

Bgl II 切割,由于这两个 DNA 分子具有相同的粘合末端,用连接酶很容易在体外重组。

此外,利用限制内切酶在体外重组的 DNA 杂种分子(真核或原核),可以通过遗传工程的手段在体内进行基因扩增,为 DNA 分子的结构功能研究提供取之不尽的原材料。

总之,限制内切酶作为一个核酸研究的工具,以组建 DNA 分子物理图谱为基础,在基因定位、顺序分析以及遗传工程各方面越来越显示出它的巨大作用。我们相信,随着对限制内切酶研究的深入和不断发现更多的新酶,一定会对核酸结构与功能的研究产生深远的影响。

参 考 文 献

[1] Takehiko Shibata et al.: *Biochem. Biophys.*

Acta. 42, 184, 1976.

- [2] Sharp, P. A. et al.: *Biochemistry* 12, 3055, 1973.
 [3] Roberts, R. J. *CEC Crit. Rev. Biochem.* 4, 123, 1976.
 [4] Smith, H. O. et al.: *J. Mol. Biol.* 51, 379, 1970.
 [5] Smith, D. I. et al.: *Nucleic Acid Res.* 3, 343, 1976.
 [6] Bickle, T. A. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 4, 2561, 1977.
 [7] Alistair, H. A. Bingham. et al.: *FEBS Letter* 76, 250, 1977.
 [8] Reiser, J. et al.: *Anal. Biochem.* 75, 555, 1976.
 [9] Parker, R. C. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 4, 1291, 1977.
 [10] Hutchison, C. A. et al.: *Nature* 251, 536, 1974.

[本文于 1977 年 12 月 13 日收到]

λ 噬菌体及其在遗传工程中的应用(一)

劳 为 德

(中国科学院生物物理研究所三室)

一、概 论

病毒是一类最简单的生物,它由核酸及包在其周围的蛋白质外壳组成。能够感染细菌的病毒称为噬菌体。

噬菌体吸附到细菌细胞壁的受体位点上,并将其核酸注入细胞,这就开始了“感染”。然后病毒基因以一定的时间顺序进行表达,复制自己的 DNA,合成其本身的各种成份,装配成新的噬菌体,并将宿主细胞摧毁,释放出上百个

新的噬菌体颗粒。这一过程源于一个噬菌体基因组,而以菌体裂解和新噬菌体的释放而告终,构成了经典意义的噬菌体生活周期。这就是通常所说的裂解周期(图 1)。

除了裂解作用外,有些噬菌体还有另一种过程,称为溶原周期。这就是噬菌体 DNA 注入细胞之后,并不马上复

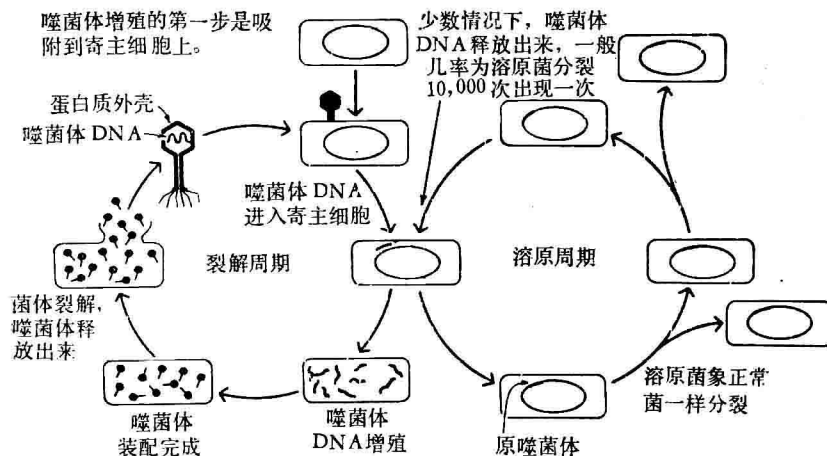


图 1 噬菌体的裂解周期和溶原周期示意图

制和表达,而是嵌入到宿主细胞染色体中去。嵌入的噬菌体 DNA 称为原噬菌体;而含有原噬菌体的细菌则称为溶原菌。一个由非溶原菌变为溶原菌的过程则称为溶原化。溶原作用的频率取决于温度、受体菌的状态、噬菌体和细菌的基因型等条件。

