

小单孢菌 40027 菌株噬菌体的分离及其生物学特性的研究

李晓华¹ 周秀芬^{2*} 邓子新²

(¹ 中南民族大学生命科学学院 国家民委生物技术重点实验室 武汉 430074)

(² 上海交通大学生命科学技术学院 教育部微生物代谢重点实验室 上海 200030)

摘 要: 以福堤霉素 A 产生菌——小单孢菌 40027 菌株为指示菌,从土壤中分离得到三株噬菌体:ΦHAU7、ΦHAU9 和 ΦHAU11。三株噬菌体的寄主专一性较强,在测试的 15 株放线菌菌株中,三株噬菌体能感染小单孢菌 40027 菌株和 A-M-01 菌株,ΦHAU9 和 ΦHAU11 还能感染蔷薇小单孢菌(*Micromonospora purpurea*)。三株噬菌体都是由多面体的头部和尾部组成,形成噬菌斑时培养基中适宜的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度分别为 32mM 和 30mM;ΦHAU7 在储存液中适宜的 pH 范围为 6~12,而其它两株噬菌体的适宜的 pH 范围为 6~10;在储存过程中三株噬菌体适宜的温度范围为 28~37℃,经 60℃保温 30min 后,除 ΦHAU7 仍有 53% 活力之外,其它两株噬菌体全部失活。限制性内切酶酶切结果表明:三株噬菌体基因组 DNA 均为双链 DNA,基因组大小分别约为 60kb、58kb 和 55kb。高压脉冲电泳结果揭示:三株噬菌体基因组 DNA 均具有粘性末端。

关键词: 小单孢菌 40027 菌株 噬菌体 福堤霉素 A

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2007)03-0482-04

小单孢菌属稀有放线菌,可产生庆大霉素、紫苏霉素、福堤霉素 A 等多种抗生素^[1]。近年来,就找到新抗生素的数目而言,它已超过链霉菌而跃居首位。小单孢菌产生的抗生素结构类型多种多样,其中还包括一些具有独特结构的抗生素,如含有不饱和和双键结构的紫苏霉素、含有 1,4-二氨基环多醇假双糖结构的福堤霉素 A^[2]。小单孢菌 40027 菌株产生的抗生素——福堤霉素 A 具有广谱的抗菌活性,对包括耐酸性在内的革兰氏阳性细菌和阴性细菌有较强的抑杀作用;毒性实验表明:肾毒性较低,比丁胺卡那霉素低得多,尤其是耳毒性在氨基糖苷类抗生素中最低^[3]。

放线菌噬菌体的研究已有 50 多年的历史,主要集中于链霉菌噬菌体。直到 1977 年才报道第一株小单孢菌噬菌体^[4],随后仅有几株小单孢菌噬菌体被分离^[5,6,7,8]。此外,小单孢菌有效的基因克隆系统尚未建立。因此,分离小单孢菌 40027 菌株的噬菌体对研究小单孢菌噬菌体和发展适合于小单孢菌的基因克隆载体有着重要意义的。本文以小单孢菌 40027 菌株为指示菌从土壤中分离获得三株噬菌体,并对三株噬菌体的生物学及其基因组特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和噬菌体

本项研究所用到的小单孢菌

和其它放线菌菌株及其来源见表 4;ΦHAU3^[9]为广寄主范围的链霉菌噬菌体。

1.1.2 主要试剂和仪器: T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、Lambda/*Hind* III、1kbLadder 购自 TaKaRa 公司;CHEF-DR III 脉冲场电泳系统购自 Bio-Rad 公司。

