

# 磷酸盐对 V 族大肠杆菌素形成的影响

胡彦民 宗书燕 李志茹

(河北师范大学生物系, 石家庄 050016)

**摘要** 含 ColV 质粒的大肠杆菌在含有磷酸盐的牛肉膏蛋白胨培养基上形成的菌落, 当覆盖敏感菌后可以形成较大的抑菌圈。说明磷酸盐对 ColV 质粒所编码的 V 族大肠杆菌素的形成有促进作用。在培养基中加入二价离子螯合剂——EDTA 对大肠杆菌素形成同样有促进作用, 而增加二价阳离子  $\text{Ca}^{++}$  或  $\text{Mg}^{++}$  却起到相反的作用。磷酸盐的这种促进作用是由于它降低了牛肉膏蛋白胨培养基中二价阳离子的浓度而引起的。因此, 在培养基中添加磷酸盐有助于分离 ColV 质粒含有菌和对 V 族大肠杆菌素的研究。

**关键词** 大肠杆菌素; 抑菌圈; 磷酸盐

大肠杆菌素 (Colicin) 是由大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 Col 质粒编码的一种分子量较小的蛋白质。对它的纯化和研究都存在着一一定的困难。大肠杆菌素的释放是由位于 Col 质粒结构基因上的裂解基因的表达所决定的<sup>[1]</sup>。该裂解基因的产物——分子量较小的外膜蛋白质直接或间接地激活了细胞外壁层上的磷脂酶, 在很大程度上改变了外膜磷脂的组成, 从而促进了外膜对大分子物质包括大肠杆菌素的通透性<sup>[2]</sup>。 $\text{Mg}^{++}$  的存在可以抑制裂解基因的表达, 阻止外膜对大肠杆菌素的释放<sup>[3]</sup>。大肠杆菌素在液体培养基中的量极少, 而且很不稳定<sup>[4]</sup>。在固体培养基中它的形成可以通过覆盖敏感菌后产生的抑菌圈来检查。

本文主要探讨了不同浓度的磷酸盐对大肠杆菌素形成的影响。试验结果表明, 磷酸盐的存在明显地促进 V 族大肠杆菌素的释放。这种添加磷酸盐的培养基有利于分离和筛选那些含 ColV 质粒的大肠杆菌。

## 材料和方法

### (一) 菌株

菌株 *E. coli* 1829 是大肠杆菌 *E. coli* K<sub>12</sub> 的变异株, 分别含质粒 ColV, I-K94; ColV4R8。菌株 dig41 是从粪便中分离的大肠杆菌, 含有 ColV-41 质粒。大肠杆菌 W3110 各菌株分别

含质粒 ColE3, ColIa, ColIb, ColK, ColG。以上菌株由伦敦大学 Rowbury 教授赠送。

### (二) 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基即营养肉汤 (NB): 牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, pH7.2—7.4。营养琼脂 (NA) 即在 NB 中加入 2% 琼脂。

### (三) 大肠杆菌素形成的测定

根据 Pugsloy<sup>[5]</sup> 的方法, 将对数生长期的不同菌株分别于 NA 平板上划线, 37℃ 培养 24 小时, 挑取单个菌落点接在另一块 20ml NA 平板上, 37℃ 培养 24 小时。经过氯仿表面杀死细菌, 在其上覆盖含有 0.1ml 经 12 小时培养的敏感菌的 5ml 半固体 NA, 制成双碟。37℃ 培养 14—16 小时, 测量抑菌圈直径, 抑菌圈直径越大说明大肠杆菌素形成越多。

### (四) 磷酸盐、EDTA 对大肠杆菌素形成影响的测定

在下层培养基 NA 中加入磷酸盐、EDTA、 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  等, 以同样方法测量抑菌圈直径。在上层半固体 NA 中加入磷酸盐、EDTA 等, 而在下层 NA 中不加, 然后按上放, 将 NA 覆盖在已杀死的大肠杆菌素生成菌上, 作为对照。

## 试验结果

### (一) 磷酸盐对抑菌圈直径的影响

将含磷酸盐浓度为 65mmol/L 的 NA 倒

平板。在其上分别接种 W3110 ColE3、W3110 ColIa、W3110 ColK、W3110 ColG、W3110 ColIb、1829ColV4R8、1829ColV、I-K94、dig 41 ColV-41 七株大肠杆菌素生成菌,覆盖敏感菌 *E. coli* 1829 后,抑菌圈的变化与对照比较见表 1。

表1 磷酸盐对大肠杆菌素形成的作用

| 含 Col 质粒<br>的大肠杆菌 | 抑菌圈直径 (mm) |                       |                   |
|-------------------|------------|-----------------------|-------------------|
|                   | NA         | NA                    | NA + 65mmol/L 磷酸盐 |
|                   | 半固体 NA     | 半固体 NA + 52mmol/L 磷酸盐 | 半固体 NA            |
| W3110 ColE3       | 10         | 10                    | 11                |
| W3110 ColIa       | 11         | 11                    | 11                |
| W3110 ColK        | 11         | 10                    | 12                |
| W3110 ColG        | 6.5        | 6.5                   | 8                 |
| W3110 ColIb       | 10         | 10                    | 11                |
| 1829ColV4R8       | 22         | 22                    | 29                |
| 1829ColVI-K94     | 11         | 12                    | 20                |
| dig41ColV-41      | 22         | 21                    | 27                |

