



第八章 微生物的遗传与变异

Heredity and Variation of Microorganisms





什么是遗传与变异

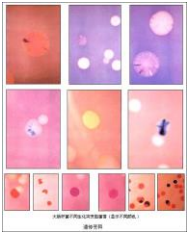


遗传 (heredity)	变异 (variation)
- 亲代与子代之间性状相似的现象 - 保证物种的存在和延续,保持种属性状的相对稳定	- 子代与亲代或子代之间性状不同的现象 - 推动了物种的进化和发展,产生变种和新种

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有何意义

- ✓ 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 | 遗传变异的物质基础 |
| 第二节 | 微生物遗传物质的类型 |
| 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 |



学习目标

- 知道微生物染色体外遗传因子的类型和特点;
- 比较细菌基因转移的**3种**主要形式;
- 辨别*E. coli* **4种**接合型菌株及其杂交结果。

第八章 微生物的遗传与变异

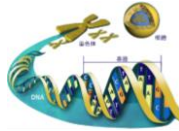
- | | |
|-----|------------|
| 第一节 | 遗传变异的物质基础 |
| 第二节 | 微生物遗传物质的类型 |
| 第三节 | 细菌的基因转移和重组 |
| 第四节 | 真菌的基因重组 |
| 第五节 | 微生物的突变 |
| 第六节 | 微生物遗传变异的应用 |
| 第七节 | 基因工程和合成生物学 |
| 第八节 | 菌种退化、复壮和保藏 |



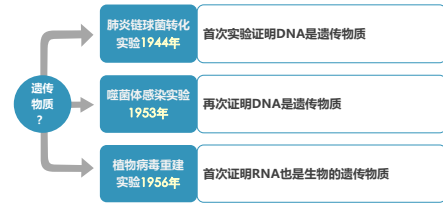
第一节 遗传变异的物质基础

一、DNA为遗传物质的3个典型实验

二、基因组学的蓬勃发展



一、DNA为遗传物质的3个典型实验 (核酸水平)



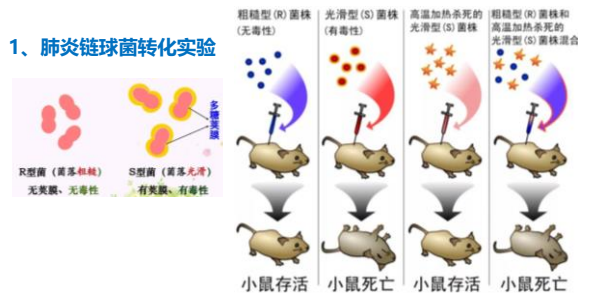
思考：为什么要以微生物作为研究遗传与变异的材料？

复习：微生物的特点

- 1、形态微小，结构简单
- 2、代谢旺盛、繁殖快速
- 3、适应性强，易变异
- 4、种类繁多、分布广泛

第1章	绪论
第2章	原核微生物
第3章	真核微生物
第4章	病毒
第5章	微生物的营养和培养基
第6章	微生物的代谢
第7章	微生物的生长及其控制
第8章	微生物的遗传与变异
第9章	微生物生态学
第10章	微生物在实际中的应用
第11章	传染与免疫
第12章	微生物的分类

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型细胞内，并使R型细胞获得稳定的遗传性状

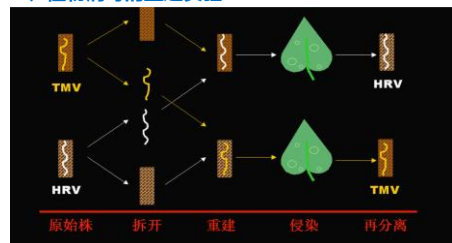
2、噬菌体侵染细菌实验

同位素 ^{32}P 标记噬菌体DNA
同位素 ^{35}S 标记噬菌体蛋白质



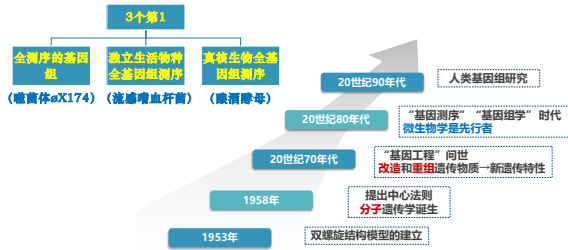
结论： ^{35}S 位于上清液中，而 ^{32}P 存在于底部，又一次证明遗传物质是DNA，而不是蛋白质

