

多基因 转化技术

李尔炆 编著



化学工业出版社

多基因转化技术

李尔炆 编著



化学工业出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

多基因转化技术/李尔扬编著. —北京: 化学工业出版社, 2006. 6

ISBN 7-5025-8925-2

I. 多… II. 李… III. 基因-遗传工程 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 066410 号

多基因转化技术

李尔扬 编著

责任编辑: 赵玉清

责任校对: 李 丽

封面设计: 关 飞

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

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

*

新华书店北京发行所经销

北京市彩桥印刷有限责任公司印装

开本 850mm×1168mm 1/32 印张 3 1/2 字数 62 千字

2006 年 8 月第 1 版 2006 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8925-2

定 价: 15.00 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

1978年，在我国第一届科技大会上，遗传工程被列为我国重点发展的科学领域之一。当时，医药方向成为研究的热点，笔者根据当时的条件，选择了环保作为自己的研究方向。非常幸运，1980年，在辽宁省科委申请到了一个采用生物技术处理含油污水的课题。当时对重组DNA技术的了解和认识都还比较浮浅，随着分子克隆技术的发展和课题研究工作的不断深入，对这项技术的了解和认识也在逐步深化。

在常规的污水净化系统中，要去除多种污染物，通常是利用多个微生物种群的降解功能来完成的。但是，每个微生物种群在生长和繁殖的过程中，都会向周围环境排泄各种代谢物，这些物质会对其他种群产生影响，使各种群之间形成一种相互制约和影响的关系（这种关系也存在于其他多因子开放生物系统），使各种群的功能不能充分发挥（即使各种群本身的功能都很优秀），因而宏观上的效果并不理想，因此，设想通过对几个降解性质粒的重组，

构建一株带有多个降解性基因的工程菌，用于含油污水的处理。希望通过多功能工程菌解除这种相互制约的关系，使各基因的功能得到充分发挥，最终达到大幅度提高生化池的净化效率。

研究发现，质粒在细菌细胞中稳定性较差，在细胞增殖的过程中存在丢失的现象，细胞丢失了重组质粒，就会失去降解功能。随着丢失质粒细胞比例的上升，污水处理的宏观效果就会下降。而处理污水的生化池是一个开放的体系，其中的微生物若经常更换或经常补加，将导致系统运行成本的增加。这就要求投入生化池中的降解性微生物具有比较高的稳定性，同时在自然界中要具有较强的竞争力，使其在含有多种微生物的生态系统中稳定存在而不被淘汰出系统。

基于上述原因，考虑不采用载体而直接将外源基因转入受体原生质体，使外源基因整合到受体染色体上，这样就降低了基因丢失的概率。此外，还存在受体是否能适应被净化污水的性质的问题，只有解决了这个问题，携带了降解性基因的受体细胞才能进入污水处理系统很好地执行净化任务。但污水水质是多种多样的，所以这项转化技术应适用于多种受体。经过八年多的实验研究，在1989年完成了此技术的研究工作，并通过了技术鉴定。

本书是作者几十年来在多基因转化技术方面科研工作的总结。该项技术融合了微生物学、分子遗传学、生物化学、生态学、现代生物技术和污水生物净化技术等方面的知识。它的特点是：①不需要借助载体，可直接将外源基因转入受体细胞，增大了DNA的转化量；②进入受体的外源基因被整合到受体染色体上，提高了外源基因的稳定

性；③可以将不同的细菌作为受体细胞，适应科研和生产的需要，扩大了转基因微生物的功能和应用范围。当然，还有许多工作有待深入。希望本书能为从事生物技术的研究人员和相关领域的大专院校师生提供參考。

将此书献给养育和培养我的父母、姑母及我的所有老师，以此书回报家人对我的支持，还要衷心感谢曾一起工作并给予我极大帮助的同事们。

由于本人知识的深度和宽度有限，书中错误在所难免，请各位读者批评指正。

李尔炆

2006年3月于常州

内 容 提 要

随着现代生物技术的发展,各种新技术层出不穷。本书介绍的是一种无需载体即可将外源基因转化入受体细胞的技术。

这项技术适用于对多种不同的细菌受体细胞的转化,可构建具有多种功能并适用于开放体系(污水生物处理、微生物采油等)的基因工程菌。全书从原理、实验方法和具体应用三方面详细介绍了该技术。本书是作者四十年来研究成果的总结,其指导性、实用性、可操作性很强。

本书可作为生物技术研究人员的工具书,也可作为相关领域大专院校师生的参考用书。

目 录

1 原理篇	1
1.1 转化原理	5
1.1.1 供体 DNA	9
1.1.2 受体	11
1.1.3 DNA 转化	12
1.1.4 选择标记	13
1.1.5 转化子的检出	15
1.1.6 转化子的稳定	16
1.1.7 转化设计策略	17
1.2 多基因转化	22
1.2.1 多基因转化的提出	22
1.2.2 多基因转化技术	23
1.3 多基因转化技术的应用前景	25
2 实验篇	27
2.1 材料与方法	29
2.1.1 仪器设备	29

