DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.003
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1133-04

论著

铜绿假单胞菌噬菌体 PaP2 生物学特性的研究

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

提 要:目的 确定铜绿假单胞菌噬菌体 PaP2 的形态与大小、裂菌特性、最佳感染复数、一步生长特性等基本的生物学特性。方法 电镜观察纯化噬菌体颗粒;制备 PaP2 噬斑,观察其特点;提取噬菌体感染的细菌基因组,用 *Sma* Ⅰ 酶切,通过脉冲场电泳观察酶切产物的带型特点;测定不同感染复数,培养 3.5 h 后细菌/噬菌体液中的噬菌体滴度;加入宿主菌及噬菌体使 MOI= 10,进行一步生长实验,在 0 时刻和每隔 15 min 测定噬菌体滴度。结果 噬菌体 PaP2 头部直径约为 52 nm,无囊膜,有一短尾;噬斑雾状半透明,直径约 1~2 mm;被噬菌体感染的宿主菌基因组的 *Sma* Ⅰ 酶切产物带型,比未感染宿主菌的多出了 1 条大于噬菌体基因组的片段;当 MOI= 10 时宿主菌产生的子代噬菌体滴度最高;绘制出了一步生长曲线。结论 PaP2 属短尾噬菌体科,是溶原性噬菌体;最佳感染复数是 10;感染宿主菌的潜伏期是 75 min,裂解期是 90 min,平均裂解量是 34。

关键词:铜绿假单胞菌噬菌体;短尾噬菌体;溶原性;最佳感染复数;一步生长实验
中图法分类号:Q935;Q939.48 文献标识码:A

Biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP2

HUANG Jian-jun, HU Xiao-mei, RAO Xian-cai, ZHANG Ke-bin, JIN Xiao-lin, ZHOU Ying-bing, LI Ming, SHEN Xiao-dong, ZHU Jun-min, 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, lytic or lysogenic capacity, optimal multiplicity of infection (MOI) and one-step growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP2. **Methods** The ultrastructure of purified PaP2 particles was observed by electron microscopy. A single plaque was picked and added to 1 ml LB (Luria-Bertani) broth and inoculated on LB agar plate. Then a single lawn was picked into 3 ml LB broth. After overnight incubation at 37 ℃, the bacterial genome was extracted and purified. And then, the genome DNA was digested by restriction enzyme *Sma* Ⅰ and the digested products were separated by pulsed field electrophoresis. The host bacteria were infected with PaP2 at six different MOI. 3.5 h later, the phage titers were determined, respectively. For one-step growth experiments, phages and its host with an MOI of 10 were used with a 15 min adsorption. Following centrifugation, the pellet was washed twice and resuspended with LB broth and incubated. Samples (30 μl) were taken at 15-min-terval (up to 210 min) and immediately tittered by the double-layer agar plate method. **Results** PaP2, without capsule membrane, had an isometric head about 52 nm in diameter and a 16 × 5 nm short tail. The plaque of PaP2 was translucent and its size was about 1—2 mm in diameter. The genome of the infected host bacteria had the phage genomic DNA fragment. Hosts infected with an MOI of 10 had the highest phage production. One-step growth curve was drawn according to the results of one-step growth experiments. **Conclusion** PaP2 belongs to the *Podoviridae* family and is a lysogenic phage. The optimal MOI of PaP2 is about 10. One-step growth kinetics of the phage shows that the latent period and the burst period were about 75 and 90 min, respectively, and the average burst size is about 34 phage particles per infected cell.

