

遗传工程参考资料

(内部参考)

(二)

中国科学院图书馆

一九七七年四月

目 次

综 述

- 1、展望基因工程应用于工业的前景..... 1
- 2、共生固氮特性、转移的研究现状..... 5
- 3、质体工程与环境保护..... 13
- 4、人工合成具有活动性功能的基因..... 17

译 文

- 5、真核基因在原核生物中的表现..... 19
- 6、允许真核DNA在细菌中调控表达的一种质体无性繁殖载体..... 23
- 7、质体和病毒作为DNA无性增殖实验的载体..... 26
- 8、什么控制基因..... 27
- 9、酵母DNA在大肠杆菌中实现的表达..... 34

会议消息报导

- 10、遗传工程的成龙配套..... 39
- 11、细菌质体生物学..... 45
- 12、第九届迈阿密 冬季讨论会——重组DNA的分子无性增殖..... 45
- 13、美国微生物学协会举行第二次染色体外成分会议..... 47
- 14、1976——1978年国外涉及质体和遗传工程专业

14、1976——1978年国外涉及质体和遗传工程专业 会议简况	49
---	----

15、遗传工程研究的新成果

——胰岛素基因转移到微生物细胞中获得成功！	53
-----------------------------	----

展望基因工程应用于工业的前景（综述）

DNA体外重组技术最重要之点在于克服生物远缘杂交的困难，所得杂交体（重组体）有可能在寄主细胞中实现功能性的表达，若真能这样的话，这不仅仅对基因结构与功能的研究以及鉴定基因产物等方面极为重要，而且在实际应用方面将开辟了新的途径。

人们知道，细菌细胞虽没有真正的核，但有类似染色体的线状结构，它是由DNA所构成，系双链螺旋状结构，彼此交缠着，象染色体那样在细胞内具有制造蛋白质的全部信息，这是个传统的观念，其实，也并非全部，因为有些蛋白质并不全是受所谓染色体基因的控制，还受染色体外遗传成分——质体基因的控制，二者按分子的大小有所不同，质体比染色体小得多，约为染色体的0.1——10%，它控制执行特殊功能的酶，因此作为基因工程的载体之一——质体加强对它基础理论的研究显有非常重要意义。

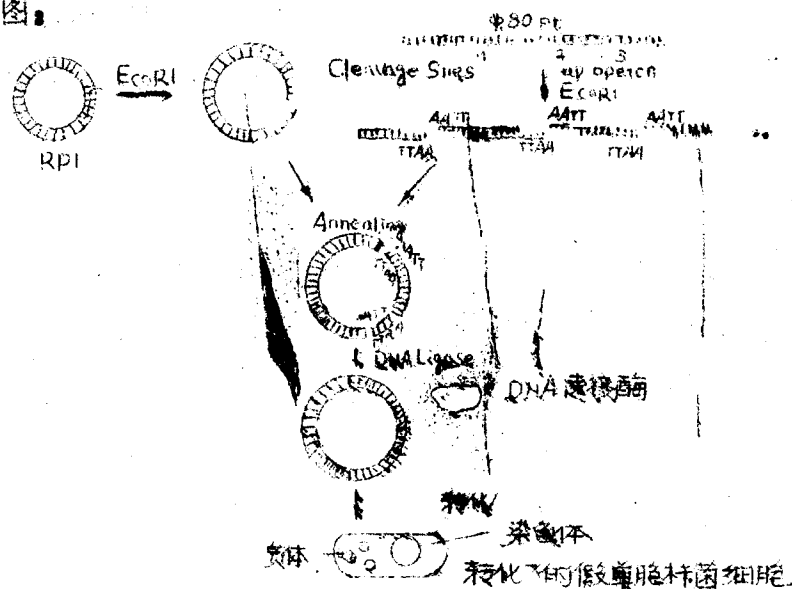
这里仅举些例子来说明基因工程应用于工业生产的可能性和索取高价值产品的种种设想，现作一简单介绍。

一、高等动物制造蛋白质基因若能嵌入到细菌质体上去，并且实现无性增殖，而且能正确地转录和翻译，即确实能在细菌中产生动物性蛋白的话，那么人们就有可能通过微生物发酵途径最经济、最快地生产大量所急需的有价值的产品，如人体免疫球蛋白、抗血友蛋白、胰岛素、干扰素、乳酪、各种激素以及生长因子等等。

* 当病毒侵入细胞后，细胞内产生一种干扰素即蛋白质，它可抑制病毒的活动，人们在设想把这种干扰素基因转移到机体内使之产生干扰素以抗病毒（Molz D, 1975）。

