



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

Genetic Improvement on Microorganisms

微生物

遗传育种学

诸葛健 李华钟 王正祥 主编



化学工业出版社



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

Genetic Improvement on Microorganisms

微生物 遗传育种学

诸葛健 李华钟 王正祥 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目(CIP)数据

微生物遗传育种学/诸葛健,李华钟,王正祥主编.北京:化学工业出版社,2008.10

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

ISBN 978-7-122-03557-8

I. 微… II. ①诸…②李…③王… III. 遗传育种-微生物遗传学-高等学校-教材 IV. S33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 126932 号

责任编辑:傅四周 孟 嘉

责任校对:宋 玮

装帧设计:刘丽华

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 装:三河市延风印装厂

720mm×1000mm 1/16 印张15 字数257千字 2009年2月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址:<http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:29.00 元

版权所有 违者必究

前 言

江南大学发酵工程专业是我国第一批国家级重点学科。优良的工业生产菌种是发酵工业的核心，我们的微生物系列课程内容历来都围绕选种、育种、培养条件优化这三者来安排。

工业微生物育种课程的创建源于 1963 年原无锡轻工业学院（江南大学前身）发酵教研室主任丁跃坤老师，当时还处于米丘林和摩尔根两学派纷争的年代。作为当时丁老师助教的诸葛健就协助开设了国内首门《工业微生物育种学》课程。

“工业微生物育种技术”课程以选修课形式从 1982 年开始在本科开设，是在完成原轻工业部“AS1.398 蛋白酶产生菌育种新技术”科研项目的基础上，以原生质体融合、原生质体转化和原生质体诱变的原生质体系列育种技术为主体作为课程内容，应该说这在当时是属于前沿的。开设几届后，发现学生人数多、学时紧，设备和实验经费不足的矛盾突出，从 1986 年开始将其列入研究生的课程范围。

鉴于随后“211”工程重点建设对微生物学系列课程的重视及课程改革的需要，本科教学的微生物学系列课程分别开设了“微生物学”和“微生物遗传育种学”两门。在开始的过渡阶段，以 2000 年李华钟教授等执教的“微生物遗传育种学”作为选修课开设，但因几乎所有学生都饶有兴趣地选读，所以两年后就将“微生物遗传育种学”作为学位课了。

诚然，作为重点学科研究生阶段开设的“工业微生物育种技术”与本科阶段开设的“微生物遗传育种学”是一个方向上的两个层次，各有其分工内容。

这门课程是理论与实验并重的应用基础课，共计 57 学时，其中理论课有 30 学时。本书的编写内容既有其遗传学的基础，但又不是系统的微生物遗传学，侧重于育种。内容共有微生物遗传育种的遗传学原理、基因突变及其机制、基因突变的应用、基因重组育种、基因工程及其应用共五章。本书将微生物遗传学基础与应用密切结合，体现育种的遗传学原理与育种技术的融合是其特色。

课程的实验内容包含紫外诱变技术及抗药性突变菌株的筛选（综合性实验）；质粒 DNA 的小量制备及电泳检测；大肠杆菌的转化实验以及酵母原生

质体融合。教学操作中则根据学时耗用具体情况适当调整实验内容。

本书由诸葛健、李华钟、王正祥三位教授主编，具有丰富教学和实践经验的段作营、饶志明、樊游、曹钰四位老师参与了撰写，可以说这本教材凝聚了微生物学系列课程所有教师多年的心血。

当然由于书中在对微生物遗传学和育种技术内容的穿插和描述时有共性，编写时有所不足实为难免，但相信在读者的帮助下会逐步完善。

编者

2009年1月于无锡市江南大学

目 录

第一章 绪论	1
第一节 工业微生物菌种	1
第二节 微生物遗传育种的遗传学原理	2
一、遗传物质的结构和功能	2
二、DNA 复制	7
第三节 RNA 和蛋白质合成	11
一、转录	11
二、翻译	13
第四节 基因表达规则	17
一、诱导和阻遏	17
二、基因表达的操纵子学说	19
第五节 微生物遗传育种技术简介	21
一、诱变育种	21
二、基因重组育种	22
三、重组 DNA 技术	23
第六节 微生物菌种选育的简史	24
一、工业微生物育种的简史	25
二、与工业微生物育种有关的重要发现与成就	26
复习思考题	27
第二章 基因突变及其机制	28
第一节 突变类型和基因符号	28
一、基因符号	28
二、突变类型	30
第二节 基因突变的规律	34
一、基因突变的自发性	35
二、基因突变的随机性	37
三、基因突变的稀有性	38
四、基因突变的独立性	39

