

一株新型溶藻弧菌噬菌体 ϕ V039C 的生物学特性和全基因组分析

陈躬浩^{1,2}, 付汉清^{1,2}, 童桂香^{3,4}, 韦信贤^{3,4}, 王乃萱^{1,2}, 林茂^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门市渔用药物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021; 3. 广西水产科学研究院, 广西 南宁 530021; 4. 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西 南宁 530021)

[摘要] 对一株溶藻弧菌噬菌体 ϕ V039C 进行了生物学特性和全基因组序列的研究。经透射电镜观察可见, 噬菌体 ϕ V039C 头部为正廿面体结构, 直径 58.9 nm, 具长 105.2 nm 的尾部; 采用双层平板法检测, 其最佳感染复数为 0.1; 通过一步生长曲线计算可得, 噬菌体 ϕ V039C 的潜伏期为 20 min, 爆发期为 10 min, 裂解量为 163 pfu/cell; 利用第三代单分子测序平台进行全基因组测序分析, 其基因组全长 43 405 bp, G + C 含量为 42.95%, 74 个开放阅读框 (ORF) 主要为噬菌体的结构、DNA 复制和裂解有关的基因; 在 NCBI 数据库中进行基因组比对, 发现与其最接近的长尾噬菌体科的溶藻弧菌噬菌体 NF 和副溶血弧菌噬菌体 Seahorse 的覆盖率仅为 11% (覆盖区域的相似度分别为 92.2% 和 93.3%), 此外, 基于裂解酶构建的系统进化树也表明, ϕ V039C 与二者处于距离最近的分支。由此得出, 溶藻弧菌噬菌体 ϕ V039C 是一株新型的噬菌体, 分类上应归属有尾噬菌体目长尾噬菌体科。

[关键词] 溶藻弧菌; 噬菌体; 生物学特性; 基因组

[中图分类号] S 942.3

Biological Characteristics and Genome Analysis of a New *Vibrio alginolyticus* Phage ϕ V039C

CHEN Gonghao^{1,2}, FU Hanqing^{1,2}, TONG Guixiang^{3,4}, WEI Xinxian^{3,4}, WANG Naixuan^{1,2}, LIN Mao^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Xiamen Engineering-Technology Research Center of Fishery Medicine, Xiamen 361021, China; 3. Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China; 4. Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture, Nanning 530021, China)

Abstract: In this paper, the biological characteristics and the whole genome sequence of *V. alginolyticus* phage ϕ V039C were studied. Through transmission electron microscopy, ϕ V039C was observed to have an icosahedral head with diameter of 58.9 nm, and a tail with length of 105.2 nm. Using the double-layer plate method, its optimal multiplicity of infection (MOI) was detected to be 0.1. One-step growth curve showed that the latent period was 20 min, the burst period was 10 min, and the burst size was 163 pfu/cell. Phage genome was sequenced using the PacBio sequencing platform. The length of the whole genome of ϕ V039C is 43 405 bp with G + C of 42.95%. And 74 open reading frames (ORFs) were annotated, including genes related to DNA

[收稿日期] 2020-09-04

[基金项目] 国家重点研发计划资助项目 (2020YFD0900102); 福建省自然科学基金项目 (2019J01695); 厦门市海洋与渔业发展专项 (21CZP007HJ06)

[作者简介] 陈躬浩 (1995—), 男, 硕士生, 从事水产生物医学研究。通信作者: 林茂 (1977—), 男, 博士, 教授, 从事水产微生物学研究。E-mail: linmao@jmu.edu.cn

replication, structure and lysis. The query of the whole genome of ϕ V039C in NCBI database indicated that *Vibrio alginolyticus* phage NF and *Vibrio parahaemolyticus* phage seahorse had the both low coverage of 11% with identity of 92.2% and 93.3%, respectively. In addition, the phylogenetic tree based on lyase also showed that ϕ V039C was nearest to the two phages. In summary, ϕ V039C is a novel bacteriophage, which belongs to Caudovirales, Siphoviridae.

Keywords: *Vibrio alginolyticus*; phage; biological characteristics; genome

0 引言

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 属于弧菌科 (Vibrionaceae) 弧菌属 (*Vibrio*)，为革兰氏阴性短杆菌，无荚膜和芽孢，是广泛存在于海水中的一种条件致病菌。它不仅对于鱼^[1]、虾^[2]、贝^[3]有致病性，同时对于人类也有一定的致病性，能够引起腹泻和食物中毒^[4]。而对于溶藻弧菌的防治，养殖户通常使用传统的抗生素或者消毒剂，但抗生素的滥用会导致养殖过程中溶藻弧菌产生耐药性，不仅影响用药效果，同时耐药菌还会随着食物链的传播感染人类，危害人类生命安全^[5]。另一方面，随着人们生活水平的不断提高，大众在食品的选择上对绿色理念越发的重视。因此，亟需寻找一种新的既环保、友好又能有效控制水产养殖动物溶藻弧菌病的方法。

