



细菌的遗传分析

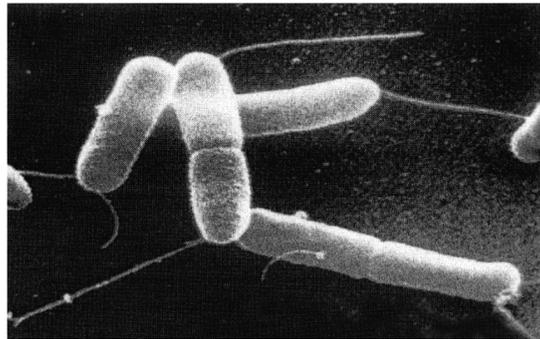
细菌(**bacteria**)、放线菌(**actinomycetes**)和蓝细菌(**cyanobacteria**)等均属于原核生物(**prokaryotes**)。这类生物的主要特征是没有核膜,其核基因组是由一个裸露的环状 **DNA** 分子构成,因此称为拟核(**nucleoid**),原核细胞(**prokaryocyte**)也由此而得名。该基因组编码功能相关蛋白质的基因或相互协同调节作用的几个基因往往成簇排列成一个操纵子。细胞内没有以膜为基础的细胞器,也不进行典型的有丝分裂和减数分裂。因此它们的遗传物质传递规律和重组机制与真核生物不完全相同。由于细菌是单细胞生物,结构简单,繁殖力强,分布广,世代周期短,个体数量多,在正常条件下,完成一个世代仅 **20 min**,较容易诱变和筛选各类突变型。细菌不仅是许多病毒的宿主细胞,而且有自身的遗传特性,又易于培养建立纯系和长期保存等优点,已成为遗传学研究中常用的实验材料之一。特别是大肠杆菌的研究与应用最为广泛和深入,遗传背景也较清楚,基因组测序也是最早完成的生物之一,碱基对为 **4 639 229 bp**,预测基因数 **4 377**,其中 **4 290** 编码蛋白,其余编码 **RNA**。许多基因不仅已定位在染色体上,而且对其功能的研究也较深入。为此本章主要以大肠杆菌为材料,讨论细菌的遗传物质的传递规律与染色体作图以及细菌同源重组的分子机制。

7.1 细菌的细胞和基因组

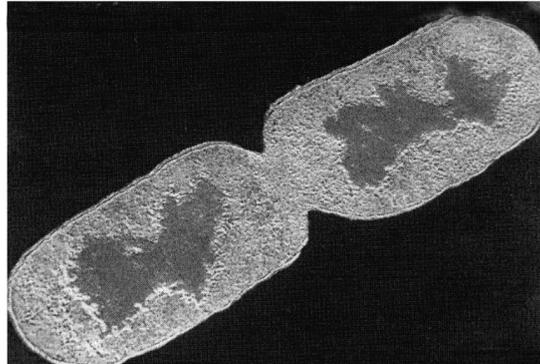
7.1.1 细菌的细胞

细菌包括真细菌(eubacteria),如大肠杆菌(*Escherichia coli*)和古细菌(archaeobacteria),如詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)。这些细菌以多种形态存在:球菌(cocci)、杆菌(bacilli)和螺旋菌(spirilla)等。其大小随种类不同而异,杆菌以长和宽表示,一般长为 $1\sim 5\mu\text{m}$,宽 $0.5\sim 1\mu\text{m}$;球菌以直径大小表示,一般为 $0.5\sim 1\mu\text{m}$;螺旋菌是测量其弯曲形长度,一般长为 $1\sim 50\mu\text{m}$,直径为 $0.5\sim 1\mu\text{m}$ 。细菌的细胞结构可分为基本结构和特殊结构,基本结构是指一般细菌细胞都具有的结构,包括细胞壁、细胞膜、拟核、核糖体、细胞质及内含物。特殊结构是指某些细菌在一定条件下所具有的结构,如荚膜

(a)



(b)



(c)

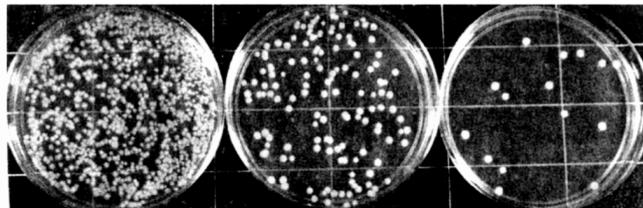


图 7-1 大肠杆菌的细胞和菌落

(a) 大肠杆菌扫描电镜照片($1\times 14\ 000$)

(b) 已分裂成两个子细胞的大肠杆菌电镜照片,可见两个染色质区——拟核,外有细胞膜和细胞壁

(c) 细菌经培养形成的菌落(每个群落来自一个单细胞)

和鞭毛等[图 7-1(a),(b)]。由此可见,细菌的细胞一般很小,不便于操作,所以遗传学很少研究单个细菌细胞,而是将来源于一个培养物的稀释样品进行平板接种(plating)后,每个细菌细胞都会自我繁殖形成肉眼可见的,由上千个细胞形成的细菌菌落(bacterial colony)或克隆(clone)。如果未发生突变,一个克隆中的所有个体在遗传上是完全相同的[图 7-1(c)]。人们正是利用细菌在特定条件下是否能生长、分裂而形成菌落和菌落的大小、形态、生长习性以及对药物或病毒病原的不同反应等而进行遗传学研究的。

细菌不通过有性方式繁殖,细菌的染色体不凝缩,没有着丝粒,也没有纺锤体结构。双链环状 DNA 分子随着细胞伸长而采取二分分裂(binary fission)的方式分开。一般来说,细胞愈小,生长分裂愈快。在合适的条件下,细菌每 20 min 繁殖一代,而大多数哺乳动物细胞约 24 h 才能分裂一次。但不论时间长短,细胞生长和分裂一个世代,细胞内染色体就要复制一次。大肠杆菌细胞在 37℃ 条件下细胞伸长, DNA 可能是同步复制,细胞膜在两个子染色体附着点中间生长,使子染色体同时拉开分向每个细胞,中间细胞膜继续向中央生长形成两个细菌细胞。因此,高等生物细胞的有丝分裂和细菌分裂是完全不同的,而唯一相同的只是两者的染色体都是随着细胞分裂而精确复制并分到两个子细胞中去(图 7-2)。

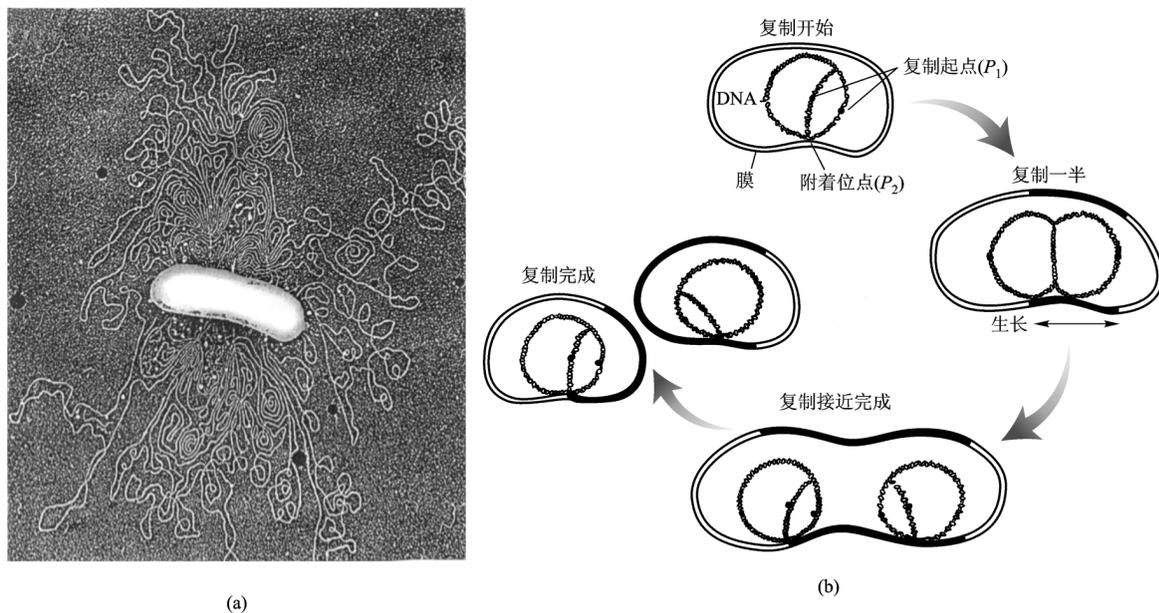


图 7-2 细菌染色体的复制和细胞分裂

(a) 裂开的 *E. coli* 细胞释放出它的染色体(电镜照片) (b) 随着细胞分裂染色体的复制与分布

细菌主要是单细胞生物,但也有例外,放线菌的一些种类可以形成丝状的多细胞结构。许多不同类型的以前被认为是单细胞生物的细菌可以形成多细胞的黏性结构,称为生物膜(biofilm)。由于这种生物膜具有多层复杂结构,很难穿透或被破坏,因而食品加工、医用导管等管道中都可见到它们的踪影。它们还可在患者组织中导致难以治疗的疾病,如部分囊性纤维化症状实际上就是由于患者肺部生物膜的积累造成的。

知识窗 7-1

古 细 菌

近 20余年在完成一些原核生物和真核生物的基因组测序基础上揭示,原核生物在极早时期就演化成两大类:真细菌(eubacteria)和古细菌(archaeobacteria)。古细菌又称原细菌,或称古核生物(archaeon)。古核生物细胞的形态结构与基因组结构装置和原核细胞相似,但有些分子进化特征更接近真核细胞。古细菌的翻译系统如核糖体蛋白、延伸因子和氨酰 tRNA 合成酶以及转录系统都与真核生物相似,而与真细菌有所不同。但是在代谢系统方面古细菌与真细菌极为相似。如从 2 600 m 深的西太平洋海底洋脊烟突状喷发流中分离到詹氏甲烷球菌,它们是生长在 88~94℃的一种厌氧古细菌,其基因组序列分析(1995年完成),发现它在起源上与真核生物更加接近。人们推测,古细菌和原始真核细胞可能从原始细胞分别继承了部分共同的遗传物质。为此,有生物学家建议将生命世界传统上分的五大王国,即动物、植物、真菌、原生生物和细菌,改为三大类群,即原核生物、古核生物与真核生物三界(图 1)。它们是 3个独立起源系统,来自共同的单细胞祖先,彼此间不存在继承关系。三界系统与传统的五大王国的差别在于,前者将动物、植物、真菌和原生生物并为同一真核生物界,而将原核生物(细菌)分为真细菌界和古细菌界。

真细菌实际包括我们所知的绝大多数原核生物,而古核生物是 20世纪 80年代出现的名称,是一些生长在极端特殊环境中的细菌,过去把它们归属于原核生物是因为其细胞的形态结构和基本的生命活动方式与原核细胞相似。但最早发现的产甲烷细菌类的 16S RNA 和 5S RNA 的核苷酸序列分析结果表明,它与其他原核细胞相差甚远,却与真核细胞更为近似,还有一些分子生物学特征的表现也是如此(表 1)。

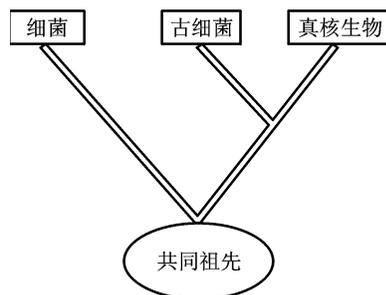


图 1 生命三界

基因组测序结果支持关于生命三界的假说,在 15亿年前地球上存在 3个独立的生命系统。2个起源不同的原核生物分别为细菌和古细菌,所有真核生物归为同一类。古细菌与真核生物的亲缘关系较之古细菌与细菌的关系更近

表 1 生命三界特征比较

特征	真细菌	古细菌	真核生物
核膜	无	无	有
细胞器	无	无	有
细胞壁肽聚糖	有	无	无
DNA 重复序列	无	有	有
基因内含子	无	多数有内含子	有
核小体结构	无	类似核小体结构	典型核小体结构
核糖体类型	70S	介于 70S 与 80S 之间	80S
核糖体蛋白质种类	55	> 60	70~84
链霉素和氯霉素等抗性	—	+	+
蛋白质合成起始氨基酸	甲基甲硫氨酸	甲硫氨酸	甲硫氨酸
RNA 多聚酶种类	1 种类型	多种类型	多种类型

由此说明,真核生物可能起源于古核生物,它们可能有过共同的进化历程。至于真核细胞起源于哪一类古细菌已提出多种推测,但目前尚缺乏充足的科学论据。现已发现 100多种古细菌,并将它们划分为目、科、属、种。它们在细胞起源和生物进化中扮演过重要角色,为此引起了许多学者广泛的关注。

7.1.2 细菌的基因组

细菌细胞的大部分遗传信息位于一条环状、双链 DNA 分子上,这个 DNA 分子一般被称为细菌染色体(bacterial chromosome),位于细胞内一个称为“拟核”(nucleoid)的区域中。有些细菌还含有小的,可自我复制的环状 DNA 分子,该小的 DNA 分子称为质粒(plasmid)。细菌的染色体长度为 250~35 000 μm 不等。这种染色体都是裸露的,没有组蛋白和其他蛋白质的结合,也不形成核小体结构,因此它们的染色体比较易于接受带有相同或不同物种的基因或 DNA 片段的插入(表 7-1)。

表 7-1 细菌的基因组结构

细菌的种类	核酸	染色体形状	染色体长度/ μm	碱基对/bp
铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	dsDNA	O?	3 480	10 440 000
天蓝色链霉菌(<i>Streptomyces coelicolor</i>)	dsDNA	O?	2 600	7 800 000
枯草杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	dsDNA	O	1 350	4 050 000
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	dsDNA	O	1 333	4 639 229
淋病奈氏球菌(<i>Neisseria gonorrhoea</i>)	dsDNA	O	640	1 920 000
无胆甾原体(<i>Achoplasma laidlawii</i>)	dsDNA	O	507	1 520 000
流感嗜血杆菌(<i>Haemophilus influenzae</i>)	dsDNA	O	505	1 515 000
人型支原体(<i>Mycoplasma hominis</i>)	dsDNA	O	253	760 000

大肠杆菌染色体长为 1 333 μm ,而要包装入一长约为 2 μm 、宽 1 μm 的细胞中,DNA 必定以折叠或螺旋状态存在。有实验证明:在 DNA 分子进行折叠和螺旋化过程中还依赖于 RNA 分子的作用。如 350 μm 的环状 DNA[图 7-3 a],通过 RNA 分子的连接作用将 DNA 片段结合起来而形成环,从而导致 DNA 长度缩小成为 30 μm [图 7-3 b],在活体大肠杆菌染色体上有 40~50个这样的环。接着每个环内 DNA 进一步螺旋,使 DNA 长度进一步缩短为 2 μm ,形成更高级结构的染色体[图 7-3 (c)]。用 RNase 处理使 RNA 连接体断裂,DNA 环展开,但不影响 DNA 环内的螺旋结构;如用 DNase 处理,结果刚好相反,不影响环的结构,但环内螺旋展开[图 7-3 d),(e)]。这些研究表明,细

