

噬菌体 A3 侵染北京棒状杆菌后 RNA 聚合酶活性的变化

那淑敏 余茂勋

(中国科学院微生物研究所, 北京)

噬菌体 A3 侵染寄主细胞 10 分钟后, RNA 聚合酶比活降低 20—30%, 30 分钟后再回升到正常细胞的水平, 或稍有增加。感染后的细胞经超声波破碎、硫酸铵沉淀、DEAE 纤维素层析、甘油梯度密度离心等方法提纯, 其比活性可提高 300 倍。噬菌体侵染后的酶与正常细胞的酶性质基本相似。以噬菌体 A3 DNA 作模板时, 转录活性可提高 10 倍以上, 说明侵染后寄主体系的酶受到修饰。

噬菌体侵染寄主细胞后对 RNA 聚合酶的修饰作用在大肠杆菌, 枯草杆菌和恶臭假单胞菌中已有不少报道^[1-3]。其中有些噬菌体诱发的 RNA 聚合酶在提纯、转录性质、基因调控和结构方面都已作了相当深入的研究。

当细菌细胞被烈性噬菌体侵染时, 细胞中 RNA 合成发生变化^[1]。有一种情况是侵染后的噬菌体仍旧使用寄主 RNA 聚合酶转录各种病毒的基因, 仅对寄主酶有一些修饰, 特异地改变转录方式^[1]。另一种情况是噬菌体侵染后合成了一个新的噬菌体基因编码的 RNA 聚合酶^[4,5]。这些酶在结构和催化性质上与寄主 RNA 聚合酶有显著的不同。噬菌体诱发的 RNA 聚合酶对利福平不敏感, 对 DNA 模板具有高度的特异性, 酶比活性增高。由单一肽链^[1,3]或四条肽链^[2]组成。Chamberlin 等在 1970 年首先纯化和鉴定了 T7 RNA 聚合酶, 证明噬菌体 T7 侵染大肠杆菌后诱发的抗利福平的 RNA 合成, 不是由于寄主 RNA 聚合酶被噬菌体特异的 σ 因子修饰的结果, 而是一个完全新的 RNA 聚合酶, 是 T7 早期基因 1 的产物^[4,5]。有 20% T7 DNA 的早期转录是由寄主 RNA 聚合酶完成的, 80% DNA 的晚期转录是

由 T7 RNA 聚合酶来完成^[6]。基因表达的调节发生在转录的水平上。

噬菌体在细菌细胞中的生长对于研究基因的表达和调控是一种十分有用的体系。我们利用北京棒状杆菌感染噬菌体后, 研究其中 RNA 聚合酶变化的情况, 结果报道如下。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种: 北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS 1.299。
2. 噬菌体: 噬菌体 A3。
3. 培养基: 培养细菌用, 每升含牛肉膏 3g, 葡萄糖 5g, 蛋白胨 10g, 氯化钠 5g; 繁殖噬菌体用, 每升含葡萄糖 10g, 蛋白胨 5g, 均以蒸馏水配制, pH7.0, 8 磅 30 分钟灭菌。
4. 各种溶液和缓冲液的配制见前文^[1,2]。
5. 噬菌体浓缩方法和 DNA 的提取方法与前文^[1,2]相同。
6. 小牛胸腺 DNA (细胞生物研究所赠), 鱼精 DNA (上海生化制药厂), 鸡红血球 DNA (匈牙利 Reanal 产品), λ DNA 为本所工厂产品。

(二) 方法

1. 噬菌体和细菌测定: 感染后的混合液经过

本文于 1981 年 5 月 7 日收到。

作者对贾鑫兴同志的有益讨论, 本所技术室协助超离心和液闪测定, 表示感谢。

离心沉降细菌菌体,按双层琼脂法测定上清液中残余的噬菌体数目。感染前的活菌数系按十倍稀释法稀释后取样,涂平板,经培养后观察计数。对于感染后的活菌测定,先需抗血清中和,取 0.1ml 混合液,与 0.5 ml 1:10 的 A3 抗血清 ($K = 600$) 在 37℃ 保温中和游离的噬菌体,然后涂平板,培养后计算菌落数,为未感染细菌数,按以上数据计算出感染率^[8]和感染复数。

