

大肠杆菌 T₄噬菌体 DNA 连接酶基因 (G30) 在无性繁殖系细胞中的表达

杨岐生 陆传宗 华陵 陈慎
(中国科学院生物物理研究所, 北京)

陆德如 王雪松 薛莉珠 陈锦光
(中国科学院微生物研究所, 北京)

从 T₄ 基因 30 的无性繁殖系细胞中, 用一般提取 T₄ DNA 连接酶的方法, 分离纯化得到与 T₄ DNA 连接酶相同的酶。无论从它在 DEAE-纤维素和磷酸纤维素柱上的层析行为, 或从用 T₄ DNA 连接酶酶活标准测定法测定结果, 都说明它与 T₄ DNA 连接酶是相同的, 这就表明 T₄ DNA 连接酶基因(即基因 30)在无性繁殖系的大肠杆菌细胞中已被表达。

无性繁殖的 T₄ 基因的表达与正常噬菌体感染的不同。基因无性繁殖系只有单个基因存在于细菌细胞中, 它的表达受运载体或细菌的基因的控制。而正常感染的噬菌体具有发育所需要的整套基因, 它们的表达受自身基因组所控制, 并且有一定的顺序。正常感染的噬菌体的基因表达自 60 年代以来已有大量的研究, 但在无性繁殖系细胞中表达的研究还刚开始。据 Mattson^[1] 研究, T₄ 后期基因需要早期基因的产物才能表达。DNA 连接酶基因是早期

基因, 在无性繁殖系细胞中是否能表达, Wilson^[2]、Krisch* 等人曾作过研究, 但结果还未报道。我们将一株四环素敏感的^[3]和日内瓦大学 Krisch 赠送的四环素抗性的无性繁殖系进行 DNA 连接酶的提取和活性的测定。

材料与方法

(一) 菌株和质粒

本文所用的菌株和质粒列于表 1。

表 1 菌株及其所带质粒的性质

菌株编号	遗传标记	所带质粒的遗传标记	来源
<i>E. coli</i> KH 802	met ⁻ r _k ⁻ m _k ⁻ Su ⁺ II	pBR 322 Ap ^R Tc ^R	H. Boyer
<i>E. coli</i> KH 802	met ⁻ r _k ⁻ m _k ⁻ Su ⁺ II	pAM 3158 Ap ^R Tc ^S T ₄ G 30	陆德如等 ^[3]
<i>E. coli</i> HB 101	recA ⁻ r _k ⁻ m _k ⁻ Su ⁻	KSK 150 Ap ^R Tc ^R T ₄ G 30	H. Krisch

本文于 1979 年 5 月 9 日收到。

本工作承日内瓦大学 H. Krisch 博士提供宝贵的建议和菌株, 中国科学院微生物研究所郭三堆同志提供枯草杆菌 DNA, 特此致谢。

* 个人通讯。

(二) DNA 连接酶的提取

DNA 连接酶的提取参照^[4]的方法进行。但硫酸铵沉淀改用 55% 饱和度的一步沉淀, 而不用 35% 和 55% 饱和度的二步分部沉淀。

(三) 焦磷酸交换活性的测定

测定方法参照 Weiss 等^[13]。在 DEAE-纤维素 (DE-11) 和磷酸纤维素柱层析分离中都用此法追踪酶活性。³²P_i 使用时的比强为 10^4 — 10^5 cpm/微克分子。

(四) DNA 连接酶的标准活法

1. 用 EcoRI 制备 DNA 底物

在 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)—0.05 M NaCl—0.01 M MgCl₂ 反应溶液中, 每 50 微升含 1 微克枯草杆菌染色体 DNA, 用 1 单位限制性内切酶 EcoRI 在 37℃ 反应 2 小时, 使 DNA 的 EcoRI 切点充分地被酶解。反应完成后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查。电泳缓冲液为 0.04 M Tris-HCl (pH 8.0)—0.02 M NaCl—0.001 M EDTA 40 伏, 4 小时。

