

遗传学（第3版）

第9章 病毒的遗传分析

1. 病毒的形态结构与基因组
2. 噬菌体的增殖与突变型
3. 噬菌体突变型的重组测验
4. 噬菌体突变型的互补测验
5. 噬菌体T4 r II 的缺失突变与作图
6. λ 噬菌体的基因组与位点专一性重组

9.1 病毒的形态结构与基因组

9.1.1 病毒的形态结构

病毒 (virus) 是一类超显微的、结构及其简单的、活细胞内寄生的、在活体外能以无生命的化学大分子状态长期存在并保持其侵染活性的非细胞生物

病毒的形态结构只能借助电子显微镜才可以观察到

病毒粒子 (毒粒)：成熟的具有侵染力的病毒个体

病毒粒子是一种包括核酸和结构蛋白或被膜的一个完整的病毒颗粒，其体积大小相差悬殊，绝大多数直径在10~ 300 nm之间。其形态多种多样，但基本形态有

杆状：如烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 等

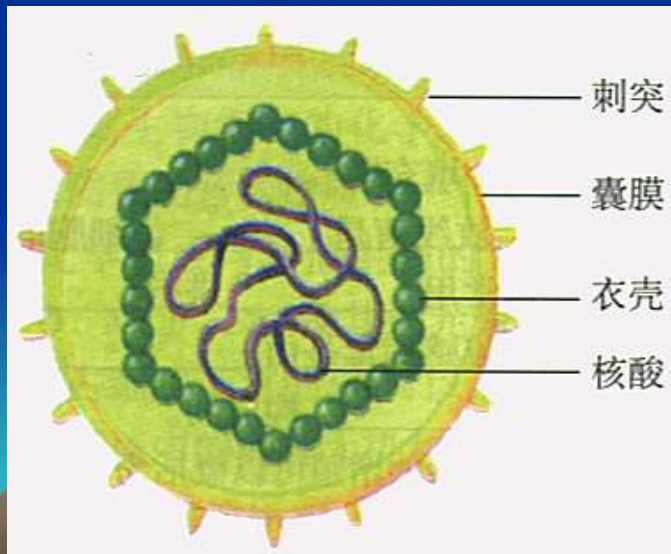
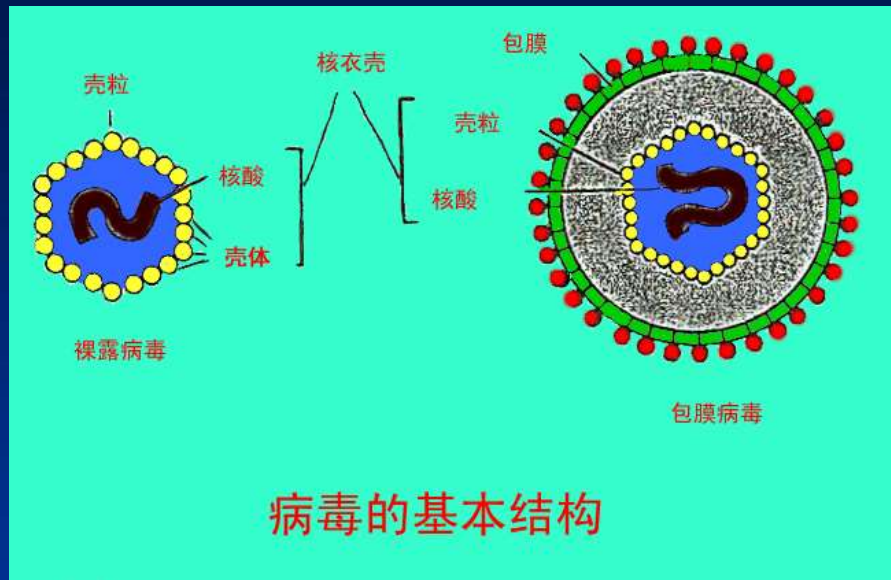
球形：如腺病毒 (adenovirus) 等

蝌蚪状：如λ噬菌体和T偶数噬菌体均为蝌蚪形。大部分噬菌体的典型形态。 ([图9-1](#))



病毒的基本结构

- 由蛋白质衣壳（capsid）和位于毒粒中心的核酸构成的核壳（nucleocapsid）组成。
- 核酸+衣壳（核衣壳）
- 核酸：DNA或RNA
- 衣壳：由许多蛋白质亚单位衣壳体以对称的形式，规则排列而成。
- 有的病毒在核衣壳外还有囊膜、包膜、被膜、外膜等结构，膜的表面还有突起：刺突、囊膜粒等



9.1.2 病毒的基因组

通常按宿主类型病毒分为：

噬菌体 (bacteriophage 或 phage)：细菌病毒、真菌病毒及藻类病毒

植物病毒 (plant virus)：感染高等植物、藻类等真核生物的病毒

动物病毒：昆虫病毒和脊椎动物病毒

已知病毒基因组的结构类型多种多样，根据病毒基因组的结构、以及其转录mRNA、指导蛋白质合成与病毒复制表达的特点，基本上可以将其分成6种类型：

双链 (ds) DNA病毒基因组

单链 (ss) DNA病毒基因组

正链 (+) RNA病毒基因组

负链 (-) RNA病毒基因组

双链 (ds) RNA病毒基因组

反转录病毒基因组



表 9-1 病毒的基因组结构

病毒的类别	核酸 ¹	染色体形状 ²	染色体长度 ³ /μm	碱基对(或碱基)的数目/bp
类病毒	ssRNA	O	<0.2	<400
噬菌体				
T4	dsDNA	L	54.0	16 890
λ	dsDNA	L/O	17.3	48 500
T7	dsDNA	L	12.5	39 940
ΦX174	ssDNA	O	1.8	5 386
MS2	ssRNA	L	1.0	3 570
植物病毒				
马铃薯 X 病毒(potato virus X, PVX)	ssRNA	L	2.9	8 670
烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)	ssRNA	L	2.1	6 300
动物病毒				
疱疹病毒(herpes virus)	dsDNA	L	53.0	159 000
冠状病毒(coronavirus)	ssRNA	M	10.0	30 000
口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)	ssRNA	L	3.4	10 300
人体免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)	ssRNA	M	3.20	9 700
脊髓灰质炎病毒(polio virus)	ssRNA	L	2.6	7 800
乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)	dsDNA	O	1.1	3 200

注:1. ss = 单链, ds = 双链。

2. L: 线状染色体, O: 环状染色体, M: 基因组含几个片段。

3. 染色体长度和碱基对数目的关系: $3\ 000\ \text{bp} = 1\ \mu\text{m} = 2 \times 10^9$ (相对分子质量)。



不同病毒的核酸含量差别较大，通常在1% ~ 50%。
但对每种病毒粒子而言，核酸的长度是一定的，一般由5~500 kb组成。

最大的病毒基因组有几百个基因

最小的病毒如M S2噬菌体仅有3个基因

病毒基因组编码的基因一般有：侵染功能所需的基因，如**侵染中的酶**；基因组复制所需的基因，如**聚合酶基因**；病毒体形成的基因，如**衣壳蛋白基因**；破坏宿主细胞的基因，如**溶菌酶基因**；有些病毒生活周期中任何特殊方面所需的基因，如λ噬菌体基因组与宿主基因组之间的位点专一性重组所需的基因等。

Figure 16.1 Overview: the reproductive cycles of retroviruses and retroposons involve alternation of reverse transcription from RNA to DNA with transcription from DNA to RNA. Only retroviruses can generate infectious particles. Retroposons are confined to an intracellular cycle.

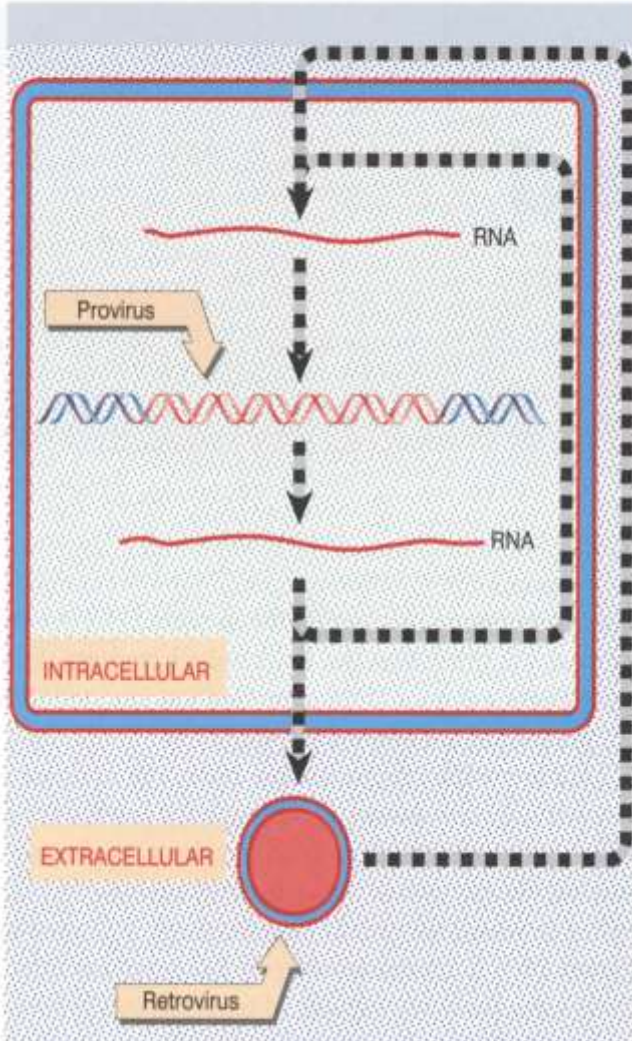
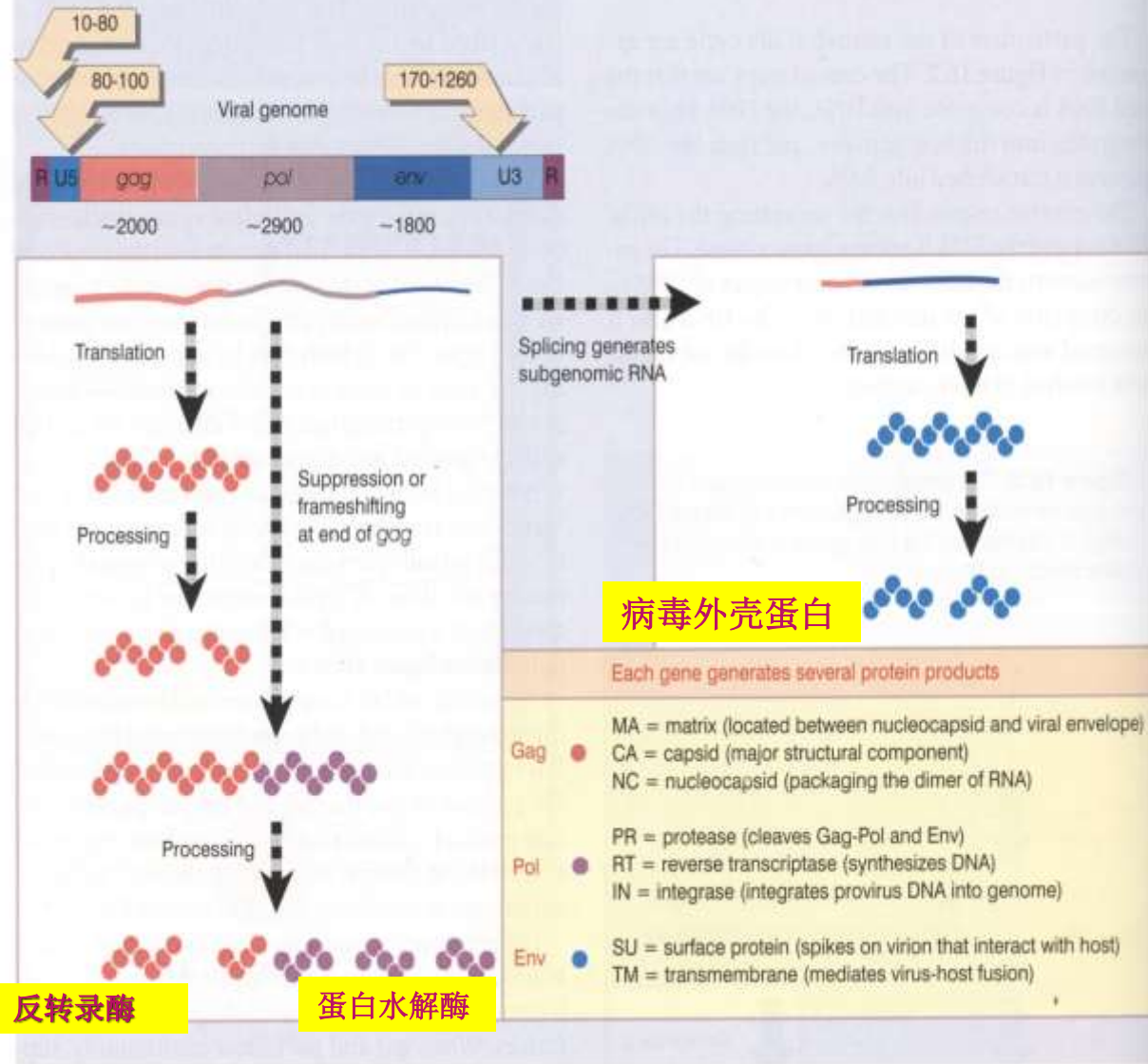


Figure 16.3 The 'genes' of the retrovirus are expressed as polyproteins that are processed into individual products.