噬菌体作为一种微生物病毒，能够侵染并裂解细菌、螺旋体、放线菌等。早在 20 世纪初期，噬菌体就被认为有替代抗生素的巨大潜力^[6-7]。相比于抗生素的高效，有关噬菌体疗法的研究始终落后于抗生素的研究^[8]。但随着近年来细菌耐药性问题趋向严峻，研究者重新将目光投向噬菌体，期望能够开发出高效的噬菌体制剂。2009 年，Wright 等^[9]首次在感染多重耐药铜绿假单胞菌的慢性耳炎患者身上使用噬菌体治疗方案，经过治疗后，患者的症状均得到改善，并且没有产生毒副作用。Cao 等^[10]从临床患者体内分离得到一株多重耐药性肺炎克雷伯菌，并用其感染小鼠，随后使用噬菌体进行治疗，结果发现未使用噬菌体治疗的小鼠在 24 h 内全部死亡，而使用噬菌体治疗的小鼠存活率则高出许多。此外，噬菌体在弧菌病防治方面的研究也取得了一些成果。Stalin 等^[11]研究发现，在斑节对虾幼体感染哈维氏弧菌后，使用噬菌体能够有效提高幼体的存活率。胡蝶等^[12]将副溶血弧菌制成噬菌体微胶囊，并拌于饲料中投喂方斑东风螺和南美白对虾，发现实验生物的肠道和水体中的宿主菌都有大幅度的减少。于鸽^[13]从自然水体中分离得到一株溶藻弧菌噬菌体，并将其用于南美白对虾的攻毒实验，结果表明 10⁸ pfu/mL 的噬菌体溶液的保护率达 88.20%。Sasikala 等^[14]分离得到的一株溶藻弧菌噬菌体能够有效抑制溶藻弧菌的生物膜形成，并且在数个小时后还对溶藻弧菌有杀灭作用。

本文以溶藻弧菌 V039 为宿主，分离得到一株新型溶藻弧菌噬菌体 ϕ V039C，并对其进行了电镜形态观察、最佳感染复数、一步生长曲线等生物学特性的研究，以及全基因测序、序列分析和功能预测，以期更好地了解其裂解机制，为溶藻弧菌的噬菌体治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

宿主菌：病原菌（溶藻弧菌 V039）从福建漳浦的对虾养殖场中分离得到，并由本实验室保藏。

主要试剂和仪器：LB 肉汤、营养琼脂 (NA)、琼脂粉、SM 病毒提取缓冲液均购自青岛海博生物技术有限公司；DL15000、DL2000、DNase I、RNase A 和限制性内切酶 (EcoR I、EcoR V、BamH I、Hind III) 均为日本 TaKaRa 公司产品；TIANamp 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司；透射电子显微镜 (TEM) 为美国 FEI 公司制造产品；离心机 (Eppendorf 5427R) 为德国艾本德公司产品。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体的分离

将取自福建漳浦各对虾养殖场的水样混合于洁净的水桶中，再把培养至对数期的溶藻弧菌 V039

菌液倒入水样中, 混匀后置于 30 ℃ 恒温培养箱中 24 h, 以富集潜在噬菌体。之后, 取 5 mL 富集液 10 000 r/min 离心 3 min, 上清液用 0.22 μm 滤膜过滤备用。吸取 100 μL V039 菌液均匀涂布在营养琼脂 (添加体积分数为 2% 的 NaCl) 上, 吸取 10 μL 富集液分数滴点于平板上, 晾干后置于 30 ℃ 培养, 24 h 后观察点接处是否有空斑出现, 如有空斑即作为溶藻弧菌 V039 的噬菌体进行挖斑纯化^[15]。

1.2.2 噬菌体的纯化与效价测定

采用双层平板法进行纯化和效价测定。将噬菌体形成的空斑挖到 SM 缓冲液中, 4 ℃ 过夜。用无菌生理盐水将浸提液稀释到合适梯度, 吸取 100 μL 稀释液和 100 μL 宿主菌液至 6 mL 半固体 (含质量分数为 0.65% 的琼脂) LB 肉汤 (提前置于 50 ℃ 保温) 中混合均匀, 倾倒在营养琼脂 (添加体积分数为 2% 的 NaCl) 上, 凝固后 30 ℃ 培养 16 h。挑取单个噬菌斑至 SM 缓冲液中 4 ℃ 过夜, 重复上述操作对分离得到的噬菌体纯化 3~5 次。噬菌体效价 (TT) 指的是每毫升样品中含有的具有侵染性的噬菌体颗粒数, 又称噬菌斑形成单位数 (plaque-forming unit)^[16]。检测样品梯度稀释后做双层平板法培养, 每个梯度设 3 个平行, 取噬菌斑颗粒数在 30~300 pfu 之间为有效数据, 以平均数计算噬菌体密度。

1.2.3 噬菌体电镜观察

取噬菌体增殖液 20 μL ($>10^{10}$ pfu/mL) 滴到铜网上吸附 30 min, 用 2% (体积分数) 磷钨酸 (PTA) 负染 10 min, 室温干燥后, 用透射电子显微镜观察并拍摄噬菌体的形态, 同时测量头部直径等数据^[17]。

1.2.4 噬菌体基因组的提取和酶切分析

取噬菌体增殖液 ($\geq 10^{10}$ pfu/mL) 至无菌 EP 管中, 分别加入 DNase I 与 RNase A 于 37 ℃ 反应 1 h, 以去除噬菌体增殖液中游离的宿主菌 DNA/RNA, 80 ℃ 处理 15 min 使酶失活。之后, 利用 TI-ANamp 病毒基因组 DNA/RNA 试剂盒提取噬菌体基因组。

酶切反应体系为 10 μL^[18]。分别取噬菌体基因组 8 μL 于 6 个无菌 PCR 管中, 再分别加入 1 μL 的酶 (DNase I、RNase A、EcoR I、EcoR V、BamH I、Hind III) 以及 1 μL 的 10×Loading Buffer, 于 37 ℃ 反应 1 h。将酶切产物置于 1% (质量分数) 琼脂糖凝胶中电泳 (110 V) 24 min, 使用凝胶成像系统观察电泳结果。

1.2.5 噬菌体最佳感染复数测定

感染复数 (multiplicity of infection, MOI), 指的是噬菌体在感染开始时噬菌体与宿主菌的比值。测定方法参考张文惠等^[19]的实验方法, 培养宿主菌液至生长对数期, 按 MOI 值为 1000、100、10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001、0.000 01 各吸取 50 μL 的噬菌体液和宿主菌液到 900 μL 无菌 LB 肉汤中, 30 ℃、160 r/min 培养 8 h, 10 000 r/min 离心 2 min, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 测定噬菌体效价。效价最高的感染复数即为最佳感染复数。

