

红霉素链霉菌 2-62 溶源性菌株的确证与特性研究

张筱玉 邹美云 李文筠 俞学琴

(上海第三制药厂, 上海)

我们从红霉素产生菌 *Streptomyces erythreus* 的 27 株系谱菌株中分离到一株带有噬菌体的 2-62 菌株, 并对 2-62 菌株作了多方面的考察。根据单菌落传代、孢子加热, 柠檬酸钠洗涤消除噬菌体后仍继续释放噬菌体; 2-62 菌株释放的噬菌体经纯化后制备抗血清, 用此抗血清处理 2-62 菌株的斜面孢子, 以中和游离的噬菌体, 这种孢子在培养过程中仍继续释放噬菌体; 2-62 菌株对其自身释放的噬菌体具有免疫力等特性, 确证 2-62 菌株为溶源性菌株。

用紫外线或丝裂霉素 C 进行诱导试验, 噬菌体释放量增加不多。将 2-62 菌株释放的温和性噬菌体感染 P³²-102 敏感菌, 得到的溶源化菌株亦释放噬菌体, 并且溶源化菌株的性状保持稳定。

1956 年首次报道在放线菌中发现真溶源现象。Alexander 和 McCoy^[1] 在对 7 株 *St. griseus* 噬菌体的比较试验中, 发现其中一株噬菌体是由溶源性菌株产生。同年, Shirling^[2] 从电子显微镜观察到放线菌 S-77 菌株中存在噬菌体颗粒, 他认为此菌株携带温和性噬菌体, 但当时没有合适的指示菌可以形成噬斑, 仅推测 S-77 菌株为一溶源性菌株。由此, Shirling 提出了真溶源或携带噬菌体这一问题。此后, 关于溶源性放线菌的工作有一些报道^[3,4], 但这些报告未详细描述溶源性菌株的特性。温和性噬菌体不仅是转导试验所必需, 同时可作为基因载体。细菌温和性噬菌体的研究和应用已有较长的历史, 但有关放线菌特别是生产抗生素的放线菌中报道甚少, 本文着重报道从红霉素链霉菌中分离得到的溶源性菌株, 并研究其有关特性。

材 料 和 方 法

(一) 菌株: 本厂保存的红霉素链霉菌的系谱菌株共 27 株, P³²-102 菌株为噬菌体试验用的指示菌。

(二) 培养基: 红霉素链霉菌的斜面及种子

培养基、噬菌体试验用的培养基与过去使用的相同^[5]。

(三) 抗血清的制备: 按照 Adams 方法^[6] 进行。以 2-62 菌株释放的噬菌体免疫兔子, 在达到一定效价后, 采血, 取其血清, 并测定其 K 值。

(四) 噬菌斑计数: 采用双层琼脂法, 以敏感菌的种子培养液作指示菌, 在 37℃ 培养 18 小时后观察结果。

实 验 结 果

(一) 溶源性红霉素链霉菌 2-62 菌株的分离

将保存的红霉素链霉菌的系谱菌株 27 株, 分别接种在斜面培养基上, 在 37℃ 培养 7 天后, 每一菌株接种至种子培养基, 在 28℃ 培养 48 小时, 种子液经离心取上清液 0.02 毫升滴在含有指示菌的平皿上, 各菌株均互为指示菌作交叉测定, 在 37℃ 培养后, 观察有无溶菌而确定是否为带噬菌体菌株。

经重复测定, 在 27 株菌株中, 2-62 菌株在 P³²-102 等菌株上出现溶菌斑, 初步确定为带噬菌体的菌株。然后将 2-62 菌

本文于 1979 年 12 月 6 日收到。

本文承沈善炯教授审阅, 特此致谢。

表 1 2-62 菌株单菌落传代后种子培养液中噬菌体数 (p. f. u/毫升)

单菌落传代数	F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
噬菌体数	2.59×10 ⁷	5.60×10 ⁷	5.60×10 ⁷	4.36×10 ⁸	2.60×10 ⁷	1.48×10 ⁷

表 2 2-62 菌株斜面孢子热处理后噬菌体数 (p. f. u/毫升)

未 加 热		60℃ 30'		70℃ 30'		80℃ 30'	
孢子数 (个/毫升)	噬菌体数	存活孢子数	噬菌体数	存活孢子数	噬菌体数	存活孢子数	噬菌体数
2.8×10 ⁶	1.7×10 ⁴	6×10 ³	1.63×10 ⁴	9.5×10 ²	1.34×10 ⁴	0	0

