

## 环化腺苷酸对细菌生长的影响

颜日祥 段康民

(西北大学生物系, 西安)

用大肠杆菌 (*Escherichia coli* AS 1.797)、北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense* AS 1.299) 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium* AS 1.217) 研究了细胞内环化腺苷酸 (cAMP) 浓度和外源 cAMP 对细胞生长的影响。结果表明, 大肠杆菌在不同碳源中生长时, 细胞的生长量随细胞内 cAMP 浓度升高而降低。在以葡萄糖作碳源时, 细胞内 cAMP 浓度低, 外源 cAMP 对生长有抑制作用, 而 cAMP 的类似物 5'-AMP 则无抑制作用。在以乳糖、麦芽糖和甘油分别作碳源时, 细胞内 cAMP 浓度高, 外源 cAMP 对生长无影响。北京棒状杆菌以葡萄糖作碳源时, 细胞生长也受外源 cAMP 的抑制, 但 cAMP 的抑制作用不是专一的, 它的作用可用类似物 5'-AMP 来代替。自身不含 cAMP 的巨大芽孢杆菌在不同碳源(包括葡萄糖)中生长时, 生长不受外源 cAMP 抑制, 也不受 5'-AMP 的影响。因此认为, cAMP 不是细菌生长的必需物, 而是生长调节物, 但这种调节物对巨大芽孢杆菌无效。

**关键词** 环化腺苷酸 (cAMP); 生长

Sutherland 等<sup>[1]</sup> 1957 年首次在动物细胞内发现了 cAMP。Okabayaski 等 (1963)<sup>[2]</sup> 和 Makman 等 (1965)<sup>[3]</sup> 发现细菌细胞内也含 cAMP。此后, 发现含有 cAMP 的原核生物逐渐增多<sup>[4-7]</sup>。

关于 cAMP 在微生物细胞内的功能, 有过不少的研究。例如, 现已查明, cAMP 影响转录和翻译<sup>[8-10]</sup>, 也影响生长、分化和发育<sup>[9]</sup> 等。

cAMP 对细菌生长的影响, 曾用 *E. coli* 作过一些研究, 证明生长速率与细胞内 cAMP 水平成反相关<sup>[11]</sup>; cAMP 促进 *E. coli* 的厌氧生长<sup>[12]</sup>; 需 cAMP 的 *E. coli* K12 突变株在葡萄糖中生长缓慢, 细胞色素 *b<sub>1</sub>* 和细胞色素氧化酶 *O* 的水平降低, 加入外源 cAMP 能刺激这些细胞色素成员的合成, 并恢复在葡萄糖上正常的生长速率<sup>[13]</sup>。

本研究的目的在于进一步探讨: (1) 在不同碳源条件下, 细胞内 cAMP 浓度及

其与生长的关系; (2) 不同的细菌在不同碳源条件下, 外源 cAMP 对生长的影响; (3) cAMP 的类似物 5'-AMP 是否具有与 cAMP 相同的功能。

### 材料和方法

#### (一) 菌株

大肠杆菌 (*Escherichia coli* AS 1.797)、北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense* AS 1.299) 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium* AS 1.217), 均来自陕西省微生物研究所。

#### (二) 培养基

1. 大肠杆菌培养基:  $K_2HPO_4$  14g,  $KH_2PO_4$  6g,  $(NH_4)_2SO_4$  2g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g, VB<sub>1</sub> 0.05g, 蒸馏水 1L, 自然 pH。

2. 巨大芽孢杆菌培养基:  $K_2HPO_4$  14g,  $KH_2PO_4$  6g,  $(NH_4)_2SO_4$  2g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g, 柠檬酸钠 0.5g, 蒸馏水 1L, 自然 pH。

3. 北京棒状杆菌培养基:  $K_2HPO_4$  1g,  $KH_2PO_4$

本文于 1987 年 3 月 2 日收到。

注: 各种培养基的碳源单独灭菌后加入。

0.5g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.005g、VB<sub>1</sub> 100 $\mu\text{g}$ 、生物素 5 $\mu\text{g}$ 、酵母膏 1g、蒸馏水 1L, 自然 pH。

