

Zonierung von intakten Bakteriophagen

Rodolphe Barrangou, Fred Breidt, Daniel Schroen

Mit den jüngsten Fortschritten in der Molekularbiologie nimmt auch der Bedarf an Isolierungen von Bakteriophagen weiter zu. Die Sorvall Discovery M150 Mikro-Ultrazentrifuge ermöglicht die schnelle Aufkonzentration und Reinigung von Bakteriophagen in einem CsCl-Stufengradienten. Die mittels Ultrazentrifugation gewonnene reine Phagenlösung kann anschließend für die Elektronenmikroskopie und die Protein- oder Nukleinsäureanalyse verwendet werden.

Phagen (Bakteriophagen) sind bakterienpathogene Viren, die ubiquitär und meist in der natürlichen Umgebung ihres Wirtsorganismus zu finden sind.

Sie werden im Zusammenhang mit Gärprozessen in der Nahrungsmittelindustrie intensiv erforscht, weil sie sich als Hauptursache für Fermentationsstörungen herausgestellt haben, vor allem in Anwendungen auf der Basis von Starterkulturen. Bakteriophagen sind auch aus einigen natürlichen Milieus wie dem Boden, Wasser, Seen und Meeren sowie Pflanzen isoliert worden. Phagen interagieren auch mit den in diesen Umgebungen natürlich vorkommenden Bakterien.

Zur Charakterisierung eines bestimmten Bakteriophagen muss dieser zunächst isoliert und aufgereinigt werden. Deshalb müssen Verfahren entwickelt und opti-

miert werden, die eine schnelle und effiziente Phagenextraktion ermöglichen.

Die Zentrifugation gilt seit langem als praktische und einschlägige Methode zur Aufreinigung und Konzentration von Bakteriophagen. In diesem Fachbeitrag beschreiben wir ein schnelles und praktisches Zentrifugationsprotokoll für die Aufreinigung von Phagen. Das erhaltene Phagenkonzentrat kann direkt für die Elektronenmikroskopie und die Nukleinsäurereinigung verwendet werden.

Material und Methoden

Für die Phagenaufreinigung wurde ein Phagenlysat von 100 ml hergestellt, indem 100 ml einer *Pediococcus*-Kultur in der Mitte der log-Phase in MRS-Medium, das 10 mM CaCl₂ enthielt, beimpft und bis zur Klärung inkubiert wurden. Der Phagenüberstand wurde durch Super-speed-Zentrifugation (Sorvall GSA oder entsprechender Rotor, 20 min, 8.000 rpm, 10.400 x g) gewonnen und mit einer 0,45 Mikron Filtrationsmembran (Corning) filtersterilisiert. Das Phagenlysat wurde über Nacht mit 2,9% NaCl und 10% PEG bei 4°C inkubiert, um die Phagenpräzipitation zu fördern. Die Phagen wurden anschließend durch Zentrifugation (8.000 rpm, 20 min, SorvallR GSA Rotor) pelletiert, und das Pellet wurde in 2 ml TE-Puffer (100 mM Tris, pH 7,6, 50 mM EDTA, Sigma) resuspendiert.

Die konzentrierte 2-ml-Phagensuspension wurde auf einen dreistufigen CsCl-Gradienten überschichtet, der 1 ml 1,7 g/ml CsCl (molekularbiologische Qualität, Sigma), 1 ml 1,5 g/ml CsCl und 1 ml

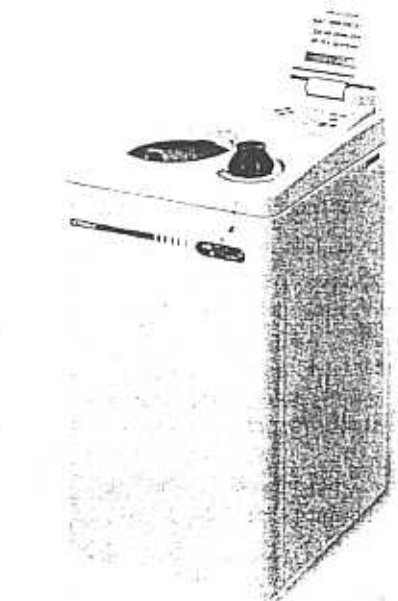


Abb. 1: Sorvall Discovery M150 Mikro-Ultrazentrifuge.

1,4 g/ml CsCl in einem 5-ml-Ultrazentrifugenröhrchen enthielt.

