

第八章 微生物的遗传与育种

[教学目标]通过本章的教学,使学生掌握什么是遗传变异的实质?

[教学的重点和难点]基因突变与育种,基因重组与育种与基因工程的实质与关系;菌种的保藏。

[教学方法和手段]主要以讲授为主。

[教学内容]

遗传(heredity 或 inheritance)和变异(Variation)是生物体最本质的属性之一。

遗传是生物的上一代将自己的遗传因子传递给下一代的行为或功能,具有极其稳定的特性。

遗传型(genotype)是某一生物所含有的遗传信息即 DNA 中正确的核苷酸序列。生物体通过这个核苷酸序列控制蛋白质或 RNA 的合成,一旦功能性蛋白质合成,可调控基因表达。遗传型是一种内在可能性或潜力,其实质是遗传物质上所负载的特定遗传信息。具有某遗传型的生物只有在适当的环境条件下通过自身的代谢和发育,才能将它具体化,即产生表型。

遗传型+环境条件 $\xrightarrow[\text{发育}]{\text{代谢}}$ 表型

表型(phenotype)是批某一生物体所具有的一切外表特征及内在特性的总和,是遗传型在合适环境条件下的具体体现。是一种现实性。

变异是生物体在某种外因或内因作用正引起遗传物质结构改变,亦即遗传型的改变变异的特点是在群体中以极低几率(一般为 10^{-5} - 10^{-6})出现;性状变化幅度大;变化后的新性状是稳定的可遗传的。

饰变(modification)批不涉及遗传物质结构改变只发生在转录、转译水平上的表型变化。其特点是整个群体中几乎每一个体都发生变化变化的幅度小;因遗传物质不变故饰变是不遗传的。如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)在 25°C 下培养时会产生深红色的灵杆菌素,在 37°C 时不产生色素。

第一节 基因突变及修复

一、 基因突变

1、 基因突变

一个基因内部结构或 DNA 序列的任何改变,改变一对或少数几对碱基的缺失、插入或置换,而导致的遗传变化称为基因突变(gene mutation)。

DNA 序列范围的改变从单个碱基改变通常称为点突变(point mutations),到基因组大范围的重排,有时称为多位点突变,其中包括 DNA 链上短的一段序列或长的一段序列改变,从而影响许多基因。多位点突变可以是碱基序列的缺失、插入、倒位、置换(包括易位)和重复以及在基因组中发生重组或转座的结果。

2、 点突变

点突变中由一个嘌呤变为另一个嘌呤(A↔G)或一个嘧啶变为另一个嘧啶(C↔T)称为转换(transition),嘌呤变为嘧啶和嘧啶变为嘌呤称为颠换(transversions)。遗传型上一个碱基的改变在表型上的效应取决于突变的性质和在基因组点突变发生的位置,有四种点突变类型:

同义突变(same-sense mutations)由于基因密码的冗余[性];同样的氨基酸插入蛋白质,结果表型上没有看出变化。

错义突变(mis-sense mutations)是指不同的氨基酸插入蛋白质的肽链中,多肽链相应氨基酸改变的结果视蛋白质的基本部分或非基本部分改变而定。前者蛋白质功能改变或丧失,后者表型上没有观察到变化。

无义突变(nonsense mutations)是指碱基序列改变为氨基酸终止密码子(UAA, UAG、UGA)。蛋白质合成超前停止,导致一个截短的蛋白质产生。

移码突变(frameshift mutations)是 DNA 序列上缺失或插入 1-2 个核苷酸,引起从这一突变点后翻译读框移位和变成一个完全改变的氨基酸序列。

3、 条件突变型

细胞中有许多基因，其基因产物对细胞生长是必需的，如 DNA 复制所需的蛋白质。因此，在这些基因中分离突变体是不可能的，因基因产物功能完全丧失，细胞将会死亡。在这些条件下，可用条件突变型。条件突变型只在某些条件下表达，最普通的是高生长温度。温度敏感突变株在低温时为野生型表型，当转换到较高温度时，才表现出突变的表型，可用于研究基因的效应。

4、 回复突变

突变的效应可以通过许多方法回复。最简单的回复突变(back mutation)是回复到原来的碱基序列(野生型)。选择回复突变是一个阐明突变类型好的检验方法。比如原来的突变型是点突变或缺失突变，并不易发生回复突变。另一个获得野生型表型的方法是通过阻抑的机制，其中第二次突变发生在基因组的不同位点，它补偿了第一次突变的效应。第二次突变可以在基因组的不同位点突变，此情况称为校正突变(intragenic suppressor, 移码突变后阅读框架复原的补偿突变)或完全不同的基因突变，它的术语是基因间抑制((intergenic suppressor)。

