

噬菌体和病毒核酸释放的电子显微镜观察

乔宝义 徐 浩 刘如臻*

(中国科学院微生物研究所, 北京)

采用国产电子显微镜和旋转投影设备, 通过一步释放或二步释放的蛋白单分子层电子显微技术, 分别对谷氨酸生产菌——北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekingensis* AS 1.299) 的 DNA 噬菌体 A3、大肠杆菌 (*E. coli*) 一些菌系的 RNA 噬菌体 C2 和 f2 以及青霉素生产菌产黄青霉菌 (*Penicillium chrysogenum* P001) 的 RNA 病毒 P. C. 颗粒释放的核酸进行了观察, 并对噬菌体 A3 的变性分子、再生分子以及释放的自然 DNA 分子的形状进行了比较。结果指出, C2, f2 噬菌体和病毒 P. C. 的核酸用一步法释放出来, 特别是 f2 噬菌体释放率较高。用二步法 (高 pH 或 5M 尿素预处理) 能将噬菌体 A3 DNA 分子释放出来, 其释放的自然分子绝大多数呈现长线状, 而变性分子呈单股树丛状, 再生分子呈多中心、双中心、单中心、扩展 (无中心)、长线状、环形、分叉, 并在双股 DNA 分子上还呈现单股树丛状、环形和单股分叉等物理特性。

噬菌体和病毒是结构比较简单的微生物。它们主要由蛋白外壳包围着的核酸组成。由于所含核酸的不同, 被分成核糖核酸 (RNA) 病毒 (或噬菌体) 和脱氧核糖核酸 (DNA) 病毒 (或噬菌体), 又根据核酸的股数不同, 分别分成单股 RNA 或 DNA 噬菌体 (或病毒) 和双股 RNA 或 DNA 噬菌体 (或病毒)^[1]。

DNA 和 RNA 是结构和遗传功能不同的两大类核酸物质, 总称为核酸。一般来讲, 前者主要在生命体继代中起传递遗传密码的作用, 后者主要起翻译遗传密码进而合成蛋白质的作用^[2]。然而, 在 RNA 病毒中, RNA 也同样具有象 DNA 那样的遗传密码的功能。

人类对核酸的认识, 是与生产和科学技术的发展分不开的, 在电子显微镜 (下称电镜) 制出之前, 人们利用光学显微镜只能在细胞水平上观察到染色体等, 电镜出现后, 由于电镜技术的发展, 可以直接观察到单核和真核生物的遗传活性物质的超显

微结构。现在人们通过蛋白单分子层技术可以直接观察到由病毒和噬菌体释放出来的核酸大分子^[3] 及其复制过程、DNA 股之间杂交、DNA 和 RNA 股杂交、信息 RNA 的翻译、DNA 的体外转录等。特别是利用异源双股倍体电镜技术可以精确地计算和绘制出两个噬菌体 DNA 退火股的突变、缺失、替换、倒位。也可以确定病毒基因组的易位和寄主基因组区域^[4]。

总之, 随着电镜分辨率的提高以及电镜技术不断发展, 必然得到越来越多的诸如核酸构造、核酸复制、蛋白质合成过程等直观资料。这样, 不仅进一步证明遗传学和生物化学等研究所得到的间接资料的可靠性及其相互关系^[5], 而且对直接揭示生命现象的物质性具有一定的意义。

本文于 1975 年 6 月 6 日收到。

* 噬菌体和病毒提纯材料分别由那淑敏、贾盘兴、徐星、梁平彦同志提供, 核酸分子长度由中国科学院地理研究所地图室金学英、陈宝雯和物理研究所二室董富民等同志帮助测量计算, 谨致谢意。

我们遵照伟大领袖毛主席关于“独立自主、自力更生”的教导,用我国设计和制造的仪器设备,对工业生产上常发现的一些噬菌体和病毒,进行了核酸释放观察,并对直接释放的核酸进行了变性退火处理,以观察核酸分子的物理特性,为噬菌体和病毒核酸特性的研究,核酸复制以及异源双股体的研究,提供一些简便条件。

一步释放法

“一步法”即是碱性蛋白的展层与核酸的释放是同时进行的。样品颗粒与高盐展层液混合后,当在下相低渗液表面开始展层时,由于处于高渗透压的样品颗粒骤然接触低渗溶液,颗粒蛋白外壳因受到渗透压的冲击而破裂,随之核酸物质被挤出。核酸与碱性蛋白的氢键紧密结合,当碱性蛋白在下相溶液展层过程中,三维的核酸丝状分子被展成二维结构的具有螺旋和一定走向的核酸分子^[6]。