反转录病毒的生活史

反转录病毒基因组的结构与功能及转录

9.2 噬菌体的增殖与突变型

9.2.1 噬菌体的增殖

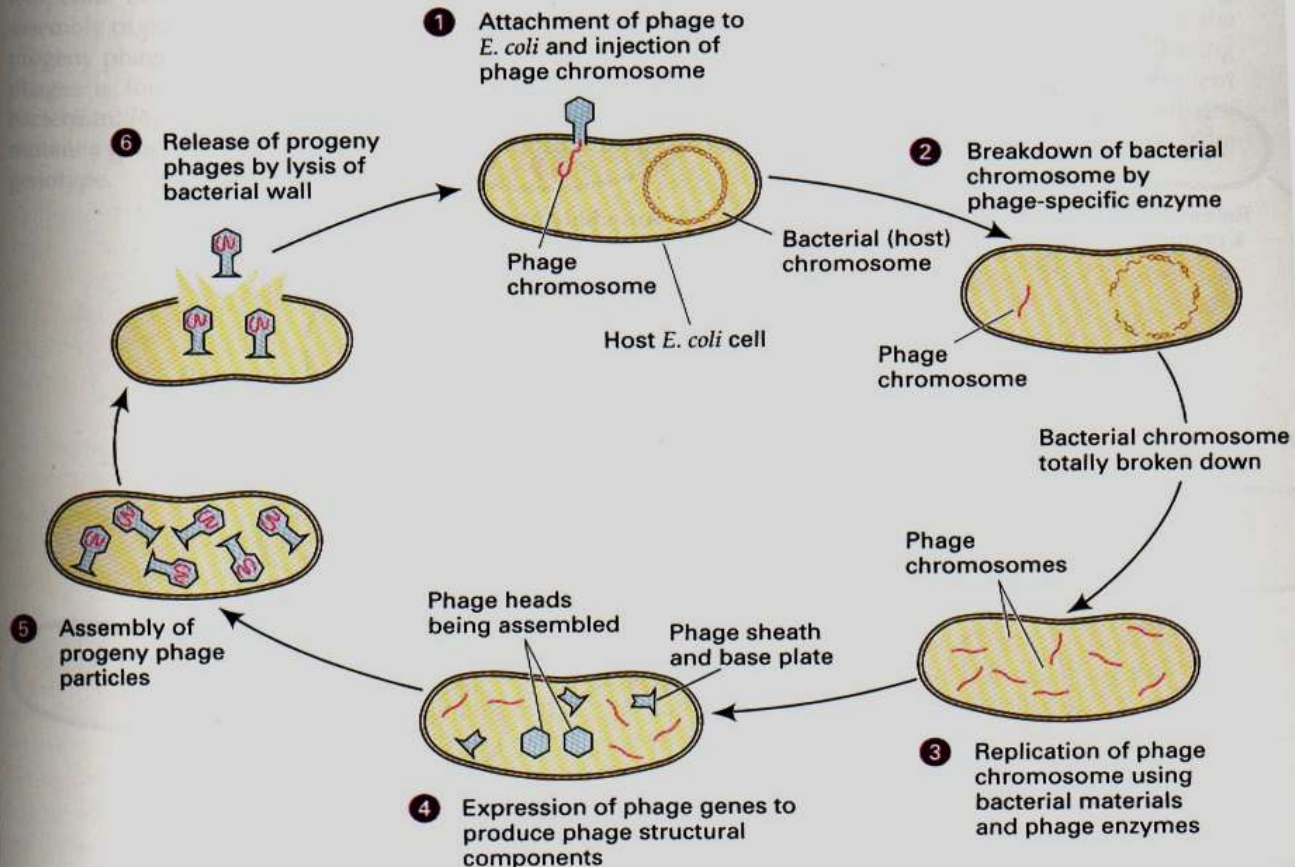
(1) 烈性噬菌体 (virulent phage) 的增殖:

感染宿主细胞后就进入裂解反应, 使宿主细胞裂解。

整个过程包括:

- 吸附
- 侵入
- 脱壳
- 生物合成
- 装配和释放

Lytic life cycle of a virulent phage, such as T2 or T4.



(2) 温和噬菌体的增殖

其感染周期有两种途径：

即裂解途径和溶源途径，

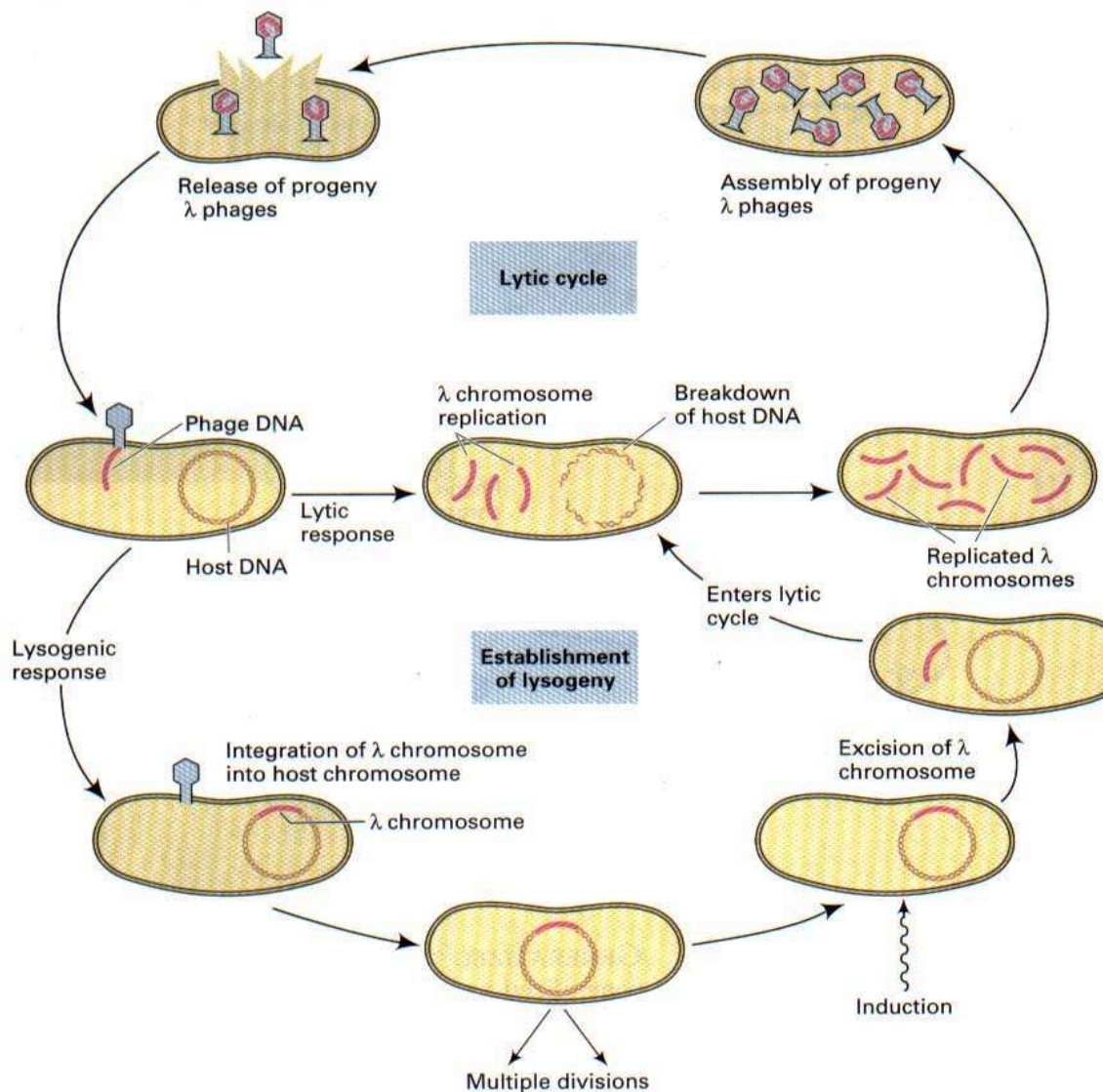
分别称为裂解周期

(lytic cycle)

和溶源周期

(lysogenic cycle)

Life cycle of a temperate phage, such as λ . When a temperate phage infects a cell, the phage may go through either the lytic or lysogenic cycle.



9.2.2 噬菌体的突变型

(1) 条件致死突变型

在某些条件下，导致某些突变型致死。

① **温度敏感突变** (temperature sensitive mutation, *ts*)，野生型噬菌体能在很大的温度变化范围内感染宿主并进行繁殖，而**热敏感突变型**，通常在30℃（许可条件）感染宿主进行繁殖，但在40~42℃（限制条件）就是致死的，不能形成噬菌斑；而**冷敏感突变型**在较低温度下就致死。

② **抑制因子敏感突变** (suppressor sensitive mutation, *sus*)，*sus*突变的实质是原来正常的密码子变成了终止密码子，因而翻译提前终止，不能形成完整肽链而产生有活性的蛋白质。带有*sus*突变的噬菌体在感染一种带有抑制基因 (suppressor, su^+)（许可条件）的宿主菌时能产生子代，但在感染另一种没有抑制基因 (su^-)（限制条件）的宿主菌时，不能产生子代。野生型噬菌体在这两种宿主中都能产生子代。



表 9-2 不同宿主菌中 *sus* 突变噬菌体的表型

噬菌体基因型	宿主菌基因型			
	<i>su</i> ⁻	<i>su</i> ⁺ <i>amb</i>	<i>su</i> ⁺ <i>och</i>	<i>su</i> ⁺ <i>op</i>
野生型	+	+	+	+
<i>sus amb</i>	-	+	+	-
<i>sus och</i>	-	-	+	-
<i>sus op</i>	-	-	-	+

“+”产生子代,“-”不产生子代。

根据在带有专一性抑制基因的宿主中的非致死性, 可以将*sus*突变分为3类: 琥珀突变 (amber, amb)、赭石突变 (ochre, och) 和乳白突变 (opal, op), 它们相应的密码子为UAG、UAA 和UGA (表9-2)





终止密码子不编码任何氨基酸，称为无义密码子，是蛋白质合成的终止信号。这些密码子是：

UAG (amber 琥珀型)

UAA (ochre 赭石型)

UGA (opal 乳白型)

如果编码多肽链中某一氨基酸的密码子突变为终止密码子，多肽链合成到此便会中断，从而使多肽链变短而失去活性。这种突变称为**无义突变**。各种无义突变都是条件致死突变，因为有相应的无义抑制基因 (su^+)。

这些 su^+ 突变型之所以在带有相应的抑制基因宿主中可产生后代，是因为翻译过程中，在终止密码子处插入一个特定的氨基酸，防止在终止密码子位置上提前终止。如琥珀突变就有许多种抑制基因，各插入某个氨基酸以防止提前终止（表9-3）。

表 9-3 琥珀抑制基因的性质

琥珀型抑制基因	插入的氨基酸	合成的蛋白质占野生型比例/ %	赭石型抑制基因
<i>su1</i> ⁺	丝氨酸	28	-
<i>su2</i> ⁺	谷氨酰胺	14	-
<i>su3</i> ⁺	酪氨酸	55	-
<i>su4</i> ⁺	酪氨酸	16	+
<i>su5</i> ⁺	赖氨酸	5	+

携带su⁺ 突变型的菌株实质是tRNA基因发生了突变，例如表9-3中的琥珀型抑制基因su3⁺在UAG密码子上插入了一个酪氨酸，这是因为tRNA^{Tyr}基因的反密码子的一个突变，tRNA^{Tyr}正常的反密码子是GUA，它按摆动规则译读酪氨酸密码子UAU。su3⁺ 菌株的tRNA^{Tyr}含有反密码子CUG，它识读琥珀型密码子UAG，并插入酪氨酸而防止终止。即使抑制基因可在相应的终止密码子处插入一个特定的氨基酸而防止提前终止，但合成蛋白质的量也只有相应野生型的5% ~ 55% (表9-3)



(2) 噬菌斑形态和宿主范围的突变型

① **噬菌斑形态突变型** 这类突变往往是致死的。但突变后有有的是由于侵染宿主细胞后溶菌速度的快慢而形成大小不同的噬菌斑（plaque）。另一些则是由于被感染细菌全部或是部分被杀死而形成清晰或混浊的噬菌斑。

② 宿主范围的突变型

	E.coli B	E.coli B/2	E.coli B+E.coli B/2
h+	+	-	半透明噬菌斑
h-	+	+	透明噬菌斑

噬菌体感染细菌时，如果受体发生改变，有可能使噬菌体不能附着，从而该噬菌体的宿主范围就缩小，另外，噬菌体突变也可以扩大寄生范围。尽管这些突变通常是致死的，不能形成噬菌斑，但有些突变在限制的宿主中是致死的，而在许可的宿主中则可形成噬菌斑。因而宿主范围的突变型其本质也是条件致死突变型之一。



Benzer所用的T4的 r_{II} 突变就是一个条件致死突变型。

T4 r_{II} 突变使所侵染细胞迅速裂解形成大的噬菌体，即快速溶菌突变体（rapid lysis mutant），这些突变体命名为 r ，称为 r_{II} 突变型。T4噬菌体有多个迅速裂解突变型，分别称为 r_{I} ， r_{II} ， r_{III} 等，位于T4染色体DNA的不同区段，这3组突变型由于在大肠杆菌不同菌株上的反应不同可以相互区别（表9-4）。

表 9 - 4 T4 野生型和突变型的区别

类型	不同大肠杆菌菌斑平板上表型		
	B	K(λ)	S
野生型	小噬菌斑	小噬菌斑	小噬菌斑
r_{I}	大噬菌斑	大噬菌斑	大噬菌斑
r_{II}	大噬菌斑	无噬菌斑(致死)	小噬菌斑
r_{III}	小噬菌斑	大噬菌斑	大噬菌斑



9.3 噬菌体突变型的重组测验

9.3.1 Benzer的重组测验与基因的精细结构析

(1) 噬菌体的杂交和重组概念

野生型噬菌体 \leftrightarrow 突变型

用两种突变型噬菌体感染同一宿主细菌，叫混合感染 (mixed infection) 或双感染 (double infection) \rightarrow 进入裂解周期 \rightarrow 两个噬菌体偶然地发生交换 \rightarrow 它们的后裔可以出现重组子。

