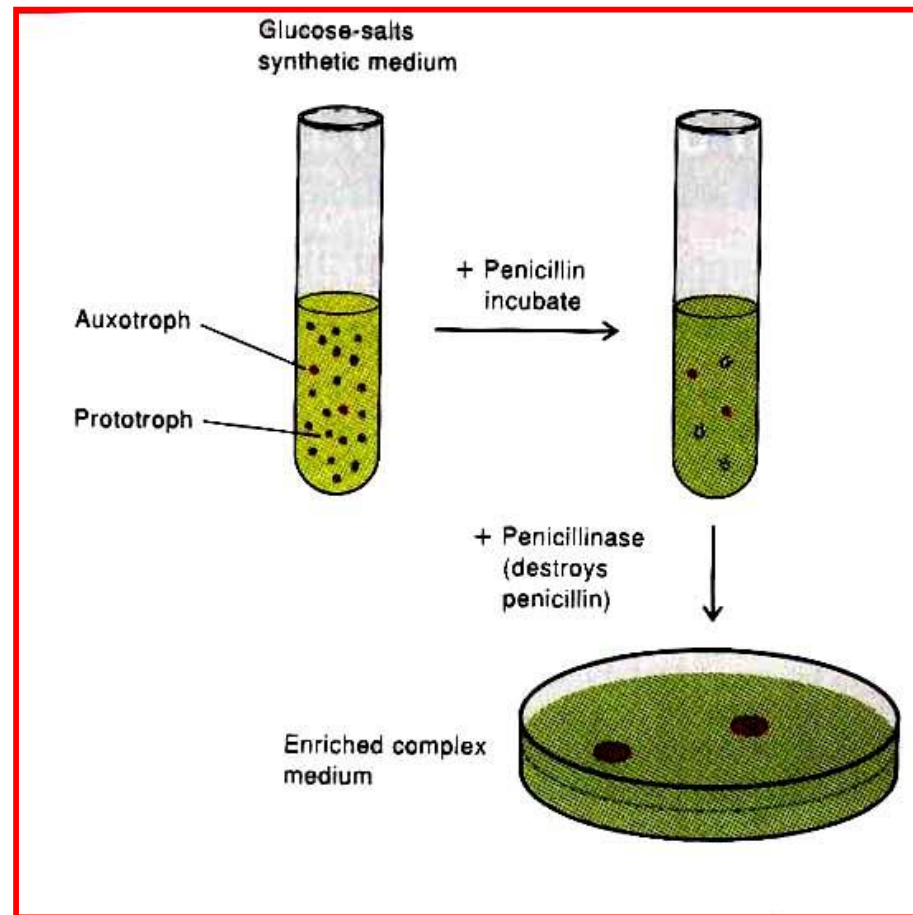
1. 诱变处理：亚硝基胍（NTG）

2. 营养缺陷型的浓缩：

1) 抗生素法：

原理：青霉素（细菌）、制霉菌素（霉菌）等抗生素作用于生长着的微生物细胞，对休止态细胞无作用。

