

(18) 35-8-361

酸碱度对温和噬菌体存活与吸附效率的影响[†]杨水云¹⁾ 易全成²⁾ 赵文明¹⁾

Q939.48

(1)西安交通大学化工学院生物工程研究所,710049,西安;2)深圳市高新技术产业
投资服务有限公司,518000,广东深圳;第一作者 35岁,女,博士生)

摘要 实验测定了 pH 对 *Bacillus thuringiensis var. entomocidus* 温和噬菌体 TP₃ 存活与吸附效率的影响作用。结果表明:在不同 pH 的介质中,TP₃ 存活的能力相差很大;酸性介质及高碱性介质对 TP₃ 都有不同程度的瞬间灭活作用;TP₃ 存活的最适 pH 为 7.7,且适宜其存活的 pH 范围很窄;pH 不同,TP₃ 吸附到苏云金芽孢杆菌表面上的效率也不同,在 pH ≥ 9 范围内,pH 升高,吸附效率降低。

关键词 酸碱度;灭活;苏云金芽孢杆菌;吸附效率;噬菌体
分类号 Q939.48

非溶源的细菌被温和噬菌体侵染后会有两种发育途径,即裂解和溶源化。寄主细胞究竟遭遇何种命运,取决于许多细胞内外因素。如寄主与噬菌体的基因型^[1]、寄主细胞的生理状态^[2]、感染复数的大小^[2]、环境理化因素^[3]等。在生产实践中,有许多生产菌本身就是溶源性菌株,由于种种理化因素的诱导,生产菌株常常发生自身裂解现象,给生产带来损失。

酸碱度(pH)是一个容易控制的理化因子,搞清楚环境 pH 与温和噬菌体存活及吸附效率之间的关系,可通过控制发酵液酸碱度而预防或治理溶源性生产菌株的自身裂解问题。

1 材料和方法

1.1 菌株与噬菌体

实验用测试菌为 *Bacillus thuringiensis var. entomocidus*, 血清型为 H₆, 来源于中国农业科学院、本实验号 B₆。温和噬菌体从 *B. thuringiensis var. tianmensis* 的自发释放液中分离得到^[4], 本实验记为 TP₃。该寄主菌血清型 H₃, 来源于湖北天门微生物研究所。经鉴定^[4], TP₃ 能使 B₆ 溶源化而形成 B₆(TP₃) 溶源性菌株。

1.2 培养基组成

用来配制噬菌体和细胞悬液的稀释液(下称“D”液,“D”取自 dilution 一词)由 1% 牛肉膏、0.5% 蛋白胨、0.5% NaCl 组成;pH 分别调至 5, 6, 7, …… 11 等。

用于细菌培养的液体和固体斜面培养基由 1% 牛肉膏、1% 蛋白胨、0.1% 葡萄糖、0.5% NaCl 组成,pH 7.0。凝固剂为 2% 琼脂。

测定噬菌斑的双层平板,底层为 pH 7.0 的 D 液加 2% 琼脂,上层由液体培养基加 0.7% 琼脂构成。

1.3 噬菌体悬液制备

为了避免寄主内限制性内切酶对噬菌体 DNA 的降解作用,试验用 B₆(TP₃) 释放的噬菌体为测试用噬菌体(其 DNA 已被修饰,不会降解),以 B₆ 作为测试用菌株。用接种针穿刺噬菌斑并移于 pH 7.7 的 D 液中(每毫升 D 液中穿刺两针,使滴度达 10^{4~5} pfu/mL, 4 000r/min 离心 30 min, 取上清液加入氯仿(氯