2. 感染细胞的制备和粗酶的制取:在容积为 500ml 和 3000ml 的三角瓶中,分别装入 50ml 和 1000ml 培养基,将培养过夜菌悬液按 10% 量接入,在 30℃ 振荡培养 (160 次/分) 2 小时,移置于 4℃ 低温 2 小时,然后继续在 30℃ 振荡 3—5 小时,添加氯化钠为 0.01M,氯化镁、氯化钙使终浓度达到 0.001M,生物素的终浓度为 30μg/l,葡萄糖 0.5%,以有利于感染^[7]。按感染复数 5 加入噬菌体 A3,对照组不加噬菌体,继续在 30℃ 振荡培养。在不同感染时间后(大量制备时侵染时间为 20 分钟),立即加入冰块使混合液迅速降至 0℃,立即收集菌体。取感染不同时间的细胞各 2g,加 6ml 缓冲液^[11,12],进行超声波破碎细胞使酶能达到最大释放量^[12],离心 45 分钟 (12,000 转/分),取上清液,以 NaOH 调 pH 至 7.9,测定粗酶

比活性。

3. RNA 聚合酶的提纯:利用超声波破碎细胞后,经硫酸铵沉淀,再通过 DEAE 纤维素 (DE-52) 层析,用 0.1M 到 0.5MKCl 加入缓冲液 II 梯度洗脱^[12],进行甘油梯度密度离心进一步纯化。在甘油梯度的制备中,先按重量百分比将甘油和缓冲液 (0.01M Tris-HCl, pH7.9, 0.0001M MgCl₂, 0.0001M EDTA, 0.0001M DTT, 0.15M KCl), 分别配成 10%、20% 和 30%, 搅拌均匀,由重到轻依次缓慢铺层于离心管中 (polyallomer 管),置于 4℃ 静置 3—4 小时,然后将从 DE-52 柱上洗脱下高活性液 1ml 铺在甘油梯度上, 4℃ 下用 SW 40 Ti 转头在 Beckman L5-65B 离心机以 36,000 转/分离心 2.5 小时,完成分离工作。然后从上到下按 0.5ml 一份依次取出,测定 280nm 的吸收值和酶活性。

4. RNA 聚合酶活力的测定及其浓缩见前文^[12]。

结 果

(一) 侵染测定

按上述方法侵染后,噬菌体效价和活

表 1 侵染前后噬菌体和寄主菌数

Table 1 Number of bacterial cell and taiter of bacteriophage prior to and after infection

侵染时间(分) Time of infection (min)	侵染前菌数 Preinfection bacterial cell/ml	游 离 噬 菌 体 Titer of phage (PFU/ml)		侵染后菌数 Postinfection bacterial cell/ml	侵 染 率 Infection (%)
		侵 染 前 Preinfection	侵 染 后 Postinfection		
10	9×10^7	2×10^8	1.8×10^6	—	—
30	9×10^7	2×10^8	1.0×10^8	1.4×10^8	98.5

菌数均比原初加入量约降低 10^2 , 与侵染前相比,被侵染的菌达到 98% 以上,结果见表 1。

(二) 侵染后寄主体内酶活的变化

在噬菌体侵染 10 分钟后,以 A3 DNA 或鱼精 DNA 为模板,在粗酶液中, RNA 聚合酶比活降低 20—30%^[10,11],说明 DNA 的早期转录受到抑制;侵染 30 分钟后,

RNA 聚合酶比活上升到接近未侵染前的水平或稍有增高(表 2)。

(三) RNA 聚合酶的洗脱

利用缓冲液 II,加入 0.1M 到 0.5MKCl,对 DE-52 柱进行梯度洗脱,出现两个峰。第一个峰无酶活性,第二个峰含有 RNA 聚合酶活性,通过电导测定,推算出第二个峰的盐浓度为 0.226—0.23M。这与寄主的

表 2 侵染后从寄主细胞提取的粗酶液中 RNA 聚合酶比活性的变化

Table 2 Alternation of RNA polymerase specific activity in crude enzyme suspension extracted from infected cell

