

# 一个完全纯化的枯草杆菌噬菌体 $\phi 29$ 脱氧核糖核酸细胞外包装系统

郭培宣 Shelly Grimes Dwight Anderson

(牧医系) (明尼苏达大学微生物学系和牙科系)

## 提 要

利用完全纯化的细胞外包装系统,能使噬菌体 $\phi 29$ 的DNA与基因3产物gp3的复合物DNA—gp3高效地装入了原衣壳(prohead)。 $\phi 29$ DNA的包装蛋白gp16(基因16的产物)于大肠杆菌中超量生产然后被提纯几至同质。纯化的gp16能将23%的纯化DNA—gp3装入提纯的原衣壳中,而感染了噬菌体的细菌抽提物中的gp16则能将26%的DNA—gp3装入。此纯化系统不需寄主蛋白。包装过程需要三磷酸腺苷,最适比例为每个DNA—gp3复合物配100个gp16分子,这个比例与感染 $\phi 29$ 的菌体内两者的比例相似。

关键词:  $\phi 29$ 噬菌体基因16克隆;超产蛋白质团;疏水蛋白质提纯;蛋白质复性

噬菌体 $\phi 29$ 构造比较简单,病毒子于细胞外装配的效率,是研究病毒脱氧核糖核酸包装(DNA packaging)机制的理想模型<sup>[1-5]</sup>。分子量为 $12 \times 10^6$ 的 $\phi 29$  DNA,其5'端有一基因3的产物蛋白质gp3以共价键与其相连。此蛋白质在DNA包装过程中有重要的作用<sup>[2]</sup>。在枯草杆菌的抽提物中,DNA—gp3复合物在病毒蛋白gp16的帮助下被装入病毒原衣壳中,其效率与在细胞内装配相似。包装过程中间产物的分离鉴定表明装壳的过程有方向性、量化性,并伴随着内部支架蛋白(scaffold protein)的释出和衣壳构型的改变<sup>[3]</sup>。以此胞外系统来分析DNA包装过程的理化反应,须要将所有构成成份确定。这里我们报告噬菌体 $\phi 29$ 基因16在大肠杆菌中的克隆,其产物gp16的超量产生和提纯,及其在完全纯化的胞外包装系统中所表现的依赖于三磷酸腺苷的高效DNA包装活性。

• 本文由美国科学院院士Franklin W. Stahl推荐并载于该院刊物Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. 1986年83卷3505—3509页。由第一作者译成中文。译文经欧守杆教授校正,谨此致谢!

我们感谢Charlene Peterson的技术帮助,以及Bernard Reilly和Thomas Molitor有益的建议和讨论。本文部份工作是在瑞士巴塞尔大学完成的,我们感谢Edouard Kellenberger博士的热情招待以及Renate Gyalog协助制备图16的显微照片。本研究工作得到美国国家卫生科学院(National Institutes of Health) DE—03606号基金的资助。

1987年1月9日收稿

## 材 料 和 方 法

### (一) 细菌、噬菌体和质粒

用非受纳寄主枯草杆菌S<sub>po</sub>A12<sup>[6]</sup>以及受纳寄主枯草杆菌sup<sup>+</sup>44<sup>[7]</sup>和L15<sup>[8]</sup>作病毒的培养和滴定。 $\phi$ 29基因重组体sus16(300)-sus14(1241)<sup>[1]</sup>, sus7(641)-sus8(769)-sus14(1241), sus4(369)-sus8(22), 和sus7(614)-sus8(22)-sus16(300)-sus14(1241)<sup>[4]</sup>的材料均已发表过。基因7和8分别编码原衣壳的支架蛋白和衣壳蛋白, 基因16的产物是DNA包装蛋白, 基因4的产物为晚期转录所必需, 基因14的突变导致细菌裂解的延迟。符号7<sup>-</sup>8<sup>-</sup>14<sup>-</sup>指有某种病毒蛋白缺陷的抽提物, 本文则指原衣壳缺失的抽提物。

大肠杆菌株M5219[Sm<sup>R</sup>, lacZam, trpAam (噬菌体 $\lambda$  bio252, cl857,  $\Delta$ H1), Sm<sup>R</sup>=链霉素抗性], K-12 $\Delta$ H1 $\Delta$ trp [Sm<sup>R</sup>, lacZam,  $\Delta$ bio-uvrB,  $\Delta$ trpEA2 ( $\lambda$  Nam7, Nam53, cl857,  $\Delta$ H1)], 和K-12r<sub>k</sub><sup>+</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup> (噬菌体 $\lambda$ 野生型) [pPLc2833 (Ap<sup>R</sup>, P<sub>L</sub><sup>+</sup>), Ap<sup>R</sup>=氨苄青霉素抗性]都由E. Remaut处获得<sup>[8][9]</sup> M5219提供了基因N的产物的抗终止作用<sup>[8]</sup>。

