

第七章 细菌及病毒的遗传作图

第一节 细菌和病毒遗传研究的意义

第二节 细菌基因重组

第三节 噬菌体的基因重组

一、转化 (transformation)

(一)、发现：1928年，F. Griffith

(二)、定义

某种基因型的细胞从周围介质中吸收来自另一基因型细胞的DNA片段，而使自身的基因型和表现型发生相应改变的现象。

(三)、转化过程

*(四)共同转化与遗传图谱绘制



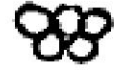
无毒 R II 型



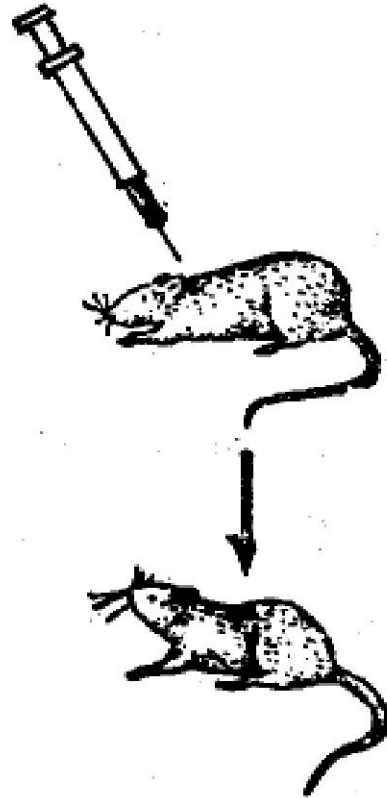
有毒 S III 型
但加热杀死



R II 型



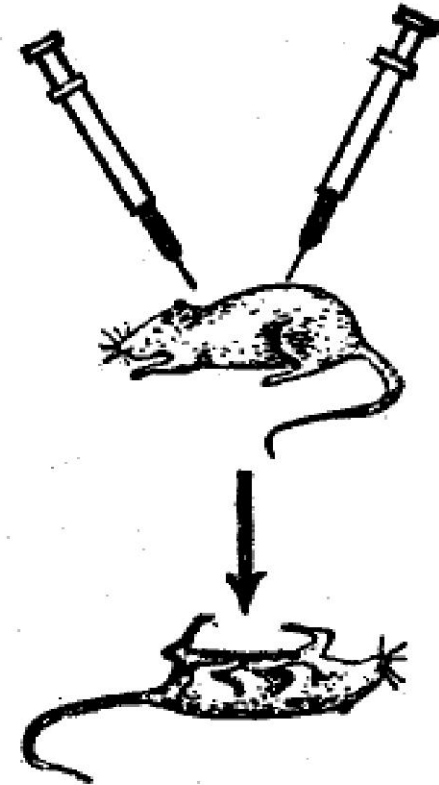
S III 型加热杀死



R II 型
细菌重现



无细菌重现



重现有毒 S III 型细菌

(三)、转化过程

- ◆ 转化现象在细菌中是一种普遍现象。它们的共同特征：
 - ◆ 1. 感受态：
 - 感受态指细菌能够从周围环境中吸收DNA分子进行转化的生理状态。
 - 一般认为感受态出现在细菌对数生长后期，并且某些处理过程可以诱导或加强感受态，以大肠杆菌为例，如用 Ca^{2+} (如 CaCl_2) 处理对数生长后期的大肠杆菌可以增强其感受能力。
-

2. 供体 (donor) DNA与受体 (receptor) 细胞结合 (binding):

- 结合发生在受体细胞特定部位 (结合点);
- 结合过程是一个可逆过程。

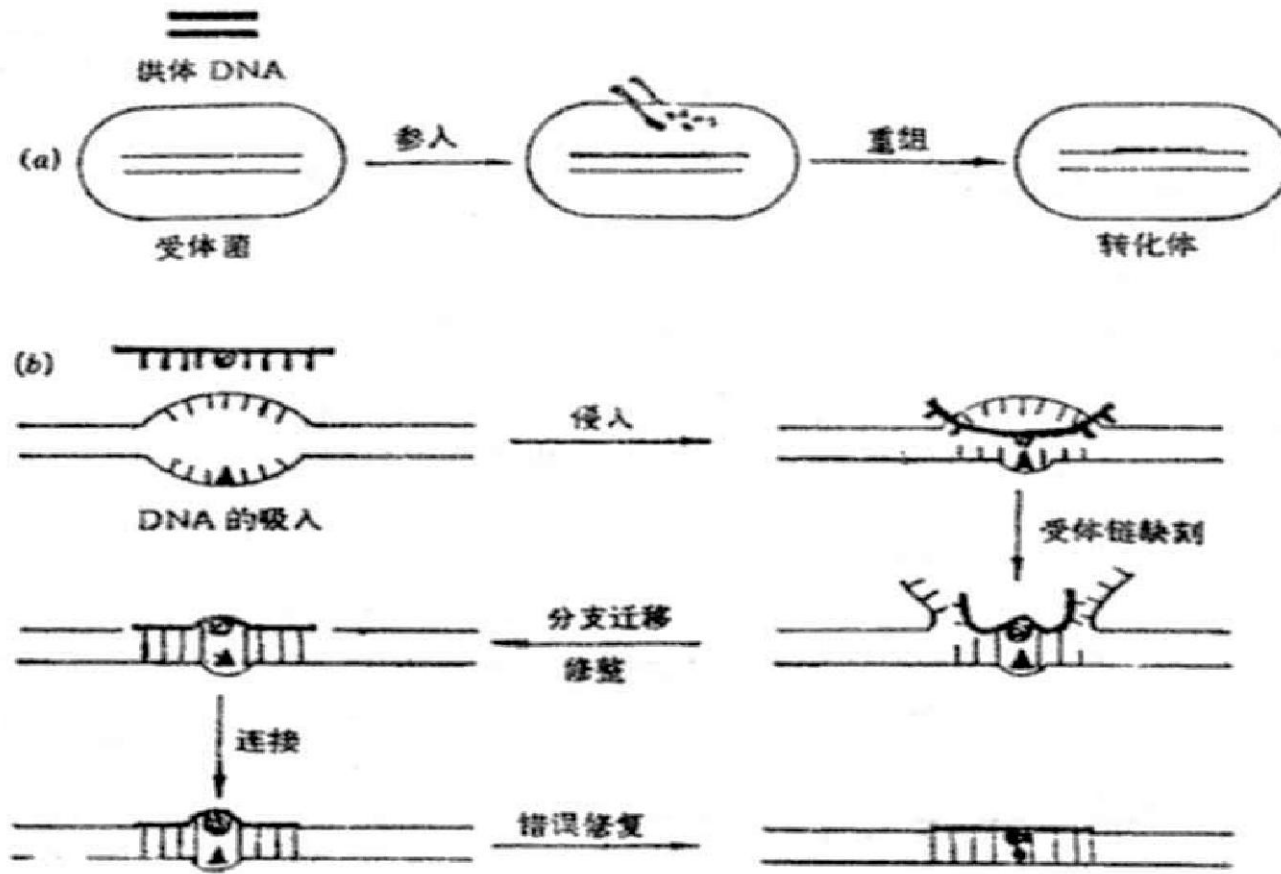
3. DNA摄取:

- 当细菌结合点饱和之后, 细菌开始摄取外源DNA;
- 往往只有一条DNA单链进入细胞 (单链摄入), 另一条链在膜上降解。

4. 联会 (synapsis) 与外源DNA片段整合 (integration):

- 整合就是指单链的转化DNA与受体DNA对应位点的置换, 从而稳定地掺入到受体DNA中的过程。
 - 实际上就是一个遗传重组的过程。
-

细菌转化过程



细菌转化过程图解

(a) 供体DNA 双链吸附, 单链吸入并整合到受体, 然后插入;
(b) 单链供体DNA 整合的假说机制。

转化结果

- 外源DNA未整合——流产转化，外源DNA被稀释，不能得到转化子；
- 外源DNA整合——成功转化，可得到转化子
 - 复制时以原来受体的DNA为模板，复制后代表型不变；
 - 复制时以供体的DNA为模板，复制后代表型改变



* (四)、共同转化与遗传图谱绘制

- 利用共同转化绘制细菌连锁遗传图谱的基本原理：
 - 相邻基因发生共同转化的概率与两者的距离间成正向关系，基因间距离越近，发生共同转化的频率越高，反之越低。
 - 因此可能通过测定两基因共同转化的频率来指示基因间的相对距离。

□ 提取基因型为 ABC 的菌株的DNA来转化基因型为 abc 的菌株，得到下列转化子：

Abc 、 aBc 、 ABc 、 abC 、 aBC ，判断 a 、 b 、 c 基因的顺序。

a *b* *c*

二、接合

- (一)、接合现象的发现和证实
 - (二)、遗传物质的单方向转移
 - (三)、F因子的发现
 - (四)、F因子及其在杂交中的行为
 - (五)、F'因子与性导 (sexduction)
-

(一)、接合现象的发现和证实

1946年，J. Lederberg和Tatum大肠杆菌杂交试验：

材料：大肠杆菌K₁₂菌株的两个营养缺陷型品系：

A—甲硫氨酸缺陷型met⁻和生物素缺陷型bio⁻；

B—苏氨酸缺陷型thr⁻、亮氨酸缺陷型leu⁻和硫氨酸缺陷型thi⁻。

方法：

将A、B混和于完全培养基中培养过夜，离心洗涤，在基本培养基(固体)上涂布培养。

结果：

平板上长出原养型菌落(++++)，概率10⁻⁷。

A 菌株
 $met^- bio^- thr^+ leu^+ thi^+$

B 菌株
 $met^+ bio^+ thr^- leu^- thi^-$

完全培养基

离心并洗涤细胞

2×10^8 细胞

1×10^8 细胞

1×10^8 细胞

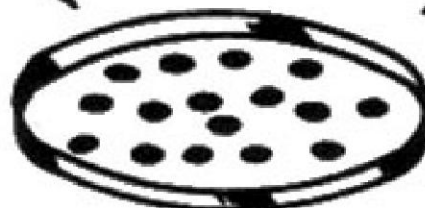
2×10^8 细胞

基本培养基

基本培养基



不生长



$met^+ bio^+ thr^+ leu^+ thi^+$



不生长

黎德伯格和塔特姆的接合（杂交）试验

这种原养型细胞的出现是：

- 1 回复突变？
- 2 转化？
- 3 细胞与细胞直接接触而发生的遗传物质交换和重组？

为了解答这个问题，Davi (1950) 设计了U型管实验。

回复突变可能的排除

- Lederberg和Tatum利用的双营养缺陷型菌株进行试验，已基本排除A或B品系发生回复突变产生原养型细菌的可能。
 - 单基因回复突变的频率约为 10^{-6} ;
 - 双基因回复突变的频率则为 10^{-12} ，频率很低。
 - 但试验中产生原养型菌落产生的频率非常高，因此基本可以排除回复突变的可能。
-

转化作用及其排除

- Lederbergy和Tatum曾把品系A的培养液经加热杀菌，加入到B品系的培养物中，未得到原养型菌落；表明原养型菌落可能不是由转化作用产生。
- 戴维斯 (Davis, 1950) 的U型管试验；滤片孔径很小，可让DNA、 $0.1\ \mu\text{m}$ 的游离分子和更小的营养物质通过，但细胞不能直接接触。
(结果没有得到原养型细菌)
- ◆ 实验结论：细胞**直接接触**是原养型细菌产生的必要条件。