溶原作用和裂解作用均具备的噬菌体称为温和噬菌体;只有裂解作用而无溶原作用的噬菌体称为烈性噬菌体。

λ 噬菌体是一种温和的噬菌体。 λ 典型的噬菌斑是浊斑,因为它不全部杀死它所感染的细菌。形成浊斑的能力是由 *c I*, *c II*, *c III* 这三个基因决定的。基因 *c I* 单独就足以维持原噬菌体,但这三个基因都是有效的溶原作用所必需的。这些基因之所以称为 *c* 是因为它们是从形成亮斑的突变体鉴定出来的缘故。噬菌体嵌入染色体后,由 *cl* 基因产生一种蛋白(称为阻遏物)来防止噬菌体 DNA 的自主复制和功能表达,因此,它是溶原的主心骨,*c I* 蛋白也阻遏超感染的 λ 噬菌体颗粒的基因。所以溶原细胞对 λ 的重感染有特异的免疫性。

如果由于某种原因阻遏物停止其作用,原噬菌体就会进入裂解周期。这个过程包括原噬菌体从寄主染色体上割离下来, DNA 进行自主复制,形成噬菌体和溶菌。一般情况下,溶原菌能自发地进入裂解周期,它的几率是 1/1000,也即约一千个细胞世代中有一个细胞。因此培养液中就含有一些噬菌体颗粒,但溶原细胞对它们是免疫的。

噬菌体的形成也可以通过实验方法来诱发。例如,把溶原菌培养物进行紫外光照射,可以使几乎每一个细胞进入裂解周期。当原噬菌体在 *c I* 上带有一个使阻遏物对温度敏感的突变位点时,溶原菌在较低温度下可以正常生长,提高温度就会形成噬菌体。紫外诱导也可使阻遏物间接失活,因为

它既取决于细菌的基因(*recA*)又取决于阻遏物的结构。影响紫外诱导的突变(*recA*⁻,*c I ind*⁻)也降低噬菌体在溶原菌培养物中的自发生成。这两种突变对噬菌体的热诱导都没有影响。

噬菌体的嵌入与阻遏作用并非一回事。当噬菌体缺乏原噬菌体嵌入细胞染色体所必需的遗传成份(*int* 或 *att*)时,阻遏仍然可以确立,细胞能活下来。由于受阻遏的 DNA 不能自我增殖,所以每次细胞分裂,只遗传给一个子细胞。这种情况称为无效溶原(或流产溶原),相当于正常的前溶原期。

诱导噬菌体生成也可以是无效的。有些 *c I* 突变体的阻遏物稍作热处理即可能可逆地失活。这样,如果时间正好使原噬菌体割离,阻遏作用又建立起来,受阻遏的噬菌体 DNA 就不能随细胞增殖而复制,非溶原菌的子代就被矫正了。

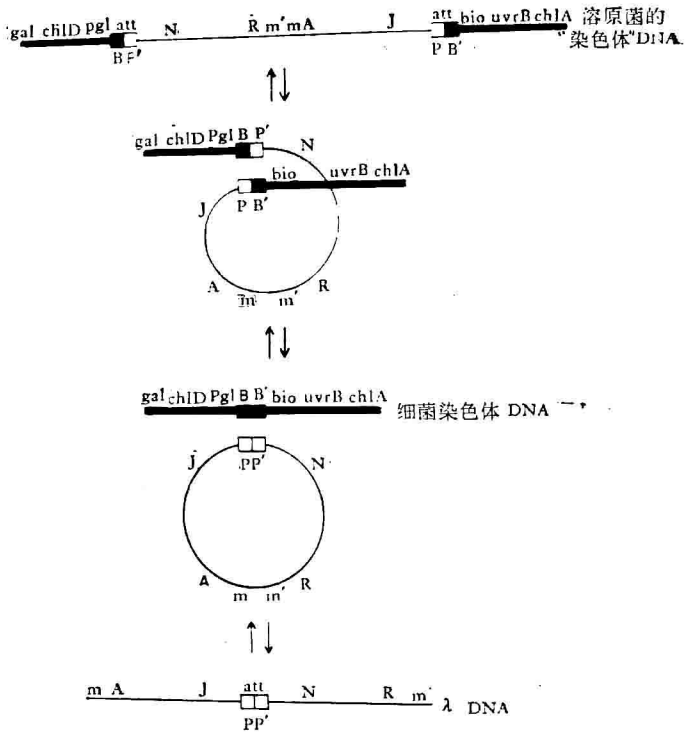


图2 λ DNA 在细菌“染色体”DNA上嵌入与割离 箭头所示的自下而上过程为嵌入步骤,自上而下为割离过程。A, J, N, R 为噬菌体基因, *attP*, *P* 和 *attB*, *B'* 分别为嵌入时噬菌体和细菌的附着。重组位点。m 和 m' 为 λ DNA 的末端。细菌的遗传符号: *gal* 是半乳糖代谢中酶系的三个基因的丛集点; *chlD*, *chlA* 是决定氯酸盐致敏的两个基因; *pgl* 为磷酸葡萄糖苷乳糖酶的结构基因; *bio* 是决定生物素合成的酶系的基因(至少有 5 个)的丛集点; *UvrB* 为耐受紫外光的基因

