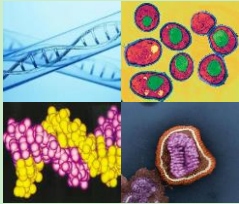




第八章 微生物的遗传与变异



Heredity and Variation of
Microorganisms

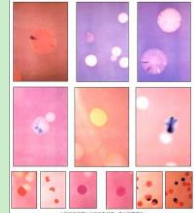
基本概念

- **遗传 (heredity)**: 亲代与子代之间性状相似的现象
- **变异 (variation)**: 子代与亲代或子代之间性状不同的现象
- 两者的关系:
 - 遗传保证物种的存在和延续, 保持了种属性状的相对稳定
 - 变异推动了物种的进化和发展, 产生变种和新种

生物界普遍发生的现象, 物种形成和生物进化的基础。

研究微生物遗传与变异的意义

- ✓ 促进现代分子生物学和生物工程学的发展
- ✓ 为育种工作提供了丰富的理论基础
- ✓ 使育种工作从不自觉到自觉、从低效到高效、从随机到定向、从近缘杂交到远缘杂交的方向发展。



第八章 微生物的遗传与变异

- 第一节 遗传变异研究概述
- 第二节 微生物的遗传物质
- 第三节 细菌的基因转移和重组
- 第四节 真菌的基因重组
- 第五节 微生物的突变
- 第六节 微生物遗传变异的应用
- 第七节 基因工程和合成生物学
- 第八节 菌种退化、复壮和保藏

第八章 微生物的遗传与变异

- 第一节 遗传变异研究概述
- 第二节 微生物的遗传物质
- 第三节 细菌的基因转移和重组
- 第四节 真菌的基因重组
- 第五节 微生物的突变
- 第六节 微生物遗传变异的应用
- 第七节 基因工程和合成生物学
- 第八节 菌种退化、复壮和保藏

第一节 遗传变异研究概述

一、DNA为遗传物质的3个典型实验—核酸水平上的研究

1. 世界上的第一个实验证明: **肺炎链球菌的转化实验** (1944年)
2. DNA是噬菌体遗传物质的直接证据: **噬菌体感染实验** (1953年)
3. RNA也是生物遗传物质的证明: **植物病毒的重建实验** (1956年)

思考: 为什么要以微生物作为研究遗传与变异的材料?

微生物的独特生物学特性

- ◆ 个体的体制极其简单
- ◆ 营养体一般都是单倍体
- ◆ 繁殖速度快
- ◆ 易于积累不同的中间代谢产物或终产物
- ◆ 菌落形态特征的可见性和多样性
- ◆ 环境条件对微生物群体中各个个体作用的直接性和均一性
- ◆ 易于形成营养缺陷型
- ◆ 各种微生物一般都有相应的病毒
- ◆ 存在多种处于进化过程中的原始有性生殖方式

1、肺炎链球菌转化实验



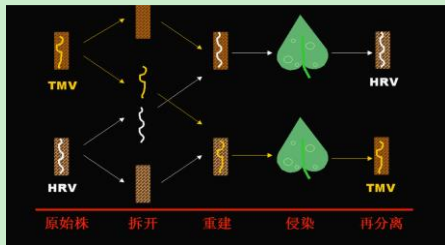
结论: S型细菌存在的转化物质, 通过某种方式进入R型细菌内, 并使R型细菌获得稳定的遗传性状

2、噬菌体侵染细菌实验



结论: ^{35}S 位于上清液中, 而 ^{32}P 存在于底部, 又一次证明遗传物质是DNA, 而不是蛋白质

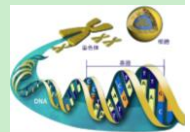
3、植物病毒的重建实验



结论: 遗传物质是RNA

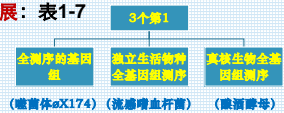
二、基因组学的蓬勃发展—分子水平上的研究

1. 双螺旋结构模型的建立 (1953年)
2. 分子遗传学的出现
3. 20世纪70年代“基因工程”问世
4. 20世纪80年代进入“基因测序”、“基因组学”研究时代
——微生物学是先行者



复习: 微生物促进生命科学中许多重大理论问题的突破

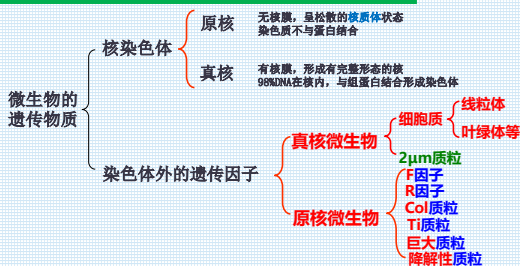
- > 分子生物学的产生: 微生物学、遗传学、生物化学交叉, 促进了生命科学的发展 (表1-6)
- > 以微生物为材料获得: 如中心法则
- > 生命起源: 如三域学说的提出
- > 促进基因组学的发展: 表1-7



第八章 微生物的遗传与变异

- 第一节 遗传变异研究概述
- 第二节 微生物的遗传物质
- 第三节 细菌的基因转移和重组
- 第四节 真菌的基因重组
- 第五节 微生物的突变
- 第六节 微生物遗传变异的应用
- 第七节 基因工程和合成生物学
- 第八节 菌种退化、复壮和保藏

第二节 微生物的遗传物质



一、核染色体与基因、基因组的概念

核染色体: 是生物遗传物质的重要载体。

基因 (gene) 一个具有遗传因子效应的DNA片段, **遗传物质的最小功能单位。**

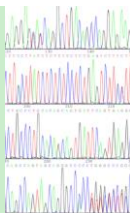
基因组 (genome) 指存在于细胞或病毒中的所有**基因**。包括细胞中的基因及非基因的DNA序列。

基因组学 (genomics) 是研究生物**基因组**的组成、组内各基因的精确结构、相互关系及表达调控的**科学**, 是研究生物基因组和如何利用基因的一门学问。



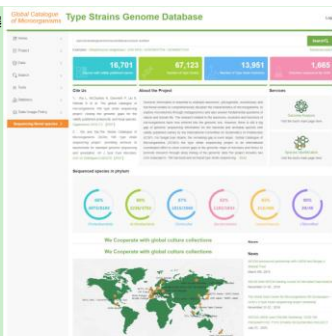
二、基因组测序技术

1. 第一代: **双脱氧链末端终止法**测序技术;
2. 第二代: **高通量**测序技术;
3. 第三代: **单分子**测序和**纳米孔**测序;