### (二) 噬菌体 $\phi$ 29基因16的克隆

$\phi$ 29基因16占据内切酶EcoRI的切段E以及D的三分之二<sup>[10]</sup>。利用不完全消化法, 以凝胶电泳提取EcoRI的E/D切段, 然后连接到按标准方法<sup>[11]</sup>从大肠杆菌K-12r<sub>k</sub><sup>+</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>获得并切开成线型和经碱性磷酸酶处理的pPLc2833质粒的EcoRI的切位上(图1a)。此经基因重组后的质粒以氯化钙/氯化铷程序<sup>[12]</sup>转化到大肠杆菌K-12 $\Delta$ H1 $\Delta$ trp中去。15个抗氨苄青霉素的菌落中有13个含有插入了EcoRI切段E/D的质粒。这些质粒分离出来后, 又重新以转化程序转移到大肠杆菌M5219中去。以与16<sup>-</sup>14<sup>-</sup>细菌抽提物胞外互补法<sup>[1]</sup>检测转化菌gp16的产生, 以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法确定gp16含量, 产量最高的菌株M5219(pPG9)被选用作以下试验。

### (三) gp16的超量产生和提纯

大肠杆菌M5219(pPG9)置于LB液体培养基[含1%胰蛋白胨(Difco公司), 0.5%酵母抽提物(Difco公司), 0.5%氯化钠]中37℃培养, 当生长至每ml含10<sup>8</sup>个细菌时, 将此培养物转至等量预先加温至42℃的LB液体培养基中, 在42℃震荡培养2小时。gp16以大凝集团累积于细胞中(图1b)。此培养物(200ml)经离心沉降后, 重新悬浮于100ml的缓冲液(0.01M Tris·HCl, pH8.0, 0.01M EDTA, 0.125M NaCl, 每ml含500 $\mu$ g溶菌酶)中, 室温保持5分钟以形成球状体(spheroplast)。以下操作除特别说明者外, 都是在4℃进行。球状体经3,000 $\times$ g离心5分钟, 将沉淀物重新悬浮于100ml含有0.01M Tris·HCl, pH7.5, 0.001M dithiothreitol(二硫苏糖醇)的液体中。球状体通过法国压力器以69MPa的压力裂解。裂解物加入8M尿素溶液(Schwarz/Mann公司, 以冰醋酸调至pH5.2)至最终浓度为0.7M。经750 $\times$ g离心力10分钟澄清后, 上清液再经7,000 $\times$ g 5分钟将gp16的凝集团沉降下来。沉降物溶于10ml的含0.01M Tris·HCl, pH7.5, 0.005M二硫苏糖醇, 6M氯化胍[Serva, Heidelberg或

BDH公司)的溶解液中,然后经 $100,000 \times g$ 离心1小时,将1 ml含有此gp16的上清液加于 $1 \times 55\text{cm}$ 的Sephadex G150葡聚糖层析柱中,以7.5M的尿素溶液(含0.001M dithiothreitol,如上法调至pH5.2)平衡。用同种溶液洗脱可出现二个含gp16的洗脱峰。收集第二峰的洗脱液,每ml加入0.2ml的饱和硫酸铵,室温保持3分钟后,经 $3,000 \times g$ 离心5分钟之后收集沉淀物,重新悬浮于如上的溶解液中。为了使gp16复性,将此溶液经0.01M Tris·HCl, pH7.5, 0.004M KCl的溶液透析40分钟。

#### (四) 原衣壳和放射性标记DNA的提纯

没有放射性标记的原衣壳按照已经报告过的<sup>[4]</sup>蔗糖密度梯度离心法提纯,不同的是,该颗粒以 $170,000 \times g$ 于 $20^\circ\text{C}$ 4小时离心浓缩,然后重新悬浮于TMS缓冲液(0.05M Tris·HCl, pH7.8, 0.01M  $\text{MgCl}_2$ , 0.1M NaCl)中。

为了分离 $^3\text{H}$ -DNA-gp3,将枯草杆菌SpoA12培养于Difco 3号抗菌素培养基中[Penassay肉汤(PB)]至每ml含 $4 \times 10^8$ 个细菌,以离心法5倍浓缩,然后以每个细菌吸附20个病毒颗粒的浓度接种突变株sus4(369)—sus8(22)。5分钟后,以1:9将感染细菌以预温的每毫升含20微居里(1微居里=37GBq) $^3\text{H}$ 胸腺嘧啶的PB稀释,然后在 $37^\circ\text{C}$ 震荡90分钟。感染细菌以离心法浓缩17倍,以每毫升0.01M醋酸钠,0.08M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.04M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH7.4,内含500 $\mu\text{g}$ 溶菌酶的溶液在 $37^\circ\text{C}$ 经90分钟裂解。加入氯化钠至0.1M的浓度然后强烈震荡15秒钟。经 $10,000 \times g$ 离心10分钟澄清之后,将裂解物加入氯化铯分段梯度中并用SW50.1转头以 $150,000 \times g$ 经24小时离心。被内切酶HaeIII处理过( $\phi 29$ 的DNA不具HaeIII切点<sup>[13]</sup>)和没处理过 $^3\text{H}$ 的样品经过琼脂凝胶电泳测出了所取用的梯度部分其中 $\phi 29$ DNA(1.699g/cm<sup>3</sup>)和枯草杆菌DNA(1.703g/cm<sup>3</sup>)的比例为4.6比1。临使用前,将DNA加于0.025 $\mu\text{m}$ 膜滤器(Millipore公司)上,经含10mM三磷酸腺苷,6mM亚精胺和3mM 2-巯基乙醇的TMS缓冲液(反应液)透析30分钟。

