

两株枯草芽孢杆菌的噬菌体

那淑敏 贾盘兴 余茂劲

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从三门峡酶制剂厂分离到与过去形态不同的两种噬菌体 BS31 和 BS32。BS31 有收缩尾梢, 头部为六边形; BS32 有复杂的短尾, 形态与 $\phi 29$ 相似, 寄主范围窄且有差异, 用限制酶分析, 噬菌体 DNA 的分子量分别为 62kb 和 17kb。根据解链温度计算噬菌体 DNA 的 G + C 含量分别为 45.7mol% 和 40.7mol%。两株噬菌体的结构蛋白经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定, BS31 有 2 条主带, 10 条次带; BS32 有 3 条主带和 6 条次带。

关键词 枯草芽孢杆菌; 噬菌体; 限制内切酶

以前报道的一些枯草芽孢杆菌 BF7658 噬菌体具有不同大小和形态的长尾噬菌体^[1], 1987 年底, 从三门峡酶制剂厂污水污物及酶粉中分离到与过去报道的噬菌体形态类型不同的两株, 对其特性进行了研究。

材料和方法

(一) 菌株

Bacillus subtilis BF7658 来自无锡酶制剂厂, 其它所用菌株为本组保存。

(二) 培养基

用于培养细菌和测定噬菌体效价的培养基为(%) : 牛肉膏 0.5, 鱼蛋白胨 1, NaCl 0.5, pH7.0, 上下层培养基分别加 1% 和 2% 琼脂。

大量培养噬菌体采用 LB 培养基。

(三) 分离方法

按常用方法^[2]对三门峡酶制剂厂的样品进行检查, 测定的敏感寄主为 *Bacillus subtilis* BF7658 和抗噬菌体菌株 K5。

(四) 寄主范围测定

取效价为 10^3 pfu/ml 的噬菌体液按双层琼脂法测定^[2]。

(五) 病毒的稳定性的测定

(六) 电镜观察

用附有碳膜的铜网粘噬菌斑, 然后用 2% PTA 进行负染, 在日立 H500 型电镜下观察。

(七) 噬菌体的提纯和浓缩

用 PEG6000 浓缩噬菌体, 并用甘油梯度纯化噬菌体^[3]。

(八) 噬菌体 DNA 的分离^[3]

(九) G + C 含量的测定

提取的 DNA 样品溶解在 $1 \times \text{SSC}$ 溶液中 ($0.15 \text{ mol/L NaCl} + 0.015 \text{ mol/L}$ 柠檬酸钠) 并用同一缓冲液将 DNA 稀释成 $15-20 \mu\text{g/ml}$, 用 SU-7 型紫外-可见分光光度计测定解链温度, 噬菌体的碱基组成按 Mandel Marmer^[4] 的公式计算。

(十) 限制酶酶切和琼脂糖凝胶电泳

EcoRI 系生物物理所产品, λ DNA 来自 BRL 公司, sppl DNA 由本所郑文尧制备和提供。两株噬菌体的 DNA 在通常的高盐缓冲液中, 用 EcoRI 在 37°C 消化 1h 后, 取 $10 \mu\text{l}$ 样品, $3 \mu\text{l}$ 溴酚兰染料在加有 EB 的 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳 5h, 缓冲液为 TAE, 紫外灯下观察凝胶上出现的 DNA 区带, 并照相记录。

本文于 1988 年 9 月 1 日收到。

(十一) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

参照 Kadota^[9] 的方法进行。

结 果

从三门峡酶制剂厂分离到两株侵染 BF7658 的噬菌体, 编号为 BS31 和 BS32。

(一) 寄主范围

BS31 和 BS32 分别对芽孢杆菌属的 11 个种 (*B. subtilis*, *B. anthracoides*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. natto*, *B. globigil*, *B. polymyxa*) 的 21 株菌进行感染测定。其中只有两株 *B. subtilis* BF7658 和 *B. natto* AS1.1086 可同时被两株噬菌体侵染。除上述两株菌外, BS31 可侵染 *B. subtilis* K5、*B. cereus* AS.1.268 和 *B. licheniformis* AS.1.934, BS32 可侵染中性蛋白酶生产菌 *B. subtilis* AS.1.398。

