

白喉毒素的双重溶原性转换的研究

司穉东 王家驹 朱素娟 戈宝榛 戴耀勋* 张煜华*

(中国科学院上海植物生理研究所微生物室, 上海)

从白喉噬菌体 β 和 γ 杂交, 分离得到一株白喉噬菌体的重组子 r' 、具有亲代噬菌体 β 产生毒素的溶原性转换能力, 即带有 β 的毒素基因 (tox) 和噬菌体 γ 的溶原性免疫性的特征。该噬菌体再感染单溶原性产毒菌株 C7(β), 得到双重溶原性菌株, 携带了两个前噬菌体及其所携带的两个毒素基因, 菌株产毒能力比单溶原性亲代株高。

细菌溶原性转换现象首先是 Freeman^[1] 在白喉棒状杆菌中发现, 后来 Murphy 等^[2] 证明毒素的结构基因是由噬菌体携带的。携带产毒基因的噬菌体透明噬斑突变株感染敏感菌株时, 在裂解前已出现毒素的合成^[3]。Gill 等^[4] 发现噬菌体所携带的毒素基因不论整合于菌细胞染色体上与否, 都能表达。有关携带两个毒素基因的双重溶原菌株对该菌毒素产量的影响, 尚未见报道。将两个相同的外源结构基因通过噬菌体引入到同一菌株中, 研究对基因产物产量的影响, 可能对微生物育种提供一个新的途径。我们从白喉噬菌体携带的毒素基因为标志进行了研究, 现报道如下。

材料与方 法

(一) 菌株和噬菌体

白喉棒状杆菌 C7(-), C7(β), C7(γ) 为 A. M. Pappenheimer, Jr. (Biological Laboratories, Harvard University) 所赠。噬菌体 β , γ 系分别从菌株 C7(β), C7(γ) 分离得到。

(二) 培养基

1. 液体培养基: 系用牛肉胰酶消化液培养基(由卫生部上海生物制品研究所提供), 使用前加麦芽糖至最终浓度 1.0%。

2. 平板产毒培养基: 参照 Groman (1958)^[5] 成分稍加改变。豚蛋白胨 (OXOID) 2%, 氯化钠 0.5%, 琼脂 2%, pH7.8, 使用时加无菌猪血清

15% 和白喉抗毒素至 3Lf**/ml 或不同量, 借与抗毒素发生沉淀环, 用以观察细菌在平板上产生毒素的情况。

3. 双层琼脂底层固体培养基: 成分为豚蛋白胨(东海制药厂) 2%, 酵母透析液 4%(V/V), 氯化钠 0.5%, 水解酪蛋白 0.1%, II 号液 0.2%, III 号液 0.5% (Mueller 及 Miller)^[6], 琼脂 2%, pH7.8, 15 磅灭菌 15 分钟备用, 制备平板前加无菌麦芽糖 1%。

双层琼脂的上层半固体培养基: 为 1 号培养基添加 0.7% 琼脂。

4. 分离单菌落的固体培养基: 为 3 号培养基添加 5% 无菌猪血清。

(三) 毒素与抗毒素

白喉毒素批号为 65-2, 白喉抗毒素批号为 79-1, 均由卫生部上海生物制品研究所提供。

(四) 溶原菌产生噬菌体的检查

用诱导产生噬菌体法检查。

1. 液体培养基中诱导法: 取培养过夜菌液 0.1ml 接种于 2.5ml 液体培养基中, 37℃ 振荡培养至对数生长期, 加丝裂霉素 C 至最终浓度为 0.2—0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 继续振荡培养 6 小时, 离心, 以孔径 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌, 用双层琼脂平板检查噬斑。

2. 固体培养基中诱导法: 于底层琼脂平板上加入含指示菌的 2.5ml 半固体培养基为上层, 凝固后用无菌牙签穿刺接种待检菌株, 在 15W 紫

本文于 1981 年 9 月 2 日收到。

* 卫生部上海生物制品研究所, 上海。

** 絮状单位

外光灯下照射 1 分钟(灯距 60cm), 遮暗, 37℃ 培养过夜, 观察结果。溶原性菌在穿刺点周围出现裂解区或噬菌斑。

(五) 菌株双重溶原化

将溶原菌培养液 0.1ml 加于 2.5ml 半固体培养基中浇注于琼脂板上成双层, 凝固后滴加重溶原化用的噬菌体, 28℃ 培养过夜, 次日取融汇性裂解区内生长的再生菌落, 接种于 2.5ml 液体培养基中, 28℃ 振荡培养 6 小时, 离心, 菌体用含 0.07M 柠檬酸钠的上述培养基洗涤一次, 再做成细菌悬液, 稀释后接种平板分离单菌落, 检查每个单菌落的溶原性。

