

第八章 微生物的遗传与变异

遗传性：指生物的亲代传递给其子代一套遗传信息的特性。

基因型：指生物体所携带的全部基因的总称。

表型：指遗传特性在一定环境条件下的具体表现。

变异：指遗传型的改变，即生物遗传物质结构上发生改变。

饰变：同样遗传型的生物，在不同的外界条件下呈现不同的表型。

第一节 微生物遗传变异的物质基础

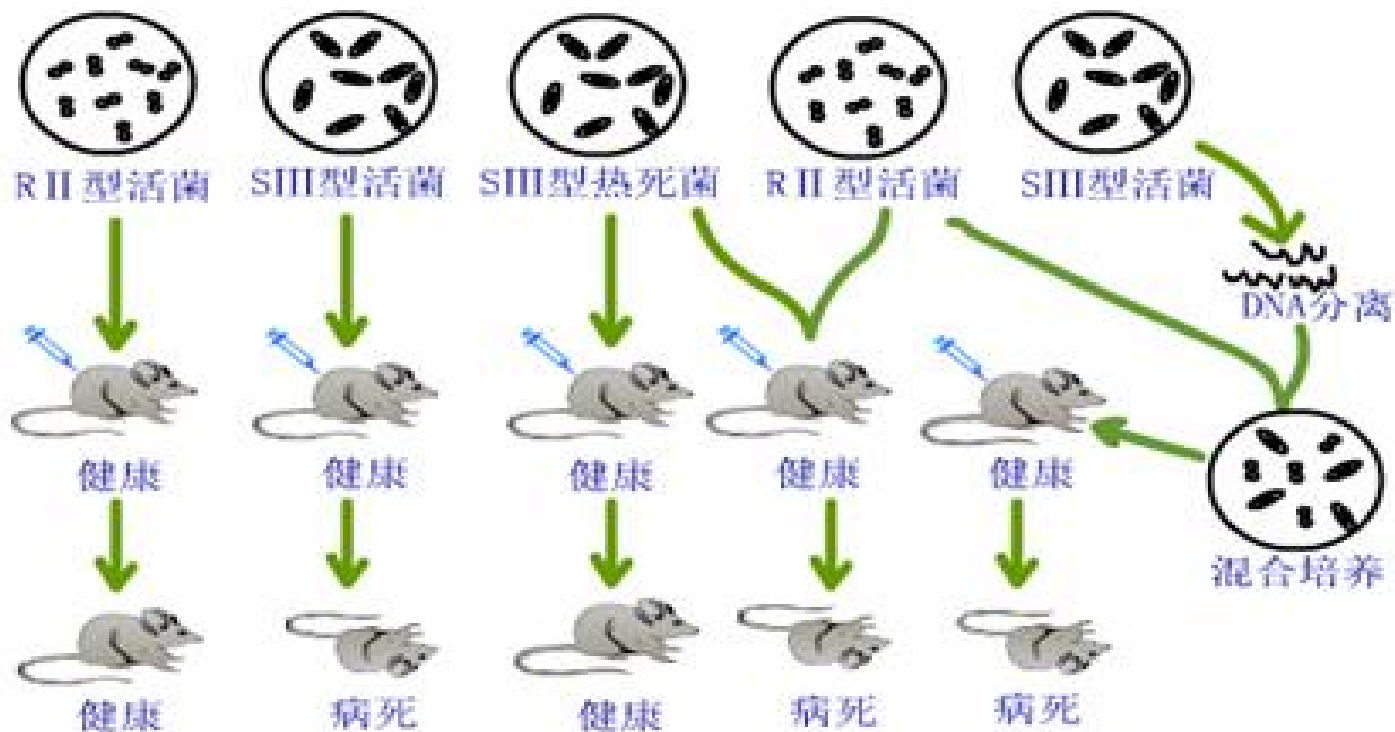
(一) 转化实验

1944年美国洛克非勒医学研究所的Avery等人证实了1928年英国人Griffith的发现，并将肺炎链球菌SIII型的DNA成功的转化无毒性的肺炎球菌R II型为有毒的肺炎球菌SIII型，第一次证明了载有肺炎链球菌SIII型荚膜遗传信息的物质是DNA。

