

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.12.005

喀拉库勒湖两株侵染同一宿主黄杆菌低温噬菌体的分离及生物学特性研究

李明源, 王继莲, 张甜,
周茜, 美合热阿依·木台力甫

喀什大学 生命与地理科学学院/叶尔羌绿洲生态与生物资源研究自治区高校重点实验室, 新疆 喀什 844006

摘要: 低温噬菌体作为高原湖泊中的主要生物类群, 在调控原核菌群结构及 C、N 等元素循环方面意义重大。从喀拉库勒湖中分离纯化低温噬菌体并对其生物学特性进行研究, 采用双层平板法分离纯化低温噬菌体, 利用透射电镜观察噬菌体粒子形态; 结合 16S rDNA 序列比对及系统发育分析确定宿主菌分类地位; 对噬菌体最佳感染复数、一步生长曲线和吸附速率等基本生物学特性进行比较, 分析理化因素对噬菌体的影响; 采用 PEG 沉淀法浓缩噬菌体颗粒; 酚-氯仿法提取噬菌体基因组并进行酶切。结果表明: 从喀拉库勒湖分离到两株能侵染同一宿主黄杆菌 *Flavobacterium* sp. KHhb03 的噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02, 其均能在 4 ℃ 侵染宿主并增殖, 从形态上分别归属为长尾噬菌体科(Siphoviridae)和肌尾噬菌体科(Myoviridae)。KH-sph01 和 KH-sph02 均对热敏感, 在 pH 值为 7~8 范围内最稳定, 对氯仿、表面活性剂等不敏感, 对蛋白酶 K 敏感; 最佳感染复数分别为 10 和 0.1, 吸附速率均较强, 裂解量分别为 3.16 个和 10.22 个, 基因组均为 dsDNA, 初步估算基因组大小分别为 60~65 kb 和 40~45 kb。得出噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 能侵染同一宿主菌 *Flavobacterium* sp. KHhb03, 但生物学特性各异。

关键词: 低温噬菌体; 喀拉库勒湖; 黄杆菌属; 生物学特性

中图分类号: Q939.48

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)12-0038-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Isolation and Characterization of Two Cold-Active Bacteriophages That Infect the Same Host *Flavobacteria* in Karakul Lake

LI Mingyuan, WANG Jilian, ZHANG Tian,
ZHOU Qian, Mihray · Mutallip

Collage of Life and Geography Sciences, Kashi University/Key Laboratory of Ecology and Biological Resources in Yarkand Oasis of Education of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Kashi Xinjiang 844006, China

Abstract: As the main biological group in plateau lakes, the cold-active bacteriophages are of great significance in regulating the structure of bacterial flora and in the circulation of elements such as C and N. The

收稿日期: 2020-08-26

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2016D01B011); 新疆维吾尔自治区高校科研计划项目(XJEDU2018Y038)。

作者简介: 李明源, 博士, 副教授, 主要从事低温微生物学的研究。

cold-active bacteriophages were isolated from Karakul Lake, and their biological characteristics were studied. Bacteriophages were isolated and purified with the double-layer plate method. The morphology of the phages was observed with transmission electron microscopy. The 16S rDNA sequence alignment and phylogenetic analysis were combined to determine the host bacteria classification status. The basic biological characteristics, such as the optimal phage infection complex number, one-step growth curve and adsorption rate, were compared. The effects of temperature, pH and chemical reagents on the phages were analyzed. The phage particles were concentrated by PEG precipitation. The genome of the phages was extracted with chloroform extraction. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the genomic DNA, constituent proteins and physiological analysis of the bacteriophages were carried out to characterize the phages. Two lytic cold-active bacteriophages, designated as KH-sph01 and KH-sph02, were isolated from the Karakul Lake. Their host strain KHhb03 was identified as a member of the genus *Flavobacterium*. They were morphologically classified as Siphoviridae and Myoviridae. Physiological analysis results showed that both cold-active bacteriophages had infection activity at 4 °C, and were sensitive to heat, insensitive to chloroform and detergents, but sensitive to protease K. They were most stable at a pH in the range of 7-8, and their optimal infection complex was 10 and 0.1, and their cracking volume was 3.16 and 10.22, respectively. The genome of KH-sph01 and KH-sph02 consisted of double-stranded DNA and were approximately 60-65 kb and 40-45 kb in size, respectively. Kh-sph01 and Kh-sph02 can infect the same host bacteria *Flavobacterium* sp. KHhb03, but are different in biological characteristics.

Key words: cold-active bacteriophage; Karakul Lake; *Flavobacterium*; biological characteristic

低温噬菌体广泛分布于极地、冰川、高原湖泊、深海及其他各类低温生境中,是地球生物圈最丰富多样的生命形式,同时也是调节各类环境中原核生物群落结构和生态功能最主要的驱动因子之一^[1-2]。近年来,超级耐药细菌的频繁传播和化学农药的滥用,对全世界公共卫生及绿色可持续发展事业造成了日益严重的威胁,迫切需要寻找替代或补充抗生素、化学农药的新技术^[3-5]。噬菌体又称细菌病毒,因其对宿主菌的高度专一性、生物安全性高及在各类环境中广泛存在和持久的增殖能力,在治疗人类和动植物细菌感染方面潜力巨大^[6-7],被认为是 21 世纪重要的战略生物资源^[8]。

黄杆菌属(*Flavobacterium*)细菌是非发酵革兰氏阴性杆菌,广泛存在于土壤和水环境中,多为条件致病菌,常引起人和鱼类感染,不仅是造成医院感染的主要病原菌之一,还给水产养殖业造成了重大的经济损失^[9]。当前主要是使用化学药物对抗由细菌引起的水产病害,这不仅直接导致水产品药物残留的安全问题,而且间接造成水体生态系统失衡和耐药菌株频现等不良问题。噬菌体的治疗或预防方案为水产养殖及生态系统安全提供了新思路^[10-14],如基于噬菌体能够降解致病菌的噬菌体鸡尾酒疗法,或噬菌体所编码裂解蛋白(穿孔素或裂解酶)的开发应用已得到广泛关注等^[6, 15]。