1.1.3 溶液和培养基: 溶液的配制参见文献^[11],培养基的配制参见文献^[10]。

1.2 噬菌体的分离

分离噬菌体的土样分别来自几种不同类型的土壤,噬菌体分离、纯化和富集参照文献^[11]进行。

1.3 噬菌体 DNA 的提取

参见文献^[11]所述方法。

1.4 寄主范围的测定方法

采用双层平板法^[11]和点滴法^[11]进行。

1.5 高压脉冲电泳分离噬菌体 DNA

参见文献^[11]所描述的方法进行。

1.6 噬菌体的电子显微镜观察

参见文献^[11]进行操作。

2 结果

2.1 噬菌体的分离纯化

根据小单孢菌的生活习性,从不同地方采集土样,分别浸泡在 Difco 营养肉汤(DNB)中并接入小单孢菌 40027 菌株的孢子,用不同土样浸出液分别感染小单孢菌 40027 菌株。其中有 3 种土样浸出液感染的平板上有噬菌斑,分别挑出几个单斑进行分离

基金项目:国家自然科学基金(30570046);湖北省自然科学基金(2004ABA129);中南民族大学自然科学基金(YZZ04003)

* 通讯作者。Tel: 86-21-62933404; E-mail: xzfzhou@mail.sjtu.edu.cn

作者简介:李晓华(1968-),男,安徽省天长人,副教授,博士,研究方向为分子微生物学。E-mail: li_xiaohuav@yahoo.com.com

收稿日期:2006-11-03;接受日期:2006-12-18;修回日期:2006-12-11

纯化 3 代后 ,提取纯化噬菌体的 DNA ,经 *Pvu* II 和 *Sal* I 酶切 ,与链霉菌噬菌体 Φ HAU3^[9]的酶切带谱进行比较(图 1),并与文献报道的小单孢菌噬菌体^[5-8]的酶切结果进行比较 ,结果表明 ,新分离的几株噬菌体 DNA 酶切带谱与文献报道的小单孢菌噬菌体以及链霉菌噬菌体 Φ HAU3 是不一样的 ,并且新分离的几株噬菌体之间的酶切带谱和基因组大小也有所不同 ,表明它们为 3 株不同的噬菌体 ,分别命名为 Φ HAU7、 Φ HAU9 和 Φ HAU11。

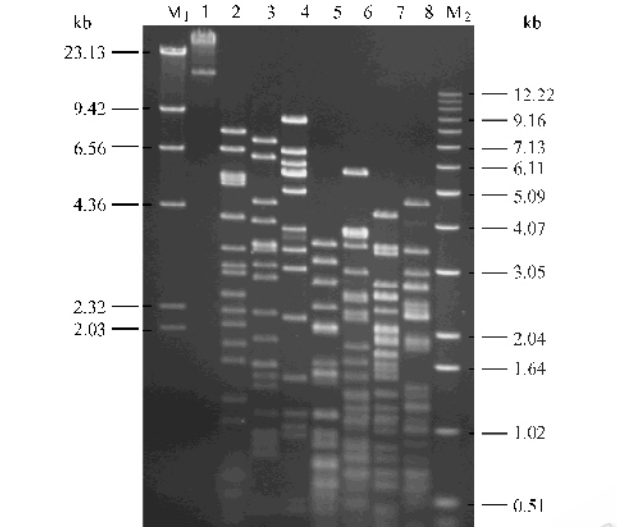


图 1 三株噬菌体限制性内切酶酶切图谱

Fig.1 Enzyme banding of three phage DNAs. Lane 2 , 3 and 4 are the banding patterns of three phages DNA digested with *Pvu* II (Φ HAU7 , Φ HAU9 , Φ HAU11), respectively. Lane 6 , 7 and 8 are the banding patterns of three phages DNA digested with *Sal* I (Φ HAU7 , Φ HAU9 , Φ HAU11), respectively. Lane 1 and 5 are the banding patterns of Φ HAU3^[9] DNA digested with *Pvu* II and *Sal* I , respectively. Phage λ DNA digested with *Hind* III (*M*₁) and 1kb ladder (*M*₂) were used as size standard.

