

維生素B₁₂对大腸杆菌β-半乳糖 苷酶合成的作用*

郑幼霞

(中国科学院植物生理研究所微生物室, 上海)

Davis 和 Mingioli^[1], Gibson 和 Woods^[2], Kisluk 和 Woods^[3], Kisluk^[4] 等在大腸杆菌維生素 B₁₂ 缺陷型变种的研究中, 指出 B₁₂ 与甲硫氨酸的合成有关, 能使同型半胱氨酸甲基化而形成甲硫氨酸; Kitay^[5] 等发现維生素 B₁₂ 能代替 *Lb. leickmannii* 生长时所需的核苷酸; Beck^[6] 等工作指出 B₁₂ 参与核酸的生物合成; Wagel^[7] 等利用患 B₁₂ 缺乏症的大白鼠肝脏的无細胞制品作材料, 发现 B₁₂ 能促进标记氨基酸参入到蛋白質的部分。因之推測 B₁₂ 与蛋白質的合成有关系。我們利用大腸杆菌 B₁₂ 缺陷型变种研究 β-半乳糖苷酶的合成, 主要目的在观察 B₁₂ 除了促使甲硫氨酸的合成外, 它与蛋白質合成的关系。

一、材料与方 法

菌株 *Escherichia coli* K₁₂M-1, 需甲硫氨酸或 B₁₂ 才能生长。

培养基 采取 Anderson^[8] 的 M-9 合成培养基, 含葡萄糖 0.5%; NH₄Cl 0.1%; Na₂HPO₄ 0.6%; KH₂PO₄ 0.3%; NaCl 0.5%; MgSO₄ · 7H₂O 0.01%; D-1 甲硫氨酸 75 微克/毫升 (B. D. H.)。在个别試驗中以維生素 B₁₂ (0.5 毫微克/毫升) 代替甲硫氨酸。葡萄糖与氨基酸, 維生素均在分别灭菌后加入。

培养条件与生长测定 在肉湯琼脂斜面上培养 16 小时的細菌, 用生理盐水洗下, 洗滌 1 次后做成悬液, 約含細菌数 10⁸/毫升, 接种 0.2 毫升到 10 毫升的培养基內, 在 37°C 行振蕩培养。用 Dr. B. Lang 光电比色計(波长 660 mμ)测定混浊度以表示細菌的生长。

β-半乳糖苷酶的測定 参照 Lederberg^[9] 的方法測定 β-半乳糖苷酶, 酶的活力单位指每毫升測定液中, 起始 15 分钟能水解 0.01 微克分子的 β-邻位硝基酚半乳糖苷即为 1 单位。β-邻位硝基酚半乳糖苷参照 Seidman 和 Link^[10] 的方法合成。

細菌細胞內游离氨基酸的分析 細菌在含有 1 微克/毫升甲硫氨酸的培养基中生长 15 小时后, 离心, 先后以生理盐水及蒸餾水各洗滌 1 次, 然后混悬于 5 毫升蒸餾水中, 在 100°C 水浴上加热 10 分钟, 立即冷却, 离心, 吸出上清液, 加入乙醇使达 80% 含量, 置于水箱中过夜, 离心除去沉淀, 将上清液真空干燥, 然后溶于少量蒸餾水中, 进行氨基酸的紙层析。先以測定样品經 Whatman 3 号滤紙单相层析 1 次, 使氨基酸分离, 除去样品中的部分盐分, 然后参照 Dent^[11] 的方法, 将氨基酸再以 Whatman 1 号滤紙, 10×10 厘米, 进行双相层析。

甘氨酸-1-C¹⁴ 参入 β-半乳糖苷酶的測定 細菌在含甲硫氨酸的培养基中生长 12 小时, 离心, 用不含碳源的合成培养基洗滌 2 次, 然后将細菌悬置在这种无碳源培养基中, 使每毫升約含 0.3 毫克干重的

