

近年来噬菌体研究及应用的几个侧面

罗 成

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

The Outline of Study and Application for Bacteriophage in Recent Years

Luo Cheng

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

关键词:

噬菌体转座子, 噬菌体载体, 噬菌体追踪, 温敏调控, 强启动子

Key Word:

transposon of phage, vector of phage, tracer of phage, regulation of temperature, strong promoter

近年来由于基因工程的兴起, 使噬菌体在分子遗传学方面得到广泛的应用。环境科学的发展使人们不仅认识到噬菌体是自然环境中一类很重要的净化因子, 而且也认识到许多噬菌体与肠道病毒在理化特性、分布等方面存在相关性, 故被用来作为指示者、追踪者, 其存在量可充当特定环境的污染指数。医学科学的发展使人们发现许多具有强烈的毒性作用的细菌毒素是由前噬菌体(prophage)DNA 编码, 而可采取新的治疗措施。由于噬菌体的应用反过来又促进了噬菌体本身的发展, 这些包括噬菌体的形态分类, 核酸序列, 溶原转换(lysogenic conversion), 成斑理论, 甲基化修饰、基因结构与调控, 复制与装配, 启动子与表达载体, 噬菌体转座子与插入突变等等。本文有望对这些进展作一扼要的评述, 以促进我国科学工作者更好地利用噬菌体有益于人类的一面。

一、噬菌体在分子遗传学中的研究和应用

1973 年以前, λ 噬菌体只能用于大肠杆菌之间的局限性转导, 然而 1973 年 Doy 等人成功地利用 λ 和 $\phi 80$ 把大肠杆菌染色体基因转入了 *Lycopersicon esculentum* 和 *Arabidopsis thaliana* 两种植物的单倍体细胞系, 他们用这两种细胞系的乳糖缺陷型, 检测并证明了转入的基因获得了表达^[1]。当时他们为区别于细菌中的转化、转导、而引入了“转入”(transgenesis)的概念。1974 年 Thomas 等人证明了 λ DNA 在一定范围丢失(低

本文于 1987 年 12 月 9 日收到

于 25% 左右)和在一定范围内外源 DNA 插入(总 DNA 不超过 λ DNA 的 108% 左右)之后, λ 噬菌体的外壳蛋白仍能进行正常包装, 并形成有活力的噬菌体颗粒^[2]。由此开始构建了大量的 λ 衍生型载体, 并不断完善^[3]。用 λ DNA 改造来的载体对重组子筛选有两种非常有效而又方便的方式。1. λ spi 筛选, 这是基于如下现象而建立的: 野生型 λ 噬菌体不能在 *E. coli*(p_2)溶原菌株中生长, 这种现象即为 λ spi (λ sensitive to p_2 interference)。这是由 λ 噬菌体 DNA 左、右两臂之间的 red, gamma 基因决定的, 然而 λ 的大多数载体都是置换型载体, 当 red, gamma 基因都被置换掉而使之由 spi⁺ 表型转变为 spi⁻ 表型, 并可在 p_2 溶原化的寄主中正常生长, 形成噬菌斑, 如 λ EMBL3, 4 和 λ 1059 就能利用这一筛选方式。2. sup⁺ 探针钓取, 先在一个 sup⁺ 质粒上克隆一段探针序列, 然后用这一探针质粒去转化另外已经收集了重组噬菌体的 sup⁻ 受体细胞, 如果有对应的序列, 就会通过同源重组实现“杂交”, 并由此使带有琥珀突变的噬菌体载体 DNA 得以校正, 使之产生噬菌斑, 所以形成空斑区域的噬菌体就是所要钓取的重组子。此法可省去使用同位素, 凡带有琥珀突变的载体, 如 λ charon 4A, λ EMBL3 等都能利用此法筛选^[3]。