高原湖泊作为一类古老的生态系统,低温菌及其噬菌体是其中主要的生物类群,独特的基因组成、进化特征及在低温生境中不可替代的生态功能使其备受关注。挖掘高原湖泊中的低温菌及噬菌体资源,不仅对了解细菌-噬菌体的协同进化关系有重要意义,而且对发掘新物种和基因资源有重大实践价值。本文从喀拉库勒湖分离获得两株能侵染同一宿主黄杆菌的低温噬菌体,对其电镜形态、生物学特性、基因组酶切图谱以及理化因素敏感性等进行了分析,以期为后续噬菌体与宿主菌协同进化、噬菌体编码裂解蛋白开发利用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2018 年 10 月,于东帕米尔高原喀拉库勒湖(38°25'N, 75°02'E; 海拔 3 618 m)沿湖采集水样,封装于 50 mL 离心管中于低温下带回实验室。采样点水温 2~4 °C, pH 值为 7.8~8.4。

1.2 培养基与主要试剂

宿主菌及噬菌体分离采用 PYGV 培养基^[16], 半固体培养基使用熔点更低的琼脂糖作凝固剂(终浓度为 0.4%), 细菌基因组提取试剂盒、Taq 酶、限制性内切酶等均购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

1.3 宿主细菌及噬菌体分离

1.3.1 宿主细菌分离

将不同采样点湖水样混匀后 10 倍序列稀释, 取 200 μL 不同稀释度水样涂布于 PYGV 平板上, 15 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~7 d, 依据平板上菌落形态特征进行划线纯化, 获得纯菌株。

1.3.2 噬菌体分离

采用双层琼脂平板法分离噬菌体^[16], 依据噬菌斑形态特征挑取单斑纯化, 待噬菌斑形态一致时刮取上层琼脂接入 PYGV 液体培养基中进行增殖培养, 培养液经 13 000 r/min 离心 10 min, 上清液即噬菌体液。

1.3.3 噬菌体宿主谱分析

将纯化的噬菌体液与全部分离菌株分别进行双层平板实验, 检验是否有噬菌斑产生, 以确定已分离噬菌体是否存在其他宿主菌。

1.4 宿主菌鉴定与噬菌体电镜形态

1.4.1 宿主菌 16S rDNA 基因测序及系统发育分析

采用细菌基因组提取试剂盒提取宿主菌 DNA, 以通用引物 27 F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和 1541 R(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')^[17] 扩增 16S rRNA 基因序列。PCR 反应条件参照文献^[16]进行, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 所得 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中已知序列进行 BLAST 比对分析, 用 ClustalX 软件和 MEGA 6.0 构建系统发育树, 确定分类地位。

1.4.2 噬菌体形态观察

取效价约 1×10^8 PFU/mL 的噬菌体液 100 mL, 采用超滤离心管(millipore, 10 kD)浓缩至 1 mL。吸取 20 μL 滴于铜网上, 10 min 后用吸水纸吸干多余液体, 于铜网上加 1 滴 2%, pH 值为 4.5 的磷钨酸染色 5~10 min, 待铜网自然干燥后用透射电子显微镜(JEM1200EX)观察噬菌体的粒子形态。

1.5 宿主菌生长及噬菌体侵染温度范围

1.5.1 宿主菌生长温度范围测定

将宿主菌接种于 PYGV 平板上, 分别于 4, 10, 15, 20, 25, 30, 37 和 42 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d, 定时观察菌落生长情况。依据菌落生长特征设定培养温度范围, 在装液量和接种量都统一的条件下采用液体振荡培养, 以浊度法绘制不同温度下宿主菌的生长曲线, 确定其生长温度范围, 3 次重复。

1.5.2 噬菌体侵染温度范围

取 100 μL 噬菌体液与 300 μL 对数生长期的宿主菌悬液混合进行双层平板实验, 分别置于宿主菌各生长温度下培养 3 d, 观察噬菌斑及菌膜生长情况, 确定噬菌体侵染宿主菌的温度范围, 3 次重复。

1.6 理化因素对噬菌体的影响

1.6.1 热稳定性分析

将噬菌体液效价调整为 1×10^5 PFU/mL, 分别取 2 mL 于 40, 50, 60 和 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴处理, 自 0 时起每 10 min 取样测定不同温度下的噬菌体效价。各处理均 3 次重复, 以未处理的噬菌体液作对照, 分析不同温度处理下噬菌体的稳定性。

1.6.2 酸碱耐受性分析

同 1.6.1, 分别取 500 μL 噬菌体液加入到 4.5 mL 不同 pH 的缓冲液中, 室温处理 1 h, 12 000 r/min 离心 5 min, 测定上清液中噬菌体效价。各处理均 3 次重复, 以未处理的噬菌体液作对照。

1.6.3 氯仿、蛋白酶 K 和表面活性剂对噬菌体的影响

氯仿敏感性: 同 1.6.1, 分别取 2 mL 噬菌体液, 加入 0.5 mL 氯仿(终浓度为 20%), 混匀后于室温下处理 10 min, 经 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液测定噬菌体效价, 以未处理的噬菌体液作对照。

蛋白酶 K 敏感性: 同 1.6.1, 取 2 mL 噬菌体液至 5 mL EP 管中, 加入蛋白酶 K 至终浓度为

1 mg/mL, 在 56 °C 水浴处理 30 min, 经 12 000 r/min 离心 5 min 后测定上清液中噬菌体效价, 以未处理的噬菌体液作对照。

表面活性剂敏感性: 同 1.6.1, 取 2 mL 噬菌体液, 加入表面活性剂 SDS 至终浓度为 0.1%, 于 56 °C 处理 10 min 后离心, 测定上清液中噬菌体效价。各取 2 mL 噬菌体液, 加入 0.3% 的表面活性剂 Triton X-100 于室温下处理 10 min, 离心测定上清液中噬菌体效价。各处理均作 3 次重复, 以未处理的噬菌体液作对照。