#### (五) 胞外互补

噬菌体感染细胞的抽提物按照已报告的方法<sup>[3]</sup>制备。将反应液中的抽提物和(或)提纯的成份置于拟菲林膜(parafilm)上混合,室温互补120分钟,然后以每毫升20微克的脱氧核糖核酸酶I(DNase I)处理15分钟。为了测定装入了DNA的衣壳,以反应液将样品加至100微升,加于5~20%含有TMS缓冲液的线性蔗糖梯度内,置于SW50.1转头中以每分钟35,000转的速度于 $20^\circ\text{C}$ 离心30分钟<sup>[1-5]</sup>。

在完全纯化的系统中,反应液、原衣壳、gp16和DNA-gp3的体积,一般以2:3:7:10的比例混合。

#### (六) 电泳和电子显微镜观察

十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[14]</sup>和电子显微镜超薄切片的方法<sup>[15]</sup>已有论文发表。

## 试验结果

### (一) gp16的克隆和超量产生

为了克隆 $\phi 29$ 的基因16及让其在 $\text{E. coli}$ 内高度表达, 将 $\phi 29$  DNA的EcoRI切段E/D分离出来然后插入质粒pPLc2883中(图1a)。重组质粒以转化法移入 $\text{E. coli}$  M5219细胞内, 构成M5219 (pPG9) 菌株。当处于繁殖阶段的M5219 (pPG9) 培养物

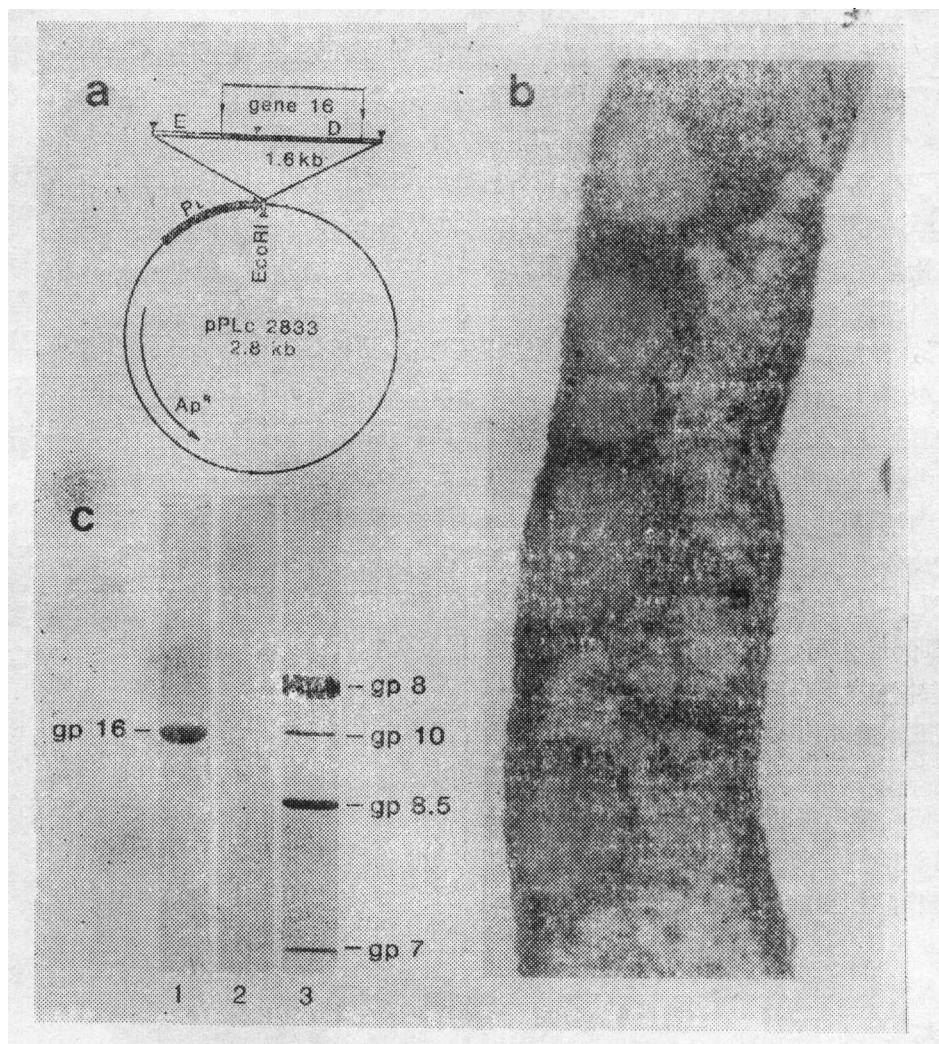


图1 a.  $\phi 29$ 的EcoRI切段E/D被连接到质粒pPLc2883<sup>[8]</sup>的EcoRI切位。重组后的质粒pPG9最终以转化法转移到 $\text{E. coli}$  M5219内。b.  $\text{E. coli}$  M5219 (pPG9)的超薄切片, 显示了经42°C培养120分钟后的gp16凝集团(12,400倍)。c. 十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱, 纯gp16(第一行);  $^{32}\text{P}$ -DNA—gp3(第二行)和16S原衣壳(第三行)。以考马斯亮蓝(Coomassie blue)染色。原衣壳的成份为gp8(衣壳), gp10(入口顶点), gp8.5(纤维)和gp7(支架蛋白)。Kb——千个碱基。

