

μ_2 噬菌体 RNA 的转染

张继仁 陈 慎

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

本文报道了提纯的 μ_2 RNA 在下述三种方法中的转染效率: (1) Ca^{2+} 处理, (2) 高渗培养基, (3) 硫酸鱼精蛋白存在下的溶菌酶-EDTA 系统。实验结果表明采用第三种方法的转染效率最高, 可达到 2.1×10^6 p.f.u./ μg RNA。研究了硫酸鱼精蛋白在转染中的作用, 并观察了 RNA 浓度, RNA 末端部分降解, 溴化乙锭 (EB), 放线菌素 D 和热变性等对 μ_2 RNA 转染效率的影响。

关键词 RNA 噬菌体; 转染; 硫酸鱼精蛋白

RNA 噬菌体是一种最简单的噬菌体。自 1961 年 Loeb 和 Zinder 首次发现 RNA 噬菌体以来^[1], 许多学者相继对这类噬菌体及其 RNA 的基本理化性质, 一级和高级结构, 基因组的复制, 遗传信息的表达, 复制酶的结构与功能等进行了广泛的研究^[2,3], 取得了一系列重要结果。但迄今为止, 对这类噬菌体 RNA 转染报道甚少。有关噬菌体 RNA 转染方法及其影响因素对于深入研究 RNA 噬菌体的基因结构与功能, 体外诱变, RNA 体外重组, 都有密切关系。

μ_2 噬菌体是 Dettori 等在意大利分离到的^[4]。它与 Q β 不同, 属于另一个血清学类群^[5]。Petrus 等对 μ_2 噬菌体的形态, 某些理化性质, 裂解方式进行了研究^[6], 但至今对 μ_2 RNA 的许多基本性质了解很少, 有关它的转染尚未见报道。为此, 我们建立了 μ_2 RNA 转染方法并对某些影响转染效率的因素进行了研究。

材料和方法

(一) μ_2 噬菌体的扩增培养

基本参照 Pace 的方法^[6]。RNA 噬菌体采自中国科学院上海植物生理研究所, 寄主菌为大肠

杆菌 As 1.630, 由中国科学院微生物研究所菌种保藏组提供。

(二) μ_2 噬菌体的大量制备

基本参照 Rushizky 等人的方法^[7]。

(三) μ_2 噬菌体 RNA 的分离纯化

把纯化的噬菌体悬浮于 0.02 M Tris 缓冲液 (pH 7.2), 浓度约 20mg/ml, 与等体积 0.02 M Tris 缓冲液 (pH 7.2) 饱和酚混合振荡, 3000rpm 离心 15 分钟, 保留水相, 重复三次酚处理。同时在酚相中加等体积无水乙醚除酚, 重复三次乙醚处理。加入 1/10 体积的 2M 醋酸钾和 2—3 倍体积预冷无水乙醇。 μ_2 RNA 以在乙醇中沉淀或溶于 0.01 M Tris 缓冲液 (pH 7.2) 中保存。

(四) 凝胶电泳

2% 聚丙烯酰胺-0.5% 琼脂糖凝胶配制及电泳均按文献方法^[8]进行。

(五) μ_2 RNA 的形态观察

μ_2 RNA 的样品制备基本上按 Robberson 的方法^[9]。在甲酰胺和尿素与 RNA 混合后, 作用温度改为 45℃。

(六) 转染试验使用了下述三种方法

1. Ca^{2+} 处理: Ca^{2+} 处理方法用于 RNA 转染尚未见报道, 参照 Mandel^[10] 和 Cohen^[11] 分别在 DNA 转染和转化的条件下进行, 略有修改。大

本文于 1982 年 4 月 21 日收到。

蒋美岩同志提供宝贵的经验; 徐伟、鲁崎唔、吴莲英和杨玉茹同志在电泳观察和分析超离心方面给予帮助, 在此一并致谢。

肠杆菌 As 1.630 生长在不含苏氨酸和亮氨酸的 HI 培养基中。 Ca^{2+} 处理后的寄主菌与 μ_2 RNA 在 0°C 低温时间延至 3 小时, 42°C 保温 4 分钟。然后加入 0.1ml 指示菌, 倒双层平板。 37°C 培养 8 小时后观察结果。

