



微生物学

Microbiology

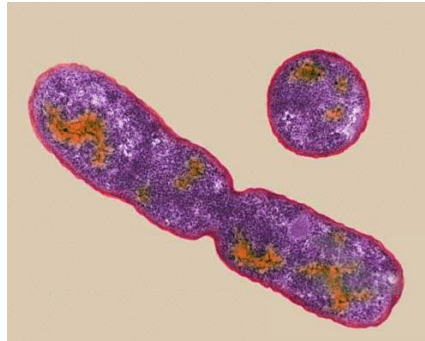
崔恒林

江苏大学食品与生物工程学院



第八章 微生物的遗传

Microbial genetics



概述

- 遗传 (heredity or inheritance) 和变异 (variation) 是生物体的最本质的属性之一。
- 遗传即生物的亲代将一整套遗传因子传递给子代的行为或功能。变异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。
- 基因型 (genotype) 某一生物个体所含有的全部基因的总和。表型 (phenotype) 某一生物所具有的一切外表特征及内在特性的总和。
- 饰变 (modification) 不涉及遗传物质结构改变而发生在转录、翻译水平上的表型变化。

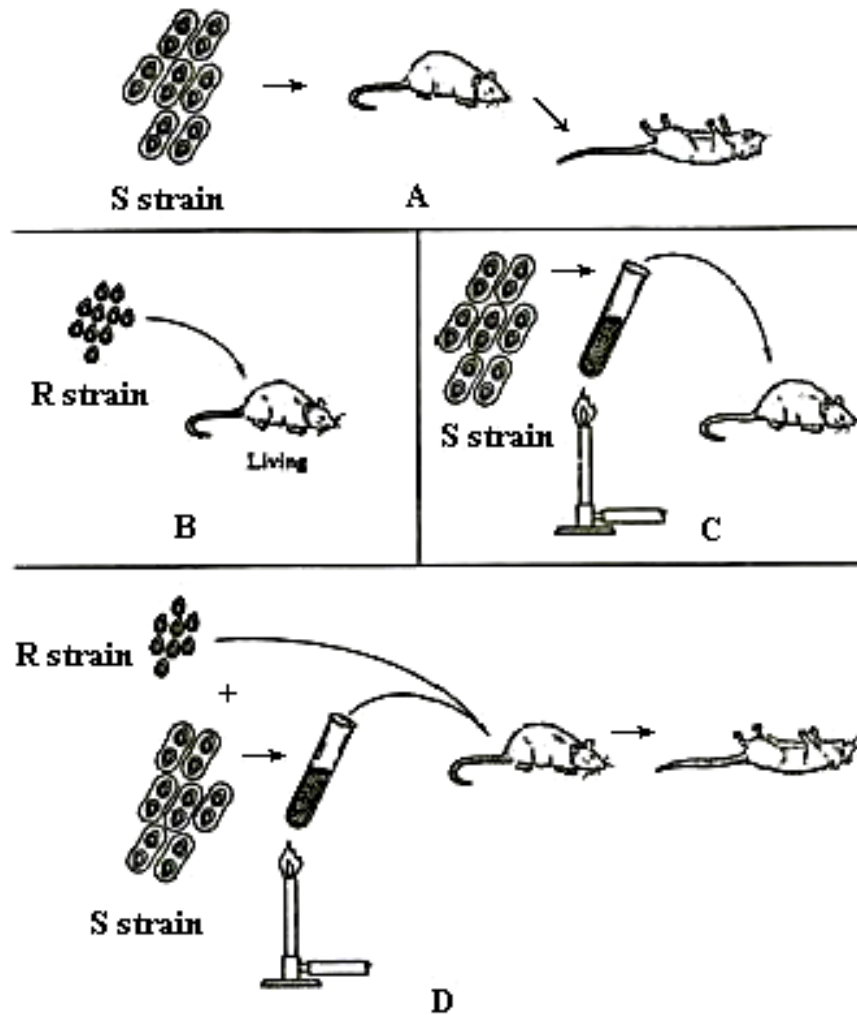
8.1 遗传变异的物质基础

8.1.1 三个经典实验

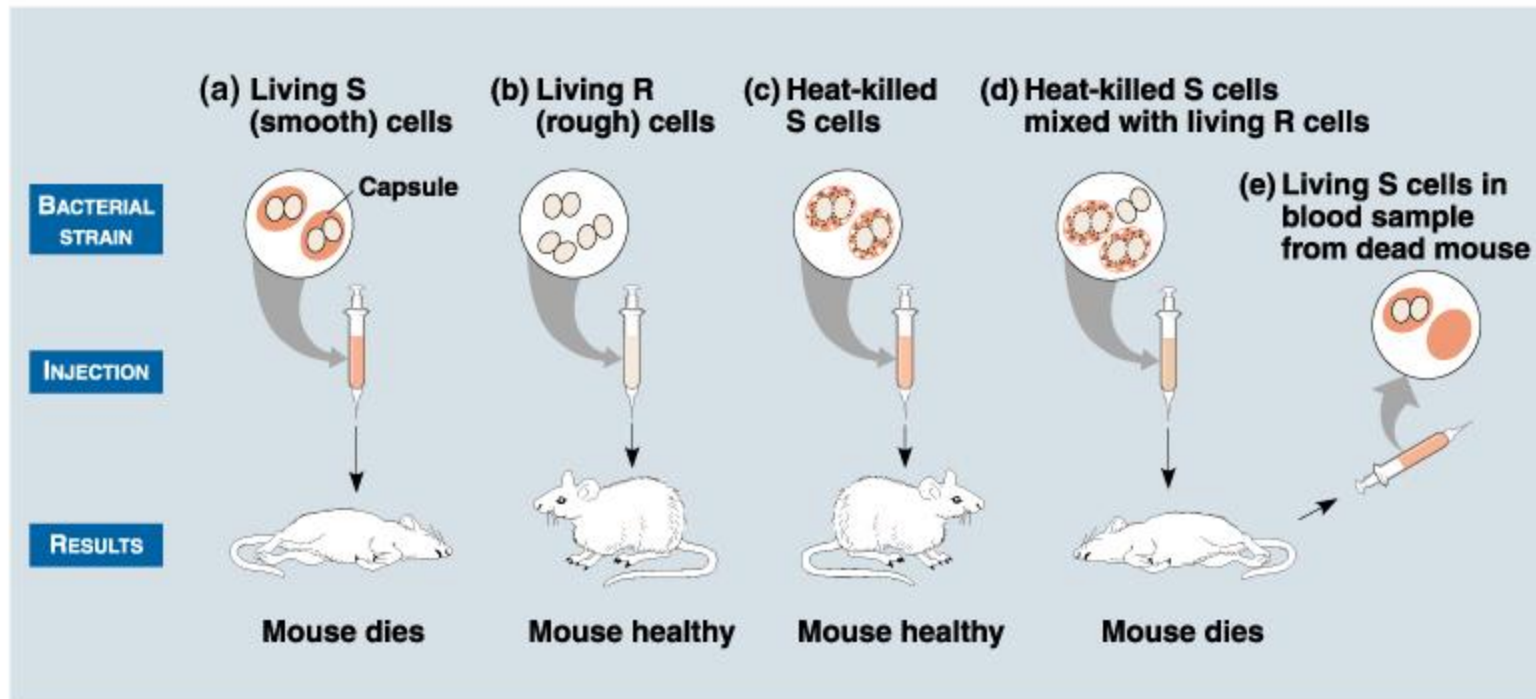
1. 经典转化实验

- 1928年F.Griffith以Streptococcus pneumoniae为研究对象进行转化（transformation）实验。1944年O.T.Avery等人进一步研究得出DNA是遗传因子。

Griffith experiment first demonstrating transformation with *Streptococcus pneumoniae*

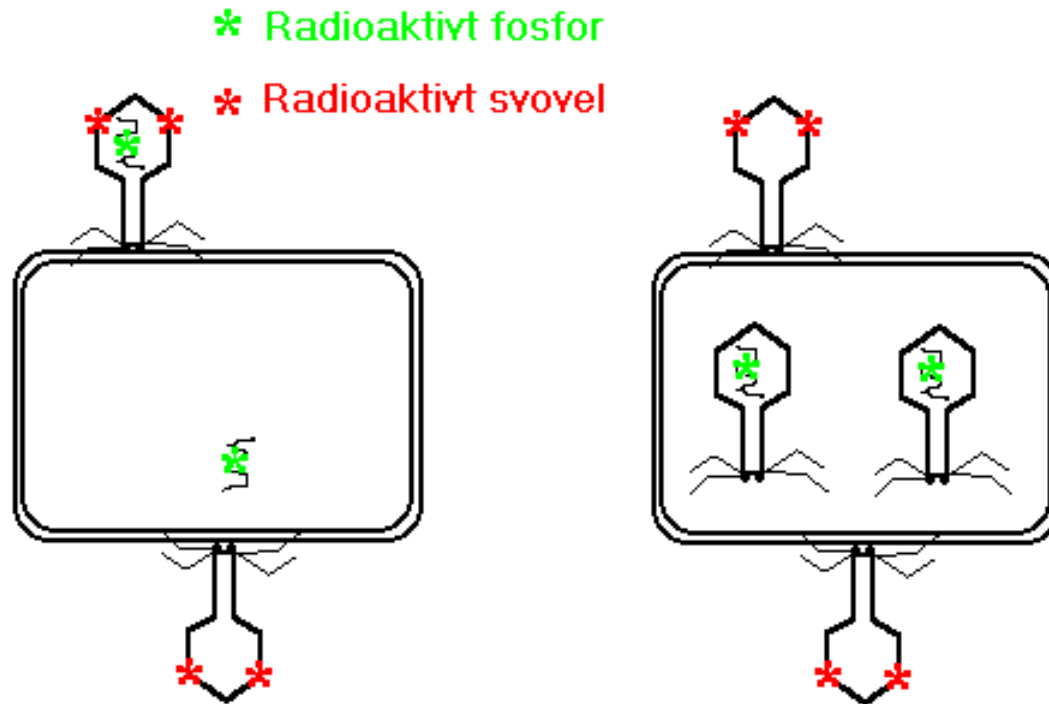


Transformation of Bacteria (Griffith Experiment)



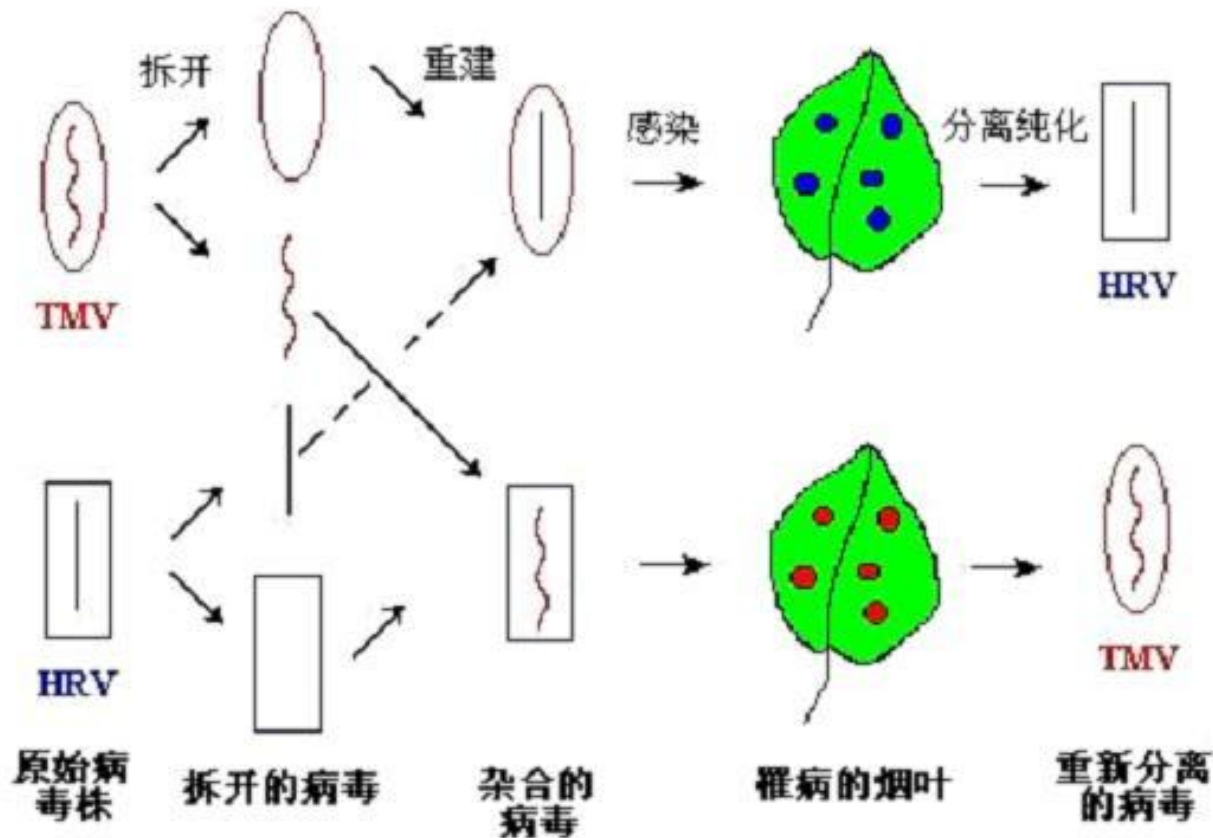
2. 噬菌体感染实验

- 1952年 Alfred D.Hershey 和 Martha Chase 用 ^{32}P 标记病毒的DNA，用 ^{35}S 标记病毒的蛋白质外壳，证实了 T_2 噬菌体的DNA是遗传物质。



3.植物病毒的重建实验

- 1956年 H.Fraenkel-Conrat 用含 RNA 的烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 所进行的拆分与重建实验证明 RNA 也是遗传的物质基础。



8.2 微生物的基因组结构

- 基因组 (genome) 是指存在于细胞或病毒中的所有基因。细菌在一般情况下是一套基因, 即单倍体 (haploid); 真核微生物通常是有两套基因又称二倍体 (diploid)。
- 基因组通常是指全部一套基因。由于现在发现许多非编码序列具有重要的功能, 因此目前基因组的含义实际上是指细胞中基因以及非基因的DNA序列的总称, 包括编码蛋白质的结构基因、调控序列以及目前功能还尚不清楚的DNA序列。
- 微生物基因组随不同类型表现出多样性。

微生物与几种代表生物的基因组

生物	基因数	基因组大小 (bp)
MS2噬菌体 (MS2 phage)	3	3×10^3
λ 噬菌体 (λ phage)	50	5×10^4
T4噬菌体 (T4 phage)	150	2×10^5
生殖道支原体 (<i>Mycoplasma genitalium</i>)	473	0.58×10^6
詹氏甲烷球菌 (<i>Methanococcus jannaschii</i>)	1682	1.66×10^6
幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)	1590	1.66×10^6
嗜热碱甲烷杆菌 (<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>)	1855	1.75×10^6
流感嗜血菌 (<i>Haemophilus influenzae</i>)	1760	1.83×10^6
闪烁古生球菌 (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)	2436	2.18×10^6
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	3700	4.2×10^6
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	4100	4.7×10^6
黄色粘球菌 (<i>Mycococcus xanthus</i>)	8000	9.4×10^6
啤酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	5800	13.5×10^6
脉孢菌属 (<i>Neurospora</i>)	>5000	60×10^6
果蝇 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	12000	165×10^6
<i>Mus musculus</i> (一种脊索动物)	70000	3300×10^6
<i>Nicotiana tobacum</i> (一种烟草)	43000	4500×10^6
拟南芥菜 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	16000~33000	$(70\sim145) \times 10^6$
人 (human)	50000~100000	30×10^9

