

大多数噬菌体是烈性的(如 T4、T7、 $\phi \times 174$  等),即它们在生长循环结束时杀死细胞。不过有许多噬菌体,能以另一种方式和寄主相互作用:噬菌体和寄主一起增殖,这样的关系就叫做溶原性。在溶原性细胞中的噬菌体叫做前噬菌体。

### 一、溶原性菌株的性质

温和噬菌体感染一个敏感细菌菌株时,可根据各

种遗传和生理条件,有两种可能(图1):有些细胞被噬菌体增殖所裂解,而另一些被溶原化。产生溶原化的菌株,是在细菌菌株的名称之后,加上一个括弧,括弧内是它所携带的前噬菌体的那个噬菌体名称。例如, Lederberg 的大肠杆菌的溶原菌株用 K12( $\lambda$ ) 表示。温和噬菌体仅裂解一部分敏感细胞,它们产生混浊噬菌斑。

溶原性通常是一种菌株的非常稳定的特性,几乎

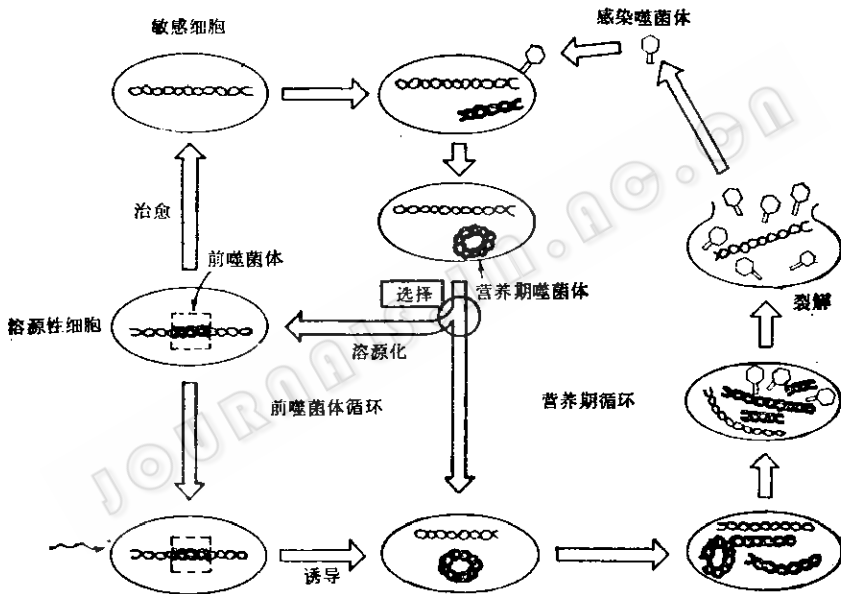


图1 温和噬菌体的发育<sup>[1]</sup>

像菌株的其它遗传特性一样稳定。因此在大多数溶原细菌细胞群体中只有极少数溶原菌会丢失它们的前噬菌体。

溶原性细菌有两个主要性质:(1)溶原性细胞可释放正常的有感染力的噬菌体,能够复制和溶解寄主细胞。但是,对溶原性细胞进行人工裂解,却不能使其释放具有感染力的噬菌体粒子,可见前噬菌体并不等于噬菌体粒子;(2)溶原性细菌对于同一种噬菌体或是密切有关的噬菌体所表现的免疫性,即不能再为同一种噬菌体所裂解或溶原化。免疫性不同于细菌对噬菌体的抗性,抗性是由于细胞表面受体结构的改变而使噬菌体不能吸附。

溶原性细菌很易识别,只要把溶原细菌在固体培养基上划线,当划过一个对噬菌体敏感的菌株时,沿着溶原性细菌的交界处可以看到一个窄的裂解区。识别溶原性细菌主要是要有一个敏感菌株。此外,许多菌株可被几个不同的噬菌体溶原化。

### 二、营养期循环

温和噬菌体的营养期循环与烈性噬菌体相似,但有某些改变。 $\lambda$ 病毒子含有一条线状双链 DNA, 48502 碱基对<sup>[2]</sup>,在噬菌体颗粒中, $\lambda$ DNA 两 5' 末端各为单链,长为 12 个核苷酸,并且是互补的末端,称为粘性末端或成熟末端。其左链的 5' 末端称 m 末端,