第八章 微生物的遗传与变异

华南师范大学

生命科学学院



(二) 噬菌体的感染实验

1953年美国人Hershey和Chase用放射性同位素方法，提供了DNA是噬菌体遗传物质的直接证据。他们用含 ^{32}P 和 ^{35}S 的培养基培养大肠杆菌H，再用被标记的大肠杆菌H培养T2噬菌体，直至完全标记上 ^{32}P 和 ^{35}S 的T2噬菌体为止。用标记的T2噬菌体侵染没有标记的大肠杆菌H，结果表明，T2噬菌体外壳蛋白中有 ^{35}S 放射性并与细菌的细胞壁连接，而DNA部分则有 ^{32}P 放射性并进入细菌的细胞质中。这一事实说明，在噬菌体侵染细菌过程中蛋白质外壳留在细菌细胞外，只有DNA进入了细胞，又一次证明遗传物质是DNA，而不是蛋白质。

(三) 病毒拆开和重建实验

通过Fraenkel—Conrat等在植物病毒领域中的著名实验，证明RNA是烟草花叶病毒的遗传物质。

第二节 微生物突变

突变 (mutation) 指遗传物质——核酸 (DNA或RNA) 中的核苷酸顺序突然发生了稳定的可遗传的变化。突变包含基因突变和染色体畸变, 基因突变是由于DNA链上的一对或少数几对碱基发生改变而引起的。

一、基因突变的自发性和突变结果与原因不对应性的证明

人们通常认为，某种细菌从对药物敏感到产生抗性是由于药物长期作用于细菌的结果，但实际上，对药物的这种抗性突变与接触药物无关，即突变的性状与引起突变的原因间无直接的对应关系。后来，人们通过几个严密的科学实验后终于证明，在接触抗性因子之前便已出现了抗性菌落。最著名的实验有：变量试验、涂布试验、影印培养试验

(一) 变量试验

1943年，鲁里亚 (S. E. Luria) 和德尔波留克 (M. Delbruck) 首先设计。其要点是：先将大肠杆菌液分成等量的两部分。一部分装在大试管里，另一部分装在50支小试管里，将大小试管里的大肠杆菌放在恒温箱里培养，经过24到60小时后分别接种到固体培养基上。一只大试管分接50副培养皿，而50支小试管，每支接一副培养皿。每皿固体培养基里有等量的噬菌体，能生长的大肠杆菌是抗噬菌体的突变体。所得结果是，从一支大试管里长出来的菌落，也就是抗噬菌体的数量比较一致，即使有差异，也仅仅是实验上的误差。而由50支小试管长出来的抗噬菌体菌落，在数量上的差异较大。这说明抗噬菌体突变体是在接触噬菌体前在一次细胞分裂过程中随机自发产生的。这一自发突变发生得越早，则抗噬菌体菌落出现得越多，反之越少。抗噬菌体突变体的出现与是否接触噬菌体无关。

(二) 涂布试验

1949年Newcombe设计的试验，其要点：在12个平板上涂上数目相等的敏感于T1噬菌体的大肠杆菌，经5小时的培养，在皿上长出大量的微菌落，取其中6皿直接喷上T1噬菌体，另6皿则先用灭菌玻棒把微菌落重新均匀涂布一次后同样喷上等量的T1噬菌体，培养后发现，涂布过的一组有抗性菌落353个，比未涂布过的（仅28个菌落）高得多。这说明该抗性突变发生在未接触噬菌体前，噬菌体的加入不是诱导突变的因素。

（三）影印培养试验

所谓影印培养法，实质上是使在一系列培养皿的相同位置上能出现相同菌落的一种接种培养方法。1952年 J. Lederberg 夫妇首先进行的实验，是通过使菌不接触抗性环境而检查其抗性菌落出现的方法来证明的。方法要点是：包有灭菌丝绒布的木质圆柱（直径略小于培养皿底）为印章，用不具抗性环境（如不加抗生素等）的完全培养基进行培养，以印章轻轻粘取菌落，然后再一一接种到不同的选择培养基（如含有不同抗生素等）上，培养后，对各培养皿相同位置上的菌落作比较，便可选出相应的突变型菌落。