侵染时间(分) Time of infection (min)	比酶活 Specific activity of RNA polymerase (cpm/mg)	
	以小牛胸腺 DNA 为模板 Calf thymus DNA template	以 A3 DNA 为模板 A3 DNA template
0	3797	2558
10	3075	1754
30	3188	3104

表 3 提纯过程中酶活性的测定

Table 3 Determination of RNA polymerase activity during purification

提纯步骤 Step	酶 活 Enzyme activity ($\times 10^4$ cpm)	提高倍数 Purification factor
硫酸铵沉淀 Ammonium sulphate fraction	7	—
DE-52 柱层析 DE-52 chromato graphy	35	5
甘油梯度离心 Glycerol gradient centrifugation	2230	64

RNA 聚合酶洗脱峰形一样,洗脱的盐浓度也相同。

甘油梯度离心提纯后,从酶活和蛋白的测定结果来看,绝大部分 RNA 聚合酶活性在 10% 甘油区带内,而在其余两部分中活性甚低;蛋白峰与酶活峰重叠;通过甘油梯度离心,酶比活比柱层析的高 64 倍。蛋白和酶活峰的图形见图 1,结果列入表 3。

(四) RNA 聚合酶的性质

噬菌体侵染后的 RNA 聚合酶性质基本上与寄主 RNA 聚合酶的相似,未诱发新的 RNA 聚合酶,此酶仍受低浓度利福平

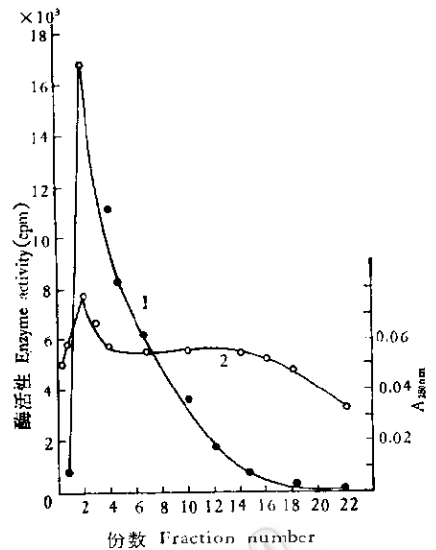


图 1 甘油梯度离心活性分布图

Fig. 1 After glycerol gradient centrifugation fractions of 0.5ml were collected and assayed for enzymatic activity and protein.

1. 酶活性 Enzyme activity;
2. 蛋白浓度 Protein concentration

和放线菌素 D 的抑制,具有明显的模板依赖性,以噬菌体 A3 DNA 作模板,可得到与小牛胸腺 DNA、鱼精 DNA 作模板所取得的相似的掺入,结果见表 4。

(五) 利福平的影响

从试验中可见,侵染后的 RNA 聚合酶仍受低浓度利福平的强烈抑制, $10 \mu\text{g/ml}$ 的利福平可抑制酶活 79% (图 2)。

(六) 镁、锰离子的影响

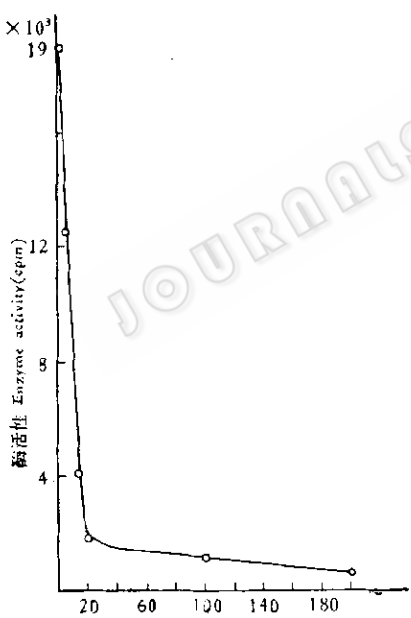
相同浓度下,锰离子比镁离子激活能力强,与寄主的 RNA 聚合酶对离子要求情况相同,结果见图 3。

(七) 模板 DNA 对 RNA 聚合酶转录的影响

1. 不同来源的 DNA 作模板的转录活性: 噬菌体侵染后的 RNA 聚合酶像寄主酶一样,可以利用多种来源的 DNA 作模板。用噬菌体 A3 DNA 作模板的转录活性比未侵染时的提高 10 倍以上。说明寄

