

大肠杆菌噬菌体 C2 的一些物理化学特性

刘玉方 贾盘兴 余茂勋

(中国科学院微生物研究所, 北京)

大肠杆菌噬菌体 C2 是含 RNA 的微球形噬菌体, 直径约 22 毫微米。提纯的噬菌体在 SSC 缓冲液中沉降系数为 79 S, 在 260 毫微米比吸收值为 7.8/毫克/毫升。纸层析分析表明其核酸碱基组成的克分子百分数为: A 22.0、U 27.0、G 26.1 和 C 24.8。其解链温度为 57.5℃。聚丙烯酰胺凝胶电泳测得 RNA 分子量为 1.1×10^6 。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得外壳蛋白和 A 蛋白的分子量分别是 13,200 和 42,000。

Loeb 和 Zinder^[1]发现大肠杆菌 RNA 噬菌体以来, 不少实验室相继分离到一些 RNA 噬菌体, 根据它们的血清学特性和物理化学性质分成四个类群^[2-5]。1974 年以来, 我们从污水中陆续分离到一批 RNA 噬菌体, 并鉴定其生物学特性。本文报道大肠杆菌 RNA 噬菌体 C2 的一些物理化学特性, 并与已知的 RNA 噬菌体进行了比较。

材料和方法

(一) 噬菌体 C2 的制备

1. 培养基: 制备噬菌体的培养基每升含 Na_2HPO_4 7 克, KH_2PO_4 3 克, NH_4Cl 1 克, NaCl 0.5 克, 酪素水解物 6 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 克, 甘油 3 毫升。硫酸镁和甘油分别灭菌。感染 C2 噬菌体之前加 1 毫升 1 M 的氯化钙。

2. 裂解溶液: 每 100 毫升蒸馏水中含有 10 毫克溶菌酶, 0.29 克的 EDTA 和 12.11 克 Tris, pH 7.5。

3. 噬菌体悬液的制备和提纯: 3000 毫升三角瓶装 500 毫升培养基, 接入对数生长期的大肠杆菌 285 菌悬液, 加入 C2 噬菌体原液, 感染复数为 10, 于 37℃ 回旋式摇床上振荡培养 (198 次/分), 感染 6 小时后, 加入 0.05—0.10% 裂解溶液和 1% 氯仿 (v/v), 摇匀, 使其完全裂解。

基本按 Yamamoto^[6]的方法提纯 C2 噬菌体。将上述粗制裂解液加入固体 NaCl, 最终浓度为

0.5 M, 于 4℃ 过夜, 5000 转/分离心 20 分钟, 除去细菌碎片。在上清液中加入 10% 聚乙二醇-6000, 在 4℃ 静置过夜, 12,000 转/分离心 30 分钟, 沉淀物溶于相当于所用裂解液体积 1% 的 SSC 缓冲液中, 对 SSC 透析 24 小时。10,000 转/分离心 30 分钟, 上清液再经 35,000 转/分 (MSE 40) 离心 1.5 小时, 获得 C2 噬菌体沉淀, 溶于少量 SSC 中备用。上述粗制裂解液也可用 Gesteland^[7]等人的方法提纯。

(二) C2-RNA 的制备

按 Gesteland^[7]等人方法制备 C2-RNA。

(三) 嘌呤和嘧啶碱基的分析方法

利用 HClO_4 (70—72%) 将 C2-RNA 于 100℃ 水解 1 小时^[8]或用 0.3 N KOH 在 37℃ 水解 18 小时^[9]。产物分别为游离碱基和 2'、3'-核苷酸混合物。

酸水解后加入 2 N KOH 调 pH 到 4, 离心除去 KClO_4 , 经浓缩后在异丙醇: 盐酸: 水 = 65: 16.7: 18 的层析液中进行下行纸层析分离。新华 1 号滤纸, 温度 24℃。

碱水解所得 2'、3'-核苷酸混合物先通过强阳 1 号树脂处理, 去钾离子后, 冷冻干燥, 溶于少量 SSC 中进行纸电泳。电泳缓冲液为 0.02 M 柠檬

本文于 1979 年 2 月 16 日收到。

广东省微生物研究所电镜室协助进行噬菌体电镜观察; 中国科学院化学研究所李玄同志协助进行超离心分析; 本所技术室协助进行超离心制备; 徐浩同志帮助测定解链温度; 本所三室提供 TMV-RNA 样品, 特此致谢。

