

核酸研究技术

下 册

蔡良琬 主编

科学出版社

核 酸 研 究 技 术

下 册

蔡良琬 主编

科 学 出 版 社

1 9 9 0

内 容 简 介

本书包括分子克隆和基因表达两大部分。分子克隆部分介绍有关的基本知识,如常用的受体菌、载体及有关的核酸酶;分子克隆的具体操作,即DNA的剪切、重组、转化及重组DNA克隆的筛选和鉴定;基因文库和cDNA库的建立。基因表达部分重点介绍外源基因在大肠杆菌、酵母及哺乳动物细胞三种体系中的表达。可供生物学、医学、农学的有关研究人员和大专院校师生参考。

核 酸 研 究 技 术

下 册

蔡良琬 主编

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1990年7月第一版 开本:787×1092 1/16

1990年7月第一次印刷 印张:19 1/2

印数:0001-1400 字数:443 000

ISBN 7-03-001650-5/Q·242

定价:16.50元

前 言

基因工程是近十年发展起来的新技术,由于它与工业生产密切相关,可促进生物产品的工业改造,故一开始就为发达国家所重视,有些企业家为此创办了相应的基因工程公司,从而有力地推动了这一技术的发展。基因工程现已成为生物工程中的核心部分,在某些国家还被列入重点研究与开发项目。

基因工程的核心技术是分子克隆,其次是外源基因的高效表达,而基因表达也离不开分子克隆技术。从1973年出现第一个分子克隆以来,应用的有关载体与核酸酶类在品种上已大量增加,应用新的分子克隆与基因表达原理构建了许多适用的载体,又建立了三大外源基因表达体系,使基因工程技术日趋完善。从事这一新领域工作的科研人员不断增加,实验室也不断扩展,这种技术已应用到整个生物学、医学与农学等各学科的研究中。

基因工程技术受到广泛重视,除了它与工农业生产密切结合,可提供某些生物产品外,另一个突出的优点是应用分子克隆技术可纯化任一生物基因,并可通过大量培养受体菌(通常是大肠杆菌)得到纯化的基因,使研究者可用此技术得到其所需的基因;分子克隆技术也因此广泛应用,并逐步达到简便易行,成为分子生物学中即将普遍应用的技术。现在所用的载体、限制性内切酶、常用的核酸酶以及人工合成的寡核苷酸等都有商品供应,其中不少国内已生产供应,这也大大促进了分子克隆技术的推广。为了进行复杂的真核生物特别是高等动植物的基因研究,又建立了基因文库与cDNA库技术,操作虽然繁杂一些,但也不难掌握。本书首先介绍了一般分子克隆基本技术,也对以上两种文库作了详细的介绍。

近年来通过基因工程研究,已有一些生物产品,如蛋白质制品、活性多肽、酶等开始出售,并产生了一定的经济效益和社会效益。此外,基因工程的产品还显示出其特殊的优点,即提高了产品纯度,降低了销售价格。同时,还获得了一些很难工业生产的药物与疫苗等,使外源基因高效表达研究理论仍为当前研究的一个重点,本书也介绍了三大基因表达体系。

本书作者都是从事有关研究的同志,所写内容是几年来的经验总结,方法又都是国内比较切实可行的。可供从事核酸或基因研究、教学及生产人员参考。

本书的编写由蔡良琬同志主持,参加编写的有中国医学科学院基础医学研究所杨善荣、强伯勤、余曙华、王申五、蔡良琬、李进、罗刚、袁建刚、许彩民、吴石君同志,南开大学生物系蒋如璋同志,中国预防医学科学院病毒学研究所侯云德、任贵方同志,中国科学院生物物理研究所申同健同志。

蔡良琬

目 录

前言

第一部分 分子克隆

第一章 大肠杆菌的基本知识和技术.....	1
第一节 大肠杆菌的特征及其细胞结构.....	1
一、大肠杆菌的分类特征	1
二、大肠杆菌的细胞结构	2
第二节 大肠杆菌基因的命名规则.....	3
一、与代谢有关的结构基因	3
二、与代谢无直接关系的结构基因	4
三、与药物或噬菌体抗性有关的基因	3
四、抑制基因	4
五、染色体结构突变	5
六、其他	6
第三节 大肠杆菌的遗传性和变异性.....	6
一、大肠杆菌的变异性	6
二、大肠杆菌的菌株及其特性的鉴定	8
三、大肠杆菌菌株的保存方法	10
第四节 大肠杆菌的营养和生长.....	11
一、大肠杆菌的营养	11
二、大肠杆菌在固体培养基上的生长	12
三、大肠杆菌在液体培养基中的生长	13
✓第二章 基因工程的载体体系.....	16
第一节 质粒载体.....	16
一、细菌质粒的基本概念	16
二、基因工程中质粒载体的选择	20
三、介绍几类质粒载体	23
第二节 λ 噬菌体载体.....	28
一、 λ 噬菌体的生物学特性	28
二、 λ 噬菌体载体的构建	33
三、常用的 λ 载体种类	37
四、 λ 载体的选择和应用	43
✓第三章 基因工程中常用的核酸酶类.....	47
第一节 DNA 和 RNA 连接酶.....	47
一、T4 DNA连接酶.....	48