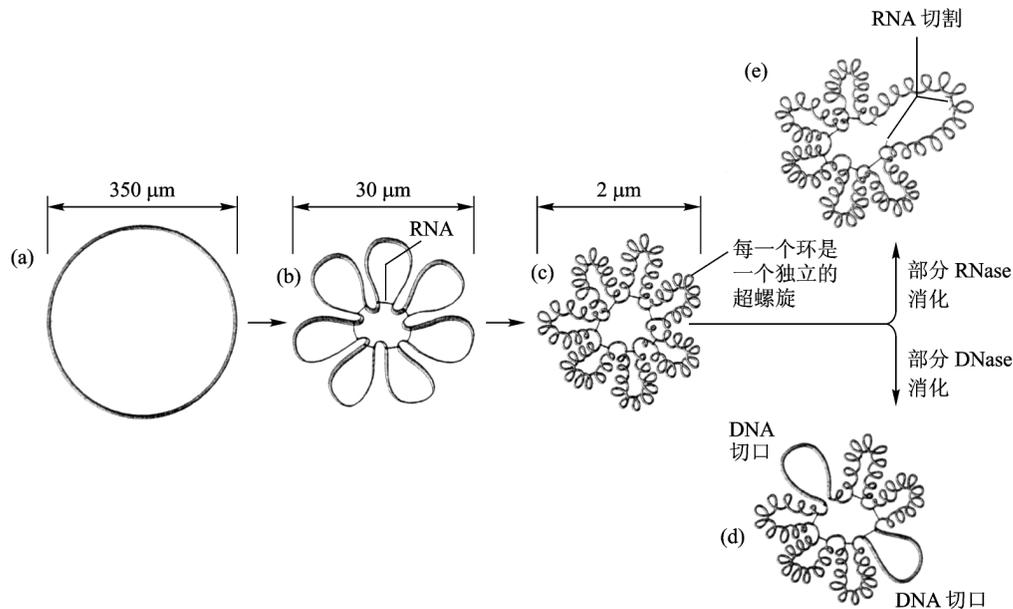


图 7-3 大肠杆菌染色体的基本结构图解

(a) 未折叠的环状染色体 (b) 折叠的染色体 40~50个环 (c) 超螺旋折叠的染色体
(d) 部分解螺旋的染色体 (e) 部分解折叠的染色体

菌的染色体不单是一条裸露的 DNA 链,而是以高度组装的形式存在,同时这种组装不仅为了适应细菌细胞的狭小空间,而且还要有利于染色体功能的实现,便于染色体复制和基因表达。

7.2 大肠杆菌的突变型及其筛选

7.2.1 大肠杆菌的突变类型

研究细菌的基因结构与功能,首先要有突变型,细菌中有各种突变型,现以大肠杆菌为例将其突变型大体分为:

(1) 合成代谢功能的突变型 (anabolic functional mutants)

野生型 (wild type) 即原养型 (prototrophic) 大肠杆菌能生长在十分简单的基本培养基 (minimal media, MMD) 上,其中唯一的有机成分是碳源,一般为葡萄糖。野生型品系在基本培养基上具有合成所有代谢和生长所必需的复杂有机物的功能,这称为合成代谢功能 (anabolic function)。然而这一系列合成代谢功能的实现必然需要大量基因的表达,其中任何一个必需的基因发生了突变都不能进行一个特定的生化反应,从而阻碍整个合成代谢功能的实现,这种突变型称为营养缺陷型 (auxotrophic)。它们多是条件致死突变 (conditional lethal mutation),因为能通过基本培养基中添加所需的有机成分使具有这种突变的细菌存活。营养缺陷型细菌的表型一般是根据该菌株所不能合成的物质来命名。取这一物质的前 3 个字母,第一字母用大写表示,指出它们生长所需的物质。例如 Met^- 、 Thi^- 和 Pur^- 表明这些突变品系分别需要甲硫氨酸 (methionine)、硫胺 (thiamin) 和嘌呤 (purine),而相应的原养型的表型记为 Met^+ 、 Thi^+ 和 Pur^+ 。如果不同基因突变可能表现出相同的营养缺陷型表型,那么具有这些突变的细菌的基因型则用小写斜体字母表示。如 $metA$ 和 $metB$ 突变是野生型基因 $metA^+$ 和 $metB^+$ 突变的等位基因。每一突变型的表型都是 Met^- ,这是因为 $metA^+$ 和 $metB^+$ 这两个基因都是甲硫氨酸生物合成的必需基因。

(2) 分解代谢功能的突变型 (catabolic functional mutants)

野生型大肠杆菌能利用比葡萄糖复杂的不同碳源,因为它能使复杂的糖类转化成葡萄糖或其他简单的糖类,也能将复杂分子,如氨基酸或脂肪酸降解为乙酸或三羧酸循环的中间物。这些降解功能称为分解代谢功能 (catabolic function)。同样,一系列降解功能的实现也需要许多有关基因的表达,其中任何一个基因的突变都会影响降解功能的实现。如 Lac^- 突变型不能分解乳糖,因此就不能生长在以乳糖为唯一碳源的基本培养基中,而野生型 Lac^+ 细菌都能利用乳糖。 Lac^- 表型可能是由于 $lacZ^+$ 或 $lacY^+$ 基因发生突变,分别产生了基因型为 $lacZ^-$ 或 $lacY^-$ 的突变型菌株。这种菌株显然亦是条件致死突变型。

(3) 抗性突变型 (resistant mutants)

细菌由于某基因的突变而对某些噬菌体或抗生素产生抗性 (resistant),对噬菌体的抗性突变往往是以某种方式改变细菌的膜蛋白,从而某种噬菌体不能吸附或吸附在这种突变细菌上的能力降低。对抗生素产生抗性的突变是一个严重的公害问题,所以研究得也较深入,而且细菌对各种抗生素的抗性机制各不相同。如对链霉素抗性突变的细菌是由于核糖体的 30S 亚基的 S12 蛋白变异,链霉素能和敏感细菌 (野生型) 的 S12 结合,从而使翻译过程发生差错或者使翻译过程的启动作用失效。而抗链霉素突变型的 S12 不再和链霉素结合,因此抗性突变细菌可以在链霉素存在的情况下,进行正常的翻译作用和正常的分裂繁殖。对 T1 噬菌体抗性表型以 $T1^r$ 表示,对 T1 噬菌体敏感 (sensitive) 表型则以 $T1^s$ 表示;对链霉素 (streptomycin) 抗性表型以 Str^r ,对链霉素敏感表型以 Str^s 表示。决定这些表型的基因则记为 ton 和 str ton^+ 的表型是 $T1^s$, str^+ 的表型是 Str^s 。细菌中常用的若干突变型的基因

符号如表 7-2 所示。

表 7-2 细菌中某些突变型的基因符号

ara	阿拉伯糖不能利用	mtl	甘露糖醇不能利用
arg	精氨酸缺陷型	pdx	吡多醇缺陷型
att	原噬菌体附着点	phe	苯丙氨酸缺陷型
ade	腺嘌呤缺陷型	pro	脯氨酸缺陷型
azi	叠氮化钠抗性	pur	嘌呤缺陷型
bi	生物素缺陷型	pyr	嘧啶缺陷型
cys	半胱氨酸缺陷型	rha	鼠李糖不能利用
gal	半乳糖不能利用	str	链霉素抗性
his	组氨酸缺陷型	thi	硫胺缺陷型
lac	乳糖不能利用	thr	苏氨酸缺陷型
leu	亮氨酸缺陷型	ton	噬菌体 T1 抗性
lys	赖氨酸缺陷型	tp	色氨酸缺陷型
mal	麦芽糖不能利用	tsx	噬菌体 T6 抗性
man	甘露糖不能利用	tyr	酪氨酸缺陷型
met	甲硫氨酸缺陷型	xyl	木糖不能利用

7.2.2 细菌的培养与突变型筛选

细菌培养可有两种方法,即只需供给基本营养成分的液体培养基培养和固体(如琼脂)表面培养。在液体培养基中,细菌以二分裂方式分裂,它们以几何级数增殖,直至耗尽营养物质或积累了毒素因子废物使细菌群体停止增长为止。用移液管将这种液体培养物移取少量,放入含琼脂的培养基表面,用无菌涂布玻璃棒均匀涂布,每个细菌细胞即分裂繁殖。由于细胞在琼脂凝胶上不能运动,所有的子细胞聚集成团,细胞数量很快达到 10^6 ,成为肉眼可见的菌落。此过程称平板接种(plating)。如果最初接种的样品所含细胞非常少,那么平板上每个单独的菌落就是来自单个的原初细胞。所有细胞都来自一个原初细胞的菌落称为无性繁殖系或克隆(clone)。无性系有许多特征很容易进行直观检查或简单的化学检验,从而决定其表型;此表型可归类于这个无性系的原初细胞,这样即可测得吸移样品中各种表型的频率。如需测定丧失合成某种营养物质能力的营养缺陷型或对某类药物(或对某类噬菌体)有抗性的抗性突变型,均可采用由莱德伯格等(J Lederberg 和 E. M. Lederberg 1952)所设计的影印培养法。先在一个母板(master plate)上使细菌长成菌落,然后用一个比培养皿略小的木板,包上一层消过毒的丝绒,印在母板上,将菌落吸附在丝绒上,再将这块丝绒印到含有各种不同成分的培养基上,例如,缺乏某一特定营养成分的琼脂板上。凡不能出现在影印培养基上的菌落,说明它缺乏合成这一物质的能力,是突变的菌落,可以把它们从母板上取下来做进一步的研究。

显然要得到特定表型的突变型,主要不是依赖使用不同的诱变剂,而是依赖于采用不同的筛选方法。根据不同的突变类型建立了相应的筛选手段。糖发酵性突变株 Lac^- 选择,可将 Lac^+ 和 Lac^- 涂布于伊红-美蓝培养基(EMB培养基)上, Lac^+ 可形成有金属光泽的紫色菌落,而 Lac^- 则形成白色菌落,因此很容易识别。抗性突变型也很容易选择,把经过诱变处理的细胞直接涂布到含有某种噬菌体或抗生素的培养基上,形成的菌落克隆就是抗性突变。至于营养缺陷型突变的选择,如选择氨基酸营养缺陷型,可把先经诱变剂,如 X 射线、紫外线或化学诱变剂等处理的细菌涂布在含所有 20 种氨基酸的完全培养基上,这种培养基能使各种营养缺陷型生长,目的是通过细胞分裂使突变型充分表现。待菌落出现后,用印迹法(replica plated method)将它们影印到基本培养基上鉴别出在不含任何氨基

酸的培养基上不能生长的克隆。然后再从母板上将这一克隆培养在只含一种氨基酸的培养基上,从而判定该突变型需哪种氨基酸才能生长(图 7-4)。

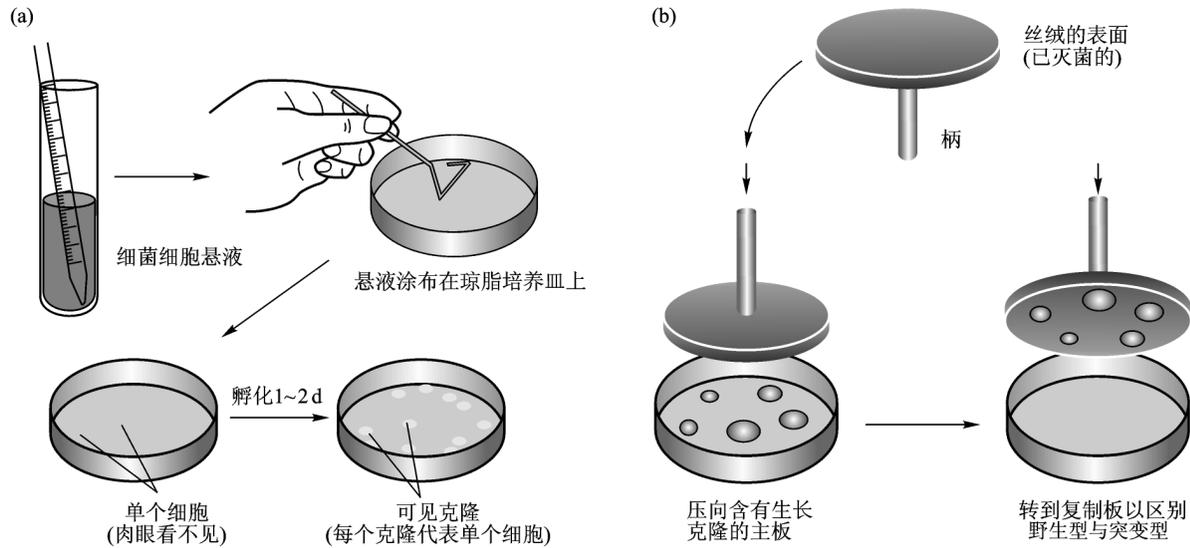


图 7-4 细菌的培养与突变型筛选

(a) 细菌的培养 (b) 突变型筛选

7.3 细菌的接合与染色体作图

7.3.1 细菌接合现象的发现

1946年, J Lederberg和 E Tatum设计了一个研究细菌基因重组的试验。他们选用大肠杆菌 K 12 的两种不同营养缺陷型菌株,即甲硫氨酸(met^-)、生物素(bio^-)的营养缺陷型和苏氨酸(thr^-)、亮氨酸(leu^-)、硫胺(thi^-)的营养缺陷型。“+”代表原养型或抗性,“-”代表营养缺陷型或敏感型。

菌株 A 的基因型为: $met^- bio^- thr^+ leu^+ thi^+$,只能在补充有甲硫氨酸、生物素的培养基上生长。

菌株 B 的基因型为: $met^+ bio^+ thr^- leu^- thi^-$,只能在补充苏氨酸、亮氨酸和硫胺素的培养基上生长。

在这一试验中,他们将两种细菌都涂布到基本培养基中培养,其中有些平板只涂布菌株 A,有些平板只涂布菌株 B,有些则涂布预先在液体完全培养基中培养了数小时的 A 和 B 株的混合物[图 7-5 (a)]。经培养后发现,只有在混合培养平板上长出了菌落,其频率为 1×10^{-7} ,而在单独培养 A 菌株和 B 菌株的培养基上都没有长出菌落。由于只有原养型 $met^+ bio^+ thr^+ leu^+ thi^+$ 细菌能在基本培养基上生长,因此这一试验表明这两个菌株的基因组之间发生了某种形式的基因重组。

这种原养型菌落是如何产生的呢?由于 Lederberg和 Tatum用的是多重营养缺陷型,因而可以排除发生回复突变的可能。单个基因的突变率约为 10^{-6} ,两个或两个以上基因同时发生突变,其突变率远远小于 10^{-12} ,这在基本培养基上几乎不可能获得菌落。那么是否发生遗传转导呢? B Davis设计的 U 型管实验否定了这一推测。他在一根 U 型管底部用超微孔滤片隔开,将 A 和 B 菌分别注入两臂中[图 7-5 (b)]。这种滤片使大肠杆菌不能直接接触,但可以允许 $0.1 \mu m$ 以下的分子通过。他在 U 型管的一端通入灭菌空气或用吸气方法使培养液从一端经过滤片渗透到另一端,使两边的培养基较好地相通。培养一段时间后,取出两端的细菌并分别涂布于不同的基本培养基上,结果也没有任

何原养型菌落出现。这一试验至少可以说明 A 菌株和 B 菌株细胞之间的直接接触或称接合 (conjugation) 是基因重组的前提。

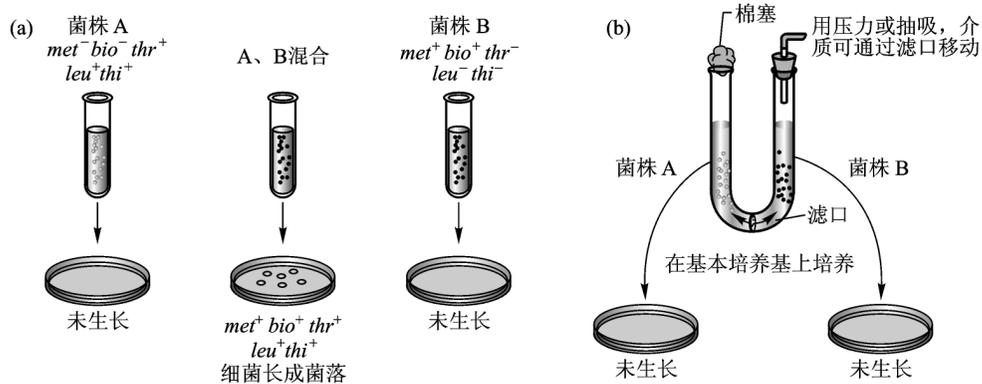


图 7-5 Lederberg 和 Tatum 的细菌接合试验

(a) 营养缺陷型菌株 A、B 在基本培养基上均不能生长, 当两者混合后, 由于基因的转移而在基本培养基上形成菌落 (b) U 型管实验证明, A、B 两菌株间直接接触对基因的转移是必需的