酸缓冲液, pH 3.5, 电压 450 伏, 室温下电泳 7 小时。上述二种方法所得结果的紫外吸收显示四个点, 这些点用 0.01N HCl 洗脱 (GMP 用 0.1N HCl 洗脱)。根据碱基和核苷酸特定波长的克分子消光系数^[10], 计算碱基的克分子百分数^[11]。

(四) 外壳蛋白和 A 蛋白的提取

外壳蛋白的提取按 Sugiyama^[12]等人方法制备。

A 蛋白的提取按 Osborn^[13]等人的方法。

(五) 分子量测定

1. RNA 分子量的测定: 用 2.4% 聚丙烯酰胺圆管凝胶电泳测定 C2-RNA 分子量^[14,15]。上下电泳槽均用 E 缓冲液 (0.04 M Tris, 0.02 M NaAc, 2 mM EDTA pH 7.8), 加样前预电泳 1 小时, 用溴酚蓝作指示剂, 以 TMV-RNA 和大肠杆菌 r-RNA 为对照, 加样量为 10—30 微克, 5 毫安/管电流在 4℃ 电泳 3 小时, 剥胶后用 1 N 乙酸固定 15 分钟, 用 Scanner 400 型核酸蛋白质测定仪在 260 毫微米波长扫描; 或用 2% 的次甲基蓝 (溶于 1 N 乙酸) 在室温下染色 8—15 分钟, 自来水冲洗脱色, 测定 RNA 的迁移率。

2. 外壳蛋白和 A 蛋白分子量的测定: 基本上按 Weber^[16]的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法进行。

(六) 解链温度 (T_m 值) 的测定

C2-RNA 溶于 SSC 中配成适当浓度, 置于 1 厘米的比色杯中, 从室温开始升温, 利用 Unicam SP 700 型紫外分光光度计在波长 260 毫微米测定吸收值的变化, 以温度对相对吸收作图, 取曲线的直线部分的中点所对应的温度即为解链温度。

(七) 比吸收的测定

按 Gesteland^[7]等人方法测定 C2 的比吸收值。

(八) 沉降系数的测定

将提纯的 C2 经氯化铯密度梯度离心进一步纯化^[17]。在 5 毫升硝酸纤维素管中用铺层法预先制作三个氯化铯溶液的不连续梯度, 密度分别为 1.6、1.4 和 1.2 克/毫升和一个溶于 SSC 中 20% 蔗糖溶液层, 然后加入样品溶液, 在 VAC-601 离心机吊篮式转头以 37,500 转/分离心 2.5 小时。收集样品带, 对 SSC 透析 24 小时, 透析后

与饱和氯化铯溶液混合, 使样品密度大于梯度密度, 重新加样于离心管的底部, 上面依次加入 1.6、1.4 和 1.2 克/毫升的氯化铯溶液和 20% 的蔗糖溶液, 再经 37,500 转/分离心 2.5 小时, 收集样品带, 对 SSC 透析 48 小时, 在 Spinco E 型离心机 An-A 转子进行分析超速离心, 转速为 38,540 转/分, 温度为 20℃, 待稳定后, 每隔 4 分钟拍照一次。

(九) 电镜制片

用聚乙二醇提纯的 C2 溶于 SSC 中, 再经 MSE-40 离心机以 35,000 转/分离心 1.5 小时, 沉淀溶于少量 SSC 中, 取一小滴滴于附有火棉胶薄膜的铜网上, 稍干后用 pH 7.0 的 2% 磷钨酸进行负染, 在 HS-7S 型电子显微镜 50 千伏放大 3 万倍进行观察。