1.2.6 噬菌体一步生长曲线测定

参考王九儒等^[20]的研究方法, 按照感染复数为 0.1 的比例, 混合噬菌体液和宿主菌液, 宿主菌液浓度为 1×10^8 cfu/mL, 总体积为 1 mL, 30 ℃ 孵育 10 min, 让噬菌体充分吸附在宿主菌上, 10 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 用 LB 肉汤洗涤 2 次去除未吸附的噬菌体, 加入 1 mL LB 肉汤重悬。置于 30 ℃ 的恒温培养箱中振荡培养, 并开始计时, 分别在 0、10、20、30、40、50、60 min 时间点取样, 测定噬菌体效价并绘制生长曲线。

1.2.7 噬菌体的全基因组测序及生物信息学分析

噬菌体 φV039C 的基因组利用第三代单分子测序平台 (PacBio SMRT) 进行全基因组测序分析。利用 GeneMarkS (<http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>) 网站进行基因预测。使用在线 blastp 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进一步对预测的基因进行注释。使用软件 DNA Plotter 绘制全基因组圈图。用 MEGA 7.0 软件, 选择 *N*-乙酰壁氨酰-L-丙氨酸酰胺酶 (ORF6) 和大亚基终止酶 (ORF19) 两种蛋白进行系统进化树的构建。

2 实验结果与分析

2.1 噬菌体形态特征

以溶藻弧菌 V039 为宿主, 采用点斑法筛选得到噬菌体 ϕ V039C (见图 1a), 经纯化后得到的噬菌斑清晰, 直径在 1 mm 左右, 呈现出透明、无晕圈的形态 (见图 1b)。通过电镜观察 (见图 1c), 该噬菌体的头部结构是正廿面体结构, 头部直径 (58.9 ± 2.9) nm, 尾长 (105.2 ± 5.7) nm。根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 第九次报告的病毒分类系统^[21], 噬菌体 ϕ V039C 在分类上可能属于有尾噬菌体目 (Caudovirales) 长尾噬菌体科 (Siphoviridae)。

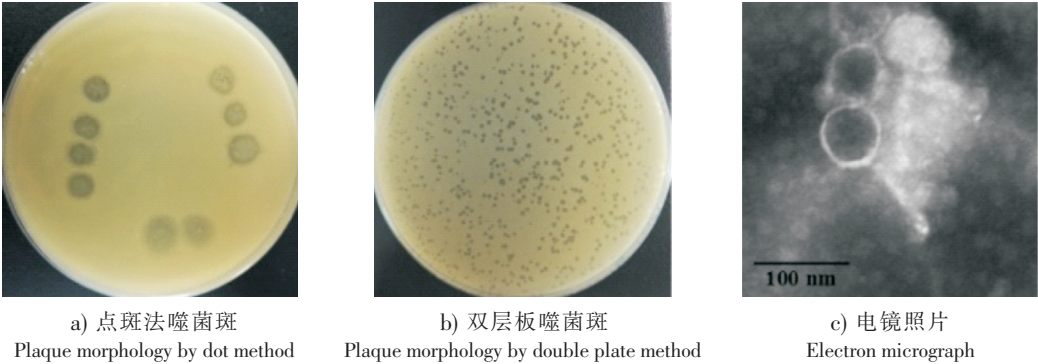


图 1 噬菌体 ϕ V039C 噬菌斑形态及电镜照片

Fig.1 Plaque morphology and electron micrograph of phage ϕ V039C

2.2 噬菌体基因组酶切结果

酶切产物电泳结果 (见图 2) 显示: 噬菌体 ϕ V039C 的基因组能被 DNase I 降解, 但不能被 RNase A 降解, 说明其基因组类型是 DNA; 电泳结果也表明其基因组上有 EcoR V、Hind III 和 EcoR I 的酶切位点, 但没有 BamH I 酶切位点。因此, 噬菌体 ϕ V039C 基因组类型属于 dsDNA。

2.3 噬菌体的最佳感染复数

按照不同的感染复数 (MOI) 混合噬菌体和宿主菌液培养 8 h 之后, 用双层板测定各个 MOI 的效价。实验结果 (见表 1) 表明, 当噬菌体与宿主比值为 0.1 时, 噬菌体效价最高, 能够达到 3.34×10^{10} pfu/mL, 因此噬菌体 ϕ V039C 的最佳感染复数为 0.1。

表 1 不同感染复数下噬菌体 ϕ V039C 的效价

Fig. 1 The titer of phage ϕ V039C with different multiplicity of infection

感染复数 MOI	初始含量 Initial content		噬菌体终含量 Terminal content of phage /(pfu · mL ⁻¹)
	噬菌体 Phage /(pfu · mL ⁻¹)	宿主菌 Host /(cfu · mL ⁻¹)	
1000	10 ⁷	10 ⁴	4.90 × 10 ⁸
100	10 ⁷	10 ⁵	4.80 × 10 ⁸
10	10 ⁷	10 ⁶	2.40 × 10 ⁹
1	10 ⁶	10 ⁶	3.10 × 10 ¹⁰
0.1	10 ⁵	10 ⁶	3.30 × 10 ¹⁰
0.01	10 ⁴	10 ⁶	8.10 × 10 ⁹
0.001	10 ³	10 ⁶	1.70 × 10 ⁹
0.0001	10 ²	10 ⁶	2.40 × 10 ⁸

