

灰色鏈絲菌噬菌體的提純

徐尚志 劉 垚 單紹霖 童 村

(化學工業部上海醫藥工業研究所)

自從鏈霉素的發酵遭到放綫噬菌體的侵蝕以後,除了積極選育抗噬菌體的菌株以保證生產能繼續進行^[1]外,又展開了一系列對放綫噬菌體本身的研究。本文即報導放綫噬菌體 530-P 的精製及其性能方面的工作。

早在 1933 年 Schlesinger 氏^[2]首先用超濾和離心機處理,得到了乾燥的含氮量為 13.2% 的大腸桿菌噬菌體製品,但此種方法為容量所限。到 1938 年 Northrop 氏^[3]將硫酸銨鹽析法應用到細菌噬菌體的提純時,噬菌體的精製就不受容量的限制。他並使用了胰蛋白酶消化,除去了一部分不活性蛋白質,使噬菌體純度有了提高。以後流水透析法被介紹來作為噬菌體溶液中除去無機鹽類的一種方法。日人相磯等氏^[4]綜合了前人的細菌噬菌體的提純方法,並將此方法應用於放綫噬菌體,並且獲得了噬菌體精製品 214 mg (10^{-11});但他們的工作缺少完整的數據,對提純的條件也未系統的研究。我們選用了放綫噬菌體 530-P,找出培養條件,建立提純方法,並對提純的噬菌體性能作了研究。

材 料 和 方 法

所用放綫噬菌體是從鏈霉菌菌株 530 在發酵培養液中分離出來的^[1]。寄主鏈霉菌對其噬菌體非常敏感,在培養皿中不易產生再生性菌落;即使在液體培養情況下,鏈霉菌的菌絲體經溶解後,在一星期內亦不能發生再生性的菌絲體。

放綫噬菌體 530-P 的培養: 先將鏈霉菌菌株 530 培養在下列組成的培養基中:

蛋白胨	10 克	葡萄糖	30 克
磷酸二氫鉀	25 克	食鹽	5 克
硫酸鎂	0.25 克	硫酸銨	0.2 克
碳酸鈣	3 克	自來水	1,000 毫升
pH	6.8—7.0		

培養基分裝在 500 毫升三角瓶中,每瓶裝 50—80 毫升,在 15 磅 121°C 蒸汽滅菌 30 分鐘。接種 1 毫升芽胞懸浮液或 1 毫升沉沒培養的年青菌絲培養物,在往復式搖瓶機上搖動,振幅 6 厘米,每分鐘 95 次,28°C 培養 24 小時。此時菌絲大量生長,培養物黏而且稠,在這時接種放綫噬菌體 1 毫升,內約含噬菌體 10^5 — 10^{10} 個。繼續搖動培養至 72 小時,即在放綫噬菌體加入後的 48 小時,取出加入無菌石棉攪拌後過濾,以除去大量剩餘菌絲體及蛋白質,再經 Seitz 過濾器過濾。將濾液放入冰箱保存備用,一般培養出來的噬菌體濃度為 10^{10} — 10^{11} 個/毫升。

1957 年 9 月 23 日收到。

放綫噬菌體 530-P 濃度的測定：採用蝕孔計數法^[5]，培養基組成如下：

葡萄糖	10 克	蛋白朊	5 克
牛肉膏	5 克	食鹽	5 克
瓊脂	15 克	水	1 餅
pH 6.8—7.0			

配製後分裝在三角瓶中，在 15 磅 121°C 蒸汽滅菌 30 分鐘，冷卻到 50—70°C，倒入乾燥而無菌的培養皿中，每一培養皿約放 10 毫升，攤平。放綫噬菌體懸液用 0.1% 氯化鈣溶液稀釋至每毫升 50—500 個，每一培養皿中加入 1 毫升和培養 24 小時的鏈霉菌菌株 530 搖瓶培養物 0.5 毫升，然後加入 4 毫升 50—60°C 培養基作為上層，立即搖動培養皿，務使噬菌體和菌絲體混合均勻，放入 28°C 培養，到 24—36 小時後即可記錄形成的蝕孔數。若培養時間過短，則蝕孔不很清楚，若過長，則蝕孔太大而互相重疊。蝕孔記錄後，按稀釋倍數計算出放綫噬菌體原液濃度。

