

圆褐固氮菌转导噬菌体 AC-5.1 的形态及其 DNA 的长度测量

范成英 陈可詠 杜千有

(中国科学院植物研究所, 北京)

圆褐固氮菌转导噬菌体 AC-5.1 为蝌蚪形, 头部呈正六边形。尾部呈圆柱状, 可自然弯曲。尾丝缠绕于尾端, 使尾端呈倒钟状膨大。当尾丝散开后, 表现为马尾状, 倒钟状膨大消失。噬菌体吸附于寄主细胞的鞭毛上。噬菌体 DNA 自头部释放, DNA 是双股的。DNA 分子长度为 $17.03 \pm 0.18 \mu\text{m}$, 根据经验公式得知, 分子量约为 3.6×10^7 道尔顿。

我们在圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 中已找到一个转导系统^[1], 本文报道该转导系统中噬菌体 AC-5.1 的形态、DNA 的释放、在寄主细胞上的吸附等的电镜观察和 DNA 分子长度测量的结果。

材料和方法

(一) 菌株和噬菌体

圆褐固氮菌转导噬菌体 AC-5.1 及其寄主菌圆褐固氮菌 5016 均由本组从土壤中分离^[1]。

(二) 培养基

增殖噬菌体采用修改的 Burk's^[1] 无氮培养基, 但蔗糖浓度降低为 0.5% (简称 Bup 培养基)。双层平板的底层含琼脂 1.8%, 上层含琼脂 0.9%。

(三) 噬菌体裂解液的制备

挑取单个噬菌斑于 Bup 培养基中制成悬液, 然后按 Hegazi^[2] 的双层平板法制备噬菌体, 用 Adams^[3] 的方法测定噬菌体效价。

(四) 载膜的制备

观察噬菌体外形或 DNA 释放, 均采用 0.25% 的 Formar 膜, 经真空镀膜机喷碳后使用。

(五) 噬菌体形态的电镜观察

用效价为 10^{10} 单位/ml 左右的新鲜噬菌体裂解液制片, 2% 磷钨酸 (pH7.0) 负染, 置于干燥器内干燥后, 在日立电镜下放大 40,000 倍观察。

(六) 噬菌体在寄主细胞上吸附的电镜观察

取对数生长期的圆褐固氮菌 5016 培养物, 同噬菌体 AC-5.1 的裂解液等体积混合, 30°C 保温 15 分钟后, 按噬菌体形态的电镜观察方法制片。

(七) 噬菌体 DNA 释放的电镜观察

根据乔宝义等^[4]和 Kleinschmiet^[5] 的方法采用一步释放法观察噬菌体 DNA 的释放。上相液为 6M 的醋酸铵。展层蛋白为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的细胞色素 C。下相液为去离子蒸馏水。展开 1 分钟后用喷碳 Formar 膜蘸取, 置干燥器干燥, 用 ϕ 0.1mm 的钨合金 24.7mg 以 7° 角在国产 GZD310 型高真空镀膜机中旋转投影。用日立电镜观察。

(八) DNA 分子长度的测量

电镜负片经 4 倍光学放大制成正片, 然后用塑料绘图薄膜盖在正片上, 准确描绘核酸分子图象, 再用数字转换器描述核酸分子图, 数据穿孔记录于纸带上。最后在 nova12 型电子计算机上计算 DNA 分子长度。

结果和讨论

(一) 噬菌体 AC-5.1 的形态

圆褐固氮菌转导噬菌体 AC-5.1 为蝌蚪形, 由头、颈、尾和尾丝组成。头部呈正

本文于 1981 年 3 月 16 日收到。

本工作得到中国科学院乔宝义同志的帮助, 特志谢意。

六边形(图版 I-3、5)。颈部稍细,很容易同尾部脱离,呈现出短尾状(图版 I-5)。在我们的操作条件下,用冰箱贮存的噬菌体裂解液制片,常见短尾状的形态,只有用新鲜的噬菌体裂解液制片才能得到完整的噬菌体形象。但冰箱存放并不影响该噬菌体形成噬菌斑的能力,说明并非在存放过程中造成噬菌体尾部的脱落,造成这一现象的真正原因尚待进一步研究。关于这一点,在该噬菌体的形态观察中值得注意。

噬菌体的尾部为圆柱状,较柔软,可呈不同形状的自然弯曲。尾丝缠绕于尾端,使尾端呈钟形膨大(图版 I-4)。当尾丝散开后,尾端的钟形膨大消失,成为马尾状(图版 I-1)。尾鞘表面粗糙,有似螺旋状的花纹(图版 I-1、2)。