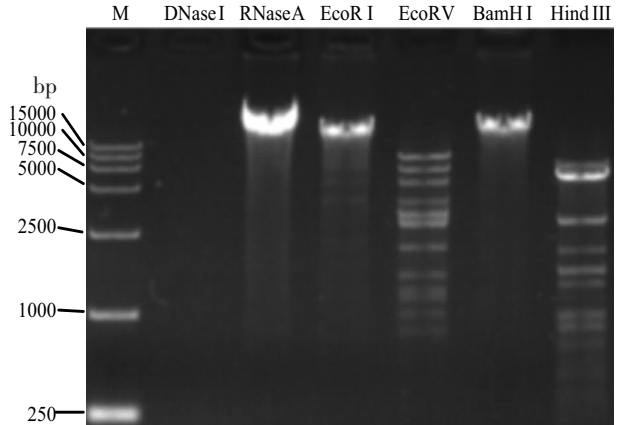


图 2 噬菌体 ϕ V039C 基因组的酶切电泳图

Fig.2 Electrophoretic map of phage ϕ V039C genome digested products

2.4 噬菌体的一步生长曲线

由噬菌体 ϕ V039C 的一步生长曲线 (见图 3) 可得出, 噬菌体与宿主菌混合培养 20 min, 效价无

明显变化，因此噬菌体 ϕ V039C 的潜伏期为 20 min；20—30 min 噬菌体效价呈现上升趋势；30 min 后噬菌体效价稳定。由此得，噬菌体爆发期为培养后 10 min。噬菌体裂解量 = 爆发期末期噬菌体密度/初始受感染宿主菌密度 = $(5.06 \times 10^7)/(3.10 \times 10^5) = 163$ pfu/cell。

2.5 噬菌体全基因组分析

第三代单分子测序平台测序结果表明，噬菌体 ϕ V039C 的基因组（GenBank 登录号 MN956515）为环形双链 DNA，全长为 43 405 bp，G + C 含量为 42.95%（见图 4）。共注释得到 77 个开放阅读框（open reading frame, ORF）。其中，已知功能阅读框有 17 个，假想蛋白有 20 个，未注释出的阅读框有 40 个。核酸序列长度在 213 ~ 2436 bp，对应的蛋白质序列长度在 71 ~ 812。所有 ORF 共含有 40 870 bp 的碱基，基因组的基因密度为 94.20%。

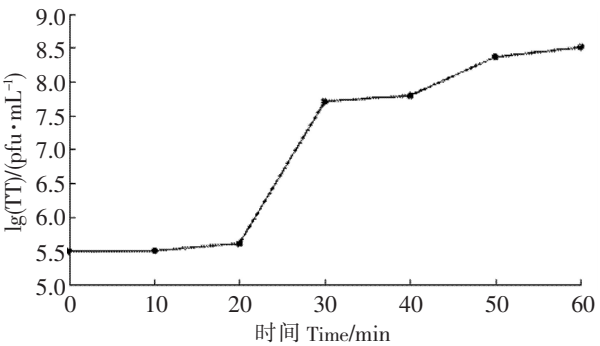


图 3 噬菌体 ϕ V039C 的一步生长曲线
Fig.3 One step growth curve of phage ϕ V039C

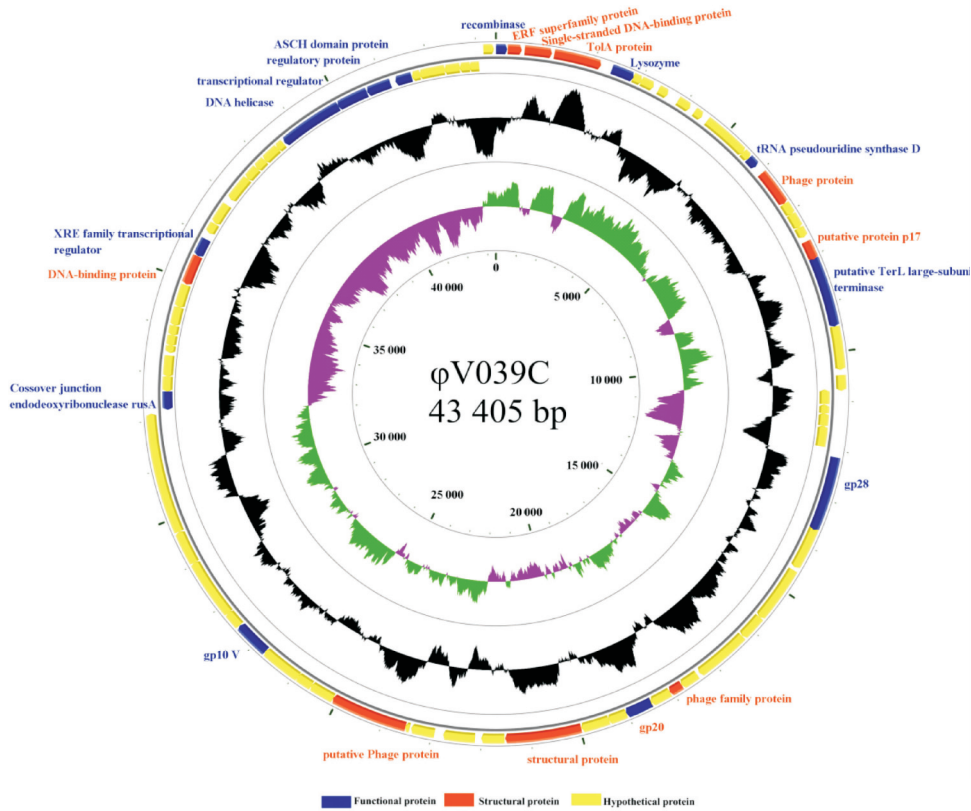


图 4 噬菌体 ϕ V039C 全基因组的组成结构图
Fig.4 The whole genome structure of phage ϕ V039C

用 NCBI 网站的 blastn（megablast）程序进行噬菌体 ϕ V039C 的基因序列比对，在得到的同源序列中，噬菌体 ϕ V039C 与溶藻弧菌噬菌体 NF（MN812722）、副溶血弧菌噬菌体 Seahorse（MN512538）的比对覆盖率最高，同为 11%，一致性分别为 92.2% 和 93.3%，即从基因组来看，噬菌体 ϕ V039C 与这二者最为接近。二者在分类上均属于有尾噬菌体目长尾噬菌体科。噬菌体 ϕ V039C 与溶藻弧菌噬菌体 PVA1（KJ395778）的覆盖率次之，为 2%，其余检索结果覆盖率仅为 1%。使用 Mauve 软件对 3 个基因组进行共线性比对分析（见图 5），发现三者相互之间存在 5 个同源片段，但位置、顺序不同，相似性也不高。

