



链霉菌遗传操作
实验手册

(美) 霍华德等著

David Howard

GENETIC
MANIPULATION
OF
STREPTOMYCES
A LABORATORY
MANUAL

链霉菌遗传操作实验手册

[英]霍香伍德等著

邓子新 唐纪良译

责任编辑：刘奇琛

*

湖南科学技术出版社出版发行

(长沙市展览馆路9号)

湖南省新华书店经销 湖南省新华印刷二厂印刷

*

1988年11月第1版第1次印刷

开本：850×1156毫米 1/32 印张：9 字数：228,000

印数：1—1,700

ISBN 7-5357-0441-7

Q·9 定价：4.20元

地科88-13

译者的话

实行开放政策以来，我们陆续来到英国约翰·英纳斯研究所 (John Innes Institute)，在霍普伍德 (D. A. Hopwood) 教授指导下从事分子遗传学研究。这类工作需要理论指导，但在具体操作中，经验的积累甚为重要。所以手头如有一本既介绍理论又概括实际经验的操作手册将会很有帮助。1985年由霍普伍德教授主编的“链霉菌遗传操作实验手册”正式出版，它是一本汇总了这里许多科学家从事二十多年链霉菌遗传研究经验的实验工具书。它不仅对从事链霉菌方面的研究工作有指导作用，而且对其它生物分子遗传学的实验操作也有很大帮助。1988年由霍普伍德教授倡导的“链霉菌遗传操作培训班”将在中国举办。为了培训班的需要，也为了尽早把本书内容介绍给国内同行们，我们决定把这本手册翻译出版。

为了“手册”中文版早日与读者见面，身为英国皇家学会中国事务组主席的霍普伍德教授极其认真地专门写了序言，又同意将一些准备“手册”再版时增加的资料首先由中文版刊载；约翰·英纳斯基金会慷慨将“手册”版权赠送给我们，国内湖南科学技术出版社在出版方面也给予了大力支持，我们在此一并致谢。

华中农业大学周秀芬同志、广西农学院柏学亮、樊妙姬同志参与了部分翻译和整理的工作。因为时间仓促，翻译中如果出现差错，希望国内同行们批评指正。

译者

1988年1月于英国约翰·英纳斯研究所

中文版序

我们很高兴地得知，由约翰·英纳斯基金会出版的“链霉菌遗传操作实验手册”中文版即将问世。1983年9月欧洲分子生物学组织在约翰·英纳斯研究所首次赞助举办“链霉菌遗传操作训练班”。在此之前就着手进行了这本手册的编著。在那期训练班上使用的手册初稿经反复琢磨后，应1985年7月第二期同类训练班的需要正式出第一版时，又加进了新的内容。自那以后，它受到许多国家从事链霉菌研究的科学工作者们的好评，已成为大部分链霉菌遗传学研究实验方法的主要参考书。

对链霉菌分子生物学和遗传学的兴趣近来有增无减。可以说，链霉菌是研究细菌基础遗传学，尤其是研究基因表达在时间和空间上分化调节的重要材料。有些基因组在生长的早期就开启，而有些很晚才启动；有些在营养菌丝阶段起作用，而另一些当孢子发育时才有效。最近阐明，这种生物含有好几种不同的核糖核酸聚合酶，可以转录不同种类的启动子，转录的特异性很可能参与了分化的调控。按此观点，天蓝色链霉菌 $whiG$ 的基因产物可以讲是一个特异性地与孢子形成有关的 σ 因子。发育的另一个开关很可能是翻译的调控。现在知道天蓝色链霉菌孢子和抗生素的产生都需要 $blaA$ 基因产物，它似乎是一个可辨别稀有TAA密码子的亮氨酸tRNA。显然，深入进行这方面研究的时机已趋成熟。

对链霉菌染色体和染色体外基因组的研究也获得了重要发现。链霉菌染色体DNA上的某个特定的片段可发生异常的巨型扩增，在某些情况下一个5—10kb的片段可扩增500个拷贝，这种扩增常伴随着成十万或更长碱基对的缺失，新性状也由此出现。染色体上也带有众多可以跳跃的DNA因子，有些与细菌转座子或插入顺序颇为相似，而对另一些如天蓝色链霉菌的微环体则显然是