### (三) 细菌的培养和生长的测定

将活化后的斜面菌种制成菌悬液, 接种葡萄糖浓度为 50mmol/L 的基础培养基, 振荡培养过夜, 离心 (3500 r/min) 15 分钟收集菌体。用 10 ml 不含碳源的培养基洗涤, 再离心。去掉上清液, 加 10ml 不含碳源的培养基制成菌悬液, 用于接种。

各种细菌的培养均在 180r/min 摇瓶机上进行。培养温度: 大肠杆菌和芽孢杆菌为 37℃, 北京棒状杆菌为 28℃。

用 72 型分光光度计在 420nm 波长处测定菌悬液的 OD 值, 用以表示生长量。

### (四) 细菌蛋白含量的测定

此项测定目的在于测定细胞内 cAMP 时, 其浓度按“cAMP p mol/mg 蛋白”计算。为此, 采用 Folin-酚试剂法<sup>[14]</sup>。待测菌体用 1mol/L NaOH 处理<sup>[15]</sup>。制作标准曲线时, 标准蛋白(牛血清蛋白)也用 1mol/L NaOH 配制。标准蛋白用微量凯氏定氮法进行标定。

### (五) 细胞内 cAMP 浓度的测定

采用特异性结合蛋白饱和和分析法。参考中国科学院原子能应用研究所的 cAMP 测定药盒说明书和 Gilman<sup>[17]</sup> 的方法, 综合两种方法的优点, 建立了一个测定程序。灵敏度约为 0.5 p mol/管。

#### A. 试剂

① TE 缓冲液: 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液中 EDTA 浓度为 0.004mol/L, pH 7.5。

②  $^3\text{H}$ -cAMP: 层析纯, 比度 20—30Ci/mmol/L, 中国科学院原子能应用研究所生产。用 TE 溶液稀释成 3000c.p.m./30 $\mu\text{l}$ 。

③ 标准 cAMP: Sigma 公司出品, 纯度 99%。按 260nm 下克分子消光系数为  $14.6 \times 10^3$  配制。先称取一定量的 cAMP, 用 TE 缓冲液配成溶液, 在 751 型紫外分光光度计上测 OD 值, 换算浓度。然后稀释成 32 p mol/40 $\mu\text{l}$ , 最后稀释为每 40 $\mu\text{l}$  含 0.5、1、2、4、6、8、12、16 p mol 的 TE 溶液。

④ 洗涤缓冲液: 20mmol/L pH 7.5 的磷酸

盐缓冲液。

⑤ 闪烁液: PPO (2, 5-二苯基噁唑) 4g, POPOP (1, 4-双-[5-苯基噁唑-2]-苯) 100g。用二甲苯加至 1000ml。前二者购自上海生化试剂商店, 均为闪烁纯。

⑥ 微孔滤膜: 直径 2.5cm, 孔径  $\leq 0.45\mu\text{m}$ , 用前在洗涤液中煮沸数分钟, 放凉。

⑦ 结合蛋白: 用新鲜牛肌提取<sup>[16]</sup>

#### B. 反应体系和 cAMP 测定

①  $^3\text{H}$ -cAMP 和结合蛋白的适宜比例: 一般以不加样品时结合蛋白能结合 30%  $^3\text{H}$ -cAMP 为宜<sup>[16]</sup>。为此, 测定了结合蛋白的饱和曲线。按测得的曲线, 结合蛋白用量应为 30 $\mu\text{l}$ 。实验时, 将 30 $\mu\text{l}$  结合蛋白稀释成 40 $\mu\text{l}$ , 结合蛋白总量不变。

#### ② cAMP 的测定:

反应总体积为 110 $\mu\text{l}$ 。取 5ml 的小试管, 依次加入: 样品或标准样 40 $\mu\text{l}$ 、 $^3\text{H}$ -cAMP 30 $\mu\text{l}$ 、结合蛋白 40 $\mu\text{l}$ 。轻轻摇匀后置冰浴中。2—3 小时后, 加 1ml 冰冷的洗涤缓冲液终止反应。5 分钟后, 将反应液滴加在处理好的微孔滤膜上抽滤。用 10ml 相同的缓冲液洗涤试管和滤膜(洗涤液盖过滤膜, 保证游离的  $^3\text{H}$ -cAMP 被洗去)。80℃ 中烘干滤膜, 然后将滤膜放在盛有 5ml 闪烁液的计数瓶中, 用国产 FJ-2101G 型双道液体闪烁计数器测定每分钟的计数 (c. p. m.)。仪器参数选用生产厂推荐的参数。