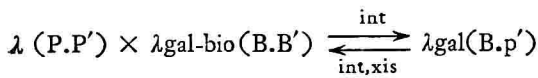
在特殊条件下, λ DNA 可作为不稳定质体由细胞携带。缺失突变体 λ dv 就是一例, 它的长度只有 λ 基因组的 15%。

总的说来, λ DNA 在细胞中可以两种互不相干的方式进行复制: 可以作为自主成分, 也可作为染色体的一部分。

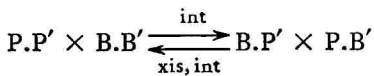
二、原噬菌体的嵌入与割离

原噬菌体的形成是通过 λ DNA 在专一位点上嵌入细菌染色体而实现的。图 2 是原噬菌体嵌入和割离的图解。下面一条线代表噬菌体连锁图的基因顺序, 上面的一条线代表带有嵌入原噬菌体的细菌染色体图。中间的圆圈即为两者连接的中间步骤。噬菌体和原噬菌体的形成分别要连接末端(m 和 m')及在专一位点(att)上重组。这就是所谓 Campbell 模型。这个模型的要点是: ①感染后, 噬菌体 DNA 通过末端连接从线性变为环状; ②在细菌染色体和噬菌体 DNA 的专一位点上进行一次相互重组, 噬菌体 DNA 即嵌入细菌染色体。这种位点称为 att, 意即附着 (attachment); 在噬菌体上的 att 位点称为 P.P'; 细菌 DNA 上的叫做 B.B'。

嵌入与割离需要 int 和 xis 基因编码的蛋白质进行催化:



$\times \lambda_{bio} (P.B')$ 或



如果将溶原菌进行诱导使之进入裂解周期, 绝大部分噬菌体就会有如图 2 所示的结构。极少部分所谓衍生颗粒(一般是 1/10⁵)则不然, 而是在噬菌体 DNA 上带有细菌基因取代的片段。这种情况是通过图 6 所示的所谓异常割离形成的。这样形成的噬菌体就是所谓的转导噬菌体(后详), 它们缺失了 λ 的基因, 因而有些功能就有缺陷。如果所缺失的功能是裂解周期所必需的话。噬菌体就不能形成噬斑。只要割离出来的 DNA 含有 mm' 区段(组成噬菌体 DNA 分子的末端), 它就有可能进入裂解周期,

但需要有一个条件, 就是在同一细胞中需要有正常的(辅助者) λ 来弥补失去的功能。它也能使细胞溶原化, 并作为原噬菌体存留下来。遗传上稳定的转导噬菌体株可以从转导体中筛选获得。

三、 λ DNA 的物理化学特性

λ 噬菌体颗粒重量为 57×10^6 道尔顿, DNA 含量约占 60%。DNA 为双链分子, 由噬菌体颗粒提取出的 DNA 为线形分子, 其钠盐的分子量为 30.8×10^6 , 相当于 47,000 碱基对, 电镜测量出的长度约 17 微米。

λ DNA 有一些很有价值的特点。这些特点对于研究其分子结构和基因功能, 基因表达的调控之间的关系是很有利的。这些特点是: (1)5' 端存在着碱基互补的单链末端; (2)在整个分子上, 碱基组份有显著的区域差异。现分别加以说明。

1. 粘性末端

将变性的 λ DNA 作复变处理, 就会得到两种分子, 在蔗糖梯度离心时, 它们都比天然 λ DNA 沉降得快, 这是由于 λ DNA 分子具有碱基互补的短单链末端, 复变后一种结果是同一分子的两个末端相互连接成环状分子; 另一种结果是两个或两个以上的分子尾对尾地接起来成连锁体。