右链的 5' 末端称 m' 末端。因此  $\lambda$  DNA 分子通过粘性末端退火可以环化,进行复制、转录和整合。

### 1. $\lambda$ 的遗传

像其它噬菌体一样,  $\lambda$  的基因如图 2 所示,基因组以环状表示,因为转录期间,在细胞内病毒 DNA 是环状。营养期遗传图是线状。

$\lambda$  有四个功能相关的基因聚集成簇,如基因表达的调节,位点特异性重组,复制和结构蛋白有关的基因都分别聚在一起。除此之外还有 b 区,它编码几个蛋白,这是一个不明其功能的不活动的区段。最后 Q 基因是晚期转录调节器, S 和 R 是负责细胞裂解的(R 编码 18,000 道尔顿噬菌体内溶素)。

$\lambda$  有两个主要的“早期启动子” PL 和 PR。PL 为左向转录的启动子,即负责调节基因 N 和 cII 以及参与重组的各种基因的早期“左转录”。早期“右启动子” PR 控制由 Cro, cII 和 Q 编码的三个调节因子以及控制蛋白 O 和 P,除了 PL 和 PR 以外,还有四个启动子, P1, PM 和 PE 是弱启动子,用于溶原性(PO 的作用不清楚)。

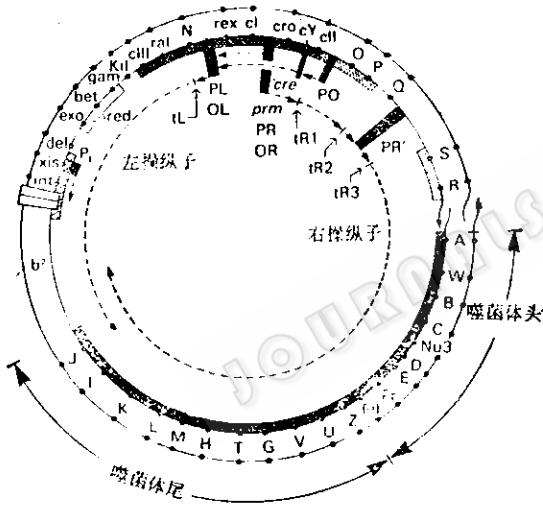


图 2  $\lambda$  噬菌体 DNA 的遗传和功能结构<sup>[1]</sup>

### 2. 转录

$\lambda$  噬菌体转录有三个不同时期:最早期,后早期和晚期。各期的信使都是由寄主转录酶合成的,大体情况是:最早期基因转录确定裂解循环(同溶原性竞争),后早期基因转录导致 DNA 进行复制和重组,晚期基因转录使 DNA 包装到成熟的噬菌体颗粒中去。 $\lambda$  噬菌体感染敏感细胞后,直接位于 cI 基因左侧的 PL 和右侧的 PR 便开始转录,产生两个信使,12S(约 850 个核苷酸)编码 N 蛋白和 9S(约 310 个核苷酸)编码 Cro 蛋白。这种转录受 Q 基因产物阻遏,而在溶原性细菌中,这种阻遏作用便是对再感染的  $\lambda$  噬菌体免疫性的基础。在感染早期,从 PL 和 PR 开始的转录物

在终止位点 tL 和 tR1 终止。tR2 位点可终止任何超出 tR1 位点的转录(虽然某些向右转录物继续通过基因 O 和 P,但在 tR2 终止)。通过抗终止作用使  $\lambda$  噬菌体从早期阶段转录转向后早期阶段转录,这种转向开关受 N 基因产物控制。N 基因产物与 RNA 聚合酶相互作用,拮抗终止蛋白质  $\rho$  的活动而克服终止信号的效应,这样 PL 和 PR 的转录便延伸到中期阶段所需的一些基因,如 red、O 和 P 等。因此,早期和中期的转录物及表达模式是重迭的。

