

# 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 CaCl<sub>2</sub> 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

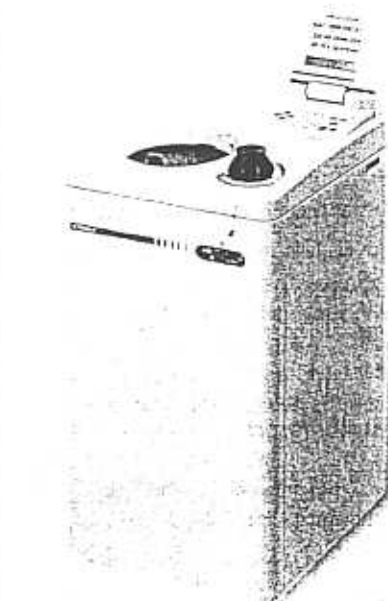


Abb. 1: Sorvall Discovery M150 Mikro-Ultrazentrifuge.

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-

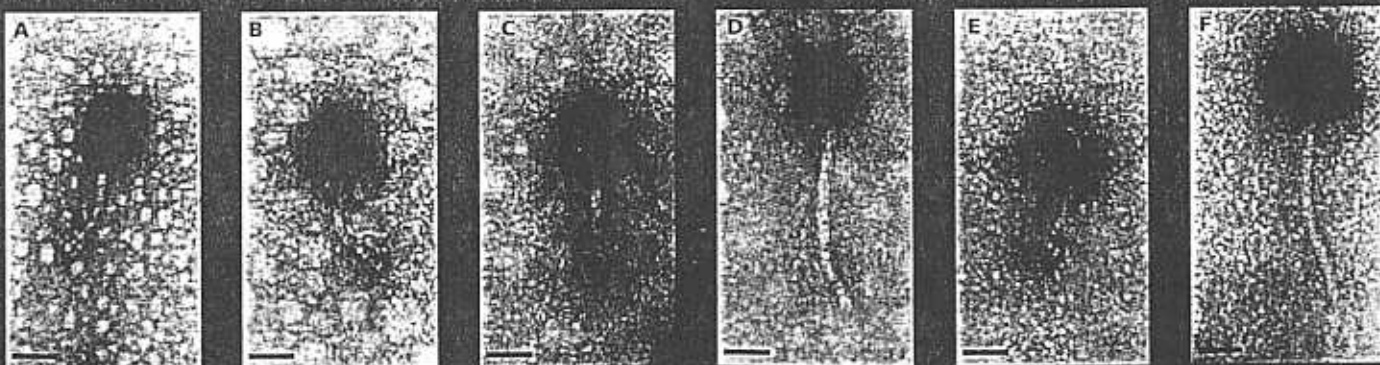


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Pediococcus*-Bakteriophagen. Die Phagenpartikel sind mit Uranylacetat negativkontrastiert bei einer Vergrößerung x 85.000. A,  $\phi$ Ps05a; B,  $\phi$ Ps05b; C,  $\phi$ Ps08a; D, Ps08b; E, Ps10a; F, Ps10b. Die Balken entsprechen 100 nm.

## PSS GRAM GPC-Säulen

### Die Vorteile:

- ✓ Optimiert 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 10<sup>11</sup> 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



extracted through the wall of the centrifuge tube by puncturing with a needle; and the CsCl was subsequently removed by dialysis (6,000 - 8,000 dalton membrane, Baxter Diagnostics Inc., McGaw Park, IL) for 15 hr with three changes of de-ionized water. Phage purification methods were mostly adapted from Maniatis et al. 1982. The resulting phage samples can be further used for electron microscopy or nucleic acid purification.

For electron microscopy, the concentrated phage were negatively stained with 2% uranyl acetate (pH 4.0) and electron microscopy was carried out using a JEOL model 100S electron microscope (JEOL USA, Peabody, MA), at 80 KV.

## Results

Phage purification and concentration using the CsCl step centrifugation yielded highly concentrated samples (over  $10^{11}$  phage / ml) of pure bacteriophage. The main advantage of this centrifugation step is time efficiency. In this case, only 7 hours of centrifugation with a Micro-ultracentrifuge were necessary, whereas 24 hours of centrifugation are typically required with a standard ultracentrifuge. Also, the samples obtained were highly concentrated, and very clean, enabling direct use for electron microscopy and protein or nucleic acid purification. Electron micrographs obtained with *Pediococcus* phage isolated from an industrial vegetable fermentation are shown in Figure 1.

