

二环素对大肠杆菌蛋白质合成的选择性作用

郭 勇 永井和夫* 田村学造*

(华南工学院, 广州)

二环素(以下简称 BCM)抑制大肠杆菌 15THU 和 K12 JE1011 的生长, 而且有杀菌作用。当氯霉素(以下简称 CAP)加到经 BCM 处理的细胞培养液中时, BCM 的杀菌作用消失, 仅出现 CAP 单独处理时那样的静菌作用。由于培养液中缺乏磷酸而诱导合成的碱性磷酸酶(以下简称磷酸酶)以及在同一培养液中加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 而诱导合成的 β -半乳糖苷酶(以下简称 β -酶)均明显地受到 BCM 的阻遏作用。

用经 BCM 处理的大肠杆菌 15THU 细胞抽出物进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可以看到分子量分别为 50.5K、47K、35K、33K、21K 和 17.5K。蛋白质含量与不经 BCM 处理者有所不同。再用二元凝胶电泳进行分离, 在经 BCM 处理过的细胞蛋白质样品中发现分子量相当于 47K、21K 和 17.5K 的三个蛋白质新斑点, 同时 50.5K 蛋白质的含量显著地减少。对大肠杆菌 K12 JE1011 的试验, 可以看到相同的结果。将细胞抽出物进行分离, 发现 47K 蛋白质存在于细胞膜中, 其中大部分在外膜之中, 21K 和 17.5K 蛋白质在细胞质中, 50.5K 蛋白质在细胞膜及细胞质中均存在。

将上述凝胶进行蛋白质染色, 用经放射性氨基酸标记的细胞进行荧光显影, 以及将预先标记的细胞洗净后再经 BCM 处理等三种方法进行试验, 可以确证上述各新斑点蛋白质不是 50.5K 蛋白质的分解产物, 也不是其它既有蛋白质的分解产物。将经 BCM 处理的细胞洗涤以除去 BCM, 或者在 BCM 处理后再加入 CAP 以阻止 BCM 的杀菌作用, 此时, 细胞中新斑点蛋白质的含量逐渐减少, 然而 50.5K 蛋白质没有任何增加, 这表明, 新斑点蛋白质不是 50.5K 蛋白质的前体。

抗 400 $\mu\text{g/ml}$ BCM 的变异菌株 G1 经 BCM 处理后, 蛋白质斑点没有变化。另一株 BCM 耐性株 G6 经 BCM 处理后, 仅出现 21K 和 17.5K 蛋白质的新斑点。

以上结果表明, BCM 抑制大肠杆菌中 50.5K 蛋白质的生物合成, 同时诱导 47K、21K 和 17.5K 三种蛋白质的产生, 这三种蛋白质既不是 50.5K 蛋白质的前体也不是它的分解产物。可以认为, 47K 蛋白质异常地插入细胞外膜之中是 BCM 杀菌作用的主要原因。

BCM 是具有独特结构^[1,2]的抗革兰氏阴性菌^[3-5]的肽环类抗生素。

已知 BCM 抑制细胞中蛋白质和 RNA 的生物合成, 但在破碎细胞中不起抑制作用^[6]。已发现 BCM 与内膜蛋白结合^[7,8], 导致细胞变成纤毛状并产生多核细胞^[6,9], 阻止脂蛋白结合到肽多糖的生物合成^[6]。

本文报道了 BCM 对大肠杆菌细胞中蛋白质合成的独特的抑制与诱导作用。

材料和方法

(一) 菌株和培养基

1. 菌种: 大肠杆菌 15THU (胸腺嘧啶、组氨酸和尿嘧啶缺陷型) 和大肠杆菌 K12 JE1011。

2. 基本培养基: 增强的 M₉ 培养基, 其组成如

本文于 1981 年 1 月 12 日收到。

* 日本东京大学。

本文采用以下缩写: 间-硝基苯- β -D-半乳糖苷: ONPG; 对硝基苯磷酸: NPP

下(%) : Na_2HPO_4 0.6, KH_2PO_4 0.3, NaCl 0.05, NH_4Cl 0.1, 葡萄糖 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mM, CaCl_2 0.1mM, 酪蛋白水解物 0.1, 色氨酸 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 组氨酸 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 胸腺嘧啶 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 尿嘧啶 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3. Tris 培养基: 组成如下(%) : Tris-HCl (pH 7.4) 0.1 M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, NaCl 0.5, CaCl_2 0.1 mM, MgCl_2 1mM, 葡萄糖 0.4, 酪蛋白水解物(不含维生素) 0.1, 组氨酸 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 色氨酸 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 胸腺嘧啶 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 尿嘧啶 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

