

大肠杆菌依赖链霉素突变抑制 λ 噬菌体的裂解生长*

童克忠 王 玮 张秀媛

(中国科学院遗传研究所, 北京)

摘 要

本文从 *Escherichia coli* C 600 菌株分离到依赖链霉素突变体(Str^DA)。在 C600 Str^DA 中, λ Nam 和 λ cI 857 的裂解生长都受到抑制。E. coli 1.1485 (λ cI 857) 突变成 Str^DA 后, λ cI 857 的诱导释放大大降低。在 C 600 Str^DA 和 1.1485(λ cI 857) Str^DA 中, T 4 和 T 7 的成斑率和裂解量都保持正常。由于 str^DA 是编码核糖体蛋白质 S 12 的结构基因, 实验结果说明 Str^DA 核糖体抑制 λ 的裂解生长。还根据 λ Nam 和 λ cI 857 遗传背景的异同, 讨论了 Str^DA 核糖体抑制 N 基因表达的可能性。

Watson 于 1957 年首先对核糖体进行系统的研究。其后经许多科学家的共同努力, 对核糖体的结构, 已经基本上研究清楚^[1,2]。至于核糖体蛋白质的确切功能, 却“仍然一无所知”^[3]。

本实验室以往的结果^[4,5]说明枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC 6633 菌株依赖链霉素突变体 (Str^DA) 的孢子形成有缺陷, 抗生素产量和碱性蛋白酶活性降低。Hummel 和 Böck^[6]报道 E. coli Str^D 在撤去链霉素的条件下, 有些蛋白质的合成速率发生变化; 另一些蛋白质不再合成; 还合成一些在有链霉素条件下所不合成的蛋白质。Duvall 等^[7]报道 B. subtilis 核糖体蛋白质 BL 12 a 发生突变, 质粒基因 cat-86 就不能由发菌素诱导表达。本实验室最近报道在 B. subtilis 168 菌株的 Str^DA 中, 噬菌体 ϕ 105 的裂解量下降, 蛋白质合成受阻, 但 RNA 和 DNA 合成正常^[8]。本实验室还测定了噬菌体 ϕ 29 在 28 种共 44 株核糖体蛋白质突变体中的成斑率^[9]。在多数突变体中, 成斑率下降, 最低达 10^{-6} ; 少数升高, 最高达 3 倍; 还有一些升降都不明显。以上这些实验结果, 都说明核糖体蛋白质突变会影响其他某些基因的表达, 核糖体蛋白质对基因的表达表现出选择性。

E. coli 及其 λ 噬菌体都经过详细的遗传学和生物化学研究, 因此选用这一系统, 研究 Str^DA 突变对 λ 裂解生长的影响。

一、材料和方法

1. 细菌菌株 *Escherichia coli* C 600 (F⁻, thr, leu, thi, lac, supE, ton^r) 和 E. coli T83 (F⁻, mul18, lac ZU 118, thi) 都由 Richardson^[10] 提供。E. coli 1.1485 (λ cI 857) 由中国科学院

本文 1985 年 9 月 18 日收到, 1986 年 6 月 9 日收到修改稿。

* 国家自然科学基金资助的课题。

遗传研究所徐乃正提供。所有 Str^{DA} 和 Str^{RA} 都是在含有 250—300 μg 链霉素/ml 的 TB 培养基上选择的自发突变体。 Str^{I} 是把 $\text{Str}^{\text{D-A-3}}$ 的培养物经过洗涤, 涂布在无链霉素的 TB 培养基上筛选到的、不依赖链霉素的回复突变体。

2. 噬菌体 λ c I 857, 由 *E. coli* 1.1485 (λ c I 857) 诱导得来。 λ N 7 和 λ N 7 N 53 都由 Adhya^[11] 提供。T4, T7 和 T3 由中国科学院微生物研究所贾盘兴提供。

3. 培养基 LB 培养基 每升含肉膏(上海生化制药厂) 10 g; 酵母膏(上海酵母厂) 5 g; NaCl 5 g; pH 7.0.

TB 培养基 10 g/l 肉膏; 蛋白胨(日本大五荣养株式会社) 10 g; NaCl 5 g; pH 7.0. 固体培养基加琼脂 1.7%.

4. 链霉素 华北制药厂出品。

5. 缓冲液 1.21 g/l Tris, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.20 g; 明胶 0.10 g; 用 HCl 调 pH 到 7.4.

