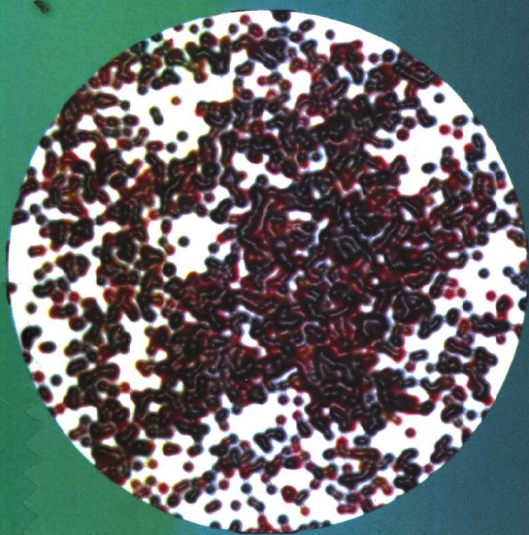


现代分子细菌学

MODERN MOLECULAR
BACTERIOLOGY

主编 府伟灵



汕头大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

府伟灵/ 编

—汕头:汕头大学出版社,1999.12

ISBN 7-81036-070-1

I. 现…

II. 府…

III. 分子生物学—遗传学—细菌学

IV. R

汕头大学出版社出版

(广东省汕头市汕头大学内)

重庆师范学院印刷厂印制 新华书店发行

1999年第1版 1999年12月第1次印刷

开本:850×1168 1/32 印张:6.6875

字数:383千字 印数:0~2000册

定价:38.00元

前 言

分子生物学基因克隆和重组 DNA 技术被认为是二十世纪科学史上一项最伟大的成就,也是当今科学技术革命的重要组成部分。目前,这项技术已经渗透到生命科学的各个领域。由于细菌是简单的生物体,极易在实验室中进行操作。因此,许多分子生物学实验及重大发现都是围绕着细菌发展起来的。同时,细菌也常被用来作为理解复杂生命体的细胞功能和发展过程的模型系统。

本书介绍了现代分子细菌学的相关理论和最新进展,并着重对一些重要的实验方法进行了较详尽的阐述。我们的主要目的是为医学本科生、研究生和临床实验室高级实验人员以及从事细菌研究工作的广大科技人员提供一本有益的参考书,希望对他们今后的工作有所裨益。

本书的作者大多是在读的博士、硕士研究生和长期从事分子生物学实验的实验室工作人员。他们在完成繁重的科研任务的同时,利用业余时间翻阅了大量的文献和书籍,用极其严谨的态度完成了这本专著。这反映了他们强烈的事业心和献身精神,使我们看到了检验事业的未来。

本书的编辑及出版工作得到了重庆市医学情报所医学书籍编辑部、第三军医大学西南医院检验科全体工作人员以及重庆泰斯特公司的大力支持,在此致以诚挚的谢意!

府伟灵

2000 年 于重庆

目 录

导 论	(1)
第一章 DNA 结构及其复制	(24)
第一节 DNA 结构	(24)
第二节 DNA 复制机制	(28)
第三节 细菌染色体复制和细胞分裂	(38)
第二章 基因表达	(52)
第一节 转 录	(54)
第二节 翻 译	(64)
第三章 细菌突变	(77)
第一节 基本知识和概念	(77)
第二节 细菌遗传学中有用的表型	(82)
第三节 细菌的遗传	(85)
第四节 突变速率	(90)
第五节 突变类型	(93)
第四章 质 粒	(95)
第一节 基本知识和概念	(95)
第二节 质粒的性质	(98)
第三节 质粒遗传学	(106)
第四节 重组 DNA 技术中几个常用质粒	(109)
第五章 接 合	(113)
第一节 概述	(113)

第二节	革兰氏阴性细菌接合过程中的 DNA 转移机制	(115)
第三节	由质粒传递染色体	(122)
第四节	质粒传递的遗传学	(127)
第五节	革兰氏阳性细菌的转移系统	(134)
第六章	转 化	(137)
第一节	自然转化	(137)
第二节	双链 DNA 的结合和摄取	(141)
第三节	供体 DNA 的整合	(147)
第四节	自然感受态细菌的质粒转化和转染	(149)
第五节	自然转化的作用	(150)
第六节	人工诱导感受态	(152)
第七章	噬菌体	(155)
第一节	噬菌体裂解周期	(156)
第二节	噬菌体 DNA 复制	(166)
第三节	普遍转导	(179)
第四节	溶原状态	(182)
第五节	小 结	(198)
第八章	转座作用和非同源性重组	(201)
第一节	转座作用	(201)
第二节	位点特异性重组	(219)
第九章	重组的分子基础	(228)
第一节	重组概述	(229)
第二节	重组的分子模型	(231)
第三节	大肠杆菌重组的分子基础	(235)