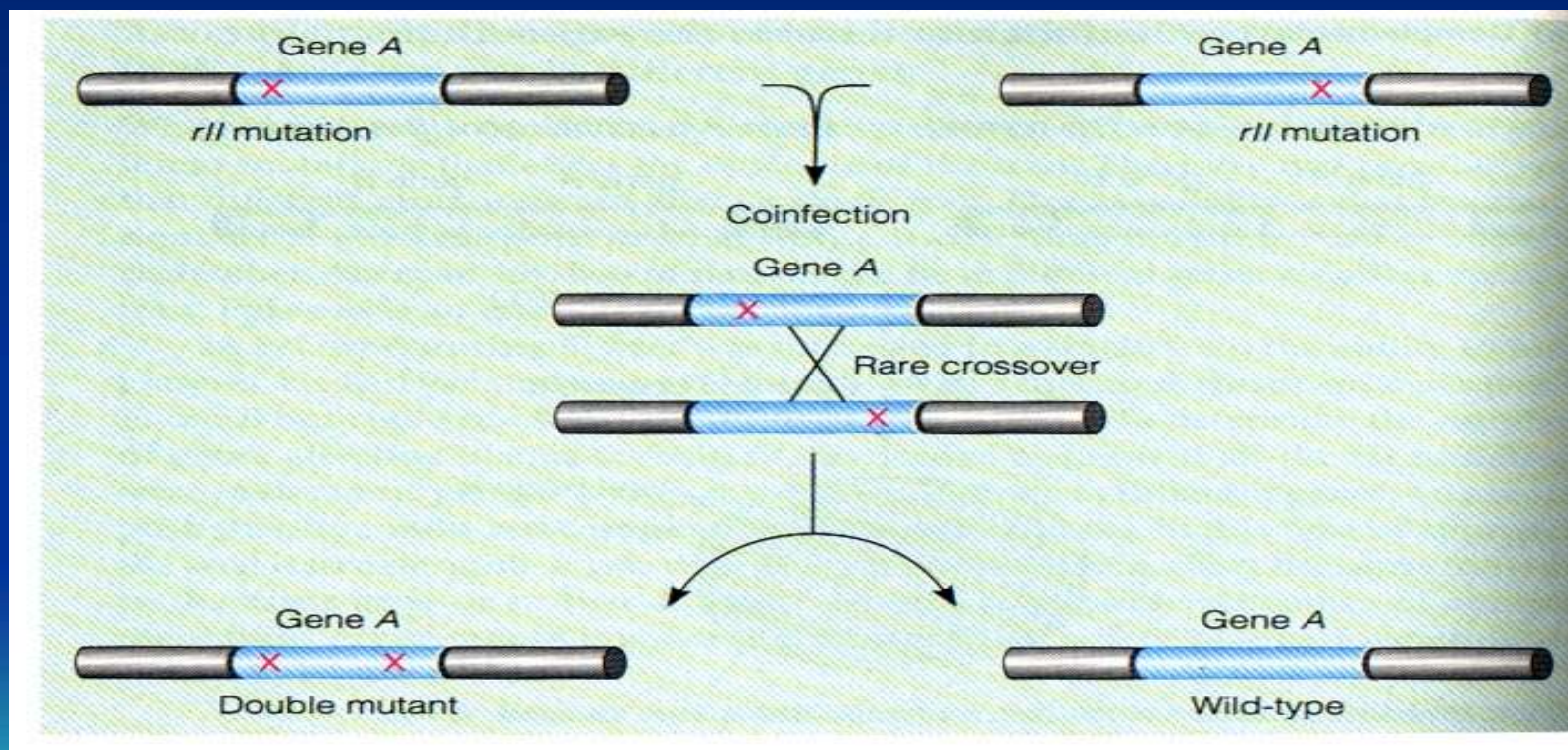
因此可以进行染色体作图分析





(2) 基因的精细作图——基因内重组 (Intragenic recombination)

基本原理如图所示:



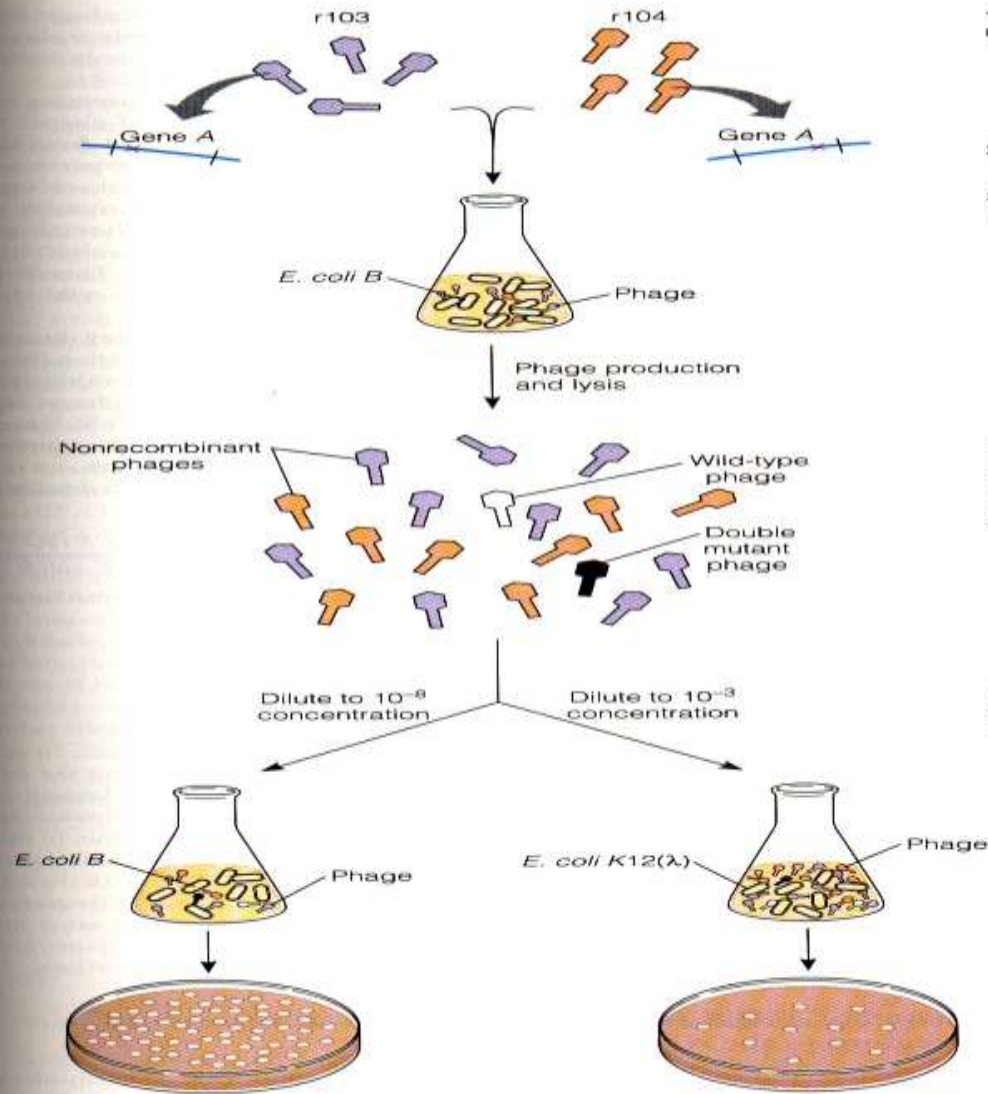


虽然基因内重组能够发生，但实验很难做，因为在两个相同基因内的两个突变间的距离非常短，在这样一个极其小的区域，产生重组的可能性仅 1×10^{-5} 。真核生物如果蝇、植物这样低的频率是无法从实验上得到的。*rII* 突变型品系，在 *E.coli* 中的不同表型提供了一个实验系统，可以检测到 1×10^{-6} 的重组子。



1955年 Benzer : 细菌噬菌体遗传区的精细结构

- 1、分离两个不同的（非互补的） r II 噬菌体突变子
- 2、共感染 *E.coli* B，形成噬菌体的新群体，*E.coli* B 细胞逐渐裂解。
- 3、收集裂解液，和 *E.coli* K 菌株混合后倒在固体平板上
- 4、取一些噬菌体 \rightarrow 稀释到 10^{-8} ，感染 *E.coli* B，也取一些噬菌体 \rightarrow 稀释到 10^{-3} ，感染 *E.coli* K12 (λ)
- 5、涂布细胞，观察噬菌斑的数目



1. Isolate two different (noncomplementing) *rII* phage mutants, r103 and r104.

2. Mix the two phages together.

3. Coinfect *E. coli B*. A new population of phages will be made. The *E. coli B* cells will eventually lyse.

4. Reisolate this new population of phages. It will primarily contain nonrecombinant phages, but it will occasionally contain intragenic recombinants of wild-type and double mutant phages (depicted in white and black respectively). The reisolated phage preparation can contain several billion phages per milliliter.

5. Take some of the phage preparation, dilute it greatly (10^{-8}), and infect *E. coli B*. Also, take some of the phage preparation, dilute it somewhat (10^{-3}), and infect *E. coli K12(λ)*.

6. Plate the cells and observe the number of plaques. The number of plaques observed from the *E. coli B* infection provides a measure of the total number of phages in the population. The number of plaques observed from the *E. coli K12(λ)* infection provides a measure of the wild-type phage produced by intragenic recombination.

FIGURE 6-17

 Benzer's method of intragenic mapping in the *rII* region.



Benzer利用T4的两个r II 不同突变型如 $r^{47}+$ 和 $+r^{104}$ 在许可条件下进行双重感染，即 r^{47} 和 r^{104} 同时侵染大肠杆菌B菌株，形成噬菌斑后收集溶菌液，将此溶菌液等分两份，一份再接种大肠杆菌B菌株：

在*E.coli* B 菌株的细胞中 $r^{47}+$ 、 $+r^{104}$ 、 $r^{47}r^{104}$ 、 $++$ 都能生长，故在此平板上可统计噬菌体总数；

另一份溶液接种于大肠杆菌K (λ) 菌株中倒平板，在这里，只有 $++$ 重组子才能生长（[图9-3](#)）

由于r II 双重突变的交互重组子 $r^{47}r^{104}$ 不能生长，所以无法检出，但是它的频率和 $++$ 相等，因此估算重组子数要将 $++$ 数乘以2，代入公式：



因此可用以下公式计算相邻不同位点的遗传距离：

$$Rf = \frac{2 \times r\text{II}^+ \text{重组噬菌体数}}{\text{总噬菌体数}}$$

由于在*E.coli* B平板感染后得到的噬菌斑数为群体总数，在*E.coli* K12 (λ)的噬菌斑为基因内重组所得到的野生型的噬菌体数，所以上公式可以表示为：

$$Rf = \frac{2 \times \text{在} E.coli K(\lambda) \text{上生长的噬菌斑数}}{\text{在} E.coli B \text{上生长的噬菌斑数}}$$

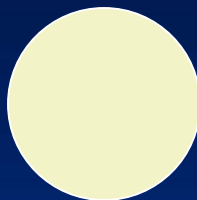
B菌株

K菌株

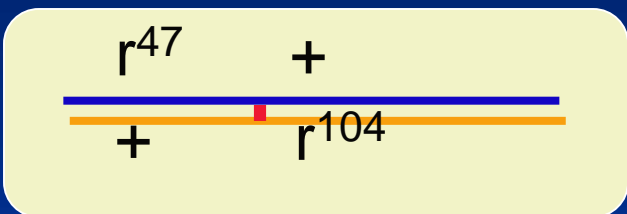
a



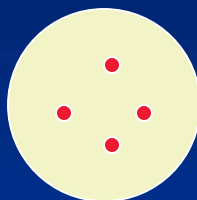
裂解液



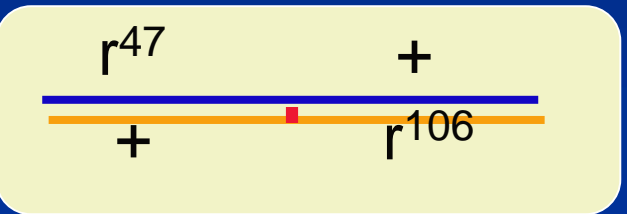
b



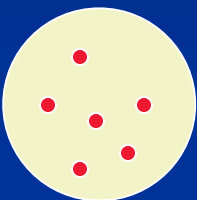
裂解液



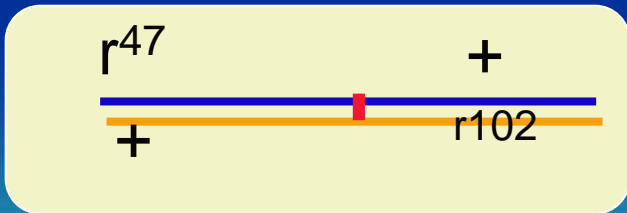
c



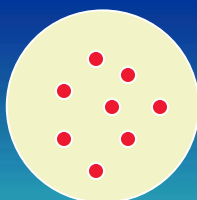
裂解液



d



裂解液



精细作图

图9-4 T4 rII不同突变位点图距的测定



这一测定方法称为重组测验（recombination test），它是以遗传图的方式确定突变子之间的空间关系（图9-4）。

根据公式

$$\begin{aligned} \text{重组频率} &= 2 (11 \times 10^3) / 6.6 \times 10^9 \\ &= 3.3 \times 10^{-6} \end{aligned}$$

$$= 0.0000033 \quad (\text{一百万分之}3.3)$$

作图显示r+重组子最低频率，在r II 突变子中带有的异点等位突变是0.01%，最小的图距0.01%来对两个标记间的分子距离——以碱基对表示的距离——做一个粗略地估计。

可检测到两个r II 突变之间重组率为0.000 2%（ $2 \times 1 / 10^6 = 2 \times 10^{-6}$ ）。但实际上所观察的最小重组率为0.02%，即0.02个图距单位，还没有发现小于这个数值的重组率（图9-

5）



以前用来计算重组的方法是计算基因与基因之间的距离，而Benzer的方法可以用来测算一个基因内部不同位点的距离，它的精确度可达到十万分之一，也就是0.001个图距单位，故称作**基因的精细作图**



例： 噬菌体T4=1500 map units (1.8×10⁵bp)

如果两个r II 突变子产生0.01% r⁺突变子，则意味突变是由0.02图单位所分开。

占整个T4 Genome: $0.02/1500 = 1.3 \times 10^{-5}$

T4 phage 有: 1.8×10⁵bp

所观察到的最小重组距离:

$$(1.3 \times 10^{-5}) \times (1.8 \times 10^5) = 2.4 \text{ bp}$$

这意味Benzer's结果已显示遗传重组可能出现在2个碱基对顺序的距离内，后来由其他人的实验已做出结论性的说明，重组可出现在影响DNA中邻近碱基对的突变之间。

也就是说：遗传实验已经说明碱基对

既是 突变单位 (unit of mutation)

也重组单位 (unite of recombination)



(3) 基因的基本概念

经典遗传学基因概念： 基因是一个基本的结构单位，基因内不发生重组；基因是一个基本的突变单位，基因内部没有更小的突变发生；基因是一个基本的功能单位，它决定着一个特定的表型性状。

即：基因是一个重组、突变和功能三位一体的单位。





现代遗传学基因概念: Gene (Cistron) is the segment of DNA involved in producing a polypeptide Chain; it includes regions preceding and following the coding region (leader and trailer) as well as intervening sequences (**introns**) between individual coding segments (**exons**).