(一) 实验步骤

分别取大肠杆菌 RNA 噬菌体 C2 和 f2 以及青霉素生产菌产黄青霉 RNA 病毒 P. C. 溶液各 0.05 毫升,其浓度 C2 和 f2 分别为 5×10^{11} 个/毫升和 2×10^{12} 个/毫升,真菌病毒 P. C. 为 2×10^{12} 颗粒/毫升,分别放入 0.45 毫升含有 100—200 微克/毫升细胞色素 C 的 2M 醋酸铵 (NH_4Ac) 的溶液中(展层前加入 0.5% 的异丙醇),作为展层溶液。下相溶液分别为 0.2M NH_4Ac 溶液或蒸馏水。

在直径 9 厘米清洁培养皿内放入 25 毫升左右的下相溶液,倾斜放入用下相溶液浸润的玻璃片于下相溶液中,并在下相溶液表面放上少许滑石粉。用滴管吸取展层溶液,在接近下相溶液表面的玻璃片上轻轻滴一滴,徐徐下流,当接触下相溶液表面时,很快扩展成单分子层并把滑石粉推

向四周。所有过程均在室温下进行(约 20℃),静置一分钟后,用火棉胶制成的铜网蘸取,分别在无水酒精或异戊烷溶剂中两次脱水(各 10 秒),用滤纸吸去多余溶剂,风干。

用国产 DM-300 型真空镀膜机旋转投影。真空度 3×10^{-5} 托,钨丝直径 0.5—1.2 毫米,钨钨合金(60:40)直径 0.1 毫米,用量 20—50 毫克,喷涂源与旋转台水平距离 10—15 厘米,喷涂角约 5—7 度。旋转台转速分别为每分钟 30 转和 60 转。

用国产 DX-2 型电子显微镜观察。加速电压 50 千伏(KV),物镜光栏 50 微米,以晶格复型(1152 条/毫米)测量放大倍数。

核酸分子长度测量,用 5,000—10,000 倍左右电光放大的 6×9 干板,以光学放大 4—8 倍,制成正片,然后用图形数字转换器描述,电子计算机计算。

(二) 观察结果

C2、f2 噬菌体以及真菌病毒都能用这个方法得到核酸的释放。

图版 I-1, 3 是 C2 噬菌体释放核酸的情况。其中 1 显示从颗粒裂口中释放并与噬菌体空壳连接着的 RNA 巨大分子,有 8 个游离端,链总长为 40.83 微米,有的 C2 噬菌体释放的 RNA 分子总长才 7.24 微米。释放核酸的噬菌体颗粒比未释放核酸的颗粒体积大 3—4 倍。图版 I-2, 3 是脱离了噬菌体空壳的不同长度的游离 RNA 分子,链平均长 6.23 微米左右。有的伸展开来,有的呈雪花状。

图版 II 是不同放大倍数的 f2 噬菌体释放的 RNA 分子。与 C2 噬菌体释放 RNA 的情况不同: 1. 没有观察到明显的裂口,大量照片呈线团状,从图版 II-2—4 可看出,它们是由包围在空壳周围的 RNA 分子形成的; 2. RNA 分子链断断续续地断裂

成有一定走向的片段(图版 II-1); 3. 从 2—4 还可看到, 刚从噬菌体颗粒释放的 RNA 分子, 在连接空壳的地方还保持单条 RNA 分子的形状, 但是远离空壳的分子, 二条或多条链机械地拧成一束, 呈草绳状。也有几条小束拧成大束或大束又分成小束。

图版 III 是真菌病毒 P. C. 核酸释放的情况。1. 病毒颗粒膨胀变形, 但没有破裂, 在颗粒周围包有一层膜状物, 许多丝状物与膜平行排列; 2. 是颗粒受到渗透冲击后体积显著膨胀(为未释放核酸颗粒的 3—10 倍), 爆炸破裂后, 除少数 RNA 分子与残缺空壳相连外, 大量分子与空壳平行排列。

二步释放法^[17]

二步释放法, 即是在展层之前先用高 pH 或高浓度尿素对样品进行预处理, 其蛋白外壳变性(或溶解), 在展层过程中易受渗透冲击而释放出核酸。北京棒状杆菌 DNA 噬菌体 A3 采用一步释放法没有释放出核酸, 而用二步释放法的两个实验方法都观察到了核酸的释放。