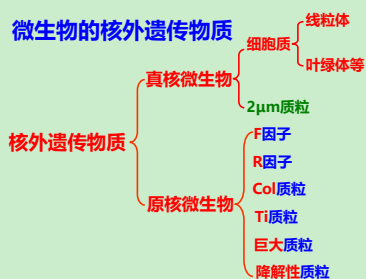
全球模式微生物基因组测序计划取得重要进展

全球模式微生物基因组测序计划: 2018年中国微生物所牵头组织发起, 预计5年内完成超过10,000种的细菌、真菌、古菌模式菌株基因组测序, 建立全球微生物模式菌株基因组测序合作网络。



Nucleic Acids Research, 2021, 49, D694-D705

三、微生物的核外遗传物质



- > 原核微生物: 核外遗传物质主要存在于**质粒**中
- > 真核微生物: 核外遗传物质主要存在于**细胞器和质粒**中。

(一) 细菌质粒

> **细菌质粒 (plasmid):** 细菌细胞内**独立于染色体**之外的遗传物质, 是一种可**自主复制**的环状DNA分子, 并可在细胞分裂时传递给子代的遗传物质, 赋予宿主细胞某种**遗传特性**, 如抗某种抗生素。

- > **类型**
1. F因子 (fertility factor)
 2. R因子 (resistance factor)
 3. Col因子 (colicinogenic factor)
 4. 降解质粒 (代谢质粒)
 5. 毒性质粒
 6. 隐性质粒



- 质粒 (oc)、线型 (L)
- F质粒: 与有性接合有关
- R质粒: 与抗菌性有关
- Col质粒: 编码免疫蛋白
- 毒性质粒: 亦云金黄色杆菌内毒素质粒
- 代谢质粒: 降解复杂有机化合物
- 降解质粒: 酵母的 2 μm 质粒

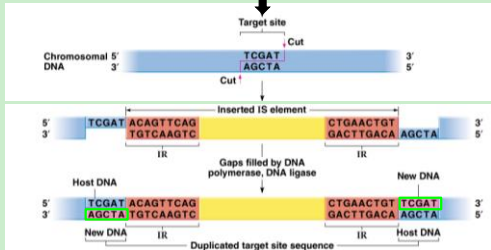
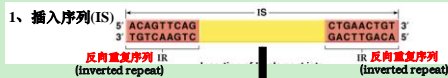
(二) 可移动遗传因子

即转座因子(transposable element): 生物体细胞中一类能在DNA分子内和DNA分子间移动位置的一段DNA序列, 这类基因又被称为“跳跃基因”(jumping gene), 可在DNA分子的许多位点插入及整合。

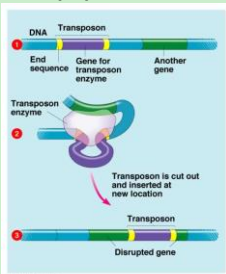
分类: 根据其分子结构和遗传性质可分为3类

区别

1. **插入序列(insertion sequence, IS):** 能在细菌染色体、噬菌体DNA和质粒上的许多位点移进移出的序列;
2. **转座子(transposon, Tn):** 是基因组中一段可移动的DNA序列, 可通过切割、重新整合等一系列过程从基因组的一个位置“跳跃”到另一个位置;
3. **Mu噬菌体:** 以大肠杆菌为宿主的温和性变噬菌体。



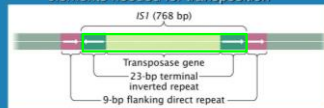
2、转座子(Tn)



- 基因组中一段可移动的DNA序列
- 从基因组的一个位置“跳跃”到另一个位置

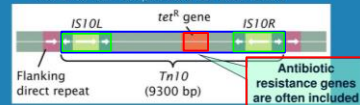
Transposable Elements in Bacteria

IS Insertion Sequences contain only the elements needed for transposition



IS & TN 的区别

TN Composite Transposons contain DNA that has insertion sequences on both sides



两个同类型的IS基因通过与其他基因结合形成一个更大的转座子

(三) 真核微生物的染色体外遗传现象

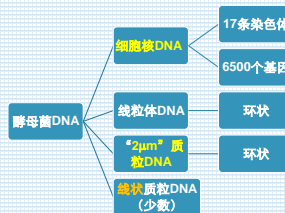
核外遗传: 存在于细胞核外, 即细胞质也能携带控制子代的遗传因子, 也能使子代或异核体的表型发生改变。

特点: 控制的性状通常不分离, 遗传特性一般来自母本的原生质。

来源: 线粒体、质粒或病毒颗粒的转移。以酵母菌2 μm质粒构建的克隆和表达载体已得到广泛的应用。



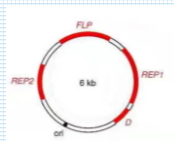
复习: 酵母的遗传物质



“2 μ m”质粒DNA

1967年在*S. cerevisiae*的细胞核中发现的，是一个闭环环状超螺旋DNA分子，长约2 μ m (6 kb)。

- 研究基因调控、染色体复制的理想系统
- 酵母菌转化的有效载体
- 可组建“基因工程菌”



第八章 微生物的遗传与变异

- 第一节 遗传变异研究概述
- 第二节 微生物的遗传物质
- 第三节 细菌的基因转移和重组
- 第四节 真菌的基因重组
- 第五节 微生物的突变
- 第六节 微生物遗传变异的应用
- 第七节 基因工程和合成生物学
- 第八节 菌种退化、复壮和保藏

第三节 细菌的基因转移和重组

细菌基因转移的形式主要有3种：

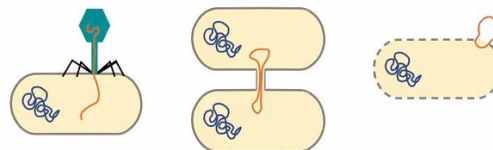
- ① 接合
 - ② 转化
 - ③ 转导
- 基因转移导致遗传重组

差异：获取外源DNA的方式不同

- 接合通过细菌间的接触
- 转化通过裸露的DNA
- 转导需要噬菌体作媒介

视频观看：转化、转导和接合（细菌中的水平基因转移）

Horizontal Gene Transfer



水平基因转移 (HGT)

- **Horizontal Gene Transfer:** Gene transfer that is divorced from reproduction. Transmission of genetic material between unrelated genomes; hence, horizontal gene transfer involves gene transfer across species boundaries.
- **Vertical Gene Transfer:** Genetic information is passed from parent to offspring.

