

雷 璘,孙宇杰,于 达,等.一种利用噬菌体裂解大肠杆菌 Rosetta 菌株菌体的方法[J].江苏农业科学,2015,43(9):61-63.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.016

一种利用噬菌体裂解大肠杆菌 Rosetta 菌株菌体的方法

雷 璘,孙宇杰,于 达,李胜菊,林连兵

(昆明理工大学生命科学与技术学院,云南昆明 650500)

摘要:*Escherichia coli* Rosetta 菌株是基因克隆表达的重要宿主菌,为了探索裂解 *E. coli* Rosetta 菌体的新方法,从污水中分离到 1 株能裂解 *E. coli* Rosetta 菌株的噬菌体,命名为 ETP-1,并研究其生物学特性和裂解效率。结果表明,ETP-1 在双层平板上形成直径为 1~3 mm 的噬菌斑;噬菌斑透明,周围有晕环;该噬菌体的潜伏期为 20 min,裂解期为 70 min,在 55 ℃ 以上以及 pH 值大于 11 时,噬菌体失去活性。在 6 h 内,噬菌体可裂解 73% 的 *E. coli* Rosetta 菌体,ETP-1 裂解其宿主细胞为 *E. coli* Rosetta 菌株菌体的破碎提供了新的方法。

关键词:细胞破碎方法;*E. coli* Rosetta;噬菌体;裂解效率

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0061-03

大肠杆菌系统由于其遗传学、生物化学和分子生物学方面已充分被人们了解而成为表达多种异源蛋白质的首选系统^[1]。迄今为止,由大肠杆菌改造而来的基因工程菌已达近百种之多,常用的就有 50 种左右^[2],如 *E. coli* BL21、*E. coli* Rosetta、*E. coli* JM109、*E. coli* JM110 等。常见的大肠杆菌噬菌体也有很多种,如烈性噬菌体中的 T₄ 噬菌体、T₁ 噬菌体,温和噬菌体中的 λ 噬菌体^[3]。T₄ 噬菌体常用于噬菌体展示,λ 噬菌体常作为克隆表达的载体。实验室中常用 *E. coli* Rosetta 作为克隆表达菌株,*E. coli* Rosetta 在 *E. coli* BL21 基础上,补充了大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子对应的 tRNA,以提高外源基因尤其是真核基因在原核系统中的表达水平。克隆表达的一般步骤是诱导表达后,直接使用超声破碎细胞。超声破碎是一种相对温和的细胞破碎方法,但是超声破碎时会产生一定的热量,对于一些结构不稳定的目的蛋白,其结构依然会被破坏。本研究以 *E. coli* Rosetta 为宿主菌,分离 *E. coli* Rosetta 的噬菌体,对其进行感染、裂解,对其生物学特征、裂解效果等进行研究,探索使用噬菌体替代超声破碎细胞的可行性。

1 材料与方法

1.1 菌种及噬菌体来源

E. coli Rosetta 菌株。

1.2 主要试剂和仪器

LB 培养基、蛋白质电泳系统、恒温摇床、恒温培养箱。

1.3 ETP-1 的分离

采集生活污水 10 mL 经 5 000 g、15 min 离心去除杂质,再经 0.22 μm 的滤膜滤除细菌,收取滤液,吸取滤液 5 mL 与

过夜培养的 *E. coli* Rosetta 培养液 5 mL 混匀,于 37 ℃、12 h 振荡培养。

根据文献[4]的方法,采用双层平板法检测和筛选噬菌体。将上述培养液离心并通过 0.22 μm 滤膜过滤,取 200 μL 滤液和 200 μL 处于对数期的 *E. coli* Rosetta 菌液混合,静置 15 min 后,将其加入装有 4 mL 0.9% 琼脂的预热 LB 半固体培养基的离心管中,混匀后平铺至 LB 固体培养基上,37 ℃ 过夜培养,观察噬菌体的生长情况。若有噬菌斑,挑取单个形态均一噬菌斑。将噬菌斑置于 4 mL 无菌水的离心管中,37 ℃ 温浴 0.5 h,取 100 μL 上述噬菌体悬液和宿主做双层平板。重复 4~5 次可得到纯噬菌体。

