

成都制药四厂卡那霉素链霉菌 噬菌体的研究

魏芸斋 崔汉钧
张仪裳 张永地

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

提 要

从成都制药四厂卡那霉素链霉菌异常发酵液中分离出四株噬菌体 ϕSK_1 , ϕSK_2 , ϕSK_3 和 ϕSK_4 , 经形态特征比较和一些生物学性质的研究, 证明它们彼此存在着差异, 属同一血清型的不同噬菌体株, 与国内外已知的某些卡那霉素链霉菌噬菌体也不相同。

1980—1982年初, 成都制药四厂卡那霉素生产多次发生自溶现象, 倒罐体积达 614 吨, 严重影响生产, 经检测证明为噬菌体污染。我们从异常发酵液中获得四株噬菌体, 定名为 ϕSK_1 、 ϕSK_2 、 ϕSK_3 和 ϕSK_4 , 经形态观察和生物学性质的研究, 证明它们彼此有一定差异, 是四个不同的噬菌体株。

材料和方法

1. 噬菌体 ϕSK_1 、 ϕSK_2 、 ϕSK_3 和 ϕSK_4 。成都制药四厂卡那霉素链霉菌异常发酵液经单斑分离而得。

2. 指示菌 卡那霉素链霉菌 39[#] (*Streptomyces kanamyceticus* 39)。从成都制药四厂保存的生产菌种中筛选获得。

3. 培养基与稀释液 (1)、固体培养基(%)：葡萄糖 1, 蛋白胨 0.3, 牛肉膏 0.3, NaCl 0.5, 斜面和平板下层加琼脂 2, 上层除加日本产琼脂粉 0.6—0.7 外, 另加 CaCl₂ 0.15。pH7.3。

(2)、液体培养基(%)：

种瓶培养基同斜面培养基, 不加琼脂。

摇瓶发酵培养基：

可溶性淀粉 4.5, 黄豆粉 3.0, 葡萄糖 0.5, NaNO₃ 0.8, ZnSO₄ 0.01, KH₂PO₄ 0.005。pH7.2。

本文 1986 年 8 月 6 日收到

(3)噬菌体稀释液

1升水中含 $MgSO_4$ 20mmol/L, Tris (pH9.0) 10mmol/L, NaCl 5 mmol/L。

4. 平板效率(EOP)测定 按Adams^[1]双层法进行, 30℃培养48小时左右检查结果。

5. 抗血清制备与中和试验 用固体残渣法富集噬菌体, 15000r/m 离心 20 分钟, 上清液经细菌过滤器过滤后再以40000r/m离心2.5小时沉淀噬菌体, 重悬于稀释液(浓缩20倍左右)。以此制备抗血清, 进行中和试验^[2]。

6. 电镜观察 用2%火棉胶制膜, 喷碳, 经2%pH7.0磷钨酸负染, 在日本JEM—100CX 电镜下观察噬菌体颗粒。

7. 有机溶剂对噬菌体的影响 用一定体积的乙醇、丙酮、氯仿、乙醚分别在能密闭的试管内与噬菌体液充分混合30分钟后测噬菌斑。处理浓度以有机溶剂与噬菌体液之体积比表示, 分别为: 乙醇(无水)3:1, 丙酮1:9, 氯仿1:6, 乙醚1:1。

8. pH稳定性测定 按余茂效等^[3]的方法进行。pH3—11用雷磁 25 型酸度计测定, pH12—13用精密试纸测定。

9. 热失活测定 各取 10^{8-11} pfu/ml噬菌体液 1 ml 于不同温度水浴中处理, 冷却终止作用, 测噬菌斑。

10. 宿主范围测定 用链霉菌14个类群的代表菌株孢子悬液和卡那霉素链霉菌不同菌株的菌丝培养液以 10^4 和 10^8 pfu/ml 两种浓度的噬菌体液按双层法测定四株噬菌体的EOP。

结 果

1. 噬菌斑的形态特征

四株噬菌体噬菌斑的特征见表1和图版 I。

表1 噬菌斑的形态与大小

Table 1 Size and morphology of plaques of phage ϕSK_1 — ϕSK_4

噬菌体 Phages	噬菌斑形状 Shapes of plaques	清晰度 Clearness	大小(mm) Size	
			范围 Range	平均 Average
ϕSK_1	圆形, 边缘整齐, 有时有晕圈 Circular shape with a clean edge, and, some- times, a muddy zone	清晰 Clear	2—7	4.3
ϕSK_2	同上 id.	最清晰 Most clear	0.5—1.5	1.0
ϕSK_3	同上 id.	清晰至半透明 Clear to semi- transparent	1—3	1.9
ϕSK_4	同上 id.	清晰 Clear	0.5—2	1.3