从30℃转移到42℃时,寄宿在细胞内的原噬菌体的温度敏感突变体cI857阻遏物被灭活,而激活了质粒中的噬菌体入的P<sub>L</sub>启动子。

在42℃ 2小时培养期间,细胞体积显著增加,产生gp16的大凝集团(图1b)。凝集团外表光滑,边界清楚,没有明显的结晶结构。当球状体经法国压力器裂解时,凝集团被释放出来。

## (二) gp16的提纯

gp16凝集团的收集和溶解已于材料和方法中详细叙述。简要地说,溶解于6 M氯化胍的gp16经100,000×g离心,上清液经Sephapex G-150柱层析,以含有二硫苏糖醇的7.5M, pH5.2的尿素溶液洗脱。gp16在洗脱液中以二个峰出现(材料没发表)。第一峰中的gp16在与16<sup>-</sup>14<sup>-</sup>抽提物<sup>[1]</sup>互补时没有生物活性,同时被大多数的寄主蛋白所污染(材料没发表)。第二峰含有纯的gp16(图1c),经硫酸铵沉淀后,重溶于含二硫苏糖醇和氯化胍的溶液,再经4 mM的KCl复性后表现了生物活性。提纯全过程中gp16的总回收率超过50%(材料没发表)。

胞外装配系统中的原衣壳和DNA-gp 3以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析其纯度。DNA-gp 3的制备物中没有发现多余的其它蛋白质(DNA-gp 3不能进入凝胶),原衣壳只含有gp 7(支架蛋白), gp 8(衣壳), gp8.5(纤维)和gp10(入口顶点)(图1c)。

## (三) 完全纯化的胞外装配系统

提纯的原衣壳, <sup>3</sup>H-DNA-gp 3和gp16于含有三磷酸腺苷, 亚精胺和2-巯基乙醇的反应液中互补。混合物于室温孵化2小时并以脱氧核糖核酸酶 I 处理后, 装于衣壳中

表1  $\phi 29$  的 胞 外 装 配 \*

| 混合物号 | gp16来源                                            | 原衣壳来源                               | 外 源 性<br>DNA—gp3 | pfu/ml × 10 <sup>-11</sup> | 实验次数 |
|------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------|----------------------------|------|
| 1    | 7 <sup>-</sup> 8 <sup>-</sup> 14 <sup>-</sup> 抽提物 | 16 <sup>-</sup> 14 <sup>-</sup> 抽提物 | -                | 27 ± 2                     | 2    |
| 2    | 7 <sup>-</sup> 8 <sup>-</sup> 14 <sup>-</sup> 抽提物 | 纯                                   | +                | 12 ± 1                     | 2    |
| 3    | 纯                                                 | 16 <sup>-</sup> 14 <sup>-</sup> 抽提物 | -                | 2.7 ± 0.6                  | 5    |
| 4    | 纯                                                 | 纯                                   | +                | 1.1 ± 0.2                  | 3    |

\* 感染了突变株7<sup>-</sup>8<sup>-</sup>14<sup>-</sup>(提供gp16和DNA)或16<sup>-</sup>14<sup>-</sup>(提供原衣壳和DNA)的细胞抽提物以等容量混合;所用的裂解和反应缓冲液含0.05M Tris·HCl, pH7.8, 10mM三磷酸腺苷, 6 mM亚精胺, 3 mM 2-巯基乙醇<sup>[1]</sup>。每种抽提物含10<sup>9</sup>pfu/ml或更少。提纯的成份(gp16, 原衣壳和DNA—gp3)加入到抽提物或混合起来以提供相近的互补容量。混合物1~3号中内源性DNA—gp3的浓度各大约为每毫升10<sup>13</sup>, 5 × 10<sup>12</sup>和5 × 10<sup>13</sup>。外源性4<sup>-</sup>8<sup>-</sup>[<sup>32</sup>P]DNA—gp3的浓度为每毫升2.1 × 10<sup>12</sup>。

\*\* 一半的纯化混合物以20ug/ml的脱氧核糖核酸酶 I 处理, 然后以蔗糖密度梯度离心法测定其装包的衣壳(图2); 另外一半与等容量的7<sup>-</sup>8<sup>-</sup>14<sup>-</sup>16<sup>-</sup>抽提物混合, 此抽提物作为颈和尾装配时所需的蛋白质来源, 然后再次孵化120分钟。后代中97%含有外源性4<sup>-</sup>8<sup>-</sup>基因组(被检测的300个克隆中占291个)。在加入7<sup>-</sup>8<sup>-</sup>14<sup>-</sup>16<sup>-</sup>抽提物之前, 提纯成份的混合物每毫升含少于10<sup>4</sup>空斑形成单位。

