

## 圆褐固氮菌噬菌体 AC-5.1 的基本特性及其 DNA 分子量的测定

范成英 杜千有

(中国科学院植物研究所, 北京)

本文报道了圆褐固氮菌转导噬菌体 AC-5.1 的基本特性。它的寄主专一性很强, 吸附速度常数  $K = 5.26 \times 10^{-2} \text{ ml/min}$ , 潜伏期为 90min, 裂解量为 950 噬菌体颗粒/细胞。它在 pH6—11 的范围内较稳定; 在紫外线照射下 30 秒钟可失活 90%; 在热处理中, 50℃ 失活 90% 需要 1h, 而 60℃ 和 70℃ 1min 即可失活 90% 以上。提取了该噬菌体的 DNA, 通过原生质体转染试验, 证明所提 DNA 具有重新形成噬菌斑的能力, 经琼脂糖凝胶电泳的测定, 该噬菌体 DNA 的分子量与噬菌体  $\lambda$  DNA 的分子量相当。

**关键词** 圆褐固氮菌; 噬菌体; 特性

对圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*) 转导噬菌体 AC-5.1 我们已进行了电镜观察<sup>[1]</sup>, 本文将报道该噬菌体的其它一般特性及其 DNA 的提取、转染和分子量的测定。

### 材料和方法

#### (一) 菌株

圆褐固氮菌 5016、504、507 和 5016 的无荚膜变异株 AW, 以及种未鉴定的固氮菌 (*Azotobacter*) 205、602、701、3502、6201、6807 和 7802 均为本组从土壤中分离的菌株。

圆褐固氮菌 AS1.142, AS1.143, AS1.175, AS1.176, AS1.178, AS1.206, AS1.211, AS1.213, AS1.233, AS1.827, AS1.496 和棕色固氮菌 (*A. vinelandii*) AS1.207, AS1.492, AS1.500, AS1.824, AS1.1005, AS1.1007 以及贝氏固氮菌 (*A. beijerinckii*) AS1.489, AS1.491 均为中国科学院微生物研究所提供。噬菌体的增殖试验和双层琼脂法的指示菌都是圆褐固氮菌 5016。

#### (二) 培养基和试剂

细菌的培养、噬菌体裂解液的稀释剂和双层琼脂的上、下层均为修改的 Burk's 无氮培养基, 简称 Bu 培养基<sup>[2]</sup>。

原生质体转染试验用高渗培养基, 即将 Bu 培养基的蔗糖浓度改为 90g/l, 简称 BuH 培养基。

噬菌体  $\lambda$  DNA 由中国科学院微生物研究所提供。

#### (三) 噬菌体裂解液的制备、浓缩和纯化

本实验用于提取 DNA 的噬菌体裂解液按 Hegazi 等的液体法制备<sup>[3]</sup>。用于其它方面的噬菌体裂解液按常规双层平板法制备。噬菌体的浓缩和纯化按那淑敏等的方法进行<sup>[4]</sup>。

#### (四) 抗血清的制备和纯化

按 Adams 的方法制备噬菌体抗血清<sup>[5]</sup>。为了从血清中除去寄主细胞的抗体, 将血清与寄主菌悬液按 1:1 (V/V) 混合, 30℃ 保温 10min 后, 以 4000rpm 离心 30min, 除去沉淀, 上清液按 Adams 的中和反应法测定抗血清的滴度。

#### (五) 吸附速度常数和一级生长曲线实验

按 Adams 的方法进行<sup>[5]</sup>。

#### (六) 紫外线失活试验

参考 Adams 的方法, 取 6ml  $10^6 \text{ p.f.u./ml}$  的噬菌体悬浮液于直径为 7.5 cm 的培养皿内, 置于 20W 紫外灯下 25cm 处, 在电磁搅拌下定时取样, 做双层平板测定存活率。以上过程均在

本文于 1983 年 3 月 16 日收到。

红光下进行。最后在黑暗中培养。

### (七) pH 稳定性的测定

参考余茂劲等的方法<sup>[6]</sup>, 处理介质为 Bu 培养基, pH 用 NaOH 或 HCl 调节, 以 pHM64 型 pH 计测定。处理后用 Bu 培养基稀释。