2.1.2	化学试剂	29
2.1.3	小型器械	31
2.1.4	溶液	32
2.1.5	培养基	33
2.1.6	电泳	33
2.2	选择标记的设计与筛选	37
2.2.1	营养缺陷型标记	38
2.2.2	抗药标记	42
2.2.3	基因产物标记	43
2.3	操作方法	44
2.3.1	受体	44
2.3.2	供体	46
2.3.3	转化	50
2.3.4	转化子的筛选与检测	51
2.3.5	多基因转化子的稳定	52
2.3.6	注意事项	53
3	实践篇	55
3.1	多基因转化技术在工业污水处理中的应用	57
3.1.1	含油污水的处理	57
3.1.2	化纤污水的处理	62
3.1.3	印染废水的处理	67
3.1.4	制药污水的处理	72
3.1.5	化工污水的处理	76
3.1.6	含盐废水的处理	79
3.1.7	VHb 血红蛋白在污水生物 处理中的应用	85
3.2	多基因转化技术在其他开放体系中的应用	93

3.2.1	微生物采油	93
3.2.2	在油藏示踪技术中的应用	96
3.2.3	在汽油、柴油的生物脱硫 技术中的应用	96
3.2.4	修复被污染的土壤	98
参考文献		99

1 原 理 篇

转化指某一基因型的细胞从周围介质中吸收来自另一基因型细胞的 DNA，而使受体的基因型和表现型发生相应变化的现象。转化现象是 1928 年由英国医学细菌学家 F. Griffith 发现的（即肺炎双球菌的转化现象）。

在肺炎双球菌中存在着几十种血清型，同时，肺炎双球菌里有两种不同菌落形态的菌株。一种细菌细胞外有一层多糖荚膜，菌落是光滑的，称为光滑型（S 型），能引起人的肺炎和小鼠的败血症；另一种细胞不产生多糖荚膜，菌落小而粗糙，称为粗糙型（R 型），不引起病症和死亡。

F. Griffith 将从肺炎球菌 II 型（血清型）得到的 R 型培养物和少量经热处理杀死的 III 型 S 型肺炎球菌一起注射到小鼠体内引起感染，并从感染的小鼠心脏血液中培养得到了 III 型 S 型肺炎球菌。R 型菌株是无毒的，它自己不能引起小鼠死亡。而热处理过的 III 型 S 型细胞悬液中不含有活细胞。肺炎球菌 II 型 R 型细胞也不可能自发转变成 III 型 S 型细胞。这个实验结果说明，经热处理杀死的 III 型 S 型肺炎球菌的一种物质使 II 型 R 型菌转变成成为 III 型的 S 型菌。

F. Griffith 把引起肺炎球菌转化的物质称为“转化因子”。为了弄清楚转化因子的化学本质，20 世纪 40 年代在美国纽约 Rockefeller 研究所的医学细菌学家 O. T. Avery 进行了研究。

O. T. Avery 和他的同事 C. M. Macleod 和 M. M. Carty 于 1944 年证明了转化因子不是蛋白质而是 DNA。他们首先着手进行了 S 型细胞的无细胞提取液

的分离工作，该提取液中含有能使 R 型细菌转变成 S 型细菌的转化因子。结果当使用一系列化学和酶降解的方法，把各种蛋白质、类脂、多糖和核糖核酸从提取液中去除掉，对提取液的转化作用的影响并不明显。且随着样品纯度的提高，氮/磷比值与 DNA 接近。将得自 S 型细胞提取液的纯化 DNA（即使此提取液浓度稀释为原来的六亿分之一仍有转化活性）加入到细胞 R 型细胞的培养物中，也能够将 R 型细胞转化为 S 型。不仅如此，由 R 型细胞转化的 S 型细胞的培养物中提取的 DNA 也能将 R 型细胞转化为 S 型细胞。遗憾的是他们的这个结论未能被当时的科学界所重视。

1952 年 A. D. Hershey 和 M. Chase 报道了 T_2 噬菌体感染实验。他们用放射性同位素 ^{35}S 和 ^{32}P 分别标记 T_2 噬菌体的蛋白质和 DNA。在感染过程中，噬菌体的 DNA 进入细菌细胞中，而它的蛋白质外壳并不进入细胞，电子显微镜的观察证实了这一点。经过约二十分钟后，从细胞中释放出大约上百个噬菌体，这些噬菌体蛋白质外壳的大小与感染最初留在细胞外的外壳完全一样。这说明决定 T_2 噬菌体蛋白质外壳的遗传信息的携带者是 DNA，进一步证明了 DNA 是遗传物质^[1]。

从转化现象的发现到研究转化的化学本质，证明“转化因子”就是 DNA，并进一步引申到基因是由 DNA 分子所携带，最终使人类对 DNA 的认识有了一个大的飞跃，同时也为改造生物的性状提供了一种新的手段和依据。

