

改变寄主细菌长期增殖的噬菌体某些特性的研究

于恩庶 李功惠

(福建省流行病研究所, 福州)

噬菌体在异种寄主细菌增殖后的情况, 还缺乏研究。我们选择鼠疫噬菌体和假结核噬菌体在相互寄主细菌内进行增殖, 并研究其生物学特性的变化情况。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

1. 鼠疫耶氏菌 3 株: EV 株从北京生物制品研究所提供的鼠疫活菌苗分离获得, 另外两株 Otten 和 M₂ + 40 系原中央鼠疫研究所分让。上述菌种均干种保存。临用前检查具有典型鼠疫菌特性。

2. 假结核耶氏菌 9 株, 其中 5 株从前长春鼠疫防治所分让, 其余 4 株为作者在福建分离

的,均做过系统检定。

3. 鼠疫噬菌体和假结核噬菌体系中国流行病学微生物学研究所分让,两者裂解效价在 10^{-7} 至 10^{-8} 左右。

(二) 噬菌体中和试验

噬菌体抗血清是用鼠疫或假结核噬菌体反复注射兔静脉制成的。把此种抗血清稀释为不同的浓度,和噬菌体(稀释为1:20—1:40)等量混合,置37℃作用,次日取其一滴,加于预先划有鼠疫菌或假结核菌的平皿上,然后置于37℃培育,次日观察结果。噬菌体与抗血清作用后失去裂解力者,判定中和试验阳性,抗血清最高稀释度能抑制噬菌体裂解的,即为该血清中和抗体的效价。

(三) 噬菌体计数及噬菌斑观察

采用双层琼脂法,底层为1.5%琼脂,上层加0.7%琼脂;内含适当稀释的噬菌体和指示菌液,置30℃培养,次日计算噬菌斑数及其形态特征。

(四) 耐热性测定

用蛋白胨肉汤(pH7.2)稀释噬菌体,使每毫升大约含有1000个噬菌体颗粒,在55℃或60℃水浴中加热5、10、15、20、25、30分钟,然后取0.1 ml用双层法测定活性噬菌体颗粒数。

(五) 潜伏期测定

基本按一般生长曲线实验法^[1]。取鼠疫菌24小时培养菌,用肉汤稀释为每毫升含 10^8 个活菌,以0.9ml上述稀释液,和0.1ml噬菌体(浓度为 10^8 /ml)混合后,置37℃保温5分钟。取此液0.1ml加0.9ml抗噬菌体血清(先稀释1:50),混合后保温5分钟,再取此液0.1ml,加9.9 ml肉汤中,然后稀释7倍,从14分钟起,每隔2分钟取0.1ml,加双层法测定噬菌体颗粒,以测定噬菌体增殖的潜伏期。

(六) 中和率及中和速度常数测定

取噬菌体(预先测定每毫升含有的噬菌斑数)与抗噬菌体血清(1:1000稀释)等量混合后,立刻测定一次噬菌斑数。于37℃水浴作用后,每隔10分钟,取0.5ml稀释 10^{-4} 后,取0.1ml用双层法测定噬菌斑数,与混合后立刻测定的

噬菌斑数,按Adams法^[1]计算中和百分率,同时计算中和速度常数。

结 果

(一) 鼠疫噬菌体在假结核菌寄39株增殖试验

先取假结核菌寄39株接种于肉汤内培养数小时,待其发育呈轻度混浊时,按1:10加入假结核噬菌体,置于30℃保温,次日观察肉汤透明者,作为增殖一代计算。以后按同法反复传代。取5代、10代、20代、30代和41代进行测定其裂解范围和中和效价。试验结果证明鼠疫噬菌体在异种寄主菌(假结核菌)41代,仍然只为抗鼠疫噬菌体血清所中和,而未为抗假结核噬菌体血清中和,其裂解范围也未改变。这说明鼠疫噬菌体在异种寄主菌传41代,仍保有原来的特征,见表1、2。

(二) 假结核噬菌体在鼠疫菌EV株增殖传代

按上述鼠疫噬菌体在假结核菌增殖传代的同样方法,结果也未改变性状,见表1、2。

表1 裂解范围和裂解稀释度

指示菌	鼠疫噬菌体		假结核噬菌体	
	原株	41代株①	原株	41代株②
鼠疫菌 EV	10^{-6}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-7}
Otten	10^{-6}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-7}
M ₂ + 40	10^{-6}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-8}
假结核菌 1033	—	—	10^{-5}	10^{-8}
1034	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-5}
1035	—	—	10^{-7}	10^{-7}
1036	—	—	10^{-6}	10^{-7}
1037	—	—	10^{-2}	10^{-4}
闽 I	—	—	10^{-6}	10^{-4}
闽 II	—	—	10^{-6}	10^{-4}
周宁	—	—	10^{-3}	$<10^{-1}$
寄 39	10^{-6}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}