1.4 ETP-1 的电镜观察

取出单个噬菌斑于 LB 液体培养基中 37 ℃ 过夜培养,用 10% 的 PEG8000 在 4 ℃ 下过夜沉淀后,将沉淀溶于 SM 缓冲液中,再加入 CsCl,使其 $\rho = 1.5 \text{ g/mL}$ 。以 36 000 r/min 超速离心 18 h,抽取噬菌体条带,通过负染后观察。

1.5 噬菌体一步生长曲线绘制

按照文献[5]的方法。取一定量的新鲜噬菌体培养液 1 mL (病毒滴度 $\approx 10^7$ PFU/mL) 与处于对数生长期的 *E. coli* Rosetta 10 mL 混合,使得感染复数 MOI = 0.01,37 ℃ 温育 10 min。13 000 g 离心 2 min,弃上清,用 30 μL 的 LB 液体培养基洗涤 3 次,最后用 30 μL LB 液体培养基悬浮宿主细胞。取 60 μL 上述细胞到 5 mL LB 液体培养基,37 ℃ 180 r/min 振荡培养 100 min,同时开始计时,每隔 10 min 取 100 μL 培养液测定噬菌体的滴度。以感染时间为横坐标、滴度的对数为纵坐标,绘制一步生长曲线,估算出噬菌体的潜伏期、暴发期。

1.6 温度对噬菌体活性的影响

按照文献[5]的方法,将噬菌体悬液(将 LB 液体培养基 0.99 mL 和 0.01 mL 滴度为 1×10^7 PFU/mL 的噬菌体悬液混合),分别置于 15、25、35、45、55、60 ℃ 处理 1 h,每隔 20 min 取样,用双层平板测定滴度。试验重复 3 次,取平均值。

1.7 pH 值对噬菌体活性的影响

按照文献[5]的方法,将 pH 为 3.4、5.6、7.8、9、10、11 的 LB 液体培养基 0.99 mL 和 0.01 mL 滴度为 1×10^7 PFU/mL

收稿日期:2014-09-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160035、31260034)。

作者简介:雷璘(1989—),男,云南昆明人,硕士研究生,主要从事噬菌体及其蛋白研究。E-mail:leijin1989@hotmail.com。

通信作者:林连兵,硕士,教授,主要从事高温噬菌体研究。E-mail:570782220@qq.com

的噬菌体悬液混合,室温静置 1 h,分别用双层平板测定噬菌体滴度。试验重复 3 次,取平均值。

1.8 ETP-1 感染 *E. coli* Rosetta 对其生长的影响

分别设立试验组和对照组,测定 Rosetta 的生长曲线,当培养至对数期时($D_{600\text{ nm}} \approx 0.6$)加入一定效价的噬菌体悬液,使 $\text{MOI} = 0.01$,培养 20 h,每隔 30 min 分别测定 $D_{600\text{ nm}}$ 的数值。以横坐标为时间、纵坐标为 D 值绘制一条试验组与对照组的 Rosetta 生长曲线。

1.9 ETP-1 对 *E. coli* Rosetta 裂解效果

准备 3 组 150 mL 的液体培养基在恒温摇床中振荡培养 *E. coli* Rosetta,至对数期($D_{600\text{ nm}} \approx 0.6$)。分别设立试验组、对照组和空白组,向试验组中加入一定效价的噬菌体,使 $\text{MOI} = 0.01$,空白组加入等量无菌水,然后分别继续培养 6 h。对照组以 5 000 g 离心,然后将菌体溶于 5 mL 的 LB 培养基,使用超声破碎法破碎细胞。试验组和空白组先以 5 000 g 离心,然后取上清,再浓缩至 5 mL。分别测定 3 组的蛋白含量,同时进行 SDS-PAGE。

