

感染丝状蓝藻的噬藻体的裂解周期和释放量的测定*

程 凯¹, 王春艳¹, 郭亚新¹, 石正丽², 赵以军^{1**}

(1. 华中师范大学生命科学学院, 湖北武汉 430079; 2. 中国科学院武汉病毒研究所无脊椎动物病毒学联合开放实验室, 湖北武汉 430071)

Measurement of Lysing Cycle and Burst Size of Cyanophage Infecting Filamentous Cyanobacteria (blue-green algae)

CHENG Kai¹, WANG Chun-yan¹, GUO Ya-xin¹, SHI Zheng-li², ZHAO Yi-jun^{1**}

(1. College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China; 2. Joint Laboratory of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of Virology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: Several methods were tested for measurement of lysing cycle and burst size of the cyanophage infecting the filamentous cyanobacterium-*Plectonema boryanum* IU594. The results indicated that the lysing curve of host cells was consistent with the one-step growth curve of cyanophage, thus it was more convenient to substitute measuring the lysing curve of host cells for the one-step growth curve measurement of cyanophage. Besides, the burst size increased with the reducing cyanophage inoculation, reaching the maximum of 206 PFU/Cell by 1 PFU infection. It was suggested that more exact burst size of cyanophage could be obtained under 1 PFU cyanophage inoculation.

Key words: Cyanophage; Filamentous cyanobacteria; Lysing cycle

关键词: 噬藻体; 丝状蓝藻; 裂解周期; 释放量

中图分类号: Q939.48 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)04-0374-03

近年来,随着浮游病毒的认识的深入,人们认识到浮游病毒对水体中初级生产力的影响是巨大的^[1],其主要证据就是发现噬藻体在海洋蓝藻的种群控制上发挥着重要作用^[2]。噬藻体的释放量和裂解周期是衡量噬藻体感染力的重要指标,很多重要的生态指标如病毒在生态系统中对宿主的致死率、病毒种群得以维持的阈浓度等都需要使用病毒的释放量和裂解周期来加以推算^[3,4],因此准确地测定这两个基本参数是十分重要的。在自然界,很多丝状蓝藻,如颤藻、鱼腥藻、螺旋藻、席藻等是能够形成水华的,其中有些还具有产毒的功能^[5]。丝状蓝藻的形态特征有别于单细胞蓝藻,在被噬藻体感染时,丝状蓝藻的感染周期和光合生理也与单细胞蓝藻有较大的差异^[6],因此研究裂解丝状蓝藻的噬藻体的方法可能不同于感染单细胞的噬藻体。本次试验以一种感染丝状宿主的噬藻体为材料,探讨了确

定其裂解周期和释放量的研究方法。

1 材料与方法

1.1 材料

噬藻体是 2001 年从本地分离得到的,试验所使用的宿主蓝藻为鲍氏织线藻 (*Plectonema boryanum* IU594)。

1.2 以显微计数法获得裂解曲线

将一定浓度的噬藻体和处于对数生长期的鲍氏织线藻 IU594 进行混合、在避光条件下于 28℃ 静置 30 min, 10 000g 离心 5 min。收集藻细胞,用 AA 培养基洗涤,重复 3 次。然后于 28℃ 培养,每隔 1h 用血球计数板计数细胞数目和藻丝长度。

1.3 以噬菌斑(PFU)法测定噬藻体一步生长曲线

将一定浓度的噬藻体和处于对数生长期的鲍氏织线藻 IU594 进行混合、吸附、离心、洗涤(方法同

收稿日期:2002-01-30,修回日期:2002-04-01

* 基金项目:国家自然科学基金资助(39600004, 399700647)

