

微生物遗传学 与实验技术

王 昱 五 陈 宁 编译



南开大学出版社

内 容 简 介

本书涉及微生物遗传学研究的基本原理与实验技术。反映了微生物遗传学的新近成就。概括介绍细菌、放线菌、粘菌、酵母菌、丝状子囊菌、担子菌等的多种典型菌株的遗传分析方法和诱变及分析中常用到的各种实验材料与基本技术。可作为大学生、研究生的教材。并供从事生物学、医学、药学、农学以至生物工程技术的科研和教学人员参考。

微生物遗传学与实验技术

王岳五 陈宁 编译

南开大学出版社出版

(天津八里台南开大学校内)

新华书店天津发行所发行

河北省邮电印刷厂印刷

1989年4月第1版 1989年4月第1次印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 9.3125 插页 2

字数: 230千 印数: 1—2500

ISBN7 310-00159-1/Q·5 定价: 2.30

前 言

目前，遗传学研究已成为生物学的重要内容，尤其是近年来随着分子生物学的发展，它已成为与生物学有关的医学、药学、农学以至工程学的研究基础。

遗传学工作者的任务是阐明未知的遗传现象及其机制。为使读者了解遗传学的发展和最新成就，我们特将有关内容分三篇加以介绍。第一篇集中阐述了遗传学研究的基本原理和实验法，对如何选择实验材料，利用双核体或多核体的异宗接合细胞检测显隐性及互补性关系作了重点概括。在遗传物质的重组研究方面，尽量反映出微生物重组的多种可能途径，并重点阐述了重组体的四分子分析。

由于各种微生物具有各自的特点，因此其实验体系也各异，第二篇包括大肠杆菌、酵母菌的各种分子水平实验，枯草杆菌孢子形成，粘菌的细胞聚合，担子菌的子实体形成等细胞的分化、形态建成等有关控制系统的研究。

第三篇为各有关菌株的基因图谱。

本书的遗传实验法包括突变研究法和基因分析法，在此基础上介绍诱变及分析中常用到的各种实验材料与基本技术。在基因分析法中将原核生物与真核生物分开介绍。

本书涉及面较宽，而且内容新颖、详细，谨供广大从事科研和教学的同志们参考。

由于水平有限，书中难免有不妥之处，敬希读者批评指正。

编者 1989年

目 录

第一篇 基础实验方法与原理

第一章 突变的研究方法	(3)
第一节 突变研究的理论背景	(3)
第二节 诱变与突变株的分离方法	(10)
第三节 诱变剂实验法	(16)
第二章 原核微生物的基因分析方法	(33)
第一节 依据表型区分	(35)
第二节 互补测验	(35)
第三节 缺失分析	(39)
第四节 二点测验绘制染色体图	(41)
第五节 三点测验绘制染色体图	(44)
第六节 判断引起突变的碱基对	(46)
第三章 真核微生物的基因分析方法	(49)
第一节 核基因分析法	(50)
第二节 基因微细结构分析法	(68)
第三节 细胞质基因分析法	(73)

第二篇 微生物遗传学实验法

(微生物材料各论)

第一章 大肠杆菌	(83)
第一节 大肠杆菌的处理方法	(83)
第二节 突变株的分离方法	(88)
第三节 杂交方法	(96)
第四节 其他实验方法	(97)
第二章 枯草杆菌	(102)
第一节 枯草杆菌的转化	(102)

第二节	枯草杆菌PRS 1噬菌体的转导	(109)
第三节	利用温和噬菌体进行基因克隆	(113)
第四节	利用质粒进行基因克隆	(120)
第五节	原生质体转化法	(122)
第三章	放线菌	(127)
第一节	菌株的选择与培养方法	(128)
第二节	诱变与突变株的分离方法	(130)
第三节	杂交与子代分离方法	(131)
第四节	依据重组子分析绘制基因图	(133)
第五节	一次杂交决定多个基因排列顺序的方法	(139)
第六节	通过杂核系确定基因排列顺序的方法	(140)
第四章	粘菌类	(146)
第一节	生活史	(147)
第二节	培养方法及保存方法	(148)
第三节	诱变与突变株的分离方法	(155)
第四节	杂交与重组子的分离	(158)
第五节	利用突变株进行遗传学实验	(161)
第五章	酵母菌	(165)
第一节	菌株与生活史	(166)
第二节	培养方法与表型的判断	(168)
第三节	突变株的分离	(179)
第四节	杂交法	(183)
第五节	子囊孢子的分离方法	(185)
第六节	显微操作	(188)
第七节	基因符号命名法	(190)
第八节	原生质体融合育种	(191)
第六章	丝状子囊菌	(197)
第一节	菌株的选择与培养方法	(197)
第二节	诱变与突变株的分离方法	(209)
第三节	杂交与子代分离	(215)
第七章	担子菌	(231)

