



普通高等教育“十二五”规划教材

微生物遗传育种学

梁金钟 主编

MICROBIAL GENETICS
AND BREEDING



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

微生物遗传育种学

主 编 梁金钟

副主编 付大伟

科学出版社

北 京

《微生物遗传育种学》编委会名单

主 编 梁金钟

副 主 编 付大伟

编写人员 (按姓氏笔画排序)

王 薇 哈尔滨商业大学

王红英 大连工业大学

邓永平 齐齐哈尔大学

付大伟 哈尔滨商业大学

刘晓飞 哈尔滨商业大学

关桦楠 哈尔滨商业大学

池振明 中国海洋大学

李 杰 东北农业大学

杨素萍 华侨大学

宋 刚 黑龙江大学

张 智 东北林业大学

范洪臣 哈尔滨商业大学

徐 伟 哈尔滨商业大学

梁金钟 哈尔滨商业大学

主 审 陈冠军 山东大学



前 言

微生物遗传育种学是研究微生物遗传与变异的一门重要学科，它是微生物学一个非常重要的分支学科，也是遗传学和分子生物学重要的基础学科。由于近代基因工程和分子生物学的发展都是在微生物遗传学基础上发展起来的，基因工程和分子生物学研究也几乎都是以微生物为材料进行的，因此，微生物遗传学、微生物学、基因工程、分子生物学、分子遗传学已成为密不可分的交叉学科，其中很多内容互相渗透，互相交叉。

微生物遗传育种学推动了微生物发酵工业的发展。20世纪60年代之前，微生物育种工作仅限于物理诱变和化学诱变处理。随着近代微生物遗传学的发展，微生物杂交、转导和转化，尤其是重组DNA技术已应用到微生物育种研究工作中。目前，基因工程技术已成为微生物遗传育种研究的主要手段，此项技术已在工业微生物、农业微生物、环境微生物、医学微生物的研究中得到广泛应用，另外，分子遗传学的发展也对微生物遗传学的研究起到了促进作用。

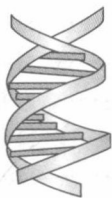
随着近代微生物发酵工业的发展，微生物菌种选育研究变得越来越重要，微生物菌种选育完全是建立在微生物遗传学的基础之上，可以说，没有微生物遗传学的基础和发展就没有近代微生物育种学。现在，微生物遗传育种学已成为一门独立学科，成为生物科学中一门重要的专业基础课程。

本书共11章，具体编写分工如下：第一章由梁金钟、范洪臣编写；第二章第1~4节由王红英编写，第5、6节由王薇编写；第三章第1~5节由杨素萍编写，第6~9节由付大伟编写；第四章由邓永平编写；第五章由池振明、梁金钟编写；第六章和第七章由李杰编写；第八章第1~4节由宋刚编写，第5~7节由徐伟编写；第九章第1~2节由张智编写，第3~4节由王薇编写；第十章第1~6节由刘晓飞编写，第7~12节由关桦楠编写；第十一章由付大伟编写。

参加本书编写工作的人员都是高等学校从事本领域教学和科研的教授和博士，具有扎实的微生物遗传育种的专业基础和很高的学术素养，在编写过程中，编者广泛收集和参考了国内外微生物遗传学领域最新的文献资料，在基本概念、基本常识方面力求全面、简明和准确，使之更适合于教学。在研究方面，也尽可能多地介绍一些最新进展和研究成果。但由于本领域发展迅速及编者水平有限，书中难免有遗漏或叙述不够详尽之处，敬请读者批评指正。

编 者

2013年9月19日



目 录

前言

第一章 绪论	1
第一节 微生物遗传育种学的发展史	1
一、微生物遗传育种学的奠基阶段	1
二、微生物遗传育种学的形成阶段	1
三、微生物遗传育种学的发展阶段	3
四、微生物遗传育种学的研究内容及意义	4
第二节 微生物细胞的基本结构	6
一、病毒的基本结构	6
二、原核生物细胞的基本结构	6
三、真核微生物细胞的基本结构	8
第三节 微生物的遗传物质	9
一、DNA 的基本结构	9
二、DNA 的复制	11
三、DNA 的基本性质	12
四、DNA 的变性、复性和杂交	12
五、RNA 的基本结构和功能	13
思考题	13
第二章 微生物基因组的结构与功能	14
第一节 微生物的基因和基因组	14
一、基因与基因组的概念	14
二、基因与基因组学	15
三、互补测验和顺反子概念	16
四、操纵子学说与基因家族	17
五、外显子与内含子	17
六、重叠基因与转座基因	18
第二节 原核生物的染色体及其复制	21
一、原核生物染色体的基本特征	21
二、细菌染色体的结构	21
三、细菌染色体的复制	22
第三节 原核生物的基因与基因组	24
一、大肠杆菌的基因组	24
二、原核生物的拟核结构	25
三、细菌的质粒	25
第四节 病毒的基因与基因组	26
一、病毒基因组的结构	26
二、反转录病毒基因组的结构与功能	26
三、反转录病毒的特征与遗传	27
四、T4 噬菌体的基本特征与遗传	28
五、λ 噬菌体的遗传特征	29

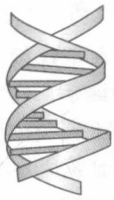
第五节 真核生物染色体的基本结构和复制	30
一、真核生物染色体的基本结构	30
二、常染色质和异染色质	33
三、真核生物染色体的复制	33
第六节 真核生物的基因与基因组	35
一、真核生物基因组的大小	35
二、真核生物 DNA 的复性	37
三、真核生物染色体上的单一序列及重复序列	38
四、卫星 DNA	39
五、基因家族与基因簇	40
六、真核生物的割裂基因	40
七、串联重复序列	42
思考题	42
第三章 微生物基因表达的调控	44
第一节 微生物基因表达调控概述	44
一、微生物基因调控的类型	45
二、微生物基因调控的主要特点	46
第二节 操纵子	47
一、操纵子模型的提出	47
二、操纵子的基本结构	47
三、操纵子类型	47
第三节 乳糖操纵子	48
一、乳糖操纵子基本结构	48
二、乳糖操纵子负调控诱导模式	49
三、乳糖操纵子的正调控模式	50
四、其他调控模式	52
五、乳糖操纵子的本底水平表达	52
六、阻遏蛋白与激活物	53
七、诱导物与辅阻遏物	54
八、阻遏蛋白与操纵子 DNA 的作用机制	54
第四节 其他操纵子及其调控模式	55
一、半乳糖操纵子——具有双启动子	55
二、阿拉伯糖操纵子	56
三、色氨酸操纵子——负控阻遏	58
四、含多启动子的操纵子	61
五、细菌的应急反应	62
第五节 微生物基因的转录	62
一、特定的 DNA 结构	62
二、RNA 聚合酶	64
三、转录过程	67