8.2.1 大肠杆菌的基因组

- 大肠杆菌基因组为双链环状的DNA分子。在细胞中以紧密缠绕成的较致密的不规则小体（拟核，nucloid）形式存在于细胞中，其上结合有类组蛋白蛋白质和少量RNA分子，使其压缩成脚手架形的（scaffold）致密结构（大肠杆菌DNA分子长度是其菌体长度的1000倍，必须以一定的形式压缩进细胞中）。
- 基因组全序列测定于1997年由Wisconsin大学的Blattner 等人完成。

大肠杆菌基因组结构特点

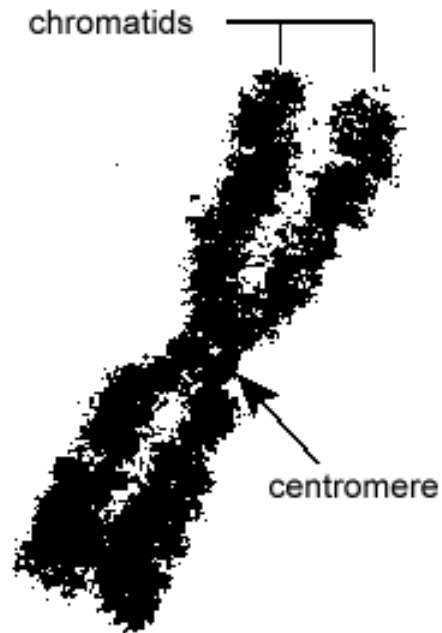
- 1.遗传信息的连续性
- 个别细菌（鼠沙门氏菌和犬螺杆菌）和古生菌的 rRNA 和 tRNA 含有内含子或间隔序列，其他绝大部分原核生物不含内含子，遗传信息是连续的而不是中断的。
- 2.功能相关的结构基因组成操纵子
- 大肠杆菌共有2584个操纵子，基因组测序推测出2190个操纵子。如此多的操纵子结构可能与原核基因表达多采用转录调控有关。此外，有些功能相关的RNA基因也串联在一起，如构成核糖体的三种RNA基因转录在同一转录产物中，依次是16S rRNA-23S rRNA-5S rRNA。三种RNA在核糖体中的比例是1：1：1。

- 3. 结构基因的单拷贝及rRNA 基因的多拷贝
- 大肠杆菌有7个rRNA操纵子其特征都与基因组的复制方向有关即按复制方向表达。7个rrn 就有6个分布在双向复制起点oric(83min)附近，有利于核糖体的快速组装。
- 4. 基因组的重复序列少而短
- 原核生物基因组存在一定数量的重复序列，但比真核生物少得多，重复序列一般为4~40 bp，重复程度十多次、上千次不等。

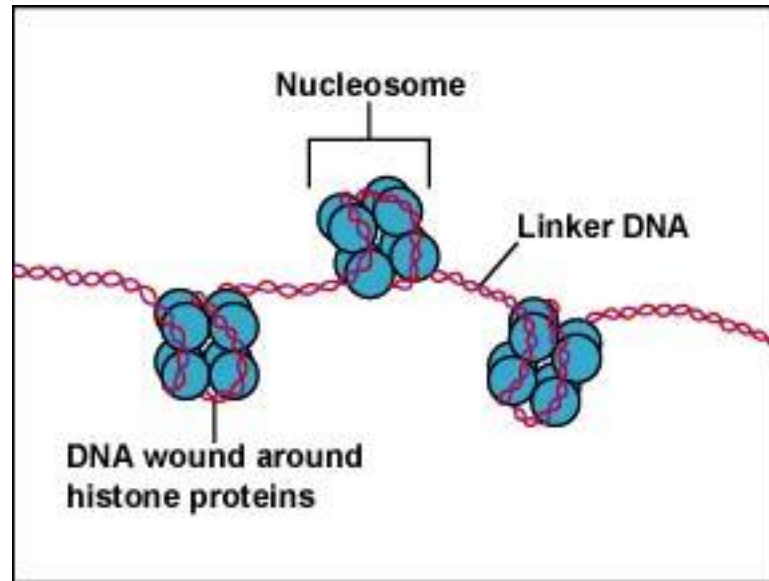
8.2.2 啤酒酵母的基因组

- 啤酒酵母是单细胞真核生物，1997年，有欧洲、美国、加拿大和日本共96个实验室的633为科学家是艰苦努力完成了全基因组的测序工作。是第一个完成测序的真核生物基因组。
- 基因组大小 13.5×10^6 bp，分布在16个不连续的染色体中。
- 酵母菌的DNA与四种主要的组蛋白（H2A、H2B、H3、H4）结合构成染色质（chromatin）的14bp核小体核心DNA；染色体DNA上有着丝粒（centromere）和端粒（telomere）没有明显的操纵子结构，有间隔区或内含子序列。

Replicating Eukaryotic Chromosome



Nucleosome



- The DNA in eukaryotic cells is packaged in a highly organized way. It consists of a basic unit called a nucleosome, a beadlike structure with 146 base pairs of DNA wrapped around eight histone molecules. The nucleosomes are linked to one another by a segment of DNA approximately 60 DNA base pairs long.

酵母菌基因组的特点

- 高度重复
- tRNA有250个拷贝。rRNA只位于XII号染色体的近端粒处，每个长9137 bp，有100~200个拷贝。
- 较高同源性的DNA重复序列称为遗传丰余（genetic redundancy）——一种进化的策略（有备无患）。

8.2.3 詹氏甲烷球菌的基因组

- 詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*) 属于古菌，发现于1982年。生活在2600m深， 2.63×10^7 Pa (260个大气压)，94°C的海底火山口附近。1996年由美国基因组研究所 (The Institute for Genomic Research, 简称TIGER) 和其他5个单位共40人联合完成了该菌的基因组全测序工作。这是完成的第一个古菌和自养型生物的基因组序列。根据对该菌全基因组序列分析结果完全证实了1977年由Woese等人提出的三界学说。

詹氏甲烷球菌基因组的特点

- 詹氏甲烷球菌只有40%左右的基因与其他二界生物有同源性，其中有的类似于真细菌，有的类似于真核生物，有的二者融合。
- 古菌在基因组结构上类似于细菌。詹氏甲烷球菌有 1.66×10^6 bp的 环形染色体DNA，具有1682个编码蛋白质ORF；功能相关的基因组成操纵子共转录成一个多顺反子转录子；有2个rRNA 操纵子；37个tRNA 基因，基本上无内含子；无核膜。
- 负责信息传递的基因类似于真核生物。转录起始系统、RNA聚合酶的亚基组成及序列、启动子结构、翻译延伸因子、复制起始因子均与真核生物相似。古菌还含有5个组蛋白基因。

8.3 质粒和转座因子

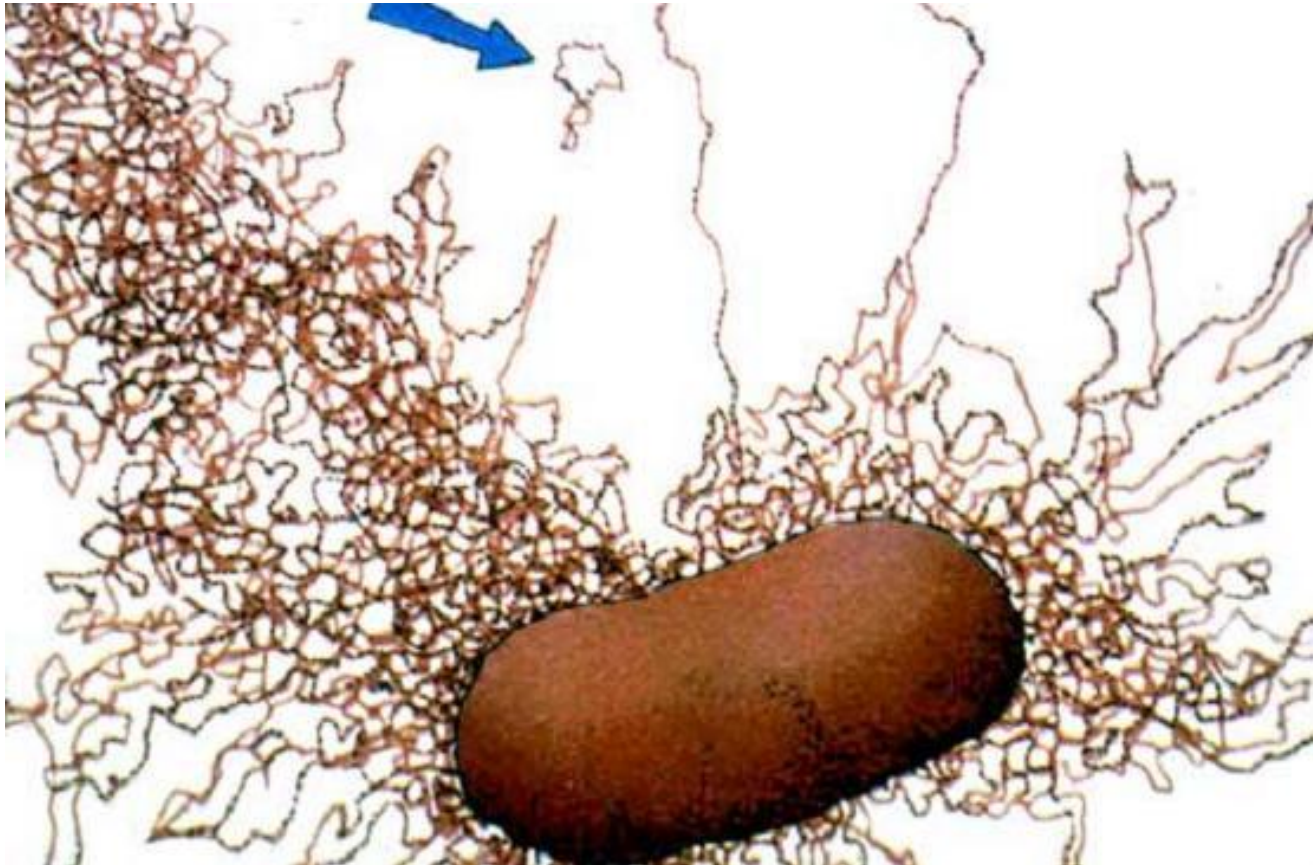
- 质粒 (plasmid) 和转座因子 (transposable element) 都是细胞中除染色体以外的另外两类遗传因子。前者是一种独立于染色体外，能进行自主复制的细胞质遗传因子，主要存在于各种微生物细胞中；后者是位于染色体或质粒上的一段能改变自身位置的DNA序列，广泛分布于原核和真核细胞中。

8.3.1 质粒



- 1.质粒的分子结构
- 通常以共价闭合环状 (covalently closed circular,CCC) 的超螺旋双链DNA分子存在于细胞中，从细胞中分离的质粒大多是三种构型即CCC型、OC型 (open circular)、L型 (linear form)。近年来在疏螺旋体、链霉菌和酵母菌中也发现了线形双链DNA质粒和RNA质粒。质粒分子大小范围1 kb~1000 kb。

Plasmid



2.质粒的主要类型

- 质粒所含有的基因对宿主细胞一般是非必须的，只是在某些特殊条件下，质粒能赋予宿主细胞以特殊的机能，从而使宿主得到生长优势。
- 根据质粒所编码的功能和赋予宿主的表型效应，可将其分为不同的类型。

- 1、致育因子 (fertility factor, F因子)：又称F质粒，大小约100kb，是最早发现的一种与大肠杆菌的有性生殖现象（结合作用）有关的质粒。
- 2、抗性因子 (resistance factor, R因子)：包括抗药性和抗重金属两大类。
- 3、Col质粒 (colicinogenic factor)：产大肠杆菌素因子，能编码大肠杆菌素 (colicin) 属于细菌毒素 (bacteriocin)。
- 4、Ti质粒 (tumor inducing plasmid)
- 5、代谢质粒 (metabolic plasmid)
- 6、隐秘质粒 (cryptic plasmid)：不显示任何表型效应。只有通过物理的方法，如凝胶电泳检测细胞抽提液等方法才能发现。酵母的2 μ m质粒。

根据质粒的拷贝数、宿主范围分：

- 高拷贝数质粒 (high copy number plasmid)：每个宿主细胞中可以有10~100个拷贝。又称松弛型质粒 (relaxed plasmid)。
- 低拷贝数质粒 (low copy number plasmid)：每个宿主细胞中可以有1~4个拷贝。又称严谨型质粒 (stringent plasmid)。
- 窄宿主范围质粒 (narrow host range plasmid)：复制起始点 (origin of replication) 较特异。
- 广宿主范围质粒 (broad host range plasmid)：复制起始点不太特异。
- 附加体 (episome)：能整合进染色体而随染色体的复制而进行复制且又能脱离的质粒。

3.质粒的不亲和性 (incompatibility)

- 细菌通常含有一种或多种稳定遗传的质粒，这些质粒即为彼此亲和的 (compatible)。如果将一种类型的质粒通过接合或其他方式 (转化) 导入某一合适的但已含另一种质粒的宿主细胞，只经少数几代后，大多数子细胞只含有其中一种质粒，那么这两种质粒是不亲和的 (incompatibility)。
- 根据某些质粒在同一细菌中能否并存的情况，可将质粒分成许多不亲和群 (incompatibility group)，能在同一细菌中并存的质粒属于不同的不亲和群，而在同一细菌中不能并存的质粒属于同一不亲和群。
- 当两种同一不亲和群的质粒共处同一细胞时，其中一种由于不能复制因而在细胞的不断分裂过程中被稀释 (diluted out) 或被消除 (curing)。

