

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 链霉素座位的自发突变*

童克忠 李明鳳

(中国科学院遗传研究所, 北京)

细菌的依赖链霉素突变系统, 其突变和回复突变都容易作定量测定, 近来对链霉素的作用机制也有愈来愈多的了解^[1-6], 所以得到遗传学家的重视^[7-13]。不过在已经报导的若干依赖链霉素突变系统中, 其回复突变都不是真正的回复突变^[10, 14, 15]。在枯草杆菌中, 也可分离到大量的依赖链霉素突变体^[16, 17]。而且在枯草杆菌中, 既可进行转化^[18, 19], 又可进行转导^[20], 便于进行遗传学分析。在枯草杆菌中, 关于依赖链霉素突变的遗传学研究, 据作者们所知, 尚无详细报导^[16, 17, 21, 22]。在本文中, 报导了关于枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 链霉素座位自发突变的实验结果, 并且用转化分析的方法, 研究了在本实验菌株中, 依赖链霉素突变体的回复突变, 是不是真正的回复突变。

材料与 方法

菌株 主要实验菌株是由北京农业大学赠送的枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) ATCC 6633 (以前称为 6633^[16, 17, 19]) 菌株的一个自发突变体^[16, 17], 对红霉素 (10 微克/毫升) 和地霉素 (4 微克/毫升) 抵抗, 对 Sm (1 微克/毫升) 敏感; 在肉汤洋葱培养基上菌落光滑; 在 Burkholder 等^[23]和 Ivánovics^[24] 的基本培养基上都可生长; 经过多次单菌落纯化。另外由卫生部生物药品检定所赠送枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) ATCC 6633 一株, 在肉汤洋葱培养基上菌落粗糙, 对 Sm 敏感。为了便于区别, 将前者名之为 ATCC 6633 ET, 简称 ET; 后者仍用原名, 简称 6633。枯草杆菌可转化的受体菌株 Ki-2^[19] 也曾用过, 由于在 Ki-2 中未曾分离到依赖链霉素突变体, 所以只用作转化实验的受体菌株。

培养基 肉汤培养基: 肉膏 1%; 蛋白胨 1%; 氯化钠 0.5%; pH 6.8—7.0。如用固体培养基, 则加入 2.5% 的洋菜。

基本培养基: 分别按 Burkholder 等^[23]和 Ivánovics^[24] 的方法配制。

链霉素 用链霉素硫酸盐, 华北制药厂出品, 先用无菌水配成 10,000 微克/毫升的链霉素溶液, 在冰箱中保存备用。保存时间不超过一周。临用时用磷酸缓冲液盐水稀释。

磷酸缓冲液盐水 磷酸缓冲液 (0.02M, pH 7.2) + NaCl (0.85%)

* 本文是中国科学院遗传研究所和中国科学院微生物研究所合作进行的研究工作报告, 由微生物研究所相望年教授指导。

遗传研究所彭德兴同志参加全部工作, 汤懋斌、金振华、莫鑫泉等同志参加部分工作; 本文所有数理统计部分, 承中国科学院生物物理研究所杨纪珂教授提供宝贵意见, 并详加校正。作者谨表深切谢意。

本文采用下列简写: Sm, 链霉素硫酸盐; Sm^D, 依赖链霉素突变(体); Sm^r, 抗链霉素突变(体); Sm^s, 链霉素敏感(株); DNA, 脱氧核糖核酸。

本文 1965 年 2 月 22 日收到。

实 验 结 果

(一) 依赖链霉素突变体的分离

将 ET 或 6633 由新鲜的斜面培养接种在肉汤培养基中,在 37℃ 振荡培养过夜,再接在肉汤培养基中,在 37℃ 振荡培养 16 小时。离心收集菌体,悬浮于原容积 1/10 的磷酸缓冲液盐水中。取一部分经适当倍数稀释,在肉汤洋菜培养皿上计数总活菌数;其余则每次取 0.1 毫升,涂布在含有 40 微克 Sm/毫升的肉汤洋菜培养皿上,置 37℃ 培养。48 小时后,只有链霉素突变体仍能存活并形成菌落。取此突变体菌落在含有和不含 40 微克 Sm/毫升的肉汤洋菜培养皿上影印培养或划种,在 37℃ 培养 16—24 小时。凡在含有 Sm 的培养基上能够生长而在无 Sm 的培养基上不能生长者为 Sm^D ; 在两种培养基上都能生长者为 Sm^r 。经过百余次实验,按上法分离的突变体中,90% 以上、甚至全部都是 Sm^D , Sm^r 只占 10% 以下。在一般条件下, Sm^D 的突变频率在 10^{-9} 左右,但如培养条件改变,则可以有相当大的变动(见下)。

