

# 苏芸金杆菌噬菌体的形态观察及噬菌体 GP-10 在寄主细胞内增殖

颜望明 蔡德霖 王绮文

(山东大学生物系, 济南)

高天祥 张惠琳 李伯勤

(山东医学院电子显微镜室, 济南)

本文对山东大学生物实验厂几年来从周围环境和发酵裂解液中分离的 10 株噬菌体进行了寄主范围(包括 9 个血清型共 55 株苏芸金杆菌)的测定和电子显微镜观察和比较。根据其形态,可归纳为三种不同的类型。同时以噬菌体 GP-10,在感染寄主细胞后的不同时间进行了电子显微镜观察。结果表明噬菌体核酸在侵入细胞后,寄主细胞核区明显扩大,并在扩大的核区复制,逐渐出现电子密度较大的噬菌体颗粒,数量逐步增加,至增殖后期,几乎充满了整个扩大的核区。最后导致寄主细胞壁破裂而释放出成熟的噬菌体。其数量估计每个细胞接近 1000 个。

利用昆虫病原细菌——苏芸金杆菌来防治农林害虫已在国内外广泛应用和推广。但在生产过程中经常受到噬菌体的侵染,严重地影响了细菌农药的生产和应用。因此,苏芸金杆菌噬菌体的研究,对防止噬菌体的危害具有重要的意义。

几年来,我们从山东大学生物实验厂分离出了几株噬菌体,本文报道这些噬菌体的寄主范围及形态观察结果,并利用超薄切片在电子显微镜下观察了噬菌体 GP-10 在寄主细胞内的增殖过程。

## 材料和方法

### (一) 噬菌体的来源

10 株噬菌体是 1973—1977 年从山东大学生物实验厂周围环境及发酵裂解液中分离得到的。

### (二) 噬菌体的分离和纯化

用 Adams<sup>[1]</sup> 双层平板法,重复分离直至噬菌斑形状大小基本一致。

### (三) 噬菌体原液的制备

挑取纯化的单个噬菌斑入少量无菌蒸馏水中,用双层平板法在 33℃ 培养 8—12 小时,噬菌斑连成一片,然后加入胰蛋白胨培养基(胰酶 1%, NaCl 0.5%)10 毫升,静置浸泡 1—2 小时,获得噬菌体悬液。另用普通肉汤培养基平板滴入敏感孢子悬液,涂匀后培养 7—8 小时,至对数生长期。再混合上述浸泡后的噬菌体悬液移入已灭菌的三角瓶,置摇床振荡培养至变清,约 3—4 小时(必要时可用同法再增殖一次)。用 3000 转/分离心 20 分钟,取上清液经 EK 石棉板过滤除菌后分装,滴入一滴氯仿保存于 4℃ 冰箱备用。

### (四) 噬菌体寄主范围测定方法

标准血清型菌株 009、021、016、023、087、010、096、012、013 由武汉微生物农药厂供给;306、HD-1 由中国科学院动物研究所供给;其它菌株均由中国科学院微生物研究所供给。

用接种针蘸取不同噬菌体原液分别在混入待测菌悬液的双层平板内穿刺,培养 18—24 小时后观察结果,每一菌株重复五次。“+”为敏感

本文于 1977 年 12 月 13 日收到。

表 1 噬菌体寄生范围测定

血清型	变 种	菌 号	噬 菌 体																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
			GP-1	GP-2	GP-3	GP-4	GP-5	DP-6	DP-7	DP-8	DP-9	GP-10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
H <sub>1</sub>	<i>Bacillus, thuringiensis</i> , var. <i>berliner</i>	009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



(溶菌现象明显),“—”为不敏感(无溶菌现象),“±”为不完全敏感(溶菌不明显,仅在针刺点周围有微弱的溶菌区)。

### (五) 电子显微镜观察

1. 形态观察: 用接种环取噬菌体原液或用新鲜噬菌斑, 以针刺加入一滴 0.01 M 醋酸钠缓冲液内, 再加入一滴 2% 磷钨酸 (预先用 NaOH 调 pH 至 7.0) 进行负染, 然后将载膜铜网覆盖在混合液滴上, 约一分钟后, 将铜网取出, 置于干燥器内干燥。在电子显微镜下放大 50,000—80,000× 进行观察。