5、 突变株分离

虽然细菌突变以很低的频率自然发生，但通常采用一个合适的诱变剂如紫外线，增加分离突变株的机会。鉴定突变株根据基因的特殊性质，但一般来说分成三类：

有毒化合物抗性突变株，如对抗生素或对噬菌体侵染的抗性。这些突变株能通过有毒药剂或噬菌体存在下生长来选择。只有抗性突变株才生长。

营养缺陷型突变株不能合成生长所必需的基本化合物如一个氨基酸或维生素(参见四)。这些突变株不能直接分离，但能通过下面所叙述的影印培养法(replica plating)筛选。

不能利用特殊底物如乳糖和麦芽糖生长的突变株，这些也可以通过影印培养法鉴别。

6、 影印培养法

这是用于筛选大量特殊突变菌落的一个方法。细菌铺制成平板，在所含营养成分的培养基上亲本和突变株均能生长，采用一个稀释度使单个菌落能在平板上看到；培养后，用一个无菌的丝绒布包裹的圆柱章的圆垫转移上述菌落至可以检出突变株的培养基平板上(图)。培养基的性质根据突变株的需求，在营养缺陷型突变株的情况下，可以在有特殊生长因子和没有特殊生长因子的平板上影印法转移菌落，不能合成那种生长因子的突变菌株，在基本培养基上不能生长，但能在加入已知生长因子的基本培养基上生长(加富培养基)，突变株菌落通过在基本培养基不能生长来鉴别，可以从能生长的补充培养基平板上选出和纯化。

二、 诱变

1、 自发突变

基因组中经常发生的突变似乎是随机的，虽然有突变发生特别高频率的“热点”。自发突变是由于碱基互变异构、胞嘧啶氧化脱氨基或当 DNA 在短的重重复的核苷酸序列合成瞬间位点链滑出的结果。转座因子在基因组中的移动和之间的重组，也对基因组中的突变负责。

整个基因组所有时间均可发生突变，但是一个基因组的某些位点比其他的位点更易突变。这些突变聚集的位点称为热点。一个基因的突变率是不一样的，从每 10^4 复制周期每个基因出现一个基因突变到每 10^{11} 复制周期每个基因出现一个基因突变，平均大约每 10^6 复制周期每个基因出现一个突变。

突变原因

突变可因许多原因增加，包括 DNA 复制时 DNA 聚合酶产生的误差，DNA 的物理损伤，重组和转座。然而，重要的是应意识到 DNA 受大量 DNA 修复系统保护，使其适合于突变率减至最小程度。

自发突变的一个主要原因是由于碱基存在不同的构型称为互变异构体，使形成不同的碱基对。通常以氨基式出现的腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)配对，当 DNA 复制到这一位置瞬间时转变为稀有的亚氨基式(A*) (互变异构现象，tautomerism)，则与胞嘧啶(C)碱基配对，这就意味着一个胞嘧啶(C)插入 DNA，代替胸腺嘧啶(T)。假如在下次复制周期前不被修复 A-T 碱基对将变为 C-C 碱基对。

当 DNA 复制时自发突变也能由 DNA 链在短的重重复核苷酸序列处向外环出而引起。导致插入或

缺失一小段 DNA，结果它自身对 DNA 分子造成实际的损伤。非常稀少，一个碱基可以从一个核苷酸解离的缺口上除去，称为脱嘌呤(apurinic)或脱嘧啶(apyrimidinic)位点，通常在下一次复制周期时不能碱基配对。这是胞嘧啶自然脱氨基形成尿嘧啶的一般原因。此现象被认为是 DNA 修复系统的一个错误，而尿嘧啶通过脱离一个脱嘧啶的位点而被除去。

最后，自发突变的主要原因是转座因子，它可以随机插入基因组，引起突变，而且假如有两个或多个拷贝，作为同源重组的位点，能导致基因组区段缺失、重复和倒位。

2、诱变剂

结合至 DNA 的化学和物理的诱变剂能提高诱变率。化学诱变剂作用有许多方式：

碱基类似物(base analogs) 如 5—溴尿嘧啶和 2—氨基嘌呤，当 DNA 复制时掺入 DNA 分子，类似自发突变的碱基互变异构移位，但以高频率导致突变。

