

微生物学译丛

WEISHENGWUXUEYI CONG

上海植物生理研究所微生物研究室编

第 1 辑

上海科学技术文献出版社

3-55
W
0952

前 言

在过去三十年里微生物学经历了飞跃发展的历程,今天的微生物学已成为生物科学的带头学科。由于微生物具有结构比较简单,培养方便等特点,许多类型的微生物都成为研究生物学基本理论的材料,其研究成果对阐明生命的基本现象和活动本质作出了重要贡献。更由于微生物学与生物化学、遗传学和生物物理学等不同学科之间的相互结合、相互渗透,使得微生物学以及整个生物科学进入了分子水平的崭新阶段。

微生物学也是密切联系工、农、医和环保等方面生产实践的学科,其中突出的例子是抗菌素的生产和临床应用,以及重要生理活性物质的生产等。当前的趋势是如何更好地把生产实践与微生物学基础理论结合起来,使之更有利于两方面的发

展。本书主要是介绍国外有关微生物学基础理论和生产实践方面的最近进展,着重代谢调节、透传、分子遗传、吸收运转、能量代谢、细胞结构与功能、分化发育以及工、农、医和环保等有关的微生物基础知识。此外,近代微生物学研究采用了很多新的技术和方法,这些对开展科学实验也是极为重要的,我们也要作适当介绍。本书可为从事微生物学教学、科研以及生产的同志们提供较新的参考资料,以利于推动各方面微生物学工作的开展。此外,希望读者在选题以及译文方面,提出宝贵意见,以便改进我们的工作。

编 者

1979年5月

本书可作为微生物学、生物化学、遗传学、生物物理学等学科的参考书。

目 录

1. Mu 噬菌体的特性	1
2. 关于抗性质粒起源的一些想法	14
3. 抗菌素产生的遗传学	22
4. 代谢途径的调节模式	54
5. 细菌内糖类运转的酶学	60
6. 用固相微生物菌体进行有机物质的转化	76
7. 应用聚乙二醇浓缩和纯化病毒和噬菌体	91
8. 第三次国际工业微生物遗传学座谈会论文摘要的选译	96

一九八〇年七月

Mu噬菌体的特性

小川智子

Mu噬菌体的遗传特性是：伴随着它的DNA的复制和整合等过程，可以使宿主菌的基因发生突变、转座、插入和倒位等反应。此外Mu噬菌体不仅能在大肠杆菌中，而且能在多种其它细菌中增殖，所以也可以用于对这些宿主细菌的遗传分析。本文介绍关于Mu噬菌体DNA复制和整合机理的最新进展。

前言

Mu噬菌体是Taylor从1963年开始研究的^[1]，以后应用了现代分子生物学所使用的一切手段对它进行了遗传学、生物化学和DNA分子的物理化学等研究。Mu噬菌体增殖的生活史同迄今所看到的大肠杆菌噬菌体完全不同^[2,3]，特别是Mu噬菌体DNA必需同宿主的DNA相结合才能增殖。它也能整合到与大肠杆菌完全不同的宿主菌中，因此对于了解在生命现象中起重要作用的DNA的新的复制与重组机理是个很好的材料，关于Mu的报道主要也集中在这两种机理的分析。就Mu生活史的分子机理来说，不仅在模型上，而且在其它许多方面存在着不少有趣的问题，即使就模型而言，也经常在变换。将Mu的基因整合到抗药质粒(RP₄)上以后，就能把它转移到多种的细菌中，现在已经可以转移到固氮细菌肺炎克氏杆菌(*K. pneumoniae*) M 5a 1 (肠杆菌科)、根瘤菌菌根瘤菌(*Rhizobium meliloti*) 2011 (根瘤细菌科)和植物病原菌青枯病极毛杆菌(*Pseudomonas solanacearum*) GMI 1000 (假单胞菌科)等菌株上^[4]，Mu能够在这些细菌中表达其基因的功能；将这些细菌的染色体整合到RP₄上，并可能再次转移到大肠杆菌中，而Mu整合到这些细菌的染色体上还可以诱发突变。因此，利用这些技术就有可能进行固氮菌(肺炎克氏杆菌)的遗传分析；对植物病理学有重要意义的细菌毒性和关于宿主特异性的遗传分析；以及对沙门氏菌和志贺氏菌的致病性机理的遗传分析。将来，Mu很可能成为适用于多种细菌基因操作的手段。

Mu的整合反应所诱发的宿主宿的突变

Mu噬菌体就是因为它能诱发宿主菌突变才被命名为Mu的。诱发突变的频率相当于自发突变频率的50~100倍^[1]，随机选择的Mu溶原菌有2%是营养缺陷型突变株。Taylor证明，这种突变的诱发是由于Mu噬菌体的溶原化而引起基因突变所造成的。同只能整合到宿主染色体的特定位点(*att*位点)的 λ 和 ϕ 80等温和噬菌体相比，Mu噬菌体能整合到宿主染色体的各个位点。对在各个位点上发生的整合进行更详细的单基因(*lac Z*基因)诱发

突变研究,显示出 Mu DNA 的整合位点可以分布在 *lac Z* 基因的任意位点上^[5,6],现在至少已发现 Mu 在 *lac Z* 基因上的整合位点有 50 个以上。如果 Mu 的整合反应必需要识别某些特定的碱基序列,那么这样的结果就暗示着被识别的碱基序列只要有 2~3 个碱基对就足够了。最近知道, Mu 的整合反应可以发生在同大肠杆菌的碱基组成(GC 含量)完全不同的质粒及其它细菌的染色体上^[4],因此可以认为: Mu 能够整合到与宿主的碱基序列没有相关性的 DNA 上。另一方面,由 Mu DNA 的整合所诱发的突变是非常稳定的,在可以检测的范围内没有回复突变。在用 X 突变株*的实验中^[7],伴随有回复突变的 Mu 前噬菌体的切除频率仅只有 $10^{-6} \sim 10^{-8}$,有些 Mu 前噬菌体的切除频率为 $10^{-5} \sim 10^{-7}$,但几乎都不能使突变回复,已经知道这是由于导致了邻接染色体 DNA 缺失的缘故。但是存在着能够产生回复突变的切除,说明 Mu 的整合反应对宿主 DNA 没有任何损伤,而仅仅只是基因的分割而已。

Mu 噬菌体的基因图

为了了解 Mu 噬菌体的性质,分离了各种必需基因的琥珀(amber)突变株和温度敏感性阻遏突变株^[8~12],并用这些突变株进行配对实验,制作了 Mu 噬菌体增殖状态的基因图(Vegetative map——见图 1)。

这些琥珀突变株不能在重组功能缺失(*rec* 缺失)的宿主突变株中进行重组^[10,11,14],由此可知, Mu 噬菌体本身并不具有重组功能(相当于大肠杆菌的 *rec A* 与 λ 噬菌体的 *red* 功能)。另一方面, Mu 噬菌体在 *rec*⁻ 突变株中与在 *rec*⁺ 株中同样地能够溶原化^[15,16],说明 Mu 噬菌体的溶原化不仅能在宿主染色体的各个位点上发生,而且是由来源于 Mu 噬菌体的特定酶(整合酶 Integrase)进行的,这种酶的功能对 Mu 的重组没有作用(正常重组)。从 Mu 的溶原菌分离了缺失一部分 Mu 噬菌体基因的突变株,制成了前噬菌体状态的基因图^[10,12,13],结果证明,它的基因次序同增殖状态的基因图是完全相同的。用几株独立分离到的 Mu 溶原菌来分离缺失突变株时,可以看到 Mu 噬菌体溶原性的方向性对宿主染色体的基因序列而言,有两种类型^[12,17],这同目前看到的大肠杆菌温和噬菌体有方向性的发生溶原化的情况是不同的。从增殖状态的基因图和前噬菌体状态的基因图是相同的这点看,如果 Mu 的整合反应也是如 λ 噬菌体那样按 Campbell 模型进行的话,那末必需考虑在整合反应中,噬菌体 DNA 上的 *att* 位点(和宿主发生重组时,噬菌体 DNA 上的位点)是在 Mu DNA 的任何一端呢? 还是在两端结合时产生的?