(二) 噬菌体的稳定性

两株噬菌体的 pH 适应范围和稳定性不同。BS31 在 pH 5—8 之间较稳定, 存活率达 90% 以上, 而 pH 4 和 pH 9 时存活率分别为 1.42% 和 10.4%。BS32 在 pH 5—11 稳定, pH 4 时存活为 6.3%。

两株噬菌体在低温保存, 存活率显著不同, BS31 在 4℃ 下放置两星期, 失活 99% 以上。在 20% 甘油中 -20℃ 保存一个月, 几乎全部失活。但 BS32 较稳定, 可在 4℃ 下长期保存。

为了了解温度对它们的影响, 将 BS31 在 60℃ 处理 10min, 100% 失活; 50℃ 处理 1h, 存活 50% (图 1)。BS32 60℃ 处理 1h, 存活 0.026%; 70℃ 处理 1h, 几乎全部失活。

氯仿对这两株噬菌体均有显著影响, BS31 和 BS32 经氯仿处理 10min 后, 存活率分别为 12.7% 和 16.6%。

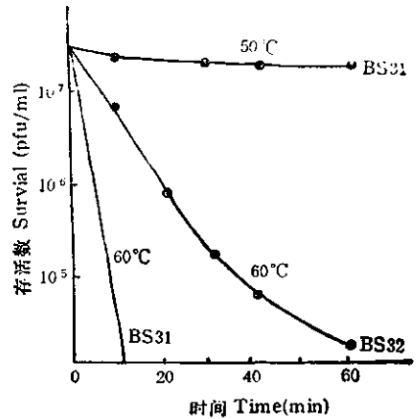


图 1 噬菌体的热失活曲线

Fig. 1 Thermal inactivation of phages

(三) 噬菌体形态

两株噬菌体的噬菌斑形态不同; BS31 噬菌斑中度透明, 圆形, 直径 1—1.5mm;

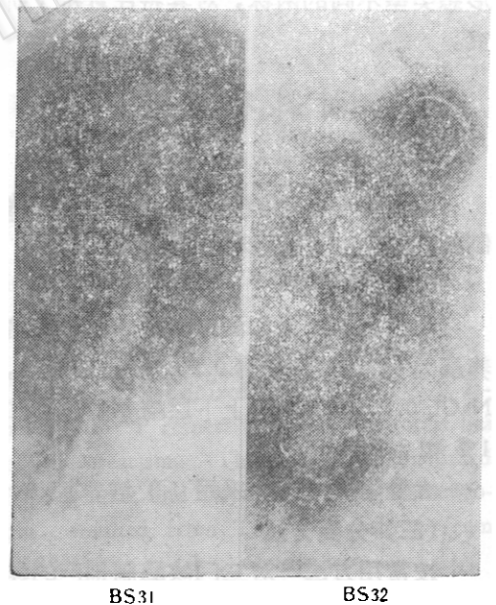


图 2 BS31 和 BS32 噬菌体的形态(200000×)

Fig. 2 Electron micrographs of phages BS31 and BS32(×200000)

BS32 噬菌斑有呈白色的同心圈, 直径 1—2 mm, 易于辨认。

在电镜下观察到 BS31 噬菌体尾鞘收缩为全尾的 1/2, 露出空心尾管, 基片处有几支刺突, 头部呈六边形的二十面体 (图 2); BS32 为短尾噬菌体, 形态与枯草杆菌噬菌体 $\phi 29$ 相似^[7], 略大于 $\phi 29$, 具有较延长的六边形头部, 头部周围放射出刺状物, 颈部附有 12 支棒状结构, 包围在一个短粗的尾部四周 (图 2)。