在大量改造各种载体中, 人们发现 λ 左右启动子 λP_L 和 λP_R 比其它启动子起动力强, 而 λP_L 又比 λP_R 强, 所以现在普遍使用这两个启动子来构建表达型载体, 而且 λP_L 和 λP_R 可同一方向起动力, 因此可串联起来以更加强起动力^[4]。这类表达载体有一个最为显著的特点, 就是易于表达的控制, 即 30°C 以下, 它不表达, 因为这时由 cIts857 提供的阻遏物能正常阻遏 P_L 或 P_R 的起动力, 然而如果提高到 30°C—42°C, 启动子逐步开启, 当高到 42°C 时, 启动子开启到最大, 即可带动后面的结构基因进行最高表达。如果象 PUC18 那样, 在这类表达载体中也引入 LacZ 基因, 用 Xgal 来指示, 在 28°C 呈白斑, 同克隆了的重组子一样, 但在 32°C 就会呈浅蓝色斑, 37°C 呈蓝斑^[5], 所以这类表达载体很好检测和控制。 λP_L 比一般启动子要强, 是因为在 λ 噬菌体基因组中的左半臂是编码包括头部和尾部蛋白的所有结构基因, 在只有几十分钟的隐蔽期 (eclipse phase) 内要合成 150 个左右的噬菌体颗粒的外壳蛋白, 这种需求使得 λP_L 必须高效。这同杆状病毒中的强启动子的需求相似, 因为大量的多角体蛋白都是这一启动子所操纵的 800bp 左右的多角体蛋白基因的产物。考察它们的结构都富含 AT 序列, 故容易解链, 同时它们的空间结构也非常有利于 DNA 聚合酶的结合或复盖^[6,7]。目前杆状病毒基因工程在很大程度上是基于这点发展起来的。大肠杆菌 T₄ 噬菌体中的两个启动子也开始应用于表达载体的构建, 但 T₄ 的两个启动子的起动力方向则刚好相反^[8]。在 T₄ 噬菌体中也存在强启动子^[9], 可见噬菌体 DNA 中的启动子将会在基因工程中得到更多的应用。

丝状噬菌体中的 M13 单链克隆载体早已被用来克隆需进行序列分析的 DNA, 以获得大量的单链 DNA 用于双脱氧法测序。然而丝状噬菌体也可参与某些穿梭载体的改造, 使之能在转入酵母等细胞之前, 先在大肠杆菌中克隆。如果对克隆片段需进行测序或定向诱变, 此时可用某些助手噬菌体去感染细胞, 由于这种穿梭载体中有丝状噬菌体的 ori 位点, 一旦助手噬菌体在细胞内合成了全部外壳蛋白, 由于 ori 的识别作用又能包裹穿梭载体的 ssDNA, 形成噬菌体, 如 pVT-L 本身为 7kb, 能克隆 3kb 的外源

DNA^[10]。从这些噬菌体中抽提出 ssDNA, 然后用克隆酶游离出克隆片段进行测序。还由于 M13 已被发展起来用于蛋白质工程中的点定向诱变, 尽管 M13 是单链, 但在复制中也为双链形式。所以如果引入一个按设计要求的单链 DNA 序列, 就能通过双链复制形式插入, 使子代有一半按照这种引入的序列而改变成新的子代^[11]。通过测序结果和表达结果的比较可知克隆位置是否在阅读框架内, 如果不在或偏离都需进行亚克隆, 定位后再向酵母细胞中克隆, 并进行表达。可见这种载体把克隆、穿梭、测序、诱变、表达联系起来, 极大地方便了使用。

我们知道要使一个结构基因能有效表达, 必须使转录和翻译起始点紧位于起始密码子之后。但要获得一个与原来完全相同的蛋白质, 则也要考虑转录的终止位置。用 fd 噬菌体提供的转录终止子则非常有效, 它不仅可在转录水平来提供终止信号, 也可在翻译水平上提供琥珀突变 (amber mutation) 使多肽翻译终止。如 pJLA501 表达型载体的多酶位点聚合集头 (polylinker) 位于串联的 λP_L , λP_R 与 fd 转录终止子之间^[12]。

ssDNA 噬菌体中大多数都是正链、而可充当 mRNA 形式, 由于 mRNA 是 DNA 流向蛋白质的中间形式, 因此用它来作为研究材料可做如下几个方面工作: 1. 筛选抑制依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶, 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶的药物, 进而可筛选出抗癌药物。2. 可用于研究寄主细胞内的修复系统。3. 由于在短时间内可获大量 RNA 拷贝, 可用于 RNA 一级、二级三级结构的研究, 从而为植物病毒 RNA 的研究提供模式。又如用 Q β 噬菌体来研究大肠杆菌光修复系统, 首先发现当用紫外线仅照射噬菌体, 以后成斑率便下降, 表明紫外线能有效地杀伤噬菌体。但用低剂量紫外线处理 Q β 并感染细胞, 随后用白光处理, 成斑率会有一定的恢复。如果 Q β 感染寄主 7 分钟后加利福霉素, 噬菌体生长正常, 但却抑制了由寄主菌胞提供的修复系统, 因为如果再用紫外线处理过的 Q β 去感染这种细胞, 成斑率不会上升。表明光修复系统在应激条件下产生^[13]。