- ① 接合
- ② 转化
- ③ 转导

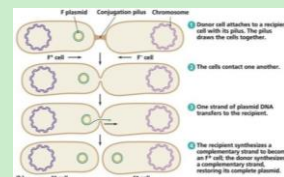


一、接合 (conjugation)

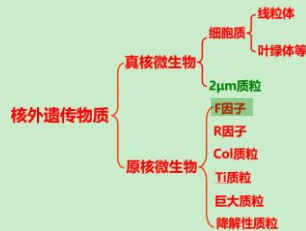
接合：供体菌和受体菌的完整细胞通过相互间的直接接触，进而进行DNA的转移和传递的现象。

接合子：获得新性状的受体细胞称为接合子。

接合及其发现：大肠杆菌杂交实验。

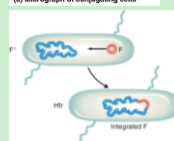
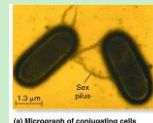


(一) 接合菌株与F因子



1、F因子(fertility factor)

- 是一种独立于染色体的小型环状DNA
- 具有自主的与染色体进行同步复制和转移到其它细胞中去的能力
- 控制着大肠杆菌性菌毛的形成
- 在大肠杆菌中存在两种形式：游离态和整合态



根据是否具有F因子及F因子的特点，大肠杆菌存在4种接合型菌株

2、大肠杆菌的4种接合型菌株

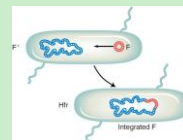


F⁺菌株: 含有F因子的菌株，细胞表面着生1条或多条性菌毛的雄性菌株(F⁺)；F因子游离存在大肠杆菌细胞质中，可独立复制；

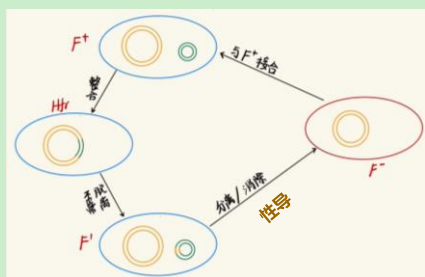
F⁻菌株: 无F因子的雌性菌株；

Hfr菌株(high frequency recombination, Hfr): 又称高频重组菌株，F因子从游离态转变成整合在宿主染色体特定部位的整合态，并与宿主染色体同步复制；

F'菌株: 当F因子从Hfr菌株染色体上脱落时，会出现一定概率的错误基因交换，从而使F因子带上宿主基因组DNA的部分片段，这时的F因子称为F'因子，含有F因子的菌株称为F'菌株；

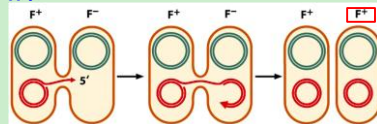


2、大肠杆菌的4种接合型菌株

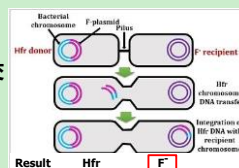


(二) 几种杂交结果

1. F⁺ x F⁻ 杂交



2. Hfr x F⁻ 杂交

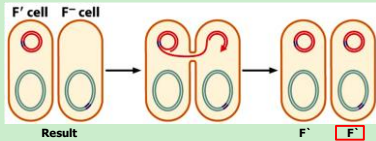


(二) 几种杂交结果

3. $F^+ \times F^+$ 杂交 & $Hfr \times Hfr$ 杂交 仅少数个体进行

4. $F' \times F$ 杂交

供体的部分基因会随 F' 一同转入 F 受体菌，而且不需要整合即可表达，同时受体菌也变成了 F' 菌。细胞基因的这种转移过程称为**性导**(sexduction)。



二、转化 (transformation)

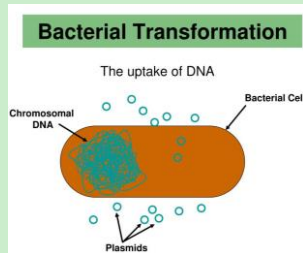
(一) 重要概念

- 转化(transformation):** 受体细胞从外界直接吸收来自供体细胞的DNA片段，并与其染色体同源片段进行遗传物质交换，从而使受体细胞获得新的遗传特性，这种现象称为转化。
 - 受体菌(recipient/receptor): 转化基因的接受者
 - 供体菌(donor): 转化基因的提供者
- 转化子(transformant):** 转化后出现供体性状的受体细胞，即**转化成功**的菌落。
- 感受态(competence):** 细菌能够从周围环境中吸收外源DNA分子进行转化的生理状态。

思考：转化何时发生？有何步骤？

(二) 转化过程

- 1、感受态细胞的制备
- 2、DNA的结合和摄取
- 3、转化子与染色体重组



(三) 感受态的机理研究

- > 只有处于感受态的细菌才能吸收外源DNA实现转化。
- > 感受态时，细菌发生了什么？使其能接受外源DNA？

感受态的**本质**有两种解释：

- ①**局部原生质体化**假说：处于感受态的受体菌**局部**失去细胞壁，使外源DNA能顺利经膜进入菌体；
- ②**酶受体**假说：是受体细胞**表面**出现了一种能结合DNA并使之进入细胞的酶。

思考：所有的细菌都能发生转化吗？

三、转导 (transduction)

转导(transduction): 通过完全缺陷或部分缺陷噬菌体为媒介，把供体细胞的DNA片段转移到另一个细胞（受体细胞）中，并使后者发生遗传变异的过程称为**转导**。

转导子 (transductant) : 获得新遗传性状的受体细胞。

转导噬菌体: 携带供体部分遗传物质的噬菌体

分类：根据噬菌体和转导DNA产生途径的不同分类

三、转导 (transduction)

自学P205-208（转导机制简单了解），4min

思考：

- 1、普遍性转导和局限性转导有何区别？
- 2、局限性转导可分为哪两类？二者有何区别？
- 3、什么是流产转导？

小组讨论3min，组间交流。

第八章 微生物的遗传与变异

- 第一节 遗传变异研究概述
- 第二节 微生物的遗传物质
- 第三节 细菌的基因转移和重组
- 第四节 真菌的基因重组
- 第五节 微生物的突变
- 第六节 微生物遗传变异的应用
- 第七节 基因工程和合成生物学
- 第八节 菌种退化、复壮和保藏

