

北京棒状杆菌噬菌体脱氧核糖核酸的 分离及其性质的研究

那淑敏 徐 星 余茂勋

(中国科学院微生物研究所, 北京)

利用酚法除蛋白提取北京棒状杆菌的三株不同血清型的噬菌体 A2、A3 和 A133 的核酸, 对核酸的硷基组份进行了分析, 含有四种通常的硷基, 根据脱氧核糖核酸的解链温度, 计算噬菌体脱氧核糖核酸的 G + C 克分子百分数分别依次为 61.2、65.6 和 67.5%, 所有噬菌体脱氧核糖核酸均联结有葡萄糖基。利用 α -纤维素酶制备获得北京棒状杆菌的原生质体, 所提取的三种噬菌体脱氧核糖核酸对此可以转染成功。

关于噬菌体的各种类型核酸的分离和鉴定, 已有不少报道。但有关各种产谷氨酸菌株的噬菌体核酸的研究, 仅见到乳糖发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*) 的四株噬菌体核酸的工作^[1]。

北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense* AS 1.299) 是一株广泛使用的产谷氨酸菌株^[2], 已经鉴定有三株不同血清型的噬菌体: A2、A3 和 A133^[3]。现对该三株噬菌体的核酸进行分离和分析, 利用制备成功的原生质体进行转染试验, 建立一种转染系统。

材料和方法

(一) 细菌和噬菌体

北京棒状杆菌 AS 1.299 和它的三株不同血清型噬菌体 A2、A3 和 A133^[3]。

(二) 培养基

BP 培养基, 见文献 [3]。PA 培养基为每升含牛肉膏 10 克, 水解酪素氨基酸 10 克, 葡萄糖 10 克, 蔗糖 100 克, pH7.0。

(三) 缓冲液

Tris-HCl 缓冲液为 0.01M Tris-HCl, pH7.5; Tris-EDTA-SDS 缓冲液为 0.01M Tris-HCl, 0.005M EDTA-Na₂, 0.075M NaCl, 0.5% SDS, pH8.3; SSC

缓冲液为 0.15M NaCl, 0.015M 柠檬酸钠, pH7.0。

(四) 大量培养噬菌体方法

将 3000 毫升容量的三角瓶装 500 毫升 BP 培养基, 按接种量 6% 将对数生长期的菌悬液 (10^8 细胞/毫升以上) 接入, 同时以感染系数为 0.1 的噬菌体悬液加入, 于 30℃ 振荡培养 (每分钟 198 次的旋转式摇床) 15 小时, 一般效价可达 $1-5 \times 10^{10}$ 单位/毫升。经 5000 转/分 (Janetzki K70) 离心 30 分钟, 去除菌体碎片和杂质, 获得粗制裂解液。

(五) 噬菌体的浓缩和提纯

将裂解液冷却至 10℃ 以下, 缓慢地加入分析纯的硫酸铵, 不断进行搅拌, 促使均匀溶解, 达到添加量为 40%, 并且每升中加入 pH7.0 的 0.1M EDTA 溶液 25 毫升^[4]。移置冰箱中约 48 小时, 待噬菌体完全沉降, 吸除上清液。将含沉降物的悬液经 10000 转/分离心 10 分钟 (Janetzki K14/A), 收集沉淀, 悬浮于 0.01M 的 Tris-HCl 缓冲液中, 经 15000 转/分离心 30 分钟, 去除杂质, 装入透析袋中对 Tris-HCl 缓冲液在冰箱中透析除盐, 多次更换透析缓冲液。然后进行酶法处理, 在处理中加入胰蛋白酶 (Difco) 50 微克/毫升、核糖核酸酶 (上海东风试剂厂) 为 100 微克/毫升、脱氧核糖核酸酶 (Scravac Laboratories) 5 微克/毫升, 37℃ 作用 30 分钟, 冷却终止反应, 最终