7.3.2 F 因子及其转移

在细菌中发现不同品系细胞接合进行基因转移与重组后, 不仅证明细菌间可以杂交, 而且还发现了大肠杆菌也有“性别”。在这里仍用大肠杆菌 K 12 两个菌株: A 菌株的基因型为 $met^- bio^-$; B 菌株基因型为 $thr^- leu^- thi^-$, 同时这两个菌株中都分别具有链霉素敏感型 (str^s) 和抗链霉素突变型 (str^r)。在不含链霉素的基本培养基上将这两种菌株进行正反杂交, 即 $A str^s \times B str^r$ 与 $A str^r \times B str^s$, 结果都可以得到原养型菌落; 在含有链霉素的基本培养基上进行同样杂交时, 只有 $A str^s \times B str^r$ 这一杂交得到原养型菌落, 而 $A str^r \times B str^s$ 杂交中未产生原养型菌落。由此说明菌株 A 和菌株 B 虽然来自同一野生型菌株 K 12, 但在杂交中显然起着不同的作用, 菌株 A 相当于雄性, 是遗传物质的供体 (donor), 而菌株 B 相当于雌性, 是遗传物质的受体 (recipient)。所以在含有链霉素的基本培养基中, $A str^s \times B str^r$ 这一杂交组合能得到重组原养型菌落, 这是因为供体虽然对链霉素敏感, 而细胞不能分裂, 但链霉素并不影响供体的基因转移。受体是对链霉素抗性的, 所以在含有链霉素的培养基中既不影响细胞分裂, 也不影响它接受外源遗传物质而发生重组, 从而形成原养型菌落。这是单向的遗传物质的转移, 所以反交 $A str^r \times B str^s$ 不能得到原养型, 因为受体对链霉素敏感, 虽然供体能转移遗传物质, 但是受体细胞不能分裂, 所以不能重组形成原养型菌落。在这一点上有些类似于动物中的情况, 如雌雄亲本一旦交配以后, 杀死雄体不会影响杂交子代的产生, 可是杀死雌体以后, 则不会出现杂交子代。

大肠杆菌中供体和受体菌株的区别就在于它们是否有一种微小的质粒——F 因子 (F factor 或 F element)。F 因子又称性因子 (sex factor) 或致育因子 (fertility factor)。F 因子具有赋予中性的细菌呈现性别的奇妙性质。它是一种封闭的环状 DNA 分子, 相对分子质量约为 4.5×10^6 , 全长约为 9×10^4 bp, 大约为大肠杆菌环状染色体全长的 2%, 以游离状态存在于细胞质中。在大肠杆菌中并不是每个细菌细胞中都有这种游离的 F 因子, 只有供体细胞才含有 F 因子, 这种菌株就称为 F^+ , 受体细胞不含 F 因子, 这种菌株称为 F^- 。F 因子结构包含 3 个区域 (图 7-6): ① 原点 (origin), 它是转移的起点。② 致育基因 (fertility gene), 这些基因使它具有感染性, 其中一些基因编码生成 F 菌毛 (F pili) 的蛋白质, 即 F^+ 细胞表面的管状结构, 称为接合管 (conjugation tube), F 菌毛与 F^- 细胞表面的受体相结合, 在两个细胞间形成细胞质桥即接合管。③ 配对区 (pairing region), F 因子的这一区域与细菌染色体中多处的核苷酸序列相对应, 因此 F 因子可以分别地与染色体上这些同源序列

配对,通过交换整合到染色体中成为细菌染色体的一部分。像这种既可存在于染色体之外作为一个独立的复制子,也可整合到细菌染色体中作为细菌复制子的一部分的遗传因子称为附加体(episome)。

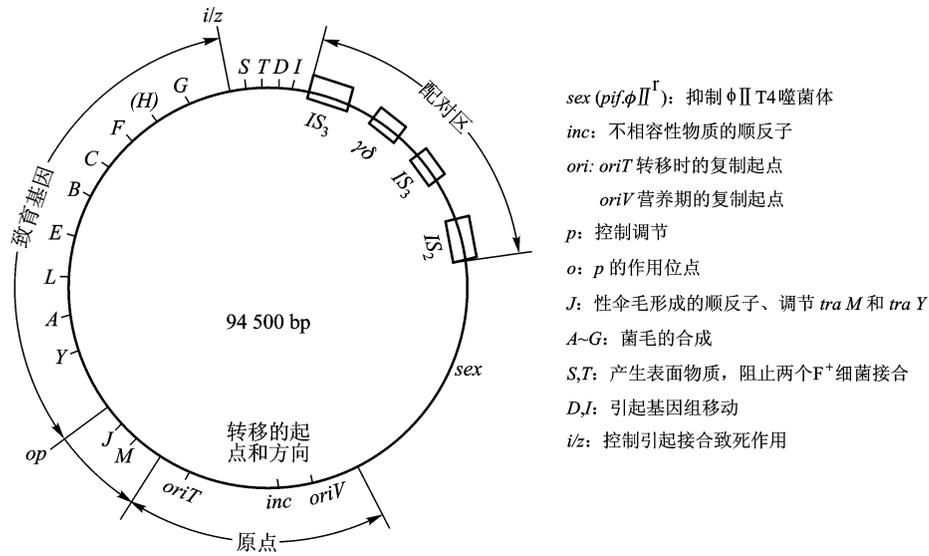


图 7-6 F 因子的结构

F^+ 细胞和 F^- 细胞接触时,形成细胞质桥(接合管),这时 F^+ 细胞的 F 因子通过接合管从转移的起点开始向 F^- 细胞传递,转移时 F 因子双链 DNA 分子中的一条链打开一个缺口,打开的链从 5' 磷酸基团单链尾巴先进入受体 F^- ,在 F^- 中复制形成一个完整的 F 因子,因而使 F^- 细胞转变成 F^+ ;另一条没有缺口的完整链留在供体内作为模板进行复制,也形成一个完整的 F 因子[图 7-7 (b)]。 F^+ 与 F^- 之间杂交只有 F 因子的传递,而细菌的染色体并不转移,因此尽管 F 因子转移频率很高,但两者染色体之间重组频率很低,大约是每百万个细胞中发生一次重组,因此 F^+ 品系称为低频重组(low frequency recombination, Lfr)。另外, F 因子也可以整合到细菌染色体中,像这种带有一个整合的 F 因子的品系则称为高频重组(high frequency recombination, Hfr),因为 Hfr 细胞与 F^- 细胞接合后可以将供体染色体的一部分或全部传递给 F^- 受体,当供体和受体的等位基因带有不同标记时,在它们之间就可以发生重组,重组频率可达到 10^{-2} 以上,故称 Hfr 品系[图 7-7 a]。

7.3.3 细菌重组的特点

整合在染色体中的 F 因子虽然不能独立自主复制,但是一旦接合开始,整合的 F 因子的“复制机器”首先启动,并在它的序列之内一条单链的某处打开一个缺口,同时进行滚环复制,而带缺口链 5' 端进入接合管,因为细菌染色体和这部分 F 因子相连,所以细菌染色体也随着进入 F^- 细胞。由于在接合期间, Hfr 细胞和 F^- 细胞之间的接合管常会自发断裂,进入的 Hfr 染色体也随之断裂,通常很少有整条 Hfr 染色体转入 F^- 细胞的,因此:

① F^- 细胞得到的只是 F 因子的一部分, F 因子其余部分依赖于整条 Hfr 染色体转移。这样在 $\text{Hfr} \times \text{F}^-$ 杂交中选出的大多数重组子仍为 F^- 。

② F^- 受体细胞只接受部分的供体染色体,这样的细胞称为部分二倍体(partial diploid)或称为半合子(merozygote),也称局部融合(meromixis),即采取任何方式只转移一个细胞中的部分遗传物质到另一个细胞中的遗传交换过程都称为局部融合。在这种部分二倍体细胞中,供体提供的部分基因组称为外基因子(exogenote),而受体提供完整的基因组,受体完整的基因组统称内基因子(endogenote)。所以供体与受体的重组就是内基因子与外基因子之间的重组,而且这种重组不同于

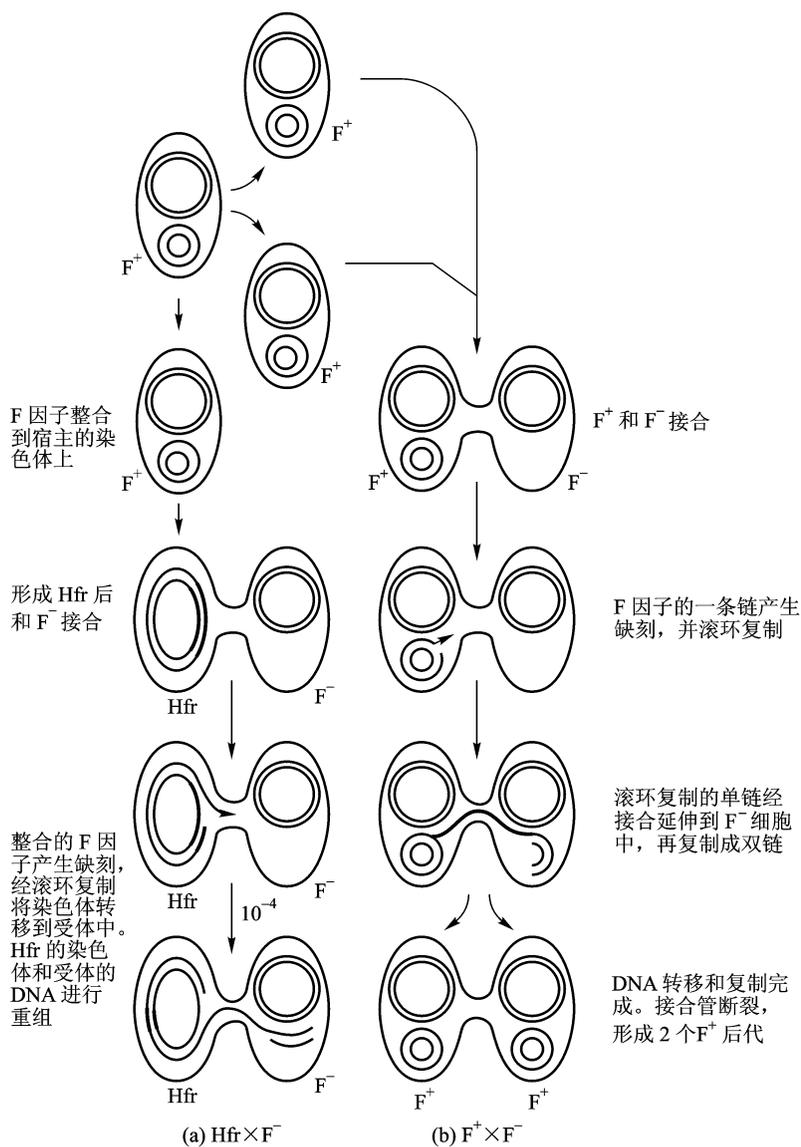


图 7-7 F 因子和 Hfr 的关系

真核生物的完整二倍体重组[图 7-8 a]。

③ 如果内、外基因子之间只发生单交换, 则环状染色体被破坏, 形成的线状染色体不能复制, 因而含有这种线状染色体的细胞就不能繁殖。只有偶数次的交换才能保持细菌染色体的完整性, 产生有活性的重组子[图 7-8 b]。

④ 偶数次交换得到的重组子只有一种类型, 因为相反的重组子 (reciprocal recombinant) 是一个线状的片段, 照例不能复制, 随着细胞分裂而被丢失, 所以重组后 F⁻ 细胞所产生的菌落不再是部分二倍体, 而是单倍体[图 7-8 c]。可见, 原核生物中的遗传交换并不像真核生物那样在两整套基因组间进行, 而是在一完整的基因组 (F⁻ 受体基因组) 与一不完整的基因组 (供体外基因子) 间进行, 即在部分二倍体 (或部分合子) 间进行。因此, 在细菌的重组中有下列两个特点: (a) 只有偶数次交换才能产生平衡的重组子。(b) 不出现相反的重组子, 所以在选择培养基上只出现一种重组子。

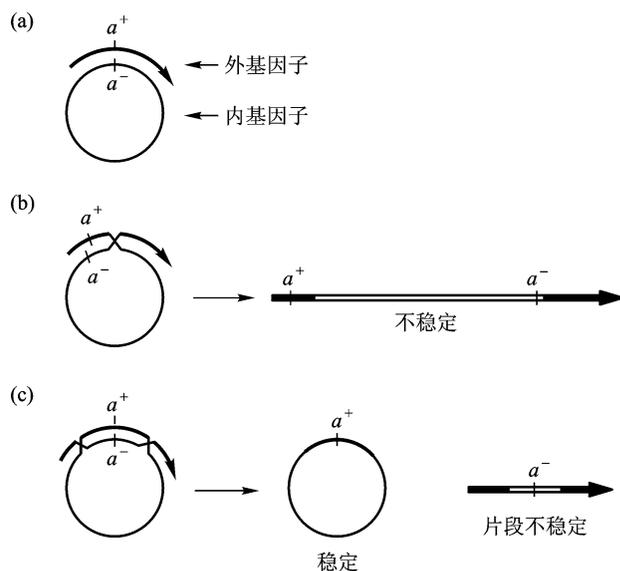


图 7-8 细菌重组的特点

7.4 中断杂交与重组作图

7.4.1 中断杂交实验原理

基因从 Hfr 细胞按次序转入 F^- 细胞,可根据基因进入 F^- 细胞的时间和次序制作基因图谱。Wollman 和 Jacob 于 1954 年在大肠杆菌中曾进行了以下杂交试验: $Hfr: thr^+ leu^+ azi^r ton^r lac^+ gal^+ str^s \times F^-: thr^- leu^- azi^s ton^s lac^- gal^- str^r$ 。在时间 $t=0$ 时,让这两种细胞培养物混合进行通气培养使之接合,每隔一定时间取样,把菌液放入搅拌器内搅动以打断配对的接合管,使接合的细胞分开以中断杂交,将中断接合的细菌接种在几种不同的培养基上,测定形成了何种重组子。例如,检查 F^- 细胞是否得到了 thr^+ ,就可将所取得的样本接种到含有链霉素的基本培养基上,在这种培养基上如形成菌落,它的基因型必定是 $thr^+ leu^+ str^r$,因为只有这种重组子才能生长,说明供体 thr^+ 和 leu^+ 基因已进入受体细胞并发生重组。先用 thr^+ 、 leu^+ 和 str^r 这 3 个基因作为选择标记,其他几个基因作为非选择标记。经多次中断杂交和取样选择,得到大量 $thr^+ leu^+ str^r$ 菌落,再分别从每一个这样的菌落中取样,接种到不同的培养基上,对选出的重组子中每一非选择标记的频率与接合持续时间作图。如接种在含叠氮化钠(azi)及 T1 噬菌体培养基上,观察对叠氮化钠抗性(azi^r)和 T1 噬菌体抗性(ton^s)这两个基因转移的情况;接种在不加葡萄糖而补加乳糖和半乳糖的培养基上,在这两种培养基上分别加伊红和美蓝作指示剂,如出现红色,则表示能利用乳糖或半乳糖以检查 lac^+ 和 gal^+ 的转移情况,这样一种用来研究细菌接合过程中基因转移方式的实验方法称为中断杂交实验(interrupted mating experiment)。其基本步骤是:

