

测定 λ 原噬菌体诱导频率的新方法

范成鹏, 方呈祥**, 张珞珍, 戴淑香

(武汉大学生命科学院, 湖北武汉 430072)

New Methods for Determining Induction Rate of λ Prophage in Lysogenic Bacteria

FAN Cheng-peng, FANG Cheng-xiang**, ZHANG Luo-zhen, DAI Shu-xiang

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Two new methods, colony counting method and plate inducing method, were established for determining ultraviolet induction rate of λ prophage in the present study. Culture of lysogenic bacteria (λ) which was induced by ultraviolet irradiation and cultivated in dark was directly spread on the plate, and induction rate of λ prophage was calculated based on the CFUs (colony forming units). The plate with mixture of lysogenic bacteria and indicator strain was induced by ultraviolet irradiation. The induction rate of λ prophage was calculated based on the PFUs (plaque forming units). These two methods not only can determine precisely induction frequency of λ prophage, but also are easy to manipulate, and they can save efforts and apparatus, they are also easy to repeat. Furthermore, the mixture of *Cordyceps sinensis* extract and lysogenic bacteria was irradiated with UV. The results demonstrate that the new methods are practical and easy to conduct, and that *Cordyceps sinensis* has a strong protection effect against UV-irradiation.

Key words: Induction rate of λ prophage; Soft agar layer technique; Colony-counting method; Plate-inducing method

摘要: 本文报道两种测定 λ 原噬菌体紫外诱导频率的新方法——菌落计数法和平板诱导法。将溶源菌液经紫外诱导暗培养稀释后直接涂布在平板上培养,根据平板上菌落形成单位数计算 λ 噬菌体紫外诱导频率。另一种是将溶源菌与指示菌混合制备的平板用紫外线诱导,根据平板上噬菌体形成单位确定 λ 噬菌体紫外诱导频率。这两种方法不仅能准确测定噬菌体紫外诱导频率,而且操作简便,节省时间和用具,重复性好。本研究还将冬虫夏草浸出汁与溶源菌混合后进行紫外辐射,通过几种方法进行比较,结果证明建立的新方法确实可行,易操作;同时也表明冬虫夏草具有较强的抗紫外辐射作用。

关键词: λ 原噬菌体; 诱导频率; 软琼脂平板法; 菌落计数法; 平板诱导法

中图分类号: Q939.48 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)04-0367-04

λ 噬菌体是分子生物学和分子遗传学研究中常用材料,其诱导与诱导频率的测定成为实验室的常规内容。

溶源菌中的 λ 原噬菌体经紫外诱导由溶源状态变为裂解状态,最后裂解宿主细胞,释放出大量的具有侵染力的噬菌体颗粒^[1,2]。

目前测定 λ 噬菌体诱导率常规的方法是软琼脂平板法^[3]。软琼脂平板法不仅工作量大,而且效价和产量均较低^[4],而且在软琼脂平板法中,使用的琼脂量及噬菌体浓度不当极易造成噬菌体计数的较大误差^[5]。我们经过反复试验,发现实际上这种方法不能测定 λ 原噬菌体溶源菌的诱导频率,而且操

收稿日期:2002-03-15, 修回日期:2002-04-09

作者简介:范成鹏(1977-),男,湖北省籍,硕士研究生。

** 通讯作者:方呈祥(1950-),男,湖北省籍,副教授。Correspondence author

作程序多,所需时间长,易产生较大的误差。因此,建立快速、准确测定 λ 原噬菌体紫外诱导频率的方法非常必要。

根据溶源菌中 λ 原噬菌体紫外诱导的基础理论,我们建立了两种有效测定 λ 原噬菌体紫外诱导频率的方法,适宜于 λ 噬菌体诱导研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

溶源菌株 *Escherichia coli* K12(λ), 指示菌 *E. coli* W3001 由中国典型培养物保藏中心提供。

1.2 培养基与试剂

LB培养基,磷酸缓冲液(0.1mol/mL)和YT培养基(使用前加入麦芽糖和 $MgSO_4$,终浓度分别为2mg/mL和10mmol/mL)均按常规方法配制。

冬虫夏草浸出汁:将单个冬虫夏草捻成粉末状,称取适量干粉放入100 mL蒸馏水中,煮沸后过滤,将滤液定容至一定体积,使冬虫夏草的浓度为10 mg/mL,过滤除菌,置4℃保存,备用。