由全基因组的比对结果可见, 噬菌体 ϕ V039C 与现有 NCBI 登录的其他噬菌体基因组相似区的比例很低, 是一株新型的溶藻弧菌噬菌体。

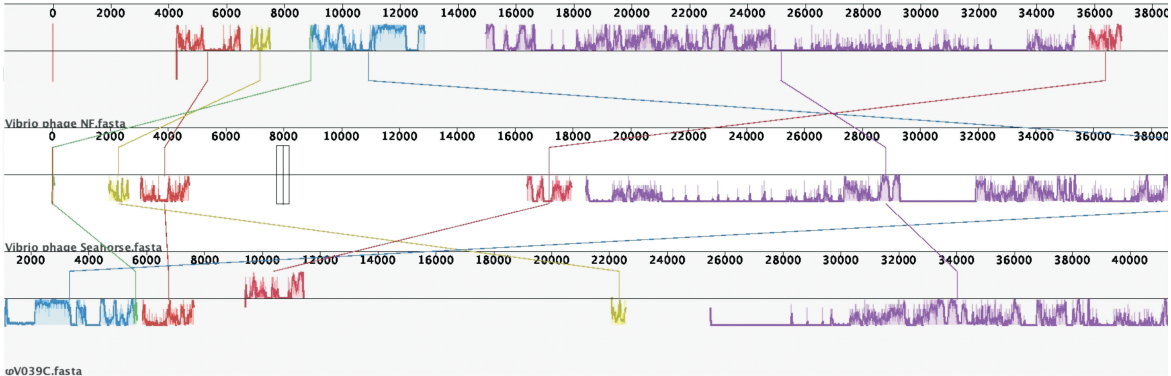


图 5 噬菌体 ϕ V039C 与噬菌体 NF、噬菌体 Seahorse 基因组的共线性分析

Fig.5 Collinearity analysis of phage ϕ V039C with phage NF and phage Seahorse

2.6 噬菌体 ϕ V039C 功能性 ORF 的分析

对噬菌体 ϕ V039C 的基因组进行 ORF 注释, 共注释出 74 个 ORF (见表 2)。

表 2 噬菌体 ϕ V039C 的开放阅读框注释表
Tab. 2 Open reading frame of phage ϕ V039C

开放阅读框 ORF	开放阅读框名称 ORF name	相似性 Identity (%)	登录号 Accession No.
1	重组酶 Recombinase	74	WP_057101637
3	单链 DNA 结合蛋白 Single-stranded DNA-binding protein	79	WP_020330824
6	<i>N</i> -乙酰壁氨酰- <i>L</i> -丙氨酸酰胺酶 <i>N</i> -acetylmuramoyl- <i>L</i> - alanine amidase	56	YP_009126538
19	大亚基终止酶 TerL, large-subunit terminase	65	YP_007006411
25	通道蛋白 Portal protein	51	YP_009103293
26	Mu gpF 类蛋白 Mu gpF-like protein	46	YP_009103294
28	次要衣壳蛋白 Minor capsid protein	62	YP_009103298
29	主要衣壳蛋白 Major capsid protein	65	YP_009103299
39	尾部装配配子 Tail assembly chaperone	35	YP_009103311
40	卷尺测量蛋白 Tape measure protein	37	YP_009103313
42	噬菌体相关蛋白 Phage related-protein	39	WP_049246803
43	P2 gpD 类蛋白 P2 gpD-like protein	46	YP_009103316
44	P2 gpV 类蛋白 P2 gpV-like protein	53	YP_009103317
45	P2 gpW 类蛋白 P2 gpW-like protein	36	YP_009103318
46	P2 gpJ 类蛋白 P2 gpJ-like protein	44	YP_009103319
49	交叉连接内脱氧核糖核酸酶 Crossover junction endodeoxyribonuclease	36	WP_001563212
57	DNA 结合蛋白 DNA-binding protein	58	WP_046205846
58	转录调控因子 Transcriptional regulator	44	WP_049592808
65	DNA 螺旋酶 DNA helicase	39	WP_046360908
66	DNA 结合蛋白 DNA-binding protein	45	WP_060424859

说明: 上述有功能注释的 ORF 共 20 个。另有假想蛋白 30 个 (ORF 序号分别为 2、4、10、12、14 – 15、18、20、24、27、30 – 37、41、47 – 48、50 – 51、56、59 – 60、62、67 – 68、70), 以及未比对到结果的 ORF 24 个 (序号分别为 5、7 – 9、11、13、16 – 17、21 – 23、38、52 – 55、61、63 – 64、69、71 – 74) 未列出。

Notes: There are 20 ORFs with functional annotation. 30 hypothetical proteins (ORF serial numbers are 2, 4, 10, 12, 14 – 15, 18, 20, 24, 27, 30 – 37, 41, 47 – 48, 50 – 51, 56, 59 – 60, 62, 67 – 68, 70) and 24 ORFs with unknown functional annotation (serial numbers are 5, 7 – 9, 11, 13, 16 – 17, 21 – 23, 38, 52 – 55, 61, 63 – 64, 69, 71 – 74) not listed.