株培养的上清液用赛氏漏斗过滤，滤液再用双层琼脂法测定有噬菌斑，因而进一步确定 2-62 菌株为带噬菌体的菌株。噬菌体以连续 3 次挑取单噬菌斑进行纯化，然后放入 1% 蛋白胨液中置 4℃ 冰箱保存，并以此噬菌体制备抗血清。经测定，抗血清的 K 值为 300。

(二) 2-62 溶源性菌株的确证及其特性考察

1. 单菌落传代试验

2-62 菌株经单孢子分离，挑取单菌落传代，每代测定所释放的噬菌体数。证明在没有任何外源噬菌体的条件下，连续经过 5 次单菌落传代，每代种子培养 48 小时释放噬菌体数均在 10⁷p. f. u/毫升以上，结果如表 1。

2. 孢子加热试验

将 2-62 菌株的斜面孢子刮下，以玻璃珠将孢子链打碎后过滤，制成单孢子悬液，并经离心洗涤 3 次，以减少游离噬菌体，然后分别在 60℃、70℃、80℃ 处理后以双层琼脂法测定噬菌体数，如表 2。

孢子经 60℃、70℃ 加热 30' 后在培养过程中仍继续释放噬菌体，在 80℃ 处理 30'，孢子均死亡，亦无噬菌体。

3. 抗血清处理孢子

2-62 菌株的斜面孢子经无菌水洗涤，用 2-62 释放的噬菌体所制备的抗血清来处理孢子，此孢子液用双层琼脂法测定噬菌体数，结果是未经抗血清处理的释放噬菌体量为 1.37 × 10⁶ p.f.u/毫升，经抗血清处理后释放噬菌体的量为 2.20 × 10⁵ p.f.u/毫升。这说明 2-62 菌株的斜面孢子经抗血清中和了游离噬菌体后，此孢子在培养过程中仍继续释放噬菌体。

4. 柠檬酸钠处理

2-62 菌株的斜面孢子经无菌水洗涤三次后，再用 0.2% 柠檬酸钠溶液洗涤，以除去游离噬菌体，然后测定孢子释放噬菌体的量，试验结果，处理前为 2.55 × 10⁷p.f.u/毫升，处理后为 4.85 × 10⁶ p.f.u/毫升。说明去除游离的噬菌体后，在培养过程中仍释放大量的噬菌体。

5. 免疫性试验

以 2-62 菌株为指示菌，用其自身所释放的噬菌体进行感染，并以敏感菌 P³²-102 菌株为对照，用双层琼脂法进行测定，结果如表 3。

表 3 指出，2-62 菌株释放的噬菌体只有在 P³²-102 菌株上能显示明显的溶菌斑，而且释放的噬菌体量达 10⁹ p.f.u/毫升，在以 2-62 菌株为指示菌的平皿上看不到溶

表 3 2-62 菌株对其自身释放的噬菌体的免疫性

噬菌体 \ 指示菌	2-62	P ³² -102
2-62 菌株释放的噬菌体 (种子培养液上清液)	0	1.81×10 ⁹

菌斑。说明 2-62 菌株对其自身所释放的噬菌体表现免疫性。

6. 溶源化效应

2-62 菌株释放的噬菌体能使敏感菌 P³²-102 菌株产生溶源化,被溶源化的 P³²-102 菌株同样能释放大量的噬菌体,如表 4。

表 4 溶源化的 P³²-102 菌株及 2-62 菌株释放噬菌体数 (p. f. u/毫升)

菌 株	释放噬菌体数
2-62	1.54×10 ⁸
溶源化 P ³² -102	5.18×10 ⁸

7. 2-62 菌株与溶源化 P³²-102 菌株免疫特性试验

分别以 2-62 菌株及已被溶源化的 P³²-102 菌株为指示菌,用其自身所释放的噬菌体进行感染及交叉感染,以敏感菌 P³²-102 菌株为对照,用双层琼脂法测定溶菌斑,结果如表 5。

表 5 2-62 菌株及溶源化 P³²-102 菌株对自身释放噬菌体的免疫性比较

噬菌体数 \ 指示菌 \ 噬菌体来源	2-62	溶源化 P ³² -102	敏感菌 P ³² -102
2-62	0	0	1.81×10 ⁹
溶源化的 P ³² -102	0	0	6.9×10 ⁶

