

检测噬菌体 DNA 法鉴别细菌的溶原性

王家驹 朱素娟 戈宝榛 戴小密 司穉东

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

根据前噬菌体的可诱导性, 将细菌培养物经丝裂霉素 C 诱导, 诱导液滤过除菌, 经核酸酶处理和聚乙二醇 (PEG 6000) 浓缩, 再用苯酚进行抽提。通过检测抽提物中有无 DNA, 以确定菌株的溶原性。实验证明从溶原菌诱导液中可提取 DNA, 同时表明该 DNA 确为溶原菌诱导出的噬菌体 DNA, 而非溶原性菌以同样方法不能取得 DNA。用此方法, 可以作为鉴别细菌溶原性的一个手段。

关键词 溶原性; 前噬菌体可诱导性; 噬菌体 DNA

溶原性细菌在自然界普遍存在, 有些菌类的大多数可能是溶原的^[1]。细菌获得或失去溶原性后, 将改变菌株的某些性状, 如菌株的膜结构^[2], 生化特性^[3], 致病力^[4], 细胞产物^[5]等。因此溶原性的研究在细菌的变异、演化、鉴定、分类、噬菌体与宿主间遗传学联系的探索都非常重要。对溶原性的检查通常是选出溶原性噬菌体的指示菌株^[6], 或选出溶原复愈菌株^[7], 在特别情况下, 将菌株诱导液直接电镜观察有无噬菌体颗粒^[8], 但直接电镜观察由于噬菌体数量所限, 不一定能检测到噬菌体颗粒, 同时也受条件的限制。溶原复愈菌株有时不易选到。溶原性噬菌体指示菌的方法简便可靠, 使用广泛, 但寻找指示菌有偶然性, 当未选到敏感的指示菌之前, 既不能证明菌株的溶原性, 也不能肯定为非溶原性。为了弥补这些缺点, 我们探索用检测噬菌体 DNA 的方法鉴别细菌的溶原性。

材料和方法

(一) 菌株

菌株来源、溶原性状况与噬菌体型别见表 1, 菌株均非噬菌体的携带者。

(二) 培养基

LB 肉汤培养基^[9]。

肉汤琼脂培养基^[10]。

(三) 试剂、药品

核糖核酸酶 (RNase) 与脱氧核糖核酸酶 (DNase), 上海东风试剂厂出品; 聚乙二醇 (PEG 6000) 为日本进口分装; 丝裂霉素 C 为 Kyowa Hakko Kogyo Co., LTD. 产品; Tris 为上海化学试剂采购供应站经销, 新华化工厂分装; 限制酶 EcoRI 为上海东风试剂厂产品。

结 果

(一) 菌培养液的丝裂霉素 C 诱导和 DNA 的抽提

纯化的上述菌株接种 LB 肉汤, 37℃ 静止培养过夜。次日以 1% 量转种到新鲜的 LB 肉汤中, 37℃ 振荡培养至生长对数期。加入丝裂霉素 C 至终浓度为 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (对不同菌株使用的终浓度有差异), 继续振荡培养 3—4 小时。4000 rpm 离心 20 分钟, 上清液经 Millipore (0.45 μm) 滤膜除菌, 滤过后加 RNase 及 DNase 至终浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$, 37℃ 保温 30 分钟。加入 10% PEG

本文于 1984 年 8 月 30 日收到。

表1 金黄色葡萄球菌菌株的溶原性、噬菌体类型与来源

Table 1 Lysogeny, phage type and source of strain *Staphylococcus aureus*

菌株 Strain	溶原性 Lysogeny	噬菌体类型 Phage type	来源 Source
1157	非溶原的菌株 Non-lysogenic	29/52/52A/79/80/81	巴黎巴斯德研究所 Institute Pasteur, Paris
1157-1	噬菌体 α 溶原化的 1157 菌株 1157 lysogenized by phage α	52/52A/79/81	菌株 1157 衍生株 Derivative from 1157
1157-2	噬菌体 β 溶原化的 1157 菌株 1157 lysogenized by phage β	29/81	菌株 1157 衍生株 Derivative from 1157
1157-3	噬菌体 α 与 β 双溶原化的 1157 菌株 1157 lysogenized by phage α and β	81	菌株 1157 衍生株 Derivative from 1157
66	双溶原的菌株 Double lysogenic	—	巴黎巴斯德研究所 Institute Pasteur, Paris
66SAK ⁻	菌株 66 丢失 SAK 转换前噬菌体 α 株 66 lost SAK converting prophage α	29	菌株 66 的衍生株 Derivative from 66
369	未知 Unknown	29/52/52A/79/71/6/42E/ 47/53/77/83A/84/96	上海华山医院抗生素室 Department of Antibiotics, Shanghai Huashan Hospital
196	未知 Unknown	79/53/54/84/85	上海华山医院抗生素室 Department of Antibiotics, Shanghai Huashan Hospital