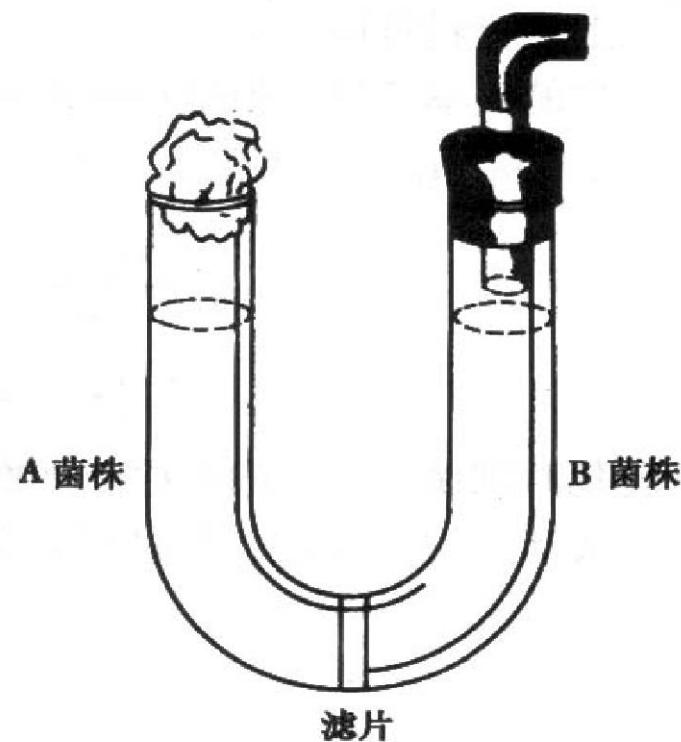


图 7-11 戴威斯 U 型管试验

(二) 遗传物质的单方向转移

W. Hayes (1952)

高剂量链霉素处理A品系或B品系然后做杂交实验

(链霉素不杀死细胞，只是阻止细胞分裂)

链霉素处理A品系 × B品系，杂交结果不受影响；

A品系 × 链霉素处理B品系，无杂交后代产生。

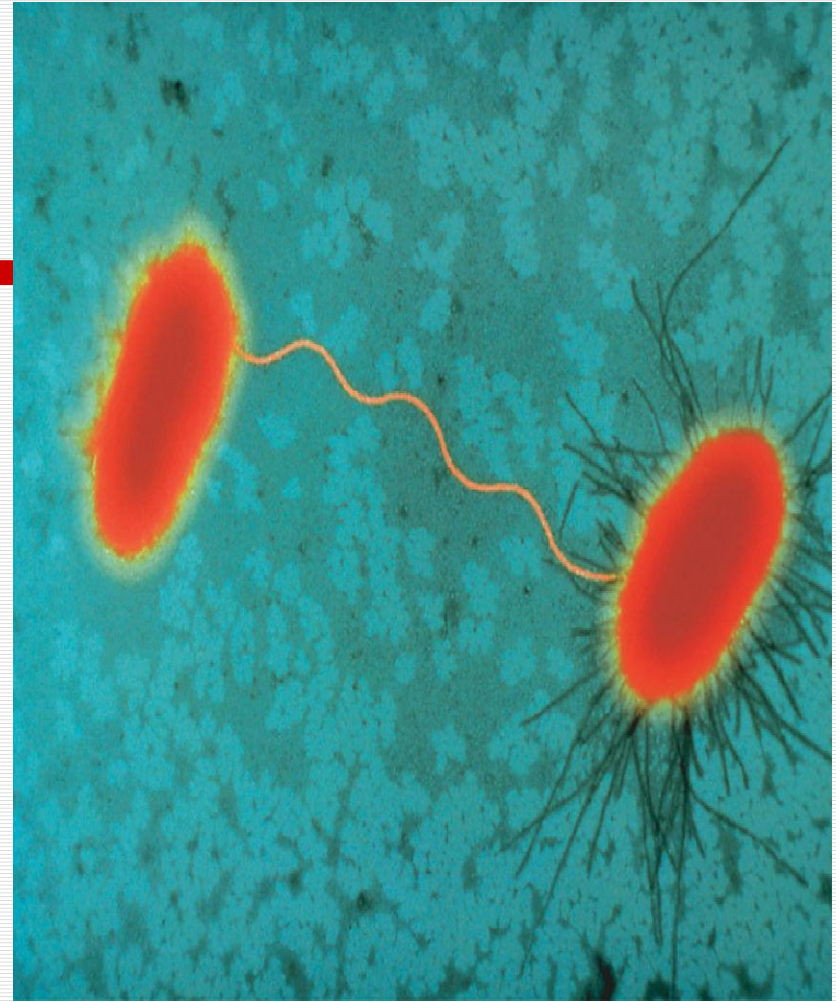
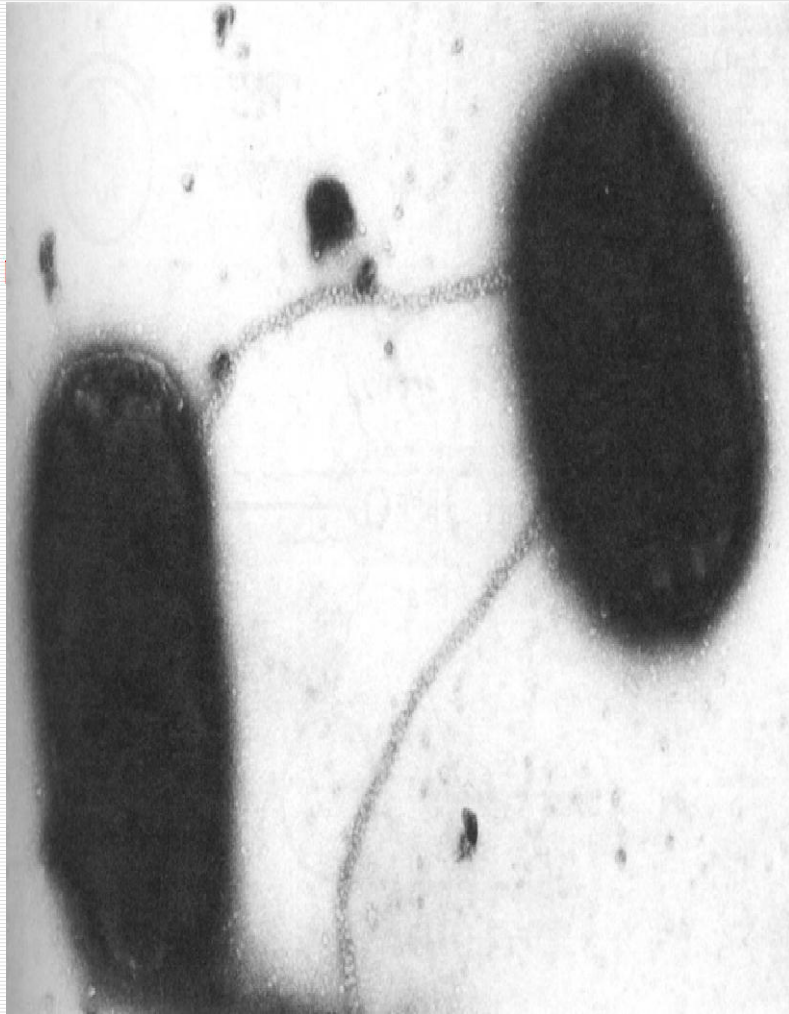
研究表明：

大肠杆菌两种不同菌株(品系)接合过程中遗传物质的转移是单向的；

从而认为大肠杆菌存在两种类型品系：雌性与雄性分别作为接合过程中遗传物质的供体与受体。

接合 (conjugation):

通过细菌细胞直接接触，使遗传物质从供体 (donor) 转移到受体 (receptor) 的重组过程。



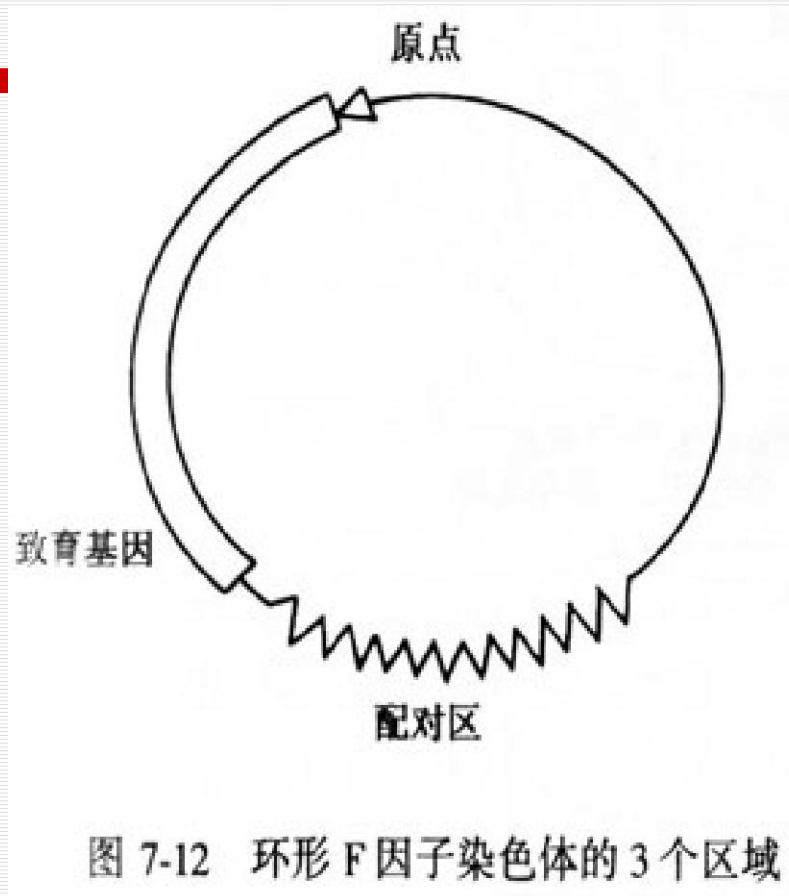
两个 *E. Coli* 细胞杂交的电子显微镜照片 (X 34, 300)

