

嗜碱芽孢杆菌 42-14 噬菌体的分离及其特性

陶涛* 陆志宇

(武汉大学病毒系, 武昌)

极端环境微生物因有开发价值而受到人们的重视。从 1969 年开始, 日本学者 Koki Horikoshi 等^[1]对嗜碱微生物 (alkaliphilics) 进行了系统研究。1978 年 Koki Horikoshi 分离到第一株能感染嗜碱芽孢杆菌的噬菌体 AL-K-1, 并进行了初步研究^[2]。在以后的 10 年里, 嗜碱菌噬菌体的研究未见报道。本文报道了从武汉地区土壤中分离到的一株能感染嗜碱芽孢杆菌 42-14 的噬菌体 AL-W-1。

材料和方法

(一) 菌株

嗜碱芽孢杆菌 42-14 (武汉大学陈毅润教授馈赠, 从黑龙江采集的土样中分离所得)。

(二) 培养基和噬菌体保藏液

1. 嗜碱细菌生长培养基 (M-1) 和噬菌体生长培养基: 按文献[2]。

2. 噬菌体保藏液: 无琼脂的 M-1。

(三) 噬菌体的分离、原液制备及纯化

将不同来源的 3g 碱性土壤分别加入盛有 20ml M-1 培养基的三角瓶中, 再加 1ml 42-14 过夜培养液, 30℃ 振荡培养 48 小时, 3000 r/min 离心 15 分钟, 取 1ml 上清液与 0.5ml 菌液混合, 室温静置 2 小时, 然后加 4ml 上层培养基, 充分混匀, 铺平板。放置 37℃ 培养 24 小时, 待噬菌斑出现, 再连续三次挑单斑纯化。

噬菌体原液用固体法制备^[3]。

用甘油梯度法纯化噬菌体: 加 7ml 噬菌体原液在预制好的 5%—40% 的甘油梯度上, 日立 RPS40T 转头 35000 r/min 离心 1 小时 (4℃)。去掉甘油, 沉淀重悬于 0.1ml PDB 中, 此时噬菌体的效价为 10¹¹ pfu/ml, 透析后保存。

(四) 宿主范围测定

取效价为 10⁷ 和 10⁸ (pfu/ml) 的噬菌体液按双层法^[4]测定, 以 42-14 菌株为对照。

(五) 热稳定性测定

按余茂勋等^[5]的方法, 处理介质为 pH10 的 1% 蛋白胨。

(六) pH 稳定性测定

方法按文献[5], 处理介质按文献[2]。

(七) 噬菌体核酸提纯、定性及 T_m 值的测定

1. 提纯: 按贾盘兴等^[6]的方法。

2. 定性: 按孟小林等^[7]的方法。

3. T_m 值及 G + C 含量的测定: 参照 Davis^[8]方法制备透析袋, 然后加核酸溶液于透析袋中 (28μg/ml) 对 1×SSC 溶液透析, 每隔 3 小时换一次 1×SSC, 4℃ 透析 24 小时。然后经 Unicam SP700 型紫外分光光度计测其 T_m 值, 按 Mandel 和 Marmur 方法^[9]计算噬菌体核酸的 G + C 含量。

(八) 碱性环境对噬菌体核酸的影响

将核酸分别溶于 1×SSC (pH9, 用 3mol/L NaOH 调) 和 1×SSC (pH7) 中, 经 37℃ 水浴保温 36 小时后测其 OD₂₆₀ 值, 其起始 OD₂₆₀ 均为 0.5。

结果和讨论

(一) 噬菌体 AL-W-1 的电镜观察

从武汉地区采集的碱性土壤中分离到能感染嗜碱芽孢杆菌 42-14 的噬菌体, 定名为 AL-W-1, 其噬菌斑为混浊斑。AL-W-1 呈蝌蚪状, 头为正多面体, 非收缩性长尾。尾部至少有 5 个尾钉, 其头部直径为 67nm, 尾长 150×7nm, 据 Bradley^[10]的分类系统, 属于 B 型 (图 1)。

