

## 噬菌体 MS2 和 $\phi$ X174 的双层琼脂平板和液体培养基扩增方法的建立

王秋英<sup>1,2</sup>, 赵炳祥<sup>2\*</sup>, 张佳宝<sup>2</sup>, 王小明<sup>3</sup>, 张辉<sup>2</sup>, 陈效民<sup>1</sup>, 龚建东<sup>1,2</sup>

(1 南京农业大学资源与环境学院, 南京 210095; 2 封丘农田生态系统国家试验站 土壤与农业可持续发展国家重点实验室 (中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 3 中国科学院南京土壤研究所土壤生物和生物化学实验室, 南京 210008)

**摘要:** 噬菌体 MS2 和  $\phi$ X174 曾广泛作为指示病毒, 用来研究病毒在土柱和田间实验条件下的迁移行为。本文详细介绍了实验室小规模双层琼脂平板扩增和大规模高复数感染法制备纯噬菌体溶液的条件和方法步骤。宿主细菌 *E. coli* (ATCC 15597) 的最佳培养时间为 90~120 min, 而 *E. coli* (ATCC 13706) 的最佳培养时间为 120~150 min, 在上述时间段内, 它们的生长分别进入对数期。小规模双层琼脂平板扩增方法耗时、耗力, 但用高复数感染法可获取一次大量 (约 500 ml) 的高浓度纯噬菌体 MS2 和  $\phi$ X174 溶液, 它们的含量分别可达  $10^{11}$  pfu/ml 和  $10^8$  pfu/ml。

**关键词:** 噬菌体; MS2;  $\phi$ X174; 扩增方法和步骤

**中图分类号:** X172

地下水已经或可能遭受致病微生物污染的报道已经很多<sup>[1-2]</sup>。特别是病毒, 由于它们绝大多数比细菌或原生动物泡囊小得多, 更能通过细菌过滤器, 同时比细菌或原生动物更能抵御消毒处理, 因而当它们迁移通过多孔土壤介质后, 被土壤“过滤净化”的可能性比细菌或原生动物泡囊要小, 而随水分迁移进入土壤深层和地下水系统的可能性要大<sup>[3-4]</sup>。这已引起土壤和环境科学家的高度关注<sup>[1-2, 5]</sup>。为此, 各国科学家投入大量的财力和物力来研究病毒在土壤环境中的迁移机理和消长规律。

然而, 由于病毒的感染剂量很低, 测定环境水样中的病毒含量非常麻烦, 通常先采取大量样品, 然后经过多次的浓缩后才有可能利用诸如 RT-PCR 之类的高新技术进行测定, 这样的测定耗时、价格昂贵、有可能污染环境也有可能受环境背景病毒的干扰, 甚至有的病毒根本不能培养<sup>[6]</sup>。另外, 在实验室或自然环境加入大量致病病毒将会对人畜健康构成极大危害。因此, 在研究病毒在土壤中的去向时, 必须使用不会致病的指示病毒替代, 但这种指示病毒要能够表达真正病毒的行为。

通常情况下, 噬菌体是指示病毒的最佳选择, 因为: ①对人畜没有任何危害, 但它能感染特定的宿主细菌; ②能够高浓度制备 (可达  $10^{10} \sim 10^{12}$  pfu/ml);

③测定相对容易<sup>[2]</sup>。噬菌体 MS2 和  $\phi$ X174 等曾广泛作为指示病毒, 用来研究病毒在土柱实验条件和田间实验条件下的迁移行为<sup>[2]</sup>。这需要准备大量的不同浓度的噬菌体 MS2 和  $\phi$ X174 溶液以满足土柱实验和田间实验要求。但对 MS2 和  $\phi$ X174 的小规模扩增方法和大量制备方法方面在国内外还鲜有系统报道。因此, 本文的主要目的是详细介绍国内实验室可操作的噬菌体 MS2 和  $\phi$ X174 的小规模双层琼脂平板扩增方法和用高复数感染法大量制备的方法步骤, 具体包括: ①确定 MS2 和  $\phi$ X174 的宿主细菌 *E. Coli* 的生长曲线, 以获得相应 *E. Coli* 的最佳培养时间; ②获取高浓度噬菌体制备时宿主细菌和噬菌体之间的最佳体积比例; ③小规模双层琼脂平板扩增方法和用高复数感染法大量制备高浓度噬菌体 MS2 和  $\phi$ X174 的方法步骤的建立。

### 1 材料与amp;方法

噬菌体 MS2 (ATCC 15597B1) 和  $\phi$ X174 (ATCC 13706B1) 及其它们的宿主细菌 *E. coli* (编号分别为 ATCC 15597 和 ATCC 13706) 均购买自美国的 American Type Culture Collection (ATCC)。两种宿主细菌 *E. coli* 的活菌含量用平板菌落计数法来计量, 以菌落形成单位 (colony forming units, cfu) 表示; 两种噬菌体的定量测定均采用双层琼脂平板法效价测定,

