

肺炎链球菌转化实验疑难解析

胡兴翠

杭州市学军中学教育集团文渊中学

[摘要]肺炎链球菌体内转化实验中转化因子为什么没有随高温杀死、为什么蛋白酶没有使R型菌裂解、DNA+DNA酶这一组实验的目的等观点和观点进行简单分析,以帮助学生理解,以及给同行教学提供参考。

[关键词]转化实验; DNA+DNA酶; 高温

[DOI] 10.12252/j.issn.2096-6288.2021.10.489

一、背景介绍

肺炎链球菌于1881年首次由巴斯德(Louis Pasteur)及G. M. Sternberg分别在法国及美国从患者痰液中分离出。为革兰染色阳性,菌体似矛头状,成双或成短链状排列的双球菌^{[1][2]}。抵抗力较弱,56℃ 15~30分钟即被杀死,对一般消毒剂敏感^[1]。肺炎链球菌分为两种类型,一种是无荚膜的粗糙无毒R型菌,另一种是有荚膜的光滑有毒S型菌^[3]。5%~10%正常人上呼吸道中携带此菌,有毒株是引起人类疾病的重要病原菌^[4]。肺炎球菌主要的致病物质是肺炎球菌溶血素及荚膜^[2]。荚膜具有抗原性,是肺炎链球菌分型的依据。此菌可引起大叶性肺炎、脑膜炎、支气管炎等疾病^{[1][5]}。

荚膜是某些细菌表面的特殊结构,是位于细胞壁表面的一层松散的黏性物质,荚膜的成分因不同菌种而异,主要是由葡萄糖与葡萄糖醛酸组成的聚合物,也有含多肽与脂质的^[1]。荚膜的作用主要有:①抗干燥的作用:荚膜多糖为高度水合分子,含水量在95%以上,可防止细菌变干,有利于细菌抵抗干燥的生活环境^{[6][7]};②当缺乏营养时,荚膜可以作为氮源和碳源^{[6][7]};③抗有害物质的损伤作用:处于细菌细胞最外层,荚膜犹如盔甲可有效保护菌体免受或少受多种杀菌、抑菌物质的损伤,如溶菌酶、补体等^{[8][9]}。

二、学生疑问及观点

(一)问题1:在学习格里菲斯肺炎链球菌体内转化实验时,学生提出问题,为什么转化因子没有和S型菌一起被高温杀死?

对于这一问题,可以进行如下解释:在高温加热条件下,细菌破裂解体。在高温的作用下,S型菌的DNA断裂成100个左右有活性的游离片段,而且每个片段至少包含20个基因,其中在某一片段上就会含有控制荚膜形成的基因^[10]。根据DNA的结构特点可知,在高温条件下DNA变性,即DNA两条链之间的氢键打开,DNA解螺旋成单链,当温度降低后,DNA复性,即DNA两条链的碱基重新互补配对形成氢键,恢复双螺旋结构^[11],所以加热并没有“杀死”转化因子,加热之后仍然具有完整的荚膜基因,经过加热之后的S型

菌和R型菌混合培养后可以检测到S型菌。

(二)问题2:艾弗里体外转化实验,课本中描述:用DNA酶处理DNA样品,DNA被降解后就不能使R型菌发生转化,而其他的酶(如蛋白酶等)对于DNA的转化能力则没有影响。学生提出问题,为什么蛋白酶没有使R型菌裂解?

艾弗里于1944年发表的《Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type II》论文,得知在肺炎链球菌的转化实验中,使用的酶有胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、核糖核酸酶、DNA酶^[12]。胰蛋白酶是一种蛋白酶,胰蛋白酶是从牛、羊、猪的胰脏中提取的一种丝氨酸蛋白水解酶^[13]。

肺炎链球菌是革兰氏阳性菌,其细胞壁主要由肽聚糖和磷壁酸(酸性多糖)构成。在我们的泪液、唾液等中含有溶菌酶,溶菌酶是我们机体免疫防疫的重要免疫物质,溶菌酶可通过破坏细菌细胞壁,使细菌裂解死亡。其作用机理是:溶菌酶能水解肽聚糖中的N-乙酰胞壁酸和N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4糖苷键,使细胞壁不溶性黏多糖分解成可溶性糖肽,导致细胞壁破裂内容物逸出而使细菌溶解^[16],能起到杀菌的作用。

(三)观点1:格里菲斯肺炎链球菌体内转化,转化因子没有和S型菌一起被高温杀死,这说明什么?