单链末端已鉴定为 12 个碱序(见图 3), 它跟 λ DNA 的生物学活性很有关系: 如果将它补平(在离体条件下用纯的 DNA 多聚酶), λ DNA 就失去了感染能力。但是如果用大肠杆菌外切酶 III 作用, 则又恢复感染力。因为外切酶 III 作用在双链 DNA 的 3' 端, 因此粘性末端是 5' 端。外切酶 III 切去一个分子的 40 个碱基对, 其感染力恢复到最大。粘性末端两端都有同样的碱基数, 因此, 在离体条件下, 单独用连接酶就可

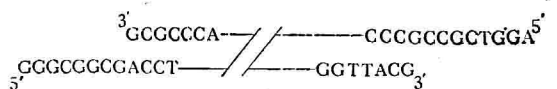


图 3 λ 噬菌体 DNA 3' 端和 5' 端的碱基顺序

以得到共价闭合的氢键环状分子。粘性末端键连起来形成环状分子,可能是跟DNA的复制以及原噬菌体嵌入有关。

一般的温和噬菌体都具有粘性末端。大肠杆菌噬菌体可以分成两类:即 λ 族和 P_2 族。 λ 族噬菌体包括 $\phi 80$, 21, 424, 434和82,它们可以被彼此重组,并在转化实验中可以彼此作为辅助噬菌体。另一族是 P_2 ,包括 P_2 和186,它们也可以彼此重组,但不能跟 λ 族的成员重组。各族中的噬菌体其粘性末端可以彼此粘合,但不同族的两种噬菌体其粘性末端没有反应。

2. 碱基组份的区域性差异

λ DNA分子中,GC含量和AT含量大致均为0.5的克分子比例。但在整个分子上的碱基组份是不均一的。有控制地将 λ DNA剪断成两半,经平衡梯度离心,可以把它们分开,一半GC对比较多,另一半AT对比较多,经遗传图定位,GC多的部分相当于遗传图上的左半部(55%GC)。

因为汞离子能可逆地跟DNA结合,而且是优先跟富于AT片段结合,结合汞离子后,实际上就增加了DNA在 Cs_2SO_4 中的浮力密度。因此可以根据其碱基组份将天然DNA群体分部分离。用这个方法可以把 λ DNA分成6个界线分明的片段,其相对GC含量在37%至57%之间。GC含量低的部分位于 λ DNA分子的中央,正好是原噬菌体嵌入时发生重组作用的区段。

另一个方法是将含有右侧末端的不同长度的 λ DNA片段进行沉降分离,然后根据浮力密度测出其每一部分的碱基组份。距离右侧末端一定距离的短片段可以从两个部分碱基组份的变化计算出来。结果如图4。

通过每一片段在转化实验中所贡献的遗传标志,可以作出其遗传定位,可以研究 λ 转录的顺序和复制起点。

此外,我们知道,变性的DNA可以跟核蛋白体RNA或富于鸟嘌呤的多体(polysome)[包括poly(G), poly(I,G), poly(A,G), poly(U,G)]形成复合物。这可能是由于C丛和G丛之间的

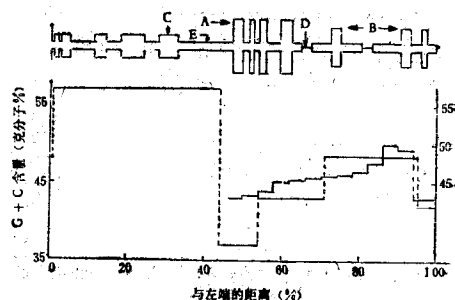


图4 λ DNA的G+C含量分布图

图上方为部分变性图。两条线的垂直距离的宽度表示A+T含量(即表示容易变性)的增加

氢键结合。不同的DNA其结合位点的分布都有其特征,而且其互补的链也很不对称,例如, T_7 DNA只有r链能跟poly(G)或poly(I,G)起作用。 λ DNA的两半链都跟(G)多聚物结合,但r链比l链多三倍¹⁾,根据poly(U,G)结合的不对称性,可以把DNA互补链分开。分离互补链的另一种方法是在碱性 $CsCl$ 上进行密度梯度离心。

应用poly(I,G)结合位点的方法,连同上述片段分部的方法,将野生型和缺失变种进行比较,可以知道结合位点最多的是在左臂。 λ DNA的r链上有9个poly(G)结合位点,其中7个均匀地分布在左臂的A-T之间,有两个是在右臂,一个在Q附近,另一个靠近P。l链上只有一个poly(G)结合位点,位于 λ 的62%长度的地方(基因xis和exo之间),poly(G)不跟 λ DNA的右侧粘性末端起作用,尽管它含有6个C和4个G。