第四节 真菌的基因重组

- > 1941年Beadle等人通过研究**粗糙链孢菌**的生化突变型，提出“一个基因一个酶”的理论。
- > 真菌在减数分裂后产生的所有细胞核都存在于**有性孢子**中，有利于进行遗传分析。
- > 真菌除了具有有性生殖和无性生殖外，还有两种独特的遗传系统，即**异核现象**和**准性生殖**，这种系统在其他类群生物中罕见，在真菌中广泛存在。
- > **真菌在遗传学研究上占有重要地位。**

一、有性生殖

- 发生于**单倍体核**之间；
- 多数真菌核融合后进行**减数分裂**，并发育成新的单倍体细胞；
- 亲本的基因重组主要通过**染色体的独立分离和染色体间的交换**。
- 相当一部分真菌的减数分裂发生在1个闭合的**子囊壳**中，并具**较短的生活周期**，故为遗传重组的研究带来极大方便。



二、异核现象(heterokaryosis)

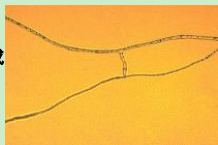
- > **异核现象**：在一些真菌菌丝体的菌丝细胞内存在**一个以上不同遗传型细胞核**的现象，已在许多子囊菌、担子菌和半知菌中发现。
- > 产生原因：突变或是不同遗传型菌丝之间的联合导致细胞质或细胞核转移的结果。
- > 结果：导致**体细胞重组**，产生互补的异核体具有高度的生理适应性。

三、准性生殖(parasexuality or parasexual reproduction)

1、概念：**不产生有性孢子的丝状真菌，不经减数分裂就能导致低频的基因重组**，由此导致的变异过程称为**准性生殖**。

2、过程：3个阶段

- (1) 异核体形成
- (2) 核融合和杂合二倍体的形成
- (3) 单倍体化



3、准性生殖的应用

成功用于**杂交育种**，包括以下步骤：

- > 选择合适的营养缺陷型作为亲本，强制形成**异核体**，移种异核体或杂合二倍体的单菌落，检验结合菌株的稳定性，从而选出稳定菌株——**杂合二倍体**，进一步采用不同诱变剂促进其子代**变异**，以最终获得理想菌株。
- > 灰黄霉素产生菌——**尊麻青霉**准性生殖进行杂交育种主要步骤：①选择亲本；②强制异核；③移单菌落；④验稳定性；⑤促进变异。

3、准性生殖与有性生殖的比较 (表8-7)

项目	准性生殖	有性生殖
接合的亲本细胞	体细胞	性细胞
独立生活的异核体阶段	有	无
接合后二倍体的细胞形态	与单倍体基本相同	与单倍体明显不同
二倍体变为单倍体的途径	有丝分裂	减数分裂
结合发生的概率	偶尔, 概率低	经常, 概率高

大多数的半知菌进行准性生殖, 某些真菌既可以有性生殖也可以进行准性生殖。

微生物基因转移和重组的实例

例1: 海洋微生物与肠道细菌交换基因

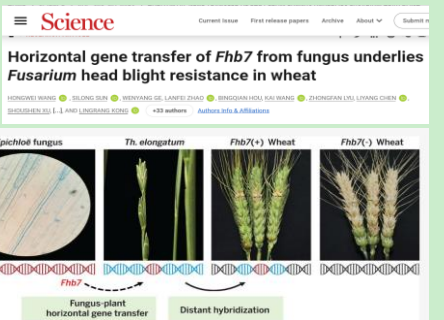
- 法国科学家在研究海洋微生物如何消化海藻时, 意外得到一个结果
- 方法: 13个日本人与18个北美人的微生物基因组进行对比
- 发现: 只有日本人才能消化包寿司的紫菜, 并获取能量。
- 消化海藻的关键: 海藻细胞壁成分不同于陆生植物, 需要特殊的酶才能分解
- 酶的来源: 几乎所有海洋细菌都有这种基因, 几乎所有陆地生物都不携带这种酶的遗传基因。这种酶并不局限于海洋生物中存在, 它们还存在于人体肠内的细菌中——*Bacteroides plebeius*, 被发现存在于日本人体内。

> Nature. 2010 Apr 8;464(7290):908-12. doi: 10.1038/nature09297.

水平基因转移 (HGT)
Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota



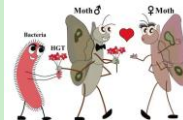
例2: 真菌与小麦间的水平基因转移 Fhb7基因水平转移 塑造小麦赤霉病抗性



例3: 细菌与昆虫间的水平基因转移

HGT is widespread in insects and contributes to male courtship in lepidopterans
Cell
Volume 185, Iss.

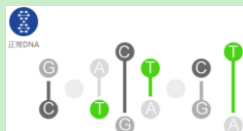
- 蝴蝶和蛾从李斯特菌 *Listeria* 中获得同一个水平转移基因 **LOC105383139**;
- 基于基因编辑技术, 把十字花科农业害虫小菜蛾的水平转移基因 **LOC105383139** 进行敲除发现: 相比较野生型小菜蛾, 突变体小菜蛾后代数目少了约70%, 但是**生长发育** (如体长、进食、运动、生殖器官等) 均未受到影响;
- 行为学实验进一步验证, 发现突变体雄虫对雌虫的求偶欲望显著地降低。
- 蝴蝶和蛾HGT基因LOC105383139有助于增强雄虫对雌虫求偶行为。



第五节 微生物的突变

广义的突变(mutation): 是指染色体数量、结构及组成等遗传物质发生多种变化的现象, 包括**染色体畸变**和**基因突变**等, 可导致后代形态、功能的改变。

变异: 由突变导致遗传性状改变。



几个相关概念

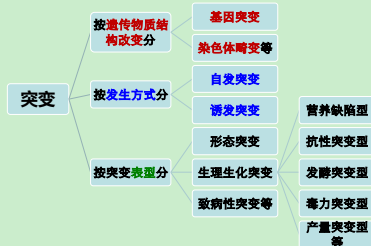
- 表型(phenotype)**
是指可以观察或检测到的个体性状或特征, 是特定的基因型在一定环境条件下的表现。
- 基因型 (genotype)**
指储存在遗传物质中的信息, 即DNA碱基序列。
- 野生型**
未发生突变的从自然界分离到菌株。
- 突变体**
野生株经突变后带有新的遗传性状的菌株 (增加或缺失)。