的  $^3\text{H}$ -DNA-gp 3 以蔗糖梯度离心测定 (图 2)。梯度的第 2—8 管为装饱的衣壳, 占互补时加入的  $^3\text{H}$ -DNA-gp 3 的 23%。将作为 gp16 来源的  $7^{-}8^{-}14^{-}$  抽提物与提纯的原衣壳和  $^3\text{H}$ -DNA-gp 3 互补以作对照 (图 2), 梯度中第 2—8 管占加入的  $^3\text{H}$ -DNA-gp 3 的 26%。因此, 被来自大肠杆菌的纯化 gp16 包装的外源性 DNA-gp 3 的量, 可与被  $7^{-}8^{-}14^{-}$  感染的枯草杆菌抽提物中的 gp16 所包装者等同。

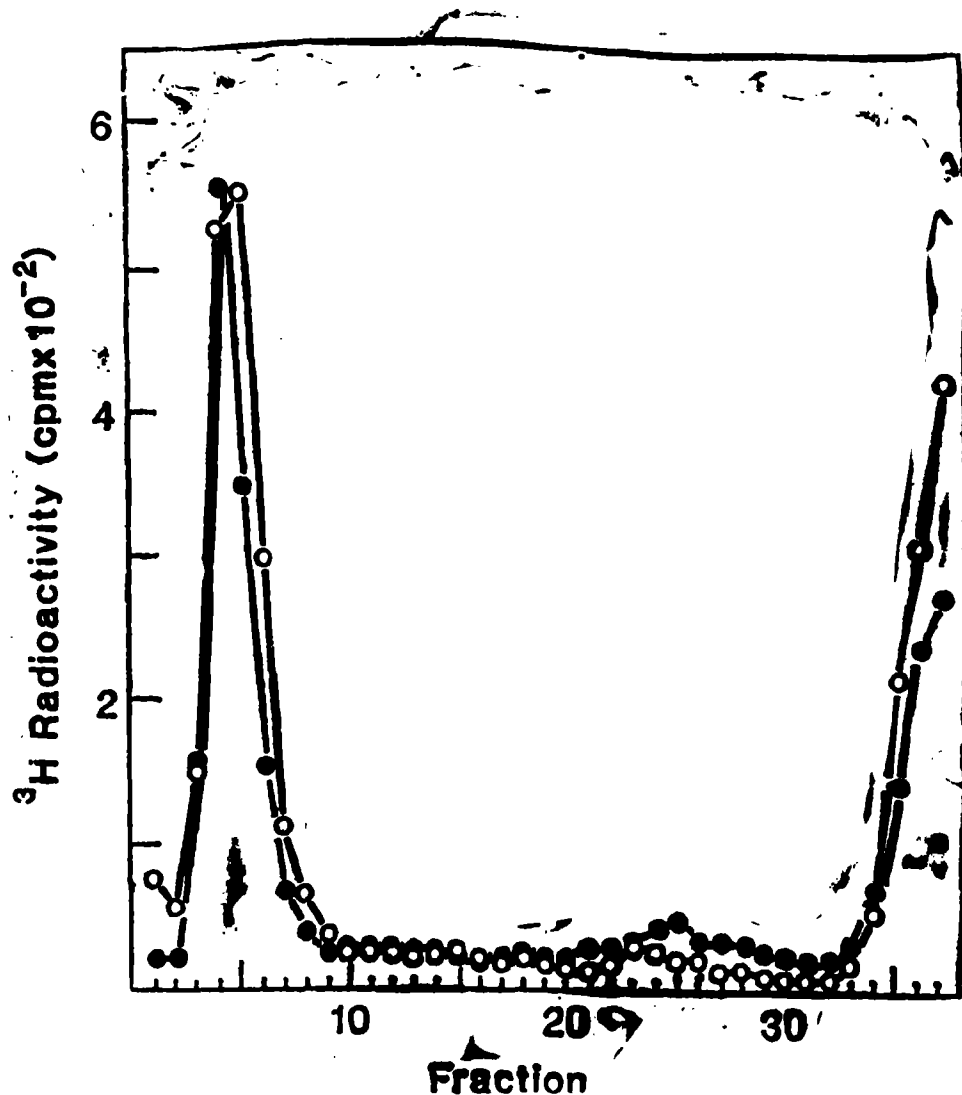


图 2 提纯的 gp16 跟  $7^{-}8^{-}14^{-}$  抽提物中的 gp16 一样有效地包装外源性 DNA-gp3。外源性  $4^{-}8^{-}$  ( $^3\text{H}$ )-DNA-gp3 ( $2.1 \times 10^{12}/\text{ml}$ ) 和提纯的原衣壳与作为 gp16 来源的  $7^{-}8^{-}14^{-}$  抽提物或与每毫升反应液含 14 微克的纯 gp16 互补。置室温 120 分钟后, 此混合物以脱氧核糖核酸酶 I ( $10\text{ug}/\text{ml}$ ) 消化, 稀释至 100 微升, 然后于蔗糖梯度中沉降。通过测定三氯乙酸不溶性放射性, 表明  $7^{-}8^{-}14^{-}$  抽提物产生的噬菌体 (●) 或由纯 gp16 产生的装了 DNA 的衣壳 (○) 集中于梯度的第 4—5 管 (Fraction)。

