

第七章 微生物遗传变异和育种

遗传：指上一代生物如何将自身的一整套遗传基因稳定地传递给下一代的行为。

变异：指生物体在某种外因或内因的作用下所引起的遗传物质结构或数量的改变，亦即遗传型的改变。

第一节 遗传变异的物质基础

一. 3个经典实验

(一) 经典转化实验

1928年英国细菌学家F. Griffith做如下实验

研究对象: *Streptococcus pneumoniae* (肺炎链球菌)

S型菌株: 有荚膜, 菌落表面光滑, 有致病性

R型菌株: 无荚膜, 菌落表面粗糙, 无致病性

●动物试验

对小鼠注射活R菌或死S菌 ——小鼠存活

对小鼠注射活S菌——小鼠死亡

对小鼠注射活R菌和死S菌 ——小鼠死亡

↓
抽取心血可分离到活的S菌

● 细菌培养试验

死S菌——不生长

活 R 菌——长出R菌

死S菌和活 R 菌——长出大量R菌和少量S菌

● S型菌的无细胞抽提液试验

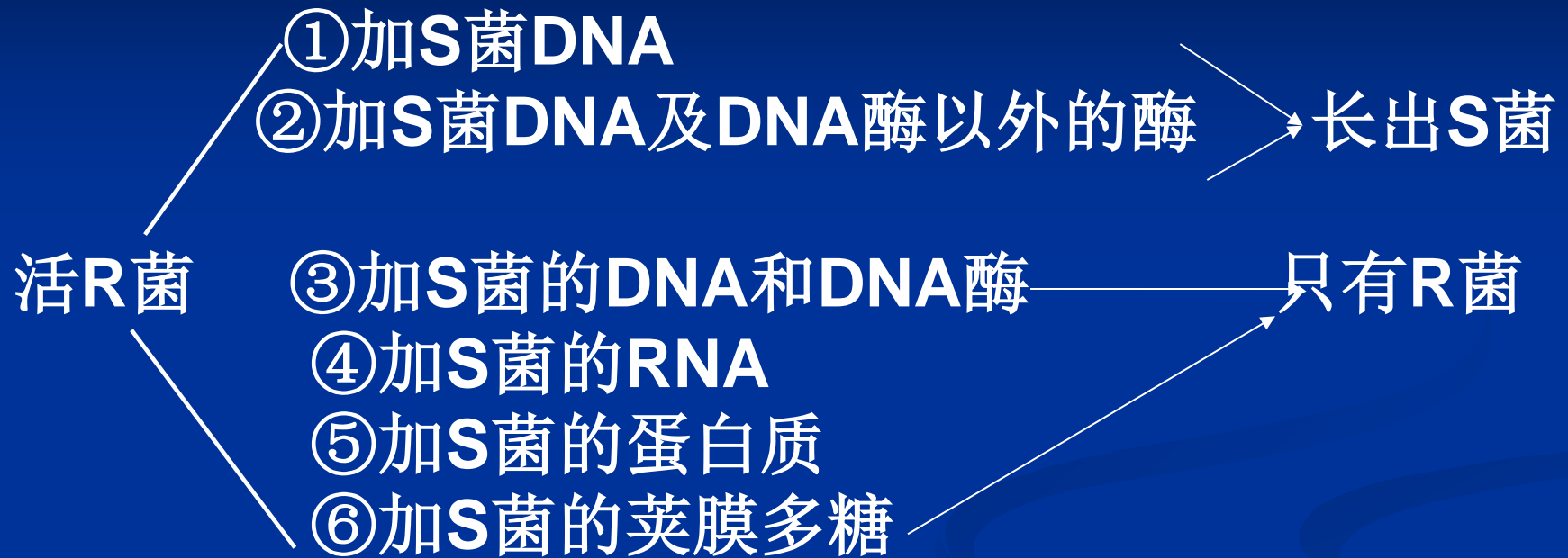
活R菌+S菌无细胞抽提液——长出大量R菌和少量S菌

●

Griffith认为：活的、非致病的R菌株从死亡的S菌株中获得了遗传物质，使其转化成能致病的S菌。

Griffith将这种现象称为转化，将引起转化的物质称为转化因子。

1944年Avery等人证明转化因子是DNA.



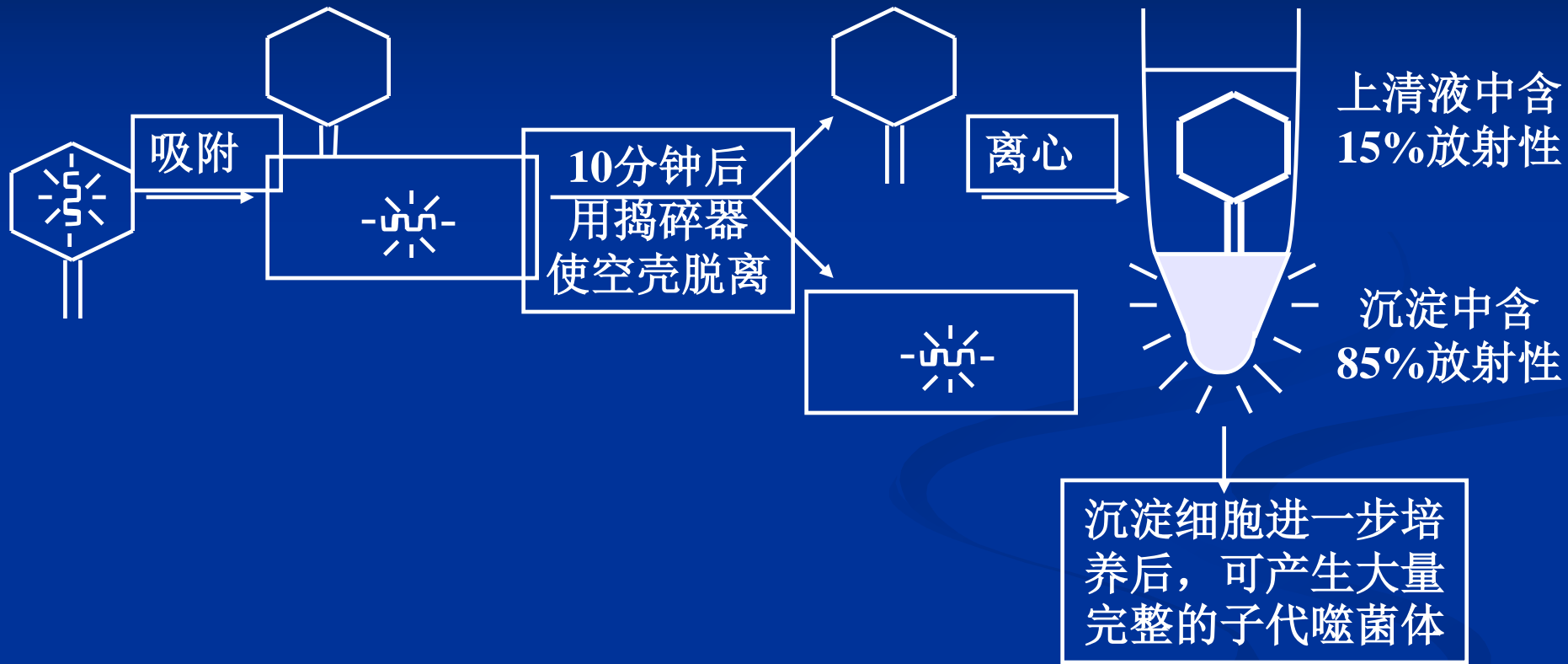
只有S型细菌的DNA才能将*S. pneumoniae*的R型转化为S型。且DNA纯度越高，转化效率也越高。说明S型菌株转移给R型菌株的DNA是遗传物质。

(二)、噬菌体感染实验

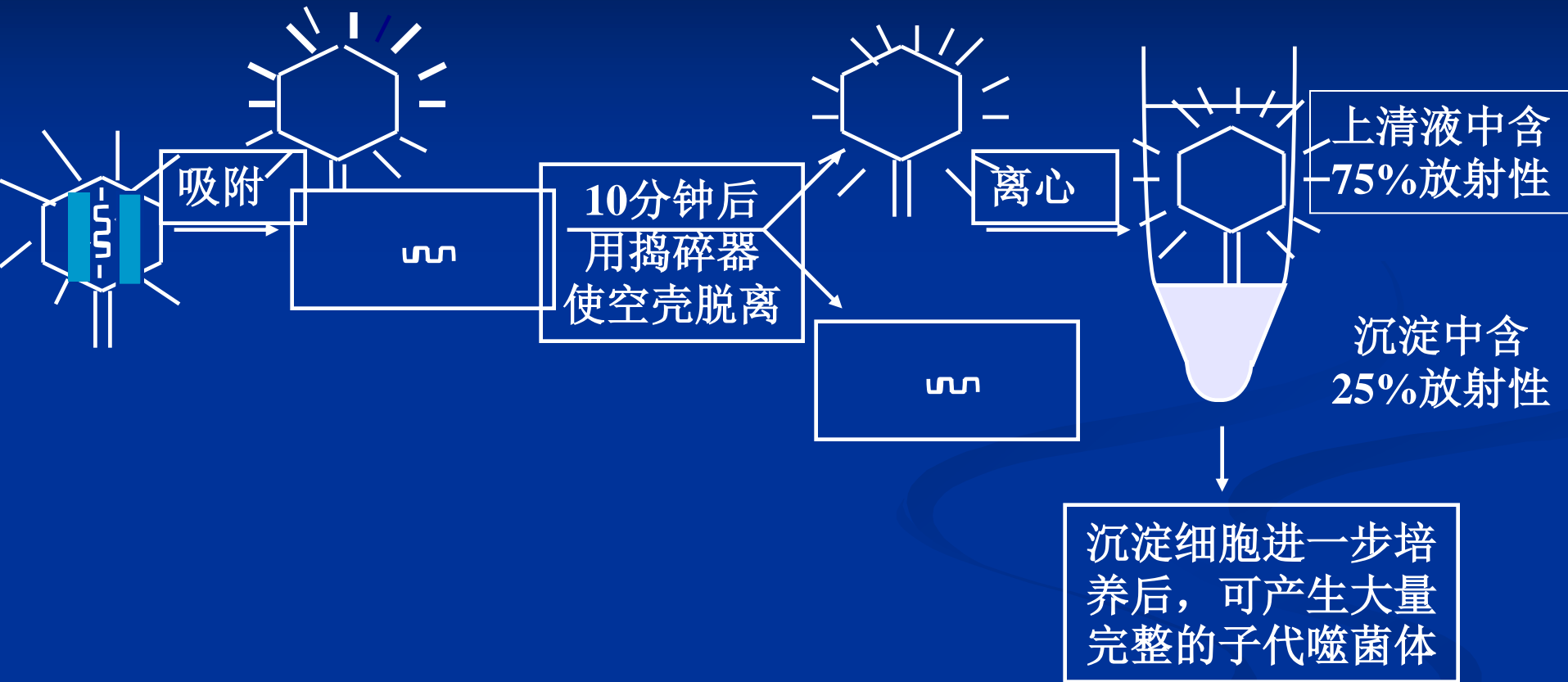
(1952年A.D.Hershey和 M.Chase)