(DNA 分子)嵌入剂 是扁平的三个环的类似于碱基对形状的化合物，它们能插入 DNA 分子，引起螺旋结构变形，DNA 复制时导致环出及插入和缺失碱基。溴化乙啶和丫啶橙是这类试剂的典型代表。

修饰 DN 的化学药品 是改变 DNA 中碱基的化合物，导致下一次复制周期时错误配对。例如包括将胞嘧啶转变成羟胺胞嘧啶的次黄嘌呤，它同腺嘌呤配对。

电离辐射 可能引起 DNA 损伤。实验室中常常用紫外线诱发突变，而且它的作用机制已了解很清楚。紫外线引起的主要损伤是形成嘧啶二聚体，最普通的是胸腺嘧啶二聚体，相邻碱基间引起 DNA 螺旋的扭曲畸变。它本身不是导致突变的，但突变发生在当细胞尽力修复此损伤时，用了一个倾向错误的修复系统，称作 SOS 修复系统。

当 DNA 序列已知时，体外诱变现在经常采用的办法是精确改变 DNA 序列。以化学合成的一个突变序列的拷贝代替野生型基因组的序列。

三、DNA 的修复机制

DNA 的损伤对细胞可能是致死的，已形成大量的 DNA 修复系统去修复诱变剂引起的损伤。了解最清楚的是大肠杆菌紫外线损伤修复，至少有四个不同的系统。

1、光复活

在光照下光解酶转变紫外线诱导的胸腺嘧啶二聚体返回单聚体。在依赖于光的修复机制中，光解酶与黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)能切割相邻嘧啶间的环丁烷环恢复为原来的单聚体。这是对紫外线损伤的第一线防御。

2、切补修复〔暗修复〕

为把它与光复活作用区分开，切补修复常称为暗修复。它作为许多不同类型的 DNA 损伤修复的普遍系统，如嘧啶二聚体和错误碱基配对引起的 DNA 损伤。uvrA、B 和 C 基因产物结合形成一个核酸内切酶，它能识别碱基改变所引起的 DNA 螺旋扭曲。uvrABC 内切核酸酶在损伤的任何一边作一切口，DNA 聚合酶 I 切除和替换损伤部位的碱基，DNA 连接酶将缺口填补上。

3、重组修复(复制后修复)

胸腺嘧啶二聚体不能被复制，不是在此位点阻塞，而是 DNA 聚合酶能跳过该损伤部位，沿着下面 DNA 的模板，恢复 DNA 继续合成。在新合成的 DNA 子链上二聚体对面留下一个缺口。由于需要一个完整的链作为模板，不能用切补修复来恢复。而这个缺口能由 RecA 蛋白调控的通过与母链 DNA 螺旋发生重组来填补。母链 DNA 在二聚体的对面应当含有完整的序列。尽管重组并不能修复损伤，它确创造了两个新的 DNA 分子，通过切补修复完成了修复的功能。

4、SOS 修复系统

细胞中有许多基因和操纵子受 RecA 蛋白协同调控和 LexA 蛋白阻遏转录。它涉及处理 DNA 损伤和称为 SOS 修复系统。为一个倾向差错的修复系统，该系统与 DNA 聚合酶相互作用，使之通过嘧啶二聚体继续复制 DNA。3'—5'校正读码能力的酶被抑制，结果碱基能随机插入二聚体的对面，没有精确的碱基对(参见 C2)，这个机制是紫外线所以致突变的主要原因，因为大多数的其他系统是精确

修复 DNA 的。

SOS—修复系统是由 RecA 蛋白诱导的,由于存在 DNA 损伤,RecA 蛋白构型改变显示出激活态。激活态的热 RecA 蛋白引起 LexA 蛋白被蛋白水解酶切开,结果 LexA 蛋白不再作为一个转录的阻遏物。只要细胞中存在 DNA 的损伤,SOS 修复系统的基因就能表达。一旦 DNA 损伤被消除,RecA 蛋白不再有活性,不再作为 LexA 蛋白水解诱导物,lexA 蛋白在细胞中累积,并且抑制 SOS—修复的基因转录。

第二节 微生物基因的转移和重组

一、 F 质粒与接合

1、 接合

接合(conjugation)是同通过质粒使遗传物质在两个细菌细胞间转移的机制。一个含有接合质粒(F+, 致育性)的细胞与不含有接合质粒(F-)的细胞借助于细胞表面的 F-性菌毛形成交配个体。性菌毛收缩,拉两个细胞接触,从含有质粒的细胞(供体)DNA 转移到受体。在 F 质粒上携带的 tra 基因,含有接合过程所有的信息。