* 本研究是在沈善炯教授指导下进行, 朱家璧、王家駒同志参加部分实验工作。

本文 1963 年 2 月 4 日收到。

細菌,然后以 500 毫升的細菌悬液,加入 0.1% 的乳糖与 50 微居里的甘氨酸- $1-C^{14}$, 分别进行下列的保温試驗:(1)加甲硫氨酸 75 微克/毫升。(2)加 B_{12} 0.5 毫微克/毫升。(3)甲硫氨酸 75 微克/毫升与 B_{12} 0.5 毫微克/毫升。保温 90 分钟后,經低温离心,以 0.01 M 磷酸缓冲液, pH 7.3, 洗滌細菌 2 次,悬置在磷酸缓冲液中使成糊状,加約 3 倍菌体湿重的玻璃粉,在冰浴上研磨 30 分钟,离心,吸出上清液,加入 10% 鏈霉素溶液 1/10 体积,于冰箱放置过夜,經 15000 rpm 离心 5 分钟后,除去核蛋白沉淀,上清液加硫酸銨至 65% 飽和度,15000 rpm 离心 10 分钟,将所得沉淀溶于 1 毫升水中,对 0.01 M 磷酸缓冲液, pH 7.3, 透析 18 小时,然后参照 Smith^[12] 的方法进行淀粉电泳,将酶进一步的純化;淀粉电泳时采取焦磷酸缓冲液 0.025 M, pH 8.5, 电压 360 伏,电流 8 毫安,温度 4℃,电泳时间 11 小时;电泳完毕后,将淀粉块切成小段,每段 1.0 厘米,放置于 10×1.5 厘米的离心管中,加 2 毫升磷酸缓冲液 (0.01 M, pH 7.3), 攪匀后,离心,使之澄清,吸出上清液,測定蛋白質^[13], β -半乳糖苷酶活力及放射脉冲数。

二、实验结果

(一) 大腸杆菌 $K_{12}M-1$ 代謝过程的阻塞部位

甲硫氨酸是这个細菌生长所必需的,半胱氨酸、胱硫醚及同型胱氨酸都不能代替甲硫氨酸,但 B_{12} 能代替甲硫氨酸使細菌生长,在 B_{12} 上生长的細菌,它的生长延緩期一般要比在甲硫氨酸上生长的延长 2 小时左右(图 1)。

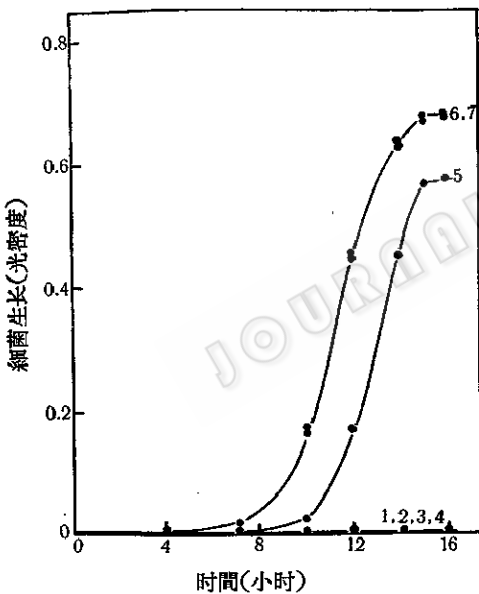


图 1 大腸杆菌 $K_{12}M-1$ 的生长

1. 对照; 2. 加半胱氨酸, $5 \times 10^{-4} M$; 3. 加胱硫醚, $2.5 \times 10^{-4} M$; 4. 加同型胱氨酸, $2.5 \times 10^{-4} M$; 5. 加 B_{12} , 0.5 毫微克/毫升; 6. 加甲硫氨酸, $5 \times 10^{-4} M$; 7. 加 B_{12} 与甲硫氨酸。

将細菌培养在每毫升含 1 微克甲硫氨酸的培养基上,使細菌能开始最低量的生长。这样培养 12 小时后,收集細菌,測定其細胞內的游离氨基酸,发现有胱硫醚及同型半胱氨酸的堆积。这时如果在培养基中加入 0.5 毫微克/毫升的 B_{12} ,繼續保温 2 小时,細菌細胞內胱硫醚及同型半胱氨酸的含量减少,相应的产生了甲硫氨酸。这說明 B_{12} 有促进上述两种氨基酸轉变成甲硫氨酸的作用(图 2)。根据上述两个試驗的結果,可以說明这个菌株实质上是属于 B_{12} 的营养缺陷型,因为失去了合成 B_{12} 的能力,所以影响了甲硫氨酸的合成,与 Davis 等所报告过的一些需要甲硫氨酸或 B_{12} 才能生长的变种相同。