二、大肠杆菌 DNA 连接酶	50
三、T4 RNA 连接酶	51
第二节 DNA 聚合酶	51
一、大肠杆菌聚合酶 I	51
二、DNA 聚合酶的 Klenow 片段	53
三、T4 DNA 聚合酶	54
四、逆转录酶	56
五、末端转移酶	58
第三节 磷酸激酶和磷酸酶	60
一、T4 多核苷酸激酶	60
二、碱性磷酸酶	63
第四节 核酸水解酶	65
一、外切酶 III	66
二、S1 核酸酶	67
三、绿豆核酸内切酶	68
四、外切酶 VII	69
五、 λ 外切酶	69
六、Bal 31 核酸酶	70
七、核糖核酸酶 H	72
第五节 甲基化酶	73
一、原核细胞中的甲基化酶	73
二、存在于大肠杆菌 K12 株中的甲基化酶	74
三、甲基化酶的用法	75
四、甲基化酶的实际应用	76
第四章 分子克隆技术(一)	
——基因与载体的剪切及重组	81
第一节 重组技术概述	81
一、剪切获取特定的基因片段	81
二、载体的选择	82
三、载体的剪切	82
四、基因与载体的重组	82
第二节 基因剪切常用方法	82
一、基因剪切的特点	82
二、应用限制性内切酶水解基因与载体形成粘末端	83
三、形成带有平末端的基因	88
四、从平末端改造成粘末端	97
第三节 剪切后基因与载体的连接	104
一、带有粘末端的 DNA 片段之间的连接	105
二、平末端及 3' 突出末端的连接特点	106
三、基因片段大小与连接的关系	107
四、防止载体自身连接的脱末端磷酸基团	108
五、连接后限制性内切酶识别位点的恢复	110

六、同聚物加尾后的连接	110
第五章 分子克隆技术(二)	
——重组 DNA 的转化、筛选和鉴定	111
第一节 重组 DNA 对大肠杆菌的转化	112
一、氯化钙法	112
二、氯化钙-氯化铷法	113
三、大肠杆菌 X1776 的转化	114
四、重组 DNA 克隆的初步筛选	116
第二节 重组 DNA 克隆的核酸杂交筛选方法	117
一、菌落杂交	117
二、重组噬菌体 DNA 的杂交筛选	119
第三节 免疫化学筛选方法	120
一、抗体的制备	121
二、抗体的纯化	121
三、抗体蛋白质的 ¹²⁵ I 标记	122
四、溴化氰活化滤纸法	122
五、固相筛选法	124
第四节 重组质粒和 λ 噬菌体 DNA 的小量快速制备方法	125
一、碱裂解法制备质粒 DNA	125
二、煮沸法制备质粒 DNA	126
三、从单菌落中制备质粒 DNA	127
四、平板裂解法制备 λ 噬菌体 DNA	127
五、液体培养基裂解法制备 λ 噬菌体 DNA	128
第五节 重组 DNA 的酶切分析和鉴定	129
一、单酶解分析	129
二、双酶解分析	130
三、多次酶解和电泳分析	130
四、部分降解酶切分析	131
五、人工合成探针在鉴定中的应用	132
第六节 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 技术在克隆鉴定中的应用	133
一、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	134
二、电泳转移	136
三、抗体的放射性检测法	137
第六章 基因文库	139
第一节 引言	139
一、基因的分离	139
二、什么是基因文库	140
三、基因文库构建的基本步骤	141
第二节 供体 DNA	143
一、染色体 DNA 的抽提	143
二、染色体 DNA 的切割	145
第三节 载体 DNA	148