(二) 噬菌体 AL-W-1 的宿主范围

在用于测定 AL-W-1 宿主范围的 21 株嗜碱菌中 (表 1), 仅 X3-38 (新疆土样分离得到) 能被 AL-W-1 感染, 噬菌斑形成单位与 42-14 接近, 说明 X3-38 可能是 42-14 的变异株, 或亲缘关系相近。

(三) 噬菌体 AL-W-1 的热稳定性

本文于 1989 年 10 月 12 日收到。

* 现在工作单位: 武汉大学生物系。

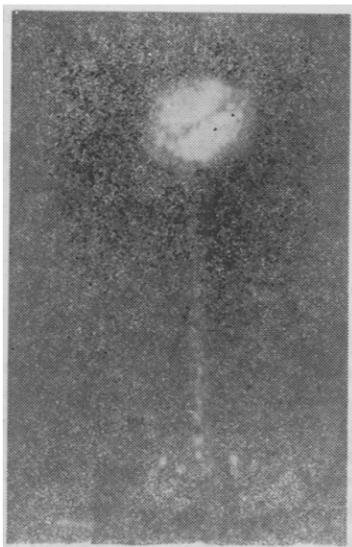
图1 AL-W-1 的电镜形态($\times 224000$)

表1 噬菌体 AL-W-1 的宿主范围

属名	菌号	来源	效价
<i>Bacillus</i>	NTT6	内蒙古	0
	NTT17		0
	NTT24		0
	NTT45		0
	NTT52		0
	NTT46		0
	NTT61		0
	NTT81		0
	NTT84		0
	NTT89		0
	NTT87	0	
	X3-37	新疆	0
	X3-38		10^6 pfu/ml
	X1-23(5)		0
	X1-24(4)	0	
42-14	黑龙江	10^6 pfu/ml	
27-20(4)	0		
51-5(8)	0		
51-5(10)	0		
<i>Micrococcus</i>	NTT48	内蒙古	0
<i>Flavobacterium</i>	NTT79	内蒙古	0
	NTT80		0

从图2可以看出, AL-W-1 在 pH10 时对热很敏感, 60°C 处理 20 分钟已基本灭活。 70°C 10 分钟即可完全灭活。

(四) 噬菌体 AL-W-1 的 pH 稳定性和

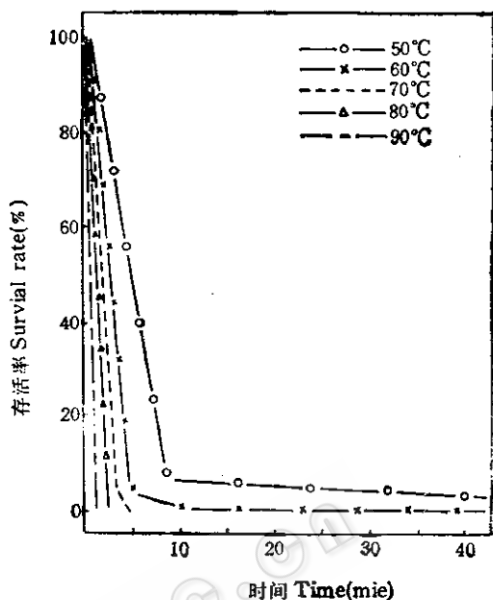


图2 AL-W-1 热灭活曲线

G + C 克分子百分含量

图3-A 曲线表明 AL-W-1 仅在 pH8-11 的范围内存活稳定, 其最适 pH 为 9。B 曲线表明在加有 1% 蛋白胨的缓冲液中, AL-W-1 可在 pH4-12 的范围中存活, 说明蛋白胨中可能存在某些因子能增加 AL-W-1 在低 pH 环境中的稳定性。