二、深入研究了各种致病动物病毒基因组上的基因序列时，使得人们有可能分离出这样的基因组仅含有控制病毒外壳蛋白基因。这种片段如能通过分子杂交如质或噬菌体DNA实行连接所得分子重组体转入某种特定细菌中去，并表现其活性功能。那么这种动物病毒外壳蛋白就有可能通过发酵方法进行大量生产。这种抗原性外壳蛋白就可用作疫苗（Chakrabarty A. M 1976），毫无疑问，进行这类完全无害的研究，只有给人类带来好处，可喜的是印度 Sujata D (1975) 用基因转移技术获得新的菌株，从而创造一种新类型的霍乱和伤寒疫苗。这一成果在临床上的应用效果如何没有进一步阐明。

三、最近 Chakrabarty A. M (1976) 报导，试图从大肠杆菌提取 trp 操纵子，系大肠杆菌外源DNA无害部分，含有合成色氨酸的密码，并把它引入到假单胞杆菌（Pseudomonas）中去，使之产生色氨酸所需要的酶，获得被转化的假单胞杆菌细胞的程序见下图。



当色氨酸操纵子基因嵌入质体后，此重组体转到细菌中则产生500拷贝，这样，色氨酸合成酶基因拷贝数也是500。而色氨酸酶蛋白达到细胞蛋白的25% (Alikhanian S. I. 1976) 如果酶产量与活性成正比例的话，那么这项成果在生产的应用潜力必将对其他氨基酸生产是个巨大的促进！

四、曾报导链霉菌有质体存在，同一菌株可以产生几种抗菌素，如天蓝色链霉菌 (*Streptomyces Coelicolor*) 产生次甲基霉素 (Methylenomycin) 和放线紫红素 (Actinothoridin)，前者受质体基因控制，后者受染色体基因控制 (Sermont; G. 1976)，通过质体 (如SOP1) 或良性放线菌噬体 (如 ϕ_1) 将遗传物质从一种菌传递给另一种菌，实现放线菌不同种间的遗传物质的传递 (Преедсавкевичка Я. Т. Н. 1974) 苏联从链霉素产生菌培育出一种遗传工程菌，使链霉素产量比原始菌株有很大提高 (1977)，在印度通过遗传工程途径培育出能同时产两种抗菌素的新菌种 (1973) 美国 Cohens 实验室正在设想把链霉素产生菌产链霉素遗传物质转移到大肠杆菌中去，以大量生产链霉素 (1974)。

五、除了上面谈到的外，近年 Chakrabarty A. M 创造一种遗传工程菌——带有多质体的假单胞杆菌，不仅应用于消除汞化合物 ($HgCl_2$)、浮油 (烃类) 等有害物质产生良好效果 (1976) 而且还有可能把这种对某些贵重金属离子有特别亲和力的遗传工程菌株应用于从三废中回收贵重的稀有金属如金、铂、铀等 (1975)。

金铂往往是铜、镍矿的付产品。这样看来，人工创造的遗传工程菌株有目的地为开发综合利用，环境保护、回收贵重金属等许多方面将发挥作用。

结语

从上面谈的情况可以看出，成功地获得遗传工程菌种在工业上的应用是有重要意义的，载体（质体、噬菌体、动物病毒）在获得遗传工程菌中占有极重要的地位，研究其结构与功能对基因工程学的发展显有特殊意义，异源生物性状的携带是通过载体来完成的。遗传工程菌种最突出之点：打破生物科属间特异性的界限，按人的意愿取出或综合生物某一有益性状，使之能转移到新的宿主细胞中去，并有完全充分地功能表达；而且有遗传的稳定性和生态的适应性，这样，人工创造的遗传工程菌种应用于工业化生产的价值就在于，某些所需要的特定产品（如免疫球蛋白、疫苗、氨基酸、抗菌素等等）将会成倍增长。毫无疑义，也会促进微生物工业多快好省地发展，遗传工程菌的潜力资源也就在这里。现正等待人们去努力发掘，“世上无难事，只要肯登攀”。

亦工

1977.3.

