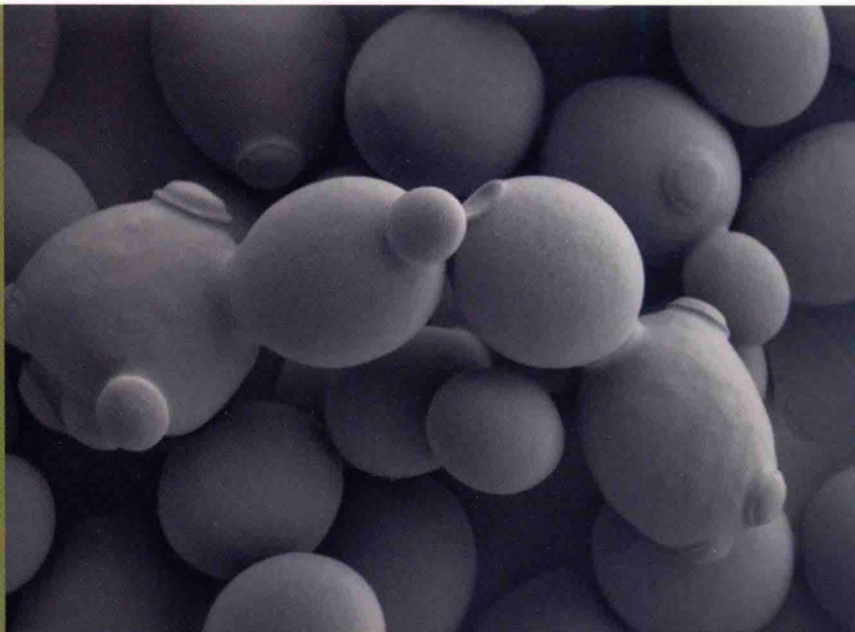




“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材



新形态教材



微生物学教程

第4版

ESSENTIAL MICROBIOLOGY

周德庆 编著

高等教育出版社

仅供个人科研教学使用

内容提要

本书作为“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材,在保持第3版体系的基础上,与时俱进,充实了本学科近年来进展较快的一些前沿热点,如耐药菌、基因编辑、人体微生物组和免疫应答机理等新内容。

全书以微生物的形态构造、生理代谢、遗传变异、生态特性和进化分类五大生物学规律为主线,从细胞、分子和群体水平上,分10章全面、系统地讲清概念、阐明规律、充实知识、联系实际。

本书具有内容丰富、条理清晰、表达简明等特点。书中提供了大量自创的直观、形象的表解和图、表,易读利记。此外,各章后的复习思考题、书后的附录(有关教学评估的八项指标),以及配套的网上数字课程资源等内容,都有利于教学质量和效果的提高。

本书可用作综合性大学、师范院校以及理工、农林、环境、医药等相关专业本科生的教材,也可供从事微生物学研究以及相关管理、生产和应用领域的科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

微生物学教程 / 周德庆编著. --4版. --北京:
高等教育出版社, 2020.4

ISBN 978-7-04-052197-9

I. ①微… II. ①周… III. ①微生物学 - 高等学校 -
教材 IV. ①Q93

中国版本图书馆CIP数据核字(2019)第133903号

策划编辑 王莉 责任编辑 赵晓玉 王莉 封面设计 张志奇 责任印制 赵义民

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印 刷 北京中科印刷有限公司
开 本 889mm×1194mm 1/16
印 张 24
字 数 750千字
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.hepmall.com.cn>
<http://www.hepmall.com>
<http://www.hepmall.cn>
版 次 1993年5月第1版
2020年4月第4版
印 次 2020年4月第1次印刷
定 价 52.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物料号 52197-00

仅供个人科研教学使用

数字课程 (基础版)

微生物学教程

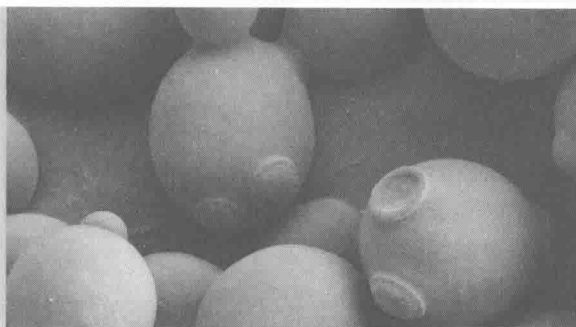
(第4版)

周德庆 编著

登录方法:

1. 电脑访问 <http://abook.hep.com.cn/52197>, 或手机扫描下方二维码、下载并安装 Abook 应用。
2. 注册并登录, 进入“我的课程”。
3. 输入封底数字课程账号 (20 位密码, 刮开涂层可见), 或通过 Abook 应用扫描封底数字课程账号二维码, 完成课程绑定。
4. 点击“进入学习”, 开始本数字课程的学习。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请点击页面右下角的“自动答疑”按钮。



微生物学教程 (第4版)

微生物学教程 (第4版) 数字课程与纸质教材一体化设计, 紧密配合。数字课程内容包括各章小结、重要名词、常见微生物的学名及其音标等, 有利于拓展学习, 为学生提供了思维与探索的空间, 进而提升教学效果。

用户名: 密码: 验证码: 5360 忘记密码?

<http://abook.hep.com.cn/52197>

扫描二维码, 下载 Abook 应用



仅供个人科研教学使用



目录

绪论 微生物与人类 /1

- 一、什么是微生物 /1
- 二、人类对微生物世界的认识史 /1
- 三、微生物学的发展促进了人类的进步 /5
- 四、微生物的五大共性 /7
- 五、微生物学及其分科 /10