按加入的标准 cAMP 量和测得的 c.p.m. 作标准曲线。每测一个样品, 同时作标准曲线, 用双管作平行测定。样品中 cAMP 浓度从标准曲线中查得。

③ 测定细胞内 cAMP 浓度时菌体的处理: 取 5—10ml 菌悬液, 迅速在室温下离心 (4000r/min) 10min。去掉上清液, 加适量的 0.1mol/L HCl, 在 95℃ 水浴中提取 10min。然后在 0—4℃ 下离心 (10000r/min) 15min, 收集上清液。用 NaOH 调至 pH 7.2 左右。稀释后取适量测定 cAMP。

## 结 果

### (一) 大肠杆菌 AS 1.797 细胞内 cAMP 浓度和生长的关系

该菌株分别以葡萄糖、乳糖、甘油和

表 1 *E. coli* AS 1.797 在不同碳源上生长时代时间和细胞内 cAMP 浓度的关系

Table 1 The relationship between generation time and intracellular cAMP concentration in *E. coli* AS 1.797 cultivated in different carbon sources

碳源* Carbon sources	世代时间 (min) Generation time	细胞内 cAMP 浓度 (p mol/mg 蛋白) Intracellular cAMP concentration (p mol/mg protein)
葡萄糖 Glucose	66	0.9±0.3
乳糖 Lactose	75	8.2±3.9
甘油 Glycerin	93	14.0±2.6
蔗糖 Sucrose	480	40.0±8.7

\* 甘油为 68mmol/L, 其余的为 50mmol/L. Glycerin 68 mmol/L, others 50 mmol/L.

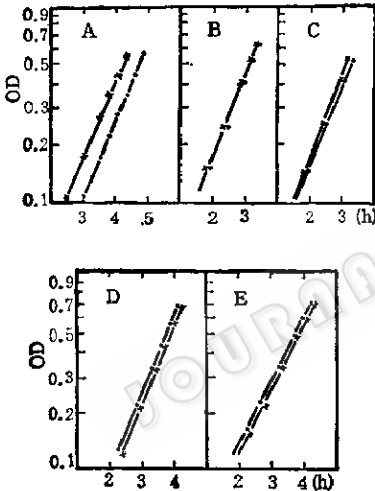


图 1 外源 cAMP 对巨大芽孢杆菌在不同碳源中生长的影响

A. 乳糖; B. 葡萄糖; C. 蔗糖; D. 麦芽糖; E. 半乳糖。● 不加 cAMP; × 培养开始时加 cAMP; 终浓度为 5mmol/L。

Fig. 1 The effect of exogenous cAMP on the growth of *B. megaterium* AS 1.217 in different carbon source

A. lactose, B. glucose, C. sucrose, D. maltose, E. galactose. ● without addition of cAMP, × cAMP was added at initiation of culture, terminal concentration 5 mmol/L.

蔗糖作碳源生长时, 在对数期内, 细胞内 cAMP 浓度与世代时间的关系见表 1。表 1 表明, 细胞内 cAMP 浓度越高, 世代时

间越长。

(二) 外源 cAMP 对生长的影响

1. 外源 cAMP 对巨大芽孢杆菌生长的影响: 按细胞内 cAMP 测定结果, 该菌株不含 cAMP。它在分别以葡萄糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖和蔗糖作碳源的培养基中生长时, 外源 cAMP 对生长几乎没有影响(图 1)。cAMP 的类似物 5'-AMP 对生长也无影响(图 2)。

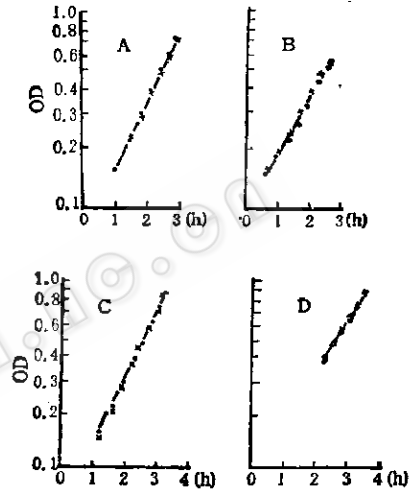


图 2 5'-AMP 对巨大芽孢杆菌在不同碳源中的生长无影响

A. 葡萄糖; B. 乳糖; C. 麦芽糖; D. 半乳糖。● 不加 5'-AMP, × 培养开始时加 5'-AMP 至 5mmol/L 终浓度。

Fig. 2 5'-AMP had no effect on the growth of *B. megaterium* AS 1.217 in different carbon source A. glucose, B. lactose, C. maltose, D. galactose. ● without addition of 5'-AMP, × 5-AMP was added to terminal concentration 5 mmol/L at initiation of culture.