2 结果与分析

2.1 *E. coli* Rosetta 噬菌体的噬菌斑形态和电镜图

通过双层平板法,分离 *E. coli* Rosetta 噬菌体,命名为 ETP-1。ETP-1 在双层平板上形成直径为 1~3 mm 的噬菌斑,噬菌斑透明(图 1)。

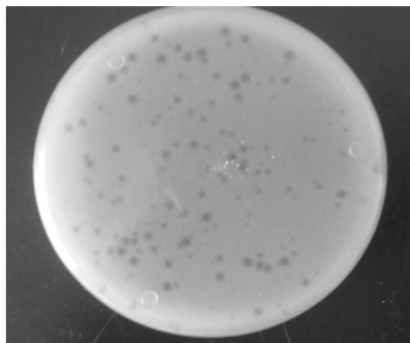


图1 ETP-1 噬菌斑

从电镜图(图 2)中可看出,ETP-1 有 1 个正多面体对称的头部,直径约为 50 nm,尾长约 100 nm,尾部带有基盘。根据其形态特征,ETP-1 属于有尾噬菌体目长尾噬菌体科。

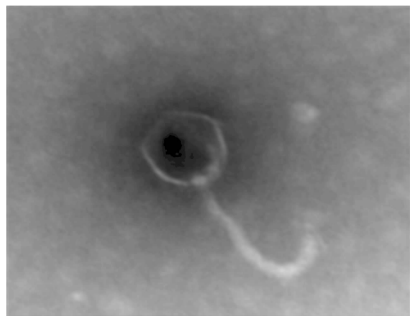


图2 ETP-1 电镜形态

2.2 *E. coli* Rosetta 的噬菌体一步生长曲线

如 *E. coli* Rosetta 噬菌体的一步生长曲线(图 3)所示, *E. coli* Rosetta 噬菌体从吸附吸附、侵染、复制到病毒颗粒全部

释放总共持续约 110 min。在这个过程中, *E. coli* Rosetta 噬菌体的潜伏期约是 20 min,暴发期约 70 min。

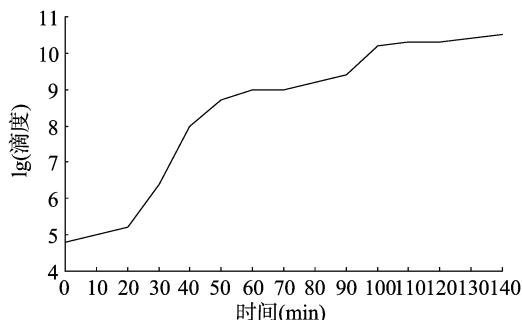


图3 *E. coli* Rosetta 噬菌体一步生长曲线

2.3 温度对噬菌体活性的影响

温度对噬菌体活性的影响分析结果(图 4)表明,ETP-1 在 25 °C 最稳定,随着温度的升高,ETP-1 的存活率降低,在 45 °C 和 55 °C 经过 1 h 处理后,噬菌体的滴度降低了 50% 和 80%,在 60 °C 处理 1 h 后,噬菌体基本完全丧失感染能力。

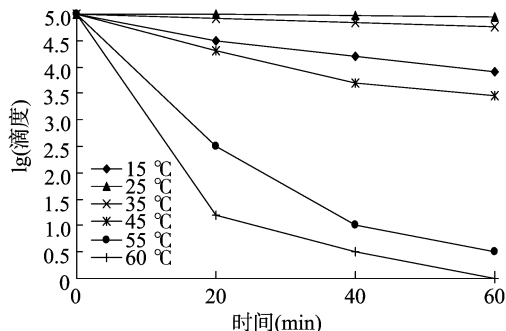


图4 温度对 ETP-1 活性的影响

2.4 pH 值对噬菌体活性的影响

pH 值对噬菌体活性影响分析结果(图 5)表明,在 pH 值 4~8 内,ETP-1 依然保持着 90% 以上的滴度;当 pH 值 > 8 后,噬菌体的滴度随着 pH 值的增大明显降低;当 pH 值 = 11 时,ETP-1 只剩下 20% 的滴度;噬菌体对于酸性环境有较好的耐受能力,当 pH 值 = 3 时,ETP-1 仍保持着 60% 以上的滴度。