在感染期间,当 cro 产物积累到足够数量之后, cro 结合到 OL 和 PR,抑制 RNA 聚合酶结合,因此关闭从 PL 和 PR 的转录,到此时,另一个控制蛋白 Q 已经合成足够数量,使晚期基因转录(Q 基因从延长的 PR 转录物的末端部分表达),并担负着从中期转向晚期转录的开关作用。这同样也受抗终止作用操纵。Q 基因产物特异地抗终止短的 P'R 的转录,使它延伸到跨越 cos 区段的一些晚期基因,因此最终产生出许多成熟的噬菌体颗粒。N 和 Q 起正调节作用,对于噬菌体的生长和噬菌斑的形成是必不可少的。

### 3. 复制

$\lambda$  DNA 复制仅仅利用外源前体,因为细菌 DNA 未破坏,复制以两个阶段进行。首先环状亲本 DNA 与细胞膜结合,并对称复制,产生环状分子。在复制开始时,需病毒基因 O 和 P 的功能以及寄主功能。复制在 Q 基因内开始,然后在相反方向继续进行,在两个分叉点相遇时终止。

第二阶段即晚期阶段,子代 DNA 离开膜,按照滚动环模型复制,在环状 DNA 不同位置起始,产生生长的连环。从早期转换到晚期的控制取决于依赖 N 情况下的噬菌体基因,因为要是缺 N, DNA 将继续以环状形式复制。为了抑制寄主编码的 Rec B、C,核酸酶需要 lam 基因的功能。另外还需核酸外切酶降解连环。

在带有粘性末端的成熟分子形成过程中,噬菌体 A 基因(PA)指定的蛋白结合到连环,在相当于粘性末端的位点上,产生交错的单链切割。PA 蛋白也携带成熟分子进入前头部。在头部装配的以后阶段以及衣壳的成熟过程一般均按 T 偶效噬菌体的模式进行。病毒子通过其 S 基因的作用——停止细胞代谢和减弱细胞膜释放病毒子, R 基因产生的内容素使细胞壁裂解。

## 三、溶原状态

### 1. 溶原性和裂解发育

$\lambda$  感染大肠杆菌后是进入裂解途径还是建立溶原性主要由一些调节蛋白巧妙地相互作用所决定。在溶原反应中,首先,线状病毒基因组环化成闭环,这种环状的双链 DNA 分子在染色体附着位点 attB 整合,

需要 *Int* 基因(编码整合酶,它促进噬菌体和细菌插入位点之间的特异性重组)和 *ci* 基因(编码一个阻遏物,它与左右两个操纵子结合,阻止所有早期基因表达)。*ci* 和 *Int* 基因的转录由 *cII* 和 *cIII* 蛋白激活,而 *cII* 和 *cIII* 蛋白的产生又依赖 *N* 蛋白在 *tL* 和 *tR1* 的抗终止作用。在裂解反应中,感染细胞死亡,释放噬菌体。这一反应需要 *O*、*P* 和 *Q* 基因。*O* 和 *P* 为噬菌体 DNA 早期复制所必需。*Q* 为裂解途径晚期正调节基因,它促进由 *P'*R 开始的转录。为了进入裂解途径,需要阻止阻遏物的合成,这种抑制可由 *cro* 基因产物来完成。*cro* 产物关闭后早期基因的转录,包括 *cII*、*cIII*。*cII* 和 *cIII* 蛋白不稳定,很快耗竭,因此不能促动 *ci* 转录的开始,而合成的 *Q* 蛋白激活 *P'*R 启动子,因而开始晚期操纵子的转录,从而进入裂解途径。因为 *cro* 是唯一的最早期基因,它的表达受阻遏物控制,这样 *cro* 产物和阻遏物相互呈拮抗作用,这是调整溶原化途径和裂解途径之间的关键。

## 2. 溶原性的建立

维持溶原性仅需阻遏蛋白,但  $\lambda$  DNA 感染寄主细胞后建立溶原性还需 *cII*、*cIII*、*cY* 的功能。 $\lambda$  *cII*<sup>-</sup> 和  $\lambda$  *cIII*<sup>-</sup> 减少溶原化但获得溶原性是稳定的。对 *cII* 的需要比 *cIII* 更精确,被 *cII* 突变体感染的细胞大约 1% 或小于 1% 变成溶原性细菌,而 10—30% 被 *cIII* 感染的细胞变成溶原性细菌(大多取决于感染复数和另一些条件)。*cII* 和 *cIII* 在刺激溶原性方面有三个作用(1)诱导 *ci* 从阻遏物建立启动子(*PE*)转录;(2)诱导 *Int* 从 *Int* 启动子(*P<sub>i</sub>*)转录;(3)抑制裂解发育。看来在促进溶原性方面 *cII* 的作用比 *cIII* 更直接。