基因内部可以发生重组，基因内部可以发生更小的突变
一些基因可被转录但不被翻译，如rRNA，tRNA等；
一些既被转录也被翻译，如Structural gene等。



9.3.2 T2 突变型的两点测交与作图

1940年 Alfred Hershey & R.Rotman 发现

T2品系噬菌体两个特定性状：噬菌斑的形态 (r^- 或 r^+)

宿主范围 (h^- 或 h^+)

一个T2品系：基因型 $h^+ r^-$

另一个T2品系：基因型 $h^- r^+$

r^- ：噬菌斑形态突变型，快速溶菌，产生大的有明显界限的噬菌斑

r^+ ：噬菌斑形态为野生型，缓慢溶解产生界限不清的小噬菌斑

h^+ ：能够溶裂 *E.coli* B品系，不能溶解*E.coli* B/2品系

h^- ：宿主范围突变型，既能溶裂*E.coli* B品系也能溶裂 *E.coli* B/2品系

让 $h^+ r^-$ 和 $h^- r^+$ 共感染*E.coli* B即 $h^+ r^- \times h^- r^+$

⇒ 得到 $h^+ r^-$ 、 $h^- r^+$ 、 $h^- r^-$ 、 $h^+ r^+$

(图9-6)

不同速溶性噬菌体的突变在表型上不同，可分别写成 r_a^- 、 r_b^- 、 r_c^- 等，用 $h^+ r_x^- \times h^- r_x^+$ 获得的试验结果如下：

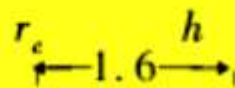
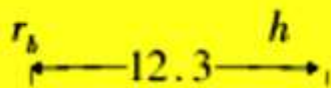
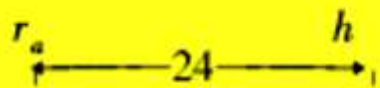
表 9-5 $h^+ r_x^- \times h^- r_x^+$ 噬菌斑数目及重组值 (r_x^- 代表不同的 r^- 基因)

杂交组合	每种基因型的%				重组值
	$h^+ r^-$	$h^- r^+$	$h^+ r^+$	$h^- r^-$	
$h^+ r_a^- \times h^- r_a^+$	34.0	42.0	12.0	12.0	$24/100 = 24\%$
$h^+ r_b^- \times h^- r_b^+$	32.0	56.0	5.9	6.4	$12.3/100.3 = 12.3\%$
$h^+ r_c^- \times h^- r_c^+$	39.0	59.0	0.7	0.9	$1.6/99.6 = 1.6\%$

分别统计各种噬菌斑的数目，由此计算出重组值，去掉%，作为图距进行作图。

$$\text{重组值} = \frac{(h^+ r^+) + (h^- r^-)}{\text{噬菌斑总数}} \times 100\%$$

根据表9-5结果可以分别作出以下 r_a 、 r_b 、 r_c 与 h 之间的3种顺序：



由于有3个不同的 r 基因，故可根据表9-5的重组值列出以下4种可能的基因排列连锁图：

(a)

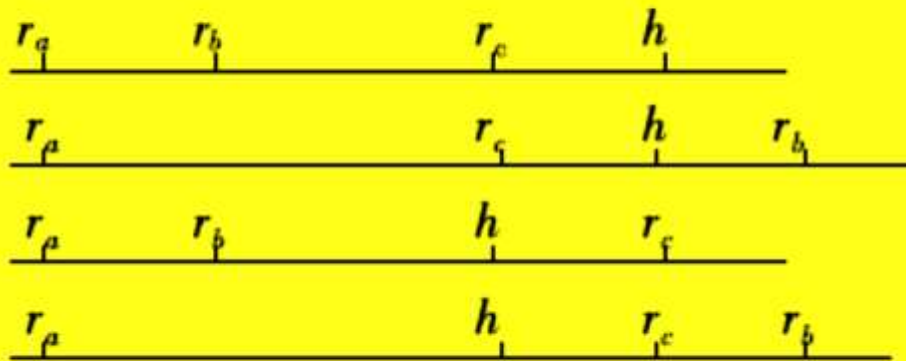
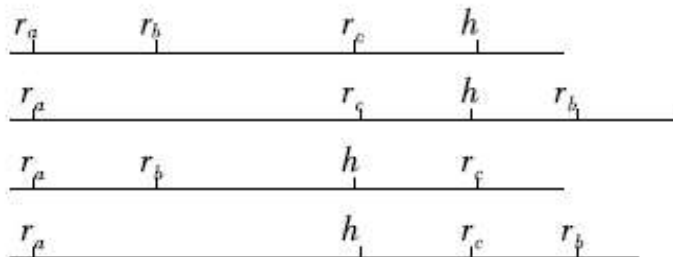


图 9-7



为了确定基因排列的正确顺序，可先只考虑 r_b 、 r_c 及 h 来确定是 $r_c h r_b$ 还是 $h r_c r_b$ 。为此需作 $r_c^- r_b^+ \times r_c^+ r_b^-$ 杂交，将所得重组值与 r_b-h 间的距离比较，据此可知 h 应位于 r_b 及 r_c 之间，所以排列顺序就是 $r_c h r_b$ [图9-7 (a)]。至于 r_a 在 h 的哪一边？是靠近 r_b 还是靠近 r_c ？因为T2噬菌体的连锁图是环状的 [图9-7 (b)]，所以两种答案都是正确的。

(a)



(b)

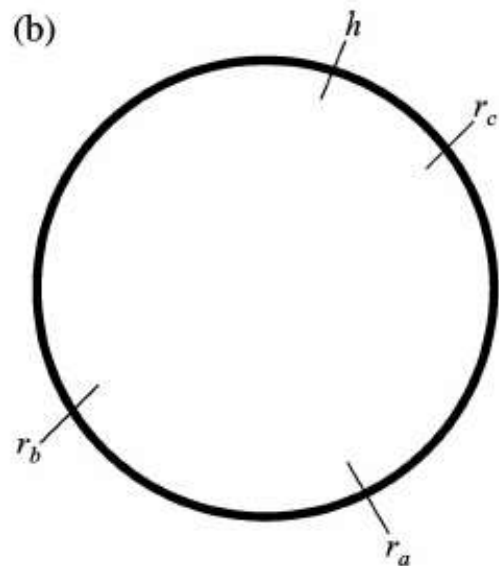


图9-7 T2的连锁图



9.3.3 λ 噬菌体的基因重组与作图

Kaiser 1955年最早进行了 λ 噬菌体的重组作图试验。

他用紫外线照射处理得到5个 λ 噬菌体的突变系：

s 系：小噬菌斑

*mi*系：微小噬菌斑

c 系：完全清亮的噬菌斑

*co*₁ 系：除中央一个环之外其余部分都清亮的噬菌斑

*co*₂ 系：比*co*₁更浓密的中央环噬菌斑。

Kaiser用*s co*₁ *m i* × + + + 杂, 交所得后代有8种类型。病毒是单倍体，与二倍体生物不同，亲本组合与重组交换的组合可直接从后代中反映出来。8个类型中数目最少的两种类型就是双交换的结果，频率最高的两种是亲本类型，其余的为单交换类型。结果及分析作图可归纳于表9—6。

表 9-6 λ 噬菌体 $s\ co_1\ mi\ \times\ +\ +\ +$ 的杂交结果及分析

类型	噬菌斑数目			占总数比例/%	重组率/%				
	$s - co_1$	$co_1 - mi$	$s - mi$						
亲本类型	+	+	+	975	1 899	90.82%			
	s	co_1	mi	924					
单交换型 I	s	+	+	30	62	2.97	√	√	
		+	co_1	mi					32
单交换型 II	s	co_1	+	61	112	5.35		√	√
		+	mi	51					
双交换型	s	+	mi	5	18	0.86	√	√	
		+	co_1	13					
合计				2 091			3.83	6.21	8.32

从双交换的类型可知，这3个基因的次序就是 $s - co_1 - mi$

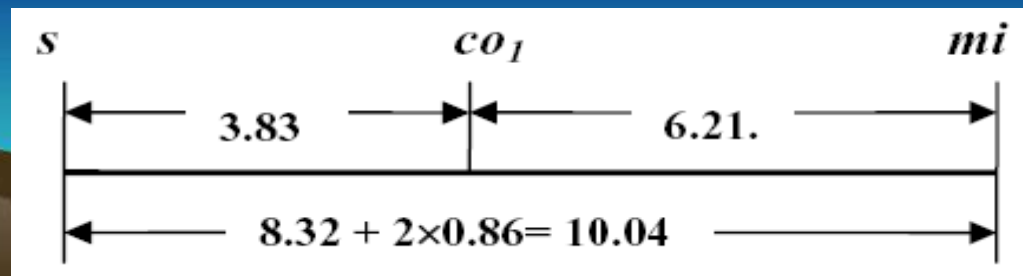
s 与 co_1 的图距应为 3.83 cM；

co_1 与 mi 之间则为 6.21 cM；

因为有双交换的存在， s 与 mi 之间的图距则为

$$8.32 + 2 \times 0.86 = 10.04$$

3个基因的遗传图：





9.3.4 T4 突变型的三点测交与作图

采用三点测交的方法，在噬菌体中同样可进行基因定位。
用T4噬菌体的两个品系感染*E. coli*。

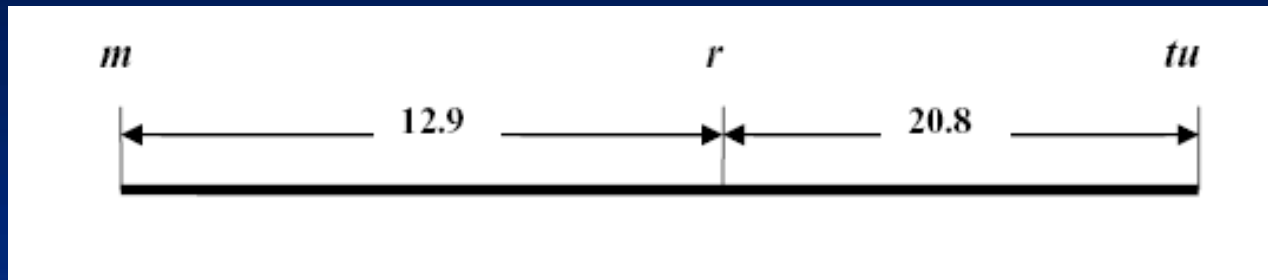
一个品系：*m r tu*（小噬菌斑、快速溶菌 浑浊溶菌斑）
突变型。另一个品系对这3个性状都是野生型（+++）的。
三点测交结果见表9-7：

表9-7 T4的 *m r tu* × + + + 三点测交结果

类型	噬菌斑数目			占总数比例/%	重组率/%		
	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>tu</i>		<i>m-r</i>	<i>r-tu</i>	<i>m-tu</i>
亲本类型	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>tu</i>	3 467	33.5	69.6	
	+	+	+	3 729	36.1		
单交换型 I	<i>m</i>	+	+	520	5.0	9.6	✓
	+	<i>r</i>	<i>tu</i>	474	4.6		✓
单交换型 II	<i>m</i>	<i>r</i>	+	853	8.2	17.5	
	+	+	<i>tu</i>	965	9.3		✓
双交换型	<i>m</i>	+	<i>tu</i>	162	1.6	3.3	✓
	+	<i>r</i>	+	172	1.7		✓
合计				10 342			12.9 20.8 27.1



根据上述结果，可绘出这3个基因的染色体图：



三点测交所得8种噬菌斑都可观察到，单倍体的病毒、亲本型与重组型可直接从后代中表现出。

虽然将真核生物中两点测交和三点测交的基本原理和方法应用于噬菌体杂交，但是两者在杂交机制上是完全不同的：

①噬菌体在杂交中，每个亲代对子代所提供的遗传贡献取决于感染细菌时每种亲代噬菌体的相对数量。如基因型A与基因型B的亲代比=10：1，则产生重组子代的数量A型常多于B型子代数。