第四节	噬菌体重组通路·····	(239)
第五节	细菌中重组的遗传分析·····	(241)
第十章	DNA 诱变形成与修复机理 ·····	(252)
第一节	突变及诱变·····	(252)
第二节	DNA 修复 ·····	(259)
第十一章	基因表达的调控 ·····	(267)
第一节	操纵子调控系统·····	(268)
第二节	负调节·····	(272)
第三节	正调节·····	(286)
第四节	转录衰减调节·····	(297)
第五节	反馈抑制·····	(300)
第十二章	细菌的通用调节机制 ·····	(302)
第一节	概 述·····	(302)
第二节	细菌营养代谢的调控机制·····	(302)
第三节	细菌对渗透压的调节·····	(307)
第四节	细菌的毒力调节·····	(308)
第五节	细菌的应激调节·····	(309)
第六节	细菌核糖体与 tRNA 合成的调节·····	(310)
第十三章	噬菌体遗传分析 ·····	(312)
第一节	用噬菌体进行遗传分析的步骤·····	(313)
第二节	利用病毒进行重组及互补试验·····	(315)
第三节	T4 噬菌体 rII 基因试验 ·····	(321)
第四节	噬菌体遗传连锁图的构建·····	(335)
第五节	λ 噬菌体的遗传实验 ·····	(340)
第十四章	细菌的遗传分析 ·····	(347)

第一节	分离细菌突变体.....	(347)
第二节	突变的遗传作图.....	(352)
第三节	细菌遗传分析的互补试验.....	(366)
第四节	细菌遗传分析实例.....	(369)
第十五章	DNA 重组技术与细菌基因的克隆	(391)
第一节	DNA 限制性内切酶	(391)
第二节	重组 DNA	(399)
第三节	克隆细菌基因.....	(420)
第四节	克隆基因的应用.....	(426)
第十六章	分子遗传分析与生物学技术.....	(428)
第一节	蛋白质功能单元的缺失图及质粒复制的调控	(428)
第二节	细菌中的转座成份.....	(433)
第三节	基因替换和反向遗传.....	(451)
第四节	细菌分子遗传学.....	(456)
第五节	DNA 重组技术在医学中的应用	(458)
第十七章	PCR 技术在微生物诊断中的应用	(469)
第一节	PCR 技术原理与分类(469)	
第二节	PCR 的临床应用(474)	
常用词汇表		(503)

导 论

遗传学是研究生物体遗传与变异的学科。早期的经典遗传学 (Classical Genetics) 主要涉及对遗传基本规律的认识, 如孟德尔定律, 达尔文进化论, 基因的连锁与互换等。在二十世纪中叶, 人们发现遗传的物质基础(基因)的本质是脱氧核糖核酸(DNA), 并确定了 DNA 的双螺旋结构及遗传密码。从而使遗传学由经典遗传学进入分子遗传学 (Molecular Genetics) 时代。很多分子遗传学、分子生物学技术, 以及 DNA 重组技术都是基于对细菌的研究而发展起来的。由于细菌存在一些其它生物不具备的特性, 使得细菌在实验室内易于操作, 适合作为遗传学的研究材料及实验工具。细菌常被作为了解细胞功能及更复杂生物发育过程的模型系统, 所以以细菌为研究对象的细菌分子遗传学内容最为丰富。本书的目的便是将细菌分子遗传学的基础理论及方法系统地、全面地介绍给各位感兴趣的读者。

细菌除可作为遗传学实验中的研究工具外, 细菌本身还有很多其它重要的令人感兴趣的作用。它们在生物界中与其它生物相互依存, 没有细菌的世界是无法想像的。它们在地球的生态稳定中起到不可替代的作用。细菌是唯一能使大气中氮“固定”的生物, 将 N_2 转化为氨, 后者能被用于合成含氮的细胞成份(蛋白质、核酸)。如果没有细菌, 自然界的氮循环将被破坏。细菌在地球的碳循环中也处于中心地位, 它们能降解难处理的自然多聚物, 如纤维素、本质素等。细菌可避免地球被掩埋于植物碎片及其它含碳物质之中。毒性化合物, 如石油、许多氯化的碳氢物及其它化学工业产品也可被细菌降解, 所以细菌对于水的净化及毒性废物的清