3、植物病毒的重建实验

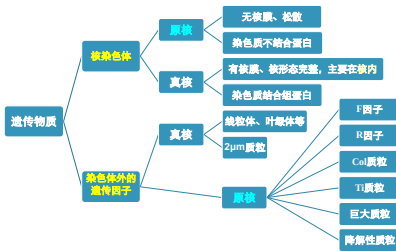


结论：遗传物质是RNA

二、基因组学的蓬勃发展 (分子水平)



第二节 微生物遗传物质的类型



二、基因组测序技术 思考: 微生物种类繁多, 应该对哪些微生物的基因组进行测序?

- 第一代: 双脱氧链末端终止法测序技术
- 第二代: 高通量测序技术
- 第三代: 单分子测序和纳米孔测序



第八章 微生物的遗传与变异

- 第一节 遗传变异的物质基础
- 第二节 微生物遗传物质的类型
- 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



一、核染色体

思考: 用什么方法研究微生物的基因组呢?

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) 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) 研究生物基因组的组成、各基因的精确结构、相互关系及表达调控的科学。



全球模式微生物基因组测序计划 (Global Catalogue of Microorganisms)

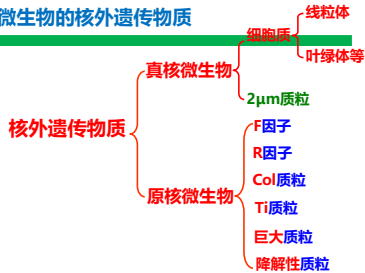
2018年中国微生物所发起, 预计5年内完成超过10,000种的细菌、真菌、古菌模式菌株基因组测序, 建立全球微生物模式菌株基因组测序合作网络。

Type Strains Genome Database



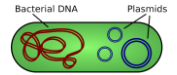
Nucleic Acids Research, 2021, 49, D694-D705

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) F质粒：与性接合有关
 2. R因子 (resistance factor) R质粒：与抗药性有关
 3. Col因子 (colicinogenic factor) Col质粒：编码生产大肠杆菌素（杀死亲缘关系近的、不具Col质粒的肠道菌）
 4. 降解质粒 (代谢质粒) 代谢质粒：分解有机化合物
 5. 毒性质粒 毒性质粒：编码生产毒素，如苏云金杆菌
 6. 随性质粒 随性质粒：不赋予宿主功能

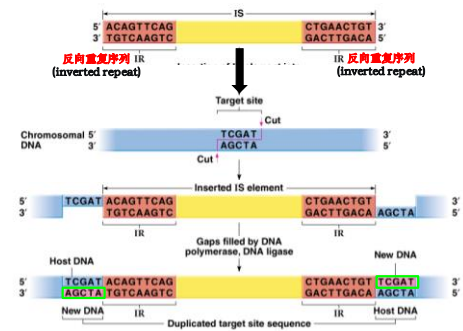
(二) 可移动遗传因子

即转座因子(transposable element)：能在细胞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。

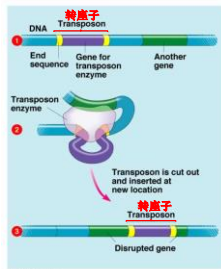
分类：根据其分子结构和遗传性质可分为3类

- 1、插入序列(insertion sequence, IS)：发现最早，能在细菌染色体、噬菌体DNA和质粒的许多位点移进移出的序列；
- 2、转座子(transposon, Tn)：基因组中可移动的DNA序列，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，最大的转座因子。

