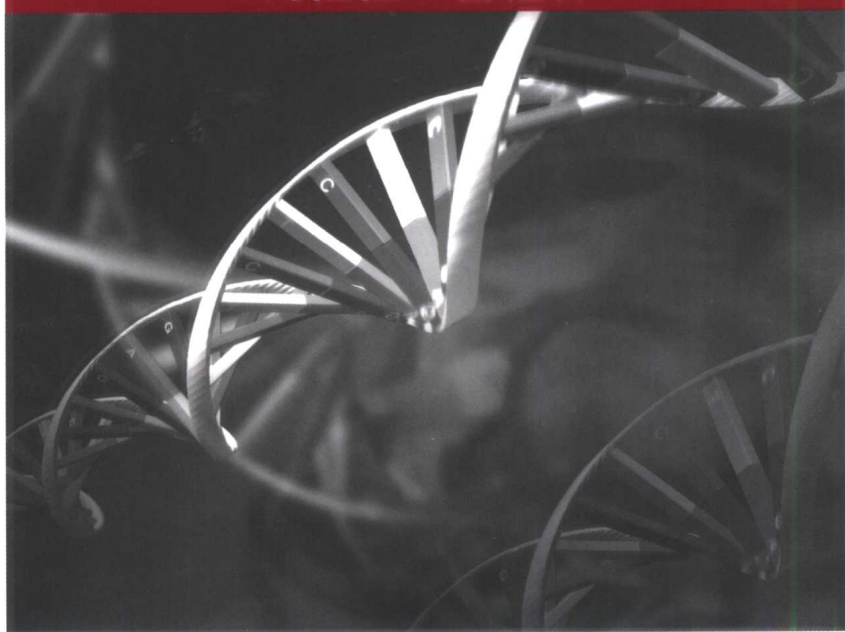


高 等 学 校 教 材

生物技术 原理与方法

刘佳佳 曹福祥



Chemical Industry Press



化学工业出版社
教材出版中心

生物工程专业系列教材

微生物学 喻子牛

生物化学 张洪渊 万海清

生物分离工程 孙 彦

生化分离工程 严希康 国家“九五”重点教材

生物反应工程 戚以政

工业微生物学 岑沛霖 蔡 谨

应用生物化学 欧 伶等

生物工程设备 陈国豪

新编生物工艺学 俞俊棠

新编酒精工艺学 贾树彪等

生物分离原理及技术 欧阳平凯 胡永红

多尺度微生物过程优化 张嗣良

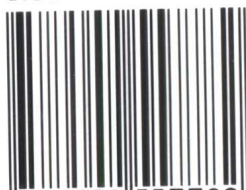
现代工业发酵调控学 储 炬 李友荣

生物工程 / 生物技术 专业英语 邬行彦

生物化学工程基础 李再资 面向二十一世纪教材(适用非生物专业)

生命科学概论 万海清 赵振镛 (适用非生物专业)

ISBN 7-5025-5778-4



9 787502 557782 >

ISBN 7-5025-5778-4/G · 1548 定价: 30.00元

高等学校教材

生物技术原理与方法

刘佳佳 曹福祥



化学工业出版社
教材出版中心

· 北京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物技术原理与方法/刘佳佳, 曹福祥. —北京: 化学工业出版社, 2004. 7
高等学校教材
ISBN 7-5025-5778-4

I. 生… II. ①刘…②曹… III. 生物技术-高等学校-教材 IV. Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 062732 号

**高等学校教材
生物技术原理与方法**

刘佳佳 曹福祥
责任编辑: 赵玉清
文字编辑: 孔 明
责任校对: 凌亚男
封面设计: 蒋艳君

*

化学工业出版社
教材出版中心 出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销
北京云浩印刷有限责任公司印装

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 17¼ 字数 374 千字

2004 年 8 月第 1 版 2004 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-5778-4/G · 1548

定 价: 30.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

生物技术是一门既古老又现代的技术，它的历史与人类文明的发展史一样源远流长，可以追溯到几千年前的酿酒技术。它的发展促进了人类文明的进步和生存条件的改善。20 世纪 40 年代以青霉素为代表的抗生素的工业化生产，为人类提供了对抗许多致命性、传染性疾病的有力武器，使人类免于这些疾病的威胁。

生物技术具有其他技术无可比拟的优越性，即可持续发展。它的研究领域涉及影响人类生存的几乎所有重大问题，包括医药、食品、能源、环境和信息。生物技术已逐步成为与微生物学、生物化学、化学工程、信息技术、药学、医学等学科密切相关的综合性学科。许多专家将现代生物技术产业称为 21 世纪的朝阳产业。生物技术领域的研究报告、专著和资料层出不穷，这为我们编写一本介绍生物技术的基本原理与方法，反映生物技术领域的最新发展动态的教材提供了有利条件。本书可作为希望了解生物技术领域的读者的入门教材，也可作为生化工程领域的工程技术人员的参考书。

本书共分 15 章，主要介绍微生物的分类和分类技术，细胞的结构与功能、细胞的分离纯化与保存、细胞的生长与检测、基因的复制、修复、转录、表达与调控，基因重组技术，生物反应器，干细胞工程和生物技术在医药工业中的应用。