复习思考题 /10

第一章 原核生物的形态、构造和功能 /12

第一节 细菌 /12

- 一、细胞的形态、构造及其功能 /13
- 二、细菌的群体形态 /33

第二节 放线菌 /34

- 一、放线菌的形态和构造 /35
- 二、放线菌的繁殖 /36
- 三、放线菌的群体特征 /37

第三节 蓝细菌 /38

第四节 枝原体、立克次氏体和衣原体 /39

- 一、枝原体 /40
- 二、立克次氏体 /40
- 三、衣原体 /41

复习思考题 /42

第二章 真核微生物的形态、构造和功能 /43

第一节 真核微生物概述 /43

- 一、真核生物与原核生物的比较 /44
- 二、真核微生物的主要类群 /45
- 三、真核微生物的细胞构造 /45

第二节 酵母菌 /52

- 一、酵母菌分布及与人类的关系 /52
- 二、酵母菌细胞的形态和构造 /52

三、酵母菌的繁殖方式和生活史 /53

四、酵母菌的菌落 /56

第三节 丝状真菌——霉菌 /56

- 一、霉菌分布及与人类的关系 /56
- 二、霉菌细胞的形态和构造 /56
- 三、真菌的孢子 /60
- 四、霉菌的菌落 /60

第四节 产大型子实体的真菌——蕈菌 /62

复习思考题 /63

第三章 病毒和亚病毒因子 /65

第一节 病毒 /65

- 一、病毒的形态、构造和化学成分 /66
- 二、病毒的分类 /69
- 三、4类病毒及其繁殖方式 /71

第二节 亚病毒因子 /78

- 一、类病毒 /78
- 二、拟病毒 /78
- 三、卫星病毒 /79
- 四、卫星 RNA /79
- 五、朊病毒 /80

第三节 病毒与应用 /81

- 一、噬菌体与发酵工业 /81
- 二、昆虫病毒用于生物防治 /81
- 三、病毒在基因工程中的应用 /82

复习思考题 /83

第四章 微生物的营养和培养基 /84

第一节 微生物的6类营养要素 /84

- 一、碳源 /84
- 二、氮源 /85
- 三、能源 /86

四、生长因子 /87

五、无机盐 /87

六、水 /88

第二节 微生物的营养类型 /88

第三节 营养物质进入细胞的方式 /89

一、单纯扩散 /90

二、促进扩散 /90

三、主动转运 /90

四、基团转位 /90

第四节 培养基 /92

一、选用和设计培养基的原则和方法 /93

二、培养基的种类 /97

复习思考题 /101

第五章 微生物的新陈代谢 /102

第一节 微生物的能量代谢 /102

一、化能异养微生物的生物氧化和产能 /102

二、自养微生物产 ATP 和产还原力 /120

第二节 分解代谢和合成代谢的联系 /126

一、两用代谢途径 /126

二、代谢物回补顺序 /127

第三节 微生物独特合成代谢途径举例 /129

一、自养微生物的 CO₂ 固定 /129

二、生物固氮 /132

三、微生物结构大分子——肽聚糖的生物合成 /137

四、微生物次生代谢物的合成 /140

第四节 微生物的代谢调节与发酵生产 /142

一、微生物的代谢调节 /142

二、代谢调节在发酵工业中的应用 /142

复习思考题 /144

第六章 微生物的生长及其控制 /146

第一节 测定生长繁殖的方法 /146

一、测生长量 /146

二、计繁殖数 /147

第二节 微生物的生长规律 /148

一、微生物的个体生长和同步生长 /148

二、单细胞微生物的典型生长曲线 /148

三、微生物的连续培养 /152

四、微生物的高密度培养 /154

第三节 影响微生物生长的主要因素 /155

一、温度 /155

二、氧气 /156

三、pH /159

第四节 微生物培养法概论 /161

一、实验室培养法 /161

二、生产实践中培养微生物的装置 /165

第五节 有害微生物的控制 /167

一、几个基本概念 /167

二、物理灭菌因素的代表——高温 /168

三、化学杀菌剂、消毒剂和治疗剂 /172

复习思考题 /180

第七章 微生物的遗传变异和育种 /181

第一节 遗传变异的物质基础 /182

一、3 个经典实验 /182

二、遗传物质在微生物细胞内存在的部位和形式 /184

第二节 基因突变和诱变育种 /193

一、基因突变 /193

二、突变与育种 /203

第三节 基因重组和杂交育种 /212

一、原核生物的基因重组 /213

二、真核微生物的基因重组 /220

第四节 基因工程 /223

一、基因工程的定义 /223

二、基因工程的基本操作 /223

三、基因工程的应用 /225

四、CRISPR 与基因编辑 /226

第五节 菌种的衰退、复壮和保藏 /228

一、菌种的衰退与复壮 /229

二、菌种的保藏 /230

复习思考题 /233

第八章 微生物的生态 /235

第一节 微生物在自然界中的分布与菌种资源的开发 /235

一、微生物在自然界中的分布 /235

二、菌种资源的开发 /248

第二节 微生物与生物环境间的关系 /248

一、互生 /248

二、共生 /250

三、寄生 /252

四、拮抗 /253

五、捕食 /253

第三节 微生物的地球化学作用 /254

一、碳素循环 /254

二、氮素循环 /255

三、硫素循环与细菌沥滤 /257

四、磷素循环 /258

第四节 微生物与环境保护 /259

- 一、水体的污染——富营养化 /259
- 二、用微生物治理污染 /260
- 三、沼气发酵与环境保护 /264
- 四、用微生物监测环境污染 /270

复习思考题 /270

第九章 传染与免疫 /272

第一节 传染 /272

- 一、传染与传染病 /272
- 二、决定传染结局的三大因素 /273
- 三、传染的3种可能结局 /279

第二节 非特异性免疫 /280

- 一、表皮和屏障结构 /280
- 二、吞噬细胞及其吞噬作用 /281
- 三、炎症反应 /284
- 四、正常体液或组织中的抗菌物质 /284

第三节 特异性免疫 /286

- 一、免疫器官 /287
- 二、免疫细胞及其在免疫应答中的作用 /288
- 三、免疫分子及其在体液免疫中的作用 /293

第四节 免疫学方法及其应用 /307

- 一、抗原、抗体反应的一般规律 /308
- 二、抗原、抗体间的主要反应 /309
- 三、免疫标记技术 /313

第五节 生物制品及其应用 /315

- 一、人工自动免疫类生物制品 /316
- 二、人工被动免疫类生物制品 /319

复习思考题 /321

第十章 微生物的分类和鉴定 /323

第一节 通用分类单元 /323

- 一、种以上的系统分类单元 /323
- 二、学名 /325
- 三、种以下的几个分类名词 /327

第二节 微生物在生物界的地位 /328

- 一、生物的界级分类学说 /328
- 二、三域学说及其发展 /330

第三节 各大类微生物的分类系统纲要 /332

- 一、伯杰氏原核生物分类系统纲要 /332
- 二、Ainsworth 等人的菌物分类系统纲要 /339

第四节 微生物分类鉴定的方法 /341

- 一、微生物分类鉴定中的经典方法 /341
- 二、微生物分类鉴定中的现代方法 /344

复习思考题 /350

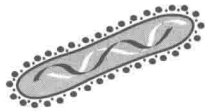
结束语 微生物学的展望 /353

- 一、微生物在解决人类面临的五大危机中的作用 /353
- 二、现代微生物学的特点及其发展趋势 /355
- 三、微生物在“生命科学世纪”中的作用 /357
- 四、大力开展我国微生物学研究 /359
- 五、学好微生物学,推动人类进步 /359

附录 谈谈“评教八率” /360

参考书目 /363

索引 /365



第七章 微生物的遗传变异和育种

遗传 (heredity, inheritance) 和变异是一切生物体最本质的属性之一。所谓**遗传**，讲的是发生在亲子间即上下代间的关系，即指上一代生物如何将自身的一整套遗传基因稳定地传递给下一代的行为或功能，它具有极其稳定(保守)的特性。在学习遗传、变异内容时，先应搞清楚以下4个基本概念：

(1) **遗传型** (genotype) 又称基因型，指某一生物个体所含有的全部遗传因子即基因组 (genome) 所携带的遗传信息。遗传型是一种内在的可能性或潜力，其实质是遗传物质上所负载的特定遗传信息。具有某遗传型的生物，只有在适当的环境条件下，通过其自身的代谢和发育，才能将它付诸实现，即产生自己的表型。

$$\begin{array}{ccc} \text{遗传型} + \text{环境条件} & \xrightarrow{\text{代谢, 发育}} & \text{表型} \\ \text{(可能性)} & & \text{(现实性)} \end{array}$$

(2) **表型** (phenotype) 指某一生物体所具有的一切外表特征和内在特性的总和，是其遗传型在合适环境条件下通过代谢和发育而得到的具体体现。所以，它与遗传型不同，是一种现实性(具体性状)。

(3) **变异** (variation) 指生物体在某种外因或内因的作用下所引起的遗传物质结构或数量的改变，亦即遗传型的改变。其特点是在群体中只以极低的概率(一般为 $10^{-10} \sim 10^{-5}$) 出现，性状变化幅度大，且变化后的新性状是稳定的、可遗传的。

(4) **饰变** (modification) 顾名思义，饰变是指外表的修饰性改变，意即一种不涉及遗传物质结构改变而只发生在转录、翻译水平上的表型变化。其特点是整个群体中的几乎每一个体都发生同样变化；性状变化的幅度小；因其遗传物质未变，故饰变是不遗传的。例如，*Serratia marcescens* (黏质沙雷氏菌) 在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养时，会产生深红色的灵杆菌素，它把菌落染成鲜血状(宗教中曾认为是“神显灵”，故该菌旧称“神灵色杆菌”或“灵杆菌”)。可是，当培养在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下时，此菌群体中的一切个体都不产色素。如果重新降温至 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，所有个体又可重新恢复产色素能力。所以，饰变是与变异有着本质区别的另一种现象。上述的 *S. marcescens* 产色素能力也会因发生突变而消失，但概率极低(10^{-4})，且这种消失是不可恢复的。

微生物由于其一系列极其独特的生物学特性，而在现代遗传学、分子生物学和其他许多重要生物学基础研究中，成了学者们最热衷选用的**模式生物** (model organism)。这些独特生物学特性如：物种与代谢类型的多样性；个体的体制极其简单；营养体一般都是单倍体；易于在成分简单明确的组合培养基上大量生长繁殖；繁殖速度快；易于积累不同的中间代谢物或终产物；菌落形态的可见性与多样性；环境条件对微生物群体中各个体作用的直接性和均一性；易于形成营养缺陷型突变株和抗药性突变株；各种微生物一般都有其相应的病毒；以及存在多种处于进化过程中、富有特色的原始有性生殖方式等。

对微生物遗传规律的深入研究，不仅促进了遗传学向分子水平的发展，还促进了生物化学、分子生物学和生物工程学的飞速发展；由于它密切联系生产实践，故还为微生物和其他生物的育种工作提供了丰富的理论基础，促使育种工作从自发向着自觉、从低效转向高效、从随机转为定向、从近缘杂交朝着远缘杂交等方向发展。在宏伟的人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)的推动下，微生物又充当了最好的

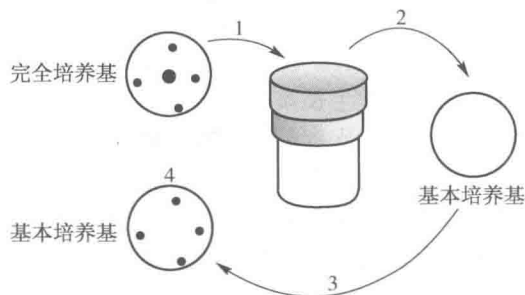


图 7-22 用影印平板法检出营养缺陷型突变株

①将完全培养基平板上的菌落转移到影印用丝绒布上；②将丝绒布上的菌落转印到基本培养基平板上；③适温下培养；④长有菌落的基本培养基平板

面干燥后，在皿背划几个区，然后在平板上按区加上微量待鉴定缺陷型所需的营养物粉末(用滤纸片法也可)，例如氨基酸、维生素、嘌呤或嘧啶碱基等。经培养后，如发现某一营养物的周围有生长圈，就说明此菌就是该营养物的缺陷型突变株。用类似方法还可测定双重或多重营养缺陷型。