本文于 1978 年 3 月 24 日收到。

所得噬菌体悬液效价可达 10^{11-12} 单位/毫升。

(六) 噬菌体核酸的分离

利用酚法去除蛋白, 提取噬菌体核酸^[11], 全部操作过程在 4°C 左右的低温下进行。将提纯的噬菌体悬液与等体积新蒸的经 Tris-EDTA-SDS 缓冲液饱和的酚, 在带塞三角瓶中混合振荡 20 分钟, 取混合液以 10,000 转/分离心沉降 10 分钟, 分成两相。将上层水相溶液与等体积经 Tris-EDTA-SDS 缓冲液饱和的新蒸酚混合, 重复提取一次, 再取其上层水相溶液, 对 SSC 缓冲液进行透析, 除去残酚。以两倍于透析液体积的 4°C 95% 乙醇加入透析液中, 使核酸沉淀形成乳白色丝状体。将丝状体溶于 SSC 缓冲液, 再以 95% 乙醇沉淀, 反复提取两次以上, 最后溶解在 SSC 缓冲液中, 经 105000 $\times g$ 离心 (MSE40) 1 小时, 得到清澈透明而粘滞的脱氧核糖核酸溶液。

(七) 分析方法

定磷按照 King^[12] 的方法。测定蛋白利用 Folin 法^[13]。测定 DNA 和 RNA 分别采用二苯胺法^[14] 和 苔黑酚法^[15]。DNA 硷基组份的测定利用高氯酸水解液纸层析法^[10,11], 取已知样品腺嘌呤 (BDH)、鸟嘌呤 (上海试剂厂)、胞嘧啶 (Light & Co. Ltd.)、胸腺嘧啶 (Light & Co. Ltd.) 和尿嘧啶 (E. Merck) 作为标准样, 层析后各斑点的洗脱液在紫外分光光度计 (Hilger) 中测定全波吸收曲线, 并与已知样品作比较。

(八) 葡萄糖基的测定和验证

称取干燥的噬菌体脱氧核糖核酸制品 10—15 毫克, 加入 1 毫升 1N HCl 于 100°C 水解 60 分钟, 离心取上清液在新华滤纸上点样, 对照样品为 D-葡萄糖 (北京化工厂, 分析纯)。所采用的溶剂系统为异丙醇-水 (160:40), 层析后凉干显色。显色剂为丙酮 (100 毫升)、二苯胺 (1 克)、苯胺 (1 毫升) 和浓磷酸 (10 毫升) 的混合液。在瓷盘中将显色剂浸润层析后的滤纸, 持续 5—10 分钟, 加温 60°C 烘干, 显示蓝灰色斑点, 与对照标准的葡萄糖 R_f 值比较, 以上基本方法参照 Takahashi 和 Marmur^[12]。

为了验证所显示的蓝灰色斑点, 除了比较 R_f 值外, 还利用葡萄糖氧化酶 (北京化工厂) 在 30°C 水浴中轻度振荡处理噬菌体核酸水解产物和标准葡萄糖, 再在室温下斜置 3 小时后, 按上

法层析显色, 不再呈现蓝灰色相应的斑点, 从而可以证实噬菌体核酸中有联结的葡萄糖基^[12]。

(九) 噬菌体 DNA 解链温度的测定及其硷基克分子百分数的计算

按照 Marmur 和 Doty^[13,14] 的方法测定解链温度曲线。所使用的分光光度计是 Unicam sp. 700C 及其配套加热器。取适当浓度溶于 SSC 缓冲液中的噬菌体 DNA 液置于光径为 1 厘米的杯中, 在 260 毫微米波长测定室温下的吸收值, 然后利用加热器加热使之逐渐增温, 测定吸收值的生长变化, 将吸收的相对增长值对液体的温度作图, 求出解链温度 (T_m) 值, 按公式^[13] 计算硷基比例, 即

$$(G + C) = \frac{T_m - 69.3}{0.41}$$

(十) 原生质体的制备和转染试验

取在 30°C 下 BP 培养基中振荡培养过夜的菌悬液 (4×10^8 细胞/毫升) 3 毫升接入 20 毫升新鲜 BP 培养基中, 振荡培养 6 小时, 得到生长状态较为相近的对数生长细菌。取此菌悬液 3 毫升经 3000 转/分离心 15 分钟, 将沉淀菌体悬浮于 0.7 毫升 1.5M 蔗糖溶液中, 加入 1 毫升 2% 的 α -纤维素酶 (Carl Roth OHG, 由 *Aspergillus niger* 制取) 和 pH8.1 的 0.01M Tris 0.5 毫升, 0.01 毫升 0.01M EDTA 溶液作用 15 分钟, 在相差显微镜下观察, 可以见到圆形原生质体。部分方法系参照 Guthrie 和 Sinsheimer 方法^[15]。

