

全国高校基础微生物学讲座
及教学经验交流班

细 菌 质 粒

中科院上海植物生理研究所微生物室

郑 幼 霞

一九八四年八月 上海

细 菌 质 粒

分子遗传学的大量研究表明，在生物的染色体中贮存着它们生命活动所必需的遗传信息，而脱氧核糖核酸（DNA）则是遗传的物质基础。但在某些细菌中，除了染色体DNA以外，还存在着一种染色体外的遗传因子，称为质粒，它是一种共价闭环结构的双螺旋DNA分子（Covalently closed circular，简称CCC DNA），具有自主复制的功能。在质粒DNA分子中除了带有复制、转移所必需的基因外，不同的质粒还分别带有使寄主细胞获得某些特殊遗传性状的基因，如致育性、抗药性、抗生素产生等。这些功能对于细菌细胞的生长繁殖不一定是必需的，因之当质粒从细胞中消失后，并不影响细菌在正常条件下的生命活动。

最早发现的细菌质粒是大肠杆菌的性因子（即F因子也称致育因子），以后陆续发现了产大肠杆菌素因子（Col因子）及抗药因子（R因子）等，到现在为止，已经知道质粒在微生物细胞中的存在有一定的普遍性。除细菌外，近年在酵母、霉菌及放线菌中都发现有质粒的存在，它们控制着多种不同的遗传性状。由于细菌质粒和抗药性有关，而且能在遗传工程中作为基因的运载体，因之受到了普遍地重视。

一、几种最早发现的质粒

1. 细菌性因子（或称致育因子，F因子）

美国微生物学家Lederberg等在研究大肠杆菌的遗传重组时发现了F因子，它也是最早发现的细菌质粒，他们用二个营养缺陷型变种作为亲本进行杂交，A亲株为甲硫氨酸缺陷型（Met⁻），B亲株为苏氨酸、亮氨酸及硫胺的缺陷型（Thr⁻ Leu⁻ Thi⁻），在一个杂交实验之前，他们将A亲株用链霉素处理使之不能再长成菌落，再与B亲株混合进行杂交，可以得到能在最低培养基上生长

的原养型重组子，可是如果对B亲株进行同样的链霉素处理，然后再与A亲株杂交，则完全没有重组子产生。这个实验表明，大肠杆菌的遗传重组是一种染色体，基因单向转移的结果，其中A亲株作为遗传物质的供体，当二亲株细胞发生接触的情况下，遗传物质由A进入B细胞，接着在B细胞中发生供体DNA片段和受体基因组之间的同源重组而产生原养型重组子。链霉素使供体失活，并不影响其提供遗传物质的能力，而如果使受体失活，则使重组子无法繁殖，因之它们的结论是：细菌的接合作用是一种异亲配合的过程，二个亲株在配合过程中作为供体的一方相当于雄性，而作为受体的一方相当于雌性。决定这种雌雄性别的遗传因子就叫做性因子。换句话说，带有性因子的菌株就是可以作为供体的雄性菌株，叫做 F^+ 菌株，不带性因子的菌株即是可作为受体的雌性菌株，叫做 F^- 菌株。当F因子和细胞的染色体整合在一起时，成为高频重组菌株，叫做Hfr菌株；F因子也可从Hfr菌株的染色体上重新落下来，从而带上染色体的一个片段，这就成为 F' 菌株。 F^+ ， F^- ，Hfr， F' 分别表示F因子存在的不同状态。

2. 产大肠杆菌素因子(Col因子)

大肠杆菌素是某些大肠杆菌产生的一类具有抗菌作用的蛋白质分子，它和抗生素不一样，只杀死同种细菌的其它菌株和与之关系密切的菌种。虽然好几十年前就已经知道大肠杆菌能产生大肠杆菌素，但直到F因子发现后，才认识到它的产生是受质粒控制的。现在已经鉴定出了很多种Col因子，在遗传工程研究中广泛利用Col因子中的Col EI质粒及它的衍生质粒作为基因载体，受到应有的重视。

3. 抗药因子(R因子)

这是1957年日本的细菌学家在研究痢疾杆菌的流行病学时发现的，以后陆续在大肠杆菌、变形杆菌、绿脓杆菌、葡萄球菌等致病菌中也证实有R因子的存在。有些R因子是转移性的，可以通过接合转移使原来对某种药物（如抗生素）是敏感的细菌获得R因