(二) B_{12} 对誘导酶合成的作用

将生长 12 小时的細菌洗滌后,悬置在含乳糖的培养液中,进行保温,发现有微弱的 β -半乳糖苷酶活力产生,加入甲硫氨酸或 B_{12} 后,这种誘导酶的合成能力就开始增加;如果同时加入甲硫氨酸与 B_{12} 时,誘导酶的形成就显著提高(图 3a)。同时发现在誘导系統中如有 B_{12} 存在时,甲硫氨酸的作用可以被同型胱氨酸所代替。說明 B_{12} 有促使后者变为甲硫氨酸的作用。但是, B_{12} 对这种誘导酶合成的作用,似并不仅由于对甲硫氨酸形成的关系,因为我們曾經試驗加入不同量的甲硫氨酸来观察酶的合成,发现当甲硫氨酸的量从 20 微克增加到 150 微克/毫升,均不能象甲硫氨酸

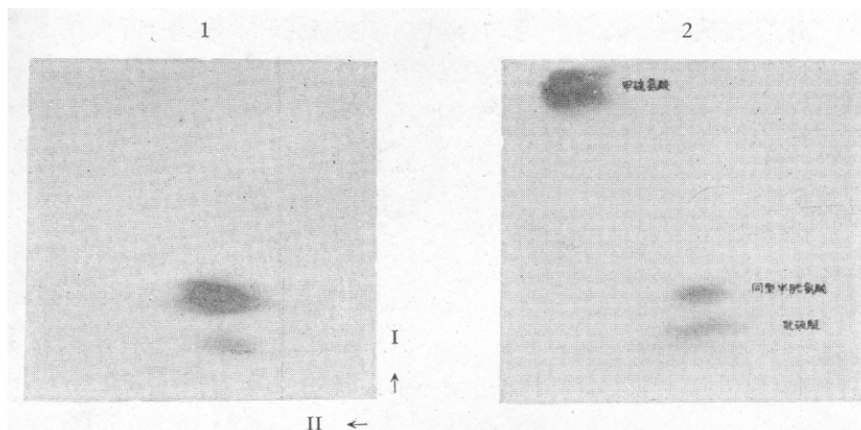


图 2 大肠杆菌 K₁₂M-1 细胞内游离氨基酸纸层析图谱

(1) 在含甲硫氨酸 1 微克/毫升的合成培养基中生长 12 小时的细菌; (2) 在含有甲硫氨酸 1 微克/毫升的合成培养基中生长 12 小时后再加入 0.5 毫微克/毫升的 B₁₂, 继续保温 2 小时的细菌。

溶剂: 第一相 正丁醇: 蚁酸: 水 = 75:15:10 第二相 酚: 水 = 80:20。

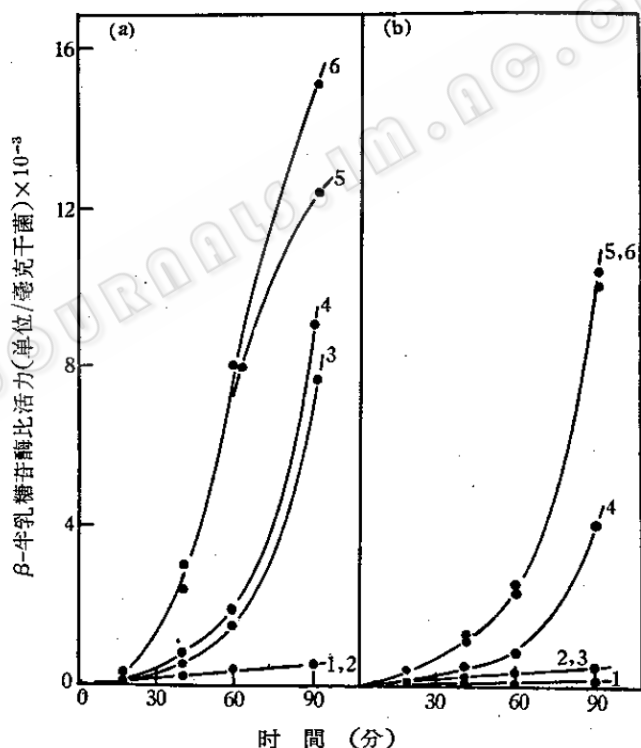


图 3 甲硫氨酸与 B₁₂ 对大肠杆菌 K₁₂M-1 β -半乳糖苷酶合成的作用比较

(a) 细菌在含甲硫氨酸 75 微克/毫升的合成培养基中生长 12 小时, 离心, 细胞经过洗涤, 悬置在沒有碳源的合成培养基中, 含细菌数约为 10^8 /毫升。诱导系统: 细菌悬液 8 毫升, 乳糖 1 毫升 (10 毫克/毫升) 在加入下列各化合物后, 总体积以水补充至 10 毫升。