一、 λ 替代型载体的结构特点	149
二、载体 DNA 的制备	151
三、制备载体的两臂和去除中央片段	152
第四节 重组连接、体外包装和感染方法	154
一、重组连接	154
二、重组噬菌体 DNA 的体外包装	158
三、重组噬菌体的感染	161
四、基因文库的构建规模	165
五、基因文库的扩增和贮存	166
第五节 考斯质粒为载体的基因文库	168
一、考斯质粒作载体的优缺点	168
二、基因文库的构建过程	168
结语	170
第七章 cDNA 克隆	172
第一节 cDNA 克隆的一般方法和步骤	173
一、cDNA 克隆方法	173
二、cDNA 克隆的具体步骤	174
第二节 特异 cDNA 的克隆	179
一、插入到表达载体中的 cDNA 克隆的筛选	179
二、选择杂交法筛选特异 cDNA 克隆	179
三、cDNA 克隆操作实例	180
第三节 cDNA 克隆应注意的问题	182
一、cDNA 克隆所使用的酶制剂	182
二、作为 cDNA 合成模板的 mRNA	183
三、载体 DNA	185
四、器械的消毒处理	185

第二部分 基因表达

第八章 基因表达与几种表达体系	187
第一节 基因表达的基本原理	188
一、乳糖和色氨酸操纵子的特点及其转录翻译元件	188
二、lac 与 trp 操纵子的基因表达调节	191
三、真核细胞中的基因表达与多级调控	193
第二节 常用的基因表达质粒	194
一、lac 启动子的应用	194
二、trp 启动子与人工合成 tac 启动子的应用	196
三、 λ 噬菌体中 P_L 与 P_R 两个启动子的应用	199
第三节 翻译框架与融合蛋白	199
一、基因表达与翻译框架	200
二、融合蛋白	200
第四节 几种基因表达体系的比较	201

第九章 大肠杆菌体系中的基因表达	202
第一节 真核基因与原核基因在结构和表达调控上的差异	202
第二节 影响真核基因在大肠杆菌体系中表达的因素	203
一、启动子	203
二、基因剂量	205
三、核糖体结合位点	206
四、基因产物的稳定性	207
五、编码多肽密码子的组成情况	207
六、表达产物的构象	208
七、表达产物的分子量大小	208
八、原核增强序列	208
第三节 真核基因在大肠杆菌中表达的方式	209
一、融合基因-融合蛋白	209
二、非融合基因-非融合蛋白	210
三、融合基因-非融合蛋白	211
第四节 真核基因在大肠杆菌体系中的表达设计	211
一、 <i>lac</i> 启动子	211
二、 <i>trp</i> 启动子	216
三、 <i>tac</i> 启动子	219
四、 <i>P_L</i> 启动子	220
五、 β 内酰胺酶启动子	225
六、 <i>lpp</i> 启动子	225
第十章 酵母体系中的基因表达	232
第一节 酵母表达系统概述	232
一、载体	232
二、启动子及其他控制序列	234
三、寄主酵母菌株	236
第二节 酵母表达系统的构建	236
一、酵母启动子的提取	236
二、表达载体的构建	239
三、外源基因的引入和表达质粒的构建	243
第三节 酵母体系中的基因表达	248
一、酵母菌的转化	248
二、酵母质粒的检测	250
第十一章 哺乳动物细胞受体系统中的基因表达	255
第一节 哺乳动物细胞表达外源基因概述	256
第二节 哺乳动物细胞表达外源基因的必需条件	256
一、外源 DNA 或供体 DNA	258
二、载体	259
三、重组质粒的改建	260
四、受体细胞	267

五、选择标记和选择培养基	269
六、重组 DNA 转染细胞	271
七、图示几种转化表达 HBsAg 的系统	275
附录一、大肠杆菌的常用培养基	279
附录二、大肠杆菌的常用菌株	281
附录三、大肠杆菌遗传学中常见的基因型	282
附图	283

第一部分 分子克隆

第一章 大肠杆菌的基本知识和技术

蒋如璋

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是现代生物学尤其是分子遗传学和生物化学研究中简单而又极富成果的模式实验系统, 是生命科学前沿领域研究的主要实验生物之一。大肠杆菌分布广, 容易得到, 营养要求简单, 生长迅速, 便于实验操作, 被人们广泛而深入地研究过。它在近代生物学研究的各个阶段, 以及在解决重大基础理论上起了关键性的作用。