(一) 尿素处理方法

取 0.4 毫升 A3 噬菌体放入装有 1.6 毫升的 5M 尿素溶液小试管内, 混合后, 分别在 5、10、15、20、25、30 分钟取样 0.07 毫升, 滴在比色碟上, 随后加上 0.07 毫升的 2M NH_4Ac 溶液(含有 200 微克/毫升细胞色素丙), 混合后作为展层溶液, 下相溶液为 0.25M NH_4Ac 溶液, 展层方法同一步法。火棉胶网醮取单分子层后, 在蒸馏水中漂浮 2 分钟, 再在无水乙醇中脱水 2 次, 风干, 投影后, 进行电镜观察。

通过观察比较表明, 除 5 分钟处理外, 其他处理时间都有一定比例的释放, 15、20 分钟处理呈现与空壳相连的核酸比较多, 25、30 分钟处理游离的核酸较多, 大量

噬菌体头部和尾部分离。图版 IV-1 是从噬菌体头部(尾部已脱离)释放核酸的情况, DNA 分子围绕着噬菌体头部空壳呈放射状分布, 释放总长度可达 83.14 微米左右。另外还观察到, 35.03 微米、30.07 微米和 10.19 微米的总长度的 DNA 分子从噬菌体释放出来。图版 IV-2 是从噬菌体尾部释放出两条 DNA 分子, 一条长 1.11 微米, 另一条长 8.71 微米。在观察中大量出现的是从与头部脱离的尾部末端释放一条或两条 DNA 分子的情况。图版 V-1 是游离的 DNA 分子, 我们测量了 10 条分子长度, 分别为 14.34 微米、12.69 微米、12.58 微米、12.17 微米、10.44 微米、9.17 微米、8.47 微米、6.93 微米、4.58 微米和 3.66 微米, 平均长度约为 9.50 微米。

(二) 高 pH 方法^[8]

在试管中依次加入 0.1 毫升 0.1M 的乙二胺四醋酸二钠($\text{Na}_2\text{-EDTA}$), 0.15 毫升 5M 氯化钠, 0.45 毫升蒸馏水, 0.1 毫升噬菌体 A3(浓度为 2×10^{12} 个/毫升), 0.1 毫升 2M 氢氧化钠。轻轻振荡, 混合后 pH 大于 12。室温放置 10 秒钟左右进行预处理, 随后, 立即以 0.1 毫升 2M 磷酸二氢钠溶液中和, 至 pH 6.5 左右, 取 0.05 毫升中和液放入含有 100 微克/毫升的 0.25 毫升 NH_4Ac 溶液中作为展层溶液, 下相溶液为蒸馏水。展层、投影等方法同一步法。

图版 V-2, 是 A3 噬菌体从头部释放 DNA 分子的情况, 可观察到噬菌体头部有裂口, 核酸分子从中释放出, 整个噬菌体头部释放的 DNA 分子总长度为 10.51 微米左右, 没有游离端。图版 V-3 是从尾部末端释放的长线状分子, 长度为 2.80 微米左右。

以上照片是短时间高 pH 处理得到的。在这种条件下大部分噬菌体蛋白外壳尚未溶解, 如果时间过长大部分外壳溶解,

DNA 分子呈长线状游离出来。

DNA 分子变性退火处理

所谓变性退火处理是指加热与冷却交替处理使核酸分子变性和再生。实验方法,前几步基本与二步释放法的高 pH 处理相同,不同的是在调节 pH 之前,在室温放置 10 分钟,然后,在冰浴中骤冷,冷冻 30 分钟后,用 0.1 毫升 2M 磷酸二氢钠溶液中和(取部分混合液,用高 pH 释放方法制备标本,观察单股 DNA 分子),并立刻放入 80℃ 的水浴中加热 30 分钟,再置冰浴中骤冷。取样,按高 pH 释放方法制备标本,观察再生分子物理特性。

通过高 pH 和骤冷处理后,大量 A3 噬菌体蛋白外壳溶解, DNA 分子释放后在冷冻条件下变性,双股分裂成单股^[8],如图版 VI-1 所示,由于我们采用了水溶液蛋白单分子层技术,在这种条件下,单股 DNA 分子本身碱基氢键的随机结合,所以多形成树丛状^[9]。在观察中尚未看到双股分成单股的过程,也未看到尚未分股的舒展转好反差较强的双股 DNA 分子。

在 80℃ 加热和冷冻处理条件下,变性再生的 DNA 分子呈现各种情况。图版 III-3 分子呈长线状。图版 VI-2, 3 呈现多中心和双中心状再生分子。图版 VII-1, 2 为单中心 DNA 分子,有的有两个游离端,有的有 4 个游离端,图版 VII-3 为扩展状分子(无中心)。图版 VIII 上行 3 张照片为环状双股 DNA 分子,长度分别约为 1.99 微米、0.66 微米和 0.65 微米、0.48 微米;中间 2 张照片是双股 DNA 分子上呈现的单股环状 DNA 分子;下行为分叉或多分枝 DNA 再生分子。