Mu 噬菌体 DNA 和它的物理图谱

从 Mu 噬菌体粒子抽出的 DNA 是具有双链的线状结构,长度为 36~38 个千碱基对(Kb),分子量为 25×10^6 道尔顿。Mu DNA 的有趣特性是:把 DNA 变性和重新退火(denature-reanneal)后,显示出特异的不均一性^[18~22,23],用电子显微镜观察经这样处理的 Mu DNA,可以看到图 2(b) 和 (c)所示的分子,在 DNA 双链的一端上,具有不能重新退火

* X 突变株: 在 Mu DNA 的 C-末端 1500 碱基对的地方,由于插入顺序 1 (IS-1) 的插入而造成 Mu 噬菌体失去增殖、整合或者杀死宿主的功能的突变株。

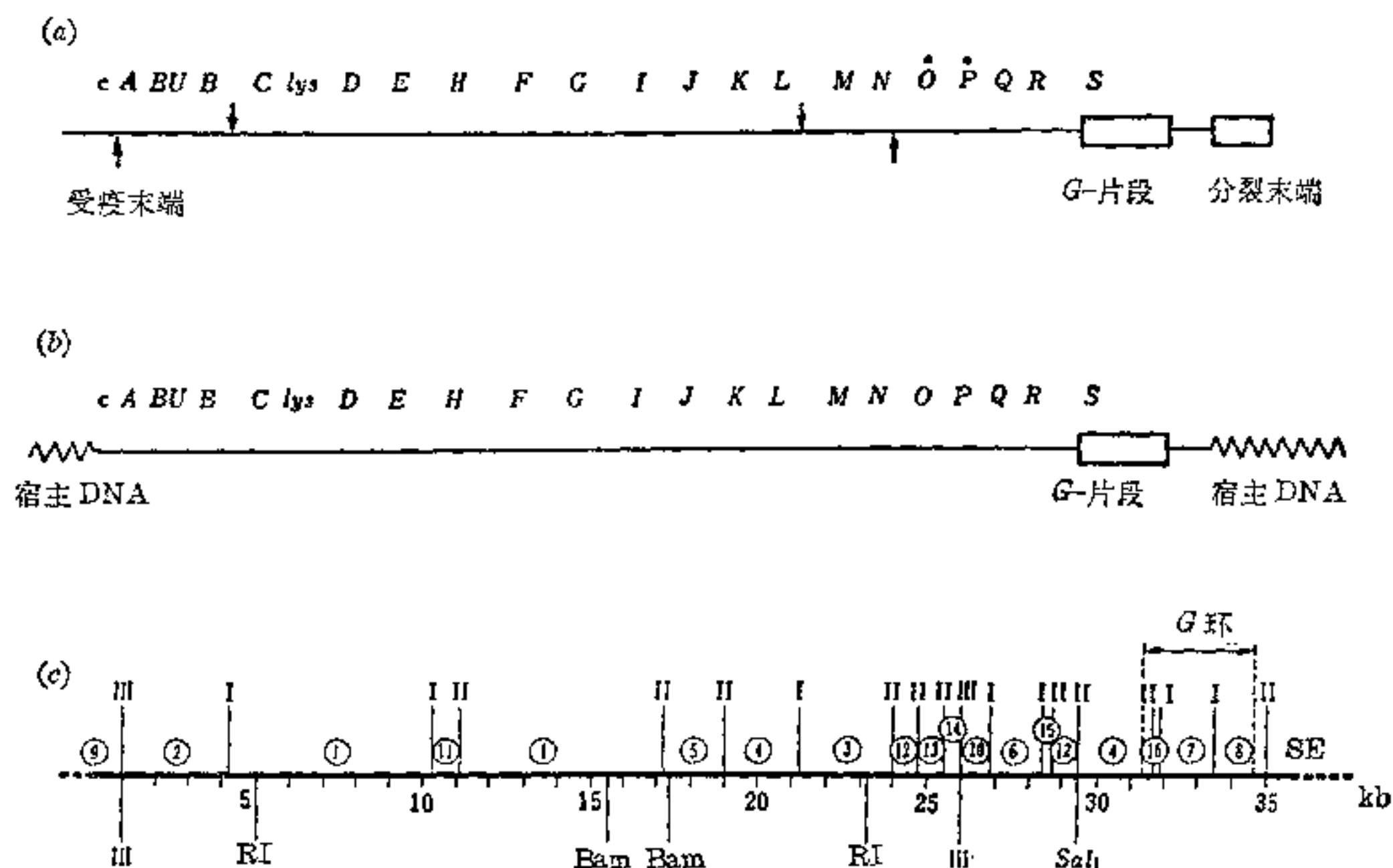


图1 Mu 噬菌体增殖状态和前噬菌体状态的基因图^[50]。

(a) 增殖状态的基因图。C 基因的左侧(A、Bu、B)区域的基因同 Mu 增殖初期的功能表达有关,当 A、Bu、B 突变时,不能合成 DNA。A 基因是同 Mu 整合反应有关的基因之一,在这个区域还有称为 kil (杀死宿主功能), sov [提供转染(transfection)的功能], gam (类似 λ 噬菌体 gamma 基因的功能)和 cim (控制免疫的功能)等基因存在。在这个区域中插入 DNA 就会产生 X 突变。lys 基因在 Mu 增殖中具有使细胞溶菌的功能,从 D 到 J 是与噬菌体头部合成有关的基因,从 K 到 S 是与尾部合成有关的基因。S 基因在 G-片段上,但只有在 G-片段具有方向性时, S 基因才表达,因此只有具有方向性的 G-片段的噬菌体粒子才能成为有增殖可能的 Mu 噬菌体,即使是缺失部分 S 蛋白的噬菌体吸附在细胞上也不能发生感染。O、P 很可能是一个基因。此外, mom (DNA 修饰有关功能), gin (G 倒位有关的基因)等在 G、β 区域。↓表示用限制性酶 ECo R I, ↑表示用 Hind III 切断的位点,从而鉴定了在各断片上存在的基因。(b) 前噬菌体状态的基因图。(c) 核酸内切酶的切点图。各种限制性内切酶的符号为: I, Hpa I; II, Hind II; III, Hind III; RI, ECo R I; Bam, Bam I; Sal, Sal I。“O”中的数字表示用 Hind II 和 Hind III 产生的 DNA 片段的大小顺序。

的部分^[19],这一端称为分裂末端(split end)。图 2(c)的分子是在分裂末端上的另一个不能退火的部分(称为 G-环)^[2,3],这些不均一部分在 Mu 噬菌体 DNA 上有一定的位置,因此通过这些分子的分析即可给 Mu 噬菌体 DNA 的各部分命名^[8]。如图 2(a)所示,把长的双链部分称为“α-片段”,短的双链部分称为“β-片段”,在 α 和 β 之间形成的“G-环”部分称为“G-片段”,并把具有不能退火部分的一端称为易变末端(Variable end)或分裂末端。这些片段的长度分别是: α-片段 30.7 ± 1.1 Kb, G-片段 2.9 ± 0.4 Kb, β-片段 1.6 ± 0.1 Kb, 分裂末端的长度是参差不齐的,为 0.5~3.2 Kb, 平均为 1.5 Kb^[24]。最近利用 T₄ 基因 32 蛋白进行的电子显微镜观察知道,和分裂末端相反的另一端也有由约 100 个碱基对组成的不均一的 DNA 组成部分^[25,26]。由此,利用 Mu DNA 特异的不均一性,制成了 Mu 噬菌体的物理图谱 [图 2(a)]^[9,15,27]。将 Mu 噬菌体基因的一部分整合到 λ 噬菌体中以产生 λ 噬菌体的缺失突变株(λd_{pg} 1Mu),对它进行的遗传和结构分析表明: Mu 基因 P、Q、R 和 S 位于 G-片段的右端,而 C、A 和 B 基因则位于 Mu DNA 的左端。与分裂末端相对的左端称为免疫末端(immunity end),即 C-末端。