Die Phagen wurden mit dem S100-AT6 Rotor in einer Discovery M150 Mikro-Ultrazentrifuge 7 h lang bei 600.000 x g zentrifugiert. Die phagenhaltigen Banden (transparent weiß/grau) wurden durch Punktion mit einer Nadel durch die Wand des Zentrifugenröhrchens extrahiert, und das CsCl wurde anschließend durch Dialyse (6.000 - 8000 Dalton Membran, Baxter Diagnostics, Inc.) über 15 h gegen deionisiertes Wasser bei dreimaligem Wechsel entfernt. Die Phagenaufreinigungsmethoden wurden überwiegend analog Maniatis et al. durchgeführt. Die resultierenden Pha-

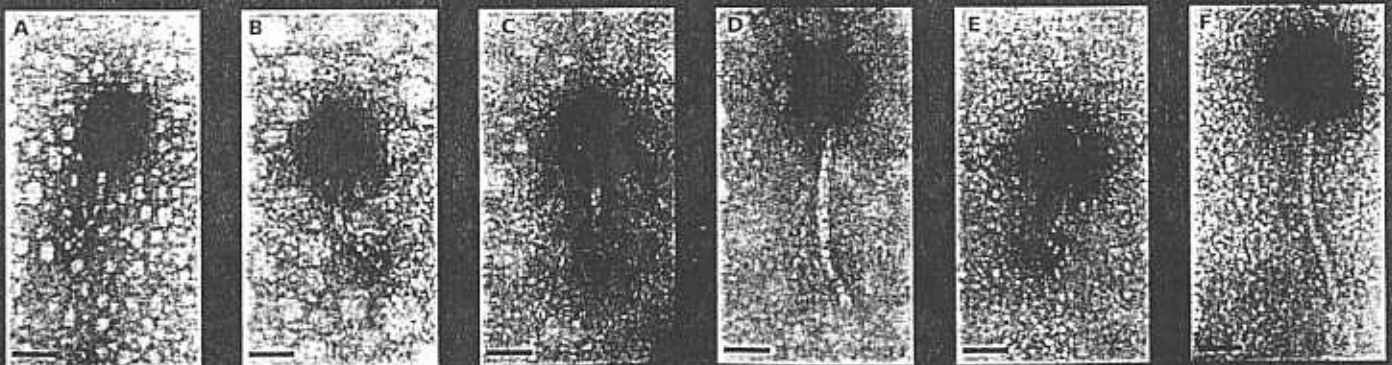


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Pediococcus*-Bakteriophagen. Die Phagenpartikel sind mit Uranylacetat negativkontrastiert bei einer Vergrößerung x 85.000. A, ϕ Ps05a; B, ϕ Ps05b; C, ϕ Ps08a; D, Ps08b; E, Ps10a; F, Ps10b. Die Balken entsprechen 100 nm.

PSS GRAM GPC-Säulen

Die Vorteile:

- ✓ Optimierte für mittelpolare Eluenten (DMAc, DMF u.a.)
- ✓ Großer GPC-Trennbereich (100 bis > 10 Mio. D)
- ✓ Verbesserte Oligomeranalytik
- ✓ Einsetzbar bis 100 °C

PSS
POLYMER STANDARDS SERVICE

Tel: 06131-96239-0
Fax: 06131-96239-11
Email: info@polymer.de
Internet: www.polymer.de

Easy Info Nr. • 686

genproben können für die Elektronenmikroskopie oder die Nukleinsäurereinigung weiterverwendet werden.

Für die Elektronenmikroskopie wurden die konzentrierten Phagen mit 2% Uranylacetat (pH 4.0) negativkontrastiert, und die Elektronenmikroskopie erfolgte mit einem Joel 100S Elektronenmikroskop (Joel USA, Peabody, MA) bei 80 kV.

Ergebnisse

Die Phagenaufreinigung und -konzentration mit der CsCl-Stufenzentrifugation ergab hochkonzentrierte Proben (mehr als 10¹¹ Phagen/ml) aus reinen Bakteriophagen. Der Hauptvorteil dieses Zentrifugationsverfahrens ist die erzielte Zeitersparnis. In diesem Fall war lediglich eine 7-stündige Zentrifugation mit einer Mikro-Ultrazentrifuge erforderlich, während normalerweise mit einer Standard-

Ultrazentrifuge 24 Stunden lang zentrifugiert werden muss. Außerdem waren die gewonnenen Proben hochkonzentriert und sehr rein, so dass sie direkt für die Elektronenmikroskopie und die Protein- oder Nukleinsäurereinigung eingesetzt werden können. In Abb. 2 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Pedococcus*-Phagen dargestellt, die aus einer industriellen Pflanzengärung isoliert wurden.