表 2 中的 ORF1（重组酶）、ORF3（单链 DNA 结合蛋白）、ORF49（连接内脱氧核糖核酸酶）、ORF57（DNA 结合蛋白）、ORF58（转录调控因子）、ORF65（DNA 螺旋酶）、ORF66（DNA 结合蛋白）与噬菌体 DNA 复制有关；ORF6（*N*-乙酰壁氨酰-L-丙氨酸酰胺酶）为裂解酶，属于噬菌体的裂解系统；ORF25（孔道蛋白）、ORF28（次要衣壳蛋白）、ORF29（主要衣壳蛋白）、ORF39（尾部装配子）等属于噬菌体结构蛋白。

2.7 噬菌体 φV039C 比较基因组学和系统发育树的构建

为探究噬菌体 φV039C 与其他噬菌体的进化关系，选择 *N*-乙酰壁氨酰-L-丙氨酸酰胺酶（ORF6）和大亚基终止酶（ORF19）两种蛋白进行系统进化树的构建。从基于 *N*-乙酰壁氨酰-L-丙氨酸酰胺酶构建的系统进化树可以看出，φV039C 与副溶血弧菌噬菌体 Seahorse、溶藻弧菌噬菌体 NF 有着较近的亲缘关系（见图 6），这与全基因组的 blast 结果相近。而从基于大亚基终止酶构建的系统进化树可以看出，噬菌体 φV039C 与灿烂弧菌噬菌体 1.144.0.10N.286.45.B3 在同一分支上（见图 7），后者在分类上也同样属于长尾噬菌体科。综上所述，噬菌体 φV039C 在分类上应归属有尾噬菌体目长尾噬菌体科。

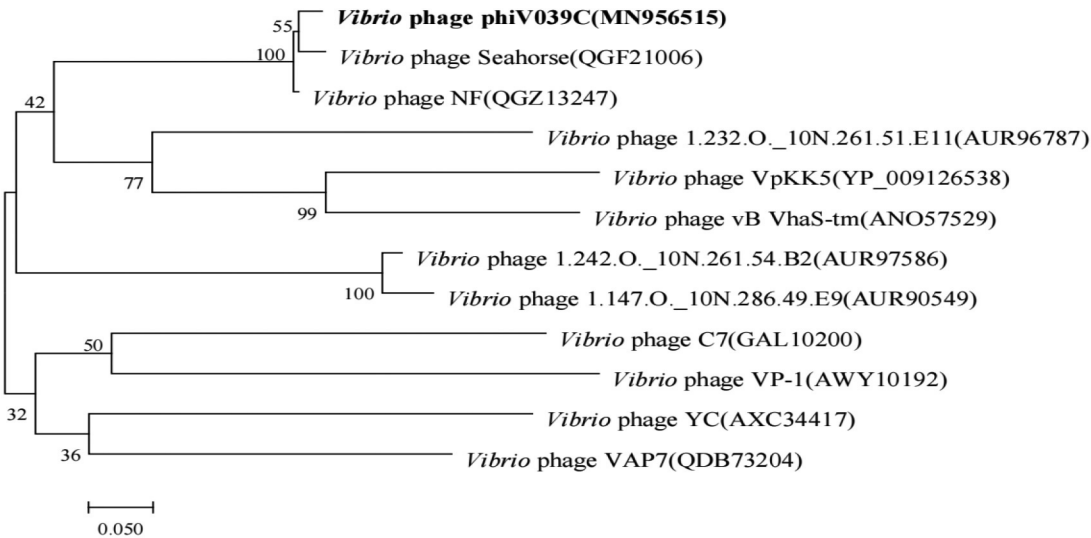


图 6 基于 *N*-乙酰壁氨酰-L-丙氨酸酰胺酶的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree based on *N*-acetylmuramoyl-L- alanine amidase

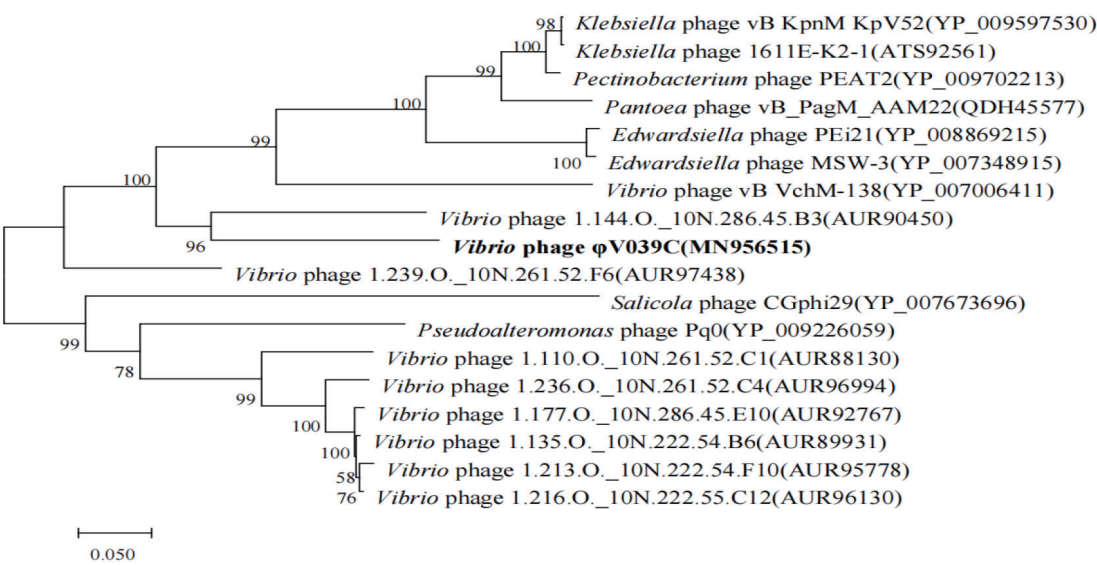


图 7 基于大亚基终止酶(TerI)的系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree based on large-subunit terminase

