

卷曲链霉菌噬菌体的研究

崔汉钧 张仪常 魏芸斋

林端方 莫卫平 窦永泽

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

从安阳第一制药厂卷曲霉素生产的异常发酵液中分离到一株噬菌体, 定名为 ϕSC 。呈现头部和尾部结构, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离得 15 条蛋白质亚基谱带, 含双链脱氧核糖核酸。其 DNA 分子量为 10.89×10^6 道尔顿, 宿主范围很窄, 热失活温度为 $70^\circ C$, 在 pH5—9 稳定。

关键词 卷曲霉素; 噬菌体 ϕSC

卷曲霉素系我国河南省安阳市第一制药厂生产, 1982 年下半年, 生产连续不正常, 被迫停产, 经鉴定, 证实为噬菌体污染所致。卷曲链霉菌噬菌体, 在国内属首次发现, 国外也未见有报道。我们通过电镜和其它生化分析, 对其形态大小、理化特性进行了研究, 选育出产量较高的抗噬菌体菌株, 并已用于生产。此外, 对该噬菌体的蛋白和核酸也进行了初步研究。

材料与方 法

(一) 指示菌

卷曲链霉菌 (*Streptomyces capreolus*) 系由河南省安阳市第一制药厂提供。

(二) 噬菌体

从河南省安阳市第一制药厂卷曲霉素生产的异常发酵液中分离获得。

(三) 培养基和稀释液

1. 斜面培养基: 高氏一号琼脂培养基。

2. 平板培养基 (%): 可溶性淀粉 1, 酵母粉 0.3, 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 1, NaCl 0.2, $NaNO_3$ 0.2, $CaCO_3$ 0.2, pH7.2。下层加琼脂 2, 上层除琼脂 0.6—0.7 外, 另加 $CaCl_2$ 0.15。

3. 二级菌种培养基: 同平板培养基, 不加琼脂。

4. 发酵培养基 (%): 可溶性淀粉 3.5, 蛋白

胨 3, 葡萄糖 1.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3, KH_2PO_4 0.01, $CaCO_3$ 0.4, pH7.2。

5. 噬菌体稀释和保存液 (g/L): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 4.9, Tris 1.2, NaCl 0.29, pH8.0。

(四) 噬菌体平板计数

按 Adams^[1] 双层法进行, $28-30^\circ C$ 培养 48 小时左右检查结果。

(五) 电镜观察

按常规方法制片, 2%、pH7.0 的磷钨酸负染, 在 JEM-100X 型电镜下观察, 电镜照片通过幻灯投影测量噬菌体颗粒大小。

(六) 有机溶剂的影响

用浓度为 10% 氯仿、75% 乙醇、10% 丙酮分别在密闭试管内室温下处理噬菌体 30 分钟, 测定噬菌斑数目。

(七) pH 稳定性测定

基本按余茂效等^[2]方法进行。pH3—11 用酸度计测定, pH12、13 用精密试纸测定, 噬菌体起始效价 10^6 pfu/ml, $25^\circ C$ 水浴 1 小时, 适当稀释后测定噬菌斑数目。

(八) 热失活测定

取 10^7-10^8 pfu/ml 噬菌体液分装大小厚薄一致的试管, 每管 2ml, 在不同温度水浴中保持 30 分钟, 冷却后测定噬菌斑数目。

(九) 对紫外线敏感性的测定

本文于 1985 年 3 月 18 日收到。

取 10^4 pfu/ml 噬菌体液 0.2ml 于直径 2.5cm 的平底玻皿中, 在紫外灯下 (20W, 距离 45cm) 照射后继续保持黑暗 30 分钟, 测定噬菌斑数目。

(十) 宿主范围测定

用链霉菌 14 个类群的代表菌株孢子悬液与 10^4 和 10^5 pfu/ml 两种浓度的噬菌体液, 按双层法测平板噬菌斑形成单位。

(十一) 噬菌体悬液的制备和提纯

用固体平板法^[3]繁殖噬菌体, 收集平板上层琼脂, 离心, 取上清液经 $0.3\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后, 再以 45,000rpm 超速离心 2.5 小时, 噬菌体沉降物悬于稀释液 (约浓缩 20 倍) 中, 为噬菌体粗提液。