8.3.2 转座因子

- 转座因子 (transposable element) 是细胞中能改变自身位置的一段DNA序列。广泛存在于原核和真核细胞中。

原核和真核生物中的转座因子

原核生物

插入序列：IS

转座子：Tn

病毒：Mu

真核生物

酵母：sigma

酵母：TY

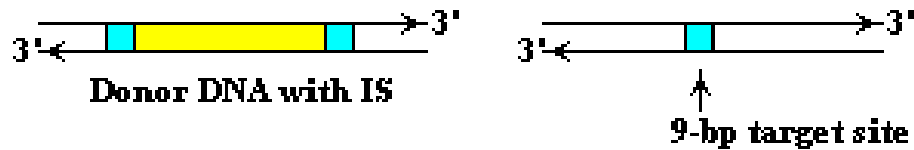
果蝇：copia,P

玉米：Ac

逆转录病毒：劳氏肉瘤、HIV

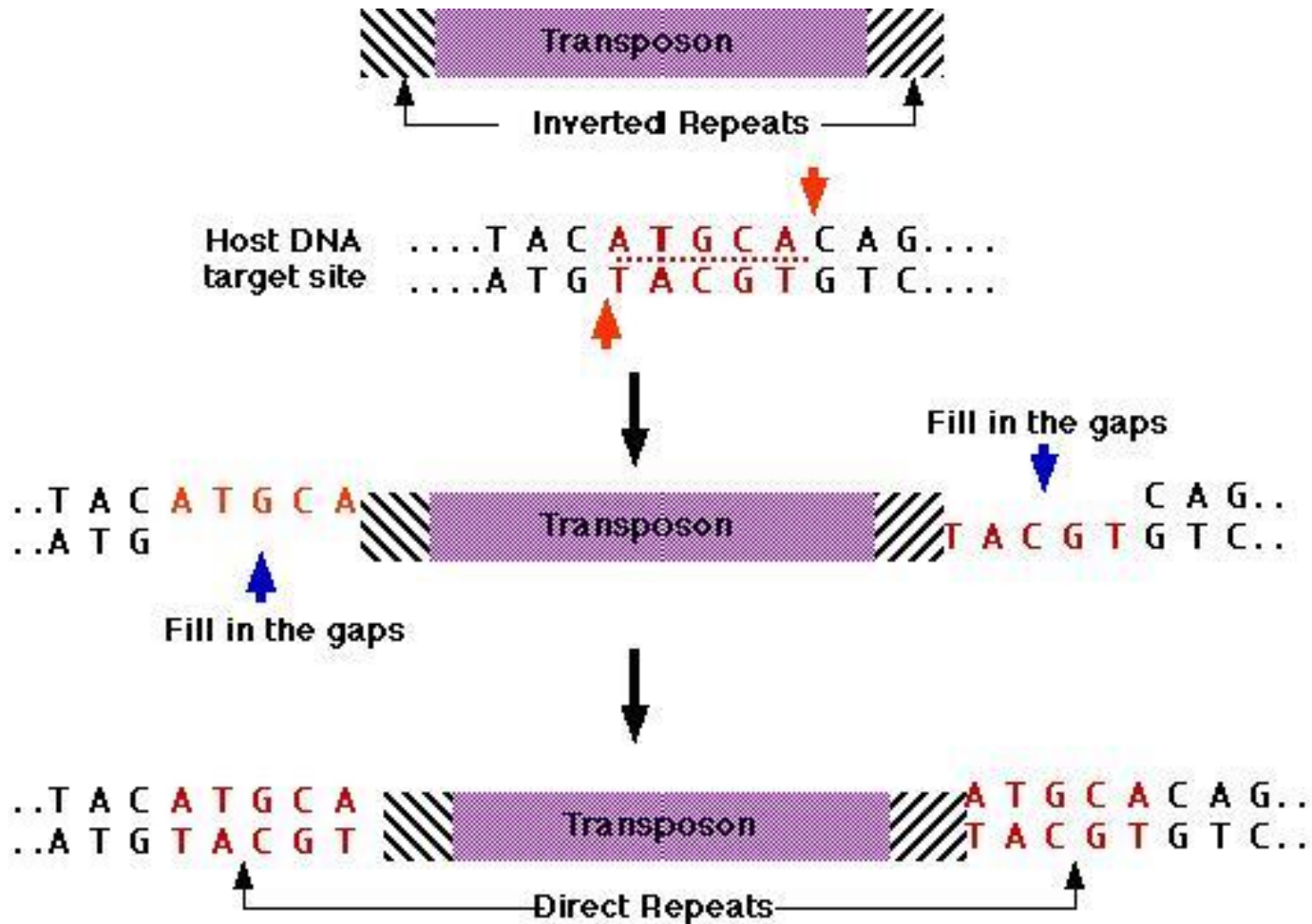
原核生物中的转座因子有三种类型

- 插入序列 (insertion sequence, IS)



- 转座子 (transposon, Tn)
- 某些特殊病毒 (Mu, D108)

Transposition



转座的遗传学效应

- 1、插入突变
- 2、产生染色体畸变
- 3、基因的移动和重排

8.4 基因突变和诱变育种

- 8.4.1 基因突变 (gene mutation)
- 生物体内遗传物质的分子结构发生的可遗传的变化。
- 1、突变类型
 - 营养突变型 (auxotroph)
 - 抗性突变型 (resistant mutant)
 - 条件致死突变型 (conditional lethal mutant)
 - 形态突变型 (morphological mutant)
 - 抗原突变型 (antigenic mutant)
 - 产量突变型

2、突变率 (mutation rate)

- 每一细胞在每一世代中发生某一性状突变的几率。
- 突变率一般为 $10^{-6} \sim 10^{-9}$ 。

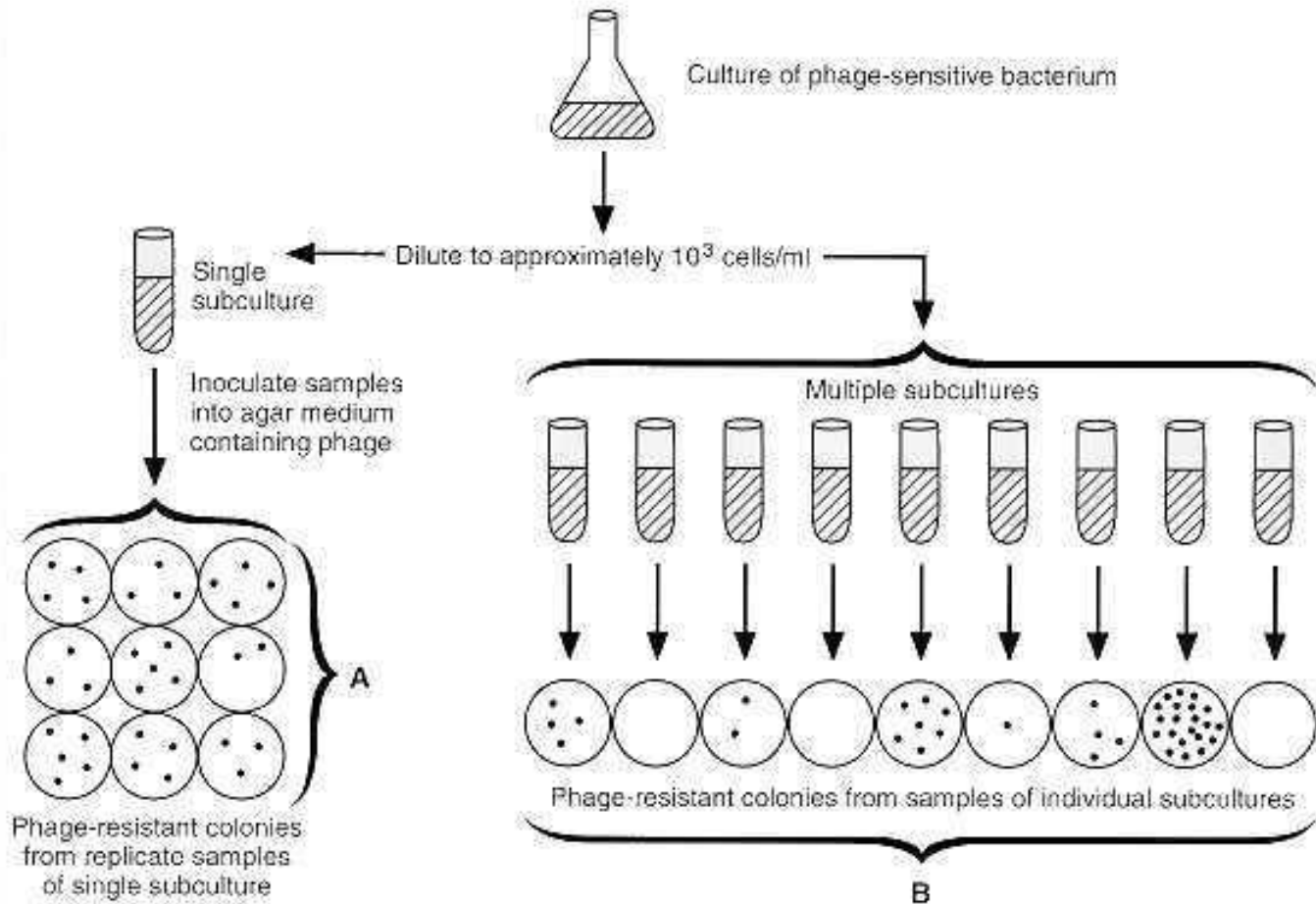
3、突变的特点

- 不对应性
- 自发性
- 稀有性
- 独立性
- 诱变性
- 稳定性
- 可逆性

4、基因突变的自发性和不对应性的证明

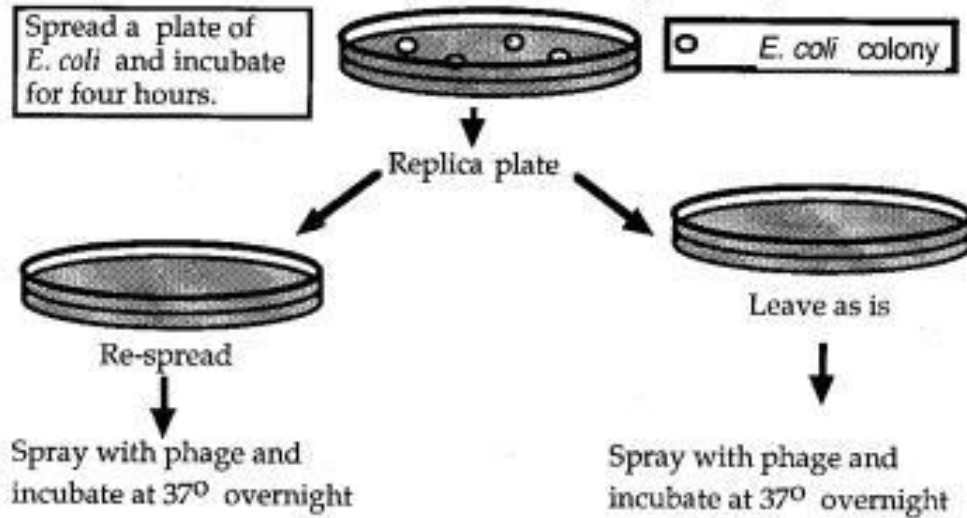
- 变量试验 (fluctuation test)
- 涂布试验 (Newcombe experiment)
- 平板影印培养试验 (replica plating)

Fluctuation test



涂布试验

Newcombe Spread - Transparency 1

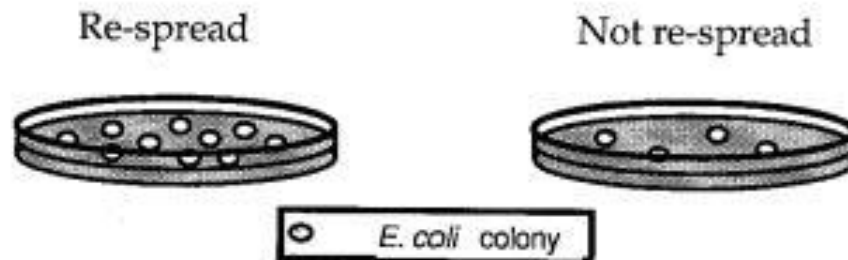


If bacteria develop resistance to phage as a result of exposure to the phage then ...

If bacteria have preexisting mutations for resistance to the phage then ...

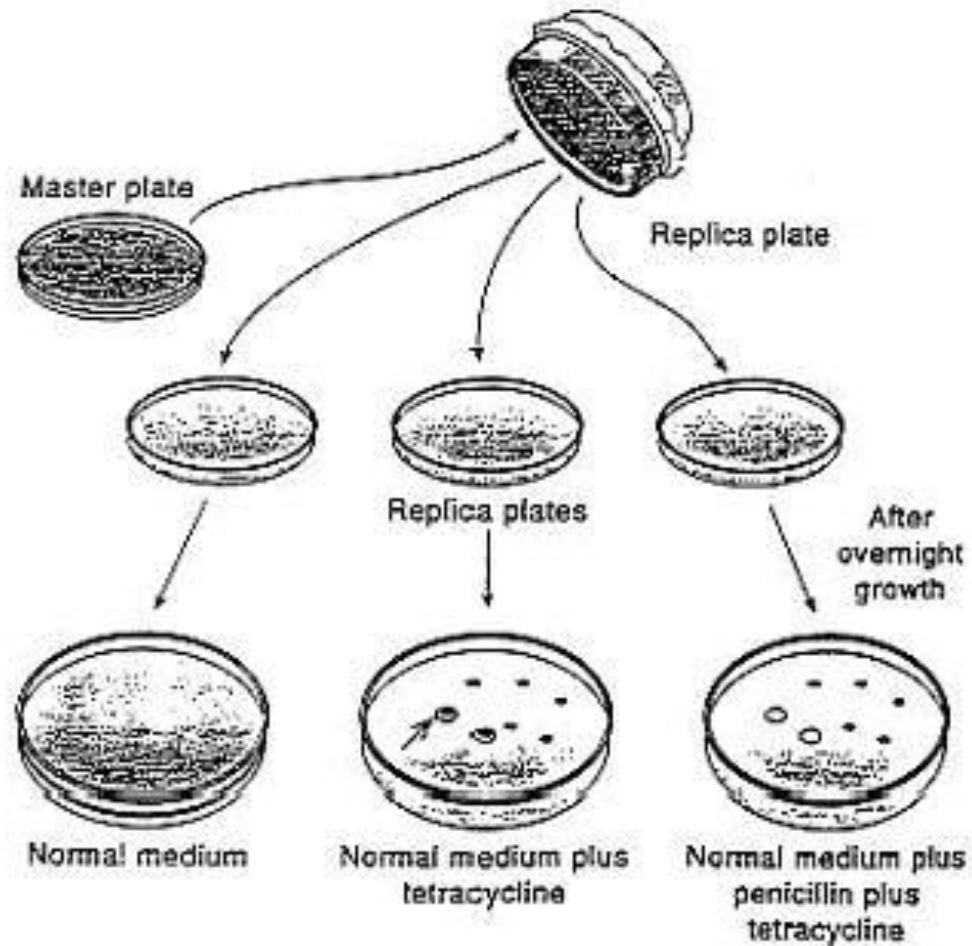
Newcombe Spread - Transparency 2

Results after incubation



The experimental design is flawed. The flaw is...
To correct this flaw ...