1.7 噬菌体主要生物学特征分析

1.7.1 最佳感染复数(Optimal Multiplicity of infection, OMOI)测定

以噬菌体效价(PFU/mL)与宿主菌悬液(CFU/mL)分别为 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 和 100 的比例混匀, 终体积为 30 mL, 15 °C, 180 r/min 振荡培养 4 h, 12 000 r/min 离心 5 min, 测定上清液中噬菌体效价。各处理均 3 次重复, 计数噬菌斑形成数量最多的“比例”即为 OMOI。

1.7.2 吸附速率测定

将噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 分别以最佳感染复数与对数期宿主菌悬液混匀, 于 15 °C 下静置, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 和 30 min 时取样 100 μ L, 12 000 r/min 离心 5 min, 测定上清液中未被吸附的噬菌体粒子数量(PFU/mL)。以取样时间为横坐标, 测得的噬菌体效价为纵坐标, 绘制曲线。

1.7.3 一步生长曲线测定

取对数期宿主菌悬液 10 mL, 调整吸光度 OD_{600} 为 0.6(活细胞数约 1×10^8 CFU/mL)。按最佳感染复数加入噬菌体液混合, 15 °C 吸附 10 min, 以 12 000 r/min 离心 5 min 弃上清以去除未被吸附的噬菌体粒子, 加入 10 mL 的 PYGV 液体重悬沉淀后于 15 °C, 180 r/min 振荡培养。自 0 时起每 10 min 取样 1 次, 12 000 r/min 离心测定上清液中噬菌体效价。以未加宿主菌的噬菌体液和未加噬菌体的宿主菌悬液作对照, 以取样时间为横坐标, 噬菌体效价的对数值为纵坐标绘制一步生长曲线。

1.8 噬菌体颗粒浓缩、基因组提取与酶切分析

1.8.1 噬菌体颗粒浓缩

将噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 与宿主菌悬液按最佳感染复数混匀接入 PYGV 培养基, 15 °C, 180 r/min 振荡培养 2 d。取培养液 1 L 于 12 000 r/min 离心 10 min, 向上清液中加入脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 和核糖核酸酶 A (RNase A) 至终浓度为 1 μ g/mL, 37 °C 水浴 30 min 后加入 NaCl 至终浓度为 1 mol/L, 冰浴 1 h 后于 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min。向上清液中加入 PEG 8000 至终浓度为 10%, 充分溶解后于 4 °C 静置过夜, 经 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min 弃上清, 用 4 mL 的 SM 缓冲液重悬沉淀, 加入等体积氯仿涡旋振荡 2 min, 8 000 r/min 离心 10 min 收集水相, 即得浓缩的噬菌体液。

1.8.2 噬菌体基因组提取

取浓缩的噬菌体液 500 μ L, 加入乙二胺四乙酸(EDTA)至终浓度为 20 mmol/mL、蛋白酶 K(终浓度为 50 μ g/mL)和 10% SDS(终浓度为 50 μ L/mL), 56 °C 水浴 1 h, 以酚-氯仿法抽提噬菌体基因组。12 000 r/min 离心 5 min 收集水相, 加入等体积冰冷的异丙醇混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 1 mL 无水乙醇洗涤, 12 000 r/min 离心 10 min, 加入 50 μ L 的 TE 缓冲液溶解沉淀, 即得噬菌体 DNA。采用微量紫外分光光度计(Nanodrop 2000)检验纯度和浓度后于 -20 °C 保存。

1.8.3 噬菌体基因组酶切

分别用 DNase I 和 RNase A 对噬菌体基因组进行酶切, 反应体系为 10 μ L, 即基因组 1 μ L, DNase I 或 RNase A 酶 1 μ L, 10 $\times$ buffer 1 μ L, ddH₂O 补至 10 μ L。37 °C 水浴 30 min 后采用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以判断噬菌体基因组的核酸类型。基因组为 DNA 的, 则继续用 *Eco*R I, *Bam*H I, *Pst* I 和 *Xho* I 等限制性核酸内切酶酶切分析, 以 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结 果

2.1 宿主菌分离及其噬菌体初步鉴定

从喀拉库勒湖水样中共分离得到低温细菌 43 株, 以此为宿主, 分离得到两株能侵染同一宿主菌的低温

噬菌体. 结合 16S rRNA 序列比对及系统发育分析(图 1), 发现该宿主菌与 *Flavobacterium frigidus* (JQ712371) 相似度最高, 鉴定其为黄杆菌属细菌, 命名为 *Flavobacterium* sp. KHhb03, GenBank 序列登录号 MT919896.

两株噬菌体侵染宿主菌后于双层平板上形成大(直径约 3~5 mm、边缘不光滑不整齐)、小(直径约 1~2 mm、边缘整齐光滑)两种形态的噬菌斑(图 2). 透射电镜观察发现两株噬菌体粒子形态明显不同, 噬菌斑较大的一株头部呈正多面体对称, 直径约 55~60 nm, 尾管细长, 约 230~250 nm, 从形态上初步鉴定为长尾噬菌体科(Siphoviridae), 命名为 KH-sph01. 噬菌斑略小的一株噬菌体同为头尾复合结构, 正多面体头部直径略大, 约 70~75 nm, 尾管粗壮呈针管状, 长约 120~150 nm, 尾管直径约 20~25 nm, 将其鉴定为肌尾噬菌体科(Myoviridae), 命名为 KH-sph02. 经宿主谱分析, 两株噬菌体仅对宿主菌 *Flavobacterium* sp. KHhb03 敏感, 表现为烈性噬菌体.