五、基因突变的可诱发性	39
六、基因突变的可遗传性	40
七、基因突变的可逆性	40
第三节 自发突变的机制	40
一、背景辐射和环境因素引起的诱变	41
二、自身代谢产物的诱变作用	41
三、转座因子的作用	41
四、DNA 分子的运动	42
五、DNA 分子自发的化学变化和复制差错	43
第四节 诱变剂及其作用机制	44
一、化学诱变剂	44
二、物理诱变剂	55
三、生物诱变剂	61
第五节 突变生成过程	61
一、诱变剂接触 DNA 分子之前	62
二、DNA 的损伤	62
三、DNA 的修复	64
四、突变基因的形成	76
五、从突变到突变表型	77
复习思考题	78
第三章 基因突变的应用	79
第一节 诱变育种	79
一、概述	79
二、诱变育种方案的设计	82
三、诱变育种的一般流程	84
四、诱变育种需要注意的一些问题	95
第二节 营养缺陷型突变菌株的筛选与应用	96
一、营养缺陷型及其应用	97
二、营养缺陷型突变株的筛选	101
第三节 抗反馈调节突变型的筛选及应用	109
一、反馈调节和抗反馈调节突变	109
二、抗结构类似物突变株的筛选及应用	112
第四节 其他突变型的筛选及应用	116
一、组成型突变株的筛选	116

二、抗降解代谢物阻遏突变株的筛选与应用	117
三、细胞膜透性突变株的筛选与应用	118
四、次生代谢障碍突变株的筛选与应用	120
五、其他抗性突变株的筛选与应用	121
六、无泡沫突变株的筛选与应用	123
第五节 菌种退化及其防止	123
一、菌种退化及其表现	123
二、菌种退化的原因	124
三、防止菌种退化的措施	126
四、退化菌种的复壮	127
复习思考题	128
第四章 基因重组育种	129
第一节 转化	130
一、自然转化	130
二、人工转化	132
三、转化合种程序	133
第二节 接合	134
一、接合现象的发现和证实	135
二、F 因子与大肠杆菌的性别	136
三、大肠杆菌的接合过程	137
四、染色体转移和遗传图谱	139
五、细菌接合育种程序	139
第三节 转导	141
一、普遍性转导	141
二、局限性转导	144
三、转导育种程序	145
第四节 真菌的有性生殖	146
一、粗糙脉孢菌的有性生殖	147
二、酵母菌的基因重组(杂交育种)	149
第五节 真菌的准性生殖	152
一、准性生殖过程	153
二、准性杂交育种	156
第六节 原生质体育种	159
一、原生质体融合育种	160

二、原生质体转化	166
复习思考题	167
第五章 基因工程及其应用	169
第一节 基因克隆的酶学基础	169
一、核酸内切限制酶与 DNA 分子的体外切割	169
二、DNA 连接酶与 DNA 分子的体外连接	174
三、其他酶	178
第二节 基因克隆的载体	181
一、质粒载体	181
二、噬菌体载体	184
三、柯斯质粒载体	188
第三节 目的基因的获得	192
一、从染色体 DNA 基因组中获得	192
二、mRNA 反转录获得 cDNA	193
三、聚合酶链反应体外扩增目的基因	194
四、基因的化学合成	195
第四节 重组体 DNA 分子的构建及导入受体细胞	196
一、外源 DNA 片段同载体分子的重组	196
二、基因工程中常用的宿主系统	197
三、重组体 DNA 分子导入受体细胞的途径	198
四、影响外源基因表达的因素	199
第五节 重组子的筛选	200
一、遗传检测法	201
二、物理检测法	202
三、核酸杂交筛选法	204
四、免疫化学检测法	204
五、DNA-蛋白质筛选法	206
第六节 基因工程研究进展及应用	206
一、基因工程育种	206
二、定向进化和基因定点诱变	206
三、代谢工程	210
四、基因组重组	212
五、基因工程的应用	214
复习思考题	215