新的东西。链霉菌质粒的研究也日益深入，质粒不相容性、分离和接合机理的新颖含意正在得到揭示。尤其值得提到的是最近在链霉菌中发现了巨型线性质粒。

除了基础研究的兴趣以外，链霉菌及其近缘生物在生物工程学方面具有特殊的重要性。它们产生了绝大多数已知的抗生素，其中许多已在医疗或兽医上应用（红霉素、四环素、卡那霉素、链霉素、氯霉素、利福霉素、亚德尼亚霉素、杀念珠菌素）。那些在农业上用作动物生长促进剂（如莫能霉素，泰洛霉素和维及尼霉素）、家畜抗寄生虫剂（阿凡曼菌素）和用在植物保护（春日霉素、多氧霉素、庆丰霉素）或用作杀草剂的Bialaphos等抗生素，几乎全部都由链霉菌产生。在过去的二三年中，抗生素生物合成分子遗传学的进展十分迅速。也许最重要的进展就是阐明了，控制每种抗生素生物合成的基因几乎总是成簇分组排列，不仅包括生物合成酶的结构基因，也包括特异性的抗性和调节基因。现在分离这种基因簇并不困难，只要日益增加对在这些基因簇中起调控作用的因子认识，至少增加对那些在转录水平上起作用的调控子的认识，无疑会对提高抗菌素的产量提供合理的途径。同时，通过在产生化学结构类似的抗生素的链霉菌之间，进行抗生素生物合成基因的体外转移，以及采用不同菌株的杂交和原生质体融合都可以得到新的抗生素。链霉菌中bialaphos抗性基因转移到高等植物，并赋予高等植物具有杀草剂抗性的成果也令人振奋。链霉菌分子生物学方面有许多重要的工作正等待着人们去进一步开拓。

尽管放线菌生物工程学的重要特征是其产生抗生素能力的多样性，但它们生产工业用酶的潜力也不可忽视。链霉菌作为葡萄糖异构酶的天然产生菌已经占有重要地位。利用重组DNA技术来提高生产这种酶的能力无疑还有巨大的潜力。对其它种类的酶如蛋白酶、纤维素酶、木质素酶、木聚糖酶、淀粉酶和角蛋白酶也基本如此。放线菌也可以用作替代寄主来生产哺乳动物蛋白如胰岛素、干扰素、Interleukins或者重组疫苗。而在低成本、大规模生产工业或化学合成用酶方面，它们也可以起到特殊的作用。用

自身的转录和翻译调控信号来表达其它细菌的基因，它们可能也有许多优越性，引起结核病和麻疯病的致病性分枝杆菌的基因就是一个例证。

在中国，对链霉菌遗传学的兴趣正在增长，在以后的几年中似乎还会有更大发展。在一些研究中心，包括武汉、北京、上海、成都、合肥和台北都建立了活跃的研究组。我和“链霉菌遗传操作实验手册”的其它作者真诚希望“手册”的中文版会增加人们对它所叙述的技术的兴趣。我们感谢译者和湖南科学技术出版社为此付出的努力和辛劳，并衷心希望“手册”中文版的读者们在用这种无以伦比的微生物进行的试验中取得成功。

戴维德·霍普伍德

1988年1月于诺里季

前 言

50年代中期在链霉菌中发现的遗传重组现象引起了人们的关注。近年来,对链霉菌遗传学和分子生物学的兴趣更是迅速增强。引起这种广泛兴趣的主要推动力,就是在链霉菌中形成了有效的基因克隆系统。除了已经可能通过以质粒中介的接合进行体内遗传分析外,原生质体融合也得以实现,而体外遗传操作技术更开阔了崭新的途径,可用于深入研究这类革兰氏阳性原核生物的独特无二的特征,特别是其复杂的形态分化和合成抗生素的巨大能力。

对链霉菌遗传操作产生兴趣的科学工作者具有不同的背景,有些人在链霉菌的其它学科如分类学、生态学、代谢或抗生素生产方面已有所建树,期望利用遗传和分子生物学技术来分析一个系统或发掘新的菌种,他们有着丰富的有关链霉菌方面的知识,但对其分子生物学的概念或实用技术甚为陌生;另外,许多从事其它生物,通常是大肠杆菌分子生物学研究的分子生物学家,陆续把注意力转向了链霉菌,他们对DNA的操作技术比较熟悉,但却不了解链霉菌操作的特殊技能。此“手册”对这两类人都有裨益。在我们实验室,当引导学生或访问学者熟练掌握链霉菌遗传学这门技术时,即使一些关于DNA操作的方法与大肠杆菌系统类似,或有的方法由大肠杆菌系统的方法发展而来,我们觉得有一本列出主要实验程序的手册颇为有益。综合了解DNA操作的理论和实际技术或引进有关大肠杆菌及其质粒和噬菌体的试验,我们推荐读者参阅冷泉港试验室Maniatis等1982年编纂的“分子克隆实验手册”一书,其中有些试验如组建 λ 或cos质粒的基因库,或扩增穿梭载体的方法与从事链霉菌研究的工作者直接有关。