① 鼠疫噬菌体在假结核菌增殖41代。

② 假结核噬菌体在鼠疫菌增殖41代。

(三) 几种生物学特性的研究

1. 噬菌斑特征观察

(1) 鼠疫噬菌体:以假结核菌为指示菌时,形成小噬菌斑,以鼠疫菌为指示菌时则形成

表2 中和试验

噬菌体	在异种寄主菌增殖代数	抗噬菌体血清	
		鼠疫	假结核
鼠疫	0	+	-
	20	+	-
	30	+	-
	41	+	-
假结核	0	-	+
	20	-	+
	30	-	+
	41	-	+

注1. 鼠疫噬菌体在假结核菌增殖传代

假结核噬菌体在鼠疫菌增殖传代

2. “+”表示有中和作用,“-”表示无中和作用

较大的圆形和透明的噬菌斑。

(2) 假结核噬菌体: 在假结核菌为指示菌时出现两种噬菌斑, 一种透明清晰, 边缘有白环, 外有晕圈; 另一种较模糊, 边缘也有晕圈。以鼠疫菌为指示菌时, 呈现中等大小噬菌斑, 边缘也有晕圈。

(3) 鼠疫噬菌体在假结核菌增殖传代41代: 以鼠疫菌为指示菌时出现大小两种噬菌斑, 大者与原鼠疫噬菌体同; 小者边缘不整齐。以假结核菌为指示菌时也有两种噬菌斑, 但边缘均有晕圈。

(4) 假结核噬菌体在鼠疫菌增殖传代41代: 以假结核菌为指示菌出现很小噬菌斑, 边缘不整齐, 呈瓣状, 以鼠疫菌为指示菌时, 同鼠疫噬菌体的噬菌斑。

2. 潜伏期: 每种噬菌体的潜伏期均测定3—5次, 所得结果极为相近。鼠疫噬菌体的潜伏期较短, 为40—45分钟。假结核噬菌体的潜伏期为70—80分钟, 两者相差显著。这两种噬菌体改变寄主菌, 再经过长期增殖传代后, 鼠疫噬菌体的潜伏期, 基本保持不变或稍延长些。而假结核噬菌体的潜伏期由70—80分钟缩短为50—54分钟。

3. 耐热性: 鼠疫和假结核两种噬菌体在55和60℃作用5—10分钟, 即受到影响。其中鼠疫噬菌体较假结核噬菌体更为显著。前者当

加热55℃25分钟即完全失去活性, 而假结核噬菌体在同样温度则需30分钟以上。改变寄主菌增殖的鼠疫噬菌体, 耐热性减弱, 加热55℃5分钟即失活性; 假结核噬菌体与此相反, 没有减弱(见表3)。

表3 耐热性测定

	增殖用菌	加热55℃的时间(分)						
		0	5	10	15	20	25	30
鼠疫噬菌体	鼠疫	98	6	3	3	2	—	—
鼠疫噬菌体	假结核菌	127	—	—	—	—	—	—
假结核噬菌体	假结核菌	60	39	35	28	13	7	4
假结核噬菌体	鼠疫菌	143	114	83	77	46	22	27

注: 表内数字为噬菌斑数; “—”示无噬菌斑。

4. 中和率及中和速度常数测定: 从各株噬菌体在抗噬菌体血清作用下, 被中和情况与时间的关系; 及计算出的中和率和中和速度常数来看, 两种噬菌体改变寄主菌增殖传代后, 与在本寄主菌增殖传代的结果是相同的, 说明这两种噬菌体改变寄主菌后, 抗原性并未改变。

结 语

噬菌体的繁殖与寄主菌成分及机能有关。如果改变寄主, 转在有裂解能力的另一种细菌细胞增殖时, 会发生某些性状的改变, 可能受寄主的限制和修饰。

本实验使用鼠疫和假结核两种噬菌体交换寄主, 长期反复传代, 继续传代至41代。证明了在另一种敏感寄主亦可增殖, 并仍然保持其基本特性, 即作为噬菌体鉴定的血清学方法并未改变, 仅在某些个别性状上发生了变异, 如噬菌斑形态和潜伏期, 以及在不同温度下所表现的裂解力改变。这项研究有助于阐明一个地区分离到噬菌体, 而分离不到其寄主菌的原因。因为细菌消灭了, 而其噬菌体在异种寄主菌保存下来是可能的。

参 考 文 献

[1] Adams, M. H.: Bacteriophages, p463—465, 1959.