② 噬菌体的基因重组发生在噬菌体的DNA复制以后，因此从单个混合感染的细菌中可以得到亲代噬菌体和重组噬菌体

③ 噬菌体中不同基因型之间可以发生多次交换

④ 在噬菌体中基因重组率可以随着宿主细胞裂解时间的延长而增加

因此噬菌体杂交时，应该注意：

① 控制每种亲代噬菌体基因型的投放量。

② 控制允许发生复制和重组的时间。

只有控制这两个因素并在标准条件下进行杂交，所得重组率才能用于绘制近似的遗传图





9.4 噬菌体突变型的互补测验

9.4.1 互补测验与顺反子

所谓互补作用是指二个突变型染色体同处在一个细胞中，由于相对的野生型基因的互相补偿而使表型正常化的作用。

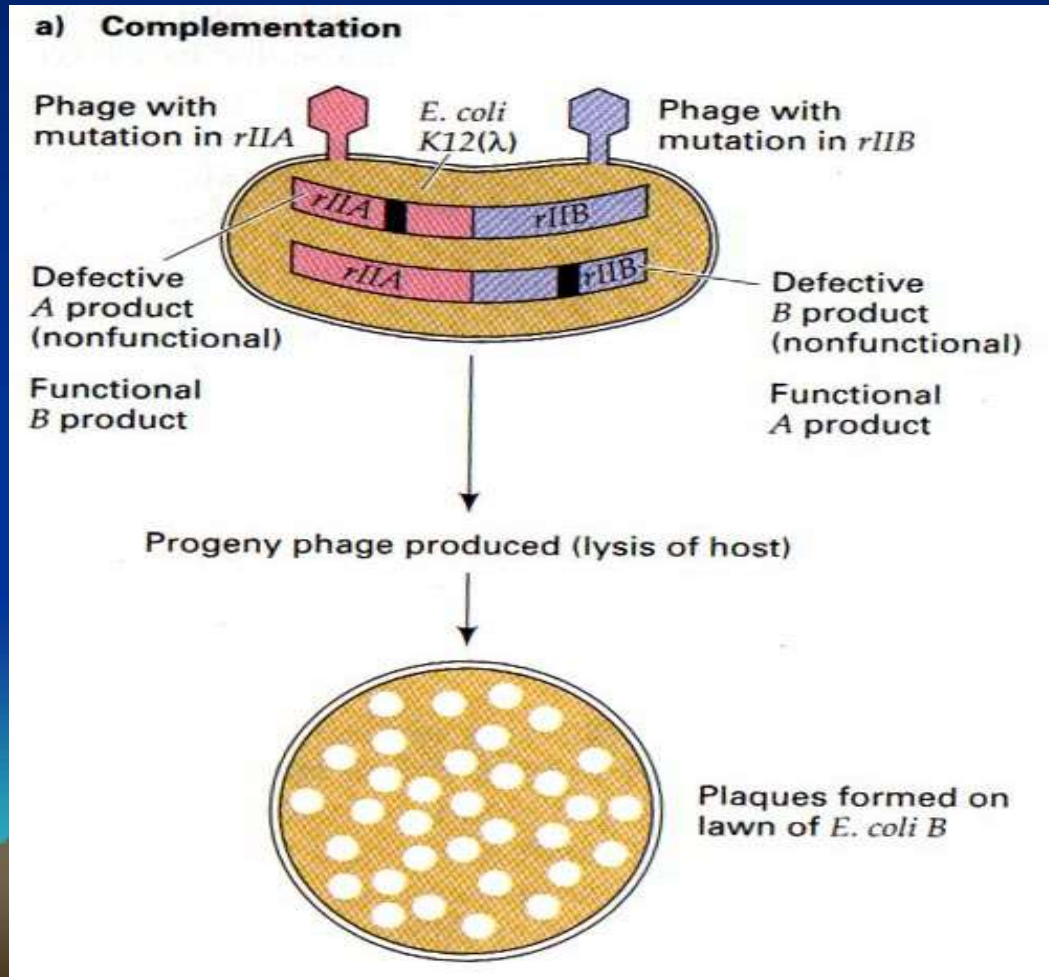
互补测验 (complementation tests) 条件：

必须是二个突变型染色体同处在一个细胞中（二倍体或部分二倍体），而且它们之间不发生重组或者只发生忽略不计的极少重组，否则将不能判断表型正常化是重组的结果还是互补的结果。

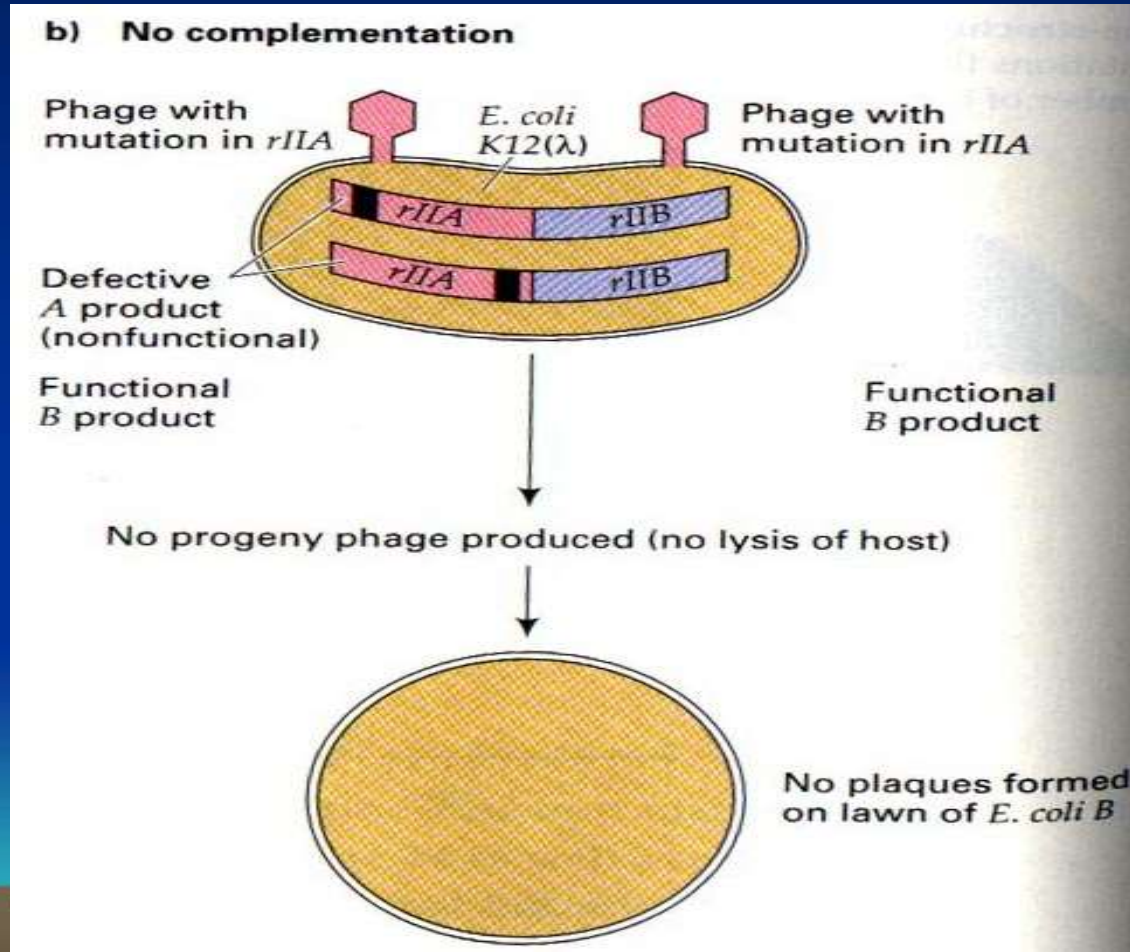
互补测验是确定突变基因的功能关系。为了界定基因的功能单位，必须进行互补测验。1957年Benzer以大肠杆菌T4噬菌体为材料，通过互补实验，在DNA分子水平上，研究快速溶菌突变型r II的基因精细结构。

Benzer的互补试验:

①用两个不同的r II 突变型r II A和r II B同时感染（共感染）*E.coli* K12 (λ), 结果可以互相弥补对方的缺陷, 共同在菌体内增殖, 引起溶菌, 释放原来的两个突变型。



②用rII A中的两个突变型，共感染或用rII B中的两个突变型共感染*E.coli* K12 (λ) 菌株，都不能互补，不产生溶菌现象



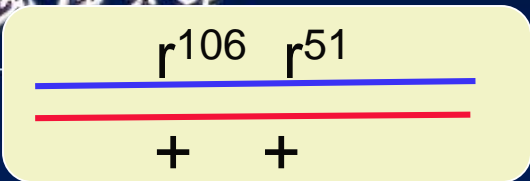


Benzer将rII 突变型 $r51$ 、 $r47$ 和 $r106$ 分别感染寄主细菌 *E.coli* K12(λ)菌株，不能形成噬菌斑，因为它们都不能复制，没有噬菌体从被感染的K 菌株释放出来。（?）

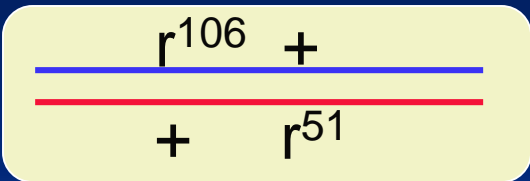
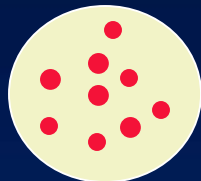
而将 $r51$ 和 $r106$ 对K菌株混合感染后，无论是顺式排列还是反式排列在指示菌*E.coli* B菌株中都能产生噬菌斑。（?）

而将 $r47$ 和 $r106$ 混合感染K菌株，只有在顺式排列的情况下，在指示菌 *E.coli* B中才出现噬菌斑，而在其反式排列中不形成噬菌斑。（?）

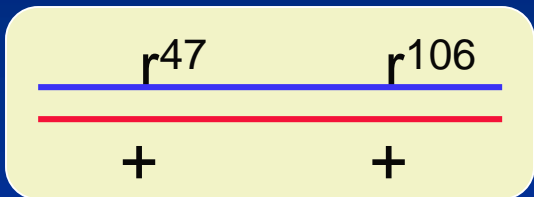
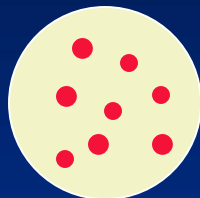




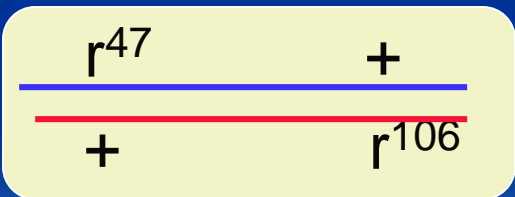
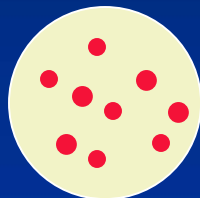
裂解液



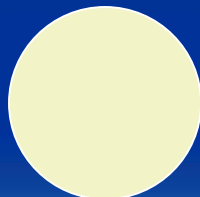
裂解液



裂解液



裂解液



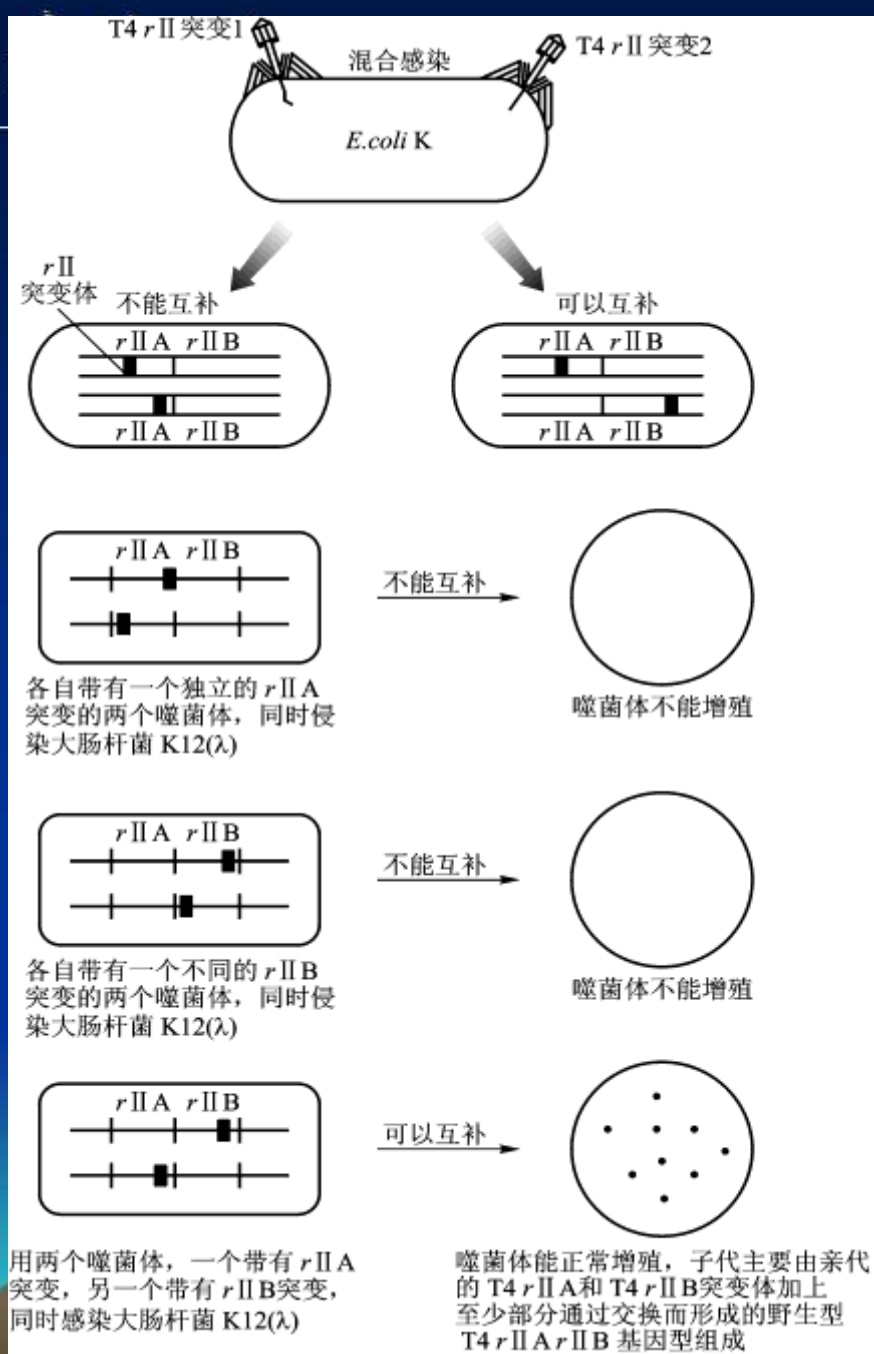
顺反测验

K菌株

B菌株



顺式排列的效应不同于反式排列的效应的现象被称为顺反位置效应。Benzer通过该实验首先提出具有顺反效应的突变型，属于同一个顺反子。在这里 $r51$ 和 $r106$ 无论是顺式排列还是反式排列在K菌株内都能生存，说明这两个突变型一定可以在功能上互补，那么这两个突变位点不在同一个顺反子中；而 $r47$ 和 $r106$ 只有在顺式排列的情况下才能互补，而在反式排列的情况下不能互补，说明这两个突变位点一定在同一个顺反子中。