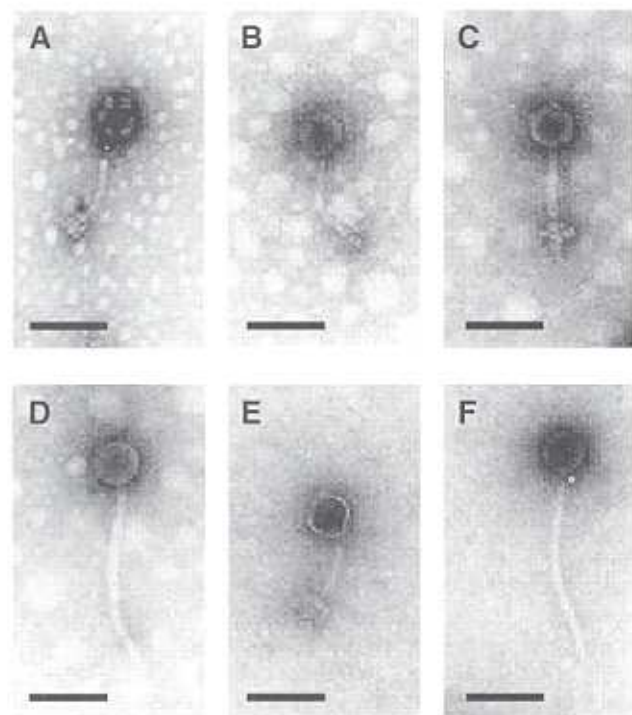


Figure 1: Electron micrographs of *Pediococcus* bacteriophages. The phage particles are negatively stained with uranyl acetate at a magnification of 85,000 x. A,  $\phi$ Ps05a; B,  $\phi$ Ps05b; C,  $\phi$ Ps08a; D, Ps08b; E, Ps10a; F, Ps10b. Each bar denotes 100 nm.

## Conclusions

The centrifugation procedure described in this study is designed for rapid and convenient phage purification and concentration. The suggested protocol for this application is 7 hours at 600,000 x g using the S100-AT6 rotor in a Discovery M150 Micro-Ultracentrifuge. The phage samples prepared using this method can be used for electron microscopy, and protein or nucleic acid purification.

## References

- Ashelford, K. E., M. J. Day, M. J. Bailey, A. K. Lilley, and J. C. Fry. 1999. In situ population dynamics of bacterial viruses in a terrestrial environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:169-174.
- Ashelford, K. E., S. J. Norris, J. C. Fry, M. J. Bailey and M. J. Day. 2000. Seasonal population dynamics and interactions of competing bacteriophages and their host in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4193-4199.
- Bergh, O., Y. Borsheim, G. Bratbak, and M. Heidal. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature.* 340:467-468.
- Bratbak, G., M. Heidal, S. Norland, and T. F. Thingstad. 1990. Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1400-1405.
- Bratbak, G., F. Thingstad, and M. Heidal. 1994. Viruses and the microbial loop. *Microb. Ecol.* 28:209-221.
- Brussow, H., A. Bruttin, F. Desiere, S. Lucchini, and S. Foley. 1998. Molecular ecology and evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages - a review. *Virus Genes.* 16:95-109.
- Cresswell, N., P. R. Herron, V. A. Saunders, and E. M. H. Wellington. 1992. The fate of introduced streptomycetes, plasmid and phage populations in a dynamic soil system. *J. Gen. Microbiol.* 138:659-666.
- Hennes, K. P., and M. Simon. 1995. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:333-340.
- Hill, C. 1993. Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:87-108.
- Jarvis, A. W. 1989. Bacteriophages of lactic acid bacteria. *J. Dairy. Sci.* 72:3406-3428.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Pantastico-Caldas, M., K. E. Duncan, C. A. Istock, and J. A. Bell. 1992. Population dynamics of bacteriophage and *Bacillus subtilis* in soil. *Ecology.* 73:1888-1902.
- Wichels, A., S. F. Biel, H. R. Gelderblom, T. Brinkhoff, G. Muyzer, and C. Schutt. 1998. Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4128-4133.

## For Ordering or Technical Information

<b>Asia Pacific North</b>	Kendro Laboratory Products (H.K.) Limited - Hong Kong - Tel: +852 2711-3970 - Fax: +852 2711-3858 - info@kendro.com
<b>Asia Pacific South</b>	Kendro Laboratory Products - Sydney NSW 2066 - Tel: +61 (2) 9936 1540 - Fax: +61 (2) 9427 9765 - info@kendro.com.au
<b>Europe, Middle East, Africa</b>	Kendro Laboratory Products International Sales - Hanau - Germany - Tel: +49 (1805) 536 376 - Fax: +49 (1805) 112 114 - info@kendro.de
<b>Latin America</b>	Overseas Contract Services, Inc. - Wilmington, DE, USA - Tel: +1 (302) 658-9272 - Fax: +1 (302) 658-9970 - ocs@kendro.com
<b>USA</b>	Kendro Laboratory Products - Newtown - Tel: +1 (800) 522-7746 - Fax: +1 (203) 270-2166 - info@kendro.com
<b>Internet</b>	http://www.kendro.com



Quality Products - Lifetime Care

SORVALL