

苏芸金杆菌抗噬菌体血清的制备及应用

吴 继 星

(湖北省天门县微生物研究所)

在生产苏芸金杆菌 7216 菌剂中,曾一度受到噬菌体的严重威胁。为了有效防治噬菌体的危害,选用不携带烈性噬菌体的优良菌株,是重要措施之一。本文报道抗噬菌体血清的制备及其应用效果。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

苏芸金杆菌天门亚种 (*Bacillus thuringiensis* var. *tianmensis*) 7216。

(二) 培养基

1. 双层平板培养基(%)：牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1, 琼脂分别为 2 和 0.7, pH 7.2。
2. 液体摇瓶培养基(%)：玉米粉 1.7, 豆饼粉 1.9, 棉饼粉 0.5, 蚕蛹粉 0.2, CaCO_3 0.1, pH 8.0。

(三) 噬菌体的分离纯化及原液制备

取堆于地上的废菌粉或发酵车间脏土 1—2g, 参考 Adams 方法^[1]分离、纯化噬菌体。按常规方法^[2]进行效价测定。

(四) 抗噬菌体血清的制备

将噬菌体原液经耳缘静脉注射家兔, 共注射 5 次, 剂量分别为 (ml): 4、2、3、3.5、4。在第一次注射后每三天注射一次。最后一次注射后的第三天心脏采血, 分离抗血清, 将抗血清用生理盐水稀释 20 倍后过滤, 进行无菌检查并测定效价, 确证无菌后置冰箱保存备用。

(五) 抗噬菌体血清与噬菌体中和反应试验

将 7216 菌接入摇瓶培养基中, 每瓶接种量为 0.1ml (0.5 亿/ml), 培养 6 小时后分别接入不同剂量的抗血清与噬菌体, 以后每隔 6—8 小

时转一代 (接种量为 0.1ml), 每代振荡培养到全部形成孢子囊并有 10% 的芽孢、晶体脱落为止。最后分别倒双层平板检查噬菌体并镜检芽孢、晶体形成情况。

最适血清中和浓度试验采用两种剂量抗血清与不同效价的噬菌体分别加入 20ml 牛肉膏、蛋白胨液中混合, 充分作用后倒双层平板, 30℃ 培养 16 小时后检查噬菌斑数。

(六) 抗血清对噬菌体有效中和时间试验

将一定稀释度的抗血清与一定浓度的噬菌体同时加入牛肉膏、蛋白胨液中, 充分振荡后分别在不同时间吸取混合液 0.1ml 与 0.2ml 指示菌倒双层平板, 检查噬菌斑数。

结 果

1. 在本实验室条件下, 噬菌体经分离、纯化后得到直径为 0.3—0.5cm 的噬菌斑, 编号为 D_1 。制得的噬菌体原液效价为 2.1×10^8 单位/ml。制备的抗血清效价为 1:1280。

2. 抗噬菌体血清与噬菌体中和反应液对 7216 菌的芽孢、晶体形成的影响: 用噬菌体液 (效价为 2.1×10^8 单位/ml) 0.1 ml, 分别加入抗血清 1、0.5、0.2、0.1ml (均为用生理盐水稀释 20 倍的过滤液)。形成的菌落转接 6 次。加抗血清的菌落, 传代 6 次后均未出现噬菌斑, 产生的孢子囊、芽孢、晶体均与同步试验中的对照无差别。而不加抗血清、只加噬菌体的处理, 则菌体极不整齐, 皿内布满噬菌斑。试验表明, 抗血清与噬菌体中和反应液对 7216 菌的芽孢、晶体的形成均无影响。

3. 对抗血清与噬菌体 (D_1) 进行了最适中和浓度试验, 其结果见表 1。

表 1 最适中和浓度试验*

噬菌斑数 抗血清 (稀释 20 倍)	噬菌体 D ₁ 0.5ml (单位/ml)	2.1×10 ⁹	2.1×10 ⁸	2.1×10 ⁷	2.1×10 ⁶	2.1×10 ⁵	2.1×10 ⁴	2.1×10 ³
		2.1×10 ⁹	2.1×10 ⁸	2.1×10 ⁷	2.1×10 ⁶	2.1×10 ⁵	2.1×10 ⁴	2.1×10 ³
0.5ml	噬菌体 D ₁ 0.5ml (单位/ml)	密集	106	9	0	0	0	0
1.0ml	噬菌体 D ₁ 0.5ml (单位/ml)	密集	76	5	0	0	0	0
CK**	噬菌体 D ₁ 0.5ml (单位/ml)	密集	密集	密集	密集	密集	密集	密集

* 为 13 次试验平均数。

** 只加噬菌体 0.1ml, 不加抗血清。

表 2 抗血清对噬菌体有效中和时间试验结果*

噬菌斑数 抗血清** +噬菌体(D ₁)	时间 (min)	2	4	6	8	10	12	15	18	20	25
		2	4	6	8	10	12	15	18	20	25
抗血清 0.5ml + 噬菌体(2.1×10 ⁷ 单位/ml) 0.5ml	抗血清 0.5ml + 噬菌体(2.1×10 ⁷ 单位/ml) 0.5ml	10.5	9.5	12.5	9.5	8.5	11	11.5	11.5	9	7
抗血清 0.5ml + 噬菌体(2.1×10 ⁶ 单位/ml) 0.5ml	抗血清 0.5ml + 噬菌体(2.1×10 ⁶ 单位/ml) 0.5ml	10	11.5	8	9	4.5	0	0	0	0	0

* 为 9 次试验的平均数。

** 抗血清均为 20 倍稀释液。

表 1 结果表明, 当抗血清浓度稀释 400—800 倍时, 可以全部中和 5×10^4 单位/ml 的噬菌体, 可以基本中和 5×10^5 单位/ml 的噬菌体, 可以中和 5×10^6 单位/ml 的噬菌体 95% 以上。

4. 用抗血清对噬菌体进行的有效中和时间试验, 结果见表 2。

结果表明, 在抗血清完全中和噬菌体的情况下 (其浓度为 2.1×10^6 单位/ml), 有效中和时间为 12 分钟。

讨 论

本研究证明, 用血清法除掉带有噬菌体菌

株中的噬菌体是行之有效的。由于制备抗血清的周期太长, 因此必须寻求更有效的制备方法, 以便及时解决生产菌株随时可能携带噬菌体的问题。另外, 如何制备高效价抗血清仍需进一步研究。笔者认为, 第一次注射噬菌体的剂量应高, 其剂量应以使动物产生不致死的较强反应为好。

参 考 文 献

- [1] Adams, M. H.: Bacteriophages Interscience Publishers, New York, 1959.
- [2] 中国科学院微生物研究所噬菌体组: 噬菌体及其防治, 科学出版社, 北京, 1973。