Replica plating



5、基因突变的机制

- 1) 诱变机制
 - 碱基的置换 (substitution) : 分为转换 (transition) 和颠换 (transversion)
 - 移码突变 (frame-shift mutation)
 - 染色体畸变 (chromosomal aberration)
- 2) 自发突变机制
 - 背景辐射和环境因素的诱变
 - 微生物自身有害代谢产物的诱变效应
 - 互变异构效应
 - 环出效应

6、紫外线对DNA的损伤及其修复

- 紫外线 (U.V., ultraviolet ray) 主要作用是使同链DNA的相邻嘧啶间形成共价结合的胸腺嘧啶二聚体。
 - 光复活作用 (photoreactivation)
 - 暗修复作用 (dark repair) 又称切除修复 (excision repair)

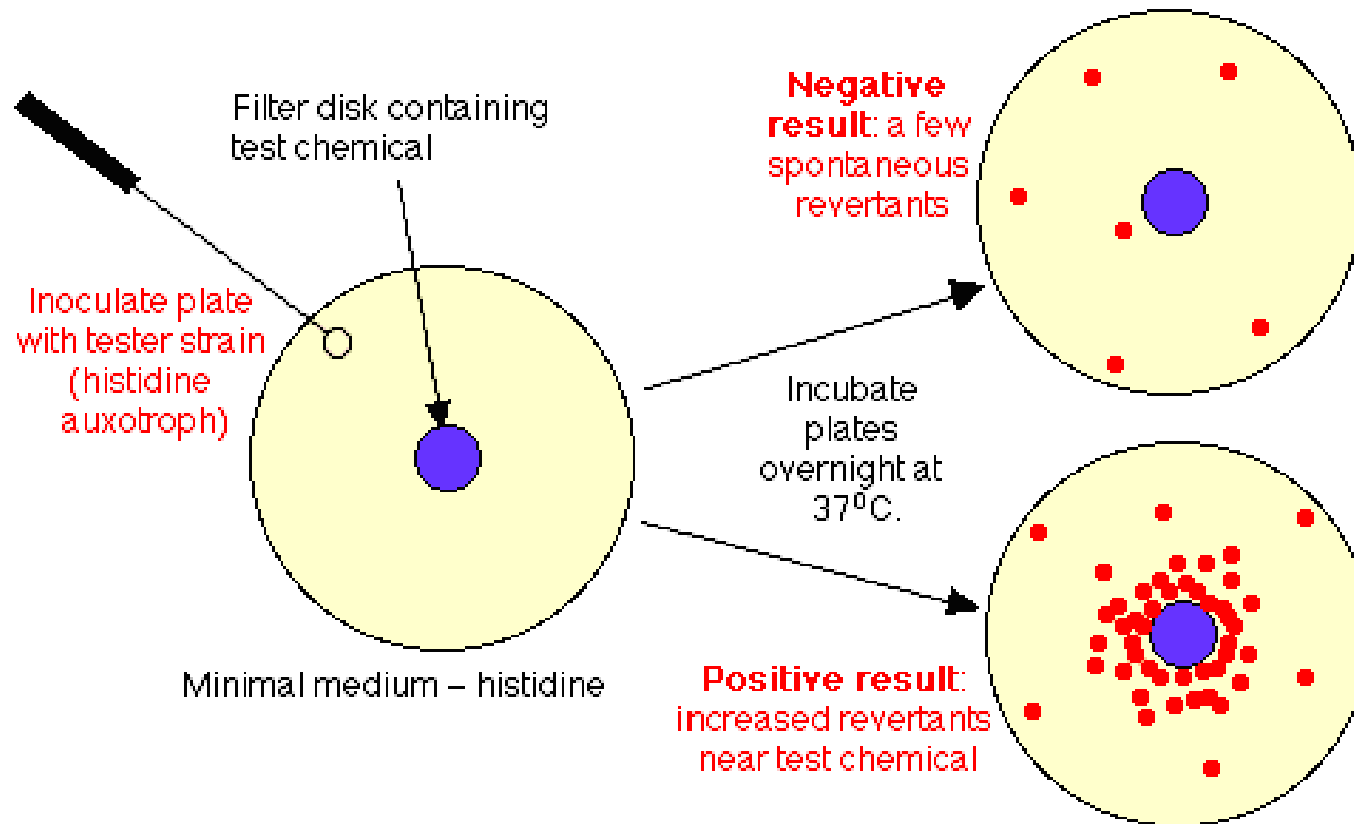
8.4.2 突变与育种

- 1.自发突变与育种
 - ①从生产中选育
 - ②定向培养优良品种
- 采用梯度平板法 (gradient plate) 筛选抗代谢拮抗物的突变株。
- 2.诱变育种——利用物理或化学诱变剂 (mutagen) 处理均匀而分散的微生物细胞群, 促进其突变率显著提高, 然后采用简便、快速和高效的筛选方法, 从中挑选少数符合育种目的的突变株, 以供生产实践或科学实验之用。

诱变育种工作中应遵循的原则

- 1.选择简便有效的诱变剂：潜在化学致癌剂的测定——艾姆斯试验 (Ames test)
- 2.挑选优良的出发菌株 (original strain)
- 3.处理单孢子 (或单细胞) 悬液
- 4.选用最适诱变剂量
- 5.充分利用复合处理的协同效应 (synergism)
- 6.利用和创造形态、生理与产量间的相关指标
- 7.设计或采用高效筛选方案或方法

Ames test



营养缺陷突变株的筛选

- 1.与筛选营养缺陷突变株有关的三类培养基
- ①基本培养基 (MM,minimal medium)
- ②完全培养基 (CM, complete medium)
- ③补充培养基 (SM,supplemental medium)

2.与筛选营养缺陷突变有关的三类遗传型个体

- ①野生型 (wild type)
- ②营养缺陷型 (auxotroph)
- ③原养型 (prototroph)

3.营养缺陷型的筛选方法

- ①诱变剂处理
- ②淘汰野生型
- ③检出缺陷型
- ④鉴定野生型

8.5 基因重组

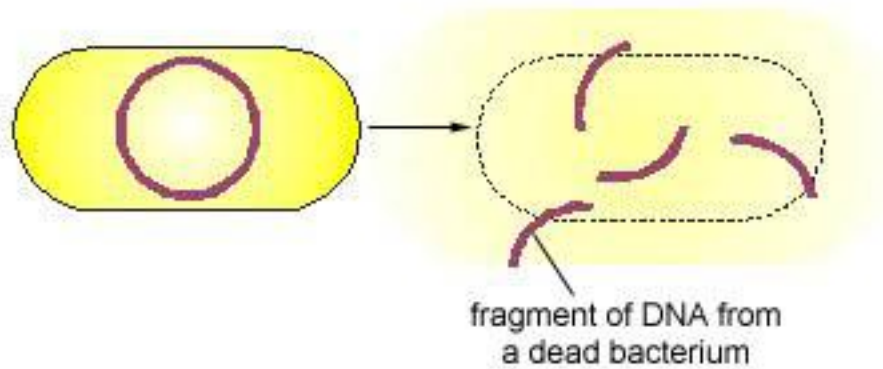
- 基因重组 (gene recombination)：把两个不同性状的遗传基因转移到一起，经过遗传分子间的重新组合，形成新遗传型个体的方式。

8.5.1 原核微生物的基因重组

1.转化（transformation）

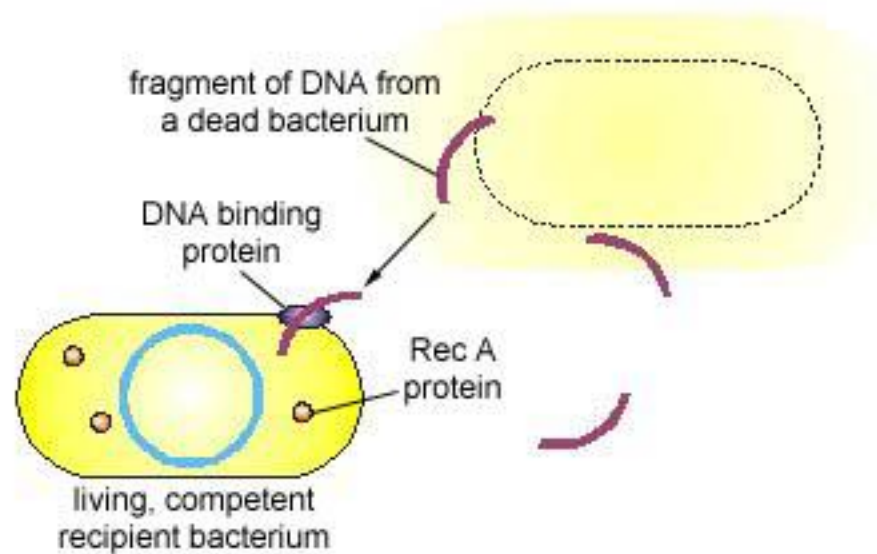
- 受体菌（receptor）接受供体菌（donor）的DNA片段而获得部分新的遗传性状的现象。

Transformation



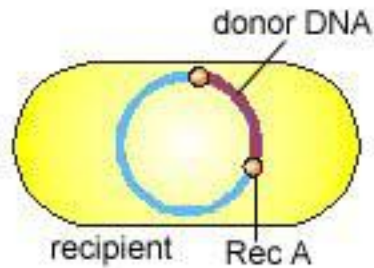
A donor bacterium dies and is degraded.

Transformation



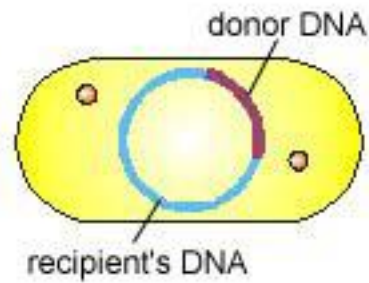
A fragment of DNA from the dead donor bacterium binds to DNA binding proteins on the cell wall of a competent, living recipient bacterium.

Transformation



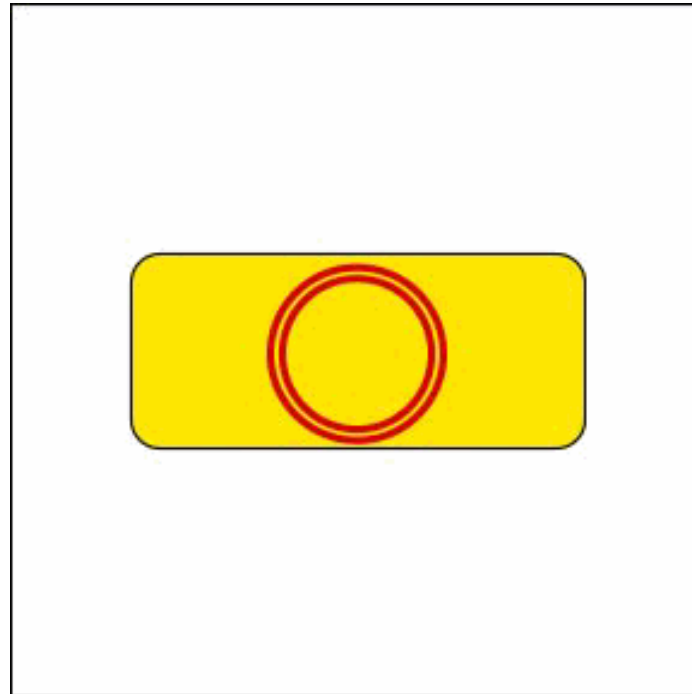
The Rec A protein promotes genetic exchange between a fragment of the donor's DNA and the recipient's DNA.

Transformation



Exchange is complete.

Transformation



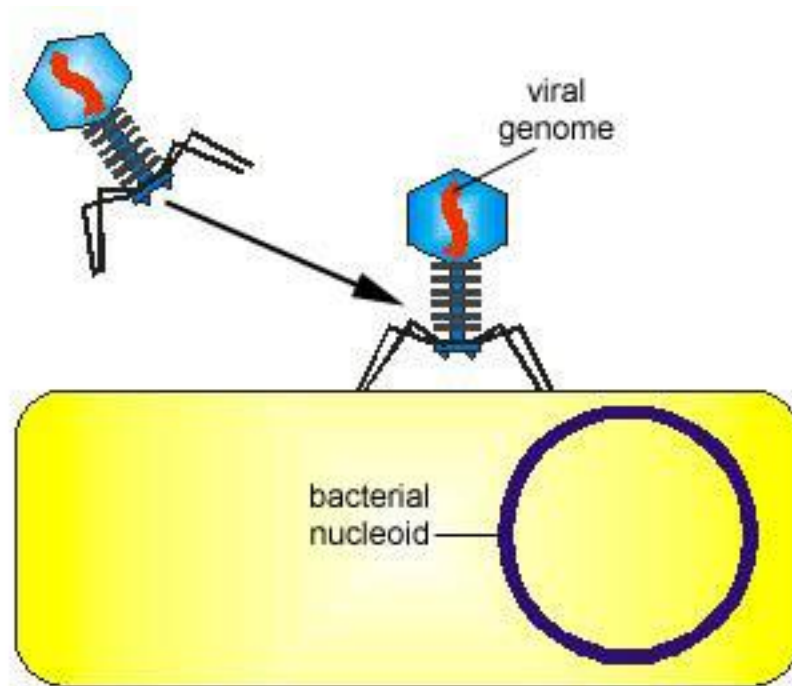
2.转导 (transduction)

- 通过完全或部分缺陷噬菌体的媒介，把供体细胞的DNA小片段携带到受体细胞中，通过交换与整合，从而使后者获得前者部分遗传性状的现象。

Generalized transduction

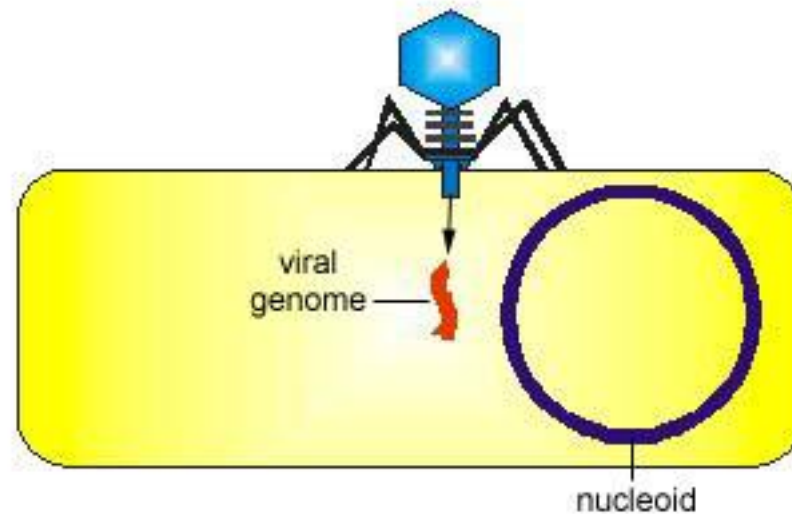
- During the replication of a lytic phage, the capsid sometimes assembles around a small fragment of bacterial DNA.
- When this phage infects another bacterium, it injects the fragment of donor bacterial DNA into the recipient where it can be exchanged for a piece of the recipient's DNA.
- Plasmids, such as the penicillinase plasmid of *Staphylococcus aureus*, may also be carried in a similar manner.