第一节	菌种的选择与培养方法	(232)
第二节	诱变与突变株的分离方法	(235)
第三节	杂交方法与子代分离方法	(237)
第四节	丝状菌遗传实验法	(239)

第三篇 几种微生物的遗传图

第一篇

基础实验方法与原理

第一章 突变的研究方法

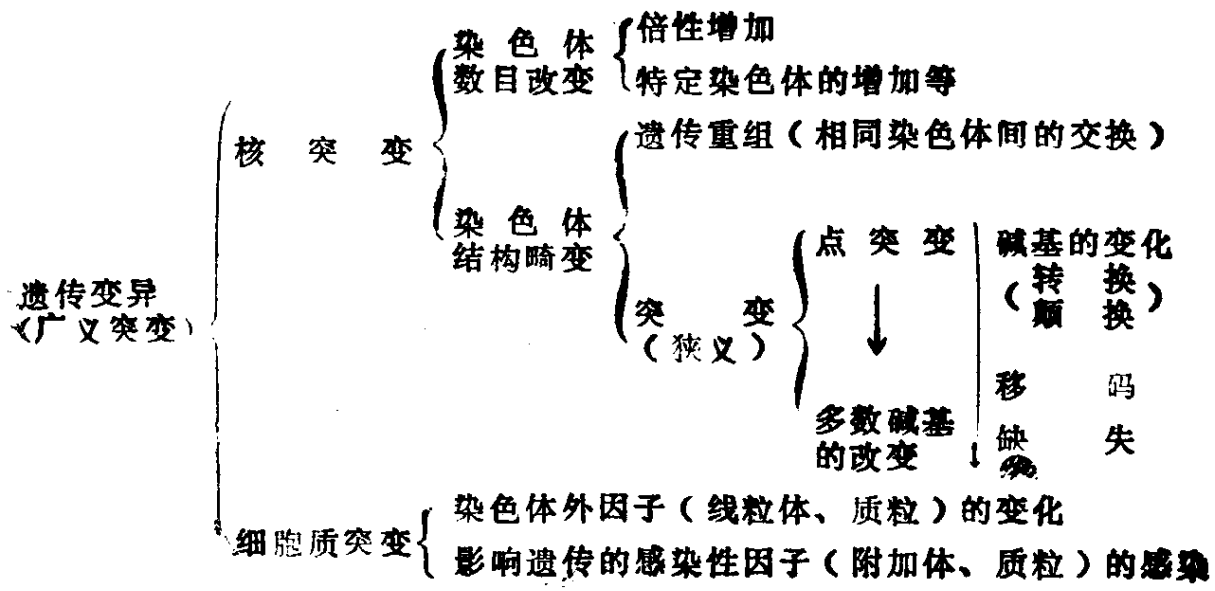
第一节 突变研究的理论背景

研究突变，首先要考虑突变现象的根本机制，其次是遗传学研究的技术和方法。详细讨论突变的机制并不是本章的主要目的，但是，由于这方面知识对了解遗传学研究的技术、方法起着很大作用，为此须简略论述一下。

所谓突变，就是生物出现与亲代（parents）不同的遗传性状的现象。表1-1可以帮助我们对确定遗传性状的基因的存在形式和基因的改变进行分析。微生物既包括原核细胞，又包括真核细胞，表1-1涉及整个生物界。

质粒和附加体等感染因子或染色体因子可整合到基因中，当它

表 1-1 突 变 的 分 类



们脱落时，则该基因所决定的性状亦随之消失。当附加体插入染色体时，有时会损伤插入部位的基因功能。真核生物的染色体是许多基因的集合体，由于特定染色体的缺失或异常，将同时造成这些基因的缺失或重排（rearrangements）。