上述粗提液加氯化铯 (终浓度 0.85g/ml) 进行密度梯度离心, 20°C , 40,000rpm, 18 小时, 用注射器收集梯度中青蓝色噬菌体带于透析袋中, 对噬菌体稀释液透析 6—8 小时。

(十二) 噬菌体蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按 Laemmli^[4] 不连续系统电泳法进行, 用 $82 \times 82 \times 2.7\text{mm}$ 平板凝胶, 70V, 90—70mA, 室温下电泳 4 小时。蛋白质固定、染色及退色均按 Porro 等^[5] 的方法。

(十三) 噬菌体蛋白亚基分子量的测定

按 Pharmacia 公司说明书^[6] 介绍的方法进行。以该公司生产的低分子量和高分子量标准蛋白质 (均用亚基) 作对照。低分子量标准蛋白含磷酸化酶 b (94,000dal), 牛血清白蛋白 (67,000dal), 卵清白蛋白 (43,000dal), 碳酸酐酶 (30,000dal), 大豆胰蛋白酶抑制剂 (20,100dal) 和 α -牛乳清蛋白 (14,400dal); 高分子量标准蛋白含甲状腺球蛋白 (330,000dal), 铁蛋白 (半亚基 220,000 和亚基 18,500dal), 过氧化氢酶 (60,000dal) 和乳酸脱氢酶 (36,000dal)。

(十四) 核酸的分离、定性及分子量测定

1. 定性: 噬菌体悬液经 2%SDS 裂解后用二苯胺法检测。

2. 分离: 参照崔道珊等^[7]、叶盛玉等^[8] 的方法, 取 0.1—0.3ml 纯化的噬菌体液于 Eppendorf 管中, $50-60^\circ\text{C}$ 加热 10 分钟, 冷至室温, 加 2% SDS 至终浓度为 1%, 37°C 保温 1 小时, 加等体积 TE 缓冲液 (TE: 0.25M NaCl, 10mM Tris, 1mM

EDTA, pH8.0) 饱和的苯酚, 混匀, 于 TGL-16 台式离心机离心 1—2 分钟, 取水相, 重复一次, 再用上述饱和苯酚与氯仿 (V/V1:1) 对水相抽提一次, 所得水层用乙醚抽提除酚后, 加冷乙醇置冰箱过夜, 离心收集 DNA 沉降物, 溶于适量 $1 \times \text{SSC}$ 缓冲液 (SSC: 0.15M NaCl, 0.015M 柠檬酸钠) 中。

3. 分子量测定: 参照陈关君等^[9] 方法, 用 0.7% 琼脂糖平板凝胶电泳, 以大肠杆菌噬菌体 λ DNA HindIII 酶切样品为对照, 根据已知 λ DNA 酶切片段的分子量和泳动距离绘制标准曲线, 测出噬菌体 ϕSC 的分子量。

(十五) 限制内切酶切割 ϕSC 的 DNA

全部酶反应均按劳为德等^[10] 的条件进行。

结 果

(一) 噬菌体的分离和纯化

安阳市第一制药厂卷曲霉素生产的异常发酵液经稀释, 用双层法^[1] 进行连续单斑分离, 获得两株噬菌体, 通过电镜观察和测量, 确认为同一种噬菌体, 定名为 ϕSC 。

(二) ϕSC 的颗粒及噬菌斑的形态与大小

ϕSC 的噬菌斑圆形, 边缘整齐, 大而清晰, 直径 3—7mm, 平均 4.8mm (图 1)。噬

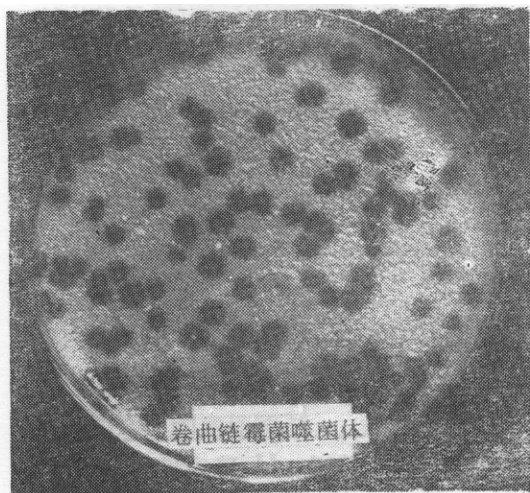


图 1 ϕSC 噬菌斑

Fig. 1 Morphology of ϕSC

菌体颗粒的头部长宽相当,尾部细长,按 Ackermann^[11] 分类标准属 B₁ 型(图 2),其大小见表 1。

表 1 ϕ SC 颗粒的大小 (nm)