1.3 方法

1.3.1 噬菌体裂解液的制备 参考 Jeffrey^[3]的方法进行。

1.3.2 λ 原噬菌体紫外诱导效率的测定

1.3.2.1 常规软琼脂平板法 分别取 λ 噬菌体裂解液和指示菌液混合,37℃水浴保温20 min;取出试管,加入YT半固体培养基,混匀后倒入含YT底层平板;待凝固后,置37℃培养过夜。根据噬菌斑数量确定噬菌体效价,即噬菌斑形成单位(PFUs)。同时以不经诱导的溶源菌作对照。

1.3.2.2 菌落计数法 上述经紫外诱导的暗培养物进行适当稀释后,取不同的稀释液涂布于YT平板上,37℃培养过夜。同时以不经紫外诱导的溶源菌稀释液作对照。根据菌落形成单位(CFUs)确定 λ 原噬菌体紫外诱导频率。

1.3.2.3 平板诱导法 先将指示菌液涂布在YT平板上,置37℃培养;然后如前所述,将溶源菌进行适当稀释,取不同的稀释液和适量YT半固体培养基混合后,倒入涂有指示菌的平板上,待凝固后直接置紫外灯下进行诱导,然后置37℃暗培养过夜。同时以不经紫外诱导的平板作为对照。根据PFUs/mL和CFUs/mL确定 λ 原噬菌体紫外诱导频率。

2 结果

2.1 紫外诱导频率

2.1.1 常规软琼脂平板法 不同细胞密度的溶源菌细胞经紫外诱导后,测定噬菌体效价,结果见图1。当细胞密度低于 2×10^8 个/mL时,PFUs/mL随溶源菌细胞密度的增加而增加。当溶源菌细胞密度为 2×10^8 个/mL时,PFUs/mL最高,为 1.1×10^6 个/mL。细胞密度高于 2×10^8 个/mL时,随着细胞密度的增加,噬菌体效价则迅速下降。

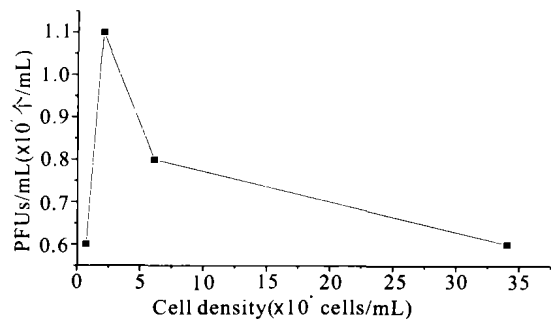


图1 常规软琼脂平板法测定的紫外诱导效果

Fig. 1 Induction effect determined by routine soft agar layer technique

2.1.2 菌落计数法 随着溶源菌细胞密度的增加,经紫外诱导后平板上形成的菌落数也增加,最后测得的CFUs/mL随之上升(图2)。根据平板上菌落数,按诱导频率公式 $(CFUs_{\text{对照}} - CFUs) / CFUs_{\text{对照}} \times 100\%$,计算 λ 原噬菌体紫外诱导频率。在本实验条件下,测定被紫外诱导的细胞在溶源菌细胞中所占的比例为44%。

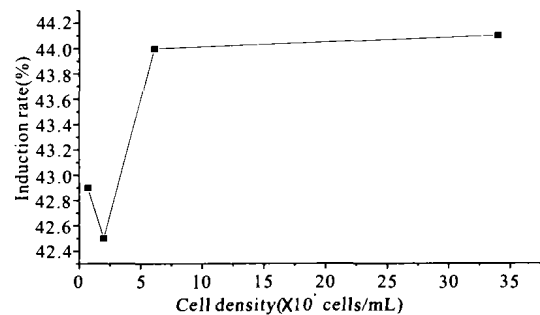


图2 菌落计数法测定的 λ 原噬菌体紫外诱导频率

Fig. 2 Induction rates determined by colony counting method

2.1.3 平板诱导法 如图3所示,随着溶源菌细胞密度的提高,PFUs逐渐增加。根据噬菌斑形成单

位(PFU)和菌落形成单位(CFU),按诱导频率公式 $(PFUs/mL)/(CFUs/mL) \times 100\%$ 计算得诱导频率最高可达44.5%.

