

## 大肠埃希氏菌诊断噬菌体受体位置的测定

何晓青 黄海青 孙吉昌

(江西省卫生防疫站, 南昌)

### 提 要

本文报道用静止期细菌吸附噬菌体速率常数测定(ARC), 和细胞壁脂多糖(LPS)使50%噬菌体失活量测定( $PhI_{50}$ )的结果, 以试图分析讨论存在于大肠埃希氏菌细胞壁上的噬菌体受体位置和数量。志贺氏菌噬菌体Sh的受体位置也一并于此进行试验和讨论。

经试验可被噬菌体E-4( $\phi 369$ )裂解的菌株9株, ARC试验K值为198~515, 其中3株提取LPS测定 $PhI_{50}$ 为 $<0.125-0.5\mu g/ml$ , 证明这些细菌细胞壁上有大量E-4噬菌体的受体, 而且这种受体就定位在LPS上。

被噬菌体E-1( $\phi 484$ )和Sh( $\phi 62$ )裂解的许多R菌株, ARC试验获得很高的K值, 但提取的LPS不能使这两株噬菌体失活, 说明这些细菌细胞壁上虽有大量的相应受体, 但受体位置不在LPS上, 很可能在脂蛋白上, 尚待实验证明。试验结果进一步推论两株噬菌体的受体是不相同的。

被噬菌体E-2( $\phi 466$ )裂解的菌株, ARC试验K值不超过100, 说明在细菌细胞壁上相应受体数目较少, 或噬菌体尾丝末端与受体的亲和力较低。单独的LPS不能作为噬菌体的受体, 但O抗原的存在似乎对噬菌体的吸附有协同作用。

噬菌体E-3( $\phi 451$ )ARC试验K值很低, 每个细菌细胞壁上的受体可能只有少数的几个。因此, 从细胞外的裂解大概是不可能的, 而是必须在细胞内复制, 然后从细胞内裂解。

如前文<sup>[1]</sup>所述, 作者已分离并筛选出大肠埃希氏菌诊断噬菌体E-1、E-2、E-3及E-4。当提高噬菌体的浓度时, 可以扩大在种内的裂解范围, 而其特异性不受影响。除噬菌体E-3与弗劳地氏柠檬酸杆菌噬菌体 $\phi II$ 相同外, E-3和E-4都能裂解一部分志贺氏菌株, 特别是福氏志贺氏菌, 几乎都同时可被这三种噬菌体裂解。

噬菌体对细菌的裂解取决于两个条件, 即必须在细菌细胞壁上有相应的受体, 同时噬菌体核酸侵入细菌细胞后能够进行大量的复制, 从细胞内使细菌裂解。如果在细胞壁上存在大量的受体, 吸附了大量的噬菌体, 也可以从细胞外使细菌裂解。在高浓度噬菌体的作用下, 细菌的裂解常采取这种方式。

本文用静止期细菌吸附噬菌体速率常数的测定, 和细胞壁LPS使50%噬菌体失活量的测定, 以试图分析讨论存在于大肠埃希氏菌细胞壁上的噬菌体的受体位置和数量。志贺氏菌属噬菌体Sh<sup>[2]</sup>的受体位置也一并于此进行试验和讨论。

本文于1987年3月16日收到

## 材 料 和 方 法

**噬菌体** 大肠埃希氏菌噬菌体 E-1 ( $\phi 484$ )、E-2 ( $\phi 466$ )、E-3 ( $\phi 451$ )、E-4 ( $\phi 369$ )，志贺氏菌属的噬菌体 Sh ( $\phi 62$ )，均按双层法<sup>[2]</sup>制备。

**菌种** 所用的菌种及来源见表 1。R 菌株是用相应 O 血清处理后在琼脂平板上分离的。

**噬菌体裂解试验** 按前文<sup>[1]</sup>的方法进行试验。

表 1 菌株及其来源

Table 1 Bacterial strains and their resource

Species	Strain No.	Derived from
Escherichia coli	K-12/HfrH, K-12/1485F+, K-12/1177F-	Department of Biology, Fudan University, Shanghai
E. coli	B, C	Shanghai Institute of Plant Physiology, Shanghai
E. coli	CMCC(B) 44369, 44370, 44371, 44174, 44128, 44384, 44386, 44389, 44397, 44406, 44422 44451, 44466, 44473, 44480, 44484, 44141,	National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing
Citrobacter freundii	CMCC(B)48040, 48075	ditto
Shigella sonnei	CMCC(B) 51592	ditto
S. flexneri	F-15, 59-132, 53-62	Our isolates