抽提物中的噬菌体产量和完全纯化系统中装饱的衣壳（随后也可转变为噬菌体）的产量已进行计算和对比（表1）。当gp16和原衣壳两者都来自抽提物时，产生 $2.7 \times 10^{12}$  /ml空斑形成单位（pfu），即等于每个提供原衣壳的细胞产生540个空斑形成单位。提纯的原衣壳加入 $7 \sim 8 \times 10^{14}$ 抽提物中时，每毫升产生大约一半的空斑形成单位。当纯gp16加入 $16 \times 10^{14}$ 抽提物中时，噬菌体的产量比 $7 \sim 8 \times 10^{14} \times 16 \times 10^{14}$ 的对照降低了十倍。完

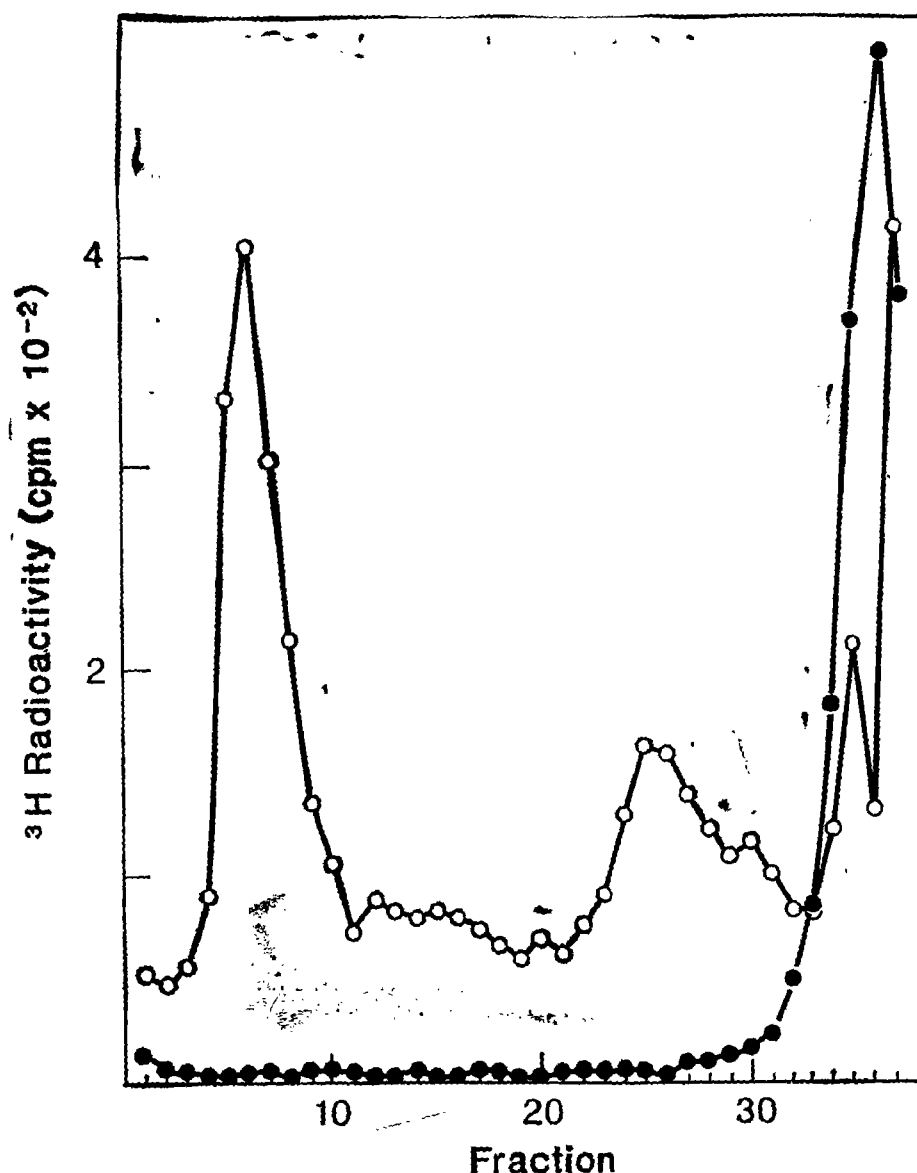


图3 在纯化系统中，DNA—gp3的包装需要三磷酸腺苷。在10mM三磷酸腺苷存在或不存在的条件下，外源性 $4 \sim 8 \times 10^{14}$  DNA—gp3 ( $2.1 \times 10^{12}$  /ml) 和提纯的原衣壳（大约 $1.3 \times 10^{13}$  /ml）与纯gp16（每毫升反应液含14微克）互补。混合物以脱氧核糖核酸酶I处理，稀释至100微升，于蔗糖梯度中离心沉降。在三磷酸腺苷存在（o）的情况下，衣壳中的 $[^3H]$  DNA—gp3集中于蔗糖梯度的第6管，在三磷酸腺苷不存在（•）的情况下，没有见到 $[^3H]$  DNA—gp3以颗粒的形式沉降下来。