作者简介:程 凯(1977-),男,湖北省武汉市籍,硕士研究生,研究方向为环境微生物学。

** 通讯作者:赵以军(1963-),男,湖北省洪湖籍,教授,研究方向为环境微生物学。Correspondence author. E-mail: pyjzhao@263.net

1.2)每隔 1h 用 PFU 法测定病毒效价,结果换算成单噬藻体的生长曲线。

1.4 用单噬藻体感染织线藻的一步生长曲线

将已知效价的噬藻体稀释至 10PFU/mL,从中取 0.1mL 感染 1mL 的对数期宿主 25 瓶,每隔 1h 取 5 瓶用 PFU 法测定病毒效价。

2 结果与讨论

由于丝状宿主与单细胞宿主具有不同的形态学特征,所以测量裂解丝状宿主的噬藻体的一步生长曲线的方法也不同于单细胞宿主。我们比较了宿主细胞的裂解曲线、宿主藻丝大小的变化曲线(图 1)和在不同 MOI 条件下的噬藻体的一步生长曲线(图 2),试图找到测定裂解丝状宿主的噬藻体的一步生长曲线的简易方法。

裂解期,但藻丝大小的变化曲线(图 1)则与上述的裂解周期不吻合,并且随着接种的噬藻体的效价的增大,藻丝开始断裂的时间明显提前。从图 1 可以看出,当 MOI 为 1:2 时,藻丝是从 3h 开始断裂的,而当 MOI 是 10:1 时,藻丝则从 2h 开始断裂。造成这一现象的原因很可能是由于不同生长状态的细胞对噬藻体的吸附能力不同^[8]。将 MOI 设计成接近和超过 1:1 时,少量敏感细胞由于承受了大量的噬藻体的入侵而直接发生裂解,从而使藻丝发生快速断。

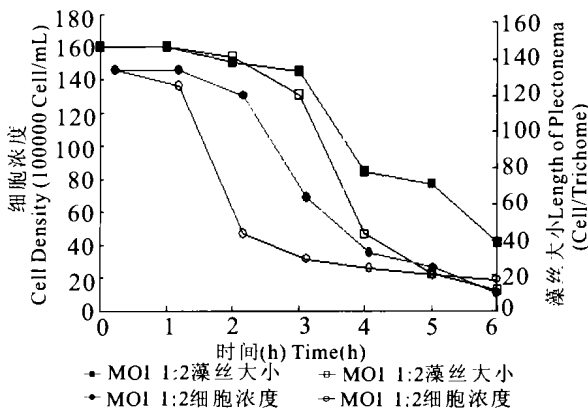


图 1 不同 MOI 感染时藻细胞的裂解曲线和藻丝大小的变化曲线

Fig. 1 Lysing curves of *Plectonema* cells and change curves of the length of *Plectonema* trichomes at different MOI