Delbrück 和 Luria (1943) 以大肠杆菌及其噬菌体为材料完成的彷徨变异测验 (fluctuation test), 证明原核生物的性状也是由基因决定的, 从而使微生物遗传学最终确立为一门独立的学科。J. Lederberg (1946) 证明大肠杆菌也有有性生殖, 可以用与高等生物相同的遗传学原理, 研究原核生物的遗传和变异问题, 从此遗传学得到了飞速的发展。又由于后来遗传学方法和生物化学方法的卓有成效的结合, 从而解决了许多单用遗传学或单用生物化学方法不能解决的许多重大问题, 比如代谢途径的研究、DNA 复制、蛋白质合成、乳糖操纵子模型, 等等。

70 年代出现的新技术——重组体 DNA 技术的基础研究, 例如寄主限制性变异和 DNA 限制性内切酶的发现等, 最初也都是在 大肠杆菌上进行的。大肠杆菌是目前基因工程研究中的最为完善的载体受体系统, 因此, 凡应用大肠杆菌为实验材料的科学工作者对它的遗传背景作一定的了解是必要的。

第一节 大肠杆菌的特征及其细胞结构

一、大肠杆菌的分类特征

大肠杆菌属肠细菌科 (Enterobacteriaceae), 革兰氏染色阴性, 菌体杆状 ($2-3\mu\text{m} \times 0.4-0.6\mu\text{m}$), 是需氧或兼性厌氧细菌, 不形成芽孢和荚膜。大肠杆菌在分类上的其他特征是周身被鞭毛, 能运动, 在琼脂上形成圆形、光滑、白色菌落, 有臭味。典型的大肠杆菌菌株能利用乳糖和发酵糖产气, 能由色氨酸产生吲哚。在伊红美蓝培养基上菌落圆形, 中央黑色; 在远藤氏培养基上菌落圆形红色, 有金属光泽。

大肠杆菌除了少数菌株外, 通常都不致病。它是肠细菌区系中的优势兼性细菌, 与其他多种肠细菌如沙门氏菌属 (*Salmonella*)、克氏杆菌属 (*Klebsiella*)、志贺氏菌属 (*Shigella*) 和弧菌属 (*Vibrio*) 等细菌共存于肠道环境中形成肠细菌区系。它们在肠道中就

• 1 •

像在实验室的连续培养装置中一样生长着，同时又以高密度存在。从遗传学和进化论的观点来看，肠道细菌区系中的不同类细菌的基因可以通过噬菌体转导、溶源化和接合作用等过程互相转移，从而促进了基因在亲缘关系较远的不同物种之间的水平分布，增强了肠细菌的变异性及其对环境的适应能力。携带多种抗药基因的 R 因子在临床上具有特殊的重要性。该因子最初是在志贺氏菌属中发现的，现在已知它们广泛分布于大肠杆菌和沙门氏菌属等肠细菌中。已经证明，它们无论是在体外或肠道内都很容易互相转移，所以，肠细菌与其他菌种相比表现出更大的代谢及抗原型上的变异性，以及遗传上的不稳定性。正因为这样，即使大肠杆菌本身并非致病菌，但它仍属于一种潜在的路原菌。

二、大肠杆菌的细胞结构

和其他革兰氏阴性细菌一样，大肠杆菌具有比革兰氏阳性细菌更复杂的细胞包被(图 1.1)。

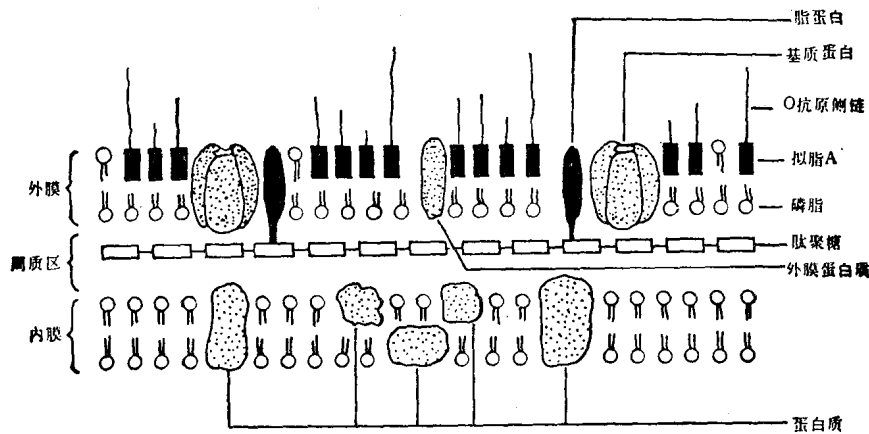


图 1.1 大肠杆菌包被模式图。

外膜中的基蛋白与脂蛋白和拟脂 A 连接，而脂蛋白与肽聚糖共价结合使外膜与细胞壁连成一体。外膜除了能让小分子扩散透过外，疏水的和亲水的脂分子都很难通过，因此，通常革兰氏阴性菌对抗生素较不敏感，可分泌蛋白质只能聚积在周质区。