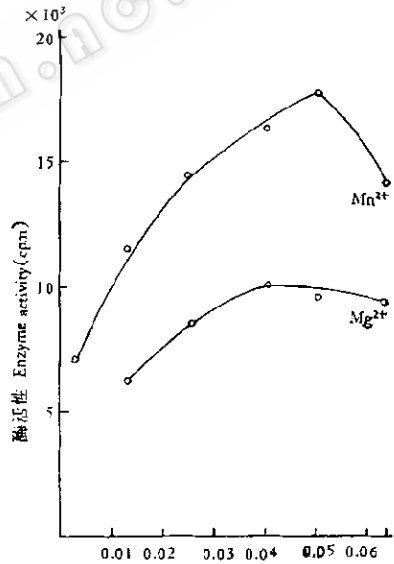
表 4 RNA 聚合酶的性质
Table 4 Properties of RNA polymerase

实 验 Expt.	I A3 DNA 为模板 I Addition of A3 DNA as template		II 鱼精 DNA 为模板 II Addition of salmon sperm DNA as template	
	酶 活 Relative activity (cpm)	酶 活 力 Activity (%)	酶 活 Relative activity (cpm)	酶 活 力 Activity (%)
全套测试剂 ^[12] Complete reagents	12,900	100	15,623	100
"-酶 "- enzyme	0	0	120	0.77
" + 利福平 " + rifampicin	90	0.7	426	2.7
" + 放线菌素 D " + actinomycin D	119	0.9	762	4.7
" - DNA	821	6.3	0	0
" - ATP-GTP-CTP	--	--	392	2.5



利福平浓度 Concentration of rifampicin ($\mu\text{g/ml}$)
图 2 利福平对 RNA 聚合酶的影响
Fig. 2 The effect of rifampicin on the activity of RNA polymerase

主酶受到修饰。在相同的体系中，同样浓度的不同来源 DNA，转录活性是不同的，其结果见表 5。



Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 浓度 Concentration of ion(M)
图 3 镁和锰离子对 RNA 聚合酶的影响
Fig. 3 The effect of Mg^{2+} and Mn^{2+} concentration on the activity of RNA polymerase

2. 变性 DNA 作模板时的转录活性:
在相同体系下，不同模板的变性 DNA 比未变性 DNA 的转录活性较高，结果列入表 6。

表 5 不同来源 DNA 作模板的转录活性

Table 5 Transcription activity with different DNAs as template

DNA 来源 DNA source from	酶活 Activity (cpm)	
	实验 I Expt. I	实验 II Expt. II
小牛胸腺 Calf thymus	28,217	8,063
鸡红血球 Chicken erythrocytes	21,331	4,706
噬菌体 A3 Phage A3	12,900	4,390

表 6 变性 DNA 作模板的转录活性

Table 6 Transcription activities with denatured and natural DNAs as template

DNA 模板 DNA template		酶活 Activity (cpm)
鱼精蛋白 DNA Salmon sperm DNA	1*	6,891
	2	4,931
小牛胸腺 DNA Calf thymus DNA	1	4,071
	2	2,851
鸡红血球 DNA Chicken erythrocytes	1	3,840
	2	3,541
A3 DNA	1	2,325
	2	1,455

