

毒力不同鼠伤寒桿菌噬菌体的某些生物学性質对比的研究*

李 煥 婁

(苏联医学科学院伽馬利流行病微生物研究所)

近几年来,对噬菌体性質的研究有了巨大的发展,特別有兴趣的是对毒力弱的噬菌体的研究。敏感細菌的一部分細胞,在毒力弱的噬菌体的作用下,不被裂解而形成所謂賦裂解性(lysogenic)細胞。一般認為在这种情况下,噬菌体以所謂“前噬菌体”(prophage)的形式存在于細菌細胞內,并随着細胞的分裂而传給其下一代,也不影响細菌細胞的繁殖。由于某些因素的影响(如 X-射綫,紫外光的照射或某些化学物質的作用),使“前噬菌体”与細胞之間的平衡破坏时,則“前噬菌体”轉变成活动性噬菌体而細菌細胞也因之裂解。

实验証明,有些細菌的某些生物学特性,可以通过毒力弱的噬菌体的作用传給另一菌株^[1],此种現象被称为“传递”(transduction),在現代微生物变异問題中,已引起了人們很大的注意。为了闡明此种現象的本質与机轉必須了解毒力不同噬菌体的生物学性質。本文中实验的目的即在于对此等生物性質进行比較的研究。

实验材料及方法

噬菌体 本实验共采用了4株噬菌体:噬菌体 T_N 系梯比利斯血清疫苗研究所所保存之菌株;噬菌体 K_I 及 K_{II} 系由本实验室 A. A. Барбицкая 氏在1955年自家兔粪便中分出。此三株皆可在敏感的細菌上形成較大的透明斑,效价为 10^{-4} ,不能引起賦裂解性細菌。其相互間的區別在于对各种細菌作用的范围不同。噬菌体 M 分自小白鼠的粪便,其所形成的透明斑較小而混浊,效价为 10^{-6} ,可以形成賦裂解性菌株^[2]。根据文献記載^[3],毒力弱的噬菌体与毒力強的之区别是在于前者能引起賦裂解性細菌。根据此特点,我們將噬菌体 T_N , K_I 及 K_{II} 划为毒力強的噬菌体,而噬菌体 M 則属于毒力弱的。

細菌 鼠伤寒桿菌 Br-2110 及 Br-70 皆为本实验室所保存的菌种。

Br-2110 为典型菌株,不发酵乳糖及蔗糖,发酵葡萄糖,麦芽糖及甘露醇产酸,产气,对上述四株噬菌体皆敏感。

Br-70 为非典型菌株,不分解乳糖及蔗糖,分解葡萄糖,麦芽糖及甘露醇产酸不产气;对噬菌体 T_N , K_I 及 K_{II} 皆敏感,但 M 不能引起其細胞的裂解。

本文所采用的实验方法,主要是根据1950年 Adams 所描述者^[4];某些地方略有修改。

抗噬菌体血清的制备 每株噬菌体采用家兔3只,皮下注射噬菌体滤液5毫升,每週

* 1958年4月22日收到。

本文系副博士論文的一部分,学术领导苏联生物学博士 Д. Г. Кудлай。

兩次。第六次注射後一週，取血，用中和實驗的方法測定每只家兔血清的抗噬菌體活性。如其活性不高則繼續注射，方法與劑量同上，到達到一定的效價後，以無菌手術自心臟取血。分離血清，不加任何防腐劑。

中和反應實驗 將免疫血清用肉湯作不同濃度的稀釋(1/1, 1/10, 1/50, 1/100)。後取 0.9 毫升，加 0.1 毫升的噬菌體(用肉湯稀釋，每毫升含噬菌體顆粒約 10^5 個)，搖勻，置 37°C 水溫箱中。另以 0.9 毫升肉湯及 0.9 毫升正常家兔血清做為對照，經過不同的時間取 0.1 毫升的標本加于 9.9 毫升的肉湯中以終止血清的作用。之後用雙層瓊膠法測定活性噬菌體顆粒之數。