3 讨论

在抗生素广泛使用的今天,细菌耐药性已然成为21世纪人类健康最大的威胁之一。而噬菌体在替代抗生素进行细菌性疾病的治疗方面有很大的应用潜力。目前文献报道的噬菌体大部分属于有尾噬菌体目,其最大特点就是与宿主识别和核酸注射有关的尾部^[22]。而有尾噬菌体目包括短尾噬菌体科(Podoviridae)、肌尾噬菌体科(Myohoviridae)和长尾噬菌体科。Lin等^[23]和张建城^[24]的研究中所分离得到的溶藻弧菌噬菌体属于短尾噬菌体科;付汉清等^[25]和欧阳敏等^[26]分离得到的溶藻弧菌噬菌体属于肌尾噬菌体科;本研究分离得到的溶藻弧菌噬菌体 ϕ V039C 在分类上应属于长尾噬菌体科,其拥有长且灵活的尾部。溶藻弧菌的噬菌体尾部形态多样,对噬菌体的吸附与侵染具有重要作用,同时也是分类上非常重要的判断依据。

噬菌体 ϕ V039C 的基因组与数据库中已知的基因组相似区覆盖率较低,是一株完全新型的噬菌体。在 ϕ V039C 的基因组注释出的74个ORF中,有20个是已知功能的ORF(占比27%),其余为未知功能的假想蛋白。而据于浩^[27]、沈婵娟^[28]、江莉莎等^[29]、韦德源等^[30]的报道,其研究对象——根瘤菌、嗜水气单胞菌、分歧杆菌、大肠杆菌的噬菌体基因组中已知功能的ORF占比分别为18%、25%、34%、44%,这说明大部分噬菌体还存在许多未知功能的基因。

大多数烈性噬菌体的遗传物质中都有与编码复制相关的酶的区域^[31]。同样,噬菌体 ϕ V039C 已知功能ORF中也有多个与DNA复制调控、核酸代谢有关的ORF(ORF1、ORF49、ORF57、ORF58、ORF65等),这些蛋白帮助其遗传物质进入宿主细胞后利用宿主的酶系统进行自身遗传物质的复制和蛋白的表达。其中,ORF49(交叉连接内脱氧核糖核酸酶)能够水解宿主细胞内的脱氧核糖核酸,以便为噬菌体合成DNA提供脱氧核糖核苷酸^[32]。

噬菌体的基因组有多种类型,分别为ssDNA、dsDNA、ssRNA、dsRNA^[22]。本研究中噬菌体 ϕ V039C 基因组类型属于dsDNA,而dsDNA噬菌体组装的重要步骤就是将DNA紧紧包裹在衣壳中^[33]。这一过程需要大亚基终止酶、小亚基终止酶和通道蛋白组合成一个“DNA包装机”来协助完成^[34]。另外,通道蛋白还能够帮助噬菌体在自身衣壳中形成通道,使其能够更好地将自己的基因组注射到宿主细胞中^[35]。噬菌体 ϕ V039C 的ORF19和ORF25分别编码大亚基终止酶和通道蛋白,但是未发现编码小亚基终止酶的ORF。

噬菌体可用于分类的形态特征太少,同源基因也不多。裂解酶是噬菌体中比较常见的一类基因,在分类上具有重要的价值。裂解酶根据作用方式可以分为三种,分别是溶菌酶、酰胺酶和内肽酶^[36]。高明明等^[37]分离到的肺炎克雷伯菌噬菌体的裂解系统仅有一个相关基因ORF48(细胞内溶素),属于溶菌酶。溶菌酶是常见的裂解酶,其作用方式是作用于细菌细胞壁上的肽聚糖,增加其溶解性,使细胞由内部破裂,释放子代噬菌体^[38]。本研究中噬菌体 ϕ V039C 的裂解系统也仅有一个相关基因,即ORF6(*N*-乙酰壁氨酰-*L*-丙氨酸酰胺酶),属于酰胺酶,其作用方式是水解细胞壁中的*N*-乙酰壁氨酰和*L*-丙氨酸之间的酰胺键,从而使宿主细胞破裂,释放子代噬菌体。此外,噬菌体因其宿主特异性较高,在实际应用中有一定的限制,而裂解酶的宿主特异性较小,因此越来越多的学者开始专注于噬菌体裂解酶的研究及裂解酶的克隆表达。

噬菌体 ϕ V039C 的结构蛋白中,ORF28和ORF29分别编码次要衣壳蛋白和主要衣壳蛋白。衣壳蛋白作为噬菌体的外壳,能够紧紧地包裹住噬菌体的遗传物质。因其编码序列具有高度的保守性,所以也常用于噬菌体的分类^[39]。ORF39(尾部装配配子)和ORF40(卷尺测量蛋白)与尾部的装配以及部分功能有关,卷尺测量蛋白能够在噬菌体尾部伸缩时控制尾部的长度^[40]。