除是必不可少的。另外,自然产生的温室气体(甲烷, CO_2)的大部分是由细菌产生的,并可被另外类型的细菌进一步降解。这种循环有利于维持气候的平衡。就地球的地质而言,细菌已对其产生了广泛的影响,细菌与地壳中某些铁矿及其它沉积物的形成有关。

某些细菌能在其它生物无法生存的环境中生存。细菌是唯一能在死海(Dead Sea)高盐水中生存的生物;某些细菌甚至能在接近沸点的热泉中幸存;有些细菌能在无氧的环境,如富含营养的湖泊及沼泽中生存。

在不利的生存环境中生存的细菌,有时可以通过共生的关系(Symbiotic relationship)使其它一些生物也能在此环境中生存。例如,在接近海底热液口的共生细菌能使管形软体虫也能在此生存。此处的细菌利用热液口释放的 H_2S 的还原能力,使 CO_2 转变为其它含碳化合物,从而以高能碳化合物的形式为软体虫提供食物。另外,共生性藻青菌(*Cyanobacteria*)与真菌形成地衣,地衣中的细菌通过固氮,以及经光合作用合成含碳化合物,而使地衣中的真菌能在无土壤的环境中得以生存。根瘤菌及固氮根瘤菌(*Rhizobium* and *Azorhizobium spp.*)存在于豆荚及某些其它类型植物的根瘤中,通过固氮作用使这些植物能在缺乏氮的土壤中生长。有些共生细菌可消化纤维素,而使牛及其它反刍动物能靠草类食物为生。此外,化学发光细菌能为鱿鱼等海洋生物产生光,以使这些海洋生物能在黑暗的深海中相互识别。

细菌与某些疾病的发生有关,对这些细菌的研究有助于对疾病的诊断及治疗。细菌能导致许多的人类、植物及动物疾病,且能引起疾病的新的细菌在不断地出现。从细菌分子遗传学中获得的知识将有助于我们去发现新的用于这些疾病治疗及控制的手段及方法。

细菌及噬菌体(bacteriophage)也是许多有用物质的来源,如在生物工程及其它工业中应用的酶,可从细菌中提取。另外,细菌

能制造抗生素及化学物质(苯、枸橼酸等)。

尽管我们对细菌的研究取得了不少进展,但对我们周围的细菌世界的认识还刚刚开始。细菌是地球上生理学差异最大的生物群体,有关细菌对其它生命的重要性及其潜在的应用价值的认识还仅仅处于推测阶段。我们已发现了几千种不同类型的细菌,通过研究已对其细胞机制及应用价值有了更深入的了解。但在所有土壤及其它环境存在的细菌中,仅有不到1%的细菌被分离鉴定,谁也无法知道未被发现的细菌究竟还存在哪些令人感兴趣的功能及应用价值。显然,在努力地认识、控制我们周围的生物世界,并从中获益的过程中,对细菌的研究是必需的。而细菌分子遗传学将是这种努力过程中必备的工具之一。但在我们探讨细菌分子遗传学领域之前,有必要先讨论一下细菌与其它生物的进化关系,使我们对细菌在整个生物界中的地位有一个准确的把握及认识。

一、生物世界

根据目前的观点,地球上所有的生物可分为3个大的类别,即真细菌(eubacteria)、原始细菌(archaea)及真核生物(eukaryote)。

(一)真细菌

大多数我们所熟悉的细菌,如大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*)及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),均是真细菌。这些生物在外观上可能存在很大的差异。尽管大多数真细菌是单细胞的,呈棒形或球形,但有些真细菌却是多细胞的,并经历了复杂的发育周期。藻青菌(以前称为蓝绿藻)也是真细菌,但它们有叶绿素,且可呈丝状,这便是以前将它们误认为是藻类的原因。产生抗生素的放线菌属(*actinomycetes*),包括链霉菌种(*Streptomyces spp.*),也是真细菌,但它们可形成菌丝及成堆的孢子,故极像真菌(*fungae*)。茎菌也是真