*cII* 刺激 *ci* 和 *Int* 的合成,促进溶原反应抑制裂解生长循环。*cII* 至少部分受细菌蛋白 *HFI* 的调节,*HFI* 控制 *cII* 的稳定性,它本身又是降解 *cII* 的一个蛋白酶。*cIII* 蛋白抑制 *HFI* 从而促进溶原反应,因此增加 *cII* 的活性。寄主降解物基因系统(*cAMP* 和它的结合蛋白, *Cap*),通过抑制 *HFI* 的合成或 *HFI* 的作用也可控制 *cII* 的稳定性,因此裂解或溶原反应看来是受 *cIII*-*HFI*-*cII* 的相互作用链控制。要是 *cII* 活性高趋向溶原性,要是 *cII* 活性低趋向裂解反应,因此 *cII* 的活性水平在决定裂解和溶原性上是关键因子。

总之,溶原性的建立除了 *ci* 以外,由三个不同的调节因子 *cII*、*cIII*、*cro* 和 *N* 产物控制。*cII*、*cIII* 起正调节作用,显然通过促进从 *PE* 的转录,也促进依赖 *P<sub>i</sub>* 的整合酶合成。另一方面,*cro* 抑制剂与 *OL* 和 *OR* 结合,抑制 *cII* 和 *cIII* 的转录,对阻遏物的产生间接起负控制作用,通过阻止 *PE* 促进的 *ci*-*rex* 转录直接负控制阻遏物的产生。最后 *N* 蛋白是一个转录抗终止子,通过在 *nut* 位点相互作用使左向和右向转录物延伸到 *cII* 和 *cIII*。

## 3. 溶原性维持

*PM* 起动的转录一旦建立,前噬菌体状态可由 *ci* 从 *PM* 转录得以稳定维持。*PM* 促进的转录不需要附加因子(虽受 *cro* 产物的抑制),但是,它受 *ci* 产物的自生控制,因为  $\lambda$  阻遏物在低浓度时与 *OR1* 和 *OR2* 结合刺激 *PM*-*ci*-*rex* 转录(在高浓度时,此条件在溶原状态不易达到,阻遏物与 *OR3* 结合,阻止从 *PM* 转录),阻遏物合成的维持模型只有建立表达后才能达到,因为是 *PE* 而不是 *PM*,与 *ci* 产物无关。

## 4. $\lambda$ 阻遏物——*ci* 和 *cro*

如前所述,溶原性状态的产生和维持,其基本机制是两个阻遏物(*ci* 阻遏物和 *cro* 抑制剂)对抗。在决定生长模型时,这两个蛋白起着截然相反的作用。从 *PL*、*PR* 和 *PM* 起始的 RNA 链直接受两个负作用蛋白,*ci* 阻遏物和 *cro* 抑制剂直接控制。为了区别两个负控制蛋白,*cro* 基因产物(7,400 道尔顿)称为抑制剂(也可称为第二阻遏物)和 *ci* 基因产物(26,200 道尔顿)称为噬菌体阻遏物。虽然  $\lambda$  阻遏物是一个酸性蛋白,它有碱性氨基末端(残基 1 到 92),负责完整阻遏物与操纵子 DNA 结合以及与此结合有关的正负控制,(见下面);C 末端(残基 132 到 236)决定它的四级结构。