本书的成书是在参考大量文献与资料的基础上写成的，从这些素材中引用了许多的资料和数据，在此对他们的工作表示真诚的感谢。在本书的编写过程中林丹老师、李晓宁博士做了大量工作，研究生王晖、罗兰、章晓骅、杨磊、龚汉祥在资料收集、图表绘制方面做了大量工作，在此对他们表示衷心的感谢。

由于作者水平有限，错误和不足之处恳切希望读者予以批评指正。

刘佳佳 曹福祥

2004 年 5 月于长沙

目 录

1 绪论	1
1.1 现代生物技术的研发内容与研发进展	1
1.2 现代生物技术对人类社会生存的影响及其前景	4
2 微生物的分类与分类技术	6
2.1 微生物的分类	6
2.2 微生物分类鉴定的特征和技术	10
2.3 微生物的快速鉴定和自动化分析技术	15
2.4 微生物的形态特征与观察	20
2.5 病毒	23
3 细胞的结构与功能	29
3.1 原核生物细胞的结构	29
3.2 真核生物细胞的结构	38
4 细胞的分离纯化与保存	44
4.1 细胞的分离纯化	44
4.2 细胞的营养要求与培养基	48
4.3 培养基与设备灭菌	59
4.4 细胞保存与复苏	62
5 细胞的生长与检测	70
5.1 细胞的个体生长	70
5.2 细胞的群体生长	75
5.3 细胞增殖的测定	80
6 遗传物质与基因	83
6.1 遗传物质的种类和性质	83
6.2 基因和基因组	85
6.3 可转移的遗传物质	89
6.4 生物体的基因转移	94
7 DNA 复制	95
7.1 复制子	95
7.2 DNA 复制机制	97
7.3 DNA 复制过程中的酶	99
7.4 复制过程	105
7.5 真核生物 DNA 的复制	108
8 DNA 损伤修复与目标菌种选育	110
8.1 DNA 损伤及修复	110
8.2 基因突变	114

8.3 目标菌种选育	121
9 转录	126
9.1 RNA 的酶促合成	126
9.2 RNA 分子的种类及转录后加工	133
9.3 真核生物的转录和 RNA 加工	137
10 蛋白质的生物合成	144
10.1 遗传密码的破译与特征	144
10.2 摇摆假设	147
10.3 蛋白质生物合成的机制	148
11 基因表达的调控	157
11.1 原核生物基因表达的调控	157
11.2 真核基因表达的调控	171
11.3 转录后的控制	180
11.4 真核蛋白质合成的控制	182
12 重组 DNA 技术	185
12.1 基因工程概述	185
12.2 载体	186
12.3 工具酶	191
12.4 克隆载体的宿主与表达载体	194
12.5 外源 DNA 的制备	197
12.6 连接反应	205
12.7 重组 DNA 转染细胞	207
12.8 重组 DNA 克隆的筛选和鉴定	210
13 生物反应器	214
13.1 概述	214
13.2 生物反应器的类型	214
13.3 生物反应器的结构特征	220
13.4 反应器中的热传递	221
13.5 生物反应器的灭菌操作	222
13.6 细胞的剪切敏感性与生物反应器设计	222
13.7 细胞培养用微载体	227
14 干细胞工程	235
14.1 干细胞的定义与分类	235
14.2 干细胞的生物学特点及其鉴别方法	237
14.3 干细胞的分离纯化与保存	240
14.4 干细胞应用前景展望	243
15 生物技术在医药工业中的应用	251
15.1 抗体的制备技术	251
15.2 疫苗制备	257
15.3 细胞因子	262

15.4 转基因蛋白质的表达形式.....	264
15.5 生物技术研究展望.....	266
参考文献	267

1 绪 论

生物技术一词最早是由一位匈牙利工程师 Karl Ereky 于 1917 年提出的, 他当时对该名词的定义是指利用甜菜进行大规模养猪, 即利用生物将原料转变为产品。实际上生物技术的历史与应用可以追溯到几千年以前, 如我国古代的杜康酿酒和古埃及的奶酪酿制。近代生物技术则开始于 19 世纪人类有意识地利用微生物进行大规模发酵生产, 当时的发酵产品主要有酒精、乳酸、柠檬酸和蛋白酶等初级代谢产物。而英国的 Fleming 爵士于 1928 年发现的青霉素是生物技术史上最重要的成果。第二次世界大战的爆发, 使青霉素很快成为最重要的抗生素, 并带动整个抗生素工业的发展, 成为生物技术的支柱产业。20 世纪 50 年代, 氨基酸成为生物技术产业的一个新成员, 到 20 世纪 60 年代, 酶制剂工业又成为生物技术产业的重要组成部分。

1953 年 Watson 和 Crick 发现了 DNA 双螺旋结构, 奠定了现代生物技术的基础, 1970 年限制性内切酶的发现使 DNA 重组成为可能。从此, 生物技术取得了迅猛发展, 生物技术逐步成为与微生物学、生物化学、化学工程、信息技术、药学、医学等学科密切相关的综合性学科。鉴于此, 1982 年国际合作及发展组织对生物技术的重新定义为: 生物技术是应用自然科学和工程学的原理, 依靠微生物、动物、植物体作为反应器将物料进行加工以提供产品为社会服务的技术。