细菌, 茎菌(*Caulobacter spp.*)也以分散或结合两种形式存在。粘球菌属(Genus *Myxococcus*)同样是真细菌, 既可以单细胞形式存在, 也可聚集成子实体(fruiting body), 后者与黏菌(slime mold)非常相像。真细菌的细胞通常比更高级生物的细胞小得多。但最近发现的一种真细菌有1mm长, 比最大的真核细胞还要长。由上可见, 真细菌的形态、大小各异, 所以不能从外观上与其它生物细胞相区分, 只能从生长特性及细胞器的存在与否与其它生物细胞相区别。

真细菌可进一步分为革兰氏阳性及革兰氏阴性真细菌。这种分类是根据真细菌对革兰氏染色的反应不同而进行的。在革兰氏染色后, 革兰氏阴性真细菌呈红色, 而革兰氏阳性真细菌呈紫色。染色的差异反映了两类真细菌细胞壁结构的差异, 革兰氏阴性真细菌的细胞壁肽聚糖含量少, 肽聚糖层之间由四肽侧链交联, 缺乏五肽桥, 不能形成三维结构, 但革兰氏阴性真细菌细胞壁中有发育完好的外膜、脂蛋白及脂多糖等; 而革兰氏阳性真细菌细胞壁肽聚糖含量高, 各层肽聚糖之间通过四肽侧链及五肽桥相互交联, 组成三维立体结构, 但无外膜, 含大量磷壁酸。两类真细菌不仅存在细胞壁结构的差异, 还有其它根本性的不同。不同类型的革兰氏阴性菌之间的亲缘性高于它们与革兰氏阳性菌的亲缘性, 表明真细菌分为两大类的时间远远早于现代细菌种属发生的时间。

(二)原始细菌

原始细菌是与真细菌相像的单细胞生物, 但在生化特性上两者有极大的差异。最具代表性的原始细菌是“极嗜菌”(extremophiles), 它们能在其它生物不能生存的极端环境中生存, 如在硫磺泉的高温下, 在海底的高压下, 以及在死海的高渗透压条件下等。某些原始细菌还具有不同寻常的生化功能, 如合成甲烷等。

将原始细菌从真细菌中单独分类出来还是不久前的事, 一般

是根据它们的核糖体 RNA(r RNA)序列、RNA 聚合酶的结构及脂质成份的不同而将原始细菌与真细菌区分开。近来,通过比较两者翻译因子及 ATPase 的序列时,发现原始细菌与真核生物的关系比其与真细菌的关系更接近。原始细菌自身形成了多种多样的生物类别,某些时候还可分属两个不同的界(kindom)。

有关原始细菌的研究已取得一些进展,但还远远不及对真细菌研究所获得的认识。所以,本书的主要例子基本上都来源于对真细菌的研究。

(三)真核生物

真核生物属于地球生物第三界,包括植物、动物及真菌(fungi)。将它们取名为“真核生物”是因为它们的遗传物质由核膜包裹,其细胞具有“真的核”(true nucleus)。“karyon”在希腊文中即为“核”(nut)的意思。真核细胞通常只有 1 个核,但贾第鞭毛虫除外。真核生物可是单细胞的,如酵母、原虫(protozoan)及某些藻类(algae);也可多细胞的,如植物、动物。尽管在外观、生活习性、复杂程度等方面有很大差异,但所有的真核生物在生物化学特性上有极大的相似性,尤其是在大分子合成途径方面更为相似。

(四)原核生物与真核生物的区别

地球上的所有生物也可分成原核生物(prokaryotes)及真核生物两大类。这是基于生物细胞是否具有“真正的核”及其它细胞器来区分的。与真核生物相反,真细菌及原始细菌均无核膜存在,所以二者均归为原核生物,即“在核以前”(before the nucleus)就已存在的生物。原核生物被认为是最原始的生物,在更高生物或真核生物发生以前就已经存在。

核膜是否存在极大地影响到细胞内合成蛋白质的机制。信使 RNA(mRNA)的合成与翻译在原核细胞内可同时进行,因为无核

膜将核糖体与 DNA 相分隔。然而,在大多数真核生物细胞,DNA 与核糖体被核膜分隔,在核内产生的 mRNA 需经核膜转运至细胞浆后,才能翻译成蛋白质,故转录与翻译不能同时进行。

原核生物细胞除缺乏细胞核外,还缺乏很多其它的在真核生物细胞存在的细胞器,如线粒体、叶绿体、高尔基器及内质网等。原核生物细胞由于不存在线粒体、叶绿体及其它一些细胞器,故在显微镜下结构显得简单得多。