两个调节蛋白在 *OL* 相互作用阻止 *PL* 促进的转录。阻遏物在 *OR1* 结合,一般仅抑制从 *PR* 的右向转录,在第一种情况下,*cro* 抑制剂的相互作用阻止这个不同的启动子位点(即 *PM* 促进的转录)的左向转录,从 *PM*(溶原性维持启动子)转录,在前噬菌体阶段,需提供低水平的阻遏物。只有阻遏物(不是 *cro* 产物)在 *OL* 和 *PR* 结合才能保证溶原性,因为两个主要启动子负责裂解发育早期基因功能的表达。左向和右向操纵子,*OL* 和 *OR*,每个有三个串联的序列(图 3)。在这个序列上  $\lambda$  阻遏物和 *cro* 产物能够结合,这些序列称之为 *OL1*、*OL2*、*OL3* 和 *OR1*、*OR2*、*OR3*。这些位点由 17 个核苷酸对组成,分别由 3—7 个或者全部或几乎由全部 AT 碱基对的“间隔”所分开。它们相似,但不一致。每个近似对称,三个位点能与 *ci* 或 *cro* 结合但不能两个同时结合。虽然 *ci* 和 *cro* 结合相同的操纵子,其结果却不相同。在 *OL* (*OL1* 和 *OL2*) 和 *OR* (*OR1* 和 *OR2*) 两个末端位点结合,抑制 *PL* 和 *PR* 促进的转录,分别停止 *N* 和 *cro* 蛋白的表达。由于 RNA 聚合酶相互作用位点和阻遏物结合位点在左向和右向调节区重迭,阻遏物可以通过排斥 RNA 聚合酶的结合起作用。

噬菌体阻遏物和 *cro* 抑制剂沿双螺旋一侧与主沟起作用<sup>[3]</sup>,而接近启动子位点(*OR1* 和 *OL1*)对阻遏物有最大的亲和力。与抑制剂结合,次序恰好相反,例如首先与 *OL3* 和 *OR3* 结合,这种有差别的结合在不同启动子位点的调节中起着重要作用。

*cro* 抑制剂是  $\lambda$  阻遏物的一个拮抗物,它像阻遏物

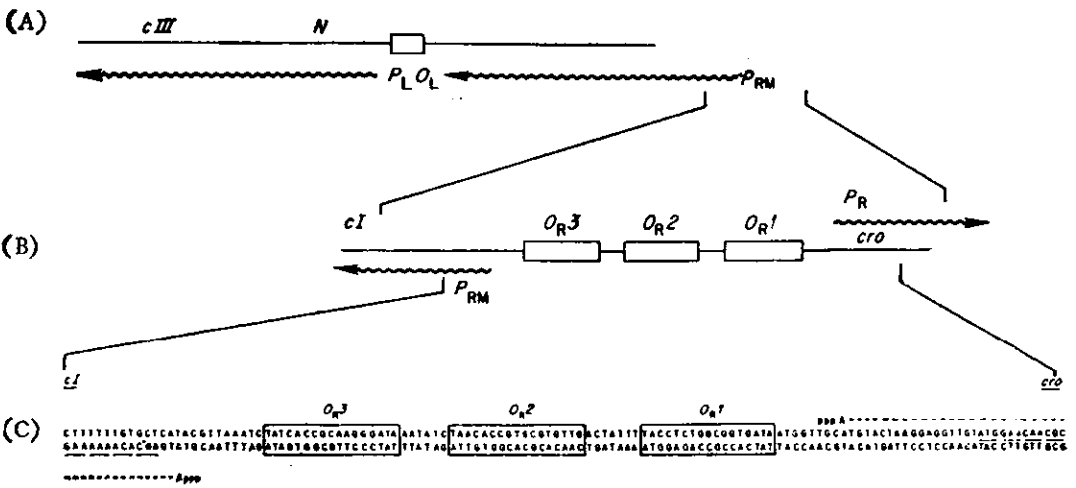


图3 λ 基因和调节单位<sup>[43]</sup>

(A) λ 基因组的一部分,箭头表示各种基因转录的起点和方向,OL PL 和 OR PR 是左右操纵子和启动子区,PRM 是 cI 启动子在溶源体中活化;(B) λOR 区的扩大图,OR1、OR2、和 OR3 是阻遏物和 cro 的结合位点,每个有 17 个碱基。图指出位于操纵子外侧的 P<sub>R</sub> 和 P<sub>RM</sub> 转录起点;(C) λOR 区的核苷酸序列