一、突变率和基因符号

突变率是指每个细胞在每一世代中发生突变的概率。

- 常用的基因突变符号：每个基因座位用其**英文单词的头3个英文字母**的小写后加一个**大写字母**表示。
- 如 *hisA*、*hisB* 代表组氨酸的A和B基因；在3个字母的右上方可用不同符号表示微生物的突变型，如 *his⁺*、*his⁻* 分别表示组氨酸**原养型**和**缺陷型**，*gal⁺*、*gal⁻* 分别表示能发酵半乳糖和不能发酵半乳糖，*str^r*、*str^s* 分别表示对链霉素**敏感**和具有**抗性**。

二、突变的类型



二、突变的类型

- (一) 基因突变与染色体畸变
- (二) 自发突变与诱发突变
- (三) 形态突变与生理生化突变

(一) 基因突变与染色体畸变

- 基因突变**(gene mutation)：DNA链上的一对或少数几**对碱基**发生改变而引起，又称**点突变**。
- 染色体畸变**(chromosomal aberration)：染色体在结构上有**较大范围**变化的变异，包括**缺失、重复、倒位、易位**。

(二) 自发突变与诱发突变

1、自发突变

- 自然条件下自发进行的突变，频率 10^{-9} - 10^{-6}
- 在没有任何人为的**诱变因素**处理的情况下，可以发生在生物的任何个体的发育时期及任何基因上
- 生物进化的根源

思考：为什么会发生自发突变？如何检测自发突变的产生？自发突变有何用处？

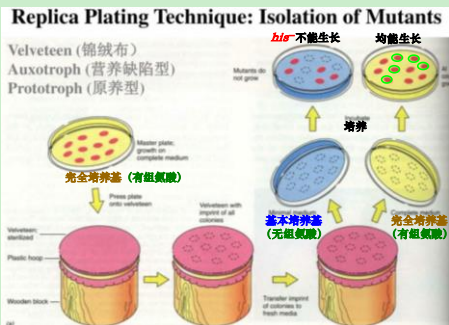
1、自发突变

(1) 自发突变产生的原因

- DNA复制过程中**碱基配对错误**
- 微生物自身产生**有害代谢产物**（诱变物质）
- 环境因素**

(2) 三个经典实验 (P212表8-10)

- 变量试验
- 涂布试验
- 平板影印培养试验



(3) 定向育种

指在某一特定条件下，长期培养某一微生物菌群，通过不断转接传代以积累其自发突变，并最终获得优良菌株的过程。



法国的 A. Calmette 和 C. Guérin 两人曾把牛型结核杆菌接种在含牛胆汁和甘油的马铃薯培养基上，并以坚韧不拔的毅力前后花了 13 年工夫，连续移种了 230 多代，直至 1923 年始获成功（卡介苗，BCG）。费时费力，效果难预测。

2、诱发突变(inducible or induced mutation)

- 定义：通过物理、化学或生物的因素而引起的加速突变。
- 诱变剂(mutagen)：凡具有诱变效应的任何因素
- 诱变剂的种类

- 物理因素：UV、激光、离子束、X射线、γ射线、快中子
- 化学因素：亚硝酸、烷化剂、碱基类似物、嘧啶类化合物
- 定位诱变：以删除、插入和置换等方法，人工特定改变克隆基因或 DNA 特定的碱基序列，通过重组 DNA 技术，精确地在基因限定位点上引入突变的方法。

三、形态突变与生理生化突变

不同类型突变体有不同的检测方法

1、形态突变：突变引起细胞形态变化或引起菌落形态改变

- 形态变化：细菌的鞭毛、芽孢或荚膜的有无菌落形态；
- 外形的光滑、粗糙和颜色的变异

2、生理生化突变：发生代谢途径变异，但没有明显形态变化的突变型

- 常见有：营养缺陷型、抗性突变型、发酵突变型、毒力突变型等

2、生理生化突变

(1) 营养缺陷型

- 必须在培养基中添加细胞不能合成的营养成分才能正常生长的突变型
- 类型：氨基酸、维生素和嘌呤嘧啶缺陷型
- 例如：*his⁻* 表示组氨酸缺陷型
- 意义：是微生物遗传学研究中重要的选择标记和育种的重要手段，在发酵工业上有广泛用途。

(2) 抗性突变型

- 一类能抵抗有害理化因素的突变型
- 类型：抗药性、抗紫外线和抗噬菌体等
- 例如：*str^r* 表示链霉素抗性

(3) 发酵突变型

- 指从不能利用到能够利用某种营养物质的突变型
- 例如：*gal⁺ → gal⁻*，表示能发酵半乳糖 → 不能发酵半乳糖

2、生理生化突变

毒力突变型

- 指突变后致病能力增强或减弱的突变型

产量突变型

- 指产生某种代谢产物的能力增强或减弱的突变型

条件致死突变型

- 指在某种条件下具有致死效应，而在另一条件没有致死效应的突变型
- 如温度敏感突变株

致死突变型

- 由于基因突变造成菌体死亡或生活能力下降
- 双倍体生物能够以杂合子的形式存活，一旦形成纯合子，则发生死亡

二、突变的类型



第六节 微生物遗传变异的应用

- 一、诱变育种
- 二、原生质体融合育种
- 三、基因编辑

一、诱变育种

1、**定义**：通过人工方法处理微生物使之发生突变，并运用合理的筛选程序和方法，把适合人类需要的优良菌种筛选出来的过程。

2、实践意义

- 提高生产性能与改善产品质量
- 扩大品种与简化生产工艺
- 方法简便易行、条件和设备要求简单

3、基本原则

3、诱变育种的基本原则

- (1) 出发菌的选择原则
 - 具有优良性状的菌株
 - 对诱变剂敏感的菌株
 - 以单倍体纯种为出发菌
- (2) 诱变剂的选择原则
 - 在同样效果下选用最方便的
 - 在同样方便的情况下选择最高效的因素
 - 充分利用复合处理的协同作用
- (3) 诱变剂量的选择
 - 诱变剂的剂量对产量变异的影响
 - 低剂量：正变较多
 - 高剂量：负变较多
 - 经多次诱变而提高产量的菌株中，更容易出现负变

(4) 突变体的筛选

初筛

- 目的：删去明确不符合要求的大部分菌株，把生产性状类似的菌株尽量保留下来。
- 方法：一般通过平板稀释法获得单个菌落，然后对菌落进行相关性状的初步筛选。如透明圈法、抑菌圈法和颜色变化等

