论著

文章编号:1000-5404(2005)09-0860-04

铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 生物学特性的研究

李 明,申晓冬,周莹冰,黄建军,胡晓梅,饶贤才,胡福泉 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 确定铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 的形态大小、核酸类型、裂菌特性、最佳感染复数和一步生长曲线等基本生物学特性。**方法** 对 CsCl 梯度离心纯化后的噬菌体 PaP1 颗粒进行电镜观察;提取 PaP1 基因组核酸,通过限制性内切酶图谱分析其核酸类型;制备 PaP1 的单个噬斑,观察噬斑特点;按照感染复数(MOI)分别为0.000 1、0.001、0.01、0.1、1 和 10 加入噬菌体纯培养液和宿主菌,37 ℃ 160 r/min 培养 3.5 h 后测定噬菌体滴度;加入噬菌体及宿主菌使 MOI = 10,37 ℃温育 15 min 后进行一步生长实验,于 0 时刻和每隔 10 min 取样 50 μl 测定上清中噬菌体滴度。**结果** PaP1 噬菌体头部呈多面体立体对称,直径约 70 nm,无囊膜,有一个约 60 nm 长的尾;PaP1 噬斑直径约 2 mm,圆形透明;当 MOI 为 0.01 时 PaP1 感染其宿主菌产生的子代噬菌体滴度最高;根据一步生长实验结果绘制出了一步生长曲线。**结论** PaP1 属于肌尾科裂菌性噬菌体,其基因组为双链 DNA 分子;最佳感染复数为 0.01,感染宿主菌的潜伏期是 20 min,爆发期是 40 min,平均爆发量约为 65。

关键词: 铜绿假单胞菌噬菌体;裂菌性,最佳感染复数;一步生长曲线

中图法分类号: Q939.112; R939.48 **文献标识码:** A

Study on biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP1

LI Ming, SHEN Xiao-dong, ZHOU Ying-bing, HUANG Jian-jun, HU Xiao-mei, RAO Xian-cai, HU Fu-quan (Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To identify some basic biological properties, morphology and size, type of nucleic acid, lytic capacity, optimal multiplicity of infection (MOI), and one-step growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP1. **Methods** Phage particles of PaP1 were purified with CsCl gradient centrifugation and the ultrastructure of PaP1 was examined by electron microscopy. The genome of PaP1 was extracted and the type of nucleic acid was identified with restriction enzyme analysis. Phage PaP1 was purified by single-plaque isolation using double-layer agar plate method. The host bacteria were infected with PaP1 at six different MOI (0.000 1, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10), then incubated for 3.5 h at 37 ℃, and the phage titer of supernatant was determined. For one-step growth experiments, following centrifugation at 13 000 *g* for 30 s after 15 min adsorption, the pellet containing (partially) infected cells was resuspended in 5 ml of pre-warmed LB broth and incubated with 160 r/min at 37 ℃. Samples (50 μl) were taken at 10 min-intervals (up to 2 h) and immediately tittered by the double-layer agar plate method. Assays were carried out in triplicate. **Results** PaP1 has an isometric head(about 70 nm in diameter)and a long tail (about 60 nm in length). The plaques of PaP1 are transparent and their sizes are about 2 mm in diameter. Ten MOI-infected host bacteria gave the highest phage offsprings. One-step growth curve was determined according to the results of one-step growth experiments. **Conclusion** PaP1 is a virulent phage of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1 and belonges to Myoviridea families. The genome of PaP1 is a dsDNA molecule. The optimal MOI of PaP1 is determined to be 0.01. One-step growth curve for PaP1 shows that the latent period is about 20 min, the rise period is 40 min, and the average burst size is about 65 pfu/cell.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* phage; virulent; optimal multiplicity of infection; one-step growth experiment

生物多样性是近年来生命科学领域的研究热点之一。自 17 世纪列文虎克发明显微镜以来,各种各样的微生物不断地被人们所发现和认识。然而,自然界中还有 95% ~ 99% 的微生物种群尚未被分离、培养和描述。微生物在生物种群、生理代谢、遗传背景、基因表现等方面所表现出来的多样性尤其引人注目。噬菌体

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270065,30300013)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270065, 30300013)

作者简介:李 明(1979-),男,江西省武宁县人,硕士研究生,助教,主要从事噬菌体基因组学方面的研究。电话:(023)68752239
通讯作者:胡福泉,电话:(023)68752240,E-mail:hufuquan@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-11-15;修回日期:2005-04-07