4. NBTU 培养基: 在营养肉汤中加进 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胸腺嘧啶和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的尿嘧啶。

5. NBTU 琼脂平板培养基: 在 NBTU 培养基中加进 1.2% 的琼脂制成。

(二) 活细胞计数

将 5% 培养过夜的细菌液接种于新鲜的培养基中。当达到对数生长期时 (A_{550} 约 0.4), 分装于四支 L-型试管中, 每管含 5 ml 培养液, 和不同含量的 BCM 或者 CAP。培养 30 分钟后, 加入其它试剂。每隔 30 分钟, 取出 50 μl 培养液, 用 0.9% 的生理盐水稀释后, 涂布在 NBTU 琼脂平板培养基上。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 小时, 计算平板上的菌落数。

(三) 碱性磷酸酶的“解除阻遏”合成和 β -半乳糖苷酶的诱导合成

将 5% 培养过夜的细菌液接种于 Tris 培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养。当 A_{550} 达到 0.3 左右时培养液中的磷酸大部分已用完, 此时加入 1mM 的 IPTG 作为 β -酶的诱导物。在预定的时间, 取出适量的细胞悬浮液并加一滴甲苯。甲苯处理的细胞悬浮液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 30 分钟, 混匀后保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中, 以备酶活力测定。

磷酸酶的测定^[10]: 取 200 μl 上述甲苯处理的细胞悬浮液, 用 300ml 0.1 M Tris 缓冲液 (pH 7.4) 稀释, 再加入 1ml 1M Tris 缓冲液 (pH 8.8)。混合液置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 分钟, 然后加入 0.5ml 的 0.4 M NPP 作为底物, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 分钟。分别测定反应前后 420nm 波长下的光吸收率。

β -酶的测定: 取 100 μl 上述甲苯处理的细胞悬浮液, 加进 0.9ml Z 缓冲液, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 分钟, 然后加入 0.2 ml ONPG 溶液 (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ONPG 溶于 0.1M 磷酸缓冲液中, pH 7.0) 作为底物, 反

应 15 分钟。分别测定反应前后的 A_{420} 。

Z 缓冲液的组成: 4.3g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.25g NaH_2PO_4 , 0.15g KCl , 0.04g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于蒸馏水中, 总体积 200 ml^[11]。

在 420nm 波长下, 光吸收率每变化 0.001 定义为酶的一个活力单位。即:

$$\text{酶活力(单位)} = \Delta A_{420} \times 1000。$$

(四) 溶胞液的制备

细胞培养到对数生长期时, 加入 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BCM。继续培养 60 分钟, 然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 用 8,000 rpm 离心 5 分钟, 以收集细胞。再把细胞悬浮于 0.3 ml 的超声波破碎用缓冲液中 (0.01 M Tris-HCl, pH 7.4 加进 5mM 氯化镁和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 核糖核酸酶), 并加入 1mM 的苯甲磺酰氟。采用大岳超声波细胞破碎机在冰浴中破碎细胞。然后在 4 $^{\circ}\text{C}$, 8,000 rpm 条件下离心 5 分钟, 以除去未破碎的细胞。取出 100 μl 溶胞液并加入 100 μl 溶胞缓冲液 (溶胞缓冲液组成: 9.5M 尿素, 10% (W/V) 胍核 X-100, 1.6% pH 5—7 的 Ampholine, 0.4% pH 3—10 的 Ampholine, 5% β -巯基乙醇)。余下的溶胞液在 4 $^{\circ}\text{C}$, 55,000 rpm 超速离心 45 分钟, 分成细胞质和细胞膜两部分。上清液(细胞质)部分加入相同体积的溶胞缓冲液, 于沉淀(细胞膜)部分加入 200 μl 的溶胞缓冲液。至于细胞内膜和外膜的分离, 是将细胞膜部分加进 200 μl 的 Sarkosyl, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 20 分钟, 然后用 55,000 rpm 超速离心 45 分钟, 此后将细胞膜部分和细胞内膜部分在 4 $^{\circ}\text{C}$ 对透析缓冲液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 加进 5mM MgCl_2) 透析 2 小时。