F因子及其在杂交中的行为

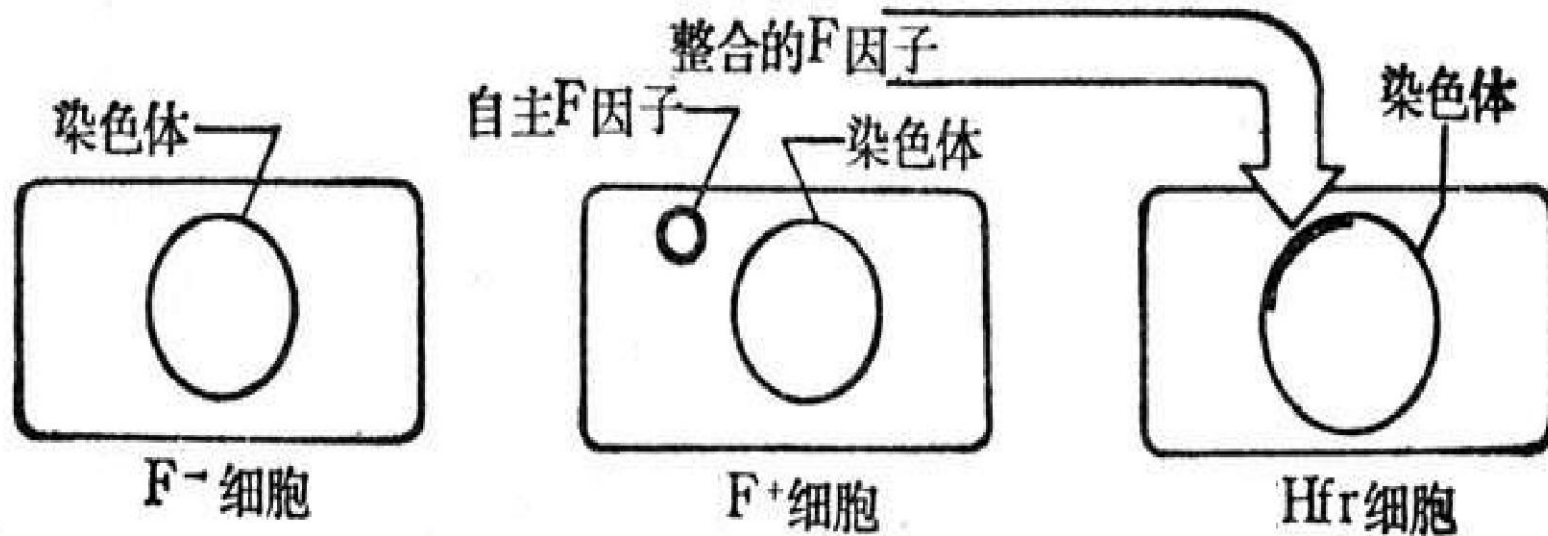
1. F因子:

- F因子就是F质粒，其化学本质是DNA，约为细菌染色体全长的2%。
- F⁺品系与F⁻品系
- F⁺与F⁻品杂交后代变为F⁺频率很高。

质粒：细菌染色体外的遗传物质，可自主复制。



3. F因子的存在状态



大肠杆菌 F 因子的三种状态

附加体 (episome): 既能整合到染色体上随染色体复制而传递，又能独立游离细胞质中的遗传物质。

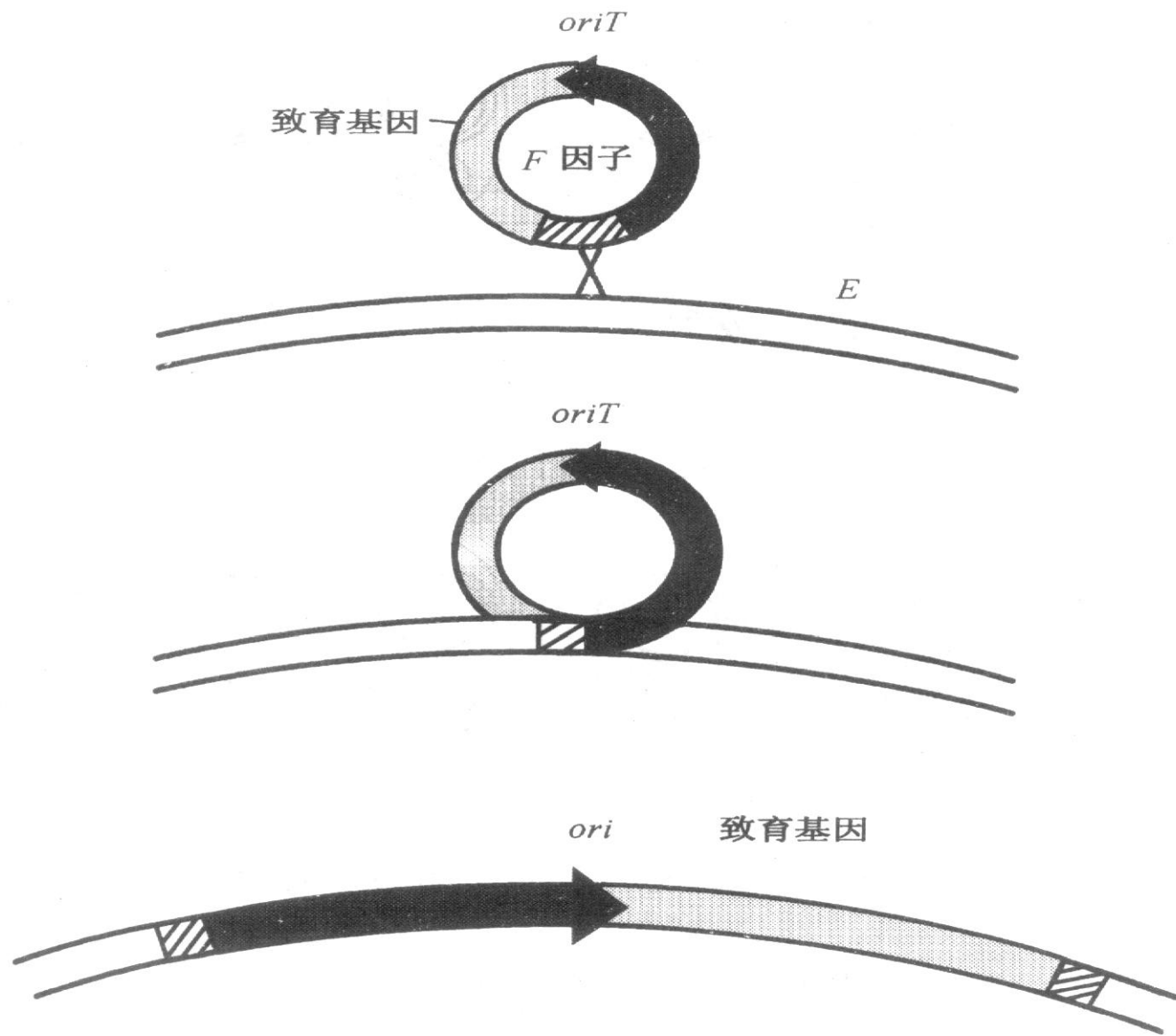


图 8-9 F 因子的整合。

4.. F因子及其在杂交中的行为

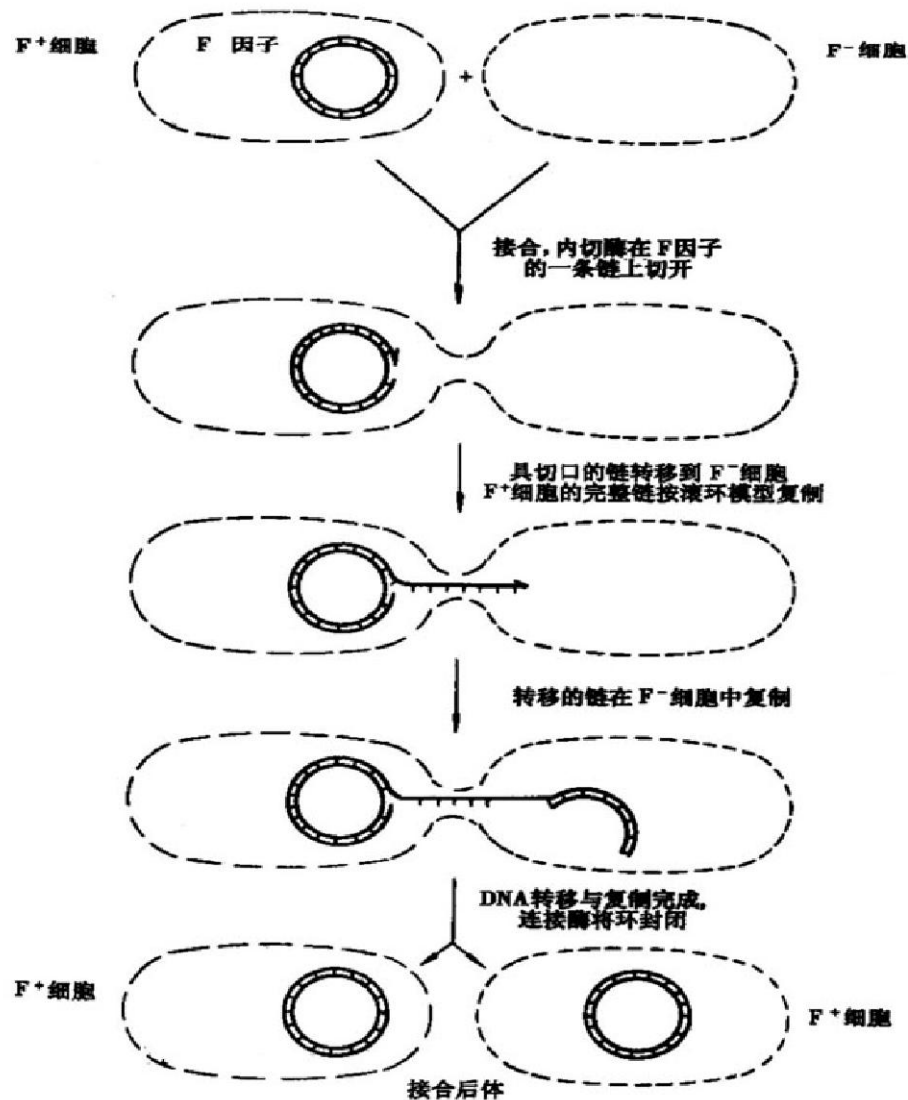


图 7-14 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Hfr 的形成及其染色体向 F⁻ 细胞的转移图解

