

# 稀有放线菌小单孢菌噬菌体 $\Phi$ HAU8 溶源菌的分离与验证

李晓华

(中南民族大学 生命科学学院, 国家民委生物技术重点实验室, 湖北 武汉 430074)

**摘要:** 用小单孢菌 40027 菌株作为指示菌, 分离得到噬菌体  $\Phi$ HAU8 的抗性菌株, 通过高压脉冲电泳(PFGE)和 Southern 杂交试验表明:  $\Phi$ HAU8 DNA 已整合到小单孢菌 40027 菌株染色体的 500 kb 的 *AseI* 片段中; 该抗性菌株为噬菌体  $\Phi$ HAU8 的溶源菌, 命名为 LXH8。

**关键词:** 小单孢菌; 40027 菌株; 溶源菌; 噬菌体

**中图分类号:** Q939.13<sup>+</sup>2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2007)07-0061-02

农业的可持续发展及公众对危害人类健康的化学农药使用的高度关注, 大大激发了人们对植物病害进行生物防治研究的兴趣。许多微生物的生物防治机理是它们能分泌一种或几种抗生素来抑制植物病原菌的生长, 如藤黄绿脓菌素、硝吡咯菌素等。小单孢菌是一类可产生多种抗生素的稀有放线菌<sup>[1]</sup>。小单孢菌所产生的抗生素结构类型多种多样, 其中还包括一些具有独特结构的抗生素, 如含有不饱和双键结构的紫苏霉素、含有 1,4-二氨基环多醇假双糖结构的福堤霉素 A<sup>[2,3]</sup> 是生物农药的重要来源之一。

对放线菌噬菌体的研究已有 50 多年的历史, 主要集中于链霉菌噬菌体。直到 1977 年才报道第一株小单孢菌噬菌体<sup>[4]</sup>, 随后仅有几株小单孢菌噬菌体被分离<sup>[5-8]</sup>。此外, 小单孢菌有效的基因克隆系统尚未建立。因此, 分离小单孢菌噬菌体的溶源菌对研究小单孢菌噬菌体与宿主之间相互关系和发展适合于小单孢菌的基因克隆载体有着重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和噬菌体 小单孢菌 40027 菌株为福堤霉素 A 的产生菌, 是由上海医药工业研究院从云南省土壤中分离得到<sup>[3]</sup>。噬菌体  $\Phi$ HAU8 是小单孢菌 40027 菌株的噬菌体。

1.1.2 培养基、试剂和仪器 小单孢菌 40027 菌株固体培养基为贝奈特培养基<sup>[8]</sup>。限制性内切酶、Lambda DNA 均购自大连 TaKaRa 公司。高压脉冲电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 溶源菌的分离 用高效价的噬菌体感染小单孢菌 40027 孢子, 在 30℃ 条件下培养, 待出现噬菌斑后, 继续培养直到在噬菌斑中长出菌落, 挑取这些菌落, 经多次划线分离, 获得候选溶源菌的单菌落。

1.2.2 脉冲电泳(PFGE)基本操作 参见文献[9]。

1.2.3 Southern 杂交 参见文献[9]。

## 2 结果

### 2.1 噬菌体 $\Phi$ HAU8 溶源菌的分离

用效价分别为  $10^7$  pfu/mL,  $10^5$  pfu/mL 的噬菌体  $\Phi$ HAU8 感染小单孢菌 40027 孢子, 在 30℃ 条件下培养, 待出现噬菌斑后, 继续培养直到在噬菌斑中长出菌落, 挑取这些菌落, 经多次划线分离, 获得噬菌体  $\Phi$ HAU8 的抗性菌落。

### 2.2 噬菌体 $\Phi$ HAU8 溶源菌的验证

小单孢菌 40027 菌株和噬菌体  $\Phi$ HAU8 抗性菌株的总 DNA 的 *AseI* 酶切的高压脉冲电泳结果(图 1)表明: 噬菌体  $\Phi$ HAU8 抗性菌株的总 DNA 的 *AseI* 酶切片段与小单孢菌 40027 菌株总 DNA 的

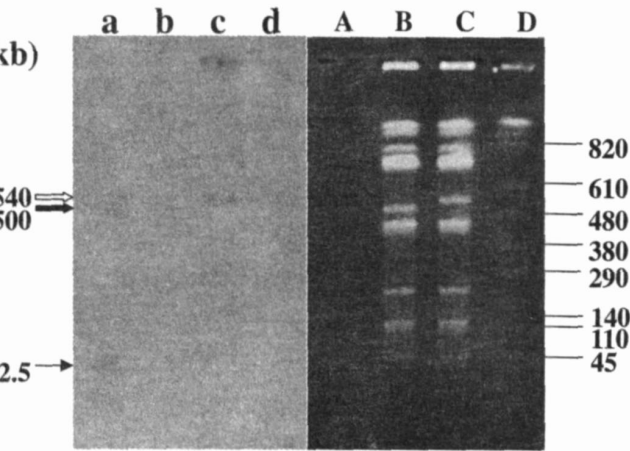
收稿日期: 2007-04-22

基金项目: 国家自然科学基金(30570046); 湖北省自然科学基金(2004ABA129); 中南民族大学自然科学基金(YZZ04003)