复筛

- 目的：对初筛出的菌株的有关性状作精确的定量测定，然后经过小试、中试，才能用于生产。
- 方法：一般是将微生物摇瓶培养，然后再对培养液进行分析测定。

4、营养缺陷型的筛选

- (1) 有关的三类遗传型个体
- (2) 有关的三类培养基
- (3) 筛选方法

(1) 与营养缺陷型突变有关的三类遗传型个体

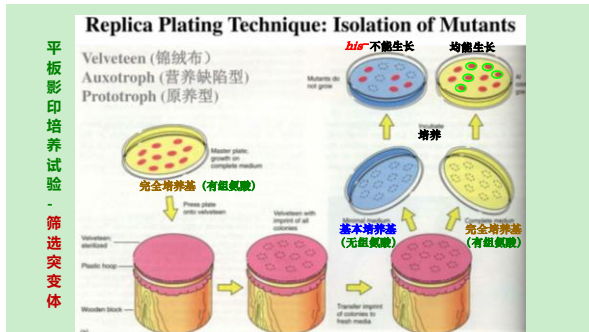
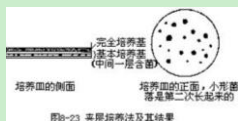
- **野生型**
 - 从自然界分离到的任何微生物在其发生营养缺陷突变前的原始菌株。
- **营养缺陷型**
 - 经诱变产生的一些合成能力出现缺陷，而必须在培养基内加入相应有机养分才能正常生长的变异菌株。
- **原养型**
 - 营养缺陷型突变经回变或重组后产生的菌株，营养要求在表型上与野生型相同。

(2) 与营养缺陷型菌株筛选有关的三类培养基

- **基本培养基 (M.M, minimal medium)**
 - 含有能满足野生型菌株营养要求的最低成分的合成培养基。“用[-]”表示
- **完全培养基 (C.M, complete medium)**
 - 满足一切营养缺陷型菌株生长的天然或半合成培养基。用“[+]”表示
- **补充培养基 (S.M, supplemental medium)**
 - 在MM中有针对性地加入一或几种营养成分以满足相应营养缺陷型菌株生长的合成培养基。用[A]或[B]表示

(3) 营养缺陷型的筛选方法

- **中间培养**
 - 分离突变核和未突变核
 - 选择合适的培养基
- **淘汰野生型**
 - 抗生素法
 - 菌丝过滤法
 - 梯度培养法
 - 差别杀菌法
- **检出缺陷型**
 - 点种法
 - 夹层培养法
 - 限量补充培养法
 - 影印法

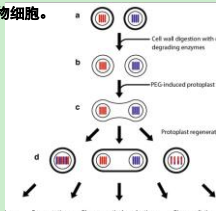


二、原生质体融合育种 (protoplast fusion)

1、**原生质体融合**: 通过人为方法, 使遗传性状不同的两细胞的原生质体发生融合, 进而发生遗传重组, 产生同时带有双亲性状的遗传性稳定的融合子的过程, 所获得的重组子叫**融合子 (fusant)**。
· 适用范围: 原核生物和各种真核微生物和高等植物细胞。

2、原生质体融合的优点

- 可以实现远缘菌株间的基因重组
- 杂交频率较高
- 可进行多亲本融合
- 遗传物质的传递更为完整
- 通过原生质体融合提高产量



3、原生质体融合育种的步骤

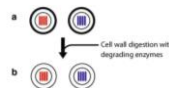
(1) 原生质体的制备

- 在高渗溶液中选择适当的方法**去除细胞壁**
 - 细菌和放线菌: 主要采用**溶菌酶**
 - 酵母菌和霉菌: 一般用**蜗牛酶**和**纤维素酶**

蜗牛酶: 从蜗牛的唾液和消化道中制备的混合酶, 它含有纤维素酶、果胶酶、淀粉酶、蛋白酶等20多种酶。

· 影响原生质体制备的因素

- 菌体的前处理、培养时间、酶浓度、酶降解的温度、酶降解的时间、渗透压稳定剂



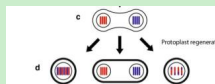
(2) 原生质的再生

- 重建细胞壁、恢复细胞完整形态，能进行生长和繁殖
- 原生质体再生率的计算

$$\text{原生质体再生率} = \frac{\text{再生菌数} - \text{剩余菌数}}{\text{破壁前菌数} - \text{剩余菌数}} \times 100\%$$

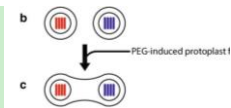
影响因素

- 本身的再生特性
- 原生质的制备条件
- 再生培养基的成分
- 再生的培养条件



(3) 原生质的融合

- 选择亲本**：亲株均要有一定的遗传标记、标记必须稳定
- 选用恰当的方法**
 - 化学助融：加入助融剂
 - 物理助融：离心、电脉冲、激光等方法
 - 生物助融：生物提取物



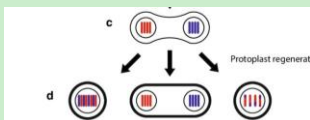
(4) 融合子的检出与鉴定

检出

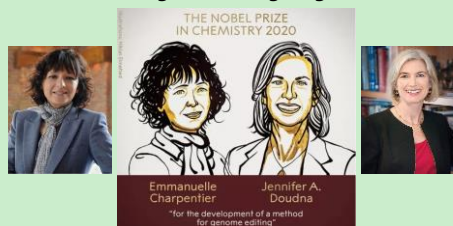
- 直接检出法
- 间接检出法

鉴定

- 形态学
- 生理生化
- 遗传学
- 生产性能



(三) 基因编辑 (gene editing or genome editing)



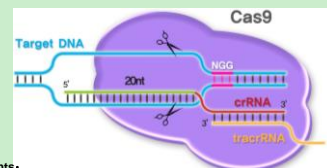
(三) 基因编辑 (gene editing or genome editing)

CRISPR (Clustered, Regularly Interspaced, Short Palindromic Repeats, 规律成簇间隔短回文重复) 是细菌及古菌保护自身、对抗病毒的一个系统，即细菌通过记录和精准攻击入侵病毒的DNA序列而进行自身防御的适应性免疫系统，是一种万能的基因武器。



视频观看：万能的基因剪刀

CRISPR-Cas9系统 (Type II)：修剪、切断、替换或添加



Components:

- Cas 9 (*Streptococcus pyogenes*);
- crRNA;
- tracrRNA;