第六节 转录水平上的调控	73	二、F 质粒与接合作用的关系	116
一、启动子的结构决定了转录起始的基准水平	73	三、F 质粒的结构	118
二、 σ 因子与转录起始调控	73	四、中断杂交和基因定位	118
三、转录终止调控——抗终止和弱化调控	74	五、其他细菌中的接合现象	119
四、组蛋白类似蛋白的调控	76	第四节 细菌的转导现象	119
五、转录调控因子的作用	76	一、细菌转导的发现	119
六、增强元件的调控	76	二、转导与噬菌体的关系	120
七、转录的抑制	76	三、普遍性转导	121
第七节 转录后及翻译水平的调控	77	四、局限性转导	122
一、重叠基因对翻译的影响	77	五、转导在遗传学研究中的应用	123
二、严紧反应	77	思考题	124
三、反义 RNA 对翻译的调控	78	第五章 酵母菌的遗传和基因重组	125
四、mRNA 结构对翻译起始的调节 (SD 序列与翻译起始效率)	79	第一节 概述	125
五、mRNA 的稳定性对基因表达的调控	80	一、酵母菌的基本特征	125
六、核糖体蛋白合成的自体调控	80	二、具有重要应用价值的酵母菌	125
七、调节蛋白的调控作用	81	第二节 酵母菌的遗传物质和遗传操作方法	126
八、稀有密码子对翻译的影响	81	一、染色体组织结构	126
九、翻译的阻遏	81	二、染色体外 DNA	126
十、核开关	81	三、酿酒酵母遗传操作方法	127
十一、噬菌体基因组表达的时序调控	82	四、酿酒酵母之外酵母中外源蛋白的表达	129
十二、原核生物的全局调控-群体感应	84	第三节 酵母线粒体基因组及其遗传	131
第八节 真核微生物基因表达的调控	85	一、呼吸缺陷突变株	131
一、真核微生物基因表达调控的特点	85	二、酵母线粒体基因组的物理图谱及其特点	131
二、真核微生物基因转录调控机制	86	第四节 酵母基因表达的调控	131
三、染色体水平的调控	90	一、酵母基因的启动子元件	131
四、转录后水平的调控	92	二、酵母的转录调控因子	132
五、翻译和翻译后水平的调控	92	第五节 酵母菌诱导和阻遏分子机制	134
第九节 蛋白质的运输和分泌	95	一、葡萄糖阻遏的分子机制	134
一、信号肽假说	95	二、磷脂酰肌醇类信号转导与葡萄糖阻遏的可能关系	135
二、细菌蛋白质的运送和分泌	96	三、葡萄糖解阻遏与酵母菌酶的合成和调控	135
三、酵母蛋白质的运送和分泌	100	四、在铁载体合成过程中阻遏机制的研究	136
思考题	101	五、氮阻遏机制的研究现状	137
第四章 细菌的遗传和基因重组	103	六、诱导机制的研究现状	138
第一节 基因的转化现象	103	思考题	139
一、转化的发现	103	第六章 放线菌的遗传和基因重组	140
二、转化的本质	103	第一节 链霉菌的染色体	140
三、利用转化绘制遗传图	105	一、DNA 的碱基组成	140
第二节 细菌的质粒	106	二、链霉菌的染色体 DNA	140
一、质粒的发现	106	三、链霉菌染色体的缺失、扩增和重排	140
二、质粒的命名原则	106	第二节 链霉菌中的质粒、转座因子和噬菌体	142
三、质粒编码的遗传表型	106	一、链霉菌中的质粒	142
四、质粒的复制和调控	108	二、链霉菌中的转座因子	145
五、质粒的不亲和性	111	三、链霉菌中的噬菌体	146
六、质粒的可转移性	112	第三节 链霉菌的接合作用	146
七、质粒不稳定性	112	一、链霉菌基因重组的发现	146
八、质粒的检测与获得	113	二、天蓝色链霉菌中的性别体制和遗传重组	147
第三节 细菌的接合作用	115	三、链霉菌遗传分析方法和基因连锁图的制作	150
一、接合现象的发现	115	四、链霉菌与大肠杆菌之间的接合作用	154

第四节 链霉菌的原生质体融合和转化.....	154	二、DNA 的切除修复	181
一、原生质体融合	154	三、DNA 的错配修复	182
二、转化和转染	154	四、DNA 的重组修复	183
思考题	155	五、SOS 修复及双链断裂修复	184
第七章 丝状真菌的遗传和基因重组.....	156	第五节 诱变育种及突变体获得.....	187
第一节 丝状真菌的遗传物质和基因表达调控	156	一、诱变育种的基本方法与步骤	187
一、丝状真菌的遗传物质	156	二、突变体的常规分离与筛选	189
二、丝状真菌的基因结构	157	三、营养缺陷型的分离与筛选	190
三、基因表达的调控	157	四、噬菌体抗性突变株的分离与筛选	191
第二节 丝状真菌中的质粒.....	158	五、温敏突变株的分离与筛选	192
一、质粒的类型和特征	158	六、转座子标签突变体	192
二、丝状真菌中的天然质粒及其分布	159	七、突变体库的饱和度分析	193
三、质粒的遗传	160	八、突变体位点的检测	194
四、质粒整合到 mtDNA	160	第六节 微生物代谢控制育种	194
第三节 丝状真菌的转化.....	160	一、初级代谢及次级代谢	194
一、外源 DNA 导入丝状真菌的方法.....	160	二、初级代谢的调节控制	195
二、载体及其选择标记	161	三、酶合成调节及酶活性调节的概念	196
三、丝状真菌转化子的表达及其稳定性	161	四、反馈抑制与反馈阻遏的比较	197
第四节 粗糙脉孢菌的遗传分析.....	162	五、次级代谢的调节控制	197
一、粗糙脉孢菌的生活史	162	六、次级代谢产物的诱导调节	197
二、粗糙脉孢菌有性杂交的四分体遗传分析	162	七、次级代谢产物的碳源分解调节	197
三、粗糙脉孢菌有性杂交的随机孢子分析	165	八、次级代谢产物的氮源分解调节	198
第五节 构巢曲霉的遗传分析.....	166	九、次级代谢产物的磷酸盐调节	198
一、构巢曲霉的生活史	166	十、次级代谢产物的细胞膜透性调节	198
二、构巢曲霉有性杂交的遗传分析	166	十一、次级代谢产物的反馈调节	198
第六节 真菌的准性生殖.....	167	十二、组成型突变株的选育	199
一、准性生殖的普遍性	167	十三、抗分解调节突变株的选育	199
二、准性生殖过程	168	十四、抗反馈调节突变株的选育	201
思考题	170	十五、营养缺陷型在代谢调节育种中的应用	203
第八章 基因突变及传统微生物育种.....	171	十六、细胞膜透性突变株的选育及在代谢调节 育种中的应用	204
第一节 基因突变的类型.....	171	第七节 微生物杂交育种.....	204
一、自发突变和诱发突变	171	一、细菌杂交育种的基本过程	205
二、基因突变及染色体畸变	171	二、杂交亲本和培养基的选择	205
三、显性突变及隐性突变	171	三、杂交亲本的遗传标记	205
四、基因突变及突变型	171	四、细菌杂交育种的方法	205
五、条件突变及非条件突变	172	五、放线菌的杂交育种原理和方法	205
六、功能缺失型突变及功能获得型突变	172	六、酵母菌的杂交育种	207
七、回复突变及抑制突变	172	七、霉菌的杂交育种	207
第二节 基因突变的分子机制.....	173	八、高产重组子的筛选	207
一、碱基置换	173	思考题	208
二、插入和缺失突变	173	第九章 微生物原生质体融合育种	209
三、移码突变	173	第一节 微生物原生质体融合育种概述.....	209
第三节 基因突变的诱发因素.....	174	一、原生质体融合育种的基本原理	209
一、基因突变的生物诱发因素	174	二、原生质体融合育种的基本方法	210
二、基因突变的物理诱发因素	175	第二节 细菌原生质体融合育种.....	216
三、基因突变的化学诱发因素	176	一、概述	216
四、诱变剂及诱变剂检测	178	二、细菌原生质体融合育种方法	217
第四节 基因突变的修复及修复机制.....	180	三、细菌原生质体融合实例	218
一、DNA 的光修复	180		