从单一噬斑或者从单一溶原菌诱导出的噬菌体粒子制备的 DNA 分子都具有分裂末

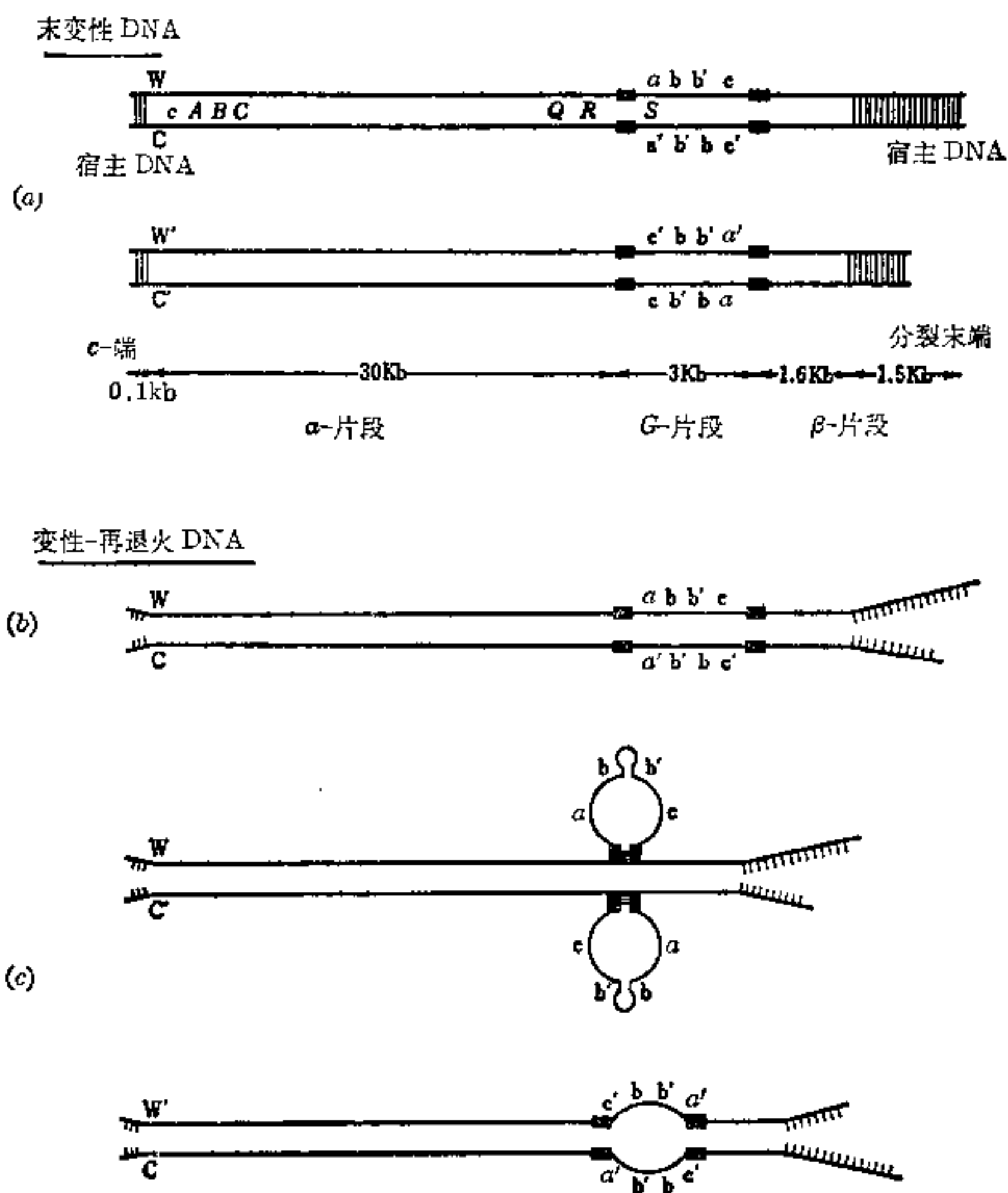


图2 Mu 噬菌体 DNA 的物理图谱和它的结构。

端,因此这种分裂末端似乎是在 Mu 的增殖中产生的;这也证明分裂末端是由 Mu DNA 和宿主 DNA 两者的核苷酸相结合而形成的。

充满头部的包装模型(headful packaging model)

Bukhari^[24] 观察到当其它 DNA 整合到 Mu DNA 上时,分裂末端的长度变短。具有 750 碱基对的其它 DNA 插入 Mu DNA 时,分裂末端 DNA 的长度约缩短 600 个碱基对。Bukhari 推测,这大概是噬菌体粒子成熟时,将完成复制后的 DNA 分子从分裂端切去一定的长度以作为 Mu 噬菌体的 DNA 而造成的。因此提出了“充满头部的包装机理”的模型,而用 Mu 的突变株(Xcam)所作的分析则进一步证实了这个模型。Mu (Xcam)是用同氯霉素抗性有关的转位子 Tn 9(2.8Kb)组合到 Mu DNA 上的突变株。Tn 9 的长度 2.8Kb 比分裂末端的平均长度 1.5Kb 长,因此如果 Mu 噬菌体按照“充满头部的包装机理”组成成熟噬菌体,那末 Mu (Xcam) DNA 的分裂末端应当大大缩短或者失去。对 Mu (Xcam) DNA

和 Mu DNA 的异源双链观察表明,在 C-末端没有观察到 DNA 的缺失,而 99.9% 以上的 Mu (Xcam) DNA 的分子则缺失分裂末端。进一步用 Mu (Xcam) DNA 彼此之间进行异源双链 DNA 的长度测定,结果表明这些分子除了缺失分裂末端之外,还缺失了一部分的 β -片段。另一方面,由于这些 Mu (Xcam) 不能再进行氯霉素抗性的转化,因此暗示了 β -片段对 Mu 噬菌体的整合是必需的。鉴于 Mu 噬菌体的成熟是以“充满头部的包装机理”进行的,从而也可以说明为什么分离 Mu 噬菌体的缺失突变株是很困难的^[8]。那么 Mu 噬菌体的整合是否利用了分裂末端与宿主 DNA 的互补性呢?因为在缺失 *lac* 和 *ton B* 基因的突变种所增殖的噬菌体能整合到 *lac*⁺ 和 *ton B*⁺ 株的这些基因上^[8],以及从后面还要提到的、整合到染色体的 Mu 前噬菌体,在整合状态下都不具有分裂末端。因此不能认为 Mu 噬菌体的溶原化机理是利用了分裂末端与宿主染色体相同的碱基序列而进行的重组反应。

G-片段的结构

在 Mu 噬菌体粒子的所有 DNA 分子上,都可以观察到显示出特异的不均一性的分裂末端,而“G-环”的形成却是根据噬菌体培养液的制备方法而变化的。只有在诱导 Mu cts 62 溶原菌得到的噬菌体 DNA 在经过变性与再退火后才能观察到“G-环”(50% 的 DNA 分子形成 G-环)。在经感染而产生的噬菌体 DNA 中则几乎不能观察到“G-环”(1% 以下)。从 Mu cts 62 溶原菌的 *rec A* 和 *rec BC* 突变株中诱导的噬菌体粒子也可形成“G-环”。观察到的“G-环”与在 *recA*⁺ 溶原菌中产生的相同^[28]。此外,前而已讲过,从 λ dpg1Mu(6d) 的 DNA 中也可以观察到“G-环”。由此可知,G-片段的 DNA 的不均一性是在前噬菌体状态形成的,如果它形成的必要功能来源于噬菌体,那末推测 λ dpg1(6d)DNA 所具有的功能是在 Mu 基因上。对电子显微镜观察到的变性-再退火的 Mu DNA 作更详细的分析^[29]后发现,G-片段上的碱基序列在某些噬菌体粒子上存在着倒位的结构,而这种倒位的存在导致“G-环”的形成。进一步研究表明,在 G-片段的两端有约相当于 50 个碱基对的逆向重复序列(inverted repetitious sequences),而

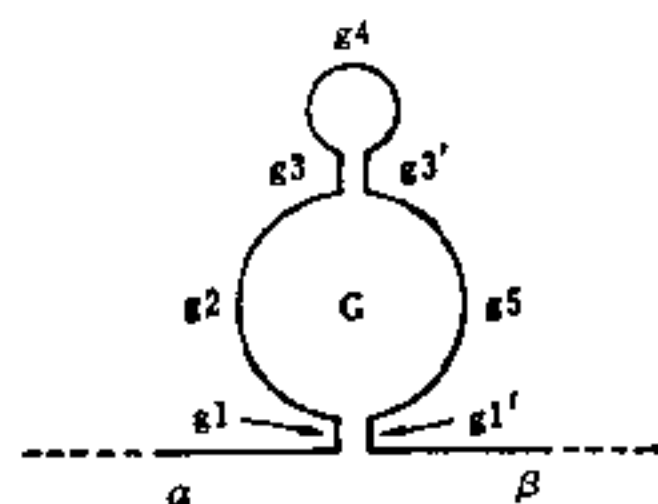


图3 G-片段的细微结构。

$g1, g1'$ 是在 G-片段上的逆向重复序列; $g3, g3', g4$ 是在 G-区域内观察到的茎状环(stem loop)结构,总长相当于 1Kb; $g2$ 和 $g5$ 长度各为 1Kb。