大肠杆菌在细胞膜外面有一层与革兰氏阳性细菌相似的以肽聚糖为主要成分的细胞壁。与革兰氏阳性细菌不同的是，在细胞壁外面还有一层脂多糖外膜。这种结构成分与细菌的抗原型有关。脂多糖是热源物质的主要来源。外膜也是阻挡可分泌蛋白分泌到细胞外的屏障，使分泌蛋白质只能积累在周质部位。

细菌染色体总是附着在间体 (mesosome) 上。被细胞膜包裹着的细胞浆是细胞代谢活动的场所，约有 30,000 个核糖体散布在其中。

细胞壁在维持细胞形状和抵抗外界不良环境方面起着重要作用。在高渗溶液 (如 20% 蔗糖) 中，用溶菌酶处理大肠杆菌细胞，可将大部分细胞壁成分去除，这时在相差显微镜下可以看到原来为杆状体的菌体变成球形，即球质体 (spheroplast)。如果将细胞壁成分全部去除，则为原生质体。除去细胞壁的大肠杆菌细胞失去了对渗透压的抵抗力，一旦遇水立即破裂。

噬菌体可以感染完整的大肠杆菌细胞，使之裂解，但不能感染原生质体。说明噬菌体

感染寄主的早期阶段需要细胞壁的某种成分作为它的受体。原生质体虽对噬菌体缺乏感受性,但可被噬菌体 DNA 转染或被外源 DNA 转化。原生质体转化已成为克服完整细胞不出现感受态的一种好方法,因而被广泛应用于多种细菌的遗传学研究。

第二节 大肠杆菌基因的命名规则

据估计大肠杆菌的整个基因组可以编码 2,000—3,000 个基因,已经做过基因定位的约占 1/3,即将近 1,000 个基因。为了叙述方便必须有一个大家共同遵循的基因命名规则。为此, M. Demerec (1966) 提出了一套细菌遗传座位的三字命名规则,其中包括应标示出的与代谢有关的基因,虽无直接关系但又是代谢中较重要的基因,药物或噬菌体抗性基因,某些与该细菌生长有关的生长抑制基因,以及突变所发生的遗传结构改变(如基因缺失,转座基因的出现等)。有关的表示法将以下面叙述的办法来命名。

一、与代谢有关的结构基因

与合成和分解代谢有关的结构基因座位,以与基因编码的酶所参与的代谢途径的三个小写英文字母表示。例如用 lac 表示与乳糖利用有关的基因, trp 表示与色氨酸合成有关的基因等。三字符号后面加上一个大写的字母用来区分与同一代谢途径有关的不同的遗传座位,例如 lac Z 和 lac Y 分别表示 β 半乳糖苷酶结构基因和乳糖透性酶的结构基因; trp A 和 trp B 分别表示色氨酸合成酶的两个亚基的结构基因等。对于同一基因内的不同点突变则以阿拉伯数字表示,比如 trpA1、trpA26 等。如果只知道突变基因所影响的表现型,而不知道确切的遗传座位,则在基因符号后以一短线代替大写的英文字母,以数码表示分离子 (isolate) 的编号,例如 thr-15, met-20 等。

在大肠杆菌的菌株列表中可以看到用诸如 *E. coli* K12 LE 392: sup E44, sup F58, hsd R514, gal K2, trp R55, met B1, lac Y1, 这样来描述一个菌株。它几乎记述了有关菌株的全部信息: ①该菌株属大肠杆菌 K12 的一个衍生株, ②LE392 是衍生菌株的代号, ③七个基因符号表示该菌株的特性或基因型。通常为了方便只需用大肠杆菌 LE 392 就可以了。

除了大肠杆菌 K12 系统的菌株外,最常用的还有大肠杆菌 B 和 C 菌株。它们之间的区别除了在生理代谢上略有不同外,对不同噬菌体感受性限制修饰酶系统等也有区别。

一定的表现型是一定的基因型在特定的条件下发育的结果,因此表现型与基因型之间存在着相应关系,一般以同样的三字符号来表示表现型,只是第一个字母为大写,并在其右上角加“+”或“-”号以表明有关基因的表现型状态。如 Lac⁺和 Lac⁻分别表示能或不能以乳糖为唯一碳源生长; Trp⁻表示该菌株的表现型只有在含有色氨酸的基本培养基上才能生长。