T₂噬菌体是感染大肠杆菌的一种噬菌体，由蛋白质外壳和DNA核心组成。蛋白质不含磷，DNA不含硫，用³²P和³⁵S分别标记T₂噬菌体DNA和蛋白质。

以 ^{32}P 标记DNA做噬菌体感染实验



以 ^{35}S 标记蛋白质外壳做噬菌体感染实验



转化实验中核酸是抽提而来，T2噬菌体感染大肠杆菌时，蛋白质与核酸是自然分离，在电镜下也观察到，T2噬菌体感染大肠杆菌时，衣壳留在胞外，只有核酸进入，从而证明遗传物质是DNA。

(三)、植物病毒重建实验

(1956年 H. Fraenkel-Conrat)

TMV: 烟草花叶病毒 (RNA病毒)

HRV: 霍氏车前花叶病毒 (RNA病毒) 

证明: 遗传物质是RNA 

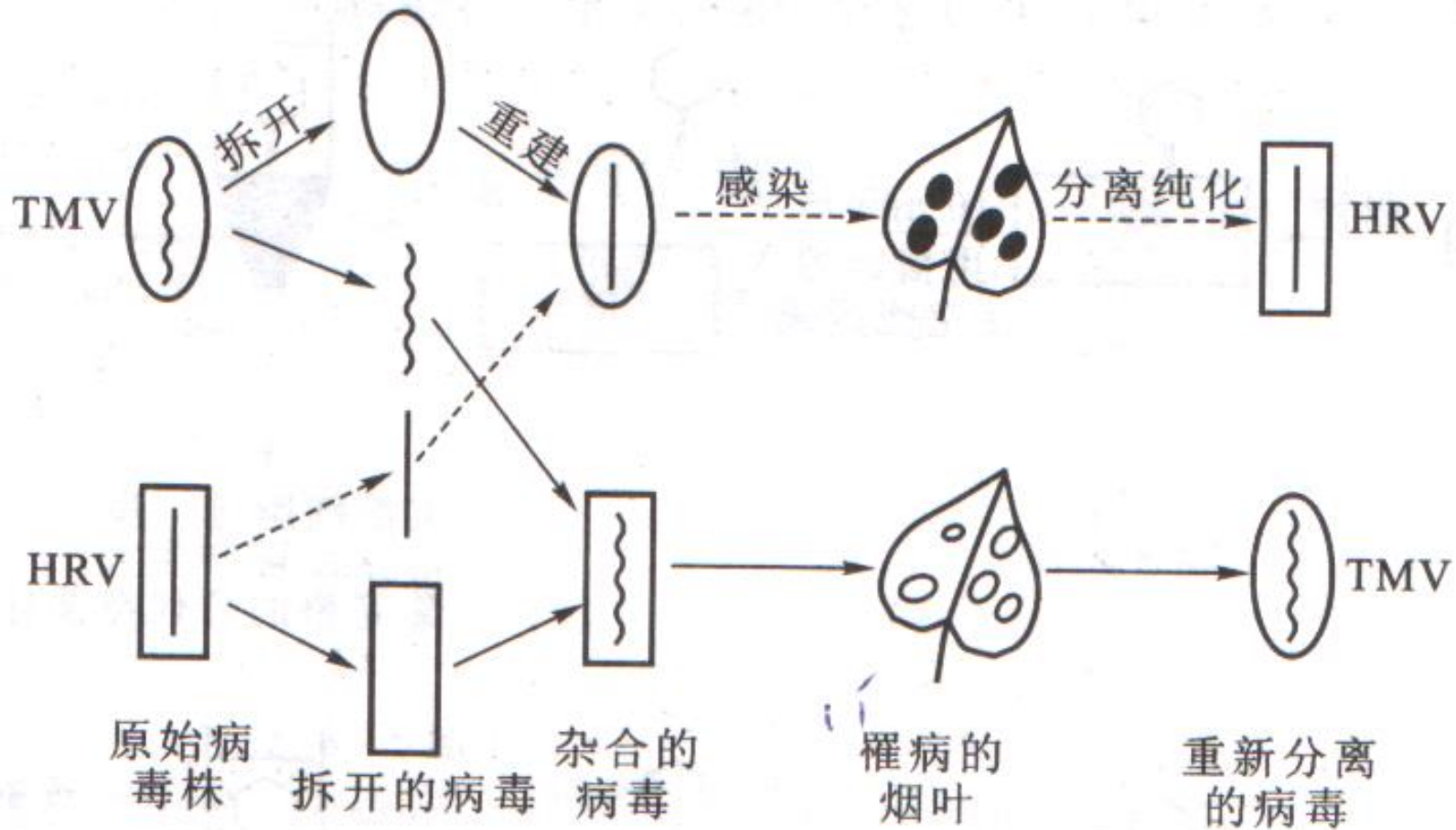


图 7-2 TMV 重建实验示意图
 实与虚的粗线箭头表示遗传信息的去向

第二节 基因突变和诱变育种

一. 基因突变（突变）

定义：指细胞内（或病毒粒内）遗传物质的分子结构或数量突然发生的可遗传的变化。

野生型菌株：从自然界分离到的菌株。

突变株：野生型经突变后形成的带新性状的菌株。

(一) . 突变类型



(二)、突变率

定义：某一细胞或病毒粒在每一世代中发生某一性状突变的几率。

另一种表示法：可用某一单位群体在每一世代（分裂一次）中产生突变株的数目来表示。

(三)、基因突变的特点：

- 1、自发性
- 2、不对应性
- 3、稀有性：突变率为 10^{-6} — 10^{-9}
- 4、独立性：某基因的突变率不受其它基因突变的影响。
- 5、可诱变性：突变频率可因诱变剂的影响而大大提高。
- 6、稳定性：基因突变后的新遗传性状是稳定的
- 7、可逆性：野生型 \longleftrightarrow 营养缺陷型

（四）、基因突变自发性和不对应性的实验证明

产生突变的原因有两种学说：定向突变
自发突变

1、卢里亚（S.E.Luria）和德尔布吕克（M.Delbruck）
的变量试验（波动试验）

1943年两学者根据统计学原理设计的。

对T1敏感的大肠杆菌

涂有T1 →

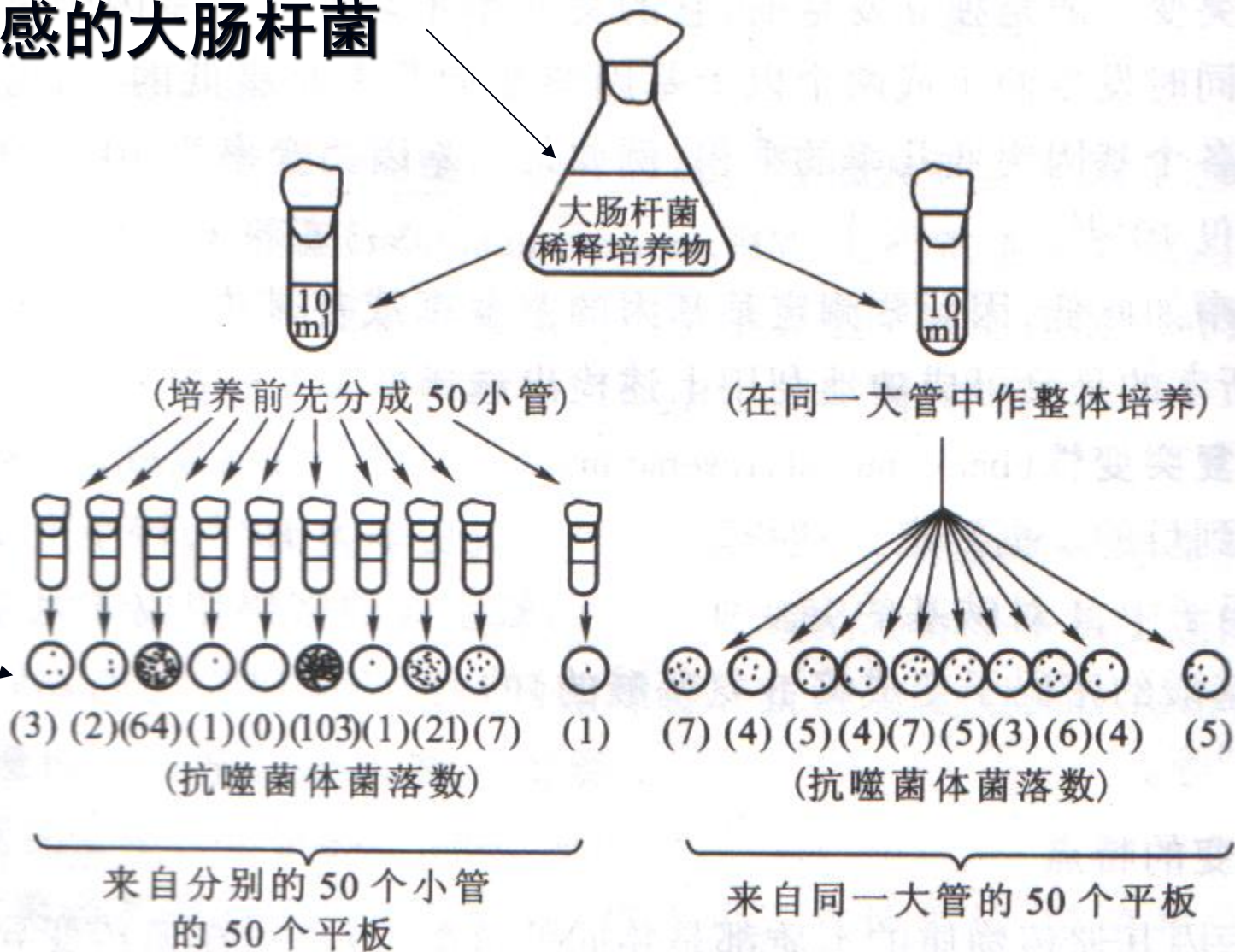


图 7-6 Luria 等的变量试验

抗T1噬菌体的大肠杆菌的波动试验

表8.1

培养皿编号	抗 T1 噬菌体菌落个数		培养皿编号	抗 T1 噬菌体菌落个数	
	不同小试管	大试管重复		不同小试管	大试管重复
1	1	14	12	0	15
2	0	15	13	0	13
3	3	13	14	0	21
4	0	21	15	1	15
5	0	15	16	0	14
6	5	14	17	0	26
7	0	26	18	64	16
8	5	16	19	0	20
9	0	20	20	35	13
10	6	13	平均数	11.4	16.7
11	107	14	方差	694	15

实验结果分析：大肠杆菌抗噬菌体性状的产生，并非由所抗的环境因素（噬菌体）诱导出来的，而是在它接触噬菌体前，在某次细胞分裂过程中自发产生的。这一自发突变发生得越早，抗性菌落出现得就越多，反之则越少。噬菌体在这里仅起着淘汰原始未突变菌株和鉴定抗性突变型的作用，而决非‘驯养者’的作用。