### (八) 热失活测定

参考 Colasito 的方法<sup>[7]</sup>, 取内径为 17mm 的试管, 内加 4.5ml Bu 培养基, 置于恒温水浴中预热, 待温度稳定后加入  $0.5\text{ml } 10^8 \text{ p.f.u./ml}$  的噬菌体悬浮液。定时取样, 用 Bu 培养基稀释, 双层琼脂法计数。

### (九) DNA 的提取和琼脂糖凝胶电泳

浓缩和纯化的噬菌体悬浮液用 Freifelder 的高氯酸盐法提取其 DNA<sup>[8]</sup> 用紫外分光光度计测定光谱吸收曲线。

所提 DNA 参考 Schrempf 和 Goebel<sup>[9]</sup> 以及 Adij 和 Borst<sup>[10]</sup> 的方法加以修改进行琼脂糖凝胶电泳纯化。用同法将纯化后的 DNA 与噬菌体  $\lambda$ DNA 一起电泳, 测定它们的泳动距离。电泳时使用 pH8.5TEB 缓冲液, 琼脂糖浓度为 0.6%。制备电泳的电压为 165 V, 测定分子量时的电压为 100V。

### (十) 原生质体的制备和转染试验

制备圆褐固氮菌 AW 的原生质体是根据那淑敏等<sup>[11]</sup>和 Guthrie 等<sup>[12]</sup>的方法加以修改的。离心收集对数初期 AW 细胞, 重新悬浮于 0.5M 蔗糖溶液中, 加入溶菌酶, 使最终浓度为 3mg/ml, 加入氯化镁, 使最终浓度为 0.05mg/ml, 30℃ 保温 150min, 其间轻轻摇动几次。最后在光学显微镜下检查溶壁情况。

用高氯酸盐提取的 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳后, 从胶条上切取 DNA 带, 放在冰浴的 Tris-EDTA 溶液中捣碎, 在冰箱中浸泡 2—4h。然后取 0.2ml 上述 DNA 浸出液加到 0.6ml 0.5 M Tris-HCl 缓冲液中 (pH 8.1), 再加入 1.2ml 原生质体悬液, 混合后于 35℃ 保温 15min, 作适当稀释后, 以圆褐固氮菌 5016 为指示菌, 用 Bu 培养基制备双层琼脂平板, 检测噬菌斑的形成并计算转染效率。

## 结果和讨论

### (一) 寄主范围

作为一株普遍性转导噬菌体, 它的寄主范围与应用范围有着密切关系。1971 年由于把大肠杆菌 (*E. coli*) 转导噬菌体 P1 用于肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)<sup>[12]</sup>, 从而推动了固氮遗传研究的进展。我们虽然通过噬菌体 AC-5.1 为圆褐固氮菌建立了转导系统<sup>[2]</sup>, 然而对该菌的生化研究工作较棕色固氮菌的少。为此我们进行了寄主范围的测定。

本实验用 16 株圆褐固氮菌, 6 株棕色固氮菌, 2 株贝氏固氮菌和 8 株种未鉴定的固氮菌, 结果除 5016 和 Aw 外, 只有 504 和 507 能被噬菌体 AC-5.1 侵染并形成噬菌斑, 而在其余的菌株上均不能形成噬菌斑。已知 Aw 为 5016 的衍生菌, 504 和 507 同 5016 是从同一土样中分离的, 具有不同菌落特征的菌株, 这就可能说明 504 和 507 与 5016 也是同一菌株的不同衍生菌。这样看来, 噬菌体 AC-5.1 的寄主专一性较强, 不仅在种间没有找到它的新寄主, 就是在种内不同来源的菌株亦不能被它侵染。

