

卡那霉素链霉菌噬菌体 SKJ1——温和性噬菌体*

石莲英 陈琳峰** 李焕娄

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

从土壤中分离出一株卡那霉素链霉菌噬菌体 SKJ1, 该噬菌体在卡那霉素链霉菌及林肯链霉菌菌苔上产生混浊的噬菌斑。从噬斑中长出的菌落后代对 SKJ1 噬菌体的感染产生了抗性。单株传代未见自发释放游离噬菌体。紫外线照射亦未发现诱导现象。抗性菌株经 $10\mu\text{g/ml}$ 丝裂霉素 C 处理后, 其中一株能释放出约 5.9×10^3 pfu/ml 游离噬菌体颗粒, 推测这些抗性菌株可能是溶源性菌株。菌落原位杂交实验证实抗性菌株的 DNA 与 SKJ1 噬菌体 DNA 有同源性, 说明这些抗性菌株已被 SKJ1 噬菌体溶源化, 从而确证 SKJ1 噬菌体为一温和性噬菌体。

关键词 卡那霉素链霉菌; 温和性噬菌体; 原位杂交

链霉菌温和性噬菌体在链霉菌遗传学研究及遗传工程操作中具有独特的性质, 因而越来越受到重视。1956 年 Welsch^[1]报道了在三个实验室同时发现链霉菌属中存在的溶源现象, 并在抗生素产生菌中作了广泛的研究。随后, 相继有了许多链霉菌温和性噬菌体的报道。1970 年 Lomovskaya^[2]等首先从天蓝色链霉菌 A(3)2 中分离了一株温和性噬菌体 φ C31。至今, 有文献报道的链霉菌温和性噬菌体已有十几种^[3-13]。日本学者于 1966 年首次分离到卡那霉素链霉菌噬菌体^[14], 我国一些生产厂家和研究单位亦发现卡那霉素发酵中噬菌体危害并有研究报道^[15], 但均未证实是否为温和性噬菌体。我们从济南第二制药厂异常发酵罐周围的土壤中分离到一株卡那霉素链霉菌噬菌体 SKJ1, 并证明其为一温和性噬菌体。本文报道实验结果。

材料和 方法

(一) 菌株

卡那霉素链霉菌(*Streptomyces kanamyceticus*) 2-8F 由济南第二制药厂赠送。林肯链霉菌(*Streptomyces lincolnensis*) AS 4.1024 由本所菌种保藏组提供。

(二) 试剂

丝裂霉素 C: 日本 Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. 产品; RNA 酶: 西德 Boehringer 公司产品; Sephadex G50: Pharmacia 公司产品。

(三) 培养基和缓冲液

本文于 1992 年 5 月 15 日收到。

* 本文系“七五”攻关项目部分工作。

** 现在地址: 福建医学院生物系。

致谢: 实验用菌株 *S. kanamyceticus* 2-8F 及分离噬菌体的土样由济南第二制药厂周东瑜工程师提供, 特此致谢。

卡那霉素链霉菌的菌丝生长培养基为改进的 Emerson (简称 E) 培养基, 成份为 (g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 4, 酵母粉 (Yeast Extract) 1, 葡萄糖 1, 氯化钠 2.5, pH 7.0—7.2; 噬菌体增殖和测定培养基为上述培养基补充 10mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 15g/L 琼脂, 上层软琼脂 (Soft Agar) 含琼脂 7g/L。

(四) 噬菌体的分离

称取土样以少量肉汤悬浮, 置室温 2—3 小时, 然后离心 (3000r/min, 10min), 轻轻吸取上清液, 经硝酸纤维素膜过滤后, 以肉汤适当稀释, 用双层平板法涂布于敏感菌平皿, 测定噬菌斑的情况。孢子液或过夜培养菌丝混和于上层软琼脂, 加量为 10^7 孢子/ml。每个直径 9cm 的平皿加 2.5ml 上层培养基。

(五) 噬菌体的纯化和高效价噬菌体悬液的制备

初分离的噬菌体, 按双层平板法长出离散的单噬斑, 挑取单个噬斑悬浮于 0.5ml 肉汤中, 室温放置 2 小时后, 离心取上清液, 稀释分离后, 再挑取离散的单噬斑, 这样反复进行 3—4 次, 直至噬斑形态基本均一为止。