Schlussfolgerungen

Das in dieser Studie beschriebene Zentrifugationsverfahren ist für die schnelle und praktische Phagenaufreinigung und -konzentration konzipiert. Das vorgeschlagene Protokoll für diese Anwendung ist: 7 h bei 600.000 x g mit dem S100-AT6 Rotor in einer Discovery M150 Mikro-Ultrazentrifuge. Die mit dieser

Methode hergestellten Phagenproben können für die Elektronenmikroskopie und die Protein- oder Nukleinsäurereinigung eingesetzt werden.

Literaturliste erhältlich bei: Kendro Laboratory Products Hanau, Herrn Timo Trageser (Fax: 06181/335965, trageser@kendo.de).

Die Autoren

Rodolphe Barrangou
Ph. D. Fred Breidt
NC State University
Department of Food Science
322 Schaub Hall, Box 7624
USA-Raleigh, NC 27695

Ph. D. Daniel Schroen
Kendro Laboratory Products
Applications Department
31 Pecks Lane
USA-Newtown CT 06470.

Easy Info Nr. • 862

Die Einheit von Härte & Brillanz

ADAMANT

- ✓ Brillanter UV-Indikator
- ✓ Rauscharmer Untergrund
- ✓ Exzellente Trenneigenschaften
- ✓ Neues, verbessertes Bindersystem
- ✓ Härtere, abriebfeste Kieselgelschicht

Die neue DC Platte

MACHEREY-NAGEL



Deutschland • Schweiz • Frankreich • USA • Grossbritannien
<http://www.mn-net.com> • e-mail: sales-de@mn-net.com



Easy Info Nr. • 687

BANDING OF INTACT BACTERIOPHAGE USING THE S100-AT6 ROTOR AND DISCOVERY™ M150 MICRO-ULTRACENTRIFUGE

Rodolphe Barrangou and Fred Breidt, Ph.D., Department of Food Science,
322 Schaub Hall, Box 7624, NC State University, Raleigh, NC 27695

Daniel Schroen, Ph.D., Applications Department, Kendro Laboratory Products,
31 Pecks Lane, Newtown, CT 06470.



SORVALL® Discovery M150 Micro-ultracentrifuge

Abstract

With recent advances in molecular biology, the isolation of bacteriophage continues to increase. The SORVALL Discovery M150 micro-ultracentrifuge allows rapid concentration and purification of bacteriophage in a CsCl step gradient. The pure phage solution obtained via ultracentrifugation can be subsequently used for electron microscopy and protein or nucleic acid analysis.

Introduction

Phage are bacterial viruses which are ubiquitous in nature, and are likely to be found in the natural environment of their host organism.

They have been extensively studied in the food fermentation industry since they were identified as a main source of fermentation failure, especially in applications based on starter cultures (Jarvis, 1989; Hill, 1993, Brussow, 1998).

They have also been isolated from several natural environments, including soil (Cresswell, 1992; Pantastico-

Caldas, 1992; Ashelford, 1999; Ashelford et al., 2000), water, lakes and oceans (Bergh et al., 1989; Bratbak et al., 1990; Bratbak et al., 1994; Hennes and Simon, 1995; Wichels, 1998), and plants. Phage also interact with bacteria naturally present in those environments.

In order to characterize a particular bacteriophage, it must first be isolated and purified. It is therefore necessary to develop and optimize protocols that enable a rapid and efficient phage extraction.

Centrifugation has long been considered a convenient and relevant method to purify and concentrate bacteriophage. In this brief, we describe a rapid and convenient centrifugation protocol which can be used to purify phage. The phage concentrate obtained can be used directly for electron microscopy and nucleic acid purification.

Materials and methods

A 100 ml phage lysate was prepared prior to phage purification by challenging 100 mL of a mid-log *Pediococcus* culture grown in MRS medium containing 10 mM CaCl₂ and incubated until clearing. The phage supernatant was collected by Superspeed centrifugation (SORVALL GSA or equivalent rotor, 20 min., 8,000 rpm, 10,400 x g), and filter-sterilized using a 0.45 micron filtration membrane (Coming). The phage lysate was incubated overnight with 2.9% NaCl and 10% PEG at 4°C to promote phage precipitation. Phage were subsequently pelleted by centrifugation (8,000 rpm, 20 min., SORVALL GSA rotor), and the pellet was resuspended in 2 mL of TE buffer (100 mM Tris, pH 7.6, 50 mM EDTA, Sigma).

The 2 mL concentrated phage suspension was overlaid onto a three-step CsCl gradient containing 1 mL of 1.7 g/mL CsCl (molecular biology grade, Sigma), 1 mL of 1.5 g/mL CsCl and 1 mL of 1.4 g/mL CsCl in a 5 mL SORVALL ultracentrifuge tube.

Phage were centrifuged for 7 hr at 600,000 x g using the S100-AT6 rotor in a Discovery™ M150 Micro-ultracentrifuge. Phage-containing bands (translucent white/gray) were