(五) 放射性亮氨酸掺入到蛋白质中

将 5% 培养过夜的细菌液接种到新鲜的培养基中, 当 A_{550} 达到 0.3 左右时, 加进 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BCM, 培养 30 分钟后, 将 1.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 的 L-[4,5- ^3H]-亮氨酸加到培养液中, 继续培养 30 分钟。对照用的培养液在相同时间内加进 ^3H -亮氨酸。然后收集细胞, 用冰冷的新鲜培养基洗涤一次, 再悬浮在分别含有或不含有 CAP 和 BCM 的新鲜培养基中, 继续培养 30 分钟, 培养前后均收集细胞进行分析。

(六) 放射性亮氨酸预先标记的细胞制备

将 5% 培养过夜的细菌液接种于新鲜的培养基中并加进 2.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 的 ^3H -亮氨酸。在 37 $^{\circ}\text{C}$

振荡培养,直到 A_{550} 达到 0.4 左右,用离心分离法收集细胞并用新鲜培养基洗涤二次。细胞再悬浮于含有或不含有 50 $\mu\text{g/ml}$ BCM 的新鲜培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 60 分钟。

(七) SDS 凝胶电泳及蛋白质分子量的测定

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶的制备是依据 Laemli 和 Farre^[12] 的方法。将 30% 的丙烯酰胺溶液、L-溶液、10% 过硫酸铵和四甲基乙二胺 (TEMED) 混合液倒进二块玻璃板之间,以作成 12% 的分离胶,并用水层覆盖。聚合后,除去上层的水,再倒进 5% 的浓缩胶。浓缩胶由 30% 丙烯酰胺、M 缓冲液*、10% 过硫酸铵和 TEMED 混合而成。让其聚合 30 分钟。然后样品和标准蛋白质(标准蛋白质由牛血清蛋白,分子量 66 K;蛋清蛋白,分子量 45 K;胰蛋白酶原,分子量 25 K 和溶菌酶,分子量 14.3K 组成)加到凝胶上。开始用 20 mA,然后用 30 mA 的电流进行电泳,直到指示剂到达底部边缘为止。取出凝胶后,按照 Fairbanks 等人的方法^[13]对凝胶进行染色和脱色。

(八) 蛋白质的二元凝胶电泳

细胞蛋白质的分离方法根据 O'Farrell 的方法^[14]略加改变。第一元电泳用的等电点聚焦凝胶在小玻璃管(内径 2.5 mm,长 130mm)中制成:4.6 g 尿素加进有边嘴的抽滤瓶中,再加进 1.97 ml 水,2 ml 氟核 X-100,1.33 ml 丙烯酰胺溶液,0.5 ml 的 Ampholine 和 10 μl 10% 的过硫酸铵溶液,然后在真空下排气,再加入 7 μl TEMED 后立即分注到小玻璃管中,加一些水覆盖并让其静置聚合 4 小时。然后除去水层,装到电泳槽中。在上层用 20 μl 溶胞缓冲液覆盖,再用除气后的 0.02 M 的 NaOH 充满玻璃管。上槽用除气后的 0.02 M NaOH,下槽用磷酸作为电泳溶液。然后根据下述程序进行预先电泳:200V15 分钟,300V30 分钟,400 V 30 分钟。然后除去管内的溶胞缓冲液和 NaOH,加进样品,在 400 V 电泳 12 小时左右,再用 800V 电压,电泳一小时。凝胶从小玻璃管取出后,放进 SDS 样品缓冲液(样品缓冲液的组成是:10% (W/V) 甘油,5% (V/V) β -巯基乙醇,2.3% (W/V) SDS 和 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8)中,平衡 30 分钟以上。第二元电泳用的 SDS 凝胶如前述方法配备。然后融化的琼脂溶液放在 SDS 凝胶上面,再将等电点聚焦凝胶放进琼脂溶液中。如