将提取的噬菌体 DNA 溶于 pH8.1, 0.5M Tris-HCl 的缓冲液中, 稀释后分别取 0.2 毫升 DNA 的不同稀释液, 与 0.25 毫升原生质体悬液混合, 置于 37°C 水浴中振荡 15 分钟后, 加入 3 毫升 PA 培养基, 继续在 37°C 下振荡培养 1.5 小时, 利用 PA 培养基进行双层琼脂方法制成平板, 在 30°C 培养 24—36 小时, 观察结果。

结果和讨论

三株不同血清型的噬菌体通过硫酸铵沉降、酶法处理提纯的噬菌体悬液, 经酚法除去蛋白, 其残量少于 2%, 提取到的核酸, 经过分析, 均为脱氧核糖核酸。以噬菌体 A3 的 DNA 为例, 含磷量为 8.66%, 紫外吸

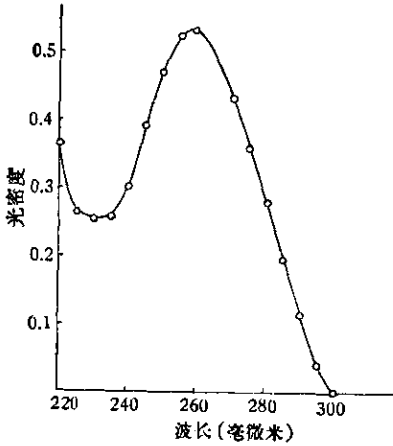


图1 噬菌体 A3 DNA 的紫外吸收曲线
(DNA 溶于 SSC 缓冲液中)

收谱见图1。最大吸收值的波长为259毫微米(光密度为0.53),最小吸收值在230毫微米(光密度为0.255),A2和A133的DNA紫外吸收谱的特征基本相同(表1)。

表1 噬菌体 DNA 的特征

DNA	波长(毫微米)		$\frac{260}{230}$	$\frac{260}{280}$
	最大值	最小值		
A2	259	234	2.01	2.09
A3	259	230	2.08	1.90
A133	259	234	1.95	1.84

根据高氯酸水解三种噬菌体 DNA 的结果,它们都含有四种通常的碱基,即腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶。

从图2中三株噬菌体 DNA 的解链温度曲线求得 T_m , 按 Doty^[13] 公式计算 $(G + C)$ 克分子百分数,所得的 $(G + C)\%$ 列于表2。从结果看来,北京棒状杆菌噬菌体 DNA 的 $(G + C)\%$ 较乳糖发酵短杆菌的四株噬菌体 P465, P468II, Ap85III 和 P4 的数值高^[2]。

根据葡萄糖基的测定和验证,三株噬菌体的 DNA 都含有葡萄糖基,层析后的 R_f 值与标准葡萄糖的值比较,都是一致或相近的(葡萄糖标准样 R_f 值为 0.69, A2 为