(六) 菌株毒素产生能力的检查

接种待测菌株于含 3Lf/ml 抗毒素的产毒平板上, 37℃ 培养 48 小时后, 置于冰箱 24 小时观察结果。产毒株在菌落周围出现不透明的沉淀环。

(七) 毒素絮状单位 (Lf) 测定

参照 Batty 的方法^[7]。

(八) 家兔皮内毒力试验

参照 Holmes 和 Barkdale 方法^[8]。

(九) 菌株间相对产毒量的比较

使用含不同浓度抗毒素平板, 接种待检菌株, 37℃ 培养 48 小时后, 置于冰箱 24 小时观察结果, 根据抗毒素平板上出现沉淀环能力, 判定菌株相对产毒能力。

结 果

(一) 重组体 r' 的获得

白喉棒状杆菌菌株 C7(r) 于液体培养基中, 以噬菌体 β 感染, 经 28℃ 培养 4 小时后, 离心, 上清液经滤膜过滤除菌, 稀释后在 C7(β) 菌株上培养, 得分离的噬斑, 随机取 20 个噬斑, 分别悬于液体培养基中, 并各自于菌株 C7 平板上培养形成噬斑, 再于每个噬斑中分离溶原化的菌株, 检查其产毒能力。选出产毒的溶原菌, 检查溶原菌对噬菌体 β 和 r 的敏感性和其诱导液对 C7, C7(β), C7(r) 的裂解能力, 得到溶原性免疫性上与 β 不同但与 r 相同的噬

菌体, 这个新的重组噬菌体称为 r' (见表 1)。

噬菌体 r' 溶原化 C7 菌株, 经过连续三次单菌落分离纯化, 得到溶原菌 C7(r')。菌株以丝裂霉素 C 诱导, 诱导液离心, 除菌过滤, 于菌株 C7 上可得到单个噬斑, 检查每个噬斑株对不同菌株裂解能力, 和经其溶原化的菌株产毒能力。所有检查过的 162 个噬斑株都是相同的, C7, C7(β) 菌株对其都是敏感的, 菌株 C7(r') 则对其具有免疫性, 而所有溶原化的菌株 C7(r') 均产生毒素。

(二) 菌株 C7(β) 的双重溶原化

用噬菌体 β 及噬菌体 r' 的过滤无菌增殖液(以 C7 为宿主增殖)分别感染相应溶原菌株 C7(r') 或 C7(β), 所得存活菌单菌落经纯化分离后, 以紫外光灯诱导, 检查所释放的噬菌体对宿主 C7(r') 及 C7(β) 的裂解反应。选取诱导出的噬菌体对两者都能裂解的纯化菌株, 并进一步分别检查对噬菌体 β 和 r' 的免疫性, 结果均被 β 及 r' 裂解。可认为此等菌株皆系 β 及 r' 噬菌体的双重溶原性株, 即 C7(r')(β) 和 C7(β)(r')。因为它们产生 β 及 r' , 使其诱导液可分别裂解 C7(r') 及 C7(β), 且均对 β 及 r' 具有免疫性。菌株 C7(β) 以噬菌体 r' 感染, 经 405 个菌落检查, 得到 147 株 C7(β)(r')。菌株 C7(r') 以噬菌体 β 感染, 经 324 个菌落检查得到 9 株 C7(r')(β)。

为证明双重溶原菌携带的两个前噬菌体都含有毒素基因, 将经连续三次单菌落分离纯化后的双重溶原菌接种于液体培养基, 用丝裂霉素 C 诱导噬菌体, 经过滤除菌, 以菌株 C7 为指示菌得到单噬斑, 检查每个噬斑的噬菌体裂解特性和其溶原化菌株毒素产生的能力。由 C7(β)(r') 得 566 个裂解 C7 的噬斑中, 200 个能裂解