子变成抗药菌，而使药物失效，另一些R因子虽然是非转移性的，但可以被某些噬菌体所转导，金黄色葡萄球菌的一些R因子就属于这种类型。一般R因子带有多种抗药基因，当敏感细菌接触抗药质粒后，虽然它们并未直接接触过药物，也可以成为对多种药物的抗性菌。所以它是医学上值得重视的问题。

4. 其它

除了上述三种发现得比较早的质粒外，近年来还陆续报导了一些新的质粒。例如某些大肠杆菌中产生肠毒素的质粒；结瘤根瘤菌中使植物产生根瘤的质粒(Ti)；假单胞杆菌中降解烷烃和芳香烃的质粒(CAM, OCT, TOL Xyl等)；酵母中大小为2 μ m的质粒；放线菌中和抗生素合成、抗生素抗性、致育性及致死接合特性有关的质粒(Scp1, Scp2, SLP1, pIJ101等)。

二、质粒的特性：

1. 自主复制 质粒是一个独立的复制子，它能在寄主细胞中和染色体一起共同存在，並同染色体进行同步的复制，在细胞分裂时，把它的拷贝数准确地分配给子细胞。

2. 分子的环状结构 到现在为止所有研究过的质粒都是环状分子，由于分子的环状结构，使质粒具备以下几方面的性质。④紧张性。当一些染料(如溴化乙烷)嵌入CC分子，造成分子内的紧张性，而OC及线形的分子，由于可以自由旋转而没有变化，由于CC分子的紧张、压缩，它的流体力学阻力减小，所以在离心时CC分子比OC及线形的分子沉降得更快，在琼脂糖凝胶电泳时，泳动度也较大，所以跑在前面；⑤比重。染料分子对DNA分子的嵌入量受分子结构的影响，CC分子因为没有末端，在一个地方嵌入一个染料分子以后，由于分子呈紧张性而限制了更多染料的嵌入，而OC及线形分子可以嵌入较多的染料分子。染料分子小，比较轻，因而嵌入染料少的CC分子比重较大，可以利用这个现象，在染料存在下进行氯化铯密度梯度离心，而分离质粒DNA；⑥限制性变性

环状分子不易随 pH 或温度上升而发生双链的解离，因之可以选择一个临界温度使 OC 及线形 DNA 变成单链，而 CC 分子则没有变化，这样可以利用硝酸纤维素膜吸附单链，而把 CC 质粒分离出来。

3. 分子的大小和数量 质粒比染色体小得多，细菌质粒的分子量一般介于 $10 \sim 100 \times 10^6$ 道尔顿，质粒的大小可以通过电子显微镜照片来测量它的分子周长，计算之，或者与已知大小的质粒 DNA 分子在琼脂糖凝胶电泳作比较而测定出来。质粒的数量（即拷贝数）可以通过多种方法来测定，一般的计算公式为：

$$\text{拷贝数} = \frac{\text{质粒 DNA 总量}}{\text{染色体 DNA 总量}} \times \frac{\text{染色体 DNA 分子量}}{\text{质粒 DNA 分子量}}$$

一般说来，质粒小的，拷贝数就多；质粒大的则拷贝数就少。

4. 转移性 细菌质粒可以分为转移性及非转移性二类。转移性质粒引起细胞感染，抗药因子也是由于它的转移性而被发现的，质粒所以能够有感染转移的特性，那是由于其自身编码的基因决定的，质粒上具有相当复杂的基因群，至少有 13 个基因（称为 tra 基因）形成一个集合体，其中有 10 个基因和形成性纤毛（pili）这一类特殊的蛋白质有关，性纤毛使 F^+ 细胞和 F^- 细胞接触时相互连接，形成通道，使质粒得以传递（Conjugation），因之转移性质粒的分子量往往比非转移性质粒的分子量大。但非转移性的小质粒却可以借助转移性质粒的存在而进行转移。

用 DNA 异源双链的电镜分析法表明 Col 因子中的 Col V2 与 R 因子中的 R1 都有一部份核苷酸顺序和 F 因子中的 tra 基因群同源，这表明不同细菌质粒的转移基因的结构基本相同。

5. 细菌质粒的复制类型 根据复制的类型，质粒可分为二类，第一类是严紧型的，由于它的复制和染色体复制相关联，每复制一个染色体，一般只有 1—2 个质粒拷贝数。另一类是松弛型的，每一个染色体，同时可以有十个以至几十个质粒拷贝。严紧型、松弛型虽然是质粒的一个特性，但和宿主细胞不无关系，同一个质粒