前述方法进行第二元电泳。

(九) 凝胶的放射荧光显影

经放射性亮氨酸标记的细胞制备的样品,在电泳以后,凝胶根据 Bonner 和 Laskey^[15]描述的方法进行处理。将凝胶放进 20 倍体积的二甲基亚砜 ((CH_3)₂SO) 中浸 30 分钟,再在新鲜的二甲基亚砜中浸 30 分钟,然后在 4 倍体积的 20% (W/W) PPO 二甲基亚砜溶液中浸 3 小时,再浸漂在水中。凝胶干后,将凝胶与 X-线菲林(原子核乳胶片)一起固定在显影盒中,在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 的低温条件下进行放射荧光显影。

(十) 抗 BCM 菌株的选育

当生长在 NBTU 培养基上的细胞达到对数生长期时,用膜过滤器($\phi 0.45\mu$)过滤。细胞用冷的 M₂ 盐水洗涤二次。将细胞悬浮于 M₂ 盐水中,用 100 $\mu\text{g/ml}$ 的亚硝基胍于 30 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 分钟。然后用膜过滤器过滤,收集细胞,并用 M₂ 盐水洗涤二次,再将细胞悬浮于 NBTU 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养。当 A_{550} 增加到开始培养时的二倍时,取出适量培养液涂布在含有 400 $\mu\text{g/ml}$ BCM 的 NBTU 琼脂平板培养基上。对于自然变异株的选育,是将对数生长期的细胞直接涂布在含 BCM 的 NBTU 琼脂平板培养基上。然后,将琼脂平板培养基置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 小时。

结 果

(一) BCM 和 CAP 对大肠杆菌菌落形成能力的影响

活细胞计数的试验表明,对照试验从原来的 3×10^8 菌落/ml,经 90 分钟培养后,增加到 2.6×10^9 菌落/ml,经 50 $\mu\text{g/ml}$ BCM 处理 90 分钟后,菌落数减少了 99.5%。而经 10 $\mu\text{g/ml}$ CAP 处理后,菌落数只有很小的变化。当 CAP 加到经 BCM 处理 30 分钟后的培养液中,或者 BCM 加到经 CAP 处理 30 分钟后的培养液中时,可以看到,活细胞计数与单独用 CAP 处理者相似,而不呈现出 BCM 的杀菌作用。(见图 1)

* M 缓冲液的组成: 1.5 M pH6.8 Tris-HCl, 加入 0.4% SDS。

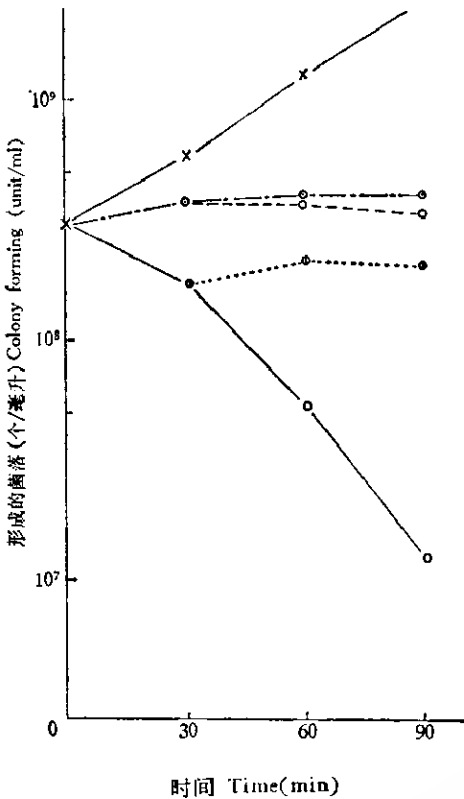


图1 BCM 和 CAP 对大肠杆菌 15 THU 菌落生成的影响

Fig 1 Effect of BCM and CAP on colony forming ability of *E. coli* 15 THU

- ×-×: 对照 Control
- : 在 0 时加入 10 μg/ml CAP, At 0 min 10 μg/ml CAP added
- : 在 0 时加入 50 μg/ml BCM At 0 min 50 μg/ml BCM added
- ...○: 在 0 时加入 10 μg/ml 的 CAP, 培养 30 分钟后再加进 50 μg/ml 的 BCM At 0 min 10 μg/ml CAP added, 50 μg/ml BCM added after culturing 30 min
- : 在 0 时加进 50 μg/ml 的 BCM, 培养 30 分钟后再加入 10 μg/ml 的 CAP At 0 min 50 μg/ml BCM added, 10 μg/ml CAP added after culturing 30 min