1.1 现代生物技术研究内容与研究进展

近年来, 现代生物技术已成为一门分支众多、涉及多学科的综合性技术, 在农业、医药、轻工业、食品、环保、海洋和能源等方面得到广泛应用, 取得了一系列显著成绩, 尤其是医药生物技术成果显著。大量与人类疾病相关的基因已得到克隆和表达; 多种基因药物和疫苗在治疗和预防传染性、难治性疾病方面取得了显著成绩, 干扰素、白细胞介素、粒细胞集落刺激因子、促红细胞生成素、乙肝疫苗、甲肝疫苗等现代医药生物技术产品分别对治疗和预防肝炎、癌症和再生障碍性贫血有显著疗效; 干细胞研究、基因治疗及生物信息技术也取得一系列重要成就。此外农业生物技术在提高作物的抗病、抗虫、抗逆和品质改良方面发挥了重要作用, 目前世界各国已批准了数以千计的转基因作物进行大田实验, 生物技术成为 21 世纪最热门的领域之一。

1.1.1 基因药物与疫苗

1978 年 Genetech 公司的科学家成功地将编码人胰岛素两条链的基因转入一个载体上, 并在大肠杆菌中得到成功表达, 从而获得世界上第一个基因工程蛋白药物。1979 年该公司又成功克隆并在微生物中成功表达了人类生长激素。自此以后, 世界上著名的医药企业、生物技术公司、大学和科研院所对医药生物技术表现出了最大的热情, 利用 DNA 重组技术, 克隆并表达了包括红细胞生成素、白细胞介素、干扰素、粒细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子等在内的几十种基因工程药物。

除了基因工程药物外, 生物技术在疫苗的开发利用上也取得了重要成果。乙肝是我国的一种严重的传染病, 有 1.3 亿人是乙肝病毒的携带者, 每年有 2 000 万左右的肝炎病人, 防止肝炎病毒的传播是肝炎病防治的重要措施。我国已成功应用乙肝疫苗防止健康人感染乙肝病毒。2003 年 2 月爆发的非典型性肺炎 (SARS), 由于是由一种新的冠状病毒感染引起的急性传染病, 目前还没有特效药治疗, 给人民群众的生命安全带来了极大威胁, 也给国家的经济发展带来了巨大的不确定因素。为防止非典型性肺炎的传播, 研制疫苗是最有效的防治手段。国内有多家单位开始了对 SARS 疫苗的研究, 由北京大学医学部承担的 SARS 研究紧急启动项目之一《SARS 相关冠状病毒抗原肽疫苗的基础研究》, 最近取得阶段性成果。这项研究表明, 利用 HLA-A2 (人类白细胞抗原亚型之一) 抗原肽疫苗, 可以治疗和预防一半的 SARS 病毒感染。目前 SARS 疫苗已开始进行临床 1 期试验, 预计在两年后进入临床应用。

1.1.2 动物克隆与干细胞研究

常见的动物克隆手段是体细胞核移植技术, 即从体细胞中提取出细胞核并注射到已经去除自身细胞核的卵细胞中, 而后发育成动物个体。1997 年英国科学家宣布成功进行了绵羊的克隆, 并将其命名为“多利”。从此, 克隆技术风靡全世界, 并有个别极端科学家宣布要进行人的克隆。这一行为将极大地影响人类的伦理道德和法律秩序, 世界各国纷纷立法禁止对人类自身进行克隆。实际上, 动物克隆还存在很多技术上的难题, 世界上第一只克隆羊已经死亡。几年来, 许多科学家一直怀疑在克隆

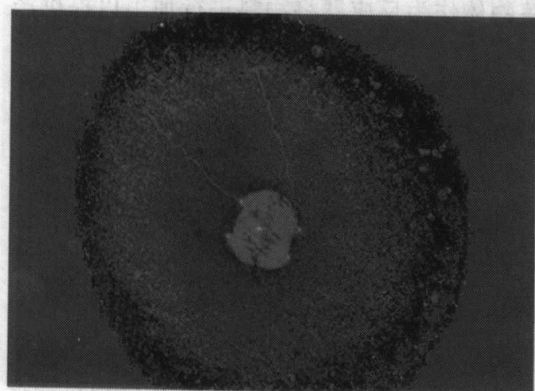


图 1-1 克隆胚胎细胞的分裂

胚胎中有什么东西干扰了细胞分裂。匹兹堡大学医学院的沙滕博士等人利用现有的 4 种细胞核移植技术, 对 724 个恒河猴卵细胞进行了克隆操作。研究人员共获得 33 个克隆猴早期胚胎, 但将其移植入代孕动物体内后, 这些胚胎经过初步的细胞分裂后无一真正孕育, 恒河猴的克隆胚胎中很多细胞内的染色体出现了紊乱。带有这样缺陷的胚胎尽管能完成最初的几次细胞分裂, 但最终无法完成进一步的发育过程。为了查明干扰正常细胞分裂的原因, 研究