多数突变是由于基因本身微细结构的改变。在此，就已知的几种基因突变产生的机制论述如下：

一、碱基置换（base substitution），移码（frame shift），缺失（deletion）

遗传信息的表达主要是靠三联体密码，它是四种碱基在磷酸和核糖组成的聚合物上排列组合而成，呈直线状。mRNA、tRNA及核糖体共同作用可以转录、翻译出各种氨基酸顺序不同的蛋白质。由于蛋白质活性的改变，就可以导致遗传性状的改变。这种遗传密码机制我们暂且不讨论，但应考虑到DNA碱基排列顺序与蛋白质氨基酸组成的关系，所以，有必要讨论突变的诱发机制。如图1-1。

有时DNA即使一个碱基被其他碱基置换，但所密码的蛋白质氨基酸顺序也不会发生变化。遗传密码的第三个碱基不同，亦可能密码同一种氨基酸。但是，大多数的情况则是密码出截然不同的氨基酸，因而造成蛋白质中氨基酸的置换。如果这种现象发生在酶蛋白中，往往导致酶失活或部分失活，这种现象称作酶的渗漏（leaky）。由于碱基置换造成该密码没有相应的氨基酸，称为无义密码，结果造成蛋白质翻译过程的终止。在这种情况下，其功能就完全丧失了。

我们知道，突变的结果会造成DNA少数（1~5个）碱基缺失或增加，其产生机制以后加以讨论，在此仅考虑对遗传信息的影响。由于碱基的缺失或增加，DNA会相应地缩短或伸长，如图1-1所示。每三个密码的片段（frame）就会发生改变，致使该点以后的氨基酸排列顺序完全改变，这意味着蛋白质急剧失活。一般情况下，这种变化在中途就出现无义密码，蛋白质合成就会停止。很明显，整个基因的严重缺失、脱落，会造成基因功能完全丧失。

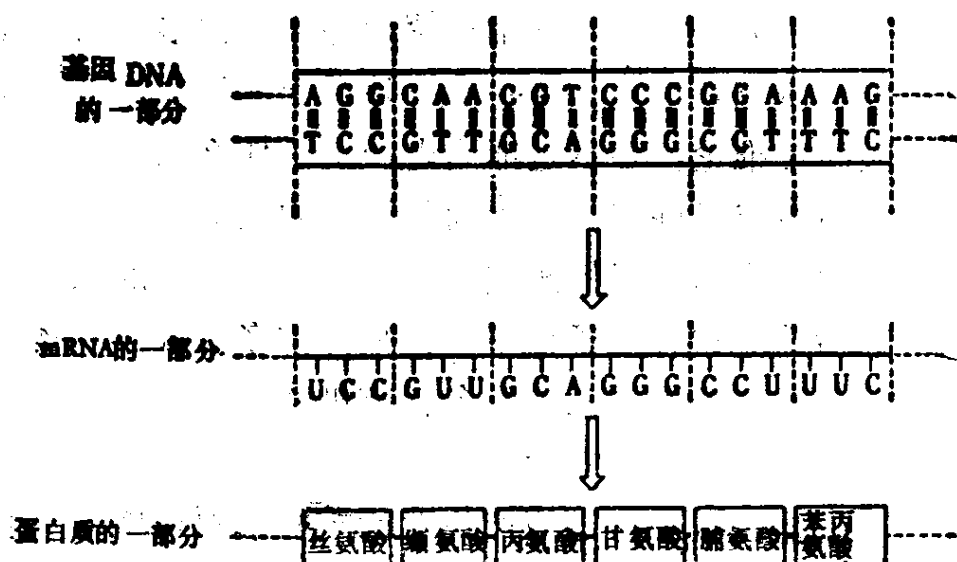


图 1-1 DNA 碱基的排列顺序决定蛋白质氨基酸的排列顺序

二、自发突变 (spontaneous mutations)

生物发生自发突变的频率往往很低，但有时会因各种原因而显著提高。造成自发突变的原因不是单一的，有很多因素至今并不完全为人所知。通常使用的培养基和培养时的通气条件等，也会包含着微小的诱变因子，所以，以往观察到的自发突变并不仅是由细胞的内因性因子造成的，但是，在这里我们仅就内因性因子加以讨论。