6. 成斑率的测定 将指示菌接种在 TB 培养基中, 37°C 振荡培养过夜, 转接到预热 37°C 的 LB 培养基中, 继续培养 3 h, 使细胞密度达到约 $2 \times 10^8/\text{ml}$, 将菌体悬浮于缓冲液中, 与悬浮于缓冲液中的噬菌体混合, 室温放置 15 min, 按双层平皿法测定成斑率。

7. 相对产率 仿照 Richardson 等^[10]的方法加以修改。宿主细胞在 TB 培养基中培养过夜, 转移到预热 37°C 的 LB 培养基中, 37°C 继续培养 3 h, 离心收集菌体, 悬浮于 1/5 体积的缓冲液中。取此细菌悬浮液和缓冲液中的噬菌体悬浮液混合, 使感染指数约为 0.1。冰浴中保持 20 min 后, 以 1:100 体积比加到预热 37°C 的 LB 培养基中, 振荡培养 15 min, 取一份样品测定每 ml 中噬菌体的数目; 另取一份与少量三氯甲烷混合, 测定游离噬菌体的数目。以二者之差作为侵染中心的数目。继续培养到 90 min 或 3.5 h, 以三氯甲烷处理, 测定噬菌体的总数。按下式求得相对产率

$$\text{相对产率} = \frac{\text{增殖后噬菌体数} - \text{游离噬菌体数}}{\text{侵染中心数}}.$$

8. λ c I 857 的诱导释放 按 Miller^[12]的方法。

9. 裂解量的测定 按盛祖嘉描述的方法^[13]。

二、实验结果

1. 成斑率

用经过纯化的 λ N 7 和 λ N 7 N 53, 先在 T83 上测试, 证实不能形成噬菌斑, 然后测定它们在 C 600 及其突变体上的成斑率。结果(表 1)说明以 C 600 Str^{RA} 为宿主, 在不加链霉素的条件下, λ N 7 和 λ N 7 N 53 都不能形成噬菌斑; 而 λ c I 857, T4 和 T7 的成斑率, 仅比在 C 600 上略有下降。在补加链霉素的条件下, λ N 7 和 λ N 7 N 53 的成斑率都恢复到相当高的程度。对 Str^{DA} 来说, 虽然培养基中加有链霉素, 但 λ N 7 和 λ N 7 N 53 仍不能形成噬菌斑; λ c I 857 能形成噬菌斑, 但成斑率降低, 噬菌斑十分模糊; T4 和 T7 的成斑率和在 C 600 上一样。

2. 相对产率

测定相对产率的结果(表 2), 与测定成斑率的结果一致。以 Str^{RA} 为宿主, 在无链霉素的条件下, λ N 7 和 λ N 7 N 53 的相对产率都很低, 表现典型的限制现象; 如果加入链霉素, 相

表 1 λ , T4 和 T7 在 *E. coli* C 600 及其突变体上的成斑率

细菌菌株	$\lambda cI857$	$\lambda N7$	$\lambda N7N53$	T4	T7
C600	1	1	1	1	1
Str ^R A (-Sm*)	0.85	5×10^{-6}	$<10^{-9}$	0.70	0.78
Str ^R A (+Sm*)	1.12	0.84	0.06	0.94	0.82
Str ^D A-1 (+Sm)	0.45	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$	1.01	1.01
Str ^D A-2 (+Sm)	0.68	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$	1.06	0.95
Str ^D A-3 (+Sm)	0.71	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$	0.93	1.08
Str ^D A-4 (+Sm)	0.58	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$	1.11	1.02

* +Sm 或 -Sm: 培养基中分别加或不加 200 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素.

表 2 λ 噬菌体在 C 600 及其突变体中的相对产率

细菌菌株	$\lambda cI857$	$\lambda N7$	$\lambda N7N53$
C 600	42	242	113
Str ^R A (-Sm)	36	13	2
Str ^R A (+Sm)	36	175	66
Str ^D A-1 (+Sm)	0	0	0
Str ^D A-2 (+Sm)	0	0	0
Str ^D A-3 (+Sm)	0	0	0
Str ^D A-4 (+Sm)	0	0	0
Str ^I -3(-Sm)	(未测定)	109	(未测定)
Str ^I -3 (+Sm)	(未测定)	146	(未测定)

对产率大大提高. 以 Str^RA 为宿主, $\lambda cI857$ 在有、无链霉素的条件下, 相对产率都下降, 但都不严重. 以 Str^DA 为宿主则不同, 虽然加了链霉素, 但无论 $\lambda N7$ 或 $\lambda cI857$, 全都不能增殖. 曾将培养时间由 90 min 延长到 3.5 h, 但噬菌体仍不增加. 用 Str^DA-3 的回复突变体 Str^I 作宿主, 在无链霉素时, $\lambda N7$ 的相对产率达 109, 在有链霉时达 146; 与 C 600 宿主相比, 分别达到 45% 和 60%.

