

鼠伤寒沙门氏菌维生素 B<sub>2</sub> 生物合成的调节

王敖全

(中国科学院微生物研究所, 北京)

维生素 B<sub>2</sub> (又称核黄素 Riboflavin) 是微生物能量代谢中电子受体 DNA 和辅酶 A 的重要组成部分, 它还可能是维生素 B<sub>2</sub> 生物合成的前体<sup>[1]</sup>。在医药上除作营养添加剂外, 对治疗神经性炎症也有一定疗效。目前有关维生素 B<sub>2</sub> 生物合成途径和代谢调控的知识主要来自对芽孢杆菌<sup>[2,3]</sup>和酵母<sup>[4-6]</sup>的研究, 有关肠道杆菌中的报道甚少, 其主要原因是在这类细菌中难以分离到维生素 B<sub>2</sub> 营养缺陷型。作者在解决了从鼠伤寒沙

门氏菌中分离营养缺陷型的方法后, 进行了维生素 B<sub>2</sub> 生物合成在转录水平上的调控研究

## 材料和方法

## (一) 菌株

见表 1。

## (二) 培养基

Vogel 和 Bonnev 的 E 培养基<sup>[4]</sup> 补加 0.2% 葡萄糖用作基本培养基; 丰富培养基为 LB; Green

表 1 实验菌株(均来自鼠伤寒沙门氏菌 LT2)

菌株	遗传型	来源
TT12088	hisA::MudA, hisD::MudJ	J. Roth 实验室
TT13663	hem env53	[7]
TT14445	hem env53 rib1::MudJ	本工作
TT14446	hem env53 rib2::MudJ	本工作
TT14447	hem env53 rib3::MudJ	本工作
TT14448	hem env53 rib4::MudJ	本工作
TT14449	hem env53 rib5::MudJ	本工作
TT14450	hem env53 rib6::MudJ	本工作
TT14451	hem env53 rib7::MudJ	本工作

指示平板按文献[9]配制。

(三)  $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定

参照文献[10]。

(四) 带有 M<sub>13</sub> 转座基因片段和 MudJ 的噬菌体裂解物的制备

按文献[11]。

## (五) 转导杂交

转导杂交用噬菌体 P22 (HT int<sup>-</sup>) 步骤按文献[12]进行。

## 结果和讨论

## (一) 出发株的确定

通过提高检测培养基中维生素 B<sub>2</sub> 浓度(终浓度达 300  $\mu$ g/ml) 的方法, 从 NTG 诱变处理的鼠伤寒沙门氏菌野生菌株分离到第一批维生素 B<sub>2</sub>

营养缺陷型。但从研究维生素 B<sub>2</sub> 生物合成调控的观点, 采用如此高浓度分离与维生素 B<sub>2</sub> 生物合成有关基因的 MudJ (*lacZ*, *kan<sup>r</sup>*) 插入突变体不可取, 因为加入到培养基中的维生素 B<sub>2</sub> 浓度并不能反映进入细胞的浓度。同时由于维生素 B<sub>2</sub> 的光化产物对细胞生长有毒害作用, 且浓度愈高毒害愈大<sup>[13]</sup>, 为了克服这一弊端, 作者采用胞被 (*env<sup>-</sup>*) 突变以增加维生素向细胞的透入量。实验表明, 当维生素 B<sub>2</sub> 营养缺陷型突变体引入胞被突变体后, 其细胞正常生长所需的维生素 B<sub>2</sub> 浓度从 300  $\mu$ g/ml 降低至 2.5  $\mu$ g/ml。以下实验选用带有胞被突变的 TT13663 为出发株。