除了个别例外的情况,此“手册”所编入的试验程序都是我

们在约翰·英纳斯研究所日常所用到的。当然，这些程序也并非不能变动，但我们觉得在没有个人经验的情况下，只依赖文献来变动方法并没有沿用已经成熟的方法稳妥。变青链霉菌和天蓝色链霉菌是我们用得最多的链霉菌菌种，此“手册”所述方法最适用于这两个菌株。然而，链霉菌分子生物学与大肠杆菌、芽孢杆菌或酵母菌分子生物学最大的一个区别就是人们感兴趣的菌种非常广泛，这个特点出自对不同的抗生素和酶类的生物合成遗传调控研究的需要。我们这里描述的试验程序对许多链霉菌也都适用，但用于某些菌种时则需要加以修改。需要修改的方面大多在原生质体形成、转化和再生的条件方面，但也不是绝对的。对书中所列出的一些选择性试验步骤，我们提供了一些文献供参考，但对一些特殊的菌株，仍有必要改变一些实验步骤。

“手册”在有些章节前编入了一些背景知识和一些参考文献。不过“手册”旨在汇入实验操作程序，所以对背景知识的介绍只好从简。不熟悉链霉菌遗传学文献资料的读者参阅近期这个领域的几篇综述文章会有收益（见Chater和Hopwood, 1983; Hopwood和Chater 1984）。另外三篇有关链霉菌基因克隆的综述文章也很值得一读（见Chater等, 1982; Hopwood和Chater, 1982及Bibb等, 1983）。

“手册”主要列出各项试验的程序，我们尽力做到编排合理，风格一致，但因整理工作出自不同作者之手，部分差异也在所难免。每项试验程序编排顺序是：导言（必要时）；试验材料（细分为生物材料、溶液和化学试剂等、小仪器、仪器设备）；试验步骤及注释。试验程序的每个步骤都编了号，注有星号（*）的步骤在注释部分有相应的说明。许多试验程序需要特殊的仪器和缓冲液，其配方在各试验的材料部分列出。许多试验通用的缓冲液或培养基的成分通常列于附录（不过在有些单个试验部分也有列出）。

这本“手册”是在欧洲分子生物学组织赞助下，为约翰·英纳斯研究所举办的两次试验操作训练班（1983年9月和1985年7月）

而编写的。我们衷心希望读者从“手册”中受益，并将感谢读者对“手册”的评价和指正，以使我们在改编和再版该“手册”时更上一层楼。

目 录

译者的话 I

中文版序 II

前言 V

1. 生物材料和噬菌体的制备

链霉菌琼脂平板培养物 1

链霉菌孢子悬液的制备 1

用链霉菌孢子悬液涂布平板 4

链霉菌菌丝体的生长 4

链霉菌孢子的预萌发 5

用链霉菌菌丝体提取“总”DNA 7

变青链霉菌66和天蓝色链霉菌A3(2)原生质体的制备 8

链霉菌噬菌体的纯化 10

单个链霉菌噬菌斑的分离纯化 12

制备高效价链霉菌噬菌体原液 13

分离新的链霉菌噬菌体 14

ϕ C31溶源菌的制备 16

链霉菌菌株和噬菌体的贮存 18

培养大肠杆菌以提取质粒 20

- 大肠杆菌感受态细胞的制备 21
2. 链霉菌体内遗传学
- 链霉菌的诱变 23
 - 链霉菌孢子的紫外线诱变 25
 - 8-甲氧基补骨脂素存在时近紫外线对链霉菌孢子的诱变 27
 - N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)对链霉菌孢子的诱变 28
 - 通过杂交和原生质体融合所进行的遗传分析 29
 - 杂交的建立、收获和平板的涂布 31
 - 重组子基因型的鉴定 32
 - 杂交试验结果的计算 35
 - 用“4×4”步骤制作一个链霉菌新菌种的基因连锁图 36
 - 用单一选择定位新的标记 41
 - 平板杂交 43
 - 与变青链霉菌杂交后通过麻点Pock的形成检测接合性质粒 43
 - 原生质体融合 46
 - 通过原生质体融合的遗传分析 49
3. 染色体、质粒和噬菌体DNA的制备
- 使用苯酚和SDS的注意事项 50
 - 链霉菌总DNA的分离方法 50
 - 链霉菌总DNA分离的方法(程序1) 51
 - 用氯化铯梯度离心提取链霉菌总DNA(程序2) 54
 - 链霉菌总DNA的分离(程序3) 55
 - 链霉菌总DNA的少量快速分离(程序4) 57
 - 分离链霉菌质粒DNA的程序 59
 - 利用中性溶菌从链霉菌中大量制备质粒DNA(程序1) 59