第三节 基因重组和杂交育种

两个独立基因组内的遗传基因，通过一定的途径转移到一起，形成新的稳定基因组的过程，称为**基因重组**(gene recombination)或**遗传重组**(genetic recombination)，简称重组。重组是在核酸分子水平上的一个概念，是遗传物质在分子水平上的杂交，因此，与一般在细胞水平上进行的**杂交**(hybridization)有明显区别。细胞水平上的杂交，必然包含了分子水平上的重组，例如真核微生物中的有性杂交、准性杂交、原生质体融合以及原核生物中的转化、转导、接合和原生质体融合等(表 7-12)。

表 7-12 微生物中各种基因重组形式的比较

供体和受体间的关系		重组范围			
		整套染色体		局部杂合	
		高频率	低频率	部分染色体	个别或少数基因
细胞融合或联结	性细胞	真菌的有性生殖			
	体细胞		真菌的准性生殖		
细胞间暂时沟通				细菌的接合	性导
细胞间不接触	吸收游离 DNA 片段				转化
	噬菌体携带 DNA				转导
由噬菌体提供遗传物质*	完整噬菌体				溶原转变
	噬菌体 DNA				转染

* 虽不属重组，但与转导和转化有某些相似处，可供比较。

基因重组是杂交育种的理论基础。由于杂交育种是选用已知性状的供体菌和受体菌作亲本，因此，不论在方向性还是自觉性方面，均比诱变育种前进了一大步；另外，利用杂交育种往往还可消除某一菌株在经历长期诱变处理后所出现的产量性状难以继续提高的障碍，因此，杂交育种是一种重要的育种手段。

一、原核生物的基因重组

原核生物的基因重组形式很多, 机制较原始, 其特点为: ①片段性, 仅一小段 DNA 序列参与重组; ②单向性, 即从供体菌向受体菌(或从供体基因组向受体基因组)作单方向转移; ③多样性, 即转移机制独特而多样, 如接合、转化和转导等。以下分别介绍原核生物的 4 种主要遗传重组形式。

(一) 转化(transformation)

1. 定义

受体菌(recipient cell; receptor)直接吸收供体菌(donor cell)的 DNA 片段而获得后者部分遗传性状的现象, 称为**转化**或转化作用。通过转化方式而形成的杂种后代, 称**转化子**(transformant)。转化物质可来自染色体或质粒 DNA; 可来自同源或异源生物体; 受体细胞可以是自然或人工感受态; 转化条件可以是自然转化或人工转化。转化现象的发现(F. Griffith, 1928), 尤其是转化因子 DNA 本质的证实(O. T. Avery 等, 1944), 是现代生物学发展史上的一个重要里程碑, 由此促进了分子遗传学和分子生物学的诞生和发展。

2. 转化微生物的种类

转化微生物的种类十分普遍。在原核生物中, 主要有 *Streptococcus pneumoniae*(肺炎链球菌, 旧称“肺炎双球菌”)、*Haemophilus*(嗜血杆菌属)、*Bacillus*(芽孢杆菌属)、*Neisseria*(奈瑟氏球菌属)、*Rhizobium*(根瘤菌属)、*Staphylococcus*(葡萄球菌属)、*Pseudomonas*(假单胞菌属)和 *Xanthomonas*(黄单胞菌属)等; 在真核微生物中, 如 *Saccharomyces cerevisiae*(酿酒酵母)、*Neurospora crassa*(粗糙脉孢菌)和 *Aspergillus niger*(黑曲霉)等。可是, 在实验室中常用的一些属于肠道菌科的细菌, 如 *E. coli* 等则很难进行转化。为克服这一不利条件, 可选用有利于 DNA 透过细胞膜的 CaCl_2 处理 *E. coli* 的**球状体**(sphaeroplast), 以使之发生低频率的转化。此法对不易降解和能在宿主体内复制的质粒 DNA(或人工重组的质粒 DNA)导入受体菌时特别有用。有些真菌在制成**原生质体**(protoplast)后, 也可实现转化。

3. 感受态(competence)

两个菌种或菌株间能否发生转化, 有赖于其进化中的亲缘关系。但即使在转化频率极高的微生物中, 其不同菌株间也不一定都可发生转化。研究发现, 凡能发生转化者, 其受体细胞必须处于感受态。**感受态**是指受体细胞最易接受外源 DNA 片段并能实现转化的一种生理状态。它虽受遗传控制, 但表现却差别很大。从时间上来看, 有的出现在生长的指数期后期, 如 *S. pneumoniae*, 有的出现在指数期末和稳定期, 如 *Bacillus* 的一些种; 在具有感受态的微生物中, 感受态细胞所占比例和维持时间也不同, 如 *Bacillus subtilis*(枯草芽孢杆菌)的感受态细胞仅占群体的 20% 左右, 感受态可维持几个小时, 而在 *S. pneumoniae* 和 *H. influenzae*(流感嗜血杆菌)群体中, 100% 都呈感受态, 但仅能维持数分钟。外界环境因子如环腺苷酸(cAMP)及 Ca^{2+} 等对感受态也有重要影响, 如 cAMP 可使 *Haemophilus* 的感受态水平提高 1 万倍。

调节感受态的一类特异蛋白称**感受态因子**, 它包括 3 种主要成分, 即**膜相关 DNA 结合蛋白**(membrane-associated DNA binding protein)、**细胞壁自溶素**(autolysin)和几种核酸酶。

4. 转化因子(transforming factor)

转化因子的本质是离体的 DNA 片段。一般原核生物的核基因组是一条环状 DNA 长链(如在 *B. subtilis* 中长为 1 700 μm), 不管在自然条件或人为条件下都极易断裂成碎片, 故转化因子通常都只是 15 kb 左右的片段。若以每个基因平均含 1 kb 计, 则每一转化因子平均约含 15 个基因, 而事实上, 转化因子进入细胞前还会被酶解成更小的片段。在不同的微生物中, 转化因子的形式不同, 例如, 在 G^- 细菌 *Haemophilus* 中, 细胞只吸收 dsDNA 形式的转化因子, 但进入细胞后须经酶解为 ssDNA 才能与受体菌的基因组整合; 而在 G^+ 细菌 *Streptococcus* 或 *Bacillus* 中, dsDNA 的互补链必须在细胞外降解, 只有 ssDNA 形式的转化因子才能进入细胞。但不管何种情况, 最易与细胞表面结合的仍是 dsDNA。由于每个细胞表面能与转化因子相结合的位点有限(如 *S. pneumoniae* 约 10 个), 因此从外界加入无关的 dsDNA 就可竞争并干扰转化作用。除 dsDNA 或

ssDNA外, 质粒 DNA 也是良好的转化因子, 但它们通常并不能与核染色体组发生重组。转化的频率通常为 0.1% ~ 1.0%, 最高为 20%。能发生转化的最低 DNA 浓度极低, 为化学方法无法测出的 $1 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ (即 $1 \times 10^{-11} \text{g/mL}$)。

5. 转化过程

转化过程被研究得较深入的是 G^+ 细菌 *S. pneumoniae*, 其主要过程可见图 7-23。①供体菌(str^R , 即存在抗链霉素的基因标记)的 dsDNA 片段与感受态受体菌(str^S , 有链霉素敏感型基因标记)细胞表面的膜连 DNA 结合蛋白相结合, 其中一条链被核酸酶切开和水解, 另一条进入细胞; ②来自供体菌的 ssDNA 片段与细胞内的感受态特异的 ssDNA 结合蛋白相结合, 并使 ssDNA 进入细胞, 随即在 RecA 蛋白的介导下与受体菌染色体上的同源区段配对、重组, 形成一小段杂合 DNA 区段(heterozygous region); ③受体菌染色体组进行复制, 于是杂合区也同时得到复制; ④细胞分裂后, 形成一个转化子(str^R)和一个仍保持受体菌原来基因型(str^S)的子代。

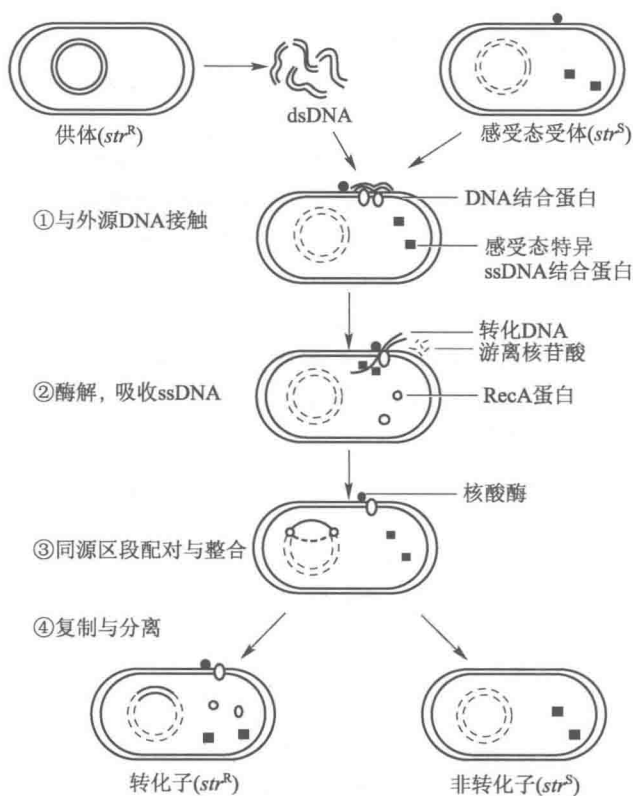


图 7-23 G^+ 细菌的转化过程及其机制示意图

6. 转染 (transfection)