在含有 40 微克 Sm/毫升的肉汤洋菜培养皿上, Sm^D 与 Sm^r 的菌落形态不同。 Sm^D 菌落较小,边缘整齐,颜色较浅; Sm^r 菌落较大,边缘往往不整齐,颜色亦较深(图 1a)。在 6633 中, Sm^r 菌落粗糙,与原敏感菌同;而 Sm^D 则菌落较小,隆起(培养时间延长,则中部又凹下),表面光滑,油亮(图 1b)。 Sm^r 在含有 Sm 的 Ivánovics 的基本培养基上,菌落为紫铜色;而 Sm^D 则为白色。



图 1a *B. subtilis* ATCC 6633 ET 培养在含有链霉素的肉汤洋菜培养基上所形成的突变菌落。图中上部两个大菌落是抗链霉素突变体,其余都是依赖链霉素突变体。

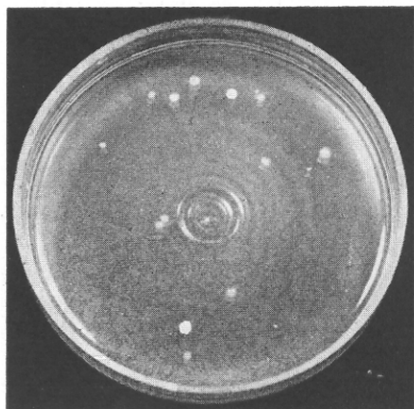


图 1b *B. subtilis* ATCC 6633 培养在含有链霉素的肉汤洋菜培养基上所形成的突变菌落。图中下部一个白菌落是抗链霉素突变体,其余都是依赖链霉素突变体。由于依赖链霉素突变菌落隆起、光滑、油亮,所以都在培养基的背景上映成一个影象。

随机挑取由 ET 中分离的 Sm^D 32 株,在含有不同剂量 Sm 的肉汤培养基中,测其生长所需最适剂量,结果 32 株 Sm^D 生长所需 Sm 最适剂量都在 20—200 微克/毫升之间。当 Sm 在 5 或 500 微克/毫升时,也可生长,但较为迟缓。

原 Sm^r 菌株 ET 是原养型,突变为 Sm^D 以后,在 Burkholder 等的基本培养基上,生长受到抑制;补加谷氨酸(1000 微克/毫升),可以支持生长,但仍不及在肉汤洋菜培养基上生长为佳(表 1)。

表1 由 *B. subtilis* ATCC 6633 ET 中分离的依赖链霉素突变体
在含有 40 微克链霉素/毫升的各种固体培养基上的生长

培 养 基	培养时间 (小时)	每 1 毫升菌液中形 成的菌落数目		菌落大小
		菌 落 数 目	(%)	
肉汤洋葱培养基	48	2.28×10^9	100	大
Burkholder 基本培养基	120	7.70×10^6	0.34	小
同上加 1000 微克谷氨酸/毫升	120	1.72×10^9	75	小

(二) 依赖链霉素突变体的突变起源

在 *E. coli* 中,曾以实验说明 Sm^D 的出现系由于突变所引起^[25]。在本文中,按 Luria 和 Delbrück^[26] 的原理,进行彷徨测验。由于 Sm^D 在沒有 Sm 的培养基中不能继续存活(见下)。因此培养早期产生的 Sm^D 不能随着整个群体的不断增长而继续繁殖,不同培养间方差的变差不会太大。但是多次彷徨实验的结果,其差异都超过显著标准。表 2 是多次实验中的一次实验结果。在表 2 中同一培养的 x^2 值均小于 $x^2_{0.05,4}$,而不同培养间 x^2 值则大于 $x^2_{0.001,11}$,表明 Sm^D 的出现确是由于原敏感菌在接触 Sm 以前发生突变所引起的。

表 2 *B. subtilis* ATCC 6633 ET 依赖链霉素突变的彷徨测验

培养号	每 一 培 养 皿 上 的 x					Σx	x^2
1	15	15	17	17	15	79	0.30
2	24	16	23	20	19	102	2.03
3	15	13	14	15	15	72	0.22
4	22	19	21	18	27	107	2.17
5	19	18	18	20	22	97	0.56
6	4	11	8	7	9	39	3.71
7	27	19	27	24	27	124	2.10
8	15	14	20	20	13	82	2.68
9	19	17	23	15	13	87	3.29
10	16	12	18	17	18	81	1.65
11	13	12	14	14	15	68	0.38
12	8	9	11	11	11	50	0.81