(一) DNA 复制

细胞内 DNA 复制时，有时会产生微小的差错，尽管人们对 DNA 复制的详细分子机制仍有争论，但都承认 DNA 聚合酶Ⅲ在碱基正常配对 (A-T 和 G-C) 中的重要作用。碱基配对中微小的错误亦会造成 DNA 链中的碱基置换。在大肠杆菌和枯草杆菌中发现了由于 DNA 聚合酶Ⅲ的结构发生微小变化，致使在高温下 (例如 43°C) 活性丧失的一种突变株。同样，这些菌在常温 ($30\sim 37^{\circ}\text{C}$) 条件下也可以观察到具有各种标记的高频突变。除了 DNA 聚合酶Ⅲ以外，参与 DNA 复制的因子，与复制正确性有关的因子也是造成自发突变的原因。关于 DNA 损伤的修复，以后加以讨论。

(二) 细胞内诱变剂

从沙门氏菌、大肠杆菌、枯草杆菌中分离出许多可以诱发高频突变的突变株，研究其机制，有一部分是由于DNA的错误复制造成的。也有人间接推论：是不是细胞内产生了什么诱变因子呢？对于诱变因子人们很容易联想到是以前就了解的核酸合成的前体物质。最近，通过环境诱变剂的研究，发现细胞内存在的天然物质中也具有诱变剂活性，这种例子很多，例如，许多醛类具有诱变剂的活性，在机体代谢物中含有乙醛及多种有机醛；过氧化氢也具有诱变作用。制备培养基的材料中含有构成诱变剂的物质的可能性很大，例如：硝酸盐被微生物还原产生亚硝酸盐，亚硝酸盐和胺类反应生成的亚硝基胺，对生物体就有诱变作用。

(三) 感染因子，质粒等

当细胞染色体外的感染因子和质粒等外源基因存在时，亦会引起突变（如前所述），还会因此大大提高自发突变的频率。人们最为熟悉的例子，如作为沙门氏菌（*Salmonella*）回复突变株而广泛应用的TA98菌株和TA100菌株，它们是将一种称为pKM101的质粒分别导入TA1538和TA1535产生的，结果这些菌株不仅自发突变率上升，而且各种诱变剂作用所造成的诱变率也增大。其原因尚不清楚，可能是由于质粒DNA密码的代谢酶破坏了微生物DNA损伤的修复功能。

三、直接诱变（direct mutagenesis）

为了使突变的细胞表达出突变后的性状并稳定遗传，一般地说，必须将无意义的DNA损伤转换成有意义的突变，才能表达遗传信息。一次造成DNA损伤就能马上表现出来，这种情况极少。例如，胞嘧啶本应与鸟嘌呤配对，但由于紫外线的照射而脱氨基，生成尿嘧啶（U），结果与腺嘌呤配对，而产生G→A这一碱基对的转换。

四、DNA修复与诱变（repair & mutagenesis of DNA）

研究物理及化学因子所造成的诱变机制，不能不考虑细胞对损伤的DNA所进行的修复。对于DNA修复机制，要用简短的篇幅叙

述清楚是很困难的，在此，就其要点尽可能简要地介绍一下。DNA修复模式如图1-2。

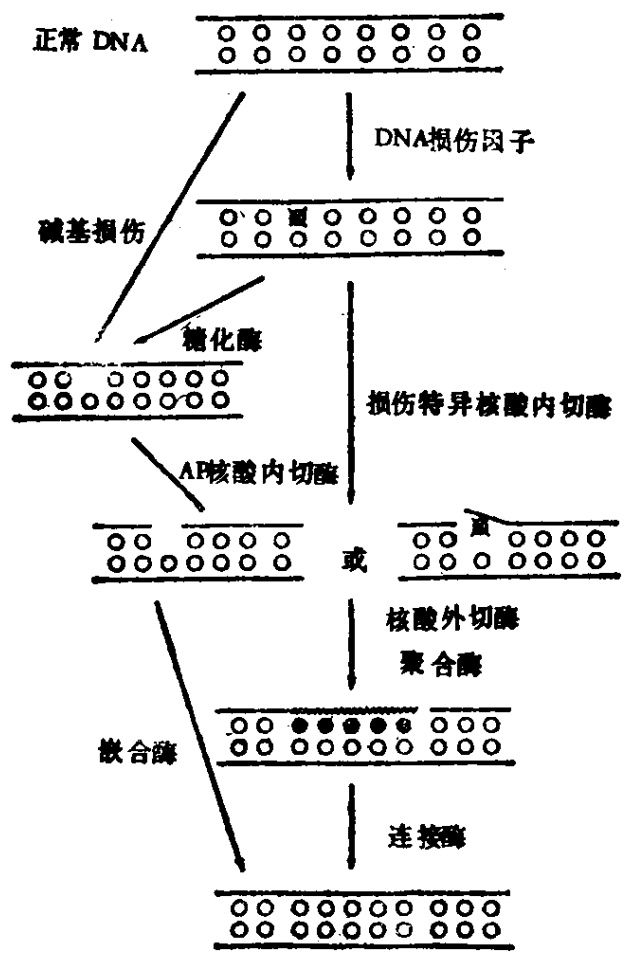


图 1-2 DNA修复模式

选自Hanawalt, P.C., P.K.Cooper, A.K.Ganesan, C.A.Smith: Ann. Rev.Biochem.48.783~836 (1979)