以 C 600 为宿主, 37°C 培养 15 min 后, 游离噬菌体的数目低于所加噬菌体数目的 1%. 以 Str^DA 为宿主, 游离噬菌体高达 20% 左右. 其实以 Str^DA 为宿主, 培养 90 min 或 3.5 h 后测得的噬菌体数, 就是这些未入侵的噬菌体数. 已经入侵的噬菌体, 并未增殖, 也不能形成噬菌斑 (表 3).

C600 Str^DA 即使在加有链霉素的条件下, 其生长速率往往(但不尽然)比 C 600 或 C 600 Str^RA 慢. 但 λ 噬菌体在 Str^DA 上不能增殖, 并非由于 Str^DA 生长慢、核糖体翻译能力下降. 曾测定 T4 在 Str^DA-3 中的裂解量为 131, 而在 C 600 中为 134, 没有明显的差异.

表 3 侵染后不同时间游离噬菌体的百分数

侵染后时间 (min)	处理 I*	处理 II**	处理 III***
15	23.02	22.06	19.22
30	24.31	25.26	16.73
45	21.81	25.87	24.66
60	20.89	21.96	19.57
75	21.81	20.75	19.32
90	21.46	20.39	17.79

* 在侵染后不同时间, 取样测定游离噬菌体。

** 同 *, 但加一滴氯仿在样品中。

*** 同 **, 但侵染后 15min, 加柠檬酸钠到培养物中, 其终浓度为 20 μ g/ml。

3. λ cI 857 的诱导释放

表 3 的数据说明 λ 噬菌体入侵 C 600 Str^DA 比较慢。培养 15 min 以后, 游离噬菌体高达 20% 左右; 而以 C 600 为宿主, 游离噬菌体低于 1%。Str^DA 不应该存在膜突变的问题。假如由于细胞膜发生突变而阻止链霉素透入, 则 Str^DA 细菌不能生存。为什么 λ 噬菌体入侵 Str^DA 细胞比较慢, 目前不能解释。但游离噬菌体较多不是相对产率等于 0 的原因, 其原因在于噬菌体入侵以后不能增殖。溶源菌 1.1485 (λ cI 857) Str^DA 诱导释放率极低的实验结果 (表 4), 从另一方面说明了这种情况。

表 4 *E. coli* 1.1485 (λ cI 857) 及其突变体中 λ cI 857 的诱导和 T4 的成斑率

细 菌 菌 株	λ cI 857 的诱导	T4 的成斑率
1.1485 (λ cI 857)	1	1
Str ^R A (-Sm*)	1.02	1.22
Str ^R A (+Sm*)	1.15	1.27
Str ^D A-2 (+Sm)	4.3×10^{-5}	1.36
Str ^D A-3 (+Sm)	4.3×10^{-5}	1.12
Str ^D A-5 (+Sm)	4.3×10^{-5}	1.62
Str ^D A-7 (+Sm)	8.6×10^{-5}	1.35
Str ^D A-11 (+Sm)	4.3×10^{-5}	未测定
Str ^D A-12 (Sm)	1.3×10^{-4}	1.35
Str ^D A-18 (+Sm)	4.3×10^{-5}	1.34

* 同表 1 脚注。

和 C 600 一样, 1.1485 (λ cI 857) Str^DA 的生长, 一般也比野生型或 Str^RA 慢。但 λ 的诱导释放率低, 并非由于 Str^DA 生长慢。T4 在 1.1485 (λ cI 857) Str^DA 上的成斑率反高于野生型宿主 (表 4), 噬菌斑也比较大; T4 在 1.1485 (λ cI 857) 及其 Str^DA 中的裂解量分别是

58 和 59; 都证明 Str^DA 核糖体的翻译机能正常, 只是特异性不同。

三、讨 论

1. *strA* 与核糖体蛋白质 S 12

在 *E. coli* 中, *str* 有二, 即 *str A* 和 *str C*^[14], *str C* 只抗 5 $\mu\text{g/ml}$ 以下浓度的链霉素^[15], 位于 5 分^[14], *str A* 抗高剂量链霉素, 位于 73 分^[14]。本实验所用 Str^DA 和 Str^RA 抗 250—300 $\mu\text{g/ml}$ 以上浓度的链霉素, 属于 *str A*。