2. 高渗培养基: 参照 Taketo^[12] 方法进行。

3. 在硫酸鱼精蛋白存在下的溶菌酶-EDTA 系统: 修改了 Henner 等人的 DNA 转染方法^[13]。把活化的大肠杆菌 As 1.630 接种到培养基中, 37°C 振荡培养过夜, 再按 1% 接种量转接至新鲜培养基中, 生长至 A_{600} 为 0.5 时, 取 25 ml 在室温下 3000 rpm 离心 15 分钟, 沉淀的菌体用 4ml 0.01 M NaCl 洗涤, 弃上清液, 把菌体悬浮于 0.2 ml 1.5 M 蔗糖溶液, 加入 0.06 ml 3% 鸡卵清蛋白(可省略), 0.08 ml 溶菌酶 (10mg/ml, 用 pH 8.1 的 0.025 M Tris 缓冲液新鲜配制), 0.03ml 4% EDTA, 室温下静置 2—5 分钟后加入 0.07 ml 10% MgSO_4 , 0.02 ml 1% 硫酸鱼精蛋白。冰浴中放置 4—24 小时, 加入 μ_2 RNA 和指示菌倒双层平板, 37°C 培养 8 小时后观察结果。

(七) μ_2 RNA 的末端部分降解

分别用蛇毒磷酸二酯酶(VPDase)和脾磷酸二酯酶(SPDase)进行 μ_2 RNA 的 3' 端和 5' 端的部分降解。

1. VPDase 反应: 将 μ_2 RNA 8 μl (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、0.02 M Tris 缓冲液 (pH 9.0) 10 μl 、VPDase (昆明动物所提供) 100 μl (0.75 u/ μl)、0.2 M MgCl_2 20 μl 混合置于 37°C 保温 45 分钟, 酚抽提终止反应。

2. SPDase 反应: 将 μ_2 RNA 1.5 μl (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 磷酸单酯酶(本室核酸合成组制备) 4 μl (0.06 u/ μl) 1 M Tris 缓冲液 (pH 8.5) 10 μl , 0.02 M MgCl_2 , 3 μl 混合于 37°C 保温 35 分钟。加入 1 M 醋酸铵 (pH 5.7)–0.02 M EDTA 20 μl , SPDase (上海细胞所提供) 20 μl (0.048 u/ μl) 在 37°C 保温 45 分钟, 用酚抽提终止反应。

(八) 溴化乙锭(EB)和放线菌素 D 对 μ_2 RNA 转染的影响

取 μ_2 RNA 1 μl (1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 分别加入各种浓度 EB (Serva 产品) 100 μl 在室温 (25°C) 下作用 30 分钟后加入用转染方法(3)制备的原生质体 0.15ml, 测定它的转染效率。放线菌素 D 在转染

方法(3)制备的原生质体测定系统中终浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

(九) μ_2 RNA 的热处理和紫外吸收——温度曲线测定

把 μ_2 RNA 以 0.05 M Tris 缓冲液 (pH 7.2) 稀释至 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在所要求的各种温度中保温 3 分钟后, 迅速至冰水中冷却。紫外吸收——温度曲线用乙二醇循环加热法, 在 QR-50 岛津分光光度计上测定。 μ_2 RNA 溶于 0.05 M Na_2HPO_4 + 0.05 M NaH_2PO_4 缓冲液中。

结 果

(一) μ_2 RNA 的纯度鉴定

为使 μ_2 RNA 转染获得可靠结果, 首先对 μ_2 RNA 的纯度进行了鉴定。纯化的 μ_2 RNA 在 259.5nm 和 230nm 分别有最大和最小吸收峰(图 1)。 $A_{230}:A_{260} = 0.47$, $A_{280}:A_{260} = 0.49$ 。用平衡超离心沉降速度法分析 μ_2 RNA 时, 它的沉降界面峰形是