二、与代谢无直接关系的结构基因

有许多结构基因,其基因产物并不是代谢链的某种酶,而是 RNA 或结构蛋白,或者

是与 RNA 转录、DNA 复制、蛋白质合成等生物学过程有关的酶或多肽等。在这种情况下仍以三字符号表示，不同的是往往用几个英文单词的字头缩写。例如表示与核糖体大亚基中的某种多肽结构有关的基因时用 rpl (ribosomal protein large)。表示与辐射损伤修复有关的酶的基因用 uvr (ultra violet repair)。dna 表示与 DNA 合成有关的基因。rec (recombination) 表示普遍性(同源性)重组有关基因的符号。met T, ala T 分别表示蛋氨酸和丙氨酸转移 RNA 基因。rrn 是核糖体 RNA 操纵子的基因符号,等等。

三、与药物或噬菌体抗性有关的基因

这类基因通常直接以所抗的药物或噬菌体名称的缩写表示。例如 str 是与链霉素抗性有关的基因; rif 是与利福平抗性有关的基因; ton 和 tsx 是与抗噬菌体 T1 (和T5) 和 T6 有关的基因。

抗性表现型与前面介绍的表示法相似,只是在符号的右上角加上“r”或“s”,以表示抗性和敏感表现型的区别。例如 Str^r/Str^s 分别为链霉素抗性和敏感表现型。

随着抗性机制研究的进展,对有些抗性突变的实质已经了解。例如 str 是因为核糖体小亚基的第十二号蛋白质的变化,所以也可以表示为 rpsL(ribosomal protein small)。

四、抑制基因

也有些基因不符合上述基因型-表现型命名规则,例如抑制基因就是这样。野生型菌株不携带抑制基因,在遗传学上应为 sup⁺,而其表现型效应为 Sup⁻; 携带抑制基因的突变型菌株,其基因型应为 sup⁻,表现型效应为 Sup⁺。为了避免此基因型与表现型的混淆,现在常用数字表示特定抑制基因的表现型,以字母表示相应的基因型。例如 Su1 表示特定抑制基因的表现型,而以 sup D 表示其基因型(表 1.1)。如 Su⁻ 及其基因型则不以任何符号表示。抑制基因的实质是 tRNA 基因的突变。

表 1.1 大肠杆菌无义密码系的抑制基因

抑制基因	表型符号	被抑制的无义密码子	插入的氨基酸
sup D	Su1	UAG	丝氨酸
sup E	Su2	UAG	谷酰胺
sup F	Su3	UAG	酪氨酸
sup C	Su4	UAG,UAA	酪氨酸
sup G	Su5	UAG,UAA	赖氨酸
—	Su6	UAG	亮氨酸
sup U	Su7	UAG	谷酰胺
sup V	Su8	UAG,UAA	—
—	Su9	UGA	色氨酸
sup B	SuB	UAG,UAA	谷酰胺

摘自 Gorini, L., *Ann. Rev. Genet.*, 4:107, 1970.

五、染色体结构突变

除了点突变外,还有一类与染色体结构改变有关的突变,常遇到的有缺失和易位(translocation)两种类型。表示缺失突变的符号是“ Δ ”。 Δ 符号后面标记的基因符号为所缺失的基因,例如 Δ uvr 表示缺失了与辐射损伤修复有关的酶的基因。如果缺失范围包括几个连锁基因,则将所缺失的基因放在括号内,如 Δ (lac pro)。如果同一区域分离到多个独立的缺失突变型时,便在缺失基因后面加上分离子的编号,如 Δ (gal uvr B)47。染色体中的易位,从遗传因子看,实际是基因的转座(transposition)。

可转移遗传因子是 50 年代初美国细胞遗传学家 McClintock 在玉米遗传学研究中发现的。这种因子可以跳跃转移(转座),影响插入部位邻近基因的表达和引起染色体重排。但对转座作用的分子基础的研究则是 60 年代末 70 年代初在大肠杆菌和低等真核生物(酵母菌)上完成的。

在大肠杆菌中发现有两类可转移遗传因子:插入序列(IS)和转座子(Tn)。二者的不同点仅在于后者除了具有与转座功能有关的基因外,还携带其他功能基因,比如抗性基因等。不同的插入序列的大小不同,DNA 序列不同,转座时要求的靶序列的碱基数也不同。在大肠杆菌中已发现六种不同的插入序列,它们分别表示为 IS1, IS2..... IS5 和 $\gamma\delta$ 。