### 噬菌体吸附速率常数 (Adsorption Rate Constant, 简称 ARC) 的测定:

按文献<sup>[4]</sup>的方法进行。噬斑减少在 10% 以内者作为是测定误差，不予计算。测得的结果按下列公式计算 K 值。

$$K = \ln \frac{P_0}{P} \times \frac{1}{B_t} \times 10^{11} \text{ ml/分}$$

$P_0$  吸附前噬斑对照计数

$P$  吸附后噬斑计数

$B$  每 ml 所含细菌数

$t$  吸附试验时间 (分)

**细菌脂多糖 (LPS) 的提取:** 按 Westphal 酚水提取法<sup>[5]</sup>提取细菌的 LPS。

**LPS 使 50% 噬菌体失活量 (PhI<sub>50</sub>) 测定** 按文献<sup>[6]</sup>方法进行。PhI<sub>50</sub> 量以 LPS  $\mu\text{g/ml}$  表示，按噬斑计算的结果直接读取。

## 结果与讨论

噬菌体 E-4 ( $\phi 369$ )，经试验出现三类不同的结果(表 2)。大肠埃希氏菌 K-12、大肠埃希氏菌 B 和 44484、44466，均不被 E-4 噬菌体裂解，ARC 试验结果 K 值为 0，LPS 在  $500\mu\text{g}/\text{ml}$  也不能使噬菌体失活。证明这些细菌细胞壁上没有相应的受体。

表 2 E-4 ( $\phi 369$ ) 噬菌体测定结果  
Table 2 Results obtained from phage E-4 ( $\phi 369$ )

Strains No.	Lysis	ARC (K value)	$\text{PhI}_{50}$ (LPS/ $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
<i>Escherichia coli</i>			
K-12/HfrH	—	0	> 500
K-12/1177F-	—	0	
44484R*	—	0	> 500
44466	—	0	
B	—	0	> 500
<i>E. coli</i> C			
44174	CL	286	
44369	CL	275	
44128	CL	199	0.25
44370	CL	198	0.5
<i>Shigella flexneri</i>			
F-15	CL	340	< 0.125
59-132	CL	264	
58-62	CL	225	
<i>S. sonnei</i>			
51592R	CL	515	
<i>E. coli</i>			
44480R	OL	55	
44480	OL	51	
44371R	OL	59	> 500
44371	OL	62	

\*R strains, see text.

大肠埃希氏菌 C，大肠埃希氏菌 44174、44369、44128(R)、44370(R)，福氏志贺氏菌 3 株和宋内氏志贺氏菌 II 相，均可被 E-4 噬菌体裂解，ARC 试验 K 值为 198—515，经试验过的几株菌所提取的 LPS， $\text{PhI}_{50}$  为  $< 0.125\mu\text{g}/\text{ml}$  至  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 。证明这些细菌细胞壁上有大量的相应受体，而且受体就是定位在 LPS 上。

大肠埃希氏菌 44480 和 44371 虽然也被  $\phi 369$  裂解，它们 ARC 试验的 K 值在 51—62 之间，但用 44371(R) 菌株制备的 LPS 测定  $\text{PhI}_{50}$ ， $500\mu\text{g}/\text{ml}$  仍然无作用。说明系类属反应，可能在完整的细菌细胞壁上具有构成一个类似于这类受体的一个条件，其机理尚不清楚。

噬菌体 E-1 ( $\phi 484$ ) 和 Sh( $\phi 62$ )：从表 3 可以看出， $\phi 484$  和  $\phi 62$  都能裂解大肠埃希氏菌 K-12，而且 ARC 试验获得高的 K 值。从 R 菌株和 S 菌株配对的试验结果来看，R 菌株均比 S 菌株具有较高的吸附速率。说明这两株噬菌体的受体具有相似的特性。由于 S 菌株的 O 抗原形成为固体屏障，妨碍噬菌体的吸附，R 菌株不形成 O 抗原糖链，故噬菌体可以较为容易地吸附在受体上。这一现象与 O-1 噬菌体相似，O-1 噬菌体的受体已确定是在 LPS 上， $PhI_{50}$  试验所需 Ra 和 SR 菌株的 LPS 量  $< 0.1 \mu g/ml^{[4,7]}$ 。而我们所提取的大肠埃希氏菌 K-12 的 LPS 则不能对这两株噬菌体呈现明确的失活作用，