噬菌斑形态大小受多种因子影响, 指示菌生理状况的影响尤其明显, 但多次试验比较, 以 ϕSK_1 的最大, ϕSK_2 的最小, 其余二者居中。

2. 噬菌体颗粒的形态特征

四株噬菌体颗粒的形态和大小见表2和图版II。

按 Ackermann 分类标准⁽⁴⁾, 四株噬菌体均属B₂自然群(尾鞘不能收缩、头长长于头宽的长尾噬菌体)。 ϕSK_1 个体稍大, ϕSK_3 头较狭长, ϕSK_2 介于二者之间, ϕSK_4 尾部略粗短。

表2 噬菌体颗粒的形态与大小
Table 2 Size and morphology of the phage particles

噬菌体 Phages	形态 Morphology	大小 Size (nm)			
		头长 Head length	头宽 Head width	尾长 Tail length	尾宽 Tail width
ϕSK_1	蝌蚪形 Tadpole shape	103.7	72.2	240.5	7.5
ϕSK_2	同上 id.	97.3	72.8	235.0	7.3
ϕSK_3	同上 id.	99.1	61.5	227.6	7.6
ϕSK_4	同上 id.	97.5	71.5	221.0	10.5

3. 有机溶剂对噬菌体的影响

表3说明, 四株噬菌体对氯仿均敏感, 对乙醇也表现不同程度的敏感, 以 ϕSK_2 为最显著, 而丙酮和乙醚则基本无影响。

表3 有机溶剂对噬菌体存活率的影响
Table 3 Organic solvent influence on the survival rate of phage ϕSK_1 — SK_4

溶 剂 Solvents	浓度(溶剂: 噬菌体液, V/V) Concentration (solvent: suspension of phage) (V/V)	存 活 率 (%) Survival rate			
		ϕSK_1	ϕSK_2	ϕSK_3	ϕSK_4
氯仿 Chloroform	1:9	0.9	1.0	0.4	0.9
乙醇(无水) Ethyl alcohol absolute	3:1	84.8	43.7	66.9	67.4
乙醚 Ethyl ether	1:1	98.9	98.2	92.2	104.4
丙酮 Acetone	1:9	94.9	92.8	102.3	88.8

4. 噬菌体对pH的稳定性

各噬菌体在pH 5—11范围内皆稳定, pH 4和12有明显影响, pH 3和13则接近全部失活。四株噬菌体对pH的反应趋势基本一致(见表4)。

表4 pH对噬菌体稳定性的影响
Table 4 pH influence on the stability of phage ϕ SK₁— ϕ SK₄

噬菌体 phages	(pH)										
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	存活率 Survival rate (%)										
ϕ SK ₁	0.7	72.6	90.3	100.8	100.0	92.9	99.7	105.0	103.1	29.3	0.08
ϕ SK ₂	0.4	76.7	112.8	114.1	100.0	112.5	110.7	128.1	106.9	51.8	0.11
ϕ SK ₃	0.4	73.3	98.9	102.5	100.0	99.0	112.6	99.9	94.0	32.1	0
ϕ SK ₄	0.9	57.9	100.5	132.5	100.0	83.2	94.3	124.3	117.1	17.0	0.05

5. 热失活测定

表5说明, 90°C60分钟, 四株噬菌体都失活, 但株间有一定差异, 尤以 ϕ SK₂耐热力为弱。

6. 血清中和试验

ϕ SK₁、 ϕ SK₂、 ϕ SK₃和 ϕ SK₄的血清滴度分别为7000、5000、5000和100*, 抗血清稀释度为1000倍(ϕ SK₄为50倍), 其K值分别为470、350、380和6*(注: 制备 ϕ SK₄抗血清时, 兔子中途罹病, 采血过早, 故滴度和K值都偏低)。

四株噬菌体血清交叉中和实验结果见表6。

表5 温度对噬菌体存活力的影响
Table 5 Temperature influence on the survival rate of phage ϕ SK₁— ϕ SK₄