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (40471063) 资助。

\* 通讯作者 (bzhaob@issas.ac.cn)

作者简介: 王秋英 (1978—), 女, 硕士研究生, 主要从事病毒在土壤中的去向的研究。

以噬菌斑形成单位 (plaque forming unit, pfu) 表示。

配备培养基所需的酵母膏 (Yeast Extract LP0021)、胰蛋白胨 (Tryptone LP0042)、牛肉膏 ('Lab-Lemco' Powder LP0029) 均购自英国的 OXOID 公司; NaCl、KCl、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  均为分析纯试剂; 琼脂使用日本进口琼脂粉。所有的噬菌体溶液均用磷酸盐缓冲 (phosphate-buffered saline, PBS) 溶液 ( $0.02 \text{ mol/L Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.10 \text{ mol/L NaCl}$ ,  $0.003 \text{ mol/L KCl}$ , pH 7.5) 配制。

噬菌体 MS2 (ATCC 15597B1) 及其宿主细菌 *E. coli* (ATCC 15597) 的培养基成分为: 酵母膏 1.0 g, NaCl 8.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, 琼脂 13.5 g, 蒸馏水 1000 ml。上述为固体培养基配方, 如果需要配制半固体或液体培养基, 则琼脂含量降为 4.0 g 或 0.0 g。

噬菌体  $\phi\text{X174}$  (ATCC 13706B1) 及其宿主细菌 *E. coli* (ATCC 13706) 的培养基成分为: 牛肉膏 3.0 g, NaCl 5.0 g, 胰蛋白胨 5.0 g, 琼脂 13.5 g, 蒸馏水 1000 ml。上述为固体培养基配方, 如果需要配制半固体或液体培养基, 则琼脂含量降为 4.0 g 或 0.0 g。

宿主细菌 *E. coli* 的生长曲线的测定: 在温度为 37

℃、速度为 200 r/min 的恒温振荡器上培养, 利用紫外分光光度计 (Shimadzu UV-1700, 岛津 (香港) 有限公司) 进行光电比浊测定不同培养时间细菌悬浮液的  $\text{OD}_{600}$  值 (光波 600 nm), 绘制生长曲线; 同时, 利用平板菌落计数法测定不同培养时间的活菌数。所有测定 3 次重复。

## 2 结果与讨论

### 2.1 宿主细菌生长曲线

宿主细菌 *E. coli* (ATCC 15597) 和 *E. coli* (ATCC 13706) 分别在 0 ~ 360 min 和 0 ~ 420 min 时间段内的浊度和活菌数随时间变化的趋势见图 1、2。两种宿主细菌 *E. coli* 的浊度在实验时间内有稳定增加的趋势, 这主要是由于浊度所反应的溶液中细菌浓度包含活细菌和已经死亡的细菌所产生的浓度。平板菌落计数法测定的活菌数结果表明大约在 80 ~ 120 min 期间, *E. coli* (ATCC 15597) 的生长进入对数期, 150 min 左右进入稳定期; 而对 *E. coli* (ATCC 13706) 来说, 其进入对数期的时段大约为 90 ~ 220 min 间, 约在 260 min

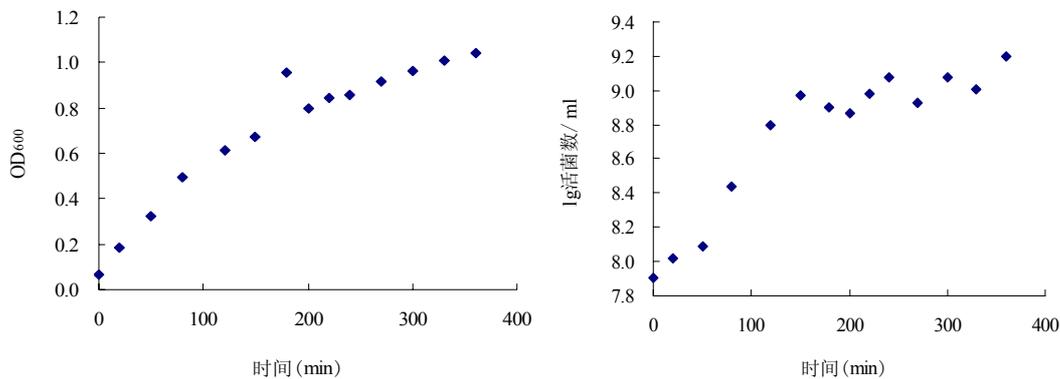


图 1 宿主细菌 *E. coli* (ATCC 15597) 生长曲线

Fig. 1 Growth curve of host bacteria *E. coli* (ATCC 15597)