噬菌体核酸释放后,头部空壳的透明度大大提高,因而在电镜观察时除清晰的轮廓外,头壳内呈现暗色(图版 I-2)。

关于噬菌体对寄主细胞的吸附,在我们的观察中未发现在寄主细胞壁上吸附的现象,看到的是噬菌体成串地吸附于寄主细胞的鞭毛上(图版 I-6)。

(二) 噬菌体 DNA 的释放

采用一步释放法观察噬菌体 DNA 分子,是使噬菌体颗粒自高浓度盐溶液突然进入低浓度溶液中,借渗透压冲破外壳而释放出 DNA 来。不同噬菌体外壳的机械强度不同,内部的压强与渗透压不同,对上相溶液与下相溶液的盐浓度之差的要求亦不同。圆褐固氮菌转导噬菌体 AC-5.1 用 6M 醋酸铵为上相液,其中不加异丙醇,而下相液用无离子蒸馏水,可以较满意地释放 DNA(图版 I-7—9)。若上相液用 2—4M 醋酸铵,下相液用 0.2M 醋酸铵,就根本释放不出 DNA 来。看来,该噬菌体蛋白外壳的机械强度是比较牢固的。

噬菌体 AC-5.1 的 DNA 是自头部释

放的,未观察到从尾部释放的现象。但可清晰地看出该噬菌体 DNA 是双股的。

(三) 噬菌体 AC-5.1 DNA 分子长度的测量

在运用电镜观察测量噬菌体 DNA 分子长度时,影响测量精确度的因素很多,除了严格校准电镜和光学的放大倍数外,还要使用统计学方法处理^[6]。我们把获得的 DNA 电镜照片分为三类: 1. 噬菌体虽已释放出 DNA,但整个蛋白外壳还比较完整, DNA 分子与外壳紧密相连, DNA 两端没有暴露出来(图版 I-7)。2. 噬菌体头壳已经碎裂, DNA 分子已露出一端或两端,却都是围绕着释放中心作菊花形展开(图版 I-8)。3. 噬菌体外壳与 DNA 分子已经脱离, DNA 分子作无规则展开(图版 I-9)。对这三类照片各取 30 张分别进行 DNA 分子长度测量。结果列于表 1。

表 1 表明: 第一、二类照片的变异幅度很大,变异系数达 14.5—31.5%,说明这样的 DNA 照片属于 DNA 分子或者没有充分释放,或者没有充分展开,所以它们不能代表噬菌体 DNA 的真正分子长度。第三类照片的变异幅度仅为 0.47 μm , 变异系数只有 1.06%, 这样的差异都可视为实验误差。所以我们以这类照片为准计算该噬菌体 DNA 的分子长度为 17.03 \pm 0.18 μm 。

根据以上的观察测量,我们不仅进一步从形态特征上认识了噬菌体 AC-5.1,而且也知道了它的 DNA 分子长度。按照经验公式: $1\mu\text{m} = 2.07 \times 10^6$ 道尔顿^[7] 计算,该噬菌体的 DNA 的分子量应为 3.6×10^7 道尔顿。这与大肠杆菌 (*E. coli*) λ 噬菌体的 DNA 分子量相当^[8]。由于它是一株普遍性转导噬菌体,在转导时,它所能携带的寄主细胞 DNA 片段最长也只能有 50 个平均基因长度。

表 1 根据噬菌体 AC-5.1 DNA 的三类电镜照片测得的 DNA 分子长度数据的统计学分析
Table 1 The statistical analysis of data of the DNA molecular length determined from three types of electron micro-photograph of DNA

类别 Type	平均分子长度 (μm) Average value of DNA molecular lengths	标准离差 (μm) Standard deviation	变异幅度 (μm) Fluctuation of variates	变异系数 (%) Coefficient of variation
1	7.40	2.33	6.9 (10.95, 4.05)	31.5
2	12.77	1.85	5.6 (15.91, 10.31)	14.5
3	17.03	0.18	0.47 (17.25, 16.78)	1.06

参 考 文 献

- [1] 杜干有等: 微生物学报, 21 (4): 449—451, 1981.
- [2] Hegazi, N. A. and V. Jensen: *Soil. Biol. Biochem.*, 5(20): 235—243, 1973.
- [3] Adams, M. H.: *Bacteriophages*, Interscience Publishers INC, New York, 450—451, 1959.
- [4] 乔宝义等: 微生物学报, 16(1): 7—11, 1976.
- [5] Kleinschmied, A. K.: in *Methods in Enzymology*, vol 12 part B, 361—377, 1968.
- [6] 乔宝义: 微生物学通报, 3(4): 23—26, 1976.
- [7] Lang, D.: *J. Mol. Biol.*, 54: 557—585, 1970.
- [8] Freifelder, D.: *J. Mol. Biol.*, 54: 567—577, 1970.

MORPHOLOGY OF A TRANSDUCING PHAGE AC-5.1 OF *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* AND DETERMINATION OF THE LENGTH OF ITS DNA MOLECULE

Fan Chengying Chen Keyong Du Qianyou
(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing*)

Electron microscopic observation showed that the shape of the transducing phage AC-5.1 of *Azotobacter chroococcum* resembles a tadpole; the head of the phage is hexagonal; The tail of it assumes the form of cylinder and can bend naturally; The tail fibers wind round the tail end, so it looks like a top; as the tail fibers spread, the tail

end looks like a horse tail. This phage is adsorbed on the flagella of the host cell. The DNA is double helix and it is released from the head. The length of the DNA molecule is $17.03 \pm 0.18 \mu\text{m}$. The M. W. of DNA, as calculated by the empirical formula, is about 3.6×10^7 dalton.