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

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300013),重庆市攻关项目(2000-6458)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300013) and the Research Project of Sci & Tech of Chongqing (2000-6458)
作者简介:黄建军(1969—),男,四川省岳池县人,博士研究生,助理研究员,主要从事噬菌体基因组学方面的研究。电话:(023)68752290
通信作者:胡福泉,电话:(023)68752240,E-mail:hufuquan@yahoo.com.cn
收稿日期:2004-03-30;修回日期:2004-05-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

噬菌体是细菌的病毒,广泛存在于自然环境之中,数量庞大。噬菌体是细菌之间基因水平转移的重要载体,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。作为感染细菌的病毒,噬菌体可在耐药性和多药耐药性细菌性疾病的治疗中发挥作用。近年的研究表明,多价噬菌体和经人工改造形成的"广宿主谱"噬菌体在细菌感染性疾病的治疗上有着巨大的前景,对噬菌体展开广泛和深入的研究具有重要的基础意义和潜在的临床价值。因此国际上对噬菌体的研究再度成为微生物学研究的热点之一。铜绿假单胞菌在医学上常称为绿脓杆菌,是人类重要的条件致病菌,对许多抗生素具有耐药性,是创伤、烧伤及免疫受损机体最容易感染的细菌之一,严重危害人类的健康与生命。噬菌体PaP2是我室以铜绿假单胞菌为宿主菌分离的一株噬菌体,本研究是对PaP2的颗粒形态、噬斑特性、溶原性、最佳感染复数以及一步生长曲线等生物学特性的研究报告,为深入研究PaP2奠定基础。

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PaP2为我室自行分离鉴定株[1],其宿主菌--铜绿假单胞菌(pseudomonas aeruginosa, PA) PA2是由新桥医院检验科鉴定后提供的临床分离株,用成都生物制品研究所提供的分群血清鉴定为第20群。

1.2 噬菌体单个噬斑的制备

将PaP2保存液加入对数期生长的宿主菌液中,于37 ℃ 160 r/min培养8 h,10 000× *g* 离心10 min,将上清作倍比稀释,采用双层琼脂培养法制备单个噬斑,37 ℃过夜培养。次日即可长出单个噬斑。

1.3 噬菌体PaP2的电镜观察

参照文献[2]中λ噬菌体颗粒提取方法提取PaP2颗粒,并用CsCl梯度离心纯化。取纯化的PaP2颗粒悬液20 μl滴于铜网上,待其自然沉淀15 min,用滤纸从侧面吸去多余液体,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,干燥后用透射电镜(PHILIPS TECNAI 10)观察。

1.4 噬菌体PaP2溶原性的确定

确定噬菌体是否具有溶原性的基本原理是用噬菌体感染宿主菌,证实感染后细菌中存在着前噬菌体。本研究采用的方法是从单个噬斑中得到可能的"溶原菌"单个菌落;同时制备未感染宿主菌的单个菌落。增菌培养,按照文献[3]中细菌基因组DNA的小量制备方法提取宿主菌及"溶原菌"的基因组DNA。用限制性内切酶 *Sma* Ⅰ (TaKaRa)酶切细菌基因组DNA,将酶切产物进行Switch-Back脉冲场电泳,比较酶切产物带型的差异。

1.5 最佳感染复数的测定

感染复数(multiplicity of infection, MOI)是指噬菌体初始感染宿主菌时噬菌体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,通过倍比稀释和双层琼脂培养法测得噬菌体纯培养液的滴度;用SmartSpec™ 3000 (BIO-RAD)测定对数早期生长的宿主菌液 A_{600} 值(用平板菌落计数法测定细菌浓度,建立 A_{600} 值与细菌浓度的标准曲线),根据标准曲线计算细菌浓度。按照MOI分别为0.01、0.1、1、10、100、1 000的比例分别加入噬菌体纯培养液和宿主菌,加入LB液使培养体系的总体积相同。在37 ℃摇床中160 r/min大振幅培养3.5 h。于10 000× *g* 离心10 min,测定上清中噬菌体滴度,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。其中在培养3.5 h后产生最高滴度的MOI即为最佳感染复数。