(五)线粒体与叶绿体

所有的真核生物细胞均有线粒体,另外,植物细胞及一些单细胞性真核生物细胞含有叶绿体。真核细胞的线粒体是 ATP 产生的场所,而叶绿体是进行光合作用的场所。

近来有证据表明:真核生物的线粒体及叶绿体起源于与之共生的真细菌。事实上,这两种细胞器在许多方面与细菌相似。例如,它们都含有编码核糖体、tRNAs、翻译因子及其它与转录/翻译相关成份的 DNA。更令人惊奇的是:线粒体及叶绿体编码的 RNAs 及蛋白,以及这两种细胞器的膜结构与真细菌更为相近。

线粒体与叶绿体起源于与之共生的真细菌不仅毫无疑问,而且推测它们起源于何种细菌家族也是可能的。比较高度保守的细胞器基因,如编码 rRNAs 的基因的序列后,推测线粒体起源于 Proteobacteria,而叶绿体起源于藻青菌。

线粒体与叶绿体的形成可能与早期的真核细胞吞食真细菌有关,从而使早期的真核细胞利用真细菌的能量产生系统或通过光合作用而获得能量。事实上,真核生物腰鞭毛虫(dinoflagellates),有些时候吞食藻青菌,而使腰鞭毛虫能通过光合作用获得能量。

二、遗传学的简要定义

从遗传学的主要研究策略来看,遗传学可简单地定义为:通过

对 DNA 进行人为的操作及处理,从而研究细胞及生物功能的学科。因为 DNA 编码构成细胞及完整生物所需的所有成份,改变 DNA 所产生的效应可为细胞及生物的正常功能的研究提供线索及基础。

在试管内操作 DNA 的方法出现以前,研究细胞及生物功能的遗传学方法是经典遗传学方法。这种类型的研究方法需分离被研究的功能发生改变的突变体(mutant,表型与正常或野生型不同的个体),经基因杂交,将与功能变化有关的 DNA 改变或突变在染色体上定位;再经等位性试验确定有多少不同的基因与功能改变有关。最后,可根据突变对生物体产生的特殊效应来推导相关基因的功能。

经典遗传学分析还可继续为发育及细胞生物学研究作出贡献。经典遗传学分析方法的优势在于:在预先完全不了解某种功能的分子基础的情况下,可分离出功能发生改变的突变体,并可对突变体的特征进行研究;经典遗传学分析常常是研究有多少基因产物与某个功能有关的唯一方法,通过抑制物分析还可发现与这些基因产物发生相互作用的其它相关基因产物。

分子遗传学技术的产生极大地丰富了我们用于研究基因及其功能的方法。这些技术包括分离 DNA,确定与特定功能相关的 DNA 区域,以及在试管内使 DNA 突变,将突变 DNA 导入细胞、分析突变对生物体的效应等方法与技术。

先克隆一个基因,然后在试管内使之突变,再将之导入细胞,最后分析基因改变所产生的效应,这便是“反向遗传学”(reverse genetics)的分析方法。反向遗传学分析基本上是经典遗传学分析的相反过程,即由基因着手,研究其结构与功能,进而研究其编码蛋白质产物的结构与功能及其在细胞或机体生命活动中的作用,即从基因→蛋白质→表型的研究过程。在经典遗传学,人们通过观察突变体的生物学特性及功能变化,来推测某个基因的存在。

利用分子遗传学的分析方法,在完全不知道某个基因功能的情况下,可克隆出这个基因,并在试管内使之突变,在突变基因被导入生物体后,才能发现该基因的功能。

分子遗传学分析方法不是对经典遗传学分析方法的取代,这两种不同分析策略可用于研究不同类型的问题,这两种方法也常常相互补充。事实上,有时在对生物学功能进行深入研究时,往往需要这两种遗传学分析方法的结合使用。

三、细菌遗传学

在细菌遗传学,遗传学技术被用于细菌的研究。细菌遗传学的分析原理与其它生物的遗传学分析原理没有差别,但用于细菌遗传学方法的具体方法都与其它生物有极大的差异。由于细菌在遗传学实验中的操作相对容易,故人们对细菌的认识远远超过对地球上其它生物的认识。下面列举了使细菌遗传学实验相对简单的一些细菌特性,即将细菌作为遗传学研究材料的优越性。