共生固氮特性转移的研究现状 (综述)

固氮微生物与高等植物共生固氮特性主要表现有三方面：一是感染性即固氮微生物对植物宿主具有结瘤能力；二是有效性即共生体行共生固氮能力；三是专异性即共生固氮微生物表现对一定植物宿主具有结瘤固氮能力。这三方面特性是相互联系、相互制约。研究这三方面特性转移问题是生物固氮中的重大理论课题。应用现代遗传学成就有可能实现这些特性的转移及其控制。通过转导、转化、接合、融合以及遗传工程技术来实现这些特性的转移，这是当前固氮遗传学中引起注意的重要研究课题。

转导法即通过具有感染力而无致病力的噬菌体把供体的遗传性传给受体。转化法即采用从供体中取得DNA在特殊条件下培养受体细胞使遗传特性经DNA而转移；接合是通过带有F因子的供体细胞与未带F因子的受体细胞接触，藉性须之助使供体DNA传递至受体细胞，从而获得接合体式接合子；融合系选择适当酶溶解细胞壁使之两个不同亲本原出质融合在一起形成杂交细胞（融合体），经分裂与繁殖而发育成为双亲优良性状后代。遗传工程技术是利用外源DNA或人工合成DNA分子片段经酶切连后，通过载体于体外实行分子重组，重组体引入宿主细胞表达所携带新的遗传信息特征的一项新兴技术。

这些方法在共生固氮特性转移的研究中得到了实际应用。根瘤菌的转化包括非共生特性和共生特性转化的两方面。这里除着重介绍有关根瘤菌共生特性的转化外，还简介基因工程应用于生物固氮特性转移的一些研究近况。

转化法在根瘤菌遗传学上已经有了成功的实际应用。五十年代 Bafassa R 开展了这方面研究,六十年代 Bafassa G 对这方面研究结果做了全面总结 (1963, 1964)。Łorkiewicz Z (1972) 采用转化法实现了一株大豆根瘤菌的结瘤特性能够转移给另一株在大豆上不结瘤的大豆根瘤菌。结果这株菌能在大豆植物上具有形成根瘤能力。结果在培养基中添加丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸,则使这种特性转化效果最好。这仅是菌株之间的转化,而在根瘤菌种间的转化在 Bafassa R 的研究中做了大量工作。他成功地将苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*) 的 DNA 处理羽扇豆根瘤 (*R. lupini*) 和大豆根瘤菌 (*Rh. Japonicum*), 而使受体菌大豆根瘤菌获得苜蓿根瘤菌的特性,结果它能在苜蓿植物上形成根瘤,从其结瘤时间、根瘤形态与苜蓿根瘤相似,而且结的是有效根瘤。如果将受体菌羽扇豆根瘤菌再次用给体菌苜蓿根瘤菌 DNA 处理,则在苜蓿上获得有效根瘤。Lange RT 等 (1961) 用转化法使三叶草根瘤菌 (*Rh. trifolii*) 在苜蓿上结瘤,以后日本工作者将两个不同种的根瘤菌如四季豆根瘤菌 (*Rh. Phaseoli*) 和豌豆根瘤菌 (*Rh. leguminosarum*) 进行转化,发现四季豆根瘤菌 DNA 处理受体菌豌豆根瘤菌,结果豌豆根瘤菌能够在普通菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 上形成根瘤。

从上述结果可以看出,在根瘤菌属中种间转化的成功说明根瘤菌的感染性、有效性及其专异性均受遗传物质 DNA 控制,而这种共生特性的表现及其发展不仅受细菌遗传因子,而且也受植物遗传因子及其相互作用所控制 (Marecckowa, H. 等)。

近几年来,许多国家在研究如何把豆科根瘤菌引入非豆科植物

特别是谷物等经济作物中行有效共生固氮作用？这样一个具有很重要实践意义的理论问题引起了许多科学工作者的兴趣和极大注意。遗传工程技术作为一种手段来探索、研究和控制不同种属的共生特性的转移便具有极为重要的价值。先看看四年前澳大利亚科学工作者 Trinick M.J. (1973) 开展非豆科植物共生固氮的研究，尽管他还没有应用遗传工程技术，但基于他自己多年的实验所得结果是很有意思的，他发现榆科植物（非豆科）中糙叶山黄麻*（*Trema aspera*）根瘤内生菌（除类似放线菌的外，也有类似豇豆族慢生长型根瘤菌）不仅在非豆科植物（5个科，7个种）上结瘤，而且能在若干豆科植物（如 *Vigna sinensis*、*Vigna sinensis sesquipedalis*、*Phaseolus*

atrovirens 和 *Ph. latyrodides*）形成有效根瘤，从根瘤组织学、细胞学分析得到充分证明（Trinick M. J., 1976）。还有两点值得注意：1. 这种内生细菌比豇豆根瘤菌（*Rh. vigna*）有更大范围的结瘤固氮作用；2. 具有这种作用可能是受一种共有的扩散因子所制约（Hardy R. W等，