作者简介: 李晓华(1968-), 男, 安徽天长人, 副教授, 博士, 主要从事分子微生物学与基因工程教学与研究工作。

*AseI* 酶切片段相比, 仅有 1 条片段不同, 即在小单孢菌 40027 菌株中为 500kb 的片段, 而在抗性菌株中为 540kb 左右; 其他片段完全一致。

以噬菌体  $\Phi$ HAU8 DNA 为探针, 与噬菌体  $\Phi$ HAU8 抗性菌株的染色体 DNA 的 *AseI* 酶切片段杂交。从杂交照片 (图 1) 中可以看出: 噬菌体  $\Phi$ HAU8 抗性菌株的 540kb 片段恰好与  $\Phi$ HAU8 DNA 同源, 表明  $\Phi$ HAU8 DNA 已整合到小单孢菌 40027 菌株染色体的 500kb 的 *AseI* 片段中; 该抗性菌株为噬菌体  $\Phi$ HAU8 的溶源菌, 命名为 LXH8。



I 为高压脉冲电泳 II 上的 DNA 转移到尼龙膜上, 并经 Southern 杂交显影的照片。所有的样品都被 *AseI* 酶切后, 并经 PFGE 分离, 以噬菌体  $\Phi$ HAU8 DNA 为探针, 在小单孢菌 40027 菌株 (B) 和溶源菌 LXH8 (C) 之间仅有一条带不同, 分别为 500kb 和 540kb, 并且溶源菌 LXH8 的 540 kb 与噬菌体  $\Phi$ HAU8 DNA (A) 同源, 表明  $\Phi$ HAU8 DNA 已整合到小单孢菌 40027 菌株染色体的 500kb 的 *AseI* 片段中。M 145 的 *AseI* 酶切片段 (D) 作为分子量对照。PFGE 的条件为: 0.5× TBE 缓冲液; 1% TBE 琼脂糖凝胶; 电压为 6V/cm; 电场角度为 120°; 电场转换时间为 20 ~ 80s; 14℃ 下电泳 20h。洗膜条件: 65℃, 2× SSC, 2× 5min。

图 1  $\Phi$ HAU8 溶源菌的 Southern 杂交验证

3 讨论

溶源菌具有以下特点: ① 处于溶源状态的宿主细胞对噬菌体具有免疫性, 不能被同株噬菌体所感染。② 溶源菌可自发或诱发以低频率释放噬菌体粒子, 常用诱发溶源菌释放噬菌体的物理或化学因素有紫外线、丝裂霉素 C 等。溶源菌经诱导后, 噬菌体从溶源途径转向裂解途径, 因而可以明显提高

溶源菌释放噬菌体的频率。③ 进入溶源状态, 噬菌体 DNA 特异性整合到寄主的 DNA 上, 因而可以利用噬菌体 DNA 作为探针与溶源菌总 DNA 进行 Southern 杂交, 在 DNA 水平上验证。文中利用溶源菌第 1 个特性进行分离, 利用第 3 个特性进行验证。

致谢: 衷心感谢上海医药工业研究院朱宝泉研究员慷慨提供供试菌株!

参考文献:

[ 1 ] Wagman G H, Weinstein M J. Antibiotic from *Micromonospora*. *Annu Rev Microbiol*[ J ]. 1980, 34: 537 - 557.

[ 2 ] 王狱, 方金瑞. 抗生素[ M ]. 北京: 科学出版社, 1988.

[ 3 ] 马加生, 杨昭中, 石光敏, 等. 小单孢菌 SIPI436 及其代谢产物福堤霉素 A[ J ]. 抗生素, 1986, 11( 2 ): 11 - 18.

[ 4 ] Nara T, Yamamoto M, Kawamoto I, *et al*. Fortimycin A and B, new aminoglycoside antibiotics. I producing organisms, fermentation and biological properties of fortimicins[ J ]. *J Antibiotics*. 1977, 30: 533 - 540.

[ 5 ] Pigac J, Schrempf H. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other *Streptomyces* by electroporation[ J ]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61( 1 ): 352 - 356.

[ 6 ] Mazy Servais C, Baczkowski D, Dusart J. Electroporation of intact cells of *Streptomyces parvulus* and *Streptomyces vinaceus*[ J ]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 151( 2 ): 135 - 138.

[ 7 ] Bierman M, Logan R, O'Brien K, *et al*. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp[ J ]. *Gene*, 1992, 116( 1 ): 43 - 49.

[ 8 ] Li X H, Zhou X F, Deng Z X. Vector systems allowing efficient autonomous or integrative gene cloning in *Micromonospora* sp. strain 40027[ J ]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69 ( 6 ): 3144 - 3151.

[ 9 ] Kieser T, Bibb M J, Chater K F, *et al*. Practical *Streptomyces* genetics[ M ]. Norwich, United Kingdom. John Innes Foundation, 2000.