近年来分子杂交中的探针越来越多地用 RNA 来代替 DNA; 因为在真核和病毒的基因组中都存在内含子, 而这些内含子并不投影到氨基酸序列上来, 故对这些内含子的序列了解较难, 如果某些高度保守序列也存在于这些内含子中, 就有可能导致杂交中获得不真实的正结果。此外制备 RNA 特征序列比较容易。因为大多数蛋白产物在某一阶段的某一特化细胞中很易分离到这样 mRNA。可以预料如果大量地使用 RNA 作为探针, 有关 RNA 噬菌体的研究会更加深入。

虽然 Mu 噬菌体是 1959 年发现的, 然而是在近年内才得到较大发展。Mu 是一种温和性噬菌体, 但在整个溶原周期与 λ 有许多差异, 首先它可转座, 整合到染色体 DNA 上时也是随机的, 在染色体 RNA 上能形成一种 G 环结构^[14]。由于它的转座特性, 与广泛性转移质粒 RP4 连接起来便可作为普通的转座子使用, 由于 MuDNA 的长度比其它类型的转座子都要长, 因此它的插入失活作用, 极性作用来得都更猛。D108 是与 Mu 相似的一种噬菌体, 其基因组的同源性也很高, 但二者有异源免疫作用 (heteroimmune), 即不能发生超感染现象^[15]。建立一个只包含有 D108 左末端 1.7kb 和右末端 8kb 去除中间区域的微小片段, 相当于一个质粒, 然而在有诱导后的助手噬菌体 (如 Mu) 存在时, 它仍能进行转座, 比如检测到能转座到 F 因子上^[16]。D108cts 在溶原周期中的

转座及诱变频率低,但在诱导进入营养周期后的转座及诱变频率在 1.06×10^{-2} 至 1.9×10^{-2} ^[17]。

有关寄主、噬菌体与空斑的关系,近年来分析了核糖体对成斑率的影响^[18],基因文库中 *chi* 序列对成斑的影响^[19],同一细胞容量所主导的生物合成总量趋于相等的制约^[20],使得对噬菌斑的认识更加深了一步。

二、噬菌体在环境科学中的研究和应用

环境中致癌因子或其它诱变剂的筛选,过去主要是利用 Ames 测试法。由于用 Ames 测试法是检查待检物质诱导回复突变的能力,比如缺组氨酸的合成培养基里,加入所要测试的物质倒成平板,然后接种上标准的 His⁻菌株,如果发现平板上有菌落生长,表明这种物质有诱变能力,而且回复突变率越高,则这种物质的诱变能力越强。然而 Devoret 建立了一种用溶原菌来替代突变株进行诱变物质的分析^[21]。我们知道溶原菌中的前噬菌体进入营养周期的自然频率很低, λ 为 10^{-6} — 10^{-8} , μ 为 10^{-5} — 10^{-6} 。尽管这种突变随时都可发生,然而在培养后期由于周围细胞停止代谢,就是有噬菌体产生也无法形成肉眼可见的噬斑。这里应指出温和性噬菌体只能形成混浊斑(turbid plaque),这一方面是由于噬菌体感染细胞后仍有两种机率,或进入溶原周期,或进入营养周期,另一方面虽然噬菌体能感染同型噬菌体溶原细胞,但不能进行复制,而通常的指示菌并非为百分之百的非溶原菌,这样就形成了不十分规则的混浊斑。如果除去了整合所需要的区域,如 λ charon 4A,就不存在这种情况,实际上它已经成了一种烈性噬菌体。所谓 Devoret 测试就是用溶原菌与非溶原菌以 $1:10^8$ 的比例混合,涂布于含有诱变物质的普通培养上,如果有诱变物质的存在,就能形成噬菌斑,同样根据诱发频率可判断这种物质诱变能力的强弱,此法不需要配制合成培养基,而且比 Ames 测试法更为灵敏。现在这种方法在美国已普遍地用来测定工业中的化学药品和食物添加剂,看它们是否有诱变和致癌作用。