$x^2 = 81.98$

将 ET 在斜面上培养 24 小时,悬浮于磷酸缓冲液盐水中。每次取 3.5×10^9 活菌,接种在装有 30 毫升肉汤培养基的 200 毫升锥形瓶中。在 37℃ 振荡培养 16 小时。放冰箱中 1 小时。取 15 毫升用冰冻离心机在 4℃、2400 rpm 离心 25 分钟。将菌体悬浮于 1.5 毫升磷酸缓冲液盐水中(菌浓度约为 4.4×10^9 /毫升)。每次取 0.1 毫升,涂布在含有 40 微克 Sm /毫升的肉汤洋葱培养基上。在 37℃ 培养 48 小时后,观察依赖链霉素突变的菌落数。

$x =$ 每一培养皿上实际观察到的依赖链霉素突变菌落数目

$y = \sqrt{4x + 1} \quad \delta^2 = 1 \quad x^2 = \frac{\varepsilon(y - \bar{y})^2}{\delta^2} = \varepsilon(y - \bar{y})^2$

同一培养内 $df = 5 - 1 = 4, \quad x^2_{0.05,4} = 9.49, \quad x^2 < x^2_{0.05,4}$

不同培养间 $df = 12 - 1 = 11, \quad x^2_{0.001,11} = 31.26, \quad x^2 > x^2_{0.001,11}$

(三) 突变发生在 DNA 分子上

可以利用转化来鉴别突变是否发生在 DNA 分子上。将对 Sm 敏感的 *B. subtilis* Ki-2 涂布在含有 Sm 的肉汤洋葱培养基上,截至目前为止,一直未能分离到 Sm^D 。如以 Ki-2 为

受体, 用由 ET 中分离的 Sm^D 作为给体提取 DNA, 按前已报导的方法^[19]进行转化实验, 则可使 Ki-2 转化成 Sm^D , 转化频率为 2.8×10^{-5} , 与以 6633 Sm^r 作为给体进行 Sm^r 转化的转化频率相似^[19]。

(四) 在不同剂量链霉素条件下依赖链霉素突变的突变频率

将 ET 的悬浮液, 涂布在含有 10, 20, 40, 100, 200 和 500 微克 Sm /毫升的肉汤洋葱培养皿上, Sm^D 的突变频率不同。若剂量在 40 微克/毫升以下, 则突变频率随 Sm 剂量增高而降低, 差异显著; 剂量在 40 到 500 微克/毫升之间, 突变频率差异不显著, 但都较 20 或 10 微克/毫升者为低 (表 3 实验 I)。可是, 如果先将细菌悬浮液涂布在 10 毫升无 Sm 的肉汤洋葱培养皿上, 在 37℃ 培养 3 小时后, 将培养基挑起, 在培养皿底上平铺 0.5 毫升 Sm 溶液, 然后将培养基放下, 使 Sm 最终浓度分别为 10、20、40、100、200 和 500 微克/毫升, 置 37℃ 继续培养。则 Sm 剂量在 100 微克/毫升以上者, 其突变频率有较高的趋势 (表 3 实验 II)。表 3 实验 I 和实验 II 结果不同的原因, 还没有进行分析。在不同剂量条件下分离到的 Sm^D , 其生长所需 Sm 最适剂量并无不同 (见前)。

表 3 *B. subtilis* ATCC 6633 ET 在含有不同剂量链霉素的培养皿上依赖链霉素突变频率的比较

链 霉 素 剂 量 (微克/毫升)	每一培养皿上的 $\bar{x}$	
	实 验 I*	实 验 II*
10	13.71	22.43
20	7.57	28.00
40	2.57	29.00
100	1.00	30.11
200	1.29	34.57
500	1.43	30.11
$\bar{x}^2$	22.19	2.61

* 见正文

$\bar{x}$ = 平均每一培养皿上观察到的依赖链霉素突变菌落数

在实验 I 中, 每一培养皿涂布 1.39×10^8 活菌。

在实验 II 中, 每一培养皿上有 2.56×10^8 活菌。

$$y = \sqrt{4x + 1} \quad \delta^2 \approx 1 \quad x^2 \approx \frac{s(y - \bar{y})^2}{\delta^2}$$