Table 1 The size of ϕ SC particle

头部 Head		尾部 Tail	
长度 Length	宽度 Width	长度 Length	宽度 Width
35.4	34.7	73.2	4.7



图 2 ϕ SC 颗粒的形态 (288,000 \times)

Fig. 2 Plaques of ϕ SC

(三) 有机溶剂对 ϕ SC 存活力的影响

表 2 表明,该噬菌体对氯仿、乙醇均敏感,而对丙酮不敏感。

表 2 有机溶剂对 ϕ SC 存活率的影响

Table 2 Influence of organic solvents on the survival rate of ϕ SC

溶 剂 Solvent	处理终浓度(%) Final concentration of treatment	存活率(%) Survival rate
氯仿 Chloroform	10	0
乙醇 Ethanol	75	3.2
丙酮 Acetone	10	97.7

(四) 热失活和 pH 稳定性

ϕ SC 不耐热,70 $^{\circ}$ C 30 分钟几乎全部失活(图 3); pH 适应范围在 pH5—9 之间,

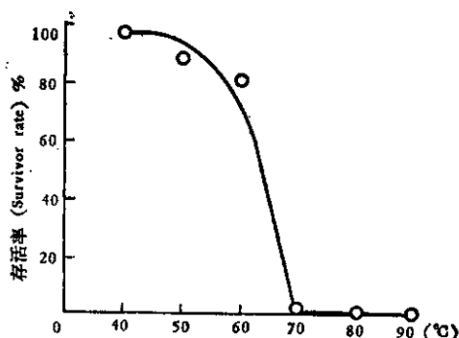


图 3 温度对噬菌体存活的影响

Fig. 3 The effect of temperature on the survival rate of ϕ SC

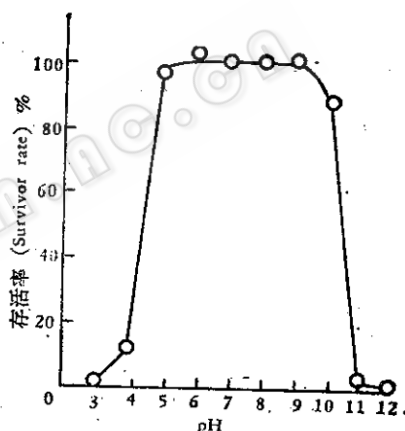


图 4 pH 对噬菌体存活率的关系

Fig. 4 The relationship between pH and the survival rate of ϕ SC

低于 pH3、高于 pH11 则基本失活(图 4)。

(五) ϕ SC 对紫外线照射的敏感性

随着紫外线强度的增加, ϕ SC 噬菌体的存活率降低,在试验条件下,照射时间超过 24 分钟则完全失活(图 5)。

(六) 宿主范围的测定

卷曲链霉菌噬菌体 ϕ SC 对链霉菌 14 个类群的代表菌株和卡那霉素链霉菌进行侵染试验,经多次检测结果表明,该噬菌体宿主范围很窄,在试验条件下均不出现噬菌斑。

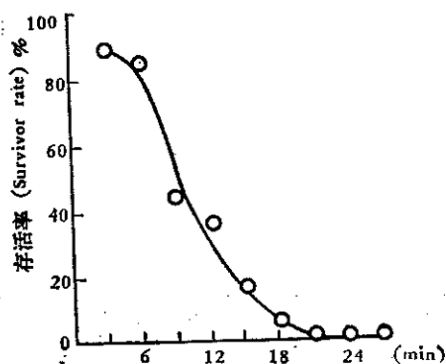


图 5 紫外线照射对噬菌体存活率的影响

Fig. 5 The influence of UV radiation on the survival rate of ϕ SC

(七) 噬菌体蛋白 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白亚基分子量的测定

纯化的噬菌体悬液用等量含 SDS 样品的缓冲液(含 10mM Tris-ClpH8.0, 1mM EDTA, 2.5% SDS, 5% β -巯基乙醇)处理后,通过 0.1% SDS 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,出现 15 条蛋白亚基谱带,其中 5 条较弱(图 6)。