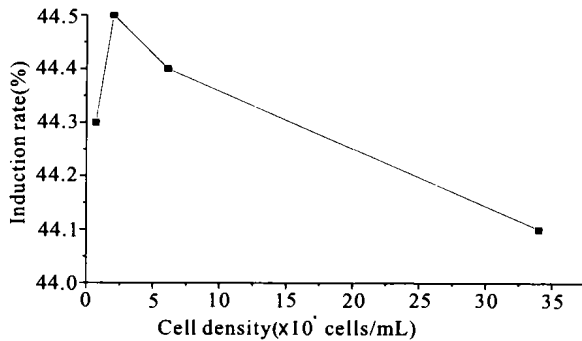


图3 平板诱导法测定的紫外诱导频率

Fig. 3 Induction rates determined by Plate inducing method

正如我们预期的那样,这两种方法测定的 λ 原噬菌体诱导频率十分接近,而且经反复试验,表明这两种方法均有很好的重复性;与常规软琼脂平板法明显不同的是,尽管使用的细胞密度不同,其诱导频率不尽相同,但细胞密度相同,使用菌落计数法和平板诱导法测定的 λ 原噬菌体诱导频率分别为44%和44.5%,结果十分相近。

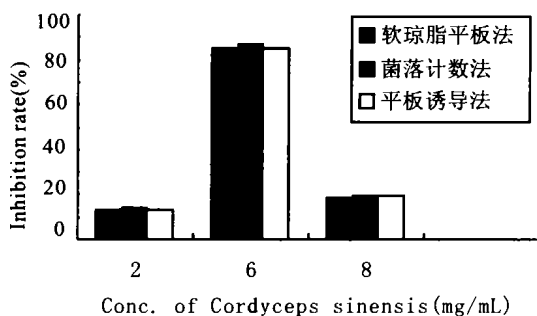


图4 冬虫夏草对紫外诱导的抑制效果

Fig. 4 Inhibition effect of *Cordyceps sinensis* on UV induction

2.2 冬虫夏草对紫外辐射的抑制作用

应用上述三种测定方法研究冬虫夏草对紫外诱导的抑制作用。如图4所示,冬虫夏草对 λ 原噬菌体紫外诱导表现出显著的抑制作用。当冬虫夏草的浓度为6mg/mL时,对 λ 原噬菌体紫外诱导抑制效果最佳,抑制率可高达84%以上;其浓度为2mg/mL或8mg/mL时,其抑制率很低,均低于20%。常规法测定的冬虫夏草对 λ 原噬菌体紫外诱导的最大抑制率是84.7%,菌落计数法测定的是85.8%,平板诱导法测定的是85.1%,这三种方法测定的效果

较为一致,由此可见,新建立的测定方法是可靠且行之有效的方法,适宜于 λ 原噬菌体的诱导研究。

3 讨论

本研究中所使用的紫外线照射的剂量,既不会杀死细菌,也不会抑制噬菌体的增殖。溶源菌经紫外诱导后在暗培养期间, λ 噬菌体在宿主细胞内进行复制,并形成大量的噬菌体。但在溶源菌群体中,有的细胞被诱导,有的细胞则未被诱导;有的细胞被诱导后由于修复作用并非产生噬菌体颗粒。再者,不同的诱导细胞中形成完整的噬菌体颗粒并非同步,有的细胞形成的噬菌体可多至200个,有的则较少。因此,常规软琼脂平板法所测定的PFUs/mL只是溶源菌群体中部分细胞所产生的噬菌体颗粒的总数。用这种结果与对照比较,只能初步评估 λ 噬菌体的诱导效果,而不能表示被诱导的细胞所占的比例。也就是说,该方法无法测定 λ 原噬菌体的诱导频率。