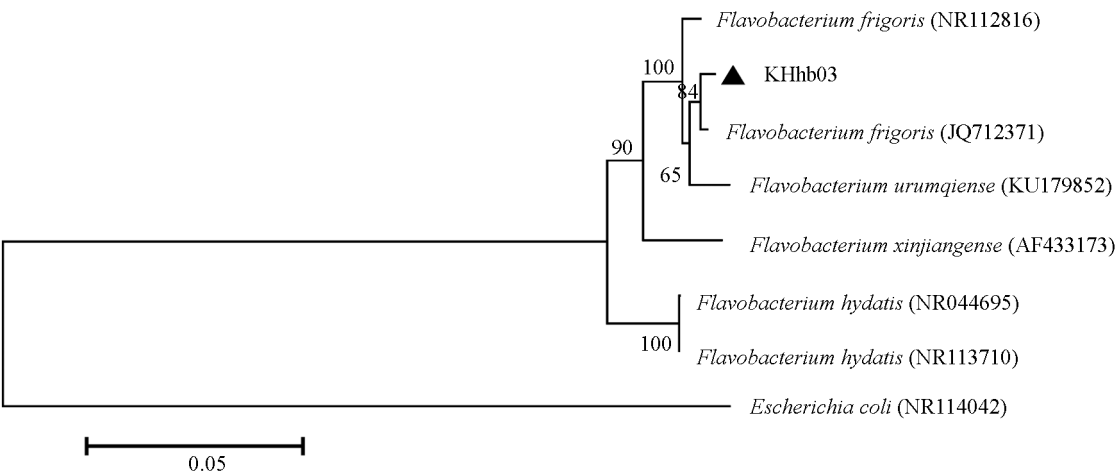


图 1 宿主菌 KHhb03 系统发育分析

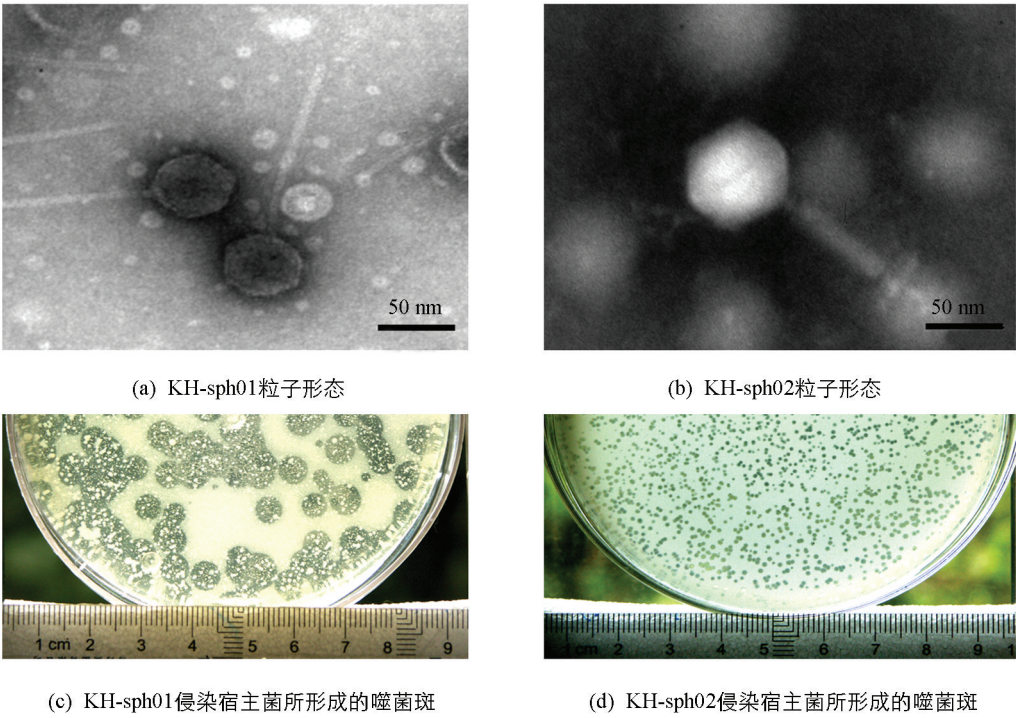


图 2 噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 颗粒形态及噬菌斑特征

2.2 宿主菌生长及噬菌体侵染温度范围

宿主菌 *Flavobacterium* sp. KHhb03 经平板培养, 发现可在 4~37 ℃ 生长, 40 ℃ 时菌落生长不明显. 不同温度下的生长曲线显示(图 3), 该菌株在 37 ℃ 时生长不明显, 培养 8 h 后培养液 OD_{600} 几乎不再变化; 4 ℃ 和 30 ℃ 时, 该菌株生长较缓慢, 代时明显延长. 宿主菌 *Flavobacterium* sp. KHhb03 最适生长温度为 15~20 ℃, 属于耐冷菌.

由表 1 可见, 长尾噬菌体 KH-sph01 在 4~25 ℃ 培养时能于双层平板上产生清晰的噬菌斑, 而肌尾噬菌体 KH-sph02 侵染温度范围为 4~30 ℃, 但在 30 ℃ 时的噬菌斑数量低于 4~25 ℃.

表 1 宿主菌 KHhb03 生长与噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 侵染温度范围

样 品	温 度/℃							
	4	10	15	20	25	30	37	42
KHhb03	+	++	+++	+++	++	—	—	—
KH-sph01	+	++	+++	++	+	—	—	—
KH-sph02	+	++	+++	++	+	+	—	—

注: + 表示可形成菌落或产生噬菌斑, 其数量越多表示宿主菌生长情况越好或噬菌斑形成数量越多; — 表示不可形成菌落或产生噬菌斑.

2.3 理化因素对噬菌体的影响

2.3.1 热稳定性分析

两株噬菌体均表现出一定的热不稳定性(图 4). 40 ℃ 处理 60 min, KH-sph01 和 KH-sph02 效价仍分别有原效价的 82% 和 79%. 50 ℃ 处理 60 min, 两株噬菌体均有超过 50% 的粒子失活. 但随温度继续升高, 两株噬菌体耐热性显著降低. 70 ℃ 处理 10 min, 两株噬菌体效价仅为原效价的 45% 和 63%; 70 ℃ 处理 60 min, 两株噬菌体均基本失活. 由此表明, 两株噬菌体均对热敏感, 但具备一定的耐热性.