不同转座子所携带的功能基因不同,按其结构及转座特性又可分为三种类型:IS 型复合转座子, Tn3 型转座子和噬菌体 μ 。

IS、Tn 和噬菌体 μ 的共同特性是,它们都能以一定的机率或多或少随机地插入细菌染色体或其他复制子中,中断插入部位基因的功能,引起基因突变;或者影响邻近基因的表达。表示转座作用的符号为“::”例如 gal::Tn10 表示 Tn10 插入大肠杆菌基因组的 gal 操纵子内并引起突变。

由于重组体 DNA 技术的广泛应用,人为的转座作用几乎彼彼皆是。实际上重组体 DNA 分子也可以用“::”表示。例如将 λ 噬菌体基因组的一个已知限制性内切酶 EcoRI 酶切片段 C 重组到质粒 pBR322 上,所得到的杂种质粒也可以记为 pBR322:: λ EcoRI-C。

无论是缺失或转座都有可能得到基因融合突变型。如果相邻的两个结构基因之间缺失一个片段,这时两个基因的部分结构序列将拼接在一起,出现基因融合。当该 DNA 片段转录为 mRNA 时,融合基因可以产生一个杂种的 mRNA 分子,从而有可能翻译成具有其中一种功能或同时具有两种功能的融合蛋白。表示融合的符号为“ ϕ ”,例如 ϕ (Trp-lacZ) 表示由色氨酸合成有关的某一酶与 β 半乳糖苷酶基因形成的一个融合基因,转录方向为 trp \rightarrow lacZ。

如果一个基因的遗传调控部位(促进子和操纵子)与任何一个结构基因融合称为操纵子融合,其表示符号基本相同。例如 ϕ (trp-lacZ⁺),意即有活性的 β 半乳糖苷酶是在色氨酸操纵子的控制下合成的。

操纵子融合可以用来研究一些不便检测的操纵子表达的调控机制。上例中可以通过 lac Z 基因的表达来研究 trp 操纵子的表达控制规律。

六、其 他

此部分包括原来不是细菌染色体上的基因,如性因子,其他质粒或噬菌体等,它们通过整合,转移到细菌染色体中。

1. 表示细菌性别状态采用的符号

F^- 表示无 F 因子(性因子)。

F^+ 表示携带质粒状态的 F 因子。

F' 表示携带有宿主染色体片段(基因)的 F 因子。

Hfr 表示所携带的 F 因子以整合在细菌染色体上的状态存在。

2. 表示携带原噬菌体或质粒

E. coli K12 (λ) 表示该菌株携带 λ 原噬菌体; *E. coli* K12 (pBR 322) 表示携带质粒 pBR 322。

第三节 大肠杆菌的遗传性和变异性

遗传性和变异性是一切生物的基本属性。大肠杆菌作为一个物种而区别于其他物种,在形态、生理、生化、遗传特性上是很稳定的。然而当我们仔细研究它的表现型特征时,发现这种稳定性又是相对的。

一、大肠杆菌的变异性

各种生物的特性都蕴藏在其遗传物质——DNA 分子的一级结构中,由于 DNA 的半保守复制机制才使得各种生物的特性得以世代相传,表现为遗传性的稳定性。即使在自然状态下 DNA 的复制也会因为个别核酸碱基的互变异构体的出现,或正在复制中的 DNA 双链出现局部瞬时环突,而引起的碱基的置换或个别碱基的缺失和插入,从而导致基因的自发突变(图 1.2)。诱变剂的作用只是对这类变化起了促进作用而已。

当我们检测不同基因的稳定性时,会发现在一定条件下不同基因表现出不同的突变率(表 1.2)。可见基因的自发突变率(即在自然情况下基因在细胞经历一次细胞分裂时发生突变的机会)通常是很低的。

如果以表现型特征的改变,而不是以特定基因的突变为依据来考查突变率时,突变率虽然是相当恒定的,但这一表现型相似的特征的变化可能是所研究的性状有关的某一个基因突变的结果。如以大肠杆菌由不依赖组氨酸(His^+)突变为依赖组氨酸(His^-)的表现型改变为例,已知大肠杆菌组氨酸的生物合成过程是由前体 5-磷酸核糖焦磷酸开始经相继的 9 个反应步骤完成的。 $His^+ \rightarrow His^-$ 的突变率(1×10^{-6})实际上是合成途径有关的 9 个基因的所有可能发生突变的位点的突变效应的总和。由 $His^- \rightarrow His^+$ 的突变率(3×10^{-8})则不同,它通常只反映组氨酸合成途径的与某一特定反应步骤有关的基因的回复突变的结果。这也可以解释正向突变($His^+ \rightarrow His^-$)比回复突变($His^- \rightarrow His^+$)的突变率高 300 倍的原因(表 1.2)。