結 果

一、放綫噬菌體的穩定性

1. 放綫噬菌體 530-P 的保存：放綫噬菌體培養液放在冰箱中，可以保持半年以上，不會失效。如果採用 0.1 M 磷酸鹽 pH 7.0 緩衝液或 0.1% 氯化鈣溶液或 1% 蛋白朊溶液稀釋到一定濃度後，放入冰箱保存，8 天內濃度亦無顯著變化。

2. 溫度對放綫噬菌體 530-P 穩定性的影響：將放綫噬菌體 530-P 培養液用 0.1% 氯化鈣溶液稀釋到每毫升 10^6 個左右，再放入不同溫度的恆溫水浴鍋中，保持不同時間，取出後立即冷卻，測定濃度，結果如圖 1。

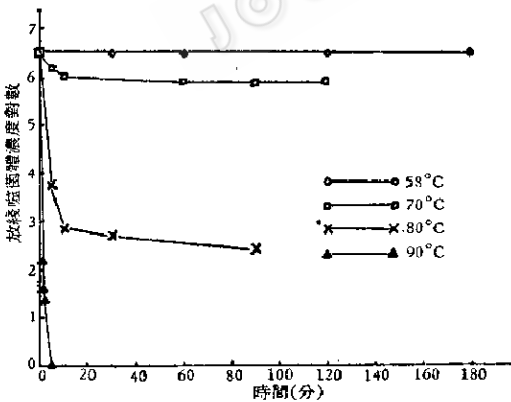


圖 1 不同溫度對放綫噬菌體活力的影響

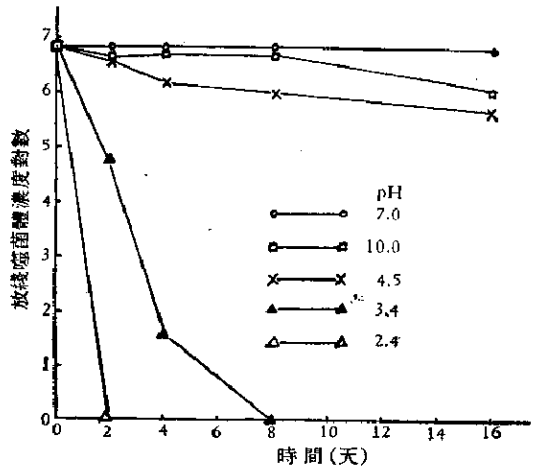


圖 2 不同 pH 對放綫噬菌體活力的影響

從圖 1 可以看出，放綫噬菌體 530-P 在 58°C 放置 3 小時，濃度不變，70—80°C 保持 1 小時，濃度即顯著降低，而在 90°C 時，5 分鐘即完全失去活力。

3. pH 對放綫噬菌體 530-P 穩定性的影響：將噬菌體用 0.1 M 磷酸鹽不同 pH 的緩衝液稀釋到每毫升 10^6 個左右，再放入冰箱保存，至不同時間後，測定放綫噬菌體濃度，結果如圖 2。

從圖 2 可以看出，放綫噬菌體 530-P 在 0.1 M 磷酸鹽緩衝液中，在 pH 7.0 時，保持 16 天，其濃度無顯著變化。在 pH 4.5 時和 pH 10.0 時一樣，其濃度降低，而在 pH 3.4 時，8 天內完全失去活力，pH 2.4 時，只要 2 天，即完全失去活力。