讨 论

本工作参考了 Kleinschmidt 的蛋白单

分子层技术^[3]和 Davis^[8] 的核酸异源双股体等方法,根据我们实验室的条件,对几种噬菌体和病毒颗粒进行了释放核酸的初步摸索。通过一步释放方法能得到 C2、f2 噬菌体和真菌病毒 P. C. RNA 分子的释放。特别是对 f2 噬菌体,释放率较高。可是,不能使 A3 噬菌体释放出 DNA 分子,然而通过二步释放,即采用高 pH 和高浓度尿素预处理的两个实验方法,均能使 A3 噬菌体释放出 DNA 分子。

以 A3 噬菌体为材料,用直接从噬菌体释放核酸的方法,对其释放的游离 DNA 分子和变性退火 DNA 分子进行了比较。通过照片分析,变性 DNA 分子呈现树丛状单股;退火分子有下面几种物理特性:多中心状、双中心状、单中心状、扩展形状(无中心状)、长线状、环状、分叉状等,并在退火双股分子链上可观察到单股环、单股树丛状和单股分枝。然而在游离的自然 DNA 分子除了呈现大量的长线状分子外,很少表现其他物理特性,就其线状分子长度来讲,自然 DNA 分子长度平均约为 9.50 微米。而退火分子长度约为 19.36 微米,最长可达 26.30 微米左右。通过退火分子与游离自然分子的比较,变性分子与退火分子的比较以及退火处理后,再生分子所呈现的单股环、单股分叉、单股树丛状的特性,可以确认 A3 噬菌体所含的 DNA 分子链是由双股 DNA 分子组成的。

蛋白单分子层方法很多,我们只采用了水溶液技术,这种方法,展层液和下相溶液的条件不同都会影响核酸分子的性状,特别对核酸分子长度测量影响很大,本文的结果和分析是在一定的实验条件下得到的。

在变性退火试验中,加热温度只采用了 70℃ 和 80℃,就以此两种温度比较,再生分子表现的特性也有所不同,前者出现

分叉状分子比率较后者高。

参 考 资 料

- [1] 中国科学院微生物研究所噬菌体组：噬菌体及其防治，科学出版社，1973。
- [2] 三浦 谨一郎：核酸：1—34，1970。
- [3] Kleinschmidt, A. K. Lang, D., Jaecherts, D. and Zahn, R. K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **61**: 857—864, 1962.
- [4] Szybalski, W., Kubinski, H. and Summers, C.: *Methods in Enzymology*, **21**:

- part D, 383—413, 1971.
- [5] Hamkalo, B. A. and Miller, O. L.: *J. Ann. Rev. Biochem.*, **42**: 379—396, 1973.
- [6] Kleinschmidt, A. K.: *Methods in Enzymology*, **12**: part B, 361—377, 1968.
- [7] Vasquez, C. and Kleinschmidt, A. K.: *J. Mol. Biol.*, **34**: 137—147, 1968.
- [8] Davis, R. W. and Davidson, N.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **60**: 241—250, 1968.
- [9] Davis, R. W., Simon, M. and Davidson, N.: *Methods in Enzymology*, **21**: part D, 413—427, 1971.

ELECTRON-MICROSCOPY OF NUCLEIC ACIDS RELEASED FROM PHAGES AND FUNGAL VIRUS

Qiao Baoyi, Xu Hao and Liu Ruzhen

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

With the aid of an electron microscope and a rotation shadowing attachment, both made in China, visualization of nucleic acid released from A3 DNA phage of *Corynebacterium pekingensis* AS 1.299, C2 as well as f2 RNA phages of certain *E. coli* strains and virus of *Penicillium chrysogenum* strain P001 were made by means of the protein monolayer technique adopted for one and two steps nucleic acid releasing methods. An electron microscopic comparison was made between the native and the denatured, annealed molecules released from A3 phage. It was shown that the nucleic acids of C2 and f2 phages as well as

virus *P. chrysogenum* could be released by the one step method, that of C2 being the easiest. The DNA in phage A3 could be released by the two step methods with a prior treatment with an alkaline pH or a 5M urea solution at room temperature. The DNA released naturally assumed a linear configuration. The denatured molecules appeared only single-strand bushy, and the renatured molecules were multi-centered, double-centered, mono-centered, extended (without any center), looping or branched. The double stranded DNA molecules may also exhibited single strand looping, bushy or branching.