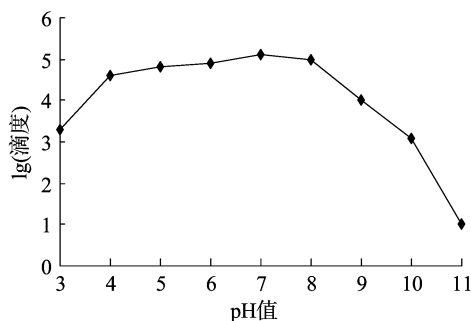


图5 pH 值对 ETP-1 活性的影响

2.5 ETP-1 感染对 *E. coli* Rosetta 生长的影响

通过上述试验可知,在 3.5 h 加入噬菌体 ETP-1 后(如图 6 箭头所示),试验组中的 *E. coli* Rosetta 的生长受到抑制,其吸光度下降,对照组中的 *E. coli* Rosetta 的生长正常。

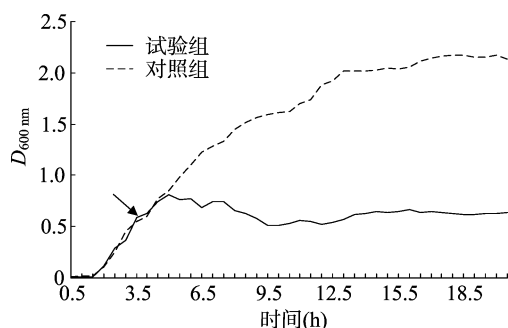


图6 ETP-1 感染对 *E. coli* Rosetta 生长的影响

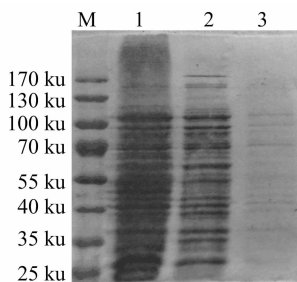
2.6 ETP-1 裂解 *E. coli* Rosetta 的效果评价

2.6.1 蛋白质含量测定 通过测定 3 管液体的蛋白质含量可知,对照组(超声破碎)蛋白质含量为 2.30 mg/mL,试验组(噬菌体破碎)蛋白质含量为 1.69 mg/mL,空白组蛋白质含量为 0.16 mg/mL。如果通过超声破碎的细胞破碎率为 100%,以蛋白质含量来衡量破碎率,则通过噬菌体破碎的效率达 73%(表 1)。

表 1 细胞裂解液的蛋白质含量

破碎方法	蛋白质含量 (mg/mL)	破碎率 (%)
对照组(超声破碎)	2.30	100
试验组(噬菌体破碎)	1.69	73

2.6.2 蛋白质电泳结果 通过蛋白质电泳(图 7)可知,泳道 1 为对照组(超声破碎),其细胞完全破碎。泳道 2 为试验组(噬菌体破碎),泳道 1 和泳道 2 的条带基本一致,表明细胞基本裂解,而部分条带的丢失可能是细胞中部分细胞器没有完全裂解造成的。泳道 3 为空白组,*E. coli* Rosetta 自然情况下也会有少数细胞自行裂解或向外分泌了少量蛋白质。



1—对照组(超声破碎);2—试验组(加入噬菌体);
3—空白(未加入噬菌体);M—protein marker

图7 细胞裂解液的 SDS-PAGE

3 讨论

噬菌体广泛存在于细菌存在的环境中,人们对噬菌体的研究取得了可喜的进展。目前对于噬菌体研究一般集中于噬菌体治疗、环境噬菌体上。如 Cappaeu 等筛选出可以对抗耐药性金黄色葡萄球菌,并通过此噬菌体来控制金黄色葡萄球菌的感染,取得了良好的临床效果^[6]。又如洪伟等从云南腾冲热泉中分离出栖热菌的噬菌体 TSP-10,并对其性质进行了研究^[7]。