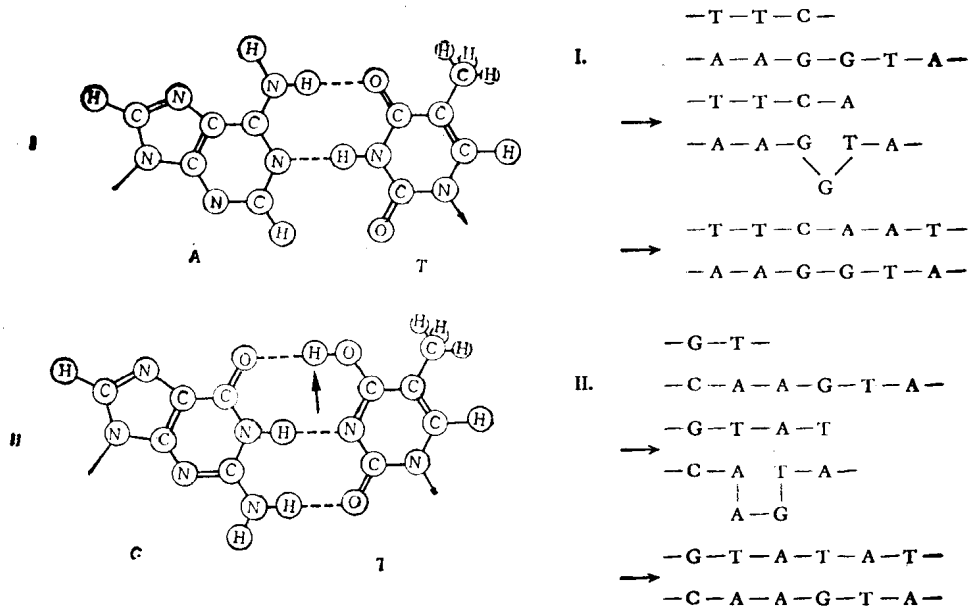


图 1.2 自发突变的机制。

左图 I 示出正常情况下酮式构型的胸腺嘧啶与腺嘌呤配对；II 为烯醇式构型的胸腺嘧啶与鸟嘌呤配对，从而引起转换突变。右图为正在复制中的 DNA 由于瞬息的环突变化引起碱基的缺失和插入。I 示单个碱基环突；II 示两个碱基环突。

表 1.2 大肠杆菌某些基因的自发突变率

发生突变的基因	突 变 率	资 料 来 源
抗链霉素 (1,000 μg/ml)	1×10^{-10}	<i>J. Bact.</i> , 57, 565, 1949
抗辐射	1×10^{-8}	<i>Genet.</i> , 32, 639, 1951
抗噬菌体 T3	1×10^{-7}	<i>Genet.</i> , 30, 119, 1945
抗噬菌体 T1	1×10^{-8}	<i>Genet.</i> , 28, 491, 1943
组氨酸缺陷突变 ($his^+ \rightarrow his^-$)	1×10^{-6}	<i>Genet.</i> , 36, 460, 1951
组氨酸回复突变 ($his^- \rightarrow his^+$)	3×10^{-8}	<i>Genet.</i> , 34, 72, 1949
半乳糖不发酵 ($gal^+ \rightarrow gal^-$)	1×10^{-10}	<i>J. Bact.</i> , 85:244, 1963

正因为突变不时发生，所以在实际工作中即使我们的操作十分仔细，也有可能出现菌株丢失或不纯的现象。

对于生物的变异现象要有所分析，首先要将遗传性变异(基因型变异)和环境变异引起的(对环境的适应)这两类不同的变异现象区分开来。例如我们经常做大肠杆菌的转化实验，为了得到高感受态细胞，除了要掌握好菌的生长期外，还要控制好培养条件。通常我们都采用 LB 培养基，并在 37°C 通气培养，便可达到目的。如果一切条件都不变，而只是在 30°C 下通气培养；或者虽在 37°C 通气培养，但不注意菌的生长期，都不能得到良好的感受态细胞。这是一种变异现象，但它并不是遗传性变异，而是环境变异引起的。因为当用上面所得到的感受态不好的细菌悬液重新接种并在 37°C 下培养，控制生长期，仍可得