1.6 噬菌体PaP2一步生长曲线的绘制

一步生长曲线是反映病毒生长繁殖规律的曲线,本研究参照文献[4,5]的方法。加入噬菌体及对数期生长的宿主菌使MOI=10,37 ℃温育15 min,13 000× *g* 离心30 s,弃上清,用LB液洗涤2次。用预热的LB液混悬沉淀,迅速置于37 ℃摇床中160 r/min振荡培养,同时开始计时,在0时刻和每隔15 min取出30 μl,10 000× *g* 离心2 min,测定上清中噬菌体滴度,结果为双份复管取均值。以培养时间为横坐标,培养体系中噬菌体滴度为纵坐标绘制一步生长曲线。从该曲线可以获得噬菌体繁殖的3个特征性数据:潜伏期(latent period)、裂解期(burst period)和裂解量(burst size)。潜伏期是指噬菌体吸附于宿主菌之后到子代噬菌体被释放到细菌体外环境所需的最短时间,其值等于从噬菌体吸附细菌之后开始,到培养体系中噬菌体滴度第一次大量急速上升之间的时间。培养体系中噬菌体滴度急速上升所维持的时间,即是噬菌体的裂解期,也称上升期(rise period)。裂解量也称暴发量,是指每个受染细胞所产生的子代噬菌体的平均数目,其值等于培养体系中噬菌体滴度急速上升末期的噬菌体滴度与被感染细菌的初始浓度之比。

2 结果

2.1 噬菌体PaP2的噬斑特性

以铜绿假单胞菌PA2为宿主菌,采用双层琼脂培养法制备的噬菌体PaP2单个噬斑(37 ℃温育10 h)如图1所示。可见噬菌体PaP2形成的噬斑很小,直径约1~2 mm,雾状半透明,表现为溶原性噬菌体的噬斑特征。

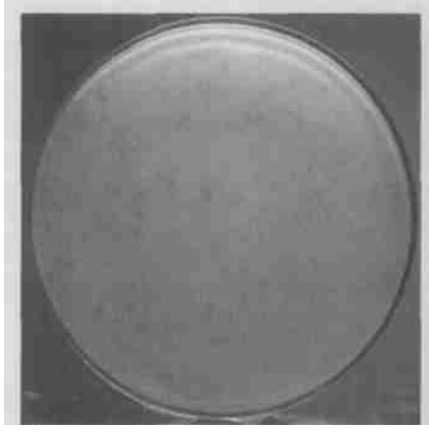


图1 PaP2感染PA2形成的噬斑

Fig 1 Plaques formed by host bacteria PA2 after infection of phage PaP2

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　噬菌体 PaP2 的电镜观察

电镜下可见噬菌体 PaP2 有一个多面体立体对称的头部, 头部直径约为 52 nm; 无囊膜; 有一短尾, 尾长约 16 nm, 尾宽约 5 nm(图 2)。

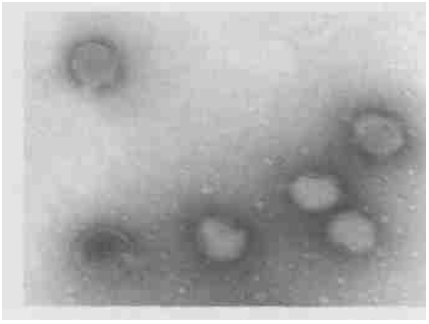
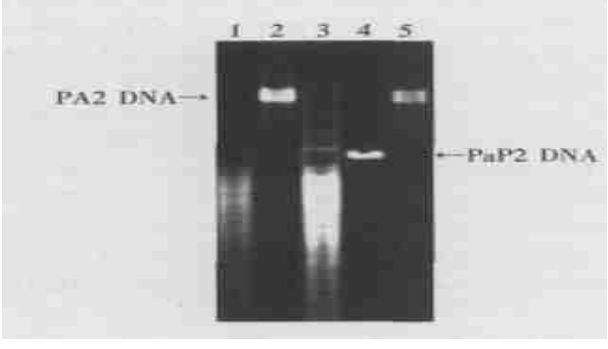