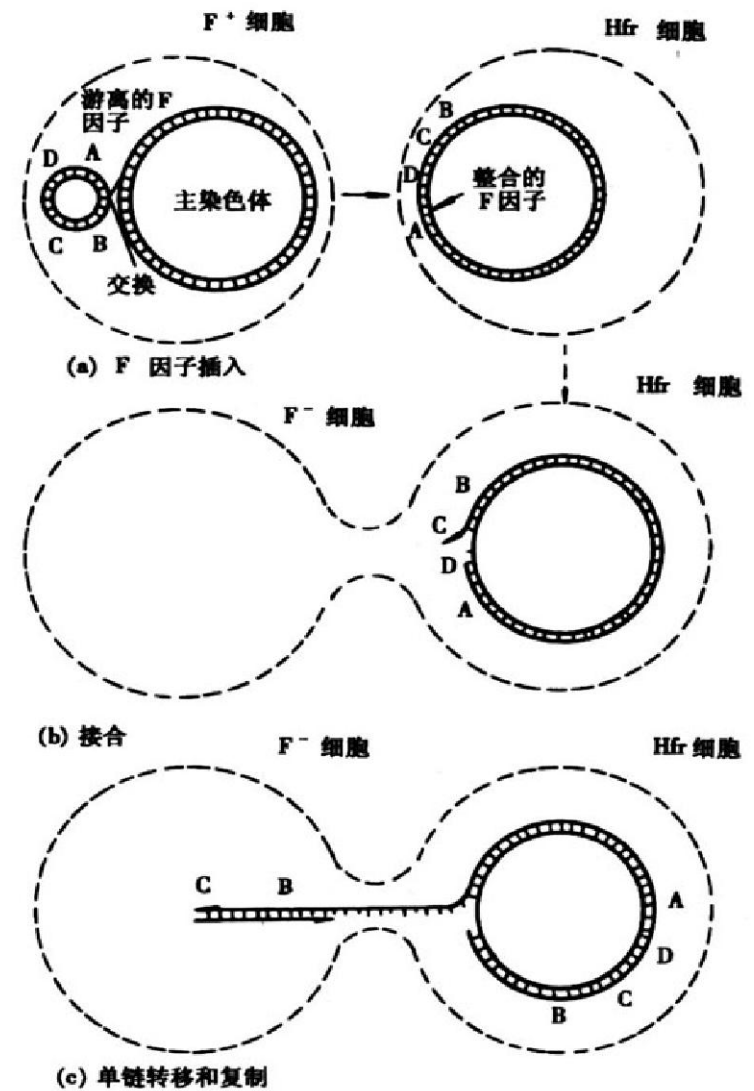
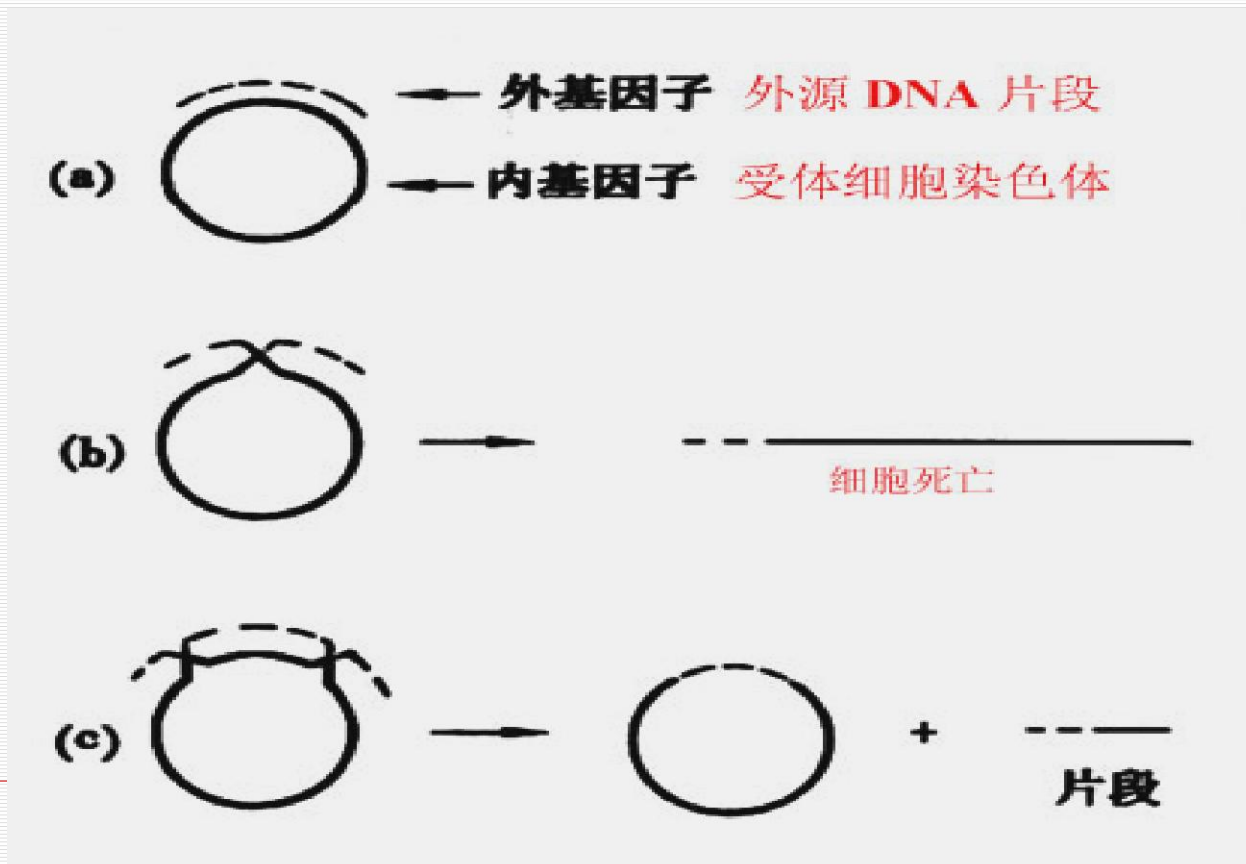


图 7-15 大肠杆菌 (*E. coli*) Hfr 的形成及其染色体向 F⁻ 细胞的转移图解

4. F因子及其在杂交中的行为

部分二倍体：一个完整的基因组和一个不完整的基因组所构成的二倍体。其中受体的基因组叫**内基因子**，供体的基因组叫**外基因子**。



F因子及其在杂交中的行为

2. 高频重组品系Hfr

1951年，Luca Cavalli-Sforza偶然发现，用氮芥处理A品系后从存活的细菌中分离出一种新品系，将这种新品系和经典的B品系杂交，得到的重组体比一般杂交高出一千倍，称为高频重组品系Hfr。

Hayes (1954) 也从F⁺品系分离出Hfr新品系Hfr C和HfrH.

Hfr和F⁺的异同

相同

1. 都能和F⁻进行杂交产生重组后代;
2. 杂交时都要通过接合管和受体菌相连接;
3. 用高剂量链霉素处理后都不影响杂交,说明它们都是作为一种供体。

不同

1. 产生的重组子频率不同; 10^{-4} , 10^{-7}
2. F⁺ × F⁻后代常为F⁺, 而Hfr × F⁻后代绝大多数为F⁻

-
- Wollman和Jacob想了解Hfr杂交时，什么时候把致育基因传给F⁻，设计了中断杂交试验，该试验对大肠杆菌遗传研究有重大突破。
-

中断杂交试验1

Hfr: thr⁺leu⁺str^sazi^rton^rlac⁺gal⁺

F⁻: thr⁻leu⁻str^razi^ston^slac⁻gal⁻

二者混合于液体培养基培养，每隔一定时间取样，把菌液用组织捣碎器猛烈搅拌，中断杂交，样品稀释分别涂到含链霉素的基本培养基上，再影印培养用不同选择培养基鉴别基因型。

	基本+azi	基本+T1	乳糖为唯一碳源	半乳糖为唯一碳源
8min	—	—	—	—
9min	+	—	—	—
11min	+	+	—	—
18min	+	+	+	—
25min	+	+	+	+