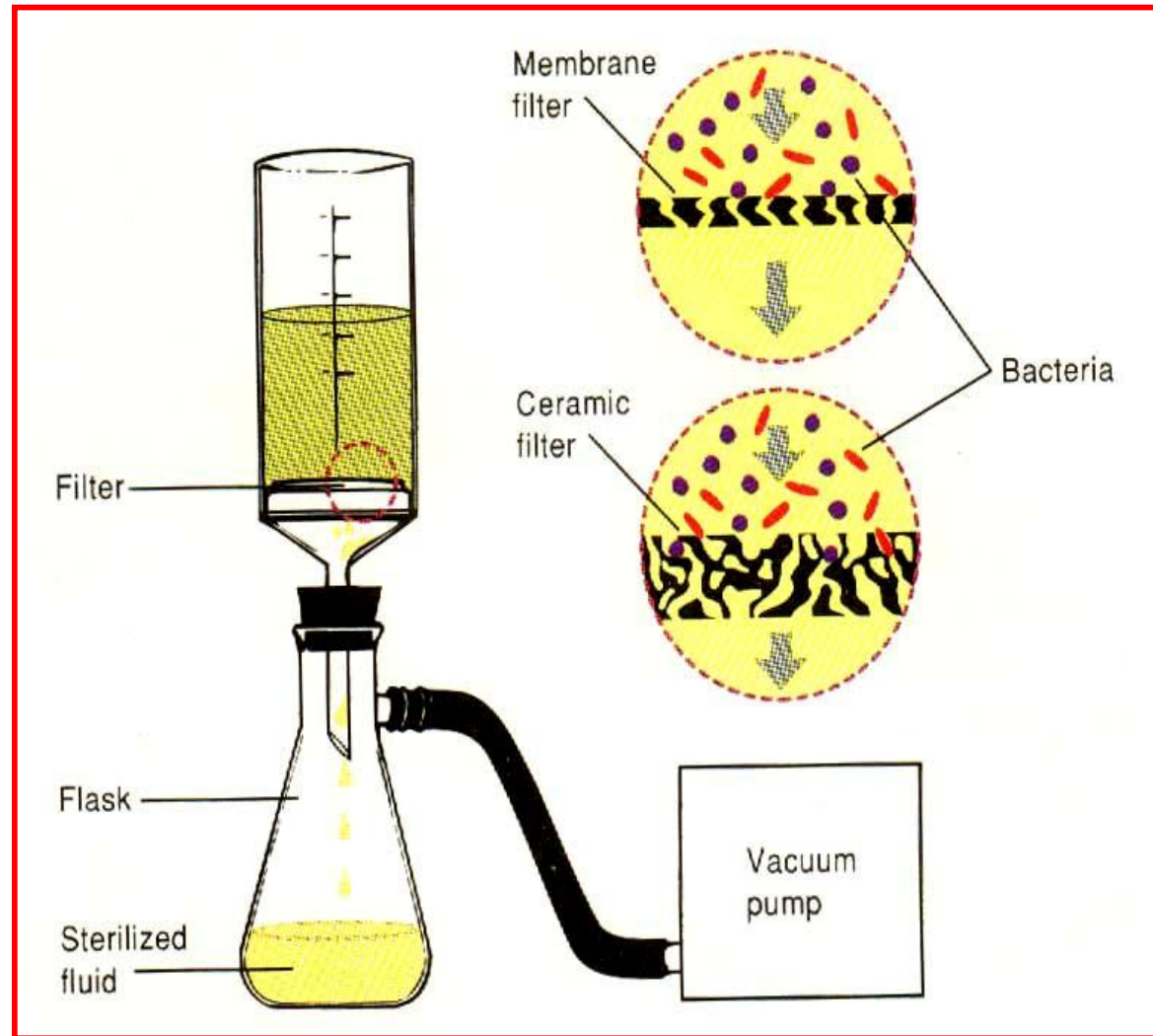
方法：菌培养在含抗生素的MM基中。



2) 菌丝过滤法:

适用于丝状（放线菌、霉菌）。

原理：野生型在基本培养基上发育成菌丝，不能通过滤膜；营养缺陷型孢子可通过滤膜，野生型菌丝不能通过。



3) 差别杀菌法:

基本培养基上只有野生型生长，加热杀死野生型营养体，保留营养缺陷型芽孢。

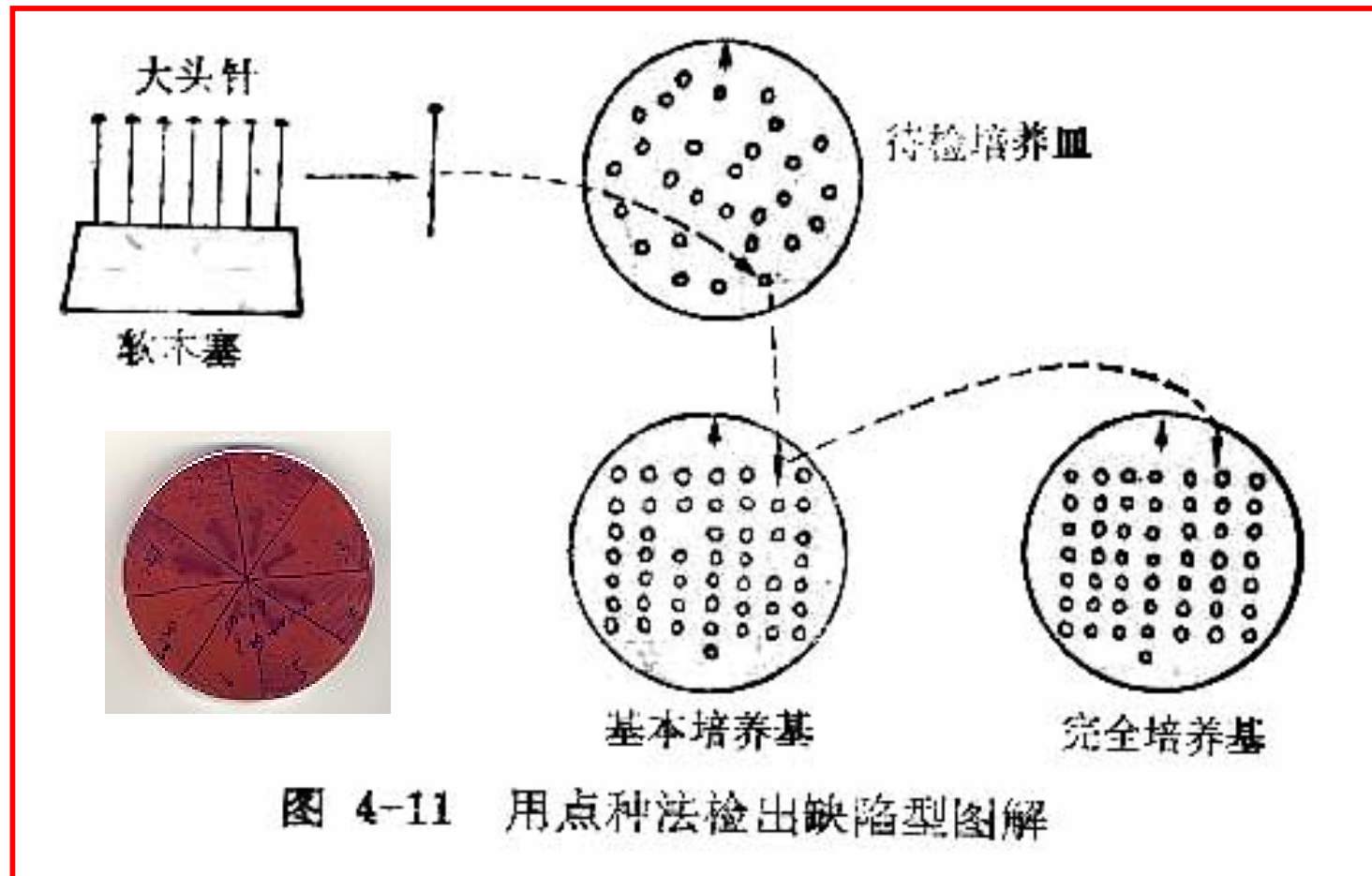
细菌——80℃

酵母——60℃

适用于产芽孢、孢子菌。

3. 营养缺陷型的检出

1) 逐个检出法

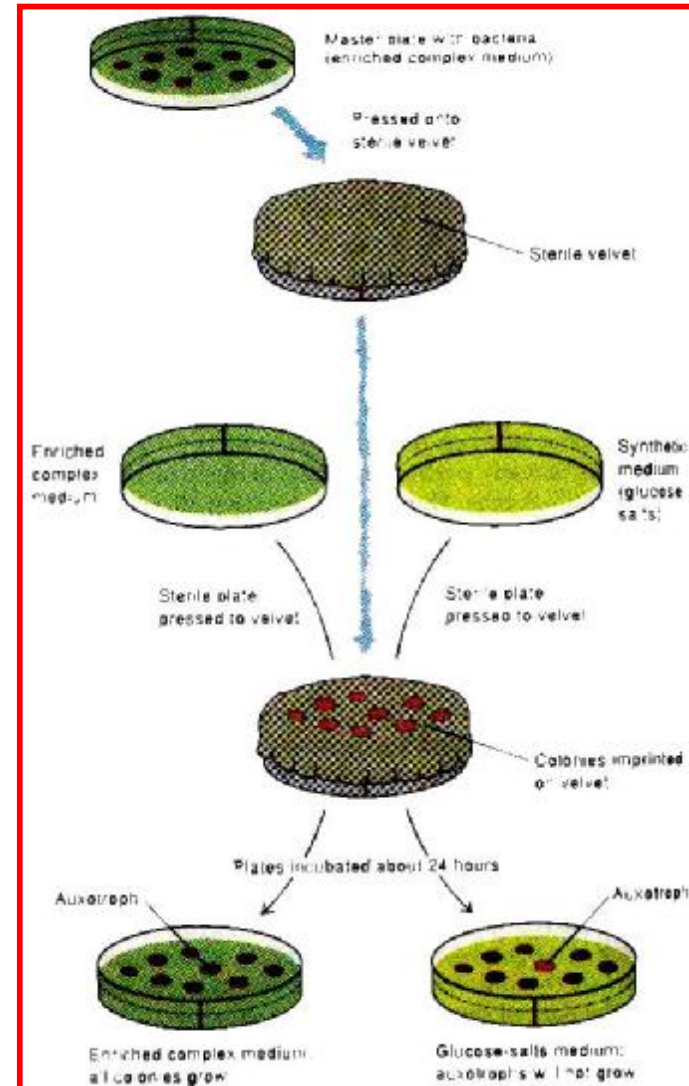


3. 营养缺陷型的检出

2) 影印平板培养法

3) 限量补充法

(在基本培养基中加0.01%
蛋白胨, 营养缺陷型菌落小,
野生型菌落大)



3. 营养缺陷型的检出

4) 夹层培养法