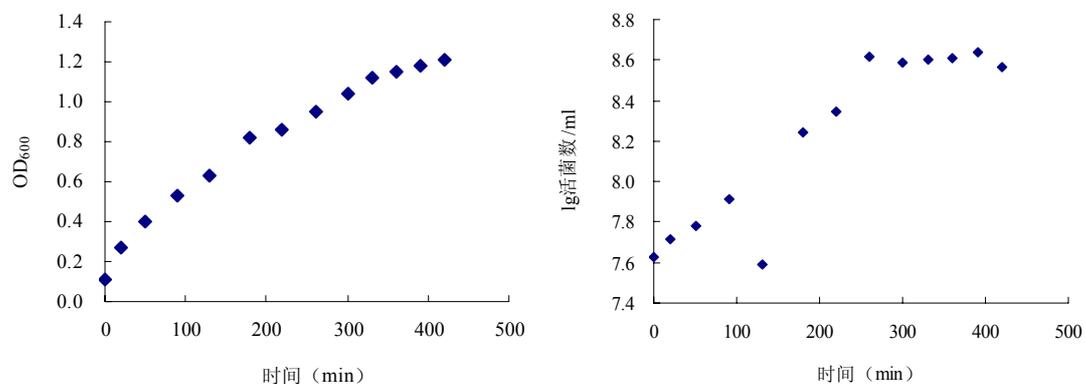


图 2 宿主细菌 *E. coli* (ATCC 13706) 生长曲线

Fig. 2 Growth curve of host bacteria *E. coli* (ATCC 13706)

左右进入稳定期。因此, 选择 *E. coli* (ATCC 15597) 的培养时间为 90 ~ 120 min, *E. coli* (ATCC 13706) 的培养时间为 120 ~ 150 min。

## 2.2 噬菌体与宿主细菌之间的最佳体积搭配比例

将 pfu 为  $10^{11}$  (MS2) 和  $10^8$  ( $\phi$ X174) 的噬菌体溶液和它们各自培养至对数期的宿主细菌溶液按不同比例混合, 双层平板法效价测定的子代噬菌体 MS2 和  $\phi$ X174 的浓度结果表明, 不同体积比例的噬菌体和宿主细菌混合对子代噬菌体溶液的浓度影响不大, 结果变动均在一个数量级范围内 (表 1)。因此, 为了操作方便, 选择 1:1 比例作为统一操作比例。

表 1 不同体积比的噬菌体和宿主细菌混合对子代噬菌体浓度的影响

Table 1 Effect of initial volume ratio of bacteriophage vs host bacteria on concentration of harvested bacteriophage

噬菌体: 宿主细菌	子代噬菌体浓度 (pfu/ml)	
	MS2	$\phi$ X174
1: 5	2.50E+11	3.43E+08
1: 3	3.30E+11	7.50E+08
1: 2	5.60E+11	4.00E+08
1: 1	3.80E+11	8.70E+08
2: 1	3.70E+11	7.00E+08
3: 1	3.40E+11	3.50E+08
5: 1	2.78E+11	3.20E+08

## 2.3 方法步骤及最后结果

参考沈萍等<sup>[7]</sup>和萨姆布鲁克等<sup>[8]</sup>文献, 我们提炼出以下操作步骤:

**2.3.1 双层平板扩增步骤** ①将培养至对数期的宿主细菌悬液和噬菌体母液按 1:1 比例充分混合, 然后在 37°C 条件下温浴培养 20 min; ②将①中的培养物加入融化的半固体培养基中, 然后迅速倒入事先准备好的固体培养基平板; ③待上层半固体培养基凝固, 将平板倒置放入 37°C 培养箱培养 8 ~ 12 h (MS2) 或 5 h ( $\phi$ X174); ④培养完成后, 选择噬菌体长满的平板, 将上层半固体培养基全部用刮刀刮入离心管, 然后在 4°C 条件下以 10000 r/min (即 12096 $\times$ g) 离心 15 min, 取上清液, 即得到培养好的纯噬菌体溶液, 每个平板大约可得 1 ml 左右的噬菌体溶液, 其浓度可高达  $10^9$  pfu/ml (MS2) 和  $10^7$  pfu/ml ( $\phi$ X174)。

**2.3.2 大规模液体制备步骤** 将 MS2 分别采用“低复数感染”和“高复数感染”两种方法培养得到浓度均高达  $10^{11}$  pfu/ml 的 MS2 溶液, 因后者比前者操作简便, 因此, 在以后的实验中, 对 MS2 和  $\phi$ X174 均采用“高复数感染”方法来获取一次大量 (约 500 ml) 的高浓度