#### 2. 超薄切片:

标本制备: 噬菌体 GP-10 (1977 年山东大学生物实验厂从发酵裂解液中分离), 按 1:1 加入对数生长期的 G-33 (*Bacillus thuringiensis* var. *gal-leriae*) 菌液内, 于 28℃ 旋转式摇床上振荡培养, 并分别于感染后 1 小时和 3 小时取样。

标本固定: 采用 Kellenberger<sup>[2]</sup> 标准钨酸固定法:

(1) 取上述混合培养物 30 毫升, 加入 3 毫升 1% Kellenberger 钨酸固定液, 立即用 1800×g 离心 5 分钟。

(2) 取离心沉降物悬浮于 1 毫升 1% Kellenberger 钨酸固定液中, 加入 0.1 毫升细菌培养基。在室温下过夜 (大约 16 小时)。

(3) 用 8 毫升 Kellenberger 缓冲液稀释, 1800×g 离心 5 分钟。

(4) 取沉淀物悬浮于几滴热琼脂, 滴一滴于载玻片上, 凝固后切成 1 立方厘米小块, 放入 0.5% 醋酸铀溶液在室温下静置 2 小时。

脱水、包埋、切片和染色: 标本用梯度酒精脱水, 用 Epon 812 包埋, LKB 超薄切片机切片, 厚度约 700 Å, 用醋酸铀<sup>[3,4]</sup>及柠檬酸铅<sup>[5]</sup>染色后在电子显微镜下放大 20,000—40,000× 观察。

## 结 果

### (一) 寄主范围的测定

10 株噬菌体对 9 个血清型共 55 株苏芸金杆菌寄主范围的测定结果列于表 1 (按其血清型排列)。

从表 1 可以看出: (1) 噬菌体 GP-1、

GP-2、GP-3、GP-4、GP-5 来源于苏芸金杆菌血清型 H<sub>5</sub> (*Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*), 这个血清型的大部分菌株对它们都较敏感, 此外血清型 H<sub>6</sub> 和 H<sub>8</sub> 也敏感。(2) 噬菌体 GP-10 来源于血清型 H<sub>5</sub>, 这个血清型的大部分菌株及 H<sub>6</sub> 和 H<sub>8</sub> 各菌株对它们较敏感, 但血清型 H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub> 和 H<sub>4</sub> 的大部分菌株则不敏感。(3) DP-6、DP-7、DP-8 DP-9 的敏感菌是松蠹菌 (*Bacillus thuringiensis* var. *Dendrolimus*), 9 个血清型的大部分 (除少数外) 菌株都对它们敏感, 表现了明显的交叉感染现象, 看来这几株噬菌体的寄主范围较广, 专属性不明显, 而且它们本身之间的寄主范围也有差异。

### (二) 噬菌体的形态观察

(1) 噬菌体 GP-1—GP-5: 头部略呈圆形, 但仔细观察实际上是多面体。尾部直, 无收缩性尾鞘, 尾部末端略有膨大。这 5 株噬菌体除头部大小及尾部长短略有差异外, 在形态上无显著差别, 结合寄主范围的测定结果, 可以认为它们是属于同一类型的噬菌体 (图版 I-1)。

(2) 噬菌体 DP-6 和 DP-7: 结构较为复杂, 头部是多面体结构, 有收缩性尾鞘 (图版 I-2)。在某些照片中可见其尾部末端附着在鞭毛上, 并可清楚看出其头部衣壳呈六角形 (图版 I-3)。