1、插入序列 IS

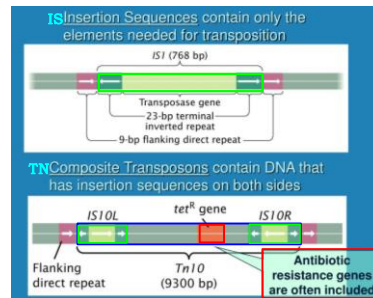


2、转座子(Tn)



- 可移动
- 从一个位置“跳跃”到另一个位置

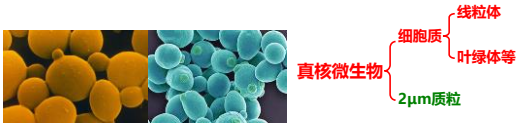
IS & TN 的区别



两个同类型的IS基因通过与其他基因结合可以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**: 细胞质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2 μ m 质粒构建的克隆和表达载体已得到广泛的应用。



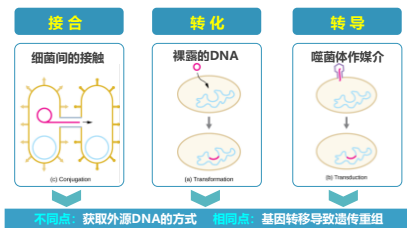
第八章 微生物的遗传与变异

- 第一节 遗传变异的物质基础
- 第二节 微生物遗传物质的类型
- 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



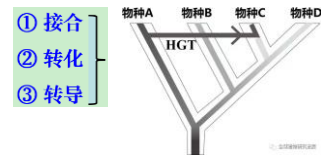
第三节 细菌的基因转移和重组

基因转移3种主要形式



水平基因转移 (HGT)

- **Horizontal Gene Transfer**: 与繁殖无关, 可在不相关的基因组间进行基因转移; 可跨越物种边界。
- **Vertical Gene Transfer**: parent (亲代) → offspring (子代)



一、接合 (conjugation)

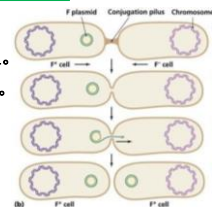


一、接合 (conjugation)

接合: 供体菌和受体菌的完整细胞通过相互间的直接接触, 进行DNA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。

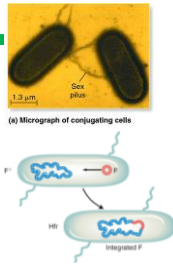
发现: 大肠杆菌杂交实验。



1、F因子(fertility factor)

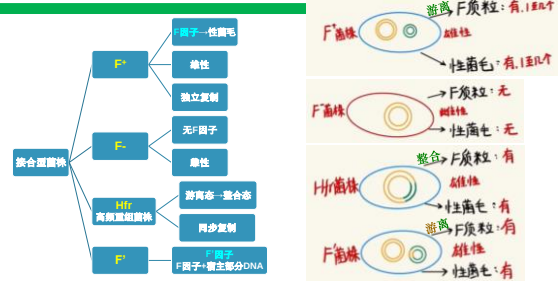
- 一种独立于染色体的小型**环状DNA**
- 具有**自主**的与染色体进行同步**复制**和**转移**到其它细胞中去的能力
- 控制着**大肠杆菌性菌毛**的形成
- 在大肠杆菌中存在两种形式：**游离态**和**整合态**

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

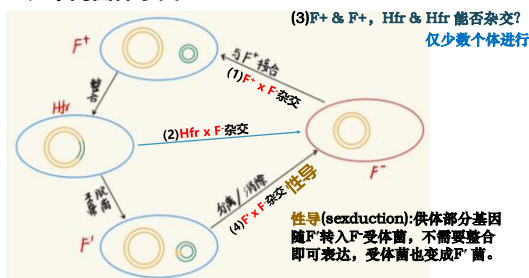


2、大肠杆菌的4种接合型菌株

思考：不同菌株杂交结果如何？

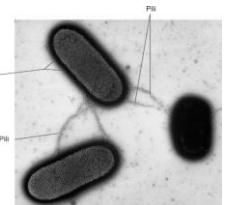


3、不同菌株杂交



复习：性菌毛(pili, pilus)