用 Pharmacia 公司的 11 种标准蛋白

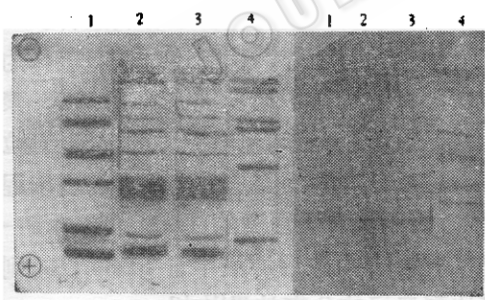


图 6 噬菌体蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(右)及其模拟图(左)

Fig. 6 The pattern of phage proteins on SDS-polyacrylamide gel (right) and an imitative profile (left)

1. 低分子标准蛋白;

2,3. 噬菌体蛋白;

4. 高分子标准蛋白。

1. Low MW standards;

2,3. Phage proteins;

4. High MW standard.

一起电泳,求出各标准蛋白分子量(M)的对数与电泳迁移率(以 R_f 值计)之间的回归方程为:

$$\hat{Y} = a + bx = 5.2102 - 1.3700x$$

以 $\log M$ 为 Y , R_f 为 x 作回归直线,并以此为标准曲线,求出相应蛋白亚基的分子量(表 3)。

(八) 核酸定性和分子量的测定

用二苯胺法检测证实, ϕ SC 含脱氧核糖核酸,琼脂糖凝胶电泳上出现一条谱带(见图 7),以 λ DNA 经 *Hind*III 酶切谱带为对照,计算其分子量为 10.89×10^6 道尔顿。



图 7 ϕ SC DNA 的电泳图

Fig. 7 Phage DNA pattern on agarose gel

1. ϕ SC DNA

2. λ DNA 经 *Hind* III 酶切的谱带

1. ϕ SC DNA

2. DNA digested with *Hind* III (control)

(九) 限制内切酶谱

ϕ SC DNA 在同一试验条件下,可被多种限制内切酶切割。图 8 指出, ϕ SC 经 *Eco*RI、*Hind* III 切割后电泳,分别出现 17

表 3 噬菌体蛋白亚基电泳相对迁移率和分子量

Table 3 Relative electrophoresis mobilities (Rf) and molecular weights of the phage protein subunits

编号 No.	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Rf 值 Rf values	0.16	0.17	0.25	0.29	0.34	0.43	0.52	0.53	0.55	0.57	0.58	0.69	0.75
分子量 MW	330,000	300,000	73,790	65,310	55,590	41,690	31,620	30,550	28,510	26,610	26,000	18,410	15,310

注: 1,2 蛋白亚基分子量大于 330,000, 3,4 亚基分子量不在标准曲线范围内,是标准蛋白 Thy 和 Fer-1 的相应估计值。

MW of no. 1 and 2 are higher than 33×10^4 dal, MW of no. 3 and 4 are not on the curve. Their values were estimated according to the molecular weights of thyroglobulin and ferritin.

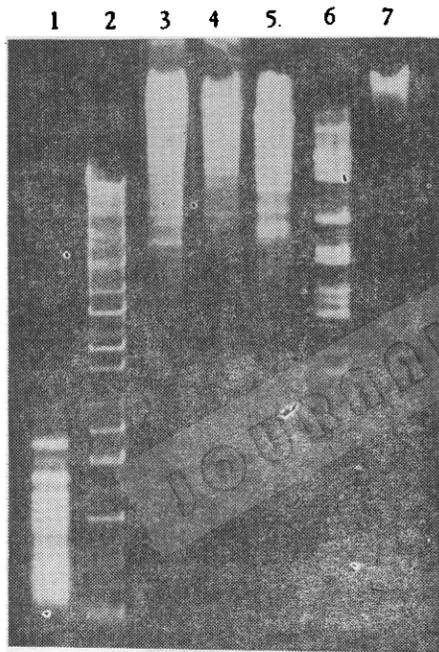


图 8 ϕ SC DNA 的限制酶切图谱

Fig. 8 The fragment patterns of ϕ SC DNA digested with restriction endonucleases

切割用酶 digested with:

- 1. Bsp 211 2. Bgl I 3. Xho I
- 4. Bgl II 5. HindIII 6. EcoRI
- 7. ϕ SC DNA (control)

和 19 条谱带,用 Bgl I 和 Bsp 211 切割,分别产生 22—24 和 10 条谱带,用 Bgl II 和 Xho I 切割,出现谱带也都在 10 条以

上,但不够清晰。

讨 论

ϕ SC 为卷曲链霉菌的噬菌体,头为长宽相当的多角形,尾部细长,与链霉菌中出现的大多数噬菌体形态相似,按 Ackermann^[11]分类标准属 B₁ 型。 ϕ SC 对温度和酸、碱的耐受性不强,对氯仿、乙醇敏感,对丙酮不敏感,对紫外线照射的耐受力较强。

ϕ SC 噬菌体宿主范围很窄,在试验条件下,对所有测试菌株均不感染,这一特点给选育抗噬菌体菌株提供了有利条件。

除上述特征外,我们还对该噬菌体的蛋白和核酸进行了初步研究。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,可对完整的 ϕ SC 颗粒蛋白进行分离,无需加外壳蛋白的提取程序。用于解离蛋白质的 SDS 浓度为 1—2%(W/V),电泳缓冲液中含 SDS0.1%,则可达到良好的分离效果^[12—14]。

卷曲链霉菌噬菌体 ϕ SC 含 DNA,琼脂糖凝胶电泳证明, ϕ SC DNA 可被多种限制酶切割。用 Hind III 和 EcoR I 切割较用这两种酶切割大肠杆菌噬菌体 λ DNA 产生的谱带多。 ϕ SC DNA 分子量比 λ DNA 小,因此抽提制备比较容易,如能找到切口较少的适宜限制酶,则有可能成为优良的参照物。

参 考 文 献

- [1] Adams, M. H.: *Bacteriophages*, Interscience Pub. Inc., New York, pp. 450—451, 1959.
- [2] 余茂効等: 微生物学报, **14**(2): 216—223, 1974.
- [3] 中国科学院微生物研究所噬菌体组: 《噬菌体及其防治》, 科学出版社, 北京, 第 35—36 页, 1974.
- [4] Laemmli, U. K.: *J. Mol. Biol.*, **62**: 465—473, 1971.
- [5] Porro, M. et al.: *Anal. Biochem.*, **127**: 316—321, 1982.
- [6] Pharmacia Fine Chemicals, Calibration kits for molecular weight determination using electrophoresis, pp. 1—22, 1978.
- [7] 崔道珊等: 生物化学与生物物理进展, **2**: 45—

- 47, 1978.
- [8] 叶盛玉等: 生物化学与生物物理进展: **4**, 61—62, 1980.
- [9] 陈关君等: 遗传学报, **11**(2): 141—146, 1984.
- [10] 劳为德等: 生物化学与生物物理学报, **13**(2): 175—181, 1981.
- [11] Ackermann, H. W.: *CRC Handbook of Microbiol.*, 2nd ed., Vol. II, eds. A. I. Laskin and H. A. Lechevalier, pp. 639—642, 1978.
- [12] Lundrigan, M. D. et al.: *J. Virol.*, **45**(2): 700—707, 1983.
- [13] Pepinsky, R. B. and Vogt, V. M.: *J. Virol.*, **45**(2): 648—658, 1983.
- [14] 莽克强等: 《聚丙烯酰胺凝胶电泳》, 科学出版社, 北京, pp. 14—15, 1975.

STUDIES ON A NEW PHAGE OF *STREPTOMYCES CAPREOLUS*

Cui Hanjun Zhang Yichang Wei Yunzai Lin Duanfang
Mo Weiping Dou Yongze

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu)

A new phage, designated as ϕ SC, was isolated from an abnormal fermentation involved in the production of capreomycin in the First Pharmaceutical Factory of Anyang, Henan Province. Electron microscopic observation revealed that the phage has a shape of tadpole. Fifteen subunit bands from the protein moiety were separated by SDS-polyacrylamide

gel electrophoresis. The phage contained DNA having a molecular weight of 10.89×10^6 daltons. The phage has a very narrow host range, remains stable at pH 5—9 and is inactivated at 70°C.

Key words

Capreomycin; Phage ϕ SC.