对于分子克隆上,噬菌体研究常见于噬菌体展示技术,如 Ellis 等指出利用噬菌体展示多肽库可以筛选和确定线虫疫苗的抗原,这是疫苗抗原鉴定的一种新方法^[8]。而王晓娜等

通过噬菌体展示技术从抗体库中筛选出分歧杆菌 Acr 蛋白,并制备出了 Acr 蛋白的抗体^[9]。但关于基因工程菌株的噬菌体报道比较少见,仅见黎庶等报道分离出 1 株基因工程菌株 *E. coli* BL21 的噬菌体 EECF,并对其性质和防止流入发酵过程做了相关研究^[10]。

烈性噬菌体可以高效裂解细菌,其感染效率很高,一般只需要重复 4 次感染周期,1 个噬菌体便可杀死数十亿个细菌细胞。鉴于噬菌体有如此强的裂解效率,因此噬菌体可以作为潜在的替代超声破碎基因工程菌的工具。噬菌体在裂解细菌细胞时,裂解温和,不会因为物理作用导致基因工程菌表达产物的物理损坏。

在温度耐受方面,ETP-1 在高于 55 ℃ 基本失去感染活性;在 pH 值耐受方面,ETP-1 在 pH 值超过 11 后,基本失去活性,而在 pH 值 = 3 时,仍然有活性,说明 ETP-1 更能耐受酸性环境。黎庶分离出的 BL21 噬菌体对高温耐受能力好,90 ℃ 时仍具有活性,在 pH 耐受能力上,表现为耐碱不耐酸, pH 值为 3 时其噬菌体活性基本丧失^[10],这与本试验室分离的噬菌体在酸碱耐受上正好相反。

关于噬菌体对细胞裂解效率的文献报道较少,本研究通过收集裂解后的总蛋白液的蛋白量来定义噬菌体破碎效率,可知 ETP-1 是一种较高裂解效率的噬菌体,在 6 h 内噬菌体的裂解效率达到了 73%;进一步试验结果表明,其裂解率在 12 h 可达到 95% 以上。鉴于噬菌体 ETP-1 的培养和裂解不需要专门的设备,如果需要去除裂解液中的噬菌体,可以将裂解液通过简单的超滤加以过滤收集,噬菌体的灭活可以通过 50 ℃ 的加热来实现,可见利用 ETP-1 裂解 *E. coli* Rosetta 菌体不失为一种简单可行菌体破裂的方法。

参考文献:

- [1] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,2002:1217.
- [2] Neve H, Kemper U, Geis A, Heller K J. Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophage in a dairy plant[J]. Kiel Milch-wirtschaft Forschungsber,1994,46:167-178.
- [3] 张忠信. 病毒分类学[M]. 北京:高等教育出版社,2006:488-512.
- [4] Jamalludeen N, Johnson R P, et al. Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. Veterinary Microbiology,2007,124(1/2):47-57.
- [5] 韩 剑. 云南洱源热泉亚栖热菌噬菌体 MMP17 的分离鉴定及其基因组解析[J]. 昆明:昆明理工大学,2011.
- [6] Cappaeu R, Parlato M, Borriello G, et al. Experimental phage therapy against staphylococcus aureus in mice[J]. Anti-Infect Agents Chemother,2007,51(8):2765-2773.
- [7] 洪 伟,韩 剑,林连兵,等. 腾冲热海一株栖热菌裂解性噬菌体的分离及其特征[J]. 微生物学报,2010,50(3):322-327.
- [8] Ellis S E, Newlands G F J, Nisbet A J, et al. Phage-display library biopanning as a novel approach to identifying nematode vaccine antigens[J]. Parasite Immunology,2012,34:285-295.
- [9] 王晓娜,米志强,安小平,等. 从大容量噬菌体抗体库中筛选抗 Acr 蛋白人源单链抗体[J]. 中国生物工程杂志,2012,32(9):22-27.
- [10] 黎 庶. 一株基因工程菌噬菌体 (EECF) 的分离与鉴定[D]. 重庆:第三军医大学,2008.