所用的两个突变如果分别位于两条染色体上，这种组合方式称为反式排列，如果两个突变同时位于一条染色体上，则称为顺式排列。

图9-8 突变噬菌体之间的互补测验



结论：当两个突变型的顺式排列互补表现为野生型，反式排列不互补表型为突变型，这两个突变位点（sites）它们应属于同一基因（同一顺反子）。当两个突变型顺式、反式排列都表现为野生型，即没有位置效应时，它们应属于不同的功能基因，位于不同的座位（非等位）上。

图9-8

彼此不能互补的突变肯定影响相同的功能单位；
彼此能够互补的突变必定影响不同的功能单位。

Benzer将这样一个不同突变之间没有互补的功能区称为顺反子（cistron），即遗传的功能单位就是一个顺反子。

A cistron is a genetic region within which there is normally no complementation between mutations. The cistron is equivalent to the gene.



9.4.2 Φ X174条件致死突变的互补测验

Φ X174有许多条件致死突变型，将这些突变型成对地进行互补测验以确定不同来源的两种条件致死突变影响的遗传功能是相同还是不同的。

如am9与am32同时感染宿主后则不产生子代，因此这两个突变就归入同一顺反子G，由此推论出 Φ X174基因组中的顺反子数。根据互补测验结果， Φ X174的39种条件致死突变分属于8个顺反子（表9-8）。

表9-8 Φ X174突变的互补测验结果

顺反子	突变型
A	am8, am18, am30, am33, am35, am50, am86, ts128
B	am14, am16, och5, ts9, ts116, och1, och8, och11
C	och6
D	am10, amH81
E	am3, am6, am27
F	am87, am88, am89, amH57, op6, op9, tsh6, ts 41D
G	<u>am9</u> , <u>am32</u> , ts γ , ts79
H	amN1, am23, am80, am90, ts4

9.4.3 T4条件致死突变型的互补测验

条件致死突变型是于1960年首次在T4中分离出来的，这些条件致死突变在基因组内似乎是随机发生的，通过这些T4基因突变就可以表明不同基因在发育过程中的功能。

图9-10中外圈数字表示噬菌体基因在染色体图上大概的排列次序

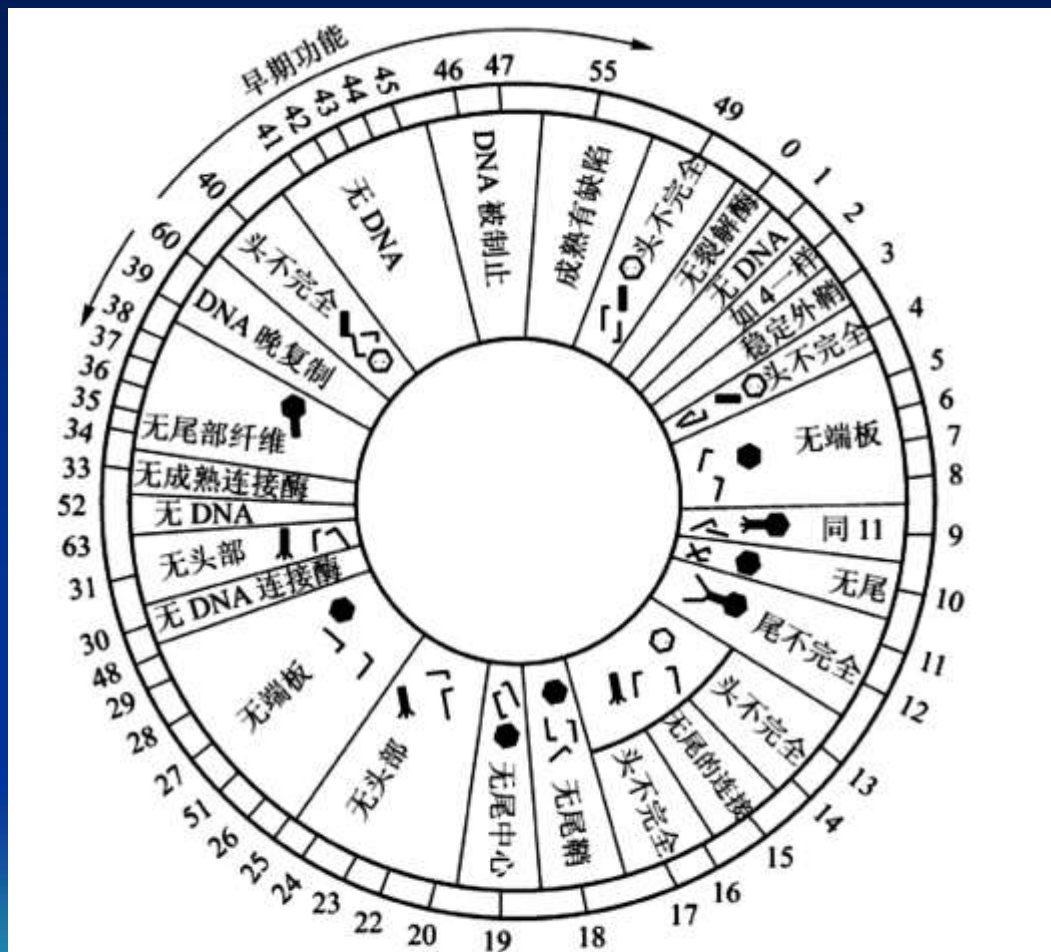


图9-10 噬菌体 T4 的遗传图

T4的条件致死突变型同样可以用互补测验法将它们归属于特定的顺反子中。

例如图9-11 (a) 基因23突变型产生尾和尾纤维但无头，而基因27突变型产生头和尾纤维但无尾。将这两个流产感染细群的裂解液混合并保温应会产生能感染的颗粒；(b) 基因13的突变型的装配进程和(a)一样，证明基因13所产生的头部有缺陷，而且只有当完整的头部存在时，尾和尾纤维等结构才能装配完成

由此说明基因13一定控制着头部装配过程中的某一步骤，只有这一步完成后，头和尾部才能装配在一起。

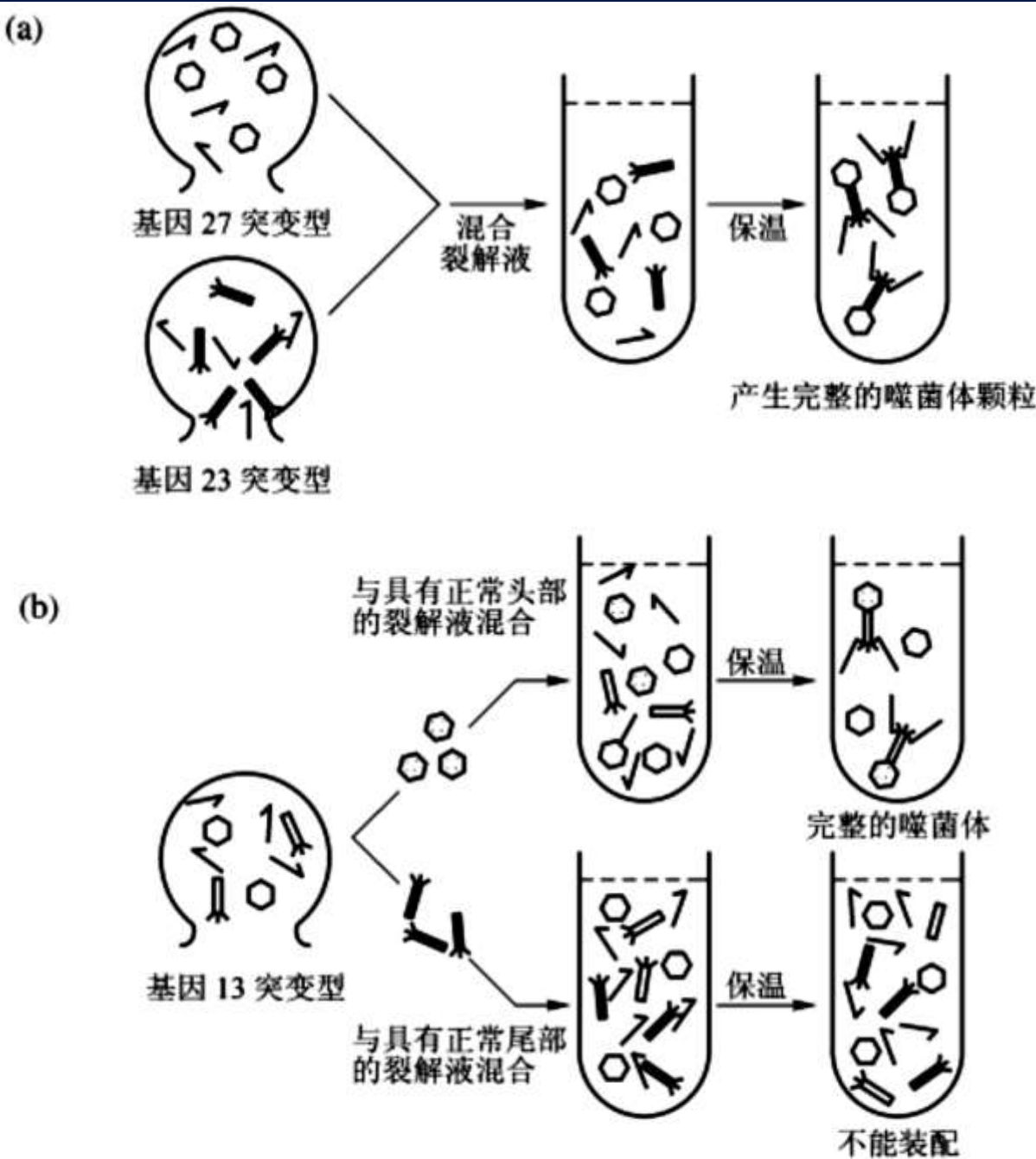


图 9 - 11 T4 条件致死突变型之间的体外互补



9.4.4 基因内互补

一般情况下同一顺反子内两个突变是不能互补的，但是也有一些例外，这种例外发生于同一基因内两个不同位点突变致使两条原来相同的多肽转变成两条分别在不同位点上发生变异的多肽链，而后将这两条多肽构成双重杂合子，这两者配合起来，有可能表现出不同程度酶活性部位的恢复，这种现象称为基因内互补（intragenic/intracistronic complementation），又称等位（基因）互补（allelies complementation）

(Fig16.9)