在不同的宿主细胞中可能表现不同的复制类型，如抗药质粒R1，在大肠杆菌中为严紧型的，而转移到奇异变形杆菌中则成为松弛型质粒，由此可见质粒的复制特性受其本身及宿主的双重控制。

6. 质粒的不相容性 某些相似的质粒不能稳定地共存于同一宿主细胞中，这就是质粒的不相容特性，例如当细菌在引入带有不同抗药基因的质粒 $p_{SC101 km}$ ， $p_{SC101 AP}$ 后，当生长繁殖时，其中一种质粒往往会从细胞中消失掉，只剩下另一种抗性质粒， $F-lac$ 和 $F-gal$ 共存于一个细胞，其结果也是一样，产生这种现象的原因可能和质粒在宿主细胞中的复制机制有关。根据这种性质可以将质粒分成20多个不相容性组，属于不同的不相容性组的质粒可以共存于一个宿主细胞中，属于同一个不相容性组的质粒则不能稳定地共存于同一个宿主细胞中。

用DNA异源双链分析方法证明，同一个不相容性组的质粒之间存在着很大的同源性，这反映各组的质粒存在系统发育上的关系。

7. 质粒对F因子致育性抑制 将质粒和F因子引进到同一个细菌细胞中，有一些质粒能抑制F因子的致育性，称为致育抑制型质粒 ($f1^+$)，没有这种抑制作用的称为非致育抑制型 ($f1^-$)，这种性质很可能和不相容性相类似。

三、复合复制子的形成——插入顺序IS的作用

我们在前面已经提到，质粒是具有单一复制系统的复制子，但具有不同复制控制系统的复制子，由于相互作用而形成新的复制控制系统的情况，已有发现，其中有许多是在自然界中由二个以上复制子相连接而融合为一个复制子的，称为复合复制子，例如Hfr菌株中就存在F因子和宿主染色体的复合复制子，在复合复制子形成中起主要作用的是具有150—1300bp的插入顺序(IS)。

四、质粒的检测：

细菌所表现的某种遗传性状究竟是由染色体基因还是由质粒基因

因所决定，我们可以从以下几方面来加以推测。

1. 从自然界分离同一种细菌，如果检测到某一遗传性状有正、负二种菌株，就可能有质粒的作用。

2. 检测某一遗传性状的正菌株时，发现该性状不稳定，易丧失，就可能和质粒有关。

3. 再用一些质粒消除因子处理带某一性状的菌株，如果负菌株的产生比例提高，更证明可能和质粒有关。质粒消除因子包括：染料，如吖啶类染料吖啶黄，吖啶橙等，菲啶类染料溴化乙锭等；表面活性剂 SDS 等或高温培养。

4. 观察某一性状有无接合转移的特性

5. 把具有某一性状菌株的质粒 DNA 抽提出来，制片后在电镜下观察是否为环状分子，再用此质粒 DNA 对负性状的受体菌进行转化，看受体菌是否得到具有这一性状的转化子。

如果能从细胞中提出环状分子，又能转化受体菌使之获得供体的某一性状，那末无疑，该性状是由质粒控制的了。

五、质粒作为基因工程中的基因运载体

1. 什么叫基因工程 基因工程即遗传工程或称重组 DNA 技术，它是从分子生物学，特别是细菌质粒，限制性内切酶等方面的研究成就中发展起来的一个十分重要的新领域，所谓基因工程，就是应用酶学方法，把一个外源的目的基因（原核的或是真核的）和细菌质粒连接在一起，成为一个重组 DNA 分子，再把它引入到细菌细胞中使之增殖，繁衍到子代，而子代细胞则成为能表达目的基因所决定的性状的新菌种。换句话说：通过体外的基因重组，可以人工的创造出新的生物物种。这在生物学的理论和实践上都具有十分重要的意义。

2. 什么是基因载体 在基因工程中要把一个目的基因引入到宿主细胞中，必须依靠一个合适的运载体把它带进去，用得最多的是质粒（或温和性噬菌体），因为质粒是一个独立的复制子，分

子量又比较小，它很容易通过人工转化引入到宿主细胞，并以一个独立的复制单位而进行无性繁殖，一般用作基因载体的质粒还常常带有抗性基因，使带有这个质粒的宿主菌能在含药的平板上生长，如果外源基因插入在和质粒复制及抗性无关的位置上，那末就很容易利用抗性，在含药的平板上选择出带有重组 DNA 的转化子（最好外源基因也能有易于识别的遗传标记，或者利用对载体质粒的插入钝化来进行选择）。