作为细菌的病毒,在自然界中广泛存在。有人估计,自然界中细菌的数量大约为 10^{30},假设每个细菌有 10 种对应的噬菌体,那么噬菌体的数量将达到 10^{31} 之巨[1]。因此,分离培养和描述新的微生物仍然是微生物学工作者所面临的任重而道远的艰巨任务,也是一项具有重要科学意义的工作。本室前期的工作以绿脓杆菌为宿主菌分离鉴定了 3 株噬菌体,分别命名为 PaP1、PaP2 及 PaP3。本研究拟深入描述 PaP1 的颗粒形态、核酸类型、噬斑特性、最佳感染复数和一步生长曲线等基本生物学特性,为今后对该噬菌体的深入研究奠定基础,并丰富对噬菌体多样性的认识。

1　材料与方法

1.1　噬菌体及其宿主菌

铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 为本室分离鉴定株[2],其宿主菌—铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA) PA1 是由新桥医院检验科提供的临床分离株,用成都生物制品研究所提供的分群血清鉴定为第 11 群。

1.2　噬菌体的培养与噬斑观察

采用双层琼脂平板培养法。将噬菌体原液按一定比例稀释,吸取 10 μl 稀释液加入到 0.2 ml 对数生长期的宿主菌中,混匀,室温放置 15 min。加入 55 ℃融化的半固体 LB 培养基 3 ml,混匀,倾倒于固体 LB 平板上,37 ℃过夜培养。次日即可长出单个噬斑。

1.3　噬菌体 PaP1 的电镜观察

参照文献[3]中 λ 噬菌体颗粒提取方法提取 PaP1 颗粒,并用 CsCl 梯度离心纯化。取纯化的 PaP1 颗粒 20 μl 滴于铜网上,待其自然沉淀 15 min,用滤纸从侧面吸收多余液体,加 1 滴 2% 磷钨酸于铜网上,染色 10 min,用滤纸从侧面吸去染液,干燥后电镜观察。

1.4　噬菌体 PaP1 核酸的提取及鉴定

取 PaP1 纯化颗粒,用蛋白酶 K 消化噬菌体衣壳,释放出核酸,酚氯仿抽提,溶解定量后用限制性核酸内切酶 *Sca* Ⅰ酶切 PaP1 基因组核酸,根据酶切图谱鉴定其核酸类型。

1.5　最佳感染复数的测定

感染复数(multiplicity of infection, MOI)是指初始感染时加入噬菌体的数量与宿主菌数量的比值,也称感染倍数。参照 Lu 等[4]的方法,略有改动。培养宿主菌 PA1 至对数前期,用 SmartSpec™3 000 分光光度计(BIO-RAD)测定此时的 $D(600)$ 值≈0.2,相当于 1×10^8 CFU/ml。按照感染复数分别为0.000 1、0.001、0.01、0.1、1 和 10 的比例,加入噬菌体纯培养液和宿主菌,加入 LB 培养基使各管总体积相同。在 37 ℃摇床中 160 r/min 培养 3.5 h,再10 000 × *g* 离心 10 min,收集上清测定噬菌体滴度。各点均作双份复管培养取平均值,同时以不加噬菌体的宿主菌和不加宿主菌的噬菌体为对照,以产生最高噬菌体滴度的 MOI 为最佳感染复数。

1.6　一步生长曲线的绘制

参照 Lu 等[4]和 Weiss 等[5]的方法,略有改动。加入噬菌体及宿主菌使 MOI = 10,37 ℃温育 15 min 后13 000 × *g* 离心 30 s,弃上清,LB 液洗涤 2 次,用 5 ml 预热的 LB 液混悬沉淀并充分混匀,迅速置于 37 ℃大振幅摇床中培养(160 r/min),开始计时,于 0 时刻和每隔 10 min 取样 50 μl,13 000 × *g* 离心 30 s,吸取上清测定噬菌体滴度,各时间点均作双份复管取平均值,同时以不加噬菌体的宿主菌和不加宿主菌的噬菌体为对照,实验重复 3 次。最后以感染时间为横坐标,感染体系中噬菌体的滴度为纵坐标,绘制一步生长曲线,得出 PaP1 的潜伏期、爆发期和爆发量。

2　结果

2.1　噬菌体 PaP1 的电镜观察

将 CsCl 梯度离心、透析后得到的纯化 PaP1 颗粒透射电镜观察其形态,结果见图 1 所示。由电镜照片可见,噬菌体 PaP1 有 1 个多面体立体对称的头部,直径约 70 nm,无囊膜,有一个长约 60 nm 的尾。