本文于 1990 年 1 月 20 日收到。

本工作是在美国 Utah 大学生物系 J. Roth 教授实验室完成。

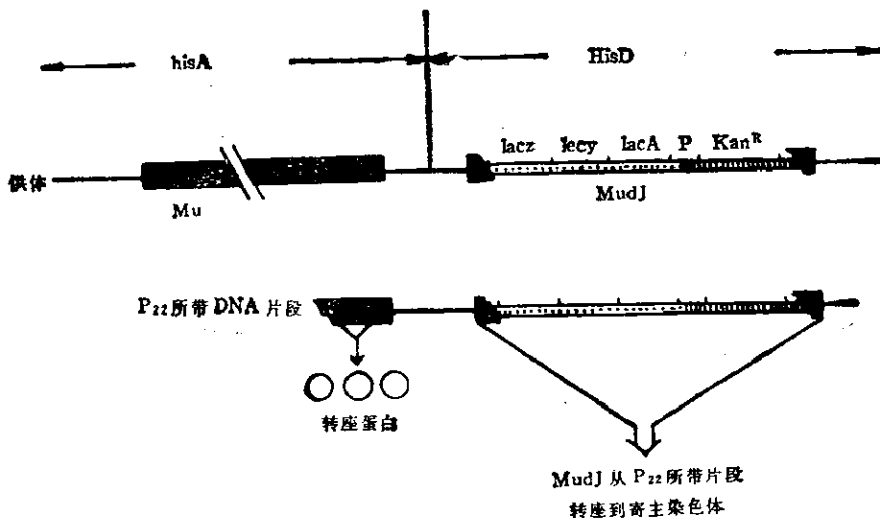


图 1 MudJ 的组成和转座

**(二) *rib::MudJ (lacZ, kan<sup>r</sup>)* 基因融合株的分离**

MudJ 的组成和转座示于图 1。以 TT12088 的 P22 裂解物为供体对卡那霉素敏感并带有胞被突变的 TT13663 为受体作转导，在补加卡那霉素和维生素 B<sub>2</sub> (2.5 μg/ml) 的 LB 平板上选择 Kan<sup>r</sup> 转导子(每个平板约 300—500 个菌落)以此为母平板，用灭菌的丝绒布接种后分别影印 E 和 E + Rib 平板，以检出 MudJ 插入维生素 B<sub>2</sub> 结构基因的突变体。虽然在上述转导实验中所获得的转导子并不都产生于 MudJ 的转座，因为 P22 带有的 *hisD* 片段可与受体发生同源重组产生 Kan<sup>r</sup> 重组子。但由于这样的重组子仍然为 His<sup>-</sup>，在对 Kan<sup>r</sup> 作平板影印时在 E 和 E + Rib 平板上不能生长，这样的重组子并不影响 *rib::MudJ (lacZ, kan<sup>r</sup>)* 的分离。采用上述方法共分得了 7 株独立的 *rib::MudJ (lacZ, kan<sup>r</sup>)* 突变体，在 X-gal 平板上测定了 MudJ 的插入方向，其中 5 株为蓝色 (rib1-rib5)，表明 MudJ 插入方向与被插结构基因的转录方向一致。其余为白色 (rib6-rib7)，表明插入方向相反。

**(三) 维生素 B<sub>2</sub> 生物合成的构成性表达**

为了从转录水平上研究维生素 B<sub>2</sub> 在其生物合成过程中是否起调节作用，将 5 株 *rib::MudJ (lacZ, kan<sup>r</sup>)* 融合株分别接于含 2.5、5.0、100、150 和 300 μg/ml 维生素 B<sub>2</sub> 的 E 培养液中，培养至对数后期，测定 β-半乳糖苷酶活性，结果发现

5 株 *rib::MudJ (lacZ, kan<sup>r</sup>)* 突变体在含不同浓度维生素 B<sub>2</sub> 的培养条件下 β-半乳糖苷酶活性无明显差别。可见 *rib* 基因表达是构成性的。为进一步证实这一点，取其中一株菌接于补加不同浓度维生素 B<sub>2</sub> 的 E 培养液中，37℃ 培养至对