附录 微生物遗传育种实验	216
实验 1 紫外诱变技术及抗药性突变菌株的筛选	216
实验 2 质粒 DNA 的小量制备及电泳检测	220
实验 3 大肠杆菌的转化实验	224
实验 4 酵母原生质体融合	226
主要参考资料	229

第一章 绪论

第一节 工业微生物菌种

在大规模培养条件下，批量商业性获得微生物细胞或其代谢产物过程中所使用的微生物菌株；或利用微生物特定代谢过程，规模化加工或转化特定底物或环境物料的微生物菌株，即为工业微生物菌种。习惯上，具有上述潜在应用前景的微生物菌株也常被称为工业微生物菌种。工业微生物菌种是工业微生物学的主体研究对象，是工业生物技术特别是新一代工业生物技术研究发展的中心内容。一个好的工业菌种，可以形成和发展出一个工业并形成产业；同样，现代工业生物技术的发展，也不断要求有新的、性能更优越的工业菌种出现。

用作工业菌种的微生物，应具有如下基本特征：

- ① 非致病性；
- ② 适合大规模培养的工艺要求；
- ③ 利于应用规模化产品加工工艺；
- ④ 相对稳定的遗传性能和生产性状；
- ⑤ 形成具有商业价值的产品或具有商业应用价值。

用作工业菌种的微生物，其来源主要有两个途径：从自然样本中通过筛选与分离获得（即选种）；在实验室中对保藏的微生物菌株进行遗传改良获得（即育种）。选种是获得工业菌种的基础，是目前若干工业应用的工业菌种的重要获得方式；育种是获得性能卓越的工业菌种的必要手段，是目前工业菌种获得的主要途径。随着工业微生物学的发展，作为主要的生物资源，大量的具有工业应用前景的微生物菌株被分离、系统鉴定和长期保藏。现在，微生物菌种的建立和形成，主要工作集中在对现有微生物资源的遗传育种上。当然，育种过程无一例外地穿插使用选种技术。

依据育种技术的使用和微生物菌种获得的方式，工业微生物菌种又有如下不同的界定或不同的描述。天然菌种（native strain）是通过自然筛选和分离获得的工业菌种，如目前工业上使用的啤酒酿制用酵母菌种、葡萄酒酿制用酵母菌种、面包等焙烤食品中的酵母菌种等。天然菌种是微生物菌株在自然条件

下, 经过随机突变或自然遗传变异产生的优良的生产性状的长期积累后形成的, 一般皆为野生型 (wild type)。诱变菌种 (mutagenized strain) 是通过物理、化学等诱变剂在实验室人工诱变自然筛选与分离的菌株, 获得产量或/和性状改善的工业菌种。目前, 工业上使用的许多生产菌种都属于这一类型。诱变菌种与天然菌种的本质区别在于, 诱变菌种是通过诱变剂加速基因突变过程及定向筛选获得的。因此, 此类工业菌种也被认为是类似于天然菌种的、非遗传修饰的工业菌种。重组菌种 (recombinant strain) 是通过遗传重组技术对菌种进行定向遗传改良获得的, 所使用的技术包括杂交、原生质体融合、分子克隆等。不同国家对经外源基因导入并因此发生遗传整合和性状改变的所谓遗传修饰生物体 (genetic modification organisms, GMO) 的商业使用有不同的法律规范, 工业微生物菌种同样受到这些法律规范的管理。目前认知的是, 天然菌种、诱变菌种、杂交菌种被认为是非 GMO。