在实验 I 和实验 II 中, $df = 6 - 1 = 5$

$$x_{0.001, 5}^2 = 20.52$$

$$x_{0.05, 5}^2 = 11.07$$

(五) 在不同培养时间条件下的突变频率

将 ET 先在肉汤培养基中培养到静止期, 置冰箱中 1 小时, 离心, 悬浮于磷酸缓冲液盐水中, 每次取 0.1 毫升 (约 10^8 活菌), 涂布在 10 毫升肉汤洋葱培养基上, 在 37℃ 培养不同时间后, 按前述方法在培养皿底上加入 Sm 溶液, 使 Sm 最终浓度达 40 微克/毫升, 置 37℃ 继续培养, 48 小时后观察 Sm^D 菌落数。经过多次实验, 证明 Sm^D 菌落数和突变频率, 都随着培养时间的不同作规律性的变化 (图 2, 表 4 第二行): Sm^D 菌落数先缓缓上升, 到第三小时前后达最高峰, 以后急剧下降, 第五小时以后, 几乎观察不到 Sm^D 菌落。若在加 Sm 之前, 按 Beale^[27] 之法计数培养皿上的总活菌数, 证明培养 3 小时后, 总活菌数正迅速

增加。培养 5 小时以后,培养皿上细菌生长成一厚层,已不能按上法测定 Sm^D 的数目。

将 ET 先在肉汤培养基中培养到静止期,置冰箱 1 小时,再接种在肉汤培养基中,于 $37^{\circ}C$ 振荡培养不同时间后,在 Sm 培养皿上测定 Sm^D 的数目和 Sm^D 的突变频率。结果与上述固体培养基上培养不同时间后进行的实验结果大致相似。不过在液体培养基中进行实验时,整个历程较长,而且突变频率的高峯与突变体数目的高峯同时出现(图 3)。

根据上述实验(图 2, 图 3, 表 4 第二行)看来, Sm^D 细胞在绝对不接触 Sm 的情况下,其存活力不能超过 2 小时。若在 2 小时内未能得到 Sm , 则这些 Sm^D 细胞即将迅速死亡。至于 Sm^D 细胞在绝对不接触 Sm 的情况下,是否能进行分裂,在上述实验中,不能得到解答。

Newcombe^[28] 的重新涂布法可以帮助解决这一问题。若 Sm^D 细胞在绝对不接触 Sm 的情况下,也可进行分裂,则在重新涂布以后, Sm^D 菌落会有所增加;不然,重新涂布与否对 Sm^D 菌落的数目没有影响。

将培养到静止期的细菌用冰冻离心机离心 25 分钟,把菌体悬浮在磷酸缓冲液盐水中,每次取 0.1 毫升 (6.45×10^8 活菌)涂布在 10 毫升不含 Sm 的肉汤洋葱培养基上,置 $37^{\circ}C$ 培养 0、1、2、3、4、5 小时后,各取 10 个培养皿,其中 5 个各加 0.1 毫升磷酸缓冲液盐水,用玻璃棒把菌体充分重新涂布后,在培养皿底上加入 Sm 溶液,使 Sm 最终浓度为 40 微克/毫升;另外 5 个培养皿则只加 Sm 溶液而不重新涂布。以后都在 $37^{\circ}C$ 继续培养,48 小时后观察 Sm^D 菌落的数目。结果如表 4。由表 4 的数据看来, Sm^D 细胞在绝对不接触 Sm