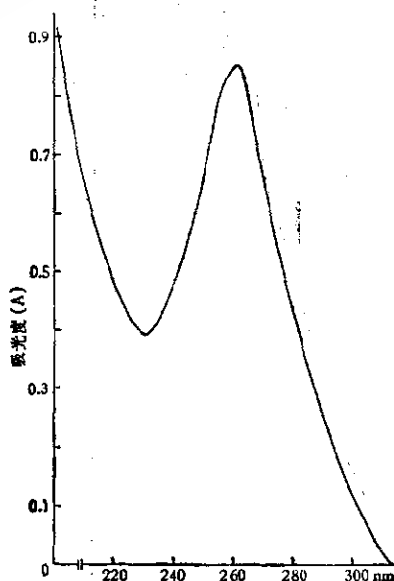


图 1 μ_2 RNA 的紫外吸收曲线

Fig. 1 UV absorption curve of μ_2 RNA

μ_2 RNA 溶于 0.01 M Tris-HCl pH 7.2, 用日立 556 分光光度计测定

μ_2 RNA in 0.001 M Tris-HCl (pH 7.2), measured by Hitachi 556 Spectrophotometer.

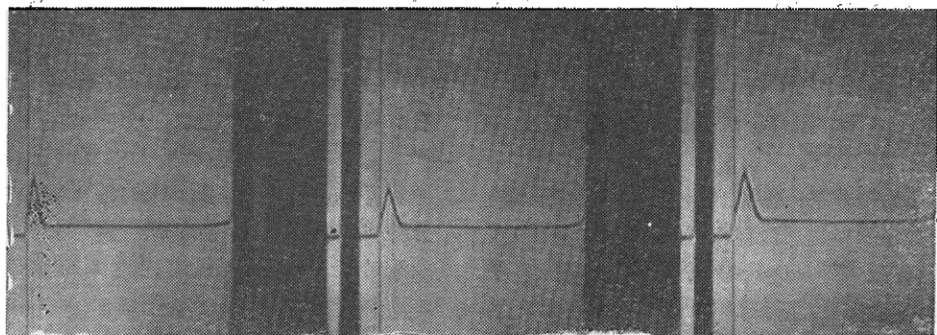


图2 μ_2 RNA 的超离心沉降分析图

Fig. 2 Analytical ultracentrifugation pattern of μ_2 RNA

单一的(图2)。在2%聚丙烯酰胺-0.5%琼脂糖凝胶电泳中只有一条带,其电泳迁移率大于质粒 pBR₃₂₂ DNA (图3)。以上结

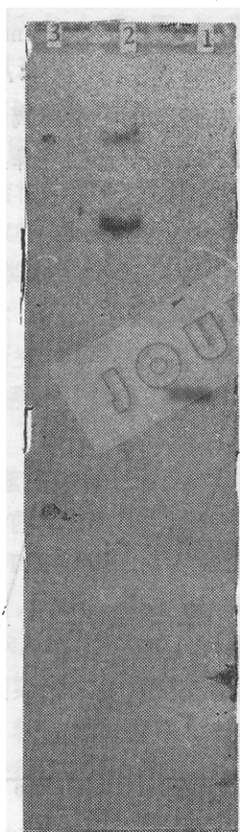


图3 μ_2 RNA 的2%聚丙烯酰胺-0.5%琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Electrophoresis pattern of μ_2 RNA in 2% polyacrylamide gel-0.5% agarose gel