中和速度常數按下述公式求出：

$$-dP/dt = KP/d$$

$$K = 2.3 d/t \times \log P_0/P$$

K ：中和速度常數；

d ：抗噬菌體血清的最終稀釋度；

t ：噬菌體與血清接觸的時間(分鐘)；

P_0 ：與血清接觸前活性噬菌體顆粒數；

P ：與血清接觸 t 分鐘後活性噬菌體顆粒數。

雙層瓊膠法 1 毫升被稀釋的噬菌體及 0.1 毫升 18 小時肉湯培養物，加于 2.5 毫升熔化而後冷卻到 45°C 0.7% 的瓊膠中，混合搖勻，傾倒于 1.5% 的瓊膠平板上。待表層冷卻後置 37°C 溫箱中孵育 18 小時後觀察結果。

吸著實驗 取 18 小時細菌培養物，用肉湯稀釋至每毫升中含細胞 5×10^8 個(在本實驗中活細胞數占 20%)。取其混合物 4 毫升加入噬菌體 1 毫升(肉湯稀釋每毫升中含噬菌體顆粒 10^5 個)。另以 4 毫升肉湯代替細菌培養物為對照。于 37°C 水浴箱中孵育不同的時間後，取標本 0.1 毫升加于 9.9 毫升冷卻于冰水中的肉湯中以終止其吸收作用。離心沉澱 3,000 轉/分 5 分鐘。取上清液加熱 58°C 30 分鐘殺死殘余的細胞。之後，用雙層瓊膠法測定未被吸收的噬菌體顆粒數。

本實驗是在正常的及加熱 58°C 30 分鐘殺死的兩種細菌上進行的。

吸收速度常數按下述公式求出：

$$-dP/dt = K(B)P$$

$$K = 2.3/(B)t \times \log P_0/P$$

K ：吸著速度常數(ml/min)；

P_0 ：在零分時未吸著噬菌體顆粒的%；

P ：在 t 分時未吸著噬菌體顆粒的%；

(B) ：具有生活力的細菌細胞濃度(每毫升中)。

單循環繁殖實驗 0.1 毫升噬菌體(濃度為 10^8 /ml.) 加于 0.9 毫升 18 小時細菌培養物中(濃度為 10^8 /ml.)。置 37°C 水溫箱內，使尽可能多的噬菌體顆粒吸著于細胞上(對 T_H , K_I , K_{II} 為 8 分鐘，對 M 為 30 分鐘)。以後，加入特異抗噬菌體血清以中和其未吸著的噬菌體顆粒。5 分鐘以後，用肉湯稀釋使每一毫升中不多于 1,000 個被感染的細胞為第一管。自第一管取標本若干，再稀釋 100 倍為第二管(每毫升中含被感染的細胞不超過 10 個)。每隔兩分鐘分別自第一、第二管中取標本 0.1 毫升用雙層瓊膠法測定其噬菌體顆粒之數。為了便於了解，茲引實驗之一為例如下：

表 1 单循环繁殖实验(噬菌体 K_{II})

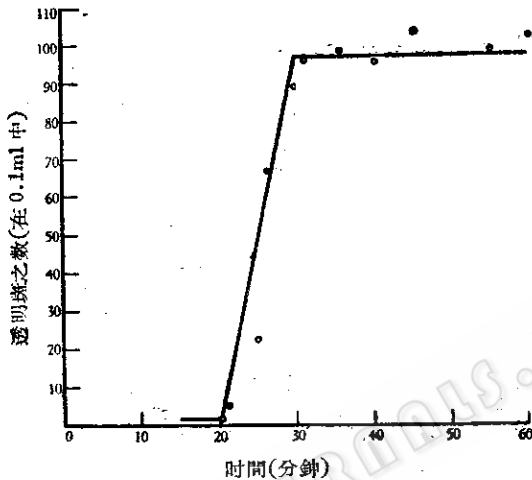
时间(分)	试管号数 (No)	试管名称	试验程序	每 ml 中可能被 感染的细胞数
0	1	吸 收 管	0.1ml 噬菌体+0.9ml 细菌	7×10^6
8	2	中 和 管	0.1ml No1+0.9ml 血清	7×10^5
13	3	稀 释 管	0.1ml No2+9.9ml 肉汤	7×10^3
13.5	4	第 一 管	1.0ml No3+6ml 肉汤	10^6
14	5	第 二 管	0.1ml No4+9.9ml 肉汤	10

注: 1. 噬菌体 K_{II} 8 分钟约有 70% 可以吸着于细胞上, 0.1 毫升噬菌体中含噬菌体颗粒 10^7 , 故吸着管中可能被感染的细胞为 7×10^6 个/ml。