当溶源细胞经紫外线诱导后, λ 原噬菌体进入裂解生长,最后宿主细胞被裂解,释放出大量的成熟的噬菌体。那么,诱导细胞在平板上不会形成菌落,而在平板上形成的菌落则应是未被诱导或诱导后经修复的溶源细胞生长繁殖的结果。 $(CFUs/mL_{\text{对照}} - CFUs/mL) / (CFUs/mL_{\text{对照}})$ 表示被有效诱导的溶源细胞在溶源菌细胞群体中所占的比例。因此,菌落计数法便是间接测定诱导频率的一种方法。

溶源细胞中 λ 原噬菌体经紫外线诱导进入裂解生长,导致其细胞被裂解,释放出噬菌体,可进一步感染指示菌 *E. coli*. W3001, 经过感染、繁殖、裂解和再感染的循环,最后在软琼脂平板上形成清晰的噬菌斑,而未被诱导或辐射后经修复的溶源细胞与指示菌混合后在诱导平板上则不能形成噬菌斑。将适当密度(<100 细胞/皿)的溶源菌涂布在平板上进行紫外诱导,最后形成的一个噬菌斑可视为一个被诱导的溶源细胞,则PFUs等同于被有效诱导的CFUs。因此, $(PFUs/mL) / (CFUs/mL) \times 100\%$ 则可表示 λ 噬菌体的诱导频率。

常规软琼脂平板法用于测定紫外诱导效率时,不仅操作程序较繁琐,而且易造成较大的误差^[6]。主要表现在:1)由于氯仿是蛋白质变性剂,在用氯仿破细胞时,使用过量,将对噬菌体颗粒的尾丝等有影响,导致其侵染能力降低;但若加入的氯仿过少或作用时间过短,不利于破细胞,所得的噬菌体数量则

少;2)半固体培养基与已感染的指示菌液有时混合不均匀,而且混合液倒入底层平板时,难免在混合液试管中残留少许。这种量虽少,但相对于含噬菌体的混合液4 mL而言,会产生5%~10%的误差;3)该法操作时所需器具较多。我们建立的两种新方法则可以克服上述弊病。

菌落计数法,操作程序简单。溶源细胞经紫外诱导暗培养后,进行适当稀释,将稀释液直接涂布平板,培养后与对照比较菌落数,计算出诱导频率。这种方法节省时间,不需制备噬菌体裂解液,也无需直接测定噬菌效价,用具也大为减少。实践证明,这种方法操作简便、快速,重复性好,是一种很好的间接测定 λ 原噬菌体紫外诱导频率的方法。

相比较菌落计数法而言,平板诱导法能观察诱导产生的噬菌斑,直接测定 λ 原噬菌体紫外诱导频率。该方法省去了加入 $2\times$ LB培养液的步骤,只需将诱导平板上溶源细胞控制在适宜的密度(<100 细胞/皿),以及先将指示菌涂布在YT平板上培养,便可准确测定诱导频率。这种方法同样具有准确、简便、快速、重复性好的效果,而且能直接反映诱

导频率。

冬虫夏草是一种名贵中草药,药效显著,清除自由基是其主要药理功效之一^[6]。应用本研究建立的菌落计数法和平板诱导法,研究冬虫夏草对 λ 原噬菌体紫外诱导的影响。结果表明它具有较强的抗紫外辐射能力,能有效的抑制 λ 原噬菌体的紫外诱导。这不仅为研究紫外诱导机理提供实验证据,同时也证实了我们建立的新方法的可行性。

参考文献

- [1] Johnson A D. λ repressor and cro-components of an efficient molecular switch[J]. *Nature*, 1981, 294: 217-232.
- [2] Alcamo I E. *Fundamentals of microbiology*[M]. Massachusetts: Addison - Wesley Publishing Company, 1983.
- [3] Jeffrey H M. *Experiments in Molecular Genetics*[M]. New York: Cold Spring Laboratory. 1972.
- [4] 杨水云,崔亚丽,赵文明,等.一种制备高效噬菌合格悬液的有效方法[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 1999, 2: 45-46.
- [5] 王新为,芮期义,高明,等.影响大肠杆菌噬菌体 λ 计数的因素[J]. *中国公共卫生*, 1997, 13: 93-94.
- [6] 温元祥,穆殿平.冬虫夏草的药理作用及临床研究[J]. *天津药学*, 1999, 10: 47-50.