

短小芽孢杆菌缺陷噬菌体

蒋如璋 樊庭玉

(南开大学生物系,天津)

经丝裂霉素 C 诱发和 CsCl 密度梯度离心,得到了短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 噬菌体 PPO。该噬菌体具有典型的 20 面体的头部,长而可收缩尾鞘的尾,尾鞘的下端附有基板及尾丝。噬菌体 DNA 的限制核酸内切酶酶切电泳及其与宿主基因组 DNA 之间的分子杂交结果证明,噬菌体 PPO 颗粒内包裹的是寄主 DNA,因而它是一缺陷噬菌体。

关键词 短小芽孢杆菌;缺陷噬菌体;噬菌体 PPO

缺陷噬菌体广泛分布于自然界,但由于这类噬菌体不能在任何菌株中繁殖,因而不能采用一般的噬菌体操作技术来研究它们,只有通过物理或化学因子处理,诱导宿主菌裂解,才能制备足够量的供研究用的噬菌体颗粒。据报导至少已对 15 个属 22 种细菌携带的缺陷噬菌体进行电镜观察或采用其他分子生物学技术进行了研究^[1]。许多缺陷噬菌体具有复杂的结构和生理特性,携带者通常对同源噬菌体免疫,有的还能抑制近缘物种的生长^[2]。

缺陷噬菌体按其形态结构和所包裹的核酸的性质,又可分为不同类型^[1],其中的一类噬菌体颗粒内包裹的只是宿主 DNA。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 缺陷噬菌体 PBSH^[3-5] 和地衣形芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 缺陷噬菌体 PBLB^[6] 属于这一类型,推测这类噬菌体起源于普遍性转导噬菌体。

短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 209 能被丝裂霉素 C 诱导,并释放出形态结构均一的噬菌体颗粒 PPO。本文报道通过电镜观察、限制内切酶酶切电泳和 DNA 分子杂交等方法证明所携带的噬菌体 PPO 是一种只包裹宿主 DNA 的缺陷

噬菌体。

材料和方法

(一) 菌株和培养基

B. pumilus 209 系本室保藏, LB 培养基^[7]被用作宿主菌培养及噬菌体诱导试验。

(二) 噬菌体诱导释放及纯化

基本操作按 Haas^[3] 等方法略加修改。过夜培养物用 LB 培养基稀释 100 倍, 37℃ 摇床培养至 OD₆₀₀ = 0.4, 加入丝裂霉素 C (0.8 μg/ml), 继续培养 20 min, 离心弃上清液, 并重悬于等体积的新鲜预热的 LB 培养基中, 37℃ 摇床培养至裂解 (约 3—4 h)。收集裂解液, 加入 1 mol/L NaCl 和 10 mmol/L MgCl₂, 8000 r/min 离心 15 min。上清液中加入 9% PEG6000, 8000 r/min 离心 20 min, 所得沉淀溶于噬菌体缓冲液 (含 10 mmol/L MgCl₂ 的 1% NH₄AC) 中, 加入 DNA 酶和 RNA 酶各 50 μg/ml, 37℃ 水浴保温 30 min, 加入 20 mmol/L EDTA 后, 以氯仿抽提两次, 上清液以 26,000 r/min CsCl 密度梯度离心 120

本文于 1989 年 4 月 3 日收到。

min; 用注射器分别收集不同的带, 并对噬菌体缓冲液充分透析备用。

(三) DNA 的制备

噬菌体 DNA 制备按 Maniatis 等^[7]方法; 细菌 DNA 制备按 Palva 方法^[8]。

(四) 电镜 (EM) 观察

噬菌体样品以 2% 磷钨酸负染 Imin, 以 Philips EM400ST 电镜观察。

(五) DNA 分子杂交

DNA 分子杂交按 Maniatis 等^[7]进行。缺口转译试剂盒购自北京福瑞诊断试剂公司。

(六) 酶及试剂

限制核酸内切酶、DNA 酶、RNA 酶和链霉菌蛋白酶 K 购自华美生物工程公司; 丝裂霉素 C 购自日本 Kiowa Hakko Kogyo 公司。

结 果

(一) 电镜观察

噬菌体颗粒 PPO 悬液经 CsCl 密度梯度离心后, 在合适的灯光下明显区分为轻重两条带。在电镜下可见轻带为仅含可

收缩尾鞘的尾部(图 1), 尾管由尾鞘两端伸出, 较短的与头部连接的一侧的端部呈火柴头状膨大(图 1)。重带为噬菌体颗粒(图 2), 头部呈 20 面体(图 2), 其各部大小见表 1。尾鞘的下端附有基板及几根尾丝(图 2), 尾鞘与头部之间的距离在不同噬菌体颗粒之间表现明显的差异, 似乎尾鞘可以沿尾管上下移动。



图 1 噬菌体 PPO 的尾部形态
Fig. 1 Morphology of tail phage PPO,
detailed explanation in context
(Magnification 75000x)