① 接合 采用 Hfr 菌株为 Str^s , F^- 菌株为 Str^r ,接合在完全培养基上进行,培养基以葡萄糖为碳源,不加链霉素、叠氮化钠和噬菌体 T1。

② 中断接合 在接合处理后的不同时间搅拌和提取样品,从而获得不同接合时间(m in)的细菌样品。

③ 杀死 Hfr 将不同接合时间的细菌样品稀释后接种在含有链霉素的完全培养基上,结果对链

霉素敏感的 Hfr 菌株被杀死,只有 F⁻ 细菌存活。

④ 检查 F⁻ 细菌所含供体基因 将获得不同接合时间的 F⁻ 细菌样品都分别接种在含叠氮化钠,含噬菌体 T1,含乳糖而无葡萄糖,含半乳糖而无葡萄糖的培养基上,结果如图 7-9 a)(b)和表 7-3 所示。

⑤ 作图 根据各基因出现时间先后的顺序将它排列在染色体上,并标明出现的时间,而各基因出现时间的差数就是它们之间的距离,这种图距是以时间(m in)为单位的,有别于真核生物遗传作图时以厘摩(cM)为单位[图 7-9 c)]。

7.4.2 中断杂交作图

中断杂交实验结果表明,在接合开始后,Hfr的不同非选择标记可与 F⁻ 细胞的染色体在不同时间形成重组子(表 7-3)。thr⁺ 最先进入 F⁻ 细胞,接合 8 m in就出现了重组子,接着 leu⁺ 出现,azi^r在 9 m in时出现,最后出现的是 gal^r 基因。在被选择的 thr⁺ leu⁺ str^r的重组子中,其他的供体基因按一定时间顺序依次地转入 F⁻ 细胞中去,随着时间的推移,具有某一基因的菌落逐渐增加,达到一定频率后就不再变动,而且愈早转入的基因,它所达到的频率也愈高。如叠氮化钠基因(azi^r)出现最高,在 24 m in就可达到约 90%的频率;半乳糖发酵基因(gal^r)出现最迟,即使在接合后 60 m in取样,其频率也不到 30%,即 70%以上的菌落仍属于半乳糖不发酵型(图 7-9)。

表 7-3 中断杂交实验结果

基因	转入时间/m in	频率/%
thr ⁺	8	100(选择标记)
leu ⁺	8.5	100(选择标记)
azi ^r	9	90
ton ^r	11	70
lac ⁺	18	40
gal ^r	25	25

不同基因所能达到的稳定转移频率不同,这表明它们与 thr和 leu基因之间以及它们之间的顺序和距离不同。同一个 Hfr菌株转移的起始点以及转移顺序在不同实验中都是相同的,但是一个 F⁺ 品系可产生许多 Hfr品系,这是因为 F因子在细菌染色体上有许多插入位点,而且其插入片段的取向不同而形成不同的 Hfr品系。用这些不同 Hfr菌株进行中断杂交实验,则它们的转移起点、基因转移顺序以及转移方向都不相同[图 7-10 a),(b)]。

Wollman和 Jacob根据实验结果证实大肠杆菌遗传图呈环状,可用基因转移时间进行作图,图距单位用 m in来度量,它的全部染色体转移需 100 m in,每分钟约以 3.3×10^4 bp即 1.2 μm DNA的均衡速度进行转移。因此,大肠杆菌 K12菌株整个环形遗传图为 100 m in[图 7-10 c)]。

7.4.3 重组作图

在中断杂交中是根据基因转移的先后次序,以时间为单位进行基因定位的,而重组作图(recombination mapping)是根据基因间重组率进行基因定位的。这两种方法可以相互补充,提高基因定位的精确度。如基因距离较远用中断杂交作图是很有效的,但是基因距离较近,基因间转移时间在 2 m in之内,那么仅用中断杂交实验进行基因定位就不十分精确可靠。不过它可为重组作图提供某些基因之间连锁关系及其前后次序的依据。例如,根据中断杂交实验已知 lac⁺ade⁺这两个基因是紧密连锁的,而且在 Hfr lac⁺ade⁺ × F⁻ lac⁻ade⁻这一杂交中是 lac⁺先进入 F⁻受体,而 ade⁺后进入。Hfr lac⁺ade⁺进入受体后将会发生:① 因为供体 Hfr转入片段不能独立复制,如果未进入 F⁻受体的基因组中,那么在以后的细胞分裂中就丢失了[图 7-11 a)]。② 如果已进入 F⁻基因组中,而且在缺乏腺

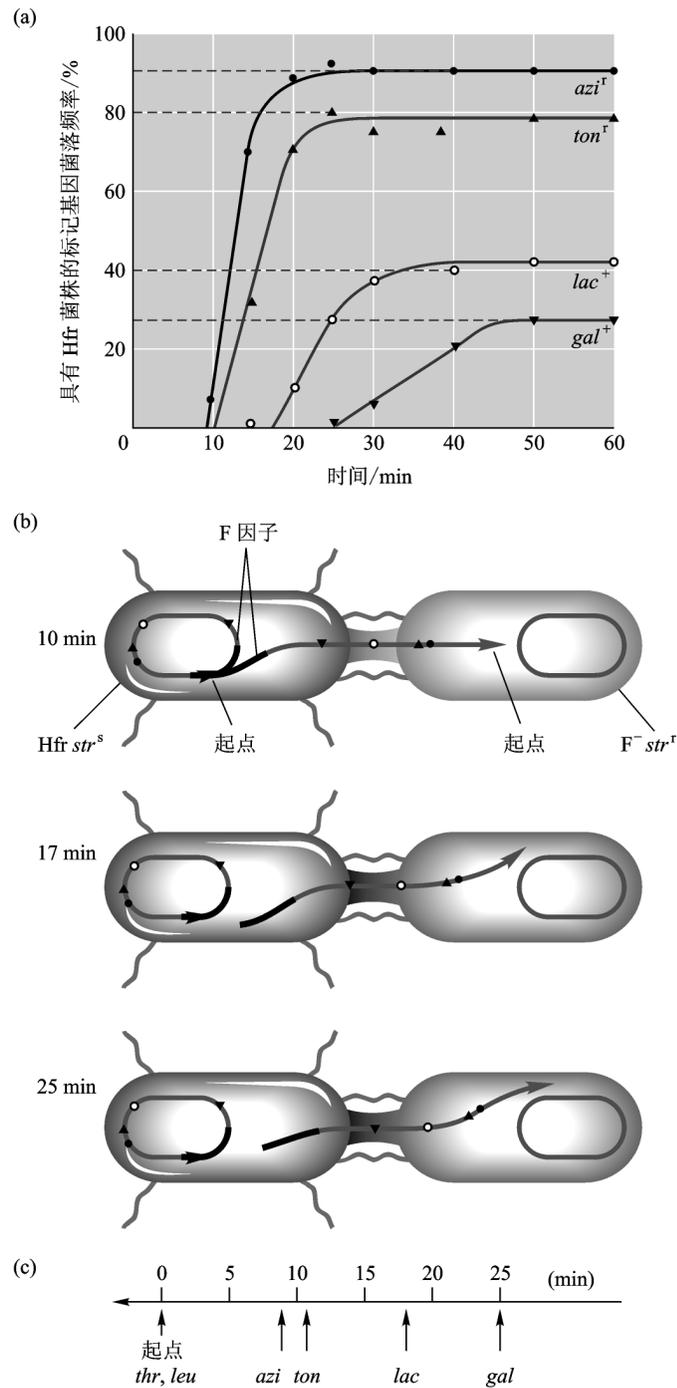


图 7-9 中断杂交实验

(a) 选出的 $thr^r leu^+ str^r$ 重组中非选择标记与转移接合时间作图

(b) 各个非选择标记基因在不同时间转移的动态过程

(c) 根据中断杂交实验结果作图, 基因间的图距单位为时间 (min)

嘌呤的培养基上表型为 $F^- lac^+ ade^+$, 这显然是这两个基因之外发生双交换的产物, 在 $lac ade$ 这两基因之间并未发生重组[图 7-11(b)]。③ 表型为 $lac^+ ade^-$, 这种类型在缺乏腺嘌呤的培养基中就不能生长, 所以筛选不出来, 而且对测定这两个基因之间的图距也没有意义, 因为可能是 lac^+ 进入, 而 ade^+ 还未进入 F^- 细胞。④ 只有在缺乏腺嘌呤的完全培养基上选出 $lac^- ade^+$ 才是其真正的重组子。

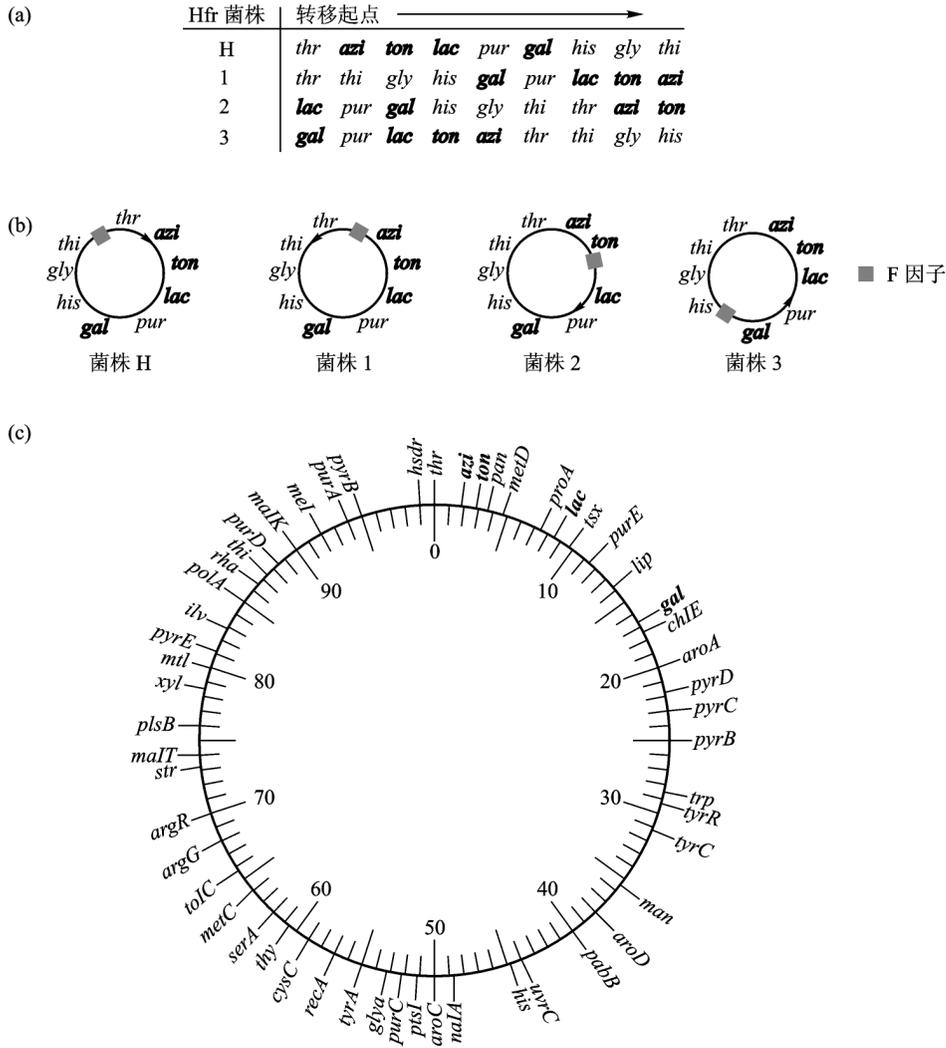


图 7-10 不同 Hfr 品系基因转移的顺序
 (a) 不同 Hfr 品系中基因转移的顺序 (b) 由于 F 质粒的不同方向 and 不同位置插入环形供体染色体而形成不同的 Hfr 品系
 (c) E. coli K12 的部分遗传图, 整个环状基因组为 100 min

这是因为已知 ade^+ 是在 lac^+ 之后进入 F 细胞, 既然 ade^+ 已进入, lac^+ 也已先进入, 所以选出重组子 $F^- lac^- ade^+$ 必然是外因子和内因子在这两个基因之间发生交换的结果[图 7-11(c)]。 $F^- lac^- ade^-$ 在缺乏腺嘌呤的条件下是不能生长的, 当然对于计算这两个基因之间的图距也是没有意义的。因此 lac 与 ade 之间图距应为:

$$lac-ade = \frac{lac^- ade^+}{(lac^- ade^+) + (lac^+ ade^+)} \times 100 = \frac{lac^- ade^+}{ade^+} \times 100$$

用重组率 (R) 所测得的基因间距离与用中断杂交以时间 (T 为单位的基因间距离基本上是一致的。两个值的比: R:T 约等于 20, 即它们之间关系大约是 1 min 等于 20 个图距单位 (cM)。大肠杆菌染色体全长约 100 min, 含 4×10^6 核苷酸对, 所以总图距相当于 2000 cM, 故 $1 cM \approx 2000 bp$ 。这种接合重组作图在短距离内是有效的。如相距 2 min 以上的就有可能表现不连锁。同时这种接合重组不产生交互重组类型, 所以用这种方法得出的图距和减数分裂生物中所确定的图距不同。

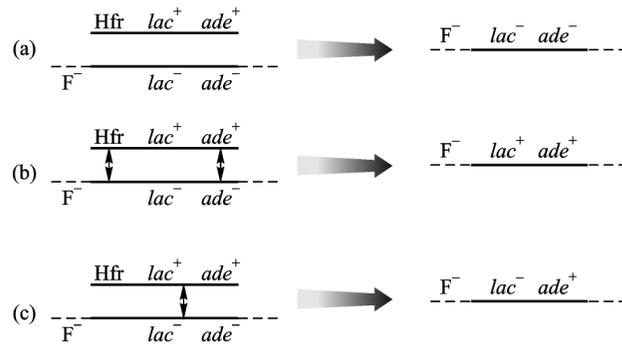


图 7-11 重组作图

(a) 外基因子与内基因子间未发生重组 (b) *lac*与 *ade*两基因之外发生双交换 (c) *lac*与 *ade*之间交换产生重组子

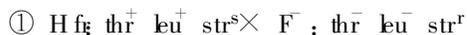
7.5 F'因子与性导

7.5.1 F'因子

F⁺与Hfr两种菌株可以相互转变,也就是说F因子既可以插入到染色体中去,形成Hfr菌株,又可通过规则的交换和剪接,从染色体上完整地游离下来形成F⁺菌株[图7-12a],但是偶尔也会出现不规则的环出,形成F因子携带一段相邻的细菌染色体[图7-12b]。这种带有插入细菌基因的环状F因子是一个复制子,这种新的F因子称为F'因子(F' factor)。已知F因子在细菌染色体上插入位置不同而构成不同的Hfr品系,由此也可形成不同的F'因子。它们各自携带细菌的不同基因,有的F'因子携带若干个基因的一大段细菌的染色体。F'与λdgal或λdbio颗粒不同,F'携带细菌的基因,但并不减少自身的基因,如果自身的基因丢失,转移就可能停止(详见下节)。此外,F'因子也不存在蛋白质外壳包装的问题,所以它的长度不为包装所限制,可以携带不同长度的细菌DNA片段。F'因子和F⁺一样是能感染的,并把F'因子转移给F⁻细胞,同时也能转移细菌基因,其结果使F⁻变成F'菌株,并形成部分二倍体[图7-12c]。

7.5.2 性导

F'因子转移细菌基因不同于Hfr菌株。如比较下列两个杂交结果:



结果:筛选出F⁻:*thr*⁺*leu*⁺*str*^r重组子。



结果:筛选出F':*thr*⁺*leu*⁺*str*^r重组子。

这两个杂交一个是Hfr菌株,另一个是来源于它的F'菌株。杂交中把混合培养物涂布在含链霉素的基本培养基上,第一个杂交选出的菌株都是F⁻,因此不能将*thr*⁺*leu*⁺转入F⁻菌株,而第二个杂交选出的菌株都带有活性的F因子,能与其他F⁻菌株杂交,并能将*thr*⁺*leu*⁺转入F⁻菌株,而且这些菌株也具有F'因子,所以都是F⁺,仍具有感染能力。