第三节 放线菌原生质体融合育种	219	三、PCR 的反应体系	259
一、放线菌结构细胞	219	四、PCR 反应的影响因素	261
二、放线菌的繁殖方式	219	五、PCR 技术的基本操作	262
三、放线菌原生质体融合育种的基本方法	220	六、扩增产物的分析与检测	262
四、放线菌原生质体融合体的检出和鉴定	221	七、PCR 技术的扩展	264
第四节 酵母菌和霉菌原生质体融合育种	222	第八节 体外克隆	266
一、酵母菌细胞壁结构和繁殖方式	222	一、分子克隆的基本步骤及研究内容	266
二、酵母菌原生质体融合育种的基本方法	222	二、基因克隆的一般方法	267
三、霉菌原生质体融合育种的基本方法	224	三、克隆筛选与鉴定	268
思考题	227	四、影响连接反应的因素	269
第十章 基因工程育种技术	228	第九节 重组 DNA 的导入	270
第一节 概述	228	一、感受态细胞的制备	270
一、重组 DNA 技术基本原理	228	二、外源基因导入原核细胞的方法	271
二、重组 DNA 技术的基本流程	228	三、外源基因导入真核细胞的方法	272
第二节 重组 DNA 中常用的载体	228	四、基因转移所用的病毒载体	273
一、作为载体的基本要求及载体类型	228	第十节 重组 DNA 的筛选和鉴定	273
二、克隆载体	229	一、抗生素平板法	273
三、表达载体	234	二、插入失活法	274
四、穿梭质粒载体	239	三、插入表达法	274
五、人工染色体	239	四、限制性内切核酸酶分析法	274
六、其他载体	240	五、原位杂交法	274
第三节 重组 DNA 中常用的工具酶	241	六、PCR 鉴定法	275
一、限制性内切核酸酶	241	七、原位放射免疫法	275
二、DNA 连接酶	243	第十一节 分子杂交和印迹技术	276
三、DNA 聚合酶	245	一、核酸分子杂交的基本原理	276
四、反转录酶	247	二、DNA 的变性、复性及杂交	276
五、碱性磷酸酶	248	三、核酸探针	277
六、末端转移酶	248	四、核酸杂交方法	278
七、依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶	249	五、常用印迹杂交方法	278
八、S1 核酸酶、BAL31 核酸酶	249	第十二节 基因的表达	280
九、大肠杆菌外切核酸酶 III	250	一、影响外源基因表达的因素	280
十、其他核酸酶	250	二、外源基因在原核细胞中的表达系统	280
第四节 克隆载体的宿主	251	三、外源基因在真核细胞中的表达系统	282
一、宿主的基本要求及性质	251	四、差减杂交法	283
二、原核生物的宿主	251	五、mRNA 差异显示和限制酶酶切片段差异显示	284
三、真核微生物的宿主	252	六、基因表达快速分析技术	285
第五节 外源 DNA 制备	253	七、基因组表达连续分析技术	286
一、质粒 DNA 的提取与分离	253	八、微阵列技术	287
二、染色体 DNA 的提取与分离	253	思考题	288
三、RNA 的提取与分离	254	第十一章 蛋白质(酶)工程及基因组改组	289
四、核酸的定量测定	255	第一节 概述	289
第六节 目的基因的获得	255	第二节 理性设计	290
一、基因文库法	255	一、寡聚核苷酸定点诱变的原理	290
二、cDNA 文库法	256	二、寡聚核苷酸定点诱变的方法	291
三、化学合成法	257	三、寡聚核苷酸定点诱变方法的改进	291
四、PCR 法扩增目的基因	257	四、PCR 介导的定点突变的原理和方法	291
第七节 PCR 技术	258	五、重叠延伸 PCR 技术	291
一、PCR 技术的基本原理	258	六、大引物 PCR 定点突变法	292
二、PCR 技术的特点	258		

七、盒式突变	292	四、各种展示技术	306
第三节 非理性设计	292	第五节 基因组改组育种的原理、策略及其应 用实例	307
一、蛋白质分子定向进化简介	293	一、基因组改组育种的原理	307
二、蛋白质分子定向进化的原理	293	二、基因组改组育种的程序及策略	308
三、蛋白质分子定向进化的策略	293	三、基因组改组技术的应用实例	309
第四节 定向进化基因文库高通量筛选方法	299	思考题	310
一、常用的仪器和设备	299	主要参考文献	311
二、常用的数据分析软件	302		
三、常用的高通量筛选方法	303		



第一章

绪 论

第一节 微生物遗传育种学的发展史

一、微生物遗传育种学的奠基阶段

早在微生物学发展初期，微生物遗传和变异的现象就被微生物学家所发现。法国微生物学家路易斯·巴斯德 (L. Pasteur, 1822~1895) 曾经观察到炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 在高温条件下培养，其毒性大减而抗原性不变的现象，这一变异现象被成功地应用到炭疽杆菌的疫苗制造。

德国细菌学家罗伯特·科赫 (R. Koch, 1843~1910) 在研究疾病发生的原因时，发现某种疾病的发生和某种特殊细菌有着直接的关系，为了证实这一结论，他将由病原体所分离得到的细菌重新接种到健康的动物体上，观察是否引起同一病症，然后由病体上再分离到同一种细菌，由此来研究疾病与微生物之间的关系。通过长期深入的研究，某种疾病的发生与微生物的关系得以证实，并且微生物可以遗传的理论也初步确立。

19世纪末，在研究小麦锈病过程中，发现了小麦锈病的生理族及小麦锈病相关微生物的分化变异现象，从而加深了人们对于微生物遗传和变异的认识。

1907年，发现了睡眠病虫中微生物的抗药性变异现象，同年，马西尼 (Massini) 发表了名为《可突变的大肠杆菌》的学术论文，报道了从非乳糖发酵的菌株中分离出可发酵乳糖的变异株，并且测定了变异率。

1927年，哈德利 (Hadly) 系统地论述了细菌形态、生理生化特征、防腐剂抗性等方面发生的变异现象。随着化学药物治疗的发展，又陆续发现了细菌对于各种药物的抗药性现象。但是，在20世纪40年代以前，一般认为，细菌的抗药性并非由基因突变引起，而是长期与药物接触引起的生理适应性。

1928年，人们发现了肺炎双球菌的转化现象，但是，直到40年代中期才阐明了转化因子的化学本质是脱氧核糖核酸 (DNA)。

20世纪30年代，对酵母菌、草履虫和脉孢菌进行了较为系统和深入的遗传学研究，并进行了基因重组和基因定位。

总之，20世纪40年代以前，微生物遗传学的研

究是不系统和非常初步的。这个时期的遗传学研究只限于对一些进行有性生殖，特别是产生有性孢子的微生物，对不进行有性生殖的微生物的遗传学研究手段尚未建立。

但是，20世纪40年代以前大量关于微生物遗传和变异现象的观察，以及酵母菌和脉孢菌中的经典遗传学 (classical genetics) 研究都为整个微生物遗传学的发展打下了基础。此外，40年代初期，由于抗生素工业的兴起，又推动了微生物遗传育种学的大发展。在研究高等生物基因的作用机制时，人们发现采用微生物作为研究材料具有诸多好处，这为现代微生物遗传学、分子生物学及基因工程的诞生起到了极大的推动作用。