全纯化的系统中(表1的第4号混合物),每毫升有 $1.1 \times 10^{11}$ 空斑形成单位,此产量表明,当加入含有尾和颈装配所必需的蛋白质的抽提物时,混合物中5%的DNA-gp3转变成了噬菌体。在完全纯化的反应混合物中,原衣壳的浓度大约为 $1.3 \times 10^{12}/\text{ml}$ ,可与DNA-gp3每毫升为 $2.1 \times 10^{12}$ 相比。gp16的浓度为 $14 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,相当于每个DNA-gp3配100个gp16分子。

在纯化系统中,DNA-gp3的包装需要三磷酸腺苷(ATP)(图3)。在蔗糖梯度离心的过程中,部份装饱的原衣壳受到裂解,而仍然附着于衣壳上的 $^3\text{H}$ -DNA-gp3,则集中在第25管。这一现象已有过描述<sup>[3]</sup>,然而出现于此位置的放射性标记的量变化不一。

## 讨 论

$\phi 29$ 的DNA包装蛋白gp16是一种分子量为39,000道尔顿的蛋白质,含有331个氨基酸<sup>[10]</sup>。我们组建了含有 $\phi 29$ DNA的EcoRI切段E/D的重组质粒pPG9,使gp16在大肠杆菌M5219(pPG9)中大量产生并以凝集团出现(图1b),它们占细胞总蛋白的30%。产量之高可能取决于M5219<sup>[8]</sup>中基因N的产物的抗终止作用,因为在大肠杆菌 $K_{12} \Delta H 1 \Delta \text{trp}$ (pPG9)中gp16的产量则约少10倍(材料没发表)。在EcoRI切段E/D中,两个大的可解读编码(open reading frame)的位置已经确定,两者一起几乎跨越了整个序列<sup>[10]</sup>。第一个可解读编码产生一个融合蛋白,第二个可解读编码具996个给gp16编码的碱基对。质粒pUB110插入了EcoRI切段E/D<sup>[4]</sup>,从带有此质粒的枯草杆菌小细胞(minicell)中可观察到这两种蛋白质。通过确定 $\phi 29$ 突变株sus16(300)—sus14(1241)<sup>[10]</sup>的碱基序列,基因16的可解读编码的同一性得到肯定。gp16合成的可能原发位置已经判定,并推算出gp16的分子量为38,920道尔顿,与通过十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳估测的分子量为36,000道尔顿相接近<sup>[10]</sup>。在 $K_{12} \Delta H \Delta \text{trp}$ (pPG9)菌株中,主要的大量产生的蛋白质,估计是由第一个可解读编码产生的一个低分子量融合蛋白(材料没发表)。

唯有1%十二烷基硫酸钠和4—8 M氯化胍才能有效地溶解分离出来的gp16凝集团。十二烷基硫酸钠处理过的gp16没有生物活性,但经氯化胍处理后可以复性。一旦溶于氯化胍溶液,经7.5 M, pH5.2的尿素溶液提纯,得到几乎同质的gp16(图1c)。尿素溶液的pH在维持其生物活性至为关键。经0.01 M Tris·HCl, pH7.5, 0.004 M KCl的溶液透析去除尿素以使gp16复性时,部份蛋白根据不同的浓度产生沉淀。gp16的难溶性可能归咎于它的高度疏水性, gp16中苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸和色氨酸的含量占46%,与大肠杆菌蛋白平均为29%形成鲜明的对比。

在抽提物中,提纯的原衣壳和DNA-gp3产生算术级的浓度反应曲线, gp16则产生较高级数的浓度反应曲线,这表明DNA包装的过程需要多个gp16分子参与<sup>[4]</sup>。对纯化的gp16浓度依赖性的研究初步表明存在类似的较高级数的反应(材料没发表)。我们尚不知具活性的gp16是单链还是低聚物(oligomer),然而,估计每个DNA—gp3需要加入100个纯gp16分子与噬菌体感染细胞内每个DNA—gp3所需要的gp16的数没有明显的差别。每个病毒子含有170个gp3(衣壳的主要蛋白)分子<sup>[17]</sup>,感染了噬菌体的枯草

杆菌经紫外光放射后产生的gp16的量大约是gp8的一半<sup>[10]</sup>。纯化的gp16在某种情况下产生凝集，形成了立体的薄片和管状结构，这可能反应了它在DNA包装过程中的结构组织（材料没发表）。