高效价噬菌体悬液的制备, 基本按 Hopwood^[16] 方法进行。

(六) SKJ1 噬菌体抗血清的制备

参照 Adams^[17] 方法进行。用滴度为 10^{10} — 10^{11} pfu/ml 的 SKJ1 噬菌体悬液皮下注射免疫兔子。每周注射 2 次, 每次注射量为 2—5ml。连续注射 3 周后, 取少量兔血清测定 K 值。若 K 值达到预计要求, 则从兔子心脏穿刺取血, 血清经无菌过滤后置 4℃ 保存。

(七) 溶源菌的分离

分别将 28℃ 培养 4 天的敏感菌噬斑中长出的菌落挑出, 划线于含有 SKJ1 特异性抗血清的平板上, 长出的菌落再一次划线, 挑出单菌落, 进行噬菌体 SKJ1 的抗性实验, 分离出抗性菌落。

(八) 丝裂霉素 C 对溶源菌的诱导

将溶源菌接种摇瓶培养过夜, 菌丝转种于新鲜的 E 培养基摇瓶中, 培养 5—10 小时至生长对数期, 加入丝裂霉素 C, 使其终浓度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$, 继续振荡培养 1—2 小时, 沉淀离心, 菌丝重新悬浮于新鲜的 E 液体培养基摇瓶中, 继续培养 36—40 小时, 测定诱导液中的噬斑数。

(九) SKJ1DNA 的制备及纯化

采用 Suarez 和 Ikeda^[18] 的方法, 将制备的噬菌体悬液 25000r/min (HITACHI SCP70H RP50T) 离心 75 分钟以沉淀噬菌体。用 SDS 混和液 (1 倍体积的 pH 9.6, 2mol/L Tris-HCl; 2 倍体积的 pH 7.4, 0.5mol/L EDTA 钠盐; 1 倍体积的 10% SDS) 处理沉淀的噬菌体, 再加入 8mol/L 乙酸钾除蛋白, 上清液经三次异丙醇沉淀溶于适量 TE 缓冲液中即得 DNA 粗制品, 此 DNA 再经 RNase ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理以除去 RNA, 最后经酚-氯仿抽提得纯 DNA 样品, 于岛津 UV120-02 紫外分光光度计 260nm 处测定 DNA 浓度, 然后放置于 -20℃ 保存备用。

(十) 菌落原位杂交

参照 Hopwood^[16] 等的方法进行。

1. DNA 从链霉菌菌落到硝酸纤维素滤纸的转移: 将溶源菌斜面在 28℃ 培养至生成

孢子,用灭菌无盐水将孢子洗下,再用 10mmol/L 柠檬酸钠洗涤孢子两次以除去游离的噬菌体。将孢子液点种于硝酸纤维素滤膜上,待菌落长出后,用溶菌酶溶液(溶菌酶 4mg/ml TE 缓冲液)原位溶菌,用 1%SDS 和 1mol/L NaOH 使 DNA 变性,再用中和溶液(7 份 pH 7.5, 1mol/L Tris-HCl 和 3 份 5mol/L NaCl)中和,以 90%乙醇沉淀 DNA,室温干燥后再于 80 C 烘箱中烤干。

2. 以 α - ^{32}P dCTP 标记 SKJ1 DNA,酶反应温度为 12—13 C,反应时间为 3.5 小时,65 C 加热 10 分钟终止反应,反应液经 Sephadex G50 柱层析后用 TE 缓冲液洗脱并收集被标记的 DNA,用液体闪烁计数器测定比活。

3. 杂交反应:采用甲酰胺法进行^[16]。

4. 放射自显影:参照文献^[16]方法进行。

结 果 和 讨 论

(一) 溶源菌的分离和纯化

SKJ1 噬菌体在卡那霉素链霉菌和林肯链霉菌的菌苔上形成混浊的噬菌斑。28 C 培养 3—5 天后在噬斑中央出现许多小菌落,见图 1。这些菌落经抗血清处理并经过 3—5 代分离纯化后,再用 SKJ1 噬菌体感染,测定其对 SKJ1 噬菌体的敏感性。结果发现 SKJ1 噬菌体不再能感染这些菌株。因而可以推测 SKJ1 噬菌体能使卡那霉素链霉菌和林肯链霉菌溶源化。SKJ1 可能是一温和性噬菌体。