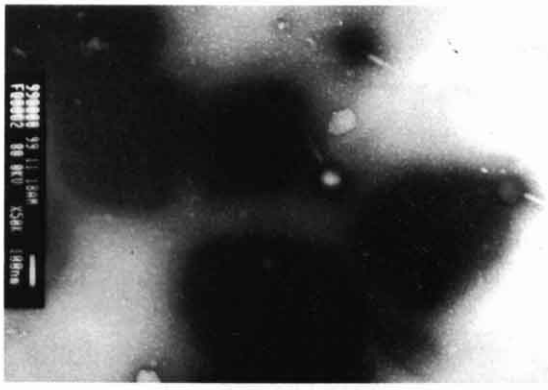


图 1　噬菌体 PaP1 的电镜照片　(TEM × 50 000)

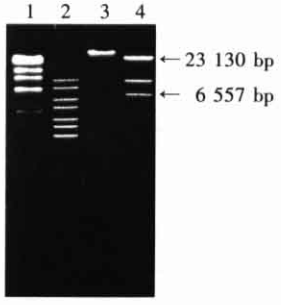
Fig 1　The phage PaP1　(TEM × 50 000)

2.2　噬菌体 PaP1 的噬斑特性

以铜绿假单胞菌 PA1 为宿主菌,采用双层琼脂培养法制备出噬菌体 PaP1 单个噬斑。可见噬菌体 PaP1 形成的噬斑明显,直径约 2 mm,圆形透明,呈现出典型的裂菌性噬菌体的噬斑特征。

2.3　噬菌体 PaP1 核酸类型的鉴定

PaP1 基因组核酸被限制性内切酶 *Sca* Ⅰ酶切后,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后的结果如图 2 所示。从泳道 1 可见,PaP1 基因组核酸能够被 *Sca* Ⅰ切开,而 *Sca* Ⅰ为双链 DNA 内切酶,表明该基因组为双链 DNA。酶切图谱分析表明 PaP1 基因组约有 65 kb 左右。



1: PaP1/*Sca* Ⅰ; 2: 1 kb DNA marker; 3: PaP1 genome; 4: λDNA/*Hind* Ⅲ

图 2　PaP1 基因组/*Sca* Ⅰ酶切电泳图

Fig 2　Electrophoresis of PaP1 genome with *Sca* Ⅰ digestion

2.4 噬菌体 PaP1 最佳感染复数的测定

加入噬菌体和宿主菌培养 3.5 h 后，宿主菌被充分裂解，培养液变得澄清，计数各测定管中的噬菌体滴度，结果见表 1。

表 1 噬菌体 PaP1 最佳感染复数的测定

Tab 1 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI)

Tube	Number of bacteria	Number of bacteriophages	MOI	Titer at 3.5 h(PFU/ml)
1	1×10^8	1×10^9	10	2.5×10^8
2	1×10^8	1×10^8	1	5.0×10^9
3	1×10^8	1×10^7	0.1	1.6×10^{10}
4	1×10^8	1×10^6	0.01	4.4×10^{10}
5	1×10^8	1×10^5	0.001	3.2×10^{10}
6	1×10^8	1×10^4	0.000 1	2.3×10^9

根据表 1 的实验结果，当 MOI = 0.01 时，噬菌体 PaP1 感染其宿主菌铜绿假单胞菌 PA1 产生的子代噬菌体滴度为 4.4×10^{10} PFU/ml，在 6 个感染复数中，该产出率是最高的。因此，确定噬菌体 PaP1 感染其宿主菌铜绿假单胞菌 PA1 的最佳感染复数为 0.01。

2.5 噬菌体 PaP1 一步生长曲线的绘制

在总量为 2×10^8 CFU 的宿主菌中加入 MIO = 10 的噬菌体，37 ℃温育 15 min 后离心、洗涤。由于是高复数感染，因此可以认为每个细菌都已经被噬菌体感染了，即被感染的细菌初始数量就是 2×10^8 CFU，用 5 ml LB 液混悬沉淀，则培养液中细菌的初始浓度为 4×10^7 CFU/ml。

在噬菌体 PaP1 吸附宿主菌之后进行培养的不同时间里，分别取样 50 μl，以离心后测得上清液中噬菌体的滴度的对数值为纵坐标，感染时间为横坐标，绘制一步生长曲线，如图 3。根据该曲线，可以清晰地看出 PaP1 感染宿主菌 PA1 的潜伏时间约为 20 min，爆发时间约为 40 min。根据裂解量计算公式：裂解量 = 爆发末期噬菌体滴度 ÷ 感染初期宿主菌浓度，计算如下：$2.6\times10^9 \div (4\times10^7) = 65$，即 PaP1 感染宿主菌 PA1 的裂解量为 65。