(二) BCM、CAP 和普鲁卡因对碱性磷酸酶“解除阻遏”合成和 β-半乳糖苷酶诱导合成的影响

如图 2 所示, 当培养液的 A_{550} 达到 0.3 左右时, 培养基中原有的磷酸已经用完, 此时磷酸酶的“解除阻遏”合成开始。在其后

120 分钟内酶活力从 195 单位增加到 1567 单位。而在 2 μg/ml CAP 或 12.5 μg/ml、25 μg/ml、50 μg/ml 的 BCM 存在下, 该酶的合成分别被阻遏到 937、1267、1072 和 936 单位。当 IPTG 加到同一培养液时, 在 120 分钟内诱导生成了 936 单位的 β-酶, 而在 2 μg/ml 的 CAP 或 12.5 μg/ml、25 μg/ml、50 μg/ml 的 BCM 存在下, 该酶的合成在相同的时间内分别被阻遏到 540、532、353 和 281 单位。将 BCM 加到这两种酶的反应液中时, 看到 BCM 对这两种酶的活性都没有抑制作用。普鲁卡因对磷酸酶合成的阻遏作用比对 β-酶的作用强得多。这与 Tribhwan 和 Pradhar 所报道的相同。

(三) 蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

经 BCM 处理及未经 BCM 处理的细胞蛋白质通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行试验。结果如图版 I-1, 2 所示, 二种细胞蛋白质的电泳带有所不同。经 BCM 处理的细胞中, 细胞膜部分的 50.5 K 蛋白质比未经处理者少, 47 K 蛋白质的含量比未经处理者较高, 在细胞质部分的 21 K 和 17.5 K 蛋白质也比未经处理者多。同时还可以看到 35 K 及 33 K 蛋白质的含量有所不同。使用放射荧光显影的方法, 蛋白质电泳带的不同就更为明显。在经 BCM 处理的样品的电泳凝胶的起点上看不到的, 而在对照试样中看到的膜蛋白电泳带, 可能是结合型脂蛋白, 已有人报道过, BCM 抑制脂蛋白结合到肽多糖的生物合成^[16]。

(四) 蛋白质的二元凝胶电泳

大肠杆菌 15 THU 细胞蛋白质的二元凝胶电泳表明, 经 BCM 处理的细胞的溶胞液中有三种新的蛋白质, 它们的分子量分别为 47 K、21 K 和 17.5 K, 同时 50.5 K 蛋白质的含量显得比未经处理者少。(图版 I-3-6)。用大肠杆菌 K12JE 1011 进行试