中断杂交试验2

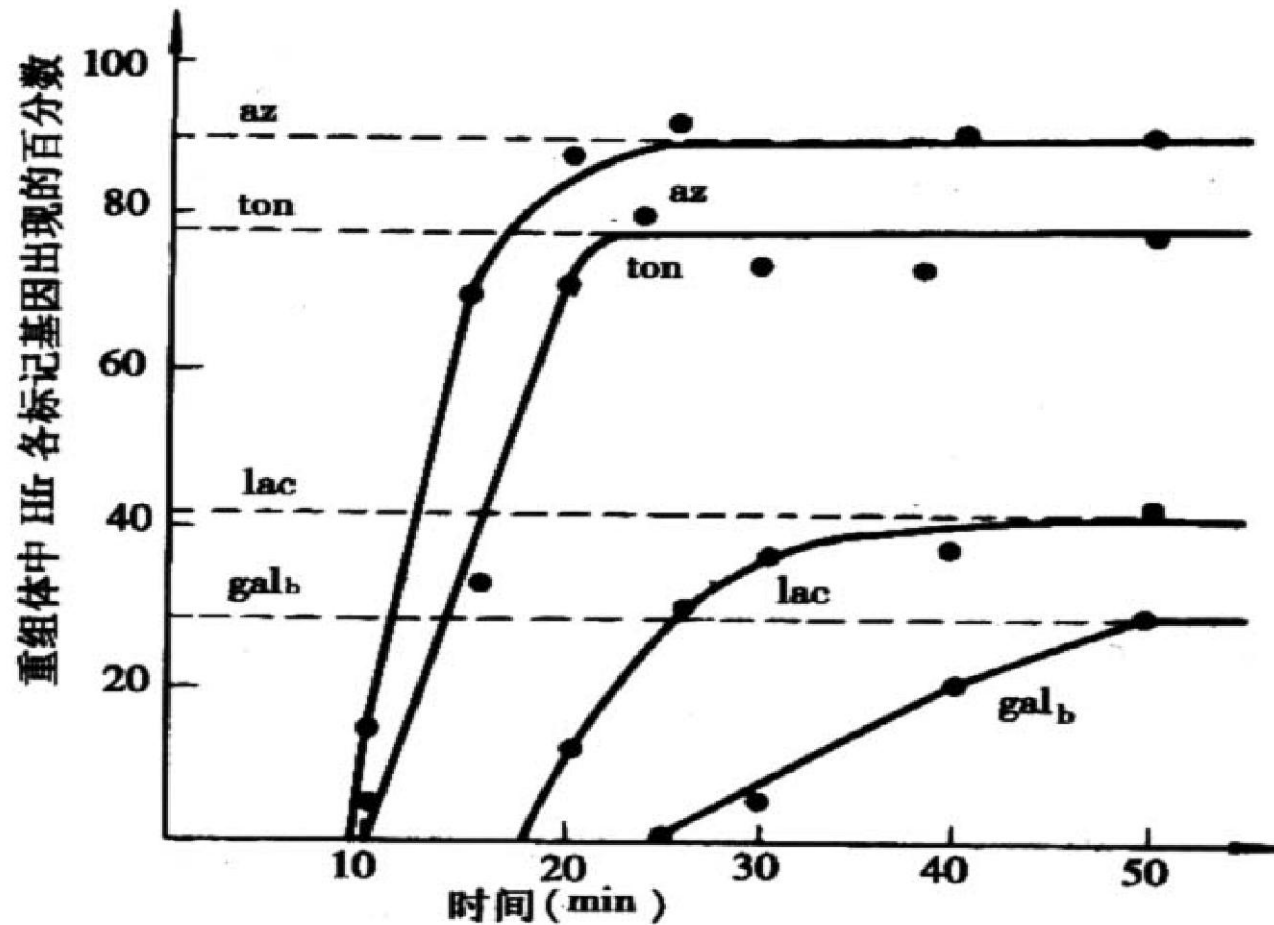


图 7-17 中断杂交后，重组体中 Hfr 遗传性状出现的频率
各标记基因进入 F⁻ 细胞中的时间不同，达到最高水平的时间也不同

中断杂交试验3

Hfr上基因以一定顺序先后转移到F⁻。

- 转移从一端开始，即从原点O开始。
- 以线性方式进入F⁻。
- 基因离原点越近，进入F⁻越早，转移频率越高；反之进入F⁻越晚，转移频率越低。

假设基因传递速度均匀，进入F⁻时间越早，则离原点越近，据此可作出Hfr上基因分布图。

O	azi	ton	lac	gal
	9	11	18	24

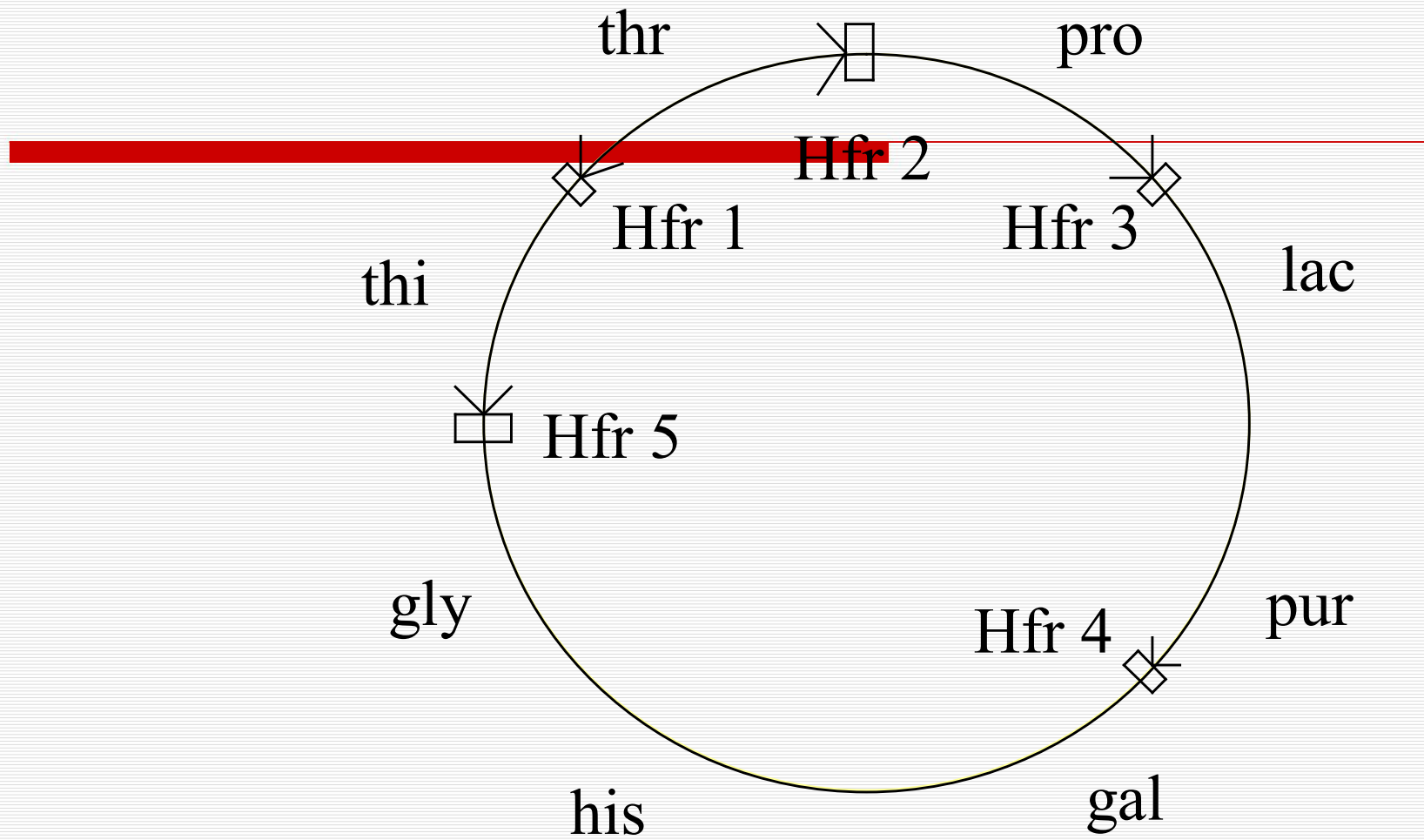
如让杂交持续两小时，然后中断，一些F⁻变为F⁺，说明F因子最后转移。

大肠杆菌环状染色体

Wollman和Jacob用不同Hfr品系做了大量中断杂交来确立大肠杆菌基因连锁图。

Hfr品系	基因顺序
1	thr pro lac pur gal his gly thi
2	thr thi gly his gal pur lac pro
3	pro thr thi gly his gal pur lac
4	pur lac pro thr thi gly his gal
5	thi thr pro lac pur gal his gly

从试验中可知：大肠杆菌染色体为环状。



大肠杆菌环状染色体图

传统作图法

Hfr: lac⁺ade⁺ × F⁻: lac⁻ade⁻

$$\begin{aligned}\text{重组值} &= \text{lac}^- \text{ade}^+ / \text{ade}^+ * 100\% \\ &= 20\%\end{aligned}$$

中断杂交实验 lac-ade 相距 1 分钟

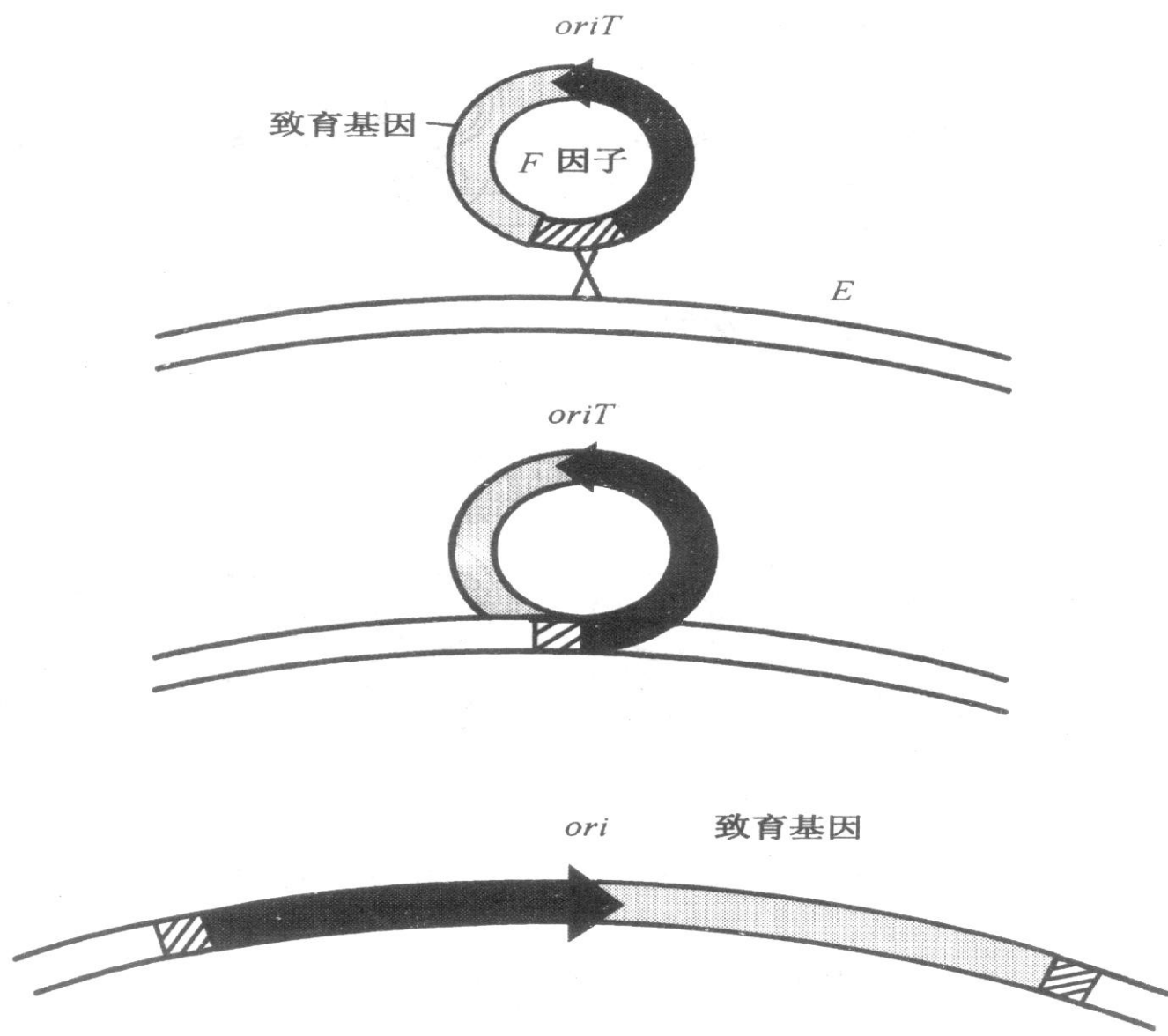


图 8-9 F 因子的整合。

三、性导——概念

□ (一) F'因子

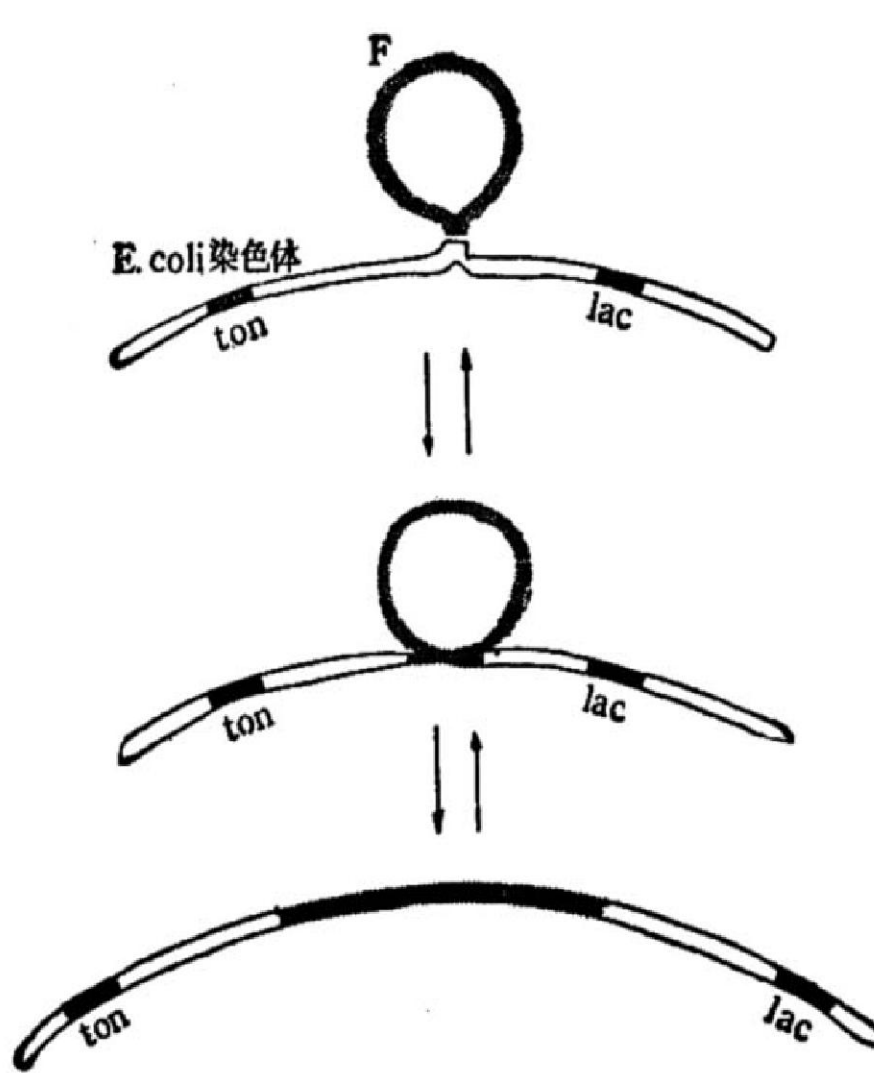
- Hfr菌株在切除F因子时发生错误切除，分离出一个携带F因子和部分宿主染色体基因的遗传因子，这种**带有宿主染色体基因的F因子**称为F'因子。