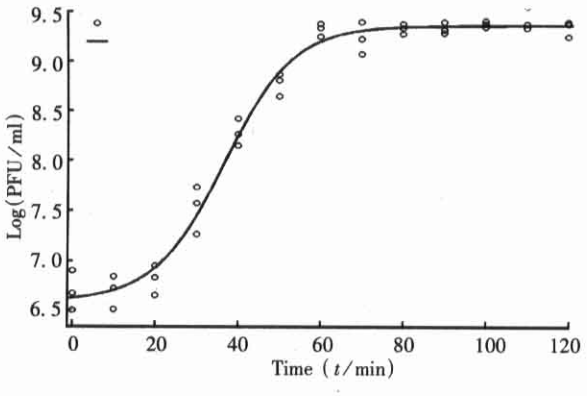


图 3 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 的一步生长曲线

Fig 3 One-step growth curve for phage PaP1

3 讨论

噬菌体是一种比前核生物细菌更小、结构更简单、进化阶梯上更为原始的非细胞形态的生命现象。它作为细菌的病毒，广泛存在于自然环境之中，与宿主菌有着密切的关系。一方面，噬菌体是细菌之间基因水平转移的重要载体，是研究生命的起源、进化、遗传变异、复制代谢和生命多样性等生命基本现象的重要材料。另一方面，它是除质粒之外的一股重要基因流，在细菌基因组的进化、细菌的致病性和耐药性中具有非常关键的作用[6,7]。由于噬菌体易于培养，且基因组小，易于基因操作，故人们常常以噬菌体作为研究对象来阐明一些生命现象的基本问题。因此，噬菌体多年一直是生命科学中的研究热点。而研究一个新发现的噬菌体株的生物学特性，是认识该生命体的基本前提。

噬菌体基因组进入宿主细胞后，除了宿主菌的生理状态和环境条件外，主要取决于噬菌体的性质。如果是毒性噬菌体(即裂菌性噬菌体)，则发生增殖性或裂解性感染，噬菌体增殖，最终导致宿主菌的裂解，因此在固体培养基上可见清晰透亮的噬斑。而温和噬菌体(即溶源性噬菌体)则可将其基因组整合到宿主菌染色体中，一些整合形式的噬菌体 DNA 可自发地在某些理化因素的影响下脱离细菌基因组而进入裂菌周期，在固体培养基上形成浑浊的噬斑。以铜绿假单胞菌 PA1 为宿主菌，噬菌体 PaP1 形成的噬斑圆形透明，表现出典型的裂菌性噬菌体的噬斑特性。

与大多数有尾噬菌体一样，噬菌体 PaP1 的基因组为双链 DNA 分子。以 λDNA/*Hind* Ⅲ和 1 kb DNA Marker 为标准，推算 PaP1 基因组 DNA 大小约为 65 kb 左右。当然，该基因组的实际大小只有在完成测序之后才能最终确定，而基因组大小的估计是预计测序工作量的重要依据。

感染复数是为研究病毒感染与产出之间量效关系而提出的一个重要生物学指标。以不同感染复数的噬菌体感染一定量的宿主菌，所得子代噬菌体的产率有很大差异，即存在一个最佳用量和最大产出的问题，即最佳感染复数。不同噬菌体的最佳感染复数不同，测定一个特定噬菌体的最佳感染复数对噬菌体颗粒的分离纯化、结构蛋白的制备、基因组的提取以及噬菌体呈现技术等研究都有重要的指导意义。本实验测得噬菌体 PaP1 对其宿主菌 PA1 的最佳感染复数为 0.01，而本室前期研究测得另一株绿脓杆菌溶源性噬菌体 PaP2 感染其宿主菌 PA2 的最佳感染复数为 10，二者相差甚远，充分显示了裂菌性噬菌体的毒性要远远强于溶源性噬菌体。