2、Newcombe的涂布试验（1949年在《自然》上发表）

实验结果：涂布过的一组中，共有抗性菌落353个，未涂布过的一组中仅有28个抗性菌落。

实验结果分析：对噬菌体的抗性发生在与噬菌体接触之前，噬菌体只起到鉴别细菌自发突变是否发生，而不是诱变因素。



自发突变

定向突变

获得无反应菌株

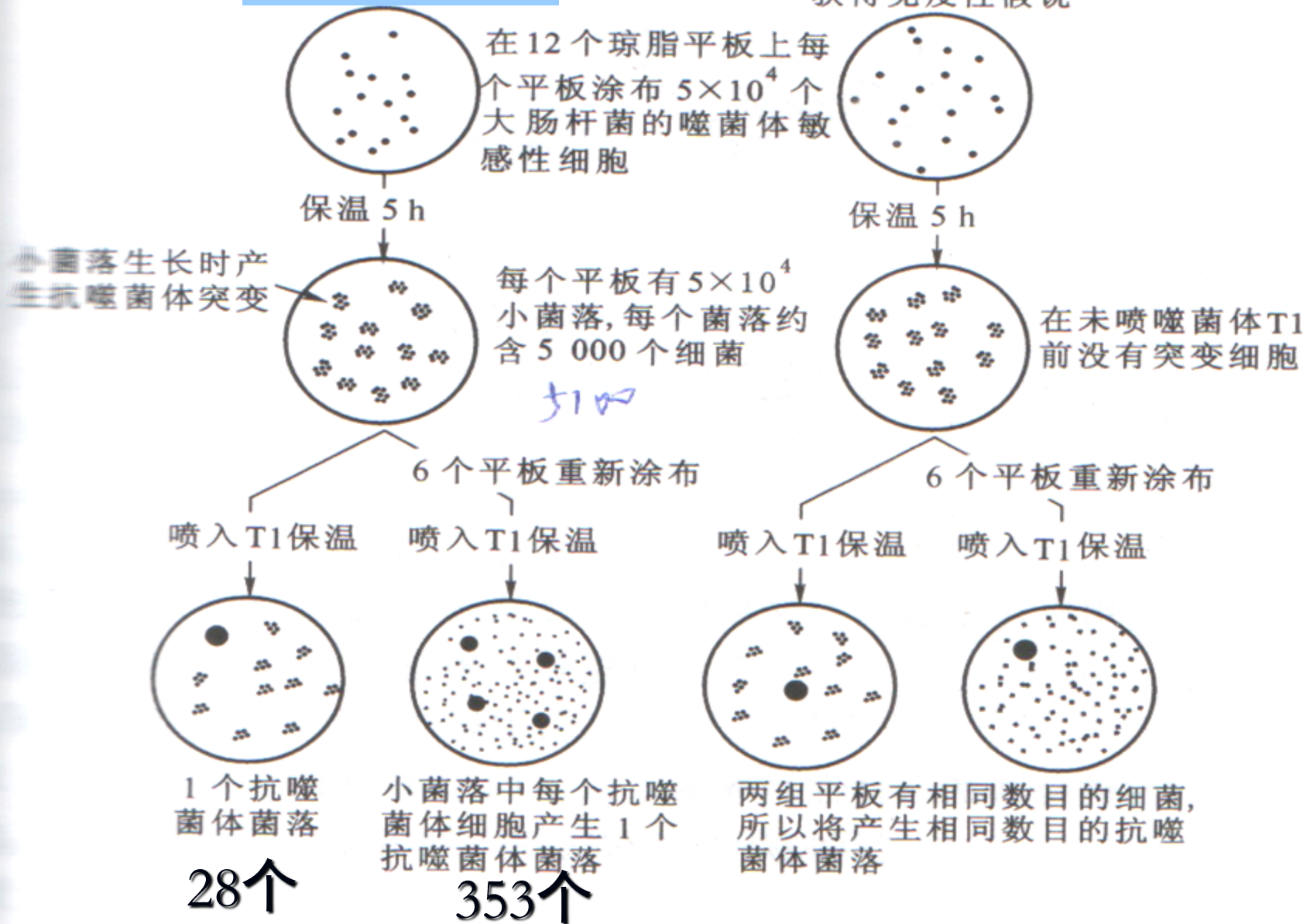


图 7-7 Newcombe 的涂布试验

3、莱德伯格（Lederberg）等的影印平板法

1952年莱德伯格夫妇发明的 

实验结果分析：

细菌对链霉素的抗性突变是在接触链霉素之前产生的，链霉素也只起到鉴别抗链霉素变异的作用。 

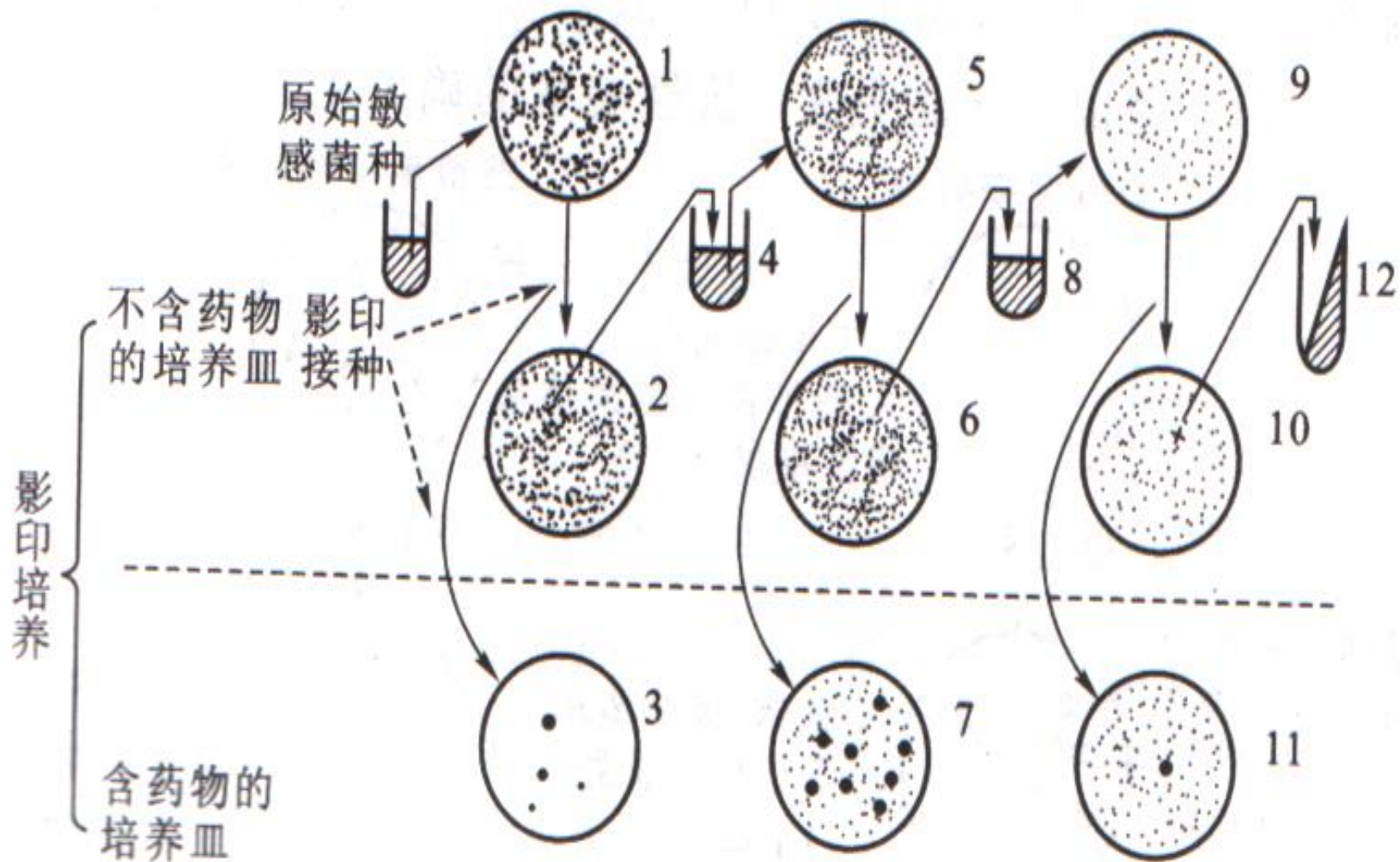


图 7-8 Lederberg 的影印平板培养法

第三节 基因重组和杂交育种

基因重组：是指两个独立基因组内的遗传基因，通过一定的途径转移到一起，形成新的稳定基因组的过程。

原核生物基因重组方式：

转化、转导、接合、质生质体融合

一、原核生物的基因重组

(一)、转化

1、定义

转化：受体菌直接吸收供体菌的DNA片段而获得后者部分遗传性状的现象。

转化子：通过转化方式而形成的杂种后代。

2、转化微生物的种类：

原核---肺炎链球菌；嗜血杆菌属；芽孢杆菌属；根瘤菌属等

真核---酿酒酵母；黑曲霉等

3、感受态：是指受体细胞最易接受外源DNA片段并能实现转化的一种生理状态。

4、转化因子：是离体的DNA片段。