根据 Ackermann 和 Eisenstark 修正的形态分类法, BS31 和 BS32 分别属于 A1 和 C2 型。

(四) 噬菌体的蛋白组成

提纯的噬菌体经 SDS 聚丙烯酰胺凝

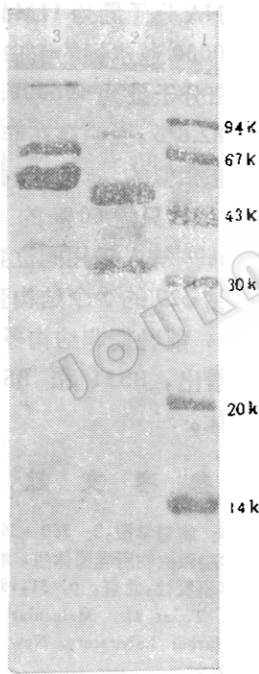


图 3 BS31 和 BS32 结构蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE patterns of structural protein of BS31 and BS32

1. Marker; 2. BS32; 3. BS31

胶电泳发现, 两株噬菌体的结构蛋白数目与分子量均不相同, BS31 噬菌体的结构蛋白有 2 条主带, 分子量分别为 72000

和 61000。至少还有 10 条次带, 其分子量分别为: 57000、48000、42000、41000、30000、28000、25000、23000、19000、18000 (图 3); BS32 呈现 3 条主带, 分子量分别为: 80000 55000、37000, 6 条次带的分子量分别为 74000、69000、50000、49000、41000 和 40000。这两株噬菌体的结构蛋白数目、带形及其分子量与前述 6 株^[2]噬菌体有显著区别。

(五) 噬菌体 DNA 的特性

琼脂糖凝胶电泳表明, BS31 和 BS32 经酶切后显示不同区带 (图 4), 以噬菌体 *spp1* DNA 及 λ DNA 的 *EcoRI* 酶切片段为标准分子量, 比较测算两株噬菌体 DNA 的分子量, 从解链曲线测出 T_m 值, 求出相

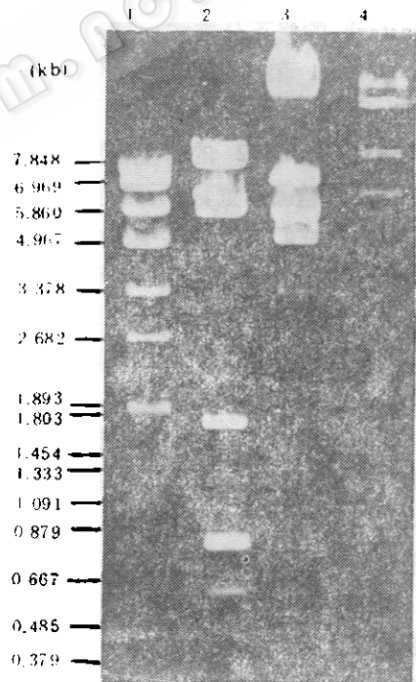


图 4 噬菌体 DNA 的 *EcoRI* 酶切电泳图

1. *EcoRI* 酶解的 *spp1*-DNA; 2. BS32DNA; 3. λ DNA; 4. BS31DNA

Fig. 4 Pattern of *EcoRI*-digested DNA fragment on agarose gel
EcoRI-digested maps of: 1. *spp1*DNA; 2. BS32DNA; 3. λ DNA; 4. BS31DNA

表 1 两株噬菌体的物理特性
Table 1 Physical characteristics of two phages

噬菌体 Phage	形态类型 Type	大小 Size(nm)		片段数 No. of Fragment	分子量 MW (kb)	DNA G + C 百分含量 (G + C%)	解链温度 T _m (°C)
		头部 Head	尾部 Tail				
BS31	A1	95×95	195	4	62	45.7	88.5
BS32	C2	42.5×50	45×10	5	17	40.7	86.0