Str A 和核糖体蛋白质的关系, 曾经经过详细的研究。除一例 Str^D 可能是改变核糖体蛋白质 S 8^[16] 外, 其余都是改变 S 12 (评论见文献[2]第 51—88 页)。迄今未见 Str^DA 与其他蛋白质改变相关连的报告。1976 年以来连续三次补充、修订大肠杆菌基因连锁图谱, 都把 *str A* 作为 *rps L* (S 12 的结构基因) 的别号。所以在本文中, 把 Str^DA 核糖体蛋白质, 作为核糖体蛋白质 S 12 的突变, 是有根据的。

2. Str^DA 与 Str^RA

虽然 Str^DA 和 Str^RA 都是 S 12 结构基因的突变, 然而两类性质不同的突变。首先提出这种看法的是 Spotts 和 Stanier^[17]。Hummel 和 Böck^[6] 根据他们的实验结果, 认为 Str^D 在有、无链霉素的条件下, 其合成的核糖体的结构和性质不同。对于 Str^D 来说, 链霉素是核糖体的必要成分。在无链霉素条件下合成的核糖体, 一旦在培养基中加入链霉素, 不能立即表现在有链霉素条件下合成的核糖体的机能; 必须在有链霉素的条件下, 经过若干世代的繁殖, 把原有的、无链霉素的核糖体稀释掉, 合成新的、联结有链霉素的核糖体, 才能表现新的机能。反之亦然。对于 Str^R 来说, 情况就不是这样。表 5 的实验结果说明 Str^R 核糖体在无链霉素的条件下, 其无义抑制的效率虽然大大受到限制 (处理 I); 但只要加入链霉素, 核糖体毋须更新换代, 立即解除无义抑制的限制, 其相对产率 (处理 II) 与始终加有链霉素的对照 II 无异。转接培养时撤去链霉素, 由于细胞内已有的链霉素尚未完全稀释掉, 相对产率虽然下降 (表 5 处理

表 5 链霉素与 λ N 7 在 C 600 Str^RA 中的相对产率

细菌菌株与处理	200 $\mu\text{g/ml}$ 链 霉 素			相对产率
	前培养*	转接培养*	裂解生长*	
C 600, 对照 I	不加	不加	不加	229
Str ^R A, 处理 I	不加	不加	不加	8
Str ^R A, 处理 II	不加	不加	加	107
Str ^R A, 处理 III	不加	加	加	112
Str ^R A, 对照 II	加	加	加	108
Str ^R A, 处理 IV	加	加	不加**	107
Str ^R A, 处理 V	加	不加***	不加	64

* 见材料和方法。

** 转接培养物离心后, 将菌体悬浮于 1/2 体积缓冲液中, 在噬菌体吸附后, 以 1:100 稀释到预热的新鲜 LB 培养基中。

*** 将前培养物洗一次, 悬浮在同体积的缓冲液中, 取 0.1ml, 转接到 2.5ml 预热的新鲜 LB 培养基中。

V), 但仍高于始终无链霉素的核糖体 (处理 I)。裂解生长时才撤去链霉素 (处理 IV), 由于胞内链霉素依然存在, 相对产率与对照 II 无异。

Gorini 和 Kataja^[18] 报道过条件依赖链霉素 (CSD) 的现象。他们用的是 Str^{RA} , 而不是 Str^{DA} 。“在低限培养基上, 需补加链霉素, 这些突变体才能生长; 在补加了所需氨基酸的培养基上, 就不需要链霉素”^[18], 他们把它称为 CSD, 只是因为这种 Str^{DA} 需要依赖链霉素来起表型抑制作用。 Str^{DA} 是指完全培养基上需要补加链霉素才能生长的突变体。本文所用的 Str^{DA} 就是这样。Gorini 等根据 CSD 现象进行了一系列工作 (评论见文献 [19]), 证明 Str^{RA} 提高翻译遗传密码的准确性, 限制了无义密码的抑制; 外加链霉素可以解除这种限制, 从而提高抑制无义密码的效率。对本文所用的 Str^{RA} 来说, 在无链霉素的条件下, $\lambda \text{N} 7$ 和 $\lambda \text{N} 7 \text{N} 53$ 的成斑率和相对产率都低, 补加链霉素提高成斑率和相对产率 (表 1, 2)。这和 Gorini 的 CSD 论点是一致的。对 Str^{DA} 来说, 虽然培养基中有链霉素, 但 $\lambda \text{N} 7$ 和 $\lambda \text{N} 7 \text{N} 53$ 仍然不能增殖, 证明 Str^{DA} 并不存在限制与解除限制的现象。 Str^{I} 改变了 Str^{DA} 核糖体的结构, 其生长不再依赖链霉素, Str^{DA} 不能翻译的遗传密码又被翻译出来, 相对产率得以恢复到相当高的程度。