噬菌体	70°C			80°C			90°C			沸水浴	
	10	30	60	10	30	60	10	30	60	2	5
	时间(分钟)										
	存活率(%)										
ϕ SK ₁	78.9	69.4	66.4	7.7	6.5	3.7	0.08	0.04	0	0	0
ϕ SK ₂	9.6	7.4	6.8	2.5	2.0	1.9	0.02	0.0005	0	0	0
ϕ SK ₃	88.1	83.8	70.6	12.1	9.0	3.8	0.11	0	0	0	0
ϕ SK ₄	84.8	71.7	68.7	9.6	8.2	3.1	0.05	0.005	0	0	0

表6 血清交叉中和试验

Table 6 The cross-neutralization of infectivity of phage ϕ SK₁— ϕ SK₄ by their antisera

噬菌体	抗血清			
	ϕ SK ₁ K=470	ϕ SK ₂ K=350	ϕ SK ₃ K=380	ϕ SK ₄ K=6*
	出现率(%)			
ϕ SK ₁	0.3	7.5	0.0	29.1
ϕ SK ₂	1.1	9.3	2.0	5.2
ϕ SK ₃	0.1	4.6	0.5	9.3
ϕ SK ₄	0.3	2.6	1.9	8.5

从表6可以看出, 四株噬菌体基本上没有血清学差异, 交叉反应显著, 说明它们彼此的亲缘关系相近。

7. 宿主范围测定

(1)、对链霉菌14个类群代表菌株和卷曲链霉菌、诺卡氏菌、小单孢菌测定结果表明, 四株噬菌体都可以侵染天蓝色链霉菌、烬灰链霉菌、白色链霉菌和孔雀石绿链霉菌, 但株间具有明显差异, ϕ SK₁对天蓝色链霉菌侵染力强, ϕ SK₃则对烬灰链霉菌侵染力强。 ϕ SK₂、 ϕ SK₃、 ϕ SK₄还侵染吸水链霉菌, ϕ SK₁和 ϕ SK₄

还侵染青色链霉菌, 在吸水链霉菌上的平板效率以 ϕSK_4 为高, 见表7。

表7 四株噬菌体在几种链霉菌上的平板效率*
Table 7 The efficiency of plating of phage ϕSK_1 — ϕSK_4 on several species of *Streptomyces*

宿 主 Hosts	噬 菌 体 Phages			
	ϕSK_1	ϕSK_2	ϕSK_3	ϕSK_4
吸水链霉菌 <i>S. hygroscopicus</i>	$< 10^{-8}$	10^{-6}	10^{-7}	10^{-4}
青色链霉菌 <i>S. glaucus</i>	10^{-6-7}	$< 10^{-8}$	$< 10^{-6}$	10^{-8}
孔雀石绿链霉菌 <i>S. melachiticus</i>	10^{-7}	10^{-7}	10^{-6-7}	10^{-5-7}
烟灰链霉菌 <i>S. cinereogriseus</i>	10^{-6}	10^{-6}	10^{-1}	10^{-6}
天兰色链霉菌 <i>S. coelicolor</i>	10^{-1}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-2}

- * 1. 平板效率以指示菌为 10^7 计算。
- 2. 四株噬菌体在白色链霉菌 (*S. albus*) 上噬菌斑不明显, 难以计算平板效率。
- * 1. The efficiency of plating of phage ϕSK_1 — ϕSK_4 on their indicator strain was shown by 10^7 .
- 2. The efficiency of plating of phage ϕSK_1 — ϕSK_4 on *S. albus* can not be determined because of their muddy plaques.

(2)、对成都制药四厂部分卡那霉素生产菌菌株敏感性的测定, 结果见表8。

表8 四株噬菌体侵染卡那霉素链霉菌不同菌株的平板效率
Table 8 The efficiency of plating of phage ϕSK_1 — ϕSK_4 on the different strains of *S. kanamyceticus*

噬菌体	菌 株 号							
	39	K ₁ -41	13-2-6	11	10-5	102	85-22	N18
ϕSK_1	100	0	17.7	34.5	39.4	37.0	36.4	40.1
ϕSK_2	100	0	61.2	52.2	141.8	115.3	217.8	193.3
ϕSK_3	100	0	13.8	17.4	31.4	19.6	30.3	31.3
ϕSK_4	100	0	13.9	12.2	32.1	23.3	40.3	20.1