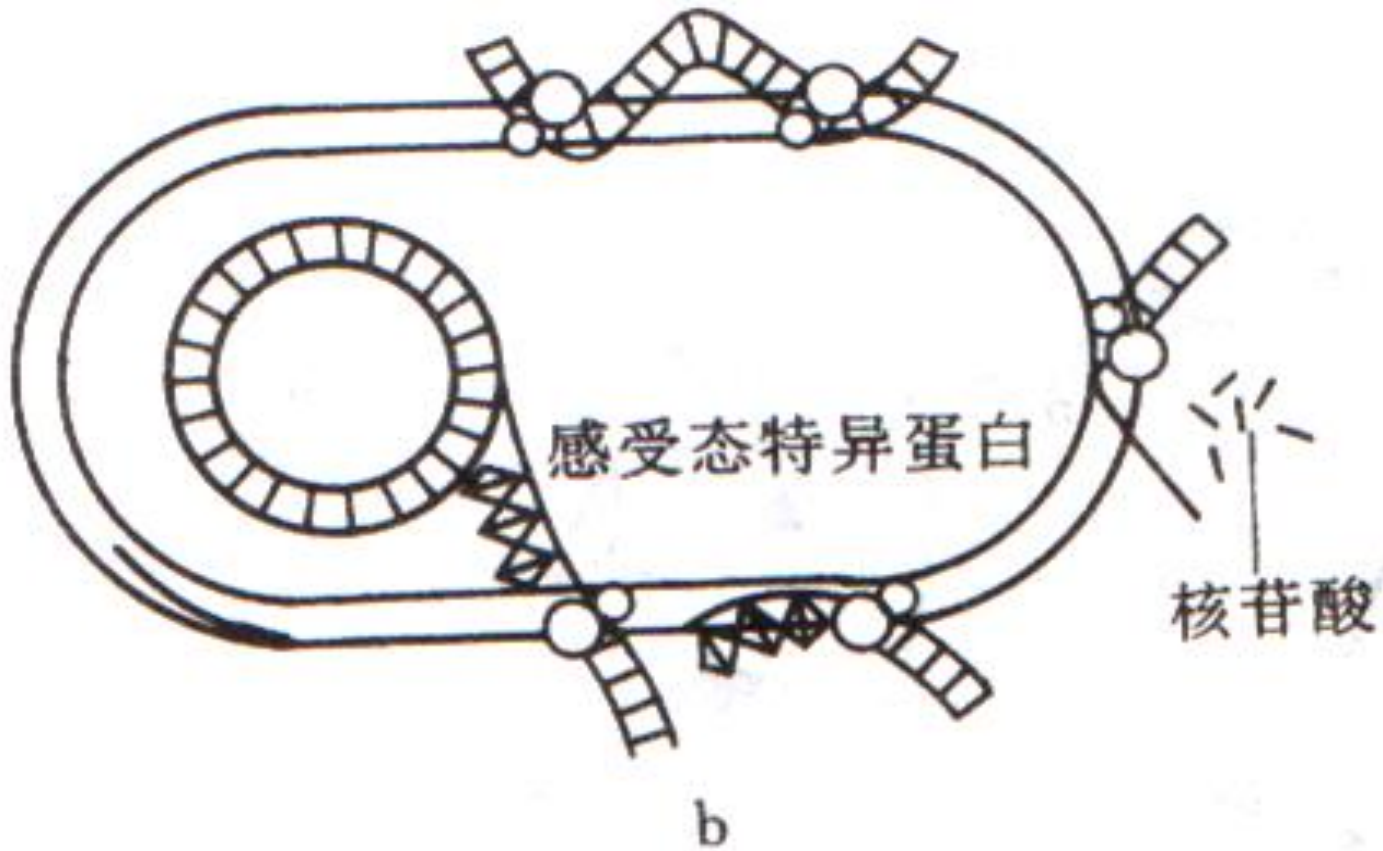
最易与受体细胞表面结合的是dsDNA。

5、转化过程：

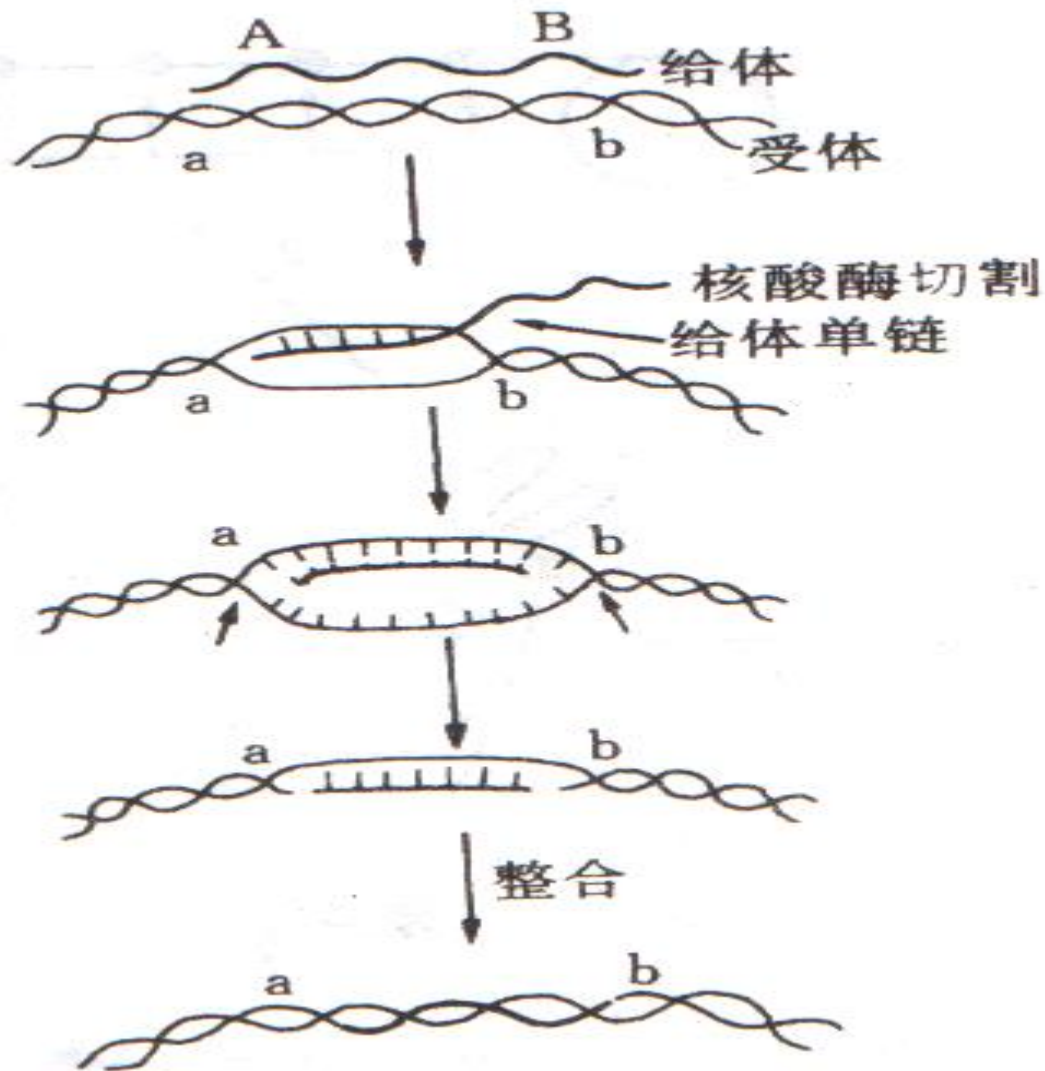
供体菌提供的dsDNA与感受态受体菌细胞表面的DNA结合蛋白结合 → 其中一条链被核酸酶降解，另一条进入细胞 → 来自供体的ssDNA与细胞内特异性蛋白RecA结合 → ssDNA与受体菌核染色体的同源区配对、重组，形成了一小段杂合DNA → 受体染色体复制，杂合区也复制
细胞分裂后形成一个转化子



双链DNA的结合和进入



DNA的整合



(二)、转导

转导：通过缺陷噬菌体的媒介，把供体细胞的小片段DNA携带到受体细胞中，通过交换与整合，使后者获得前者部分遗传性状的现象。

缺陷噬菌体：在噬菌体内仅含有供体DNA或在噬菌体内同时含有供体DNA和噬菌体DNA的称为缺陷噬菌体。

(前者为完全缺陷噬菌体；后者为部分缺陷噬菌体)

转导子：由转导作用而获得部分新性状的重组细胞。

1、普遍转导：通过极少数完全缺陷噬菌体对供体菌基因组上任何小片段DNA进行“误包”，而将其遗传性状传递给受体菌的现象。

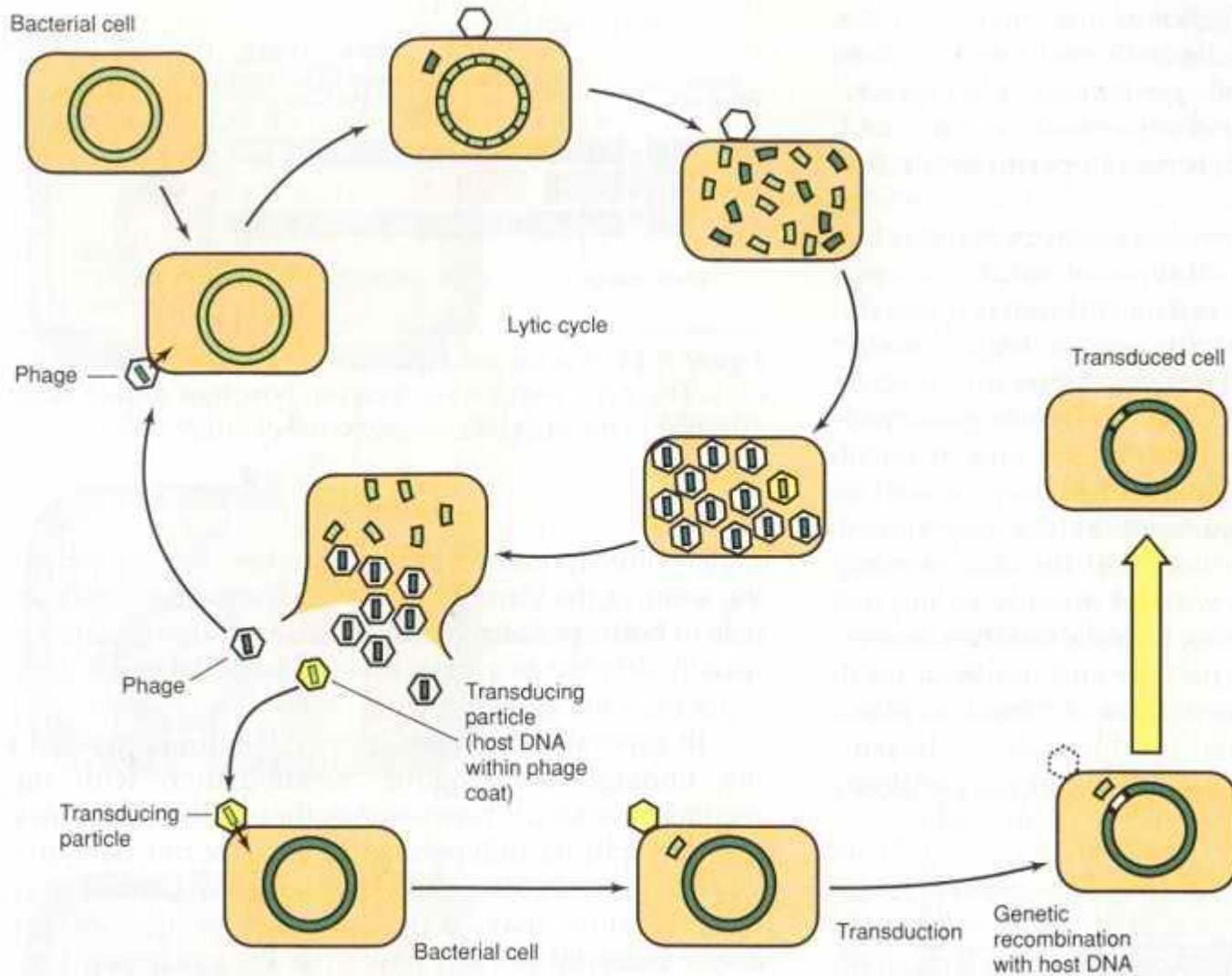


Figure 9.16 Generalized transduction: the process by which virus (phage) particles containing host DNA can be formed.