1) 对照; 2) 加同型胱氨酸 $2.5 \times 10^{-4}M$; 3) 加 B₁₂ 5 毫微克; 4) 加甲硫氨酸 $5 \times 10^{-4}M$; 5) 加同型胱氨酸和 B₁₂; 6) 加甲硫氨酸和 B₁₂。

(b) 细菌在含甲硫氨酸 75 微克/毫升的合成培养基中生长 12 小时, 离心, 细胞经过洗涤, 悬置在沒有甲硫氨酸的新鲜合成培养基中, 继续培养 3 小时, 使细菌成甲硫氨酸饥饿状态, 离心, 细胞经过洗涤, 悬置在沒有碳源的合成培养基中, 细菌数及保温系统均同(a)。

1) 对照; 2) 加 B₁₂, 5 毫微克; 3) 加同型胱氨酸, $2.5 \times 10^{-4}M$; 4) 加甲硫氨酸, 5×10^{-4} ; 5) 加同型胱氨酸和 B₁₂; 6) 加甲硫氨酸与 B₁₂。

与 B_{12} 同时存在那样,有效地提高诱导酶的合成作用。在另一试验中,将细菌悬置在不含甲硫氨酸的合成培养基中,经过 3 小时保温,使成甲硫氨酸饥饿状态,然后再进行诱导酶的试验。发现经过这样处理的细菌,只有给以甲硫氨酸才能合成诱导酶,而 B_{12} 不能代替甲

硫氨酸的作用,说明甲硫氨酸是酶的合成所必需的。但是,在这个试验中,我们仍然发现这个现象,即在诱导系统中,当 B_{12} 与同型胱氨酸或 B_{12} 与甲硫氨酸同时加入时,细菌形成诱导酶的能力,要比单独增加甲硫氨酸的浓度为有效(图 3b)。

(三) α -硫代尿嘧啶的抑制作用

在酶的诱导系统中,仅加入甲硫氨酸, α -硫代尿嘧啶有抑制酶合成的作用,如果诱导系统中加入 B_{12} 代替甲硫氨酸,发现仅在诱导开始 30 分钟内有抑制现象。但是如果将甲硫氨酸与 B_{12} 同时加入诱导系统,那么 α -硫代尿嘧啶对诱导酶合成的抑制作用,开始时与甲硫氨酸单独存在时相似,但 60 分钟后,就恢复到与不加 α -硫代尿嘧啶系统中的酶合成速率相近,因之 B_{12} 似有抵制 α -硫代尿嘧啶对酶合成的抑制作用(图 4)。

(四) 诱导酶的合成与甘氨酸-1- C^{14} 的参入

为了了解 B_{12} 与甲硫氨酸对 β -半乳糖苷酶合成的作用,将培养 12 小时菌龄的细菌做成悬液,加入乳糖与甘氨酸-1- C^{14} ,象

上述试验一样,分成 3 组;分别加入甲硫氨酸、 B_{12} 、甲硫氨酸与 B_{12} 。保温 90 分钟后,收集细菌,经洗涤后做成细胞抽出液,加链霉素除去核蛋白,再经硫酸铵沉淀,获得酶的粗制备。再经过淀粉电泳,将酶进一步的纯化,测定甘氨酸-1- C^{14} 的参入与酶形成的关系。结果指出,在诱导系统中有甲硫氨酸或 B_{12} 存在时,诱导酶的合成与甘氨酸-1- C^{14} 的参入酶蛋白的情形是符合的,说明二者有促进细胞内源物质合成蛋白质的现象。当二者同时加入诱导系统后,甘氨酸-1- C^{14} 参入酶蛋白的程度增加,值得注意的是酶的比活力大大提高(图 5)。从图 5 还可以看到在酶的诱导系统中加入 B_{12} 或者甲硫氨酸加 B_{12} ,甘氨酸-1- C^{14} 参入非酶蛋白质部分亦较单加甲硫氨酸有所增加。