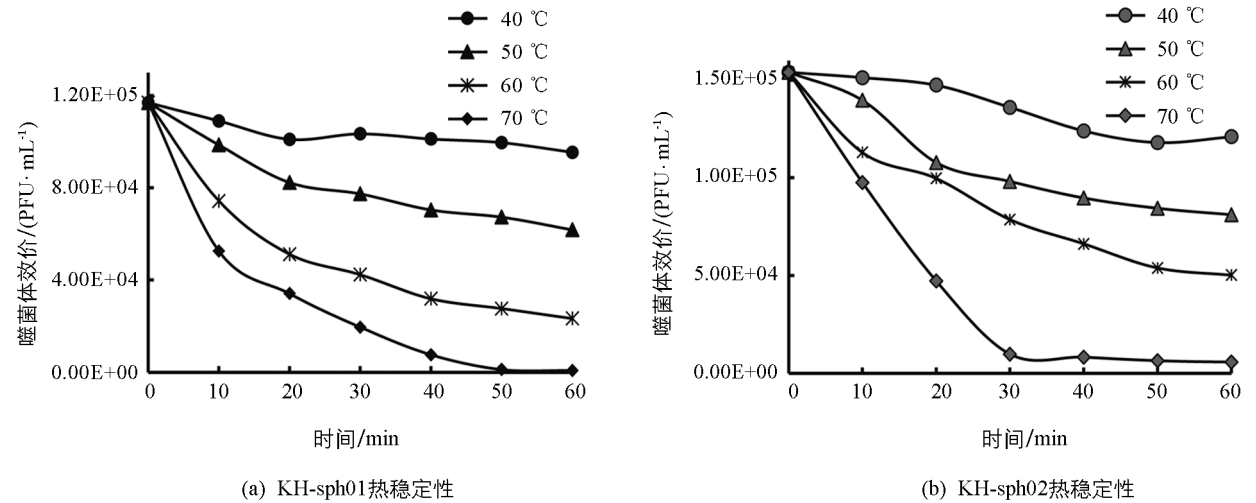


图 4 噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 的热稳定性

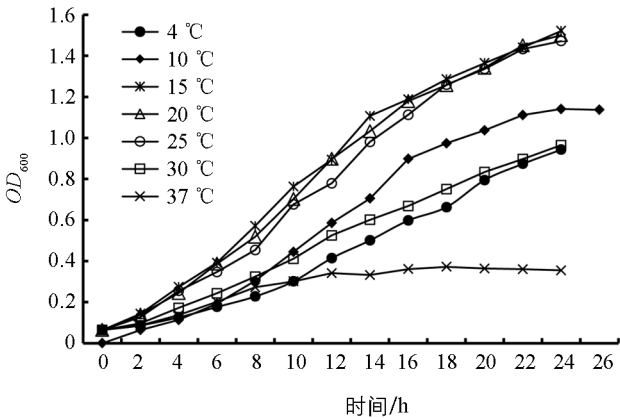


图 3 不同温度培养下宿主菌 *Flavobacterium* sp. KHhb03 的生长曲线

2.3.2 酸碱耐受性分析

KH-sph01 和 KH-sph02 在 pH 值为 7~8 范围内均较稳定(图 5),再侵染能力不受影响. 相比而言, KH-sph01 比 KH-sph02 更耐酸, 且对 pH 的耐受范围更宽, 其在 pH 值为 6 时侵染能力不受影响, 在 pH 值为 5 时也有 34% 的噬菌体存活. 而 KH-sph02 在 pH 值为 7~9 范围内最稳定, 在 pH 值为 6 和 pH 值为 10 时也分别能保持 47% 和 49% 的存活率, KH-sph02 更能耐受碱性环境.

2.3.3 氯仿、蛋白酶 K 和表面活性剂对噬菌体的影响

经氯仿处理后(图 6), KH-sph01 和 KH-sph02 的效价相比对照组仍有 80.6% 和 85.3%, 表明两株噬菌体均对氯仿不敏感, 说明两株噬菌体衣壳组分中均无脂质包膜成分.

经蛋白酶 K 处理后, KH-sph01 和 KH-sph02 效价仅为对照组的 10% 和 17%, 说明两株噬菌体均对蛋白酶 K 敏感.

KH-sph01 和 KH-sph02 对表面活性剂(SDS 和 Triton X-100)均表现不敏感, 且敏感程度差异无统计学意义, 经处理后均能保持 85% 的侵染活性.

2.4 两株噬菌体的主要生物学特征

2.4.1 最佳感染复数

由图 7 可见, KH-sph01 与宿主细胞比例为 10 时, 培养液中所获子代噬菌体数量最多, 而 KH-sph02 与宿主细胞比例为 0.1 时, 测得培养液中噬菌体效价最高, 说明 KH-sph01 与 KH-sph02 感染宿主菌 *Flavobacterium* sp. KHhb03 的最佳感染复数分别为 10 和 0.1.