1975），然而，这一事实有力地证明了某些非豆科植物根瘤的内生菌未经任何诱变处理能在豆科植物上形成有效根瘤，实现了宿主植物科间的天然交互感染性，这是非常有意义的。但是，在豆科植物上形成根瘤的共生菌能否再引起榆科植物的根瘤？能否实现在其他豆科植物上结瘤？是否结有效瘤？所谓扩散因子的本质是什么？均有待作进一步的研究。

*后为光叶山黄麻（*Trema cannabina*）

Trinick所取得这项成果无疑对研究固氮微生物与非豆科重要粮食作物之间建立共生联系提供了最有意义的启示。所谓共生联系应从三个方面(结合性共生、专异性共生和寄生性转变为共生性)进行讨论。过去多重于专异性共生方面的研究,其他两方面研究得很有限,然而这两方面研究的价值并不亚于专异性共生。

1)、关于结合性共生现象(associative symbiosis): 粮食植物根际中存在某些自生固氮微生物,这类微生物可能侵入到植物根皮层细胞,一般不引起结瘤,但行共生固氮,为双方创造一个互为有利的生理环境。这种共生虽没有表现出根瘤形态的特征,但这样一个生理过程就是一种结合性共生现象。如雀稗固氮菌(*Azotobacter paspali*)和雀稗(*paspalum notatum*)之间、带脂螺菌(*spirillum lipoferum*)与俯仰马唐(*Digitaria decumbens*)、玉米以及热带草类的相互关系就是一种结合性共生固氮的联系,如同豆科根瘤菌那样有效地行共生固氮(1974, 1976)。

2)、关于专异性共生现象(obligatory symbiosis) 根瘤菌与豆科以及未鉴定的“根瘤菌”与非豆科植物所建立的结瘤固氮联系则是这种形式的典型代表。除上面谈到Trinick所建立的这种非豆科共生固氮系统外,还有一个例子值得注意 Лукьяненко

发现育成的高产小麦根系中“内寄生物”(注:未指明是什么菌)比低产小麦“内寄生物”多得多,似乎与产量成正相关,而这种“内寄生物”的发育周期以及与植物的相互关系很象根瘤菌(引自 Черетисов, В.М., 1975) 如果真是这样的话,那么这类菌与禾本科植物的共生是很有价值的,同时为固氮遗传工程研究

提供了基础。

3. 关于寄生性转变为共生性问题：人们熟悉，有效根瘤是根瘤菌与植物行共生的结果；植物肿瘤是某些寄生菌与植物行寄生的结果，前者有益，后者有害，如何化害为益呢？这种转化工作不单是有其哲学含义，而重要的是为科学工作者提出了积极研究的任务：

化害为益。辩证唯物论认为，在一定条件下“坏事也可以变成好事”，“坏东西可以引出好的结果……”。这样就提出一个问题：有没有可能把这种寄生性转化为有益的共生性呢？遗传工程技术为开展这方面研究提供了有力工具。已知根癌病农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 是引起植物形成肿瘤的病原菌，它的毒力是受菌体中大质体 (Ti 质体) 所制约 (Zaenen E, 1974; Watson B 等, 1975; Saunders, J.R. 1976)，它与根瘤菌是同科不同属，二者有一定的亲缘关系 (Narman P.S, 1975)。但就本质的差别，根癌病农杆菌带致瘤的质体，两根瘤菌带 *nif* 质体。通过遗传工程技术有可实现科属之间遗传性状的转化。Парийская, А. М (1974) 的综述报告中谈到从根癌病农杆菌分离的 DNA 在其作用下能够将产生肿瘤特性传给某些根瘤菌，使之在茄科 (*Solanaceae*) 植物上形成“肿瘤”，实现了不同属科植物之间细菌感染性及其特异性的转化 (Kern H, 1965)，这不仅使根癌病农杆菌失去了致癌性，而且从供体根瘤菌得到固氮力 (Lorkiewicz Z, 1972)，因此，①、根瘤菌能在茄科植物上结瘤 提供一个可能性即通过转化法可以将那些有害特性转化为有益；②、寄生菌获得引起寄主植物有结瘤和固氮能力。这样，对农业生产是十分有益的。如果将根瘤菌的共生固氮