(3) 噬菌体 DP-8 和 DP-9: 头部也是多面体, 有收缩性尾鞘, 尾部末端呈扁平膨大状基片 (图版 I-4 和图版 I-5)。

(4) 噬菌体 GP-10: 结构较特殊, 头部呈六棱长柱状, 有短尾, 末端略有膨大, 颈部有一“衣领”, 其左右两端略有膨大 (图版 I-6)。

以上各噬菌体的形态特征列于表 2。

### (三) 噬菌体 GP-10 在寄主细胞内增殖

噬菌体感染寄主细胞进行增殖的过程

表 2 噬菌体的形态

噬 菌 体	噬菌斑(毫米)	敏 感 菌	噬 菌 体 形 态	
			头 (毫微米)	尾 (毫微米)
DP-6—DP-7	1.5—1.8	松属杆菌 ( <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>dendrolimus</i> )	六角形 80×75	直尾,有鞘,能收缩,尾部末端有尾丝 114×22.5
DP-8—DP-9	1.2—1.4	松属杆菌 ( <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>dendrolimus</i> )	多面体 88—99×68—71	直尾,有鞘,尾部较长,末端呈扁平状膨大。148×16.6
GP-1—GP-5	3.5—4.0	蜡螟杆菌 ( <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i> )	多面体 56—60	直尾细长,无鞘,不能收缩 126—140×9—12
GP-10	2.1	蜡螟杆菌 ( <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i> )	六棱柱状 54×37	直尾,较短,无鞘,颈部有一“衣领”状结构 37×8.5

可以分为四个阶段,即吸附、侵入、增殖和裂解。我们在感染后 1 小时和 3 小时所取的样品中,这一过程大致可以观察到。

在感染后 1 小时的切片中,可以清楚地看到噬菌体以其尾部吸附于寄主细胞壁的表面,且排列整齐(图版 II-9)。从电镜观察看来,噬菌体与寄主细胞壁的吸附是非常牢固的,感染后一系列处理都没有能使噬菌体从细胞壁上脱落下来。并且在将近裂解的菌体细胞壁上仍可看到吸附着的噬菌体。经过负染色处理的某些标本,可以看到噬菌体的尾部插入寄主细胞壁,达到细胞壁下的间隙与细胞膜相接触(图版 I-7)。

噬菌体的核酸侵入菌体细胞之后,最早的形态学反应是核区的明显增大(图版 I-8),含 DNA 的噬菌体是在核区进行复制的,随着核区的继续扩大,已复制的噬菌体核酸和衣壳蛋白质亚单位即装配成为噬菌体(图版 I-8)。它们的数量逐渐增多(图版 II-10),几乎充满了整个扩大的核区。如图版 II-11 所示的一个横切面中,噬菌体的数目可达 50—60 个。当寄主细胞内充满了装配好的噬菌体时,细胞壁即破裂,放出成熟的子代噬菌体(图版 II-12),箭头所表示的为细胞壁破裂部位和已释放出来的噬菌体。在许多切片中,可以看到细胞壁的几个部位同时破裂。

## 讨 论

国际病毒命名委员会 (ICNV)<sup>[6]</sup> 建议根据形态学将所有的噬菌体分为 6 个属。苏芸金杆菌噬菌体已报道的都是有尾的。我们分离的 10 株噬菌体都是有尾的,按其形态(头部、尾部形态,尾鞘的有无)可归纳为三个类型:

第一类以 DP-7 为代表,头部为多面体,长尾,有收缩性尾鞘。这一类噬菌体结构较为复杂,与 Chapman 等<sup>[7]</sup>所报道的噬菌体 III 在形态上有些相似。

第二类以 GP-3 为代表,头部为多面体,长尾,无收缩性尾鞘。这类噬菌体较为常见,在形态上与 Chapman 等报道的 I 和 IV 噬菌体相似。

第三类:以 GP-10 为代表,头部呈六棱柱状,尾短,无收缩性尾鞘,颈部有“衣领”状结构。这一类噬菌体较为特殊,与沙搓云等<sup>[8]</sup>以及国外 Yoder<sup>[9]</sup>, Chapman, Colasito<sup>[10]</sup>, de Barjac 等<sup>[11]</sup>报道的苏芸金杆菌噬菌体在形态上是不同的。与 Раушенберг 等<sup>[12]</sup>报道的对 *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* 有特异性的噬菌体 1-97,在“衣领”结构方面也有些差别,1-97 噬菌体的“衣领”有 12 个辐射状尖齿状 (tine) 物。GP-10 未观察到这种结构,尾部形态也有些不同。GP-10 尾部比 1-97 噬菌体粗而短。