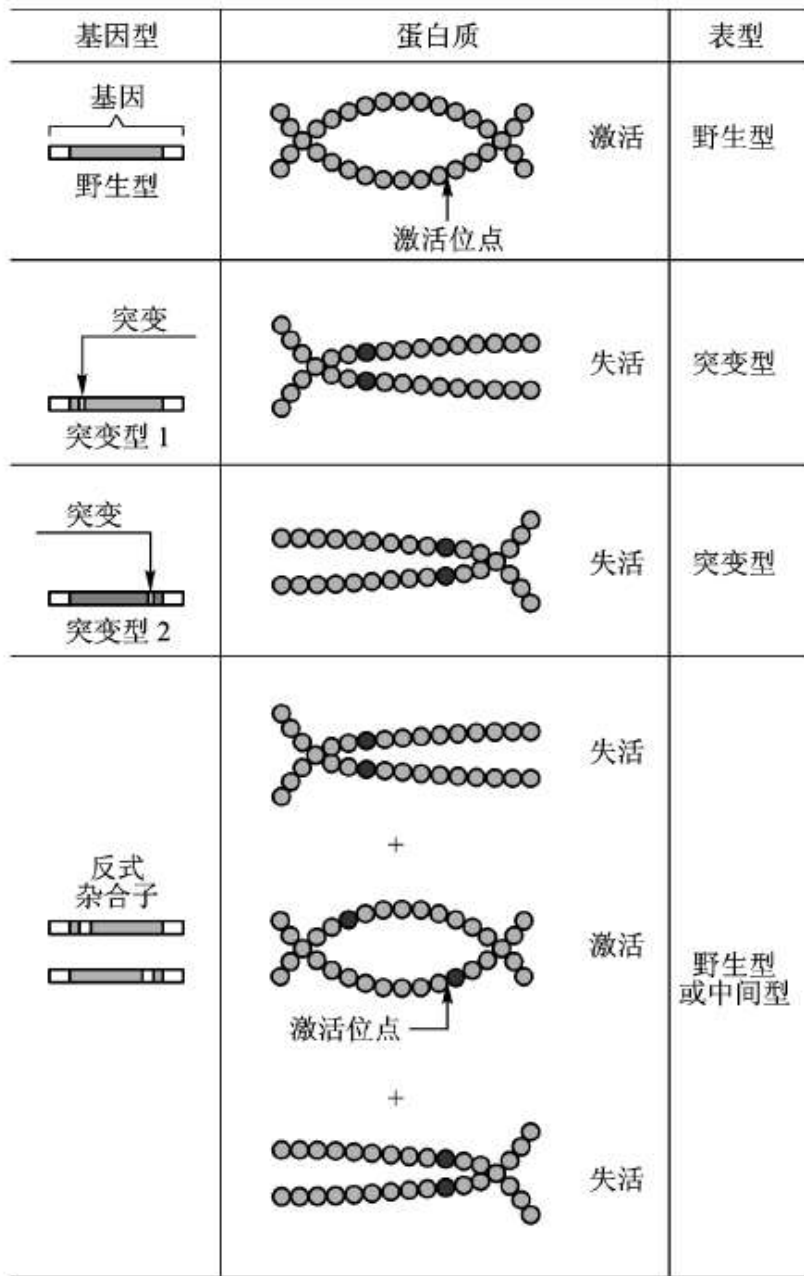


图 8-14 基因内互补作用机制图解

编码多肽的基因 → 多肽体蛋白

稀少情况下，出现基因内互补：**突变**的蛋白质的每个单体是没有活性的，但是，当这些单体结合在一起时，形成有活性的，功能上的多聚体。

在同一基因内两个不同位点的以反式排列所形成的杂合体中可以形成两种不同的肽链，一种在一个位置上有毛病，另一种在另一位置上有毛病。这样两种肽链聚合成的酶有时便可能部分具有活性或完全具有活性。这表明，一个突变肽链的非突变片段的氨基酸顺序有可能补偿另一个不同的突变肽链的突变片段的氨基酸顺序。

基因内的互补与基因间的互补的主要区别：

- ① 任何两个不同基因间的突变总是互补的，即**基因间互补是普遍存在的**，而同一基因内不同位点突变绝大多数是不能互补的，只有少数例外；
- ② 基因内两个突变能互补的也只能是点突变，无缺失，这种突变的功能效应一定是错义突变，绝不是无义突变或移码突变；
- ③ **基因内互补作用的酶活性往往明显低于正常水平**，最多只有野生型酶活性的25%，同时所形成的蛋白质也常有某种异常，例如温度的稳定性或pH依赖性等。



9.5 噬菌体T4 rII的缺失突变与作图

9.5.1 缺失作图原理

缺失作图 (Deletion mapping) 就是利用一系列缺失突变型，把所要测定的突变型和这一系列缺失突变型分别进行重组测定，凡是能和某一缺失突变型进行重组的，它的位置一定不在缺失范围内，凡是不能重组的，它的位置一定在缺失范围内。通过与一系列的缺失突变型进行重组的结果，可以精确确定某待测突变型 (点突变) 的位置。



缺失和基因突变之间一个重要的区别是缺失不能回复到野生型。

Benzer 发现r II 区的许多缺失之后，采用了缺失作图（deletion mapping）的方法，使T4 phage r II 区不同突变的定位变得迅速简便。

[图Fig 8.25](#)





Benzer的缺失作图：

利用一组重叠缺失（overlapping deletions）系来进行的：带有7个大缺失的7个品系（r1272 r1241 rJ3 rPT1 rPB242 rA105 R638）rII deletion tester strains

测定：

[图 Fig8.26](#)

一个未知位点的点突变 × （7个重叠缺失系）

若点突变的位点在A3e片段中，则与r1272，r1241和rJ3缺失品系杂交不产生野生型重组体，但和其余缺失突变系杂交时产生野生型重组体，在J3缺失的右端到PT1缺失左端的区域内点突变的位置可以与有关的小缺失突变系即r221，r184，r250和c33杂交来测定。A3e突变系和r1231杂交应当不产生野生型重组体，但和其他的几个小系列产生。

[图Fig8.26](#)



只需要通过次数不多的杂交就可以把这一突变定位在A3e片段中，然后再与A3e片段中其他点突变系杂交，就可以确定这一突变在A3e中的位置，用这种方法Benzer第一个确定了基因精细图。

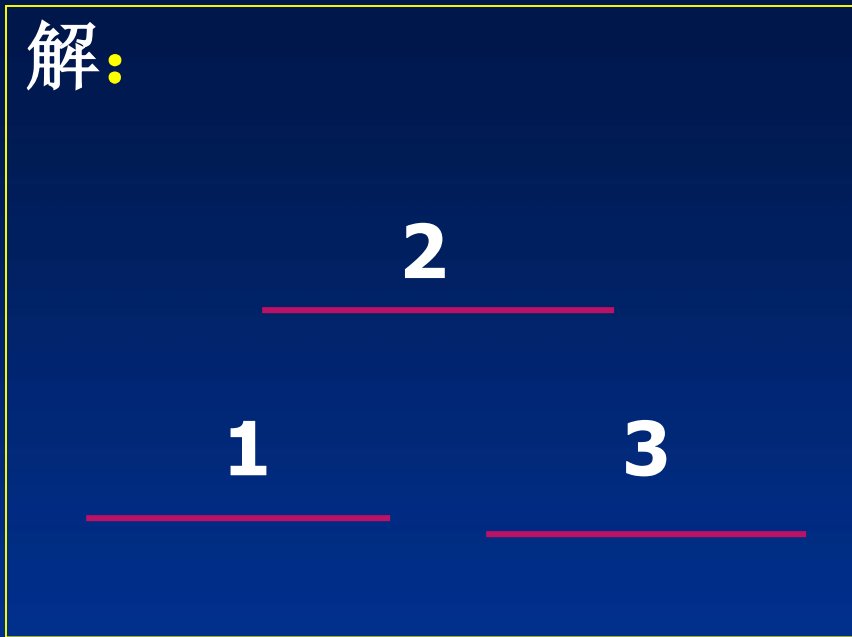
此外，Benzer还记载了各个位点发生突变的频率（ $r^+ \rightarrow r$ ，和 $r \rightarrow r^+$ ），显然，基因中存在许多自发突变优先发生的“热点”（**hot spot**），最明显的热点的突变数可达500个以上。其他许多座位往往只有一个突变。



缺失作图举例：

	1	2	3
1	0	0	+
2	0	0	0
3	+	0	0

解：



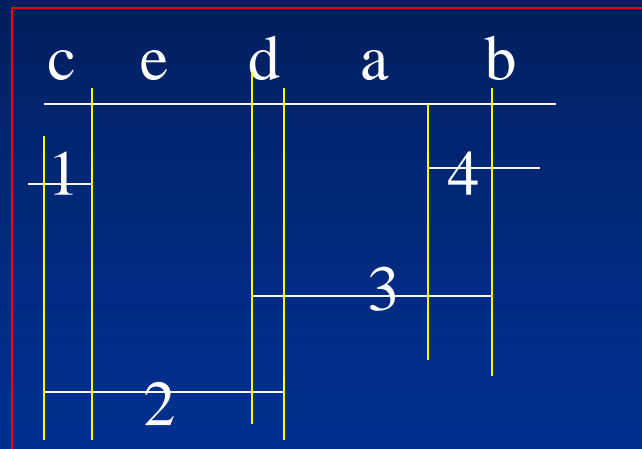
有三个缺失突变，每一个影响一个基因的不同区段，带有1和3缺失的突变品系能重组，产生野生型重组体（+），但1和3缺失的品系和缺失2品系杂交都不能产生野生型重组体（0）





例：请根据下列实验结果划分出噬菌体T4的r Π 缺失突变型a、b、c、d、e的缺失段。

	a	b	c	d	e
1	+	+	-	+	+
2	+	+	-	-	-
3	-	-	+	-	+
4	+	-	+	+	+



解：根据：凡能和某一缺失突变型进行重组的，它的位置一定不在缺失的范围内；凡是不能重组的，它的位置一定在缺失范围内，这一原理。

a与3无重组，说明缺失3包括了a所在的位置；b与3和4都无重组，说明b在缺失3和4的范围内，同时表明，缺失4包括缺失3中a的位置。

c与1无重组，说明其处于缺失1的范围，但同时又与2无重组，进而说明缺失2包括缺失1的c位点，另有涉及d和e，而d所处的位置是缺失2和3都涉及到的，e位于缺失2中但绝未处在缺失1上。



9.6 λ 噬菌体的基因组与位点专一性重组

9.6.1 λ 噬菌体的基因组

λ 噬菌体的基因可归为两类：噬菌斑形成所必需的基因，用大写字母表示，以及噬菌斑形成非必需基因，用小写字母或希腊字母表示，功能相关的基因在基因组中是成簇分布，并受协同调节（[图9-14](#)）。

λ 噬菌体基因组大小为48 500 bp的线状DNA分子，其主要特点是：

①许多功能相关的基因聚集在一起，如头部形成基因和尾部形成基因等，调控基因也集中排列在DNA链的一个区域。②结构基因及其编码蛋白质的部位也处在邻接的区域，如整合基因int和切离基因xis位于附着位点att的旁边，复制基因O和P也位于复制起点旁边。③从 λ 噬菌体颗粒中分离出的DNA是双链线状分子，具有由12 bp的互补的单链黏性末端。在进入宿主细胞以后，这些“黏性末端”退火形成的环状分子上的单链“缺口”，在连接酶作用下形成共价键而被封闭。



武汉大学

Wuhan University

9.6.2 λ 原噬菌体与合子诱导 (学生自学)

9.6.3 原噬菌体的整合与切除 (在9.6.4中讲)