根據放綫噬菌體 530-P 在不同溫度及 pH 的特點，確定了下列的提純步驟。

二、放綫噬菌體的提純

1. 培養液過濾：由於培養液中含有大量的蛋白質、碳酸鈣及剩餘菌絲體，用普通離心機及直接過濾的方法，均很難除去。因此採用 4% 石棉板漿作助濾劑，速度既快，濾液又清，而又無吸附噬菌體的作用。

2. 鹽析和濃縮濾液：用硫酸銨鹽析是通常採用的方法之一，可以使噬菌體從培養液中沉澱析出。我們用不同量的硫酸銨作試驗，當硫酸銨加入溶解後，即有噬菌體析出，放置 2 小時，用 1,000 r. p. m. 離心處理，倒去上層清液，沉澱用同體積的 pH 7.0 的 0.1 M 磷酸鹽緩衝液溶解洗脫，結果如下表 1。

表 1 濾液用硫酸銨鹽析

培養液中放綫噬菌體濃度 (個/毫升)	9.9×10^{10}					
硫酸銨用量 (%)	5	10	20	25	30	35
沉澱洗脫液中噬菌體濃度 (個/毫升)	0	0	8.0×10^{10}	7.8×10^{10}	9.1×10^{10}	9.8×10^{10}
收得率 (%)	0	0	81	80	92	99

從表 1 可以看出，須用 20% 以上的硫酸銨方能析出，並在 35% 以上時，方才可析出 99% 的放綫噬菌體，但仍帶有大量的雜質未能除去。

大量體積的培養液加硫酸銨鹽析沉澱，再用小量體積的緩衝液溶解洗脫，如此可以將培養液中的噬菌體濃縮到一定要求，如表 2。

表 2 噬菌體的濃縮

	體積 (毫升)	濃度 (個/毫升)	備註
濾液	4570	5.23×10^{10}	加 35% 硫酸銨
廢液	4950	2.6×10^9	
沉澱洗脫液	200	1.35×10^{13}	收得率 95%

從表 2 可以看出，培養液已濃縮了 22 倍，唯雜質尚很多。

3. 除去色素及不活性蛋白質：濃縮的放綫噬菌體懸液，用 20% (重量/體積) 純硫酸銨鹽析沉澱，用緩衝液洗脫，再鹽析，再洗脫，如此反覆操作 5 次，溶液可以從原來的紅棕色變為乳白色。

此溶液加 1.0 N 氫氧化鈉調節 pH 至 8.5 後，再加入 0.005% 胰蛋白酶，在室溫 28°C

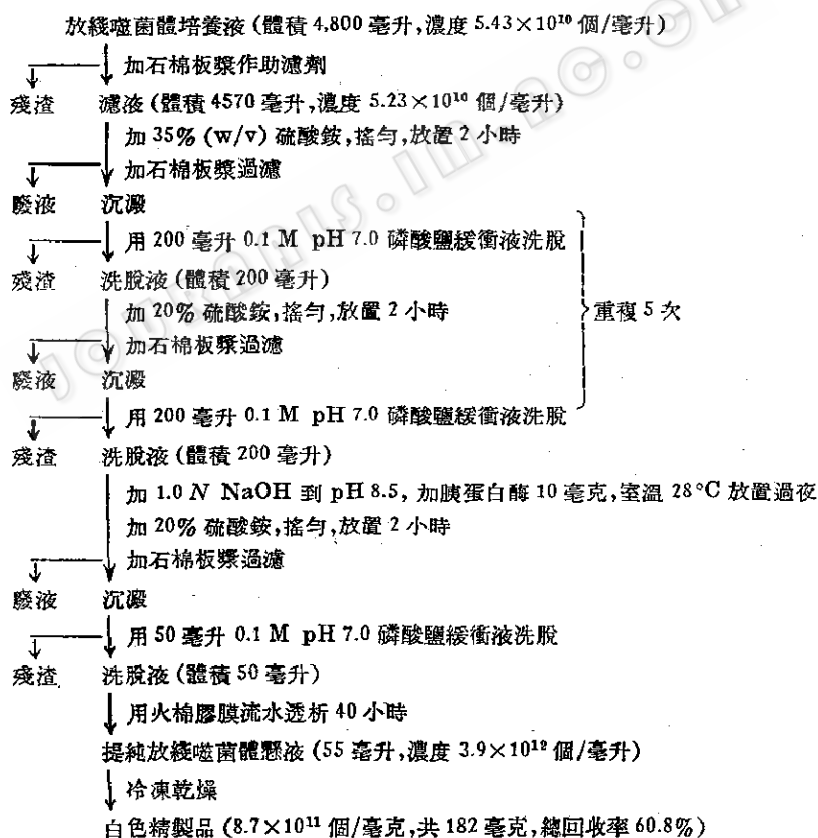
保持過夜,加硫酸銨鹽析過濾,以緩衝液洗脫。這樣處理以後,一部分不活性蛋白質能為胰蛋白酶所分解,在下一輪鹽析及洗脫時,不再和放綫噬菌體相混雜。