G-片段的倒位可能是由这种逆向重复序列之间的重组产生的。图3表示用电子显微镜观察到的“G-环”的结构^[26,28],在这样的 G-片段中还存在着另一个逆向重复的碱基序列,对这个逆向重复存在的意义尚不清楚,但有报道, Mu 缺失突变株的热点之一是在 $g3' \sim g5$ 之间^[30]。Chow 等分离了用插入其它 DNA 代替缺失了 G 和一部分 β -片段的突变株以研究“G-环”的形成,结果看到一株 gin (G 倒位)缺失突变株(缺失一部分 β -片段而保持全部 G-片段)的 G-片段上的碱基序列不是倒位的,这暗示着 β -片段上存在着控制 G-片段倒位的基因。此外,由于 Mu vir* 突变噬菌体的 DNA 不形成“G-环”,所以此突变噬菌体的 G-片段的碱基序列常常是同一方向的,当和此噬菌体 DNA 产生异源双链时,是否形成“G-环”,就可以决定另一噬菌体 DNA 的 G-片段的方向性。Chow 等分离的 7 株缺失突变株的 G-

• Mu vir 为烈性突变株。

片段的碱基序列是一个方向的, 这和感染后产生的噬菌体粒子的方向性相同。不能分离到方向性相反的 G-片段的缺失突变株的原因, 可能是由于相反方向性的 G-片段上如果缺失了一部分 DNA 就会有致死的效果, 这暗示着在 G-片段上存在着 Mu 噬菌体增殖所必需的功能。以后报道在 G-片段上存在着 δ 基因 (图 1 的说明)。Chow 和 Bukhari 还进一步揭示, 在 P1 噬菌体的 DNA 上也存在着和 G-片段相同的碱基序列^[29]。这两种噬菌体的 DNA 在结构等方面是大不相同的 (P1 噬菌体具有末端重复和环状排列等结构), 但两者的共同性质是能普遍转导。从这里可以窥视 G-片段的在存在和它的作用之间的某种关系, 这是极有趣的一个问题。

整合在染色体上的 Mu DNA

Mu 噬菌体的增殖状态的基因图和前噬菌体状态的基因图是相同的, 这表示 Mu 噬菌体溶原化时, 噬菌体 DNA 整合到宿主染色体上, 其基因次序是不发生变化的 (直线插入)。Hsu 和 Davidson 用异源双链观察 Mu DNA 的整合, 从分子水平证明了确实是直线插入的^[20,28], 而且他们用下述实验表明前噬菌体 DNA 是没有分裂末端的: 用 $F'_s(F45::Mu)$ 和 $F'V(33\sim43)$ 及 Mu 这三种 DNA 产生双异源双链(diheteroduplex)以求观察到图 4(a)或(b)那样的分子。如果观察到(a)那样的分子, 就表示 F'_s 上的 Mu 前噬菌体 DNA 上具有分裂末端; 如果观察到的是(b)那样的分子, 就表示这个前噬菌体的 DNA 上没有分裂末端。用从三种独立分离到的溶原菌中得到的 $F'_s(F45::Mu)$ DNA 进行实验结果只观察到图 4(b)

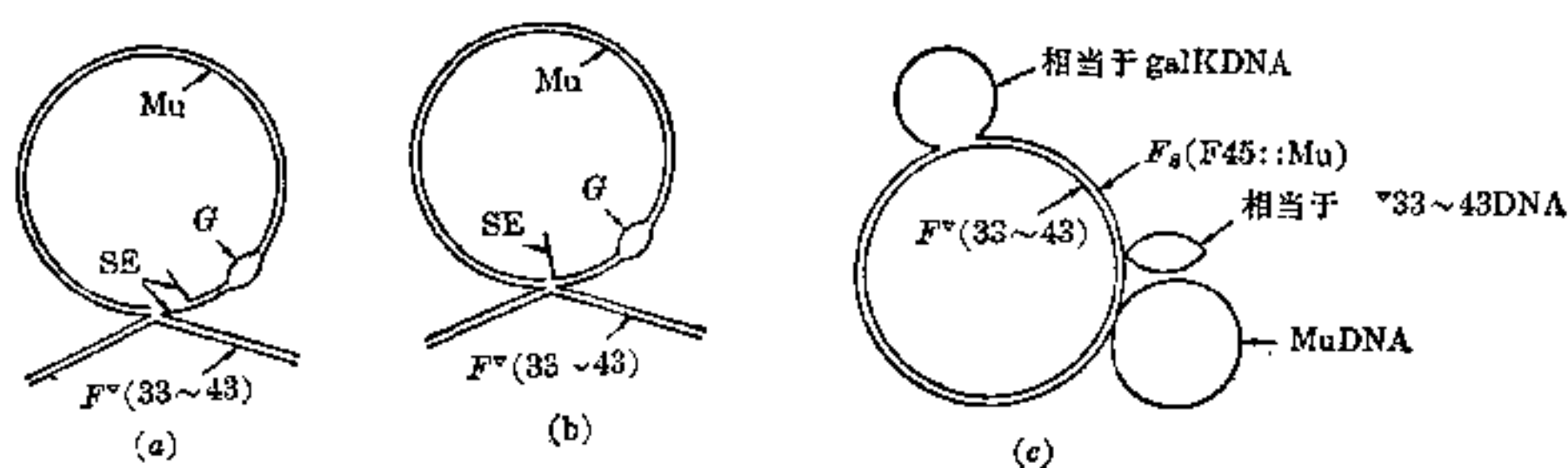


图 4 $F'_s(F45::Mu)$, $F'V(33\sim43)$ 和 Mu DNA 的双异源双链分子模式图。

(a) 和 (b) 系 $F'_s(F45::Mu)$ 和 $F'V(33\sim43)$ 形成双异源双链分子的模式图。(c) 系 $F'_s(F45::Mu)$ 和 $F'V(33\sim43)$ DNA 的异源双链分子的模式图。

那样的分子, 因而证明在前噬菌体上不存在分裂末端, 这表明分裂末端是 Mu 增殖时, 随机地摄取了宿主菌的 DNA 而产生的, 且在溶原化时再度失去。那么在 Mu DNA 的两端由宿主来的 DNA 又是以怎样的机理失去的呢? 是否同其它噬菌体一样, 整合反应的前体是呈环状结构的 DNA? 即使如此, 环状结构的 DNA 又是如何产生的? 这些都是有关 Mu 噬菌体的有趣的核心问题, 了解这些机理的方法之一是分析感染后的 Mu DNA 或者诱发后的前噬菌体 DNA 的去向。

不能从诱导后的宿主染色体上切除 Mu 前噬菌体的 DNA

Ljungquist 和 Bukhari 研究了当诱导前噬菌体时, DNA 是怎样切除的^[2,31]。从溶原

菌抽出 DNA, 用限制性酶分解 DNA, 用琼脂糖电泳分出 DNA 片段并使这个 DNA 在凝胶中变性, 再将变性 DNA 移到硝化纤维纸上, 以研究这些 DNA 片段能否同用 ^{32}P 标记的 Mu DNA 进行杂交。这个方法可以从溶原菌抽出的全部 DNA 中选出含有 Mu DNA 的 DNA 片段。选出的 DNA 片段有这样两种组成: 只有 Mu DNA 组成的片段, 以及在 Mu DNA 整合到染色体时宿主 DNA 结合到其两端的双链 DNA 片段。从溶原菌的噬菌体整合位点上抽出的这种双链 DNA 连接片段在琼脂糖电泳上有特定的位置, 如果被诱导的溶原菌发生前噬菌体的切除, 那末在凝胶上就不能检出这个连接片段。因此, 如果在前噬菌体诱导后的不同时间来检定连接片段, 就可以知道当诱导后, 它是在什么时候从染色体上被切除的。前噬菌体切除后如果 Mu DNA 形成环状结构, 则凝胶上就会有新的 Mu DNA 片段出现。用对切除机理了解得最清楚的 λ 噬菌体的溶原菌进行同样实验, 可以看到在诱导 15 分钟后, λ DNA 和宿主 DNA 组成的双链连接片段就消失了, 并可检出含有新的 *att* 位点的 λ DNA 片段。但在 Mu 溶原菌中, 经诱导后, 不能检测到这些连接片段的消失, 也不能检出有新的 DNA 片段, 这些事实表明, Mu 前噬菌体和 λ 前噬菌体是不同的, 诱导后, 前者不能从宿主染色体上被切除。引起 Mu 噬菌体诱导的机理同解释温和噬菌体诱导机理的 Campbell 模型是完全不同的。Mu 噬菌体发生诱导时并不进行前噬菌体的切除, 它是整合在染色体上进行 DNA 复制的。此外, 这些结果还表明, 在染色体上发生的 Mu DNA 复制仅仅是产生 Mu 基因而并不伴随有邻接的宿主 DNA 的复制。