二、微生物遗传育种学的形成阶段

(一) 20世纪40年代

20世纪40年代以比德尔 (J. W. Beadle) 和塔特姆 (E. L. Tatum) 为代表的微生物和遗传学家利用X射线诱变脉孢菌细胞，发现了脉孢菌营养缺陷型。这项研究开辟了生化遗传的新思路和新方法，不但为基因作用机制的研究确立了基础，而且为阐明代谢途径提供了有效方法，在基因作用机制研究中提出了“一个基因一种酶”的假设，这是分子遗传学研究的开端。

利用营养缺陷型探索代谢途径这一思想方法在微生物遗传育种学中得到广泛应用，逐步开展了基因重组、发育、分化、形态建成、诱变育种等方面的研究。营养缺陷型在基因作用、基因结构、基因突变等研究中也是良好的实验材料。此外，也将营养缺陷型的研究方法应用到人类遗传学、动植物遗传育种等研究中。营养缺陷型的发现，使得细菌的基因重组得以发现，从此微生物遗传学研究几乎在任何一种生物遗传的研究中得以应用。

1943年之前，人们一直认为细菌抗药性是细菌与药物接触引起的生理适应性现象，并非基因突变引起的，对此存在很大的争议。直到1943年，卢里亚 (S. E. Luria) 和德尔布吕克 (M. Delbruck) 用著名的波动试验证实了细菌的抗性是基因突变的结果。这

成的起始氨基酸都是甲酰甲硫氨酸。发现了核糖体上的 P 位点和 A 位点, 分离出连接酶, 发现了线粒体具有环状 DNA。

1969 年发展了原位杂交技术, 用仙台病毒使人、鼠细胞融合。1970 年发现了 RNA 反转录酶和限制性内切核酸酶 I, 发现了传递信号的 G 蛋白及其功能, 人工合成了酵母丙氨酸 tRNA 的基因。

(五) 20 世纪七八十年代

20 世纪 70 年代, 随着基因工程的崛起, 微生物遗传育种学进入了基因工程快速发展期, 基因分离合成技术和细胞分离融合技术得到了快速发展, 并普及到原核生物和真核生物的研究中。这个阶段取得的主要成果有以下几点。

1971 年绘制了第一张限制性内切核酸酶图谱, 并鉴别出费城染色体是 22 号染色体缺失了 1/3 而形成的。

1972 年, 创建了 DNA 体外重组技术。1973 年, 首次在体外构建了具有功能的细菌质粒。

1975 年, 建立了 DNA 印迹技术、菌落膜上杂交技术、高分辨双向蛋白电泳技术、单克隆抗体制备技术。

1976 年, 证实了免疫球蛋白形成的体细胞重组学说, 发现了鸟类肉瘤病毒中含有癌基因, 并首次将分子杂交技术用于地中海贫血遗传病的产前诊断。

1977 年, 发现了基因中的外显子与内含子, 提出了断裂基因的新概念, 建立了 DNA 的化学测序法及 DNA 测序的“加”、“减”法, 即酶法。

1978 年, 首次将真核基因 (*dhfr*) 在细菌中表达, 建立了装配型载体, 克隆了 DNA 大片段, 建立了定点突变技术, 发现了四膜虫端粒的串联重复顺序。

1979 年进行限制性片段长度多态性的研究, 提出了 Z-DNA 模型。1980 年用限制性片段长度的多态性构建人类遗传学连锁图。

1981 年发现了四膜虫 rRNA 的自体拼接, 发现了增强子, 并首次将疱疹病毒的 TK 基因转移到小鼠中表达。1982 年证实了癌基因中单个碱基的突变可引起肿瘤的产生。

1983 年建立了线虫胚细胞谱系, 应用 Ti 质粒将基因转入植物。1983 年, 启动了大肠杆菌基因组项目, 于 1995 年完成。1984 年, 发现了果蝇同源异型盒及同源异型基因, 建立了脉冲变角凝胶电泳技术, 用于大片段 DNA 的分离。

1985 年, 建立了 PCR 技术进行体外扩增。1986 年发现了 RNA 编辑现象, 对植物类病毒拟病毒提出了锤头结构模型。1987 年, 构建了酵母的人工染色体 YAC。

1988 年, 研究了 *Rb* 抗癌基因的功能, 启动了嗜血流感菌的测序工作。1989 年, 报道了 *E. coli* 中氨

酰-tRNA 合成酶的结构与功能。

三、微生物遗传育种学的发展阶段

微生物基因组时期是随着 20 世纪 80 年代部分微生物基因组研究工作的开展而启动的, 如 1983 年大肠杆菌基因组项目、1988 年嗜血流感菌基因组的测序等, 酵母基因组测定始于 20 世纪 80 年代末期, 于 1996 年完成。

从 20 世纪 90 年代以后, 微生物遗传育种学发展迎来了微生物基因组学的时代, 从 1994 年美国启动微生物基因组计划, 到 2006 年春季人类元基因组计划的启动, 把微生物遗传学研究又推向一个新的高峰, 由此进入微生物基因组学研究新时期。这期间, 1990 年建立了端粒的复制模型, 克隆证实了人类和哺乳动物性别决定的主要基因是 *SRY/sry*, 启动了人类基因组计划 (完成于 2001 年), 并完成了全长 230kb 的人类巨细胞病毒全序列的测序工作。

1991 年提出了 RNA 编辑的转酯反应模型。1992 年揭示了 p53 的抗癌作用机制。1994 年提出了“内蛋白质”的概念, 提出了细菌复制叉上的复制体模型, 1994 年完成了第一个微生物基因组嗜血流感菌的测序工作, 同时美国能源部启动了微生物基因组计划。

1995 年完成了生殖道支原体项目, 随后完成了詹氏甲烷球菌、热自养甲烷杆菌、激烈火球菌及 *Aquifex aeolicus* VF5 真细菌等细菌的测序工作, 发现了 II 类内含子的结构及剪接。1996 年日本完成了光合蓝细菌集胞藻的物理图谱。

在基因组时代的初期, 1997 年法国巴斯德研究所对革兰氏阳性枯草芽孢杆菌基因组进行了测序, 1998 年瑞典乌普萨拉大学完成了普氏立克次氏体基因组测序, 由于微生物种类的多样性, 微生物基因组计划正在以惊人的速度扩展, 它的总投入和工作量都将超过人类基因组, 它对人类产生的影响也将是难以估计的。

在 21 世纪的基因组时代中, 2000 年 8 月华盛顿大学基因组中心与病原学公司合作完成了铜绿假单胞菌的测序工作。2002 年美国国立过敏、传染病和人类病原体研究所资助了 15 种重要的人类病原菌的测序, 正在资助和参与资助 44 种与人类健康相关的细菌、真菌和寄生虫的测序项目。