3. 遗传工程的主要步骤 主要有以下几步：①用限制性内切酶把用作运载体的质粒切开（一个切点或几个切点，有些酶性把质粒切成具有粘性末端的直链分子。②用内切酶或其它方法分离目的基因。③使具有相同粘性末端的运载体质粒和目的基因混合，退火，使它们以氢键共价配对。④以 T4 连接酶使目的基因和运载体连接成为重组 DNA 分子。⑤以重组 DNA 转化受体菌。⑥筛选鉴定转化子。

4. 遗传工程的成就 遗传工程技术的问世，对解决生物学上一些基础理论问题及生产实际方面的一些问题起了决定性的作用。生物学中有许多问题长期无法解决，例如生物怎样从一个受精卵发育成个体？细胞如何病变？人为什么会生癌……等等，其主要原因之一是以往要对高等生物细胞中的基因进行分析，在技术上有很大困难，以致很少能对基因的结构和功能进行研究，遗传工程技术为解决上述基础理论问题提供了有效手段。首先是它能直接从生物细胞中分离出所需的基因（即特定的 DNA 片段）并通过增殖，获得大量的同质基因，这种方法在生物史上是前所未有的，有了这种方法不仅能够把生物的一个基因从成千上万个其它基因中分离出来，大量繁殖。运用繁殖得到的大量 DNA 片段就能测定基因在染色体上的位置，也能分析其结构和功能（如胰岛素，人的生长激素， β -球蛋白及肿瘤基因等）并能进而人工合成基因。

由于遗传工程技术的日益完善和发展，人们已经能够利用它来为人类谋福，这可从二方面来看：①利用遗传工程技术来提高有用

产物的产量，如提高氨基酸的发酵产量，譬如把产生L-苏氨酸的大肠杆菌K12的抗代谢类似物抗性变种的苏氨酸基因操纵子和 p_{BR322} 连接，转化入大肠杆菌，然后加氯霉素扩增基因，基因的拷贝数增加了，作为基因产物的苏氨酸产量也提高了。第二，把高等生物基因引入细菌细胞，由细菌来生产高等动物的产物，换句话说，即可以利用DNA重组技术来培育“工程菌”，建造“细菌工厂”，通过发酵途径，大量而廉价地生产人类所必须的有价值的动物来源的产品，下面举几个例子：

① 哺乳动物脑下垂体分泌的生长激素释放因子，这是一个由14个氨基酸组成的多肽，能调节机体的生长，还对糖尿病有一定的疗效，是一种贵重的药剂。本来要取得5毫克的这种激素，需要从50万头羊脑组织中来提取，价格十分昂贵，现在用遗传工程创造的“工程菌”，就等于建成了一座“细菌工厂”，可以从细菌发酵液中得到这种激素，估计只要9升大肠杆菌的培养液就可以得到5毫克，价格当然更便宜得多。这是第一个用DNA重组技术进行商品化生产的例子。

② 胰岛素。这是一个由50个氨基酸组成的多肽，为治疗糖尿病的药物。以前都是从猪和其它家畜的胰脏中提取，价格昂贵。尽管猪的胰岛素对治疗人的糖尿病也有作用，但它和人体本身的胰岛素之间仍然存在一些差别，当然最好是用人的胰岛素来治病，但这在能够利用遗传工程技术创造“工程菌”之前，是不可能做到的。现在已经能够把产生人胰岛素的基因和大肠杆菌的高拷贝质粒 p_{BR322} 组合成重组DNA，转化到大肠杆菌中，进行发酵，由“细菌工厂”来生产人的胰岛素，不仅价格便宜，而且治疗效果也好，确是糖尿病患者的福音。

用基本相同的方法，已经试验成功用细菌工厂来生产的高等动物来源的产品还有：干扰素，人的生长激素，尿激酶，猪口蹄疫抗原蛋白，肝炎病毒表面抗原等。

参 考 文 献

1. 松原谦一 质粒(中译本)

程光胜、王海清译 科学出版社

2. DNA Insertion Elements, Plasmids and
Episomes Ed. A.I. Bukhari et al

3. 微生物与分子遗传学〈专集〉

范云六等编译 科学技术文献出版社