1. μ_2 RNA 2. pBR322 3. μ_2 RNA + RNaseA

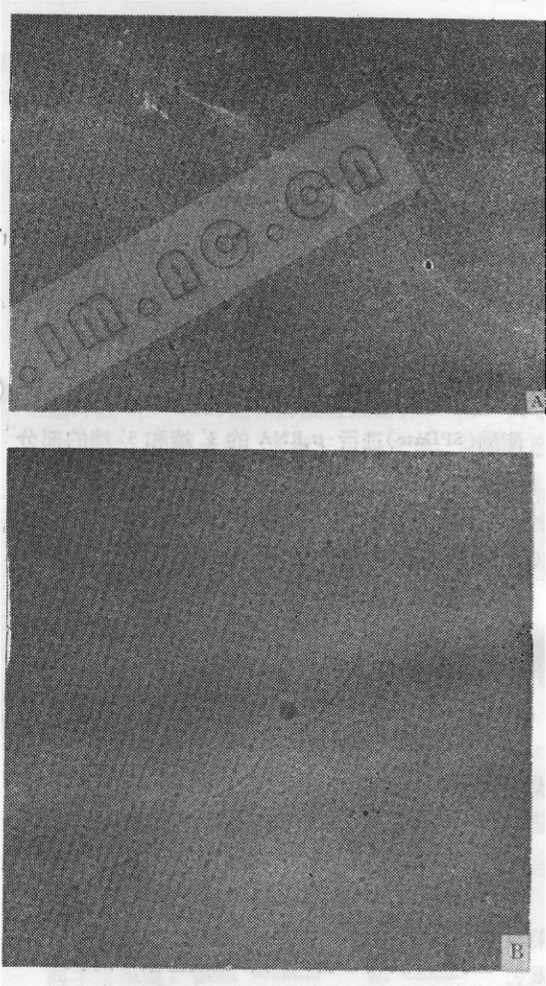


图4 μ_2 RNA 分子的电镜照片

Fig. 4 Electron micrograph of μ_2 RNA molecules

A. 40,000 \times B. 60,000 \times

日立 JEM 100 CX 透射电镜

Hitachi JEM 100 CX transmission electron microscope

果说明用上述方法制得的 μ_2 RNA 样品是纯的。

μ_2 RNA 分子经甲酰胺-尿素处理和加热变性后,利用细胞色素 C 展开后可在电镜下观察到伸展的线状分子(图 4)。根据测量 18 个 μ_2 RNA 分子长度,求得 μ_2 RNA 分子平均长度为 $1.10 \pm 0.02 \mu\text{m}$ 。根据 Granboulan 等^[44] 提出的 mRNA 类碱基间距值为 3.17\AA 计算, μ_2 RNA 碱基数约为 3470。

(二) μ_2 RNA 的转染

1. 转染方法比较: 在 μ_2 RNA 转染中使用了三种方法,结果列于表 1。三种方法都能转染寄主菌 As 1.630,但第三种方法的 p.f.u 最高。按方法(3)制备的原生质体中加入 20%葡萄糖, 0.02 M Ca^{2+} 和 0.04 M Mg^{2+} ,可提高 p.f.u 2.5—10 倍。

表 1 μ_2 RNA 三种转染方法的转染效率比较
Table 1 Comparison of transfection efficiency by 3 methods of transfection of μ_2 RNA

方 法 Method	μ_2 RNA (μg)	p. f. u	p.f.u/ μg RNA
Ca^{++}	0.15	120	8×10^2
高渗培养基 Hypertonic medium	5	25	5
硫酸鱼精蛋白- 溶菌酶-EDTA Protamine sul- phate-lysozyme- EDTA	1.2×10^{-4}	254	2.1×10^6

2. 硫酸鱼精蛋白在转染方法(3)中的作用: 表 2 表明,硫酸鱼精蛋白和溶菌酶的配合使用,所得到的 p.f.u 比只有溶菌酶或只有硫酸鱼精蛋白的系统大。从图 5 可以看出在硫酸鱼精蛋白存在下用溶菌酶-EDTA 方法制备的原生质体,其感受态稳定性比不含硫酸鱼精蛋白的原生质体

高,在 4°C 保存 24 小时可达到最高的 p. f. u, 96 小时只下降 13%,两星期后仍有 80%以上的转染活性。

表 2 硫酸鱼精蛋白对 μ_2 RNA 转染的影响
Table 2 Protamine sulfate effect on transfection of μ_2 RNA

处 理 Treatment	p. f. u	p. f. u%
加溶菌酶和硫酸鱼精蛋白 Lysozyme and protamine sulfate	306	100
只加溶菌酶 Lysozyme	40	13
只加硫酸鱼精蛋白 Protamine sulfate	165	55
二者均不加 Without protamine sulfate and lysozyme	0	0