虽然噬菌体在自然界丰度极高(据估计超过 10^{31} 个),但是目前NCBI Genome数据库中仅有9000余条噬菌体完整基因组,且没有对应宿主的基因组信息,因此噬菌体在基因组及其功能注释的研究方面还存在很多未知领域。本文对分离得到的一株新型溶藻弧菌噬菌体 ϕ V039C 进行生物学特性和全基因组的研究,对探索噬菌体未知领域,以及进一步将噬菌体投入到实际应用提供了重要的理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] KALATZIS P G, BASTIAS R, KOKKARI C, et al. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Gm1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds [J]. PLOS ONE, 2016, 11(3): e151101.
- [2] 陈强, 鄢庆彬, 马甦. 溶藻弧菌致病性研究进展 [J]. 海洋科学, 2006, 30(8): 83-89.
- [3] RIPABELLI G, SAMMARCO M L, GRASSO G M, et al. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 49(1): 43-48.
- [4] 林业杰, 欧剑鸣, 董新平, 等. 溶藻弧菌的病原学研究 [J]. 海峡预防医学杂志, 2001(1): 45-46.
- [5] 胡梦华, 马立才, 赵姝, 等. 一株致病性溶藻弧菌的多重耐药与毒力基因分子分析 [J]. 海洋渔业, 2015(6): 557-564.
- [6] GU J, LIU X, LI Y, et al. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential [J]. PLOS ONE, 2012, 7(3): e31698.
- [7] HO K. Bacteriophage therapy for bacterial infections; rekindling a memory from the pre-antibiotics era [J]. Perspectives in Biology and Medicine, 2001, 44(1): 1-16.
- [8] SULAKVELIDZE A, MORRIS J G Jr, ALAVIDZE Z. Bacteriophage therapy [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(3): 649-659.
- [9] WRIGHT A, HAWKINS C H, ANGGARD E E, et al. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy [J]. Clinical Otolaryngology, 2009, 34(4): 349-357.
- [10] CAO F, WANG X, WANG L, et al. Evaluation of the efficacy of a bacteriophage in the treatment of pneumonia induced by multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* in mice [J]. BioMed Research International, 2015, 2015: 1-9.
- [11] STALIN N, SRINIVASAN P. Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India [J]. Veterinary Microbiology, 2017, 207: 83-96.
- [12] 胡蝶, 邱德全, 邱明生. 副溶血弧菌噬菌体微胶囊的制备及在饵料中的应用 [J]. 广东海洋大学学报, 2015, 35(3): 28-34.
- [13] 于鸽. 溶藻弧菌噬菌体、菌影疫苗及其对对虾免疫保护性的比较研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2011.
- [14] SASIKALA D, SRINIVASAN P. Characterization of potential lytic bacteriophage against *Vibrio alginolyticus* and its therapeutic implications on biofilm dispersal [J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 101: 24-35.
- [15] 林业杰, 陈亢川, 陈拱立, 等. 溶藻弧菌噬菌体的分离 [J]. 微生物学报, 1993, 33(4): 285-289.
- [16] GU J, XU W, LEI L, et al. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 49(1): 111-117.
- [17] 余静丹. 鲍曼不动杆菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [18] 张改, 黄德海, 靳静, 等. 肺炎克雷伯菌噬菌体 LH-02 的生物学特性及基因组初步研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(1): 9-12.
- [19] 张文惠, 安小平, 范航, 等. 一株粪肠球菌噬菌体的分离及其生物学特性研究 [J]. 生物技术通讯, 2013, 24(4): 484-487.
- [20] 王九儒, 赵飞扬, 李曼莉, 等. 一株肺炎克雷伯菌噬菌体的生物学特性及全基因组分析 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3402-3413.
- [21] 冯烨, 刘军, 孙洋, 等. 噬菌体最新分类与命名 [J]. 中国兽医学报, 2013, 33(12): 1954-1958.
- [22] CUERVO A, CARRASCOSA J L. Bacteriophages: structure [M]. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd, 2012.
- [23] LIN Y R, CHIU C, CHANG F, et al. Characterization of a new phage, termed ϕ A318, which is specific for *Vibrio alginolyticus* [J]. Archives of Virology, 2012, 157(5): 917-926.

- [24] 张建城. 溶藻弧菌噬菌体特性及其防控刺参感染的研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2017.
- [25] 付汉清, 林茂, 翟少伟, 等. 一株宽谱裂解性溶藻弧菌噬菌体 ϕ V170 的分离鉴定及生物学特性 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 819-828.
- [26] 欧阳敏, 高璐, 高亚军, 等. 溶藻弧菌烈性噬菌体分离鉴定及其抑菌作用研究 [J]. 扬州大学学报 (农业与生命科学版), 2019, 40(4): 74-79.
- [27] 于浩. 豆科根瘤菌噬菌体分离鉴定及部分基因组学研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2016.
- [28] 沈婵娟. 嗜水气单胞菌噬菌体的生物学特性及基因组学研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [29] 江莉莎, 刘平, 邬亭亭, 等. 噬菌体 Chy5 的生物学和基因组学特征 [J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(6): 462-468.
- [30] 韦德源, 陆泽宁, 张聪, 等. 产志贺毒素多重耐药大肠杆菌噬菌体的生物学特性及全基因组分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(2): 352-362.
- [31] LI P, CHEN B, SONG Z, et al. Bioinformatic analysis of the *Acinetobacter baumannii* phage AB1 genome [J]. Gene, 2012, 507(2): 125-134.
- [32] KROPINSKI A M, WADDELL T, MENG J, et al. The host-range, genomics and proteomics of *Escherichia coli* O157: H7 bacteriophage rV5 [J]. Virology Journal, 2013, 10(1): 76.
- [33] BLACK L W. DNA packaging in dsDNA bacteriophages. [J]. Annual Review of Microbiology, 1989, 43: 267-292.
- [34] ROY A, BHARDWA J A, DATTA P, et al. Small terminase couples viral DNA binding to genome-packaging ATPase activity [J]. Structure, 2012, 20(8): 1403-1413.
- [35] PREVELIGE P E, CORTINES J R. Phage assembly and the special role of the portal protein [J]. Current Opinion in Virology, 2018, 31: 66-73.
- [36] 张瑞安, 刘军, 冯书章. 噬菌体裂解酶的研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(5): 657-660.
- [37] 高明明, 王灿, 李璞媛, 等. 一株新型裂解 K63 荚膜型肺炎克雷伯菌的噬菌体分离鉴定和生物学特性研究及全基因组分析 [J]. 微生物学通报, 2020, 47(1): 210-221.
- [38] MASSCHALCK B, MICHIELS C W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2003, 29(3): 191-214.
- [39] BAMFORD D H, GRIMES J M, STUART D I. What does structure tell us about virus evolution? [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2005, 15(6): 655-663.
- [40] XU J, HENDRIX R W, DUDA R L. Conserved translational frameshift in dsDNA bacteriophage tail assembly genes [J]. Molecular Cell, 2004, 16(1): 11-21.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)