一样结合在相同的位置,抑制从 PL、PR、PM (和 PE) 的转录,但阻遏物协同结合到 OR1 和 OR2,刺激 PM 促进的 cI-rev 转录物产生, cro 抑制剂最初结合到 O<sub>R3</sub>,因此阻止从 P<sub>M</sub> 的转录,而没有改变从 P<sub>R</sub> 的右向转录。以后在高抑制剂浓度,通过在游离的 OR1 和 OR2 位点结合,关闭它自己的基因 cro。因此, cro 抑制剂受到自体控制。两个明显不同的蛋白质二聚体有能力识别相同的 DNA 序列,得出不同的反应是特别有意义的。

#### 四、前噬菌体循环

当出现溶原化时,营养期的 λ DNA 以前噬菌体插入细胞 DNA。相反,在诱导时前噬菌体又产生环状营养期 DNA,因此前噬菌体循环在营养期循环中是可供选择的道路。

##### 1. 前噬菌体在溶原细胞中的位置和状态

大多数前噬菌体在细胞染色体上有固定的整合位置。在细菌杂交时,它们与 Hfr 染色体一起转移。噬菌体整合位置与细菌基因有关。在大肠杆菌中,λ 和有关噬菌体通常在寄主染色体的特定位点整合, P2 至少能占据九个不同位点,其中两个是主要的。Mu 能在寄主染色体任何地方整合,而噬菌体 P1 没有结合位点。

##### 2. 前噬菌体增殖

噬菌体 DNA 的营养期增殖是自主的,即噬菌体基因控制。前噬菌体的复制受细菌染色体复制体系所调节,因此在 40℃,一些温度敏感噬菌体突变体虽不能开始营养复制,却可作为前噬菌体存在。此外,遗传

证据表明在复制的细菌 DNA 的一个生长点达到结合位点时,一个前噬菌体变成二个。

##### 3. λ 噬菌体位点特异性重组

(1) λ 整合重组: 在溶原反应过程中,噬菌体基因如何整合到细菌染色体中去呢? 前面已提到溶原化需要 λ DNA 整合到寄主染色体。这一过程由 λ Int 基因产物和两个寄主因子完成。

a. 附着位点: λ 整合时,感染的噬菌体首先通过它的粘性末端环化,然后在 λatt 位点 (POP) 和细菌

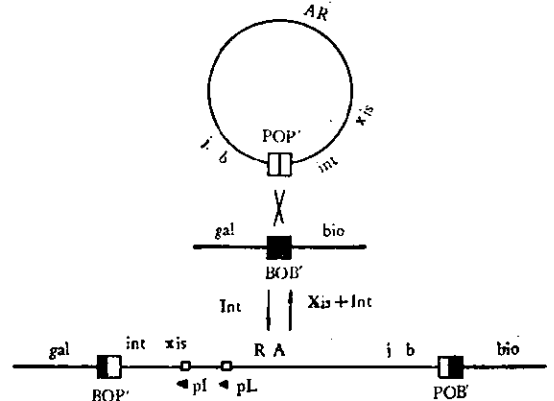


图4 整合和切除<sup>[17]</sup>

λ 附着位点, POP', 和细菌附着位点, BOB' 之间的位点特异性重组由 Int 蛋白 (加上几个寄主蛋白) 催化,导致噬菌体基因组整合,左和右前噬菌体附着位点, BOP' 和 POB' 之间位点特异性重组由 Xis 和 Int (加上几个寄主蛋白) 催化导致环状噬菌体基因组切除, b 区和 int 基因在噬菌体中邻近但因整合而被分开

```

...tt ttacgttttctcgttcacGCTTTTATACTAAgtggcattataaaagcat...
...aaaatgcaaagagcaagtCGAAAAAATATGATTcaaccgtaatttttctgta...
...atgaatc cgttgaagcctGCTTTTATACTAActtgagcgaaacgggaaggta...
...tactraggcaacttcggaCGAAAAAATATGATTgaactcgccttgccttccat...