第二节 微生物遗传育种的遗传学原理

与其他生物一样, 微生物在特定环境 (发酵培养工艺) 条件下所表现出的所有特性, 都是由其基因组 (genome) 中的基因 (gene) 或基因簇控制或影响的。微生物的遗传特性包括它们的形状、结构特征 (形态学)、生理特征 (耐酸、耐碱、耐温、耐盐等)、生化反应 (代谢类型、新陈代谢)、运动能力或其他形式的表现及它们与其他微生物的关系。微生物是通过遗传物质的基本单位——基因, 将这些特性传递给它们的后代; 微生物在生理或代谢等方面的性能改变, 是通过改变其基因特征, 即遗传变异或遗传重组实现的。工业微生物遗传育种, 究其本质, 是在实验条件下, 引导微生物的遗传变异或遗传重组, 使其表现现状向改善工业应用性能方向改变并由此获得新的或改建的稳定遗传性状的过程。

一、遗传物质的结构和功能

微生物的所有遗传现状是由其遗传物质控制的, 其遗传的本质及其机理是微生物遗传学的基本研究内容。需要回答的基本科学问题包括: 基因是什么; 基因是怎样携带信息、怎样复制, 又是怎样将遗传信息传递给下一代或者其他微生物的; 在微生物中决定其独有特性的信息又是怎么表达的等。

1. 染色体与基因

染色体是微生物基因组的细胞结构单位。基因是编码功能性产物的一段具有特征结构的 DNA 片断（一些以 RNA 为遗传物质的病毒除外）。DNA 是由脱氧核糖核苷酸组成的、具有特定排列特征的大分子。每一个核苷酸是由一个碱基（腺嘌呤，A；胸腺嘧啶，T；胞嘧啶，C；鸟嘌呤，G）、一个脱氧核糖和一个磷酸基团组成的（图 1-1）。