结果与讨论

(一) C2 噬菌体的性质

1. C2 噬菌体紫外吸收特性: 提纯的 C2 溶于 SSC 中, 测定其紫外吸收图谱, 在 256 和 241 毫微米处分别有吸收高峰和低谷, 这与第一类群的 MS-2 极相近^[19] (见图 1)。

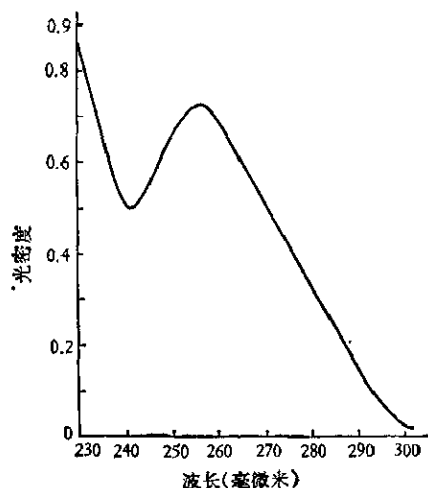


图 1 提纯的 C2 紫外吸收图谱
浓度为 115 微克/毫升。

2. C2 噬菌体的形态: C2 噬菌体在电镜下观察是微球形有规则的多面体, 直径

约 22 毫微米,略小于 MS-2 和 Q β 噬菌体 (见图 2)。

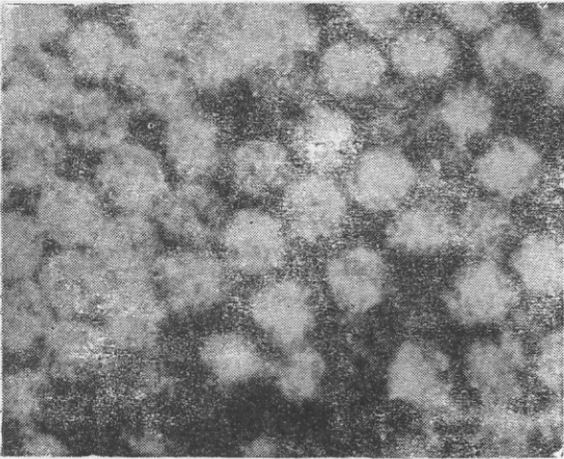


图 2 C2 噬菌体的形态
磷钨酸负染, 500,000 \times

3. 超离心沉降系数分析: 用 Spinco E 型分析超离心机测定 C2 噬菌体的沉降系数, 经计算为 $S_{w, 20} 79S$ 。提纯的 RNA 噬菌体粒子, 除了 Q β 沉降常数为 84 S 以外, 其它的 RNA 噬菌体的沉降常数都在 77—81 S 之间, 第一类群的 R17 在 SSC 中沉降常数为 79—80 S^[7] (见图 3)。

4. 比吸收: 提纯的 C2 噬菌体在 SSC 中, 在波长 260 毫微米测得比吸收为 7.8/毫克/毫升。这个数值略高于 R17 噬菌体在同样条件下测得的值^[7]。

(二) C2-RNA 的性质

1. C2-RNA 紫外吸收特性: 提纯的 C2-RNA 在 SSC 中紫外吸收图谱, 在 259 和 231 毫微米处分别有高峰和低峰 (见图

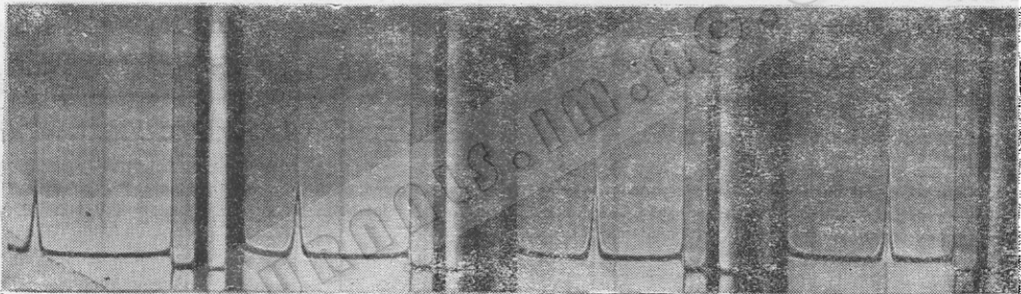


图 3 提纯的 C2 噬菌体超离心沉降图
C2 溶于 SSC 中, 浓度为 5 毫克/毫升, 20 $^{\circ}C$, 稳定后每隔 4 分钟拍照。

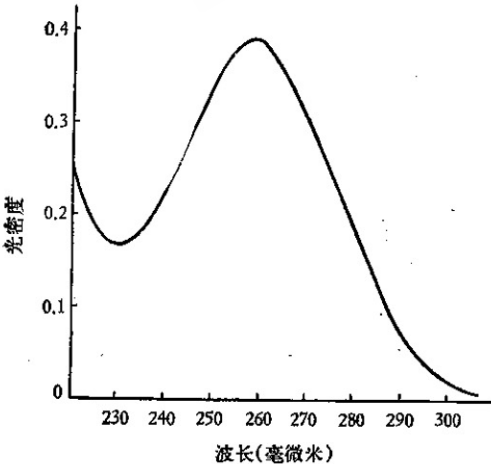


图 4 C2-RNA 在 SSC 中紫外吸收图谱
浓度为 15 微克/毫升。

微米/280 毫微米为 2.0。在波长 260 毫微米处的比吸收为 25.7/毫克/毫升, 与 MS-2 很接近^[19]。

2. 碱基组成: 利用酸水解和碱水解两种方法分析碱基组成的克分子百分数, 结果列于表 1。

表 1 C2-RNA 嘌呤和嘧啶碱基组成

分 析 方 法	碱基克分子百分数			
	A	C	G	U
HClO ₄ 水解纸层析	22.0	24.8	26.1	27.0
KOH 水解纸电泳	22.4	24.7	25.3	27.4