二、自发突变

自发突变：指微生物在没有人工参与下所发生的突变。

自发突变可能的机制：

（一）背景辐射和环境因素的诱变

例如：充满宇宙空间的各种短波辐射、高温的诱变效应以及自然界中存在的诱变物质的作用。由于长期受到原因不详的诱变因素的综合效应，便发生自发突变。

（二）微生物的代谢产物的诱变

通常存在于细胞内的天然物质，如：过氧化氢、咖啡碱、硫氰化合物、二硫化二丙烯、重氮丝氨酸等。它们既是微生物的代谢产物，又可以引起微生物的自发诱变。

（三）环出效应

在DNA复制的过程中，如果其中某一单链上偶尔产生一小环，则会因其上的基因越过复制而发生遗传缺失，从而造成自发突变。

三、诱发突变

(一) 物理因素的突变

1. 紫外线

紫外线的大剂量作用可导致菌体死亡，小剂量则可引起突变。其主要生物学效应是其对DNA的作用。其中主要机制是胸腺嘧啶二聚体的形成，它可在同一条链或两条链上发生。但发现形成的复合物暴露在可见光下，会使胸腺嘧啶二聚体重新解聚成为单体，此过程称为光复活作用。在紫外线照射进行诱变育种工作时，必须在红光下进行处理或操作，并在黑暗条件下培养，以免发生光复活作用。

2. X射线和 γ 射线

X射线和 γ 射线是不带电的光量子，不能直接引起物质电离，但在与原子或分子碰撞时，能把全部能量或部分能量传给原子而产生次级电子，这些次级电子具有很高的能量，使产生电离作用，从而直接或间接的改变DNA的结构。其直接效应是使碱基间、DNA间、糖与磷酸间相接的化学键断裂；间接效应是，电离作用引起水或有机分子产生自由基作用于DNA分子，导致缺失或损伤。

(二) 化学因素的诱变

1. 碱基结构类似物

这是一类与正常碱基结构（A、T、C、G）相似的物质，如5-溴尿嘧啶（5-BU）、5-脱氧尿嘧啶（5-dU）、8-氮鸟嘌呤（8-NG）、2-氨基嘌呤等，它们能掺入DNA分子中而不妨碍DNA的正常复制，但其发生的错误配对便可引起碱基对的置换，出现突变。这类代谢类似物只有对正常进行新陈代谢和繁殖着的微生物才起作用，而对休止细胞，游离的噬菌体粒子或离体的DNA分子却不起作用。

2. 与核酸上碱基起化学反应的诱变剂

有些化合物能与DNA分子的某些基团起化学反应，如亚硝酸可使碱基脱氨，脱去的氨基被羟基取代，从而使A、G、C分别转变成H（次黄嘌呤）、X（黄嘌呤）、U（尿嘧啶），复制时它们便与C、G、A配对。

3. 移码诱变

吡啶类化合物,如原黄素、吡啶橙、吡啶黄、 α -氨基吡啶等是一类染料,具有扁平结构,能插入到DNA分子的碱基对之间,使DNA结构变形,在复制时产生不对称交换,从而引起在DNA链中插入或缺失一个或几个核苷酸,造成这一对核苷酸以后所有密码发生移动,产生移码突变。