讨论：基因编辑婴儿，创新还是伤害？



视频观看：基因编辑婴儿案

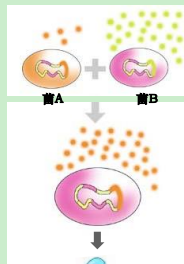
第七节 基因工程和合成生物学

- 一、基因工程
- 二、合成生物学

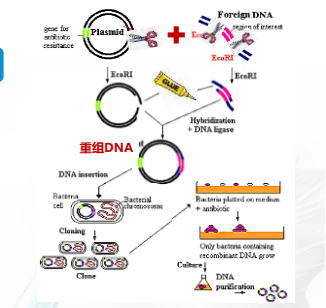


一、基因工程

基因工程:用人工方法, 通过**体外基因重组**和**载体**的作用, 使新构建的遗传物质组合进入新个体, 并在此新个体中得以稳定地遗传和表达的过程。



基因工程的主要步骤:



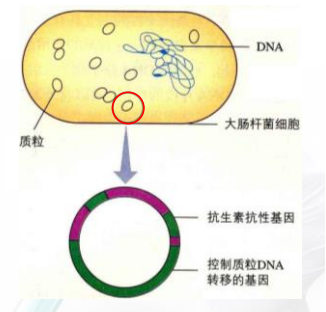
1、如何获取目的酶基因？

- ❖ 构建基因组DNA文库
- ❖ 构建cDNA文库
- ❖ 化学合成法
- ❖ PCR扩增



2、用什么做载体？

- (1) 细菌质粒；
- (2) 噬菌体DNA；
- (3) 粘粒；
- (4) 动物病毒。



3、基因工程中的酶学

- 限制性核酸内切酶
- 连接酶
- DNA聚合酶

Enzyme	Sequence of Recognition Site	Microbial Origin
TaqI	5'- GAATTC -3' 3'- CTAAGG -5'	<i>Thermus aquaticus</i> YT1
RsaI	5'- GAATTC -3' 3'- CTAAGG -5'	<i>Rhodospseudomonas sphaeroides</i>
Sau3AI	5'- GATC -3' 3'- ATCA -5'	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A
EcoRI	5'- GAATTC -3' 3'- CTAAGG -5'	<i>Escherichia coli</i>
BamHI	5'- GATC -3' 3'- ATCA -5'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H.
HindIII	5'- GAATTC -3' 3'- CTAAGG -5'	<i>Haemophilus influenzae</i>
KpnI	5'- GAATTC -3' 3'- CTAAGG -5'	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8
ClaI	5'- GAATTC -3' 3'- CTAAGG -5'	<i>Caryophanon latum</i>
BsuHI	5'- GATC -3' 3'- ATCA -5'	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
NciI	5'- GAATTC -3' 3'- CTAAGG -5'	<i>Nocardia cattediacarum</i>

二、合成生物学

- (一) 合成生物学的出现
- (二) 什么是合成生物学
- (三) 合成微生物的应用举例
- (四) 合成生物学的危险性

(一) 合成生物学的出现

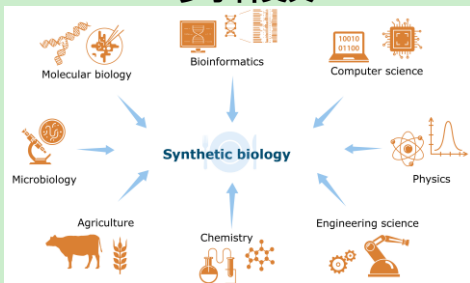
- 传统模式：基因片段转移（一个生物→另一个生物）
- 新的研究：阅读遗传密码→书写遗传密码
- 目的：实验室合成DNA →制造自然界不存在的细菌或病毒 →按照人类要求进行工作



(二) 什么是合成生物学

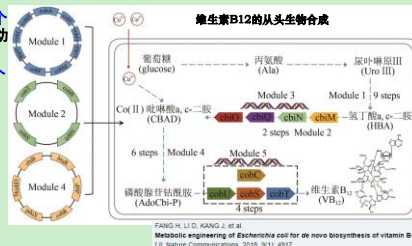
- **synthetic biology**: 设计和构建自然界中不存在的人工生物系统，以解决人类社会的重要问题。
- 研究方法：采用工程学“设计—合成—测试”的研究方法，在学习抽象自然生命系统的基础上，或对自然生物系统“重编程”，或重头设计具有全新特征的人工生命体系；然后，利用“基因编辑”“基因合成”等“工具包”，用实验方法来构建，再对构建出来的生物系统进行测试，如此反复循环优化，形成了一个正向可靠的科学闭环。
- 应用：对我国绿色生物制造产业和可持续发展战略至关重要

多学科交叉



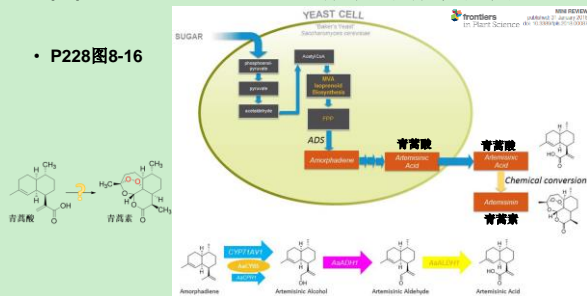
(三) 合成生物学的应用举例--维生素B12的生物合成

- 天然产物活性高、动植物体内含量低、制备难，开发和利用受限
- 来源5种细菌的28个基因在*E. coli*中成功异源表达
- 按人工途径划分5个模块进行组装
- 合成菌株发酵周期仅为工业生产菌株的1/10，极具工业应用前景



(三) 合成生物学的应用举例—青蒿素前体青蒿酸的生物合成

• P228图8-16



(四) 合成生物学的危险性

- 可以构建新的生物，如脊髓灰质炎病毒、流感病毒、支原体等
- 潜在危险

第八节 菌种退化、复壮和保藏

- 菌种退化与复壮
- 菌种的保藏
- 国内外菌种保藏部分情况

一、菌种退化与复壮

自学P230表8-13思考：

1. 菌种退化有什么表现？
2. 为什么会发生？
3. 如何避免？
4. 退化的菌种是否可以恢复原有生长状态和特性？

小组讨论：每人陈述一个问题，不准看书，用自己的语言表达！

一、菌种退化与复壮

1、菌种退化 (degeneration)