三、讨 论

总结上列试验的结果,本实验所用的大肠杆菌菌株,主要由于缺乏合成 B_{12} 的活力,因之需要有甲硫氨酸或 B_{12} 的供给才能生长。前人已有许多的工作指出,一些氨基酸或核酸

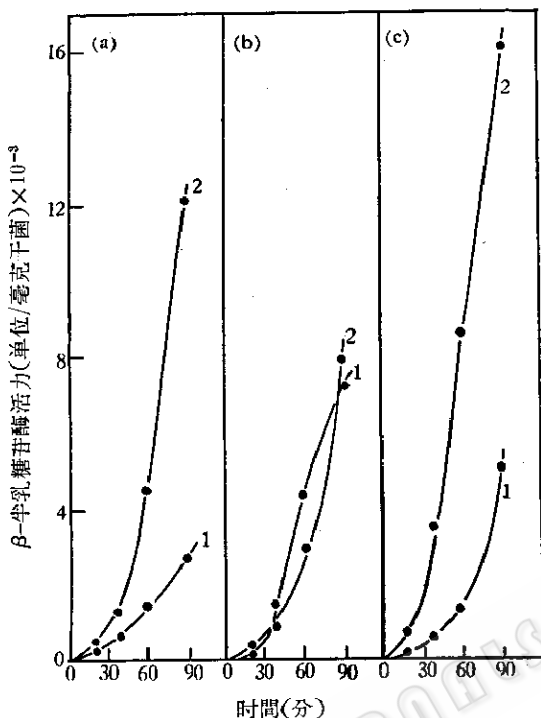


图 4 α -硫代尿嘧啶对大肠杆菌 $K_{12}M-1$ 变种合成 β -半乳糖苷酶的抑制作用

诱导系统如图 3 说明

(a) 加甲硫氨酸, 75 微克/毫升; (b) 加 B_{12} , 0.5 毫微克/毫升; (c) 加甲硫氨酸与 B_{12} 。

(1) 加 α -硫代尿嘧啶 0.5 毫克/毫升;

(2) 无 α -硫代尿嘧啶。

的細菌变种必須有它生长所需的物質,也就是它所不能合成的物質存在时,才能合成誘导酶。从我們的試驗中指出,这个 B₁₂ 缺陷型变种,在合成 β-半乳糖苷酶时,需要甲硫氨酸或 B₁₂ 的供給,但是如果將細胞預先經過保温,使成甲硫氨酸飢餓状态,誘导酶的合成仅需要