应的 G + C 含量(表 1)。

讨 论

有关枯草芽孢杆菌 BF7658 的噬菌体已有报道。我们在三门峡酶制剂厂又分离到两株噬菌体,在形态结构和大小方面与前 6 株噬菌体^[1]不同。根据 Ackermann 和 Eisenstark 的修正分类法,前 6 株长尾噬菌体与 BS31 和 BS32 分属于 B2, A1 和 C2 型。

BS31 和 BS32 的寄主范围比过去所分离的 6 株噬菌体宽,在所测定的 11 株芽孢杆菌中,它们能侵染其中 4 个种内的不同菌株,但对同属的其它菌株均不能侵染,这表明它们的寄主范围专一性强。但 BS31 和 BS32 能分别侵染抗噬菌体菌株 K5 和中性蛋白酶生产菌株 AS1.398,所以当这两株噬菌体同时存在时,使用抗株 K5 和 AS1.398 菌株对生产不利。尽管噬菌体 BS31 不稳定,但它在酶粉中大量存在,在一定时间内可能对生产造成威胁。

BS31 和 BS32 的 pH 适应范围较窄,耐热较差,提示改变 pH 与温度相结合的措施,有可能在生产中作为控制噬菌体的一种简易手段。

由于噬菌体的外壳蛋白对它所包含的核酸具有保护作用,BS31 和 BS32 的热失活曲线明显不同,说明它们的蛋白质亚基结构不同,其结构蛋白的电泳结果更确

认了这一点。颗粒较大的 BS31 结构蛋白分子量小于颗粒小的 BS32 的结构蛋白,这可能就是噬菌体 BS32 耐热性较差的原因之一。实验结果并未指示 G + C 含量的高低与噬菌体的耐热性有一定相关。

BS32 DNA 分子量为 11Md,足以编码分子量为 600000 道尔顿的蛋白,而实际测得的结构蛋白分子量为 496000,只占 DNA 编码能力的 82.6%,说明存在非结构蛋白。与 BS32 形态相似的 $\phi 29$ 噬菌体结构蛋白有 6—7 条带,只需 60% 的 DNA 编码能力^[2]。Pene^[3] 等人采用同位素标记侵染的方法已发现 $\phi 29$ 的 7 个结构蛋白组分及 10 条早期及 4 条晚期非结构多肽。从以上结果可以看出,BS31 和 BS32 为两株不同的噬菌体。

参 考 文 献

- [1] 贾盘兴等: 病毒学报, 2: 360—365, 1986.
- [2] 中国科学院微生物研究所噬菌体组, 噬菌体及其防治, 科学出版社, 北京, p. 31, 1973.
- [3] Maniatis, T. et al.: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p. 80—85, 1982.
- [4] Mandel, M. et al.: *Methodes in Enzymology*, 12B: 195, 1968.
- [5] Kadota, M. S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 669—674, 1983.
- [6] Ackermann, H. W. et al.: *Intervirology*, 3: 201—219, 1974.
- [7] Bradley, D. E.: *Bacteriol. Rev.*, 31: 230—314, 1967.
- [8] Alvarez, G. E. et al.: *J. Gen. Virol.*, 39: 257—315, 1975.

PROPERTIES OF TWO *BACILLUS SUBTILIS* BACTERIOPHAGES

Na Shumin Jia Panxing Yu Maoxiao

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Two lytic bacteriophages of *Bacillus subtilis* BF7658 were isolated. Their morphology, biological properties and physicochemical characteristics of their DNAs were compared. Electromicroscopic observation indicated that BS31 has a hexagonal head and contracted tail sheath, BS32 is a complex short-tailed phage and similar to ϕ 29 but differs from ϕ 29 in size and other properties. Two phages have a narrow spectrum of host range. The molecular weight of BS31 and BS32 DNAs are 62kb and 17kb respectively by EcoRI endonu-

lease analysis. The G+C content of the DNAs are 45.7%(BS31) and 40.7%(BS32). Structural proteins of BS31 gave two major bands and at least ten minor ones; BS32 gave three major bands and six minor ones by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Key words

Bacillus subtilis; Bacteriophage; Endonuclease