2.2 噬菌体粒子和噬菌斑的形态

电镜照片显示(图 2),三株噬菌体均由多面体的头部和尾部组成。形态相似 ,大小略有差异。与大多数已知的链霉菌噬菌体和大肠杆菌 λ 噬菌体相似 ,由长尾和多面体头部组成。

三株噬菌体感染小单孢菌 40027 菌株所形成的噬菌斑都比较小 ,直径为 1mm 左右 ,园形透明、边缘清晰。

三株噬菌体不仅能感染小单孢菌 40027 菌株的孢子还能感染小单孢菌 40027 菌株的菌丝体 ,感染小单孢菌 40027 菌株的菌丝体所形成的噬菌斑在形态上与感染小单孢菌 40027 菌株的孢子所形成的噬菌斑十分相似 ,但成斑时间差异很大 ,感染小单孢菌 40027 菌株的孢子出斑时间为 72h 左右 ,感染菌丝体出斑时间仅为 20h 左右。

2.3 噬菌体贮存稳定性

在 4℃ 条件下 ,将 3 噬菌体分别悬浮于 Difco 营

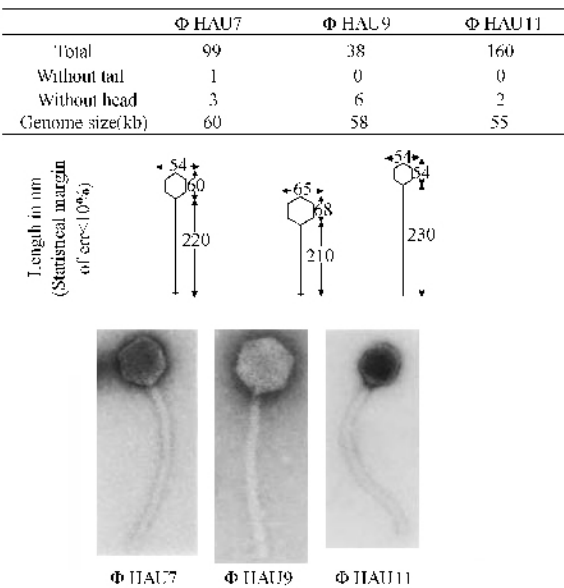


图 2 三株噬菌体粒子电镜照片

Fig.2 Electron micrograph of three phages Φ HAU7 , Φ HAU9 and Φ HAU11.

养肉汤(DNB)中贮存 3 个月后 ,噬菌体 Φ HAU7、 Φ HAU9 和 Φ HAU11 的效价分别下降到初始效价的 29.6%、87.0%和 89.4%。表明在 4℃ 条件下 ,噬菌体 Φ HAU9 和 Φ HAU11 贮存在 DNB 培养基中是非常稳定的 ,而 Φ HAU7 稳定性较差。

2.4 pH 值对噬菌体活力的影响

以小单孢菌 40027 菌株的孢子为指示菌 ,测定 pH 值对噬菌体存活率的影响。将一定效价的噬菌体悬浮于不同 pH 值的 DNB 中处理 2h 后测定其效价 ,以形成的噬菌斑数目为活力指标。结果表明 , Φ HAU7 在 pH 值为 6 ~ 12 时 ,噬菌体效价基本不变 ; pH 值为 4 和 14 时 ,噬菌体效价分别下降到初始效价的 68%和 63% ,pH 值为 2 时 ,观察不到噬菌斑。其它两株噬菌体在 pH 值为 6 ~ 10 时 ,噬菌体效价基本不变 ,pH 值为 4 或 12 时 ,噬菌体效价下降到初始效价的 10% 以下 ,pH 值为 2 或 14 时 ,观察不到噬菌斑。

2.5 噬菌体对温度的耐受能力

测定温度对噬菌体存活的影响 ,将三株噬菌体悬液分别在 28℃、37℃、40℃和 60℃保温 30min 后 ,再感染小单孢菌 40027 菌株的孢子。经 28℃ 或 37℃保温后 ,三株噬菌体效价变化不大 ;经 40℃保温后 ,三株噬菌体效价分别下降到初始效价的 57%、12.5%和 4.3% ;经 60℃保温后 , Φ HAU7 的效价下降到初始效价的 53% ,而其它两株噬菌体则全部失活。表明 Φ HAU7 比 Φ HAU9 和 Φ HAU11 对高温的耐受能力强。

2.6 二价阳离子对噬菌体成斑的影响

二价阳离子(如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+})是多数放线菌成斑所需要的。在 Difco 营养琼脂(DNA)中加入不同