```

细菌位点 attB                      15bp 共同核心

图5 在细菌和λ附着位点内的共同序列<sup>[6]</sup>

att 位点(BOB')进行一次交互重组(图4)。噬菌体位点为 attP, 细菌位点是 attB。在15个碱基对核心序列<sup>[6]</sup>内发生,常由字母O表示(图5)。插入以后在O重组,在整合前噬菌体的两侧是两个杂种 att 位点, attL (BOP') 在左, attR (POB') 在右。但是直到最近还不知道这个核心区的交换点是固定的还是可变的。Mizuuchi 等人<sup>[7]</sup>测定了参与交换的磷酸二酯主链的位置,证明重组是交错的而不是齐平的,重组子含有一个短的重迭区。

b. 附着位点的大小: 噬菌体附着位点所涉及的DNA必须多于15个碱基对的共同核心。Hsu 等人<sup>[8]</sup>和 Mizuuchi 和 Mizuuchi<sup>[9]</sup>确定了位点特异性重组所需的结构范围。他们的实验结果表明,如果P臂小于152个碱基,P'臂小于68个碱基,噬菌体 att 位点就失去它作为有效的 att POP' 的能力。attB 比attP 更小,像 att P 一样,不是完全包含在15个碱基对核心区内,整齐的 attB 衍生物如果保持核心区左右各4个碱基就有完全的活性。但是类似的 att B 衍生物仅保持15个碱基对,核心区就减少与 attP 结合的能力。在紧靠核心区的 attP 和 attB 序列之间有部分同源。attP 和 attB 大小不同,可能意味着在整合重组中有不同的作用。

c. Int 基因产物: 完成λ整合重组需要 Int 基因产物, Int 基因紧靠 att 位点 P' 一侧(右边)。Int 蛋白已提纯到接近均一;天然蛋白含有一个多肽,分子量约40,000道尔顿,大约由1,000个碱基的DNA编码。

Int 的两个特性与重组中的作用有关。早期发现 Int 是一个对附着位点有特异性的DNA结合蛋白,通过序列保护研究已测定了 Int 结合位点的正确位置。已鉴定至少有四个不同的结合位点,一个位点在共同的核心序列内,另三个位点在核心区的臂区。

Int 与重组作用有关的第二个特性是能破坏和重新密封DNA,即性状像柞朴异构酶。最近实验证明 Int 具有第一类型的柞朴异构酶活性,仅在双螺旋中的一条链打开缺口和密封。

d. 整合的寄主因子: 除了 Int 外,整合重组需要由一个大肠杆菌编码的蛋白质。这个高度提纯的蛋白

叫整合寄主因子(IHF),含有两个等量的多肽,变性分子量为11,000和9,500。IHF的天然分子量为2,000,说明是1:1的复合物。未证明IHF有内切酶或柞朴异构酶活性,但能特异地结合到DNA。它像 Int 一样,IHF在 attP 有几个结合位点,但是IHF和 Int 保护区明显不同。

(2) λ切除重组: 在Campbell模型中前噬菌体切除的概念是整合重组一个简单的颠倒,但从早期体内研究表明,情况并不那么简单。虽然整合和切除需要 Int 基因产物,但在若干其它特性上有所不同。切除需要 Xis 基因产物。体内切除重组比整合重组更抗温,切除重组比整合重组产生快,显然整合重组比切除重组需要更多的 Int。除此之外,整合重组需要超螺旋DNA基质而切除重组不需要此条件。

Xis 基因十分小,大约200个碱基,编码一个蛋白质约8,000或9,000道尔顿。Int 和 Xis 基因重迭20个碱基。

对切除重组机制的更深理解有待对切除重组所需要的 attL 和 attR 的序列分析以及 Xis、附着位点、Int、IIF 之间相互作用的研究之后。

## 参 考 文 献

- [1] Duibecco, R. and H. H. Ginsberg: *Virology*, Harper and Row, Publishers, New York, 1980, pp. 919—940.
- [2] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, 162: 729—774, 1982.
- [3] Sauer, R. T. and C. O. Pabo: *ASM, Soc. Microbiol., News*, 49: 131—135, 1983.
- [4] Ptashne, M. et al.: *Cell*, 19: 1—11, 1980.
- [5] Herskowitz, I. and D. Hagen: *Ann Rev. Genet.*, 14: 399—445, 1980.
- [6] Enquist, L. W. and R. A. Weisberg: "Microbiology-1981", ed. by D. Schlessinger, American Society for Microbiology, Washington.
- [7] Mizuuchi, K. et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 45: 429—437, 1981.
- [8] Hsu, P. L. et al.: *Nature*, 285: 85—91, 1980.
- [9] Mizuuchi, M. and K. Mizuuchi: *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 3220—3224, 1980.