4. 除去無機鹽類: 此提純的噬菌體溶液中,尚含有大量的磷酸鹽及硫酸鹽,用自製的火棉膠膜,或標準透析用的玻璃紙,經流水透析 18—48 小時後,無機鹽幾乎全部除去,這可以用硝酸銀或氯化銨溶液檢驗之。在這一步操作過程中,放綫噬菌體仍全部保存在膜中,並不消失。

5. 冷凍乾燥及保存: 已經透析過的放綫噬菌體懸液,經冷凍乾燥(在 -5 到 -20°C 凍結以後,用高真空泵抽乾),除去水分後,就成為無定形白色棉絮狀的製品,真空封固保存。

以上各步的總收得率為 60.8%, 此精製的放綫噬菌體,在真空乾燥的條件下,保存不到一年,即全部失效,比之用培養液直接冷凍,真空乾燥的^[1]相差甚大,這一特點與 Northrop 氏^[3]及 Kalmanson 氏^[7]的記載相同。

表 3 放綫噬菌體 530-P 提純過程系統



三、精製放綫噬菌體的分析 此無定形的精製品中,每毫克含有放綫噬菌體 8.7×10^{11} 個,即每個噬菌體重 1.15×10^{-12} 毫克,無定形的精製品中,每毫克含總氮 0.19 毫克,即每個噬菌體含氮為 2.18×10^{-13} 毫克,故精製品中放綫噬菌體的含氮量為 19.0%。

討 論

爲了放綫噬菌體的提純，在培養工作中，我們曾選用 6 種不同組成的培養基。其中除現用的培養基外，還有黃豆餅粉培養基^[1]，瓦克斯曼^[5]、察氏 (Czapek's)、卡氏 (Carvajal's)^[6] 和玉米漿等培養基^[8]。這五種培養基都因鏈霉菌生長不夠旺盛，因此放綫噬菌體濃度不高。現在所用培養基，培養放綫噬菌體濃度較高，一般可以達到每毫升爲 10^{10} — 10^{11} 個。在培養方法中，我們也曾試驗過噬菌體接種時間的關係，結果說明鏈霉菌培養 24 小時後，是菌絲生長最旺時間，這時接種放綫噬菌體，可以得到較高濃度。

一般說來，細菌在 58°C 就能引起死亡，可是放綫噬菌體 530-P 在 58°C 保持 3 小時，濃度不變。可知放綫噬菌體對熱的耐性，較一般細菌爲高，因此決定了在室溫條件進行提純工作。

從圖 2 可以看出，放綫噬菌體 530-P 在中性時最爲穩定，在 pH 4.5 以下或 pH 10.0 以上，保持到 16 天，濃度方有降低。可見穩定的 pH 範圍是很大的，這一特性使噬菌體不致在 pH 較低的硫酸銨鹽析過程中和在 pH 較高的胰蛋白酶消化過程中，減少其活力。