没有收缩性尾鞘的噬菌体是如何把其核酸注入寄主细胞内? 这个问题目前仍不太清楚, Беспалова<sup>[13]</sup> 认为: 这类噬菌体的“衣领”实质上相当于某些长尾噬菌体的基片, 含有溶菌酶类, 当噬菌体以其尾部吸附于细胞壁时, “衣领”就与细胞壁接触, 使其含有的溶菌酶得以发挥作用。Tosi<sup>[14]</sup> 和 Anderson<sup>[15]</sup> 研究枯草杆菌噬菌体, 发现用抗血清封闭“衣领”结构就不能发生吸附。

GP-10 噬菌体的产量是比较大的。前面已提到的图版 II-11。在一个切面中噬菌体的数目可达 50—60 个, 根据寄主细胞的体积以及切片的厚度推算, 在每个细胞中噬菌体接近 1000 个, 即裂解后放出近一千个子代噬菌体。这在生产上具有实际意义, 说明了这种噬菌体对生产的危害是较大的。

### 参 考 文 献

[1] Adams, M. H.: Bacteriophages. Inter-

- science publishers, Inc; New York, 1959.
- [2] Kellenberger, E.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:671, 1958.
- [3] Watson, M. L.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:475, 1958.
- [4] Watson, M. L.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:727, 1958.
- [5] Reyneles, E. S.: *J. Cell. Biol.*, 17:208, 1963.
- [6] Weldy, P.: 病毒的分类与命名, 科学出版社, 1974。
- [7] Chapman, H. M. and J. R. Norris.: *J. Appl. Bact.*, 29(3):529, 1966.
- [8] 沙槎云等: 昆虫学报, 18(3):273, 1975.
- [9] Yoder, P. E. and Nelson, E. L.: *J. Insect Pathol.*, 2:198, 1960.
- [10] Colasito, D. J. and M. H. Rogoff: *J. Gen. Virol.*, 5(2):267, 1969.
- [11] De Barjac, H. et al.: *C. R. Acad. Sc. Paris*, T. 279(16 Décembre), 1939—1942, 1974.
- [12] Раутенштайн Я. И. и др.: *Микробиология*, XLV (4): 690—694, 1976.
- [13] Беспалова, И. А. и др.: *Микробиология*, XLV (5):884—887, 1976.
- [14] Tosi, M. et al.: *J. Virology*, 12(6):1578, 1973.
- [15] Anderson, D. L.: *J. Bact.*, 9:2081, 1966.

## MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS OF BACTERIOPHAGES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* AND THE DEVELOPMENT OF PHAGE GP-10 IN BACTERIAL HOST CELLS

Yan Wang-ming, Cai De-ling, Wang Qi-wen

(Department of Biology, Shandong University, Jinan)

Gao Tian-xiang, Zhang Hui-ling, Li Bo-qin

(Laboratory of Electron Microscope, Shandong Medical College, Jinan)

10 isolates of bacteriophages of *Bacillus thuringiensis* were obtained from the workshop environment and phagolysates of fermentation tanks in Biological and Experimental Factory of Shandong University in the past few years. Analysis of host range was made by using 55 strains of *Bacillus thuringiensis* belonging to 9 standard serotypes. Morphological observations were carried out under electronmicroscope. According to the classification system for bacteriophages issued by International Committee on Nomenclature of Viruses (ICNV), the bacteriophages mentioned above are classified on morphological bases into 3 groups.

A strain of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* was infected with specific phage GP-10. Ultrathinsections of infected bac-

terial cells were made and examined under electronmicroscope. After adsorption of the phage particles on bacterial cell wall and penetration of phage nucleic acid, the first sign of phage multiplication as seen in the section is the enlargement of the nucleoid area. As the phage particles are being assembled, electron dense particles with hexagonal profile appear first in the nucleoid areas. They increase then in number and the distended nucleoid areas are eventually full of regularly arranged phage particles. At the final stage of multiplication, the mature phage particles are released into the surroundings due to the burst of the cell wall, and the ghost of the bacterial cell wall is left behind. It is estimated that there are about 1,000 phage particles per cell.