[†] 收稿日期:1997-11-17

仿的体积分数为 2%) 摇匀, 静置后所得上清液即为拟配噬菌体悬液。

1.4 吸附菌悬液的制备

首先将细菌液体培养至对数中期(32℃约 8 h~9 h), 测定菌液在 560 nm 下的 OD 值, 并将所测数据 OD_{560} 代入下式 $V = (15 \times 0.8) / OD_{560}$, 求取 V 值。然后取 V mL 菌液离心取菌体, 分别用不同 pH 的 D 液洗涤菌体, 最后稀释到 15 mL, 就得到了 15 mL OD 为 0.8 的一系列不同 pH 的吸附菌液。经测定如此制备的菌液每毫升菌液中细菌细胞的总数可达 10^{7-8} 个, 远比噬菌体浓度高, 且多重感染的几率很低。

1.5 对噬菌体存活率影响的测定

不同 pH 溶液中的处理时间取 $t \rightarrow 0$ 和 $t = 60$ min 两组。

$t \rightarrow 0$: 取上述噬菌体悬液数等分, 分别加入不同 pH 的 D 液吹吸均匀, 立即稀释于 pH 7.7 的 D 液中, 取部分稀释以双层琼脂平板法测定噬斑数, 剩余部分继续于 pH 7.7 的 D 液中保留 30 min。同法测定噬斑数, 可确定灭活作用是否可逆。

$t = 60$ min: 依上法将噬菌体悬液稀释于不同 pH 的 D 液中后, 摇匀静置 60 min, 最后稀释于 pH 7.7 的 D 液中, 同法测定比较噬斑数, 可知处理时间的延长是否影响噬菌体的存活率。

1.6 不同 pH 吸附菌液对噬菌体吸附效率影响的测定

取不同 pH 的吸附菌液 1.8 mL, 分别加入 0.2 mL 噬菌体悬液, 混匀于 32℃ 下吸附 25 min, 然后分别取不同 pH 下的细菌-噬菌体混合液 0.1 mL, 以双层琼脂平板法测定噬斑数, 记为 P'_i , 比较不同 pH 下的 P'_i , 令最大的 P'_i 为 P_i , 即 $P_i = (P'_i)_{\max}$ 。剩余混合液离心, 取上清液各 0.1 mL, 双层琼脂平板法测定未吸附的噬菌体数 P_f , 最后按公式 $F_a = 1 - P_f / P_i$ 求取不同 pH 下的相对吸附频率 F_a 。

2 结果与讨论

曾有人对 pH 灭活噬菌体的作用做过研究^[6], 结果认为噬菌体存活的最适 pH 为 7。本实验用不同 pH 的稀释液体进行处理后, 以双层琼脂平板法测定噬斑数结果如表 1 及图 1 所示。

表 1 不同 pH 下 TP₃ 的存活情况

Tab. 1 Survival State of TP₃ under Different pH

		pH								
		5	6	7	7.5	7.7	8	9	10	11
$t \rightarrow 0$	$P^{\text{①}}$	179	188	237	390	450	376	345	363	336
	$F^{\text{②}}$	0.40	0.42	0.53	0.87	1	0.84	0.77	0.80	0.75
$t \rightarrow 0$ (平衡 ^③)	P	162	172	309	367	447	425	317	319	316
	F	0.36	0.38	0.67	0.82	0.99	0.94	0.70	0.71	0.70
$t = 60$ min	P	24	67	112	282	423	287	221	220	228
	F	0.05	0.15	0.25	0.63	0.95	0.64	0.49	0.49	0.50

① P : 不同 pH 溶液处理后双层平板法测得的每毫升溶液中噬菌体的出斑数; ② F : 令噬菌体出斑数最大状态时的存活率为 1 时求得的相对存活率; ③ $t \rightarrow 0$ (平衡): 指在不同 pH 溶液中作瞬时处理后立即置最适 pH 溶液中静置平衡

从实验结果可知: 酸性与高碱性条件对 TP₃ 均有灭活作用, 但在相同的处理时间内, 酸的灭活作用比碱更强烈, 而且随着酸性程度的加强, 灭活作用也随之增大。在碱性介质中, 当 pH 超过 8.5~9. 这种灭活作用就不再随 pH 的提高而增强了。适宜 TP₃ 存活的 pH 范围很窄, 为 pH 7.5~8, 最适 pH 为 7.7 左右。