普遍转导的转导过程

完全缺陷噬菌体：噬菌体在组装时，蛋白质外壳内的DNA不是噬菌体基因组，而是同等大小的宿主染色体的DNA片段，这种噬菌体称为完全缺陷噬菌体。

（大肠杆菌的噬菌体P1能包裹宿主染色体基因组的2%；伤寒沙门菌的噬菌体P22能包裹宿主染色体基因组的1%）

2、局限性转导：通过部分缺陷的温和噬菌体把供体菌的少数特定基因携带到受体菌中，并与后者的基因组整合、重组，形成转导子的现象。

局限性转导

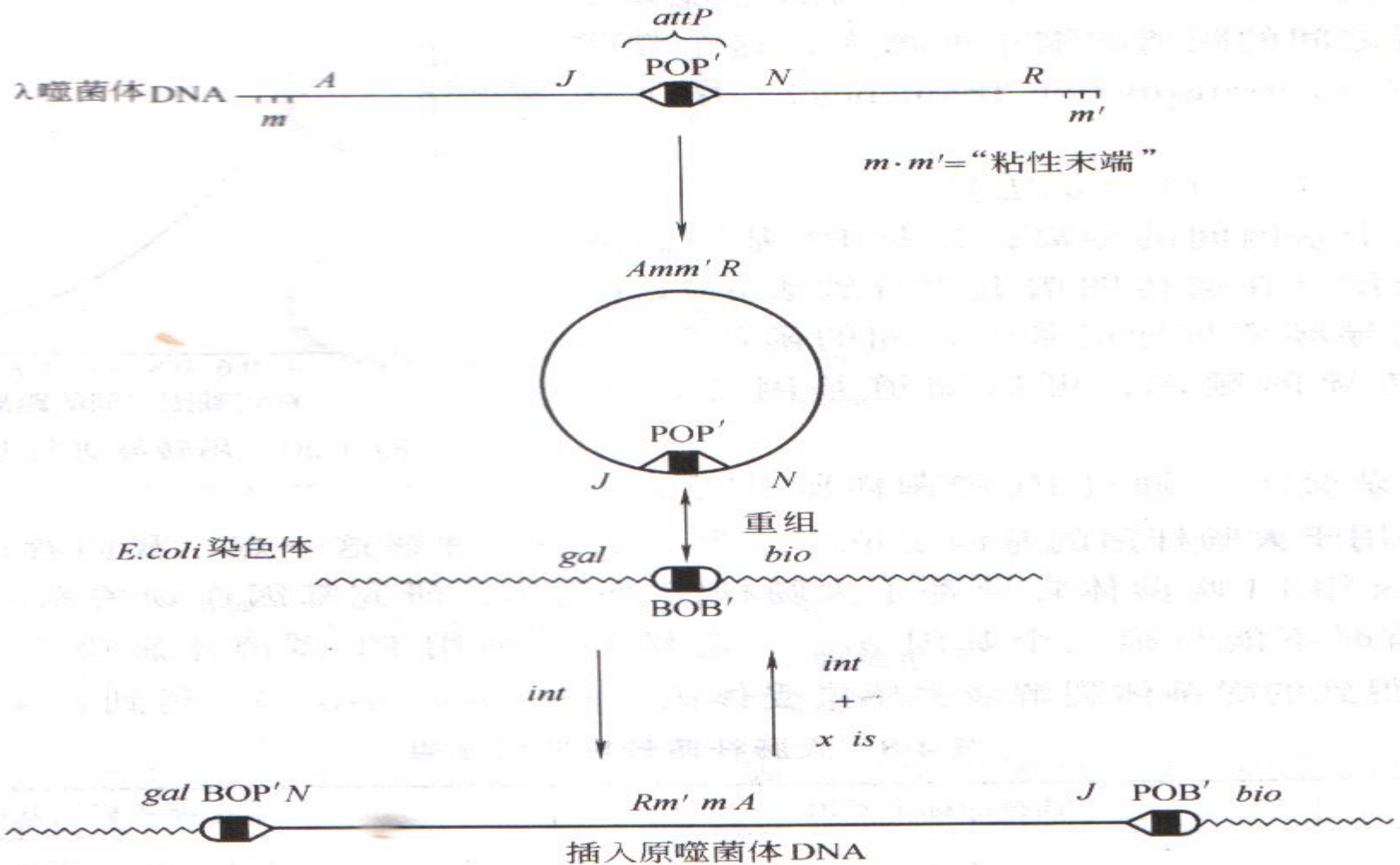


图 4-21 λ噬菌体的可逆性整合和切离

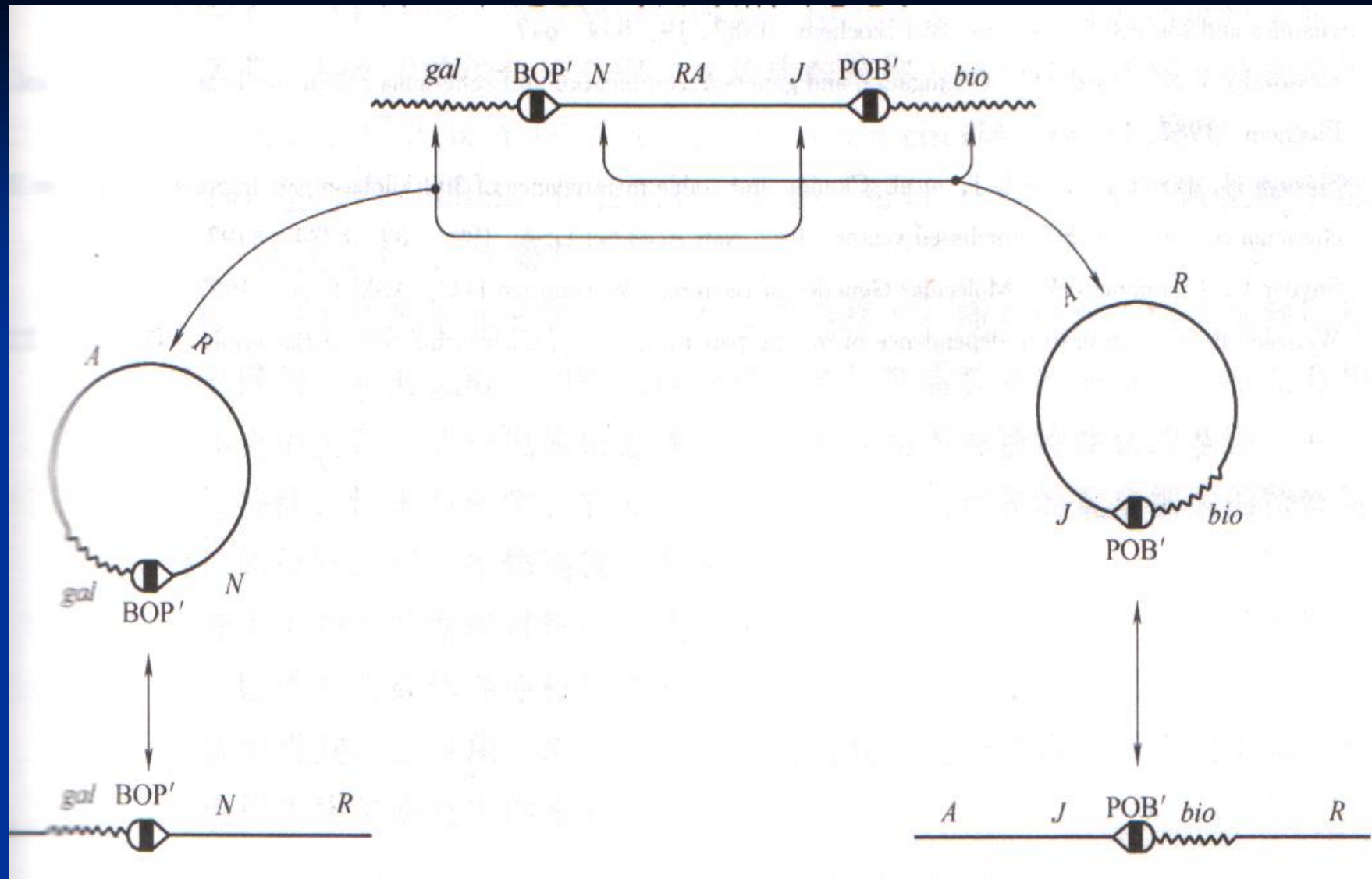


图 4-22 异常交换和切离产生的不同转导噬菌体

原噬菌体：整合到宿主染色体上的噬菌体。

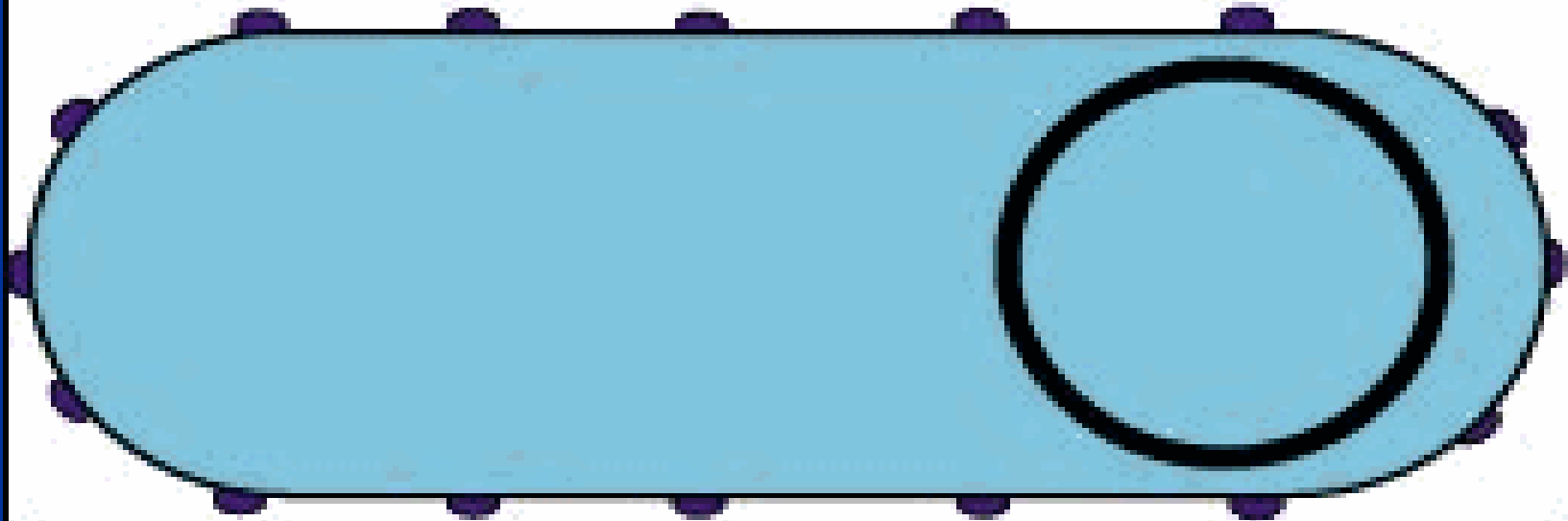
温和噬菌体的存在形式：游离态；整合态；
营养态； 

部分缺陷噬菌体：噬菌体基因组因携带有宿主染色体部分基因，导致自己一部分基因丢失，从而失去某些功能，而不能成为正常噬菌体。

表示方法： λ dgal⁺



ADSORPTION



比较普遍转导与局限转导的异同

相同点：都是以噬菌体为媒介，将供体菌DNA转移到受体菌中的转导现象。

不同点：普遍转导：是通过完全缺陷噬菌体为媒介，将供体菌的任何DNA片段转移到受体菌中而实现转导。