产生F'因子的Hfr菌株仍保持单倍体状态,当F'因子转入到受体细胞之后,由于引入了供体细胞的部分基因,从而构成了部分二倍体。如图7-12中F'*lac*⁺可转移到F⁻*lac*⁻后构成F'*lac*⁺/F⁻*lac*⁻部

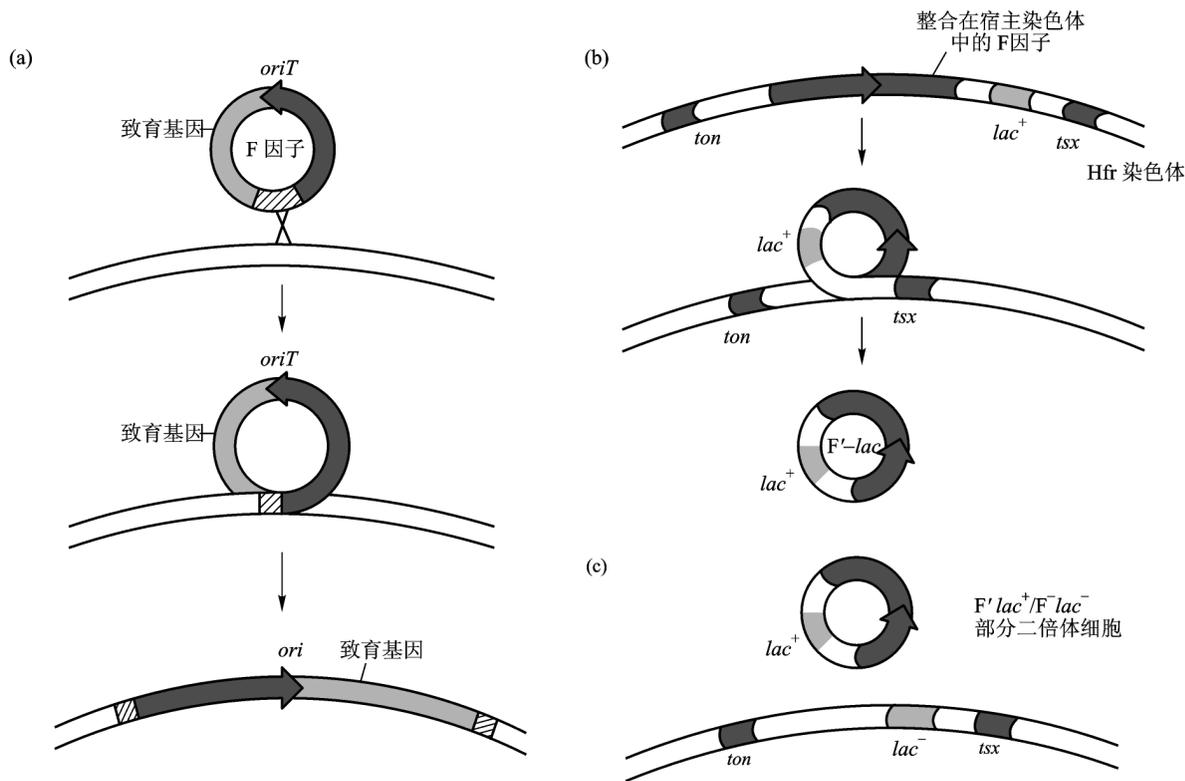


图 7-12 F' 因子的起源和部分二倍体的形成

(仿自 Griffiths 2005)

(a) F 因子通过交换整合到宿主染色体中 (b) F 因子不规则的剪切形成 F' 因子 (F' *lac⁺*) (c) F' *lac⁺* 转移到受体细胞 F⁻ *lac⁻* 后构成 F' *lac⁺* / F⁻ *lac⁻* 部分二倍体

分二倍体。这种利用 F' 因子将供体细胞的基因导入受体形成部分二倍体的过程称作性导 (sexduction 或 F'-duction)。

性导在大肠杆菌的遗传学分析中十分有用。这种部分二倍体如果不发生重组,那么① F' 因子自主复制,可在细菌细胞中延续下去。② 性导所形成的部分二倍体可用作不同突变型之间的互补测验,以确定这两个突变型是属于同一个基因或者是两个不同的基因。③ 观察由性导形成的杂合的部分二倍体中某一性状的表现,可以确定这一性状的等位基因中的显隐性关系。④ 不同的 F' 因子带有不同的细菌 DNA 片段,因此利用不同的 F' 因子性导可以测定不同基因在一起性导的频率来作图。部分二倍体中也会出现重组,即 F' 因子所带的供体细菌染色体同受体细菌染色体之间的同源重组,如果发生单交换,就导致 F' 整合形成 Hfr 品系,同时 F' 因子上所携带的基因发生重组;如果双交换,则形成 F' 品系,只是 F' 因子的细菌基因和受体染色体上的等位基因之间发生互换。

通过以上分析,可见在细菌中是由于一种核外遗传物质——F 因子存在与否而决定其“雌雄性别”,即有供体与受体之分;又根据该因子存在的状态不同而将细菌分为:① F⁻ 菌株:缺乏 F 因子。② F⁺ 菌株:具有游离的 F 因子。③ Hfr 菌株:F 因子整合到宿主染色体上。④ F' 菌株:带有部分宿主染色体的游离 F 因子。由此也决定了它们之间的接合性能和遗传重组的频率:① F⁺ × F⁺, 不能接合,因为相互排斥。② F⁻ × F⁻, 不能接合,因无 F 因子不能形成接合管。③ F⁺ × F⁻, 可接合并将受体 F⁻ 转化为 F⁺, 但为低频重组。④ Hfr × F⁻, 可接合,受体一般为 F⁻, 但为高频重组。⑤ F' × F⁻, 可接合,并将受体 F⁻ 转变为 F', 并对所携带的宿主基因是高频重组。

7.6 细菌的转化与转导作图

7.6.1 细菌的转化与作图

从细菌的培养物提取的 DNA 可以在体外转移到受体细菌中,这一过程称为转化(transformation)。显然,转化就是细菌细胞摄取周围游离的外源 DNA 片段,通过同源区段的交换而实现基因重组的过程。所以转化也是细菌传递 DNA 而实现基因重组的途径之一。自从 1944 年 Avery 等发现肺炎链球菌的转化作用后,在其他属的细菌中也发现有这种转化现象,说明在细菌中转化作用是一种十分普遍的现象。通常从一个供体菌株分离出来的 DNA 与另一受体菌株活细胞接触,大约只有 1% 的受体细菌细胞可吸收外源 DNA,并发生遗传转化。转化频率低的原因可能是:① 受体细菌细胞壁并非任何区域都允许外源 DNA 片段通过,而只是在特定区域形成临时性通道,因此将这一区域称为受体部位(receptor site),而在受体细胞表面这一部位的数目是有限的。② 外源 DNA 进入除受体部位允许通过外,还必须有酶或蛋白质分子以及能量等的协同作用。实验证明,利用某些影响酶的因素如阻碍蛋白质形成的氯霉素(chlramphenicol)和阻碍能量产生的二硝基苯(dinitrophenol)可抑制转化作用。显然外源 DNA 只能在酶促旺盛的受体部位进入。这种能接受外源 DNA 分子并被转化的细菌细胞称为感受态细胞(competence cell),而促进转化作用的酶或蛋白质分子称为感受态因子(competence factor)。

转化时供体细菌 DNA 断裂成小片段,其平均长度约为 20 000 bp,外源 DNA 片段进入受体后可以和受体染色体形成部分二倍体,有可能发生重组,从而使受体细胞发生稳定性的遗传转化。转化过程包括几个连续的阶段:① 双链 DNA 分子和细胞表面受体部位进行可逆性结合。② 供体 DNA 片段被吸入受体细胞,并要防止受体 DNA 酶的破坏。③ 供体 DNA 进入受体后,立即从双链 DNA 转变成单链 DNA,其中一条单链被降解。④ 未被降解的一条单链 DNA 部分地或整个地插入受体细胞的 DNA 链中,与同源区段形成杂合的 DNA 分子。⑤ 杂合 DNA 经复制、分离以后,形成一个受体亲代类型的 DNA 和一个供体与受体 DNA 结合的杂种双链 DNA,从而导致基因重组形成各种类型的转化子(transformant)(图 7-13)。

转化中的供体 DNA 片段往往可以携带若干个基因,这些连锁基因可以同时转化,当然同时转化的基因不一定是连锁的,因为两个不连锁的不同 DNA 片段有可能被同一个细菌细胞所吸收。但是可以区别这两个基因是连锁的还是独立遗传的,一个可靠的证据是观察 DNA 浓度降低时的转化频率的改变。如果 A 和 B 是连锁的,那么当 DNA 浓度下降时,AB 同时转化频率下降和 A 或 B 转化频率下降程度相同;如果 A 和 B 并不连锁,那么 AB 转化频率下降将远远超过 A 或 B 转化频率下降的程度,这是因为在较低浓度范围内,转化频率和转化 DNA 的浓度成正比关系。如两个基因在同一 DNA 分子上,那么浓度降低 10 倍时,两个基因同时转化的频率也将减少 10 倍;但是如果两个基因在不同的 DNA 片段上,那么 DNA 浓度下降 10 倍时,两个基因同时转化的概率将减少 100 倍,而不是 10 倍,由此可以确定 A 和 B 之间是否连锁。确定连锁关系后就可通过转化实验进一步作图。

Nester 等用枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)的一个菌株 $trp^+ his^+ tyr^+$ 作为供体,提取其 DNA 向受体 $trp^- his^- tyr^-$ 菌株进行转化,结果如表 7-4 所示。

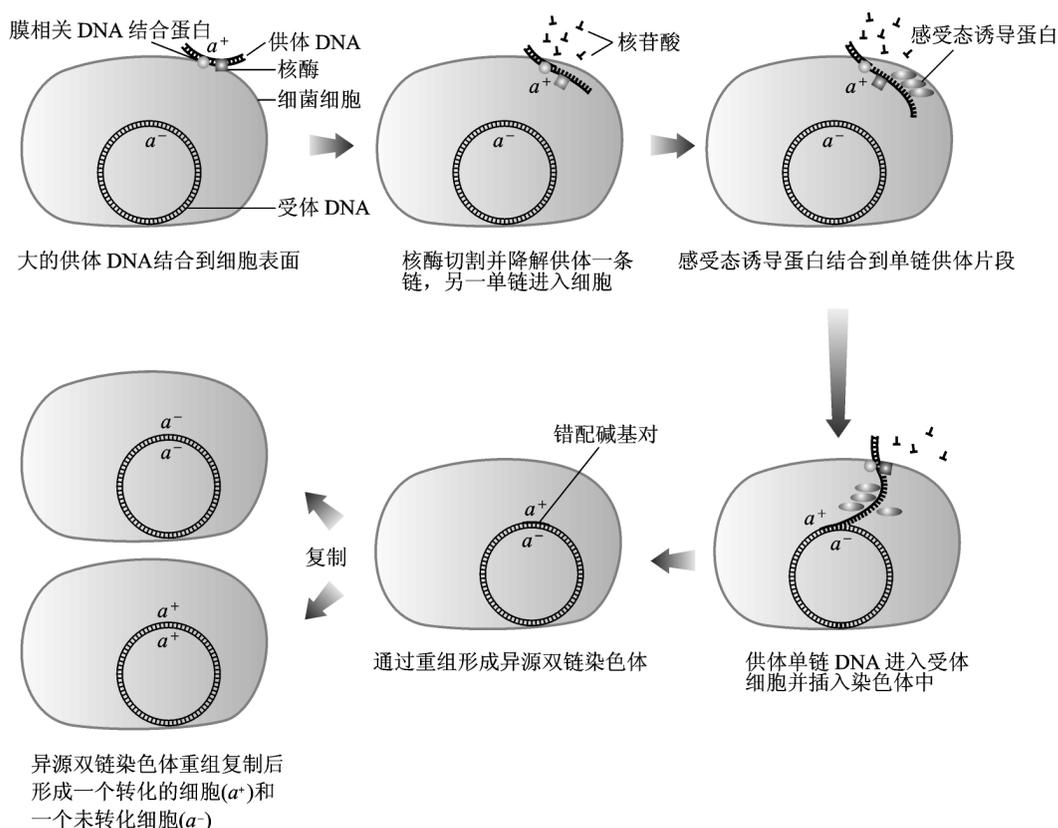


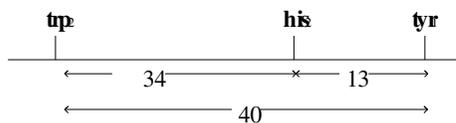
图 7-13 细菌转化的机制

表 7-4 $tp^+ his^+ tyr^+ \times tp^- his^- tyr^-$ 及其结果分析

基因	转化子类别						
tp	+	-	-	-	+	+	+
his	+	+	-	+	-	-	+
tyr	+	+	+	-	-	+	-
	11 940	3 660	685	418	2 600	107	1 180

基因间的重组	亲本型 (++)	重组型 (+-)和(-+)	重组值 (重组体数/总数)
$tp-his$	$11\ 940 + 1\ 180 = 13\ 120$	$2\ 600 + 107 + 3\ 660 + 418 = 6\ 785$	$6\ 785 / 19\ 905 = 0.34$
$tp-tyr$	$11\ 940 + 107 = 12\ 047$	$2\ 600 + 1\ 180 + 3\ 660 + 685 = 8\ 125$	$8\ 125 / 20\ 172 = 0.40$
$his-tyr$	$11\ 940 + 3\ 660 = 15\ 600$	$418 + 1\ 180 + 685 + 107 = 2\ 390$	$2\ 390 / 17\ 990 = 0.13$

从表 7-4 资料看出, 转化子中数目最多的是 3 个基因同时被转化的类型, 这说明所研究的 3 个基因在染色体上是紧密连锁的。由它们之间重组值计算结果表明, 3 个基因的次序是 $tp\ his\ tyr$ 。



同时还必须注意, 计算 tp 和 his 之间重组值时, 685 个 $tp^- his^-$ 是与供体 $tp^+ his^+$ 这两个基因

之间未发生交换的细胞数,因此不能统计在内。同理,计算 trp 和 tyr 之间重组值时不能统计 418 个 $trp^- tyr^-$, 计算 his 和 tyr 之间重组值时,则不能统计 2600 个 $his^- tyr^-$ 。转化时基因重组只发生在供体和受体的同源区域之间,同样不存在相反的重组子,而且只有双交换和偶数次的多交换才能形成重组子。

7.6.2 细菌的转导与作图

(1) 细菌转导的发现

为了验证在沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 中是否也存在类似于大肠杆菌中的接合现象, J. Lederberg 和 N. Zinder 进行了下列杂交试验:



结果发现:在基本培养基上以 10^{-5} 频率出现野生型菌株。这似乎和大肠杆菌中的接合重组情况相似,但是当他们两个亲本菌株分别置于“U”型管的两臂时,出乎意外地在 LT22 的一臂也出现了野生型细菌(图 7-14)。显然这种重组是不同于大肠杆菌中接合重组的,因为这种 U 型管的中间是用孔径小于 $0.1\mu m$ 的烧结玻璃滤板隔开的,只能允许 DNA 等大分子以及病毒通过,细菌细胞是不能通过的,所以这两种细菌不能直接接触。