由 $t \rightarrow 0$ (即处理时间趋于 0) 组结果可知, 酸、碱的灭活作用是瞬间发生的, 不需要长时间的处理。由 $t \rightarrow 0$ (平衡) 组结果可以看到, 瞬时处理的噬菌体在最适 pH 下平衡了一段时间, 但失活的噬菌体并未见恢复活性, 可见这种灭活作用是一个不可逆的过程。由 $t = 60$ min 组结果可见, 随着处理时间的延长, 酸碱灭活效果也提高了。

由于酸碱对 TP₃ 的强烈灭活作用, 使其吸附效率测定中的变量复杂化, 所以本实验仅测定了 $pH \geq$

9 范围内的吸附效率,而且,在此范围内碱对噬菌体的灭活作用相同。

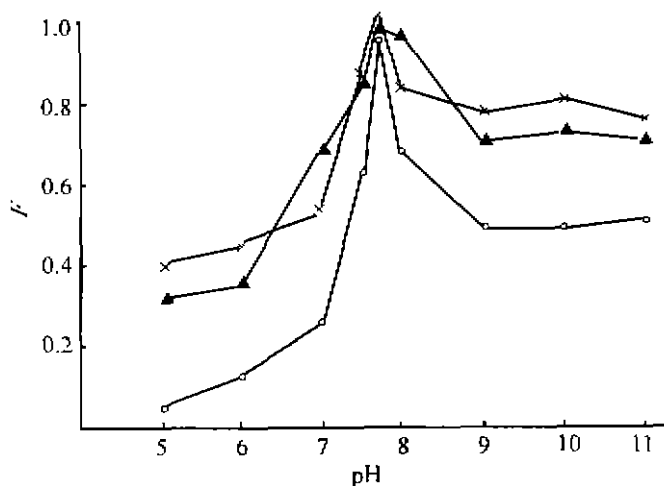


图 1 pH 对 TP₃ 存活率的影响

Fig. 1 Influence of pH on the Survival Ability of TP₃

× 处理时间 $t \rightarrow 0$ O 处理时间 $t = 60 \text{ min}$

Δ 处理时间 $t \rightarrow 0$, 于 pH 7.7D 液中平衡 30 min

对吸附效率的测定数据如表 2。从表中 P'_i 数据可知, pH9 时的出斑数最多, 因此可假定每毫升溶液中噬菌体总数为 $P_i = (P'_i)_{\max} = 7\,900$ 个。依此可按 $F_a = 1 - P_f/P_i$ 求算不同 pH 时的吸附效率, 依 F_a 可得图 2。

表 2 pH 对 TP₃ 吸附效率的影响

Tab. 2 Influence of pH on Adsorptive Efficiency of TP₃

pH	$P'_i/\text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$	$P'_f/\text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$	F_a
9	7 900	310	0.96
10	6 720	1 930	0.75
11	5 530	6 300	0.20

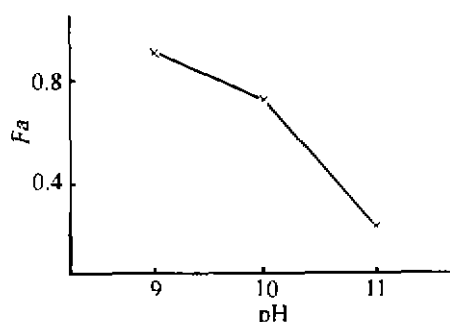


图 2 不同 pH 下 TP₃ 的吸附效率

Fig. 2 The Adsorptive Efficiency of TP₃ under Different pH

由表 2 及图 2 结果不难看出, 随着碱性增强, 未吸附的噬菌体数 (P_f) 很快增多, 吸附效率愈来愈低。

酸碱度对噬菌体的存活及吸附效率产生影响的原因在于 pH 的变化导致细菌与噬菌体表面上吸附位点或受体的电荷发生变化, 从而影响了二者之间的静电作用效果。静电吸附在噬菌体吸附的第一阶段 (即可逆的非特异性吸附阶段) 起着至关重要的作用^[6], 因此 pH 的变化必然会影响到噬菌体的吸附效率, 进而影响了它的侵染活性。不同噬菌体吸附不同寄主时, 它的最适的吸附 pH 是不同的。Fry^[7]指出, λ 噬菌体吸附 E. coli 的最适 pH 为 6.5。本实验结果表明 TP₃ 吸附 B₆ 的最适 pH 不超过 9。