纯噬菌体溶液。具体操作步骤为: ①将宿主细菌单菌落接种到装有 10 ml 液体培养基的试管中, 水浴恒温震荡 (37°C, 150 r/min) 过夜培养; ②在 2 L 烧瓶中加入 500 ml 预热至 37°C 的液体培养基, 然后在烧瓶中加入 1 ml 第①步骤培养的细菌溶液, 水浴恒温震荡 (37°C, 200 r/min) 培养 3 ~ 4 h; ③在第②步骤培养结束的烧瓶中接种 1 ml 噬菌体母液, 水浴恒温震荡 (37°C, 200 r/min) 培养直至培养物变清澈 (该步骤大约需 10 多个小时, 视噬菌体种类不同而异); ④最后在烧瓶中加入 10 ml 氯仿, 水浴恒温震荡 (37°C, 200 r/min) 培养 10 min, 即得到约 500 ml 浓度分别达  $10^{11}$  pfu/ml (MS2) 和  $10^8$  pfu/ml ( $\phi$ X174) 的噬菌体溶液。

**2.3.3 注意事项** ①所有操作均需在无菌条件下进行, 以防交叉感染; ②宿主细菌最好用当天培养的新鲜细菌悬液, 否则容易产生杂菌; ③半固体培养基要事先使其温度保持在 42°C, 以防其凝固或温度过高杀死培养物。

## 3 结论

小规模平板扩增法耗时、耗力, 实验要求精度高。宿主细菌 *E. Coli* (ATCC15597) 和 *E. Coli* (ATCC13706) 的最佳培养时间分别为 90 ~ 120 min 和 120 ~ 150 min, 但噬菌体和宿主细菌的混合比例没有影响其子代溶液中的噬菌体含量。用“高复数感染”方法可获取一次大量 (约 500 ml) 的高浓度噬菌体 MS2 和  $\phi$ X174 溶液, 它们的含量分别可达  $10^{11}$  pfu/ml 和  $10^8$  pfu/ml, 通常实验室均可操作进行。

## 参考文献:

- [1] Jin Y, Flury M. Fate and transport of viruses in porous media // Sparks DL. Advances in Agronomy. San Diego, CA: Academic Press, 2002, 77: 39-22
- [2] Schijven JF, Hassanizadeh SM. Removal of viruses by soil passage: Overview of modeling, processes, and parameters. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 2000, 30: 49-127
- [3] 周德庆著, 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 1993, 73-82
- [4] Quanrud DM, Carroll SM, Gerba CP, Arnold RG. Virus removal during simulated soil-aquifer treatment. Water Res., 2003, 37: 753-762
- [5] 赵炳梓, 张佳宝. 病毒在土壤中的迁移行为. 土壤学报, 2006, 43 (2): 306-313
- [6] Abbaszadegan M, Stewart P, LeChevallier M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65: 444-449
- [7] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版

- 社, 1999, 143-145
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T 著 (金冬雁, 黎孟枫 等译). 分子克隆实验指南. 2 版. 北京: 科学出版社, 1999: 127-137

### Propagation of Bacteriophages MS2 and $\phi$ X174 Using Double Layer Agar Plate and Liquid Medium Culture

WANG Qiu-ying<sup>1,2</sup>, ZHAO Bing-zi<sup>2\*</sup>, ZHANG Jia-bao<sup>2</sup>, WANG Yi-ming<sup>3</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>, CHEN Xiao-min<sup>1</sup>, GONG Jian-dong<sup>1,2</sup>

(1 College of Resources and Environment Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 State Experimental Station for Agro-Ecology,

State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China;

3 Department of Soil Biology and Biochemistry, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** Bacteriophages MS2 and  $\phi$ X174 have been used extensively as indicator virus widely in studying virus migration in column and field experiments. Requirements and general procedures for the laboratory propagation of bacteriophages MS2 and  $\phi$ X174 using double layer agar plates at a small scale and high multiplicity infection at a large scale were explained in detail. The optimal time when host bacterium demonstrated log growth for host bacteria of *E. coli* (ATCC 15597) infected with the bacteriophage MS2 was in the period of 90 ~ 120 min, and for host bacteria of *E. coli* (ATCC 13706) with the bacteriophage  $\phi$ X174 in the period of 120 ~ 150 min. It was observed that the double layer agar plate method was time- and labor-consuming, while the liquid medium culture of high multiplicity infection method could produce large amount of pure solution of bacteriophage, about 500 ml per one culture, with concentration reaching  $10^{11}$  pfu/ml and  $10^8$  pfu/ml for MS2 and  $\phi$ X174, respectively.

**Key words:** Bacteriophage, MS2,  $\phi$ X174, Requirements and procedures of propagation