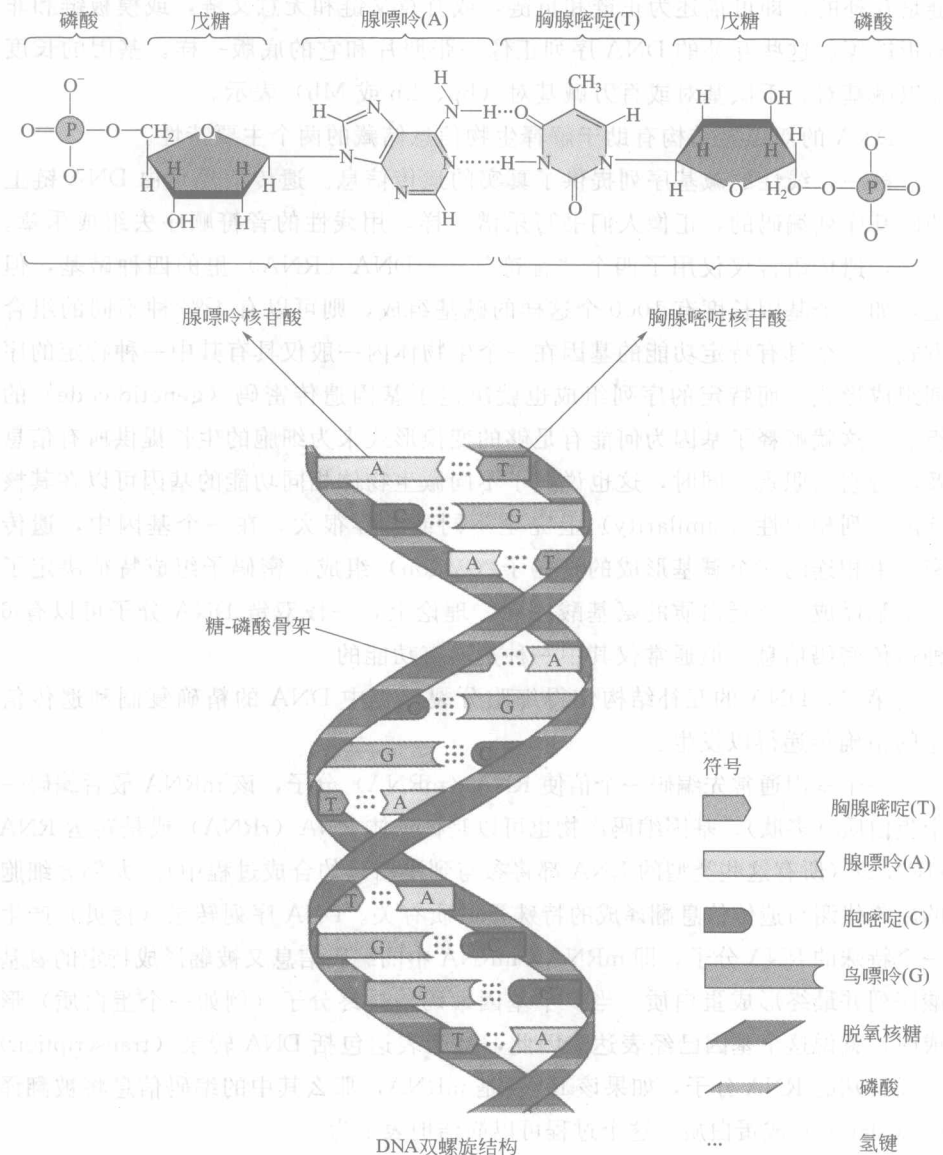


图 1-1 DNA 分子的基本结构与组成

在细胞中，DNA 以互补的双螺旋结构的形式存在。核苷酸（碱基）在 DNA 分子内侧成对互补排列；外侧经戊糖-磷酸侧链骨架将碱基对串连。在该骨架上每一个糖基和一个碱基相连。碱基对遵循特定的碱基互补配对原则：腺嘌呤与胸腺嘧啶配对，胞嘧啶与鸟嘌呤配对。正是由于这种特殊的碱基配对，一条 DNA 链的碱基序列决定了另外一条链的碱基序列。因此，DNA 的两条链是互补的，即可描述为正链和负链，或有意义链和无意义链，或模板链和非模板链等。这些互补的 DNA 序列正像一张照片和它的底版一样。基因的长度即以碱基对、千碱基对或百万碱基对（bp、kb 或 Mb）表示。

DNA 的双螺旋结构有助于解释生物信息储藏的两个主要特性。

第一，线性的碱基序列提供了真实的遗传信息。遗传信息是由 DNA 链上的碱基序列编码的，正像人们书写乐谱一样，用线性的音符顺序去组成乐章。虽然，遗传语言仅仅用了四个“音符”——DNA（RNA）里的四种碱基，但是，如一个基因长度有 1000 个这样的碱基组成，则可以有 4^{1000} 种不同的组合方式；一个具有特定功能的基因在一个生物体内一般仅具有其中一种特定的序列组成形式，而特定的序列组成也就决定了基因遗传密码（genetic code）的组成。这就解释了基因为何能有足够的变换形式来为细胞的生长提供所有信息及履行它的职责；同时，这也说明了不同微生物体相同功能的基因可以在其核苷酸序列相似性（similarity）上完全不同或差异很大。在一个基因中，遗传密码由相连的三个碱基形成的密码子（codon）组成，密码子组成特征决定了它所翻译成一个蛋白质的氨基酸序列。理论上，一段双链 DNA 分子可以有 6 种遗传密码信息，但通常仅其中一种是具有功能的。

第二，DNA 的互补结构使得细胞分裂过程中 DNA 的精确复制和遗传信息的精确传递得以发生。

一个基因通常先编码一个信使 RNA（mRNA）分子，该 mRNA 最后编码一个蛋白质（多肽）。基因编码产物也可以是核糖体 RNA（rRNA）或是转运 RNA（tRNA）（所有这些类型的 RNA 都将参与到蛋白质的合成过程中）。大部分细胞的新陈代谢与遗传信息翻译成的特殊蛋白质有关。DNA 序列转录（拷贝）产生一个特殊的 RNA 分子，即 mRNA。mRNA 中的编码信息又被翻译成特定的氨基酸序列并最终形成蛋白质。当一个基因编码的最终分子（例如一个蛋白质）形成时，就说这个基因已经表达。因此，基因表达包括 DNA 转录（transcription）形成特殊的 RNA 分子，如果该 RNA 是 mRNA，那么其中的编码信息将被翻译（translation）成蛋白质，这个过程可以简洁地表示为：



