

细菌适应突变研究进展

王敖全

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 适应突变, F'40, 非致死选择

分类号 Q933 **文献标识码** C **文章编号** 0001-6209(1999)03-0282-85

1988 年, John Cairns 在 *Nature* 杂志上发表了一题为“*The Origin of Mutations*”^[1] 论文, 宣称细菌在某种非致死的选择条件下有选择有利突变的能力, 作者称此种突变为适应突变, 其后有人称此为定向突变或选择诱发突变, 在国际遗传学界引起了强烈反响, 因为在过去的 50 多年中, 人们普遍接受新达尔文主义的突变观, 即自然界中存在的或将要发生的突变都是按物理化学规律随机发生的, 它与对细胞有利无利无关。因此 Cairns 的实验及其观点是对新达尔文主义的挑战, 近 10 年来国际上不少知名的科学家也先后投入了这一新领域的研究, 围绕着适应突变的真实性和普遍性及可能的突变机理作了不少工作, 在 *Nature* 等国际刊物发表了一系列论文^[2~12]。本文就适应突变极其研究进展作了简要评述。

1 历史的回顾

本世纪 40 年代初, 人们已认识到细菌群体中出现的遗传变异来源于少数的基因突变, 这种基因突变可用严格的选择条件检测, 如当这种选择用于液体培养基培养的微生物时, 培养不久原有群体就被突变体所代替。当选择用于固体培养基培养时, 则在平板上可观察到突变体菌落。令遗传学家感到困惑的是在此选择条件下, 突变体是产生于自发突变呢, 还是产生于在选择条件的直接诱发突变? 或二者兼有? Luria 和 delberück 用实验对此作出了回答。他们研究了大肠杆菌 T1 抗性突变体的来源。作者首先假定如果 T1 抗性突变体产生于培养物接触 T1 前, 那么对取自同一培养物的一系列独立的平行培养物而言, 由于有的培养物中突变可能发生在对数生长早期, 有的可能发生在后期, 因此大量平行培养物间产生的突变体数会出现很大的差异。如果突变发生在培养物接触选择条件后, 那么, 由于每个培养物细胞产生突变的机会相等, 因此平行培养物间出现的 T1 抗性突变数的差异会很小, 呈常态分布 (Poisson 分布)。实验结果表明各平行培养物间产生 T1 抗性突变体数差异很大, 高达 100 倍。由此证明 T1 抗性突变体是自发突变的结果, 在培养物接触 T1 前就已存在, 这就是细菌遗传学发展史上有名的 Luria 实验。此后 Lederbegr 等采用平板复制技术证明了 Luria 的结论。正是他们的实验结果排除了适应突变的可能性, 使人们长期以来对突变仅仅产生于自发突变的观点深信不疑。

2 适应突变的实验证据及普遍性

随着分子生物学的发展, 当人们重新审视 Luria 实验时, 不难发现其实验设计上的局限性。T1 噬菌体作为选择条件过于严厉, 对大肠杆菌是致死的, 而且 T1 抗性突变是隐性, 已知此种基因突变的表达需要 DNA 复制, 因此 Luria 实验结果不能排除适应突变存在的可能性。适应突变研究在沉寂 40 多年后。Cairns 采用大肠杆菌乳糖利用缺陷株 F'40 重又开始了适应突变的探索。F'40 菌株的染色体上带有不

可回复的 *lac* 缺失,染色体外带有 F'质粒,其上有可回复的 *lac* 突变,此突变产生于 *lacI* 和 *lacZ* 的融合引起的 *lacZ* 第 320 位密码子的 +1 码组框架移动,采用这一系统有如下优点:(1)乳糖作为选择条件是温和的非致死的;(2)在此选择平板上,随机突变和适应突变回复子均可形成菌落,且可通过菌落出现的先后将它们加以区别。当 Carins 等把一接种环 F'40 的饱和培养物涂布在以乳糖为唯一碳源的基础平板上时,在培养 2d 后出现少数 *lac*⁺ 回复子菌落,延长培养时发现平板不断出现回复子,直至整个平板被覆盖,为搞清楚滞后出现的 *lac*⁺ 回复子的来源,作者和其后的许多实验室开展了这方面的研究,提供了滞后突变产生于适应突变的大量实验证据。