从免疫试验结果可看出,只有在敏感菌 P³²-102 上出现溶菌斑,而以 2-62 菌株及溶源化的 P³²-102 菌株为指示菌时均无

溶菌现象,说明溶源化的 P³²-102 菌株对其自身及 2-62 菌株所释放的噬菌体均具有免疫性,2-62 菌株亦同样对两者所释放的噬菌体具有免疫性。

8. 诱导效应

(1) 紫外线诱导: 以 2-62 菌株的斜面孢子经不同剂量的紫外线诱导,结果见表 6。

表 6 紫外线对 2-62 菌株产生噬菌体的诱导效应

紫外线照射时间 (秒)	存活孢子数 (个/毫升)	溶菌斑数 (p. f. u/毫升)
0	9.95×10 ⁵	1.93×10 ⁸
5	8.50×10 ⁵	6.50×10 ⁸
10	6.35×10 ⁵	3.30×10 ⁸
15	5.0×10 ⁵	2.30×10 ⁸
20	4.90×10 ⁵	1.50×10 ⁸
25	4.05×10 ⁵	1.13×10 ⁸
30	3.0×10 ⁵	1.01×10 ⁸

从紫外线诱导试验来看,在经不同剂量紫外线照射后,噬菌体的产生量并未明显增加,在照射 20 秒后孢子量约死亡 50%,噬菌体产生量亦减少,经反复试验,均得相似结果,是否照射时间不适当或是紫外线对其不敏感尚需继续试验。

(2) 丝裂霉素 C 诱导: 以 2-62 菌株的斜面孢子及经打碎后的菌丝体溶液经丝裂霉素 C 诱导,所用的丝裂霉素剂量为每毫升 3 微克,处理不同时间后以双层琼脂法测定噬菌体数,结果见表 7。

以丝裂霉素 C 处理不同时间,存活孢子数变化不大,噬菌体释放量亦无显著增加。但以 2-62 菌株的菌丝碎片溶液处理时,丝裂霉素 C 作用 180 分钟后,存活菌丝约为未经处理的 9%,为噬菌体的释放量与未处理的相似,因此噬菌体的释放量约增加 10 倍,存在诱导效应,但不甚显著。

讨 论

2-62 菌株用单菌落传代,以除去游离

表 7 丝裂霉素 C 对 2-62 菌株产生噬菌体的诱导效应

丝裂霉素 C 处理时间 (分)	孢 子 诱 导		菌 丝 诱 导	
	存活孢子数 (个/毫升)	溶菌斑数 (p. f. u/毫升)	存活菌丝数 (个/毫升)	溶菌斑数 (p. f. u/毫升)
0	7.20×10^6	1.54×10^8	3.0×10^5	1.48×10^7
30	2.90×10^5	2.84×10^8	1.20×10^5	1.80×10^7
60	2.90×10^5	1.87×10^8	6.80×10^4	1.26×10^7
90	2.60×10^5	1.62×10^8	6.2×10^4	2.09×10^7
120	2.30×10^5	1.42×10^8	4.40×10^4	2.90×10^7
150	2.10×10^5	1.0×10^8	3.70×10^4	2.43×10^7
180	2.0×10^5	1.06×10^8	2.60×10^4	1.69×10^7

的噬菌体,连续进行五次后所得的单菌落,经振荡培养与未经单菌落分离的原始菌落一样,仍能释放大量的噬菌体,每代释放噬菌体的量保持一定水平。将 2-62 菌株的斜面孢子先经无菌水洗涤再以 60℃、70℃ 热处理,存活的孢子在繁殖过程中仍释放噬菌体,虽然此噬菌体对热不甚敏感,但孢子洗涤后剩余的噬菌体量(约 10^2 p. f. u/毫升)远比热处理后释放的少,说明这大量噬菌体是存活孢子在繁殖过程中释放出来的。在以柠檬酸钠溶液洗涤孢子后亦照旧释放噬菌体。以 2-62 菌株自身释放的噬菌体制备的抗血清处理 2-62 菌株的孢子,中和游离噬菌体,此孢子在繁殖过程中仍释放噬菌体。但用它自身释放的噬菌体感染 2-62 菌株进行双层琼脂法测定,不出现溶菌现象,说明 2-62 菌株对其自身释放的噬菌体具有免疫性。根据这些结果,我们确定 2-62 菌株为溶源性菌株,它释放的温和性噬菌体我们称它为红霉素链霉菌噬菌体 P₄,有关 P₄ 噬菌体的生物学特性已作了初步研究。