要进行遗传信息的表达，DNA 必须经过转录和翻译。虽然单个氢键的作用力很弱，但是由于 DNA 分子中氢键的密度很大，一小段 DNA 上的氢键就能提供足够的结合能量让其形成双螺旋结构。同时，DNA 分子中的遗传信息通常只有在 DNA 分子处于解链的状态下才能从 DNA 中读取。DNA 的双链解开（解链）由一组蛋白质分子与 DNA 分子作用后产生。随着基因的表达，两条分开的 DNA 单链中的一条被作为模板，转录出相应的 RNA 产物。

在细胞复制过程中，DNA 分子也需被解链。解链的两条单链 DNA 分子作为模板并合成其互补的另一条链，从而形成了两个子链 DNA 分子。在细胞分裂之前，基因组 DNA 序列通常已由酶推动下进行了精确的复制（replication）。这种复制使细胞在繁殖时通过 DNA 的复制将全部遗传信息从一个细胞传递到其子代细胞，或者从上一代传递到下一代。

DNA 分子的组成及其序列能够被改变（即变异），虽然很多变异可引起细胞的损伤或死亡，但是一些变异也能创造出可遗传的新特性，能使微生物更好地在新环境中生存。因此，从长远的角度看，变异对菌种的成功进化作出了卓越的贡献。

2. 基因型和表现型

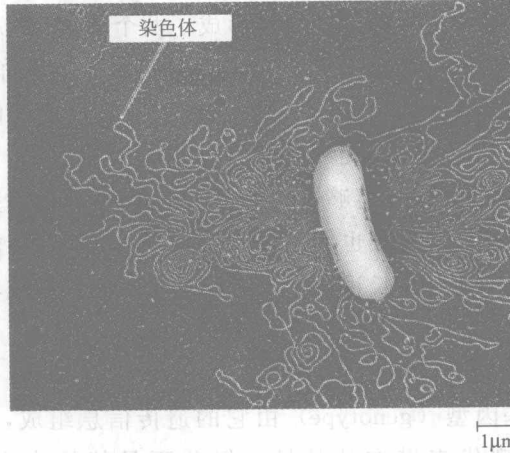
一个微生物的基因型（genotype）由它的遗传信息组成，它编码微生物的所有特性，基因型代表潜在的特性，但并不是特性本身。表（现）型（phenotype）则指细胞在一定环境条件下表现出的一些实际的、已表达的特性，例如微生物完成一个特殊化学反应的能力。因此，表现型是基因型的表现。

从分子角度看，一个微生物的基因型是它所有基因的总和，即它的全套 DNA（基因组）。那么是什么组成了微生物的表现型呢？从某种意义上说，一个微生物的表现型是它的蛋白质的总和。一个细胞的大部分特性来自于蛋白质的结构和功能。在微生物中，大部分的蛋白质要么是酶（催化特殊的反应），要么是结构物（参与大的功能性物质的合成，像膜或者核糖体的合成）。表现型还依赖于细胞的其他结构大分子（像类脂或多糖）。例如，一个复杂的脂质结构或者多糖分子是合成和降解这些结构的酶作用的结果。

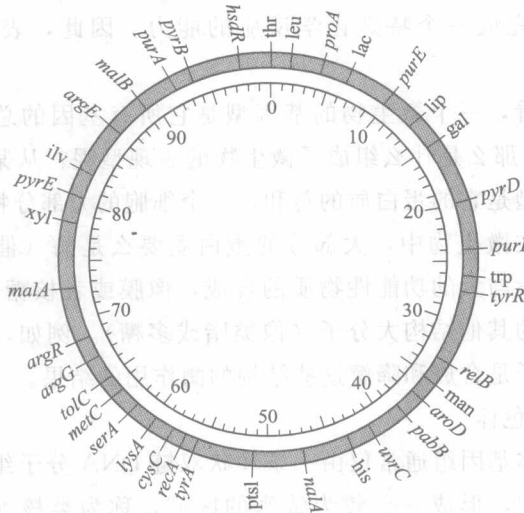
3. DNA 和染色体

细菌的染色体基因组通常仅由一条环状双链 DNA 分子组成。细菌的染色体相对聚集在一起，形成一个较为致密的区域，称为类核（nucleoid）。类核无核膜与胞浆分开，类核的中央部分由 RNA 和支架蛋白质组成，外围是双链闭环的 DNA 超螺旋。染色体 DNA 通常与细胞膜相连，连接点的数量随细菌