图 2　噬菌体 **PaP2** 的电镜照片　(TEM× 40 000)

Fig 2　Electron micrographs of phage PaP2　(TEM× 40 000)

2.3　噬菌体 PaP2 溶原性的确定

细菌基因组 DNA 和可能的"溶原性细菌"基因组 DNA 被 *Sma* Ⅰ 酶切后, 酶切产物经过脉冲场琼脂糖凝胶电泳得到如图 3 所示的电泳图谱。从泳道 1 可以看出, *Sma* Ⅰ 能够切开宿主菌基因组 DNA, 而且所有酶切产物都是明显小于噬菌体基因组 DNA 的片段, 通过电泳可以将这些酶切产物与噬菌体基因组 DNA(泳道 4)分开。全基因测组序表明, *Sma* Ⅰ 在噬菌体 PaP2 基因组 DNA 上没有切点而不能切开 PaP2 基因组, 那么 *Sma* Ⅰ 也不能切开整合在宿主菌基因组中的前噬菌体。因此可以推断, 如果含有 PaP2 前噬菌体的宿主菌基因组被 *Sma* Ⅰ 酶切时, 前噬菌体 DNA 将保持完整, 而且在前噬菌体 DNA 片段的两端还将分别带上一段或短或长的宿主菌的 DNA 序列, 于是, 在酶切产物中就一定有一条长于噬菌体基因组 DNA 的片段; 反之, 在没有被噬菌体感染的细菌基因组酶切产物中不会出现这样的条带。



1: *Sma* Ⅰ /host DNA; 2: Host DNA; 3: Sma Ⅰ /lysogenic bacterial DNA; 4: Phage DNA; 5: Lysogenic bacterial DNA

图 3　***Sma*** Ⅰ 酶切细菌基因组 **DNA** 的脉冲电泳图

Fig 3　Pulsed-field agarose gel electrophoresis

图 3 中的泳道 3 是 *Sma* Ⅰ 消化被噬菌体感染宿主菌基因组的酶切产物带型, 比未感染宿主菌(脉道 1)的多出了 1 条大于噬菌体基因组 DNA 的片段, 该片段即是两端分别带有一段宿主菌 DNA 序列的噬菌体 DNA, 也就是说在噬菌体感染宿主菌的基因组中含有噬菌体的基因组 DNA, 即在宿主菌基因组中存在有前噬菌体, 因此, 噬菌体 PaP2 就是铜绿假单胞菌 PA2 的溶原性噬菌体。

2.4　噬菌体 PaP2 最佳感染复数的测定

按照感染复数分别为 0.01、0.1、1、10、100、1 000 的比例加入噬菌体和宿主菌, 培养 3.5 h 后各管噬菌体滴度分别为: $< 10^7$、5.5×10^8、1.4×10^9、6.7×10^9、4.8×10^9 和 7.0×10^8 pfu/ml。

在 6 个感染复数中, MOI= 10 时子代噬菌体的产出率最高。因此, 确定 PaP2 感染其宿主的最佳感染复数为 10。

2.5　噬菌体 PaP2 一步生长曲线的绘制

在总量为 1.985×10^8 cfu 的宿主菌液中加入 MOI= 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, 即被感染细菌的初始数量就是 1.985×10^8 cfu。将沉淀稀释至 6 ml, 那么菌液中细菌的初始浓度即为 $1.985\times 10^8\div 6 = 3.31\times 10^7$ cfu/ml。

在 PaP2 吸附宿主菌之后培养的不同时间, 分别取出 30 μl 测定上清液中子代噬菌体的滴度。即可绘出铜绿假单胞菌噬菌体 PaP2 的一步生长曲线(图 4)。