近年来由于城市人口剧增,工业化生产规模越来越大,使得污染加剧,环境富营养化,使得有益人类生存的生物量减少,而可致病的有害生物量增加。为了解决污染源的迁移及其贮量变化,有人用噬菌体来作为追踪者(tracer)^[22],这是由于大多数噬菌体无脂质外套,而且蛋白质外壳包裹所形成的颗粒具有优化的力学结构,因此在环境中的耐性比寄主要强得多,通常在污染源投放已知的噬菌体,每间隔一定时间在周围定点取样分析,可获得污染源分散方向,污染源毒性程度,自然净化程度,移动速率等参考数值。由于向环境投放噬菌体无任何坏处,因此是一种很好的生物追踪物,可用于多种需求的投标。

过去环境病毒污染指标是检测脊髓灰质炎病毒,然而检测脊髓灰质炎病毒需要细胞培养,故难以普及,此外由于这种病毒能引起小儿麻痹症,因此操作起来非常危险。为了安全和“微生物化”,利用许多噬菌体与肠道病毒等的理化特性、耐性、分布有极好的平行关系,而改用噬菌体来作替代检查,有的噬菌体还具体地反映出某一种病毒的存在情况。尤其令人注目的是那些雄性专一感染的噬菌体,因为自然环境里的水温一般都

不超过 30℃, 而在 30℃ 以下 *E. coli* F⁺ 不能合成其纤毛, 所以一般情况下如果从环境中分离到这类小颗粒的单链核酸噬菌体, 就可判断有生活源废水的污染, 为了避免用电镜观察, 制备这类噬菌体的单克隆抗体, 用 ELISA 分析方法就可定性定量地测定。有人也用肠道噬菌体的值来反映肠道细菌的量, 并认为此法比直接测定肠道细菌更准确, 更节省时间^[23]。

由于人们在分离动植物病毒时, 经常发现噬菌体的踪迹, 有时甚至在植物细胞内也会发现。这是由于噬菌体通过根部伤口进入, 然后再通过蒸腾作用进入植物的各部。由于人们早已发现人体病毒、动物病毒也存在于植物组织内, 给蔬菜等农作物带来一大卫生公害。所以现在广泛地用噬菌体来作替代研究, 以寻找阻断途径^[24]。

在浓缩、纯化、分析噬菌体方法上也有许多进展。Logan 等人设计了一种便携式仪器, 一次可浓缩 500 升水样, 这样可方便地分析噬菌体浓度, 然后再按浓缩倍数求出环境的真实值^[25]。此外也引入了气相色谱分析^[26], 完善了 PEG + NaCl 浓缩法, 建立了蔗糖梯度离心法, 两种无拮抗作用的寄主混合滴定法等等。

三、噬菌体在工、农、医中的研究和应用

噬菌体在发酵工业中是一大危害, 现在已基本认定造成噬菌体污染主要是以下两个原因: 1. 生产菌株为溶原菌; 2. 外界污染。如果为溶原株, 尽管自发转换频率很低, 但在发酵中, 尤其是发酵后期, 会产生很多对蛋白质有强烈作用的小分子物质, 一旦解除了负控蛋白的抑制作用, 便可使溶原菌迅速释放大量噬菌体。关于防止噬菌体污染有如下主要途径: 1. 经常变换生产菌; 2. 筛选抗株; 3. 选用专门抑制噬菌体的药物; 4. 使用固定化细胞; 5. 如有条件尽可能使用混合菌株发酵。对于途径 1 和 2 我国工厂是经常采用, 对于途径 3, 过去有人在北京棒状杆菌发酵味精时就采用加 CuSO₄ 的方法, 最近有人使用六偏磷酸钠于卡那霉素发酵中也收到良好的效果^[27]。

农业上过去主要用噬菌体于种子检疫, 菌源病测报, 细菌分类等, 然而要推广还是比较困难的。1983 年有报道用于防冰冻。因为细菌很容易成为结冰种子 (即冰核细菌), 如果在越冬前用噬菌体制剂处理越冬作物, 能使之在很大程度上得以保护。有关方面认为使用此法能使美国南方作物北移 100—150 公里^[28]。如果我们结合其它防护措施进行综合治理就有可能使我国柑桔等再向北移一段, 也可能使北方有更多的蔬菜在冬季越冬。