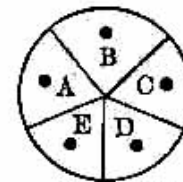


两层基本培养基，夹一层菌液，标记后，再加一层完全培养基。

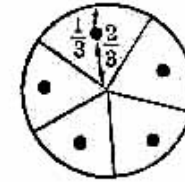
4. 营养缺陷型的鉴定

1) 生长谱法

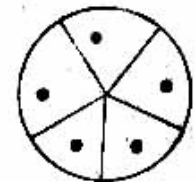
- 方法简便;
- 回变和污染不影响结果
- 测定物质可为粉末或纸片



五组氨基酸

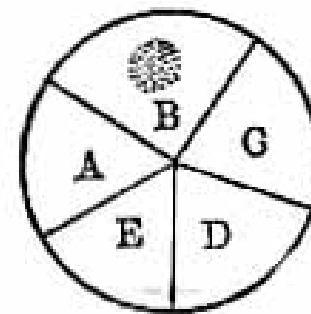
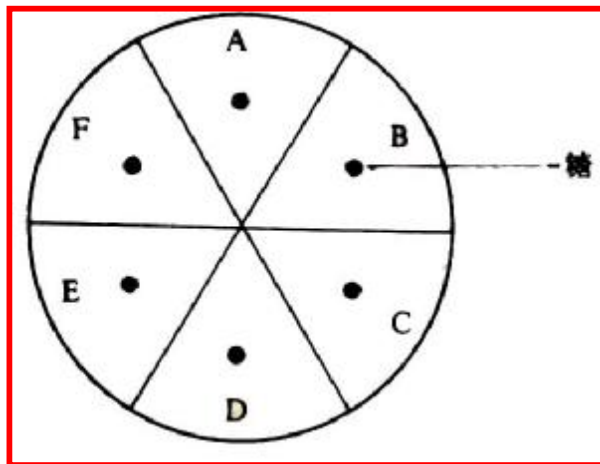