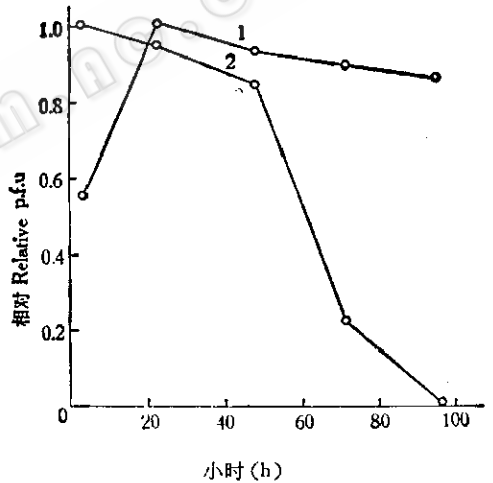


图 5 原生质感受态的稳定性
Fig. 5 Stability of competence in protoplast
1. 有硫酸鱼精蛋白 + Protamine sulphate
2. 无硫酸鱼精蛋白,以最大 p.f.u 为 1.00
— Protamine sulphate, 1.00 was taken as maximum p.f.u

(三) 与 μ_2 RNA 转染有关的几个因素

1. μ_2 RNA 的浓度: μ_2 RNA 浓度与转染产生的噬菌斑数呈较好的线性关系(图 6)。当 μ_2 RNA 浓度从 $10^{-5}\mu\text{g/ml}$ 提高到 $10^{-3}\mu\text{g/ml}$ 时,仍有与图 6 相似的线

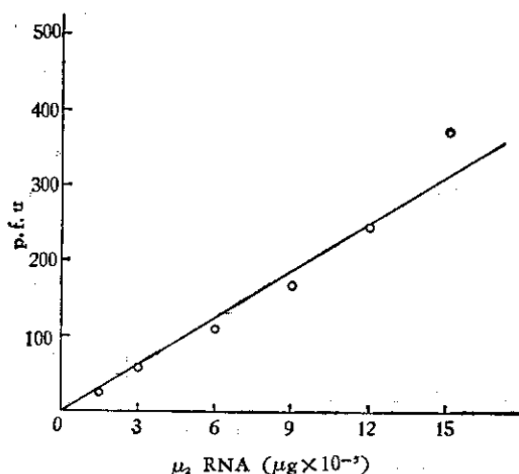


图6 μ_2 RNA 浓度与转染效率关系

Fig. 6 The relationship between μ_2 RNA concentration and transfection efficiency

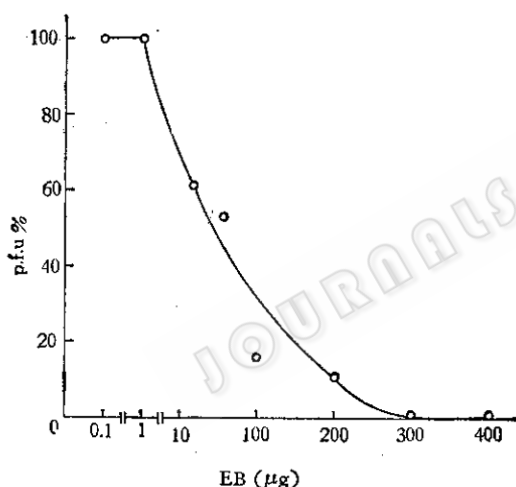


图7 EB 对 μ_2 RNA 转染的影响

Fig. 7 Effect of EB on transfection of μ_2 RNA

无 EB 作为 100%

p.f.u. in the absence of EB as 100%

性关系。

2. EB 和放线菌素 D 对 μ_2 RNA 转染的影响: EB (3, 8-二氨基-5-乙基-6-苯基嘧啶溴盐) 能与 μ_2 RNA 结合在紫外光下出现荧光(图3)。这种结合对转染效率的影响见图7。很明显, EB 的结合导致 μ_2 RNA 的转染活性迅速下降直至完全丧失。