表 1 噬菌体 β 、 γ 、 γ' 间以及其溶原菌间的比较Table 1 Comparison among the three phages (β , γ and γ') and their lysogenic strains

菌株 strain	对噬菌体的敏感性 Sensitivity to phage			溶原性试验 Lysogenicity tested against			毒性 Toxicogenicity
	β	γ	γ'	C7(β)	C7(γ)	C7(γ')	
C7	+	+	+	+	+	+	-
C7(β)	-	+	+	-	+	+	+
C7(γ)	+	-	-	+	-	-	-
C7(γ')	+	-	-	+	-	-	+

“+”裂解或产毒 “-”不裂解或不产毒

Lyse or produce toxin Does not lyse or produce toxin

C7(β), 310 个能裂解 C7(γ'), 而被其溶原化的 566 个 C7 菌株均具有毒素产生的能力。同样由菌株 C7(γ')(β) 得 648 个噬斑, 其中 389 个可裂解 C7(β), 200 个可裂解 C7(γ'), 而全部经其溶原化的 C7 菌株均具有毒素产生的能力。这个结果表明双溶原菌株都能诱导出 β 与 γ' 噬菌体, 并都具有转换毒素产生的能力, 说明双重溶原菌两个前噬菌体都携带毒素基因。

(三) 转换性噬菌体的双重溶原性对菌株毒素产量的影响

已知白喉噬菌体 β 携带毒素的结构基因, 可使非毒原非溶原菌株 C7(-) 溶原化, 并转换为毒原的菌株。如果两个这样的毒素结构基因通过噬菌体同时引入到一个菌株中, 而得到双重溶原菌, 这对毒素产

生能力将会有何影响? 我们作了以下的观察, 随机挑取单溶原菌株和再感染后得到的双重溶原菌株部分菌落进行产毒量比较。在含有不同浓度抗毒素平板上生长的单溶原菌出现沉淀环的情况如表 2 所示, 菌株 C7(β), C7(γ') 在含抗毒素 3Lf/ml 的平板上, 大部分菌落出现明显沉淀环; 抗毒素浓度高于 3Lf/ml, 只有少数菌落出现沉淀环; 抗毒素浓度为 8Lf/ml, 菌落周围没有沉淀环。而双重溶原菌 C7(γ')(β) 或 C7(β)(γ') 在平板抗毒素浓度为 9Lf/ml 时, 大部分菌落仍有沉淀环, 在含抗毒素 10Lf/ml 的平板上, 还有约 50% 的菌落出现沉淀环。毒素-抗毒素结合出现沉淀环, 决定于毒素和抗毒素浓度合适的比例。不同的溶原菌株在含不同抗毒素平板上出现沉淀环, 说明单和双溶原菌株产生

表 2 单双溶原菌生长在含抗毒素平板上产毒量的比较

Table 2 Comparison of toxin yield between mono- and dilysogenic strains in antitoxin plates

菌株 Strain	检查菌落数 Number of colonies examined	不同抗毒素浓度出现沉淀环菌落的百分率 Percentage of colonies with precipitation ring at different antitoxin levels									
		1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C7(β)	53	100	100	55	15	9	4	2	0	0	0
C7(γ')	34	100	100	98	32	23	15	3	0	0	0
C7(γ')(β)	9	100	100	100	100	100	89	89	89	78	44
C7(β)(γ')	33	100	100	100	100	100	100	100	97	97	51

* 每 ml 培养基所含絮状单位

Lf units per ml of culture medium

表 3 单双溶原菌株产毒比较

Table 3 Toxin production of mono- and di-lysogenic strains

菌株 strain	最终生长 Final growth (A590nm) (1:10 稀释) (1:10 dilution)	产毒量 Toxin yield		
		絮状单位 Lf unit 培养物 (Culture)		家兔皮试 Rabbit skin test (转换为 Lf 单位) (Converted into Lf unit)
		No.1	No.3	
C7	0.29	0	0	—
C7(γ)	0.26	0	0	—
C7(β)	0.24	10	11.5	12
C7(β)	0.32	10	16	16
C7(γ')	0.27	20	20	20
C7(γ')	0.29	20	12	12
C7(γ')(β)	0.31	40	37.5	36
C7(γ')(β)	0.28	30	—	—
C7(β)(γ')	0.23	30	27	24—28
C7(γ)*	0.34	10	—	—