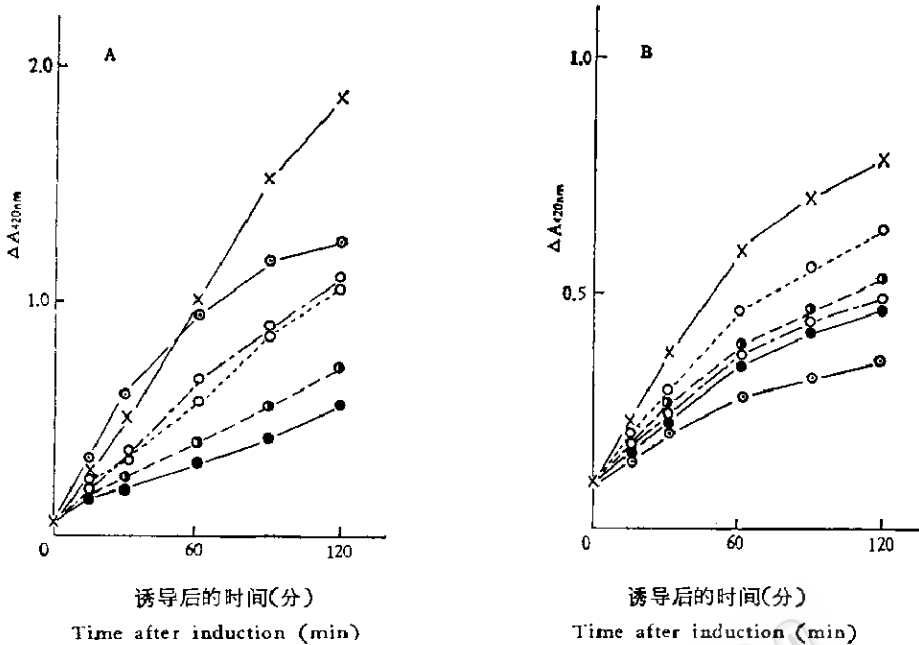


图 2 BCM、CAP 和普鲁卡因对 β -酶(A)和磷酸酶(B)诱导合成的影响
 Fig 2 Effect of BCM, CAP and procaine on induced synthesis of β -galactosidase (A) and alkaline phosphatase (B)

- X-X: 对照 control
- : 12.5 μ g/ml 四环素 12.5 μ g/ml BCM
- : 50 μ g/ml 四环素 50 μ g/ml BCM
- : 2 μ g/ml 氯霉素 2 μ g/ml CAP
- : 0.55% 普鲁卡因 0.55% procaine

验可以看到相似的结果。用从大肠杆菌 15 THU 诱变得到的抗 400 μ g/ml BCM 的变异株 G1 进行试验, 蛋白质斑点没有不同。用大肠杆菌 15 THU 的自然变异株(抗 400 μ g/ml BCM)G6 试验, 电泳凝胶上仅出现 21K 和 17.5K 二种新蛋白的斑点。将胞液进行分离后, 看到 47K 蛋白质存在于细胞膜中, 21K 和 17.5 K 蛋白质在细胞质中, 50.5 K 蛋白质在细胞膜和细胞质两者之中(图版 II-1-4)。大部分的 47K 蛋白质存在于细胞膜蛋白的抗 Sarkosyl 部分, 即是在外膜上^[16]。

(五) 凝胶的放射荧光显影

从图版 II-5-8 可以看到, 当放射性亮氨酸结合到蛋白质, 进行放射荧光显影时, 在 BCM 存在下新蛋白质的产生和 50.5 K 蛋白质生物合成的阻抑作用就更为明显。

经放射性亮氨酸预先标记的细胞溶胞液, 在二元凝胶电泳后, 进行放射荧光显影, 可以看出新蛋白质斑点没有放射性, 同时 50.5K 蛋白质的放射性也没有减少。经 BCM 处理后, 把 BCM 从培养液中除去或加入 CAP 时, 新蛋白质的含量减少, BCM 的存在也不能抑制新蛋白质的分解, 在此期间, 50.5 K 蛋白质的含量也没有增加。

讨 论

关于 BCM 对大肠杆菌蛋白质合成的不同作用, 田中等人首先报道过, BCM 对膜蛋白的作用比对细胞质蛋白的作用显著得多^[6]。申等人比较了 BCM 与 CAP 的作用, 他们看到 BCM 只是稍微地抑制 β -酶(一种细胞质蛋白质)的合成, 而更显著地抑制 λ -噬菌体接受蛋白(一种外膜蛋白质^[18])的合成^[17]。在本研究中磷酸酶(一种细胞质