在 μ_2 RNA 的转染中加入放线菌素 D 后, 其转染效率为对照组的 94%, 基本上无抑制作用。

3. 末端部分降解后 μ_2 RNA 的转染: μ_2 RNA 经 VPDase 和 SPDase 作用后, 成为 3' 端或 5' 端部分缺失的不完整分子, 这时它们保留与 EB 结合的能力, 但荧光强度明显减弱(图8)。无论 3' 端或 5' 端部分降解都导致 μ_2 RNA 的转染活性完全丧失。

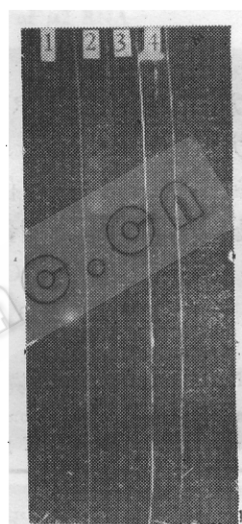


图8 外切酶部分降解后的 μ_2 RNA 在 2% 聚丙烯酰胺-0.5% 琼脂糖凝胶电泳。

Fig. 8 Electrophoresis pattern of μ_2 RNA on 2% polyacrylamide gel-0.5% agarose gel after degradation with partial exonuclease

1. 经 SPDase 部分降解
2. 经 VPDase 部分降解
3. 经核糖核酸酶降解
4. 未经酶解的 μ_2 RNA

1. Partially degraded by SPDase
2. Partially degraded by VPDase
3. Degraded by RNase
4. Non-degraded

4. μ_2 RNA 加热处理后对转染的影响:

μ_2 RNA 在各种温度保温后迅速转移至冰水浴中, 其转染效率的变化如图9所示。从图10可知 μ_2 RNA 的 T_m 值约为 53°C, 因此在 60°C 加热后迅速移至冰浴中冷却可认为是热变性过程, 这使 μ_2 RNA 的 p.f.u. 提高 60%。进一步提高温度导致转染活性下降, 在 80°C 处理后转染活性完全丧失。