小组对恒河猴克隆胚胎中与细胞分裂有关的物质进行了荧光标记。研究人员发现, 在恒河猴的克隆胚胎中, 指导染色体在有丝分裂过程中进行正确排列的纺锤体出现紊乱, 并且两种对纺锤体形成至关重要的蛋白质 NuMA 和 HSET 也出现了缺损, 图 1-1 显示克隆胚胎细胞的分裂不正常。

现有研究结果显示, 由于胚胎发育过程中存在着固有缺陷, 对人和其他灵长目动物进行生殖性克隆目前看来没有可能。其可能原因在于, 灵长目动物繁殖过程中对纺锤体组装的要求比其他哺乳动物“更为严格”。

由于对人和其他灵长目动物进行生殖性克隆目前看来没有可能, 因此科学家们对干细胞研究投入了巨大热情。在干细胞研究方面, 美国是世界上最先进的国家之一。从最初的骨髓移植算起, 干细胞研究在美国已进行了 30 多年。1998 年, 美国科学家成功地使人类胚胎干细胞在体外生长和增殖, 带动了全世界的干细胞工程研究热潮。目前, 大批美国公立、私立

机构都在研究干细胞的各种获取渠道以及它们的分化功能，并已发现可以从骨髓、胚胎、脂肪、胎盘和脐带等渠道获得干细胞。

中国的干细胞研究处于世界先进水平。中南大学的卢光绣教授 1999 年建立了人类体细胞克隆胚技术，并获得专利。2000 年始，她研究胚胎干细胞建系，现已成功建立了两株胚胎干细胞系。胚胎干细胞建系和人类体细胞克隆胚技术结合起来，可进一步诱导分化成为可供患者移植用的细胞、组织或器官，老年性痴呆、帕金森氏症、糖尿病等许多疾病将可彻底根治，将引起医学治疗的一次革命。

1.1.3 基因治疗

基因治疗是指向靶细胞或组织引入外源基因 DNA 或 RNA 片段，以纠正或补偿基因的缺陷，关闭或抑制异常表达的基因，达到治疗目的。1991 年 Rosenberg 等对 50 名黑色素瘤的晚期患者进行基因治疗。将外源的肿瘤坏死因子基因导入肿瘤浸润淋巴细胞（TIL），结果这种 TIL 细胞能在肿瘤部位杀死肿瘤细胞，治疗取得了一定效果。

反义脱氧寡核苷酸（antisense oligodeoxynucleotide, ASODN）是一段与 mRNA 或 DNA 特异性结合并阻断其基因表达的人工合成的 DNA 分子。ASODN 能通过封闭或抑制肿瘤细胞和病毒的关键编码基因来特异性抑制肿瘤细胞增殖和病毒的复制，是治疗肿瘤和病毒性传染病的潜在新型药物。目前在动物体内评价的反义药物有 10 余种，其中具抗肿瘤作用的有 7 种，具抗病毒作用的有 1 种，其他如作用于心血管、代谢、免疫及细胞黏附系统的有 4 种。

利用 ASODN 可对抗变异快的病毒。流感病毒一直威胁人和动物的健康，主要因为它变异快，从而导致疫苗的保护性小或无保护性。为此科学家们正在积极研究一种针对病毒的 PB1（是流感病毒在复制和转录中具有重要作用的多聚酶复合体的组成部分，具有高度的保守性，且在流感病毒各型中具有同源性）的 ASODN，其可导致病毒的复制受到抑制，从而达到抗病毒的作用。利用该原理可寻找对抗变异快的 HIV 病毒和 SARS 病毒的 ASODN。

1.1.4 生物信息技术

生物信息技术诞生于 20 世纪 80 年代末。这几年来，信息和生物领域内的重大成果层出不穷，发展极为迅速。生物信息有哪些主要内容？首先是获取人和各种生物的遗传密码。如今，人类基因组图谱已经公布，大约有 30 亿碱基对，10 万个左右基因。其次，寻找新的基因和发现单核苷酸多态性（SNP）。不同人种的头发、肤色、眼睛、鼻子不同，原因就在于他们的基因存在着差异。有的人吸烟喝酒却长寿，有的人自幼就病痛缠身；同一种治疗肿瘤的药物对一些人非常有效，对另一些人则完全无效等，原因在于存在单核苷酸多态性，也即单个碱基上的变异。迄今已发现了 300 多万个单核苷酸多态性。再次，随着完整的基因组数据越来越多，人类可以利用这些信息，分析研究若干重大生物学问题，如生命的起源是什么、生命是如何进化的等。举例来说，美国《科学》杂志载文称，人和黑猩猩在携带遗传信息的物质碱基的序列上仅有 1.23% 的不同，但同源的人和黑猩猩在智力、行为等方面却是天壤之别，生物信息技术有望揭开这个谜底！

生物信息技术包括两层含义。首先是利用信息技术管好和使用这些生物信息数据，做好海量数据的收集、整理与服务工作。所有生物体的基因由 4 种单核苷酸（即 4 种核苷酸 A、T、G、C）组成，基因组就是一本写好的书。人类基因组这本“天书”就由 30 亿个字符组成。30 亿个字符什么概念？一部 350 卷的大百科全书！管好和使用好这些数据就得借助大