英国桑格研究所到 2002 年 9 月完成了 7 种细菌基因组序列测序, 正在进行的有 5 种真菌, 包括裂殖酵母、烟曲霉、卡氏肺囊虫、白色念珠菌及酿酒酵母。2002 年 1 月美国能源部资助完成了 6 种古细菌、8 种真菌的基因组测序, 10 种真细菌测序完成, 另外, 14 种真细菌、2 种古细菌和 1 种真核生物测序草图已经完成。

2003 年美国破译冠状病毒基因组, 对流感病毒与禽流感病毒 H5N1 进行了系统的比较分析, 2006 年春

季,国际上6个国家的生物科学家充分论证并启动了人类元基因组计划,人类元基因组计划被称为“人类第二基因组计划”,其规模和广度将远远超过人类基因组计划。

“人类元基因组”是指人体内共生的菌群基因组的总和,包括肠道、口腔、呼吸道、生殖道等处的菌群。由于微生物代谢功能的丰富多样,人类元基因组计划有可能发现100多万新的基因,其工作量至少相当于10个人类基因组计划。这对于阐明许多疾病的发生机制、研究新的药物、控制药物毒性等将发挥巨大作用。人类元基因组计划的目标是,把人体内共生菌群的基因组序列信息都测定出来,而且要研究与人体发育和健康有关的基因功能,这将有助于更好地破解人类疾病。

21世纪,由于基因组的破译与诠释,以功能蛋白为核心的后基因组时代迎来了蛋白质研究的新起点,尤其是对于新药开发也具有了全新观念,人类对疾病的预防与治疗研究将会有很大的发展。

四、微生物遗传育种学的研究内容及意义

现代微生物遗传育种学是研究微生物基因的结构、功能、变异、传递、表达和调控规律的学科。是在分子水平上研究基因的结构与功能,以揭示微生物遗传变异及表达调控的分子机制。研究的范畴包含基因的组织结构,及其在生命系统中储存、复制、信息传递的分子机制,基因表达与代谢调控规律,基因表达产物的结构与功能,基因变异的分子机制,基因在控制细胞分裂、生长分化、形态发生与个体发育中的作用机制。

微生物遗传学研究遗传物质的分子结构与传递机制。作为遗传物质的DNA和RNA,遗传信息就储存在其中,遗传信息通过DNA双链分子的半保留复制(semiconservative replication),由亲链(parental chain)产生两个与亲链完全相同的DNA双链分子,保证了遗传物质从亲代向子代的传递,这是微生物遗传学的理论基础。某些病毒,主要是反转录病毒,是以RNA作为遗传物质,尽管RNA的化学结构与DNA不同,但复制的基本原理是相似的,也是通过其互补链的合成来实现的,从而起着遗传信息的储存与传递的功能。

微生物遗传学研究遗传信息表达的分子机制。遗传物质不仅要具有精确复制和传递的分子机制,还要有控制性状表达及实现功能的作用机制。微生物的生命活动和功能的表达是通过蛋白质来实现的。蛋白质分为结构蛋白、运输蛋白、储藏蛋白、毒蛋白、酶分子、抗体、激素、细胞因子、基因表达调控因子等。蛋白质构成了微生物细胞的基本结构,而且微生物的生长、繁殖、发育、代谢物的合成和分解、能量的产生和利用、对外界刺激的反应及运动等都是蛋白质功能的具体体现。同时,不同生物有稳定遗传的不同的

结构和性状,这些都是由基因决定的。即基因决定微生物的遗传性状是通过蛋白质来实现的。关于遗传信息的流向与表达,中心法则(central dogma)则阐明了遗传信息的流动方向,即遗传信息的复制、转录、翻译形成蛋白质,中心法则对微生物遗传学的建立与发展具有着重要意义,也是微生物遗传学的理论基础。

微生物遗传学研究基因表达调控的分子机制。基因表达(gene expression)是指基因通过转录和翻译最终产生功能产物的过程。这些功能产物为蛋白质或RNA(如tRNA、rRNA等)。基因表达过程在不同环境、不同生长阶段受到一系列精确的调控,调控可以发生在基因表达的任何阶段。Jacob提出的大肠杆菌乳糖操纵子(lactic operon)模型表明,遗传信息的表达与调控是统一的,基因不仅是遗传信息的载体,同时也具有调控其他基因的功能,这些相互制约的基因使微生物在不同环境条件下表现出不同的遗传特性,该模型为研究基因表达调控的分子机制奠定了基础。

微生物遗传学研究遗传变异的分子机制。DNA和RNA作为遗传物质不仅储存和传递遗传信息,而且含有变异的分子基础,从而使生物得以进化。基因发生突变或染色体发生改变,都将引起性状的改变并且以稳定的性状遗传下来。基因突变、染色体数目、染色体结构发生改变及遗传重组,是导致基因或基因组不断变化的主要因素,但其分子机制各不相同。此外,基因组中转座因子(transposable element)的位置移动和插入也带来各种效应的突变。虽然引起各种类型遗传变异的机制不同,但其分子基础是相同的,那就是改变了基因组DNA序列。但表观遗传变异(epigenetic variation)则是另一种类型的遗传性的变化,它是指基因组中的DNA序列不发生改变,而在基因表达时发生的可遗传的变化,造成基因产物的改变,最终导致表型的改变,如碱基的甲基化(methylation)、基因组印记(genomic imprinting)、RNA编辑(RNA editing)等,由此进一步拓宽了遗传变异的研究内容。

微生物遗传学研究基因和基因组的结构与功能。任何一种生物的基因组都具有单倍体细胞内所含的染色体(chromosome),它储藏着一套完整的遗传信息,决定了该生物体的遗传特性。基因组中的每条染色体由一个DNA分子组成,而每个DNA分子则包含很多基因。随着研究的进展,微生物遗传学的研究任务不仅是研究单个基因的结构与功能,而且还研究微生物整个基因组的结构与功能。另外,微生物遗传学还研究基因控制细胞分化和发育的分子机制,生长发育是所有生物的共同属性。

利用微生物遗传学理论和知识进行微生物育种,选育出具有工业、农业、医学、环境用途的微生物菌种,是研究微生物遗传学的最终目的。从野生型微生物中选育优良菌种,必须改变其遗传信息。微生物育

种是对基因进行有目的的改良,只有人们了解并掌握了微生物遗传学知识之后微生物育种才成为可能。目前,主要的育种方法有以下几种。

(1) 诱变育种 (mutation breeding): 诱变育种是利用物理因素或化学因素使微生物基因发生突变,最简单的一种突变是“点突变”,即将一对碱基(如腺嘌呤-胸腺嘧啶)变成另一对(鸟嘌呤-胞嘧啶)。有时一段基因顺序中也会失去一对碱基、一小段 DNA 或插入一对新的碱基。

工业生产上优良的菌株,都是经过多次突变和筛选而得到的。微生物育种时,先以一种或两种诱变剂处理初发菌株,再从几千至上万个菌落中通过检测逐步筛选获得发生变异的菌株。当发现突变株的产量增加时,又作为下一次诱变和筛选的出发菌株,这样进行多次。用这种方法,以人为方式使微生物的遗传信息发生变化,直至获得具有经济价值的生产菌株。

这种传统的选育工作进展缓慢,效率低,且工作量大,筛选结果是无法预测的。另外,由于产量不仅受菌种基因的影响,还受环境条件的强烈影响,因此,筛选到新菌株必须进行发酵试验。