3. N 蛋白质

N 基因是 λ 的前期基因之一, 无论对溶源生长或裂解生长, 其表达都至关重要。 $\lambda \text{N} 7$ 和 $\lambda \text{N} 7 \text{N} 53$ 也都携有 $cI 857$ 突变^[11], 所以 $\lambda \text{N} 7$, $\lambda \text{N} 7 \text{N} 53$ 和 $\lambda cI 857$ 的差别, 仅仅在于前二者的 N 基因含有 amber 无义突变, 而 $\lambda cI 857$ 的 N 基因是野生型。在 C 600 Str^{DA} 中, $\lambda \text{N} 7$ 和 $\lambda \text{N} 7 \text{N} 53$ 完全不能增殖, 而 $\lambda cI 857$ 能形成噬菌斑, 关键就在于 $\lambda cI 857$ 有 N 蛋白质在起作用。然而在 C 600 Str^{DA} 上, $\lambda cI 857$ 的成斑率降低了, 噬菌斑十分模糊; 在液体培养时, 也完全不能增殖; 说明 $\lambda cI 857$ 的野生型 N 基因, 在 C 600 Str^{DA} 中, 被翻译成 N 蛋白质的效率还是降低、甚至被抑制了。

4. T4, T7 及其他

在实验过程中, 除测定了 T4, T7 在 C600, 1.1485 ($\lambda cI 857$) 及其 Str^{DA} 突变体上的成斑率和裂解量外, 还以 *E. coli* B, *E. coli* A19 及其 Str^{DA} 为宿主、测定了 T4, T7, T3 和 $\phi \text{X} 174$ 的成斑率。结果都无区别。可见 Str^{DA} 核糖体所不译的基因, 仅占少数。基因表达的调节, 单从节约能量的观点来看, 也应以转录水平为主。在翻译水平决定取舍的基因, 只能占少数。所以 Str^{DA} 在有链霉素的条件下, 都能正常生长, 只有少数基因的表达受到抑制^[4, 5], 只是容易死亡。本文报道的实验结果, 支持这一论点。

参 考 文 献

- [1] Nomura, M. et al. (Eds), *Ribosomes*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1974, 930.
- [2] Chambliss, G. et al. (Eds), *Ribosome: Structure, Function and Genetics*, University Park Press, Baltimore 1980, 984.
- [3] Watson, J. D. et al., *Recombinant DNA, A Short Course*. Freeman and Company, New York, 1983, 42.
- [4] 童克忠, 遗传学报, 4(1977), 316—319.
- [5] Zhang Xiuyuan et al., (张秀媛等), in *Nucleic Acids and Proteins, The Proceedings of Symposium on Nucleic Acids and Proteins* (Ed. Shen Zhaowen), Science Press, 1980, 486—498.
- [6] Hummel, H. and Böck, A., *Mol. Gen. Genet.*, 191 (1983), 167—175.
- [7] Duvall, E. J. et al., *J. Bact.*, 161 (1985), 665—672.

- [8] 童克忠等, 科学通报, **31** (1986), 301—304.
- [9] 陈玲爱等, 科学通报, **31**(1986), 544—547.
- [10] Richardson, J. P. et al., *Mol. Gene. Genet.*, **153** (1977), 81—85.
- [11] Das, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**(1976), 1959—1963.
- [12] Miller, J. H., *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972, 320.
- [13] 盛祖嘉, 微生物遗传学, 科学出版社, 北京, 1981, 218—219.
- [14] Bachmann, B. J., *Microbiol. Rev.* **47** (1983), 180—230.
- [15] Robert, L. M. and Reeve, E. C. R., *Genet. Res.*, **16** (1970), 359—365.
- [16] Dabbs, E. R., *Mol. Gene. Genet.*, **165**(1978), 73—78.
- [17] Spotts, C. K. and Stanier, R. Y., *Nature*, **192** (1961), 633—637.
- [18] Gorini, L. and Kataja, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51** (1964), 487—493.
- [19] Gcrini, L., *Nature, New Biol.*, **234** (1971), 261—264.