2. 外源 cAMP 对 *E. coli* AS 1.797 生长的影响: 该菌株以葡萄糖作碳源时, 外源 cAMP 的存在对生长有抑制作用。随着外源 cAMP 浓度提高, 这种抑制作用加强(图 3)。而 cAMP 类似物 5'-AMP 在浓度相同时几乎不抑制生长(图 4)。但分别以乳糖、麦芽糖和甘油作碳源时, 外源 cAMP 对生长则无抑制作用(图 5)。

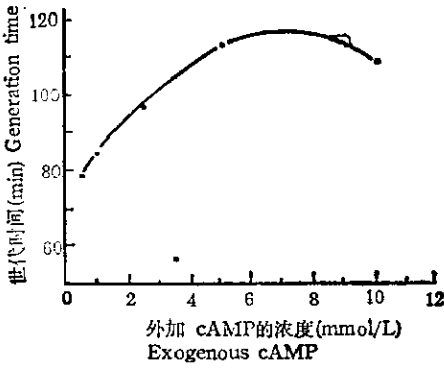


图3 *E. coli* AS 1.797 以葡萄糖为碳源时的世代时间和外源 cAMP 浓度的关系

Fig. 3 The relationship between generation time and exogenous cAMP concentration during *E. coli* AS 1.797 was cultivated in medium containing glucose.

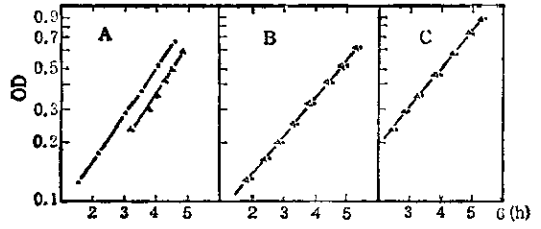


图5 *E. coli* AS 1.797 在 A. 乳糖, B. 甘油, C. 麦芽糖中的生长和外源 cAMP 的关系

● 不加 cAMP; △ 培养开始时加 cAMP 至 5mmol/L。

Fig. 5 The relationship between growth and exogenous cAMP in *E. coli* AS 1.797 grown in different carbon sources

A. lactose, B. glycerin, C. maltose.

● without addition of cAMP, △ cAMP was added at initiation of culture, terminal cAMP concentration 5 mmol/L.

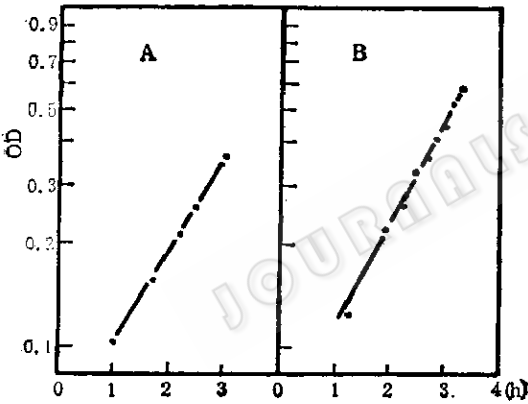


图4 *E. coli* AS 1.797 以葡萄糖为碳源时 5'-AMP 对生长无影响(5'-AMP 的终浓度为 5mmol/L)

A. 未加 5'-AMP; B. 加 5'-AMP 至 5mmol/L。

Fig. 4 5'-AMP had no effect on growth during *E. coli* AS 1.797 took glucose as carbon source (terminal 5'-AMP concentration 5 mmol/L)