感染后的 Mu DNA 是否形成环状结构

λ 和 P2 等温和噬菌体感染宿主时会形成环状结构, 而感染后的 Mu 噬菌体 DNA 又怎样呢? 用蔗糖密度梯度离心和溴乙锭 CsCl 平衡密度梯度离心, 或者用限制性酶分解 DNA, 然后用琼脂糖凝胶电泳检出 DNA 片段以研究感染后的 Mu 噬菌体 DNA 的形态变化。结果显示, 感染后的亲株噬菌体中没有检出环状结构的 DNA。而亲株噬菌体 DNA 分子在蔗糖密度梯度离心中, 其沉降速度是单体 Mu DNA 的 2 倍。此外, 大部分亲株噬菌体 DNA 的两端, 在感染后 40 分钟, 仍以原来的游离末端状态存在, 不能检出有两端结合的状态, 这些结果表明, 感染后亲株噬菌体没有两端结合成环状结构的 DNA。如后面所述, Mu 噬菌体的感染菌中, 在噬菌体增殖中堆积着大小不均一的环状 DNA^[32], 这些环状 DNA 是由 Mu DNA 和宿主 DNA 产生的, 因此 Mu 噬菌体感染后, 所检出的环状 DNA 都应当是这种结构。但在感染后的亲株噬菌体 DNA 中, 甚至连这样的 DNA 也没有, 也几乎没有整合到宿主染色体中 (10% 以下)。这些结果暗示着整合到宿主染色体的 Mu DNA 是经过一次复制的 DNA, 同时表明, Mu DNA 的整合并不是 Mu DNA 的复制和切断。Waggoner 等进一步详细地研究了 Mu DNA 的合成量和复制中堆积的环状 DNA^[32]。将 Mu cts 4 溶原菌诱导后, 以不同时间提取 DNA, 并用 DNA-DNA 杂交方法研究 Mu DNA 的合成速度。用溴乙锭 CsCl 平衡密度梯度离心以研究环状 DNA (ccc DNA*) 的产生。结果表明, 只是在 Mu 噬菌体发生增殖时才能观察到 ccc DNA, 而在不能进行复制的 Mu 突变株和未经诱导的前噬菌体中则均未检出 ccc DNA。在诱导后 12~14 分钟出现 ccc DNA 分子, 以后它的量增

• ccc DNA 系共价闭环 DNA——译者注

加;在接近溶菌时,ccc DNA 占全部 DNA 的 2~2.5%。在上述条件下,诱导后 6~8 分钟开始合成 Mu DNA,DNA 的合成量随着时间而增加,而在 15 分钟后出现的 ccc DNA 相当于一个细胞平均合成 6 个拷贝。DNA 合成开始后,检出的大部分 ccc DNA 分子比 Mu DNA 分子大(见表 1),最大的可达 Mu DNA 单体的 5~6 倍。ccc DNA 分子的大小是各种

表 1 Mu 溶原菌诱导后分离到的环状 DNA 分子的长度分布

	1 × Mu		2 × Mu		3 × Mu		4 × Mu			
	36.9		73.8		110.7		147.6			
A			82.0	98.2						
			80.6	94.6						
			78.5	91.5						
			78.4	90.6						
		65.8	78.0	90.2	114.4					
		64.2	77.9	88.1	114.1					
		61.1	76.9	87.7	113.5					
		59.2	76.5	86.6	110.7					
		59.1	74.9	86.5	107.8					
	49.2	58.6	74.0	85.4	106.2					
	48.1	57.0	72.4	85.1	101.5					
	34.4	41.5	56.6	71.5	84.8	103.7	129.8	142.0		
	26.8	38.2	52.0	69.2	83.6	102.9	128.4	137.5	161.5	
	22.1	37.9	51.2	68.5	82.7	100.5	117.3	133.1	149.3	201.5
B		65.5								
		65.3	82.0							
		63.0	81.4	98.2						
	50.0	61.0	77.3	93.5						
	46.7	59.2	75.8	93.2	113.6					
	44.7	58.3	75.2	92.4	112.1					
	40.9	57.6	73.8	88.5	110.9					
	40.3	57.0	72.7	88.5	110.0					
	39.2	56.4	71.7	88.0	107.6					
	37.6	55.2	71.1	88.0	101.4	123.3				
	37.1	53.6	69.0	85.3	100.5	120.9	136.8			
	37.0	51.7	67.7	85.3	99.4	119.7	136.1			
	36.5	51.2	67.0	83.3	98.5	116.2	133.8	156.7		
C		66.4								
	50.1	66.2								
	50.1	65.6								
	49.9	65.1								
	49.6	65.1								
	45.7	61.3	81.5	89.0						
	45.5	60.9	78.0	88.0						
	42.3	58.8	72.3	88.0	107.7					
	41.2	58.1	71.9	87.6	106.8					
	41.0	57.9	70.9	87.4	106.7					
	39.4	56.9	70.0	86.5	103.2	120.8				
	39.1	53.9	68.8	84.1	102.4	116.1				
	38.6	52.7	68.5	83.0	99.0	115.2				
D		65.1								
		64.0								
		62.5								
		60.6								
		59.8								
		59.6								
		58.6								
	50.3	58.3								
	49.2	57.3	82.1							
	48.6	55.5	77.4							
	46.2	55.0	76.2							
	43.6	55.0	70.8			126.2		162.4	285.8	
	43.5	54.4	69.0	98.3	110.4	120.5		154.2	184.7	
	40.0	53.5	67.7	93.4	104.3	117.0	144.0	153.9	174.0	
	39.7	52.1	67.3	89.6	103.3	115.4	136.7	153.0	166.7	
DNA 分子的长度 (Kb)										
0~34 35~50 51~66 67~82 83~98 99~114 115~130 131~146 147~162 >163										

Mu cts 4 溶原菌诱导后 20 分钟 (A), 30 分钟 (B) 和 40 分钟 (C) 分离到的 DNA 分子以及 *rec A⁻* Mu cts 4 溶原菌诱导后 30 分钟 (D) 所得到的 DNA 分子长度。长度单位用 Kb 表示。

各样的,不象二聚体与三聚体那样是 Mu DNA 长度的若干整数倍。由于这样大的 DNA 是不均一的,所以把这种 DNA 称为 Hc-DNA (heterogeneous circle-DNA) 即不均一环状 DNA,在 Mu 增殖过程中, Hc-DNA 长度随着时间而不同,在感染 20,30,40 分钟后, Hc-DNA 的平均长度分别是 85.5、79.9、和 71.5Kb,分子长度的分布分别是 22~201、36~156 和 38~120Kb,由此可见,随着时间的增加, Hc-DNA 的长度稍微变短。为了研究大肠杆菌功能对 Hc-DNA 分子的影响,对 *recA*⁻ 株产生的 Hc-DNA 进行了比较,表 1 的 D 部分记载了诱导 30 分钟后检出的 Hc-DNA 的长度。可见它的长度比用 *recA*⁺ 株(表 1A、B 和 C 部分)产生的 Hc-DNA 长,由此表明 *recA* 功能同 Hc-DNA 的长度缩短过程有关。但由于 Mu 噬菌体在 *recA*⁺ 和 *recA*⁻ 中的增殖几乎是相同的,因此可见 Hc-DNA 的大小对噬菌体的增殖并没有太大的影响。用 Hc-DNA 和 Mu DNA 的异源双链证实 Hc-DNA 中含有 Mu DNA;用 Hc-DNA 和宿主 DNA 进行杂交试验,表明 Hc-DNA 中也含有宿主 DNA。从这些结果可以知道, Mu DNA 在增殖中与各种长度的宿主 DNA 相结合形成了 Hc-DNA。那么与 Mu DNA 结合的这些宿主 DNA 的碱基序列是否有不同? 为了研究这种可能性,使 Hc-DNA 相互之间形成异源双链,因为如果和 Mu DNA 相结合的宿主 DNA 具有相同的碱基序列,那么形成的双链部分应当比 Mu DNA 的长度长。结果发现,形成双链 DNA 部分的长度相当于 Mu DNA (α 、 G 、 β) 的长度,从而表明结合于 Hc-DNA 的宿主 DNA 的碱基组成在各个分子中是不同的。可见在整合到某一特定定位点的溶原菌经诱导后产生的 ccc DNA 是和宿主染色体的不同部位相结合的,这就说明 Mu 噬菌体是整合在宿主染色体的不同位点,同时切除了宿主 DNA 而增殖的。虽然对于这个过程在 Mu 噬菌体的增殖中起了怎样的作用仍然不清楚,但是很容易想象到 Hc-DNA 在成熟过程中大约是 Mu 噬菌体粒子“充满头部的包装”的前体。