2、 DNA 转移

转移的起始点在质粒 DNA 一条链的一个缺口位点称作 oriT 上, DNA 以单链形式转移,通过滚环模型形式复制。完整链作为 DNA 合成的模板,而缺口链被替代和转移进入受体细胞。一旦受体细胞中互补的 DNA 链合成,形成新的 F 因子。

3、 F' 因子

F 因子从染色体上切离是与整合相反的一个过程。通常这是一个精确切离的过程,但偶尔会出现偏差,质粒选出一段相邻的染色体形成一个 F' 因子。F' 因子可将染色体基因转移到受体细胞中。细菌遗传学,特别是在细胞中产生的部分二倍体基因,用于研究同样基因的等位基因优势/隐性间的关系。

二、 转导

1、 转导

通过噬菌体的媒介把一个细菌细胞(供体)的宿主 DNA 转移到另一个细胞(受体)的过程称为转导。

2、 普遍性转导

普遍性转导是当噬菌体装配时偶然出现的错误,是替代噬菌体 DNA 包装了一段寄主(供体)染色体 DNA 进入噬菌体头部的结果。这种“误包”的转导噬菌体,能侵染新的宿主(受体),并注入此段 DNA,非噬菌体的 DNA,除非通过重组将这段 DNA 整合到宿主(受体)染色体上,否则将丢失。

3、 局限性转导

此乃某些溶源性噬菌体整合至宿主染色体上的某段时间的特征。在转导时,代替从染色体上精确切离出原溶源性噬菌体的 DNA,而是切离了一段噬菌体临近位点上的宿主染色体 DNA。含有这段染色体 DNA 的噬菌体颗粒,将会感染受体细胞,整个噬菌体 DNA 可整合在染色体上形成溶源化,或通过重组作用与染色体 DNA 整合。

三、 转化

1、 转化

转化是从周围培养基吸收游离的 DNA 片段,整合到自己染色体基因组的结果。许多细菌如芽孢杆菌属、链球菌属、奈瑟氏球菌属和嗜血菌属(嗜血杆菌属 Haemophilus)能够自然发生转化作用。

2、 感受态

细胞吸收 DNA 进行转化的能力取决于细胞所处的特殊生理状态,称作感受态(compentence)。感受态与细胞表面存在 DNA 的受体有关。其他细菌,如大肠杆菌,在冷的条件下通过化学方法处理,可以诱导建立感受态。

3、 DNA 的吸收和命运

结合和转移进入受体细胞的 DNA 片段可以是特异的序列或者非特异的序列,其差异取决于种。

通常双链 DNA 结合，但在大多数情况下，它转变成单链 DNA 进入受体细胞。亦发现流感嗜血菌(流感杆菌或流感嗜血杆菌 *Haemophilus influenzae*)吸收完整的双链 DNA。进入的 DNA 通过重组过程整合至受体菌染色体上。

四、真核生物基因重组

丝状真菌通过准性生殖进行基因重组的。

所谓准性生殖(parasexual reproduction)是指不经过减数分裂就能导致基因重组的生殖过程。真菌菌丝通过相互接触时，通过菌丝间的连接，细胞核可混合在一起而形成异核体(时具有二种或二种以上不同基因型的核的细胞)，并可以百万分之一的概率发生核融合而形成二倍体(或杂合二倍体)。

五、微生物的育种

微生物育种的目的是为了要人为地使某种的代谢产物过量积累，把生物合成的代谢途径朝人们所希望的方向加以引导，或者使细胞内发生基因的重新组合优化遗传性状，实现人为控制微生物，获得我们所需要的高产、优质和低耗的菌种。

1、诱变育种

诱变育种是指利用各种诱变剂处理微生物细胞，提高基因的随机突变频率，通过一定的筛选方法获得所需要的高产优质菌株。

一般通过营养缺陷型突变株、抗阻遏和抗反馈突变型、抗性突变型(抗生素抗性突变株、条件抗性突变)。

2、体内基因重组育种

体内基因重组是指重组过程发生在细胞内(相对体外重组技术或基因工程技术)。

体内基因重组育种是指采用接合、转化转导和原生质体融合等遗传学方法和技术使微生物细胞内发生基因重组，以增加优良性状的组合，或导致多倍体的出现，从而获得优良菌株的一种育种方法。

原生质体融合技术是将遗传性不同的两种菌(包括种间、种内及属间)融合为一个新细胞的技术。

部分真核生物可以通过杂交育种。

3、DNA Shuffling 技术

DNA Shuffling 技术是一种人工分子进化技术。