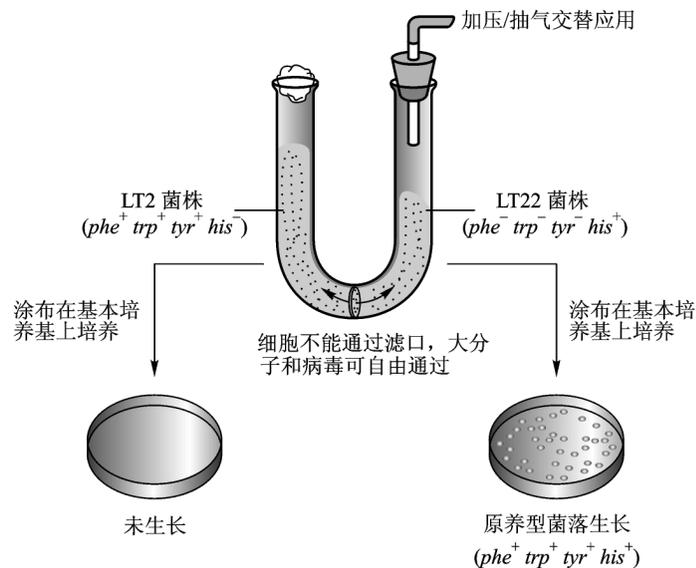


图 7-14 转导的 U 型管实验

在 U 型管两边分别培养两个营养缺陷型菌株,
结果在 LT22 的一臂出现了原养型菌落

进一步实验证明在两个菌株之间传递遗传物质的因子是沙门氏菌中的一种温和噬菌体 P22, 因为①滤板孔径允许某种因子通过, 因此称为过滤因子 (filterable agent), 而这种因子的大小和质量与 P22 相同。②免疫学试验证实这种因子可以被 P22 抗血清灭活。③如用 LT2 的菌株 P22 抗性品系来代替敏感的 LT2, 那么在“U”型管两端都不出现野生型重组体了。④进一步研究也证明 LT22 是携带了 P22 原噬菌体的溶源性细菌, LT22 是对 P22 敏感的非溶源性细菌。在培养过程中, 少数 LT22 细菌自溶释放出游离的 P22, 而这种游离的 P22 感染并裂解 LT22 细菌, 在裂解过程中, 宿主 LT22 环状染色体被裂解成小片段, 某些片段在 P22 噬菌体组装时, 偶尔装入头部, 形成转导噬菌体 (transducing phage)。由于噬菌体的吸附和注入 DNA 这两种功能取决于它的蛋白质外壳, 所以转导噬菌体能正常地吸附和注入 DNA, 于是这种转导噬菌体就将 LT22 的基因, 如 trp^+ 基因转入 LT22, 经

重组后,成为 tp^+ 转导子(transductant),由于它能在不含色氨酸的培养基上生长,所以很容易被检出。从以上实验结果可见,转导(transduction)就是以病毒作为载体将遗传信息从一个细菌细胞传递到另一个细菌细胞。转导又可分为普遍性转导和局限性转导。

(2) 普遍性转导与作图

P22噬菌体携带供体的染色体片段完全是随机的,也就是说,供体基因组中所有基因具有同等机会被转导形成部分二倍体,经交换和重组后,形成不同转导子。如在这一组合中,有些转导子表型为 tp^+ ,有些是 phe^+ ,还有一些是 tyr^+ ,而且各个标记基因转导频率大致相等,这种转导称为普遍性转导(general transduction)(图 7-15)。

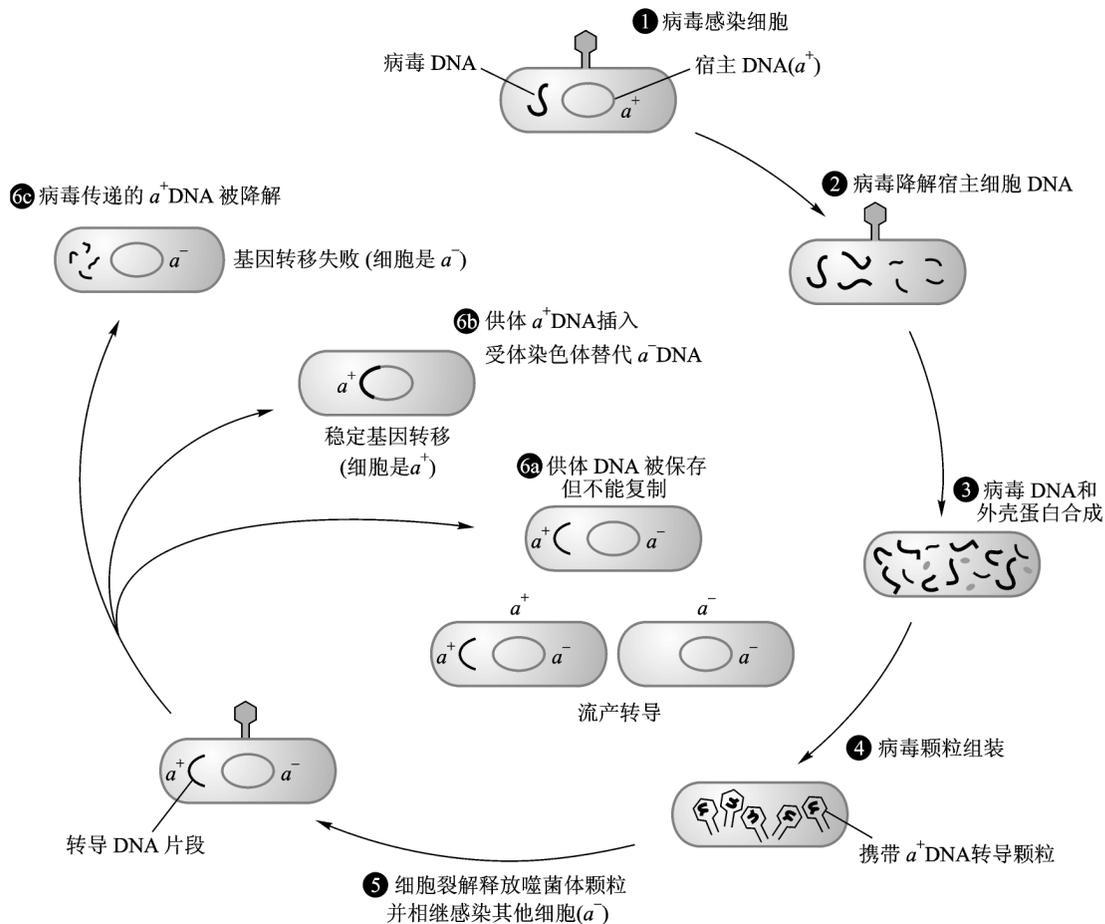


图 7-15 普遍性转导病毒颗粒的形成与受体细菌被转导的结果

普遍性转导频率很低,一般只有 0.3% 左右的噬菌体是转导噬菌体,因此尽管任何基因都有等价的转导机会,但是对每一个基因来说转导频率是有限的,如沙门氏菌染色体有 2 000~3 000 个基因,但是能装入噬菌体头部的 DNA 充其量只约为一噬菌体基因组大小,即沙门氏菌的 20~30 个基因,相当于沙门氏菌染色体的 1%。而在制备物中又只有 0.3% 左右的噬菌体颗粒是误装宿主 DNA,因此对任一基因的转导频率约为 $0.3\% \times 1\% = 3 \times 10^{-5}$ 。如果细菌的两个基因之间距离大于噬菌体的染色体长度,一般不能同时进行转导,除非携带不同基因的病毒颗粒同时感染同一细菌细胞,而这种频率仅为 $10^{-5} \times 10^{-5} = 10^{-10}$ 。所以如果两个基因始终是一起转导或同时转导频率较高,那么就足以证明这两个基因是连锁的。两个基因同时转导的现象称为共转导或称并发转导(co-transduction),两个基因共转导频率愈高,表明两个基因连锁愈紧密,相反,共转导频率愈低,则表明这两个基因距离愈远。正是利用这一原理,转导曾广泛地应用于细菌染色体基因作图。

如作双因子转导 (*two factor transduction*) 实验就是每次观察两个基因的转导, 通过每两个基因之间的共转导频率就可以确定这些基因在染色体上的排列顺序。若要分析 3 个基因则需做 3 次双因子转导实验, 才能确定这 3 个基因的次序。假定这 3 次实验结果为: ① a 基因和 b 基因共转导频率高。② a 和 c 基因的共转导频率也高。③ b 和 c 基因的共转导频率很低, 那么这 3 个基因的次序就应为 b、a、c。

如同时观察三因子转导 (*three factor transduction*) 分析, 则只做一次实验就可推出 3 个基因的次序。如 P1 先在大肠杆菌 $\text{thr}^+ \text{leu}^+ \text{azi}^s$ 供体菌株中生长, P1 的后代再感染 $\text{thr}^- \text{leu}^- \text{azi}^r$ 受体菌株, 然后将受体细胞接种到不含苏氨酸的选择培养基上对 thr^+ 进行选择, 凡具 thr^+ 的细胞都可以在这种培养基上生长, 然后再将这些被选择的受体细胞接种到其他选择培养基上, 检查共转导的频率, 结果在选出的 thr^+ 重组子中只有 3% 同时也是 leu^+ , 但没有一个同时是 azi^r 。如选择 leu^+ 重组子, 则约有 50% 同时也是 azi^r , 因此 thr^+ 与 azi^r 距离较远, 而 leu^+ 与 azi^r 距离较近, 由此推出它们的排列次序是 $\text{thr}^+ \text{leu}^+ \text{azi}^r$ 。同时在 thr^+ 转导噬菌体中也只有 3% 同时是 leu^+ , 表明这两个基因距离也很远, 所以很少同时包含在一个 P1 头部的 DNA 片段之中。

通过三因子转导可以得到不同类型的转导子及其频率, 显然频率最低的一类转导子是最难于转导的, 因为它的产生需要同时发生的交换次数最多。这种转导子的 3 个基因中, 两边的应为供体基因, 中间的为受体基因。例如, 大肠杆菌 $\text{trpA}^+ \text{supC}^+ \text{pyrF}^+$ 细胞作供体, $\text{trpA}^- \text{supC}^- \text{pyrF}^-$ 作为受体, 由 P1 噬菌体作为载体进行转导。这里 trpA 代表色氨酸 (*tryptophan*) 合成的基因, supC 代表赭石突变抑制基因 (*ochre suppressor gene*), pyrF 代表嘧啶 (*pyrimidine*) 生物合成的基因。最初选择的是 supC^+ 转导子, 然后检查 supC^+ 转导子中其他两个基因被转导的情况, 得到的转导子类型和数目如下:

(1)	supC^+	trpA^+	pyrF^+	36
(2)	supC^+	trpA^+	pyrF^-	114
(3)	supC^+	trpA^-	pyrF^+	0
(4)	supC^+	trpA^-	pyrF^-	453
				603

第三类基因型转导子频率为 0, 由此可见 3 个基因的次序是 $\text{supC} \text{trpA} \text{pyrF}$, 因为这类重组子必须同时发生 4 次交换才能产生 [图 7-16 d]。

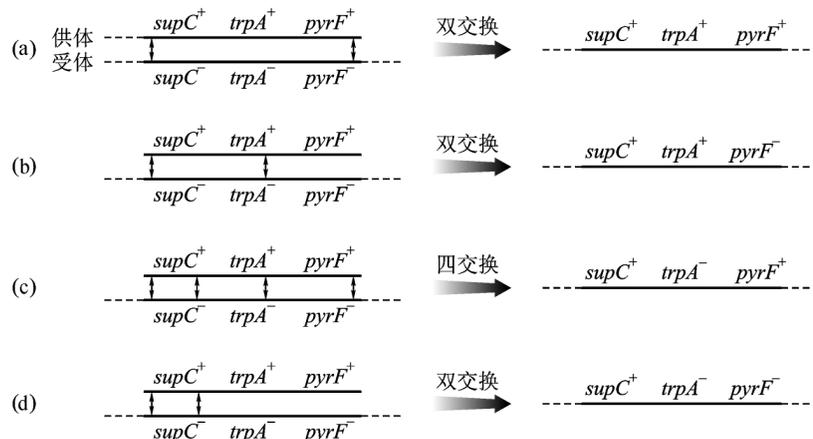


图 7-16 转导噬菌体与受体染色体之间重组
四交换形成转导子频率最低

从图 7-16 可见:① 第三类基因型的转导子是很难发生的,由此类转导子基因型可以看出这 3 个基因排列次序是 supC tpA pyrF 。② supC^+ 和 tpA^+ 在第一、二类转导子中是共转导,而在第三、四类转导子中不是共转导,所以这两个基因共转导频率为 $(36+114)/603=0.25$ 。③ supC^+ 和 pyrF^+ 仅在第一类转导子中共转导,所以共转导频率为 $36/603=0.06$ 。如果两个基因紧密连锁,它们就有可能经常在一起转导,共转导频率将接近于 1。如果两个基因从未或者几乎未包含在同一转导的 DNA 片段中,那么它们的共转导频率接近于或等于 0。利用这种关系可以求出同一染色体上两个基因之间的物理距离。经过一系列推导得到以下的计算公式:

$$d = L(1 - x)$$

式中: d ——同一染色体上两个基因之间的图距

L ——转导 DNA 的平均长度(约为一个噬菌体基因组大小)

x ——两个基因共转导的频率

利用转导作图也和转化作图一样,最好在中断杂交基础上进一步精确定位,而且只是对局部基因定位有效。

普遍性转导中,在基本培养基上除了出现正常菌落外,还有大量小菌落,这两者之比大约 1:10,这一现象称为流产转导(*abortive transduction*) (图 7-15^{6a})。这是因为转导噬菌体虽然将供体野生型基因导入受体,但是只有 10% 可以重组入受体染色体中形成完全转导(*complete transduction*),即在基本培养基上形成正常的菌落(图 7-15^{6b})。而 90% 的供体野生型基因并未重组入受体染色体中,因而也不能复制,当这些细胞分裂时,只有一个细胞得到这一基因,这一过程一再发生,供体这一野生型基因便一直沿着单个细胞传递下去,这称为单线遗传(*single line inheritance*)。凡是没有得到供体这一基因的细胞不能合成相应的酶,但仍含有母细胞残留的酶,可供这些细胞继续分裂一两次,所有的这些细胞将形成小菌落,称为流产转导型(*abortive transductant*)。此外,病毒转入含 a^+ 基因的 DNA 被降解,基因转移失败,因而受体细胞仍为 a^- (图 7-15^{6c})。

(3) 局限性转导与作图

除了宿主 DNA 片段随机地被包装进噬菌体头部蛋白质外壳中而导致的普遍性转导外,还有一种局限性的转导,这类噬菌体只能转导供体基因组中的特定基因。如温和噬菌体 λ 也是一种附加体,既可以自主状态存在,也可整合到细菌染色体中,而且是整合于宿主染色体特定的附着位点 attB 处而形成原噬菌体。它一边是半乳糖操纵子 gal 基因,另一边是生物素合成基因 bio 。原噬菌体离开细菌染色体时偶尔形成某些细菌基因和噬菌体基因连在一起的 DNA 片段。这种混杂的 DNA 片段由噬菌体外壳包装,就形成了局限性转导颗粒。通过这种颗粒可将细菌的基因由供体细胞转移至受体细胞,只是这种转导仅限于靠近原噬菌体附近的基因,如 λ 噬菌体专门转导大肠杆菌的 gal 或 bio 基因,所以称为局限性转导(*restricted transduction*)。

在局限性转导颗粒中,被包装的 DNA 总长度同样也与噬菌体基因组长度相当,否则就难以包进噬菌体的头部外壳中,那么在局限性转导颗粒中既然加进一段细菌的 DNA,必然要减少相应长度的一段噬菌体自身的 DNA。所以这种转导噬菌体是有缺陷(*defective*)的,因此用 λdgaI 或 λdbio 表示。这种有缺陷的 λ 噬菌体转导后, gal^+ 菌株在裂解时也不产生成熟的 λ 颗粒,而且局限性转导噬菌体发生概率很低,故用这种噬菌体群体感染非溶源性的 gal^- 的受体细胞后,转导子出现的频率只有 10^{-6} ,所以称低频转导(*low frequency transduction, LFT*)。