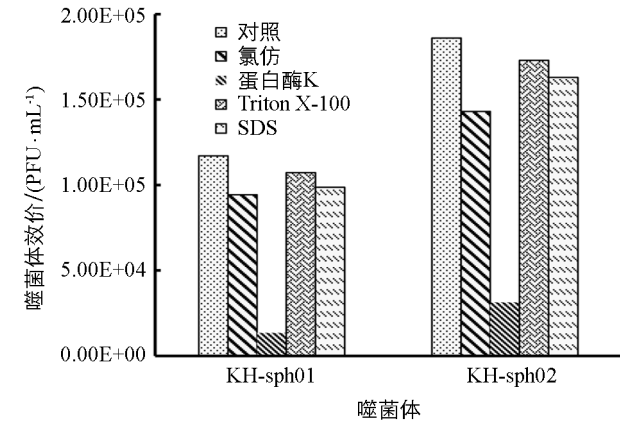


图 6 氯仿、蛋白酶 K 和表面活性剂对噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 的影响

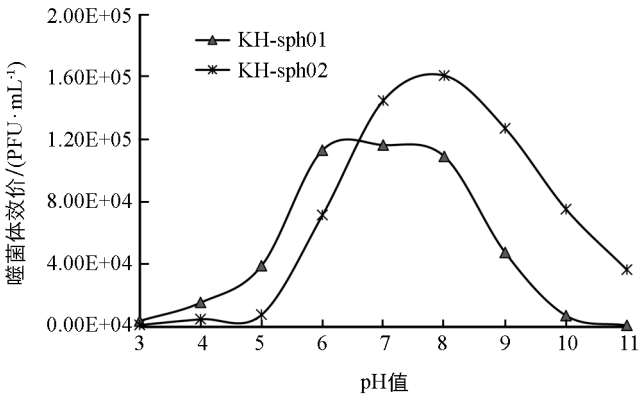


图 5 噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 酸碱耐受性

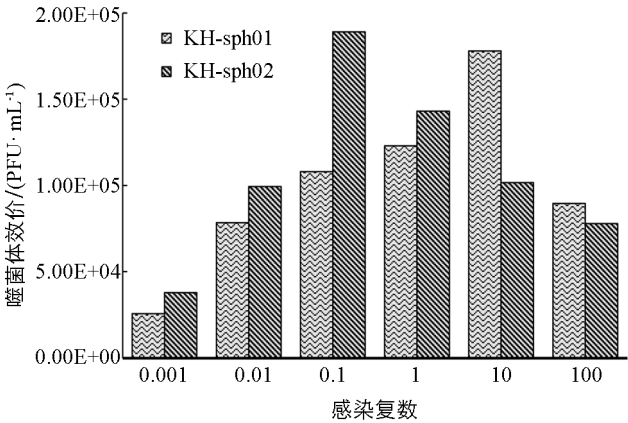


图 7 噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 最佳感染复数

2.4.2 吸附速率

吸附是噬菌体感染宿主细胞的第一步,也是其能否成功感染并实现增殖的必要前提. 由图 8 可见, 两株噬菌体几乎都能在 10 min 内完成对宿主菌的吸附. 吸附 2 min 时, KH-sph01 就有超过 50% 的噬菌体粒子完成吸附, 而 KH-sph02 的吸附速率更强, 2 min 后有超过 55% 的噬菌体粒子完成吸附, 4 min 时有 90%

的噬菌体粒子吸附到了宿主细胞上, 说明两株噬菌体吸附速率均较强。

2.4.3 一步生长曲线

一步生长曲线能反映噬菌体感染宿主细胞到增殖裂解的时间, 并由此计算噬菌体的裂解量(B)。KH-sph01 感染宿主菌的潜伏期约 50 min, 裂解期约 30 min; KH-sph02 感染宿主菌的潜伏期和裂解期分别约 30 min 和 40 min(图 9)。依据公式

$$B = P / C$$

式中, P 表示裂解末期噬菌体效价(PFU/mL), C 表示感染初期宿主菌浓度(CFU/min), 可得出 KH-sph01 和 KH-sph02 的裂解量分别为 3.16 个和 10.22 个。

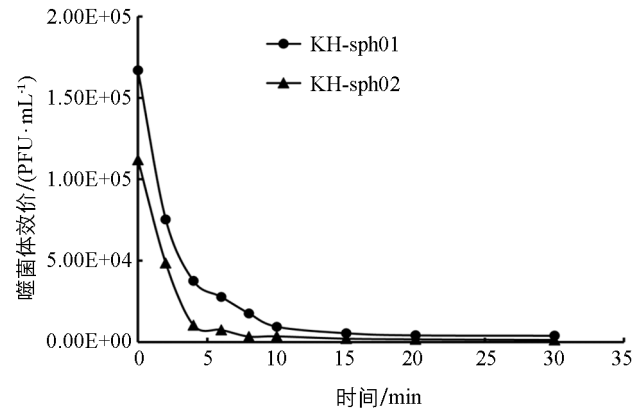


图 8 噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 的吸附速率

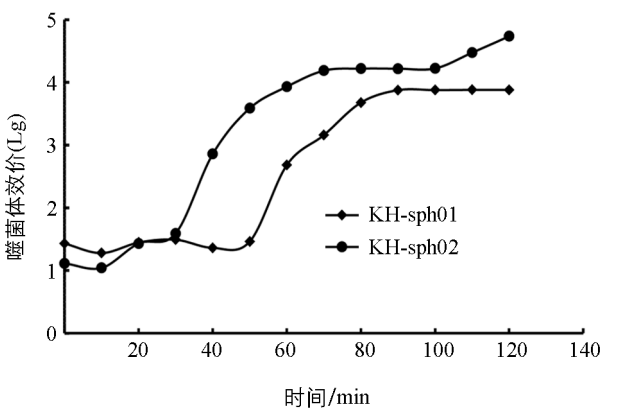
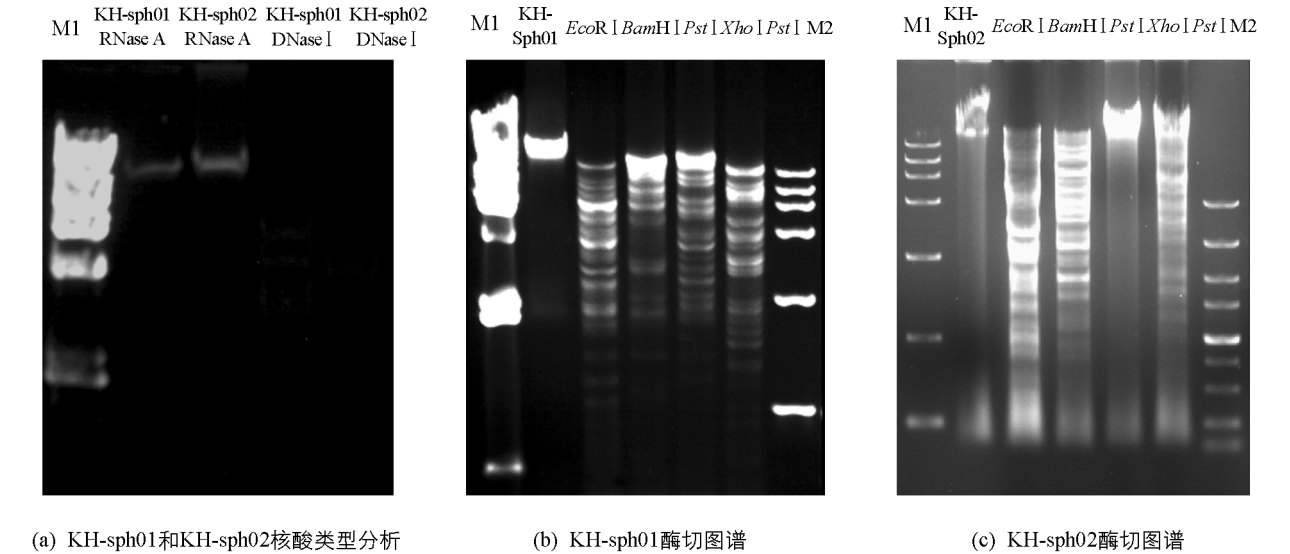