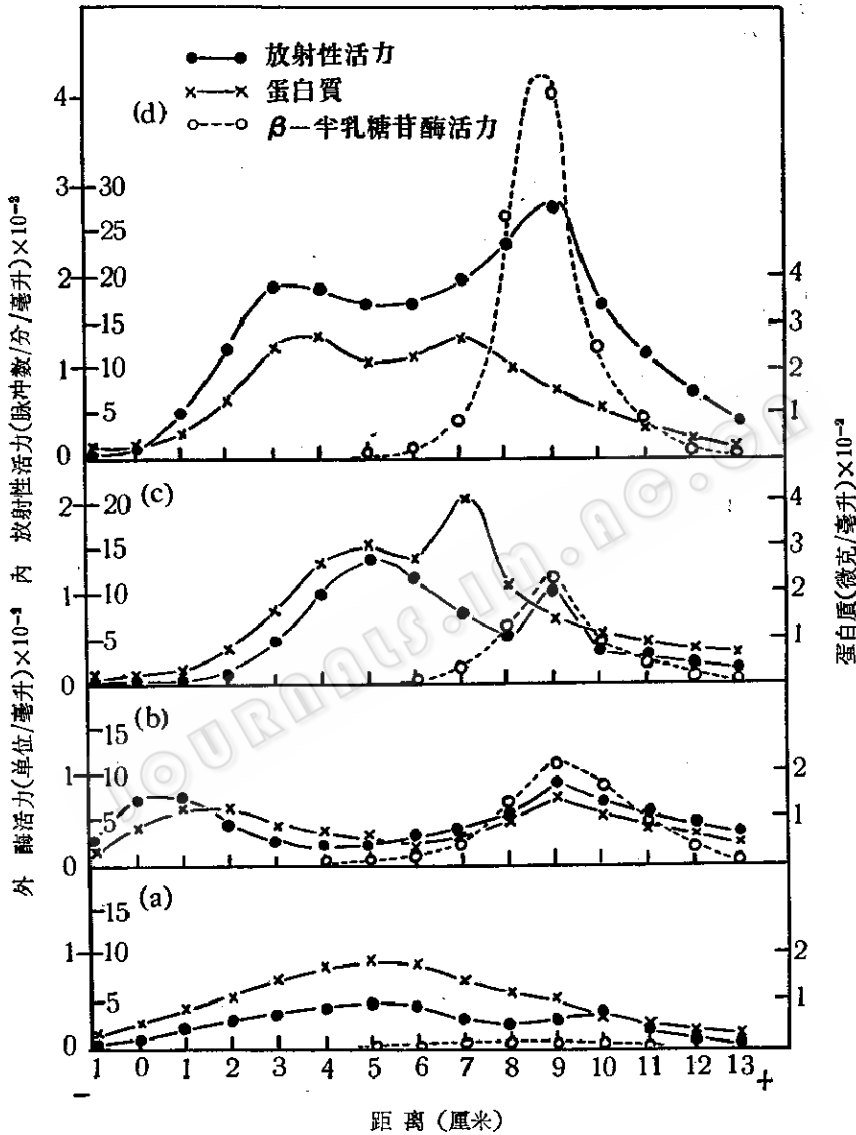


图5 β-半乳糖苷酶粗制备在淀粉电泳中的洗提图型

誘导系統：細菌在含甲硫氨酸的合成培养基中生长 12 小时后,經過洗滌,懸置在沒有碳源的合成培养基中,每毫升含細菌数約为 10⁹,乳糖 1 毫克,甘氨酸-1-C¹⁴ 0.1 微居里,37°C 保温 90 分钟。

(a)对照; (b)加甲硫氨酸; (c)加 B₁₂; (d)加甲硫氨酸和 B₁₂。

甲硫氨酸,而 B₁₂ 沒有作用,这一点說明,甲硫氨酸才是促使酶合成的主要物質。未經甲硫氨酸飢餓的細菌, B₁₂ 所以能引起酶的合成,主要因为細菌体内除了一部分內源甲硫氨酸外,尚有同型半胱氨酸的堆积,加入 B₁₂ 后,后者經甲基化反应而成甲硫氨酸,二者相加,其量足以引起誘导酶的合成。因此,当甲硫氨酸飢餓后,由同型半胱氨酸轉变成甲硫氨酸的

量就不足以引起诱导酶的合成, B_{12} 就失其作用。但是 B_{12} 除了通过形成甲硫氨酸间接有效于酶的合成外, 尚表现其本身对酶合成的作用。因为不论在正常或甲硫氨酸饥饿状态的细菌, 如果在供给甲硫氨酸时, 同时加入 B_{12} , 从测定酶的活力来看, 酶的合成要比单独供给甲硫氨酸的高得多, 我们曾经试验增加甲硫氨酸的浓度, 但不能使 β -半乳糖苷酶的合成, 象甲硫氨酸与 B_{12} 同时存在时那样增加。因此, B_{12} 对诱导酶的合成有它和甲硫氨酸不同的作用。

在诱导酶合成过程中, 应用甘氨酸-1- C^{14} 的参入酶蛋白的情形, 来分析甲硫氨酸与 B_{12} 对酶合成的作用, 结果指出, 甲硫氨酸与 B_{12} 同样能促使诱导酶的合成。因为在这个试验中, 细菌细胞未经预先保温处理, 细菌细胞内有内源甲硫氨酸存在, 单独加入 B_{12} 时, 有可能使内源同型半胱氨酸转变成甲硫氨酸, 因此增加了甲硫氨酸的含量, 而促使诱导酶的合成。但是从第 3 组的试验中, 有甲硫氨酸与 B_{12} 同时加入时, 发现一方面甘氨酸-1- C^{14} 的参入增加, 表示 β -半乳糖苷酶的合成增加, 更显著的是酶的活力大大提高, 远超出因为增加了酶的合成而理应增加的酶的活力的倍数, 也就是酶的比活力显著的提高。根据这些试验, 可以看出 B_{12} 的作用不仅仅在于促进同型半胱氨酸甲基化而转变成甲硫氨酸, 它还能促进蛋白质的合成。除此以外, B_{12} 可能对于酶蛋白也有激活的作用, 这一点 Dubuoff^[1] 在以大肠杆菌 113-3 菌株为材料所作的研究中, 曾经指出过。