转染指用提纯的病毒核酸 (DNA 或 RNA) 去感染其宿主细胞或其原生质体, 可增殖出一群正常病毒后代的现象。从表面上看, 转染似乎与转化相似, 但实质上两者的区别十分明显。因为作为转染的病毒核酸, 绝不是作为供体基因的功能, 被感染的宿主也绝不是能形成转化子的受体菌。

(二) 转导 (transduction)

通过缺陷噬菌体 (defective phage) 的媒介, 把供体细胞中的小片段 DNA 携带到受体细胞中, 通过交换与整合, 使后者获得前者部分遗传性状的现象, 称为转导。由转导作用而获得部分新性状的重组细胞, 称为转导子 (transductant)。转导现象由诺贝尔奖获得者 J. Lederberg 等首先在 *Salmonella typhimurium* (鼠伤寒沙门

氏菌)中发现(1952年),以后又在许多原核生物中陆续发现,例如 *E. coli*、*Bacillus*、*Proteus*(变形杆菌属)、*Pseudomonas*(假单胞菌属)、*Shigella*(志贺氏菌属)、*Staphylococcus*、*Vibrio*(弧菌属)和 *Rhizobium*(根瘤菌属)等。转导现象在自然界较为普遍,它在低等生物进化过程中很可能是一种产生新基因组合的重要方式。转导的种类有以下几种。

1. 普遍转导(generalized transduction)

通过极少数完全缺陷噬菌体对供体菌基因组上任何小片段 DNA 进行“误包”,而将其遗传性状传递给受体菌的现象,称为**普遍转导**。一般用温和噬菌体作为普遍转导的媒介。普遍转导又可分为以下两种:

(1) **完全普遍转导** 简称**普遍转导**或**完全转导**(complete transduction)。以 *S. typhimurium* 为例,若用野生型菌株作供体菌,营养缺陷型突变株作受体菌, P22 噬菌体作转导媒介(agency),则当 P22 在供体菌内增殖时,宿主的核染色体组发生断裂,待噬菌体成熟与进行包装之际,有 $10^{-8} \sim 10^{-6}$ 个噬菌体的衣壳把与噬菌体头部 DNA 核心大小相仿的一小段供体菌 DNA (P22 约可包装核染色体组的 1%) 误包装,形成了一个不含 P22 自身 DNA 的完全缺陷噬菌体,此即**转导颗粒**(transducing particle)。当供体菌裂解时,若把少量裂解物与大量的受体菌接触,务必使其**感染复数**(multiplicity of infection, MOI)小于 1,这时,这一完全缺陷噬菌体就可把外源 DNA 片段导入受体细胞内。在这种情况下,由于每一受体细胞至多感染了一个完全缺陷噬菌体,故细胞不可能被溶原化,也不显示其对噬菌体的免疫性,更不会发生裂解和产生正常的噬菌体后代;还由于导入的外源 DNA 片段可与受体细胞核染色体组上的同源区段配对,再通过双交换而整合到染色体组上,从而使后者成为一个遗传性状稳定的重组体,称作**普遍转导子**(图 7-24 和图 7-25)。

除 *S. typhimurium* 的 P22 噬菌体外, *E. coli* 的 P1 噬菌体和 *Bacillus subtilis* 的 PBS1 和 SP10 噬菌体等都能进行完全普遍转导。

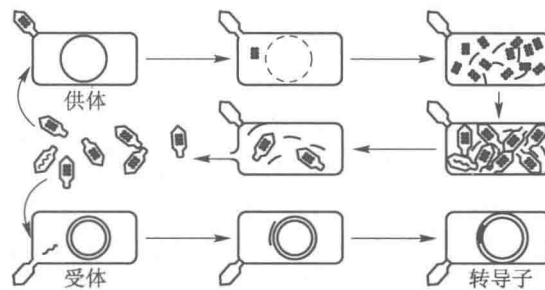


图 7-24 由 P22 噬菌体引起的完全普遍转导



图 7-25 外源 dsDNA 片段经双交换形成一稳定转导子示意图

(2) **流产普遍转导** 简称**流产转导**(abortive transduction)。经转导噬菌体的媒介而获得了供体菌 DNA 片段的受体菌,如果这段外源 DNA 在其内既不进行交换、整合和复制,也不迅速消失,而仅表现稳定的转录、翻译和性状表达,这一现象就称**流产转导**。受体菌在发生流产转导并进行细胞分裂后,只能将这段外源 DNA 分配到一个子细胞中,另一个子细胞仅获得外源基因经转录、翻译而形成的少量酶,因此,会在表型上仍轻微地表现出供体菌的某一特征,且每经过一次分裂,就受到一次“稀释”(图 7-26)。所以,能在选择培养基平板上形成一个微小菌落(即其中只有一个细胞是转导子)就成了流产转导的特征。

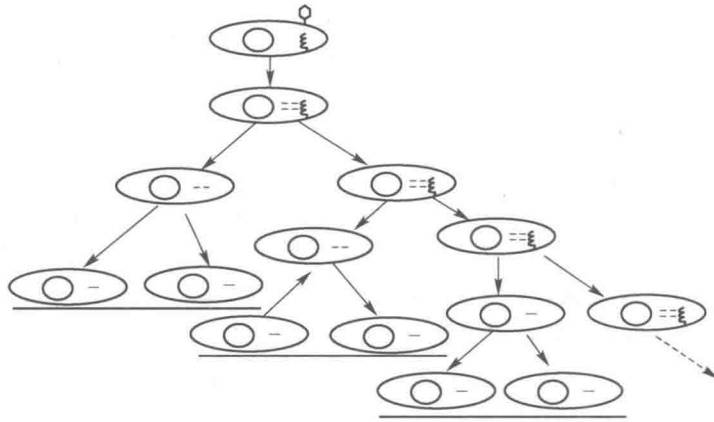


图 7-26 流产转导示意图

2. 局限转导 (specialized transduction, restricted transduction)

局限转导指通过部分缺陷的温和噬菌体 (temperate phage) 把供体菌的少数特定基因携带到受体菌中, 并与后者的基因组整合、重组, 形成局限转导子的现象。最初于 1954 年在 *E. coli* K12 中发现。特点是: ①只局限于传递供体菌核染色体上的个别特定基因, 一般为噬菌体整合位点两侧的基因; ②该特定基因由部分缺陷的温和噬菌体携带; ③缺陷噬菌体的形成方式是由于它在脱离宿主核染色体的过程中, 发生低频率 ($\sim 10^{-5}$) 的误切 (不正常切离, abnormal excision) 或由于双重溶原菌的裂解而形成 (详后); ④局限转导噬菌体的产生要通过 UV 等因素对溶原菌的诱导并引起裂解后才产生。*E. coli* 的 λ 噬菌体和 $\Phi 80$ 噬菌体具有局限转导的能力。

根据转导子出现频率的高低可把局限转导分为两类。

(1) 低频转导 (low frequency transduction, LFT) 指通过一般溶原菌释放的噬菌体所进行的转导, 因其只能形成极少数 ($10^{-6} \sim 10^{-4}$) 转导子, 故称低频转导。以 *E. coli* 的 λ 噬菌体为例, 当这一温和噬菌体感染其宿主后, 噬菌体的环状 DNA 打开, 以线状形式整合到宿主核染色体的特定位点上, 同时使之溶原化和获得对同种噬菌体的免疫性。如果该溶原菌因诱导而进入裂解性生活史时, 就有极少数 ($\sim 10^{-5}$) 的前噬菌体 (prophage) 因发生不正常切离而把插入位点两侧的之一的宿主核染色体组上的少数基因连接到噬菌体 DNA 上 (同时噬菌体也留下相对应长度 DNA 给宿主)。通过噬菌体衣壳对这段特殊 DNA 片段的误包, 就形成了具有局限转导能力的部分缺陷噬菌体 (图 7-27)。在 *E. coli* K12 中, λ 前噬菌体整合位点两侧分别为发酵半乳糖的 *gal* 基因和合成生物素的 *bio* 基因, 因此, 形成的缺陷噬菌体只可能是 λ_{dgal} (或 λ_{dbio} , 指带有供体菌 *gal* 基因的 λ 缺陷噬菌体, 其中的 “d” 表示缺陷 “defective”) 或 λ_{dbio} (带有供体菌 *bio* 基因的 λ 缺陷噬菌体)。它们没有正常 λ 噬菌体所具有的致宿主溶原化的能力; 当它感染宿主并整合在宿主核基因组上时, 可形成一个获得了供体菌的 *gal* 或 *bio* 基因的局限转导子 (specialized transductant)。