特性通过DNA如此地传给受体根瘤病农杆菌的话，那么在茄科植物上形成“**胼瘤**”实现共生固氮作用就成为可能。可惜作者还没有从这方面进行实验。但上述的发现，可以推断共生固氮特性引入非豆科作物有效地为农业服务总有一天可以实现！

前面已提到结合性共生和专异性共生两种情况，这两种情况如果都能在重要粮食作物上有所充分的表现，那对解决肥源、节约能源、增加生产、提高粮食产量和质量将会做出巨大贡献。已知在粮食作物（如小麦、玉米、高粱、水稻等）根部分布大量微生物，有所谓根际微生物，然而这些微生物并不是都象固氮菌那样均能固氮，特别是有些作物的常居微生物如大肠杆菌等系常见菌，土壤中分布很多，易于培养，但没有固氮力，美英科学工作者借助基因传递方法将根瘤菌固氮基因传递给天然不固氮的大肠杆菌（1974）产气克氏杆菌（*Klebsiella aerogenes*）（Dunick 1974, 1976），受体菌大肠杆菌、产气克氏杆菌在一些非豆科（如小麦、玉米等）根际中以固氮菌分出现，为植物提供了必需的氮素营养，但是这种根瘤菌的共生固氮特性的共生性是否引入到大肠杆菌或产气克氏杆菌？能否在非豆科植株上结瘤？其自生特性能否全具有根瘤菌的性能？至目前为止，尚未见到这种数据的影子！但不排除，这些自生菌与非豆科植物实行结合性固氮的可能性。

已知某些自生固氮菌（如雀稗固氮菌）与雀稗实现结合性共生固氮（Doering J, 1972, 1973），肺炎克氏杆菌（*K. Pneumoniae*）固氮基因通过质体（BP4）转移到大肠杆菌中去得到固氮基因，产生固氮酶（Dixon R, A, 1972, Cannon F 等, 1974a, 1974b），而且转移失去固氮力的棕色固氮菌

(Azot vineLan²i)中去使之恢复固氮酶的活性,这里还必须指出,因子对于nif基因的诱动、转移起着重要作用(DunicanL、K, 1974),建成这样的重组质体(带有RP4)具有广泛的寄生范围(Jacob F等, 1976),而nif操纵子是定位在质体上(DunicanL、K等, 1976),也证明共生固氮基因存在于细菌之中(DunicanL、K, 等1974, Postgate J, 1975, Pagan J、R、等, 1975, kurz W、G、等, 1975, McComb A、J 1975, Gibson A、H等, 1976)因此,质体在nif基因传递上占有极重要地位。nif质体的存在使之固氮基因从细菌至植物中建立结合性或专异性共生或许更容易些。英国生物固氮学家Postgate认为“肺炎克氏杆菌的固氮基因引入植物细胞,应该说是没有什么问题的”(1974),通过体细胞融合技术把豆科根瘤原生质体与受体非豆科原生质体实行融合,与此同时nif基因进入受体原生质体形成融合体(杂交体),再经组织培养有可能培育出完整的具有自主固氮力的新植株(Po--Wer J、等, 1970)。Davay M、R、等(1973)得到大豆、羽扇豆根瘤细胞原生质体及其与非豆科原生质体融合的可能性,并把大豆根瘤菌引入豌豆叶片原生质体中,在新宿主细胞中的内共生关系产生有意义的结果(Davay M、R、, 1972),Carl--SON P、S等(1974)把棕色固氮菌突变体(固氮,缺腺嘌呤不能长)与胡萝卜(缺氮化合物不能生长)于培皿中进行组织培养,二者建立了结合性共生联系,胡萝卜在没有结合态氮的培养基上也能增长。Ausubel L F (1975)试验豌豆、菜豆共生固氮菌基因转移到胡萝卜上去,则从空气中得氮素营养。今后可望通过融合

技术将豆科根瘤细胞与小麦、水稻、玉米等粮食作物细胞进行融合，培育出具有自主固氮能力的新谷物品种来，不能等待，要积极、努力、实干、去争取！去创造！

结 语

生物共生固氮的研究在生物科学中占有极其重要地位，共生固氮特性的转移是当今固氮遗传学引人注意的中心，不论在理论上，而且在实践上均有重要意义。结合性共生固氮如同专异性共生固氮一样具有同等效力，研究它在非豆科粮食作物中所起作用的共生本质是极为有意义的。寄生性转变为共生性的研究是探索固氮遗传学问题的一条新途径，引人注意。