□ (二) 性导

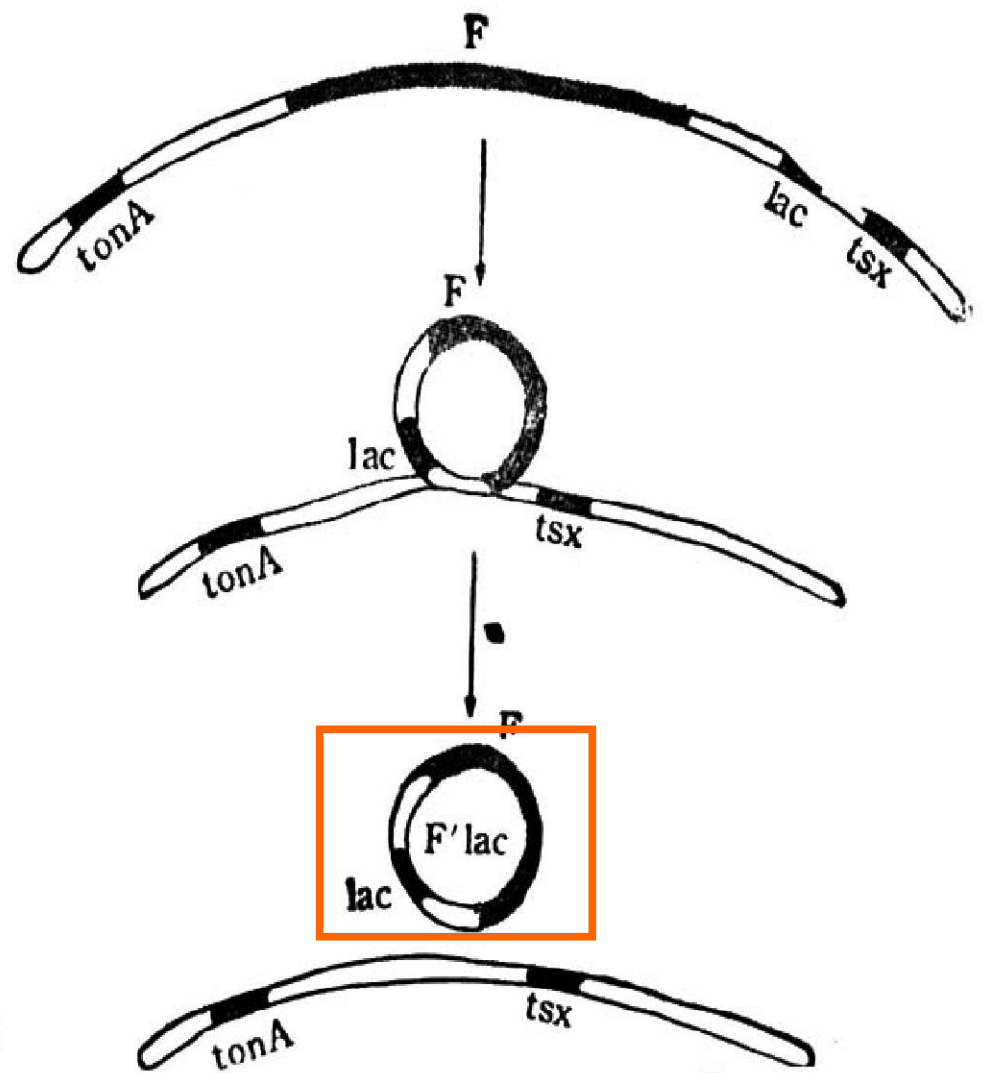
- 带有F'因子的细菌在接合时，由F'因子所携带的外源DNA转移到宿主细菌的染色体的过程称为性导。

□ (三) F'因子的特点

- ① F'因子以**极高的比率**转移它携带的基因；如同F⁺高效转移F因子一样。
 - ② F'因子有极高的自然整合率，而且**整合在一定的基因座位上**，因有与细菌同源的染色体区段，不同于F因子随机插入。
-



F 因子的整合



F 因子偶尔不准确的环出，带有一部分染色体的基因

F⁺、Hfr、F' 三者关系

F' 因子以**极高的比率**转移它携带的基因；如同F⁺高效转移F因子一样。

F' 因子有极高的自然整合率，而且**整合在一定的基因座位上**，因有与细菌同源的染色体区段，不同于F因子随机插入。

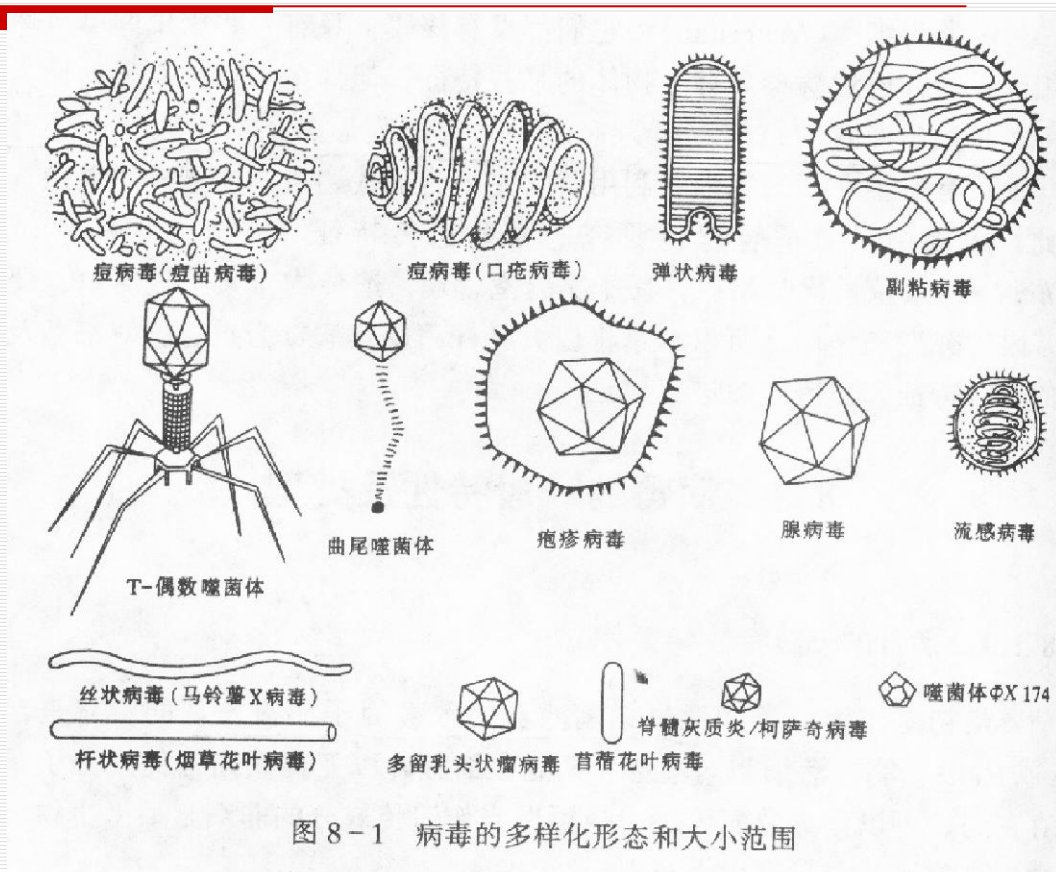
F⁺ × F⁻ 后代常为F⁺，

而Hfr × F⁻ 可以把细菌染色体高频率转移F⁻，但后代绝大多数为F⁻。

三、病毒的种类

□ 根据宿主划分:

- 微生物病毒
- 植物病毒
- 无脊椎动物病毒
- 脊椎动物病毒
- 亚病毒
 - 类病毒
 - 拟病毒
 - 朊病毒



□ 细菌病毒一般称为噬菌体 (phage)

亚病毒:

- 1 定义: 凡在核酸和蛋白质两种分子中, 只含其中之一的分子病原体。
- 2 种类: 类病毒、拟病毒、朊病毒

类病毒: 只含RNA一种成分专性寄生在活细胞内的分子病原菌。

类病毒 **1971** 年从患 **马铃薯纺锤形块茎病** 的病薯中分离出的一个病原体, 呈棒形结构, 是一个裸露的闭合环状单链 **RNA** 分子, 没有蛋白质外壳, 分子量比一般病毒分子更小, 称为类病毒。严格专性寄生, 只有在宿主细胞内才表现出生命特征, 可使植物致病或死亡。类病毒的复制机制迄今为止还不十分清楚。

拟病毒： 是指一类包裹在真病毒粒中的有缺陷的类病毒。（类类病毒、壳内病毒、病毒卫星）。

极其微小，由裸露的RNA或DNA组成。其寄主叫辅助病毒。

拟病毒复制依赖辅助病毒的协助，拟病毒干扰辅助病毒的复制和减轻其对寄主的病害。

拟病毒的发现：从绒毛烟的斑驳病毒 **V T M o V** 中分离的（1981年）。

当他们在鉴定该病毒时，发现其基因组除含一种大分子线状**ssRNA**(称**RNA-1**)外，还含有一种类似于类病毒的环状**ssRNA**分子(称**RNA-2**)及它的线状形式(称**RNA-3**)。

(**V T M o V** 核心有线状**ssRNA**、环状**ssRNA**及其线状形式，后两者为拟病毒。)

动物拟病毒：丁型肝炎病毒 (**ssRNA**)。辅助病毒为乙肝病毒 (**HBV**)。

PrP^c的结构是以 α 螺旋为主。

PrP^{sc}异构体以 β 折叠片为主。

PrP^{sc}进入细胞与PrP^c结合，使之变为PrP^{sc}造成后者剧增，在神经细胞中沉积，引起神经退行性病变，其潜伏期是28年，最长可达40年。出现症状一般一年内100%死亡。

噬菌体的类型

根据噬菌体的生活周期可分为：

(一) 烈性噬菌体 (virulent phage)

- 侵入宿主细胞后，利用宿主细胞内的物质进行自身遗传物质和蛋白质的合成，组装出子噬菌体，**使宿主细胞裂解而释放子噬菌体**，这类噬菌体称为烈性噬菌体。

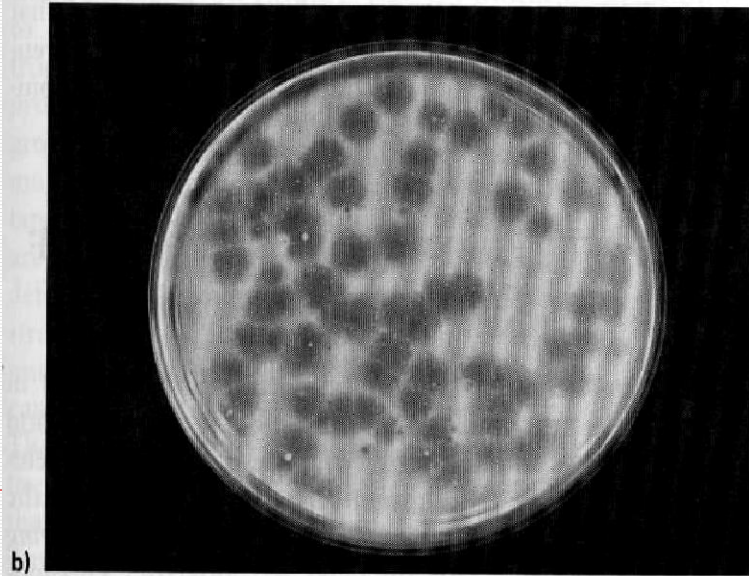
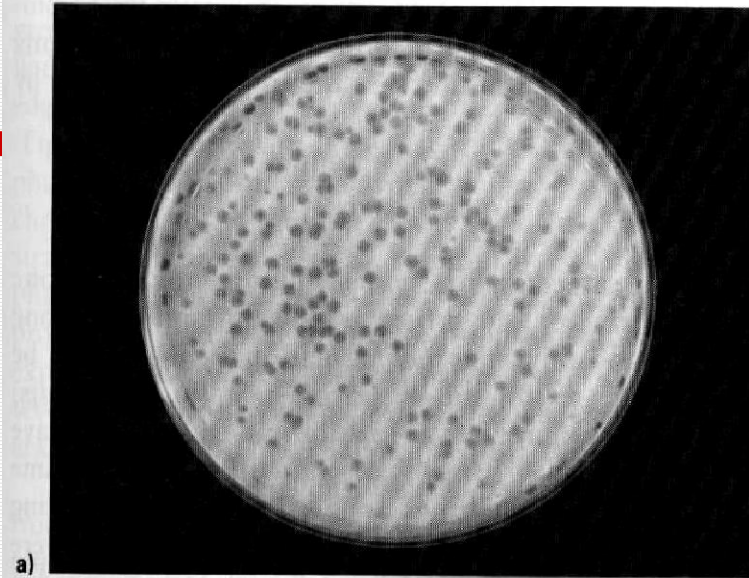
(二) 温和性噬菌体

- 侵入后并不使细菌裂解，而是以原噬菌体或质粒的形式存在的一类噬菌体称为温和性噬菌体。

某些噬菌体侵染细菌后，其DNA整合到宿主染色体中，这种处于整合状态的噬菌体称为原噬菌体

~ FIGURE 7.18

Plaques of the *E. coli* bacteriophages (a) T4 and (b) λ .