Generalized Transduction by Lytic Bacteriophage



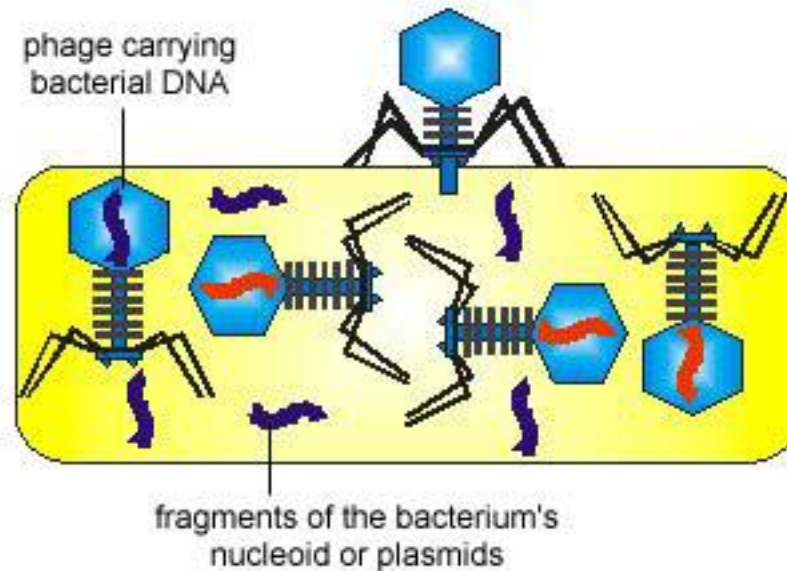
A lytic bacteriophage adsorbs to a susceptible bacterium.

Generalized Transduction by Lytic Bacteriophage



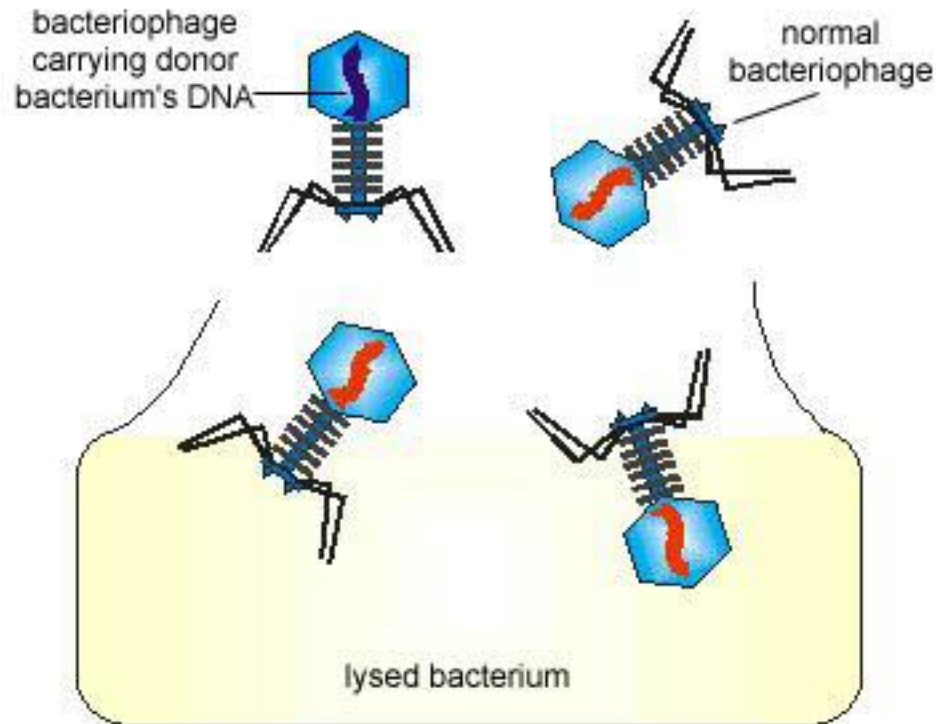
The bacteriophage genome enters the bacterium. The genome directs the bacterium's metabolic machinery to manufacture bacteriophage components and enzymes.

Generalized Transduction by Lytic Bacteriophage



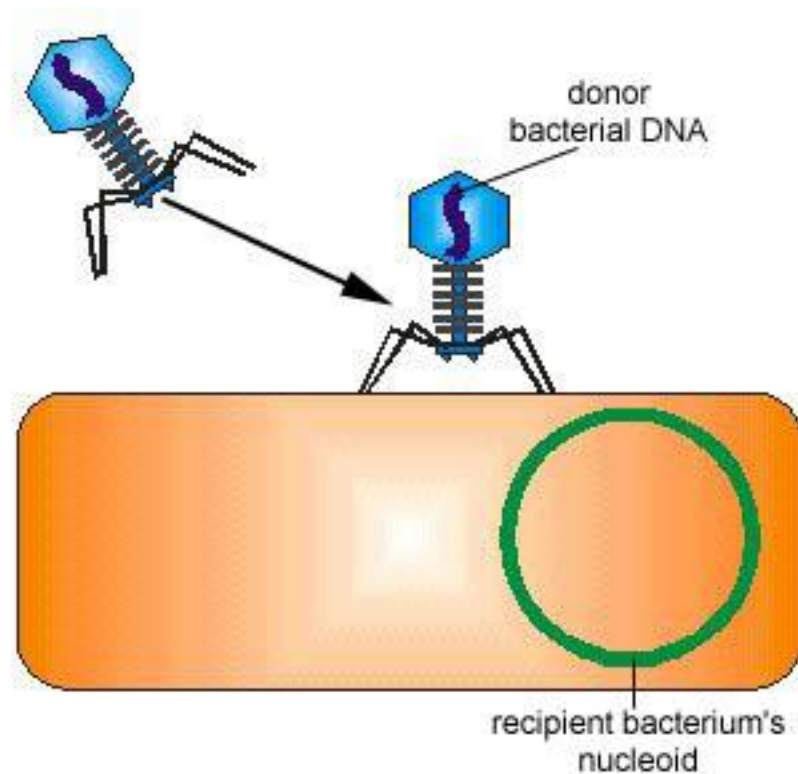
Occasionally, a bacteriophage head or capsid assembles around a fragment of donor bacterium's nucleoid or around a plasmid instead of a phage genome by mistake.

Generalized Transduction by Lytic Bacteriophage



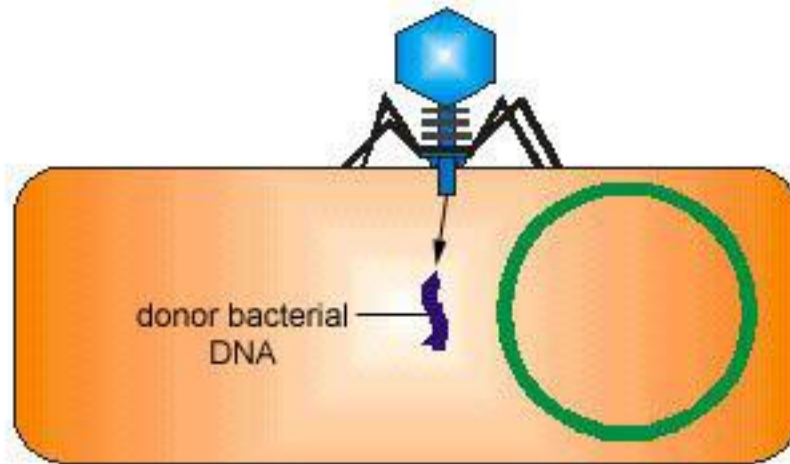
The bacteriophages are released

Generalized Transduction by Lytic Bacteriophage



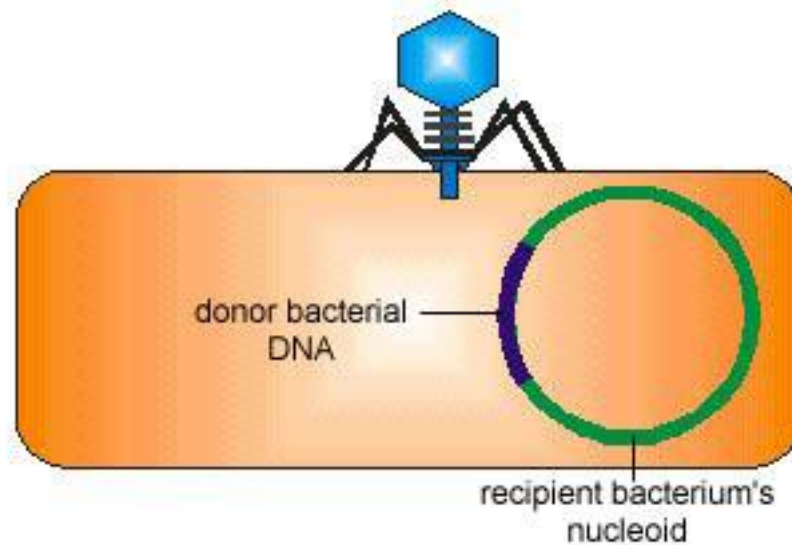
The bacteriophage carrying the donor bacterium's DNA adsorbs to a recipient bacterium.

Generalized Transduction by Lytic Bacteriophage



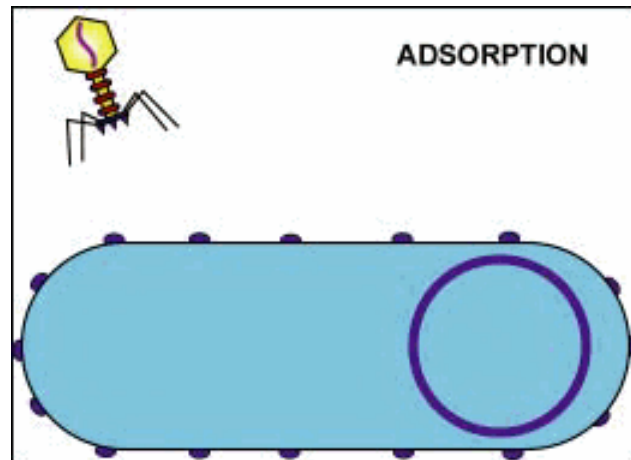
The bacteriophage inserts the donor bacterium's DNA it is carrying into the recipient bacterium.

Generalized Transduction by Lytic Bacteriophage



The donor bacterium's DNA is exchanged for some of the recipient's DNA.

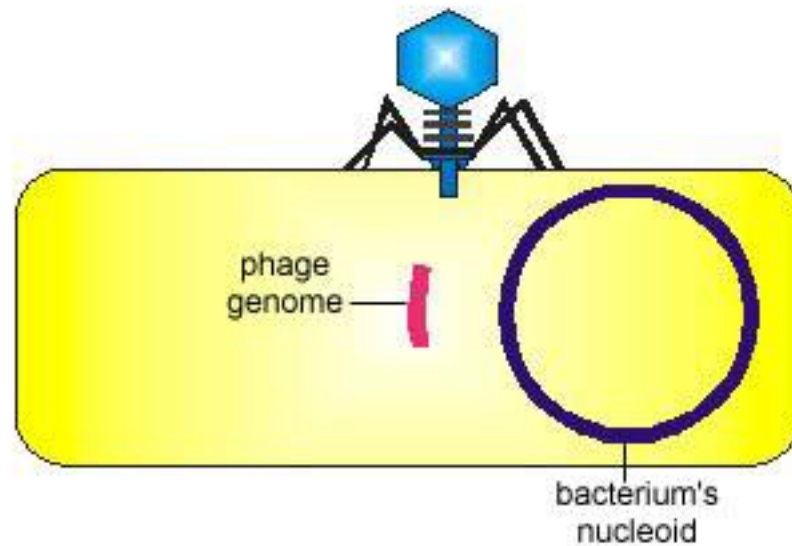
Generalized Transduction by Lytic Bacteriophage



Specialized transduction

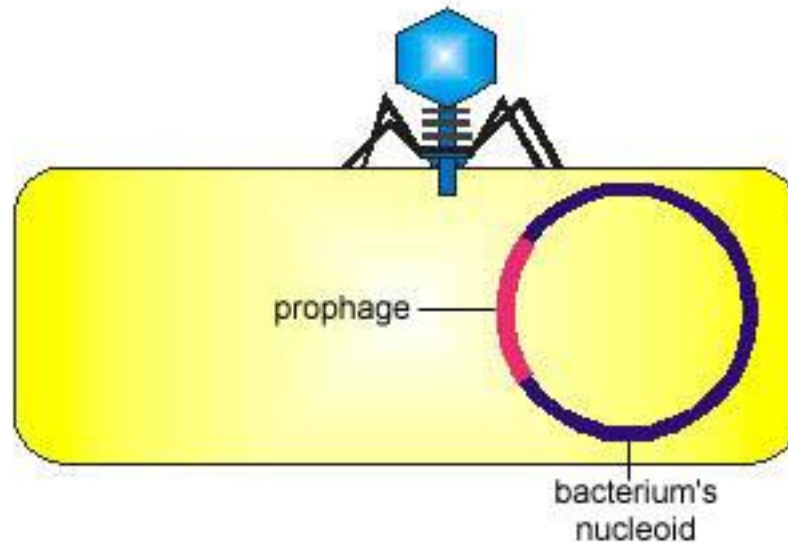
- This may occur occasionally during the lysogenic life cycle of a temperate bacteriophage.
- During spontaneous induction, a small piece of bacterial DNA may sometimes be exchanged for a piece of phage genome (which remains in the nucleoid).
- This piece of bacterial DNA replicates as a part of the phage genome and is put into each phage capsid.
- The phages are released, adsorb to recipient bacteria, and inject the donor bacterium DNA/phage DNA complex into the recipient bacterium where it inserts into its nucleoid.

Specialized Transduction by Temperate Bacteriophage



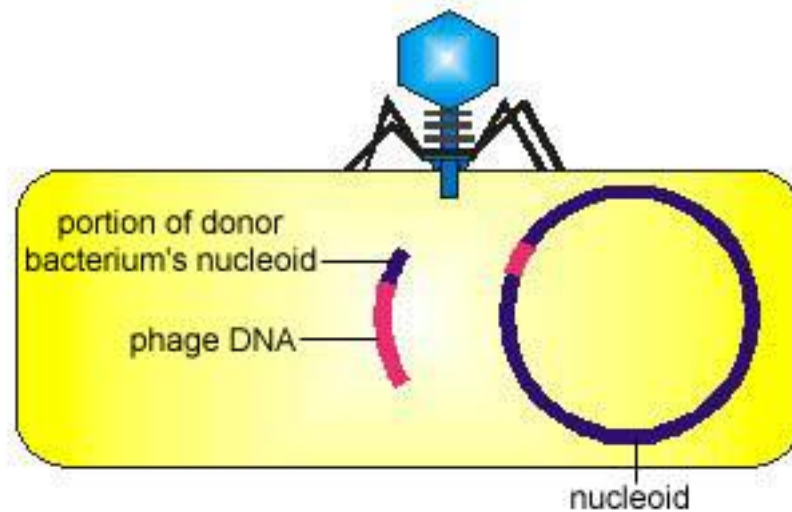
A temperate bacteriophage adsorbs to a susceptible bacterium and injects its genome.