AL-W-1 核酸与二苯胺试剂反应呈蓝色, 说明 AL-W-1 是 DNA 病毒。T_m 值为 88°C , G +

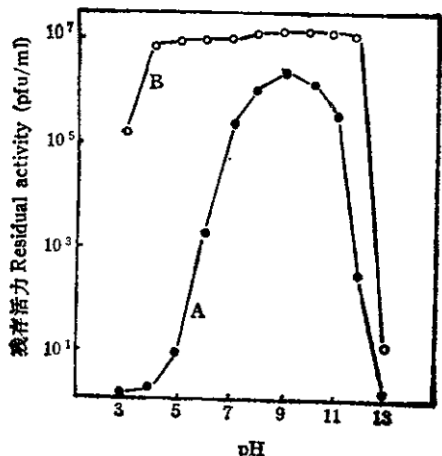


图3 噬菌体 AL-W-1 的 pH 稳定性

- A. 未加蛋白胨的缓冲液系统
B. 含 1% 蛋白胨的缓冲液系统

C 克分子百分含量为 45.6%。从 79°C 到 98°C, AL-W-1 DNA 的增色效应为 30%, 说明 AL-W-1 为双链 DNA 病毒。

裸露的 AL-W-1 DNA 在 pH9 时, 经 37°C 处理 36 小时, 测其溶液的 OD₂₆₀ 为 0.9, 而在 pH7 时, 37°C 处理 36 小时, 溶液的 OD₂₆₀ 为 0.58。说明 AL-W-1 DNA 不能抵抗碱性环境。

由于 AL-W-1 核酸不耐碱, 因此保护噬菌体在高 pH 环境下仍具活力的因素可能主要是病毒衣壳蛋白。中性环境下的噬菌体与极端环境中的噬菌体的衣壳氨基酸组成没有区别, 但对环境的承受能力却有差异。我们推测这种差异主要存在于蛋白质的构型上, 使得蛋白质对酸碱的稳定性不同。嗜碱噬菌体在高 pH 值的环境中, 蛋白质分子表面电荷少, 因而能在碱性环境中稳定。

参 考 文 献

[1] Horikoshi, K. et al.: Alkalophilic Micro-

organisms—A New Microbial World, p.2 Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1982.

[2] Horikoshi, K. et al.: *J. Gen. Virol.*, **49**: 183—185, 1978.

[3] 中国科学院微生物研究所噬菌体组: 噬菌体及其防治, 第 34 页, 科学出版社, 北京, 1973 年。

[4] 崔汉钧等: 微生物学报, **28**(3): 226—231, 1986.

[5] 余茂勋等: 微生物学报, **14**(2): 216—223, 1974.

[6] 贾奋兴等: 病毒学报, **2**(4): 360—365, 1986.

[7] 孟小林等: 武汉大学学报, **3**: 105—116, 1986.

[8] Davis, L.G. et al.: *Basic Methods in Molecular Biology*, p.113, Elsevier, 1985.

[9] Mandel, M. et al.: *Methods in Enzymology*, **123**: 195, 1986.

[10] Bradley, D.E.: *Bacteriol. Rev.*, **31**: 230—314, 1967.

ISOLATION OF A BACTERIOPHAGE ON ALKALOPHILIC BACILLUS 42-14 AND ITS CHARACTERIZATION

Tao Tao Lu Zhiyu

(Department of Virology, Wuhan University, Wuchang)

A bacteriophage (AL-W-1) which can infect an alkalophile, *Bacillus* 42-14, was isolated and characterized. AL-W-1 grows well in the range of pH 8—11, and the optimum growth pH is 9.0. But AL-W-1 is rather unstable at the neutral and acidic pHs. The phage is sensitive to heat. The nucleic acid of AL-W-1 is double-stranded DNA. The guanine plus cytosine content of the DNA was de-

termined to be about 45.6%, and melting temperature is 88°C in SSC. Uncoating DNA of AL-W-1 can not resist alkaline environment.

Key words

Alkalophilic *Bacillus*; Bacteriophage AL-W-1