2.1 Luria fluctuation test

Carins 将生长于补加甘油的基础培养液的 F'40 过夜培养物以同样培养液稀释 10^{-5} 倍后,分装成 120 个独立的培养物,培养至饱和期后分别涂布以乳糖为唯一碳源的基础培养基平板,培养不同时间计算 *lac*⁺ 回复子数,结果表明在 2~3d 出现的 *lac*⁺ 回复子,呈 Luria 分布,即 120 个培养物间突变体数差异很大,说明这些突变体为发生于前培养的随机突变,而滞后出现的 *lac*⁺ 回复子呈 Poisson 分布,表明这些突变体发生在选择平板上,和选择条件乳糖存在有关。

2.2 乳糖是产生适应突变的必要条件

当把 F'40 置于不加乳糖的基础培养基中培养时并不能产生造成 *lac*⁺ 的滞后突变,证明乳糖是 *lac*⁺ 滞后突变产生的直接原因。

2.3 乳糖并非诱变剂

如果设想乳糖有诱变作用,那么在上述选择条件下,不断出现 *lac*⁺ 回复子就不足为怪了。为排除这个可能性,Carins 构建了一株 *lac*⁻ *trp*⁻ 双重突变株,当该突变株被涂布在只含乳糖的选择平板时无 *lac*⁺ 滞后回复子出现,只有补加色氨酸是才出现 *lac*⁺,且迟后加入色氨酸出现 *lac*⁺ 的模式与一开始便加入色氨酸的一样,说明乳糖并非诱变剂。

2.4 适应突变的选择特异性

从严格意义上讲,适应突变有选择特异性,也就是处在选择条件下的细胞允许有利于生长的基因发生突变,不利的或无用的基因突变频率不变,Carins 采用中性基因(*val*^s→*val*^r)实验显示,在以乳糖为唯一碳源的选择条件下,只有 *lacZ* 出现 *lac*⁺ 滞后回复突变而 *val*^r 抗性突变频率未变。因适应突变的特异性是目前适应突变争论的焦点之一,Hall 采用一个更严密的实验系统作了研究^[10]。大肠杆菌 *ebg* 操纵子编码第二份 β -galactosidase,该酶活性微弱,即使在 *lacZ* 基因缺失时也难以检测,但在以乳糖为唯一碳源的选择平板上可分离到两类回复突变体,类型 I 可利用乳糖快速生长,但不能利用 lactose 的结构类似物 lactulose 生长,其突变位点发生在 G₁₅₆₆→A;类型 II 可利用 lactulose 和 lactose 生长,但该突变使利用 lactulose 的酶活性增加 48 倍,而利用 lactose 酶活性仅增加 10 倍,其突变位点发生在 G₄₂₂₅→C 或 T。Hall 采用这一系统检查了在 lactulose 的选择条件下,出现类型 II 适应突变的同时类型 I 是否亦随之增加。结果表明,类型 I 突变频率不变,这个实验结果表明当选择用于同一基因的一个特定的核苷酸位点时,突变发生在这个选择位点上,而处在同一基因的未被选择的位点不发生突变,有力证明了适应突变的位点特异性。

2.5 适应突变发生在稳定期

Carins 在观察到 *lac*⁺ 滞后突变体的同时测定了选择平板上细胞的生长,结果显示培养期间受试菌细胞数不变,处在稳定期。这一结果表明适应突变机制与发生在细胞快速生长的随机突变机制不同,这是迄今涉足甚少的一个新的领域。

2.6 适应突变的突变谱与随机突变不同

Susan 等分析了 F'40 在以乳糖为唯一碳源的选择平板上培养 3~4d 出现的 *lac*⁺ 回复子的突变谱,发现所试突变体均为几个单核苷酸重复的单个碱基的缺失。而随机突变谱很广,包括重复(duplication)、缺失(deletion)、插入(insertion)和转位(translocation)^[8]。

迄今为止,在大肠杆菌中,除 lacI-lacZ 外,至少还有以下遗传位点:metB⁺、trpA、trpB、trpE、cysB、ompF 和 ilvG,酵母中的 his 和 lys2 也有滞后突变现象,而且均已证明滞后突变的出现均需各自的非致死选择条件,突变出现呈 Poisson 分布,在非选择性饥饿条件下均不能产生滞后突变,在选择期间,群体中不被选择的基因突变频率不变,表现出突变的选择特异性。以上说明 Carins 发现的适应突变现象有一定的普遍性。在研究鼠伤寒沙门氏菌嘌呤生物合成调控过程中,用我们自己构建的实验系统也观察到了适应突变现象,该实验系统是由 purR 超阻遏突变和 purG-lacZ 组成,该菌株在以乳糖为唯一碳源的平板上不能生长,但在延长培养时可不断的出现 lac⁺ 回复子,对这一新的实验系统及其适应突变的机理正在研究之中。