局限转导：是通过部分缺陷噬菌体为媒介，将供体菌的特定DNA片段转移到受体菌中，并实现表达的现象。

(三)、接合

1、定义：供体菌（“雄性”）通过性菌毛与受体菌（“雌性”）直接接触，把F质粒或其携带的不同长度的核基因组片段传递给后者，使后者获得若干新遗传性状的现象。

接合子：通过接合而获得新遗传性状的受体细胞。

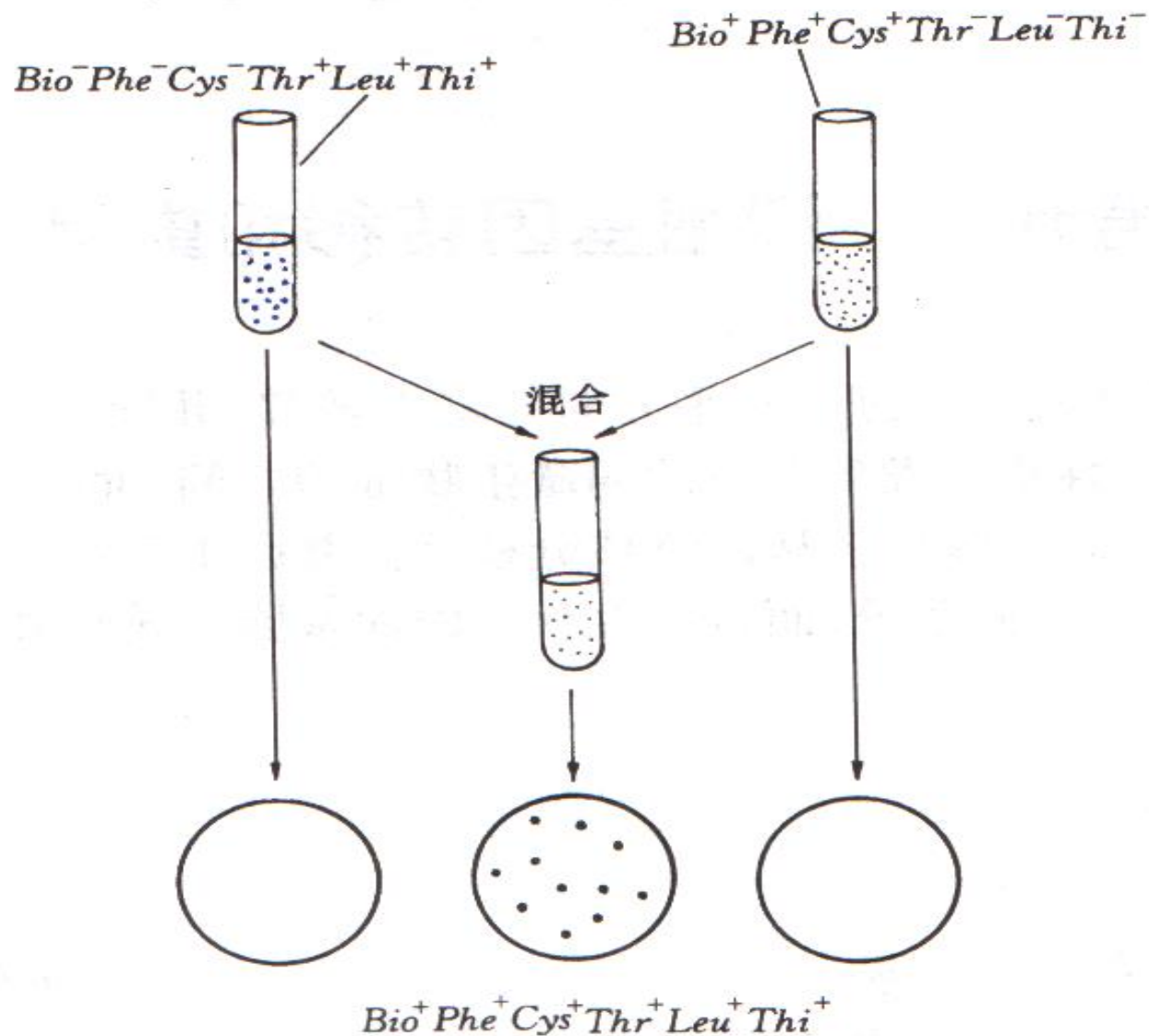


图 8-14 细菌重组的实验证据


实验结果：细菌接合以后发生基因重组，出现原养型。

3、*E.coli*的4种接合型菌株

(1)、F⁺菌株（“雄性”菌株）：指细胞内存在一至几个F质粒，并在细胞表面着生一至几条性菌毛的菌株。

(2)、F⁻菌株（“雌性”菌株）：指细胞中无F质粒、细胞表面也无性菌毛的菌株。

F⁺菌株与F⁻菌株的接合

接合配对的形成: F⁺细胞与F⁻细胞通过F⁺表面的性菌毛使二者连接到一起, 性菌毛在解聚作用和再溶解作用下, 逐渐收缩, 使二者紧密相连, 在接触处形成胞质桥 (接合管) 

DNA的转移: 内切酶在*oriT*处把一条单链切开一个切口, 并以5'末端为首通过胞质桥进入受体, 在质粒DNA转移的同时, 在供体细胞内以另外一条完整的质粒DNA链为模板, 在*oriT*3'处开始滚环式复制, 进入到受体细胞内的DNA单链也做为模板复制另一条互补链, 接合完成后, F⁻菌株变成F⁺菌株, F⁺菌株依旧含完整F质粒。