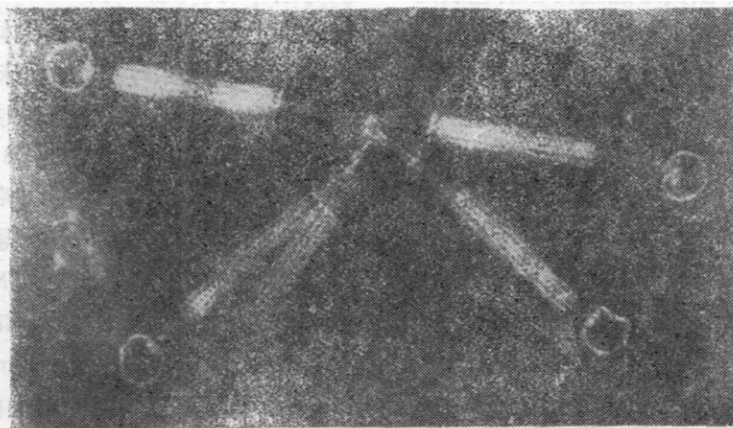


图 2 噬菌体颗粒的形态结构(说明见正文)
Fig. 2 Morphology and structure of phage PPO (Explanation in detail
in the context, Magnification 250 000x)

表 1 噬菌体 PPO 各部位的大小

Table 1 Dimensions of phage PPO particles

部位 Part	大小 Size (nm)
头部直径 Head	33
尾轴 Tail core	7×210
尾鞘 Sheath	17×120

(二) 噬菌体 PPO DNA 的性质

由未经酶切的噬菌体 PPO DNA 的

凝胶电泳带的位置推测其分子量为 10—15kb。经限制核酶内切酶 EcoRI 酶切后, 在琼脂糖凝胶电泳板上不显示特有的带型, 而是依酶切程度不同呈现分子量由大至小均一的区带(图 3-A)。当以 ^{32}P 标记的宿主菌 DNA 为探针与噬菌体颗粒 DNA 杂交时, 所得结果证明二者是同源的(图 3-B)。从而证明了噬菌体 PPO 是一种只包裹宿主 DNA 的缺陷噬菌体。



图 3 噬菌体 PPO DNA 的凝胶电泳 (A) 和 Southern 印迹分析 (B) 以 ^{32}P 标记的宿主 DNA 为探针) 图中 1,5 为分子量标准: SPP1 DNA/EcoRI; 2,6 PPO DNA/EcoRI; 3,7 PPO DNA/EcoRI; 4,8 为宿主基因组 DNA/EcoRI

Fig.3 Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blotting analysis (B) of phage particle PPO (^{32}P -labeled host DNA was used as probe) Lane 1, 5. Molecular weight marker: SPP1 DNA/EcoRI; Lane 2,6. PPO DNA; lane 3,7. PPO DNA/EcoRI; Lane 4,8. Host genome DNA/EcoRI

讨 论

短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 209 噬菌体 PPO 具有典型的形态结构: 20 面体的头部和长而收缩尾鞘的尾。在尾鞘的下端附有基板和尾丝。这种形态结构与曾经深入研究过的 *B. subtilis* 缺陷噬菌体 SPBH 十分相似。限制核酸内切酶酶切电泳及 DNA 分子杂交结果表明, 该噬菌体 DNA 与宿主菌基因组 DNA 同源, 从而

证明它是一种缺陷噬菌体。

有趣的是当以同样方法处理 *B. pumilus* 289 时, 所释放出的噬菌体颗粒与 PPO 几乎无区别。已知这两株 *B. pumilus* 菌株是我国不同科学工作者在不同时间由不同地点分离出的碱性蛋白酶产生菌株, 联系到其噬菌体颗粒与 SPBH 的相似性, 这似乎可以解释为芽孢杆菌属不同菌株在进化上的同源关系。因此, 进一步比较研究不同来源缺陷噬菌体的衣壳蛋白和尾

部蛋白的特性或许对此能提供新的线索。

参 考 文 献

- [1] Garro, A J. et al.: *Cell Physio.*, **76**: 253—264, 1970.
- [2] Okamoto, K. et al.: *J. Mol. Biol.*, **34**: 413—428, 1968.
- [3] Maas, M. et al.: *J. Virol.*, **3**: 233—247, 1969.
- [4] ————— *Ibid.*, **3**: 428—260, 1969.
- [5] ————— *Ibid.*, **4**: 844—850, 1969.
- [6] Huang, W. et al.: *J. Virol.*, **5**: 237—246, 1970.
- [7] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning* Cold Spring Harbor Lab., New York, p. 382, 1982.
- [8] Palva, I.: *Gene*, **19**: 81—87, 1981.

DEFECTIVE BACTERIOPHAGE PPO IN *BACILLUS PUMILUS*

Jiang Ruzhang Fan Tinyu

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin)

Defective bacteriophage PPO in *B. pumilus* was prepared by mitomycin C induction, followed by CsCl density gradient centrifugation. The morphology of the phage consists of isosahedral head, tail with contractable sheath, and base plate with fibles attached to distal of the sheath. The result of hybridization of DNA extracted from phage particles with host DNA labeled with ^{32}P showed that

were homologous. Therefore author considered bacteriophage PPO is a defective one in *B. pumilus*.

Key words

Bacillus pumilus; Defective bacteriophage; Bacteriophage PPO