表 3 E-1 ( $\phi 484$ ) 和 Sh ( $\phi 62$ ) 噬菌体测定结果  
Table 3 Results obtained from phage E-1 ( $\phi 484$ ) and Sh ( $\phi 62$ )

Strain No.	$\phi 484$			$\phi 62$		
	Lysis	ARC	$PhI_{50}$	Lysis	ARC	$PhI_{50}$
Escherichia coli						
B	—	0	$> 500$	CL	525	$> 100$
44369	—	0		CL	215	
44174	—	0				
E. coli						
K-12/HfrH	CL	607	$> 500$	CL	92	$> 100$
K-12/1485F+	CL	607				
K-12/1177F-	CL	550		CL	481	
E. coli						
44484R	CL	510	$> 500$	CL	314	$> 100$
44484	CL	382		CL	190	
44480R	CL	505	$> 500$	CL	311	$> 100$
44480	—	33	$> 500$	—	0	
44473R	CL	108	$> 500$	CL	597	16
44473	CL	61		CL	5	
44371R	CL	98	$> 500$	CL	329	$> 100$
44371	CL	7		CL	35	
Shigella flexneri						
F-15	CL	325	$> 500$	CL	382	8
59-132	CL	82		CL	510	
58-62	CL	18		CL	187	
S. sonnei						
51592R	CL	225		CL		

说明这两株噬菌体的受体不在 LPS 上，很可能是在与 LPS 形成镶嵌结构的脂蛋白上，尚待进一步的实验证明。

$\phi 484$  不能裂解大肠埃希氏菌 B 和大肠埃希氏菌 44369，ARC 试验 K 值为 0，而  $\phi 62$  则可以裂解这两株菌，ARC 试验 K 值分别为 525 和 215。说明这两株细菌细胞壁上没有  $\phi 484$  的受体，但存在大量  $\phi 62$  的受体，也就是说这两株噬菌体在相应细菌细胞壁上的受体是不相同的，虽然它们还具有一些相似的特性。

表 4 E-2 ( $\phi 466$ ) 和 E-3 ( $\phi 451$ ) 噬菌体测定结果  
Table 4 Results obtained from phages E-2 ( $\phi 466$ ) and E-3 ( $\phi 451$ )

Strain No.	$\phi 466$			$\phi 451$		
	Lysis	ARC	PhI <sub>50</sub>	Lysis	ARC	PhI <sub>50</sub>
<i>Escherichia coli</i>						
B	—	0		—	4	
K-12/HfrII	CL	15		—	11	
K-12/1485F+	CL	0		—		
K-12/1177F—	—	0		—	8	
<i>Shigella flexneri</i>						
58-62	CL	13		CL	6	
F-15	—	0		OL	4	
59-132	—	0		CL	14	
<i>S. sonnei</i>						
51592R	—	0		—	8	
<i>E. coli</i>						
44484R	OL	57				
44484	OL	39		—	9	
44371R	CL	81	> 500		11	
44371	CL	78		—	12	
44473R		0			11	
44473	OL	40		—	7	
44480R	CL	0	> 500			
44480	CL	18	> 500	—		
<i>E. coli</i>						
44369	CL	91		—	0	
44422	CL	34		CL		> 500
44466	CL	89		CL	0	
44451	OL	19		CL	10	
44141				CL		> 500
<i>Citrobacter freundii</i>						
48040				CL	10	
48075				CL	11	

噬菌体 E-2( $\phi 466$ ) 和 E-3 ( $\phi 451$ )：从表 4 可看出： $\phi 466$  经 ARC 试验，其 K 值没有超过 100 的，可能在细菌细胞壁上它们的受体数目较少，或噬菌体尾丝末端结构与细胞壁上受体之间的亲和力较低，故吸附速率偏低。在 S 菌株与 R 菌株的配对试验中，有两株 S 菌株的吸附速率显然高于 R 菌株，似乎 O 抗原的存在对噬菌体的吸附有协同作用。单独的 LPS 是不能作为受体的，这已可从 PhI<sub>50</sub> 试验的结果作出说明。Datta 等对 TuII 噬菌体作过研究，曾作过相似的解释<sup>(8)</sup>。