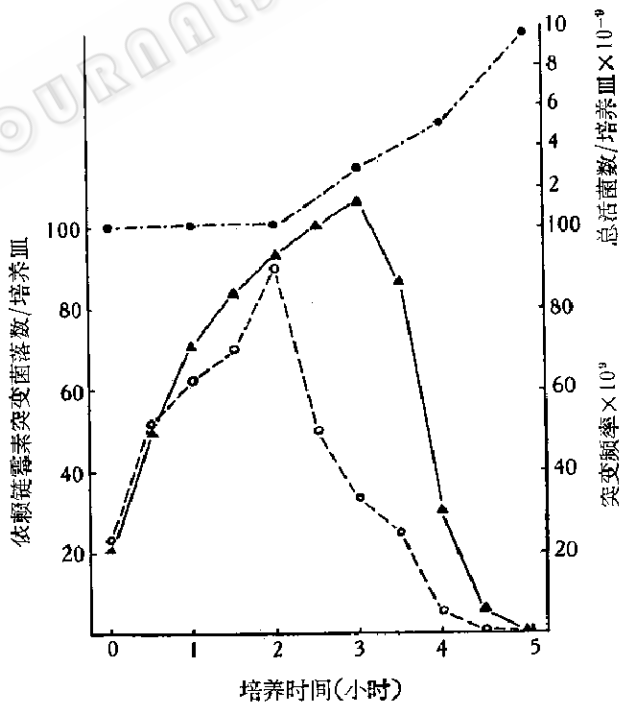


图 2 在肉汤洋葱培养基上培养不同时间后的依赖链霉素突变菌落数和突变频率

- ▲ 依赖链霉素突变菌落数/培养皿
- 突变频率
- 总活菌数/培养皿

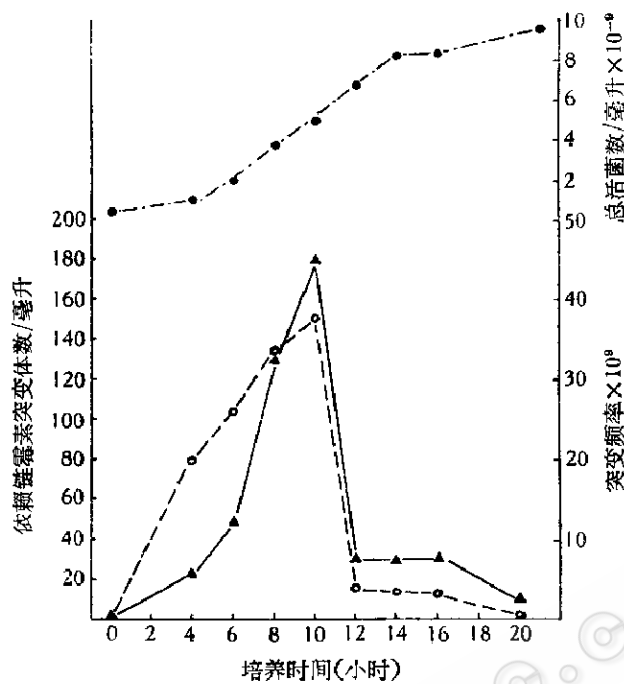


图3 在肉汤培养基中培养不同时间后的依赖链霉素突变体数和突变频率

- ▲ 依赖链霉素突变体数/毫升
- 突变频率
- 总活菌数/毫升

表4 *B. subtilis* ATCC 6633 ET 在肉汤培养基上培养不同时间后，重新涂布对依赖链霉素突变菌落数目的影响

加链霉素前培养时间 (小时)	五个培养皿上的 x		x^2
	不涂布	重新涂布	
0	48	52	0.14
1	104	100	0.30
2	121	96	3.05
3	197	249	5.74
4	66	195	67.85
5	1	30	37.95

x = 5个培养皿上观察到的依赖链霉素突变菌落总数

$$y = \sqrt{4x + 1} \quad \delta^2 = 1 \quad x^2 = \frac{E(y - \bar{y})^2}{\delta^2}$$

$$df = 2 - 1 = 1$$

$$\chi^2_{0.05,1} = 3.84$$

$$\chi^2_{0.001,1} = 10.83$$

的条件下,似乎有分裂的可能。在本实验中,重新涂布对增加 Sm^D 菌落数目的效果,似非由于重新涂布有利于 Sm 迅速扩散到菌体之故。若将未经涂布的对照组在加入 Sm 后立即放置在冰箱中 3 小时,使 Sm 充分扩散^[29],然后移 37℃ 培养,其 Sm^D 菌落数仍较重新涂布组为少。但是在此实验中,毕竟未能排除方法上的误差。而用显微镜直接观察是否能够分裂又有技术上的困难。本实验结果只能看作是初步的。

(六) 依赖链霉素突变体的回复突变

将由 ET 中分离得到的 Sm^D 接种在含有 5、10 和 20 微克 Sm /毫升的肉汤培养基中, 在 37°C 振荡培养过夜, 离心收集菌体, 以磷酸缓冲液盐水洗两次, 重新悬浮于磷酸缓冲液盐水中, 然后涂布在含有和不含 40 微克 Sm /毫升的肉汤洋菜培养皿上, 置 37°C 培养不同时间后, 一方面按 Beale^[27] 之法了解群体增殖情况, 一方面观察回复突变体的数目。结果在含有 Sm 的培养基上, 约在培养 3 小时以后, 总活菌数迅速增加; 在沒有 Sm 的培养基上, 无论前培养中 Sm 剂量为 5、10 或 20 微克/毫升, 总活菌数的增加最多不超过原活菌数的 30%; 培养 11 小时以后, 总活菌数下降; 培养 48 小时以后, 则可观察到回复突变体菌落。由回复突变体的数目和总活菌数可计算回复突变频率。随机取 13 个 Sm^D , 测定其回复突变的频率, 在 $0.7-4.0 \times 10^{-8}$ 之间。