* 1: 变性 Denatured 2: 不变性 Natural

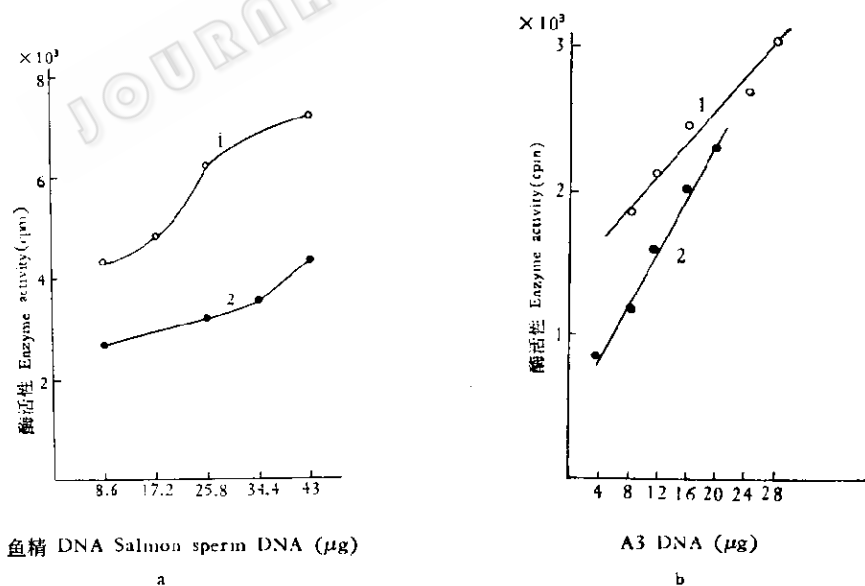


图 4 不同量的 A3 和鱼精 DNA 的转录活性

Fig. 4 Transcription activity of different concentrations of A3 and salmon sperm DNAs

1. 变性 ○——○ Denatured, 2. 不变性 ●——● Natural

3. 不同量 DNA 的转录活性比较: 在一定的 DNA 浓度范围内, 酶活随 DNA 浓度增加成直线关系, 利用不同量的 A3 和鱼精 DNA, 转录活性可见于图 4。

讨 论

1. 北京棒状杆菌在噬菌体 A3 感染后, 不诱发产生抗利福平的 RNA 聚合酶, 只对原寄主酶有所修饰。其性质类似于未感染细胞的酶, 隶属于前言中所指出的第一种情况。1964 年 Sköld 和 Buchanan^[10]证明, 噬菌体 T4 侵染大肠杆菌的最初几分钟, RNA 聚合酶活性的降低^[11]是噬菌体诱发了酶的抑制物所致^[10], 并已将这种物质提纯, 认为这是由于噬菌体侵染后, RNA 聚合酶结构上的修饰所致。1969 年 Travers^[14]从 T4 侵染的细胞中分离出类似于大肠杆菌 RNA 聚合酶的 σ 因子, T4 σ 因子与大肠杆菌的 σ 因子识别 DNA 上不同的起始位点, 并指令 T4 基因组不同部位的转录。 σ 因子作为一个正控制因素调节不同类基因的表达^[15], 或者合成了一个抗终止的因子^[12], 但 T4 酶结构的大部份与寄主酶相同或相似。Furth^[9]等人也证明噬菌体 T2 侵染寄主后 RNA 聚合酶活性的降低是由于产生了抑制物所引起。北京棒状杆菌受噬菌体 A3 感染后也有类似 T4 侵染大肠杆菌的情况。侵染的最初 10 分钟, DNA 早期转录受到抑制, 但是否与抑制物的产生有关, 尚待进一步探明。

2. 正常细胞的 RNA 聚合酶与噬菌体侵染后的聚合酶均对利福平敏感, 这与 T4^[17]、 λ ^[16] 以及 SP82^[18] 和 SP01^[19] 噬菌体侵染后的酶性质相同, 说明在整个噬菌体基因表达过程中都要使用寄主 RNA 聚合酶, 至少是对利福平敏感的组分^[16]。

3. 正常细胞的 RNA 聚合酶与噬菌体侵染后的酶的明显差别, 在于侵染后的酶

对噬菌体 A3 作模板时转录活性提高 10 倍以上。表明侵染后的酶在结构上受到修饰。模板活性的改变与聚合酶的结构改变有关^[19], 如 T4 侵染大肠杆菌后诱发了与寄主酶不同的起始因子。北京棒状杆菌受噬菌体感染后也诱发出新的噬菌体特异蛋白因子, 能识别 A3 DNA 上的位点, 可指令噬菌体 DNA 的转录。从部分纯化的感染和不感染所得酶液的聚丙烯酰胺凝胶电泳图象上显示出明显的差异, 说明它们之间有所不同(资料未列出)。