图 9 噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 的一步生长曲线

2.5 噬菌体基因组提取与酶切分析

将 KH-sph01 和 KH-sph02 的基因组分别用 DNase I 和 RNase A 酶切(图 10a), 两株噬菌体均能被 DNase I 降解, 而 RNase A 酶解无影响, 说明两株噬菌体核酸类型均为 dsDNA。两株噬菌体均能被 4 种限制性内切酶切割成大小不同的片段(图 10b 和 10c), 进一步说明 KH-sph01 和 KH-sph02 基因组均为 dsDNA。综合分析不同酶切图谱, 初步估算出 KH-sph01 的基因组 DNA 大小为 60~65 kb, KH-sph02 的基因组 DNA 大小为 40~45 kb。



M1 为 DNA 相对分子质量标准 1(10 000 bp); M2 为 DNA 相对分子质量标准 2(15 000 bp)。

图 10 噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02 基因组酶切分析

3 讨 论

噬菌体特别是低温噬菌体在防治水产病原菌、动植物病害、维持环境生态平衡等方面的应用层出不穷^[18-21],而从环境中分离筛选高效裂解性噬菌体是其开发应用的前提条件.本研究从喀拉库勒湖分离到的两株低温噬菌体 KH-sph01 和 KH-sph02,虽然能侵染同一宿主菌 *Flavobacterium* sp. KHhb03,但形态各异,在双层平板上形成大、小两种不同形态的噬菌斑,分属于长尾噬菌体科和肌尾噬菌体科.而李建凯^[22]分离的侵染同一宿主荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* W-6 的两株低温噬菌体 VW-6S 和 VW-6B 均属于典型的长尾噬菌体科,其头部直径和尾部长度分别为 66.7/233.3 nm 和 61.1/166.7 nm,这与本文的发现明显不同.噬菌体对宿主菌存在高度专一性,一般认为仅有少数形态较为相似的噬菌体才能侵染相同宿主,而本研究 KH-sph01 和 KH-sph02 在形态学上却分属于两个不同的噬菌体科,说明自然界中能侵染相同宿主的噬菌体普遍存在,且可能与形态特征无直接关系.

黄杆菌属细菌作为条件致病菌,常引起水产养殖业中细菌性鱼类疾病(如嗜冷黄杆菌 *Flavobacterium psychrophilum*, 柱状黄杆菌 *Flavobacterium columnare* 等),对鱼类特别是冷水鱼类的人工养殖影响巨大.噬菌体疗法是近年来由于抗生素滥用及化学农药、重金属等污染频现而产生的一种新型生物防治技术.它是通过定向筛选、纯化特定致病细菌的专属烈性噬菌体,经人工富集培养或改造后添加到致病细菌污染的生态环境介质中,从而定向灭活致病细菌的治疗方式^[23-24].分离和筛选特定目标致病细菌的专属噬菌体是噬菌体疗法在不同环境中开展生物防治应用的必要前提.Stenholm 等^[25]从丹麦一个虹鳟鱼养殖场水样中分离得到 22 株黄杆菌噬菌体,它们在形态学上和基因组大小上均不尽相同,其中 5 株(FpV-5, FpV-6, FpV-8, FpV-9 和 FpV-11)具有较广的宿主谱,可感染多株本地分离的嗜冷黄杆菌,具有良好的开发应用价值.本研究的宿主菌 KHhb03 与 *Flavobacterium frigidis*(JQ712371)相似度最高,且在前期的研究中发现黄杆菌属是该区域环境中的优势菌群^[26],这对作为噬菌体疗法在区域环境中靶向灭活致病黄杆菌属细菌提供了良好的材料.

系统分析新发现噬菌体的生物学特性是认识该噬菌体的基本前提,更是噬菌体资源开发应用的必要基础.感染复数是研究噬菌体感染宿主细菌与子代个体产出之间的量效关系的重要生物学指标.KH-sph01 和 KH-sph02 侵染宿主菌的最佳感染复数分别为 10 和 0.1,这与噬菌体 VW-6S 和 VW-6B 侵染宿主荧光假单胞菌 W-6(0.1 和 0.01)明显不同,说明即便是不同噬菌体侵染相同宿主菌,其最佳感染复数也可能不尽相同.一步生长曲线可间接反映噬菌体与宿主菌的相互作用及开发应用潜力,KH-sph01 和 KH-sph02 侵染宿主菌 KHhb03 的潜伏期和裂解期各不相同,裂解量分别为 3.16 个和 10.22 个,间接反映了两株噬菌体与宿主菌相互作用的复杂性.而在实际操作中也发现, KH-sph01 在纯培养条件下难以获得较高的效价,推测在纯培养条件下,随着噬菌体效价增加,宿主菌 KHhb03 极易对 KH-sph01 产生高水平抗性以避免其重新感染,这可能是因为纯培养条件下,噬菌体 KH-sph01 由烈性转变成了温和性,需要进一步验证.

与众多已报道的低温噬菌体一样, KH-sph01 和 KH-sph02 可以在 4℃ 时侵染宿主并产生噬菌斑,但分别在超过 25℃ 和 30℃ 时失去侵染活性,这也印证了两株噬菌体的低温特性.两株噬菌体均对热敏感,随着温度升高,噬菌体迅速失活.而 Wells 等^[27]在分析低温噬菌体 9A 时发现,当温度超过 35℃ 时即可使其瞬时灭活,表明低温噬菌体对温度敏感,可因高温而失去活性.究其原因可能与噬菌体结构蛋白有关,同样也与其生存环境关系巨大,这与以前关于低温噬菌体的报道相符^[22, 27-29].推测低温噬菌体普遍存在热不稳定性,但在进化过程中因环境不同而产生了不同的适应策略.