### (二) 吸附速度常数

噬菌体 AC-5.1 与寄主细胞混合 10 min 后, 有 94.5% 吸附。按照 Adams<sup>[5]</sup> 的

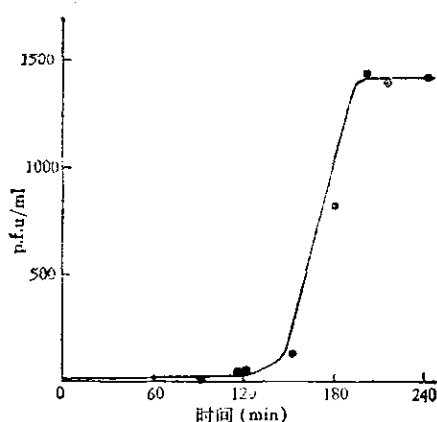


图1 噬菌体 AC-5.1 的一级生长曲线

Fig. 1 One step growth curve of phage AC-5.1

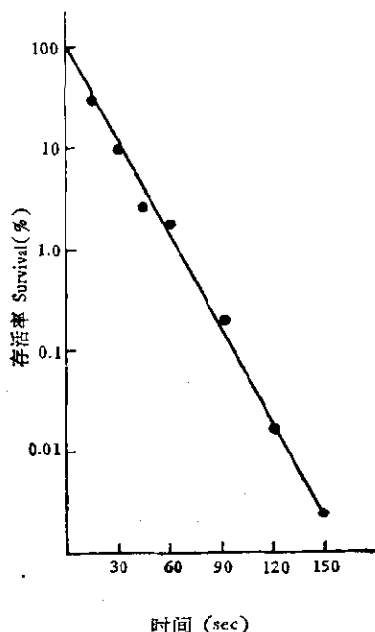


图2 噬菌体 AC-5.1 的紫外线失活。

Fig. 2 Inactivation of phage AC-5.1 by UV-irradiation

公式计算, 可得出  $K = 5.26 \times 10^{-9} \text{ ml/min}$ 。

### (三) 一级生长曲线

一级生长曲线试验表明, 在  $30^\circ\text{C}$  Bu 培养基中, 噬菌体 AC5.1 的潜伏期为 90min, 裂解量为 950。由图 1 可以看出 190min 以后, 释放量保持最大值。

### (四) 紫外线失活

紫外线失活试验可供诱变时参考。紫外线照射 30 秒钟, 可使噬菌体 AC-5.1 失活 90%, 照射 1min, 存活的颗粒所剩无几。图 2 表示紫外线失活与时间的动态关系, 它表明噬菌体的存活率与紫外线照射时间呈指数关系。

### (五) pH 值的影响

不同 pH 值对噬菌体 AC-5.1 稳定性的影响列于表 1。该噬菌体对 pH 的适应范围较广, 在 pH 6—11 的范围内较稳定, 但在 pH6 以下或 11 以上都显著失活。这

表1 不同 pH 值处理噬菌体 AC-5.1 的存活率

Table 1 Effect of pH values on phage AC-5.1

pH 值	2.95	3.98	5.07	6.04	7.01	8.04	8.99	10.06	11.01	12.1
存活率(%)										
Survival (%)	0.45	1.7	2.5	92.3	101.2	100	103.3	101.4	89.8	3.6

与它的寄主菌的 pH 适应范围相一致。

### (六) 热失活

噬菌体 AC-5.1 在室温下可存放数月后仍有活性, 为了了解较高温度对它的影响, 我们分别用  $50^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$  和  $70^\circ\text{C}$  进行处理。在  $50^\circ\text{C}$  条件下经过 50min 处理仍有 15% 的存活率, 说明它对  $50^\circ\text{C}$  有一定的忍受能力。图 3 是它在  $60^\circ\text{C}$  和  $70^\circ\text{C}$  条件下的失活曲线。这两条曲线都表现出双组分特点。噬菌体 AC-5.1 虽经多次单斑纯化, 但在制备的裂解液中大约有  $10^{-6}$  的颗粒可以忍受  $70^\circ\text{C}$  的高温, 所以图 3 中

$70^\circ\text{C}$  的曲线从 5 min 开始为一条与横座标平行的直线, 即使将时间延长到 110min, 这条线仍然保持与横座标平行 (图中未画出)。它们是否属抗温型突变, 有待进一步研究。

我们在热失活实验中遇到过波形曲线, 也看到有类似的报道, 但我们无法解释这种现象。当我们将噬菌体裂解液严格除菌后, 曲线的波动随之消除, 说明曲线的波动是由个别寄主细胞在热处理中又释放出新的噬菌体颗粒所造成的。