四、诱变育种

诱变育种是指通过人工方法处理微生物，使之发生突变，并运用合理的筛选程序和方法，把适合人类需要的优良菌株选育出来的过程。

第三节 基因重组

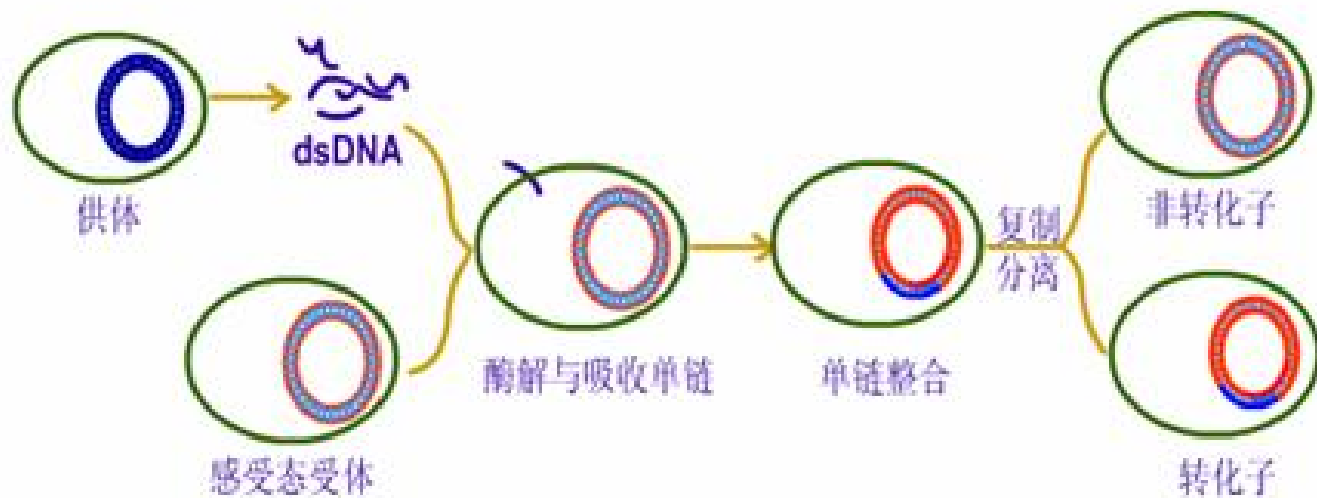
把两个不同性状的个体内的遗传基因转移到一起，经过遗传分子的重新组合，形成新遗传型个体的方式，称为基因重组（gene recombination）。

原核微生物的基因重组方式主要有转化、转导、接合等形式。

一、转化 (transformation)

受体菌直接吸收了来自供体菌的DNA片段，通过交换，把它组合到自己的基因组中，从而获得了供体菌的部分遗传性状的现象，称为转化 (transformation)。转化后的受体菌，就称转化子 (transformant)。

受体菌：只有处于感受态的细菌才能吸收外源DNA实现转化。细菌的感受态是一种生理状态，它可以通过感受态因子，一种蛋白质因子在细胞间的转移而获得；也可由某些生长条件诱导而成，如受体菌由丰富培养基转移到贫瘠培养基时约15%的枯草杆菌进入感受态。也与培养时间有关，如肺炎球菌的感受态出现在对数期后的40min。



转化过程示意图

二、转导 (transduction)

通过完全缺陷或部分缺陷噬菌体为媒介，把一个细胞（供体细胞）的DNA片段转移到另一个细胞（受体细胞）中，并使后者发生遗传变异的过程，称为转导 (transduction)。通过转导获得部分供体细胞部分遗传性状的重组受体细胞，称为转导子。携带供体部分遗传物质（DNA片段）的噬菌体称为转导噬菌体或转导颗粒。在噬菌体内仅含有供体DNA的称为完全缺陷噬菌体；在噬菌体内同时含有供体DNA和噬菌体DNA的称为部分缺陷噬菌体（部分噬菌体DNA被供体DNA所替换）。

三、接合 (conjugation)

