

枯草杆菌的遗传学

高橋伊和夫

(加拿大迈克马斯特大学生物系)



编者按：高橋伊和夫 (Iwao Takahashi) 博士是加拿大 McMaster 大学生物系教授。枯草杆菌的转导现象及其转导噬菌体 PBS1 就是由他发现的。高橋博士从事孢子形成遗传调节的研究，曾绘制第一张孢子基因在染色体上的分布图。今年四月，他应中国科学院遗传研究所的邀请来华访问，这是他在访华期间所作的一篇报告。

一、染色体图

转化是通过游离 DNA 分子进行的遗传交换。这种现象是由 Griffith 于 1928 年在肺炎双球菌上发现的^[1]。以后在流感嗜血杆菌 (*H. aemophilus influenzae*)^[2]、奈氏球菌 (*Neisseria species*)^[3] 和枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[4] 上也都观察到。

转导是通过噬菌体进行的遗传交换现象。Zinder^[5] 首先在鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 上观察到这种遗传交换。从那以后，在许多其它细菌种属中都分离到转导噬菌体。1961 年，当时我在渥太华中央农业实验场工作，成功地分离到枯草杆菌的转导噬菌体 PBS1^[6]。Thorne^[7] 也独立地分离到枯草杆菌转导噬菌体，称之为 SP10。不幸的是 SP10 的宿主范围很窄：它只能侵染 W23 及其衍生菌株，而不能侵染 168 菌株，而枯草杆菌的许多突变体都正是从 168 菌株分离得来的。由于这个原因，噬菌体 PBS1 几乎成为研究枯草杆菌遗传学的唯一的噬菌体。

枯草杆菌转化现象发现之后，好几个实验室立即利用转化的办法，对控制芳香族氨基酸（如色氨酸、酪氨酸和组氨酸）生物合成的基因进行遗传分析^[8,9]。随后，此项研究又扩展到枯草杆菌染色体上控制其他各种功能的区域，例如用转化和转导的技术研究其他氨基酸、嘌呤、

嘧啶的合成，以及对各种抗菌素的抗性等等。通过转化而转移的 DNA，其大小约为 10^7 道尔顿；通过 PBS1 转导而转移的 DNA 有 1.9×10^8 道尔顿^[10]。这说明转化和转导都只能对染色体上很小的一段进行精确的遗传分析。由于在枯草杆菌中没有接合现象^[10]，所以必须发展一种新的办法，来绘制枯草杆菌的整个染色体图。

吉川和末岡建立了基因频率分析的技术来绘制枯草杆菌的整个染色体图^[11]。这种技术假设染色体复制从一端开始(起点)，以相当恒定的速度向另一端(终点)进行，而且两股都是以半保留复制的方法进行的。按照这个假设来说，在一个未经同步的对数生长期群体中，位于复制起点附近的基因的频率，将两倍于位于复制终点附近的基因的频率。这就是说，在对数生长期群体中，遗传标志的频率，是该标志处在染色体上的位置的单价函数。处在起点附近的标志将多于终点附近的标志。标志的频率的分布是该标志在染色体上的位置 x 的函数：

$$g(x) = 2^{1-x}$$

位置 x 可以在 0(起点)和 1(终点)之间取任何值，在 $x = 0$ 和 $x = 1$ 时， $g(x)$ 的值相应为 2 和 1^[12]。用各种各样的突变体作为受体进行转化实验，可以测定 $g(x)$ 的值。

第二种办法是密度转移实验^[12,13]。与基因频率分析的技术不同，运用这种技术需要同步培养，而同步培养通常是由萌发孢子来完成的。

例如,在重水(D₂O)配制的培养基中形成孢子,然后让这种孢子在普通水(H₂O)配制的培养基中萌发,在萌发过程中,复制完了的那一部分染色体应该是杂的,其一股含有重氢,另一股含有氢。用氯化铯密度梯度超速离心的办法,可以把尚未复制的分子和杂种分子区分开来。用各式各样的突变体作为受体进行转化,就可以测定杂种分子上的基因频率。使用这种办法,可以根据基因复制的时间来确定基因在染色体上的排列次序。

Dubnau 等人^[13]就是用这种技术绘制了第一张枯草杆菌染色体图。孢子基因的第一张连锁图,则是在我们实验室中绘制的^[14]。按照我们绘制的图,许多孢子基因并不集中排列在染色体的某一区段,而是分散在染色体的各处。但也有些相互矛盾之处。例如根据密度转移实验或基因频率分析来说是紧密连锁的一些基因,在转化和转导实验中,并不表现连锁。如果我们接受枯草杆菌染色体环状^[15]、双向复制^[16]的概念,这些矛盾就解决了。Lepesant-Kejzlarova 等^[17]用 PBS1 转导的办法终于把所有测试过的标志连锁起来,第一次提出枯草杆菌的环状染色体图。