碱性溶菌法提取链霉菌或大肠杆菌质粒

(程序2) 62

SCP2衍生质粒DNA的少量制备(程序3) 68

链霉菌噬菌体DNA的大量制备 69

少量链霉菌噬菌体DNA的制备 72

4. 转化和转染

链霉菌的转化和转染 76

用质粒DNA转化链霉菌的原生质体 78

用质粒DNA转化链霉菌原生质体(初始方法) 78

用质粒DNA转化链霉菌的原生质体(小规模快速方法) 80

转化后含质粒链霉菌菌株的识别和挑选 81

链霉菌原生质体的转染 84

制备带正电荷的无DNA脂质体(脂质体上清液)
用于转染试验 86

质粒DNA对大肠杆菌感受态细胞的转化 87

5. DNA体外操作

DNA的沉淀 89

用苯酚/氯仿抽提法纯化核酸 89

从用染料-浮力密度梯度离心法制备的DNA中
去除溴乙锭和氯化铯 91

DNA和RNA的定量测定 92

DNA的限制性内切酶酶解 94

DNA的琼脂糖凝胶电泳 98

琼脂糖凝胶电泳中DNA的标样大小 99

20×20cm琼脂糖凝胶的制备 102

在5.1×7.6cm小玻璃板上制备微型胶 103

凝胶电泳样品的制备 103

凝胶摄影 104

其它有关的试验操作 104

- DNA丙烯酰胺凝胶电泳 104
- 从凝胶中回收DNA片段 106
- DNA用蔗糖梯度离心法大小分部 108
- DNA的连接 110
- 用碱性磷酸酶处理去除DNA5'端磷酸基 112
- 6. DNA基因克隆: 载体的选择和策略**
- 有关基因克隆的基本考虑 114
- 通过质粒载体的基因克隆 116
- 利用噬菌体 ϕ C31作为载体的基因克隆 119
- 制备克隆文库的统计学考虑 127
- 7. 同位素标记DNA操作技术**
- 序言 129
- ^{32}P 标记材料的操作须知 129
- DNA的切口移位标记法 129
- DNA从琼脂糖凝胶向硝酸纤维素滤纸的转移 132
- DNA从链霉菌菌落到硝酸纤维素滤纸的转移 135
- 将链霉菌噬菌体DNA转移到硝酸纤维素滤纸上 137
- 在硝酸纤维素滤纸上进行DNA-DNA原位杂交 138
- 硝酸纤维素滤纸上标记DNA的放射自显影 142
- 用T4多核苷酸激酶进行DNA5'端的标记 143
- 填补3'内凹末端标记双链DNA 145
- 使用末端转移酶进行3'端的标记 148
- 链霉菌DNA序列分析提要 149
- 8. RNA操作技术**
- 链霉菌RNA的分离 152
- 变性RNA向硝酸纤维素滤纸的转移及与 ^{32}P 标记DNA的杂交 157
- 点样原位杂交分析法 159
- DNA转录区的 S_1 核酸酶定位 160

附录 培养基和图

- 琼脂培养基 165
液体培养基 170
生长因子补充物 173
缓冲液 173
天蓝色链霉菌、变青链霉菌和小小链霉菌的菌株 186
天蓝色链霉菌A3(2)的衍生菌株 187
天蓝色链霉菌A3(2)菌株的遗传标记 188
天蓝色链霉菌A3(2)菌株的连锁图 193
变青链霉菌66菌株 194
变青链霉菌10个遗传标记的连锁图 194
小小链霉菌ATCC12434菌株 194
有关质粒和噬菌体 ϕ C31以及由它们衍生而来
的载体的图谱及其所编码的信息 195
SLP1.2的限制性酶切和功能图谱 195
PIJ101的限制性酶切和功能图谱 196
SCP2*的限制性酶切和功能图谱 197
载体中标记片段的部分限制性酶切图谱 198
六个标记片段限制性图谱 199
标记片段限制性图谱的图距 200
aph、*isr*、*vph*基因的核苷酸顺序 201
一些链霉菌质粒载体 209
质粒载体的限制性内切酶图 240
 ϕ C31的限制性内切酶图谱 241
 ϕ C31衍生载体的谱系 241
参考文献 245
新增补的参考文献 258