浓度的 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} ,观察不同浓度的 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 对噬菌斑形态和成斑效率的影响。 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 MgSO_4 的浓度分别变动于 $0 \sim 48\text{mmol/L}$ 和 $0 \sim 40\text{mmol/L}$ 之间对噬菌体效价有一些影响(表 1、表 2)。因此,在常规测定时,选用 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度分别为 32mmol/L 和 30mmol/L 。在 Difco 营养琼脂(DNA)中加入不同浓度的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,三株噬菌体形成的噬菌斑都是圆形,边缘清晰。

表 1 [Ca^{2+}] 对噬菌斑形成的影响
(此时 DNA 中 [Mg^{2+}] 为 10mmol/L)

Table 1 Effects of [Ca^{2+}] on plaque formation on <i>Micromonospora</i> sp. 40027			
[Ca^{2+}] (mmol/L)		Titer ($\times 10^5$ PFU/mL)	
		ΦHAU7	ΦHAU9
0		79	6
8		82	10
16		98	14

表 2 [Mg^{2+}] 对噬菌斑形成的影响
(此时 DNA 中 [Ca^{2+}] 为 8mmol/L)

Table 2 Effects of [Mg^{2+}] on plaque formation on <i>Micromonospora</i> sp. 40027			
[Mg^{2+}] (mmol/L)		Titer ($\times 10^5$ PFU /mL)	
		ΦHAU7	ΦHAU9
0		95	5
10		109	8
20		111	20

2.7 噬菌体基因组限制性内切酶酶切分析和基因组大小

用限制性内切酶对三株噬菌体基因组进行酶切分析表明,三株噬菌体基因组均为双链 DNA。用几种不同的限制酶内切酶酶切噬菌体 DNA 时,酶切带谱明显不同(表 3),与文献报道的小单孢菌噬菌体^[5~8] DNA 的酶切图谱相比可以看出:它们明显不同于文献报道的小单孢菌噬菌体。用连接酶连接后的噬菌体 DNA 进行高压脉冲电泳,结果显示它们均形成串联体(图 3),表明三株噬菌体 DNA 均携带粘性末端。根据三株噬菌体 DNA 高压脉冲电泳结果和噬菌体 DNA 被几种限制性内切酶酶切后凝胶电泳结果确定:三株噬菌体基因组大小分别约为 60kb 、 58kb 和 55kb 。

表 3 噬菌体 ΦHAU7 、 ΦHAU9 和 ΦHAU11 DNA
限制性内切酶酶切分析

Table 3 Restriction enzymes analysis of phage ΦHAU7 、 ΦHAU9 and ΦHAU11 DNA			
Restriction enzymes	Number of fragments		
	ΦHAU7	ΦHAU9	ΦHAU11
<i>Eco</i> R I	≥ 5	≥ 10	≥ 3
<i>Cla</i> I	≥ 12	≥ 12	≥ 11
<i>Bam</i> H I	≥ 19	≥ 15	≥ 14
<i>Bgl</i> II	≥ 13	≥ 16	≥ 12
<i>Sal</i> I	≥ 33	≥ 30	≥ 34
<i>Pvu</i> II	≥ 21	≥ 24	≥ 16
Genome size/kb	60	58	55

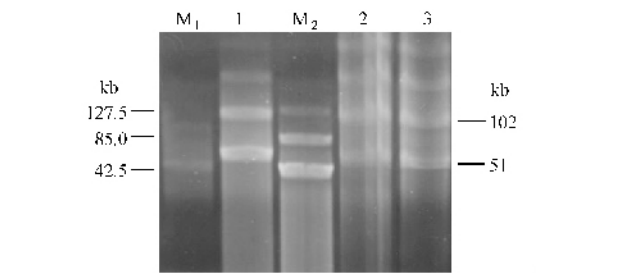


图 3 三株噬菌体 DNA 高压脉冲电泳带谱
Fig.3 Separation of the concatamers of three phage DNAs on PFGE. Phage DNAs was treated with T4 DNA ligase, then separated on PFGE. The ladder of multimers of three phage DNAs(Lane 1 : ΦHAU7 ; Lane 2 : ΦHAU9 ; Lane 3 : ΦHAU11) on PFGE indicated that three phage DNAs contain *cos* ends. Lane M₁ and M₂ are *Streptomyces* phage ΦHAU7 ^[8] DNA (ca. 51kb) and *Micromonospora* phage ΦHAU9 ^[9] DNA (ca. 42.5kb) as size standard , respectively. The run time was 15.5h at 6Vcm^{-1} with a 5-60s switch time at an included angle of 120° .