二、转导噬菌体 PBS1

当初分离 PBS1 噬菌体的时候,以为它是能使枯草杆菌细胞溶源化的、典型的温和噬菌体^[6]。以后发现溶源细胞并不稳定,往往以相当高的频率回复到敏感状态。应用密度梯度离心的办法说明 PBS1 的 DNA 是处于“溶源孢子”的状态,而不和宿主 DNA 连结^[18]。可以把这种现象叫做假溶源状态或携带状态。PBS1 和宿主的关系,不同于其他细菌-病毒的关系。

PBS1 DNA 中有尿嘧啶,可以部份地解释这种不寻常的宿主-病毒关系^[19],当我去布朗地斯大学 Marmur 博士的实验室访问时,我发现 PBS1 DNA 完全没有胸腺嘧啶而只有尿嘧啶。这样的碱基取代,使得感染 PBS1 的细胞其嘧啶代谢发生深刻的变化。我们发现 PBS1 侵染之后,会诱导出一种新的酶,即脱氧胞三磷脱氨酶(dCTP

脱氨酶),可以把脱氧胞三磷 dCTP 直接转变为脱氧尿三磷(dUTP)^[20]。还发现脱氧胸三磷(dTTP)可以抑制这个酶^[20]。可是在另一项研究中,发现感染 PBS1 会增加脱氧胸三磷酶(dTTPase)的量,从而降低 dTTP 的浓度,为 dCTP 脱氨而生成 dUTP 创造了合适的条件^[21]。感染 PBS1 的细胞,除由脱氧胞三磷(dCTP)脱氨形成脱氧尿三磷之外,偶尔也由脱氧胞一磷(dCMP)脱氨或尿三磷还原而生成^[22]。大量脱氧胸三磷酶和脱氧胸一磷酶,可能是宿主 DNA 不再合成的原因^[21]。

此外,还发现枯草杆菌细胞里有一种能够特异地切割含有尿嘧啶的 DNA 的核酸酶^[23,24]。PBS1 侵染以后,细胞中很快就合成一种蛋白质一类的抑制物^[24],这种抑制物可能就是创造先前讲过的假溶源状态或携带状态的有效物质。

PBS1 的另一个不寻常的特点,是它吸附到宿主细胞上以及注入 DNA 的方法。我们观察到吸附的最初着落点是在鞭毛上^[25]。以后向下移动到鞭毛基部,在基部把 DNA 注入细胞内。头一步是非特异的,除枯草杆菌以外, PBS1 还可以吸附在其他需氧芽孢杆菌的鞭毛上。不过在其它芽孢杆菌鞭毛的基部决不会找到 PBS1。因此,许多遗传位点都可以用来进行遗传分析。唯独不能分析控制鞭毛形成的位点。

参 考 文 献

- [1] Griffith, F., 1928. *J. Hyg.*, 27: 113.
- [2] Alexander, H. E. and G. Leidy, 1950. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 73: 485.
- [3] Alexander, H. E. and W. Redman, 1953. *J. Exptl. Med.*, 97: 797.
- [4] Spizizen, J., 1958. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S.*, 44: 1072.
- [5] Zinder, N. D. and J. Lederberg, 1952. *J. Bact.*, 64: 679.
- [6] Takahashi, I., 1961. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 5: 171.
- [7] Thorne, C. B., 1961. *Fed. Proc.*, 20: 254.
- [8] Anagnostopoulos, C. and I. P. Crawford, 1964. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S.*, 47: 378.
- [9] Nester, E. W. and J. Lederberg, 1961. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S.*, 47: 52.
- [10] Takahashi, I., 1962. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 7: 467.
- [11] Yoshikawa, H. and N. Sueoka, 1963. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S.*, 49: 559.