型计算机。其次是利用生物技术促进信息技术的发展。在计算能力上,1997年,超级计算机“深蓝”战胜国际象棋特级大师卡斯帕罗夫,其运算速度每秒不到1万亿次;而今,最快的超级计算机运算速度每秒达到12.3万亿次;日本正在开发的超级计算机“宇宙模拟器”并行运算速度可提高到每秒130万亿次。但传统的硅芯片计算机也有麻烦,由于面临耗能和散热等问题,它将不可避免地遭遇发展极限,人们越来越寄希望于全新的技术带动信息技术的发展。生物技术提供了可能性!2001年1月19日,美国能源部桑迪亚国家实验室、塞莱拉公司以及康柏电脑公司联合签署了一项协议,协议的内容就是共同开发新型超级计算机。2002年11月22日出版的《自然》杂志上,以色列科学家宣布研制出一种由DNA分子和酶分子构成的微型“生物计算机”,1万亿个这样的计算机仅一滴水那样大,运算速度达到每秒10亿次,准确率为99.8%。

利用生物信息技术使新药开发发生天翻地覆的变化。一种药物从思想酝酿到走向市场一般要10年左右的时间,耗资3亿~5亿美元。但有了灵活的生物信息工具,就可智能化、因人而异、高效率地开发相应的药物。使药物开发周期缩短一半到6年左右,成本下降40%以上,而且新药提前进入市场将取得更大的利润。

1.1.5 农业生物技术

农业生物技术主要是以转基因技术,将某些生物的基因转移到其他生物物种上,使原物种出现新的性状或产物,提高产量与改善品质,以转基因生物为原料加工生产的食品就是转基因食品。美国食品和药物管理局(FDA)于1994年5月批准首个转基因食物——西红柿FLAVRSAVR进入消费市场。Calgene公司利用抗感觉(anti-sense)技术阻碍了西红柿中多聚半乳糖醛酸酶基因的表达式,延缓了西红柿的成熟,从而培育出了转基因西红柿。FLAVRSAVR西红柿在采收后能保持其结实状态,这样它们在运输前、在保留其枝藤的情况下能放更长的时间。自1996年美国开始大规模种植转基因植物以来,转基因食品扩散的速度超乎很多人的想像。据不完全统计,1996年全球转基因农作物耕种面积为170万公顷,2000年增至4420万公顷,2002年更是达到5867万公顷。其中转基因大豆和转基因玉米的耕种面积,约占总耕种面积的80%。据报道,目前,中国转基因作物种植面积超过6.67万公顷(100万亩),有6种转基因植物已被批准商品化。

1.2 现代生物技术对人类社会生存的影响及其前景

现代生物技术在近20多年来取得了长足发展,许多专家将现代生物技术产业称为21世纪的朝阳产业。这是由于现代生物技术具有其他技术无可比拟的优越性,即可持续发展。面对人口膨胀、资源枯竭、环境污染、新的致命性疾病不断出现等一系列关系到整个人类生死存亡的严重问题,人们越来越深切地认识到发展具有可持续发展的新技术、新产业的必要性和紧迫性。由于生物技术是以生物为原料生产产品的,其原料具有再生性,生产过程条件温和,产品种类丰富多样,对环境的破坏性小,甚至可利用生物对环境污染进行治理。因此生物技术必然会在21世纪获得更大发展。

1.2.1 现代生物技术对人类生活的影响

国际上生物技术研究已取得的成果主要集中在医药领域,这体现了生物技术以人为本的

研究特性，现代生物技术极大地改善了人类生活的质量。例如：①可以更加准确快速地诊断难治性和遗传性疾病；②开发疫苗，预防和治疗传染性、难治性疾病；③开发可以生产化学药物、生物多聚体、氨基酸、酶类和各种食品添加剂的微生物；④有效提高作物的产量和品质，获得具有抗病虫害、抗逆境、品质优良的作物批准；⑤简化从环境中清除污染物和废弃物的程序，并将这些污染物和废弃物再生转化为可利用的物质。

目前，生物技术与人们的生活息息相关，疫苗使人们从过去多种恐怖性疾病如肺结核、脊髓灰质炎中解脱出来，对不断出现的新的致命性传染性疾病要依靠疫苗进行预防和治疗。为防治 2003 年出现的非典型性肺炎（SARS），国家投入大量人力和财力进行疫苗开发；人类基因测序计划的完成和基因组计划的进行使人们可以个性化服药，避免药物过敏造成的损害；胰岛素、干扰素、白细胞介素等基因工程药物已大批量生产，并在难治性疾病的治疗中发挥了重要作用；PCR、Southern 杂交等方法已广泛应用于多种疾病的分子诊断；干细胞技术应用于遗传疾病的治疗的研究也正在进行。这些成就说明，现代生物技术已从多方面深刻地影响人们的生活质量，生物技术产业具有旺盛的生命力和巨大的市场前景。