在 Mu 噬菌体的增殖中,不断发生 Mu DNA 整合到宿主 DNA 的反应,此种整合反应引起不正常重组 (illegitimate recombination)。已经知道,质粒等环状 DNA 插入到宿主染色体后引起的宿主基因的转座、倒位、缺失和融合等也是不正常重组^[33~35]。

以 Mu 为媒介的不正常重组

Mu DNA 可以作为载体将 λ 噬菌体和 F' 附加体等具有环状结构的 DNA 整合到宿主染色体上^[36,37]。这个整合反应在 *recA*⁻ 菌株中也可进行,这是 Mu 所具有的特殊功能。整合了的 DNA 在宿主染色体上常常以它的两端和 Mu DNA 相结合。这两个 Mu DNA 的基因次序是同一方向的。通过 Mu 使其它 DNA 整合的反应是由于 Mu 对感染细菌的特异性。Mu-DNA-Mu 的结构在宿主染色体的整个区域随机地产生^[38]。另一方面,对 Mu 溶原菌进行部分诱导*使产生整合反应时^[39],如果只是在宿主染色体的一个位点上存在一个 Mu 前噬菌体的 Mu 溶原菌受到诱导的话,那么 Mu-DNA-Mu 的结构最初一定是产生在 Mu 前噬菌体的位点,并在那个位点上由一个前噬菌体增加为二个,而新整合的 DNA 在这两个前噬菌体中间以夹层状态存在。在染色体上二个不同的位点各具有一个前噬菌体的溶原菌中进行同样的实验,结果发现 50% 的非 Mu DNA 被夹在两个 Mu DNA 中并整合到其中一个

* 部分诱导:使 Muets 溶原菌在 37℃ 下增殖。

前噬菌体的整合位点上,其余的50%则整合到另一个前噬菌体的整合位点上;这些结果暗示在非 Mu DNA 的整合过程中不发生 Mu DNA 的切除,而新产生的前噬菌体拷贝是在前噬菌体的整合位点上复制的。

更有趣的是可以利用这个反应使一部分染色体 DNA 以相当高的频率转座到质粒 DNA 上^[40],不论在 *rec A*⁻ 还是在 *rec A*⁺ 菌株中,只要具有转移性的质粒,在 Mu DNA 增殖时都能观察到这种转座,而且大肠杆菌染色体的所有标记位点都能发生这种转座。在不能进行

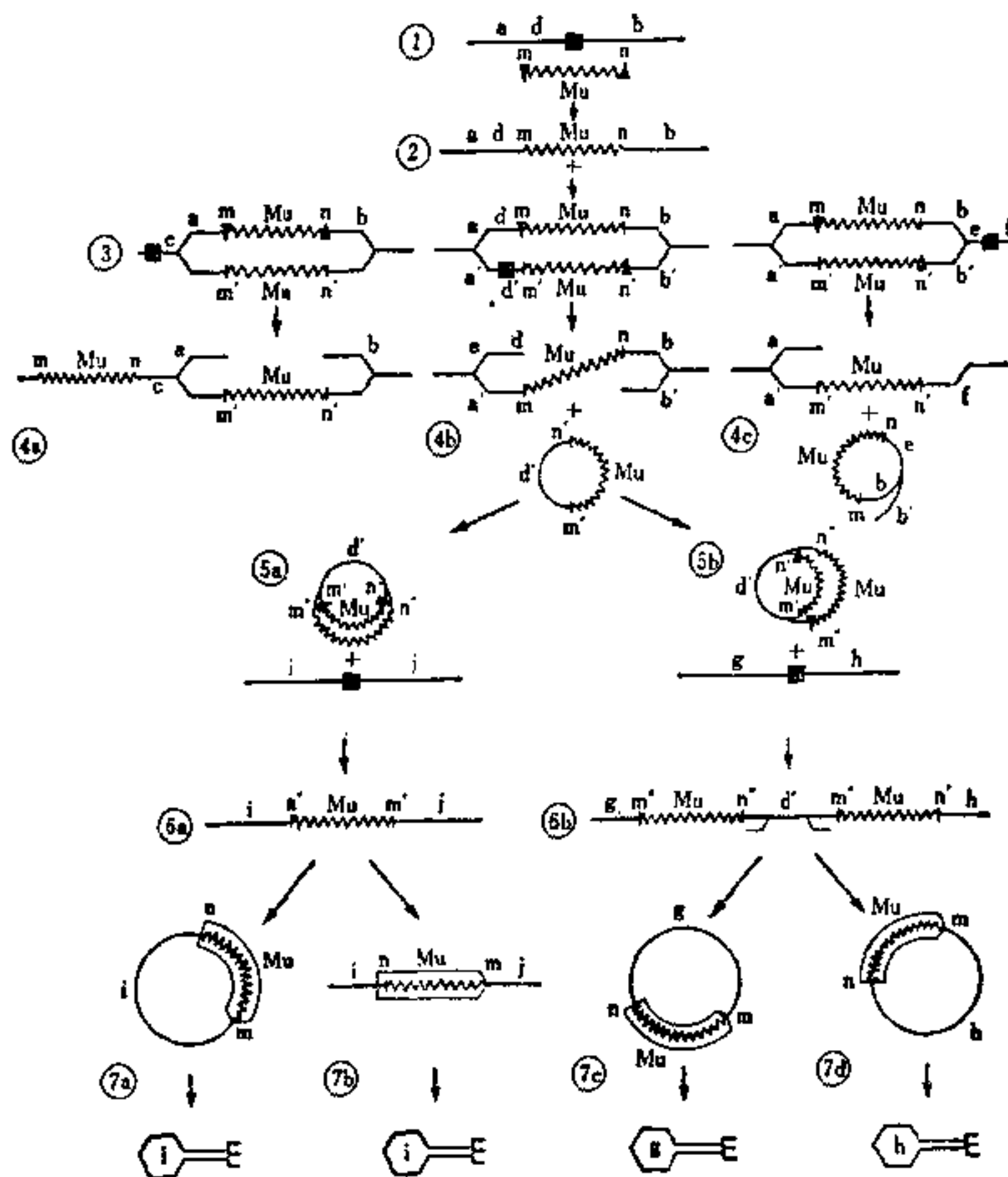


图5 Mu DNA 和宿主 DNA 的相互作用模型^[33]。

$a \sim j$ 表示宿主染色体。 m, n 表示 Mu DNA 两端的特异的碱基序列, $\blacktriangle$ 表示与整合反应有关的 Mu DNA 位点, $\blacksquare$ 表示宿主染色体位点。①~② Mu DNA 感染后插入宿主 DNA, 其过程尚不清楚。③伴随着 Mu 基因的复制, 出现了活化的 m, n 。在这个图中考虑到宿主 DNA 的部分复制, 但是现在可以认为伴随着 Mu DNA 的复制, 宿主 DNA 是不复制的。④ Mu DNA 的一个拷贝转座到宿主 DNA 的 C 位点, 另一个拷贝留在原来的位置。⑤ Mu 的 m, n' 和宿主 DNA 的 a', d' 之间发生重组。一个 Mu 和宿主的 d' 产生环状 DNA, 因而在宿主染色体上残留一个 Mu DNA。在这个过程中, 宿主 DNA 受到修复时, 在 d' 的部位就发生缺失。⑥ Mu 的 m, n' 和宿主的 e, f 之间发生重组。一个 Mu DNA 和宿主的 b, b' 产生滚环 (rolling circle)。这个时候宿主 DNA 如发生修复就会产生宿主 DNA 的 b', e 缺失。⑦~⑧ 作为环状结构切除的 Mu DNA 重复了 Mu 功能, 它的一个拷贝如 ⑧ 所示, 在宿主染色体新的位点, i, j 之间转座。⑨ 重复的 Mu DNA 的各个端 m', n' 和宿主 DNA 的 g, h 之间发生重组, 形成 ⑨ 所示的分子。这样, 宿主染色体的 d' 位点被二个 Mu DNA 以夹层状转座到宿主染色体的其它位点 (g, h 之间)。⑩ 以上过程中产生的环状 DNA 成为“充满头部的包装”机理的前体, 产生含有不同宿主染色体片段的成熟 Mu 噬菌体, 从 ⑩~⑪ 的前体所产生的噬菌体粒子, 各噬菌体头部的记号表示所含的宿主 DNA 片段。