- 菌种在培养或保藏过程中，由于自发突变的存在，出现某些原有优良生产性能下降、遗传标记丢失等现象。

2、退化的原因

- 自然突变
- 环境调节

3、退化的表现

- 形态：菌落和细胞形态改变
- 生理：生长速度缓慢，产孢子变少；抵抗力、抗不良环境能力减弱；产量或其对宿主寄生能力下降等。

如何防止退化？

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

4、菌种的复壮

- 复壮：使衰退的菌种恢复原来的优良性状
- 如何实现？ 纯种分离+生产性能测定

广义

已衰退

找出未退化个体
恢复原有性状

狭义

未退化

经常而有意识
性能逐步提高

菌种复壮的措施

- **纯种的分离**: 从退化菌种细胞群体中分离**仍保持原有典型性状**的单细胞, 扩大培养, 就可恢复原菌株典型性状。
- **通过寄主体进行复壮**: 对于**寄生性的退化菌株**, 可回接到相应寄主体, 以恢复或提高其寄生性能。
- **淘汰已衰退的个体**

二、菌种的保藏

- **原理**: 人为创造合适的环境条件, 使微生物的代谢处于**不活泼**、生长繁殖受抑制的**休眠状态**。

任务:

- ① 存活, 不丢失, 不污染
- ② 防止优良性状丧失
- ③ 随时为生产、科研提供优良菌种

“不死、不杂、不衰”

菌种保藏的方法

1、低温保藏法

- **冷藏法**
 - 斜面菌种: 4~5℃, 一般3~6个月移植一次
 - 半固体穿刺接种: 普通冰箱, 可6~12个月移植一次
- **低温法**
 - -20℃左右
- **超低温法**
 - -70℃、-150~-196℃
 - 保藏期长达数年至数十年



2、隔绝空气保藏法

- **石蜡油封藏法**
 - 在培养好的菌种管内加上灭菌石蜡油
 - 可保存1~2年
- **橡皮塞密封保藏法**
 - 用橡皮塞代替棉塞用固体石蜡封口, 4℃保存
- **琼脂柱穿刺封口**
 - 穿刺培养
 - 石蜡油封闭

3、干燥保藏法

- **原理**: 断绝水分、降低代谢活动
- **方法**
 - **砂土管保藏法**: 将干燥砂粒与细土混合后灭菌制成砂土管, 然后接种保藏, 保藏期1~10年, 适用于**产孢子微生物**
 - **真空冷冻干燥法**: 在低于-15℃下, 快速将细胞冻结, 并保持细胞完整, 然后在真空中使水分升华至干

4、寄主保藏法

- 此法适用于专性活细胞寄生物
- **方法**
 - 连续在培养基上
 - 连续在活宿主上

不同菌种保藏方法比较

保藏方法	保藏原理	保藏时间	菌种活性
定期移植法	低温(4℃)	3~6月	易退化
液体石蜡法	低温(4℃)、阻断氧气	1~2年	退化
真空冷冻干燥法	干燥、低温、无氧、保护剂	8~10年	退化
-80℃冰箱冻结法	低温(-80℃)、保护剂	2~5年	退化
液氮超低温冻结法	超低温(-150℃或-196℃)、保护剂	无限期	不易退化

保藏方法	保藏设备	保藏成本	操作性
定期移植法	冰箱	高	简单
液体石蜡法	冰箱	较高	比较简单
真空冷冻干燥法	-80℃冰箱、真空冷冻干燥机、封管设备	低	复杂
-80℃冰箱冻结法	-80℃冰箱	较低	复杂
液氮超低温冻结法	程控降温仪、液氮运输罐及液氮罐	高	复杂

是由日本经济部、商业部、工业部支持的半政府性质菌种保藏中心。该中心保藏有细菌1446株，真菌568株，酵母164株。这些菌种主要来自本国的其它菌种保藏中心。保藏的菌种可出售。

DSMZ是欧洲规模最大的生物资源中心，保藏有细菌9400株，真菌2400株，酵母500株，质粒300株，动物细胞500株，植物细胞500株，植物病毒600株，细菌病毒90株等。

第八章 微生物的遗传与变异

第一节 遗传变异研究概述

第二节 微生物的遗传物质

第三节 细菌的基因转移和重组

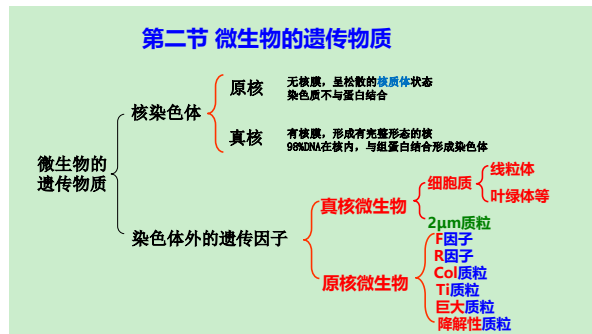
第四节 真菌的基因重组

第五节 微生物的突变

第六节 微生物遗传变异的应用

第七节 基因工程和合成生物学

第八节 菌种退化、复壮和保藏



(二) 可移动遗传因子

即转座因子(transposable element): 生物体细胞中一类能在DNA分子内和DNA分子间移动位置的一段DNA序列，这类基因又被称为“**跳跃基因**”(jumping gene)，可在DNA分子的许多位点插入及整合。

分类: 根据其分子结构和遗传性质可分为3类

区别

- 1、**插入序列(insertion sequence, IS):** 能在细菌染色体、噬菌体DNA和质粒上的许多位点**移进移出**的序列;
- 2、**转座子(transposon, Tn):** 是基因组中一段可移动的DNA序列，可通过切割、重新整合等一系列过程**从基因组的一个位置“跳跃”到另一个位置**;
- 3、**Mu噬菌体:** 以大肠杆菌为宿主的**温和性突变噬菌体**。

第三节 细菌的基因转移和重组

细菌基因转移的形式主要有3种:

- ① **接合**
- ② **转化**
- ③ **转导**

基因转移导致遗传重组

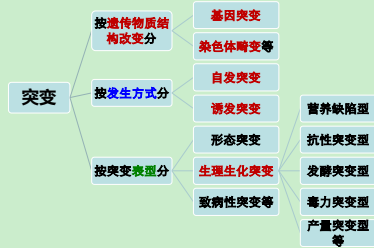
差异: 获取外源DNA的方式不同

- > 接合通过**细菌间的接触**
- > 转化通过**裸露的DNA**
- > 转导需要**噬菌体作媒介**

视频来源: 转化、转导和接合(细菌中的水平基因转移)

第五节 微生物的突变

二、突变的类型



第六节 微生物遗传变异的应用

- 一、诱变育种
- 二、原生质体融合育种
- 三、基因编辑

第八节 菌种退化、复壮和保藏

- 菌种退化与复壮
- 菌种的保藏
- 国内外菌种保藏部分情况