表8说明, 该厂目前生产用菌株, 除K₁-41外, 都不能抵抗四株噬菌体的侵染, 但敏感程度有明显差异, 其中以13-2-6和11号抗性较强。四株噬菌体的侵染力也有所不同, 以 ϕSK_2 最强。

讨 论

从成都制药四厂卡那霉素生产异常发酵液分离获得的四株噬菌体, 其噬菌斑和噬菌体颗粒的形态大小、对一些有机溶剂的敏感性、热稳定性和宿主范围等都存在着差异, 但血清型相同, 可看作是同一血清型的不同噬菌体株, 其差异只是在程度上, 而种间区分的特征不足, 初步认为它们是同一噬菌体种的不同变种。

长期以来,人们将噬菌斑形态大小作为区分噬菌体的重要特征。诚然,噬菌斑在一定条件下是相对稳定的,但本实验表明,在放线菌中噬菌斑的形态、大小、清晰度等受多种条件的制约,尤其与指示菌的生理状况关系密切。放线菌孢子萌发的不同步,菌丝团块的差异,各种发育阶段菌丝体的同时存在等,使噬菌体吸附、侵染状况不同而造成噬菌斑形态大小清晰度的差异,给单斑分离带来困难,因而认为,在区别放线菌噬菌体时,不宜过份依赖于噬菌斑的特征。

关于卡那霉素链霉菌噬菌体的研究,国内外都有过一些报道^[5-9]。日本学者从土壤等样品中分离到了pK66、pK69、pK46和Hk-2,武汉抗菌素厂分离到了K-7212和K736,江苏靖江葡萄糖厂分离到了K₁、K₂,安徽朝阳制药厂分离到了SK₁。本文阐述的噬菌体与上述某些噬菌体存在着明显的差异。如在噬菌体类群上与SK₁不同,SK₁为A群,我们分离的为B群;在宿主敏感性上与K-7212、K-736不同,*S. Kanamyceticus* 39对这两株噬菌体是抗株,而对我们分离的四株噬菌体却被确定为敏感指示菌;在噬菌体大小和失活温度方面则与pK66不同:pK66颗粒大些(头140×110、尾340×10nm),失活温度低些(70℃30分钟),而我们分离的噬菌体颗粒大小为头:97.3—103.7×61.5—72.8,尾:221.0—240.5×7.5—10.5nm,失活温度为90℃30分钟。

参 考 文 献

- [1] Adams, M.H., 1959, «Bacteriophages». Interscience Publishers, INC, New York, pp 450-451.
- [2] 中国科学院微生物研究所噬菌体组, 1974, «噬菌体及其防治», 科学出版社, pp 35—37
- [3] 余茂敦等, 1974, 微生物学报, 14(2): 216—223.
- [4] Ackermann, H.W., 1978, «CRC Handbook of microbiol.», Vol II, Editors Allen I Laskin & Hubert A Lechevalier, pp 639—642.
- [5] 武汉抗菌素厂三车间, 武汉大学生物系微生物专业实践组, 1975, 武汉大学学报, 1: 41—44.
- [6] 孔泰、顾维旭, 1977, 微生物学通报, 4(4): 23—30.
- [7] 沈淑瑜等, 1981, 安徽大学学报, 1: 1—8.
- [8] Masanori Okanishi & Yoshiro Okami, 1963, *J. Gen. Appl. microbiol.* 12(3): 207—217.
- [9] 何能波等, 1976, 微生物学报, 20(1): 56—60.