### (七) DNA 的分子量

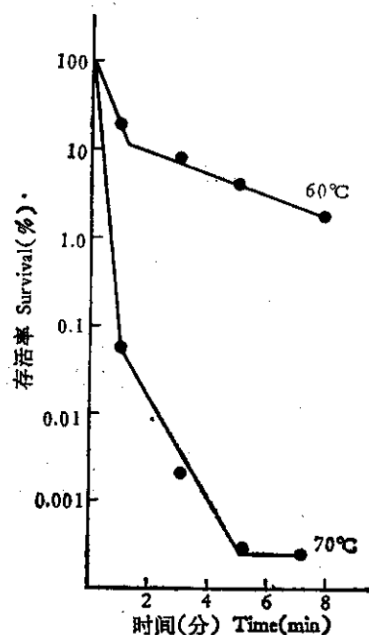


图3 噬菌体 AC-5.1 的热失活

Fig. 3 Thermal inactivation of phage AC-5.1 at 60°C and 70°C

用高氯酸盐法提取的噬菌体 AC-5.1 DNA 用 SPECORD 双波长紫外分光光度

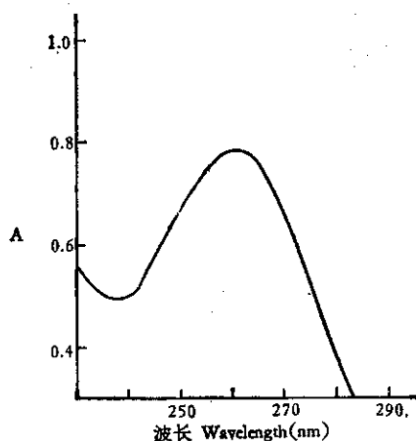


图4 噬菌体 AC-5.1 DNA 的紫外吸收曲线

Fig. 4 Absorption spectrum of DNA of phage AC-5.1

计测定紫外吸收曲线。如图4所示,最大吸收值为 260 nm,其消光系数比为  $A_{260}:A_{280} = 0.55$ ,经琼脂糖凝胶电泳,表现为一条带。证明所提 DNA 的纯度合乎要求。

噬菌体 AC-5.1 DNA 经制备电泳纯化后,一部分用于原生质体转染。由于野

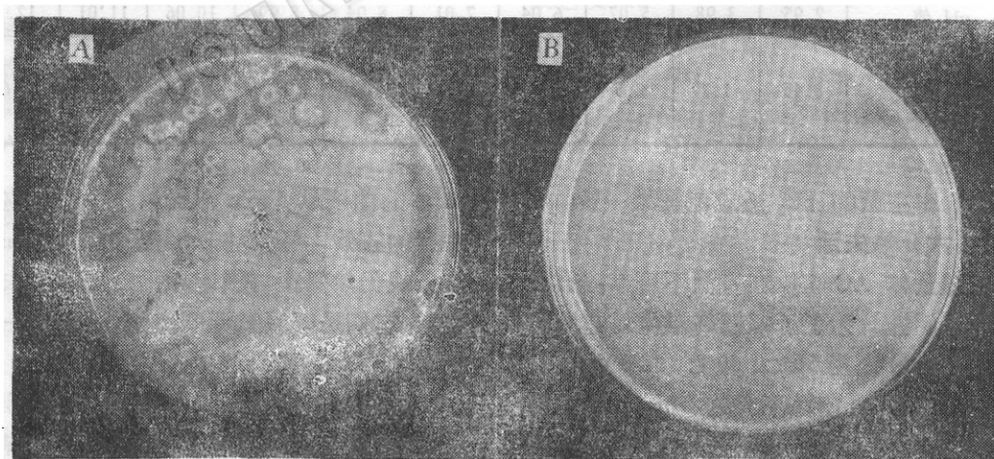


图5 噬菌体 AC-5.1 的 DNA 对圆褐固氮菌原生质的转染

Fig. 5 Transfection of DNA of phage AC-5.1 to protoplasts of *Azotobacter chroococcum*