值得注意的是转导子形成过程不像转化和普遍性转导那样是供体基因置换受体基因,而是 λdgaI^+ DNA 进入受体后,通过特定位点配对、交换,然后 λdgaI^+ DNA 整个地插入配对的位置,于是形成 $\text{gal}^+ / \text{gal}^-$ 转导子。而且转导子形成后,正常的 λ 在大肠杆菌中的附着位点 (attB) 并未被占据, attB 位点通常被与 λdgaI^+ 同时进入的正常 λ 所插入。这样形成的转导子多数噬菌体基因带有两份,

少数细菌基因如 gal 也带有两份, 即 gal^+ / gal^- , 因为 gal^+ 对 gal^- 为显性, 所以这种细胞都能发酵半乳糖。但是曾发现约有 $2/3$ 是不稳定的, 会以 10^{-3} 的概率分离出 gal^- 细胞, 也就是说转导子会以 10^{-3} 的概率丢失转导噬菌体导入的基因。如用紫外线诱导 gal^+ / gal^- 细胞裂解, 所产生的溶菌产物将包含约一半正常的噬菌体和一半 $\lambda dgal^+$ 转导噬菌体。这样的溶菌产物进行转导频率较高, 故称高频转导 (high frequency transduction, HFT)。因为这种溶菌产物中既有大量的细菌 gal^+ 基因, 又包含正常的 λ 噬菌体, 正常的 λ 起了辅助缺陷型噬菌体成熟的作用, 所以称为辅助噬菌体 (helper phage), 从而提高了转导频率 (图 7-17)。

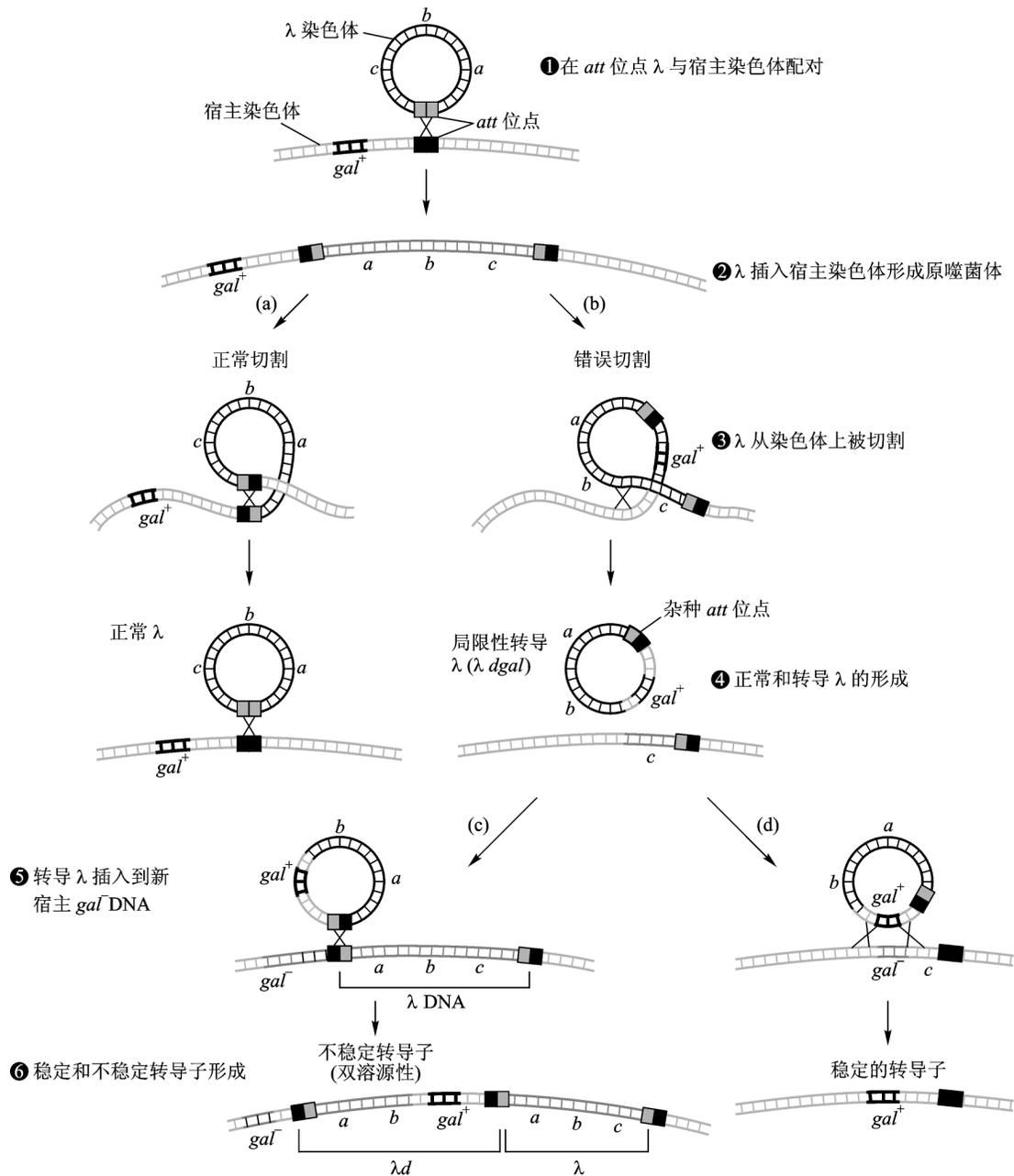


图 7-17 λ 噬菌体局限性转导机制

(a) λ 从 *E. coli* 染色体上正常切割 (b) λ 错误切割形成特异性转导颗粒

(c) 不稳定转导子形成 (d) 稳定的转导子形成

7.7 细菌同源重组的机制

7.7.1 细菌同源重组的特点

细菌的转化、接合和转导重组都是同源重组(homologous recombination),但不同于真核生物中的同源重组是涉及两个完整的线状双螺旋 DNA 分子或两个环状 DNA 分子之间的重组,而细菌中的重组是发生在一个完整的环状双螺旋 DNA 分子与一个单链或双链 DNA 分子片段之间,而且没有相对应的重组子。如细菌的转化是供体 DNA 片段进入受体细胞后,双链 DNA 解链,只有一条链进入受体细胞和受体染色体发生重组,另一条链被分解掉,因此重组是发生在单链 DNA 片段和完整的双链 DNA 之间。供体单链与受体 DNA 之间结合形成一段异源双链区。如果两者序列不完全一致,则会产生错配核苷酸对,所以转化过程的最后结果取决于错配核苷酸对的修复校正。如果校正时被切除的是异源双链区中的属原供体单链的核苷酸,那么就无重组发生;如果无修复校正作用发生,则该细菌经 DNA 复制和细菌分裂后产生的两个细胞中,一个具有受体的基因型,另一个具有重组体的基因型。但是由于转化试验中所采用的选择条件一般只是允许重组体细胞生长,因此在无校正作用时产生的菌落中绝大多数细胞为重组体。有些遗传标记在转化中或是很少发生校正作用,或是校正切除几乎总是在受体 DNA 上,因此转化频率较高,这类遗传标记称为高效率标记(high efficiency marked)。而另一些遗传标记在转化中的校正切除总是倾向于发生在供体单链上,因而表现出很低的转化频率,这类标记称为低效率标记(low efficiency marked)。如果一旦细胞内的错配核苷酸修复校正功能失活,形成修复校正缺陷型突变体,以这种突变体为受体进行转化实验,所有供体遗传标记的转化效率都很高,于是低效率标记转化为高效率标记。

大肠杆菌的接合重组是在 Hfr 细胞与 F⁻ 细胞之间进行,前者为供体,后者为受体。接合时 DNA 重组的机制类似转化,但过程更为复杂。这是因为 Hfr 供体的单链一般比转化时的供体 DNA 单链长得多。若全部 DNA 进入受体细胞,那么就可以同时和整个受体 DNA 配对并发生重组,但实际上往往只有一部分供体 DNA 能进入受体,而进入的部分也有一部分被结合到异源双链中去。

至于细菌的转导重组则不同于转化与接合重组机制。无论是普遍性转导还是局限性转导的遗传重组都是在双链 DNA 片段和完整 DNA 分子之间发生,转导 DNA 以双链形式被注入受体细胞,然后以双链形式结合进受体染色体中。这一过程很可能如同两个完整 DNA 分子重组那样。开始是局部单链侵入和取代,然后两条链都被牵扯进去,但是要完成重组需要进行两次双链交换。

7.7.2 细菌同源重组的分子基础

(1) RecBCD 识别 chi 序列引发重组

揭示参与 DNA 序列之间交换事件的本质首先是在细菌中被阐明的。在这里,识别反应是重组机制不可缺少的一部分,并且涉及 DNA 分子的有限区域而不是细菌完整的染色体,但分子事件总体顺序是相似的:断裂分子的一条单链或含单链区的双链与对应双链 DNA 分子相互作用;配对区域延伸;核酸内切酶解离偶合双链体。通过细菌不能进行同源重组的突变型 rec⁻ 研究,已发现 10~20 个相关的基因和重组每一阶段所需的酶。

细菌一般不交换大量的双链 DNA 分子,但可通过不同途径引起重组。在一些情况下可以产生含游离 3' 端单链 DNA,如:① 细菌在接合过程中转移单链。② 辐射损伤所产生的单链缺口。③ 噬菌体以滚环形式复制时产生的单链尾端等。但是,如在两条双链 DNA 分子的情况下,就像真核生物中减数分裂时期重组一样,这时必须有单链区域和 3' 端的存在。在 λ 噬菌体突变型中证实存在重组

热点,由此发现了一种产生合适末端的机制。该位点称为 *chi*位点,由于它的一个碱基对发生了突变,从而能引发重组,并使人们进一步得知其他蛋白质在重组中的作用。这些位点都含有一段长度为 8 bp 的非对称序列:



在大肠杆菌 DNA 中, *chi*位点每隔 5~10 kb 会出现 1 次。而在野生型的 λ 噬菌体 DNA 中和其他遗传元件中不存在 *chi*位点,这表明 *chi*位点不是重组所必需的。但证明 *chi*位点可促进它附近 10 kb 以内区域发生重组。*chi*位点可被特定方向上相距几个 kb 处断裂双链激活。对于取向的依赖表明重组复合物必须与 DNA 在断裂端结合,所以只能沿双链体的一个方向移动。

*chi*位点是基因 *recBCD* 编码的一种酶识别的位点,该酶复合体有多重活性:① 是一种能有效的降解 DNA 的核酸酶,最初是作为核酸外切酶 V 被鉴定的。② 具有解旋酶活性,在单链结合蛋白 (*single strand binding protein, SSB*) 存在的条件下使双链 DNA 解螺旋。③ 还具有 ATP 酶活性。该酶在重组中的作用可能是提供一条含游离 3' 端的单链区域(图 7-18)。

从图 7-18 可见:① 当 *RecBCD* 结合到 *chi*位点右侧 DNA 时,它就沿 DNA 移动,并使之解链,降解释放含 3' 端的单链。② 当它到达 *chi*位点时,暂停并在距 *chi*位点右侧 4~6 个碱基处切开 DNA 的上链,于是上面这条链就以单链形式被识别。③ 在识别 *chi*位点之后,它使 *RecD* 亚基解离或失活,从而该复合体酶就丧失核酸酶活性。④ *RecBC* 只保留解旋酶活性,继续起着解旋作用。

(2) *RecA* 催化单链同化

大肠杆菌中的 *RecA* 蛋白是第一个被发现的 DNA 链转移蛋白,它具有两个截然不同的活性:① 有促进 SOS 反应中的蛋白酶活性。② 促进 DNA 的单链与双链 DNA 分子中的互补链之间进行碱基配对。这两种活性都要求 ATP 和单链 DNA 存在。*RecA* 可使一条 DNA 单链置换一条双链 DNA 分子中同源链的反应称为单链同化 (*single strand uptake or assimilation*)。该置换反应可以发生在几种不同构型 (*configuration*) 的 DNA 分子之间,并需要 3 个一般性条件:① 其中一个 DNA 分子必须有单链区域。② 其中有一个 DNA 分子必须有游离的 3' 端。③ 该单链区域和 3' 端必须位于这两个分子的互补区域中。

当一条线性单链或环形单链入侵一条双链 DNA 分子时,它会置换双链中与它互补的链,随后供体分子或受体分子转变成环状分子是最容易发生的反应,这个反应是沿着链从 5' 端向 3' 端进行的,链的对应部分被置换,显然参与交换的链中必须有一条含有游离 3' 端(图 7-19)。

单链同化与重组的起始是相关的。所有模型都需要设计一个中间体,它使一条或两条单链从一个双链交叉到另一条双链,*RecA* 可催化这个阶段的反应。在细菌中,*RecA* 作用于 *RecBCD* 所产生的底物,而 *RecBCD* 介导的解链和切割可以产生起始异源双链分子连接点形成的末端,*RecBCD* 在 *chi*位点切开释放出 3' 端,*RecA* 携带含此 3' 端的单链并使它与同源的双链 DNA 序列作用,于是就形

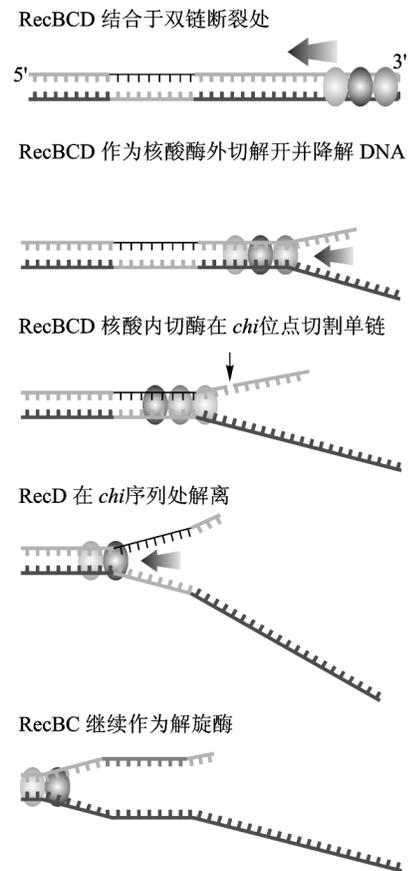


图 7-18 *RecBCD* 核酸酶识别 *chi* 序列引发重组

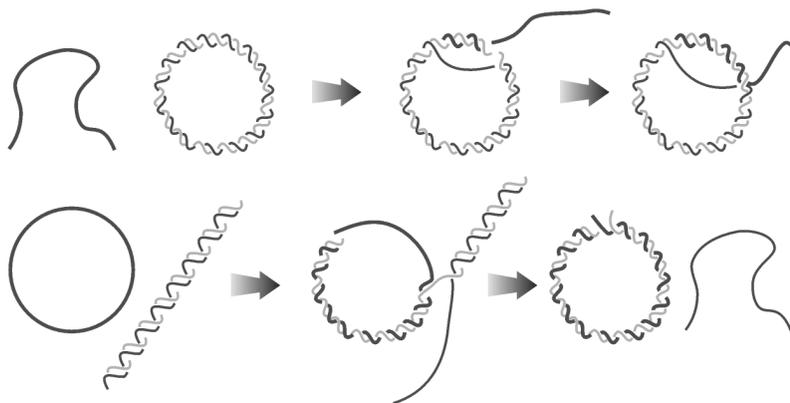


图 7-19 RecA 催化单链同化

成了联合分子。

RecA 能与单链或双链 DNA 聚集成一个长的丝状结构,真核生物中 RecA 的同源物不形成微丝,所以它们的作用机制可能不同。细菌中这种微丝的每圈含 6 个 RecA 单体。微丝为螺旋结构,它的深沟可包含 DNA,而每个 RecA 单体结合 3 个核苷酸或碱基对。此 DNA 形式相对于双链 B 型 DNA 而言被拉伸了 1.5 倍,每圈为 18.6 个核苷酸或碱基对。当双链 DNA 分子与其结合时,通过小沟与 RecA 紧密接触,使大沟可与第二个 DNA 分子反应。