- 结构：与菌毛相同
- 数目：较少(一至少数几根)
- 较长、较宽
- 存在：大肠杆菌及其它肠道细菌的**雄株菌**的表面



思考：接合现象只存在于G⁻菌株吗？

功能

- 参与细菌 (G⁻) 接合作用
- 传递遗传物质

二、转化 (transformation)

转化	内容/概念
条件	供体菌、受体菌 (感受态)
获得供体菌性状的受体细胞	转化因子
具有转化活性DNA (供体菌)	转化因子
过程	制备感受态细胞 → DNA的结合和摄取 → 转化因子与染色体重组

1、转化：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**新遗传特性**的现象。

2、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**。

3、感受态的机理研究

- 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：

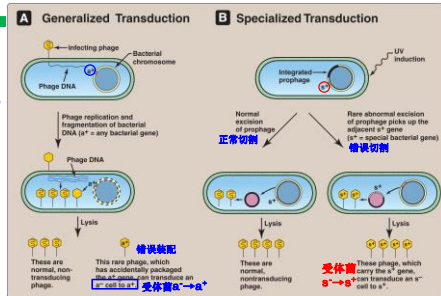
①局部**原生质体**假说：处于感受态的受体菌**局部**失去**细胞壁**，使外源DNA能顺利经膜进入菌体；

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？

普遍性转导 (generalized transduction) & 局限性转导 (specialized transduction)

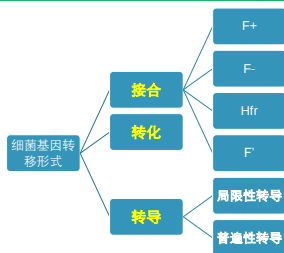
P208表8-6



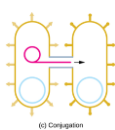
3. 流产转导

- **类型**：普遍性转导产生；
- **存在方式和位置**：转导DNA不能通过重组整合到宿主DNA上，以游离和稳定的状态存在于细胞质中；
- **结果**：DNA不能复制，细胞分裂时只能传递给一个细胞，随着细胞分裂而逐渐被淘汰。

小结&检测 (慕课堂)



细菌间的接触



裸露的DNA

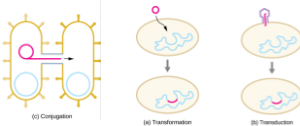


第八章 微生物的遗传与变异

- 第一节 遗传变异的物质基础
- 第二节 微生物遗传物质的类型
- 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

复习：细菌基因转移的三种主要形式

- 相同点？
- 不同点？



思考：真菌是如何进行基因转移和重组的？

第四节 真菌的基因重组

- “一个基因一个酶”：1941年Beadle等研究**粗糙链孢菌**的生化突变型提出。
- 有利于进行遗传分析：真菌减数分裂后产生的所有细胞核都存在于**有性孢子**中。
- 具有独特的遗传系统：除具有有性和无性生殖外，还有**异核现象**和**准性生殖**两种其他生物中罕见的遗传系统。
- 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。

复习：
霉菌

有性繁殖的3个阶段：

一 质配

- 两个性细胞接触并融合
- 细胞质融合→双核细胞
- 每个核均含单倍染色体 ($n+n$)

二 核配

- 两个核融合→单核细胞 ($2n$) →接合子

三 减数分裂

- 接合子细胞核 ($2n$) →减数分裂
- 核中染色体数目→ n



二、异核现象(heterokaryosis)

- 异核现象**：在某些真菌（**子囊菌**、**担子菌**和**半知菌**等）中自然发生，来自不同菌株菌丝细胞的细胞质融合，而**细胞核没有融合**产生的、存在一个以上**不同遗传型细胞核**的现象。
- 异核体**：细胞、包含它的菌丝或菌丝体称为异核体，如二核体。
- 思考：为什么会存在这样的现象？对于真菌和人类有何意义？

异核现象的存在意义

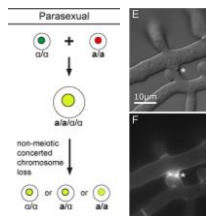
- 无性真菌**：体细胞重组，产生互补的异核体，具有高度的生理适应性；引入和维持**种群遗传变异**。
- 人工异核体的形成**：将不同的**性状结合**，产生在**抗生素和酶生产、发酵、生物防治和生物修复**方面具有**优越性能**的真菌菌株。

