

物^[9]。LamB 基因是麦芽糖操纵子 (malB) 中的一个结构基因。麦芽糖操纵子受 cAMP-CRP 的调控。当细菌的 cAMP 水平降低时, 麦芽糖操纵子的转录受到抑制, λ 吸附蛋白的合成就减少, λ 噬菌体的吸附能力也随之下降^[10]。

葡萄糖效应是微生物学中一个熟知的现象。葡萄糖能降低细菌中的 cAMP 水平, 从而关闭掉许许多多的启动子, 抑制诱导性蛋白质的合成。大肠杆菌的麦芽糖操纵子也受葡萄糖的抑制。因而当培养基中加入葡萄糖时, LamB 基因的转录受到抑制, 细菌不能合成吸附蛋白, λ 噬菌体的吸附力就大大降低。但如果加入麦芽糖和 cAMP, 大肠杆菌又会合成吸附蛋白^[11]。因此, cya^- 或 crp^- 突变型在不加 cAMP 时对噬菌体是具有抗性的。这方面的研究对防止细菌培养中的噬菌体感染和选育抗噬菌体的细菌品系具有实际意义。

四、cAMP 对 λ 噬菌体作用于寄主细菌基因的影响

噬菌体与其寄主的基因活动是相互影响着。A. M. Wu 等^[12]报道, λ 噬菌体能抑制其寄主大肠杆菌半乳糖操纵子的表达, 从而降低寄主中 β -半乳糖苷酶的合成速率。当培养基中加入外源性 cAMP 时, 合成速率即可恢复到原来水平。 λ 噬菌体可能降低寄主细菌中的 cAMP 浓度。对于噬菌体 N4, 也发现了同样的

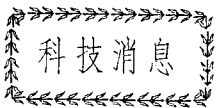
情况。

此外, 当缺乏 cAMP 时, λ 噬菌体即易进入裂解发育途径。 λ 噬菌体利用寄主细菌的基因因为它工作, 而关掉它所不需要的寄主基因。但在野生型 $cya^+ \cdot crp^+$ 寄主中或供应外源性 cAMP 的情况下, 这时如果没有其它诱导裂解的因素, λ 噬菌体通常进入溶源化发育途径, 它与寄主的 DNA 同步复制, 寄主细菌的基因仍然正常地工作, 甚至还可得到 λ 噬菌体从外面带进来的其它基因, 并加以利用, 获得新的功能。这一点, 对遗传工程是具有重要意义的。

参 考 文 献

- [1] 劳为德:《生物化学与生物物理进展》, 1978 年, 第 5 期, 第 32 页。
- [2] Grodzicker, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 366, 1972.
- [3] Rao, R. N. & Raj, C. V.: *Mol. Gen. Genet.*, **125**, 119, 1973.
- [4] Belfort, M. & Wulff, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**, 779, 1974.
- [5] Pastan, I. et al.: *Bact. Rev.*, **40**, 527, 1976.
- [6] Jordan, E. et al.: *ibid.*, **55**: 521, 1973.
- [7] Rolfe, B. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **120**, 1, 1973.
- [8] Peterkofsky, A.: *cyclic nucleotides in Bacteria*, [2], p. 1, 1976.
- [9] Hofnung, M.: *Genetics*, **76**, 169, 1974.
- [10] Pearson, M. L.: *Virology*, **49**, 605, 1972.
- [11] Ryter, A. et al.: *Excerpta Medica, Sec. 4, Microbiol.*, **29**, 358, 1976.
- [12] Wu, A. M. et al.: *Bacteriophage Lambda*, p. 589, 1971.

[本文于 1978 年 11 月 9 日收到]



科技消息

有高缠绕的 DNA 存在的定量测定弛豫

闭环 DNA 含量的方法

——改进的“开闭酶”荧光测定

这里描述的方法系利用最近发现的蛇毒磷酸二酯酶单链内切酶活力的改进荧光检定法。单链特异内切酶具有可作用于 PM₂ DNA (DNA I), 使它转变成开放型 DNA, 但不能作用于弛豫的 DNA (DNA I') 的特点。DNA I' 由荧光方法定量测定(利用它的共价键

闭环 DNA。DNA I + DNA I' 混合物中 DNA I' 的百分比的测定可达 $\pm 1\%$, 这方法也用来测定被 SV40 感染的猴细胞中半纯化的“开闭酶”活性。DNA I 含量在 0—0.4 μg 范围内呈线关系, 灵敏度达 $\pm 0.01 \mu\text{g DNA I'}$ 。
摘自“Anal. Biochem.”, **93**, 346—354, 1979

(上接 801 页)