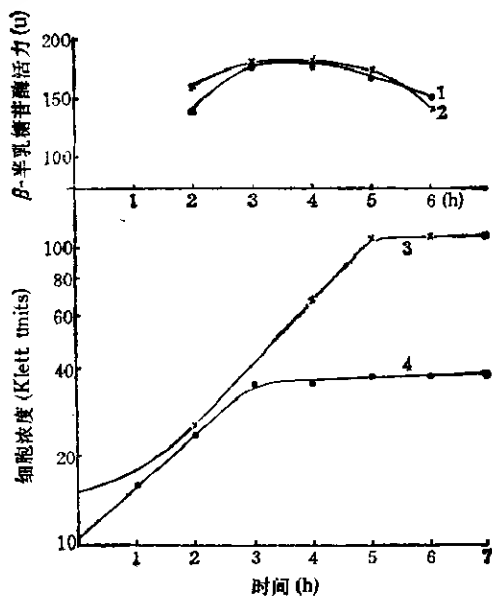


图 2 鼠伤寒沙门氏菌维生素 B<sub>2</sub> 基因的构成性表达 1,2 分别表示生长于含 0.4 μg/ml 和 10 μg/ml 维生素 B<sub>2</sub> 的 E 培养液中的 β-半乳糖苷酶活性；3,4 分别表示在含 10 μg/ml 和 0.4 μg/ml 维生素 B<sub>2</sub> 的 E 培养液中的细胞生长

数期,再分别接种于同样浓度维生素 B<sub>2</sub> 的新鲜 E 培养液中,37℃ 培养。定时取样,测定生长和  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。如果维生素 B<sub>2</sub> 基因表达受维生素 B<sub>2</sub> 的阻遏,那么当细胞生长达到稳定期时, $\beta$ -半乳糖苷酶活性应迅速上升,因为此时细胞生长已将大部分维生素 B<sub>2</sub> 耗掉(细胞处于饥饿状态 Derepression)。但实验结果与此相反,当细胞生长停止时, $\beta$ -半乳糖苷酶活性亦随之下降(图 2)。因此可得出结论:鼠伤寒沙门氏菌维生素 B<sub>2</sub> 生物合成不受其自身的调节,属于构成性表达。这一结果与从芽孢杆菌中观察到的结果不同,后者受维生素 B<sub>2</sub> 的严格调节,这种完全不同的调节现象,很可能反映了它们在进化上的差异。

### 参 考 文 献

- [1] Horing, J.A. et al.: *J. Biological Chemistry*, 286:7410—7414, 1978.
- [2] Bresler, S. E. et al.: *Genetika*, 15: 967—971, 1978.
- [3] Bresler, S. E. et al.: *Genetika*, 12: 83—91, 1976.
- [4] Bacher, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 246:7018—7022, 1971.
- [5] Oermanns, O. et al.: *J. Bacteriol.*, 110: 318—322, 1972.
- [6] Shavlovsky, G. M. et al.: *Arch. Microbiol.*, 124: 255—259, 1979.
- [7] Janzer J. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 27:226—237, 1980.
- [8] Vogel, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 213:97—106, 1956.
- [9] Davis, R.W. et al.: *A manual for genetic engineering*, Advance Bacterial Genetics, p. 201. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New York, 1980.
- [10] Miller J. H.: *Experiments in molecular genetics*, p. 403. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972.
- [11] Castilho, B. A. et al.: *J. Bacteriol.*, 158: 488—495, 1984.
- [12] Hughes, K. T. et al.: *Genetics*, 109: 263—282, 1985.

## REGULATION OF RIBOFLAVIN BIOSYNTHESIS IN *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Wang Aoquan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

7 independent rib genes fusions with MudJ (lacZ, Kan<sup>r</sup>) were isolated by transposon MudJ mutagenesis in *Salmonella typhimurium*. 5 of them are blue on the X-gal plate, and the  $\beta$ -galactosidase activity of the cells grown in E medium containing various concentration of riboflavin were assayed. The results showed that the expression of rib gene

are not repressed by riboflavin. It appears to be synthesized constitutively in *Salmonella typhimurium*.

### Key words

MudJ (lacZ, Kan<sup>r</sup>); Riboflavin; Regulation