但是,长期多次对某一菌株进行诱变剂处理,会产生“疲劳效应”,同时引起菌种生长周期延长、孢子量减少、代谢减慢等。而杂交育种作为微生物育种的另一有效手段,在种内杂交、种间杂交以至属间杂交方面都取得了令人满意的结果。

(2) 杂交育种 (hybrid breeding): 杂交育种的最主要目的就是把两个不同菌株的优良性状集中在一个重组体中,使重组体兼具两者的优良性状,此优良性状能稳定地遗传下去,杂交育种能克服长期用诱变剂处理造成的缺陷,杂交是增加产品新品种的重要手段之一,其中包括细胞融合育种技术。

(3) 代谢控制育种 (metabolic control breeding): 以氨基酸发酵为典型代表,代谢控制育种以诱变育种为基础,获得各种解除、缺陷或绕过微生物正常代谢途径的突变株,人为地使目的产物选择性地大量生成和累积。代谢控制育种的发展标志着诱变育种发展到理性阶段,导致了氨基酸、核苷酸及某些次级代谢产物的高产菌株大批地投入工业化生产。

(4) 基因工程育种 (genetic engineering breeding): 又称 DNA 重组技术,所谓基因工程育种是在 DNA 分子水平上对基因进行重组操作的复杂技术,即将外源基因通过体外重组,导入受体细胞内,使这个基因能在受体细胞内复制、转录、翻译表达的操作。基因工程育种是用人为的方法将所需要的某一供体生物的 DNA 分子提取出来,在离体条件下用适当的工具酶进行切割后,把目的基因与作为载体的 DNA 分子连接起来,然后与载体一起导入某一更易生长、繁殖的受体细胞中,让外源 DNA 在宿主细胞中进行正常的复制和表达,从而获得新物种的一种崭新技术。

基因工程育种是以分子遗传学为理论基础,以微

生物学和分子生物学的现代研究方法为手段,将不同来源的基因按预先设计的蓝图,在体外构建杂种 DNA 分子,然后导入活细胞,以改变生物原有的遗传特性、获得新品种。

目前以基因工程方法创造的各种工程菌不计其数,实现了人为的菌种选育,一切可以按照人们事先设计和控制的方法进行育种,这是一种最新的育种技术,基因工程菌的构建和应用,已在多方面显示出其巨大的生命力。

(5) 基因组改组 (genome shuffling): 是一种细胞定向进化技术,基因组改组是多亲本微生物之间发生重组,先用诱发突变或点突变技术产生复杂子代组合库,再利用改组技术将有利性状组合拼接,以快速进化目标菌的一种微生物育种新方法。

基因组改组技术巧妙地模拟和发展了自然进化过程,以分子进化为核心,用工程学原理加以人工设计,在实验室实现微生物全细胞快速定向进化,在较短的时间内便可获得性状大幅度改良的正向突变的菌株,成为微生物育种的前沿技术。

(6) 酶分子定向进化 (molecular directed evolution of enzyme): 分子定向进化是一种 DNA 水平的分子定向进化技术。20 世纪 90 年代中期美国 Arnold 和 Stemmer 首先报道了蛋白质(酶)分子改造成功的例子,从此拉开了酶蛋白分子定向进化育种的序幕。分子定向进化属于蛋白质(酶)非理性设计的主要范畴,它不需要了解蛋白质的空间结构和催化机制,在实验室中人为创造特殊的进化条件,模拟自然进化机制,在体外进行酶蛋白基因的改造,并定向筛选出具有所需特性的突变蛋白。这样就能在较短时间内完成漫长的自然进化过程,人们可以几周时间内创造出优化的酶蛋白,而在自然进化过程中,要达到此进化结果则需要等上几千万年。

(7) 高通量筛选技术 (high-throughput screening, HTS): 高通量筛选技术是微生物育种的一种重要的辅助技术,在微生物育种过程中,无论是传统的诱变育种、杂交育种、细胞融合育种、代谢控制育种、基因工程育种、基因组改组育种还是分子定向进化育种,建库后,都要对文库进行筛选。而文库的库容量很大,各样品的质量又参差不齐,筛选具有很大的随机性。使用传统的筛选方法工作量大,筛选样品少,获得目的菌的概率小,要耗费大量的人力物力,工作效率低,而高通量筛选技术则完全解决了这些问题。

高通量筛选技术是以分子水平和细胞水平的实验方法为基础,以微板形式作为实验工具载体,以自动化操作系统执行试验过程,以灵敏快速的检测仪器采集实验结果数据,以计算机分析处理实验数据,在同一时间检测数以千万计的样品,并以得到的相应数据库支持运转的技术体系,它具有微量、快速、灵敏和准确等特点。可以通过一次实验获得大量的信息,并

从中找到有价值的信息。

HTS技术的核心是,首先,必须根据目的样品的特性,开发出合适的筛选模型,将样品的这些特性转化成可以用摄像头和计算机传感器识别的光信号或者电信号。其次,要有自动化的实验操作系统,能够进行移液、接种、清洗等设备操作。再次,必须具备以下特点:具有在高洁净度下工作的能力,不引起污染,可多通道一次性进行多组操作,操作速度快,具有良好的软件和硬件兼容性,能与监测设备对接,实验数据可以在多种软件平台上进行分析,能使用各种通用型规格的耗材。

第二节 微生物细胞的基本结构

微生物的物质组分与其他一切生物几乎是相同的,即DNA、RNA、蛋白质、脂类、糖类等是细胞的基本成分。然而对不同细胞的组分和精细结构研究之后,人们发现,分别以细菌和酵母为代表的两大类细胞存在着很大差别,因此将其分为原核生物和真核生物两大类。病毒是非细胞的生物体,由于它们不能自我复制和仅在活细胞内繁殖,因此与其他生物不同。

一、病毒的基本结构

病毒是非细胞形态的生命体,是迄今发现的最小、最简单的有机体。但所有的病毒必须在细胞内才能表现出它们的基本生命活动。掌握有关病毒的知识对学习微生物是很重要的,有助于加深对微生物遗传学的理解与认识。

病毒(virus)主要是由核酸分子(DNA或RNA)与蛋白质构成的核酸-蛋白质复合物,有不少病毒还含有一定量的脂质物质、糖复合物与聚胺类化合物。类似病毒的简单的生命体如类病毒(viroid),仅由一个有感染性的RNA构成,朊病毒(prion)是更简单的生命体,仅由有感染性的蛋白质构成,不能算是独立生命体。绝大部分病毒必须在电子显微镜下才能看到。病毒虽然具备了生命活动的最基本特征(复制与遗传),但不具备细胞的形态结构,是不“完全”的生命体,因为它们的主要生命活动必须在宿主细胞内进行。病毒自身没有独立的代谢与能量转化系统,必须利用宿主细胞结构、“原料”、能量与酶系统进行增殖,因此,病毒是彻底的寄生物。病毒的增殖过程,主要是以病毒的核酸为模板进行复制、转录,并翻译成病毒的蛋白质,由这些物质装配成新的子代病毒。

根据核酸类型的不同,所有病毒可以分为两大类:DNA病毒与RNA病毒。DNA病毒所含的DNA分子又有双链DNA与单链DNA的区别。RNA病毒所含的分子也有单链RNA与双链RNA的区别。核酸在整个病毒成分中所占比例虽小,但核酸是病毒最