通过供体菌和受体菌完整细胞间的直接接触而传递大段DNA的过程，称为接合 (conjugation)。

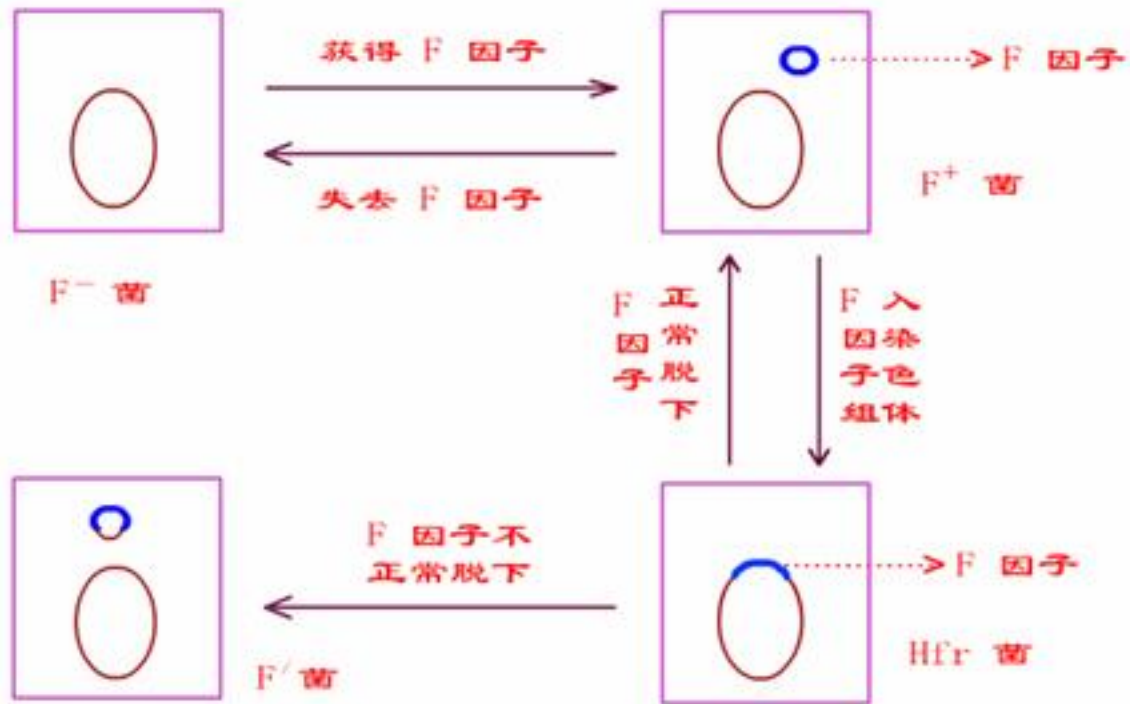
接合菌株与F因子

在细菌中，接合现象研究的最清楚的是大肠杆菌。大肠杆菌有性别分化。决定其性别的因子是F因子（即致育因子或称性质粒），这是一种在染色体外的小型独立环状DNA单位。F因子是一种属于附加体 (episome) 的质粒，它既可脱离染色体在细胞内独立存在，也可插入（即整合）到染色体组上。由于F因子在细胞中的有无和存在方式的不同，可把大肠杆菌分成4种接合类型：F⁺（雄性菌株）、F⁻（雌性菌株）、Hfr（高频重组菌株），F'菌株。

第八章 微生物的遗传与变异

华南师范大学

生命科学学院



F因子的存在和转移方式

(三) 几种杂交结果

- 1、F⁺菌株和F⁻菌株接合的结果是产生二个F⁺菌株。
- 2、F' 菌株和F⁻菌株接合的结果是产生二个F' 菌株。
- 3、Hfr菌株和F⁻菌株接合，在大多数的情况下，受体细菌仍然是F⁻，只有在极少数的情况下，由于遗传物质转移完整，受体细菌才能成为Hfr菌株。

第四节 基因工程

基因工程 (gene engineering) 指基因水平上的遗传工程, 它是用人为方法将所需要的某一供体生物的遗传物质 (DNA大分子) 提取出来, 在离体条件下进行切割后, 把它和作为载体的DNA分子连接起来, 然后导入某一受体细胞中, 以让外来的遗传物质在其中“安家落户”, 进行正常的复制和表达, 从而获得新的物种的一种崭新的育种技术。