* C7(β)(γ') β 前噬菌体治愈株
Curing strain of prophage β

毒素能力的差异,表 2 表明双重溶原菌株产毒量可能比单溶原菌株高。为进一步证实又做了单、双溶原菌株产毒量絮状单位测定,将单、双溶原菌接种到液体培养基上、37°C 培养过夜,再取 0.5ml 接种到含有 50ml 上述培养基的 500ml 三角瓶中,37°C 振荡培养 40 小时,离心,取上清液测定絮状单位,结果如表 3 所示。

为了比较同批培养液絮状单位和毒力是否一致,以家兔皮内试验测定毒力,换算成絮状单位的结果亦列于表 3。结果表明双重溶原菌株培养液中絮状单位的提高和毒力增强是一致的,可以看出双重溶原菌株的白喉毒素产生能力较之单溶原菌株有增高的趋势。

从双重溶原菌 C7(β)(γ') 中分离出发丢失一个前噬菌体的菌株,根据它产生的噬菌体能裂解 C7(β),不裂解 C7(γ) 及 C7(γ'),以及对噬菌体 β 敏感,对 γ 及 γ' 有免疫性等特征推断为 C7(γ'),其产毒量也相应下降,结果见表 3。

讨 论

白喉棒状杆菌毒素的溶原性转换陆续已有报道^[9-11],毒素产量的高低取决于宿主菌株的差异^[12,13],同时培养基中铁离子浓度有很大影响^[14],后来提出了毒素基因表达受宿主调节基因控制的假说^[15]。双重溶原性菌株能否使毒素产量提高,我们以白喉毒素为指标进行了研究,选到带有毒素基因的噬菌体重组子 γ' ,再溶原化产毒菌株 C7(β),得到双重溶原菌,经测定发现其产毒量比亲代高。通过溶原性转换性噬菌体携带的基因获得提高该基因产物的目的,这在微生物的育种上是有意义的。除两个毒素基因同时表达以外,是否存在其他因素对毒素产量提高有影响,尚待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Freeman, V.: *J. Bact.*, 61: 675, 1951.
- [2] Murphy, J. R. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71: 11, 1974.

- [3] Matsuda, M. et al.: *J. Bact.* **93**: 722, 1967.
- [4] Gill, D. M. et al.: *Virology*, **50**: 644, 1972.
- [5] Groman, N. B. et al.: *J. Bact.* **75**: 320, 1958.
- [6] Mueller and Miller: *J. Immunol.* **40**: 21, 1941.
- [7] Batty, I.: Toxin-Antitoxin, Chapter VIII, 257—281, *Methods in Microbiology*, Vol. 5A Ed. by J. R. Norris, et al., London and New York: Academic Press, 1971.
- [8] Holmes and Barksdale: *J. Virol.*, **3**: 586, 1969.
- [9] Groman, N. B.: *J. Bact.* **66**: 184, 1953.
- [10] Barksdale, W. L. et al.: *J. Bact.* **67**: 220, 1954.
- [11] Groman, N. B.: *J. Bact.* **69**: 9, 1955.
- [12] Matsuda, M. et al.: *Biken, J.*, **14**: 465, 1971.
- [13] Miller, P. A. et al.: *Virology*, **29**: 410, 1966.
- [14] Hatano, M.: *J. Bact.* **71**: 121, 1955.
- [15] Murphy, J. R. et al.: *J. Virol.*, **18**: 235, 1976.

DOUBLE LYSOGENIC CONVERSION OF DIPHTHERIA TOXIN IN *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Si Zhidong Wang Jiaxun Zhu Sujuan Ge Baozhen Dai Yaoxun* Zhang Yuhua*

(Department of Microbiology, Shanghai Institute of Plant
Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

A recombinant corynebacteriophage was isolated from recombination of the phages β and γ . This phage was found to have the same capacity of converting toxigenicity as phage β and same host range as phage γ .

After infected by γ^* , C7 (β) is tran-

sformed into a double lysogenic strain, Which integrates two prophages both carrying tox gene.

The toxin production of the double lysogenic strain is greater than each of the monolysogenic parent strain.

*Shanghai Institute of Biological Products Ministry of Public Health, Shanghai.