6000 (W/V) 和 0.5M NaCl, 置冰箱过夜。离心去上清液, 沉淀物用 pH 7.5 0.01 M 的 Tris-HCl 含 0.001 M EDTA 的缓冲液配成悬液, 用该缓冲液饱和的苯酚抽提 2—3 次, 再用乙醚萃取残留的苯酚, 减压去除乙醚, 用冷乙醇沉淀, 低温过夜, 离心去上清液, 沉淀物溶于上述少量缓冲液中, 取样进行琼脂糖凝胶电泳, 100 V, 2.5 小时, 溴化乙锭 (EB) 染色, 紫外灯下检测, 结果见图 1。

8 株菌株中有 6 株抽提到 DNA (1157-1, 1157-2, 1157-3, 66, 66SAK⁻, 196), 2 株 (1157, 369) 没有检测到 DNA。

因诱导液经除菌滤过, 又经 DNase, RNase 处理, 所以检测到的 DNA 可以排除细菌染色体或细胞质中核酸物质 (如质粒等), 而经诱导产生的噬菌体可以通过滤膜, 并有外壳蛋白的保护、不受核酸酶的影响。因此, 上述诱导液的抽提物中如检测出 DNA, 应可能为溶原菌产生的噬菌体

的 DNA, 即菌株是溶原性的。

(二) 8 个菌株诱导液溶原性指示菌的筛选和电镜观察

上述 8 株菌株诱导液抽提物中发现其中 6 株有 DNA 存在, 2 株未检测到 DNA。为确定有 DNA 的是否为溶原菌, 未检测到 DNA 的为非溶原菌, 对诱导液中有无噬菌体, 进行了溶原性指示菌的筛选, 8 株菌间交叉裂解反应结果见表 2。结果表明诱导液抽提物中有 DNA 的 6 株, 包括已知的溶原性菌都有相应的指示菌, 证明是溶原菌。而未检测到 DNA, 也未得到指示菌的 2 株菌 (1157, 369) 继续以噬菌体类型不同的金黄色葡萄球菌株 161 株与不能分型 153 株检查, 均未得到可证为溶原性的指示菌。诱导液经超离心 (35000 rpm) 60 分钟沉淀物, 以磷钨酸负染, 电镜观察也未见典型的噬菌体颗粒。