周围蛋白质^[19]) 和 β -酶的诱导合成是在同一培养液中进行, 分别地加进 BCM 和 CAP。我们发现, BCM 明显地阻遏这两种酶的合成, 而且 BCM 的作用比 CAP 的作用更为显著。本试验与前述实验中 BCM 对 β -酶的影响结果不同, 其原因尚未弄清。也许是由于细胞的生理条件所引起的。因为在本实验中, 当加进 IPTG 去诱导 β -酶产生时, 培养液中缺乏磷酸, 细胞已几乎停止生长。然而, 必须指出 BCM 对这三种位于细胞不同位置的诱导蛋白的生物合成的影响, 比通过放射性前体的结合试验^[6, 17]中所看到的, 对细胞全蛋白的生物合成的影响更为显著。为此, 有必要观察一下 BCM 对细胞内组成蛋白的作用。用放射性物质标记的细胞蛋白质进行二元电泳后, 进行放射荧光显影。结果表明, 除下述之不同点外, 细胞蛋白质斑点是相似的, 这表明在 BCM 作用下, 细胞中大多数蛋白质是以正常的比率但以较慢的速度进行生物合成的。观察到的有再现性的不同之处是分子量分别为 50.5 K, 47K, 21K 和 17.5 K 的四种蛋白质。经 BCM 作用后的细胞中, 50.5K 蛋白质的产生明显地受到抑制, 同时可以看到三种新蛋白质的斑点。这三种蛋白质显然不是原有蛋白质的分解产物, 而是在 BCM 的作用下新合成的。因为在经放射性同位素预先标记的细胞, 再经 BCM 处理后, 新斑点没有放射性。47K 蛋白质从未出现在经 BCM 处理过的抗 BCM 的变异株 G1 和 G6 细胞中, 而 21K 和 17.5K 蛋白质出现在经 BCM 处理的 G 6 细胞中。当从 BCM 处理过的细胞培养液中除去 BCM 或者把 CAP 加到经 BCM 处理的培养液中时, 这些新蛋白质被分解, 此时 BCM 的杀菌作用消失。由于加进的 CAP 的量足以阻止进一步的蛋白质合成, 这就意味着对于细胞生活力的恢复, 不必要再有 50.5 K 蛋白质

的新的生物合成。因此, 47K 蛋白质的产生是 BCM 杀菌作用的最主要原因。此蛋白质即使在 BCM 的存在条件下也有分解作用。

将溶胞物质进行分离后, 看到 47 K 蛋白质呈现在外膜之中。此蛋白质在外膜中的反常存在可能是田中等人观察到的细胞自溶现象^[17] 或者细胞分裂受到抑制^[6, 9] 的原因。

进一步对 47K 蛋白质进行特性研究将可以弄清 BCM 如何产生该蛋白质的活性, 比较上述野生菌株和变异菌株中存在于内膜中的 BCM 结合蛋白质^[7, 8] 的异同也是令人感兴趣的。这些工作正在探索之中。

参 考 文 献

- [1] Kaniya, T. et al.: *J. Antibiotics*, 25: 576, 1972.
- [2] Maag, H. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 100: 6786, 1978.
- [3] Miyoshi, T. et al.: *J. Antibiotics*, 25: 569, 1972.
- [4] Nishida, M. et al.: *J. Antibiotics*, 25: 582, 1972.
- [5] Nishida, M. et al.: *J. Antibiotics*, 25: 594, 1972.
- [6] Tanaka, N. et al.: *J. Antibiotics*, 29: 155, 1976.
- [7] Someya, A. et al.: *J. Antibiotics*, 31: 712, 1978.
- [8] Someya, A. et al.: *J. Antibiotics*, 32: 402, 1979.
- [9] Someya, A. et al.: *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 16: 87, 1979.
- [10] Torriani, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 38: 460, 1960.
- [11] Miller, J. H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab., 1972, p. 353.
- [12] Laemli, U. K., M. Favre: *J. Mol. Biol.*, 80: 575, 1973.
- [13] Fairbanks, G. et al.: *Biochemistry*, 10: 2606, 1971.
- [14] O'Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, 250: 4007, 1975.
- [15] Bonner, W. M., R. A. Laskey: *Eur. J. Biochem.*, 46: 83, 1974.
- [16] Filip, C. et al.: *J. Bacteriol.*, 115: 717,

- 1973.
- [17] Shin, W. C. et al.: *Ann. Rep. ICME*, 2: 187, 1979.
- [18] Dirienzo, J. M. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 481, 1978.
- [19] Heppel, L. A.: *Science*, 156: 1451, 1967.
- [20] Tribhuvan, R. C., D. S. Pradhan.: *J. Bacteriol.*, 131: 431, 1977.