两个 DNA 分子之间的相互作用发生在这些微丝中,当一条单链被同化侵入一条双链 DNA 分子时,首先是 RecA 在微丝结构内与单链结合,然后双链 DNA 也结合上去而形成一种三股链样的结构。在此系统中,联会是在链交换以前发生的,因为不存在游离末端也能进行配对。但 3 端对于链的交换是必需的,此反应发生在微丝结构内,RecA 继续与原来的单链结合,在反应结束时,RecA 就结合在双链 DNA 分子上了。反应中大量 ATP 被水解,ATP 可能通过变构效应影响 RecA 的构象,当 RecA 与 ATP 结合时,它的 DNA 结合位点与 DNA 有很高的亲和力,这对于结合 DNA 和配对反应是必需的。ATP 水解降低了结合位点的亲和力,这有利于释放异源双链 DNA 分子。

RecA 所催化的单链与双链 DNA 之间的反应可分为 3 个阶段:① 缓慢的联会前阶段,这时 RecA 结合在单链 DNA 上。② 单链 DNA 与双链 DNA 分子中的互补链迅速配对,形成一个异源双链 DNA 分子连接点。③ 双链 DNA 中的一条链缓慢地被置换,产生一段长的异源双链 DNA 区段。SSB 的存在促进了这个反应,它保证了底物不会出现二级结构。目前尚不知 SSB 是如何与 RecA 一起作用在同一段 DNA 上的。RecA 与 SSB 一样都是按照一定比例与 DNA 结合,表明 RecA 在链同化中的作用就是共同与 DNA 结合,从而产生丝状体结构。

当单链分子与双链 DNA 分子相互作用时,该双链 DNA 分子在重组连接点区解螺旋,异源双链 DNA 的起始区域可能不采取传统的双螺旋结构形式,是由两条并排联系在一起的链组成,此区域称为平行接点(paranemic join),此平行接点是不稳定的,在随后的反应中要求这种结构转变为双螺旋形式,这一反应相当于消除负超螺旋,有可能需要一种酶的作用产生暂时的断裂使链可以相互环绕以解决解旋或是重新螺旋的问题。

以上只是讨论了单链侵入双链 DNA 分子的重组事件,实际上两条双链 DNA 分子也可以在 RecA 引发下相互作用,只是要求其中一条含有一段至少为 50 个碱基的单链区。该单链区可以是线性分子的尾巴或是环状分子的缺口。例如发生在局部双链 DNA 分子和完整双链 DNA 分子之间的相互作用也可导致交换。反应从线性分子一端开始同化,入侵的单链置换双链 DNA 中的同源部分。但是,当反应到达两个分子都是双链的区域时,入侵链从它的互补链上解离下来,互补链再与被置换链配对,这个阶段的分子结构与 Holliday 重组接点相似。体外实验也证明,RecA 可以引发 Holliday 连接点,说明该酶可以催化互补链发生分支迁移。关于 RecA 结合 4 条链所形成的中间体的几何结构

目前尚不完全清楚,但至少可以推测两条双链 DNA 分子是以交换反应中相同的方式并行排列的(图 7-20)。

(3) Ruv 系统解离 Holliday 连接点

同源重组中最关键的一步是解开 Holliday 连接点,以完成 DNA 分子间链交换的过程。稳定和解开 Holliday 连接点的蛋白质已被鉴定是大肠杆菌中 *ruv* 基因的产物: RuvA, RuvB 和 RuvC。RuvA 和 RuvB 可增加异源双链 DNA 分子结构的形成。RuvA 识别 Holliday 连接点的结构,它在交换点处与所有 4 条链结合,形成两个四聚体将 DNA 夹在中间。RuvB 是一个六聚体的解旋酶,有 ATP 酶的活性,为分支迁移提供动力。RuvB 的六聚体环状结构结合在每条双链 DNA 分子交换点的上游(图 7-21)。

RuvAB 复合体使分支以 $10 \sim 20 \text{ bp/s}$ 的速度迁移,另一个解旋酶 RecG 也有相似的活性, RuvAB 将 RecA 从 DNA 上置换下来,而且 RuvAB 和 RecG 的活性都可以作用于 Holliday 连接点,如果两者都发生突变,那么大肠杆菌就完全丧失了重组能力。RuvC 是一个核酸内切酶,它能专一性识别 Holliday 连接点。在体外它能切开这种连接点,解开重组中间体。RuvC 的作用热点是一个四核苷酸(ATTG)的不对称序列,这样就可以指导究竟哪一条链被切开,这决定了其结果是补丁重组形式(只留下一般异源双链 DNA 序列,标记两侧未发生重组)还是剪接重组(标记两侧之间发生重组)。

在细菌中遗传重组与 DNA 损伤修复相关,而且重组过程涉及各种不同的蛋白质,并以重组来修

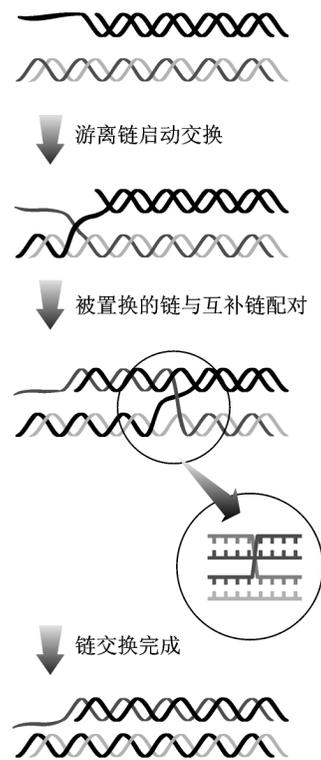


图 7-20 RecA 介导的 DNA 链交换产生一个类似的中间体结构

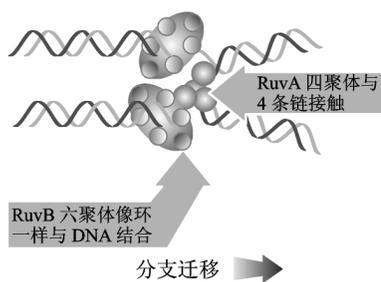


图 7-21 RuvAB 催化分支迁移

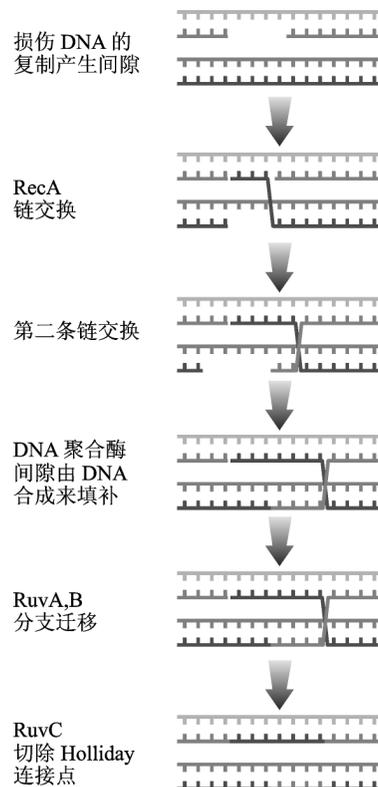


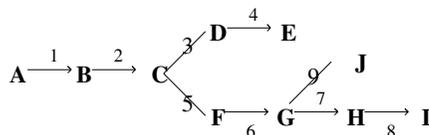
图 7-22 细菌的酶催化重组的过程

复缺口,用另一条双链 DNA 的物质来填补这条双链 DNA 分子上的缺口间隙(图 7-22)。由于细菌重组常常涉及 DNA 片段与整条染色体之间的相互作用,这种修复反应能被 DNA 损伤引发,同时该过程与减数分裂中基因组间的重组不完全相同,因而这些结论还不能完全运用到真核生物中去。尽管如此,两者相似的分子活动发生在处理 DNA 的过程之中,如酵母中 *DMC1* 和 *rads1* 编码与 *RecA* 有关的蛋白质,这些基因突变积累了双链断裂,以致不能正常形成联会复合体,表明染色体的联会与细菌链的同化反应有关。此外,在酵母和哺乳动物中也存在一种解离酶(*resolvase*)。酿酒酵母中的 *mus81* 突变型不能发生重组,而 *Mus81* 蛋白是核酸内切酶的一个组成成分,该酶能将 Holliday 连接点解离为双链 DNA 分子结构。因而解离酶在减数分裂和停滞的复制叉的重新起始的过程中都具有重要的作用。

思考题

1. 用一个来源于一种不能合成异亮氨酸的细菌菌株(*ile⁻*)的噬菌体转导一个不能合成甲硫氨酸的细菌菌株(*met⁻*)。将接合用的肉汤培养基稀释后涂布在补充有异亮氨酸的基本培养基上。另取相同量的稀释肉汤培养基涂布在基本培养基上。基本培养基上长出 18 个菌落,含有异亮氨酸的基本培养基上长出 360 个菌落。计算标准化的重组比例。

2. 下面表示的是一个假设的受到反馈抑制的生物合成途径,字母代表代谢物,数字代表酶。找出最可能受到反馈抑制支配的酶及其抑制剂。注意:抑制剂可能包含一个或多个代谢物。



3. 基因型为 *gal⁻ thr⁻ azi^r hc⁻ ton^r mal⁻ xyl⁻ ku⁻* 的链霉素抗性(*str^r*) *F⁻* 菌株跟具有与前者相反性状的原养型 *Hfr* 菌株杂交。在接合 60 min 后,将样品转移到含有链霉素的基本培养基上。原来的混合物中有 2×10^7 个 *Hfr* 和 4×10^8 个 *F⁻*。*Hfr* 基因的转移百分数分别是 72% *ton^r*, 0% *mal⁻*, 27% *gal⁻*, 91% *azi^r*, 0% *xyl⁻*, 48% *hc⁻*。

(a) 原来的混合物中,对于每一个 *Hfr* 细胞,存在多少个 *F⁻* 细胞?

(b) 为了防止 *Hfr* 个体掩盖重组子的检出,应使用什么反选择剂?

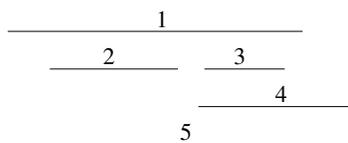
(c) *Hfr* 菌株转移这些基因最可能的转移顺序是什么?

4. 已知 4 个 *E. coli* *Hfr* 菌株可以在接合过程中以不同的顺序转移它们的遗传物质。已知遗传标记进入 *F⁻* 受体的时间,构建一个包括所有这些标记的遗传图,并在相邻的基因对之间表示出时间距离。

菌株 1	标记:	arg	—	thy	—	met	—	thr				
	时间(min):	15		21		32		48				
菌株 2	标记:	mal	—	met	—	thi	—	thr	—	tyr		
	时间(min):	10		17		22		33		57		
菌株 3	标记:	phe	—	his	—	bio	—	azi	—	thr	—	thi
	时间(min):	6		11		33		48		49		60
菌株 4	标记:	his	—	phe	—	arg	—	mal				
	时间(min):	18		23		35		45				

5. 已知位于 *tp* 基因座上的两个突变体 *tpA⁻* 和 *tpB⁻* 靠近半胱氨酸基因座(*cys*)。一个基因型为 *cys⁺ tpA⁻* 的细菌菌株被来源于细菌菌株 *cys⁻ tpB⁻* 的噬菌体转导。同时做反交,即基因型为 *cys⁻ tpB⁻* 的菌株被来源于细菌菌株 *cys⁺ tpA⁻* 的噬菌体转导。两种情况产生的原养型重组子的数目相同。确定色氨酸突变体相对半胱氨酸基因标记的顺序。

6. 测验 5 个点突变(*a⁻ e*)与下面拓扑图表示的 5 个缺失杂交产生野生型重组子情况(+ = 重组, 0 = 没有重组)。结果列在表格中。确定点突变的顺序。



	缺失				
	1	2	3	4	5
a	0	0	+	+	+
b	+	+	+	0	+
c	0	0	+	+	0
d	0	+	0	0	0
e	0	+	0	0	+

7. 某科学家应用转化技术,在不同的枯草芽孢杆菌菌株间做大量的杂交实验,下面的资料是受体菌不能合成组氨酸(基因型表示为 his^- ,但对突变基因 ant^+ , trp^+ , ind^+ 来说是野生型。3个供体菌分别带有其中的一个。实验所得到的供体和受体都是野生型转化子的记录如下:

供体	受体	野生型转化子(++)频率
ant^+	$+ his^-$	0 450
trp^+	$+ his^-$	0 190
ind^+	$+ his^-$	0 263

作出 4个基因的连锁图。

8. 现有 5个 Hfr品系 DNA转移到 F⁻细菌中去的基因顺序如下:

Hfr品系	转移顺序
1	← <u>BKARM</u>
2	← <u>DLQEOC</u>
3	← <u>OEQLDN</u>
4	← <u>MCOEQLDN</u>
5	← <u>RAKBN</u>

(a) 画出这些基因在染色体图上的顺序。

(b) 标明每个 Hfr品系的转移方向及所包括的基因。

9. 一个非溶源性菌株带 a^+ 和 b^+ 基因受到噬菌体的感染,然后用新的噬菌体感染一带 ab 的溶源性细菌菌株,实验结果如下: $8ab^+$ 和 $7a^+ b$ 585 $a^+ b^+$,问 a 和 b 连锁吗? 如果连锁,计算 a 和 b 的连锁强度(即图距)。

10. 在接合试验中,有 $Hfr a^+ b^+ str^s \times F^- a^- b^- str^r$,已知 a 和 b 基因控制营养需要,先将杂交菌株接在有链霉素的完全培养基上生长,然后在不同的培养基上测试 100个菌落,结果如下:① 添加 a 物质,得 40个菌落。② 添加 b 物质,得 20个菌落。③ 基本培养基得 10个菌落。分别写出这 3种菌落的基因型,基因 a 和 b 之间的重组率是多少?

11. 在一般性转导中,供体大肠杆菌细胞的基因型是 $tpc^+ pyf^- tpa^-$,受体细胞的基因型为 $tpc^- pyf^+ tpa^+$ 。由 P1噬菌体媒介转导,对 tpc^+ 进行选择,用选择的细胞进一步检查其他基因的转导情况,得到以下的结果:

基因型	后代数目
$tpc^+ pyf^- tpa^-$	279
$tpc^+ pyf^+ tpa^-$	279
$tpc^+ pyf^- tpa^+$	2
$tpc^+ pyf^+ tpa^+$	46

(a) 决定这 3个基因的次序。

(b) 计算 tpc 和 pyf 以及 tpc 和 tpa 的共转导频率。

(c) 假定 P1染色体长 10 cM,计算这些基因之间的物理图距。

12. 大肠杆菌 $Hfr gal^+ hc^+$ (A)与 $F^- gal^- hc^-$ (B)杂交,A向 B转移 gal^+ 比较早而且频率高,但是转移 hc^+ 迟而且效率低。菌株 B的 gal^+ 重组子仍旧是 F^- 。从菌株 A可以分离出一个突变体称为菌株 C,菌株 C向 B转移 hc^+ 早而且频率高,但不转移 gal^+ 。在 C×B的杂交中,B菌株的 gal^+ 重组子一般是 F^- 。问菌株 C的性质是什么? 试设计一个实验分离这个菌株。

13. 由一个野生型菌株抽提 DNA, 用来转化一个基因型为 $tp^- his^- tyr^-$ 的突变型菌株。不同类型的转化子的菌落数目如下:

$tp^- his^- tyr^+$	685	$tp^- his^+ tyr^-$	418
$tp^- his^+ tyr^+$	3 660	$tp^+ his^- tyr^-$	2 660
$tp^+ his^- tyr^+$	107	$tp^+ his^+ tyr^-$	1 180
$tp^+ his^+ tyr^+$	11 940		

- (a) 3个基因间的连锁距离是多少?
 (b) 它们的连锁次序如何?