- [2] 6th Int. Biophysics Cong. Abstracts, Kyoto, Japan, 1978.
- [3] 小谷正雄: 生物物理学年表,《生物物理实验ハンドブック》,吉岡書店, 527—536, 1970.
- [4] 《全国试验研究机关名鉴》, 1977—1978 年度版。
- [5] 日本生物物理年会第 1、2、3、16、17 届《预稿集》。

[本文于 1979 年 12 月 6 日收到]

噬菌体 T₇ 及其脱氧核糖核酸的分离鉴定

崔道珊 张英 李跃贞 陈奎 李金照

(中国科学院生物物理研究所)

在分子水平上研究生物学过程,噬菌体的寄主系统是最简单的系统之一。这个系统的优越性在于可以使复杂的遗传分析与简单的物理、化学分析结合起来。有关噬菌体 T₇ 的研究工作,是由 Delbrück 从 1946 年开始的。早期的工作证实,噬菌体 T₇ 是 T 噬菌体系列中最小的一个,由一个六角形的头(对侧长 63 毫微米)和一个短尾巴(10 × 15 毫微米)组成。噬菌体 T₇ 颗粒的分子量在 38—45 × 10⁶ 道尔顿之间,其中 DNA 含量占 50—55%,其 DNA 为含有四个碱基的线型双链分子,分子量为 26 × 10⁶ 道尔顿,大约为 T 偶数噬菌体 DNA 大小的四分之一。可以避免一般实验操作的剪力破坏,容易得到均一的 T₇ DNA 制剂,因此,近年来不但噬菌体 T₇ DNA 被广泛地进行着物理、化学与酶学研究,噬菌体 T₇-大肠杆菌系统也被用于探索 DNA 复制、遗传重组、病毒组装及基因表达与调控的一个重要工具。

鉴于进行遗传工程研究之需要,我们进行了噬菌体 T₇ 及其脱氧核糖核酸的分离纯化和它的某些性质的研究。

材料与方法

1. 细菌与噬菌体 野生型噬菌体 T₇ 系从 F. W. Studier (美国纽约 Brookhaven 国立实验室) 获得。寄主大肠杆菌 B 株由中国科学院微生物研究所供给。

2. 培养基 培养大肠杆菌 B 株与增殖噬菌体 T₇, 全部采用 T 汤(每升含 10 克细菌胰蛋白胍和 5 克氯化钠 pH 7.4)。测定效价用底层

含 1.5—2% 琼脂的 T 汤。顶层为含有 0.7—1.0% 琼脂的 T 汤。

3. 噬菌体 T₇ 贮存液的制备 用 200 毫升三角瓶,装入 15 毫升 T 汤。加入 5 毫升新鲜过夜培养的大肠杆菌 B 株,再接入 3 至 5 个平板培养形成的噬菌体 T₇ 噬斑,于 32℃ 振荡培养,直至完全裂解。加入 1 克固体氯化钠到裂解液中(氯化钠浓度达 5%)。离心(10,000 rpm, 15 分钟)。得上清液作为噬菌体 T₇ 贮存液,置冰箱长时间保持其效价不变(全部操作在无菌情况下进行)。

4. 噬菌体 T₇ 的培养与纯化 将大肠杆菌 B 株斜面 1 支,接入 100 毫升 T 汤。37℃ 振荡培养至对数生长期中期,接入噬菌体 T₇ (噬菌体与大肠杆菌之比为 5:1)。于 32℃ 下继续振荡培养。约 4 小时裂解完全。加入固体氯化钠于裂解液中,使浓度达 5%。离心除去细菌碎片(10,000 rpm, 15 分钟)。为进一步纯化,将上清液超速离心沉降(33,000 rpm, 2 小时)。收集噬菌体 T₇ 沉淀。将沉淀悬浮于 2—4 毫升 0.01M Tris (pH 8.0), 0.001M 乙二胺四醋酸二钠盐 Na₂EDTA, 1M NaCl 缓冲液中。再将该悬液铺于氯化铯密度梯度离心的顶层,进行梯度离心(梯度离心分层密度自下而上为 1.9、1.7、1.5、1.3 克/厘米³。每层分别加入 0.5 毫升、1 毫升、1 毫升和 1.5 毫升氯化铯) 37,000 rpm, 1.5 小时。离心后一般可见到三条明显的带。噬菌体 T₇ 在接近 1.5 密度处成带。取出此带,用 0.01M Tris (pH 8.0), 0.001M EDTA, 0.1M NaCl 缓冲液透析过夜,即得纯化的噬菌

