

苏芸金杆菌噬菌体温度敏感突变株的 筛选及其某些特性的鉴定

郜金荣 张珈敏 杨复华 廖华乐 杜红 吴柏桦

(武汉大学病毒学及分子生物学系,武汉)

筛选突变体是对生物进行遗传学研究的一个重要手段。

1957年 Jacob 等研究了 λ 噬菌体的“缺陷突变”^[1], 1961年 Campbell 分离了噬菌体的“敏感”突变体, 其中有宿主敏感突变体、温度敏感突变体(ts)和 pH 敏感突变体^[2]。1964年 Epstein 等研究了大肠杆菌噬菌体的琥珀突变(am)在 *E. coli* K-12 中能繁殖而在 *E. coli* B 株中则不能完成生长周期^[3]。这些突变都属于条件致死突变。在 ts 突变方面不少人曾作了深入研究。以后又有许多人^[4-6]分别对噬菌体 T₄D ts 突变进行了分离及遗传特性研究, 并且发现 ts 突变广泛分布在 T₄D 整个基因组中很多不同的基因上, 但其分布并不是随机的^[4-6]。到目前为止, 尚未见到有关苏芸金杆菌噬菌体 ts 突变体的报道。

我们利用 5-溴脱氧尿苷(5-BUDR) 诱变苏芸金杆菌噬菌体, 以苏芸金杆菌 1189 为宿主, 通过改变温度培养, 初筛出 24 个 ts 突变体, 根据突变体和野生型噬菌体在不同温度下的效价和形成噬菌斑能力的比较, 对它们之中的一部分进行了温度敏感特性鉴定。

材料和方法

(一) 材料

1. 噬菌体: 野生型苏芸金杆菌噬菌体由武汉大学病毒学及分子生物学系病毒学教研室提供。宿主菌苏芸金杆菌 1189 菌株由武汉大学生物系微生物教研室提供。

2. 诱变剂: 5-溴脱氧尿苷(美国) 0℃ 以下保存备用。

3. 培养基: H 肉汤, 每升含有: 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 2g, K₂HPO₄ 1g, 琼脂(上层) 8g 和(底层) 20g。

(二) 方法

1. 指示菌的制备: 从 1189 菌斜面接种一环

于 20ml 液体培养基中, 28℃ 通气培养过夜, 按 10% 接种量转种于摇瓶中, 28℃ 通气培养 6—8 小时, 直接使用。

2. 噬菌体纯化: 将 0.1ml 噬菌体加到上述培养的 0.2ml 苏芸金杆菌中, 倒双层平板, 28℃ 培养过夜, 挑取直径为 4mm 的噬斑。将此噬斑再经四次纯化, 最后得稳定的 4mm 直径噬斑的噬菌体, 作为诱变用原种。

3. 噬菌体的制备: 将纯化的噬菌体以感染系数为 1:5 倒双层平板, 28℃ 培养过夜, 刮取上层琼脂, 加 H 肉汤浸泡, 加入 5% 氯仿, 4000r/min 离心取上清液, 测效价, 冰箱保存备用。

4. 噬菌体的诱变: 在对数生长期的苏芸金杆菌 1189 中(1×10^8 细胞/ml), 加入等量的噬菌体原液 (2×10^9 /ml), 再加入 5-BUDR, 使最终浓度为 1mg/ml, 混合物在 30℃ 通气培养 90 分钟, 加几滴氯仿助裂解, 稀释终止诱变, 同时以不加诱变剂的一份作对照, 分别测效价, 1mg/ml 5-BUDR 的诱变剂致死都在 99% 以上。诱变裂解液 4℃ 保存备用。

结 果

(一) ts 突变株的分离

将诱变后的裂解液倒双层平板(每皿 30—60 个噬斑), 先于 28℃ 培养 7—8 小时, 噬菌斑出现后, 转置 37℃ 继续培养 8—12 小时, 结果出现两种类型噬斑, 一类直径为 4mm 的大斑, 这是野生型噬菌体在 37℃ 仍然能继续增殖而形成的。另一类是直径在 1mm 以内的噬斑, 可能是 ts 突变所致, 在低温(28℃)下可增殖而在高温(37℃)则不能生长。

随机挑取 100 个直径 1mm 以内的噬斑, 分别置于 H 肉汤试管中, 取两个上层混有指示菌的双

本文于 1986 年 7 月 27 日收到。

层培养皿,将上述 100 个样品分别点种于 100 个小格内(一式两份),分别在 30°C 和 37°C 培养 24 小时。以野生型作对照,在低温能形成噬斑而在高温下不能形成噬斑的初定为 t_s 突变株。

(二) t_s 突变株的鉴定

参考 Edgar 等人的方法^[4-6],在不同温度下测噬菌体效价,以野生型(W)作对照。对其中几个待测样品 B1、B21 和 B24 的鉴定结果如表 1。

表 1 在不同温度下的效价

噬菌体	效 价			
	30°C	34°C	35°C	37°C
B1	10^{13}	10^{11}	10^7	10^1
B21	10^{13}	10^{13}	10^{10}	10^2
B24	10^{13}	10^{13}	10^{11}	10^2
W	10^{13}	10^{13}	10^{11}	10^{10}

(三) 温度敏感特性测定

采用点滴法,将待测的 t_s 突变株样品逐个点加在细菌平板上,分别置于不同温度下培养,以噬菌体能否形成噬斑作为指标。首先在间隔大的几

个温度下培养,初步确定各样品的温度敏感范围。然后再以同样方法在其敏感温度下培养,测定其形成噬斑能力,结果如表 2。

讨 论

1. 从随机挑取的 100 噬斑中初筛出的 24 个突变株,在非限制温度下形成噬斑而在限制温度下大部分都不形成噬斑,但有两株在 37°C 中形成非常小的噬斑,形成的数量也极少,这一特性几乎是恒定的,这与 Edgar 等^[4]在 1964 年的报道一致,他们称这类 t_s 突变为“渗漏”突变株。所有 t_s 突变株都有这样的特性,在接近限制温度中形成的噬斑都很小。

2. 采用在不同温度下噬菌体效价的比较方法与 Edgar 等在 1964 年介绍的用噬菌体在不同温度下裂解量的比较来鉴定 t_s 突变株方法是一致的。因为只要接种量一定,培养时间一定,在某一温度下裂解量大的噬菌体其效价就高。方法简便易行,较为适用。

参 考 文 献

- [1] Jacob, F. et al.: *Ann. Inst. Pasteur*, 93: 724—753, 1957.
- [2] Cambell, A.: *Virology*, 14: 23—32, 1961.
- [3] Epstein, R. H. et al.: *Scientific American*, 212 (2): 71—78, 1965.
- [4] Edgar, R. S. & I. Lielausis: *Genetics*, 49: 649—662, 1964.
- [5] Epstein, R. H. et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28: 375, 1963.
- [6] Edgar, R. S. et al.: *Genetics*, 49: 635—643, 1964.

表 2 形成噬斑能力

噬菌体	噬斑形成能力				
	30°C	34°C	35°C	36°C	37°C
B1	+	+	-	-	-
B13	+	+	+	-	-
B21	+	+	+	+	-
B24	+	+	+	+	-
W	+	+	+	+	+