各种碱基

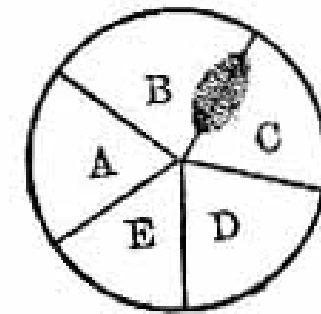


各种维生素

图 4-13 生长谱的测定



单缺陷型生长谱



双缺陷型生长谱

图 4-14 单缺陷型与双缺陷型的生长谱

4. 营养缺陷型的鉴定

2) 混合氨基酸 (Vit) 法

混合氨基酸法步骤：

a. 将多种营养因子编组，

如： 一组： 1 2 3 4 5

二组： 2 6 7 8 9

三组： 3 7 10 11 12

四组： 4 8 11 13 14

五组： 5 9 12 14 15

营养因子分组编排时注意：

- 1) 每组内无重复的营养因子
- 2) 每组中应包含只出现一次的因子
- 3) 每组中其他因子应分别出现二次

a. 将多种营养因子编组，

如： 一组：1 2 3 4 5
二组：2 6 7 8 9
三组：3 7 10 11 12
四组：4 8 11 13 14
五组：5 9 12 14 15

b. 将组合液的纸片放在涂菌的基本培养基上培养
c. 结果分析

例：



缺 13



缺 2



需 1、2 组合中的 2 种或多种因子。



缺 1，但浓度过大，稀释后可正常生长。

5. 营养缺陷型的应用

- 1) 作为标记菌株：进行基因工程、诱变育种、代谢过程的研究中的亲本标记；
- 2) 作为生产菌种：aa、核苷酸等生产菌种；
- 3) 作为aa、维生素、碱基的测定菌株。

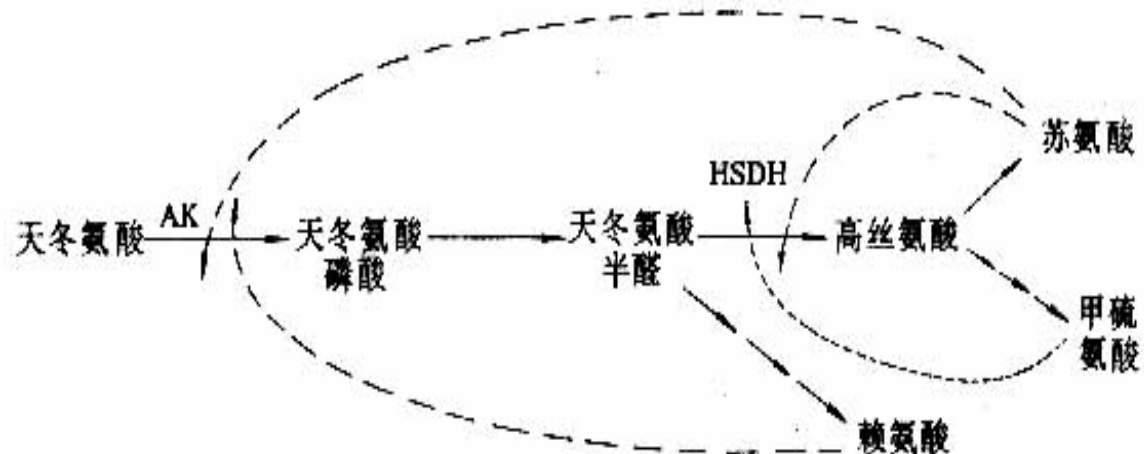


图 6-62 *Corynebacterium glutamicum* 的代谢调节与赖氨酸生产 (---→为反馈抑制,→为阻遏)

第五节 细菌基因转移和重组

第六章 真核微生物的遗传学特性

在“微生物遗传学”中学习

第七章 菌种的衰退、复壮与保藏

性状稳定的菌种是微生物学工作最重要的基本要求，
否则生产或科研都无法正常进行。

一、菌种的衰退与复壮

(一) 菌种衰退 (degeneration) :

衰退是指由于自发突变的结果, 而使某物种原有一系列生物学性状发生量变和质变的现象。

菌种衰退的特点: 大量群体中的自发突变

1. 影响微生物菌种稳定性的因素:

a) 变异;

b) 污染;

c) 死亡;