1.2.2 现代生物技术对人类社会和环境的影响

虽然现代生物技术领域的发展已带来了巨大的社会和经济效益，但技术所具有的巨大力量也给人类社会带来了许多意想不到的冲击，并可能产生许多人们始料未及的后果。现代生物技术是一把双刃剑，它既可以造福人类，也可以荼毒人类。利用现代生物技术可以制造致命的生物武器、制造克隆人和超人，破坏整个人类社会的和平和安宁。因此，现代生物技术是否会失去控制成为毁灭人类的凶手，哪些研究应该支持和鼓励，哪些研究应当禁止，已成为人们共同关注的问题。

在现代生物技术对人类和自然环境的影响方面，人们关心的主要问题有如下几点。①那些经过基因改造的物种是否会对其他生物体和环境造成危害。②使用 and 开发基因工程药物是否会降低自然界的生物多样性。③人是否也可以成为基因工程操作的对象。④基因诊断的程序是否会侵犯个人隐私权。⑤用现代生物技术生产的药物进行治疗是否会压抑同样有效的传统治疗方式。⑥农业生物技术是否会彻底改变传统的耕作方式。⑦现代生物技术专利的申请是否会阻止科学家之间自由的学术思想交流。有些问题的关注还受宗教和文化的影响，如干细胞研究，在传统欧洲国家是反对的，而治疗性干细胞研究在中国是鼓励和支持的。⑧现代生物技术能否有效对付严重危害和威胁人类健康与生命安全的传染性疾病。

现代生物技术能深刻影响人类社会的生活和生存环境，因此了解和熟悉现代生物技术的基本原理和方法，努力使生物技术造福于人类，避免其产生破坏性后果是生物科学工作者应尽的责任。

2 微生物的分类与分类技术

现代生物技术的研究与应用离不开微生物,从传统生化产业到现代医药生物技术。如抗生素、发酵酸奶菌种的选育;目的基因的克隆,宿主细胞的选择;重大传染性疾病疫苗的生产都与微生物密切相关。20世纪80年代以来,一大批以细胞因子为代表的基因工程药物如干扰素、白细胞介素、粒细胞集落刺激因子等被批准上市,成为治疗肿瘤、心脑血管疾病、肝炎等严重危害人类健康疾病的重要药物,这些药物都是将外源基因转入微生物细胞进行发酵培养。微生物成为生物技术的重要载体和工具。

2.1 微生物的分类

分类是认识客观事物的一种基本方法。人们要认识、研究和利用各种微生物资源也必须对它们进行分类。研究微生物分类理论和技术方法的学科称为微生物分类学(microbial taxonomy)。分类学内容涉及三个相互依存又有区别的组成部分:分类、命名和鉴定。分类(classification)是根据一定的原则(表型特征相似性或系统发育相关性)对微生物进行分群归类,根据相似性或相关性水平排列成系统,并对各个分类群的特征进行描述,以便查考和对未被分类的微生物进行鉴定;命名(nomenclature)是根据命名法规,给每一个分类群一个专有的名称;鉴定(identification或determination)则是指借助于现有的微生物分类系统,通过特征测定,确定未知的、新发现的或未明确分类地位的微生物所应归属分类群的过程。20世纪70年代末以来,根据寡核苷酸序列编目分析法对16S rRNA(18S rRNA)序列进行比较,结合其他表型特征如细胞核中核仁、核膜的有无,细胞壁中是否有胞壁酸,mRNA转录后是否需要剪接、加帽、加尾等特征,将生物分成三界(Kingdom)(后来改称三个域):Bacteria(细菌)、Archaea(古生菌)和Eukarya(真核生物)。

2.1.1 分类单元及其等级

分类单元(taxon,复数taxa)是指具体的分类群,如原核生物界(Procaryotae)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等都分别代表一个分类单元。由上而下分类单元依次是:界、门、纲、目、科、属、种。在分类中,若这些分类单元的等级不足以反映某些分类单元之间的差异时也可以增加“亚等级”,即亚界、亚门……亚种,在细菌分类中,还可以在科(或亚科)和属之间增加族和亚族等级。值得强调的是,分类单元的等级(阶元)只是分类单元水平的概括,它并不代表具体的分类单元。

除上述国际公认的分类单元的等级外,在细菌分类中,还常常使用一些非正式的类群术语。如亚种以下常用培养物、菌株、居群和型;种以上常使用群、组、系等类群名称;近年伍斯还在界之上使用域(domain)(他把全部生物分为古生菌域、细菌域和真核生物域,域下面再分界),把“域”作为分类单元的最高等级。下面简要介绍一些常用的类群术语。

(1) 培养物(culture) 指一定时间一定空间内微生物的细胞群或生长物。如微生物的斜面培养物、摇瓶培养物等。如果某一培养物是由单一微生物细胞繁殖产生的,就称之为该

微生物的纯培养物 (pure culture)。

(2) 菌株 (strain) 从自然界中分离得到的任何一种微生物的纯培养物都可以称为微生物的一个菌株；用实验方法 (如通过诱变) 所获得的某一菌株的变异型，也可以称为一个新的菌株，以便与原来的菌株相区别。菌株是微生物分类和研究工作中最基础的操作实体。由于同种或同一亚种的不同菌株之间，某些生物学特性可能存在一定差异，就某些非鉴别性特征 (不是界定种或界定亚种的特征) 而言，不同菌株可能存在重要差别。因此在实际工作中，除了注意菌株的种名外，还要注意菌株的名称。菌株名称常用数字编号、字母、人名、地名等表示。如枯草杆菌 ASI 398 (*Bacillus subtilis* ASI 398) 和枯草杆菌 BF 7658 (*Bacillus subtilis* BF 7658)，分别代表枯草杆菌的两个菌株 (ASI 398 和 BF 7658 分别为菌株的编号)，这两个菌株，前者可用于生产蛋白酶，后者则可用于生产 α -淀粉酶。