3 适应突变的可能机制

虽然适应突变现象已得到较多的实验支持,但产生的机理仍然不清楚,一些研究者依据已有的实验结果,提出了若干模型试图解释适应突变现象。

3.1 “超突变状态说”

Hall^[13]于 1990 年提出细胞饥饿可能诱发部分细胞呈极度可变状态。处在此状态的细胞的绝大多数因突变而死亡,但有一些获得了适应突变而快速生长从而逃脱极度可变状态。这个模型虽可部分解释在非致死选择条件下的适应突变现象,但最大的问题是按此假设则可预言饥饿亦应增加非选择基因的突变频率,但实验证明并非如此。

3.2 “多重突变说”

认为适应突变是多基因突变的结果^[14]。单一基因突变造就一个完整表型的机会甚小,而通常一次突变可能只能授予细胞少量表型特性,在培养期间,这种突变的积累最终形成正常的表型。这种多重突变观点也得到了部分学者的实验支持。

3.3 “反转录设想”^[1]

在选择条件下由于转录错误可产生各种变异,如果存在反转录酶,细胞便可通过反转录形成对生长有利的蛋白基因,这个设想得到以下事实的支持。首先,转录错误可产生变异的 mRNA,其次在许多的供试菌中可发现存在反转录酶(*E. coli*K12 中尚未发现),但目前缺乏跟踪变异体蛋白和测定有利 mRNA 序列方面的能力。

4 适应突变研究的重要性及其展望

适应突变现象的发现之所以受到特别关注,其重要性在于:(1)它将使过去近半个世纪来在学术界占主导地位的新达尔文主义关于突变随机发生的观点发生动摇;(2)适应突变普遍性及其分子机制的阐明可能为变异来源、突变机制、进化过程及其机制等重大生物学问题带来新的认识,新的观点,以至新的理论,将对生命科学的发展产生深刻的影响;(3)适应突变发生在非生长或缓慢生长细胞,对迄今人们涉足甚少的这一类突变的突变机制的阐明还将为揭示人类非生长体细胞的癌变机制带来曙光,这一理论基础研究有可能在攻克癌症保障人类健康中发挥巨大作用。

适应突变研究近十年来虽然有显著进展,但迄今尚未被人们广为接受,仍是一个有争议的问题,其主要原因有:(1)尚未找到控制适应突变的基因及其编码酶,如果这方面取得突破,那么对适应突变的其它各种解释就不复存在;(2)适应突变作为一种细胞功能其普遍性尚需要更多的实验支持。很显然离适应突变的最终阐明尚有许多挑战性的工作要做就。争论会继续下去,但在分子生物学如此发展的条件下,彻底揭开适应突变的奥秘为时已不会太遥远。

参 考 文 献

- [1] Carins J, Oorerbaugh J, Miller S. *Nature*, 1998, **335**:142~145.
- [2] Steele D F, Robertson S T. *Genetics*, 1992, **132**:9~21.
- [3] Lenski R E, Mittler J E. *Science*, 1993, **259**:188~194.
- [4] Michel G M, shapiro J A. *EMBO J*, 1994, **13**:5229~5239.
- [5] Foster P L, Cairns J. *EMBO J*, 1994, **13**:240~5244.
- [6] Shapiro J A. *Science*, 1995, **269**:285~286.
- [7] Harris R, Longeryl S, Rosenberg S M, *Science*, 1995, **264**:258~260.
- [8] Rosenberg S M, Longeryl S, Gee P *et al.* *Science*, 1995, **265**:405~407.
- [9] Galitski T, Roth J. *Genetics*, 1996, **143**:645~659.
- [10] Hall B G. *Genetics*, 1997, **145**:39~44.
- [11] Shapiro J A. *TIG*, 1997, **113**(3):98~104.
- [12] Kasak L, Horak R, Kivisaar M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **194**:3134~3139.
- [13] Hall B G. *Genetics*, 1990, **126**:5~16.
- [14] Lenski R E, Slatkin M, Avala F J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**:2775~2778.

ADVANCE OF ADAPTIVE MUTATION RESEARCH

Wang Aoquan

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

诚征科技项目和人才启事

广州生物工程中心是广州市科委直属的科研开发机构,本着深化科技体制改革精神,积极探索科技成果商品化、产业化之路,依靠科技,面向市场,政策优惠,机制灵活。现诚征具有良好市场前景并可进行产业化的生物技术相关领域的科技项目(产品)和科技开发带头人。

欢迎来函来电来人联系和有关单位及专家学者推荐。

单位地址:广州市海珠区荔福路 68 号 邮政编码:210250

联系电话:020-84411558, 84429992(传真)

联系人:林 津先生