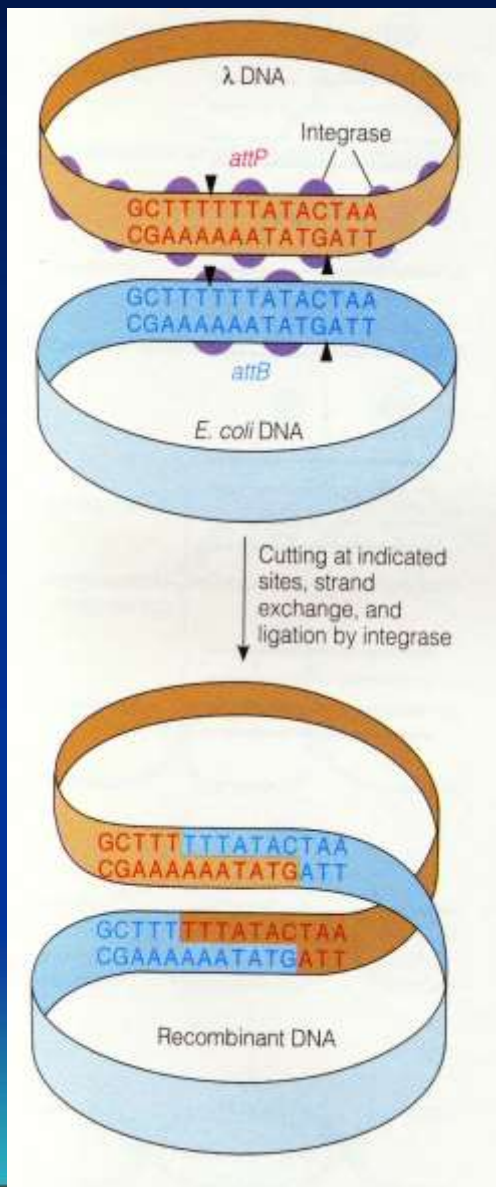
9.6.4 位点专一性重组的分子机制

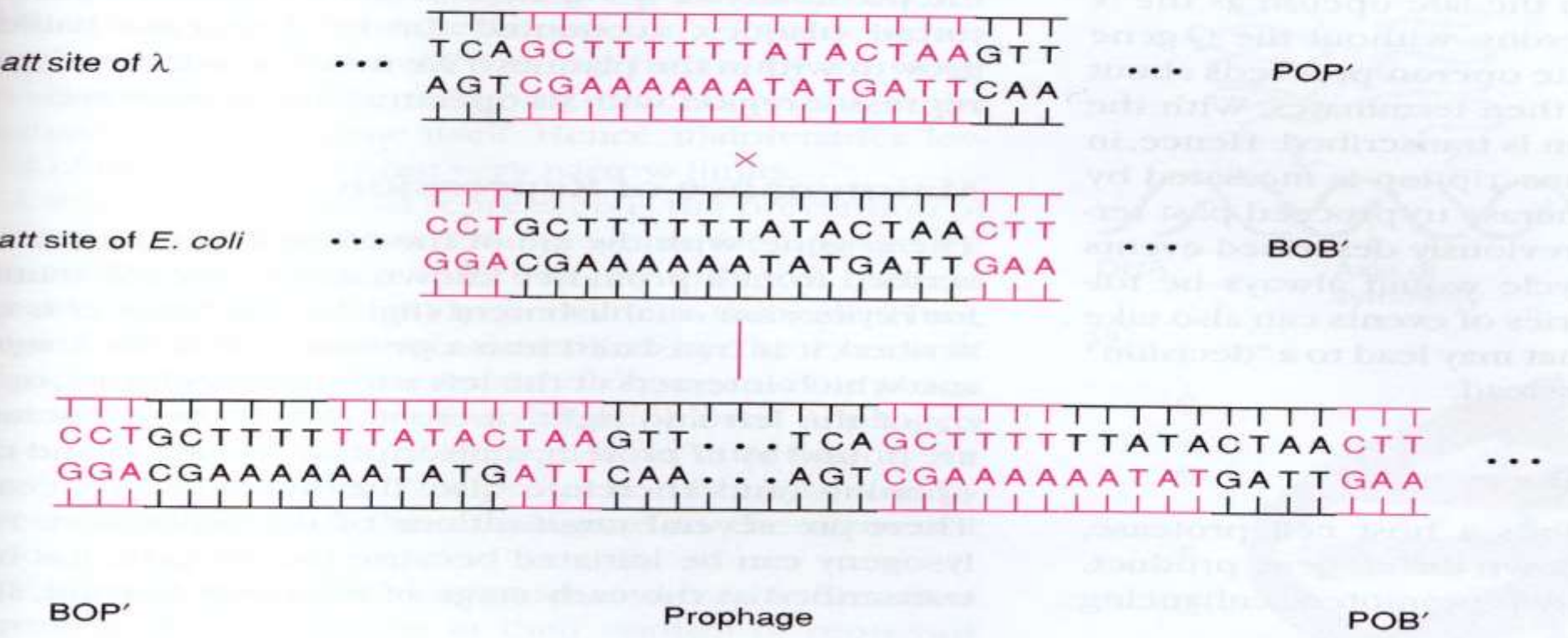
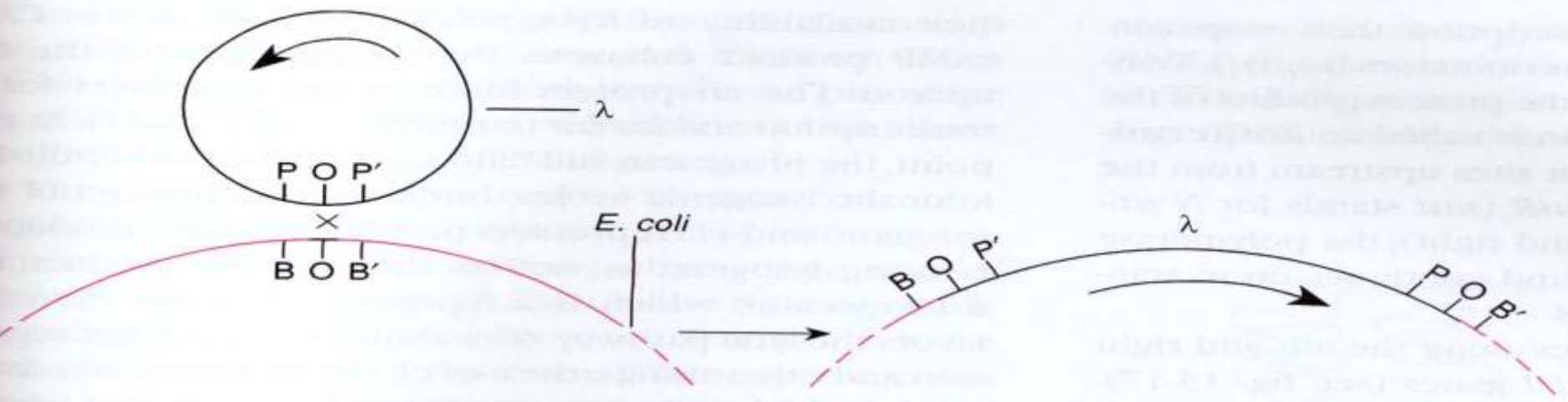
在能识别特定的核苷酸序列的重组酶作用下，DNA分子间的重组。

λ 噬菌体DNA的整合和切离是典型的位点专一性重组。

λ DNA \rightarrow att P

E.coli \rightarrow att B





λ Phage 对 *E.coli*的整合

λ DNA 存在两种物理状态

- 裂解周期： λ DNA环状分子独立存在于细菌的细胞质中
- 溶源周期：溶源化状态的 λ DNA整合在细菌的染色体中

相互转变：



附着位点 (attachment sites, att) :在细菌和噬菌体的特异位点

通过重组发生整合和切离

细菌染色体上的特异位点： att^{λ} 特异的序列为attB 成分是 BOB'，在噬菌体att位点上的特异序列称为 attP,含有 POP' 其中“O”序列是attB和attP共有的，序列完全一致，称为核心序列 (core sequence) ,长15bp,重组就发生在此序列上，两侧序列B、B'和P、P'称为臂，其序列各不相同。

整合和切离反应作用位点是不同的，整合需要识别attP和attB;而切离时需要attL和attR。位点特异重组是通过重组位点的鉴别来控制的，因此这两个反应所依赖的蛋白质也不相同。

整合 (attB × attP) 反应需噬菌体int基因的产物---整合酶 (intergrase, Int) 和细菌蛋白宿主整合因子 (integration host factor, IHF) IHF由两个不同亚单位的 20 Kda 蛋白组成, 分别由himA和himB基因编码。

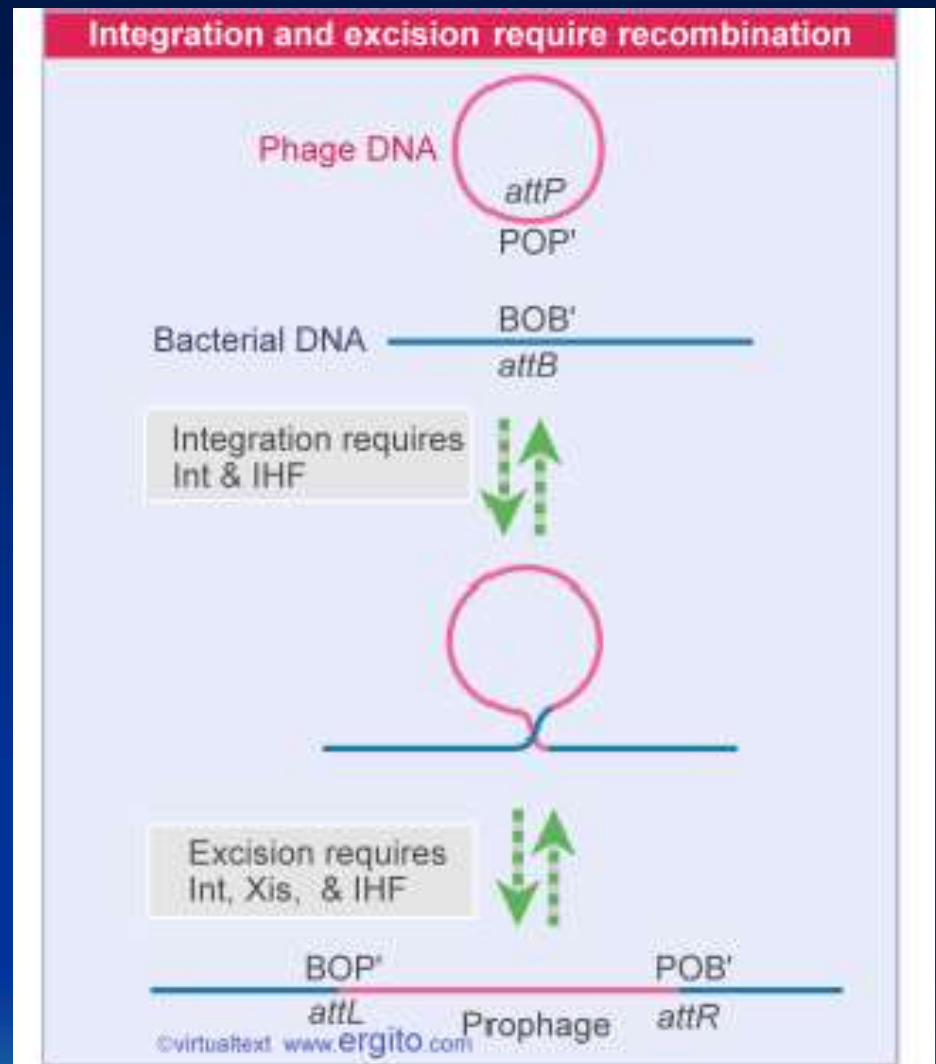
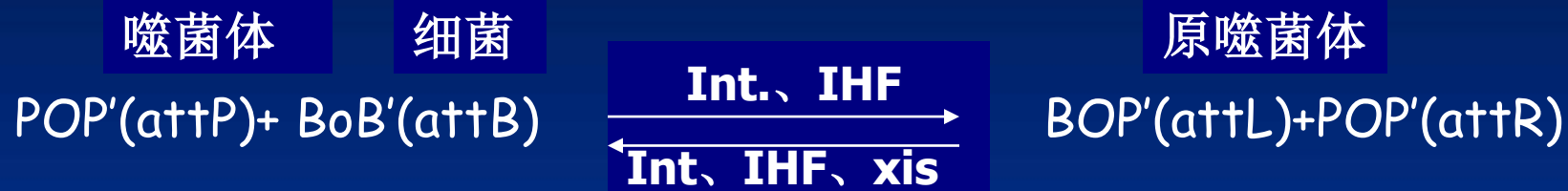


Figure 15.25 Circular phage DNA is converted to an integrated prophage by a reciprocal recombination between *attP* and *attB*; the prophage is excised by reciprocal recombination between *attL* and *attR*.

切离 ($\text{attL} \times \text{attR}$) 反应需要噬菌体 xis 基因的产物以及 Int 和 IHF 。

xis (excisionase): 切除酶, 由噬菌体 λ 的基因编码。

整合与切离反应:



机理:

Int 蛋白解离 Holliday 连接, 它负责剪切和连接。 Int 有两种不同的结合模型

- ① 它在核心序列反向结合切割位点, 在每条单链上切割这些位点一致序列
- ② Int 也结合 attP 臂上的位点, 其一致性序列不同。

Int 不同的功能区识别各类序列:

N端功能区识别 attP 的臂

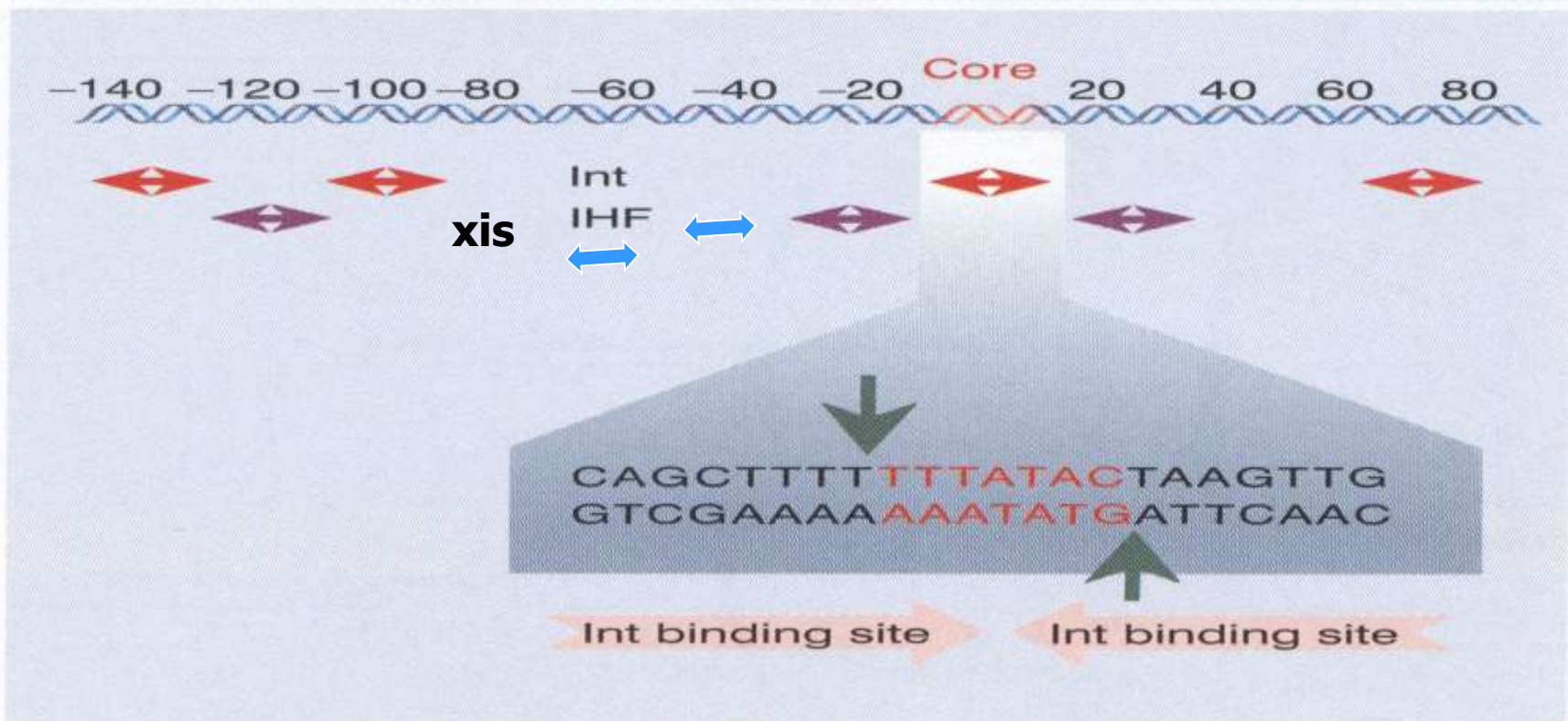
C端功能区识别 attP 和 attB 的核心区

C端和N端功能区同时结合DNA, 可将 attP 的臂拉向核心区。

Int 、 xis 和 IHF 蛋白几乎覆盖了 attP 的所有区域:

IHF结合attP中约20bp的序列，结合位点和int的结合位点邻近。Xis有两个结合位点，在attP中互相靠近，保护区域超过30—40bp。xis的结合可改变DNA的结构，使其成为整合反应的惰性底物，而促使反应向切离反向进行。

Figure 14.22 Int and IHF bind to different sites in *attP*. The Int recognition sequences in the core region include the sites of cutting.





武汉大学

Wuhan University

- 本章结束

作业 P220-4

P221-5, P221-6

谢谢!