回复体的菌落形态与原敏感菌相同。随机抽取 669 个回复突变体, 测其对 Sm 的反应, 结果只有 9 个(占 1% 强)是 Sm^r , 其余都是 Sm^s 。

前面曾提到 Sm^D 在 Burkholder 等的基本培养基上, 要求补加谷氨酸才能生长。随机抽取 298 个回复体, 在 Burkholder 等的基本培养基上培养, 都生长正常, 与原敏感菌相同。

对链霉素敏感的回变突变体, 可再次发生链霉素突变。随机抽取 108 个对链霉素敏感的回变体, 其中只有 3 个, 当涂布在含有 40 微克 Sm /毫升的肉汤洋菜培养基上, 所得到的二级突变体^[7], 全是 Sm^r ; 其余 105 个回变体的二级突变体表现为部分链霉素依赖, 即在无 Sm 的肉汤洋菜培养基上, 也可生长, 但生长缓慢, 菌落小; 在含有 Sm 的肉汤洋菜培养基上, 则生长正常。

为了测定二级突变的突变频率, 曾随机抽取回变体 15 株(都在不含 Sm 的斜面上经过多次移植, 其中 6 株还经过多次单菌落纯化), 按前法(见(一)依赖链霉素突变体的分离)测定其突变频率; 在同一实验中, 还培养 ET 15 管, 一一测定其突变频率, 以资比较。结果 ET 的突变(一级突变^[7])频率在 $0.00-2.28 \times 10^{-9}$ 之间, 回变体的突变(二级突变)频率大多在 10^{-7} 以上, 最高达 10^{-5} , 只有个别低到 4.00×10^{-8} 。

为了最终判断回变体是否由于另一点上发生抑制突变而产生, 必须进行遗传学重组实验。若回变体与野生型进行遗传学重组, 仍能分离出突变体, 则可肯定回变体并非由于原突变点上发生真正的回复突变而产生。

ET 虽然不能作为转化的受体菌株, 但可以作为转化的给体菌株^[19]。并且 Sm^D 可以通过 DNA 使 Ki-2 转化为依赖链霉素。若 ET 中分离的 Sm^D , 其回变体是由于抑制突变而产生, 则回变体的表型虽然是对链霉素敏感的, 但由于 Sm^D 记号依然存在, 其 DNA 仍有 Sm^D 的转化活性。随机取 5 株回变体作为给体提取核酸, 进行转化, 结果 5 株回变体的 DNA 都有 Sm^D 的转化活性(表 5), 证明 Sm^D 的回变体, 是由于另一点上发生抑制突变而产生的。

转化为依赖链霉素的 Ki-2, 回复突变后又成为 Sm^s 。此等对 Sm 敏感的回变体, 当涂布在含有 Sm 的培养皿上, 又可分离到链霉素突变体, 这种链霉素突变体都是 Sm^r , 与从原 Ki-2 中分离到的链霉素突变体相同。为判断 Ki-2 中 Sm^D 的回变体是否由于抑制而产生, 又用原来对链霉素敏感的 ET 为给体提取核酸, 对 Ki-2 的 6 株回变体进行转化, 结果都得到依赖链霉素的转化体(表 5), 说明在 Ki-2 中, 依赖链霉素转化体回变突变为 Sm^s , 也

是由于另一点发生抑制突变之故。

表 5 以回复体作为给体或受体与野生型进行转化,每一培养皿上的依赖链霉素转化体数
(每一培养皿上受体细菌总数约为 1×10^8)

受 体	给 体						
	ET	Sm ^D	Sm ^D -su 2	Sm ^D -su 3	Sm ^D -su 11	Sm ^D -su 12	Sm ^D -su 15
Ki-2	0	570	196	289	159	282	570
Ki-2 Sm ^D -su 11	115	—	—	—	—	—	—
Ki-2 Sm ^D -su 13	1359	—	—	—	—	—	—
Ki-2 Sm ^D -su 21	302	—	—	—	—	—	—
Ki-2 Sm ^D -su 22	2848	—	—	—	—	—	—
Ki-2 Sm ^D -su 23	2880	—	—	—	—	—	—
Ki-2 Sm ^D -su 24	2784	—	—	—	—	—	—