Specialized Transduction by Temperate Bacteriophage



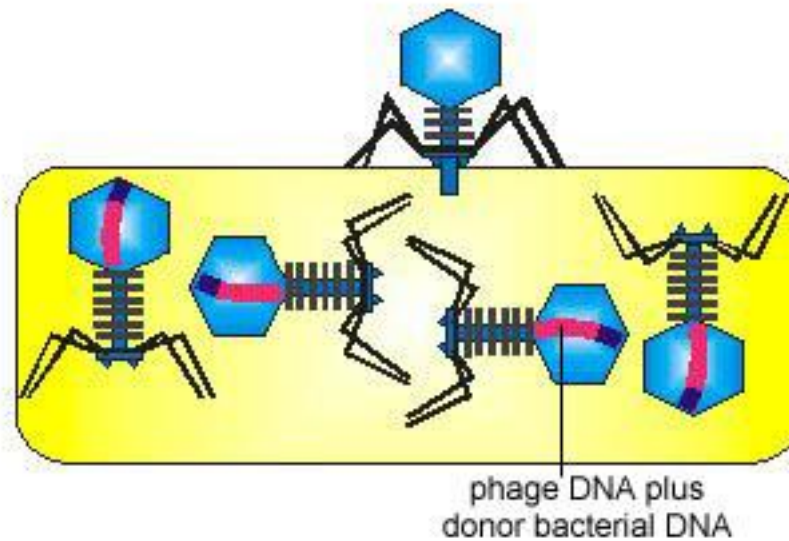
- The bacteriophage inserts its genome into the bacterium's nucleoid to become a prophage.

Specialized Transduction by Temperate Bacteriophage



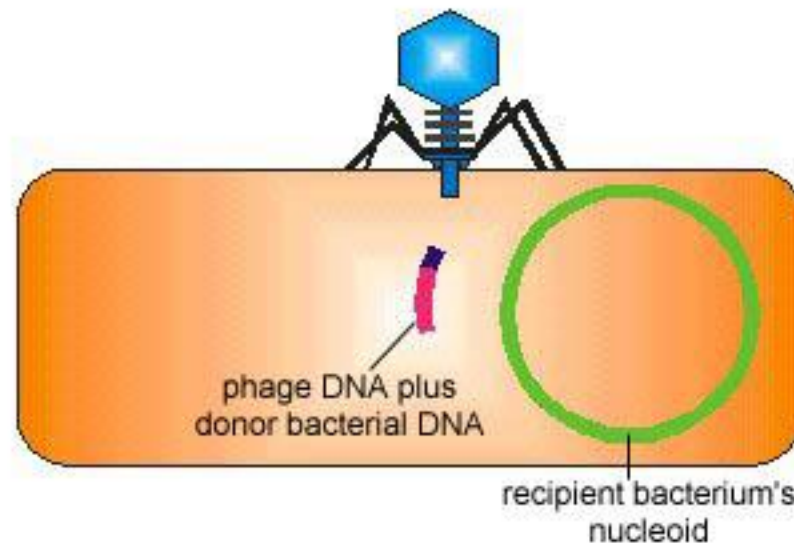
- Occasionally during spontaneous induction, a small piece of the donor bacterium's DNA is picked up as part of the phage's genome in place of some of the phage DNA which remains in the bacterium's nucleoid.

Specialized Transduction by Temperate Bacteriophage



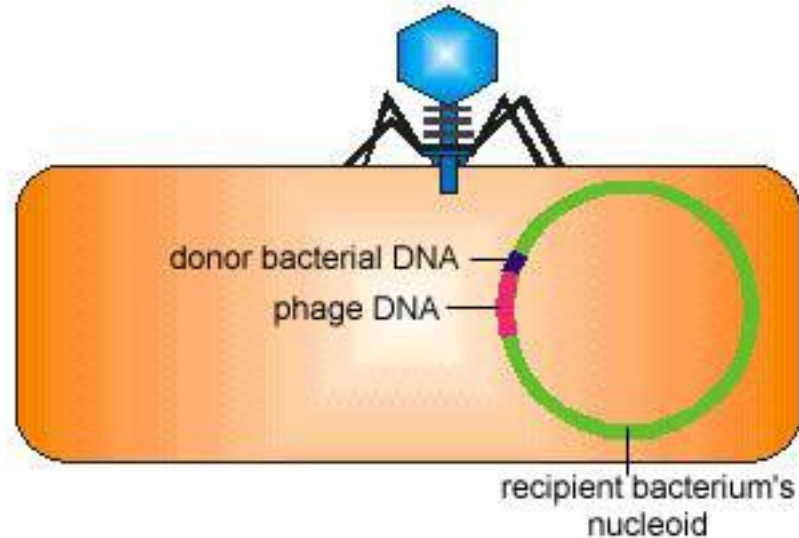
- As the bacteriophage replicates, the segment of bacterial DNA replicates as part of the phage's genome. Every phage now carries that segment of bacterial DNA.

Specialized Transduction by Temperate Bacteriophage



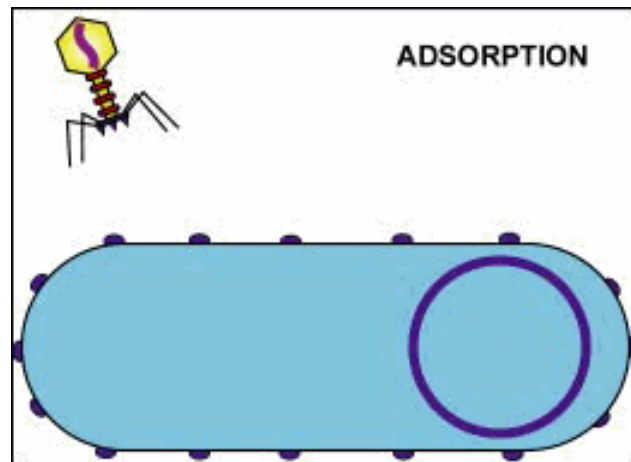
- The bacteriophage adsorbs to a recipient bacterium and injects its genome.

Specialized Transduction by Temperate Bacteriophage



- The bacteriophage genome carrying the donor bacterial DNA inserts into the recipient bacterium's nucleoid.

Specialized Transduction by Temperate Bacteriophage



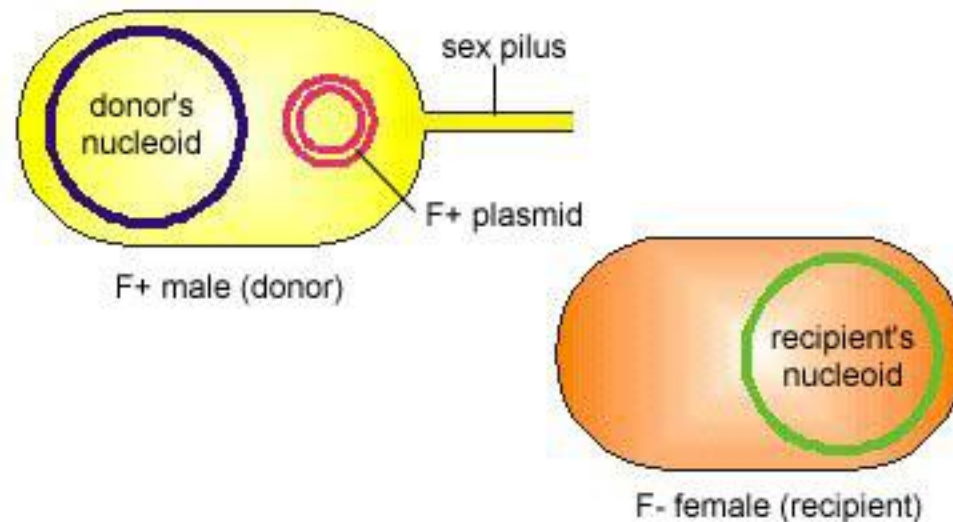
3.接合（conjugation）

- 供体菌（“雄”）通过其性菌毛与受体菌（“雌”）相接触，前者传递不同长度的单链DNA给后者，并在后者细胞中进行双链化或进一步与核染色体发生交换、整合，从而使后者获得供体菌的遗传性状的现象。

F⁺ conjugation

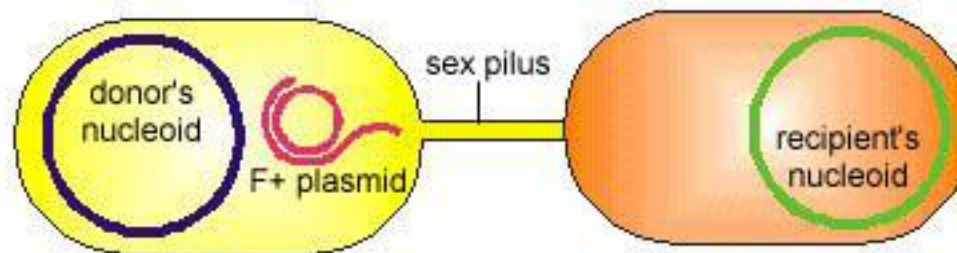
- This results in the transfer of an F⁺ plasmid (coding only for a sex pilus) but not chromosomal DNA from a male donor bacterium to a female recipient bacterium.
- One plasmid strand enters the recipient bacterium while one strand remains in the donor. Each strand then makes a complementary copy.
- The recipient then becomes an F⁺ male and can make a sex pilus.
- Other plasmids present in the cytoplasm of the bacterium, such as those coding for antibiotic resistance, may also be transferred during this process.

F⁺ Conjugation



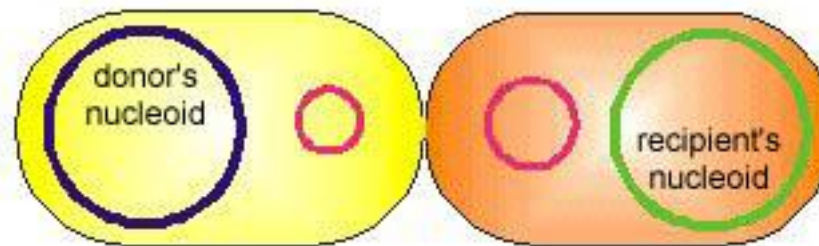
- The F⁺ male has an F⁺ plasmid coding for a sex pilus and can serve as a genetic donor.

F⁺ Conjugation



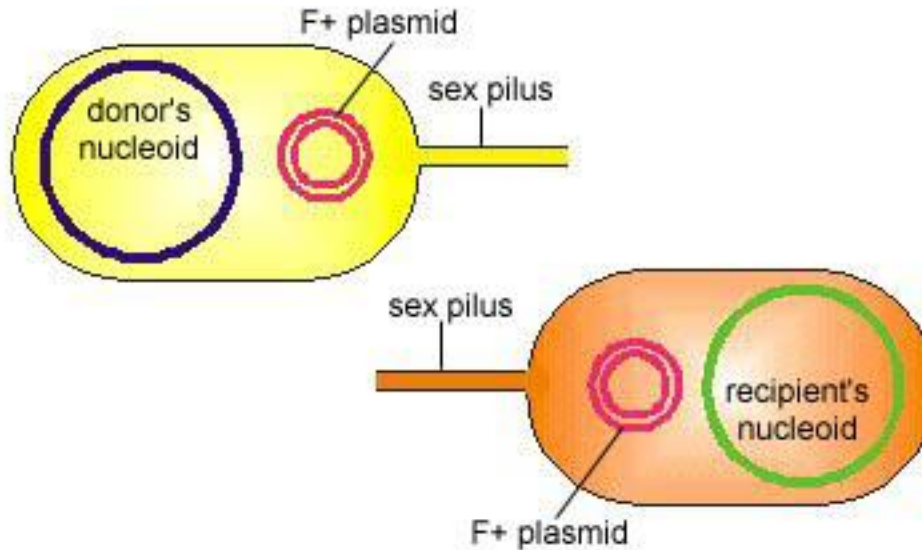
- The sex pilus adheres to an F⁻ female (recipient). One strand of the F⁺ plasmid breaks.

F⁺ Conjugation



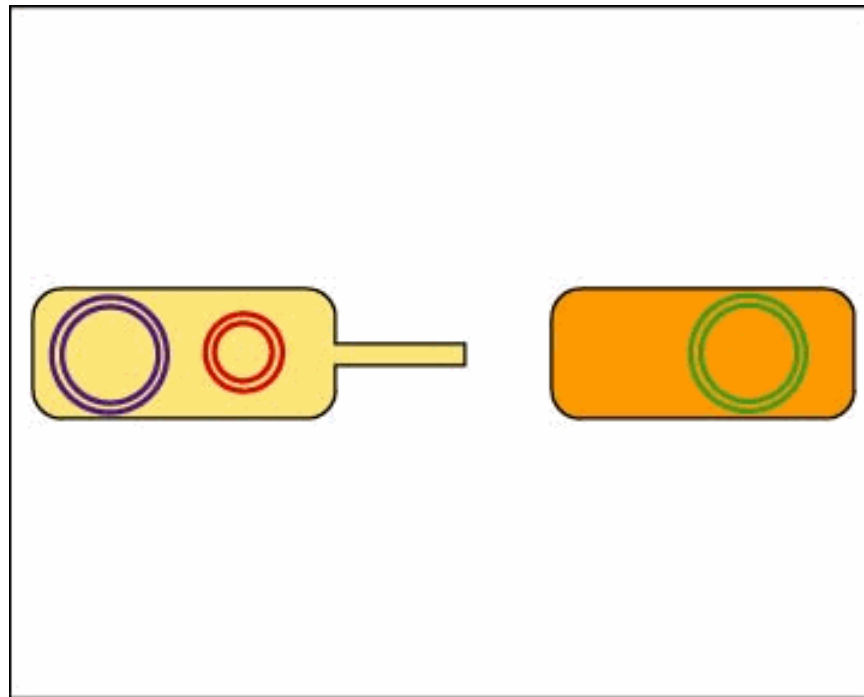
- The sex pilus retracts and a bridge is created between the two bacteria. One strand of the F⁺ plasmid enters the recipient bacterium.

F⁺ Conjugation



- Both bacteria make a complementary strand of the F⁺ plasmid and both are now F⁺ males capable of producing a sex pilus. There was no transfer of donor chromosomal DNA although other plasmids the donor bacterium carries may also be transferred during F⁺ conjugation.