Mu DNA 复制的突变株(X突变)中则不能发生此种基因转座。可见 Mu DNA 的复制对此种染色体基因的转座是必要的。

鉴于 Mu 在不正常重组中所起的特殊作用,因此可用于对多种细菌的重要功能进行遗传分析和生化分析,而这些分析将会弄清和普通重组不同的不正常重组的机理。由于在多瘤病毒(polyomavirus)和 SV 40 等致癌病毒中也观察到病毒 DNA 和宿主 DNA 的结合^[42~45],因此这种机理的分析可能将成为在分子水平上对更复杂细胞的生命现象进行分析的重要手段。

Mu DNA 和宿主 DNA 结合的事实可以概括为:(1) Mu DNA 常常是和宿主 DNA 相结合而存在,而噬菌体粒子中的 Mu DNA 的两端带有宿主 DNA。进行溶原性诱导不能使前噬菌体从染色体上切除下来。(2) Mu DNA 同 Hc-DNA 的形成是直接有关的,可以使 Mu DNA 以外的 DNA (非 Mu DNA) 从染色体的某个位点转移到其它位点,并能使质粒 DNA 整合到染色体。在这种染色体的转座和整合反应中,非 Mu DNA 的两端常常和 Mu DNA 相结合。(3)在非 Mu DNA 的整合反应中常常伴随着 Mu 前噬菌体的倍增(duplication),而整合的 DNA 常常是以夹在两个 Mu DNA 中的状态存在,这两个 Mu DNA 的基因次序常常是同一方向的。(4) Mu 噬菌体的成熟是以宿主 DNA 和 Mu DNA 的结合 DNA 作为基质并按“充满头部的包装”机理进行的。因此, Mu DNA 的整合反应是 Mu 噬菌体生活史中必需的一步。迄今尚未分离到失去整合机能而能增殖的 Mu 噬菌体突变株。图 5 是根据这些事实所推测的 Mu 噬菌体和宿主 DNA 相互关系的模型^[38]。

Mu DNA 的复制

为了了解 DNA 合成的起点和复制的机理,很多地方需要仰仗于复制中间体的观察,但遗憾的是,分离 Mu DNA 复制的中间体尚未成功。Wijffelman 等为了了解 Mu DNA 合成的方向,使用了 DNA-DNA 杂交法^[46]。将 Mu cts 62 溶原菌诱导后,经过 35 分钟,在细胞内合成的 DNA 几乎都是 Mu DNA,在这个时候用^[3H]-胸腺核苷短时间地标记感染菌,然后将 DNA 用碱性蔗糖密度梯度离心分离,^[3H]标记的 Mu DNA 在密度梯度离心中分成沉降速度快的“长的 DNA”和 8~12S 大小的“短的 DNA”。分别收集这些 DNA,进一步用 CsCl 平衡密度梯度离心精制。研究这些 DNA 和 Mu DNA 的 *l* 链与 *r* 链这两条链中的那一条链能发生特异的退火。结果发现“短的 DNA”主要和 Mu DNA 的 *l* 链退火,而“长的 DNA”以相等的比例和两条链退火。进一步用 λ_p Mu 噬菌体(带有 Mu 的 *cABC lys* 基因)的 *l* 链和 *r* 链进行同样的实验时,观察到合成的“短的 DNA”仍然同 λ_p Mu 的 Mu DNA 的 *l* 链退火,说明“短的 DNA”是从 *r* 链产生的。这就充分表明 Mu DNA 的合成是按一个方向进行的。他们又报道了 Mu 噬菌体 mRNA 的合成是转录 *r* 链,从基因图的左边到右边进行

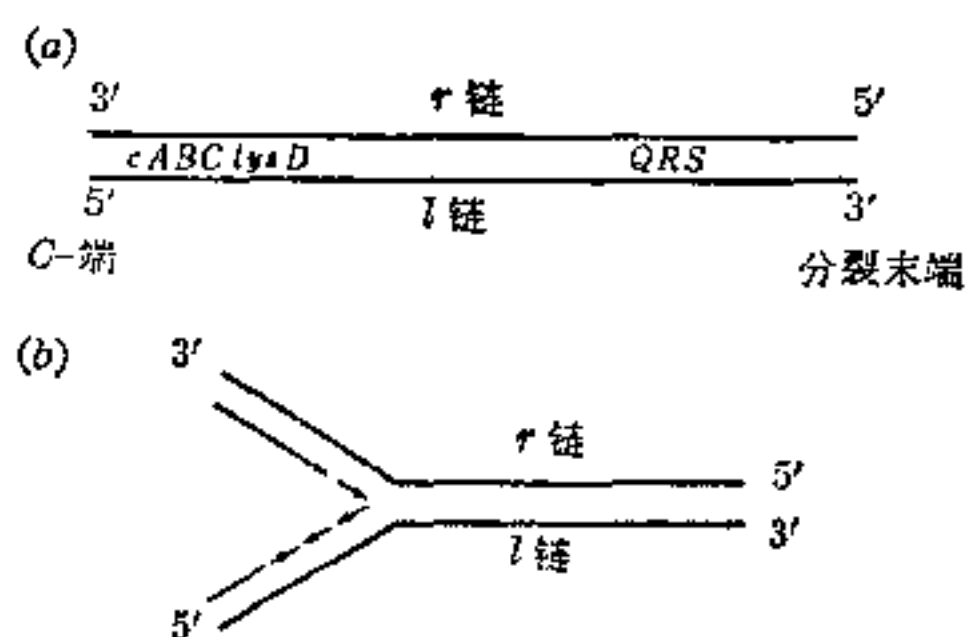


图 6 Mu DNA 的不连续合成表示 DNA 复制的极性^[46]。

(a) DNA 链的极性和基因图。(b) DNA 复制的方向性。

mRNA 的合成^[47]。从这些实验推测,由 Mu DNA 的 *r* 链和 *l* 链的极性所决定的 Mu DNA 的不连续合成是沿着 *l* 链发生的,因此推测 Mu DNA 的合成是从 C-末端开始,并按一个方向进行的(图 6)。

用 λ_p Mu 噬菌体进行 Mu 噬菌体初期功能的分析

与某些机理有关的功能分析是了解这些机理本质的关键。为此,对与 Mu 的整合反应和增殖有关的基因等进行了鉴定。有报道指出:Mu 的 A、B 两基因发生突变将会影响 Mu 噬菌体的溶原化^[12]、DNA 的复制^[48]、或 mRNA 的合成^[47,48]等重要功能。这说明,A、B 两基因的功能是 Mu 噬菌体感染初期所必需的。尚不知道 A、B 两基因的功能在本质上是否就是与溶原化和 DNA 复制功能有关的基因,也许是控制这些功能表达的基因。用将 Mu 的 A、B 两基因整合到 λ DNA 的 λ_p Mu 噬菌体进行 A、B 两功能的分析^[49], λ_p Mu 噬菌体的物理图如图 7 所示。这个噬菌体不能使 *rec A*⁻ 菌株溶原化,因为 Mu 的整合不依赖于 *rec A* 功能,并能整合到宿主染色体的各个位点。因此 λ_p Mu 的整合也许不是根据 Mu 的功能。 λ_p Mu 和宿主 DNA 的相同部分是 *bio* 基因,由于 *rec A* 功能,推测可以发生重组反应。事