2. DNA 片段去 5'-磷酸

40 微克经 EcoRI 酶解的 DNA 片段在上述同样的反应溶液中用 1.32 单位磷酸单酯酶(原液 44 单位/毫升。先加 0.88 单位, 反应 10 分钟后补加 0.44 单位), 在 65℃ 反应 30 分钟。然后用等体积的经水饱和过的苯酚振荡 20 分钟, 3,000 rpm 离心 10 分钟, 取上层水相。两次水相合并, 用无水乙醚除去苯酚。这样重复萃取 8 次, 抽干。

3. DNA 片段的 5'-OH 基进行 ³²P 标记

在反应总体积 1 毫升中含有: 40 微克 5'-OH 的 DNA 片段, 0.1 毫升浓反应液 (0.28 M Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0; 0.1 M MgCl₂; 0.17 M 巯基乙醇), 多核苷酸激酶 10 单位 (原液为 547 单位/毫升), 0.018 微克分子 γ -³²P-ATP (比强为 10^5 cpm/微克分子), 其余体积用水补充, 在 37℃ 反应 45 分钟, 然后在 100℃ 煮沸 2 分钟, 并缓慢冷却。最后在冰箱中冰冻保存。

4. DNA 连接酶的活性测定

在 52 微升反应总体积中, 含有 25 微升 5'-³²P-DNA 片段, 25 微升不同稀释比例的待测酶液和酶稀释液(酶稀释液含有 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6; 0.01 M 巯基乙醇; 0.05% 牛血清清蛋白), 2 微升的 10 mM ATP 溶液。连接反应在 37℃ 进行 20 分钟。接着加入 0.22—0.40 单位的磷酸单酯酶, 65℃ 反应 30 分钟。二个对照的反应混合物中都不加入待测的 DNA 连接酶酶液, 其中一管不加入磷酸单酯酶。在冰浴中中止反应, 并全部点样到 Whatman 3MM 滤纸的圆片上, 然后用 10% 冰冷的三氯乙酸溶液洗涤, 15 分钟后用 5% 三氯乙酸溶液洗涤四次, 再用乙醇:乙醚混合液(1:1)洗一次, 乙醚洗一次。干燥后在闪烁探头计数器上测定放射性。

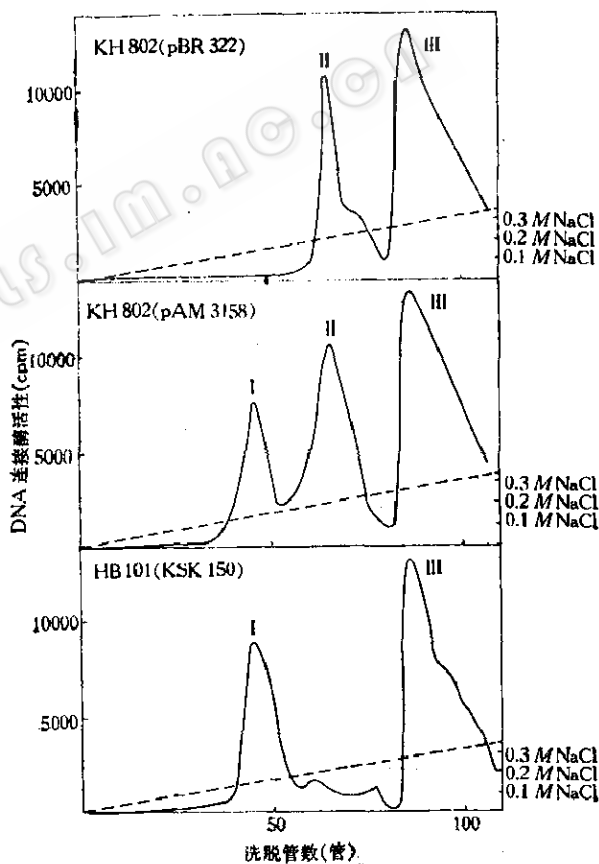


图 1 *E. coli* KH 802 (pBR 322)、KH 802 (pAM 3158) 和 HB 101 (KSK 150) 的提取液在 DEAE-纤维素 (DE-11) 柱上的层析图谱