三、准性生殖(parasexuality or parasexual reproduction)

- 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

- 异核体形成
- 核融合和杂合二倍体的形成
- 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——**草麻青霉**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。

4、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，某些真菌既可以进行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

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**都有这种酶的基因，但是这种酶还存在于人体肠道细菌（*Bacteroides plebeius*）中，在日本人体内被发现。

> Nature. 2010 Apr 8;464(7290):908-12. doi: 10.1038/nature08937.

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

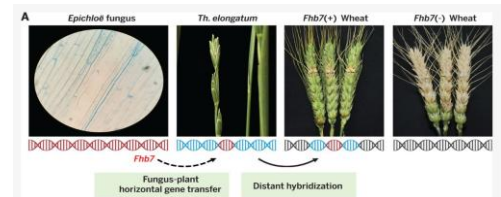


例2：真菌与小麦间的水平基因转移

Fhb7基因水平转移
塑造小麦赤霉病抗性

Science
Horizontal gene transfer of *Fhb7* from fungus underlies *Fusarium* head blight resistance in wheat

HONGWEI WANG, BILONG SUN, WEIYANG GU, LANFEI ZHANG, BINGQIAN HOU, KAILI WANG, ZHENGFAN LIU, LIYANG CHEN
DOI: 10.1126/science.1234567



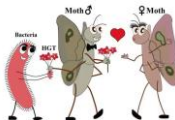
例3：细菌与昆虫间的水平基因转移

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**，有助于**增强**雄虫对雌虫**求偶行为**。
- **实验研究**：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，与**野生型**小菜蛾相比，**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，发现突变体雌虫对雄虫的求偶欲望显著地降低。



第五节 微生物的突变

广义的突变(mutation)：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



相关概念

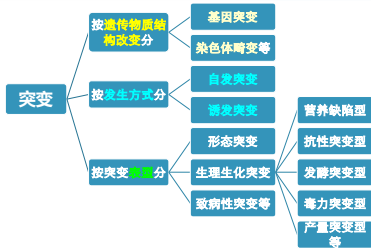
- **表型(phenotype)**：是指可以观察或检测到的个体**性状或特征**，是特定的**基因型**在一定环境条件下的表现。
- **基因型 (genotype)**：指储存在**遗传物质**中的信息，即DNA碱基序列。
- **野生型**：未发生突变的从自然界分离到菌株。
- **突变体**：野生株经突变后带有**新的遗传性状**的菌株（增加或缺失）。

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*⁻ 分别表示能发酵乳糖和不能发酵乳糖，*sts*⁺、*sts*⁻ 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

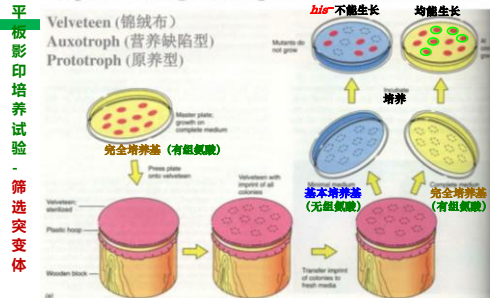
(1) 自发突变产生的原因

- 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**

Replica Plating Technique: Isolation of Mutants



(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)