噬菌体为非细胞型微生物，其增殖形式与细胞型生物二分裂繁殖的“指数生长”模式不同，从吸附宿主菌到子代噬菌体的释放是一个爆发的过程，表现为“一

步生长"的特点。一步生长实验于1939年Ellis和Delbruck创立,据此可以测知噬菌体在细菌内增殖的潜伏期和每一个细菌产生噬菌体的平均裂解量。前提是要确保每一个宿主菌都被感染,所以我们在进行一步生长实验的时候,都是按照10倍的感染复数去感染宿主菌的。由于是高复数感染,因此可以认为每个细菌都已经被噬菌体感染了。而未吸附到宿主菌上的噬菌体则不能被离心沉淀下来,在洗涤的过程中被弃去,因而不会影响到后续各时间点的噬菌体滴度的测定。噬菌体感染宿主菌的潜伏期和爆发期的长短以及爆发量的大小与噬菌体、宿主菌及环境条件都有关,因此,各种噬菌体都有其独特的一步生长曲线。如铜绿假单胞菌噬菌体ΦKMV的潜伏时间为12~13 min,爆发时间是3~8 min,裂解量是25~30[8];而野油菜黄单胞菌噬菌体XTP1的潜伏时间则为2 h,爆发时间是2 h,裂解量是35[5];对于乳酸菌噬菌体ΦJL-1来说,3个值分别是:35,40 min和22[4]。本研究根据PaP1的一步生长曲线,测得PaP1感染宿主菌PA1的潜伏期是20 min,爆发期是40 min,平均每个被感染的宿主菌产生65个子代噬菌体,比上述3种噬菌体的爆发量都要大。而对于那些临床上噬菌体治疗的前景而言,潜伏时间短、裂解量大的噬菌体是特别被看好的。

参考文献:

[1] Hendrix R W. Bacteriophage genomics[J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6(5): 506-511.
[2] 张克斌, 陈志瑾, 金晓琳, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体的分离鉴定及耐噬菌体突变频率测定[J]. 微生物学通报, 2002, 29(1): 40-45.
[3] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1996. 136-137.
[4] Lu Z, Breidt F Jr, Fleming H P, *et al*. Isolation and characterization of a Lactobacillus plantarum bacteriophage, ΦJL-1, from a cucumber fermentation[J]. Int J Food Microbiol, 2003, 84(2): 225-235.
[5] Weiss B D, Capage M A, Kessel M, *et al*. Isolation and characterization of a generalized transducing phage for Xanthomonas campestris pv. campestris[J]. J Bacteriol, 1994, 176(11): 3354-3359.
[6] Canchaya C, Fournous G, Chibani Chennoufi S, *et al*. Phage as agents of lateral gene transfer[J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6(4): 417-424.
[7] Stover C K, Pham X O, Erwin A, *et al*. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen[J]. Nature, 2000, 406(6799): 959-964.
[8] Lavigne R, Burkal'tseva M V, Robben J, *et al*. The genome of bacteriophage φKMV, a T7-like virus infecting *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Virology, 2003, 312(1): 49-59.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2004)09-0863-01

个案与短篇

鼻咽部胚胎性横纹肌肉瘤伴颈部淋巴结转移1例

A case report of embryonal rhabdosarcoma in the nasopharynx with cervical lymph node metastasis

朱 江,阎晓初,柳凤轩 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

1 临床资料

患者,女,38岁。患者于4周前无意中发现右侧颈部多个无痛性包块,质中,可活动。遂以"右侧颈部无痛性包块"收入院。入院后行右颈部包块病理活检术。病理诊断:考虑(右颈部)淋巴结转移性小细胞性癌。进一步行鼻咽部CT、MRI显示:鼻咽鼻腔部不规则结节状改变,考虑恶性肿瘤伴颈部淋巴结转移。行鼻咽镜检查见鼻咽部呈息肉样改变,表面附着干脓痂,遂取活检送病理检查。

巨检:灰白色米粒大组织一粒;镜检见组织表面被覆有完整的纤毛上皮,上皮下见肿瘤组织,瘤细胞小圆形,胞质较少,核偏位,圆形或卵圆形,部分细胞核仁明显,核分裂像多见,瘤细胞呈片状排列,其间可见大的呈分枝状排列的血管。免疫组化染色:对鼻咽部原发灶及淋巴结转移灶同时标记:CK、EMA均阴性,Vimentin阳性,LCA阴性,Syn、CgA阴性,HMB45阴性,NSE阴性,Actin阳性,Desmin阳性,Myoglobin阳性。

病理诊断:鼻咽部胚胎性横纹肌肉瘤伴右颈部淋巴结转移。

2 讨论

胚胎性横纹肌肉瘤(embryonal rhabdosarcoma, ERMS)是一种相对少见的恶性肿瘤。好发于10岁以下儿童,而40岁以上成人少见。头颈部横纹肌肉瘤研究显示多数病例肿瘤位于鼻腔,而鼻咽部相对少见[1],故本病例从发病部位看较为特殊,易被忽视而误诊为癌。

鼻咽部ERMS大多表现为葡萄状肉瘤,镜下为大量星芒状细胞及小圆形细胞呈弥散或小巢状分布于疏松粘液基质中。少

(下转867页)

作者简介:朱 江(1979-),男,四川省冕宁县人,医师,主要从事临床肿瘤病理方面的研究。电话:(023)68752246

收稿日期:2004-04-20;修回日期:2005-03-10