A. without addition of 5'-AMP, B. 5'-AMP was added to terminal concentration 5 mmol/L at initiation of culture.

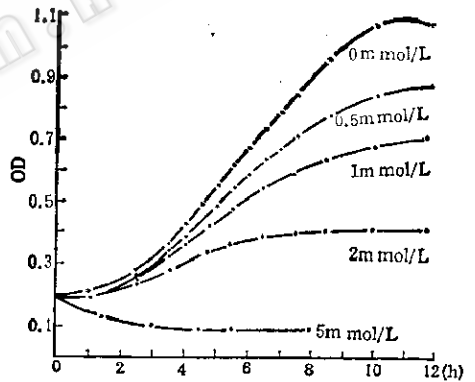


图6 北京棒状杆菌 AS 1.299 以葡萄糖为碳源时,外源 cAMP 对生长的抑制 (cAMP 在培养开始时加入,图中的数字为 cAMP 的终浓度)

Fig. 6 Growth was inhibited by exogenous cAMP during *Corynebacterium pekinense* AS 1.299 was cultivated in medium containing glucose (cAMP was added at initiation of culture, the numerical values on the figure are the cAMP concentration)

(三) 外源 cAMP 对北京棒状杆菌生长的影响

该菌株在以葡萄糖作碳源时,其生长也受 cAMP 的抑制。当外源 cAMP 浓度

达到 5mmol/L 时,生长完全停止(图 6),这与 *E. coli* AS 1.797 的情况稍有不同。

此外, cAMP 的类似物 5'-AMP 对该菌生长也有抑制作用(表 2)。

表 2 北京棒状杆菌 AS 1.299 以葡萄糖为碳源时 5'-AMP 对生长的影响

Table 2 The effect of 5'-AMP on growth of *Corynebacterium pekinense* AS 1.299 grown in medium containing glucose

培养时间(h) Culture time	0	$\frac{3}{4}$	2	$2\frac{3}{4}$	$4\frac{3}{4}$	5
OD	1.000	0.070	0.065	0.065	0.055	0.045

注: 5'-AMP 在培养开始时加入。

Note: 5'-AMP was added at initiation of culture.

## 讨 论

实验结果表明, *E. coli* AS 1.797 在不同碳源中的世代时间长短与细胞内 cAMP 浓度成正相关(表 1), 也就是说, 这种细菌的生长速率与其细胞内 cAMP 浓度成反相关。在以葡萄糖为碳源时, 细胞内 cAMP 浓度为何最低? 其原因尚有争论。目前有两种观点来解释这种现象: 其一, Makman 等<sup>[3]</sup>认为, 葡萄糖的存在会促使细胞内 cAMP 排出, 从而降低细胞内 cAMP 浓度。其二, Peterkofsky (1976)<sup>[17]</sup>则认为, 葡萄糖向细胞内运输时会降低腺苷酸环化酶的活性, 减少 cAMP 的合成, 从而使细胞内 cAMP 浓度降低。不管葡萄糖在影响细胞内 cAMP 浓度中的作用机制如何, 由于它能降低细胞内 cAMP 浓度, 有利于生长, 因此可作为良好的碳源。

实验结果还表明, *E. coli* AS 1.797 和北京棒状杆菌在以葡萄糖作碳源时, 外源 cAMP 的存在对细胞生长有抑制作用(图 3、6)。这一结果和 Torre 实验室<sup>[9]</sup>以 *E. coli* Hfr 3000 所作的研究结果相符。另外, 在我们的实验中, 当 *E. coli* AS 1.797 分别以乳糖、甘油和麦芽糖作碳源时, 细胞生长不受外源 cAMP 的抑制。Torre 实验室以琥珀酸、苹果酸或甘油分别作碳源培养 *E. coli* Hfr 3000 时, 也曾得到类似的结果。看来, 外源 cAMP 对生长的抑制作用与细胞自身 cAMP 浓度有

关。正如我们的测定结果所表明的: 以葡萄糖为碳源时, 细胞内 cAMP 浓度很低; 而以乳糖或甘油作碳源时, 细胞内 cAMP 浓度则高得多。由此可见, cAMP 对生长的抑制作用有一定的浓度范围, 当细胞内 cAMP 浓度达到这个范围时, 外源 cAMP 的加入就再不表现出抑制作用或作用甚微。

Torre<sup>[9]</sup>也曾证明, *E. coli* Hfr 3000 以葡萄糖或丙酮酸为碳源时, 外源 cAMP 对生长的抑制作用不能用相同浓度的 5'-AMP、ADP、ATP 或腺苷来代替。这就是说, 在这种细菌中, cAMP 对生长的抑制作用是专一的。而我们的实验结果表明, 外源 cAMP 对 *E. coli* AS 1.797 生长的抑制作用也不能用 5'-AMP 来代替(图 4), 但在北京棒状杆菌中, cAMP 的抑制作用则不是专一的, 它可以由 5'-AMP 来代替。