由于高通量筛选采用的是细胞、分子水平的筛选模型,样品用量一般在微克(μg)级,节省了样品资源和实验材料,降低了筛选成本。高通量筛选技术是微生物学、微生物遗传育种学、分子生物学、生物化学、细胞生物学、数学、计算机科学等多学科技术的集成,这种多学科的有机结合,促进了微生物筛选理论和各项技术的发展。随着高通量微生物筛选技术的不断提高,用于高通量微生物筛选操作的设备和检测仪器也将不断发展,有利于实现计算机控制自动化,减少操作误差的发生,筛选效率和结果的准确性也将会不断地得到提高和完善。

重要的成分。蛋白质在病毒中所占比例很大,它们主要构成病毒的壳体(capsid),少数病毒还带有酶蛋白与糖蛋白。壳体与核酸构成病毒的核壳体(nucleocapsid),又称核壳。壳体又由更小的形态单位子粒构成。

有些病毒在核壳之外,还有包膜(envelope),其主要成分为脂质与蛋白质,凡是有包膜的病毒对有机溶剂都很敏感,在有机溶剂作用下易灭活。在包膜表面具有包膜小体,主要成分为糖蛋白类,有“识别”的功能,并具有一定的抗原性。病毒的包膜与细胞膜在结构与功能上都有很大差异。

根据动物病毒的形态,主要可将其分为立体对称型与螺旋对称型。立体对称型病毒的壳体呈二十面体,每一个面又呈三角形,核酸折叠在壳体之内。立体对称型的病毒有的有包膜,有的无包膜。螺旋对称型病毒的核酸不是简单地填充在壳体内,而是核酸与壳体的子粒按特殊的结构方式结合在一起形成核壳体,大部分螺旋对称型病毒均有包膜与包膜小体。

二、原核生物细胞的基本结构

原核生物是指一大类细胞核无核膜包裹,只有称作核区的裸露DNA的原始单细胞生物,包括真细菌和古生菌两大群。原核生物缺乏一个真正的膜包裹的核。原核生物的细胞并不含有明显的与膜相结合的细胞器,与真核生物相比细胞内部未能明显分成更小的间隔。原核生物的核糖体比较小,沉淀系数为70S。原核生物形态学上的分化较少,有少数几种形态如球状、杆状或螺旋状。然而这种形态的单一性却与代谢特性上明显的多样性和灵活性相伴随。这种生理学上的多样性和灵活性,很高的生长和合成速率及简单的细胞结构和遗传物质结构已使原核微生物成为微生物遗传学研究优先选择的对象。

原核细胞最基本的特点可以概括为两点:①遗传的信息量小,遗传信息载体仅由一个环状DNA构成;②细胞内没有分化为以膜为基础的具有专门结构与功能的细胞器和核膜。

原核生物的细胞是相当小的,通常宽度不超过 $1\mu\text{m}$,长度不超过 $5\mu\text{m}$ 。许多细菌的细胞质膜伸入细胞质内。在原核生物中,细胞质膜是呼吸作用、光合作用产能的部位,而在真核生物中行使类似功能的结构位于线粒体和叶绿体的膜上。

细菌一般以二等分裂法进行繁殖,可是在许多细菌中,即使在适宜条件下,子细胞仍与母细胞结合在一起形成一定的特征形态。根据细胞分裂次数和分裂程度,在球菌中可分为成对(双球菌)、成链(链球菌)、成堆(八叠球菌)和成串(葡萄球菌)等。杆状细菌也有成对或链状的。在细胞分裂前,细菌的染色体先进行加倍和复制。因此,在细胞分裂周期中双相期只局限于极短时间内。原核生物是单倍体,原核生物的细胞大多数都有细胞壁包裹着,只有支原体、衣原体例外。细胞壁含有肽聚糖骨架,它是原核生物特有的成分。许多原核生物能借游泳或滑行的方式进行运动,主要是借助运动器官鞭毛,它的结构比真核生物鞭毛简单得多,只是一种单纯的原纤维。

原核细胞包括支原体、衣原体、立克次氏体、细菌、放线菌与蓝藻等多种庞大的家族。下面就以最常见的细菌为代表阐述原核生物细胞与遗传学有关的部分构造。

(一) 细胞壁

细胞壁是位于细胞膜外的一层较厚、较坚韧并略有弹性的结构,采用染色、质壁分离、细微解剖或电镜技术等方法可以证实细胞壁的存在。绝大多数微生物都有细胞壁,各类微生物细胞壁功能相似,但结构和化学组成各有差异。细胞壁的质量占细胞质量的 $10\%\sim 25\%$,各种细菌的壁厚度不等。细胞壁赋予细胞以硬度和形状,为细胞生长、分裂和鞭毛运动所必需,并能阻拦某些大分子物质进入细胞,保护细胞免受有害物质的损伤,它还决定了细菌具有特定的抗原性、致病性及对抗生素和噬菌体的敏感性等特有的生理功能。

真细菌的细胞壁是由一些复杂的聚合物如肽聚糖、磷壁酸、脂多糖、蛋白质等组成。

1) 肽聚糖 肽聚糖是细菌细胞壁特有的成分,每一肽聚糖单体含有三个组成部分:①双糖单位,由N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸以 β -1,4糖苷键交替连接起来的聚糖链,构成肽聚糖的骨架。②短肽,一般含4个氨基酸,有时为5个氨基酸连接起来的短肽,含有D型氨基酸,按照D型、L型氨基酸交替排列的方式连接起来,氨基酸种类因菌种而异,短肽一般连接在N-乙酰胞壁酸分子上。③肽桥,前后两个肽聚糖单体又以肽桥连接起来。这一肽桥的氨基端与前一肽聚糖单体短肽中的第4个氨基酸的羧基连接,而它的羧基端则与后一肽聚糖单体中的第3个氨基酸的氨基连接,组成肽桥的氨基酸种类和排列次序也因不同菌种而异。

2) 磷壁酸 磷壁酸是革兰氏阳性细胞壁所特有的成分,含量随培养基成分而改变。主要成分为甘油磷壁酸与核醇磷壁酸两种,磷壁酸分为两种类型:其一为壁磷壁酸,它与肽聚糖分子间进行共价结合;其二为膜磷壁酸,由甘油磷酸链分子与细胞膜上的磷脂进行共价结合后形成。

3) 脂多糖 脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁的特有成分,位于细胞壁最外层的一层较厚的类脂多糖物质。脂多糖由类脂A、核心多糖和特异侧链O三部分组成。

4) 蛋白质 在革兰氏阴性细菌中含有较多蛋白质,主要有外壁蛋白,嵌合在脂多糖和磷脂层上的蛋白质。另外还有周质蛋白,在周质空间,存在多种周质蛋白,包括各种负责溶质运输的蛋白质及各种水解酶类和某些合成酶类。

5) 缺壁细菌 细胞壁是细菌的最基本结构,但在实验室用溶菌酶处理或在培养基中加入青霉素等因子,便可破坏或抑制细胞壁的形成;或者在实验室菌种的自发突变,以及自然界长期进化都会导致细菌成为缺壁细菌。