从诱变的观点来看，DNA修复存在两种情况，或准确修复，或伴随一定错误。实际上，在DNA修复过程中，突变使修复出现的错误固定化。DNA修复的过程（pathways）、方式（mode）有多种，这是由于DNA损伤的种类、内容和在细胞中损伤的数目不同，以及诱变剂单独或协同作用的结果。因此可以说由于生物的种类、修复的方式和修复能力的不同，其情况亦不相同。

紫外线照射后，在DNA上形成的胸腺嘧啶二聚体，由于可见光与细胞内光复活酶的协同作用而分解、消失，即所谓光复活作用

(photoreactivation)。由于这一过程的出现，突变率显著降低。这个实验事实使人推测光复活作用是无错误修复(error-free)。另一种称为切补修复(excision repair)的DNA修复类型，是紫外线暗修复的机制。这一看法提出后，得到了许多支持它的证据。由于放射线和化学物质的作用，使DNA的碱基受到损伤，由于暗修复含有与光复活酶不同特性的酶的作用，通过类似的过程，把损伤部分从DNA上切下来而加以修复。许多缺乏这一修复能力的突变株便会有很高的突变率，因此，可以肯定切补修复也是无错误修复(error-free)。就是说，切补修复是诱变的障碍。

DNA重组修复这一假说，是基于这样一种实验事实，即在大肠杆菌等重组修复缺陷株(Rec⁻)中根本看不到诱发突变，或者是诱发突变率非常低。但是，对许多基因座位不同的Rec⁻株进行研究的结果，发现不全如此。目前可以认为具有代表性的Rec⁻株——recA突变株诱变率显著低是由于recA基因的产物导致下述的SOS修复的诱发。

(一) SOS修复系统

所谓SOS修复就是以DNA损伤为契机，重新诱导合成修复酶的现象。SOS修复系统的模式图如图1-3所示，受损伤的DNA产生信息(一种降解物)活化了recA基因产物，由于它不活化SOS修