2. 本实验所得的结果如表 2 所示:

表 2 单循环繁殖实验结果

时间(分)	透明斑之数 (0.1ml 中)	
	第一管	第二管
15	76	1
17	73	1 潜伏期
19	95	0
21	91	2
23	152	4
25	600±	21
27	很多	64
29	很多	88
31		95
33		102
35		122
37		98 细胞裂解
39		99
41		95
45		107
50		—
55		94
60		108

图 1 噬菌体 K_{II} 单循环繁殖曲线

爆裂度(burst size)(每个被感染的细胞放出噬菌体颗粒的平均数)用下列公式求得。

$$\begin{aligned}
 \text{爆裂度} &= \frac{\text{细胞裂解时透明斑的平均数} \times 10^2}{\text{潜伏期内透明斑的平均数}} \\
 &= \frac{100 \times 10^2}{84} \\
 &= 119
 \end{aligned}$$

本实验结果可以曲线表示如图 1。

噬菌体抗热性的测定 据 Adams 氏 1952 年报告^[3] 培养基对噬菌体的抗热性有很大的影响,故在本实验中对所有噬菌体抗热性的测定都是在同样的条件下(蛋白胨肉汤 pH. 7.2—7.4)进行的。取一定量肉汤稀释的噬菌体置试管中,在水温箱中加热 75℃,经过不同的时间取等量的标本用双层琼胶法测定其活动性噬菌体颗粒数。

噬菌体对紫外线抵抗力的测定 据文献记载,测定噬菌体对紫外线的抵抗力时,必须在没有核酸及其他可以吸着紫外线的物质而具有一定化学成份的液体中进行^[4],同时温度对实验结果也有很大的影响^[6]。为此,本实验进行如下:用磷酸缓冲液(pH 7.0)将噬菌体稀释到一定浓度,取 5 毫升置培养皿(直径 9.5 cm)中,在室温中(20—23℃)进行照射。

所用之紫外綫燈為蘇聯出品 УИ-1 型，其所產生的光綫波長基本上是 2537Å。由標本表面到燈的中心為 10 厘米。經不同時間的照射取一定量的標本用雙層瓊膠法測定活動性噬菌體裸粒之數。據 Delbecco^[7] 報告，被紫外綫照射而失去其活動性的噬菌體裸粒吸着於細菌細胞上幾秒鐘後，如被可見光綫照射可以恢復其活動性，此即所謂光復活作用 (photoreactivation)。為了避免此種現象的發生，活動性噬菌體裸粒的測定及孵育皆儘可能在黑暗中進行。

實驗結果

1. 在對家兔進行免疫時發現：同一株噬菌體以同樣的劑量與方法注射給幾只家兔，每個動物血清中抗噬菌體活動性的高低有很大的差別，此與 Adams^[4] 及 Новикова^[8] 二氏所得的結果相一致。免疫血清中抗噬菌體活動性的增長不僅決定於噬菌體的抗原性，同時也因個別動物的機體反應性的不同而異。

交叉中和反應實驗所得的結果如表 3 所示。

表 3 交叉中和實驗

噬菌體	中和速度常數					
	抗噬菌體血清				對照	
	T _{II}	K _I	K _{II}	M	肉湯	正常血清
T _{II}	36.8	11.5	23.0	0	0	0
K _I	36.8	92.0	27.6	0	0	0
K _{II}	31.7	30.0	37.5	0	0	0
M	0	0	0	4.5	0	0

噬菌體 T_{II}、K_I、K_{II} 具有陽性交叉中和反應，但當同種血清中和實驗時其中和速度常數較異種血清中和實驗時為大。噬菌體 M 與其他三株之間沒有血清學上的聯繫，因此我們認為 T_{II}、K_I 及 K_{II} 屬於同一血清學組，而噬菌體 M 則屬於另一組。

2. 噬菌體在細菌細胞上的吸着實驗：各種噬菌體的吸着曲線如圖 2 所示，吸着速度常數列於表 4 中。

由表 4 可以看出，噬菌體 T_{II}、K_I 及 K_{II} 的吸着速度常數幾乎完全一樣，而 M 則吸着較慢而不完全；T_{II} 可以吸着於加熱 58℃ 30 分鐘殺死的細菌細胞上，但其吸着速度常數 (K) 明顯降低。其餘三株噬菌體在加熱殺死的細胞上皆不吸着。