- [12] O'Sullivan, A. and N. Sueoka, 1967. *J. Mol. Biol.*, **27**: 349.
- [13] Dubnau, D., C. Golthwaite, I. Smith and J. Marmur, 1967. *J. Mol. Biol.*, **27**: 163.
- [14] Takahashi, I., 1965. *J. Bact.*, **89**: 1065.
- [15] Wake, R. G., 1973. *J. Mol. Biol.*, **77**: 569.
- [16] Gyurasits, E. B. and R. G. Wake, 1973. *J. Mol. Biol.*, **73**: 55.
- [17] Lepesant-Kejzlarova, J., J. A. Lepesant, J. Walle, A. Billault and R. Dedonder, 1975. *J. Bact.*, **121**: 823.
- [18] Takahashi, I., 1964. *J. Bact.*, **87**: 1499.
- [19] Takahashi, I. and J. Marmur, 1963. *Nature*, (London) **197**: 794.
- [20] Tomita, F. and I. Takahashi, 1969. *Biochim. Biophys. Acta*, **179**: 18.
- [21] Tomita, F. and I. Takahashi, 1976. *Microbiology*, p. 315.
- [22] Rima, B. K. and I. Takahashi, 1979. *J. Gen. Microbiol.*, in press.
- [23] Tomita, F. and I. Takahashi, 1975. *J. Virol.*, **15**: 1081.
- [24] Tomita, F. and I. Takahashi, 1975. *J. Virol.*, **15**: 1073.
- [25] Wilson, J. J. and I. Takahashi, 1978. *Can. J. Microbiol.*, **24**: 1.

遗传工程的新成就

——猴肾细胞内合成了兔 β -珠蛋白

1979年的《Nature》第277卷5692期上发表了斯坦福大学医学中心 Mulligan, R. C. 等人的工作。他们将兔 β -珠蛋白mRNA的cDNA插入SV40 DNA, 建成了SV40 β -珠蛋白重组基因组——SVGT-5-Ra β G。这个重组基因组在猴肾细胞转录了含有 β -珠蛋白mRNA的polyA-mRNA杂种分子。这些细胞合成了大量的兔 β -珠蛋白多肽, 也即兔 β -珠蛋白基因在猴肾细胞中实现了表达。

重组基因的构建是这样完成的: 用HindIII将SV40 DNA切开, 再用EcoRI和BamHI扩大切口, 得到带有切口的SVGT-5载体(4.2 Kb)。另外, 用核酸切割酶将pM89 β -珠蛋白1切割, 得到 β -珠蛋白基因片段后, 再用T4连接酶和HindIII连接酶在该片段的两端接上互补核苷酸序列, 然后用HindIII切除该互补链中的一链, 这样得到一个两端带有一段单股核苷酸序列的 β -珠蛋白基因。将其插入用HindIII切开的pBR322质粒内, 通过在大肠杆菌细胞内克隆化, 建成了pBR322 β -珠蛋白基因杂种质粒。这样一个质粒再相继用HindIII和BglII进行加工, 如此得到的片段插入到以上得到的SVGT-5内, 最后建成了SVGT-5 β -珠蛋白重组基因组。

在这个重组基因组内, 编码SV40被膜蛋白主要组分VP1的全部序列实际上都被兔 β -珠

蛋白mRNA的cDNA所代替。 β -珠蛋白基因的启动密码子及与核糖体结合的序列代替了VP1的相应起始序列, 而 β -珠蛋白基因的终止密码子紧挨载体内VP1的终止密码子。这一巧妙的设计, 使 β -珠蛋白基因插入SV40之后, 有效地合成了较小的polyA-mRNA和起始序列。

把 β -珠蛋白基因插入SV40 DNA的前期和晚期区段的几个不同部位, 评价了 β -珠蛋白基因离mRNA 5'-端远近的相距效应, 以及邻近序列对 β -珠蛋白基因表达的调节作用。

用SVGT-5-Ra β G感染的猴肾细胞合成的mRNA杂种分子所含的 β -珠蛋白基因的两端是具有SV40晚期mRNA特点的5'-端和3'-端。被感染细胞合成的兔 β -珠蛋白多肽, 其数量约等于感染SV40时合成的VP1蛋白质数量。

SVGT-5- β 珠蛋白重组基因在猴肾CV1细胞内合成的 β -珠蛋白不够稳定; 大部分新合成的 β -珠蛋白在60分钟之内便消失了。猴肾细胞内缺少正常红细胞内通常存在的那种稳定 β -珠蛋白的稳定因子。

SVGT-5-Ra β G重组基因组还能转化小鼠细胞、大鼠细胞和人细胞等各种类型的哺乳动物细胞。

Hofstetter和Berg把含有组蛋白H2B基因的果蝇DNA片段引入SV40 DNA, 后者在猴肾细胞内转录了polyA-SV40-果蝇H2B mRNA杂种分子, 并翻译了果蝇H2B蛋白质。用此方法证实了各种类型的原核基因, 低等真核基因和哺乳动物基因在哺乳动物细胞内的转录和表达。

(梁志国供稿)