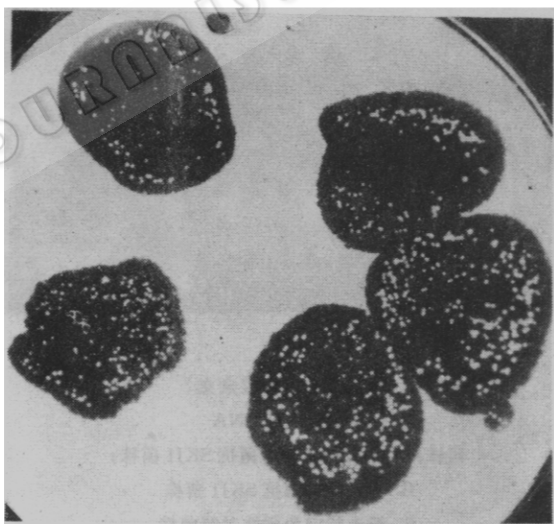


图 1 培养 4 天后噬斑中央出现的菌落(在指示菌林肯链霉菌 AS 4.1024 菌苔上)

Fig. 1 Colonies appeared from the center of plaques after 4 days incubation of indicator *S. lincolnensis* AS 4.1024

(二) 诱导

溶源菌经连续多次传代或经紫外线、丝裂霉素 C 等物理化学因素处理,应能从中释

放出成熟的原噬菌体。我们将上述对 SKJ1 噬菌体有抗性的菌落连续五次以上代,未发现自发释放出游离噬菌体颗粒。经紫外线照射后也未发现诱导现象。继以丝裂霉素 C $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 对 7 株抗性菌株进行诱导,发现其中一株能释放出游离噬菌体,其摇瓶滴度约为 $5.9 \times 10^3 \text{ pfu}/\text{ml}$,而以对 SKJ1 敏感的原株作对照,用丝裂霉素 C 进行相同的处理,则未发现释放游离的噬菌体,表明本实验中所获得的对 SKJ1 有抗性的菌落可能是溶源菌。Lomovskaya^[18]曾报道在链霉菌温和性噬菌体 ϕC31 、Vp5 和 R4 的研究中均未发现紫外线对原噬菌体的诱导作用,与我们的结果相似。在我们的实验中,用紫外线处理抗噬菌体菌株,但未发现自发释放出游离噬菌体,继而用丝裂霉素 C 处理抗性菌株,7 株中只有一株能被丝裂霉素 C 诱导释放出游离噬菌体,可见诱导也较困难,这可能是由于不同菌株的诱导条件不同。

(三) 菌落原位杂交检测抗性菌株 DNA 与 SKJ1 DNA 的同源性

用 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ dCTP 标记的 SKJ1 DNA 作为探针,与已转移在硝酸纤维素膜上的卡那霉素链霉菌及林肯链霉菌的 SKJ1 抗性菌落 DNA 进行 DNA-DNA 杂交,以原株为对照,结果见图 2。

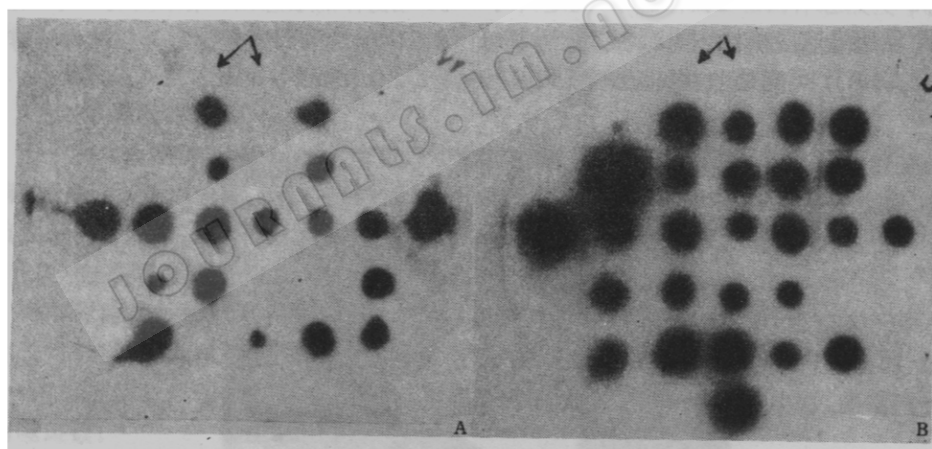


图 2 菌落原位杂交

探针:SKJ1 DNA

菌株:A. 卡那霉素链霉菌抗 SKJ1 菌株;