第二节 噬菌体 (T_2) 的基因重组

□ 噬菌体的突变:

- 噬菌斑的形态
- 宿主范围

(1) 噬菌斑突变: T 噬菌体的 r^- 突变体 (速溶)

- 正常噬菌体, r^+ , 产生的菌斑小而边缘模糊
- 突变噬菌体, r^- , 产生的菌斑大两倍而边缘清晰

(2) 宿主范围突变: T_2 噬菌体的 h^- 突变体

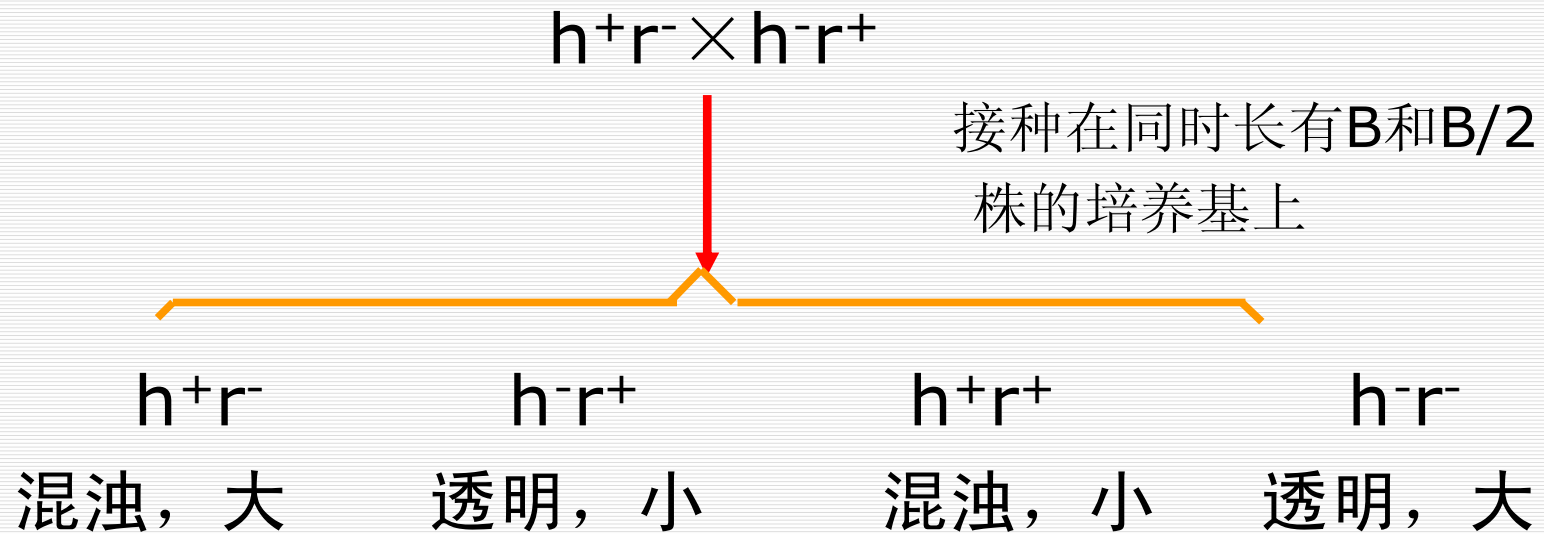
- 正常噬菌体, h^+ , 只能以大肠杆菌B株 (Tt_0^s) 为宿主
 - 突变噬菌体, h^- , 能以B株和B/2株 (Tt_0^r) 为宿主
-

T2噬菌体的基因重组

- 将两种不同的T2突变体进行杂交，对其杂交子代进行重组分析
- 杂交方法：
 - 将Tto^r和Tto^s两种大肠杆菌细胞混合
 - 同时接种高浓度的T2噬菌体的h⁻r⁺和h⁺r⁻两种突变体，保证绝大多数细菌都被一个以上噬菌体感染
 - 两种不同的噬菌体DNA可能在宿主细胞内进行重组，从而产生非亲本型子代h⁺r⁺和h⁻r⁻。

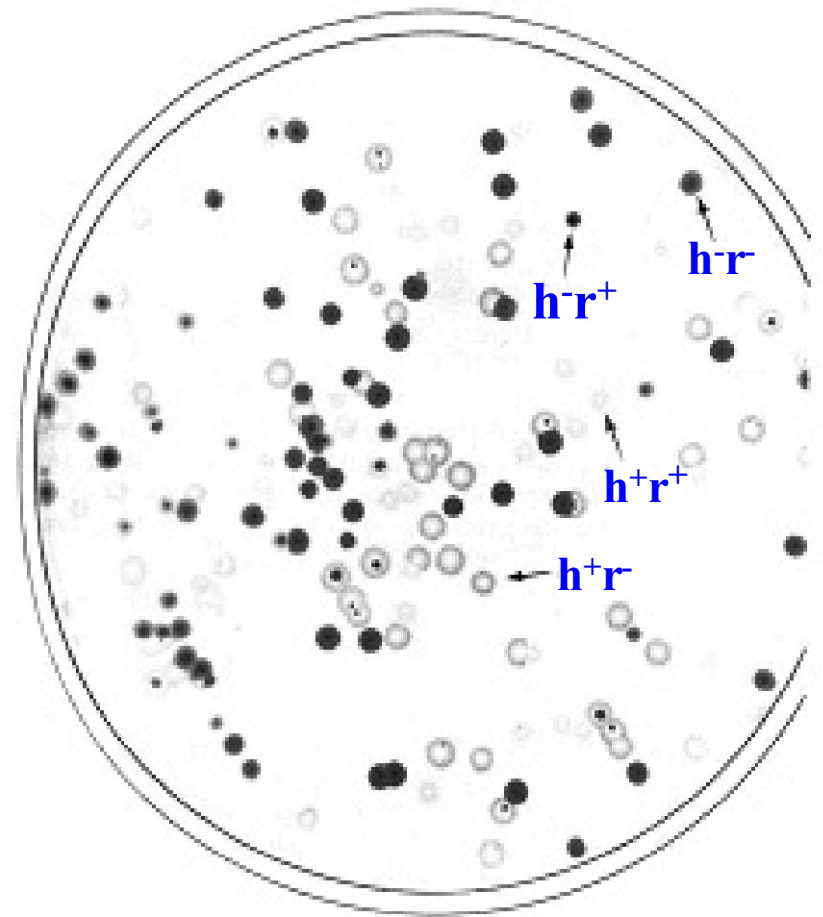
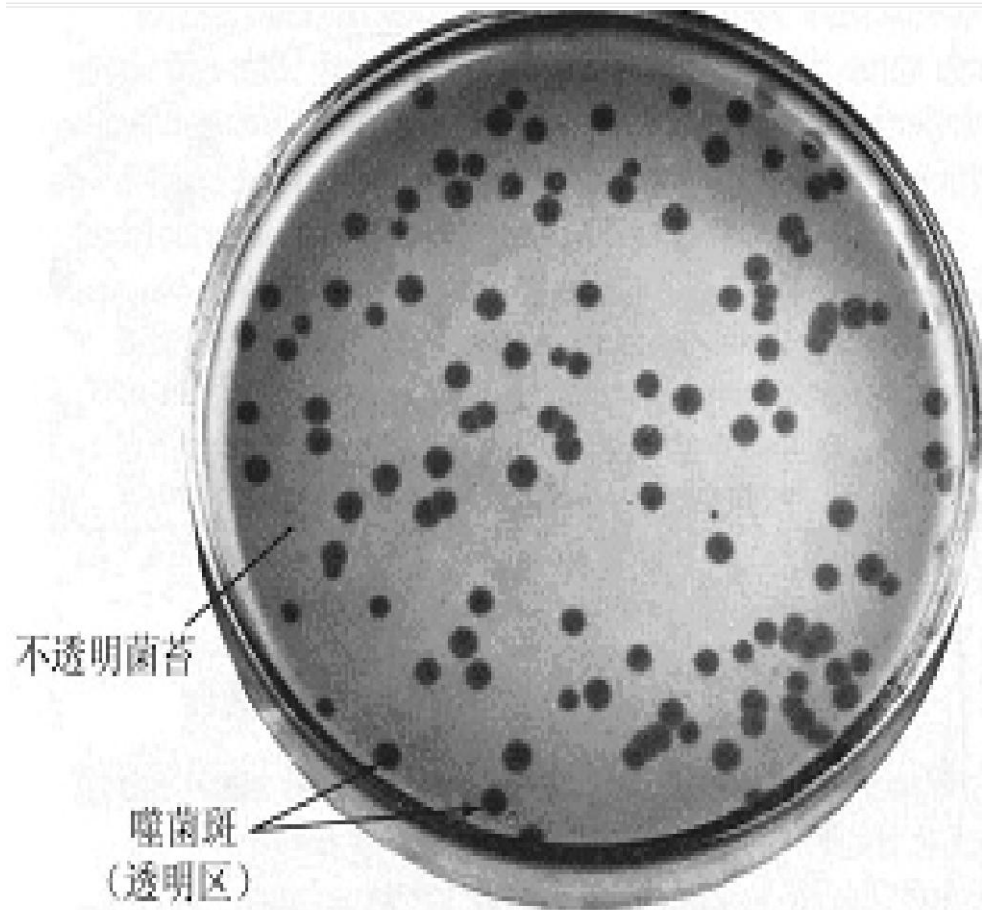