SELECTIVE EFFECT OF BICYCLOMYCIN ON PROTEIN SYNTHESIS OF *ESCHERICHIA COLI*

Guo Yong Kazuo Nagai* Gakuzo Tamura*

(South China Institute of Technology, Guangzhou)

Bicyclomycin (BCM) inhibits the growth of *E. coli* 15 THU and *E. coli* K12 JE1011. When chloramphenicol (CAP) was added to cell culture treated with BCM, viable counts were similar to those treated with CAP alone and the lethal effect of BCM disappeared.

Derepressed synthesis of alkaline phosphatase and induced synthesis of β -galactosidase were significantly suppressed when *E. coli* 15THU cells were treated with BCM.

SDS gel electrophoresis of proteins from *E. coli* 15THU showed that between cells treated with and those without BCM there were differences in the amounts of the proteins of which molecular weights were 50.5K, 47K, 35K, 33K, 21K and 17.5K.

Three new spots of 47K, 21K and 17.5K proteins while less amounts of 50.5K protein were detected by a two-dimensional gel electrophoresis in the lysate from cells treated with BCM as compared with that from non-treated cells. Similar effects of BCM were also observed with *E. coli* K12 JE1011. After the fractionation of cell lysate, 47K protein appeared in the membrane, 21K and 17.5K proteins in the cytoplasm and 50.5K protein in both fractions, respectively. The 47K protein in the membrane was resistant to Sarkosyl.

Fluorography after two-dimensional gel electrophoresis of the proteins of lysate from the cells after being prelabeled with radioactive leucine and treated with BCM showed that there was no new protein spot nor any degradation of 50.5K protein.

Protein amounts of the new spots in cell lysate decreased when BCM was removed from or when CAP was added to the medium after the BCM treatment of *E. coli* 15THU. However, 50.5K protein did not increase significantly within the same period.

The mutants, G1 and G6, resistant to 400 μ g/ml of BCM were isolated from *E. coli* 15THU. No difference of protein spot was shown between the lysates from G1 cells treated with and without BCM. But only 21K and 17.5K proteins appeared in the lysate of G6 cells treated with BCM.

Thus, from above results, it can be suggested that BCM inhibits the biosynthesis of 50.5K protein and induces the production of 47K, 21K and 17.5K proteins and that the insertion of 47K protein into the outer membrane is the major cause of the lethal effect of BCM on *E. coli*.

* Address: The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

图 版 说 明

图版 I

图 1, 2: 大肠杆菌 15 THU 的细胞溶胞液、细胞膜和细胞质的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图。图中 B、C 分别表示在 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 二环素存在和不存在的条件下。图 1 是染色处理, 图 2 是放射荧光显影。图 1 中 1, 2 管是细胞质, 3, 4 管是细胞膜, 5, 6 管是溶胞液。

图 3—6: 大肠杆菌溶胞液的二元凝胶电泳图。经二环素处理的细胞样品中出现的新蛋白质斑点用圆圈标明, 50.5K 蛋白质也在图中标出。

Fig. 1, 2: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cell lysate, membrane and cytoplasm of *E. coli* 15 THU. B and C were prepared from the cells labeled in the presence (B) and absence (C) of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of BCM. Fig. 1: stained; Fig. 2: fluorography. In fig. 1, 1 and 2: cytoplasm; 3 and 4: membrane; 5 and 6: lysate.

Fig. 3—6: Two-dimensional gel electrophoresis of cell lysate of *E. coli*. The new protein spots which appeared in the sample of BCM-treated cells are indicated by circles. The 50.5 K protein is also marked.

图版 II

图 1—4: 大肠杆菌 15 THU 的细胞质和细胞膜经二元凝胶电泳后进行放射荧光显影图。

图 5—8: 大肠杆菌 15 THU 细胞溶胞液经二元电泳后进行放射荧光显影图。图 5 是对照。图 6 是二环素处理。图 7 是洗净二环素后加入氯霉素。图 8 是洗净二环素后加入氯霉素及二环素。

Fig. 1—4: Fluorography after two-dimensional gel electrophoresis of the cytoplasm and crude membrane of *E. coli* 15 THU.

Fig. 5—8: Fluorography after two-dimensional gel electrophoresis of cell lysate of *E. coli* 15 THU.

Fig. 5: control; Fig. 6: BCM-treated; Fig. 7: CAP was added after removing BCM from the medium; Fig. 8: CAP and BCM were added after removing BCM from the medium