2-62 菌株在液体培养过程中能自发释放 10^7 p. f. u/毫升以上(最高达 10^9 p. f. u/毫升)的噬菌体,而菌体仍生长良好,无自溶的迹象,这在溶源性放线菌菌株中尚未见报道。在本试验结束一段时间后,我们看到 Hranuell 等^[7]报道的 *St. rimosus*

ATCC10970 (即 R7) 菌株亦是一溶源性放线菌,它在液体培养过程中释放的 RP2 噬菌体最高为 4.8×10^5 p. f. u/毫升,此点两者有较大差别。以不同剂量的紫外线诱导 2-62 菌株的斜面孢子,释放量均未明显增加。分别以丝裂霉素 C 诱导孢子或菌丝时,噬菌体释放量最多能增加 10 倍,这与某些溶源性细菌的诱导作用有差别,是否所采用的诱导因子及试验的条件不够适宜需进一步探讨。

溶源性的建立和保持是由温和性噬菌体的基因组所控制和调节的。我们将 2-62 菌株释放的温和性噬菌体感染 P³²-102 敏感菌,从溶菌斑中得到的溶源化菌株经单菌落传代后亦释放噬菌体,并且溶源化的菌株保持稳定,其形态类似 2-62 菌株,孢子颜色及基质菌丝分泌的色素均比 P³²-102 菌株浅。关于此噬菌体在溶源化过程中能携带那些性状,是否可用作转导试验有待进一步研究。Rautenstein 等^[8]报道的溶源性红霉素链霉菌 8594 菌株仅观察了该噬菌体的形态结构,未见其对溶源性菌株的特性详细描述。

在以放线菌生产的抗生素中,已有较多的品种在生产过程中出现噬菌体的感染,一般均筛选抗噬菌体的菌株来更换原用菌株。这些抗性菌株往往有两类,一类是由于噬菌体不能在菌体表面吸附所表示

的真正抗性, 这种抗性菌株可提供生产使用。另一类是由于放线菌内原噬菌体的存在而表现出对同源噬菌体的免疫性, 这类菌株在适宜的条件下即能释放出温和性噬菌体, 温和性噬菌体经突变可成为裂性噬菌体, 再经一系列突变又可能成为与宿主细胞毫无任何相关的超烈性噬菌体, 出现这些噬菌体将危及生产。因此在选育抗性菌株时要排除溶源性菌株, 具有真正抗性的菌株才能用于生产。

参 考 文 献

- [1] Alexander, R. R. and E. McCoy: *J. Bacteriol.*, 72: 378, 1956.
- [2] Shirling, E. B.: *Virology*, 2: 272, 1956.
- [3] Bradley, S. G.: *Science*, 126: 558, 1957.
- [4] Rautenstein, Ya. I.: *Mikrobiologiya*, 26: 573, 1957.
- [5] 张筱玉等: 微生物学报, 14(1):83, 1974 年。
- [6] Adams M. H.: *Bacteriophages* Interscience Publishers Inc., New York, 1959.
- [7] Hranuell, D. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 114: 295, 1979.
- [8] Rautenstein, Ya. I. et al.: *Microbiologiya*, 31: 49, 1962.

IDENTIFICATION AND PROPERTIES OF A LYSOGENIC STRAIN 2-62 OF *STREPTOMYCES ERYTHREUS*

Zhang Xiaoyu Zhou Minyun Li Wenjun Yu Xueqin

(Shanghai No. 3 Pharmaceutical Plant Shanghai)

A phage-carrying strain of *Streptomyces erythreus* was isolated by double layer method. Some properties of strain 2-62 were studied.

After serial single colony isolation or heat or sodium citrate treatment of the spores to get rid of the phage the spores of strain 2-62 were still capable of releasing phages. When the spores were treated with antiserum of purified phage liberated from 2-62 strain, it was found that this strain *Streptomyces erythreus* could release phages continuously. Strain 2-62 showed complete resistance to infec-

tion with the phage released by it selve. Based on these characteristics, *St. erythreus* strain 2-62 was considered as a typical lysogenic strain.

Irradiated with ultraviolet light or treated with Mitomycin C no significant increment of phage production was observed. The temperate phages released from strain 2-62 can induce lysogenization of sensitive strain P³²-102. After serial isolation of single colony this lysogenic strain was still capable of releasing phages and this characteristic was stable.