参考文献:

- [1] PAEZ-ESPINO D, ELOE-FADROSH E A, PAVLOPOULOS G A, et al. Uncovering Earth's Virome [J]. Nature, 2016, 536(7617): 425-430.
- [2] WILLIAMSON K E, FUHRMANN J J, WOMMACK K E, et al. Viruses in Soil Ecosystems: an Unknown Quantity within an Unexplored Territory [J]. Annual Review of Virology, 2017, 4(1): 201-219.
- [3] 欧 婷, 江鸿森, 任慧爽, 等. 一株香樟炭疽病拮抗菌的鉴定及其发酵条件优化 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(7): 43-52.
- [4] LOVE M, BHANDARI D, DOBSON R, et al. Potential for Bacteriophage Endolysins to Supplement or Replace Antibiotics in Food Production and Clinical Care [J]. Antibiotics, 2018, 7(1): 17.
- [5] LUEPKE K H, SUDA K J, BOUCHER H, et al. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications [J]. Pharmacotherapy: the Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 2017, 37(1): 71-84.
- [6] GOMAA S, SERRY F, ABDELLATIF H, et al. Elimination of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Biofilms Using Bacteriophages [J]. Archives of Virology, 2019, 164(9): 2265-2275.
- [7] RABIEY M, ROY S R, HOLTAPPELS D, et al. Phage Biocontrol to Combat *Pseudomonas syringae* Pathogens Causing Disease in Cherry [J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(5): 1428-1445.
- [8] 张奇亚, 桂建芳. 一类不可忽视的战略生物资源——淡水与海水中的病毒及其在生态系统中的作用 [J]. 中国科学院院刊, 2009, 24(4): 414-420.
- [9] 曹永生, 李绍戊, 王 荻, 等. 噬菌体在鲑鳟鱼细菌病治疗中的应用研究进展 [J]. 水产学杂志, 2019, 32(4): 1-8.
- [10] PÉREZ-SÁNCHEZ T, MORA-SÁNCHEZ B, BALCÁZAR J L. Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges [J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(11): 896-903.
- [11] CASTILLO D, MIDDELBOE M. Genomic Diversity of Bacteriophages Infecting the Fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(24): fnw272.
- [12] MALKI K, KULA A, BRUDER K, et al. Bacteriophages Isolated from Lake Michigan Demonstrate Broad Host-Range across Several Bacterial Phyla [J]. Virology Journal, 2015, 12(1): 164.
- [13] LAANTO E, BAMFORD J K, RAVANTTI J J, et al. The Use of Phage FCL-2 as an Alternative to Chemotherapy Against Columnaris Disease in Aquaculture [J]. Frontiers in Microbiology, 2015(6): 829.
- [14] 吕 可, 赵前程, 刘婧懿, 等. 噬菌体在水生动物病害防治中的应用问题和解决策略 [J]. 水产科学, 2020, 39(6): 964-971.
- [15] BAO J, WU N N, ZENG Y G, et al. Non-Active Antibiotic and Bacteriophage Synergism to Successfully Treat Recurrent Urinary Tract Infection Caused by Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Emerging Microbes & Infections, 2020, 9(1): 771-774.
- [16] LI M Y, WANG J L, ZHANG Q, et al. Isolation and Characterization of the Lytic Cold-Active Bacteriophage MYSP06 from the Mingyong Glacier in China [J]. Current Microbiology, 2016, 72(2): 120-127.
- [17] WEISBURG W G, BARNS S M, PELLETIER D A, et al. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [18] LÓPEZ-BUENO A, LÓPEZ-BUENO A, TAMAMES J, et al. High Diversity of the Viral Community from an Antarctic Lake [J]. Science, 2009, 326(5954): 858-861.
- [19] BHUNCHOTH A, PHIRONRIT N, LEKSOMBOON C, et al. Isolation of *Ralstonia solanacearum*-Infecting Bacteriophages from Tomato Fields in Chiang Mai, Thailand, and Their Experimental Use as Biocontrol Agents [J]. Journal of

Applied Microbiology, 2015, 118(4): 1023-1033.

[20] CHAE J C, HUNG N B, YU S M, et al. Diversity of Bacteriophages Infecting *Xanthomonas oryzae* Pv. *Oryzae* in Paddy Fields and Its Potential to Control Bacterial Leaf Blight of Rice [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(6): 740-747.

[21] WONG C L, SIEO C C, TAN W S, et al. Evaluation of a Lytic Bacteriophage, Φ St1, for Biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Chickens [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 172(1): 92-101.

[22] 李建凯. 两株低温噬菌体生物学特性及基因组解析 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2016.

[23] YU L, WANG S, GUO Z M, et al. A Guard-Killer Phage Cocktail Effectively Lyses the Host and Inhibits the Development of Phage-Resistant Strains of *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(2): 971-983.

[24] GUTIÉRREZ D, FERNÁNDEZ L, RODRÍGUEZ A, et al. Are Phage Lytic Proteins the Secret Weapon to Kill *Staphylococcus aureus* [J]. mBio, 2018, 9(1): 1917-1923.

[25] STENHOLM A R, DALSGAARD I, MIDDELBOE M. Isolation and Characterization of Bacteriophages Infecting the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(13): 4070-4078.

[26] 李明源, 王继莲, 古丽巴哈尔·萨吾提. 新疆东帕米尔高原慕士塔格峰洋布拉克冰川雪冰及融水中可培养细菌多样性分析 [J]. 冰川冻土, 2015, 37(6): 1634-1641.

[27] WELLS L E, DEMING J W. Effects of Temperature, Salinity and Clay Particles on Inactivation and Decay of Cold-Active Marine Bacteriophage 9A [J]. Aquatic Microbial Ecology, 2006, 45(1): 31-39.

[28] 张春晶. 荧光假单胞菌低温噬菌体 VSW-3 生物学特性及比较基因组分析 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2017.

[29] SENČILO A, LUHTANEN A M, SAARIJÄRVI M, et al. Cold-Active Bacteriophages from the Baltic Sea Ice Have Diverse Genomes and Virus-Host Interactions [J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(10): 3628-3641.

责任编辑 周仁惠