由于核染色体组进行不正常切离的频率极低, 因此在其裂解物中所含的部分缺陷噬菌体的比例也极低 ($10^{-6} \sim 10^{-4}$)。这种含有极少数局限转导噬菌体的裂解物称为低频转导裂解物 (LFT lysate)。若 LFT 裂解物在低 MOI (感染复数) 条件下感染其宿主, 就可获得极少量的局限转导子。

(2) 高频转导 (high frequency transduction, HFT) 在局限转导中, 若对双重溶原菌进行诱导, 就会产生含 50% 左右的局限转导噬菌体的高频转导裂解物 (HFT lysate), 用这种裂解物去转导受体菌, 就可获得高达

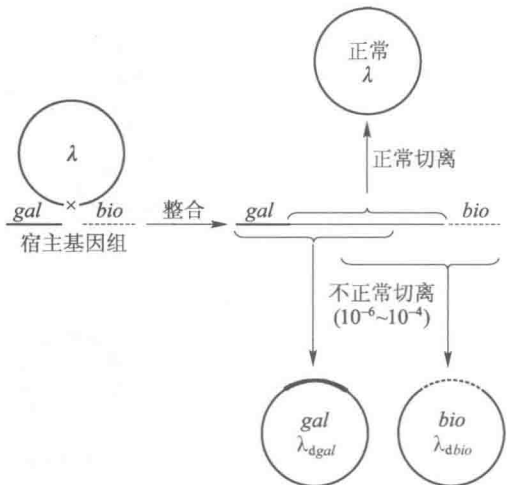


图 7-27 低频转导 (LFT) 裂解物的形成

50%左右的转导子，故称这种转导为高频转导。例如，当以不能发酵乳糖的 *E. coli gal⁻* 作受体菌，用高 MOI 的 LFT 裂解物进行感染时，则凡感染有 λ_{dgal} 噬菌体的任一细胞，几乎都同时感染有正常 λ 噬菌体。这时， λ_{dgal} 与 λ 可同时整合在一个受体菌的核染色体组上，这种同时感染有正常噬菌体和缺陷噬菌体的受体菌就称**双重溶原菌** (double lysogen)。当双重溶原菌受 UV 等因素诱导而复制噬菌体时，其中正常 λ 噬菌体的基因可补偿缺陷噬菌体 λ_{dgal} 的不足，因而两者同样获得了复制。这种存在于双重溶原菌中的正常噬菌体就被称作**辅助噬菌体** (helper phage)。所以，由双重溶原菌所产生的裂解物，因含有等量的 λ 噬菌体和 λ_{dgal} 缺陷噬菌体粒子，具有高频率的转导功能，故称**高频转导裂解物** (HFT lysate)。如果用低 MOI 的 HFT 裂解物去感染另一 *E. coli gal⁻* (不能发酵半乳糖) 受体菌，就可高频率 (~50%) 地把后者转导成能发酵半乳糖的 *E. coli gal⁺* 转导子。这种转导，称高频转导。

3. 溶原性转换 (lysogenic conversion)

当正常的温和噬菌体感染其宿主而使其发生溶原化时，因噬菌体基因整合到宿主的核基因组上，而使宿主获得了除免疫性外的新遗传性状的现象，称溶原性转换。这是一种表面上与上述的局限转导相似，但本质上却截然不同的特殊遗传现象。原因是：①这是一种不携带任何外源基因的正常噬菌体；②是噬菌体的基因而不是供体菌的基因提供了宿主的新性状；③新性状是宿主细胞溶原化时的表型，而不是经遗传重组形成的稳定转导子；④获得的性状可随噬菌体的消失而同时消失。

溶原性转换的典型例子是 *Corynebacterium diphtheriae* (白喉棒杆菌) 不产白喉毒素的菌株，它在被 β 温和噬菌体感染而发生溶原化时，就会变成产毒的致病菌株。其他例子如，*Clostridium botulinum* (肉毒梭菌) 经特定温和噬菌体感染后，就会产生 C 型或 D 型肉毒毒素；*Salmonella anatum* (鸭沙门氏菌) 在经 ϵ^{15} 噬菌体感染而溶原化时，细胞表面的多糖结构会发生相应的变化；我国学者也发现，在 *Streptomyces erythraeus* (红霉素链霉菌) 中，其 P4 温和噬菌体也有溶原性转换活性，由它决定了宿主的红霉素的生物合成和形成气生菌丝的能力。因为溶原化现象在从自然界中分离到的野生型菌株中较普遍存在，因此可以相信，溶原性转换在微生物自然进化中有一定的作用。

(三) 接合 (conjugation)

1. 定义

供体菌 (“雄性”) 通过性菌毛与受体菌 (“雌性”) 直接接触，把 F 质粒或其携带的不同长度的核基因组片段传递给后者，使后者获得若干新遗传性状的现象，称为**接合**。通过接合而获得新遗传性状的受体细胞，称为**接合子** (conjugant)。由于在细菌和放线菌等原核生物中出现基因重组的频率极低 (如 *E. coli* K12 约 10^{-6})，而且重组子 (recombinant) 的形态指标不明显，故有关细菌的重组或杂交工作一直很难开展。直到 J. Lederberg 和 E. L. Tatum (1946 年) 建立用 *E. coli* 的两株**营养缺陷型突变株** 在基本培养基上是否生长来检验重组子存在的方法后，才奠定了方法学上的基础。此法也是目前微生物遗传学和分子遗传学中最基本的和极为重要的研究方法之一 (图 7-28)。

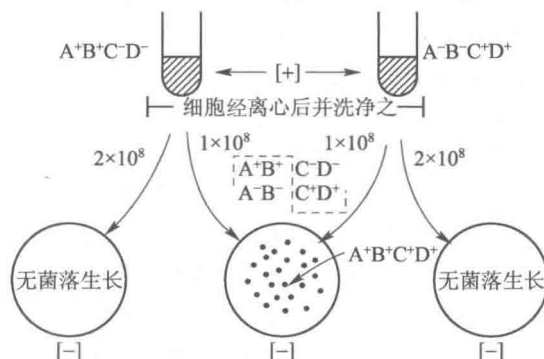


图 7-28 研究细菌接合的营养缺陷型法原理

2. 能进行接合的微生物种类

主要在细菌和放线菌中存在。在细菌中， G^- 细菌尤为普遍，如 *E. coli*、*Salmonella*、*Shigella*、*Klebsiella* (克雷伯氏菌属)、*Serratia* (沙雷氏菌属)、*Vibrio* (弧菌属)、*Azotobacter* (固氮菌属) 和 *Pseudomonas* (假单胞菌属) 等；放线菌中，以 *Streptomyces* (链霉菌属) 和 *Nocardia* (诺卡氏菌属) 最为常见，其中研究得最为详细的是 *S. coelicolor* (天蓝色链霉菌)。此外，接合还可发生在不同属的一些菌种间，如 *E. coli* 与 *Salmonella typhimurium* 间或 *Salmonella* 与 *Shigella dysenteriae* (痢疾志贺氏菌) 间。在所有对象中，接合现象研究得最多、了解得最清楚的当推 *E. coli*。*E. coli* 是有性别分化的，决定性别的是其中的 **F 质粒** (即 F 因子，见本章第一节)，它是一种属于**附加体 (episome)** 性质的质粒，即既可在细胞内独立存在，也可整合到核染色体组上；它既可经接合而获得，也可通过**吡啶类化合物、溴化乙锭或丝裂霉素**等的处理而从细胞中消除 (这些因子可抑制 F 质粒的复制)；它既是合成性菌毛基因的载体，也是决定细菌性别的物质基础。

3. *E. coli* 的 4 种接合型菌株

根据 F 质粒在细胞内的存在方式，可把 *E. coli* 分成 4 种不同接合型菌株 (图 7-29)。

(1) **F⁺ 菌株** 即“雄性”菌株，指细胞内存在一至几个 F 质粒，并在细胞表面着生一至几条性菌毛的菌株。当 F⁺ 菌株与 F⁻ 菌株 (无 F 质粒，无性菌毛) 接触时，通过性菌毛的沟通和收缩，F 质粒由 F⁺ 菌株转移至 F⁻ 菌株中，同时 F⁺ 菌株中的 F 质粒也获得复制，使两者都成为 F⁺ 菌株。这种通过接合而转性别的频率几近 100%，其具体过程为：

- ① 在 F 质粒的一条 DNA 单链特定位点上产生裂口。
- ② 以“滚环模型” (rolling circle model) 方式复制 F 质粒：在断裂的单链 (B) 逐步解开的同时，留存的环状单链 (A) 边滚动、边以自身作模板合成一互补单链 (A')。同时，含裂口的单链 (B) 以 5' 端为先导，以线形方式经过性菌毛而转移到 F⁻ 菌株中。