3. 噬菌體潛伏期及爆裂度的測定：用單循環繁殖實驗法所獲得的結果如表 5 所示。噬菌體 T_{II}、K_I 及 K_{II} 的潛伏期為 21—23 分鐘，而噬菌體 M 則為 49 分鐘，用此法所測得

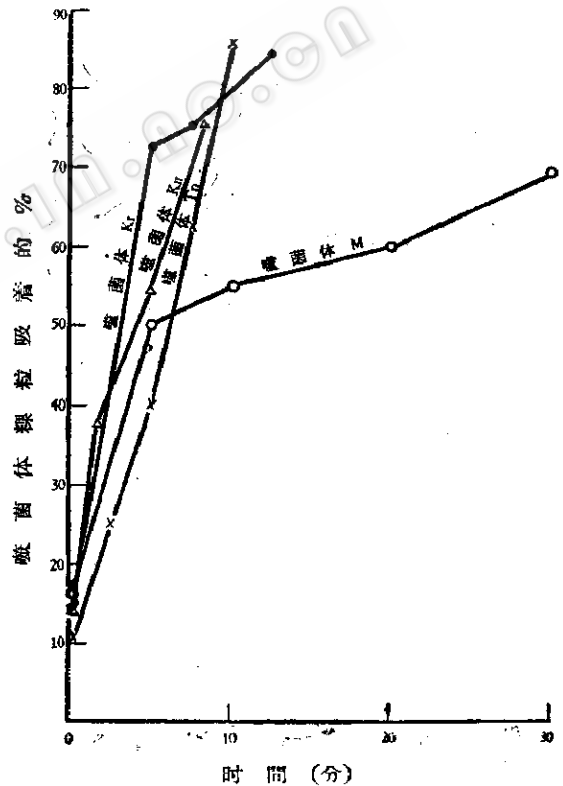


圖 2 各種噬菌體在細菌細胞上的吸着曲線

表 4 各种噬菌体在活细胞及加热杀死的细胞上吸着反应

噬菌体	细 菌	细胞浓度	接触时间(分)	吸着的%	吸着速度常数 K(ml/min)
T _H	Br-70(活)	10 ⁸	12	84.7	1.6×10 ⁻⁸
K _I	Br-70(活)	10 ⁸	12	85.5	1.7×10 ⁻⁸
K _{II}	Br-2110(活)	10 ⁸	8	71.9	1.6×10 ⁻⁸
M	Br-2110(活)	10 ⁸	30	68.4	0.4×10 ⁻⁸
T _H	Br-70(死)	10 ⁸	25	56.0	0.3×10 ⁻⁸
K _I	Br-70(死)	10 ⁸	60	0	—
K _{II}	Br-2110(死)	10 ⁸	60	0	—
M	Br-2110(死)	10 ⁸	90	0	—

表 5 噬菌体繁殖的潜伏期及爆裂度

实验号数	噬菌体	细 菌	潜伏期(分)	爆裂度
1	T _H	Br-70	23	65
2	T _H	Br-2110	21	128
3	K _I	Br-2110	21	73
4	K _I	Br-70	23	91
5	K _{II}	Br-2110	21	119
6	M	Br-2110	49	55

的爆裂度动摇的范围甚大。

4. 噬菌体抗热性及对紫外线抵抗性的测定：本实验的结果列于表 6、7 两表中，毒力弱的噬菌体 M 当加热 75℃ 10 分钟时即失去其活动性，而毒力强的噬菌体 T_H、K_I 和 K_{II} 需

表 6 噬 菌 体 的 抗 热 性

噬菌体	细 菌	温 度	活动性噬菌体颗粒数(1 毫升)						
			加 热 时 间 (分)						
			0	3	5	10	15	20	25
T _H	Br-2110	75	+++	+++	+++	+	+	—	—
K _I	Br-70	75	+++	+++	+++	+	—	—	—
K _{II}	Br-2110	75	+++	+++	+++	++	+	—	—
M	Br-2110	75	+++	+++	+	—	—	—	—

[註] +++: 约 300 个透明斑; ++: 约 100 个透明斑; +: 约 10 个透明斑; —: 没有透明斑。

表 7 噬菌体对紫外线的抵抗力

噬菌体	活动性噬菌体颗粒之数(每毫升)							
	照 射 时 间 (分)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
T _H	66	3	0	0	0	0	—	—
K _I	304	51	9	2	0	0	—	—
K _{II}	95	6	2	0	1	0	0	0
M	155	—	—	29	—	6	0	0