体 T_7 。用以直接提取 DNA。若不经透析,置冰箱中贮存备用,其稳定度甚佳。噬菌体 T_7 纯化的指标可以 $O.D_{260}$ 与 $O.D_{280}$ 的比值来检验。这个比值应该为 1.53,而且噬菌体溶液应该在 240 毫微米吸收最低^[1]。

5. 噬菌体 T_7 DNA 的抽提 噬菌体 T_7 DNA 的抽提参照 P. F. Davison^[2] 的方法稍加修改。将经氯化铯梯度离心纯化过的噬菌体溶液(溶液 260 毫微米/克吸收至少在 10 以上),与等体积缓冲液饱和酚混合振荡抽提(重新蒸馏的酚,临用前以 0.01M Tris, pH7.4, 0.001M Na_2EDTA , 0.1M NaCl 缓冲液饱和)。然后,离心分相(3,000 rpm, 15分钟),取水相,重复一次,最后再用乙醚连续抽提两次,以除去残余的酚。DNA 溶液中酚是否去除干净,可用 $O.D_{260}$ 与 $O.D_{280}$ 的比值来估计。去酚后的比值应该是接近 1.8^[2]。DNA 的浓度以核苷酸磷的当量数来表示。噬菌体 T_7 DNA-磷的克分子消光系数为 6750^[3]。

6. 噬菌体 T_7 DNA 紫外吸收性质的鉴定 纯化的噬菌体 T_7 以及噬菌体 T_7 DNA 均以 751 型紫外分光光度计测定 $O.D_{260}/O.D_{280}$ 吸收比值,以表明 DNA 样品的纯度。紫外吸收光谱以 556 型双波长双光束分光光度计测绘。

噬菌体 T_7 DNA 的熔点温度按照 M. Mandel 和 J. Marmur 方法^[4],用日本岛津 QR50 型紫外分光光度计,测定溶于 $0.1 \times SSC$ 溶液(0.015M NaCl, 0.0015M 柠檬酸钠)的 DNA 溶液,记录 DNA 在 25—85°C 之间各温度的紫外吸收值($O.D_{260}$ 毫微米),并校正升温时溶液体积膨胀产生的影响,以 25°C 时测出的 260 毫微米吸收值作为基础值绘图。

7. 噬菌体 T_7 DNA 凝胶电泳及电镜观察 噬菌体 T_7 DNA 凝胶电泳用 1% 琼脂糖制胶,胶内含 5 微克菲啉溴红 (EBR)/毫升。电泳缓冲液为 0.089M Tris, 0.089M 硼酸, 2.5mM Na_2EDTA , pH8.5。每管电流 0.8 毫安,室温下走 4—6 小时后用 254 毫微米灯并源加红色滤光片照像。

电子显微镜观察噬菌体 T_7 DNA 采用 Kle-

inschmidt^[5] 的单分子层技术。噬菌体 T_7 的观察,系将噬菌体贮存液滴在附有 Formvar 膜的铜网上,用滤纸吸去多余液滴。再将 2% 磷钨酸染色液滴在铜网上染色 2 分钟,然后用滤纸吸去多余染色液,风干后观察。

结果与讨论

经上述方法纯化的噬菌体 T_7 贮存液其 $O.D_{260}$ 在 20 以上。 $O.D_{260}/O.D_{280}$ 为 1.53。258 毫微米吸收最高,236 毫微米吸收最低(图 1)。