注:“NA”为下层培养基;“半固体 NA”为上层培养基

从表 1 中可以看出,NA 中加入磷酸盐,使 *E. coli* 1829 ColV4R8、*E. coli* 1829 ColV、I-K94、*E. coli* dig 41 ColV-41 三株菌的抑菌圈直径明显增加了,而其他几株菌的抑菌圈几乎没有变化。上述三株菌均含有 ColV 质粒。可见磷酸盐仅对 V 族大肠杆菌素的形成有促进作用。在半固体 NA 中加入磷酸盐,对抑菌圈的大小没有影响。这说明磷酸盐的这种促进作用并不是由于影响敏感菌对大肠杆菌素更加敏感而引起的。

## (二) 不同浓度的磷酸盐对大肠杆菌素形成的影响

分别将 NA 配制成含磷酸盐浓度为 5mmol/L、15mmol/L、25mmol/L、35mmol/L 及 65mmol/L,按上述方法检查抑菌圈直径的变化见表 2。

表 2 说明了在 NA 中磷酸盐的浓度为 15mmol/L 时,对大肠杆菌素的形成就有了促进作用。

表2 不同浓度的磷酸盐对 V 族大肠杆菌素形成的影响

| NA 中含磷酸盐的浓度 (mmol/L) | 抑菌圈直径 (mm)                   |                             |                                |
|----------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
|                      | <i>E. coli</i> dig41 ColV-41 | <i>E. coli</i> 1829 ColV4R8 | <i>E. coli</i> 1829 ColV、I-K94 |
| 0                    | 22                           | 22                          | 11                             |
| 5                    | 22                           | 22                          | 11                             |
| 15                   | 23                           | 24                          | 13                             |
| 25                   | 25                           | 25                          | 15                             |
| 35                   | 27                           | 27                          | 20                             |
| 65                   | 27                           | 29                          | 20                             |

## (三) 磷酸盐对含 ColV 质粒大肠杆菌生长的影响

将上述三种含 ColV 质粒的大肠杆菌分别接种于 NB 和含有 65mmol/L 磷酸盐的 NB 中,37℃ 培养过夜(12 小时),测 650nm 处 O.D 值(表 3)。

表3 磷酸盐对含 ColV 质粒的大肠杆菌生长的影响 (O.D 值)

| 含 ColV 质粒的大肠杆菌 | NB  | NB + 65mmol/L 磷酸盐 |
|----------------|-----|-------------------|
| 1829ColV4R8    | 0.9 | 1                 |
| 1829ColV、I-K94 | 1   | 1                 |
| dig41 ColV-41  | 1   | 1                 |

由表 3 结果可知,三株菌在含有 65mmol/L 磷酸盐的 NB 中与普通 NB 中生长量相同,说明磷酸盐对大肠杆菌各菌株的生长并没有影响。

## (四) EDTA 对 V 族大肠杆菌素形成的影响

磷酸盐可以与  $\text{Ca}^{++}$  和  $\text{Mg}^{++}$  结合形成非溶性复合物<sup>[6]</sup>,磷酸盐对 V 族大肠杆菌素形成的促进作用是否与 NA 中  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  浓度的改变有关呢?为此,在 NA 中加入二价离子螯合剂 EDTA,以降低 NA 中  $\text{Ca}^{++}$  或  $\text{Mg}^{++}$  的浓度,检查抑菌圈直径的变化(表 4)。

表 4 结果说明,EDTA 对 V 族大肠杆菌素形成的促进作用与磷酸盐十分相似。EDTA 和磷酸盐均可降低 NA 中二价阳离子的浓度而促进大肠杆菌素的形成。

表 4 EDTA 对 V 族大肠杆菌素形成的影响

| 含 ColV 质粒的大肠杆菌 | 抑菌圈直径(mm) |                       |                   |                   |
|----------------|-----------|-----------------------|-------------------|-------------------|
|                | NA        |                       | NA + 1mmol/L EDTA | NA + 2mmol/L EDTA |
|                | 半固体 NA    | 半固体 NA + 1mmol/L EDTA | 半固体 NA            |                   |
| 1829ColV4R8    | 22        | 21                    | 25                | 27                |
| 1829ColVI-K94  | 11        | 12                    | 20                | 21                |
| dig 41ColV-41  | 22        | 22                    | 26                | 27                |