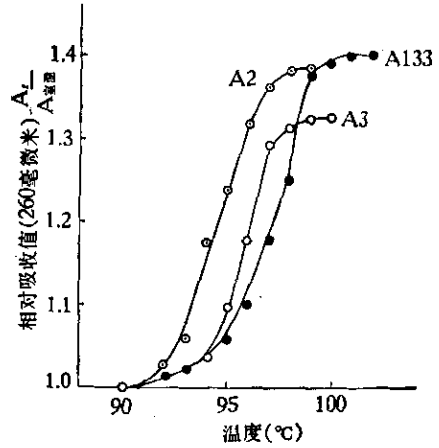


图2 三株噬菌体 DNA 的解链温度曲线

表2 噬菌体 DNA 的 T_m 值和 $(G + C)\%$

噬菌体	$T_m(^{\circ}C)$	$(G + C)\%$
A2	94.4	61.2
A3	96.2	65.6
A133	97.0	67.5

0.69, A133 为 0.69; 葡萄糖标准样 R_f 值为 0.66, A3 为 0.66)。

表3 转染试验的结果

噬菌体	A2	A133
DNA(微克/毫升)	36	8.7
产生噬菌斑数	218	165
转染效率(斑数/微克 DNA)	6	19

根据上述方法所提取的噬菌体 DNA 对北京棒状杆菌原生质体进行转染试验,可以获得肯定的结果(表3)。A133DNA 的转染效率较高,每微克 DNA 可以形成 19 个噬菌斑。但较其它系统中的转染效率低^[16,17]。根据 Spizizen 等人^[18]报道,决定转染能否成功,要考虑细胞处于感受态。此外,噬菌体 DNA 分子的大小和完整程度^[17],介质的条件,诸如两价阳离子^[16]和盐类的浓度^[15],以及鱼精蛋白硫酸盐^[19,20]的存在,均可显著有效提高产斑数。因此,有可能进一步提高转染效率。

由于北京棒状杆菌是一株格兰氏阳性菌,利用一般用于大肠杆菌等有效的溶菌酶处理细胞,甚至在 400 微克/毫升溶菌酶作用下,也没有能够获得原生质体,而利用 α -纤维素酶可以成功地制备原生质体。目前,尚需进一步探明这种酶制剂中作用于胞壁的有效成份,以便澄清这一问题。

参 考 文 献

- [1] Olo, T. and Ogata, K.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 17:102—108, 1968.
- [2] 陈琦,张震元,李玲阁:微生物学报, 13, 1—4, 1973.
- [3] 中国科学院微生物研究所噬菌体组:微生物学报, 17, 211—215, 1977.
- [4] Sinsheimer, R. L.: *J. Mol. Biol.*, 1:37—42, 1959.
- [5] Kaiser, A. D. and Hognes, D. S.: *J. Mol. Biol.*, 2:392—415, 1960.
- [6] King, E. J.: *Biochem. J.*, 26:292—297, 1932.
- [7] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193:265—275, 1951.
- [8] Dische, Z.: In "The Nucleic Acids", Eds. by E. Chargaff and J. N. Davidson,

Academic Press Inc., N. Y., vol. I, pp. 285—305, 1955.

- [9] Ceriotti, G.: *J. Biol. Chem.*, 214:59—70, 1955.
- [10] Bendich, A.: In "Methods in Enzymology", Eds. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan. Academic Press Inc., N. Y., vol. III, pp. 715—723, 1957.
- [11] Marshak, A. and Vogel, H. J.: *J. Biol. Chem.*, 189:597—605, 1951.
- [12] Takahashi, I. and Marmur, J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10:289—292, 1963.
- [13] Marmur, J. and Doty, P.: *J. Mol. Biol.*, 5:109—118, 1962.
- [14] Marmur, J. and Doty, P.: *Nature*, 183:1427—1429, 1959.
- [15] Guthrie, G. D. and Sinsheimer, R. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 72:290—297, 1963.
- [16] Sjöström, J.-E., Lindberg, M. and Philipson, L.: *J. Bacteriol.*, 109:285—291, 1972.
- [17] Baltz, R. H.: *J. Mol. Biol.*, 62:425—437, 1971.
- [18] Spizizen, J., Reilly, B. E. and Evans, A. H.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 20:371—400, 1966.
- [19] Paranchych, W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 11:28—33, 1963.
- [20] Smull, C. E. and E. H. Ludwig: *J. Bacteriol.*, 84:1035—1040, 1962.

ISOLATION AND PROPERTIES OF DEOXYRIBONUCLEIC ACIDS FROM PHAGES ATTACKING *CORYNEBACTERIUM PEKINESE*

Na Shu-min Xu Xing Yu Mao-xiao

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Deoxyribonucleic acids were isolated by phenol extraction from three serotypes of bacteriophage — A2, A3 and A133 on *Corynebacterium pekinense*.

DNAs isolated from these phages contained only four usual bases, i.e. adenine, guanine, cytosine and thymine. The mole per cent G-C of these DNAs were determined by thermal denaturation

method and the values for A2, A3 and A133 calculated by Doty's equation were 61.2, 65.6 and 67.5% respectively.

It was proved that all these phage DNAs were connected with glucose residues. These extracted DNAs were found to be able to infect protoplast prepared by treatment of *Aspergillus niger* with α -cellulase.