要 15—20 分鐘。紫外線照射 2—4 分鐘後可以使噬菌體 T_H 、 K_I 、 K_{II} 失去其活動性，而對噬菌體 M 則需要 5—6 分鐘。

討 論

尽管抗噬菌體血清對噬菌體中和作用的機轉至今還不夠了解，但有許多作者採用中和速度常數做為分類標準之一^[5-13]。這不僅如 Burnet 氏^[9] 所指出，是由於此種反應方法簡便，更是由於屬於同一血清學組的噬菌體其他生物學性質也頗相似。這種說法已被 Adams 氏所証實^[11]。但是噬菌體的分類不應只依靠血清中和反應一實驗，因為用來免疫動物的噬菌體標本中可能含有來自賦裂解性細菌的別種噬菌體；另外沒有陽性交叉中和反應也不能完全排除兩種噬菌體之間可能存在的聯繫^[12]。為此，我們除了對血清中和反應外，對其他某些生物學特點也同時進行了研究。

為了闡明噬菌體與宿主細胞間之相互作用機轉，許多作者對噬菌體在細胞上的吸着反應進行了全面的研究。某些作者認為此種反應的過程分兩步完成。第一步為可逆性的靜電的 (electrostatic) 附着，其與周圍環境中的離子濃度有密切的關係；第二步為不可逆性酶的作用過程 (enzymetic process)^[14-17]。Wolfhard^[18] 及 Kay^[19] 等氏指出，此種反應與細胞表面上的所謂受體有密切關係。自細胞中提出的受體物質可以吸着於噬菌體上並使其內含物放於周圍環境中，此種反應具有高度的特異性。此外，在被殺死的致敏感細胞上的吸着反應各種噬菌體也各有不同。例如 T_2 噬菌體在加熱或福馬林殺死的細胞上及活細胞上却同樣可以吸着，但 T_1 在此等被殺死的細胞上却不能吸着^[20]。在我們的實驗中也有類似的情況發現，因此有理由認為噬菌體在細菌細胞上的吸着反應不僅具有物理化學的特徵而且是噬菌體重要的生物學特性之一。

在測定噬菌體繁殖的潛伏期及爆裂度的實驗中，我們所獲得的結果與 Adams^[13] 及 Delbrück^[21] 二氏的報告相一致：即用單循環繁殖實驗所測定的噬菌體潛伏期具有一定的穩定性，而爆裂度雖屬同一株噬菌體也有很大的動搖。由此，我們的初步印象是：用單循環繁殖實驗所測定的爆裂度不適於作鑑定噬菌體的標準。

實驗証明：屬於同一血清學組的噬菌體 T_H 、 K_I 及 K_{II} 在吸着反應、潛伏期、對熱及紫外線的抵抗性各方面皆頗相連，而屬於另一血清學組的噬菌體 M 在上屬性質的各方面與其他三株皆有明顯的差別，這一點與上述 Burnet 氏的結論^[9] 相一致。

必須指出，本文所述之實驗原系企圖對兩種噬菌體（毒力強的和毒力弱的）生物學特性進行對比，以此找出對此二種噬菌體分類的標準，但是為了闡明此兩種噬菌體生物學性質不同的規律性還必須對更多的噬菌體進行研究。

結 論

1. 本文對鼠傷寒桿菌噬菌體 T_H 、 K_I 、 K_{II} （毒力強的）及 M （毒力弱的）的某些生物學性質進行了對比的研究。

2. 抗噬菌體血清交叉中和實驗証明毒力強的噬菌體 T_H 、 K_I 、 K_{II} 與毒力弱的噬菌體 M 在抗原構造上有明顯的區別。

3. 噬菌體 T_H 、 K_I 及 K_{II} 在敏感細菌細胞上的吸着比噬菌體 M 快。噬菌體 T_H 可以

在 58℃ 30 分钟杀死的细胞上吸着,其余的三株在此等细胞上皆不吸着。

4. 用单循环繁殖实验所测得噬菌体 T_{II} 、 K_I 及 K_{II} 的潜伏期为 21—23 分钟,而噬菌体 M 为 49 分钟。

5. 在蛋白胨肉汤中加热 75℃ 15—20 分钟可以使噬菌体 T_{II} 、 K_I 及 K_{II} 失去其活性,而对噬菌体 M 却只需要 5—10 分钟。

在磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中紫外线照射 2—4 分钟使噬菌体 T_{II} 、 K_I 及 K_{II} 失去其活性,而噬菌体 M 经过 5—6 分钟的照射后即失去其活性。

6. 再一次证明属于同一血清学组的噬菌体具有相类似的生物学特性。

参 考 文 献

- [1] Zinder, N. D., Lederberg, J.: *J. Bacter.* **64**: 679, 1952.
- [2] 吕 亨 尧: Биологические особенности бактериофагов *S. typhi-murium* различной вирулентности. Сообщение V. в печати, 1957.
- [3] Lwoff, S. K. *Bact. Reviews.* **17**: 269, 1953.
- [4] Adams, M. Study of bacterial virus. Method in Medical Research, 2, I. 1950.
- [5] Adams, M. *J. Bact.*, **64**: 387, 1952.
- [6] Eschke, W. Zur Frage der Temperaturabhängigkeit der UV-inaktivierung. Arbeitstag Biophys., 1954. Berlin, 1955, 116. 1955.
- [7] Delbrück, R. *J. Bact.* **59**: 329, 1950.
- [8] Новикова В. И. Труды Томского Научно-исследовательского Института вакцин и сывороток. **8**: 336, 1956.
- [9] Burnet, F. M. *J. Path. a. Bact.* **37**: 179, 1933.
- [10] Friedman, C. *J. Bact.* **66**: 379, 1953.
- [11] Adams, M. *Ann. N-York Acad. Sci.* **56**: 442, 1953.
- [12] Adams, M., Wode, E. *J. Bact.* **68**: 320, 1954.
- [13] Adams, M., Evelyn, N. *J. Bact.* **70**: 253, 1955.
- [14] Puck, T. T., Garen, A., Cline, T. *J. Exp. Med.*, **93**: 65, 1951.
- [15] Puck, T. T., Howard, H. Lee *J. Exp. Med.*, **99**: 841, 1954.
- [16] Garen, A., Puck, T. T. *J. Exp. Med.* **94**: 194, 1951.
- [17] Garen, A. *Acta Biochem. et Biophys.* **14**: 163, 1954.
- [18] Wolfhard, W. Phage receptor systems of *E. Coli* B. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **18**: 155, 1953.
- [19] Kay, D. *Brit. J. Exptl. Path.* **36**: 291, 1955.
- [20] Hershey, A. D., Bronfenbrenner. Bacterial viruses (bacteriophages). В КН. "Viral and rickettsial infection of man". Ed. by Rivers, T. 1952,
- [21] Delbrück, M. *J. Bact.*, **50**: 131, 1945.

СПРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ БАКТЕРИОФАГОВ *S. TYPHI-MURIUM* РАЗЛИЧНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Ли Хуан-ло

1. Некоторые биологические особенности бактериофагов *S. typhi-murium*, T_{II} , K_I , K_{II} (вирулентные), и M , (умеренного) были изучены в настоящей работе.
2. При помощи перекрестной реакции нейтрализации бактериофага антифаговой сывороткой показано, что вирулентные бактериофаги T_{II} , K_I и K_{II} резко отличаются от умеренного фага M .
3. Вирулентные фаги T_{II} , K_I и K_{II} адсорбируются на чувствительных бактериальных клетках быстрее, чем умеренный фаг M . Стандартный штамм фага T_{II} может адсорбироваться на убитых прогреванием при 58° 30 минут клетках чувствительной культуры, а остальные нет.
4. Латентный период размножения бактериофагов T_{II} , K_I и K_{II} , определенный методом одиночного цикла размножения, равен 21—23 минутам, а для бактериофага M —49 минутам.
5. При температуре 75° в мясопептонном бульоне вирулентные фаги T_{II} , K_I и K_{II} теряют свою активность, в течение 15—20 минут, умеренный фаг M при таких же условиях становится неактивным в течение 5—10 минут.
- Облучение ультрафиолетовыми лучами в фосфатном буфере pH 7.0 инактивирует бактериофаги T_{II} , K_I и K_{II} в течение 2—4 минут, а фаг M —5—6 минут.
6. Еще раз подтверждено, что бактериофаги одной серологической группы близки по другим биологическим свойствам.