从本实验结果可知, 环境介质 pH 的变化, 可以导致噬菌体吸附效率及其侵染活性随之改变; 苏云

金杆菌温和噬菌体 TP₃ 的存活最适 pH 为 7.5~8, 超出此范围, TP₃ 将在瞬间不可逆失活。知此特性, 就有可能在生产实践中应用这一性质消除或抑制噬菌体对生产菌的裂解作用。

参 考 文 献

- 1 Chols H E. Development pathway for the temperate phage. *Ann. Rev. Genetics*, 1972, 16: 157~168
- 2 Hong J S, Bertani E R. cAMP concentration in the bacterial host regulates the viral decision between lysogeny and lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, 68(9): 2 258~2 264
- 3 杨水云, 席 丹. 环境温度对苏云金芽孢杆菌溶源效率的影响. *西安交通大学学报*, 1997, 31(10): 123~126
- 4 杨水云. 苏云金芽孢杆菌溶源菌株的鉴定. *西安交通大学学报*, 1989, 23(6): 57~60
- 5 余茂效. 多粘芽孢杆菌噬菌体的分离及其特性研究. *微生物学报*, 1974, 14(2): 216~223
- 6 Fuck T T. The first step of virus invasion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 1953, 18: 149~154
- 7 Fry B A. Condition for the infection of *E. coli* with phage and for the establishment of lysogeny. *J. Gen. Microbiol.*, 1959, 21(3): 676~681

责任编辑 张银玲

pH Affecting the Frequency of Surviving and Adsorption of Temperate Phage of *Bacillus thuringiensis*

Yang Shuiyun¹⁾ Yi Quancheng²⁾ Zhao Wenming¹⁾

(1) Institute of Bioscience and Biotechnology of Xi'an Jiaotong University, 710049, Xi'an;

2) Shenzhen High Technique Investment Co. Ltd., 518000, Guangdong Shenzhen

Abstract The survival rate and the efficiency of adsorption to host cells of temperate bacteriophage TP₃ under different pH have been determined. Results showed that, both the acid and alkaline environment have the irreversible inactivation on the bacteriophage TP₃ of *Bacillus thuringiensis* in a wink. The optimum pH for TP₃ is about 7.7. The adsorptive efficiency decreased when pH rose in the range of pH ≥ 9.

Key words pH; inactivation; *Bacillus thuringiensis*; adsorptive efficiency; bacteriophage

· 学术动态 ·

我校现代化的图书馆视听阅览室建成

我校图书馆承担的“211工程”公共服务体系建设项目“文献信息保障系统”一期工程竣工后, 已得到专家们的全面验收, 现图书馆视听阅览室已向校内外全面开放。

新建成的视听阅览室设有专为多媒体教学和学术会议配备的实物视频演示仪和高配置多媒体电脑, 其中实物视频演示仪配合多媒体大屏幕投影系统, 可根据教学或会议进程, 形象、生动地演示各种资料。多媒体电脑与图书馆自动化集成系统相联, 可检索书目数据和电子阅览室光盘, 并通过大屏幕投影系统进行演示。与校园网及 Internet 等开放型计算机网络相联接, 可上网查询、演示, 实现会议与外部计算机网络数据资源的共享。总之, 我校图书馆这次新建的现代化阅览室主要具备了: ① 利用各种信号源进行高水平的多媒体辅助教学; ② 视听资料的阅览; ③ 高档次的学术会议等。这种起点高、功能多、多样化的服务项目可满足不同层次的需求, 在西北乃至全国高校中处于领先水平。

(薛 鲍)