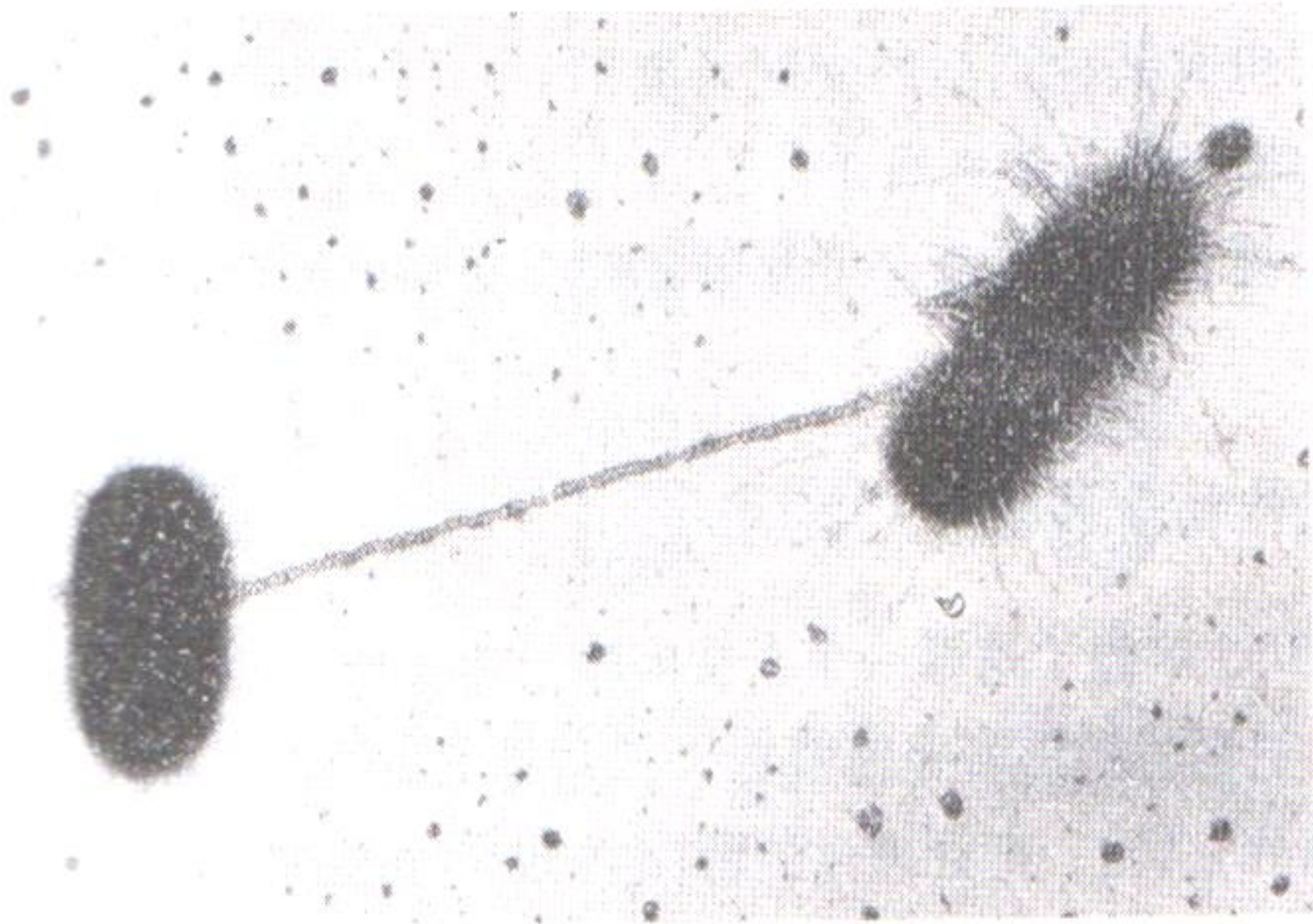


图 4-28 大肠杆菌 F^+ (右) 和 F^- (左) 接合的电镜观察

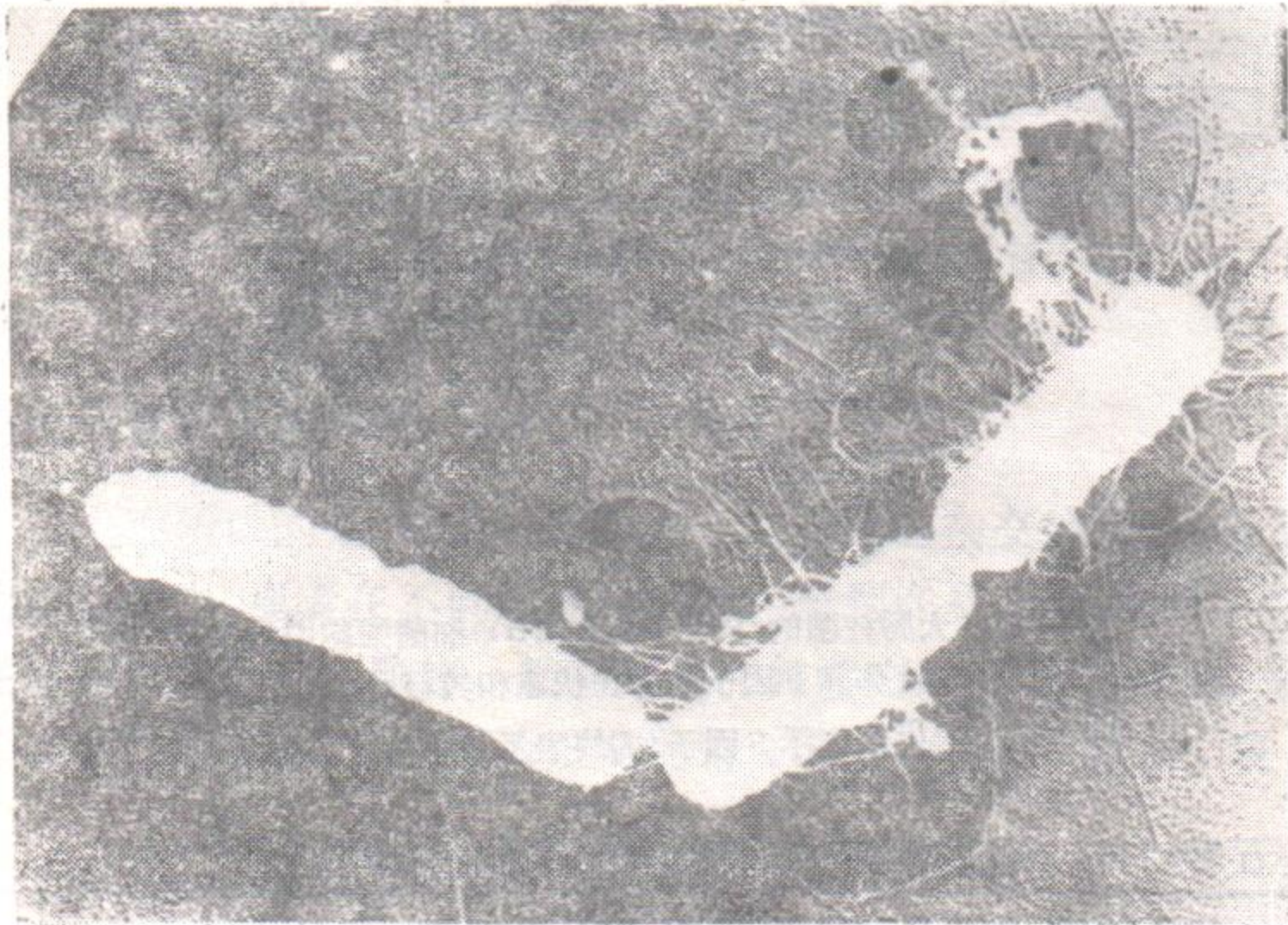


图 5-20 大肠杆菌 K12 的接合的电子显微镜照相^[57]

HfrH $\lambda^s \times F^- \lambda^s$, 可以看到左边的一个 Hfr 细菌表面吸附着 6—7 个 λ 噬菌体, 右边的两个 F^- 细菌表面有许多鞭毛。

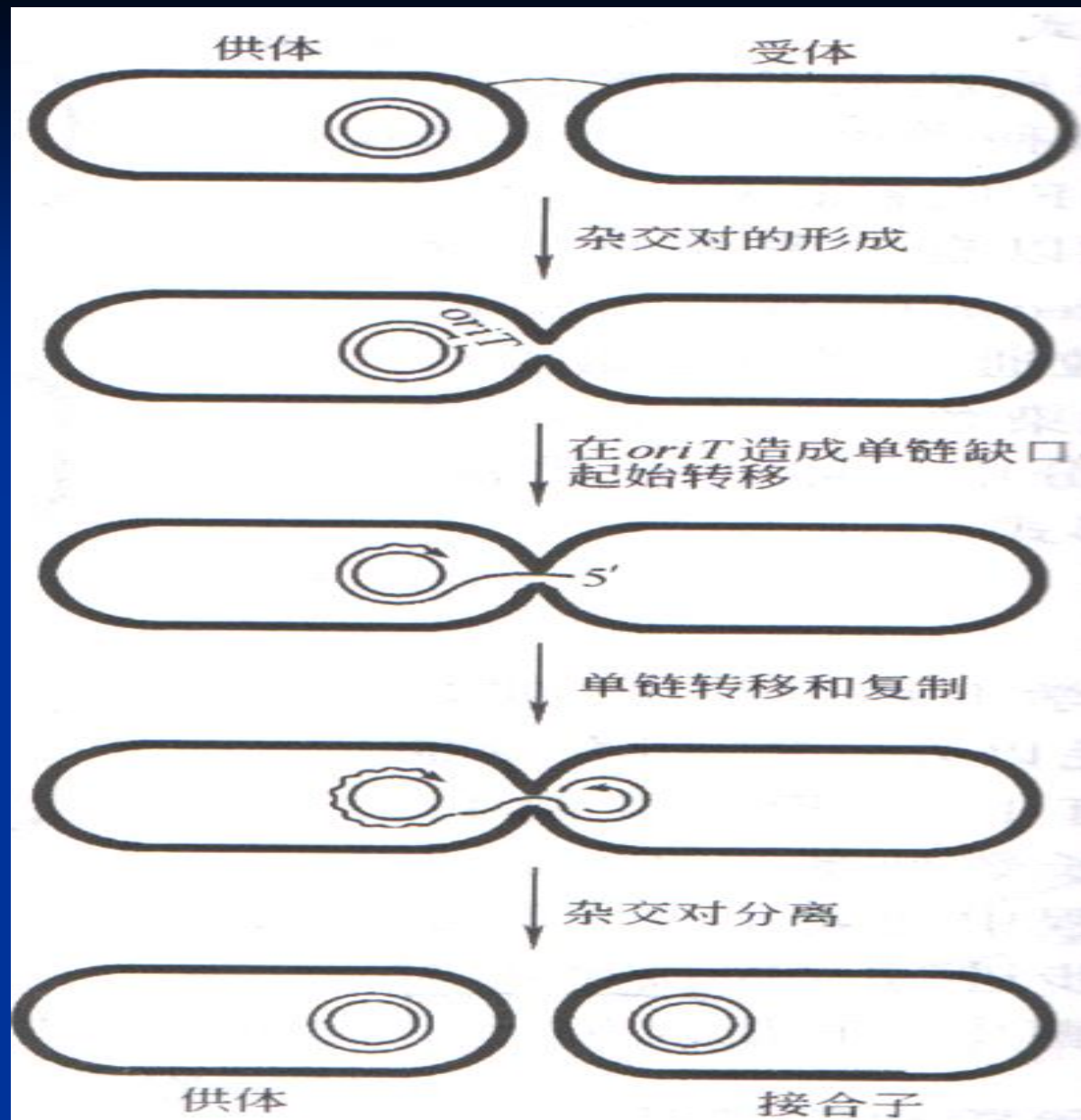


图 4-10 $F^+ \times F^-$ 杂交

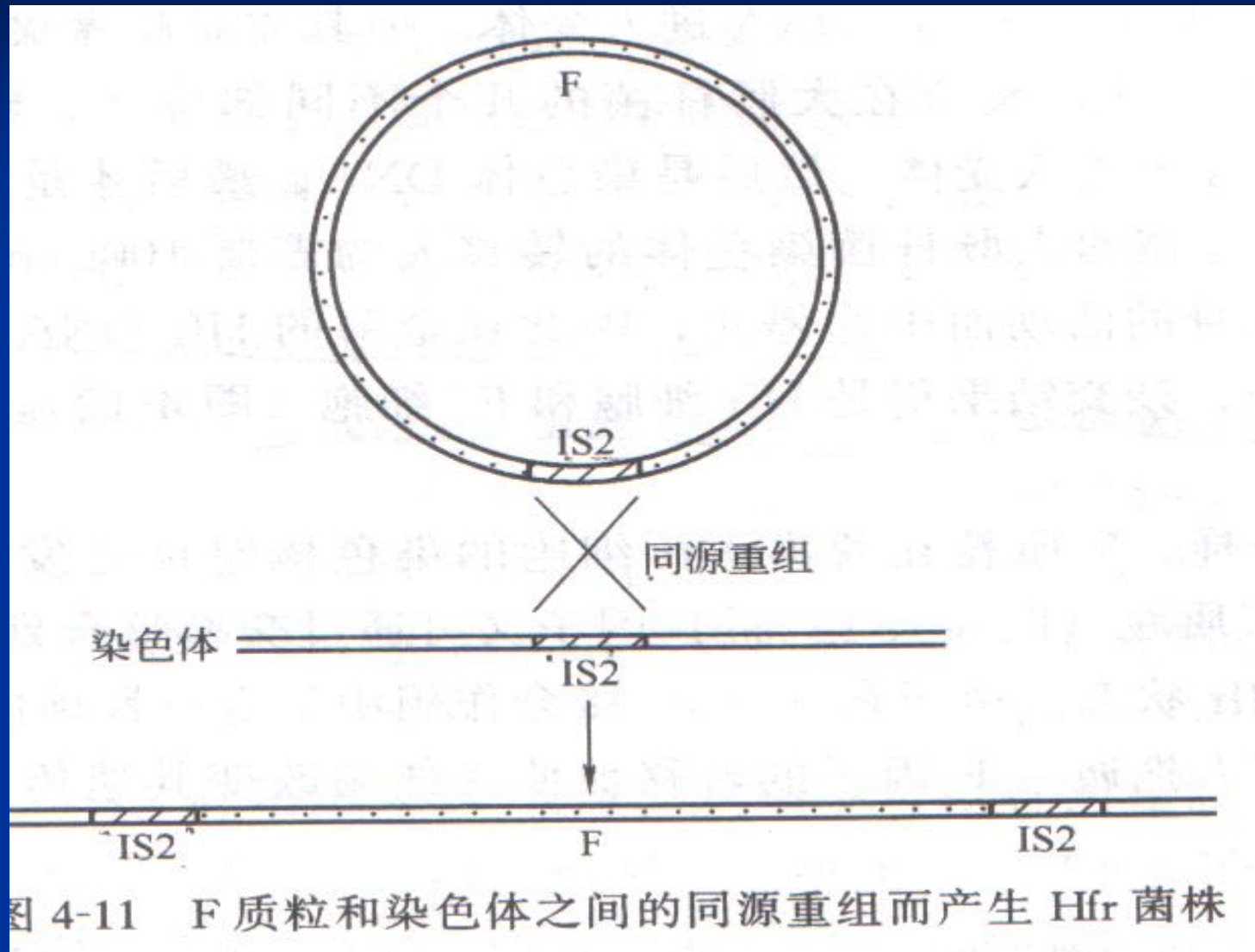
● F^+ 菌株与 F^- 菌株接合结束后， F^+ 菌株不变， F^- 菌株变成 F^+ 菌株。

● F^+ 菌株为低频重组菌株：

原因是：在 F^+ 与 F^- 的杂交中， F 质粒的转移频率很高（约70%），但两者染色体之间的重组频率却很低（约 10^{-6} ）。

(3)、Hfr菌株（高频重组菌株）：F质粒通过同源重组整合到宿主染色体上，故Hfr菌株与F⁻菌株接合后，发生基因重组的频率要比用F⁺菌株与F⁻菌株接合后的频率高出数百倍，故名。