2.8 噬菌体的寄主范围

分别用五株链霉菌、四株诺卡氏菌、五株小单孢菌和一株地中海拟无枝酸菌作为指示菌测定三株噬菌体的寄主范围。结果如表 4 所示,三株噬菌体都能感染小单孢菌 40027 菌株和 A-M-01 菌株, ΦHAU9 和 ΦHAU11 还能感染蔷薇小单孢菌(*Micromonospora purpurea*)的孢子,表明它们的寄主专一性较强。用菌丝体作为指示菌,三株噬菌体均能感染 40027 的菌丝体,而不能感染 A-M-01 的菌丝体。

表 4 三株噬菌体的寄主范围

Table 4 The host range of three phages				
Strains	Plaque formation			Source
	ΦHAU7	ΦHAU9	ΦHAU11	
<i>Streptomyces citrofluorescens</i>	-	-	-	H. Schrenpf
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	-	-	-	John Innes Centre
<i>Streptomyces coelicolor</i> J1501	-	-	-	John Innes Centre
<i>Streptomyces lividans</i> ZX1	-	-	-	Stored in this lab
<i>Streptomyces vinaceus</i>	-	-	-	H. Schrenpf
<i>Amiclatopsis mediterranei</i>	-	-	-	John Innes Centre
<i>Nocardia erythropolis</i>	-	-	-	H. Schrenpf
<i>Nocardia ruber</i>	-	-	-	H. Schrenpf
<i>Nocardia</i> A016	-	-	-	Stored in this lab
<i>Nocardia</i> A-N-01	-	-	-	Stored in this lab
<i>Micromonospora</i> sp. 40027	+	+	+	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry
<i>Micromonospora chalybeata</i> A015	-	-	-	Stored in this lab
<i>Micromonospora</i> A-M-01	+	+	+	Stored in this lab
<i>Micromonospora purpurea</i>	-	+	+	H. Schrenpf
<i>Micromonospora rosea</i> A2000	-	-	-	John Innes Centre

3 讨论

三株噬菌体都含有 *cos* 位点,暗示它们可能采用类似噬菌体的包装方式组装噬菌体。

在已报道的放线菌噬菌体,有些除了能感染孢子以外,还可以感染寄主的菌丝体。所分离的三株

噬菌体均能感染小单孢菌 40027 的菌丝体,而且形成噬菌斑的周期较感染孢子时大大缩短,感染孢子需要 3~4 天才能形成噬菌斑,而感染菌丝体只需过夜培养后即可看到噬菌斑,这对于难以形成大量孢子的小单孢菌 40027 来说,无疑是提供了极大的方便和可操作性,但并非敏感菌的菌丝体均可被其相应的噬菌体所感染。

噬菌体感染细菌具有高度特异性,一方面,细菌易受环境影响而改变表面受体的结构,噬菌体通过改变自己识别蛋白质的结构,继续识别各自特异的受体细菌,达到区别不同株系的水平,如 ϕ X174 可感染大肠杆菌 C 株,而不感染大肠杆菌其它的株系,另一方面,寄主菌体内的限制—修饰系统是保证噬菌体特异性感染的另一因素。三株噬菌体都能感染小单孢菌 A-M-01 的孢子,而不能感染小单孢菌 A-M-01 的菌丝体。存在两种可能的原因:①菌丝体表面没有噬菌体所识别的受体蛋白,而孢子的表面有噬菌体所识别的受体蛋白;②噬菌体只能从宿主孢子萌发的芽管进入宿主细胞。

致谢 衷心感谢上海医药工业研究院朱宝泉研究员、英国 John Innes 研究中心 D. A. Hopwood 教授和德国 H. Schrempf 教授向我们慷慨提供供试菌株!