(3) 居群 (population) “population” 一词也有人译为群体、种群或群丛等，是指一定空间中同种个体的组合。每一个物种在自然界中的存在，都有一定的空间结构，在其分散的、不连续的居住场所或分布区域内，形成不同的群体单元，这些群体单元就称居群。

(4) 型 (form 或 type) 常指亚种以下的细分。当同种或同亚种不同菌株之间的性状差异不足以分为新的亚种时，可以细分为不同的型。例如，按抗原特征的差异分为不同的血清型；按噬菌体裂解反应的不同分为不同的噬菌型等。由于 “type” 一词既可代表 “型” 又可代表 “模式”，为避免混淆，现在对表示型的词做了修改，用 “-var” 代替 “-type”。上述亚种以下类群名称，虽然是非法定的，但却是普遍使用的习惯用语，其含义相对而言较明确。在细菌分类中还常用群 (group)、组 (section)、系 (series) 等，这些类群名称用在不同场合，常常有不同的含义。可以是种水平上的类群，也可以代表属以上等级的分类单元的集合。如《伯杰氏系统细菌学手册》第 1 版中，主要根据表型特征将全部原核生物分为 33 组；将假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 内的 90 个种分为 5 组。因此，在阅读文献时应注意区别。下面分别介绍亚种以上等级正式分类单元的含义。

(5) 种 (species) 是生物分类中基本的分类单元和分类等级。种作为分类单元，指的是 “物种”，而物种概念目前还是生物学中尚未完全解决的问题。在高等生物中，物种通常被看作是彼此杂交能繁殖的自然群体，这个群体与其他群体在生殖上是隔离的。因此 “生殖隔离” 被看作是区分物种的标准。由于原核生物缺乏严格意义的有性杂交，很难据此标准对微生物的种进行种的定义。目前有人根据基因序列资料来分种，如把 DNA 杂交同源性在 60%~70% 以上，或者 16S rRNA 序列同源性达 97% 以上的菌株定为一个种。这一定种标准虽有其科学性，但在微生物分类中，目前尚难以普遍采用。实际上，目前微生物分类中已经描述的种仍主要是根据各种特征 (其中主要是表型特征) 综合分析划分的，因此微生物的种可以看作是是具有高度特征相似性的菌株群，这个菌株群与其他类群的菌株有很明显的区别。正是由于微生物种的划分缺乏统一的客观的标准，分类学上已经描述的种潜在着不稳定性，有的种可能会随着认识的深入、分种依据的变化而进行必要的调整。

(6) 亚种 (subspecies) 或变种 (variety) 当某一个种内的不同菌株存在少数明显而稳定的变异特征或遗传性状而又不足以区分成新种时，可以将这些菌株细分成两个或更多的小的分类单元——亚种。亚种是正式分类单元中地位最低的分类等级。变种是亚种的同义词、在《国际细菌命名法规》(1976 年修订本) 发表以前，变种是种的亚等级，因 “变种” 一词易引起词义上的混淆，1976 年后，细菌种的亚等级一律采用亚种而不再使用变种。

(7) 属 (genus) 是介于种 (或亚种) 与科之间的分类等级，也是生物分类中的基本分

类单元。通常是把具有某些共同特征或密切相关的种归为一个高一级的分类单元，称之为属。在系统分类中，任何一个已命名的种都归属于某一个属。当某一个种与其他相关属的种具有重要的区别时，也可以鉴定为只有一个种的属。就一般而言，微生物属间的差异比较明显，但属的划分也没有客观标准。因此，属水平上的分类也会随着分类学的发展而变化，属内所含种的数目也会由于新种的发现或种的分类地位的改变而变化。

(8) 属以上等级分类单元 与属的划分一样，系统分类中，把具有某些共同特征或相关的属归为更高一级的分类单元称为科；再把科归为目；……依此类推。值得提出的是：在一个完整的分类系统中，每一个已命名的种都应该归属到某一个属、科、目、纲、门、界中。表 2-1 为普氏立克次体的分类。但实际上，许多细菌类群其科、目等级的分类学关系还不明确，所以有相当一部分细菌的属未能归入相应的科目中。至于纲、门、界的划分，目前也主要处在积累资料的研究探讨阶段，所以细菌（原核生物）的分类迄今未能建立一个完整的分类系统，以使各种细菌在各个分类等级水平上都有明确的分类位置。