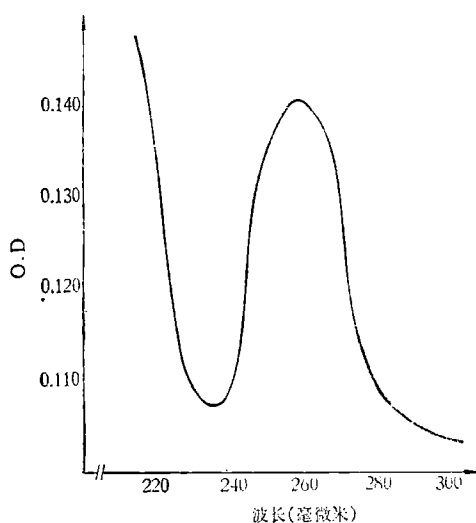


图 1 噬菌体 T_7 经 $CsCl$ 密度梯度超离心纯化后紫外吸收光谱图

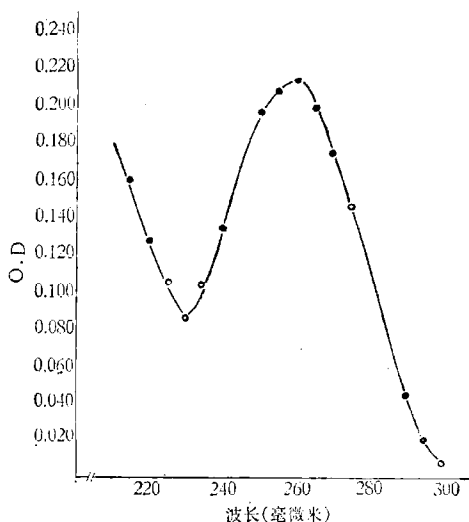


图 3 噬菌体 T_7 DNA 紫外吸收光谱

电子显微镜初步观察到噬菌体 T₇ 具有一个六角形的头和一个短小的尾部(图 2 见封三)。

噬菌体 T₇ DNA O. D.₂₆₀/O. D.₂₈₀ 为 1.79。260 毫微米吸收最高, 230 毫微米吸收最低(图 3)。从 600 毫升溶菌液中大约得到 5 μ moles 的 DNA-磷。

噬菌体 T₇ DNA 在 0.1 $\times$ SSC 溶液中测定的“熔解”曲线, 如图 4 所示, 表现为典型的 DNA “熔解”曲线。单一的转化温度 T_m 值为 74 $^{\circ}$ C $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C。根据 Mandel, M 和 Marmur; J

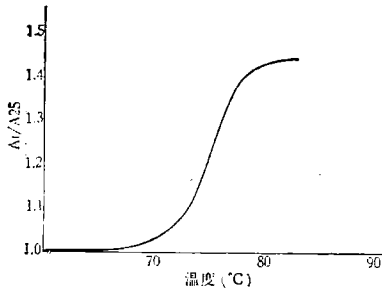


图 4 噬菌体 T₇ DNA 在 0.1 SSC 溶液中的熔解曲线示意图

的公式 $GC\% = (T_m - 53.9) \times 2.44$ 标出噬菌体 T₇ DNA GC 含量的百分比为 49%。比 Wyatt 所提出的 48% 稍高一些。

噬菌体 T₇ DNA 的葡聚糖凝胶电泳呈现单一的带(图 5 见封三), 表明所抽提的 DNA

分子是均一的。电子显微镜观察也表明抽提的 T₇ DNA 为线型大分子(图 6 见封三)。用 EcoRI 和 BamHI 限制性内切酶消化, 其谱带不变, 说明 T₇ DNA 上无 EcoRI 和 BamHI 切点。

实验结果表明, 分离纯化的噬菌体 T₇ 及其脱氧核糖核酸, 经鉴定其紫外吸收性质与 Davison 等所报道的有关噬菌体 T₇ 及其脱氧核糖核酸性质一致。此外, 我们检验了经上述方法制备的噬菌体 T₇ 贮存液, 在 4 $^{\circ}$ C 情况下放置长时间效价都维持在 10¹⁰ 左右。这样的噬菌体贮存液在用培养皿测定效价时, 37 $^{\circ}$ C 下经 2—3 小时就形成清晰的针尖状噬斑, 若放置过长则会变成巨大的连斑, 无法计数。

参 考 文 献

- [1] Misra, D. N. & Sinha, R. K.: *Virology*, **39**, 183, 1969.
- [2] Davison, P. F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **5**, 643, 1962.
- [3] Richardson, C. C.: *J. Mol. Biol.*, **15**, 49, 1966.
- [4] Mandel, M. and Marmur, J.: *Methods in Enzymology* 12, Part B. P. 195, 1968.
- [5] Kleinschmidt, A. K.: *Methods in Enzymology*, **21**, p. 419, 1971.
- [6] Wyatt, G. R. and Cohen, S. S.: *Biochem. J.*, **55**, 774, 1953.

[本文于 1979 年 1 月 5 日收到]

大型电泳仪改装光学衍射仪

杨振藩 惠虎雄 管汀鹭

(中国科学院生物物理研究所)

在 30 年代, 大型电泳仪原属于尖端设备, 50 年代降为一般贵重仪器, 70 年代已趋于被淘汰。现在经过改装, 恢复了“青春”。这样既发挥了老设备的作用, 又节省了外汇, 更重要的是争取了时间, 很快地开展了新的研究工作。为实现科学技术现代化, 必须掌握现代化的研究手段, 更新旧的仪器设备, 必然有不少旧的仪器设备会闲

置起来。如何使它们“返老还童”, 在新的长征中发挥作用? 本文介绍的经验, 可供参考。

——编者

前 言

光学衍射的原理和 x 射线衍射原理相似。当光线射到空间一系列散射点上时, 每个点都成为一个球面散射波源, 如果这些散射点是有