λ DNA中,只有C丛能作为转录模板。因此人们认为噬菌体在转录时可能起着促进子或终止符的某种识别位点的作用。

链分离的方法也常用来制作 λ DNA的实体图。将野生型噬菌体和缺失突变体DNA作

1) 关于r链和l链的命名:按照常规的 λ 图,l链是向左转录的那条链,也就是左端为5'G的链。跟r链相比,l链在碱性氯化铯上密度较大,在 $CsCl$ -poly(U,G)上密度较小,有人称为W链,也有称II或H链,还有人称L链。r链是向右转录的链,右端含有5'A,同样地,有人称为C,I或L和H链。在画图时,若将线型图变为环状图,一般向左的为反时针,向右的为顺时针。

变性处理用离心方法分离出 l 链和 r 链,然后将一种噬菌体的 l 链跟另一种噬菌体的 r 链复变成杂双链分子。由于碱基同源互补,除缺失的部位外,可以形成双螺旋结构,而未配对的单链部分则形成一种“凸起”,测量这个部位的位

置和长度,便可制出 λ 基因组的实体图。显然,这种方法也可以比较各种噬菌体 DNA 的同源性。

(待续)

生物磁学的发展和应⤵用(下)

李 国 栋

(中国科学院物理研究所)

三、生物磁学在医药学上的应用

天然磁石在医药上的应用已有两千年以上的历史。毛主席曾经指出:“中国医药学是一个伟大的宝库,应当努力发掘,加以提高”。磁学在这方面的应用也是这一宝库中的一项重要财富。从远古发展到现在,生物磁学在医药学各方面的应用已相当广泛,这里简略介绍磁场疗法、磁性药物、磁诊断术、磁手术和磁医疗器械等方面的应用情况。

1. 磁场疗法(磁疗)

这是指在人体的一定部位(经穴或患处)施加磁场治疗多种疾病的医疗方法,简称“磁疗”。也有称为“磁穴疗法”或“经络磁场疗法”的。这种磁疗方法虽从古代起就有应用,但并不很普遍,在我国文化大革命以后,广大科技工作者和医务工作者解放思想,大力协作,采用新的高性能永磁材料(如稀土-钴永磁体),经过大量医疗实践,才获得了良好的效果。根据湖南、北京、江苏、徐州等地一些单位的资料,磁场疗法目前已能治疗疼痛病、高血压、神经衰弱、失眠、神经性皮炎、气喘性支气管炎、类风湿性关节炎、慢性腹泻、肥大性脊椎炎和心绞痛等 50 余种疾病,综合几千病例的临床试验统计,磁疗的有效率达到 70—90%。而且,磁疗还在不断地向前发展,例如,目前除大量采用的恒定磁场疗法外,还开展了旋转磁场疗法和交变磁场疗法;

除永磁体的敷贴外,还试验了磁针埋人体内、磁带等新的技术。由于磁场疗法的材料简便且可多次使用,操作技术较易掌握和推广,适用的病症范围较为广泛,疗效较为显著,一般副作用很少,这些优点使磁场疗法在我国有着极为广阔的发展前途,成为落实“把医疗卫生工作的重点放到农村去”的指示的一项有力措施。国外也有报道用钕铁氧体作磁手镯和磁床等,用以治疗高血压、支气管哮喘和消除疲劳,以及用钕铁氧体抑制恶性肿瘤生长。磁场疗法的作用机制虽还未解决,但也有了一些初步的探索和尝试。

2. 磁性药物和磁化水

利用天然磁石作为内服药物治疗病,不论在我国和国外都已有悠久的历史。目前,我国药典上还有磁石及数种以磁石为重要成分的成药(表 1)。这些药物是我国劳动人民在长期同疾

表 1 我国有关利用磁石的药物

名 称	主 要 成 分	功 能	主 治
磁石	煅磁石(加热后于醋中淬酥,再煅碎)	潜阳,纳气	头目眩晕,耳鸣,耳聋,虚喘
耳聋左慈丸(蜜丸)	煅磁石、牡丹皮、茯苓等 8 种	滋肾、和肝	肾虚肝郁,耳鸣失聪,头暈目眩
紫雪(散)	生磁石、黄金、犀角、麝香等 17 种	镇静、安神、清心开窍	烦热不解,神昏谵语,发斑发狂,小儿惊风
磁珠丸(糊丸)	煅磁石、朱砂、神曲 3 种	镇心,去翳	心悸怔忡,惊悸失眠,内障膜物障瞳