$\phi 451$  经 ARC 试验，其 K 值只在 4~14 之间，而且与裂解试验的结果呈现矛盾的现象，即不论能否产生裂解现象，它们都有一些低的但是明确的吸附作用。在细胞壁上的

受体应该是极少的, 每个细菌细胞壁上甚至只有少数的几个。因此, 从细胞外的裂解大概是不可能的, 而是必须在细胞内复制, 然后从细胞内裂解。

### 参 考 文 献

- [1] 何晓青等, 1983, 中华微生物学和免疫学杂志, 3(4): 264—268.
- [2] 何晓青等, 1983, 中华微生物学和免疫学杂志, 8(2): 96—100.
- [3] Adams, M.H., 1959, Bacteriophages, Interscience Publishers.
- [4] Lindberg, A.A and Holme, T., 1969, J. Bacteriol., 99: 513—519.
- [5] Westphal, O, et al., 1952, Z. Naturf., 16: 148.
- [6] Lindberg, A.A., 1967, J. Gen. Microbiol., 48: 225—233.
- [7] Lindberg, A.A., and Hellerqvist, C.G., 1971, J. Bacteriol., 105: 57—64.
- [8] Datta, D.B. et al., 1977, J. Bacteriol., 131: 821—829.

## The Estimation of Receptor Sites on Escherichia coli Cell Wall about Their Diagnostic Phages Adsorption

He Xiao-qing

Huang Hai-qing

Sun Ji-chang

(Jiangxi Hygienic and Antiepidemic Station, Nanchang)

In the present paper, it is reported that the results of phage adsorption rate constant (ARC) on stationary phasic bacteria, and 50% phages inhibition ( $PhI_{50}$ ) of LPS  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was estimated, and there is an attempt to analyse the loci and the number of phage receptor sites existed on cell wall of *Escherichia coli*. The receptor site of *Shigella* phage Sh was also estimated and discussed.

High ARC (K values 198—515) were derived from 9 strains which lysed by phage E-4( $\phi 369$ ), and the LPS less than 0.125 to 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  from 3 strains of them may be to cause 50% phages inhibition. It is provided that the receptor sites are located in large amount on LPS of these organisms.

The high ARC K values were derived from many R strains which lysed by phages E-1( $\phi 484$ ) and Sh( $\phi 62$ ), but LPS of them are unable to cause phages inhibition. The results mentioned above point out an explanation that although the corresponding phage receptors existed in large amount, but are not located on LPS, and they are located most probably on lipoprotein. Furthermore, it is concluded that the receptor sites of the two phages are not the same.

Lower than 100 of ARC K values were derived from strains which lysed

by phage E-2( $\phi 466$ ). The results showed that the phage receptors are relatively less, or the affinity between receptor and terminal of phage tail fiber is relatively low. The single LPS is unable to take for the phage receptor, but the existing O antigen seems to have coordinated action within the phage adsorption.

The least ARC were derived from phage E-3( $\phi 451$ ), showing a few receptors located on cell wall. Therefore, it is unable to cause bacteriolysis without the cell, and it is able to cause lysis within the bacteria cells due to phage reproduction only.

#### 《国外生物科技》(季刊)1989年征订启事

生物科技是当代三大前沿科学之一,被誉为“今天的热门科学,明天的技术,后天的产业”。二十一世纪将是生物学世纪,为迎接生物学世纪的到来。1985年创立了本刊,并在全国公开发行。四年来她已成为“引进先进技术的桥梁,传播生物学知识的纽带”,有力地促进了我国生物学科研、教学及其应用技术的开发。为适应我国生物技术事业发展的需要,本刊主要栏目设置有:基础理论、研究动向、应用技术、研究报告、文摘简介以及国外生物技术书刊简介等。主要读者对象为从事农、林、医药、卫生、食品加工及生物科研部门的领导和研究技术人员,有关大专院校师生以及有关生物技术厂家的技术人员。本刊为季刊,16开横排本,正文64面,全国公开发行(国内统一刊号:CN41-1123号),自办收订,每期定价1.20元,全年4.80元(含邮费),可全年订阅或破季订阅。欢迎邮汇或信汇订阅。地址:河南省郑州市花园路28号《国外生物科技》编辑部;开户银行:中国工商银行郑州支行花园路办事处;帐号:06088237-85。