目前，不论通过什么途径或以什么形式获得有效共生固氮，但所创造的共生固氮新植株，特别是那些低光合作用的单子叶粮食作物，还必须要解决固氮所需要大量能量的消耗，异源DNA进入植物细胞进行重组可能遭受核酸酶的破坏，感受态受体细胞的研究是有重要意义的。如此同时，还要解决重组体在宿主细胞中的相容性及其有效表达力，为达此目的，所得到的基因型的稳定性及其表现型的持续性必定同其所处的生境建立不可分割的联系。这些问题得到解决，基因工程技术必将改造粮食作物，提高粮食产量和质量会做出它应有的贡献。

中国科学院微生物研究所 罗明典

质体工程与环境保护 (综述)

质体 (PLasmid) 是染色体外的遗传因子, 它自主地存在于细胞质中进行自我复制, 亦可组入到染色体上去, 它的分子量比染色体小得多, 由DNA组成, 系闭合环状结构, 是当今遗传工程学研究最重要载体之一。

近年在美国开始把质体工程技术应用于创造高效消除浮油的多质体 (multipeasmid) 的新菌株, 人们把这种多质体菌称之为超级菌 (Super. bacteria) (Chakrabarty A. M. 1975)。Chakrabarty A. M. 基于自己研究的目的选用假单胞杆菌属 (Pseudomonas) 中某些种作为受体菌, 而没有采用一般常用的大肠杆菌, 原因是: 1. 假单胞杆菌比大肠杆菌有害性少, 严格好气性, 许多腐臭假单胞杆菌 (P. Putida) 在体温下生长很慢, 这样用于质体工程的假单胞杆菌的传染性比大肠杆菌小得多; 2. 假单胞杆菌能以废油、纤维素、木质素等作碳源能生长, 如果由外源DNA控制来制造一种产品, 那最好是采用既能制造这种产品, 又能以廉价碳源 (如纤维素或废油等) 培养细菌; 3. 假单胞杆菌菌体含有降解烃的质体 (已有五种: CAMP OCTP, SALP, NAHP, TOLP), 而这种质体当然比抗药性质体更安全得多的一种载体; 4. 假单胞杆菌不存在致病性或不产生有害毒素, 因此, Chakrabarty A. M. (1976) 利用在自然界具有降解烃能力的假单胞杆菌属不同种, 把几种解烃质体组入到一种假单胞杆菌中去, 从而获得了多质体假单胞杆菌 (简称MPP), 这种质体在新的

· 近年还有一种XYL质体——解二甲基质体 (FreilLOA 1976)

寄主细菌中表现有自主复制能力，同时，由于它来自特殊的地方环境，所以得到的多质体菌株在自然界生态环境中有完全解烃能力(Chakrabarty, A. M 1976)，然而，在实验室条件下，这种多质体菌株混合培养或单独培养是困难的，一旦有可能提供氮营养或通过肺炎克氏杆菌(KL Pneumonia)的 nif^+ 引入到MPP中去，则可增加培养物的生存能力。据报导这种人工创造的新模拟菌(杂种菌)能够分解各种烃化合物，可以把原油中2/3的烃消耗掉，比其他任何已知微生物的解烃速率要快，效率高，自然菌株消除浮油要一年以上，而新的杂种菌则只要几小时就可以消除掉(W. P, 1975, 8, N, 1975)，尽管这种新“杂种菌”在自然环境中有如此的高效，可是人们还会要提出问题：这种多质体假单胞杆菌果真在自然界具有全效(KaLLiOR, C, 1976)，是否不受外界影响而具有稳定地解烃力呢？问题的提出使得人们考虑到生境的复杂性，这是很自然的。

工厂含汞废水对环境污染也带来巨大危害，现在已经发现嗜油假单胞杆菌(P. Oleovorans)有一种质体(OOT质体)能转移到腐臭假单胞杆菌中去，使之获得利用辛烷(octane)能力，另一种质体从嗜油假单胞杆菌和OOT质体一起转移到腐臭假单胞杆菌中去所具有的质体叫MER质体，而带有这种质体的菌有耐高浓度汞的能力。一般腐臭假单胞杆菌于培养基中超过 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 汞浓度界限，菌则中毒死亡，如果敏感菌株带有MER质体，则可在 $50-70 \mu\text{g}/\text{mL}$ 汞的含量水平能够生长，这种抗汞质体的细菌能够把无机汞转化成金属汞，然后这金属汞由细胞中挥发掉，这样，含抗汞质体细菌就成为清除其周围环境大量毒性无机汞的积极“参加者”。