B. 林肯链霉菌抗 SKJ1 菌株

注:箭头指向为阴性对照菌株

Fig. 2 Colony Hybridization

Probe: SKJ1 DNA

Colonies: A. *S. Kanamyceticus* resistant strains to SKJ1 phage

B. *S. lincolnensis* resistant strains to SKJ1 phage

Arrow: Indicating the control strains

由图可见,SKJ1 抗性菌株与 SKJ1 DNA 杂交均表现阳性,某些菌株与 SKJ1 DNA 有强的同源性,而原株对照与 SKJ1 DNA 则为杂交阴性。

从以上实验结果中观察到 SKJ1 噬菌体能使对其敏感的卡那霉素链霉菌和林肯链霉菌溶源化,并能从部份溶源菌株诱导释放出游离噬菌体。菌落原位杂交实验证实溶源菌 DNA 与 SKJ1 噬菌体 DNA 同源,因而可以确定 SKJ1 噬菌体是一温和性噬菌体。就多数温和性噬菌体而言,其 DNA 是整合在宿主染色体上,但 Chung Shiauta 报道^[19],新霉素产生菌弗氏链霉菌的噬菌体 ϕ SF1 在两个不同的原噬菌体阶段以质粒(pUC1 和 pUC13)形式存在于溶源菌中,SKJ1 噬菌体以何种形式存在有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Welsch, M. ; *Virology*, **2**:703, 1956.
- [2] Lomovskaya, N. D. et al. ; *Genetika*, **6**:135, 1970.
- [3] Dowding, J. E. et al. ; *J. Gen. Microbiol.*, **78**:349, 1973.
- [4] Chater, K. F. et al. ; *J. Gen. Microbiol.*, **115**:431, 1979.
- [5] Hranueli, D. et al. ; *J. Gen. Microbiol.*, **114**:295, 1979.
- [6] Klaus, S. et al. ; *M. G. G.* **172**:319, 1979.
- [7] 张筱玉等:微生物学报,**21**(3):329, 1981.
- [8] Nakano, M. M. et al. ; *J. Gen. Microbiol.*, **122**:289, 1981.
- [9] Isogai, T. et al. ; *Agric. Biol. Chem.*, **46**:2961, 1982.
- [10] Stuttard, C. et al. ; *J. Gen. Microbiol.*, **128**:115, 1982.
- [11] Ogata, S. et al. ; *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**:201, 1985.
- [12] Foor, F. et al. ; *Gene*, **39**:11, 1985.
- [13] 郑幼霞等:病毒学集刊,**5**:191, 1987.
- [14] 中国科学院微生物研究所噬菌体组:噬菌体及其防治,第三页,科学出版社,北京,1973 年.
- [15] 汪水源等:抗生素,**11**(6):507, 1986.
- [16] Hopwood D. A. et al. ; *Genetic Manipulation of Streptomyces A Laboratory Manual*, p19—20; 95—102; 194—261, John Innes Institute, Norwich, 1985.
- [17] Adams, M. H. ; *Bacteriophages*, p. 443, Interscience Publishers Inc. , New York, 1959.
- [18] Lomovskaya, N. D. et al. ; *Microbiological Reviews*, **44**(2):206, 1980.
- [19] Chung Shiauta: *Gene*, **17**:239, 1982.

ACTINOPHAGE SKJ1 OF *STREPTOMYCES KANAMYCETICUS* — A TEMPERATE PHAGE

Shi Lianying Chen Linfeng Li Huanlou

(Institute of Medicinal Biotechnology C. A. M. S., Beijing 100050)

An actinophage SKJ1 of *Streptomyces kanamyceticus* was isolated from a soil sample. It produced turbid plaques on *S. kanamyceticus* or *S. lincolnensis*. The colonies derived from the center of turbid plaques of phage SKJ1 on *S. kanamyceticus* or *S. lincolnensis* were found to be insensitive to phage SKJ1 reinfection. Phage plaques were not produced spontaneously. The resistant strains could not be induced to form plaques with UV, but one of them treated with mitomycin C (10 μ g/ml) released about 5.9×10^3 pfu/ml free phage particles, indicating that the resistant strains might be lysogenic. As it was revealed by the colony hybridization test, the homology between the resistant strains DNA and the SKJ1 DNA demonstrated that these strains could be lysogenized by the phage SKJ1, thus, proving the SKJ1 to be a temperate phage.

Key words *Streptomyces kanamyceticus*; Temperate Phage; Colony hybridization