A. 经 DNA 转染的原生质体与指示菌混合后形成噬菌斑。B. 未经 DNA 转染的原生质体与指示菌混合后没有噬菌斑形成。

A. Plaque formed by plating of mixed transfected protoplasts with indicator strain.

B. No plaques formed by plating of mixed protoplasts with indicator the strain.

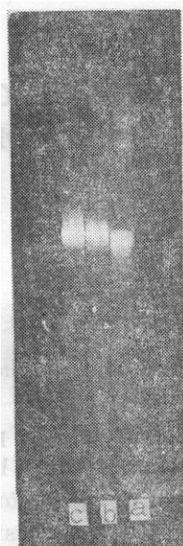


图6 噬菌体 AC-5.1 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of DNA of phage AC-5.1

a.  $\lambda$  噬菌体 DNA 的电泳带 b, c. 噬菌体 AC-5.1 DNA 的电泳带

a. DNA of phage  $\lambda$ , b, c. DNA of phage AC-5.1

生型5 016 具有很厚的荚膜,所以我们只用它作背景菌,而用它的无荚膜变异株 AW 制备原生质体。被噬菌体转染的原生质体与 5016 细胞混合后观察噬菌斑形成能力。结果在双层平板上形成了典型噬菌体 AC-5.1 的噬菌斑 (图 5)。转染效率可达  $3 \times 10^3$  p.f.u./ $\mu$ gDNA。证明所提 DNA 具有生物活性。

另一部分纯化后的噬菌体 DNA 同  $\lambda$

噬菌体 DNA 一起进行琼脂糖凝胶电泳,结果两种 DNA 的泳动距离几乎相等,前者与后者稍有差别 (图 6)。粗略估计噬菌体 AC-5.1 的 DNA 的分子量与噬菌体  $\lambda$  DNA 接近。这与我们通过 DNA 分子长度测得的分子量为  $3.5 \times 10^7$  道尔顿相一致<sup>[13]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] 范成英等: 微生物学报, 23(2): 111—113, 1983.
- [2] 杜千有等: 微生物学报, 21(4): 449—451, 1981.
- [3] Hegazi, N. A. and V. Jensen: *Soil Biol. Biochem.*, 5: 231—243, 1973.
- [4] 那淑敏等: 微生物学报, 19(1): 41—44, 1979.
- [5] Adams, M. H.: *Bacteriophages*, Interscience Publishers, New York, 1959, 466—476.
- [6] 余茂勋等: 微生物学报, 14(2): 216—223, 1974.
- [7] Colasito, D. J. and M. H. Rogoff: *J. Gen. Virol.*, 5(2): 275, 1969.
- [8] Freifelder D.: *Methods in Enzymology*, Vol XII, Nucleic Acids Part A, 550—554, 1967.
- [9] Schrempf, H. and W. Goebel: *J. Bacteriol.*, 131(1): 251—258, 1977.
- [10] Aaij, C. and P. Brost: *Biochim. Biophys. Acta*, 269: 192—200, 1972.
- [11] Guthrie, G. D. and R. L. Sinsheimer: *Biochim. Biophys. Acta*, 72: 290—297, 1963.
- [12] Streicher, S., E. Gurney and R. C. Valentine: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68(6): 1174—1177, 1971.
- [13] Freifelder D.: *J. Mol. Biol.*, 54: 567—577, 1970.

## CHARACTERIZATION OF PHAGE AC-5.1 ON *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* AND DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHT OF ITS DNA

Fan Chengying Du Qianyou

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing)

The phage AC-5.1 of *Azotobacter chroococcum* only attacks *Azotobacter chroococcum* strain 5016 and its mutants. The velocity constant  $K$  of adsorption of the phage to host cell was  $5.26 \times 10^8$  ml.  $\text{min}^{-1}$ . The single step growth curve showed that the latent period of the phage was 90 minutes and the burst size was about 950 phage particles per cell. The phage AC-5.1 was stable over the PH range of 6—11. The survival of phage AC-5.1 declined 90 per cent after U. V. irradiation for 30 seconds and the same

inactivation was caused by heating at  $50^\circ\text{C}$  for 1 h.

The experiment of phage AC-5.1 DNA, which was purified by agarose gel electrophoresis, to the protoplasts of host cell was carried out successfully.

The molecular weight of DNA of phage AC-5.1 was closed to that of phage  $\lambda$  by agarose gel electrophoresis estimation.

### Key words

*Azotobacter chroococcum*; phage; characterization