讨 论

在 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ET 和 *B. subtilis* ATCC 6633 的链霉素突变体中, 90% 以上为依赖链霉素突变, 抗链霉素突变只占 10% 以下; 依赖链霉素突变体与抗链霉素突变体菌落形态有明显的区别; 依赖链霉素突变没有表型延迟。这些特点对研究诱发突变都有一定的应用价值。可是其回复突变并不是真正的回复突变, 所以并不适于作为研究突变分子机制的突变系统。

在细菌^[7,10,11,30]和噬菌体^[31]中, 由于抑制而产生的回复体, 其表型不能完全恢复到野生状态。所以在实际工作中, 有时也可以按表型是否完全恢复原状来判断是否真正的回复突变^[30]。在本实验菌株中, 若按回复体的表型来说, 则无论菌落形态、对链霉素的反应或是营养要求, 都与原敏感菌相同。而转化分析的结果表明并不是真正的回复突变。所以表型是否完全恢复原状, 不能作为判断是否真正回复突变的可靠标准。

在 *E. coli*^[7] 和 *Proteus mirabilis*^[11] 中, 曾因回复体的突变格式与野生型的突变格式不同, 推测其回复突变并非真正的回复突变。后经转导分析, 证明上述判断可靠^[14,15]。在本实验中, 由 ET 中分离的依赖链霉素突变体, 其回复体的突变格式与野生型的不同, 经转化分析, 证明回复突变是抑制突变。将依赖链霉素记号导入 Ki-2 中以后, 其回复体的突变格式与野生 Ki-2 的相同, 但经转化分析, 证明也不是真正的回复突变。

Benzer^[31] 认为回复体与野生型在该突变点上的突变频率是否相同, 是判断是否真正回复突变的严峻的标准, 并在 *E. coli* 噬菌体 T₄ 中用实验加以证明。据本实验结果看来, 这一标准也适用于细菌。

虽然要肯定回复体是由于原突变体上发生真正的回复突变而产生, 总是有形式上的困难^[30]。但是回复体与野生型通过遗传重组而分离出突变体的事实, 则可确凿地证明回复突变不是真正的回复突变。

摘 要

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) ATCC 6633 ET (原养型, 对链霉素敏感) 当涂布在含有链霉素 40 微克/毫升的肉汤洋菜培养基上, 存活率降低到 10^{-9} 左右。在存活的细菌中,

90% 以上、甚至全部都是依赖链霉素突变体, 抗链霉素突变体只占 10% 以下。依赖链霉素突变体与抗链霉素突变体菌落形态不同。依赖链霉素突变体在 Burkholder 的基本培养基上, 须补加 1000 微克谷氨酸/毫升, 才能生长。徬徨测验的结果表明依赖链霉素突变体是由于原敏感菌在接触链霉素以前发生突变而产生的。突变频率因链霉素剂量不同而异, 并且随着培养时间的不同而作规律性的变化。用重新涂布的方法进行的实验表明, 依赖链霉素突变体在绝对不接触链霉素的情况下, 似乎也有进行细胞分裂的可能。依赖链霉素突变体可发生回复突变。回复突变的频率约为 10^{-8} 。回复体的表型与原敏感菌相同。将回复体涂布在含有链霉素的培养基上, 可分离到二级突变体。二级突变的频率较一级突变的频率约高一百倍。二级突变体为部分依赖链霉素突变体。以回复体作为给体或受体与野生型进行转化的实验结果证明, 在回复体中仍包含着依赖链霉素突变, 故回复突变系由于另一座位发生抑制突变而产生。