本研究结果所表明的另一种情况是, 自身不含 cAMP 的巨大芽孢杆菌无论以葡萄糖为碳源或以其他物质为碳源, 其生长均不受外源 cAMP 的抑制(图 1); 外源 cAMP 的类似物 5'-AMP 也不影响巨大芽孢杆菌的生长(图 2)。

从上述结果可以看出, cAMP 不是生长的必需物, 而是一种生长调节物, 它对生长起负控制作用。这种调节物对 *E. coli* AS 1.797 和北京棒状杆菌来说是有效的, 但对自身不含 cAMP 的巨大芽孢杆菌来

说却是无效的。这就是说, cAMP 对细菌生长的调节没有普遍意义。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Sutherland, E. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, **224**: 463—475, 1975.  
 [ 2 ] Okabayashi, T. et al.: *Arch. Biochem.*, **100**: 158—159, 1963.  
 [ 3 ] Makman, R. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **240**: 1309—1314, 1965.  
 [ 4 ] Okabayashi, T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **220**: 116—123, 1970.  
 [ 5 ] Ide, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**: 262—268, 1971.  
 [ 6 ] Khandelwal, R. L. et al.: *ibid.*, **151**: 75—78, 1972.  
 [ 7 ] Agabian, N. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**: 1690—1698, 1972.  
 [ 8 ] Richenberg, H. V.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **28**:

- 353—366, 1974.  
 [ 9 ] Peterkofsky, A.: in *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, **7**: 1—48, 1976.  
 [ 10 ] Dickson, R. C. et al.: *Science*, **187**: 27—35, 1975.  
 [ 11 ] Buettner, M. et al.: *J. Bacteriol.*, **114**: 1068—1073, 1973.  
 [ 12 ] Patrick, J. M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**: 555—561, 1973.  
 [ 13 ] Broman, R. L. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**: 595, 1974.  
 [ 14 ] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **139**(1): 256, 1951.  
 [ 15 ] [日]微生物研究法讨论会编(程光胜等译): 微生物学实验法, 科学出版社, 北京, 第193页, 1981。  
 [ 16 ] Gilman, A. G.: *Proc. Natl. Sci. U. S. A.*, **67**(1): 305—312, 1970.  
 [ 17 ] Peterkofsky, A.: *Cyclic Nucleotides and the Regulation of Cell Growth*, (ed Morad Abou-Sabe), Halsted Press, Stroudsburg, Pennsylvania, pp. 27—35, 1976.

## THE EFFECT OF 3',5'-CYCLIC ADENYLIC ACID (cAMP) ON THE GROWTH OF BACTERIA

Yan Rixiang Duan Kangmin

(Department of Biology, North-West University, Xian)

The effect of intracellular cAMP level on the growth of bacteria was studied with *E. coli* AS 1.797, *Corynebacterium pekinense* AS 1.299 and *Bacillus megaterium* AS 1.217. The experimental results show that the growth of *E. coli* AS 1.797 was decreased with increasing cAMP level in cell. With glucose as the sole carbon source, intracellular cAMP is low, and growth of *E. coli* AS 1.797 was inhibited by exogenous cAMP, but the analog metabolite of cAMP-5'-AMP had no effect on growth. When *E. coli* AS 1.797 was grown in media containing lactose, maltose and glycerin respectively, intracellular cAMP level is high, and exogenous cAMP did not inhibited the cell growth. When *Corynebacterium pekinense* AS 1.299 took glucose as carbon source the growth of this bacterium was also

inhibited by exogenous cAMP, but the inhibition of cAMP was not specific, its role can be exchanged by 5'-AMP. *B. megaterium* AS 1.217 cultivated in different carbon source (include glucose) do not contain cAMP in cell, and its growth was not inhibited by exogenous cAMP. 5'-AMP had also no effect on the growth of this bacterium.

Thus, the conclusion seems that the cAMP is not essential for the growth of bacteria, and it is a regulator that act a negative regulation in cell growth, but this regulator is of no effect for the growth of *B. megaterium* AS 1.217.

### Key words

Cyclic adenylic acid (cAMP); Growth