转化为相同或相近物种之间的同源重组提供了可能

性，是自然界中基因交换的一条重要途径，在生物变异和进化中起着十分重要的作用。

1.1 转化原理

转化分为自然转化和人工转化。细菌细胞不经化学或物理方法的特殊处理，就能从其环境中吸收外来 DNA 的过程称为自然转化。而细菌细胞经过特殊的化学或物理方法处理之后，才能从其环境中吸收外来 DNA 的过程称为人工转化。

转化过程涉及三个方面的问题：进行转化的 DNA，DNA 转化时受体细胞的状态，DNA 进入受体细胞后的行为。

人们对转化进行了大量的研究工作，目前一般认为，受体细胞表面的结合位点只能与双链 DNA 结合，而不能与单链 DNA 结合。有人曾观察到肺炎链球菌转化因子在 100℃ 下逐渐失去转化活性，这是由于高温下 DNA 发生变性，双链 DNA 解链成为单链 DNA。而在系统温度下降，逐渐冷却的过程中转化活性又逐渐恢复，这是由于随着温度下降，DNA 复性又成为双链 DNA。

并不是所有的细菌都能进行自然转化，能进行自然转化的细菌也并不是它们生长的任何阶段都具有吸收 DNA 的能力，而只是细胞生长到某一特定阶段的一种生理特性。人们把细菌能够从周围环境中吸收 DNA 的这种生理状态称为感受态。

目前的研究表明,在转化过程中 DNA 与革兰阳性菌和革兰阴性菌的结合和进入方式是不同的^[2]。在革兰阳性菌作为受体进行转化时,细胞在生长后期会向外分泌感受态因子,诱导细胞出现感受态,从而双链 DNA 吸附在细胞表面的特异受体上。吸附在细胞表面的双链 DNA 在两种 DNA 酶的作用下进入细胞。第一种酶是核酸内切酶,它将吸附在细胞壁上的 DNA 随机切割成相对分子质量约为 $(4\sim5)\times 10^6$ 的片段;第二种酶是核酸外切酶,它将切割后的双链 DNA 片段的一条单链分解掉,另一条单链与感受态-特异蛋白结合,以这种形式进入细胞。

而在革兰阴性菌作为受体进行转化时,在感受态细胞形成过程中(如流感嗜血菌),会形成一种能结合双链 DNA 的膜结构,叫转化小体。该结构将 DNA 吸附后,能使 DNA 免于受到外源 DNA 酶的降解。转化小体位于细胞表面,与细胞的内外膜相融合。DNA 被吸收到转化小体后,在进入细胞质前,双链 DNA 被解为单链 DNA,只有单链 DNA 才能进入细胞内部并与宿主的染色体 DNA 进行整合。

无论自然转化或人工转化,只可能有一小部分细胞能够真正吸收外源 DNA。外源 DNA 一旦被不同基因型组成的受体菌细胞吸收,就可以和受体染色体之间发生重组。供体的转化 DNA 只有一条链进入受体细胞,另一条 DNA 链被分解掉。因此,重组实际上发生在单链 DNA 片段和完整的双链 DNA 之间。在受体细胞内,刚刚进入的供体单链 DNA 片段和 SSB 蛋

白质结合而免遭核酸酶的攻击，然后供体 DNA 取代受体染色体上的一段同源序列，形成局部异源双链区。一般认为，在类似大肠杆菌 RecA 蛋白质的某种因子的协助下，供体单链 DNA 侵入受体 DNA 上与其同源的区段，取代同源单链并与互补链形成碱基配对，而受体染色体 DNA 的呼吸现象所提供的暂时性解链为这种侵入过程提供了可能性。通过一定的机制被取代的受体单链被切割，继而出现分支迁移使供体单链 DNA 取代区域逐步扩大，同时外切酶系统不断切去供体单链上和受体被取代的单链上的游离端。结合进去的供体单链和受体 DNA 之间的切口由 DNA 连

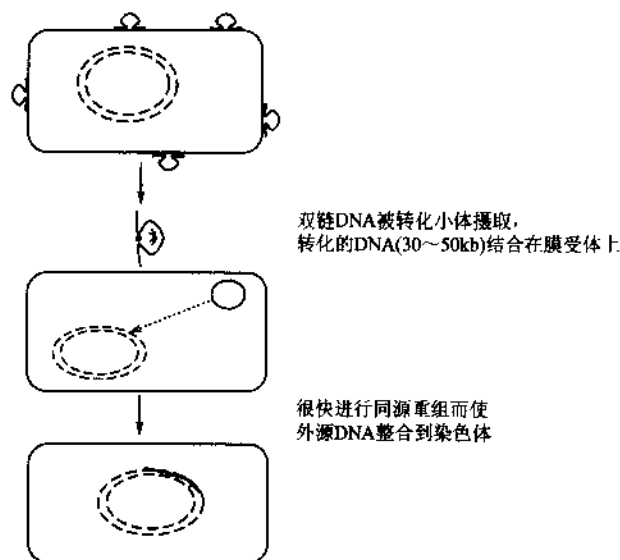


图 1.1 革兰阴性菌转化过程

· · · 膜受体； 转化小体；····· 染色体；—— 外源 DNA