纯化系统中来自大肠杆菌的gp16的DNA包装效率为23%（图2），这与枯草杆菌抽提物中由质粒产生的gp16的效率相近<sup>[4]</sup>。这数字可乐观地用以与胞内（50%）以及枯草杆菌粗提物（20%，即12~29%的范围，实验次数为6）<sup>[2][4]</sup>中DNA—gp3包装的量相比拟，故此，不需要寄主蛋白质，大肠杆菌产生的gp16是高效的。这里报告的抽提物（表1中混合物1号）的包装效率代表了每个原衣壳供体细胞具540个空斑形成单位的产量，这与典型的胞内互补的产量相类似（材料没发表）。与噬菌体感染细胞的抽提物相比较，提纯的gp16所产生的病毒量下降（表1），枯草杆菌抽提物中，质粒所产生的gp16也是如此（ $4.1 \pm 2.1 \times 10^{11}$  pfu/ml<sup>[4]</sup>）。在这两种情况下，都需要第二次互补以给脆弱的装了DNA的衣壳装配上颈和尾<sup>[4]</sup>。而且，纯化系统中DNA的含量只有抽提物的三分之一（表1混合物4号和2号）。我们已经证明，原衣壳、gp16和三磷酸腺苷三者既必需也足够以对外源性DNA—gp3进行高效地包装（引用文献[2]、[4]和本文）。

纯化系统DNA—gp3包装的高效性有利于对包装机制的研究。例如，gp16中只有二个半胱氨酸残基，此残基仅被一个异亮氨酸残基隔开<sup>[10]</sup>。分离和提纯有生物活性的gp16需要二硫苏糖醇，一个二硫键有可能决定了有活性或无活性的gp16立体结构。硫氧还蛋白（thioredoxin）具有类似的半胱氨酸残基间隔，噬菌体 $f_1$ 装配需要它，它可能在反应中执行一系列的氧化还原功能以促进 $f_1$  DNA在经细胞壁移出的过程中被“包装”。

#### 引用文献

- [1] Bjornsti, M. A., Reilly, B. E. & Anderson, D. L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5861—5865.
- [2] Bjornsti, M. A., Reilly, B. E. & Anderson, D. L. (1982) *J. Virol.* 41, 508—517.
- [3] Bjornsti, M. A., Reilly, B. E. & Anderson, D. L. (1983) *J. Virol.* 45, 383—396.
- [4] Bjornsti, M. A., Reilly, B. E. & Anderson, D. L. (1984) *J. Virol.* 50, 766—772.
- [5] Bjornsti, M. A., Reilly, B. E. & Anderson, D. L. (1985) *J. Virol.* 53, 858—861.
- [6] Reilly, B. E., Zeece, V. M. & Anderson, D. L. (1973) *J. Virol.* 756—769.
- [7] Mellado, R. P., Moreno, F., Vinuela, E., Salas, M., Reilly, B. E. & Anderson, D. L. (1976) *J. Virol.* 19, 495—500.
- [8] Remaut, E., Stanssens, P. & Fiers, W. (1981) *Gene* 15, 81—93.
- [9] Remaut, E., Tsao, H. & Fiers, W. (1983) *Gene* 22, 103—113.
- [10] Garvey, K. J., Saedi, M. S. & Ito, J. (1985) *Gene*, in press.
- [11] Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)

- [12] Kushner, S. R. (1978) in *Genetic Engineering*, eds. Boyer, H. B. & Nicosia, S. (Elsevier, Amsterdam), p. 17.
- [13] Ito, J. & Roberts, R. J. (1979) *Gene* 5, 1—7.
- [14] Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* 227, 680—685.
- [15] Kellenberger, E. & Ryter, A. (1964) in *Modern Development in Electron Microscopy*, ed. Siegel, B. M. (Academic, New York), pp. 335—393.
- [16] Hawley, L. A., Reilly, B. E, Hagen, E. W. & Anderson, D. L. (1973) *J. Virol.* 12, 1149—1159.
- [17] Carrascosa, J. L., Mendez, E., Corral, J., Rubio, V., Ramirez, G., Salas, M. & Vinuela, E. (1981) *Virology* 111, 401—413.
- [18] Russel, M. Model, P. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 29—33.

# A DEFINED SYSTEM FOR IN VITRO PACKAGING OF DNA—GP3 OF THE BACILLUS SUBTILIS BACTERIOPHAGE $\phi$ 29

Peixuan Guo

Shelley Grines Dwight Andersen

(Department of Animal Husbandry  
and Veterinary Medicine)

(Departments of Microbiology and Dentistry  
University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455)

## ABSTRACT

The bacteriophage  $\phi$ 29 DNA-gene product 3 complex (DNA-gp3) has been efficiently packaged into proheads in a completely defined in vitro system. The  $\phi$ 29 DNA packaging protein gp16, the product of gene 16, was overproduced in *Escherichia coli* and purified to near homogeneity. The purified gp16 packaged 23% of the DNA-gp3 added to purified proheads in the defined mixture, while gp16 in an extract of phage-infected cells packaged 26% of the DNA-gp3. No host proteins were required in the defined system. ATP-dependent packaging of DNA-gp3 in the defined system was optimal with  $\approx 100$  copies of gp16 per DNA-gp3, an amount similar to the production of gp16 per DNA-gp3 in  $\phi$ 29-infected cells.

**Key words,** phage  $\phi$ 29 gene 16 cloning, protein lumps in overproduction, hydrophobic protein purification, protein renaturation