T2噬菌体的基因重组



$$\text{重组值 (Rf)} = \frac{\text{重组噬菌斑数}}{\text{总噬菌斑数}} \times 100\%$$

$h^+r^- \times h^-r^+$ 培养所产生的四种噬菌斑



四、转导

□ (一) 概念

- 以噬菌体为媒介所进行的细菌遗传物质重组的过程，称为转导。

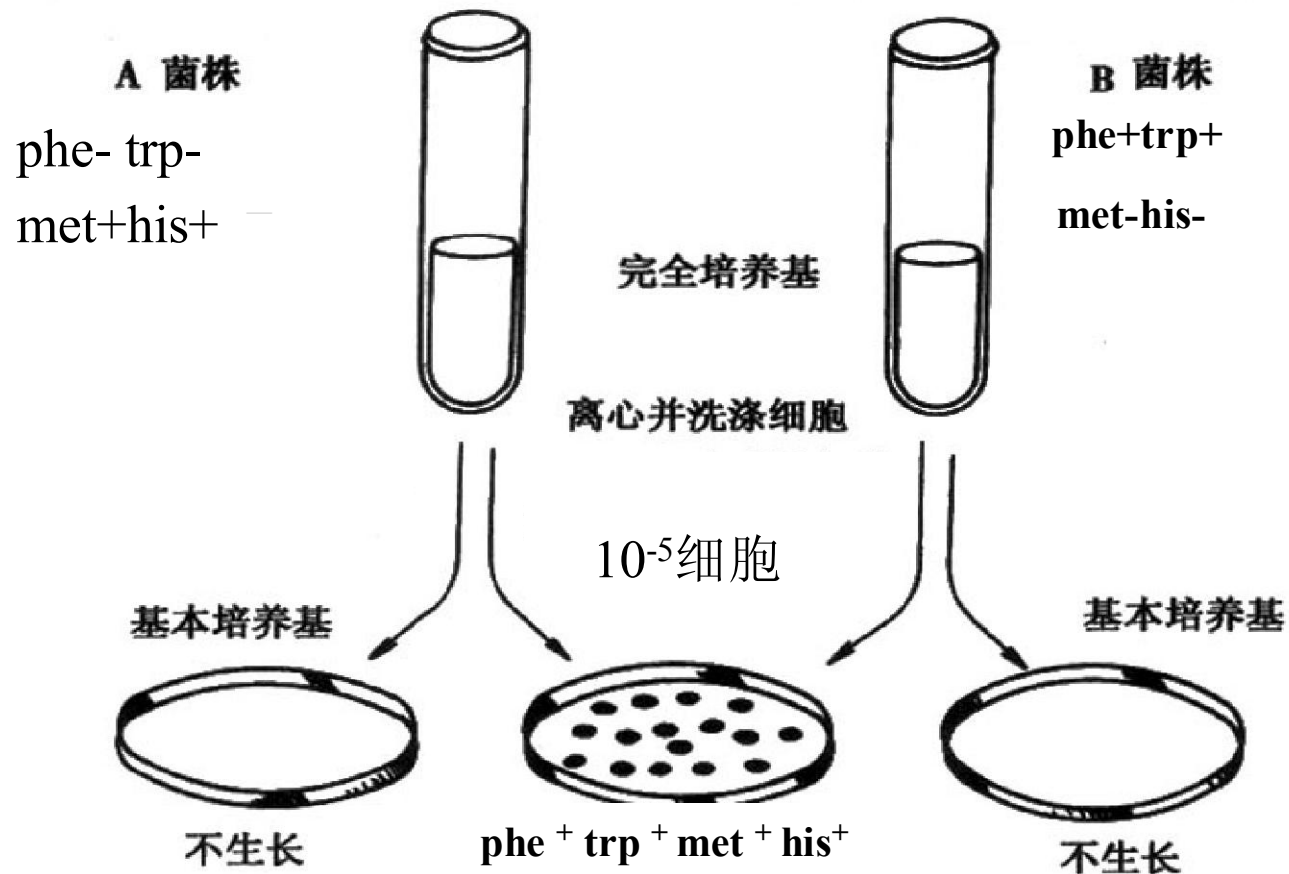
□ (二) 转导现象的发现

- Lederberg及其研究生Zinder（1952）首先在鼠伤寒沙门氏菌中发现转导现象。



普遍性转导的发现

1951年，Zinder研究鼠伤寒沙门氏菌时发现。



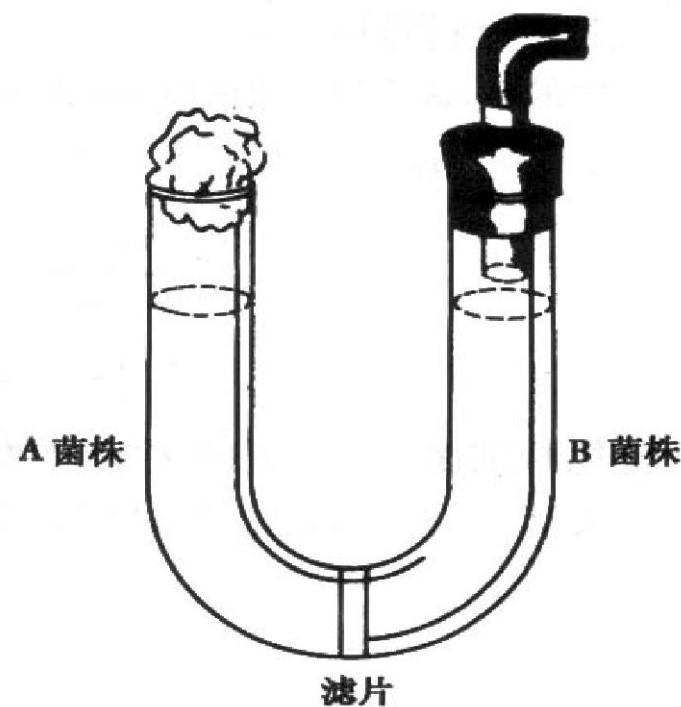
接合的原因？

普遍性转导的发现

□ 戴维斯U型管试验：结果得到了原养型细菌。

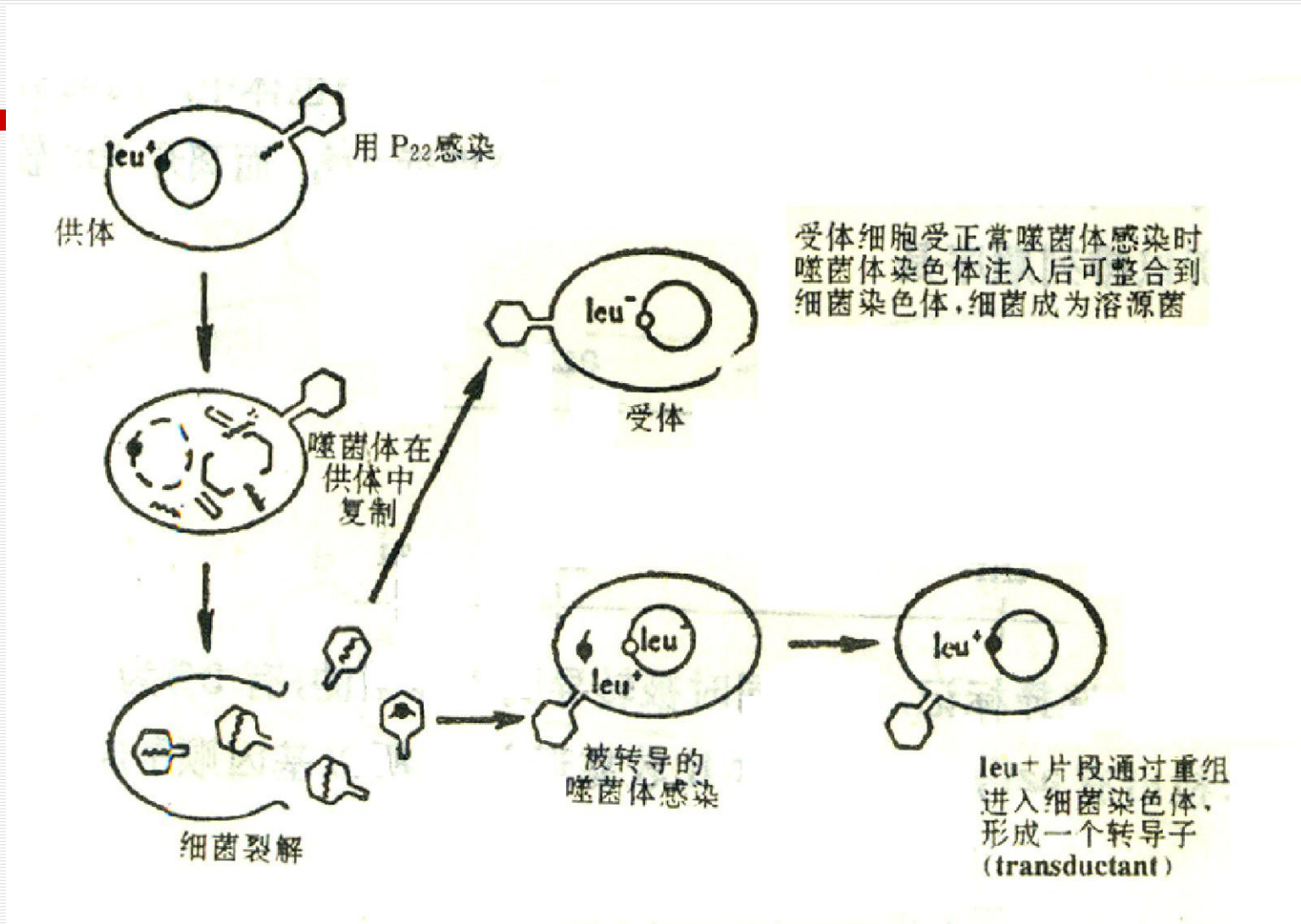
◆ 实验结论：细胞不需直接接触就可产生原养型细菌。重组体的产生通过一种过滤性因子FA进行。

◆ 此种过滤性因子就是噬菌体P22。FA与P22的大小、质量相同；二者的侵染能力都可被胰蛋白酶或DNA酶破坏；抗P22的血清或加热处理都可使二者失活，且失活的速度相等；用抗P22的菌株做亲本，FA丧失转导能力。



U型管试验

普遍性转导的过程



（三）转导的类型

□ ① 普遍性转导

- 在噬菌体感染的末期，细菌染色体被断裂成许多小片段，在形成噬菌体颗粒时，少数噬菌体将细菌的DNA误认为是它们自己的DNA，并包裹进其蛋白质衣壳内，从而形成转导噬菌体，该噬菌体再去感染其他宿主时，就将所携带的细菌染色体片段带入受体菌中，形成部分二倍体，进而重组整合。这种转导类型称为普遍性转导。
-

（三）转导的类型

□ ②流产转导

- 转导DNA分子进入受体细胞后，既不与受体基因组发生交换，又不随宿主DNA复制而复制，而是稳定地存在于细胞之中。由于细菌不断增殖，故该转导类型的细菌所占比例越来越少，以至最终消失，故称为流产转导。

□ ③局限转导

- 由温和噬菌体（如 λ ）介导的转导类型。原噬菌体离开细菌染色体时，偶尔可将噬菌体插入位点两边的细菌基因一起环落下来而形成混杂的DNA片段，该DNA片段由噬菌体蛋白质衣壳包裹，再去侵染其他宿主细菌，可将特定的细菌基因带入新的受体菌，进而重组整合，这种转导称为局限转导。
-

本章要求

- 掌握F⁻菌株、F⁺菌株、Hfr菌株的概念、区别和用途；
 - 区别F因子、F'因子的异同；
 - 掌握转化、接合、性导与转导的概念与基本原理；
 - 了解细菌遗传作图的原理和基本过程。
-