③ 在 F⁻ 中，线形外源 DNA 单链 (B) 合成互补双链 (B-B')，经环化后，形成新的 F 质粒，于是，完成了 F⁻ 至 F⁺ 的转变。

(2) **F⁻ 菌株** 即“雌性”菌株，指与 F⁺ 菌株相对应的、细胞中无 F 质粒、细胞表面也无性菌毛的菌株。它可通过与 F⁺ 菌株或 F['] 菌株的接合而接受供体菌的 F 质粒或 F['] 质粒，从而使自己转变成“雄性”菌株；也可通过接合接受来自 Hfr 菌株的一部分或一整套核基因组 DNA。如果是后一种情况，则它在获得一系列 Hfr 菌株遗传性的同时，还获得了处于转移染色体末端的 F 因子，从而使自己从原来的“雌性”变成了“雄性”，不过这种情况极为罕见。F⁻ 较为少见，据统计，从自然界分离到的 2 000 个 *E. coli* 菌株中，F⁻ 仅占 30% 左右。

(3) **Hfr 菌株 (高频重组菌株, high frequency recombination strain)** 20 世纪 50 年代初，由 J. Lederberg 实验室的学者所发现。在 Hfr 菌株细胞中，因 F 质粒已从游离态转变成在核染色体组特定位点上的整合态，故 Hfr 菌株与 F⁻ 菌株相结合后，发生基因重组的频率要比单纯用 F⁺ 与 F⁻ 接合后的频率高出数百倍，故名。当 Hfr 与 F⁻ 菌株接合时，Hfr 的染色体双链中的一条单链在 F 质粒处断裂，由环状变成线状，F 质粒中与性别有关的基因位于单链染色体末端。整段单链线状 DNA 以 5' 端引导，等速地通过性菌毛转移至 F⁻ 细胞中。在毫无外界干扰的情况下，这一转移过程约需 100 min。在实际转移过程中，这么长的线状单链 DNA 常发生断裂，以致越是位于 Hfr 染色体前端的基因，进入 F⁻ 细胞的概率就越高，其性状在接合子中出现的时间也就越早，反之亦然。由于 F 质粒上决定性别的基因位于线状 DNA 的末端，能进入 F⁻ 细胞的机会极少，故在 Hfr 与 F⁻ 接合中，F⁻ 转变为 F⁺ 的频率极低，而其他遗传性状的重组频率却很高。

Hfr 菌株的染色体向 F⁻ 菌株的转移过程与上述的 F 质粒自 F⁺ 转移至 F⁻ 基本相同，都是按滚环模型来进行的。所不同的是，进入 F⁻ 菌株的单链染色体片段经双链化后，形成**部分合子 (merozygote, 即半合子)**，然

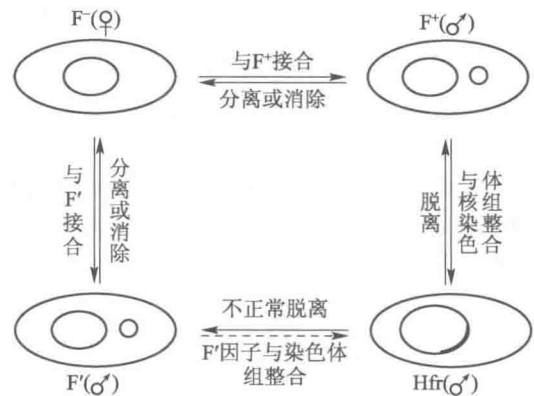


图 7-29 F 质粒的 4 种存在方式及相互关系

后两者的同源区段配对，经双交换后，才发生遗传重组(图 7-30)。

从图 7-30 可知，接合过程一般可分为：①Hfr 与 F^- 细胞配对；②通过性菌毛使两个细胞直接接触，并形成接合管；Hfr 的染色体在起始子(i)部位开始复制，至 F 质粒插入的部位才告结束；供体 DNA 的一条单链通过性菌毛进入受体细胞；③发生接合中断， F^- 成了一个部分双倍体，在那里，供体细胞(Hfr)的单链 DNA 片段合成了另一条互补的 DNA 链；④外源双链 DNA 片段与受体菌(F^-)的染色体 DNA 双链间进行双交换，从而产生了稳定的接合子。

由于在接合中的 DNA 转移过程有着稳定的速度和严格的顺序性，所以，人们可在实验室中每隔一定时间方便地用接合中断器或组织捣碎机等措施，使接合中断，获得一批接收到 Hfr 菌株不同遗传性状的 F^- 接合子。根据这一原理，利用 F 质粒可正向或反向插入宿主核染色体组的不同部位(有插入序列处)的特点，构建几株有不同整合位点的 Hfr 菌株，使其与 F^- 菌株接合，并在不同时间使接合中断，最后根据 F^- 中出现 Hfr 菌株中各种性状的时间早晚(用 min 表示)，就可画出一张比较完整的环状染色体图(chromosome map)。这就是由 E. Wollman 和 F. Jacob(1955 年)首创的接合中断法(interrupted mating experiment)的基本原理。同时，原核生物染色体的环状特性也是从这里开始认识的(图 7-31)。此法对早期 *E. coli* 染色体上的基因定位曾发挥了很大的作用。

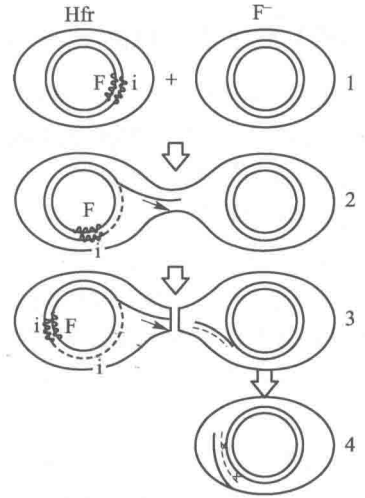


图 7-30 Hfr 与 F^- 菌株间的接合中断试验
图中的 F 质粒用波线表示，虚线表示新合成的 DNA 单链，双环表示细菌的核染色体组

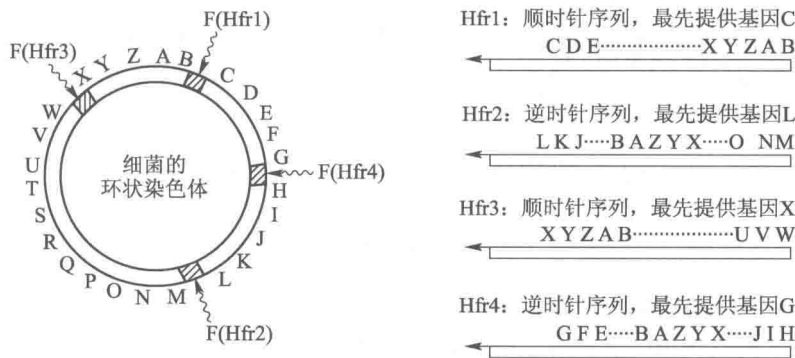


图 7-31 接合中断实验中不同 Hfr 菌株来源示意图

左：环状染色体上可供 F 质粒正、反向插入的部位；右：不同 Hfr 菌株所呈现的先后基因序列

(4) F' 菌株 当 Hfr 菌株细胞内的 F 质粒因不正常切离而脱离核染色体组时，可重新形成游离的、但携带整合位点邻近一小段核染色体基因的特殊 F 质粒，称 F' 质粒或 F' 因子。这种情况与 λ_d 形成的机制十分相似。凡携带 F' 质粒的菌株，称为初生 F' 菌株(primary F' -strain)，其遗传性状介于 F^+ 与 Hfr 菌株之间；通过 F' 菌株与 F^- 菌株的接合，可使后者也成为 F' 菌株，这就是次生 F' 菌株(secondary F' -strain)，它既获得了 F 质粒，同时又获得了来自初生 F' 菌株的若干原属 Hfr 菌株的遗传性状，故它是一个部分双倍体(图 7-32)。以 F' 质粒来传递供体基因的方式，称为 F 质粒转导或 F 因子转导(F-duction)、性导(sexduction)或 F 质粒媒介的转导(F-mediated transduction)。与上述构建不同 Hfr 菌株相似的是，因为 F 质粒可整合在 *E. coli* 核染色体组的不同位置上，故可分离到一系列不同的 F' 质粒，从而也可用于绘制细菌的染色体图。

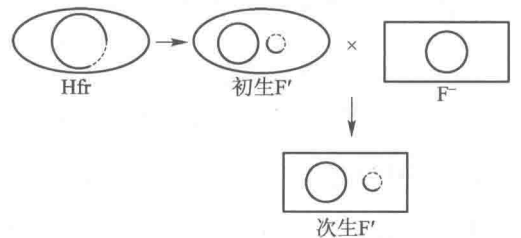


图 7-32 初生 F' 菌株和次生 F' 菌株的由来

(四) 原生质体融合 (protoplast fusion)