### (五) $\text{Ca}^{++}$ 和 $\text{Mg}^{++}$ 对大肠杆菌素形成的影响 (表 5、6)

表 5  $\text{Ca}^{++}$  对 V 族大肠杆菌素形成的影响

| 含 ColV 质粒的大肠杆菌  | 抑菌圈直径 (mm) |                                    |                               |                                 |
|-----------------|------------|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|                 | NA         | NA                                 | NA+50 mmol/L $\text{Ca}^{++}$ | NA + 100mmol/L $\text{Ca}^{++}$ |
|                 | 半固体 NA     | 半固体 NA + 50mmol/L $\text{Ca}^{++}$ | 半固体 NA                        | 半固体 NA                          |
| 1829ColV4R8     | 22         | 22                                 | 18                            | 6                               |
| dig41ColV-41    | 22         | 21                                 | 17                            | 6                               |
| 1829ColV, I-K94 | 11         | 12                                 | 9                             | 0                               |

表 6  $\text{Mg}^{++}$  对 V 族大肠杆菌素形成的影响

| 含 ColV 质粒的大肠杆菌  | 抑菌圈直径 (mm) |                                    |                               |                                |
|-----------------|------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|                 | NA         | NA                                 | NA+50 mmol/L $\text{Mg}^{++}$ | NA+100 mmol/L $\text{Mg}^{++}$ |
|                 | 半固体 NA     | 半固体 NA + 50mmol/L $\text{Mg}^{++}$ | 半固体 NA                        | 半固体 NA                         |
| 1829ColV4R8     | 22         | 22                                 | 15                            | 9                              |
| dig41ColV-41    | 22         | 22                                 | 15                            | 9                              |
| 1829ColV, I-K94 | 11         | 12                                 | 8                             | 0                              |

从表 5、6 的结果可知,  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  明显地抑制了大肠杆菌素的形成。半固体培养基中的  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  没有影响敏感菌对 V 族大肠杆菌素的反应。  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  渗透到下层 NA 中, 没有抑制已形成的 V 族大肠杆菌素的活性。抑菌

圈直径与对照的几乎相同。

以上各实验均重复 5—6 次, 抑菌圈直径均相同或相差 1mm, 说明其重复性良好。

## 讨 论

本文实验结果说明, 在牛肉膏蛋白胨培养基中加入磷酸盐可有效的降低  $\text{Ca}^{++}$  和  $\text{Mg}^{++}$  的浓度, 促进 V 族大肠杆菌素的释放。

由实验结果还得知, 磷酸盐和 EDTA 对 V 族大肠杆菌素形成的促进作用相似。有研究报道, 利用 EDTA 处理含有 Col 质粒的大肠杆菌也可以激活磷脂酶, 从而促进大肠杆菌素的释放<sup>[7]</sup>。磷酸盐是否也可以和 EDTA 一样, 通过活化磷脂酶, 改变大肠杆菌外壁层的磷脂组成而发挥作用, 有待于进一步的研究。

这种添加磷酸盐的培养基, 方法简便, 效果明显, 对细菌的生长没有伤害。它不仅明显地增加含 ColV 质粒的大肠杆菌抑菌圈的直径, 而且也可以促进其他大分子物质的分泌。由于 ColV 质粒的存在常常会增加某些宿主大肠杆菌的毒力<sup>[8]</sup>。因此, 我们利用添加磷酸盐的培养基, 分离和鉴定 ColV 质粒含有菌, 将有利于对该菌的研究, 对收获其他大分子物质也有一定的实践意义。

## 参 考 文 献

1. Pugsley AP et al.: *J. Bacteriol.* 156: 109—114, 1983b
2. Pugsley A P: *The EMBO Journal*, 3(10): 2393—2397, 1984.
3. Hardy K: Plasmid, IRL Press, Oxford, England, p138, 1987.
4. Yang C C et al.: *J. Bacteriol.* 158: 757—759, 1984
5. Pugsley, A P: *J. Gen. Microbiol.* 131: 369—376, 1985.
6. 武汉大学、复旦大学生物系微生物学教研室编: 微生物学(第二版), p.170, 高等教育出版社, 北京, 1987。
7. Hardaway K L et al.: *J. Bacteriol.* 137: 62—68, 1979.
8. Williams Smith H: *J. Gen. Microbiol.* 83: 95—111, 1974.

## EFFECT OF PHOSPHATE ON COLICIN V FORMATION BY STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI*

Hu Yanmin Zong Shuyan Li Zhiru

(Department of Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016)

ColV<sup>+</sup> strains of *Escherichia coli* produced larger inhibitory zones when these strains grown on nutrient agar containing phosphate after overlaid sensitive indicators. This appears that production of colicin V is increased by the addition of phosphate to nutrient agar. It was sure that stimulation of phosphate to colicin V formation results from its effect in reducing divalent cation levels in nutrient agar since adding EDTA to nutrient agar had the same effect as phosphate, but the addition of Mg<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup> had the opposite effect. Therefore nutrient agar supplemented with phosphate can be used to isolate and identify ColV<sup>+</sup> strains of *E. coli*.

**Key words** Colicin; Inhibitory zone; Phosphate