一、基因分离

1、提取供体细胞的DNA，加入专一性很强的限制性核酸内切酶，从而获得带有特定基因并露出称为黏性末端的DNA。

2、提供作为载体的细菌质粒（也可用噬菌体或病毒作载体）。其中DNA也可用同样的限制性核酸内切酶切断，露出其相应的黏接末端。

二、体外重组

把供体细胞的DNA片段和质粒DNA片段放在试管中，在较低的温度（5~6℃）下混合“退火”，当两者混合在一起时，凡粘接末端上碱基互补的片段，就会因氢键的作用而彼此吸引，重新形成双键。这时，在外加连接酶的作用下，供体DNA片段与质粒DNA片段的裂口处被“缝合”，形成一个完整的有复制能力的环状重组体，及“杂种质粒”。

三、载体传递

通过载体把供体的遗传基因导入受体细胞内。载体必须具有自主复制的能力。

四、复制表达

“杂种质粒”进入受体细胞后，能通过自主复制而得到扩增，并使受体细胞表达出为供体细胞所固有的部分遗传性状，成为“工程菌”。

五、筛选、繁殖

重组后的“杂种质粒”的性状是否符合原定“蓝图”，以及它能否在受体细胞内正常增殖和表达等还需要经过仔细检查，以便能在大量个体中设法筛选出所需要性状的个体，然后才可加以繁殖和利用。

第五节 菌种退化、复壮和保藏

在微生物的研究中，要保持一个优良菌株的遗传稳定性是一件艰苦的工作。菌种退化就是一种潜在的威胁。

一、菌种退化现象

菌种退化 (degeneration) 指群体中退化细胞在数量上占一定数值后, 表现出菌种生产性能下降的现象。常表现为, 在形态上的分生孢子减少或颜色改变, 甚至变形; 在生理上常指产量的下降。

二、退化菌种的复壮

因为在退化的菌种中仍有一些保持原有菌种特性的细胞，故有可能采取一些相应措施，使这些细胞生长、繁殖，以更新退化的菌株，称之为菌种的复壮。常用的方法是单细胞分离、纯化、扩大培养。

三、菌种的保藏

经诱变筛选、分离纯化以及纯培养等一系列艰苦劳动得到的优良菌株，能使其稳定的保存、保持原有的特性、不死亡、不污染，这就是菌种保藏的任务。

(一) 原理

人为地创造合适的环境条件，使微生物的代谢处于不活泼、生长繁殖受抑制的休眠状态。这些人工环境主要从低温、干燥、缺氧三方面设计。

(二) 常用方法

1、斜面保藏法

将菌种接种在斜面培养基上，待菌种生长完全后，置于4℃冰箱中保藏，每隔一定时间再转接到新的斜面培养基上，生长后继续保藏。此方法简单、存活率高，故应用较普遍。其缺点是菌株仍有一定的代谢强度，传代多则菌种易变异，故不宜长时间保藏菌种。

2、液体石蜡覆盖保藏法

为了防止传代培养菌因干燥而死亡，也为限制氧的供应以削弱代谢水平，在斜面或穿刺的培养基中覆盖灭菌的液体石蜡。本法的优点是方法简单不需特殊装置。

3、载体保藏法

使微生物吸附在适当的载体上（土壤、沙子等）进行干燥保存的方法。最常用的有土壤保藏法。主要用于能形成孢子或孢子囊的微生物的保存。此方法简便，保藏时间长，微生物转接也较方便，故应用范围较广。

4、悬液保藏法

使微生物混悬于适当媒液中加以保藏的方法，其中蒸馏水保藏法较为常用。酵母菌、霉菌和放线菌的大部分均适用此法保存。操作方法简便。

5、寄主保藏法

某些微生物只能寄生在活着的动物、植物或细菌中才能繁殖传代，故可针对寄主细胞或细胞的特性进行保存。如噬菌体可以经过细菌培养扩大后，与培养基混合直接保存。

6、冷冻干燥保藏法

这是最佳的微生物保存法之一，保存时间长。低温冷冻可以用普通 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或更低的 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱，用液氮（ $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）更好。但是手续麻烦，需要高价设备，存活率低。

7、液氮保藏法

将菌种通过预冻后放在超低温（ $-196\sim-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）的液氮中长期保藏的方法。但必须将菌液悬浮于低温保护剂（如甘油、脱脂牛奶等）中，并须控制致冷速度进行预冻，以减少超低温对细胞造成的损伤。



谢谢!