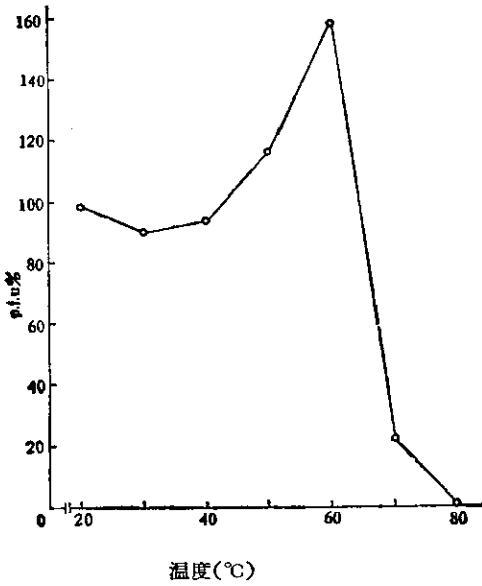


图 9 经热处理的 μ_2 RNA 转染效率变化

Fig. 9 The variation of transfection efficiency of μ_2 RNA by heating treatment

以未经热处理的 μ_2 RNA 的 p.f.u 为 100%
p.f.u of μ_2 RNA in unhrated sample as 100%

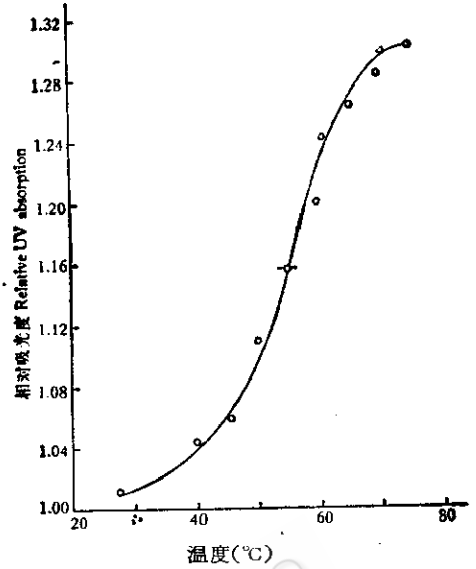


图 10 μ_2 RNA 在 260nm 的紫外吸收图谱

Fig. 10 UV absorption of μ_2 RNA at 260nm

以在 20°C 的紫外吸收值为 1.00

Taking the value of UV absorption at 20°C as 1.00

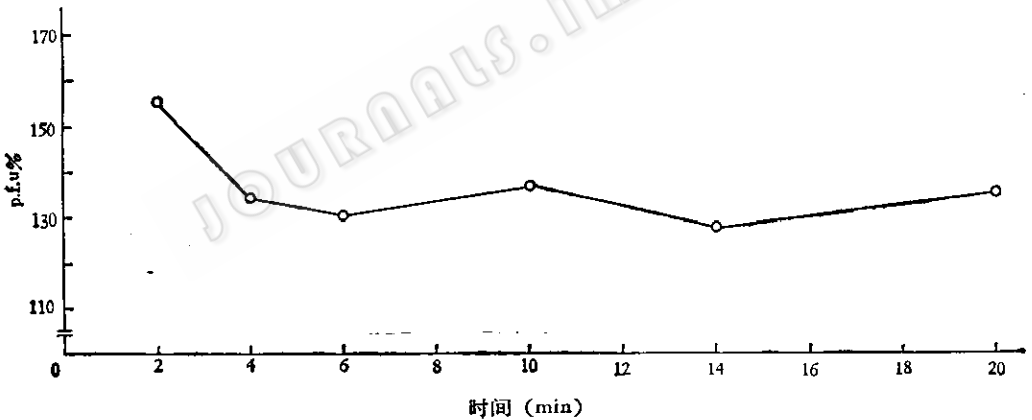


图 11 μ_2 RNA 在 60°C 加热处理时间与转染活性的关系

Fig. 11 The relationship between transfection activity and μ_2 RNA treatment time at 60°C

以未经热处理的 μ_2 RNA 的 p. f. u 为 100%

p.f.u of μ_2 RNA in unheated sample as 100%

延长 μ_2 RNA 在 60°C 的保温时间,然后迅速移至冰浴冷却,其转染效率的增加没有显著变化(图 11)。

讨 论

μ_2 RNA 在三种不同方法中的转染效率

(见表 1) 表明,用 Ca^{2+} 处理法和高渗培养基法得到的转染效率都比有硫酸鱼精蛋白存在下的溶菌酶-EDTA 系统得到的转染效率低。前两种方法都不引起寄主菌细胞壁的破坏。在溶菌酶-EDTA 转染系统中,一方面由于溶菌酶可以水解细菌细胞壁,

使大肠杆菌变为球状原生质体,另一方面由于原生质体是悬浮在 20% 葡萄糖和 10% 蔗糖溶液的高渗环境中,加之 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 二价阳离子的存在导致细胞膜通透性改变,从而获得较高的转染效率。

硫酸鱼精蛋白是一种碱性多聚物^[13],它对细胞的作用比溶菌酶和 Ca^{2+} 温和。虽然这种碱性多聚物对许多 DNA 的转化没有促进作用,但可以提高某些病毒 DNA 的转染效率^[15]。我们的结果也表明它可以提高 μ_2 RNA 的转染活性(表 2)并增加原生质体的稳定性(见图 5)。

影响转化和转染效率的因素是复杂的,除受体菌的感受态外,核酸的浓度和结构也是重要的因素。Benziger 的工作表明,在 DNA 的转染中,即使用同一种方法,由于 DNA 的种类不同,其转染效率可相差 10^7 ^[15]。推测 μ_2 RNA 在 Ca^{2+} 处理方法中转染效率与 DNA 的差别($\phi \times 174$ DNA 在 Ca^{2+} 处理中转染效率为 10^6 p.f.u./ μg DNA^[10]),也许是由于 μ_2 RNA 与 $\phi \times 174$ DNA 的化学性质及空间结构的不同造成的。

EB 与 μ_2 RNA 的结合在电泳中得到证实(图 3),EB- μ_2 RNA 复合物导致了 μ_2 RNA 的转染活性下降直至丧失(图 7),可能由于这种复合物的形成使 RNA 复制酶与模板 RNA 的结合受到抑制,结果 μ_2 RNA 即使能进入受体细胞,也不能进行复制和转译。