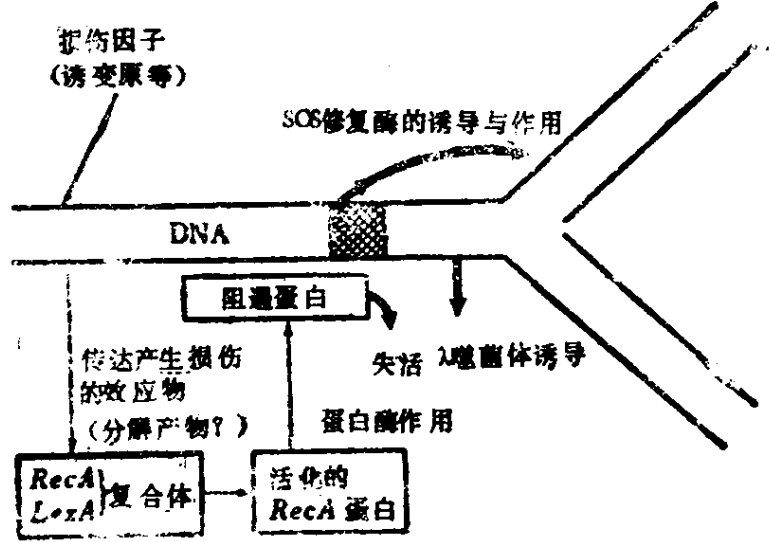


图 1-3 SOS修复机制的模式图

修复酶的阻遏物（蛋白质的酶解作用），所以活化了SOS修复系统。SOS修复酶的本质还不清楚，但如果认为它是容易引起一种错误的DNA聚合酶，有利于说明各种现象。SOS修复现象最初是在大肠杆菌中发现的，可以推测SOS修复也存在于包括哺乳动物在内的各种生物中。但有一点必须注意，即进行SOS修复时，被新诱导的修复酶出现DNA复制错误是造成突变的原因。所以，突变主要是由于碱基置换所致。这不能直接反映诱变剂作用于DNA而产生的特异性损伤。也就是说，由于不同诱变剂的作用，结果产生本质相同的突变。表现SOS修复最简单的实例是，经过一定时间间隔进行两次诱变剂处理，便可得到诱发突变的类型。图1-4表示第一次紫外线照射后，经过不同时间的培养，第二次再用紫外线照射而得到的大肠杆菌色氨酸回复突变率的变动。由于第一次照射，细胞内易引起错误的SOS修复酶的含量增加，所以把它应用于修复第二次照射而产生的DNA损伤，则可以很好地说明经第一次照射合成的修复酶，随着培养时间的延长，第二次紫外线照射突变频率急速上升。

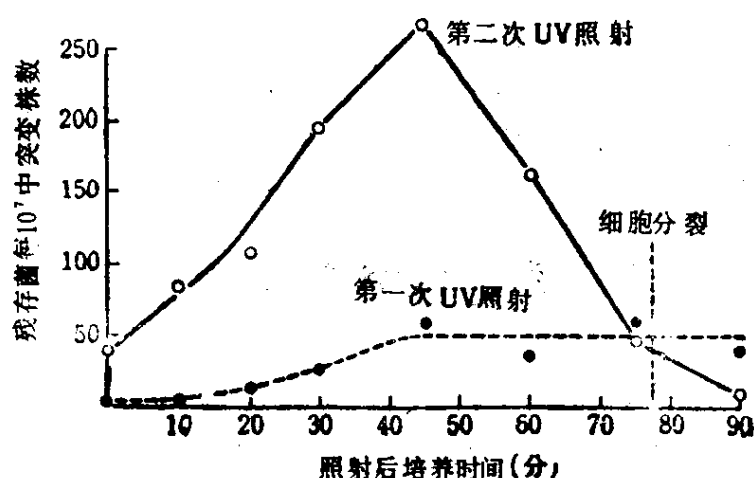


图 1-4 大肠杆菌W12trp株紫外线经两次照射后的诱发突变

经过照射的细菌在肉汤中增殖培养，每隔10分钟取样进行第二次照射，观察诱发突变。

选自Kada, T. et al. Mutation Res. 3, 118~123 (1966)

(二)适应修复

SOS修复系统诱导合成容易引起错误的修复酶，但最近还发现

可以诱导合成可正确修复的修复酶。如图1-5所示，把大肠杆菌用低浓度的亚硝基胍（NTG）处理后培养，这与图1-4所示的紫外线照射实验不同，第二次用NTG处理后的诱变率在培养过程中仍然很低。这一现象是对烷化剂作用进行观察的结果。尽管这种现象不能概括突变机制，但却是进行诱变实验时需要了解的重要知识。

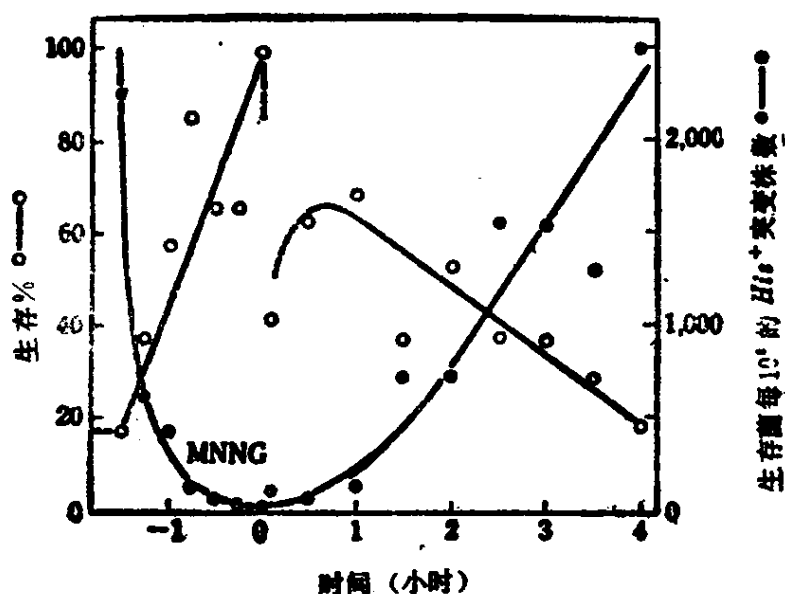


图 1-5 适应修复酶的诱导

把大肠杆菌F26 (B/r, thy his) 用 $1\mu\text{g/ml}$ 的MNNG处理1.5小时后，除去，继续培养，观察 $100\mu\text{g/ml}$ 处理5分钟的致死效果 (—○—) 以及诱发突变的效果 (---●---)。