Hfr菌株的形成



Hfr菌株 × F⁻菌株杂交

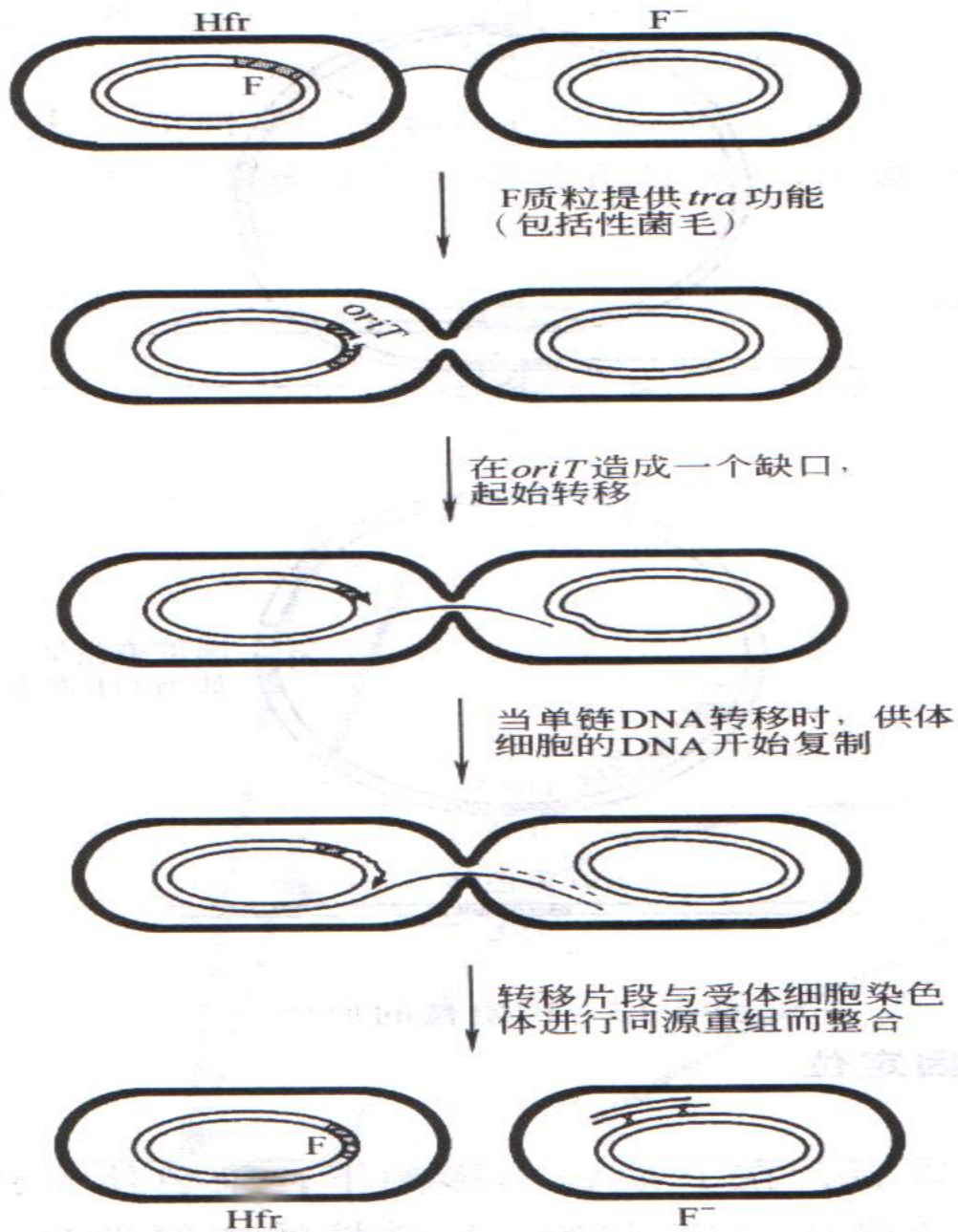


图 4-12 Hfr × F⁻ 杂交

●Hfr菌株与F-菌株接合时，完整的F质粒很难进入菌株，所以接合结束后F-菌株依旧是F-菌株， Hfr菌株不变。

●Hfr菌株与F-菌株接合时，供体细胞与受体细胞染色体重组频率较高，为 10^{-3} 。所以 Hfr菌株称高频重组菌株。

(4)、F'菌株：携带F'质粒的菌株。

F'质粒：当Hfr菌株内的F质粒因不正常切割而脱离核染色体组时，可重新形成游离的、但携带整合位点邻近的一小段核染色体基因的特殊F质粒。

●F'的命名：根据所含的细菌基因来命名。

例如：F-lac

●性导：利用F'质粒将供体细胞的基因导入受体细胞形成部分二部体的过程。

●F'质粒携带的供体细胞的基因可以通过双交换与受体细胞染色体上的等位基因发生交换，如不发生交换，供体细胞的基因随F'质粒的复制而复制，F'质粒也可整合到宿主染色体上，受体细胞成为Hfr。

●F'菌株与F-菌株接合后，F'菌株不变，F-菌株变成F'菌株。

比较 E.coli 的 F⁺、F⁻、Hfr 和 F' 菌株的异同和关系

相同

差异

F ⁻ 菌株:		无 F 质粒
F ⁺ 菌株:	有 F 质粒	F 质粒 呈游离态
Hfr 菌株:	有 F 质粒	F 质粒呈整合态
F' 菌株:	有 F 质粒	F 质粒呈游离态且携带部分 宿主基因

- ◆ F^- 菌株与 F^+ 菌株接合后获得 F 质粒转变成 F^+ 菌株。
- ◆ F^- 菌株与 F' 菌株接合后获得 F' 质粒转变成 F' 菌株。
- ◆ F^+ 菌株中的质粒整合到宿主核基因组上转变成 Hfr 菌株； Hfr 菌株中的质粒从宿主核基因组上正常解离则转变成 F^+ 菌株； Hfr 菌株中的质粒从宿主核基因组上异常解离携带了部分宿主核基因则转变成 F' 菌株； F' 菌株中的 F' 质粒也可整合到宿主染色体上转变为 Hfr 菌株。

(四)、原生质体融合：通过人为的方法，使遗传性状不同的两个细胞的原生质体进行融合，借以获得兼有双亲遗传性状的稳定重组子的过程，称原生质体融合。

转化、转导、接合导致重组的特点：

片段性；单向性；独特性；

第五节 菌种的衰退、复壮和保藏

一、菌种的衰退

1、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或质变的现象。

2、衰退表现：

(1)、原有的形态性状变得不典型了

(2)、生长速度变慢、产孢子少

(3)、代谢产物生产能力下降

(4)、致病菌对宿主侵染力下降

(5)、对外界不良条件抵抗力下降

3、衰退的防止

(1)、控制传代次数

(2)、创造良好的培养条件

(3)、利用不易衰退的细胞传代

(子囊孢子、分生孢子)

(4)、采用有效的菌种保藏方法

二、菌种的复壮

- 1、复壮：指的是在菌种已发生衰退的情况下，通过纯种分离和测定典型性状、生产性能等指标，从已衰退的群体中筛选出少数尚未退化的个体，以达到恢复原菌株固有性状的相应措施。（狭义）

复壮：是在菌种的典型或生产性状尚未衰退前，就经常有意识地采取纯种分离和生产性状的测定工作，以期从中选择到自发的正变个体。（广义）

2、复壮的方法

(1)、纯种分离法

通过纯种分离,可把退化菌种细胞群体中一部分仍保持原有典型性状的单细胞分离出来,经扩大培养,就可恢复原菌株的典型性状。

常用的分离纯化的方法：平板稀释法、
单细胞或单孢子分离法等。

(2)、通过寄主体进行复壮

对于寄生性的退化菌株,可回接到相应寄主体上,以恢复或提高其寄生性能。

例如,根瘤菌属经人工移接,结瘤固氮能力减退,将其回接到相应豆科寄主植物上,令其侵染结瘤,再从根瘤中分离出根瘤菌,其结瘤固氮性能就可恢复甚至提高。

(3)、淘汰已衰退的个体

例如对“5406”放线菌的分生孢子,采用-10~-30℃处理5~7天,其死亡率达80%,在抗低温的存活个体中,留下了未退化的健壮个体。

二、菌种的保藏

1、基本要求：

在一定时间内使菌种不死、不变、不乱

2、基本原理：

首先要挑选典型菌种的优良纯种,最好采用它们的休眠体(如分生孢子、芽孢等);其次,创造一个最有利休眠的环境条件,如干燥、低温、缺氧、避光、缺乏营养以及添加保护剂等。

3、菌种保藏方法：

(1)、斜面或半固体菌种冰箱保藏法

利用低温对微生物生命活动有抑制作用的原理进行保藏。把斜面菌种、固体穿刺培养物,直接放入4℃冰箱中。保藏时间一般不超过数月,到时必须进行移接传代,再放回冰箱。□

适宜菌种：

斜面——各大类（1-6个月）

半固体——细菌、酵母菌（6-12月）

(2)、石蜡油封藏法

利用低温和无氧对微生物生命活动有抑制作用的原理进行保藏。向培养好的菌种斜面上,加入灭菌石蜡油,高出斜面1cm,然后蜡封管口,放入4℃冰箱。该法既可防止培养基水分蒸发,又能使菌种与空气隔绝。保藏期1~2年。

适宜菌种：各大类

(3)、甘油悬液保藏法

利用低温对微生物生命活动有抑制作用的原理进行保藏。将拟保藏菌种对数期的培养液直接与经 121°C 蒸汽灭菌20min的甘油混合，并使甘油的终浓度在10%~15%，再分装于小离心管中，置低温冰箱中保藏。保藏温度若采用 -20°C ，保藏期约为0.5~1年，而采用 -70°C ，保藏期可达10年。

适宜菌种：细菌、酵母菌

(4)、砂土管保藏法

利用干燥和无营养对微生物生命活动有抑制作用的原理进行保藏。将干燥砂粒与细土混合后灭菌制成砂土管,然后接种保藏。若把砂土管放在低温或抽气后密封,效果更佳。此法适用于产孢子及芽孢菌种的保藏。保藏期1~10年。

适宜菌种：产孢子微生物

(5)、真空冷冻干燥法

是目前较理想的一种方法。在低于 -15°C 下,快速将细胞冻结,并保持细胞完整,然后在真空中使水分升华致干。在此环境中,微生物的生长和代谢都暂时停止,不易发生变异,故可长时间保存,一般为5~10年,最多可达15年之久。此法兼备了低温、干燥及缺氧几方面条件,使微生物可以保存较长时间,但手续较麻烦,需要一定的设备。

适宜菌种： 各大类

(6)、液氮保藏法：

是将菌种保藏在 -196°C 的液态氮中的长期保藏方法，它的原理是利用微生物在 -130°C 以下新陈代谢趋于停止而有效地保藏微生物。

它是以甘油、二甲基亚砷等作为保护剂，其主要原理是菌种细胞从常温过渡到低温，并在降低到低温之前，使细胞内的自由水通过细胞膜外渗出来，以免膜内因自由水凝结成冰晶而使细胞损伤。

适宜菌种：各大类

保藏期15年以上。

美国ATCC(American Type Culture Collection)采用的两种最有效的方法：

保藏期一般达5~15年的冷冻干燥保藏法

保藏期一般达20年以上的液氮保藏法

最大限度地减少传代次数和避免菌种衰退

- 1、原核微生物的基因重组方式有哪些？
- 2、概念：转化、转导、普遍转导、局限转导、接合、缺陷噬菌体、感受态。
- 3、比较 E.coli 的 F⁺、F⁻、Hfr 和 F' 菌株的异同和关系。
- 4、比较普遍转导与局限转导的异同。
- 5、实验室常用菌种保藏的方法有哪些？
- 6、防止菌种衰退的方法有哪些？