在放綫噬菌體 530-P 的提純工作中，我們首先對培養液的過濾作了一些試驗，用石棉板漿、葦漿及硅藻土作助濾劑，用量均爲 4%。結果用葦漿助濾，過濾速度雖快，但是濾得不清，用硅藻土助濾，雖清但很慢，只有用石棉板漿助濾，既快又清，而且對放綫噬菌體濃度並無顯著影響。

培養液經過濾後，再用硫酸銨鹽析，胰蛋白酶消化，火棉膠膜透析，冷凍乾燥，得到的白色棉絮狀無定形放綫噬菌體精製品，其總收得率爲 60.8%，每一步驟的數據，比日人相磯等氏^[4]完備，且整個的過程也較簡單。

精製的放綫噬菌體製品經過分析，每毫克含放綫噬菌體 8.7×10^{11} 個，即每個噬菌體重 1.15×10^{-12} 毫克。精製品每毫克含總氮 0.19 毫克，即每個噬菌體含氮 2.18×10^{-13} 毫克。所以噬菌體含氮量爲 19.0%，這說明此放綫噬菌體是由核蛋白質所組成，與 Northrop 氏^[3]的結果相同。

摘 要

在灰色鏈絲菌噬菌體 530-P 的研究中，進行了精製及有關方面的研究。除確定了放綫噬菌體的培養最適宜的培養基和接種期外，又確定了它對溫度的抵抗力，得知較一般微生物爲強，在 58°C 保持 3 小時，其濃度不變。因此確定提純工作可以在室溫中進行，噬菌體適宜的 pH 範圍較廣（在 pH 4.5—10.0），以 pH 7.0 爲最適宜，這給提純工作創造了有利條件。

放綫噬菌體 530-P 培養液經過過濾、硫酸銨鹽析、胰蛋白酶消化，再用流水透析法去鹽，最後以冷凍乾燥法得到白色棉絮狀無定形物。總收得率爲 60.8%。

精製品經過分析，得到每個放綫噬菌體體重爲 1.15×10^{-12} 毫克，含氮量爲 2.8×10^{-13} 毫克，即噬菌體含氮量爲 19.0%，這說明噬菌體是由核蛋白質構成的。

參 考 文 獻

- [1] 許文思、章村等: 微生物學報, **5**(2): 154—159, 1957.
[2] Schesinger, M.: *Z. Hyg. u. Infektionsk.*, **114**: 149, 1933.
[3] Northrop, J. H., *J. Gen. Physiol.*, **21**: 335—366, 1938.
[4] 相磯等: *J. Antibiotics*, **111-B**: 22—24, 1952.
[5] Waksman, S, et al., *J. Bact.*, **54**: 451—466, 1947.
[6] Cavajal, F.: *Mycologia*, **45**(2): 209, 1953.
[7] Kalmanson, G. et al., *J. Gen. Physiol.*, **23**: 203—228, 1939.
[8] Раутенштейн, Я. И.: *Микробиология*, **23**(2): 140—146, 1954.

THE PURIFICATION OF ACTINOPHAGE OF *ST. GRISEUS*

Hsu Shang-chih, Liu Yao, Shan Shao-lin & Tung Tsun

(Pharmaceutical Institute, Shanghai)

In the process of purification of *St. griseus* 530-p phage, the following observations were made.

The resistance of the phage to heat is stronger than that of ordinary bacteria, as the activity of phage was unchanged at 58°C after 3 hours. Taking advantage of such property purification of this phage was carried out at room temperature. It is active between pH 4.5—10.0, while the optimal pH is 7.0. This also facilitated the purification of phage. The phage particles were weighed and calculated to be about 1.18×10^{-11} mg. The nitrogen content was 2.8×10^{-13} mg per phage. It is calculated that the nitrogen content of the phage was 19.0%, which corresponds to the nitrogen content of the nucleoprotein.

The process of purification of phage consisted of salting-out of phage from broth lysate, tryptic digestion, dialysis and finally drying by lyophilization. A white amorphous powdery substance was obtained and the overall recovery being about 60%.