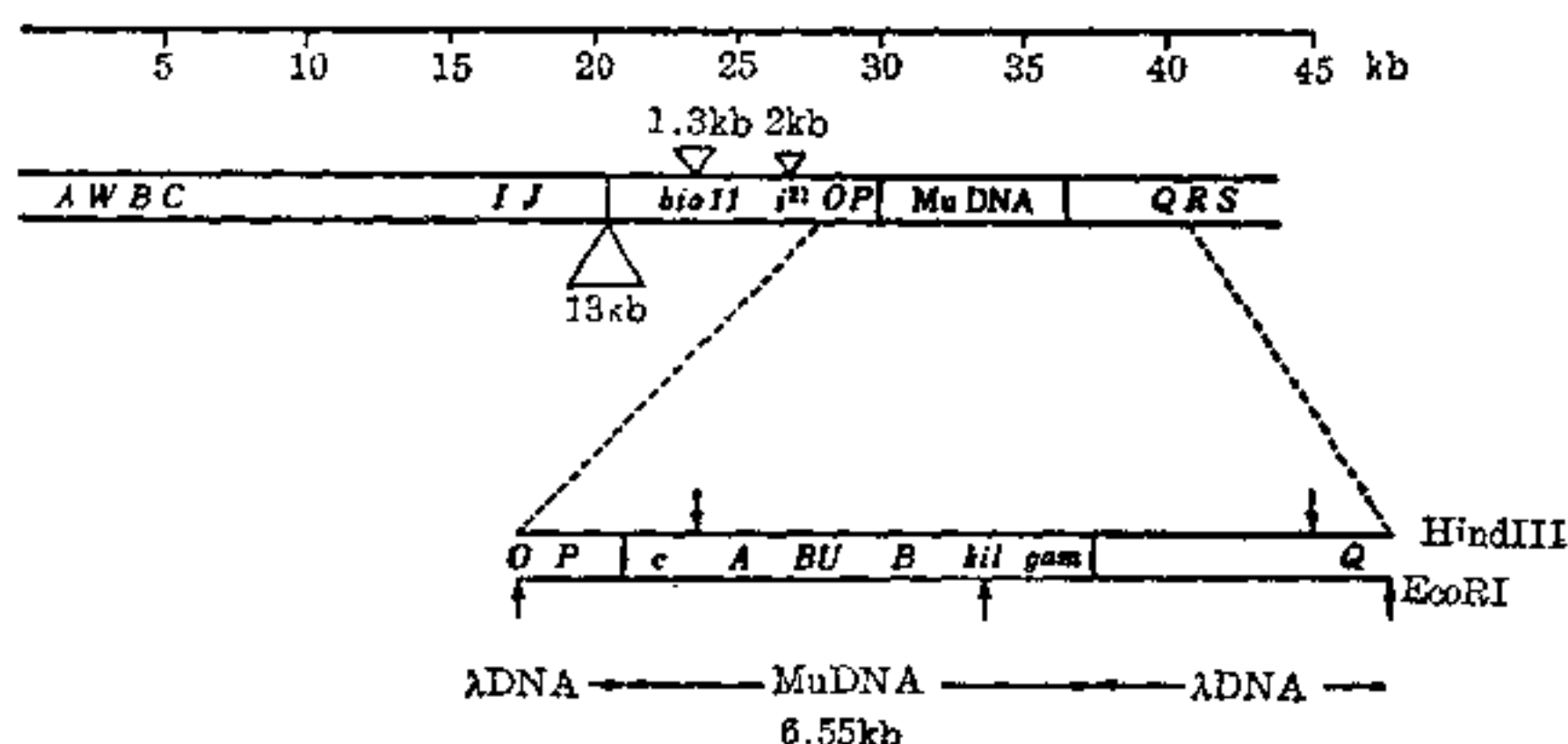


图 7 λ_p Mu 噬菌体的基因图。

λ_p Mu 噬菌体是 6.6Kb 的 Mu DNA(含有 C、A、B、*kil*、*gam* 基因)插入在 $\lambda^{101}bio 11b2$ (36 Kb)的噬菌体。

▽表示 λ DNA 的缺失部位。↓表示用限制性酶 Hind III 的切断位点。↑表示 Eco RI 的切断位点。

实用上 SA294^Δ(*gal-att^Δ-bio-uvr A*)/F'450 (*gal-att^Δ-bio*) 时, λ_p Mu 可以全部整合在 F' 上。虽然具有 Mu 的 A、B 基因和完整的 C-末端*,但不能产生依赖于 Mu 功能的整合,因此 Mu 整合的必要功能可能是在 A、B 基因之外,或者是 λ_p Mu 噬菌体缺失了相当于 Mu 的 *att* 位点。前面已经讲过, Mu 突变(*X_{cam}*)噬菌体因为缺失一部分 β -片段,所以氯霉素抗性的转化频率是相当低的,暗示出在重组中必需要有 β -片段。但到目前为止还不能认为噬菌体增殖的必要因子存在于 β -片段上。还有, λ_p Mu 不能在缺失 C-末端但具有 Mu 其它基因的 *rec A*⁻ 缺失突变株中溶原化,这表明是缺少了 Mu 的整合所必需的 *att* 位点。

* 从 λ_p Mu 感染只具有 Mu 的 C~S 基因的缺失突变株能够产生 Mu 噬菌体,可见 λ_p Mu 噬菌体具有完整的 C-末端。

已经讲过, Mu DNA 合成必需有 *A*、*B* 两基因, Mu DNA 复制的起点在 C-末端附近, 而 λ_P Mu 噬菌体既有 *A*、*B* 两基因, 又包含了完整的 C-末端, 故推测它是含有 DNA 合成起点的。因此, 在 λ_P Mu 噬菌体中导入 DNA 合成所必需的功能 *P* 基因的琥珀突变, 从而抑制了 λ DNA 的复制, 由此研究 λ_P Mu DNA 用 Mu 的复制功能是否能开始 DNA 的合成。在感染了 Su^- 株的 λ_P Mu DNA 分子中, 没有看到使 DNA 合成能部分进行的结构上的变化, 表示出并不具备 Mu DNA 复制的必要功能和 DNA 合成的起点。在这些实验中, DNA 不能合成的原因可能不是由于整合反应的缺失。

结 束 语

综上所述, Mu 噬菌体是大肠杆菌的有效诱变者, 它产生的突变使得那个基因完全失去其功能, 而且是非常稳定的。此外, 还可以利用 Mu 的整合反应在宿主菌内进行基因的操纵。由于不仅可用于大肠杆菌而且可用于多种细菌, 因此 Mu 噬菌体的应用范围是很广的。限于篇幅, 关于 Mu 的处理方法就不讲了, 读者如应用 Mu 时, 请参考文献^[17,51]。

参 考 文 献(略)

译自《蛋白质·核酸·酵素》23(5):369~381, 1978(日文)

张景六译 洪孟民校

(上接第 75 页)

识, 现在正在生物化学方面迅速深入和扩大。已经积累的大量知识可能对于帮助克服在医学上, 尤其是外科方面仍然是严重问题的细菌感染非常重要。例如, 我们知道细菌的糖运转系统对糖苷分子的糖原部分常常是很专一的, 而分子的糖苷配基部分可能在广阔范围里变化(参看金黄色葡萄球菌中的半乳糖苷的运转)。这一情况示意, 自然存在的细菌运转系统能被用于运转抗菌化合物, 而当这些化合物(如抗菌素)能以糖苷衍生物形式应用时则还可专一性地运转。这样化学修饰过的抗菌素经适当的运转系统将大量积累在细菌细胞内。由此可使靶体生物对较低浓度的经过这样方式修饰的抗菌素敏感。

参 考 文 献

(略)

译自《Current Topics in Microbiol. Immunol.》77:97~126, 1977(英文)

徐可仁 楼纯菊译 焦瑞身校

关于抗性质粒起源的一些想法

J. Davies, P. Courvalin, D. Berg

引言

一个质粒可为细菌带来许多有利条件,例如:增加了分解外来物质的潜在能力;对各种抗菌素、噬菌体和其它的细胞吞噬者产生抗性;有时为较高的自发突变频率提供选择优势(Falkow, 1975)。质粒很可能给许多更为有用的特性进行编码。目前,我们只能对一个质粒的一小部分遗传功能(只占 20%)作出说明,因此,质粒所携带的基因中,还有数百个有待鉴定,而这些基因对于细菌的生存大概有好处。质粒在由一个宿主传递给另一个宿主过程中将“拾起”这些基因成为一种集结结构而有益于下一个宿主。我们对质粒上的基因来源于何处以及如何被拾起知道得很少,至于为什么把它们拾起,也就是说与什么样的选择力有关则了解更少,对于质粒的起源和质粒建成机制,我们提出了一些看法,这些就是我们将要加以讨论的话题。

质粒决定的抗菌素抗性

研究质粒决定的抗菌素抗性有助于理解质粒基因的起源、集结和分类。特别是对氨基糖苷类抗菌素抗性(具有最广范围的有关联的抗性决定子)的研究最富有启发性。氨基糖苷类抗菌素的抗性是由质粒编码的酶所决定的(表 1),抗菌素在细胞的外缘受到酶的修饰从而不能转运到它所作用的靶位——核糖体上(Haas 和 Dowding, 1975)。对卡那霉素而

表 1 与氨基糖苷类抗菌素抗性有关的,由质粒决定的修饰酶类

修饰氨基糖苷-氨基环醇抗菌素的一些酶	
酶	典 型 底 物
3'-O-磷酸转移酶 3"-O-磷酸转移酶 5'-O-磷酸转移酶 2"-O-磷酸转移酶	新霉素,卡那霉素 链霉素 核糖霉素 庆他霉素
2"-O-腺苷酰转移酶 4'-O-腺苷酰转移酶 8"-O-腺苷酰转移酶 6'-O-腺苷酰转移酶	庆他霉素,托普霉素 BBK8, 托普霉素 链霉素,奇放线菌素 链霉素
6'-N-乙酰转移酶 2'-N-乙酰转移酶 3'-N-乙酰转移酶	BBK8, 托普霉素 庆他霉素,托普霉素 庆他霉素,托普霉素