2. 防止衰退的措施

- 1) 经常进行纯种分离，并对相应的性状指标进行检查；
- 2) 减少传代次数；
- 3) 创造良好的培养条件；
- 4) 采用有效的菌种保藏方法；

（二）菌种的复壮（rejuvenation）：

1) 从衰退的菌种群体中把少数个体再找出来，重新获得具有原有典型性状的菌种。

a) 纯种分离；

b) 通过寄主体进行复壮；

2) 有意识地利用微生物会发生自发突变的特性，在日常的菌种维护工作中不断筛选“正变”个体。

二、菌种保藏

基本要求：

在一定时间内使菌种不死、不变、不乱

基本原理：

- a. 选用优良菌种
- b. 创造一个利于微生物休眠的环境条件

环境要素：干燥、低温、缺氧、缺营养

二、菌种保藏

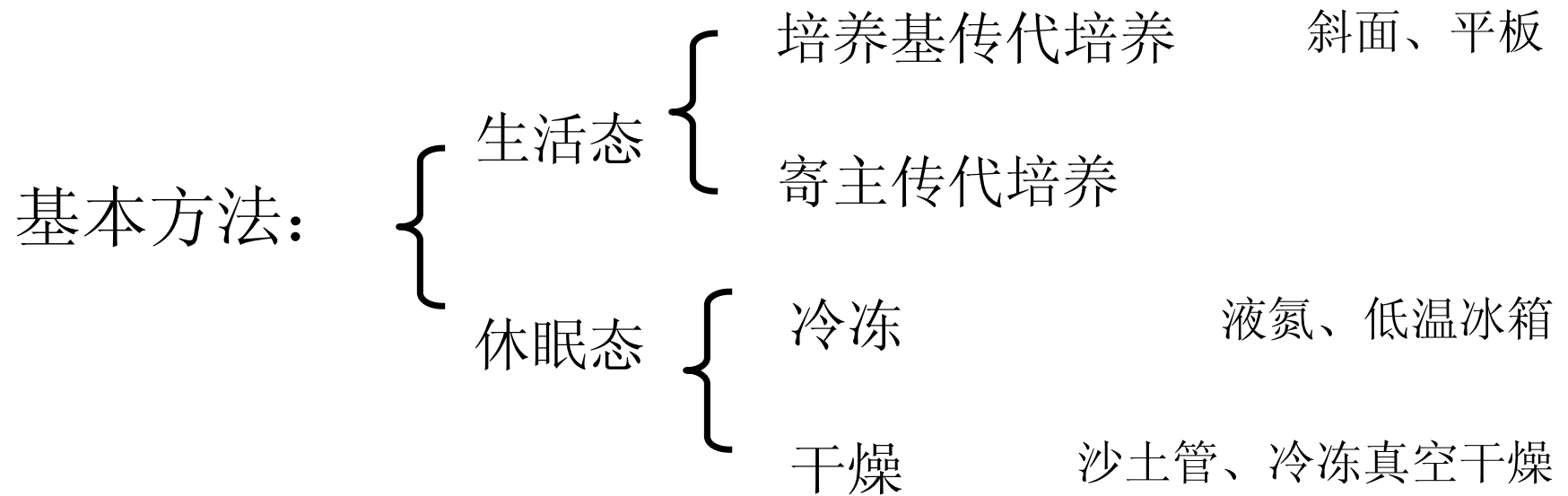


表 几种常用菌种保藏方法的比较

方法名称	主要措施	适宜菌种	保藏期	评价
冰箱保藏法（斜面）	低温（4℃）	各大类	3—6月	简便
冰箱保藏法（半固体）	低温（4℃），避氧	细菌，酵母菌	6—12月	简便
石蜡油封藏法	低温（4℃），缺氧	各大类**	1—2年	简便
砂土保藏法	干燥，无营养	产孢子的微生物	1—10年	简便有效
冷冻干燥保藏法	干燥，无氧，低温，有保护剂	各大类	5—15年以上	繁而高效
液氮保藏法	超低温（-196℃），有保护剂	各大类	15年以上	繁而高效
甘油悬液保藏法	低温（-70℃），保护剂甘油	细菌，酵母菌	约10年	较简便

*用斜面或半固体穿刺培养物均可。一般置4℃冰箱保藏。

**石油发酵微生物不适宜。