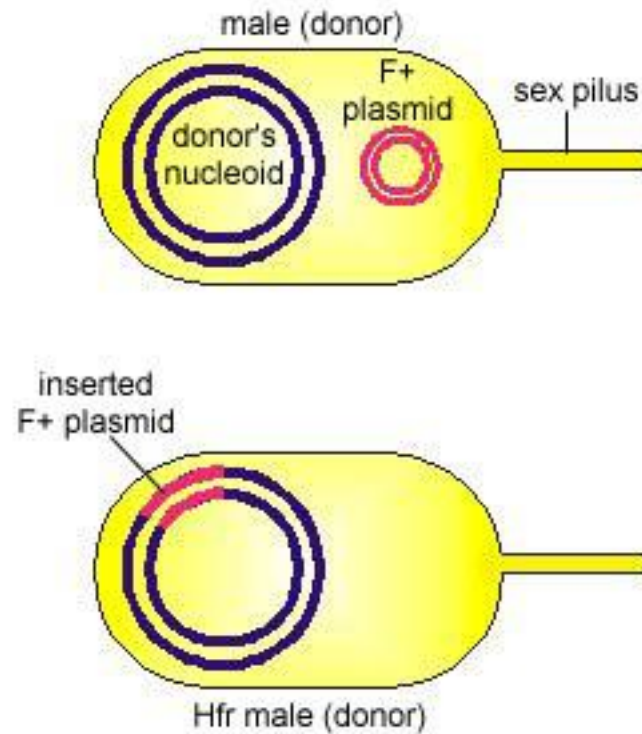
F⁺ Conjugation



Hfr (high frequency recombinant) conjugation

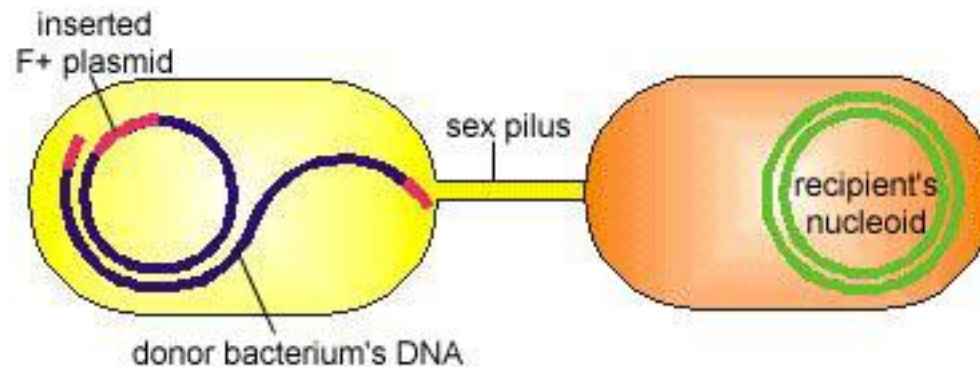
- An F⁺ plasmid inserts or integrates into the nucleoid to form an Hfr male.
- The nucleoid then breaks in the middle of the inserted F⁺ plasmid and one DNA strand begins to enter the recipient bacterium.
- The bacterial connection usually breaks before the transfer of the entire chromosome is completed so the remainder of the F⁺ plasmid seldom enters the recipient. As a result, there is a transfer of some chromosomal DNA, which may be exchanged for a piece of the recipient's DNA, but not maleness.

Hfr Conjugation



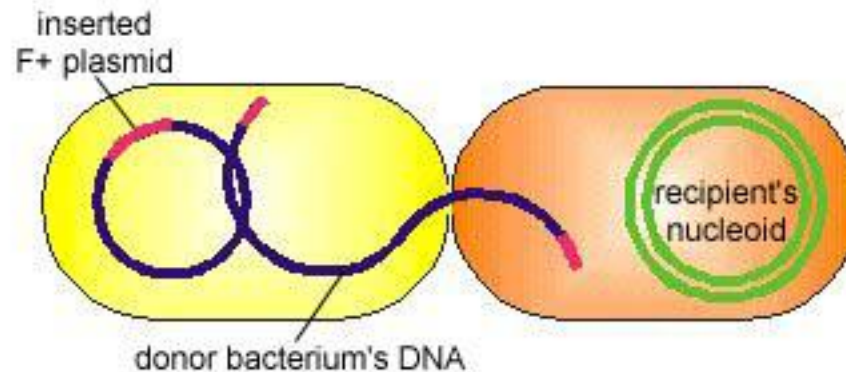
- An F+ plasmid inserts into the donor bacterium's nucleoid to form an Hfr male.

Hfr Conjugation



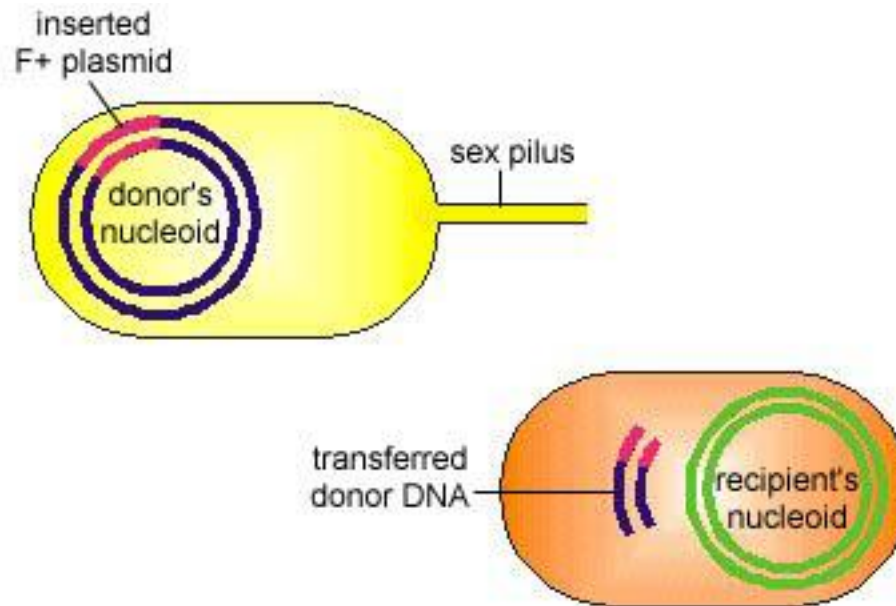
- The sex pilus adheres to an F⁻ female (recipient). One donor DNA strand breaks in the middle of the inserted F⁺ plasmid.

Hfr Conjugation



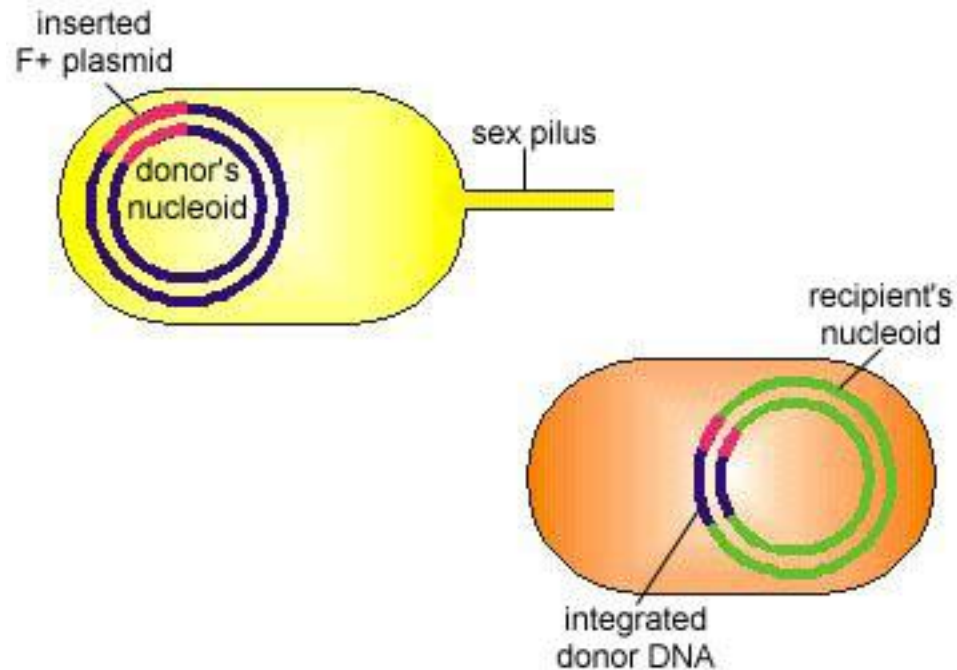
- The sex pilus retracts and a bridge forms between the two bacteria. One donor DNA strand begins to enter the recipient bacterium. The two cells break apart easily so the only a portion of the donor's DNA strand is usually transferred to the recipient bacterium.

Hfr Conjugation



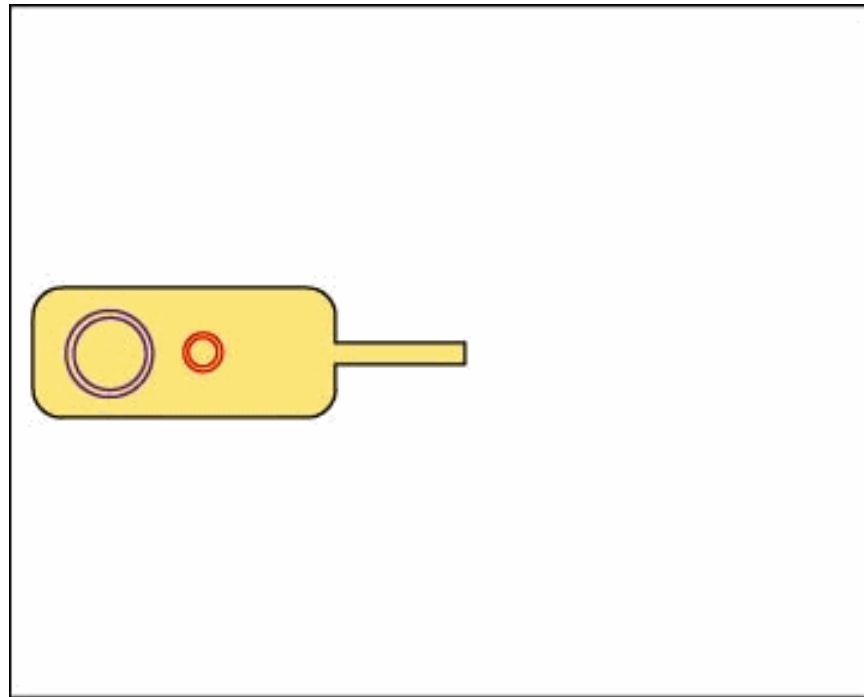
- The donor bacterium makes a complementary copy of the remaining DNA strand and remains an Hfr male. The recipient bacterium makes a complementary strand of the transferred donor DNA.

Hfr Conjugation



- The donor DNA fragment undergoes genetic exchange with the recipient bacterium's DNA. Since there was transfer of some donor chromosomal DNA but usually not a complete F⁺ plasmid, the recipient bacterium usually remains F⁻.

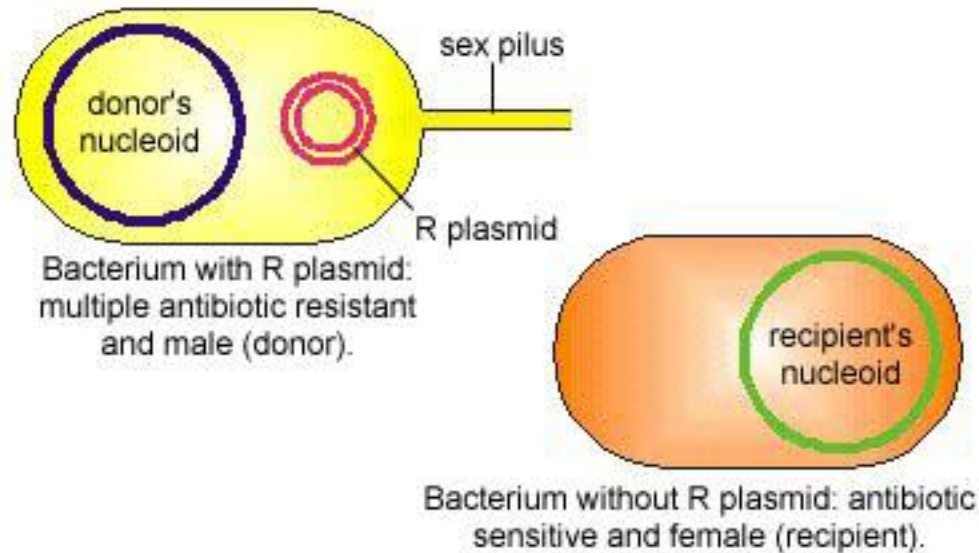
Hfr Conjugation



Resistance plasmid conjugation

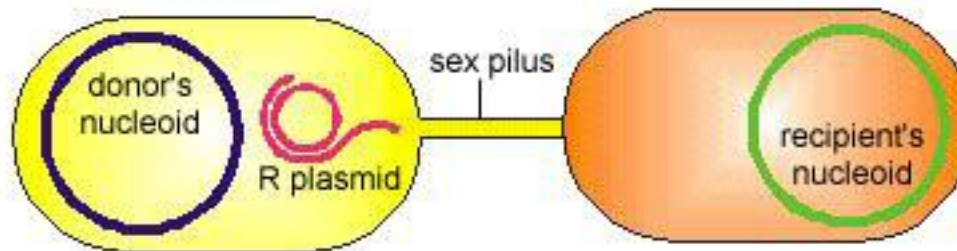
- This results in the transfer of a resistance plasmid (R-plasmid) from a donor bacterium to a recipient. One plasmid strand enters the recipient bacterium while one strand remains in the donor. Each strand then makes a complementary copy.
- The R-plasmid has genes coding for multiple antibiotic resistance and sex pilus formation. The recipient becomes multiple antibiotic resistant and male, and is now able to transfer R-plasmids to other bacteria.

R-Plasmid Conjugation



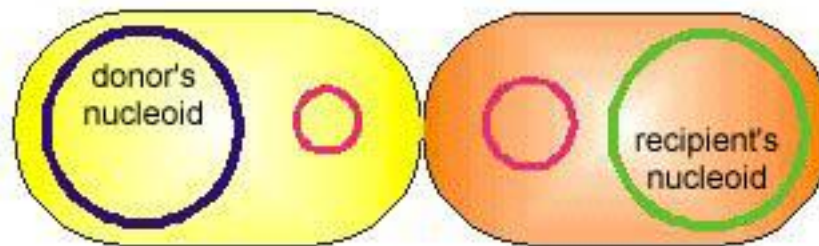
- The bacterium with an R-plasmid is multiple antibiotic resistant and can produce a sex pilus (serve as a genetic donor).

R-Plasmid Conjugation



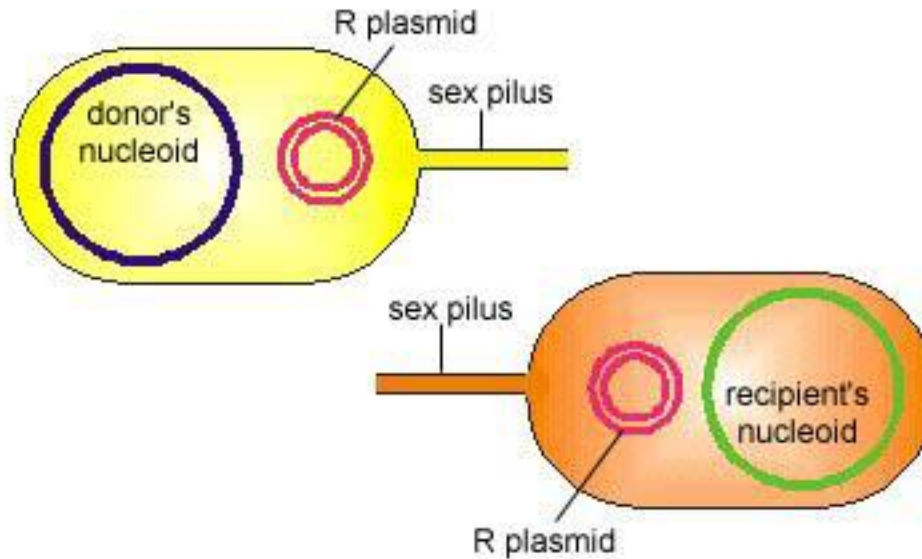
- The sex pilus adheres to an F⁻ female (recipient). One strand of the R-plasmid breaks.