4)。260 毫微米/230 毫微米为 2.3; 260 毫

Robinson^[18]指出: 一些 RNA 噬菌体形态相似, 但是这些噬菌体的 RNA 碱基组成和外壳蛋白的氨基酸组成有差异。从它们的 RNA 的 G+C 含量可分成二类。第一类 ZiK/1 和 Q_β 分别为 48.1 和 48.0; 第二类 MS-2、f2 和 R17 分别为 52.0、52.7 和 51.9。C2 噬菌体的 G+C 为 50.9, 接近于第二类。

3. 解链温度 (T_m): 提纯的 C2-RNA 溶于 SSC 中, 浓度为 8—15 微克/毫升, 测得 T_m 值为 57.5°C (见图 5)。

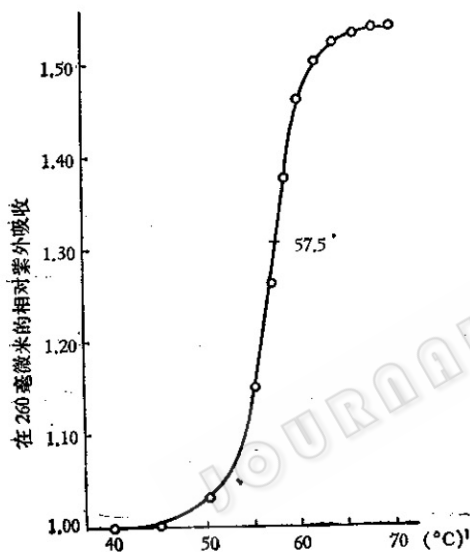


图 5 C2-RNA 解链温度曲线 (数字示 T_m 值)

4. 分子量的测定: 已知在一定分子量范围内, RNA 样品在聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 电泳迁移率与 RNA 分子量对数间有线性关系。将已知分子量的 *E. coli* r-RNA、TMV-RNA 为对照作图, 求得 C2-RNA 的近似分子量为 1.1×10^6 (见图 6)。这个结果略小于 MS2-RNA 的 1.15×10^6 ^[19] 而与 R17-RNA 相同^[7]。

(三) C2 噬菌体蛋白质的性质

提纯的 C2 噬菌体在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后所得到的图谱, 与一般的 RNA 雄性特异性噬菌体一样, 含有一个主要的

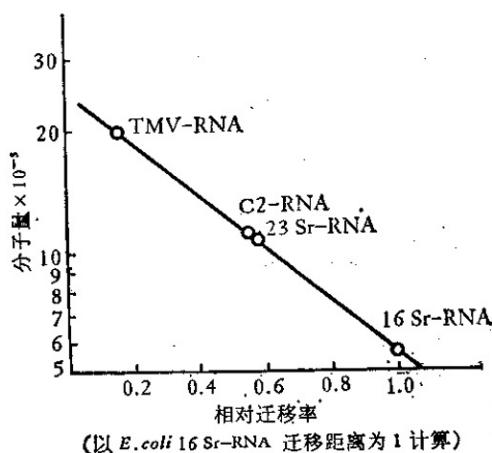


图 6 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 C2-RNA 近似分子量

图中标准 RNA 分子量如下:

E. coli 16Sr-RNA 为 5.6×10^5 ;

E. coli 23Sr-RNA 为 1.07×10^6 ;

TMV-RNA 为 2.0×10^6 。

和一个次要的蛋白质, 分别相当于外壳蛋白和 A 蛋白 (见图 7)。

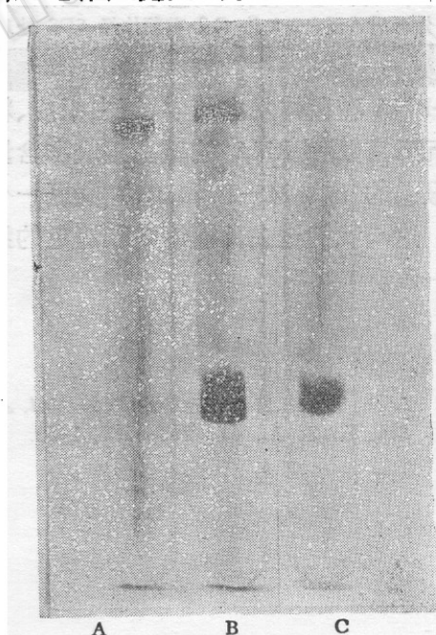


图 7 C2 噬菌体 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

A. 提纯的 A 蛋白 B. 提纯的 C2

C. 提纯的外壳蛋白

聚丙烯酰胺凝胶电泳测得 C2 蛋白质的近似分子量, A 蛋白为 42,000, 外壳蛋白为 13,200。与 R17 和 MS-2 都很相近

(见图 8)。

Watanabe^[2-5]等根据大肠杆菌 RNA 噬菌体的血清学特性和生物化学特征把它们分成四个血清类型,根据我们测定的结果,

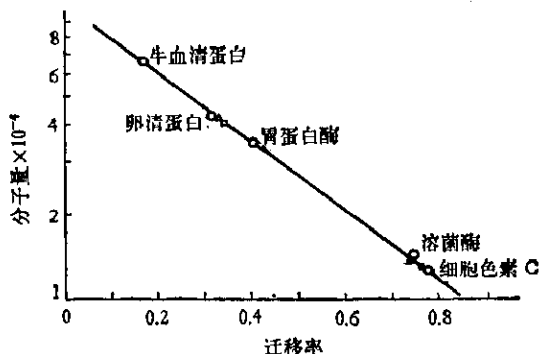


图 8 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 A 蛋白和外壳蛋白的近似分子量

图中标准蛋白分子量如下: 牛血清蛋白 67,500; 卵清蛋白 43,000; 胃蛋白酶 35,000; 溶菌酶 14,300 和细胞色素 C 12,700。△为提纯的 A 蛋白, ▲为提纯的外壳蛋白; □为 C2 噬菌体经 SDS 处理后 A 蛋白, ■为 C2 噬菌体经 SDS 处理后的外壳蛋白。

C2-RNA 噬菌体从血清学、蛋白组成、粒子的沉降常数和 RNA 的碱基组成和含量与已报道的 f2、MS-2 和 R17 同属一个类群,这与我们过去用血清中和测定的结果相一致。

参 考 文 献

[1] Loeb, T. and N. O. Zinder: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, 47: 282—287, 1960.

[2] Watanabe, I. et al.: *Proc. Jap. Acad.*, 43: 204—209, 1967a.
 [3] Watanabe, I. et al.: *Proc. Jap. Acad.*, 43: 210—213, 1967b.
 [4] Sakurai, T. et al.: *Jap. J. Microbiol.*, 12: 544—546, 1968.
 [5] Miyake, T. et al.: *Jap. J. Microbiol.*, 13: 375—382, 1969.
 [6] Yamamoto, K. R.: *Virology*, 40: 734—744, 1970.
 [7] Gesteland, R. F.: *J. Mol. Biol.*, 8: 496—507, 1964.
 [8] Wyatt, G. R.: *J. Biochem.*, 48: 584—590, 1951.
 [9] 陆应钰等: *生物化学与生物物理学报*, 5: 64—70, 1965.
 [10] Dawson, R. M. C. et al.: *Data for Biochemical Research*, 169—179, 1969.
 [11] Berndich, A.: *Methods in Enzymology*, Vol. 3: 715—723, 1967.
 [12] Sugiyama, T. et al.: *J. Mol. Biol.*, 25: 455—463, 1967.
 [13] Osborn, M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 17: 63—67, 1970.
 [14] Bishop, D. H. L. et al.: *J. Mol. Biol.*, 26: 373—387, 1967.
 [15] Loening, U. E.: *J. Biochem.* 113: 131—138, 1969.
 [16] Weber, K.: *J. Biol. Chem.*, 244: 4406—4412, 1969.
 [17] Allet, B. et al.: *J. Mol. Biol.*, 78: 589—600, 1973.
 [18] Robinson, J. W.: *J. Biochem.*, 128: 481—489, 1972.
 [19] Strauss, J. H. and R. L. Sinsheimer: *J. Mol. Biol.*, 7: 43—54, 1963.

SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF COLIPHAGE C2

Liu Yu-fang Jia Pan-xing Yu Mao-xiao

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The RNA phage C2 isolated from sewage in Beijing is identified as a polyhedron about 22 nm in diameter, with a sedimentation coefficient of 79S in SSC buffer and a specific absorbance of 7.8/mg/ml at 260 nm. Base composition analysis of the phage nucleic acid reveals that the molar ratio of adenine, uracil, guanine and cytosine are 22.0, 24.8, 26.1 and 27.0

respectively. The melting temperature of its RNA is 57.5°C and the molecular weight is 1.1×10^6 as determined by polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of coat protein and A-protein determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis are 13,200 and 42,000 respectively.