(一)细菌是单倍体生物

细菌用于遗传学研究的主要优势在于细菌是单倍体(haploid),也就是说细菌的每个基因只有1个拷贝或1个等位基因,这个特性使获得细菌的突变体变得容易得多。

相反,大多数更高级的生物是二倍体(diploid),即每一个基因均有2个拷贝(即2个等位基因),两个同源染色体上各有1个基因拷贝。由于大多数突变是隐性的,这便意味着仅有1个等位基因拷贝发生突变,而另一个等位基因拷贝正常时,将不会引起表型的改变。于是,在二倍体生物,大多数突变将不会产生效应,只有当两个在同源染色体上的等位基因拷贝均发生突变的情况下才会产生效应,这就常常需要回交(backcross)才有可能获得带有突变表型的后代。即使如此,也只有部份经回交产生的后代在两个同

源染色体上均存在突变的等位基因。然而,对于细菌这样的单倍体生物,大多数突变都可产生突变的表型,而不需要回交。

(二)传代时间短

有利于细菌遗传学研究的另一细菌特性是细菌的传代时间短。传代时间(generation time)是指生物从产生到成熟并繁殖后代所需的时间。如果一种生物的传代时间长,完成一次遗传学试验的时间也就很长,这往往会影响到实验的重复次数。在理想的条件下,大肠埃希氏菌的某些菌株在 20 分钟内便可繁殖一代。由于繁殖速度如此之快,早上培养细菌后,在当天晚些时候便可对其后代进行观察及分析了。

(三)无性繁殖

细菌的另一优势是通过细胞二分裂法进行无性繁殖。而有性繁殖则需同种个体间进行交配后才能产生子代。由于有性繁殖产生的子代绝对不会等同于它们的亲代,故可使遗传学实验变得复杂。为了获得纯系的有性繁殖生物,往往需要将个体与其近亲个体反复地进行交配。对于细菌而言,由于是通过细胞二分裂进行无性繁殖,故所有的后代相互之间及与其亲代之间在遗传学上是完全相同的。在遗传学上相同的生物可被称为克隆。除细菌外,某些低等真核生物及一些植物也可通过无性繁殖形成克隆。

(四)可在琼脂板上形成菌落

遗传学实验常需对大量的个体进行筛选。如果大量的被研究的个体能在一个小的空间内进行繁殖,将有助于遗传学筛选的进行。

利用某些类型的细菌,在一个 Petri 氏琼脂培养板上,可对百万、千万甚至几亿个细菌个体进行筛选。细菌在琼脂平板上接种

后,便不断地进行分裂繁殖,所有的后代都集中在一起,最后形成肉眼可见的菌落(colony)。每一个菌落都由几百万个细菌组成,均起源于原来接种的细菌,所有的菌落都来源于同一细菌。

(五)菌落易于纯化

一些细菌通过个体在琼脂平板上繁殖而形成菌落,使菌株及突变体得以纯化。含有不同的突变体或菌株的细菌混合物被接种于琼脂平板后,单个的突变细菌或菌株将通过繁殖形成各自的菌落。然而,这些菌落相互之间可能太靠近,以致无法分离或仍有可能含有不同菌株。但通过挑取菌落并稀释后,再接种于琼脂平板上,便可出现单个细菌经繁殖而形成的不连续的菌落。在最初接种的平板上,无论细菌有多么拥挤,只需一个或几个菌落纯化步骤,便可分离出纯的菌株。

(六)可进行系列稀释

在对培养的细菌进行计数或为了分离纯的菌落时,常常需要先获得不连续的细菌菌落。然而,由于细菌如此之小,一次浓缩培养可使1ml培养液含几亿个细菌。如果直接将这样的培养物接种于petri氏平板,细菌将会在平板上生长在一起,而不会形成不连续的菌落。为此,就需在接种前进行菌液稀释,而系列稀释则是最实用的方法。其基本原理是:最终稀释倍数=[每次稀释倍数]ⁿ,n为稀释次数。例如:将一个溶液连续进行3次1:100的稀释(先取1ml溶液加99ml水,取此稀释液1ml加99ml水,最后取第二次稀释液加99ml水),最终的稀释度是: $10^{-2} \times 10^{-2} \times 10^{-2} = 10^{-6}$,即被稀释了100万倍,如果采用一步法稀释,1ml原液需加接近1000升水,才能被稀释100万倍。显然,系列稀释要方便实用得多。

(七)可进行选择性培养