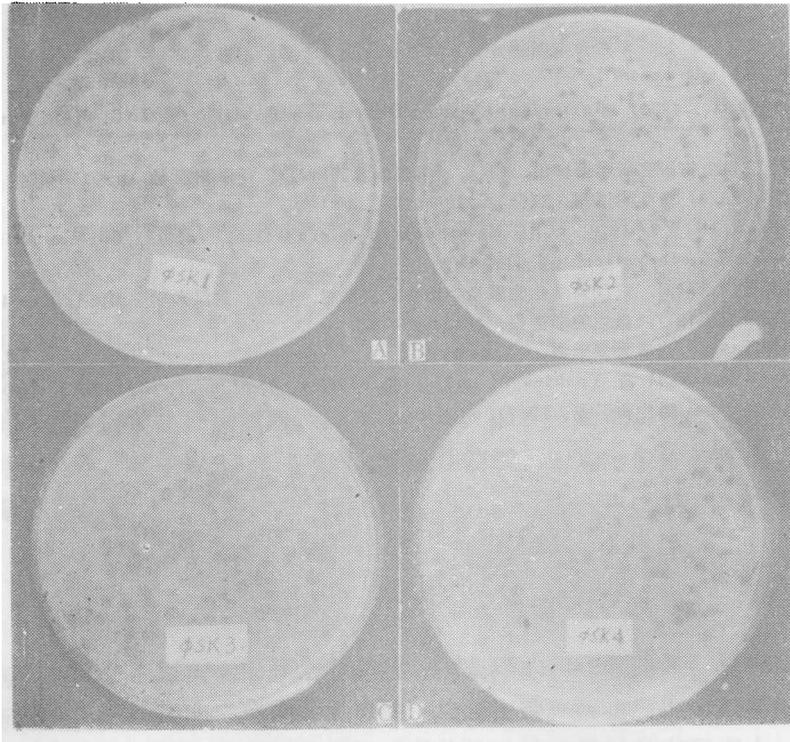
A STUDY ON ACTINOPHAGES OF STREPTOMYCES KANAMYCETICUS

Wei Yung-zai
Zhang Yi-shang

Tsuei Han-jun
Zhang Yong-di

(*Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu*)

Four strains of actinophages ϕ SK₁, ϕ SK₂, ϕ SK₃ and ϕ SK₄ were isolated from aberrant fermentation fluids of *S. kanamyceticus* obtained from the Fourth Pharmaceutical Factory in Chengdu. It was demonstrated that they differed from each other, but belonged to the same serological properties. They also showed some different characteristics from some other strains isolated in different areas in China and Japan.



A. ϕ SK₁ B. ϕ SK₂ C. ϕ SK₃ D. ϕ SK₄

图版 I. 噬菌斑的形态
plate I. The morphology of plaques



A. ϕ SK₁ B. ϕ SK₂ C. ϕ SK₃ D. ϕ SK₄

图版 I. 噬菌体颗粒的形态

Plate I. The morphology of actinophage particles

《病毒学杂志》征稿启事及简则

本刊贯彻科学技术 针面向经济建设和 百家争鸣的方针，主要反映我国病毒学各分支 学科在工、农、医、林、牧、渔等方面的研究 应用新成果、新进展、新 趋向，刊登昆虫病害、动物病毒、植物病毒、人体病毒、噬菌体和亚病毒方面的理论和应用研究报告、综述、简报、文摘、动态、学术活动消息、专题探讨以及新技术、新方法和新产品介绍等，以加强国内外同行间的学术交流，促进我国病毒科学事业的发展，更好地为四化建设服务。

本刊对从事病毒学科研和教学的人员，医药环卫工作者，农、林业植保工作者，畜牧、水产等养殖业工作者以及发酵工业的生产、检查人员和有关单位，均可订阅，并欢迎来稿。来稿要求：

(1) 文稿论点明确，论据充分，数据可靠，论述严谨，文字简洁。综述一般限定六千至八千字，简报、文摘限定七百至一千字。

(2) 研究论文报告附中文提要、外文摘要、外文图注，外文字母请用打字双行间隔打出。

(3) 来稿需一式二份，用钢笔在稿件上誊写清楚。简化字以新华字典为准，图表要完整清晰；一般线条图，用墨精绘在透明纸上，线条要均匀美观，图中文字说明用铅笔写上，并附外文说明。

(4) 图版照片力求精简，照片要清晰，并附中文与外文图版说明。

(5) 科技术语及名词，其涵义有可能发生混淆或误解者，请附外文并加括号。

(6) 度量衡单位一律采用国务院颁布的中文公制系统，表格数字一律用阿拉伯字，需附注脚的请以“*”号注明。

(7) 参考文献只列入主要的，未经公开发表的资料不得列入。

(8) 稿件经审查修改后一次清稿，排版后作者不得再次更动。一稿不能两投。

(9) 来稿请附单位推荐信，保密审查工作主要由作者单位负责；内容泄密或不宜在本刊公开发表的，概不刊用，原稿退回。一经刊登，酌致稿酬。

(10) 来稿请用挂号寄：湖北武昌小洪山中国科学院武汉病毒研究所《病毒学杂志》编辑部。