(三) 酶切诱导液中抽提的 DNA

为证明诱导液中抽提的 DNA 为非宿

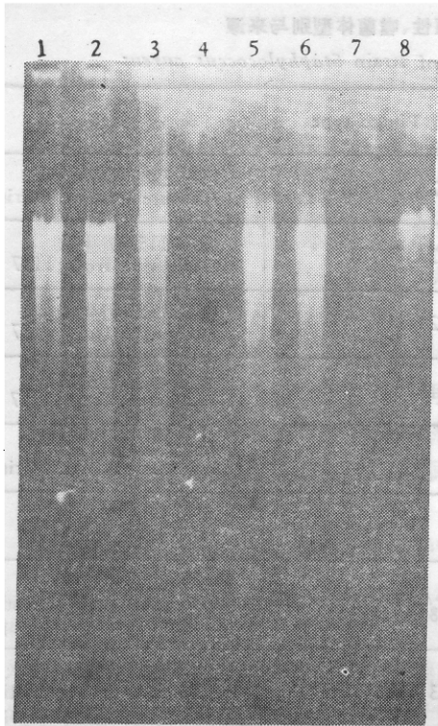


图 1 金黄色葡萄球菌诱导液抽提物中 DNA 的电泳检测

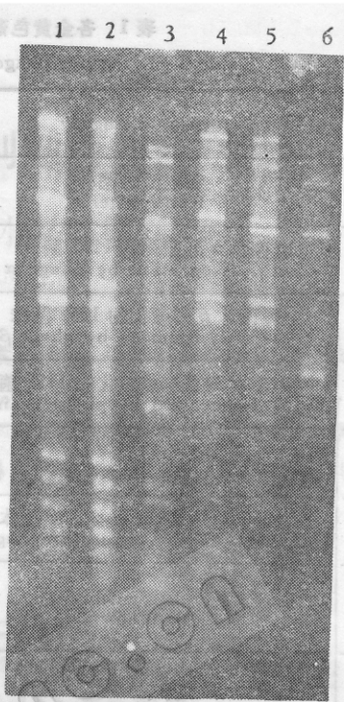


图 2 菌株诱导液中抽提的 DNA 用限制酶 EcoRI 酶切电泳图

Fig. 1 Detection of DNA from induced lysates of *Staphylococcus aureus* by agarose gel electrophoresis

1. 1157-3 2. 1157-2 3. 1157-1 4. 1157
5. 66 6. 66SAK⁻ 7. 369 8. 196

Fig. 2 Gel electrophoresis of *EcoRI* digested DNAs which were extracted from induced lysates of bacteria

1. 1157-3 2. 1157-2 3. 1157-1
4. 66 5. 66SAK⁻ 6. 196

主菌染色体 DNA, 将其 DNA 作酶切^[11]观察。宿主细胞抽提的染色体在限制酶作用后电泳观察, 看不到明显核酸片段带,

而噬菌体或质粒可以切出明显的核酸片段带。6 个菌株诱导液抽提的 DNA 用限制酶 *EcoRI* 酶切电泳图 (图 2) 中都能看到

表 2 菌株诱导液中噬菌体检查的结果

Table 2 Results of examining phage from induced lysates

宿主菌株 Host strain	诱 导 液 Inducing lysate							
	1157	1157-1	1157-2	1157-3	66	66SAK ⁻	369	196
1157	—	+	+	+	+	+	—	+
1157-1	—	—	+	+	+	+	—	+
1157-2	—	+	—	+	+	—	—	+
1157-3	—	—	—	—	—	—	—	+
66	—	—	—	—	—	—	—	—
66SAK ⁻	—	+	—	+	+	—	—	—
369	—	+	+	+	+	+	—	+
196	—	—	—	—	—	—	—	—

“+” 裂解 lysis, “—” 不裂解 no lysis

清楚的核酸片段带, 因此证明了检测到的 DNA 带不是细菌染色体。

(四) 溶原菌 1157-1 与 66 SAK⁻ 的诱导液抽提的 DNA 和其分离得到的相应噬菌体 DNA 用限制酶 *EcoRI* 酶切比较

从 6 个菌株诱导液抽提的 DNA 用限制酶 *EcoRI* 酶切电泳表明, 既然不是溶原菌株的染色体, 是否为溶原菌诱导产生的噬菌体的 DNA? 取其中 2 株溶原菌 (1157-1 与 66 SAK⁻) 诱导液抽提的 DNA 和其诱导产生的噬菌体经单斑分离纯化

后, 在相应指示菌上增殖的噬菌体, 抽提其 DNA 进行酶切比较 (图 3)。溶原菌诱导液抽提的 DNA 经限制酶酶切电泳图和增殖的相应噬菌体抽提的 DNA 酶切电泳图是相同的, 表明菌株诱导液抽提得到的 DNA 确为诱导产生的溶原性噬菌体的 DNA。

根据以上结果分析, 用诱导液抽提 DNA 的方法可以作为鉴别细菌溶原性的一个手段。

讨 论

鉴别菌株的溶原性通常是从相应的指示菌检查溶原菌产生的噬菌体, 只是在特殊情况下, 电镜直接观察诱导液有无噬菌体颗粒, 但电镜观察噬菌体必须有足够的浓度和一定的纯度。以指示菌检查噬菌斑的方法简便, 灵敏, 但首先须得到相应的指示菌, 自然分离或选取溶原性治愈株, 都有一定偶然性, 在未得到之前, 对菌株的溶原性不能得出结论。因此建立一个既不需要指示菌, 又不必用电镜鉴别菌株的溶原性的方法有一定意义。