通过人为的方法,使遗传性状不同的两个细胞的原生质体进行融合,借以获得兼有双亲遗传性状的重组子的过程,称为**原生质体融合**。由此法获得的重组子,称为**融合子(fusant)**。原核生物原生质体融合研究是从20世纪70年代后期才发展起来的一种育种新技术,是继转化、转导和接合之后才发现的一种较有效的遗传物质转移手段。

能进行原生质体融合的生物种类极为广泛,不仅包括原核生物中的细菌和放线菌,而且还包括各种真核生物细胞,例如,属于真核类微生物的酵母菌、霉菌和蕈菌,各种高等植物细胞,至于各种动物和人体的细胞更由于它们根本就不存在阻碍原生质体进行融合的细胞壁,因此就较容易发生原生质体融合。

原生质体融合的主要操作步骤是:先选择两株有特殊价值、并带有选择性遗传标记的细胞作为**亲本菌株(parent strain)**置于高渗溶液中,用适当的**脱壁酶**(如细菌和放线菌可用**溶菌酶**等处理,真菌可用**蜗牛消化酶**或其他相应酶处理)去除细胞壁,再将形成的**原生质体**(包括球状体)进行离心聚集,加入促融合剂 PEG (聚乙二醇, polyethylene glycol) 或借电脉冲等因素促进融合,然后用等渗溶液稀释,再涂在能促使它再生细胞壁和进行细胞分裂的**基本培养基**平板上。待形成菌落后,再通过**影印平板法(replica plating)**,把它接种到各种**选择培养基(selective medium)**平板上,检验它们是否为稳定的融合子,最后再测定其有关生物学性状或生产性能(图7-33)。

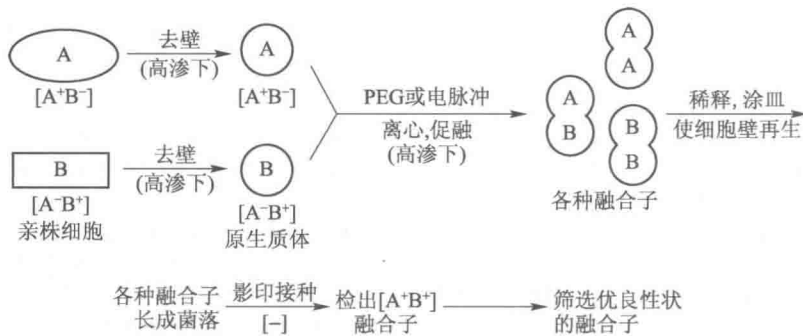


图7-33 原生质体融合的操作示意图

当前,有关在育种工作中应用原生质体融合的研究甚多,成绩显著,在某些例子中,其重组频率已达到 10^{-1} ,而诱变育种一般仅为 10^{-6} ;此外,除同种的不同菌株间或种间能进行融合外,还发展到属间、科间甚至更远缘的微生物或高等生物细胞间的融合,并借此获得生产性状更为优良的新物种。例如,国内有报道用 *Saccharomyces cerevisiae* (酿酒酵母)与 *Kluyveromyces* (克鲁维酵母属)进行属间原生质体融合,已获得在 45°C 下能进行乙醇生产的高温融合子,其产酒率达7.4%。此外,近年来在原生质体融合育种中还出现用加热或UV灭活的原生质体作一方甚至两方亲本参与融合,此法大大简化了制备遗传标记亲本的烦琐的准备工作,颇有创意。

二、真核微生物的基因重组

在真核微生物中,基因重组的方式很多,主要有有性杂交、准性杂交、原生质体融合和遗传转化等,由于后两者与原核生物中已讨论过的内容基本相同,故这里仅介绍一下有性杂交和准性杂交。

(一) 有性杂交 (sexual hybridization)

杂交是指在细胞水平上进行的一种遗传重组方式。**有性杂交**,一般指不同遗传型的两性细胞间发生的接合和随之进行的染色体重组,进而产生新遗传型后代的一种育种技术。凡能产生有性孢子的酵母菌、霉

菌和蕈菌，原则上都可应用与高等动、植物杂交育种相似的有性杂交方法进行育种。现仅以工业上和基因工程中应用甚广的真核微生物 *Saccharomyces cerevisiae* 为例来加以介绍。

S. cerevisiae 有其完整的生活史(图 2-8)。从自然界分离到的，或在工业生产中应用的菌株，一般都是双倍体细胞。把不同生产性状的甲、乙两个亲本菌株(双倍体)分别接种到含醋酸钠或其他产孢子培养基斜面上(见第二章)，使其产生子囊，经过减数分裂后，在每一子囊内会形成 4 个子囊孢子(单倍体)。用蒸馏水洗下子囊，用机械法(加硅藻土和石蜡油后在匀浆管中研磨)或酶法(用蜗牛消化酶等处理)破坏子囊，再行离心，然后把获得的子囊孢子涂布平板，就可以得到由单倍体细胞组成的菌落。把来自不同亲本、不同性别的单倍体细胞通过离心等方式使之密集地接触，就有更多的机会出现种种双倍体的有性杂交后代。它们与单倍体细胞有明显的差别，易于识别(表 7-13)。在这些双倍体杂交子代中，通过筛选，就可选到优良性状的杂种。

表 7-13 *S. cerevisiae* 的双倍体和单倍体细胞的比较

比较项目	双倍体	单倍体
细胞	大，椭圆形	小，球形
菌落	大，形态均一	小，形态变化较大
液体培养	繁殖较快，细胞较分散	繁殖较慢，细胞常聚集成团
在产孢子培养基上	会形成子囊	不形成子囊

在生产实践上利用有性杂交培育优良微生物菌株的实例很多。例如，用于乙醇发酵的酵母菌和用于面包发酵的酵母菌虽同属 *S. cerevisiae* 一个种，但菌株间的差异很大，表现在前者产乙醇率高，而对麦芽糖和葡萄糖的发酵力弱，后者则正好相反。通过杂交，就可育出既能高产乙醇，又对麦芽糖和葡萄糖有很强发酵能力的优良杂种菌株，同时发酵后的残余菌体还可综合利用作为面包厂和家用发面酵母的优良菌种。

(二) 准性杂交(parasexual hybridization)

1. 定义

要了解准性杂交，先要介绍一下什么是准性生殖(parasexual reproduction, parasexuality)。顾名思义，准性生殖是一种类似于有性生殖，但比它更为原始的两性生殖方式，这是一种在同种不同菌株的体细胞间发生的融合，它可不借减数分裂而导致低频率基因重组并产生重组子。因此，可以认为准性生殖是在自然条件下，真核微生物体细胞间的一种自发性的原生质体融合现象。它在某些真菌尤其在还未发现有性生殖的半知菌类(Fungi Imperfecti)如 *Aspergillus nidulans*(构巢曲霉)中最为常见。

2. 准性生殖过程(图 7-34)

(1) 菌丝联结(anastomosis) 它发生于一些形态上没有区别、但在遗传型上却有差别的同种不同菌株的体细胞(单倍体)间。菌丝联结的发生频率是极低的。

(2) 形成异核体(heterocaryon) 两个遗传型有差异的体细胞经菌丝联结后，先发生质配(plasmogamy)，使两个单倍体核集中到同一细胞中，于是形成了双相的异核体。异核体能独立生活。

(3) 核融合(nuclear fusion) 或称核配(caryogamy)，指在异核体中的两个细胞核在某种条件下，低频率地产生双倍体杂合子核的现象。如在 *A. nidulans* 或 *A. oryzae*(米曲霉)中，核融合的频率为 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ 。某些理化因素如樟

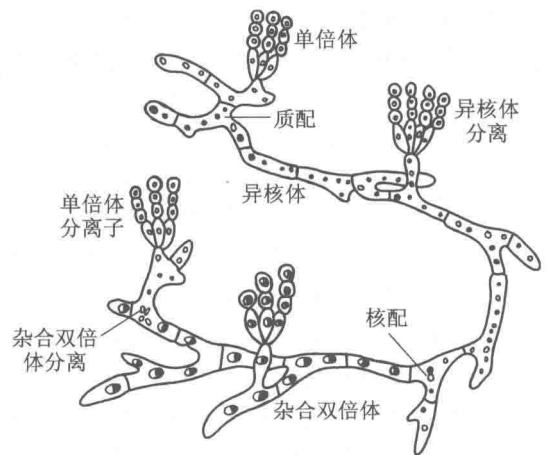


图 7-34 半知菌的准性生殖示意图

脑蒸汽、UV 或高温等处理，均可提高核融合的频率。

(4) 体细胞交换和单倍体化 **体细胞交换**(somatic crossing-over)即体细胞中染色体间的交换，也称**有丝分裂交换**(mitotic crossing-over)。上述**双倍体杂合子**(diploid heterozygote)的遗传性状极不稳定，在其进行有丝分裂过程中，其中极少数核内的染色体会发生交换和单倍体化，从而形成了极个别的具有新性状的**单倍体杂合子**(haploid heterozygote)。如果对双倍体杂合子用 UV、 γ 射线或氮芥等进行处理，就会促进染色体断裂、畸变或导致染色体在两个子细胞中分配不均，因而有可能产生各种不同性状组合的单倍体杂合子。