放线菌素 D 可与天然 DNA 的鸟嘌呤残基结合,并抑制依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶作用。 μ_2 RNA 的转染基本上不受放线菌素 D 的抑制,说明这类噬菌体是以 RNA 为遗传物质。

μ_2 RNA 经 SPDase 和 VPDase 作用后成为 5' 端和 3' 端部分缺失的不完整分子,仍有与 EB 结合的能力(图 8),说明分子中

仍有部分双链区,但转染活性完全丧失,可见 μ_2 RNA 分子一级结构的完整性对转染极为重要。

μ_2 RNA 经各种温度热处理后,转染效率出现令人感兴趣的变化(图 9, 11),这可能是由于二级结构的变化所致。 μ_2 RNA 分子中有较多的双链区,具有较复杂的二级结构。在 60℃ 加热处理后,使 μ_2 RNA 分子中氢键破坏,丧失二级结构的变性过程。也许由于这种二级结构的变化导致了 μ_2 RNA 转染活性增加。Lodish 等曾指出,用 RNA 噬菌体作 mRNA 的体外蛋白质合成中,二级结构的破坏引起复制酶和成熟蛋白合成比例的增加^[16]。我们的实验也似乎说明, μ_2 RNA 的天然构象不一定是最有利于转染的结构。这与 Hotz 和 Larry 等报道的某些 DNA 变性后转染活性增加的现象类似^[17,18]。

参 考 文 献

- [1] Loeb T. and N. D. Zinder: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 47: 282, 1961.
- [2] Zinder N. D. ed.: *RNA Phages*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring harbor Monograph Series, New York, 1975.
- [3] Fiers W.: *Comprehensive Virol.* 13: 69, 1979.
- [4] Detteri R. et al.: *Giorn. Microbiol.*, 9: 141, 1961.
- [5] De Petrie S. and G. Nana: *Giorn. Microbiol.*, 11: 1, 1963.
- [6] Pace N. R. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. XII: *Nucleic Acids part B.*, p.547, 1966.
- [7] Rushitzky G. W. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 108: 142, 196.
- [8] 养克强、徐乃正: 聚丙烯酰胺凝胶电泳,科学出版社, 1976.
- [9] Robbersen D. Y. et al.: *J. Mol. Biol.*, 60: 473, 1971.
- [10] Mandel M. and A. Higa: *J. Mol. Biol.*, 53: 159, 1970.
- [11] Cohen S. N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 69: 2110, 1972.
- [12] Takete A.: *J. Biochem.*, 65: 369, 1969.
- [13] Henner W. D. et al.: *J. Virol.*, 12: 741,

- 1973.
- [14] Granboulan N. and K. Scherrer: *Europ. J. Biochem.*, 9:1, 1969.
- [15] Benzing R.: *Morden Trends in Bacterial Transformation and Transfection*, A. Proctoles et al., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, p. 87, 1976.
- [16] Lodish H. F. and H. Roberson: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, Vol. 34, 655, 1969.
- [17] Hotz G. and R. Manser: *J. Virol.*, 12: 733, 1973.
- [18] Lanherne L.: *Mole. Gen. Genet.*, 104: 78, 1969.

TRANSFECTION OF RNA FROM μ_2 RNA PHAGE

Zhang Jiren Chen Shen

(*Institute of Biophysics, Academia Sinica Beijing*)

Three methods: 1) Ca^{2+} treatment, 2) hypertonic medium, and 3) lysozyme-EDTA system in the presence of protamine sulfate were applied to compare the efficiency of transfection of purified μ_2 RNA. Among them, the third method is the most effective for transfection with plaque forming units (p. f. u) reaching to 2.1×10^6 per μg RNA. The action of protamine sulfate and other influencing factors on the transfection

of μ_2 RNA, such as the concentration of RNA, the partial digestion of the RNA molecule in 5' or 3' terminal ends, the integration of ethidium bromide and actinomycin D, and the heat denaturation were also observed and discussed in detail.

Key words

RNA phage; Transfection; Protamine sulfate