从 α -硫代尿嘧啶抑制 β -半乳糖苷酶的合成中, 也可以看出, 由于诱导系统中 B_{12} 与甲硫氨酸的存在, 它们所表现的抑制作用不一样, 当 B_{12} 存在时, α -硫代尿嘧啶的抑制作用不明显, 是否由于 α -硫代尿嘧啶仅能抑制酶的合成, 而不能抑制 B_{12} 对酶的激活作用, 或者 B_{12} 有抵消 α -硫代尿嘧啶对酶合成的抑制作用, 但是为什么在诱导酶的合成过程中, B_{12} 单独存在时 α -硫代尿嘧啶的抑制作用小, 而与甲硫氨酸同时存在时, 抑制作用较大? 这些问题目前尚无法回答。

四、摘 要

(一) 大肠杆菌 *Escherichia coli* K₁₂M-1 的营养试验及细菌细胞内游离氨基酸变化的分析, 确定为维生素 B_{12} 缺陷型变种。

(二) 在诱导形成 β -半乳糖苷酶时, 甲硫氨酸为其必需的物质, 如果同时加入 B_{12} , 则形成诱导酶的活力显著提高。

(三) 当有甲硫氨酸存在于诱导系统中时, α -硫代尿嘧啶有抑制大肠杆菌 K₁₂M-1 菌株对 β -半乳糖苷酶合成的作用, 以 B_{12} 代替甲硫氨酸, 这种抑制作用不明显, 如果甲硫氨酸与 B_{12} 同时加入, 则 B_{12} 有抵制 α -硫代尿嘧啶对酶合成的抑制作用。

(四) 应用标记甘氨酸-1- C^{14} 作试验, 分析甲硫氨酸与 B_{12} 对 β -半乳糖苷酶合成的作用, 结果指出, 甲硫氨酸或 B_{12} 均能增加甘氨酸-1- C^{14} 的参入。如 B_{12} 加入到含有甲硫氨酸的诱导系统中, 则酶比活力较甲硫氨酸或 B_{12} 单独存在时为高。

参 考 文 献

- [1] Davis, B. D. & Mingoli, E. S.: *J. Bacteriol.*, **60**, 17, 1950.
- [2] Gibson, F. & Woods, D. D.: *Biochem. J.*, **74**, 160, 1960.
- [3] Kisluik, R. L. & Woods, D. D.: *Biochem. J.*, **75**, 467, 1960.

- [4] Kisliuk, R. L.: *J. Biol. Chem.*, **236**, 817, 1961.
- [5] Kitay, E., MucNutt, W. S. & Snell, E. E.: *J. Bacteriol.*, **59**, 727, 1950.
- [6] Beck, W. J., Coulman, M. & Hook, J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **55**, 470, 1962.
- [7] Wagel, S. R., Metha, R. and Johnson, B. C., *J. Biol. Chem.*, **230**, 137, 1958.
- [8] Anderson, E. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **32**, 120, 1946.
- [9] Lederberg, J.: *J. Bacteriol.*, **60**, 381, 1950.
- [10] Seidman, M. & Link, K. P.: *J. A. C. S.*, **72**, 4324, 1950.
- [11] Dent, C. E. & Stepha, W.: *Nature*, **160**, 682, 1947.
- [12] Smith, I.: Chromatographic and electrophoretic techniques. 2: 91.
- [13] Lowry, O. H.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [14] Dubuoff, J. W.: *Fed. Proc.*, **12**: 198, 1953.

THE EFFECT OF VITAMINE B₁₂ ON SYNTHESIS OF β -GALACTOSIDASE BY *ESCHERICHIA COLI*

CHENG YOU-HSIA

(Laboratory of Microbiology, Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai.)

Escherichia coli K₁₂M-1 which required either methionine or vitamine B₁₂ for growth was verified as a B₁₂ dependent mutant.

Methionine was essential to the inductive formation of β -galactosidase. B₁₂ exerted a remarkably stimulant effect on the enzyme synthesis only if methionine was present in the system.

Synthesis of β -galactosidase was inhibited by 2-thiouracil and the inhibition was decreased when B₁₂ was added to the induction system.

The incorporation of glycine-1-C¹⁴ into the enzyme protein was investigated during the enzyme synthesis. It has been found that both methionine and B₁₂ were effective to increase its incorporation. The most impressive feature was that the specific activity of enzyme appears to be increased when B₁₂ was administrated to the induction system in the presence of methionine.