选自Samson, L. & J. Cairns, Nature 267, 281~282 (1977)

第二节 诱变与突变株的分离方法

在微生物遗传学实验中，人为地诱发突变以分析解释遗传现象是极其重要的。能否得到目的突变株，关系到研究的成败。另外，从微生物育种这一点看，也需要想出各种办法来得到目的突变株。这些实验方法与技术必须依据突变产生机制的有关理论。

一、物理因子诱变

物理因子中最常用的是X射线（或 γ 射线）和紫外线等射线。X射线与 γ 射线大致上具有相同效果。从操作简易上看，经常采用 ^{60}Co 和 ^{137}Cs 等射线照射。用紫外线照射，可采用波长为 $2537\text{\AA}$

的灭菌灯。

(一) γ 射线照射

以 ^{137}Cs 放射线照射细菌为例。由于 γ 射线能够很容易地穿过玻璃，所以可在好气条件下进行短时间照射，操作如图1-6。在试管中加入1~2 ml的菌悬液，将试管始终浸在冰水中，从上方进行照射。根据放射线的位置，从侧面或下面进行照射时，也要采取相应的办法。若液层厚，照射时间长，则氧气的供应不足，结果的重复性较差。为了排除氧气的影响，需准备带有合适试管盖的小试管，减压脱气后，用氮气置换，密闭照射，或者一边充氮，一边照射。

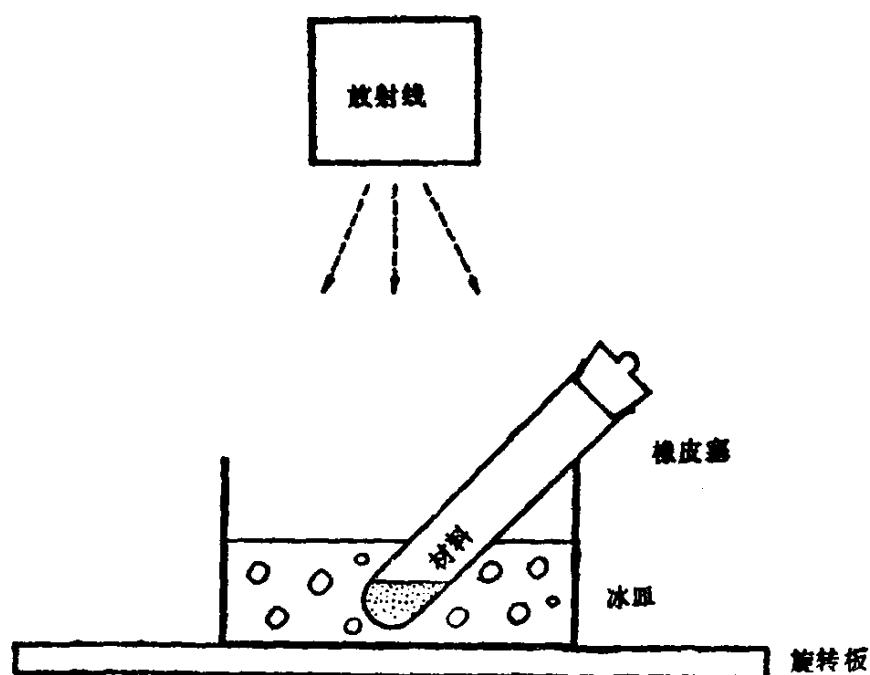


图 1-6 γ 射线照射诱变

用 γ 射线（或X射线）照射比紫外线照射和多种化学诱变剂（亚硝基胍等）对细胞的致死作用显著。一般地说，随着射线剂量的增加，残存菌的诱变率就增大。使用紫外线照射时，在某一剂量范围内常常存在引起最高诱变率的剂量。与此相反， γ 射线在达到最大诱变率前细胞就全部死亡。用紫外线照射，在活细胞中常同时发生复数突变，并可共存。相反，用 γ 射线照射，共存机率极小，