6) 原生质体与球状体 原生质体形成是在人工条件下,用溶菌酶除尽原有细胞壁或用青霉素抑制细胞壁合成后,所得到的仅有一层细胞膜包裹着的呈球状的细胞,一般由革兰氏阳性细菌形成。球状体是还残留部分细胞壁的原生质体,一般由革兰氏阴性细菌形成。原生质体和球状体的共同特点是:无完整的细胞壁,细胞呈球状,对渗透压较敏感,即使有鞭毛也无法运动,对相应噬菌体不敏感,细胞不能分裂等。在合适的再生培养基中,原生质体可以恢复长出细胞壁。原生质体或球状体比正常有细胞壁的细菌更易导入外源遗传物质和渗入诱变剂,因此是研究遗传规律和进行原生质体育种的良好实验材料。

(二) 细胞膜

细胞膜是紧贴在壁内侧、包围着细胞质的一层柔软、脆弱、富有弹性的半透性膜,主要由脂类和蛋白质两种成分组成,磷脂双分子层作为骨架,蛋白质镶嵌其中。原核微生物的细胞膜与真核微生物的细胞膜的不同之处在于原核微生物的细胞膜一般不含有胆固醇等甾醇,缺细胞壁的原核生物含有甾醇,含甾醇的细胞膜具有一定的物理强度,弥补了没有细胞壁的不足。细胞膜控制细胞内、外的物质的运送、交换,维持细胞内正常渗透压以保证屏障作用,是合成细胞壁各种组分和荚膜等大分子的场所、进行氧化磷酸化或光合磷酸化的产能基地、许多酶和电子传递链组分的所在部位,也是鞭毛着生点并提供其运动所需的能量等。

细胞膜控制着进入细胞体内营养物质的运输。在大多数革兰氏阳性细菌中细胞膜内褶形成的一种管状、层状或囊状结构称作间体,每个细胞含有一到几

十个不等,随菌种及其生理状态而异。间体内含有蛋白质、脂类、糖类、RNA等成分。一般位于细胞分裂或邻近部位。其功能主要是促进细胞间隔的形成,并与遗传物质的复制及其相互分离有关。

(三) 细胞质

细胞质是细胞膜包围的除细胞核外的物质,细胞质中含有各种酶类、蛋白质、脂类、糖类、氨基酸、核苷酸及无机离子等,并具有一定的化学组成和细胞器。细胞质是细胞进行能量代谢、蛋白质合成和其他生理活动的场所。

细菌细胞质指由质膜包围的除核区外一切半透明、胶状、颗粒状物质的总称。与真核生物最大的区别是细菌细胞质是不流动的。细胞质内形状较大的颗粒状内含物,包括各种储藏物、羧酶体、气泡等。

(四) 核糖体

核糖体为蛋白质合成的场所,原核生物的核糖体常以游离状态分散在细胞质中,在生长旺盛的细胞中,核糖体常成串排列,称多聚核糖体。核糖体之间由mRNA连接,形成核小体,其直径约为20nm,由大约60%的核糖体和40%的蛋白质组成。这些颗粒由大小亚基组成,沉降系数为70S,其中大亚基50S,小亚基30S。

(五) 核质体

核质体也称原核、拟核、核区或核基因组。原核微生物没有像真核生物那样具有核膜的细胞核,与细胞膜有一定联系。一般每个细菌细胞只含有一个染色体,它是一个高度折叠的环状DNA大分子,游离于细胞质中一定的区域。原核微生物所必需的全部遗传信息都存在于DNA中。细菌一般情况下含有一套基因,即单倍体,细菌DNA大约含有5000个基因,分别编码各种细胞蛋白质及RNA。原核微生物的基因组比真核微生物小。

(六) 质粒

质粒是独立于染色体以外的基因组,是小型共价闭合环状的超螺旋双链DNA分子,也是能独立进行复制的遗传因子。质粒主要存在于细菌细胞中,每个细胞中可含有1到多个不等,因不同质粒而异。质粒DNA比染色体DNA分子小,质粒分子大小为1~1000kb。不同的质粒携带有不同的基因,使微生物有某些特殊的机能,有些质粒可以共存在一个细胞中,彼此亲和,有些质粒不能共存在一个细胞中,彼此互斥。质粒可以自发从细胞中消除,也可以被人工处理消除。例如,用适当浓度的吡啶类染料、丝裂霉素、紫外线或离子辐射、重金属离子及高温等因素处理,质粒可自一个细菌转移到另一细菌中,但并非任何质粒都能自己转移,能自己转移的质粒也不是在任

何细菌之间都能转移,这取决于细菌和质粒的性质;某些质粒具有与核染色体整合和脱离的功能。质粒还具有重组的功能,质粒基因与染色体基因间、不同质粒的基因间发生重组。质粒的这些特性使其成为基因工程中重要的外源基因的载体。

质粒的分离大致包括细胞的裂解、蛋白质和RNA的去除和使染色体DNA与质粒DNA分开等步骤。其中最重要的是染色体DNA与质粒DNA分离这一步骤,可根据质粒分子大小和结构特征通过超离心或琼脂糖凝胶电泳将质粒与染色体分子分离从而分离到质粒。

三、真核微生物细胞的基本结构

凡是细胞核具有核膜,能进行有丝分裂,细胞质中存在线粒体或同时存在叶绿体等细胞器的微小生物,都称为真核微生物。真核微生物有发育完好的细胞核,核内有核仁和染色质;有核膜将细胞核和细胞质分开,使两者有明显的界线;有高度分化的细胞器,如染色体、中心体、高尔基体、内质网、溶酶体和叶绿体等;进行有丝分裂。真核微生物包括除蓝藻以外的藻类、酵母菌、霉菌、原动物、微型后生动物等。下面就以微生物遗传学中常用的酵母菌为例来介绍真核微生物细胞结构。

(一) 细胞壁

酵母菌的细胞壁厚25~70nm,细胞壁质量占细胞干重的18%~25%,细胞壁主要化学成分为葡聚糖、甘露聚糖、蛋白质、脂类、几丁质、无机盐等。

1) 葡聚糖 葡聚糖是酵母菌细胞壁中的一种不溶性聚糖,它构成细胞壁的骨架,是维持细胞壁强度的主要物质,是一种分支的葡聚糖聚合物。

2) 甘露聚糖蛋白质 甘露聚糖蛋白质是甘露聚糖和蛋白质共价结合形成的复合物,甘露聚糖占90%,蛋白质占10%。蛋白质除少数为结构蛋白质外。多数是起催化作用的酶。大多数酵母菌细胞壁中都有甘露聚糖,甘露聚糖也是具有分支的多聚糖。

3) 几丁质 几丁质是许多N-乙酰氨基葡萄糖以 β -1,4糖苷键连接起来的直线多聚体。多存在于酵母细胞壁的压痕的周围,几丁质在酵母细胞壁中含量很低,甚至没有;在甘露聚糖缺乏的酵母细胞壁中,含有较多的几丁质。甘露聚糖与蛋白质共价结合,位于细胞壁外侧,蛋白质部分位于中央,内侧主要是葡聚糖,呈三明治结构。

(二) 细胞膜

酵母菌的细胞膜与原核生物的基本相同。但有的酵母菌如酿酒酵母中含有固醇类(甾醇)、维生素D的前体——麦角固醇,这在原核生物中是罕见的。

(三) 细胞质和细胞器

组成酵母菌细胞质的有细胞基质、细胞骨架和各