4. 对某些大肠杆菌 RNA 聚合酶来说, 如以 T4 DNA 作模板比以小牛胸腺 DNA 作模板转录活性高 2 倍, 但对 T4 聚合酶说, 以 T4 DNA 作模板时只有用小牛胸腺 DNA 作模板时的转录活性五分之一^[11]; 但对另一些大肠杆菌来说, 用侵染它的噬菌体 DNA 作模板, 寄主酶与噬菌体酶有相同的转录活性, 以其它 DNA 作模板时转录活性较低^[18]。但在噬菌体 T7 侵染的情况下, 以 T7 DNA 作模板时, 噬菌体酶比寄主酶的转录活性高 10 倍, 而以其它 DNA 作模板时, 有的转录活性低或很低, 表明噬菌体酶对 T7 DNA 的高度选择^[4]。A3 噬菌体侵染北京棒状杆菌后, 在模板特异性上也略有变化, A3 酶比寄主酶用 A3 DNA 作模板时的转录活性可提高 10 倍以上; 与其它 DNA 模板比较, 有的活性相近, 有的相差甚远, 这可能由于提纯过程中 DNA 链发生断裂, 活性降低, 使 DNA 的有效浓度下降; 也可能不同种类 DNA 达到最高转录活性所需的 DNA 浓度有所差别^[3]。

参 考 文 献

- [1] Towle, H. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, 250: 1723—1733, 1975.
- [2] Clark, S. et al.: *Nature*, 252: 21—24, 1974.
- [3] Chamberlin, M. and J. Ring: *J. Biol.*

- Chem.*, **248**: 2235—2244, 1973.
- [4] Chamberlin, M. et al.: *Nature*, **228**: 227—231, 1970.
- [5] Bautz, E. K. F.: in "RNA Polymerase" ed. by R. Losick and M. Chamberlin, 273—284, Cold Spring Harbor Laboratory, 1976.
- [6] Niles, E. G. et al.: *Biochemistry*, **13**: 3904—3912, 1974.
- [7] Astrachan, L. and E. Volkin: *Biochem. Biophys. Acta*, **29**: 536—544, 1958.
- [8] Volkin, E. and L. Astrachan: *Virology*, **2**: 149—161, 1956.
- [9] Furth, J. J. and L. I. Pizer: *J. Mol. Biol.*, **15**: 124—135, 1966.
- [10] Sköld, O. and J. M. Buchanan: *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **51**: 553—560, 1964.
- [11] Walter, G. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**: 240—247, 1968.
- [12] 那淑敏等: 微生物学报, **22** (2): 139—144, 1982.
- [13] 那淑敏等: 微生物学报, **19** (1): 41—44, 1979.
- [14] Travers, A. A.: *Nature*, **223**: 1107—1110, 1969.
- [15] Losick, R. and A. L. Sonenshein: *Nature*, **224**: 35—37, 1969.
- [16] Takeda, Y. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**: 533—538, 1969.
- [17] Haselkorn, R. et al.: *Nature*, **221**: 836—838, 1968.
- [18] Spiegelman, G. B. and H. R. Whiteley: *J. Biol. Chem.*, **249**: 1476—1482, 1974.
- [19] Shub, D. A. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **172**: 193—197, 1979.
- [20] Burgess, R. R. and A. A. Travers: *Nature*, **221**: 43—46, 1969.
- [21] Spiegelman, G. B. and H. R. Whiteley: *J. Biol. Chem.*, **249**: 1483—1489, 1974.

THE ALTERNATION OF RNA POLYMERASE FROM *CORYNEBACTERIUM PEKINENSE* AFTER INFECTION WITH PHAGE A3

Na Shumin Yu Maoxiao

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Specific activity of DNA-dependent RNA polymerase in *Corynebacterium pekinense* AS 1.299 decreased 20 to 30 per cent during the first ten minutes after infection with phage A3. 30 minutes after infection the specific activity increased to that of normal cells. The purification of RNA polymerase from infected cells was preformed by sonic disruption, ammonium sulphate fractionation, DEAE cellulose chromatography.

followed by glycerol gradient fractionation. The specific activity of the purified enzyme increased to 300 folds. The essential properties of RNA polymerase in uninfected cells was similar to those in infected cells. Transcription activity increased over 10 folds with A3 DNA as template. These results revealed RNA polymerase in the host cells was modified after infection.