柱的大小 1.5×35 厘米, 洗脱液为 0.02 M Tris-HCl (pH 7.6)—0.01 M 巯基乙醇溶液中含 0—0.35 M NaCl (各 500 毫升) 的直线梯度。洗脱流速 7.5 毫升/12 分钟/管。

结果与讨论

(一) 在 DEAE-纤维素柱上的层析行为

三个菌株硫酸铵沉淀后的粗酶液在 DEAE-纤维素柱上的层析行为如图 1 所示。

菌株 KH 802 (pBR 322) 作为测定 DNA 连接酶活性的对照菌株。它在 DE-11 柱上只出现二个焦磷酸交换活性峰,即在 NaCl 浓度为 0.18 M 和 0.25 M 左右分别出现峰 II 和峰 III。

菌株 KH 802 (pAM 3158) 在 DE-11 柱层析中出现三个峰,在 NaCl 浓度 0.13 M、0.18 M 和 0.25 M 左右分别出现峰 I、II 和 III。

菌株 HB 101 (KSK 150) 在 DE-11 柱层析中也出现二个峰,在盐浓度 0.13 M 和 0.25 M 左右分别有峰 I 和 III。但在 0.18 M 左右只出现很小的峰。

从图 1 看出,不带有 T₄ 基因 30 的菌株 KH 802 (pBR 322) 与带有 T₄ 基因 30 的杂合质粒的无性繁殖系之间的差异在于菌株 KH 802 (pBR 322) 不出现峰 I, 而另外二个菌株却出现峰 I。因此,我们应该在峰 I 中寻找 T₄ DNA 连接酶活性。

(二) 在磷酸纤维素柱上的层析行为

三个菌株从 DEAE-纤维素柱层析上得到的各个峰,分别检查在磷酸纤维素 P-11 柱上的层析行为。发现峰 I 都可以在 P-11 上吸附,并得到进一步的纯化,而峰 II 和 III 在 P-11 上基本上都不能被吸附。

从 DE-11 柱上得到的峰 I 在 P-11 柱上的层析行为如图 2 所示。经 P-11 柱纯化后,用焦磷酸交换方法测定活性,带有 T₄ 基因 30 的无性繁殖系 HB 101 (KSK 150) 和 KH 802 (pAM 3158) 每 10 克左右的菌体分别得到 DNA 连接酶 20 单位以上。

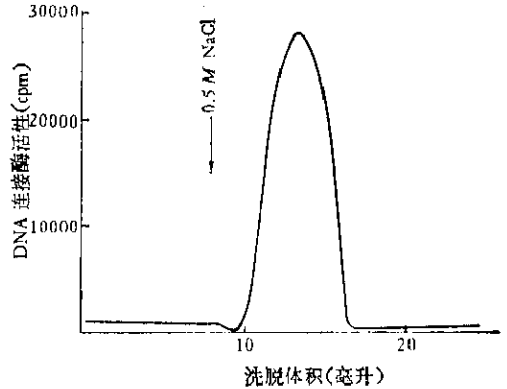


图 2 T₄ 基因 30 的无性繁殖系细胞的 DNA 连接酶提取物在 P-11 柱上的层析图谱 P-11 [Na⁺] 柱体积约 2 毫升,经 0.1 M NaCl-0.01 M 磷酸缓冲液 (pH 7.6)-0.01 M 巯基乙醇溶液平衡,上样后用 8 毫升同样的溶液淋洗,再用含 0.5 M NaCl 的同样缓冲溶液进行阶段洗脱。每 2 毫升收集一管。

(三) 标准法测定 DNA 连接酶活性

菌株 HB 101 (KSK 150) 和 KH 802 (pAM 3158) 的提取物经磷酸纤维素 (P-11) 柱纯化后用 DNA 连接酶标准测定法测其酶活性。当待测的酶量增加时, DNA 连接酶的活性也增加。结果如图 3 和图 4 所示,表明 HB 101 (KSK 150) 和 KH 802 (pAM 3158) 具有 DNA 连接酶的活性。