参 考 文 献

- [1] Spotts, C. R. & Stanier, R. Y.: *Nature*, **192**, 633—637, 1961.
- [2] Flaks, J. G., Cox, E. C. & White, J. R.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **7**, 385—389, 1962.
Flaks, J. G., Cox, E. C., Witting, M. L. & White, J. R.: *Ibid.*, **7**, 390—393, 1962.
- [3] Speyer, J. F., Lengyel, P. & Basilio, C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **48**, 684—686, 1962.
- [4] Herzog, A.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **15**, 172—176, 1962.
- [5] Davis, J. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **51**, 659—664, 1964.
- [6] Cox, E. C., White, J. R. & Flaks, J. G.: *Ibid.*, **51**, 703—709, 1964.
- [7] Demerec, M.: *Amer. Naturalist*, **84**, 5—16, 1950.
- [8] ———: *Genetics* **35**, 585—597, 1951.
- [9] Bertani, G.: *Ibid.*, **35**, 598—611, 1951.
- [10] Goldschmidt, E. P., Maeney, T. S. & Bausum, H. T.: *Ibid.*, **47**, 1475—1487, 1962.
- [11] Böhme, H.: *Z. Vererb-Lehre*, **92**, 197—204, 1961.
- [12] Gorini, L. & Kataja, E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **51**, 487—493, 1964.
——— & ———: *Ibid.*, **51**, 995, 1964.
- [13] Lederberg, E. M., Cavalli-Sforza, L. & Lederberg, J.: *Ibid.*, **51**, 678—682, 1964.
- [14] Hashimoto, K.: *Genetics*, **45**, 49—62, 1960.
- [15] Böhme, H.: *In Genetics Today*, XI Internat. Congr. Genetics, Vol. I, p. 33 Geerts, S. T. Ed., Pergamon Press, London, 1963.
- [16] 童克忠、李明凤、相望年: 科学通报, **1963**(10), 53—55.
- [17] 童克忠、李明凤、莫鑫泉、相望年: 生物化学与生物物理学报, **5**, 101—108, 1965.
- [18] Spizizen, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 1072—1078, 1958.
- [19] 汤懋斌、童克忠、陈 慎、相望年: 微生物学报, **10**, 189—194, 1964.
- [20] Thorne, C. R.: *Federation Proc.*, **20**, 254, 1961.
- [21] Kushnick, T., Randles, C. I., Gray, C. T. & Birkeland, J. M.: *Science*, **106**, 587—588, 1948.
- [22] 邱秋田: 日本细菌学杂志 **19**, 100—109, 1964.
- [23] Burkholder, P. R. & Giles, N. H.: *Amer. J. Botany*, **34**, 345—348, 1947.
- [24] Ivánovics, G. & Csiszár, K.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **9**, 209—218, 1962.
- [25] Newcombe, H. B. & Hawirko, R.: *J. Bacteriol.* **57**, 565—572, 1949.
- [26] Luria, S. E. & Delbrück, M.: *Genetics*, **28**, 491—511, 1943.
- [27] Beale, G. H.: *J. Gen. Microbiol.*, **2**, 131—142, 1948.
- [28] Newcombe, H. B.: *Nature*, **164**, 150—151, 1949.
- [29] ———: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **39** (Suppl. I), 13—26, 1952.
- [30] Ryan, F. J.: *In Methodology in Basic Genetics*, Burdette, W. J. Ed., Holden-Day, San Francisco, p. 39—82, 1963.
- [31] Benzer, S.: *In Mutations*, Second Conference on Genetics, Schull, W. J. Ed., Univ. Michigan Press, p. 145, 1962.

SPONTANEOUS MUTATIONS IN STREPTOMYCIN LOCUS IN *BACILLUS SUBTILIS*

TONG KE-ZHONG AND LI MING-FENG

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Peking)

Spreading of the cells of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ET (prototrophic, sensitive to streptomycin) on nutrient agar plate containing 40 μg streptomycin per ml, the survivals were reduced to about 10^{-9} . In the survivals, over 90 per cent or nearly all of them were streptomycin-dependent mutants, streptomycin-resistant mutants were less than 10 per cent. The colony of dependent mutant is easily distinguishable from that of resistant one. Supplement of glutamate at a concentration of 1,000 μg per ml was found to be requisite for the growth of dependent mutants in Burkholder's synthetic minimum medium. Result of fluctuation test reveals that the dependent mutants are originated from mutational nature. The mutation frequency was decreased as the dosage of streptomycin was increased, and it changed proportionally with the length of incubation. Experimental results carried with resspreading method shows that cell division is possible even when the dependent cell has not been contacted with streptomycin. Revertants were isolated in dependent population. The reversion frequency was around 10^{-8} . The phenotype of revertants was similar to that of sensitive strain. Second streptomycin mutants (second-order mutants) were isolated from revertant cells. The frequency of second-order mutation was about hundred fold higher than that of first-order mutation. The second-order mutants were partial streptomycin-dependent mutants. Evidence obtained from transformation experiments by using revertant cells as either donor or recipient strains with wild type strains indicate that the streptomycin-dependent mutation is still harbored in revertants, and the reversion is based on a suppressed mutation at another locus.