检测噬菌体 DNA 法鉴别菌株溶原性, 是检测溶原菌诱导液中噬菌体 DNA 存在, 以证明细菌溶原性。因此需要诱导液中有一定数量的噬菌体颗粒, 调节丝裂霉素 C 的浓度可得到较高效价噬菌体的诱导液, 但个别菌株诱导液的噬菌体效价太低时, 就需要更大体积的诱导液供浓缩和抽提 DNA。实验结果表明: 菌株诱导液除菌滤过, 核酸酶处理, 浓缩和苯酚抽提得到 DNA 确为诱导液中噬菌体 DNA。

检测噬菌体 DNA 法鉴别菌株溶原性, 不需特殊设备, 也不受找指示菌的限制。通过酶切电泳比较, 还可确定不同菌株中前噬菌体的异同, 因此可能有一定的实用意义。

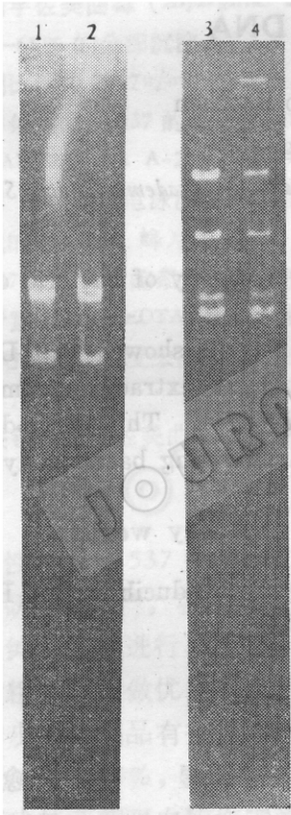


图 3 溶原菌 1157-1, 66 SAK⁻ 诱导液的 DNA 及其分离得到相应噬菌体抽提的 DNA 酶切比较

Fig. 3 Comparison of agarose gel electrophoresis of *EcoRI* digested DNAs from induced lysates of lysogens

1157-1, 66SAK⁻ with that extracted from phage ϕ 1157-1/1157, ϕ 66 SAK/1157

Lane 1, 3 induced lysate of lysogens 1157-1, 66SAK⁻ DNAs

Lane 2, 4 phage ϕ 1157-1/1157, ϕ 66 SAK⁻/1157 DNAs

参 考 文 献

- [1] Coles, H. H. et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 20: 832, 1957.
 [2] Robbins, P. W. et al.: *Biochemistry*, 1: 323, 1962.
 [3] Rosendal, K. et al.: *Nature*, 204: 1222, 1964.
 [4] Freeman, V.: *J. Bacteriol.*, 61: 675, 1951.
 [5] Kondo, I. et al.: *Infect. Immun.*, 18: 266, 1977.
 [6] Eisenstark, A.: *Methods in Virology*, Academic press, New York and London, p. 510, 1967.

- [7] Kondo, I. et al.: *Jikeikai Med. J.*, 23: 223, 1976.
 [8] Mathews, M. M. et al.: *Virology*, 29: 402, 1966.
 [9] Miller, J. H.: *Experiments in molecular genetics* Printed in the United States of America, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 433, 1972.
 [10] 王家驹等: 病毒学集刊, 1: 137, 1982.
 [11] 陈剑民等: 遗传学报, 8(3): 189, 1981.

IDENTIFICATION OF BACTERIAL LYSOGENY BY
DETECTING PHAGE DNA

Wang Jiaxun Zhu Sujuan Go Baozhen

Dai Xiaomi Si Zhidong

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

According to the inducibility of prophage, bacterial strains were induced by Mitomycin C. The induced Lysate of lysogen was centrifuged to remove the bacterial debris. The supernatant was filtered through Millipore filter (0.45 μ m) and treated by RNase and DNase, and then concentrated by PEG 6000. Pellet was dissolved in TE buffer and extracted by phenol saturated with TE buffer. Through detecting the existence of DNA in this ex-

tract, The lysogeny of bacteria can be determined.

Experiments showed that DNA from phage could be extracted from induced lysate of lysogen. This method could be used for identifying bacterial lysogeny.

Key words

Lysogeny; Inducibility of Prophage;
Phage DNA