设置这个问题,是想引导学生回答出转化因子具有稳定性的特点。但是,班级有一个同学说,转化因子没有和S型菌一起被高温杀死,说明蛋白质不是转化因子。他的观点是:本实验采用高温加热处理S型菌,在高温条件蛋白质变性失活。假设蛋白质是肺炎链球菌的遗传物质,高温加热后的蛋白质失去活性,加热杀死的S型菌和R型菌混合培养,则培养基中不会检测到活的S型菌。但实验结果显示,加热杀死的S型菌可以使R型菌转化为S型菌,实验结果和假设相违背,说明假设错误,即蛋白质不是遗传物质。

学生有这样的观点,是因为在他学习的过程中,已经有

了DNA是遗传物质，蛋白质不是遗传物质这样的知识储备。此刻的学生相对于当时的格里菲斯而言，对于DNA和蛋白质的认识，更加的清晰，因当时科学界对DNA的结构知之甚少。也没有DNA这样的名词概念，所以，当时的格里菲斯只提出了转化因子的概念。这个实验说明蛋白质不是遗传物质。杀死肺炎链球菌的温度一般不超过70℃，所以，格里菲斯分别采用了60℃和65℃两个温度来进行实验^[17]，发现，经过这两个温度处理后的S型细菌丧失了致病性，但是加热杀死的S型和R型菌混合之后，注入小鼠体内，小鼠死亡。

（四）观点2：在讲述艾弗里体外转化实验中DNA+DNA酶这一组实验的目的时，学生认为此组实验与其他三组进行对照，一方面可以进一步证实DNA是遗传物质，另一方面也可以证实DNA的基本单位和0.02%的蛋白质不是遗传物质。

多糖荚膜、蛋白质不能使R型菌转化为S型菌，DNA可以使R型菌转化为S型菌，可以说明起到转化作用的不是多糖荚膜和蛋白质，而是DNA。DNA+DNA酶这一组不能使R型菌进一步转化为S型菌，这一实验使DNA是遗传物质这一结论更加具有信服力。DNA经过DNA酶处理后，水解成脱氧核苷酸，不能使R型菌转化为S型菌，可以说明DNA的基本单位脱氧核苷酸不是遗传物质。在当时，科学界已认识到蛋白质是由20多种氨基酸构成，蛋白质结构具有多样性，结构足够复杂，对于蛋白质是遗传物质深信不疑^[18]。科学家对于DNA的认识比较少，普遍认为DNA是由4种脱氧核苷酸连接构成的一个“四核苷酸”的简单结构，这种结构简单的物质无法承担起作为遗传物质的重任^[17]。艾弗里本人也比较保守在其论文中说到“可能是由于某些吸附在核酸上微量物质的作用使核酸具有转化特性”^[12]。

总结

科学是在质疑中前行的。作为教师，在日常教学过程中，不能过于刻板，要及时倾听学生的疑问和观点，不仅可以打开课堂思维，而且可以帮助学生更好地理解课本知识，更加有助于建构学生的批判能力、思维能力。

参考文献

[1] 桂颀.肺炎链球菌HMG-CoA还原酶的性质研究及抑制剂筛选[D].华中师范大学, 2012.

[2] 姜彬.记忆性CD4T细胞对IAV/Sp共感染的免疫保护机制[D].上海交通大学, 2015.

[3] 杨静利, 张莉.基因的发现历程[J].沧州师范专科学校学报, 2005(01): 77-79.

[4] 夏振雄, 杨冰, 黄靖雯.尿肺炎链球菌抗原在诊断儿童肺炎链球菌肺炎中的意义[J].中外医学研究, 2013, 11(17): 1-3.

[5] 熊志刚, 田磊, 陈中举, 管青.2011—2016年某院肺炎链球菌的分布及耐药性[J].医药导报, 2018, 37(04): 480-483.

[6] 胡丹.猪链球菌2型荚膜缺失株的构建及其致病性研究[D].第三军医大学, 2009.

[7] 赵海平, 赵志强, 谢贵林.细菌荚膜多糖的分离纯化研究进展[J].微生物学免疫学进展, 2012, 40(02): 72-78.

[8] 安威.医学细胞生物学.北京:北京大学医学出版社, 2009.

[9] 张仲林.肺炎双球菌转化实验的疑难解析[J].生物学教学, 2007(09): 56-58.

[10] 赵开勇.对肺炎双球菌转化实验的思考[J].中学生物学教学, 2003(7): 1.

[11] 闫立, 武辉.对“肺炎双球菌转化实验”的几个疑难问题的解答[J].生物学教学, 2016, 41(11): 2.

[12] Avery, Oswald, T, et al. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III[J].The Journal of Experimental Medicine, 1944, vol.79, pp.137-158.

[13] 曹雅, 周敏, 饶春, 何泽超.胰蛋白酶生产中的固液分离工艺研究[J].现代化工, 2014, 34(04): 66-69.

[14] 邱蕊.PEG修饰 ω -干扰素与尿酸氧化酶的制备、纯化、结构分析与生物活性的研究[D].福建农林大学, 2011.

[15] 李旭霞, 李庆伟.抗凝血蛋白药物的研究进展[J].辽宁师范大学学报(自然科学版), 2003(02): 187-191.

[16] 张洪伟.克氏原螯虾无脊椎动物型溶菌酶的分子克隆与功能分析[D].山东大学, 2011.

[17] Griffith, Fred.The Significance of Pneumococcal Types[J].Journal of Hygiene, 1928, 27(02): 113.

[18] 符凯.批判与建构:肺炎双球菌的转化实验更具说服力——对“DNA是遗传物质的证据”的再斟酌[J].泰州教育, 2015(17): 2.