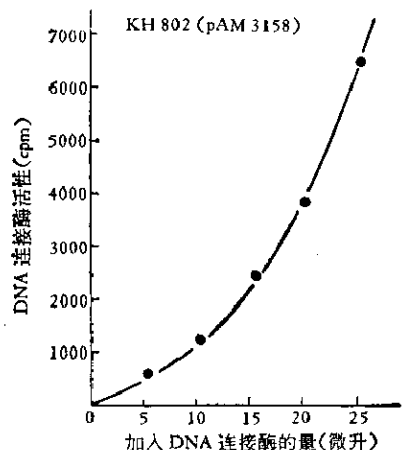


图 3 用标准法测定 KH 802 (pAM 3158) 的 DNA 连接酶活力
反应条件见“方法”。

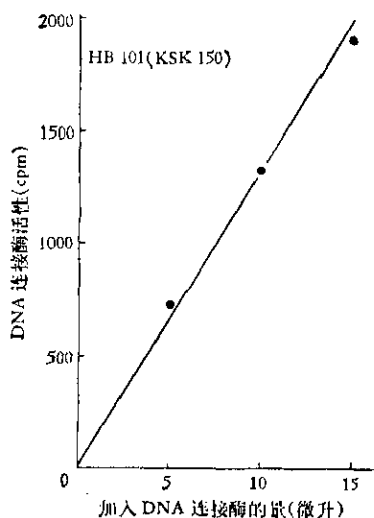


图 4 用标准法测定 HB101 (KSK150) 的 DNA 连接酶活力
反应条件见“方法”。

DNA 连接酶的活性主要存在于 DEAE-纤维素柱层析的峰 I 部分。菌株 HB 101(KSK 150) 在 DE-11 柱层析中峰 I 和峰 II 之间分离得不很好, 因此在峰 II 部分用 DNA 连接酶标准测定法测活, 仍可测出微量的酶活性, 但与峰 I 相比数量很小。峰 III 几乎没有任何 DNA 连接酶的活性。

从柱层析行为和酶活性测定清楚地表

明, 无性繁殖系的 T_4 DNA 连接酶基因能在大肠杆菌细胞内进行表达, 并能从中提取出 T_4 DNA 连接酶。与 T_4 感染的细胞相比, 酶活性还是比较低的。但是值得注意的是, 无论由于在 Hind III 切点因插入 T_4 基因而破坏了 pBR 322 的抗四环素启动子, 成为四环素敏感的 kH 802(pAM 3158), 或仍然保持着四环素抗性的 HB101(KSK150), T_4 基因 30 都能表达。这是什么原因? 搞清这个问题对基因在无性繁殖系中表达的机制及增强该基因的表达都有一定的意义。这一工作和提高无性繁殖系的酶活性的研究正在进行。

参 考 文 献

- [1] Mattson T. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **154**: 319-326, 1977.
- [2] Wilson G. G. et al.: *Mol., Gen. Genet.*, **156**: 203-214, 1977.
- [3] 陆德如等: *微生物学报*, **20** (2): 134-136, 1980 年。
- [4] 中国科学院上海实验生物研究所三室, 生物物理研究所二室: *微生物学报*, **18** (3): 202-209, 1978。
- [5] Weiss B. et al.: *J. Biol. Chem.*, **243**: 4543-4555 1968.

EXPRESSION OF CLONED DNA LIGASE GENE (G30) OF *E. COLI* BACTERIOPHAGE T₄ IN VIVO

Yang Qi-sheng Lu Chuan-zong

Hua Lin Chen Shen

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

Lu De-ru Wang Xue-song

Xue Li-zhu Chen Jin-guang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

T₄ DNA ligase was extracted and purified from clones of T₄ DNA ligase gene by means of DEAE-cellulose and phosphocellulose column chromatography. Its behaviour on the columns were the same as the ligase extracted from T₄ in-

fecting *E. coli* cells. The activity measurement of the enzyme also showed typical T₄ ligase activity.

The results provided evidences that cloned T₄ ligase gene is able to express in vivo.