(1) 定义：通过物理、化学或生物的因素而引起的加速突变。

(2) 诱变剂(mutagen)：凡具有诱变效应的任何因素

(3) 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。

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

(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

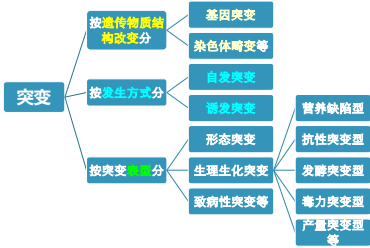
条件致死突变型

- 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



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

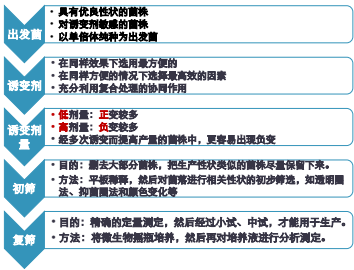
4、营养缺陷型的筛选

- (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

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

3、诱变育种的基本原则



(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

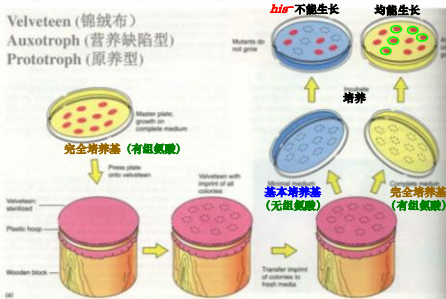
(3) 营养缺陷型的筛选方法

- **中间培养**
 - 分离突变株和未突变株
 - 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**



平
板
影
印
培
养
试
验
·
筛
选
突
变
体

Replica Plating Technique: Isolation of Mutants



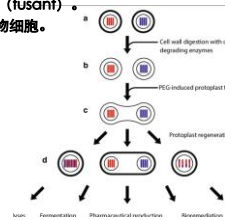
二、原生质体融合育种 (protoplast fusion)

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

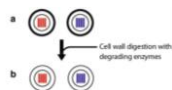
- 可以实现远缘菌株间的基因重组
- 杂交频率较高
- 可进行多亲本融合
- 遗传物质的传递更为完整
- 通过原生质体融合提高产量



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**
- 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



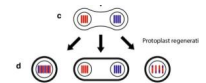
(2) 原生质体的再生

- 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

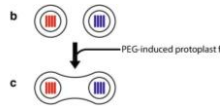
$$\text{原生质体再生率} = \frac{\text{再生菌数} - \text{剩余菌数}}{\text{破壁前菌数} - \text{剩余菌数}} \times 100\%$$

· 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



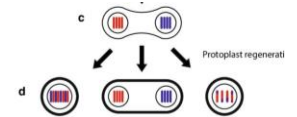
(3) 原生质体的融合



- ♦ **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**

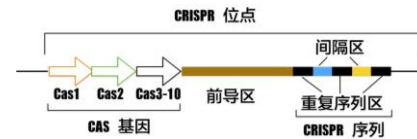


(三) 基因编辑 (gene editing or genome editing)



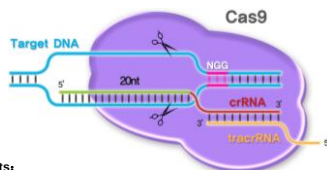
(三) 基因编辑 (gene editing or genome editing)

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:

1. Cas 9 (*Streptococcus pyogenes*);
 2. crRNA;
 3. trRNA;
- gRNA (guide RNA)

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

思考：如何理性和规范应用微生物技术？使其更好为人类服务

对分易：弹幕讨论

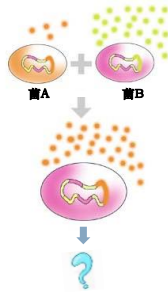
第七节 基因工程和合成生物学

一、基因工程 二、合成生物学

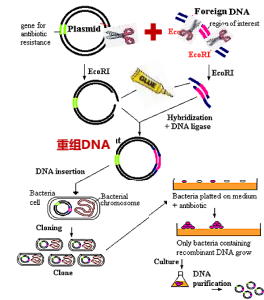
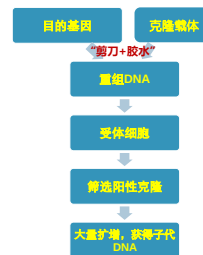


一、基因工程

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:



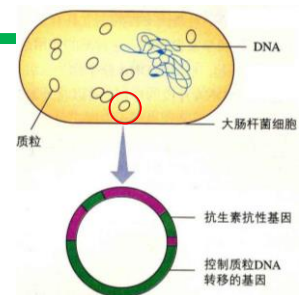
1、如何获取目的酶基因？

- 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

- 限制性核酸内切酶
- 连接酶
- DNA聚合酶

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

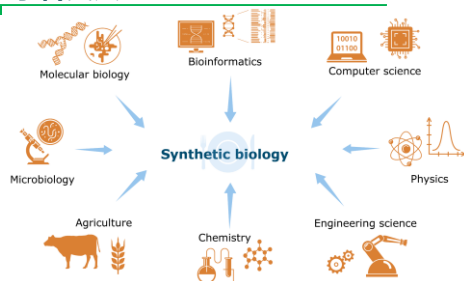
- 传统模式：基因片段转移（一个生物→另一个生物）
- 新的研究：阅读遗传密码→书写遗传密码
- 目的：实验室合成DNA→制造自然界不存在的细菌或病毒→按照人类要求进行工作



(二) 什么是合成生物学

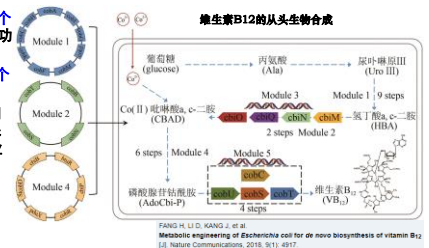
- **synthetic biology**: 设计和构建自然界中不存在的人工生物系统，以解决人类社会的重要问题。
- **研究方法**: 采用工程学“设计—合成—测试”的研究方法，在学习抽象自然生命系统的基础上，或对自然生物系统“重编程”，或重头设计具有全新特征的人工生命体系；然后，利用“基因编辑”“基因合成”等“工具包”，用实验方法来构建，再对构建出来的生物系统进行测试，如此反复循环优化，形成了一个正向可靠的科学闭环。
- **应用**: 对我国绿色生物制造产业和可持续发展战略至关重要

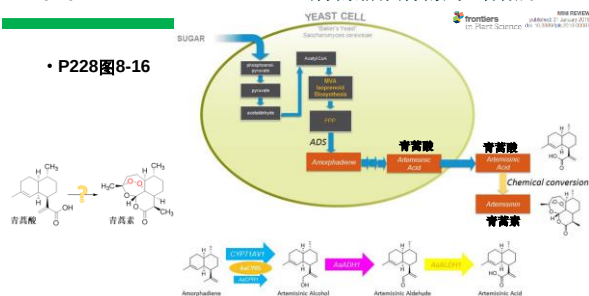
多学科交叉



(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







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**不活跃、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



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

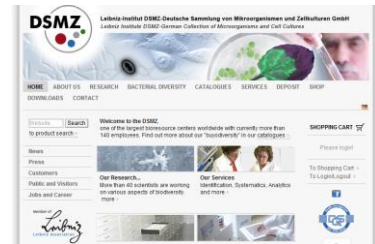
4、寄主保藏法

- 此法适用于专性活细胞微生物
- 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



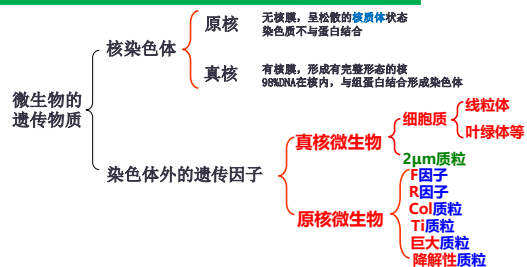
- DSMZ是欧洲规模最大的生物资源中心，保藏有细菌9400株，真菌2400株，酵母500株，质粒300株，动物细胞500株，植物细胞500株，植物病毒600株，细菌病毒90株等。

第八章 微生物的遗传与变异

- 第一节 遗传变异的物质基础
- 第二节 微生物遗传物质的类型
- 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



(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

- 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**类变噬菌体。

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

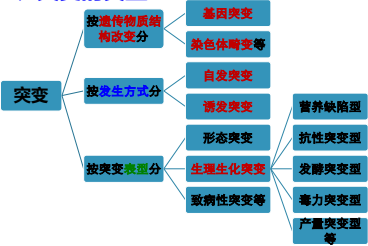
差异：获取外源DNA的方式不同

- 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**

视频观看：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