参 考 文 献

- [1] Wagman GH, Weinstein MJ. Antibiotic from *Micromonospora*. *Annu Rev Microbiol*, 1980, **34**: 537–557.
- [2] 王 狱,方金瑞. 抗生素. 北京: 科学出版社, 1988.
- [3] Nara T, Yamamoto M, Kawamoto I, et al. Fortimycin A and B, new aminoglycoside antibiotics. I Producing organisms, Fermentation and biological properties of Fortimicins. *J Antibiotics*, 1977, **30**: 533–540.
- [4] Kikuchi M, Perlman D. Bacteriophages infecting *Micromonospora purpurea*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1977, **30**: 423–424.
- [5] Kikuchi M, Perlman D. Characteristics of bacteriophages for *Micromonospora purpurea*. *Appl Environ Microbiol*, 1978, **36**: 52–55.
- [6] Tilley BC, Meyerton JL, Lechevalier MP. Characterization of a temperate actinophage, MP-WR-1, capable of infecting *Micromonospora purpurea* ATCC 15835. *J Ind Microbiol*, 1990, **5**: 167–182.
- [7] Caso JL, Hardisson C, Suarez JE. Structure of the DNA of five bacteriophages infecting *Micromonospora*. *Microbiologia (Madrid)*, 1990, **6**: 94–99.
- [8] Li XH, Zhou XF, Deng ZX. Isolation and characterization of *Micromonospora* phage Φ HAU8 and development into a phasmid. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(7): 3893–3897.
- [9] Zhou XF, Deng ZX, Hopwood DA, et al. Characterization of Φ HAU3, a broad-host-range temperate *Streptomyces* phage, and development of phasmids. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 2096–2099.
- [10] Li XH, Zhou XF, Deng ZX. Vector systems allowing efficient autonomous or integrative gene cloning in *Micromonospora* sp. strain 40027. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(6): 3144–3151.
- [11] Kieser T, Bibb MJ, Chater KF, et al. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich (United Kingdom): John Innes Foundation, 2000, 271–288.

Studies on the isolation and biological characterization of actinophages infecting *Micromonospora* sp. 40027

LI Xiao-hua¹, ZHOU Xiu-fen^{2*}, DENG Zi-xin²

(¹ Key Lab for Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

(² Laboratory of Microbial Metabolism and School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: Three actinophages, Φ HAU7, Φ HAU9 and Φ HAU11, were isolated from soil using *Micromonospora* sp. 40027 as a indicator strain. Three phages showed very narrow host-ranges. Three phages could infect both *Micromonospora* sp. 40027 and *Micromonospora* A-M-01, Φ HAU9 and Φ HAU11 could also form plaques on *Micromonospora purpurea*. All of the three phage particles have the hexagonal heads and tails; the plaque formation of three phages on *Micromonospora* sp. 40027 were best on DNA medium with addition of 32mM Ca^{2+} and 30mM Mg^{2+} ; Φ HAU7 was stable at pH 6~12, and other phages were stable at pH 6~10; the suitable incubation temperature for the propagation of three phages was between 28°C~37°C; 53% of Φ HAU7 remained viable and none of other phages was alive when they were incubated at 60°C for 30min. Restriction digestion analysis of genomes of three phages indicated that they were all double-stranded DNA with cohesive ends, their genome size are ca. 60 kb, 58 kb and 55kb, respectively.

Keywords: *Micromonospora* sp. 40027; Actinophages; Fortimycin A

Foundation item: Chinese Natural Science Foundation (30570046); Natural Science Foundation of Hubei Province (2004ABA129); Natural Science Foundation of South-Central University for Nationalities (YZZ04003)

* Corresponding author. Tel 86-21-62933404; E-mail: xzfzhou@mail.sjtu.edu.cn

Received: 3 November 2006 / Accepted: 18 December 2006 / Revised: 11 December 2006