生长状况和不同的生活周期而异。在 DNA 链上与 DNA 复制、转录有关的信号区域与细胞膜优先结合，如大肠杆菌染色体 DNA 的复制起点 (*oriC*)、复制终点 (*terC*) 等大肠杆菌的 DNA 是研究最多的细菌 DNA，它大约有 4Mb、长 1mm——比整个细胞长度的 1000 倍还要长。然而，由于 DNA 非常细，并且紧紧地被包装在细胞内，所以这个缠绕在一起呈螺旋状的大分子仅仅占据了大约整个细胞体积的 10% [图 1-2(a)]。



(a) 一个原核微生物的染色体。那些弥散的缠结在一起的环状 DNA 来自这个破裂的大肠杆菌，这只是它全套染色体的—部分



(b) 大肠杆菌染色体的基因图谱，每一个基因用一个三字母的缩写标记

图 1-2 大肠杆菌染色体及其染色体基因组图谱

近几年,近 700 个细菌染色体 DNA (基因组) 的所有碱基序列及其排列方式已被确定 (测序)。该信息和其他一些有用的遗传信息一起使科学家能够识别染色体上的基因位置。DNA 上相关的基因位置是用一个基因图谱来阐明的 [图 1-2(b)]。

酵母和丝状真菌的染色体结构与其他真核细胞相似,皆含有多条染色体。其染色体基因组是细菌的数倍。已有十多种酵母和至少四种丝状真菌的基因组被完全解析,有二十余种丝状真菌的基因组正在解析中。

二、DNA 复制

遗传信息的稳定传递需要在细胞分裂时染色体 DNA 准确的复制 (replication)。在 DNA 的复制过程中,一个亲本双链 DNA 分子被复制成两个相同的子链 DNA 分子。DNA 碱基序列的互补结构是理解 DNA 复制的关键。由于双螺旋 DNA 两条链的碱基是互补的,所以一条链能够用于复制另外一条链的模板 (图 1-3)。

在一系列复制相关酶系的作用下, DNA 分子的两条链上相应的核苷酸之间的氢键键能减弱,此时亲本 DNA 的双螺旋解开,形成局部单链状态。以亲本 DNA 的每一条链作为模板去形成新的碱基配对,随后,氢键又重新在两个新的互补核苷酸之间形成。在每一个最终的子链上,酶催化相邻的两个核苷酸之间形成糖苷键。

1. DNA 的复制

DNA 的复制要求有复杂的细胞蛋白质体系存在,该蛋白质 (酶) 体系指导着一个特殊的事件顺序。当复制开始的时候,亲本 DNA 两条链的一小部分先解螺旋并相互分开,随着 DNA 复制的进行其他部分也将解螺旋并分开。细胞质当中游离的核苷酸与单链亲本 DNA 暴露在外面的碱基进行配对。如果在原始链上是胸腺嘧啶,那么新链上对应的位置只能是腺嘌呤;同样,在原始链上是鸟嘌呤,那么新链上对应的位置只能是胞嘧啶等。所有错配碱基都将通过 DNA 聚合酶将其去除和替代。DNA 一旦开始合成,其周围多余的核苷酸就通过 DNA 聚合酶连接到正在延长的 DNA 链上。然后,亲本 DNA 继续解螺旋以便使新链上增加更多的核苷酸复制发生的位点 (复制叉, replication fork)。随着复制叉在母链 DNA 上的移动,每一个解开的单链与新的核苷酸相结合,然后起始链和这个新合成的子链缠绕在一起。因为每一个新的双链 DNA 分子是由一个原始链和一个新链组成,所以关于这样的复制过程称之为半保留复制 (semi-conservative replication)。