表 2-1 细菌分类单元的等级系统及分类单元的学名

分 类 等 级			分 类 单 元	
中文名称	英文名称	拉丁语名称	学名词尾	举 例 ^①
界	Kingdom	Regnum		Procaryotae(原核生物界)
亚界	Subkingdom	Subregnum		
门	Divisio	Divisio		Gracilicutes(薄壁菌门)
亚门	Subdivisio	Subdivisio		
纲	Class	Classis		Scotobacteria(暗细菌纲)
亚纲	Subclass	Subclassis		
目	Order	Ordo	-ales	Rickettsiales(立克次体目)
亚目	Suborder	Subordo	-ineae	
科	Family	Familia	-aceae	Rickettsiaceae(立克次体科)
亚科	Subfamily	Subfamilia	-oideae	
(族)	Tribe	Tribus	-eae	Rickettsieae(立克次体族)
(亚族)	Subtribus	Subtribus	-inae	
属	Genus	Genus		Rickettsia(立克次体属)
亚属	Subgenus	Subgenus		
种	Species	Species		Rickettsia prowazekii(普氏立克次体)
亚种	Subspecies	Subspecies		

① 根据《伯杰氏系统细菌学手册》第 1 版第 1 册 (1984)。

2.1.2 分类单元的命名

生物名称分两类，一类是区域性的俗名 (vernacular name)；另一类是国际上统一使用的名称，即学名 (scientific name)。俗名是一个国家或地区使用的普通名称，如汉语中把引起人结核病的细菌叫“结核杆菌”，而英语称“tubercle bacillus”。俗名的优点是在一定的区域内通俗易懂便于记忆，但俗名有局限性，尤其是不便于国际间的交流。所以为了使生物分类单元的名称能在国际上通用，就需要制定一个为各国生物学工作者共同遵守的命名法则，

即国际生物命名法规，来管理生物分类单元的命名，以确保生物名称的统一性、科学性和实用性。下面简要介绍有关微生物命名的基本常识。

2.1.2.1 分类单元的命名

所有正式分类单元（包括亚种和亚种以上等级的分类单元）的学名，必须用拉丁词或其他词源经拉丁化的词命名。

(1) 属名 属名用一个单数主格名词或当作名词用的形容词来表示，可以是阳性、阴性或中性，首字母要大写。例如，*Bacillus*（芽孢杆菌属）（阳性），拉丁词，原意为“小杆菌”，因该属菌有芽孢而译为“芽孢杆菌属”。*Salmonella*（沙门菌属）（阴性），以美国细菌学家 D E Salmon 的姓氏命名。

亚属分类单元的命名和属名相同。

(2) 种名 种名采用双名法（binomial nomenclature）命名，即种的学名由属名和种名加词两部分组合而成。第一个词为属名，首字母要大写；第二个词为种名加词，常用形容词（要与属名性别一致），也可以用人名、地名、病名或其他名词（名词用主格或所属格形式），种名加词首字母不大写。例如，*Pseudomonas aeruginosa*（铜绿色假单胞菌），其中 *Pseudomonas* 是属名（假单胞菌属）（阴性）；*aeruginosa* 是种名加词，是拉丁语形容词（阴性），原意为“铜绿色的”；*Mycobacterium tuberculosis*（结核分枝杆菌），其中 *Mycobacterium* 是属名（分枝杆菌属），系希腊词源的复合词（中性），*tuberculosis* 是种名加词，是希腊词和拉丁词缀合成的名词所属格形式，意为“结核病的”。当泛指某一属细菌而不特指该属中任何一个种（或未定种名）时，可在属名后加 sp. 或 spp.（分别代表 species 缩写的单数和复数形式）表示，如 *Streptomyces* sp.（一种链霉菌），*Micrococcus* spp.（某些微球菌）。

(3) 亚种名 亚种名为三元式组合，即由属名、种名加词和亚种名加词构成。

(4) 属级以上分类单元的名称 亚科、科以上分类单元的名称，是用拉丁或其他词源拉丁化的阴性复数名词（或当作名词用的形容词）命名，首字母都要大写。其中目、亚目、科、亚科、族和亚族等级的分类单元名称都有固定的词尾（后缀）。

此外，在分类单元名称的后面还可以附上命名人的姓名和命名年号。例如 *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884，这表明该菌（金黄色葡萄球菌）是由 Rosenbach 1884 年命名的。

属、种和亚种等级的分类单元的学名在正式出版物中应用斜体字印刷，以便识别。

2.1.2.2 命名模式及其指定

由于分类单元的划分缺乏一个易于操作的统一标准，为了减少因采用不同标准界定分类单元所造成的混乱，系统分类要采用“模式概念”。即根据命名法规要求，正式命名的分类单元应指定一个命名模式（简称模式）作为该分类单元命名的依据。种和亚种指定模式菌株（type strain）；亚属和属指定模式种（type species）；属以上至目级分类单元指定模式属（type genus）。因此，当某一菌株被鉴定为一个新种或新的亚种时，该菌株就应指定为该种或该亚种的模式菌株；如果有几个菌株同时被鉴定为一个新种或亚种，则必须指定其中一个较有代表性的菌株作为该种或亚种的模式菌株。模式菌株应送交菌种保藏机构保藏，以备查考和索取。模式种和模式属的确定也大体如此。

2.1.2.3 新名称的发表

根据细菌命名法规的规定，有效发表新的细菌名称应在公开发行的刊物上进行，在菌种目录、会议记录、会议论文摘要等上进行的均不能视为有效发表。此外，若新名称是在国际