1

生物材料和噬菌体的制备

链霉菌琼脂平板培养物

为了在琼脂表面（斜面或培养皿上）得到生长均匀的培养物以获得丰富的孢子，就要在整个培养基表面接种，因为在一定时间内，链霉菌菌落（与大多数霉菌相反）的扩散有限，点接不能产生良好的培养物。最好采用接种物的悬液涂布接种。这并不需要精心制备孢子悬液（尽管孢子悬液很适用），只要把接种环先蘸一滴无菌水，然后在培养物表面刮取孢子或菌丝体片段作接种物。新鲜斜面底部往往有水滴，用来接种最为方便。因为孢子往往在干燥的条件下才容易形成，因此接种后，通常让斜面平放24小时，使液体渗透到琼脂内。否则，斜面底部的培养物就可能很久不形成孢子。

靠群体连续传代培养来繁衍菌体不是理想方法，而应在平板上挑单菌落来接种新斜面。这种做法可减少某个标记的大量回复突变以及丢失未受到选择的质粒的可能性。当“回复突变子”的生长或产孢优于所需基因型时，这种可能性就容易出现。

链霉菌孢子悬液的制备

大多数链霉菌产生丰富的单倍体“单核”孢子。这些孢子着生在气生菌丝上呈链状。当将它们悬于水中并加以摇动，就很有容

易分散成单孢子（对某些菌需要加润湿剂，如0.1%吐温80或0.001%聚乙二醇辛基苯）。孢子悬液有多种用途：可用于接种液体培养基来提取质粒或染色体DNA、RNA或酶；制备原生质体；筛选突变体；用来在杂交中进行重组分析和质粒转化。以20%甘油悬浮液贮藏在-20℃的孢子，即使经多次取样仍可存活几年（但是也有例外，如不产孢子的秃型突变株和某些淡青链霉菌的链霉菌素敏感菌株）。

制备孢子悬液简单的步骤如下，从已经长好孢子的固体培养物上刮取孢子，悬于水中；用棉花过滤以除去菌丝片段和固体培养基碎片后，离心得到孢子沉淀。离心也可除去培养基中的可溶性成份（这些成份中包括生长因子，它们会影响营养缺陷型标记的选用，或包括一些可降低孢子寿命和抑制孢子萌发的“腐化”物质）。

材料

生物材料：长有新鲜菌株的斜面或平板。

溶液、化学试剂等：无菌水；20%甘油（高压灭菌）。

小仪器：接种环；吸管；用于过滤的装有脱脂棉的试管（见图1）；离心管；旋盖小瓶（7.5ml和20ml）。

仪器设备：混合振荡器；台式离心机。

试验步骤

*1. 在斜面或平板上加入9ml无菌水。

2. 用接种环刮取培养物表面的孢子，首先轻轻地，然后逐渐用力刮，以使孢子悬浮。

3. 将此粗制的孢子悬液倒入离心管中，并在振荡器上尽可能地激烈振荡1分钟左右。

4. 用装有脱脂棉的试管过滤悬液。

5. 将滤液倒入离心管中，3000转/分离心5—10分钟以使孢子沉淀。

*6. 停止离心后，马上倒掉上清液。

*7. 将离心管在振荡器上振荡几秒钟，使孢子沉淀物分散于残

存的一点无菌水中。

8. 加入无菌的20%甘油（通常一支孢子丰满的斜面或一个平板需加1—2ml）。

9. 将此悬液转至旋盖小瓶中（7.5ml小瓶甚为方便），冷冻保存。

注释

1. 为了便于制备孢子悬液，可常备盛装9ml 无菌水的 20ml 旋盖小瓶。

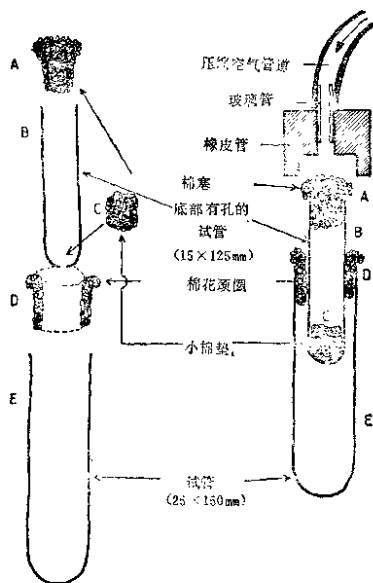


图1 过滤孢子悬液所用的试管

将制成的孢子悬液倒入B管，用手轻轻将橡皮塞I顶压在棉塞A上。接通压缩空气，滤过的孢子悬液将通过棉垫C进入试管E，拿去B管和棉花颈圈D，然后收集孢子悬液。