从表 7-14 中，可看出准性生殖与有性生殖的主要区别。

表 7-14 准性生殖和有性生殖的比较

比较项目	准性生殖	有性生殖
参与接合的亲本细胞	形态相同的体细胞	形态或生理上有分化的性细胞
独立生活的异核体阶段	有	无
接合后双倍体的细胞形态	与单倍体基本相同	与单倍体明显不同
双倍体变为单倍体的途径	有丝分裂	减数分裂
接合发生的概率	偶然发现，概率低	正常出现，概率高

3. 准性杂交育种 (breeding by parasexuality)

准性生殖对一些没有有性生殖过程但有重要生产价值的半知菌类育种工作来说，提供了一个杂交育种的手段。国内在**灰黄霉素生产菌**(production strain of griseofulvin)——*Penicillium urticae* (荨麻青霉)的育种中，曾借用准性杂交的方法取得了较好的成效。其主要原理见图 7-35。

(1) 选择亲本 即选择来自不同菌株的合适的营养缺陷型作为准性杂交的亲本。由于在 *P. urticae* 等不产生有性孢子的霉菌中，只有在极个别的体细胞间才发生菌丝联结，而且联结后的细胞在形态上并无显著的特征，因此，与研究细菌的接合一样，必须借助于营养缺陷型这类绝好的选择性标记作为准性杂交亲本的筛选指标，例如在图 7-33 中的 $[A^-B^+]$ 和 $[A^+B^-]$ 。

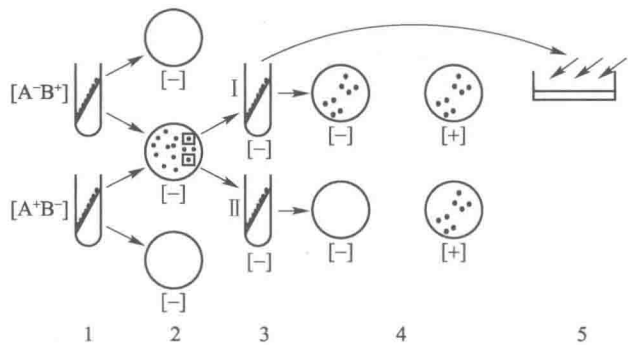


图 7-35 *P. urticae* 的准性杂交原理

(2) 强制异合 即用人力的方法强制两个营养缺陷型的亲本菌株形成互补的异核体。方法是把两菌株所产生孢子 ($10^6 \sim 10^7$) 相互混匀，用**基本培养基**[-]倾注培养皿平板，同时对各亲本菌株的分生孢子也各倒一[-]平板以作对照。经培养后，若前者只长出 10 余个菌落，而后者完全不长，即认为是正常的结果。这时，前者就是异核体或杂合二倍体菌落。

(3) 移单菌落 将平板上长出的单菌落移种到基本培养基[-]的斜面上。

(4) 验稳定性 指设法检验获得的菌株究竟是一种不稳定的异核体，还是稳定的杂合二倍体。方法是先从斜面上洗下孢子，用基本培养基[-]倾注夹层平板，经培养后，其上再倒一层**完全培养基**[+]。如在[-]上不出现或仅出现少数菌落，而加了[+]后却出现了大量菌落，则它便是一个不稳定的异核体(图 7-35 中的 II)；相反，如在[-]上出现多数菌落，而加上一层[+]后，菌落仍无显著增多，则它就是一个稳定的**杂合二倍体菌株**(图 7-35 中的 I)。在实际工作中，发现多数菌株都属于不稳定的异核体。

(5) 促进变异 把上述稳定菌株所产生的分生孢子用紫外线、 γ 射线或氮芥等理化因子进行处理，以促使其发生染色体交换、染色体在子细胞中分配不均、染色体缺失或畸变以及发生点突变等变化，从而使分离后的杂交子代(单倍体杂合子)进一步增加新性状变异的可能性。

(6) 选出良种 在上述工作的基础上,再通过一系列生产性状的测定,就有可能筛选到较优良的准性杂交菌株。

第四节 基因工程

科学家的理性探索和微生物的育种实践推动着微生物遗传变异基本理论的研究,而对遗传本质的日益深入认识又大大地促进了遗传育种实践的发展。科学和技术、理论和实践间的这种依存关系,在微生物遗传育种领域获得了最充分的证实。从19世纪巴斯德时代起,在微生物学者仅初步认识微生物存在自发突变现象的阶段,育种工作只能停留在从生产中选种和搞些初级的“定向培育”等工作;1927年,当发现X射线能诱发生物体基因突变,以后又发现紫外线等物理因素的诱变作用后,就很快被用于早期的青霉素生产菌种 *Penicillium chrysogenum*(产黄青霉)的育种工作中,并取得了显著成效;1946年,当发现了化学诱变剂的诱变作用,并初步研究其作用规律后,就在生产实践中掀起了利用化学诱变剂进行诱变育种的热潮;几乎在同一时期,由于对真核微生物有性杂交、准性生殖和对原核微生物各种基因重组规律的认识,推动了杂交育种工作的开展;步入20世纪50年代后,由于对遗传物质本质的深刻认识,以及对它们的存在形式、转移方式及其功能等问题的深入研究,促进了分子遗传学的迅速发展,由此引起了20世纪70年代开始的、在遗传育种观念与技术上具有革命性的基因工程的诞生和飞速发展。

1972年, D. Jackson、R. Symons 和 P. Berg 成功地构建了基因工程中必需的可携带外源基因的质粒载体。1973年, S. R. Cohen 和 H. W. Boyer 等首次完成用人工操作在体外进行质粒重组,并通过转化使其携带的外源基因在 *E. coli* 中获得成功表达,由此标志了一项革命性的新技术——基因工程正式诞生了。

一、基因工程的定义

基因工程(gene engineering; gene technology)又称遗传工程(genetic engineering),是指人们利用分子生物学的理论和技术,自觉设计、操纵、改造和重建细胞的遗传核心——基因组,从而使生物体的遗传性状发生定向变异,以最大限度地满足人类活动的需要。这是一种自觉的、可人为操纵的体外DNA重组技术,是一种可达到超远缘杂交的育种技术,更是一种前景宽广、正在迅速发展的定向育种新技术。

二、基因工程的基本操作

基本操作包括目的基因(即外源基因或供体基因)的取得,载体系统的选择,目的基因与载体重组体的构建,重组载体导入受体细胞,“工程菌”或“工程细胞株”的表达、检测以及实验室和一系列生产性试验等。其主要原理见图7-36。

(一) 目的基因的取得

取得具生产意义的目的基因主要有3条途径:①从适当的供体生物包括微生物、动物或植物中提取;②通过反转录酶(reverse transcriptase)的作用,由mRNA合成cDNA(complementary DNA,即互补DNA);③由化学合成方法合成有特定功能的目的基因。

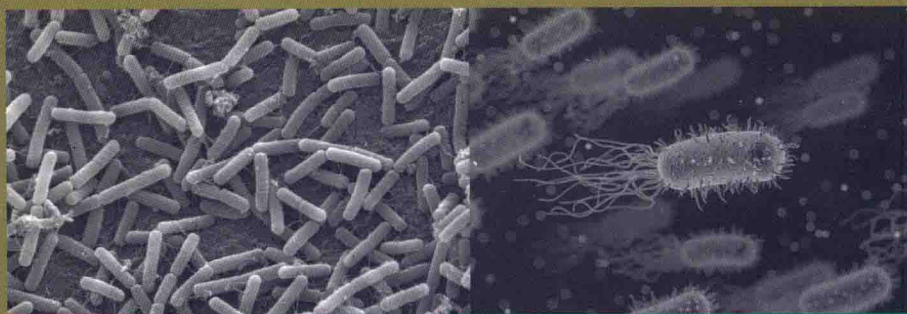
(二) 优良载体的选择

优良的载体(vector)必须具备几个条件:①是一个分子量较小、结构清楚、具有自我复制能力的复制子(replicon);②能在受体细胞内大量扩增;③载体上最好只有一个限制性内切核酸酶的切口,使目的基因能固定地整合到载体DNA的一定位置上;④其上必须有一种选择性遗传标记,以便及时高效地选择出“工程

- 第1版 1995年 获国家教委优秀教材一等奖，
1997年 获国家级教学成果奖二等奖，
1998年 获国家教委科学技术进步奖二等奖（著作类）
- 第3版 入选普通高等教育“十一五”国家级规划教材
- 第4版 入选“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

ESSENTIAL MICROBIOLOGY

Fourth Edition



数字课程网站

网址：<http://abook.hep.com.cn/52197>

<http://abook.hep.edu.cn/52197>

数字课程账号 使用说明详见书内数字课程说明页

仅供个人科研教学使用

ISBN 978-7-04-052197-9



9 787040 521979 >

定价 52.00 元