医学上愈来愈多地认识到许多对人体有强烈毒性作用的细菌毒素是由于溶原菌存在的结果, 如认识最早的是白喉毒素^[29]。现在已经发现与溶原菌中前噬菌体有关的毒素有肉毒杆菌的 C₁ 毒素和 D 毒素^[30], A 型溶血链球菌的红毒素 (引起猩红热), 葡萄球菌的纤维蛋白溶解酶和肠毒素, 酿脓链球菌的红斑毒素, 大肠杆菌中的拟志贺氏毒素等等。过去通常认为如果溶原菌产生毒素, 非溶原菌不产毒素, 就认为该毒素由噬菌体基因组编码。用分子生物学方法研究表明有如下几种情况: 1. 毒素基因和调控序列都由前噬菌体 DNA 编码; 2. 毒素基因由前噬菌体 DNA 编码, 调控序列在染色体 DNA 上; 3. 毒素基因位于染色体上, 而调控序列在前噬菌体 DNA 上^[31]; 4. 某些温和性噬菌体

有多个整合位点, 由于突变的作用而产生新的潜在的毒素。

由于温和噬菌体的感染而能产生毒素或其他性状改变的过程称为溶原转换。除此之外, 许多毒素是由质粒编码, 这两者的特点都是不象染色体遗传那样稳定。因为这些表型并不是这些细菌生长所必须的。由于这种可消除的特点, 可望用消除法作为一种治疗途径, 而且质粒和溶原菌的消除试剂基本上可相互使用, 因为都是作用于蛋白或DNA。但在体内使用也是很难的, 因为消除剂也是诱变剂。然而如果用消除了的前噬菌体的病原菌来制备疫苗可能是一条可行的途径。

以上分析和讨论了近年来噬菌体在应用上取得的显著进展的最主要方面。但应该看到, 尽管噬菌体的遗传背景比较清晰, 但就总体而言, 我们现在对它的了解还是很微小的。不过应当看到无论从它在自然界中的位置和作用, 还是对它的开发和利用都是很有价值进行深入研究的。

参 考 文 献

- [1] Doy C.H, et al., 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 : 723
- [2] Thomas M, et al., 1974, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 : 4579
- [3] 罗成, 1985, 国外医学分子生物学 7 : 167
- [4] Schauder B, et al., 1987, *Gene* 52 : 279
- [5] Windle B.E., 1986, *Gene* 45 : 95
- [6] Freifelder D., 1983, In *Molecular Biology*, Science Books International Inc., Boston, USA
- [7] Corden J, et al., 1980, *Science* 209 : 1406
- [8] 美国环境保护署黄远生博士来汉讲学, 1987
- [9] 李季锡、李育阳, 1987, *遗传学报*, 14(6) : 468—474
- [10] Vernet J, et al., 1987 *Gene* 52 : 225
- [11] 罗成等, 1981, *生物学杂志* 5 : 10
- [12] McCarthy J.G, et al., 1985, *EMBO J.* 4 : 519
- [13] Wu B.H, and Liu Z.Y., 1987 第七届国际病毒学术讨论会论文摘要
- [14] 罗成, 1988, *微生物学杂志* Vol. 8, No. 2
- [15] Hull R.C, et al., 1978, *J. Virology* 27 : 513
- [16] Szatmari G. B, et al., 1986, *Gene* 41 : 316
- [17] Chaconas G et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 50 : 343
- [18] 陈齿爱等, 1986, *科学通报*, 31 : 544
- [19] Maniatis T, et al., 1982, *Molecular Cloning*, CSH p24
- [20] 罗成等, 1987, *病毒学报* 3 : 361
- [21] Devoret R., 1979, *Science American*, August, p40
- [22] Seely N.D, et al., 1982, *J. of Applied Bacteriology* 52 : 1
- [23] Wentzel R.S, et al., 1982, *Applied Environmental Microbiology* 43 : 430
- [24] Ward R.L, et al., 1982, *ibid.* 43 : 1098
- [25] Logan K.B, et al., 1981, *J. of Virological Methods* 3 : 241
- [26] Hirsh D.C, et al., 1983, *Applied Environmental Microbiology* 45 : 260
- [27] 崔汉钧, 1987, *病毒学杂志*, 2 : 24
- [28] 余茂效, 1981, *病毒与农业*, 田波等编, 科学出版社, p281
- [29] Barksdale L, et al., 1967, *J. of Bacteriology* 81 : 527
- [30] Inoue K, et al., 1970, *J. of Microbiology* 14 : 87
- [31] Betley M.J, et al., 1985, *Science* 229 : 185