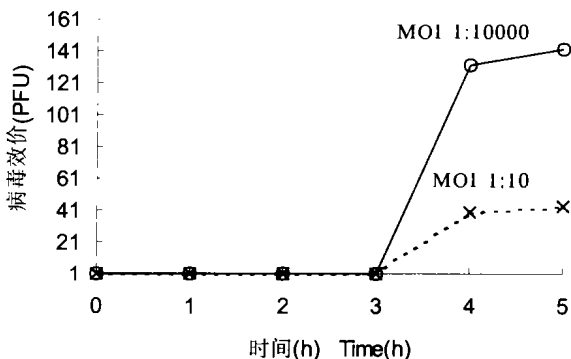


图 2 不同 MOI 感染时的一步生长曲线

Fig. 2 One-step growth curves of cyanophage at different MOI

在本试验中,宿主细胞的裂解曲线和用各种 MOI 感染的一步生长曲线均能准确指示噬藻体的裂解周期,即感染的最初 3h 为潜伏期,随后的 1h 为

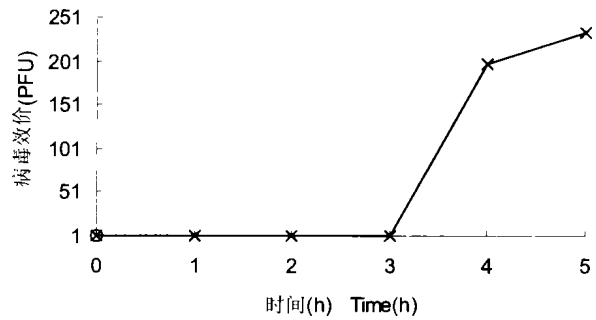


图 3 1 个 PFU 噬藻体感染的一步生长曲线

Fig. 3 One-step growth curve by 1 PFU cyanophage infection

通过比较各种效价噬藻体感染得到的一步生长曲线(图 2),我们还注意到,随着 MOI 的减小,测得的噬藻体的释放量会增加,如当 MOI 为 1:100 时测得的释放量仅为 40PFU/Cell,当 MOI 为 1:10000 时测得的释放量则为 134PFU/Cell,而用 1 个 PFU 噬藻体接种时(此时的 MOI 不超过 1:10⁷)的得数最高(图 3),释放量为 200PFU/Cell 左右。造成这一现象的原因是由丝状宿主的形态特征所决定的,根据我们的计数,正常的织线藻藻丝的平均大小为 134 细胞/根,当我们以 MOI 为 1:10000 接种时,此时噬藻体效价与藻丝的长度比为 1:75,足以保证不会出现多个噬藻体感染到同一根藻丝的情况,此时用 PFU 法计数得到的噬藻体效价是比较准确的。但由于噬藻体的释放量较大(实际为 206PFU/Cell),当经过一个裂解周期之后,噬藻体效价与藻丝的长度比就增至 200:75(即使考虑了藻丝的断裂,这个比值也不会小于 200:150),此时必然出现多个噬藻体吸附到同一根藻丝上的情况,因此用 PFU 法来检测噬藻体的效价就会偏低。

以前人们在研究感染丝状宿主的噬藻体的生长曲线时,常用的方法是将 MOI 设计成 1:100,然后通过振荡培养或将藻丝打断的方式用 PFU 法测量

噬藻体的生长曲线^[9,10]。尽管这两种方法能够在一定程度上的避免多个噬藻体吸附到同一根藻丝上的情况,但无论是振荡培养还是将藻丝打断,都有可能影响藻的生长和噬藻体对藻的裂解,而且两种方法均不能完全避免噬藻体吸附到同一根藻丝上(因为噬藻体效价可能超过宿主细胞浓度,而且藻丝也很难被完全被打散成单细胞),除此以外,这两种方法在技术条件上都有较特殊的要求,对操作水平的要求较高。而我们用1个PFU的噬藻体感染的方法则无须破坏宿主的正常培养,也排除了多个噬藻体吸附到同一根藻丝上的可能。

综合以上分析,我们认为获得噬藻体感染丝状蓝藻的裂解周期的最简便方法是用细胞计数法,获得噬藻体的准确释放量的方法则可采用1个PFU噬藻体感染,它们无需振荡光照培养等复杂的条件和操作。

参考文献

- [1] Wommack K E, Rita R C. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64: 1092 - 2172.
- [2] Suttle C A. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity [J]. *Nature (London)*, 1990, 347: 467 - 469.
- [3] Suttle C A, Chan A M. Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus* spp [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 3167 - 3174.
- [4] Proctor L M, Okubo A, Furhrman J A. Calibrating estimates of phage - induced mortality in marine bacteria; ultrastructural studies of marine bacteriophage development from one - step growth experiments [J]. *Microbiology*, 1993, 25: 161 - 182.
- [5] 许敏, 赵以军, 程凯. 水华和赤潮的毒素及其检测与分析 [J]. *湖泊科学*, 2001, 13: 376 - 384.
- [6] 赵以军, 石正丽, 黄国锦, 等. 蓝藻病毒(噬藻体)的研究进展 [J]. *中国病毒学*, 1999, 14: 100 - 105.
- [7] Suttle C A. Enumeration and isolation of viruses [A]. *Aquatic microbial ecology* [C]. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993, 121 - 134.
- [8] Suttle C A. Cyanophages and their role in the ecology of cyanobacteria [A]. *The ecology of cyanobacteria* [C]. Netherlands Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2000, 563 - 589.
- [9] Nien - tai H, Teresa T, Thomas H G, et al. New *Anabaena* and *Nostoc* cyanophages from sewage settling ponds [J]. *Virol*, 1981, 114: 236 - 246.
- [10] Franche C. Isolation and characterization of a temperate cyanophage for a tropical *Anabaena* strain [J]. *Arch Microbiol*, 1987, 148: 172 - 177.