R-Plasmid Conjugation



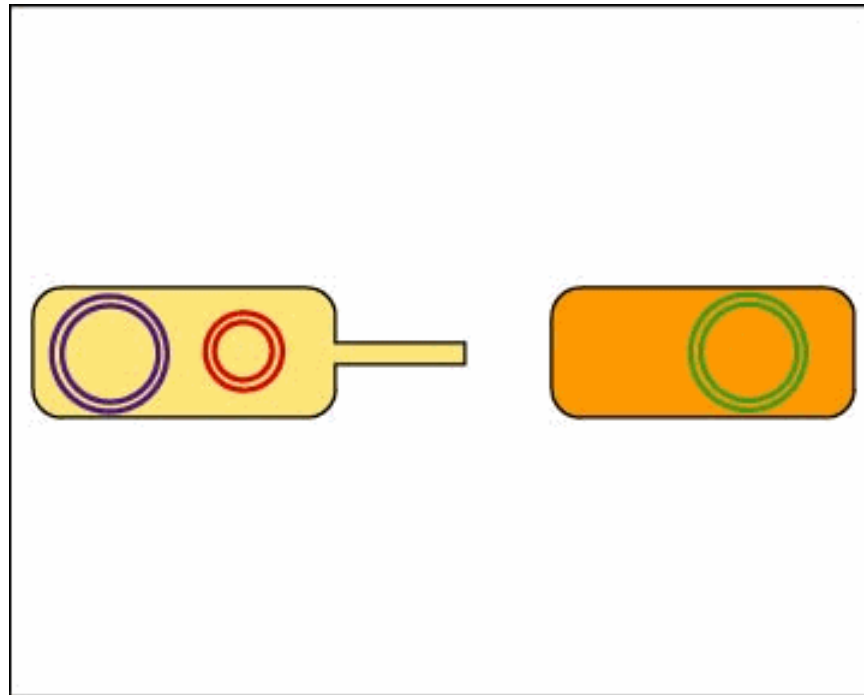
- The sex pilus retracts and a bridge is created between the two bacteria. One strand of the R-plasmid enters the recipient bacterium.

R-Plasmid Conjugation



- Both bacteria make a complementary strand of the R-plasmid and both are now multiple antibiotic resistant and capable of producing a sex pilus.

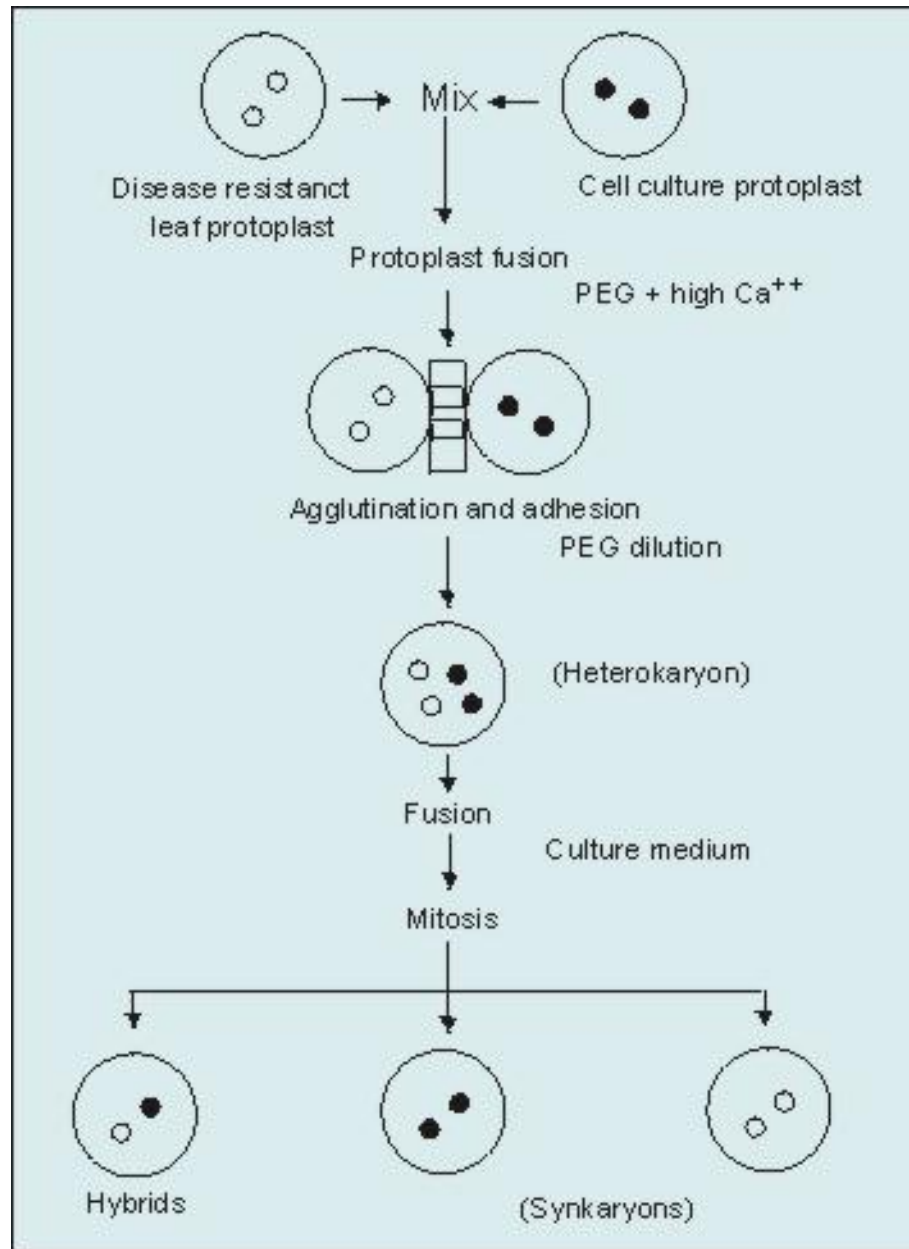
R-Plasmid Conjugation



4.原生质融合（protoplast fusion）

- 通过人为的方法，使遗传性状不同的两细胞的原生质发生融合，并进而发生遗传重组以产生同时带有双亲性状的、遗传性稳定的融合子（fusant）的过程。

原生质融合



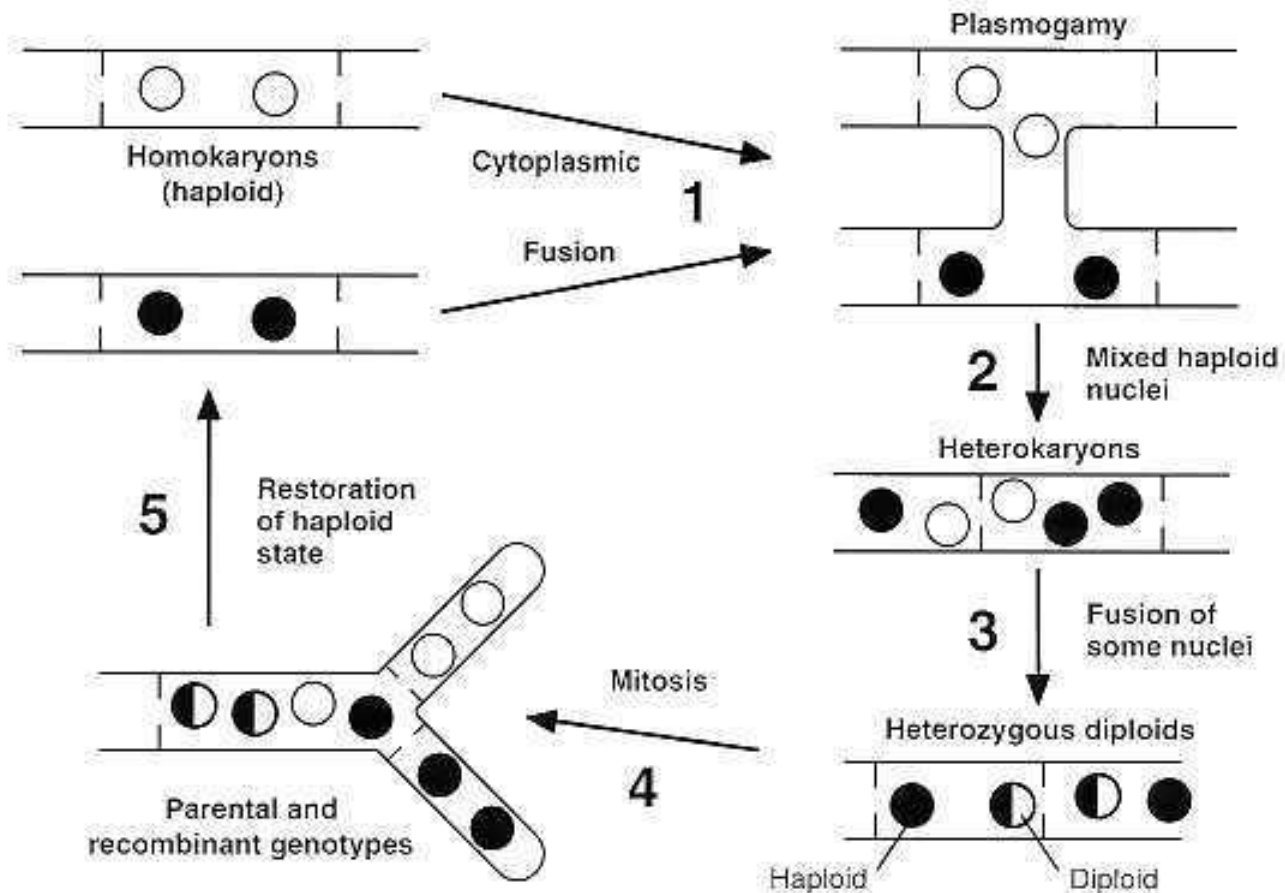
8.5.2 真核微生物的基因重组

- 1、有性杂交 (sexual hybridization) : 性细胞间的接合和随之发生的染色体重组, 并产生新遗传型后代的一种育种技术。
- 2、准性生殖 (parasexual reproduction 或 parasexuality) 与准性杂交 (parasexual hybridization) : 准性生殖是一种类似于有性生殖, 但更为原始的一种生殖方式, 它可使同种生物两个不同菌株的体细胞发生融合, 且不以减数分裂的方式而导致低频率的基因重组并产生重组子。常见于某些真菌, 尤其是半知菌中。代表: *Aspergillus nidulans*、*Neurospora crassa*

The parasexual cycle (genetic recombination without meiosis)

- 1、菌丝联结 (anastomosis) ；
- 2、形成异核体 (heterocaryon) ；
- 3、核融合 (nuclear fusion) 或核配 (caryogamy) ；
- 4、体细胞交换 (somatic crossing-over) 和单倍体化。

The parasexual cycle



(1) Hyphal conjugation (plasmogamy). (2) Heterokaryosis. (3) Nuclear fusion (karyogamy). (4) Mitotic recombination and nondisjunction. (5) Haploidization and nuclear segregation leading to homokaryosis.

8.6 基因工程

- 基因工程（genetic engineering）或重组DNA技术（recombinant DNA technology）是指对遗传信息的分子操作和施工，即把分离到的或合成基因经过改造，插入载体中，导入宿主细胞内使其扩增和表达，从而获得大量基因产物，或令生物表现出新的性状。
- 基因工程是在现代生物学、化学和化学工程学以及其他数理科学的基础上产生和发展起来的，并有赖于微生物学的理论和技术的发展 and 运用，微生物在基因工程的兴起和发展过程中起着不可替代的作用。

8.6.1 基因工程的发展历史

- 在20世纪70年代初开始出现，三项关键技术的建立为基因工程奠定了基础，这三项技术是：
 - DNA的特异切割
 - DNA的分子克隆
 - DNA的快速测序

DNA的特异切割

- 1970年Smith等人从*Hemophilus influenzae* 中分离出特异切割DNA的限制酶。

DNA的分子克隆

- 1972年Berg等将SV40DNA与噬菌体 λ 的基因相融合，最早组建成功DNA的重组体。
- 1973年Cohen和Boyer等将pSC101质粒作为载体与R质粒的四环素和卡那霉素的抗性基因相融合，并将重组体DNA转化大肠杆菌，首次实现了DNA的分子克隆。

DNA的快速测序

- 1975年Sanger实验室建立了酶法快速测定DNA序列的技术。
- 1977年Gilbert实验室又建立了化学测定DNA序列的技术。

第一个基因工程的产品

- 1977年Itakura 和Boyer用人工合成的生长激素释放抑制素（somatostatin,SMT）基因构建表达载体，并在大肠杆菌细胞内表达成功，得到第一个基因工程的产品。1982年，在建立转基因植物和转基因动物的技术上均获得重大突破。

8.6.2 基因工程的基本操作

- 1、目的基因的获得
 - 供体细胞DNA中分离
 - 由mRNA 反转录成 cDNA
 - 化学合成
- 2、载体的选择
- 3、目的基因与载体DNA的体外重组
- 4、重组载体引入受体细胞

8.6.3 基因工程的应用及展望

- 1、基因工程药物：
 - 重组胰岛素 (recombinant insulin)
 - 重组疫苗 (recombinant vaccines)
- 2、转基因植物 (transgenic plant)
- 3、转基因动物 (transgenic animals)
- 4、基因治疗 (gene therapy)
- 5、基因工程在微生物研究中的应用
- 6、基因工程研究展望

8.7 菌种的衰退、复壮和保藏

- 8.7.1 菌种的衰退与复壮
- 菌种的衰退 (degeneration) : 菌种有利性状的丧失或生活能力的减弱。
- 菌种的复壮 (rejuvenation) :
- 狭义的复壮: 在菌种已发生衰退的情况下, 通过纯种分离和测定生产性能等方法, 从衰退的群体中找出少数尚未衰退的个体, 以达到回复该菌原有典型性状的一种措施。
- 广义的复壮: 在菌种的生产性能尚未衰退前就经常有意识地进行纯种分离和生产性能的测定工作, 以期菌种的生产性能逐步提高。

衰退的防止

- 1、控制传代次数
- 2、创造良好的培养条件
- 3、利用不同类型的细胞进行接种传代
- 4、采用有效的菌种保藏方法

菌种的复壮

- 1、纯种分离
- 2、通过宿主体内生长进行复壮
- 3、淘汰已衰退的个体

8.7.2 菌种的保藏

- 菌种保藏 (preservation)：就是根据菌种特性及保藏的目的不同，给微生物菌株以特定的条件，使其存活而得以延续。
- 保藏的原则：
 - 1、挑选典型菌种 (type culture) 的优良纯种，最好采用其休眠体 (如分生孢子、芽孢等)。
 - 2、创造适合长期休眠的环境条件 (干燥、低温、缺氧、避光、缺乏营养、添加保护剂或酸度中和剂)

菌种保藏方法

- 1、传代培养保藏法
- 2、冷冻保藏法
- 3、干燥保藏法