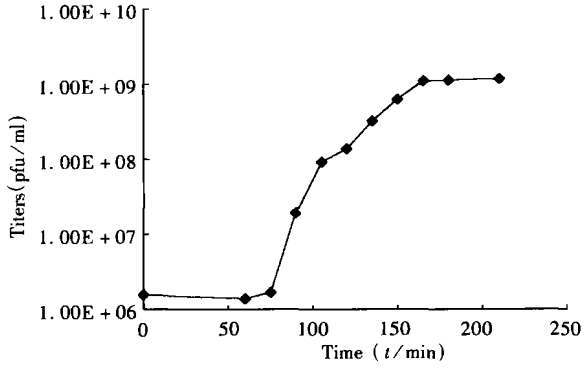


图 4　铜绿假单胞菌噬菌体 **PaP2** 的一步生长曲线

Fig 4　One-step growth curve for PaP2 phage

根据该曲线, 可以清晰地看出 PaP2 感染宿主菌铜绿假单胞菌 PA2 的潜伏期约为 75 min, 裂解期约为 90 (165— 75) min。

根据公式: 裂解量= 裂解末期噬菌体滴度÷ 感染初期宿主菌浓度, 计算如下: $1.11\times 10^9\div(3.31\times 10^7) = 33.53\approx 34$

即 PaP2 感染宿主菌的裂解量为 34, 也就是说, 当每个宿主菌中的子代噬菌体繁殖量达到 34 个时, 细菌就会裂解。

3　讨论

生物多样性是目前生命科学领域内的研究热点之一, 噬菌体的多样性尤其惊人, 在生物圈中其数量达 10^{31} 之巨[6]。而目前描述和分离的噬菌体很少, 完成基因组测序的噬菌体不过 200 余个。因此, 分离培养和描述新的噬菌体仍然是微生物学工作者所面临的任重而道远的艰巨任务。研究一个新发现的噬菌体的生物学特性, 是认识该噬菌体的基本前提。噬菌体由外部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的蛋白质衣壳和内部的核酸组成，结构简单，我室新分离的铜绿假单胞菌噬菌体 PaP2 头部直径约 52 nm，基因组是全长43 783 bp的dsDNA（待发表，GenBank 登录号是AY575774），至少含有 10 个衣壳蛋白[7]。噬菌体形态多样，是分类的重要依据之一。1991 年国际细菌病毒分类委员会根据核酸类型、颗粒的形态和囊膜的有无，将噬菌体分成 12 个科。按照这个分类标准，依据电镜观察到的颗粒形态来看，PaP2 当属于短尾噬菌体科。

噬菌体分为毒性噬菌体和温和噬菌体。毒性噬菌体（即裂菌性噬菌体）在固体培养基上形成清晰、透亮的溶菌空斑，即透明噬斑；而温和噬菌体（即溶原性噬菌体）在固体培养基上形成浑浊的半透明噬斑。以铜绿假单胞菌 PA2 为宿主菌，噬菌体 PaP2 形成的噬斑雾状半透明，表现为溶原性噬菌体的噬斑特征。

但是，仅仅依据噬斑的表型来判断噬菌体是溶原性还是裂菌性是不准确的，只有找到前噬菌体，才能作出PaP2是溶原性噬菌体的结论。前噬菌体在其溶原菌中有两种存在形式：一种是整合在溶原菌基因组中，这是大多数溶原性噬菌体的前噬菌体存在形式，如D3112[8]、φCTX[9]；另一种则是以质粒的形式存在于溶原菌的胞浆中，如大肠杆菌噬菌体N15[10]、高加索回归热疏螺旋体的噬菌体 cp32[11]、双曲钩端螺旋体的噬菌体 LE1[12] 以及耶尔森菌噬菌体 PY54[13] 等的前噬菌体就是以环状或者线性质粒的形式存在。本研究在PaP2感染宿主菌的基因组中找到了整合形式存在的PaP2的前噬菌体，说明 PaP2 是溶原性噬菌体。

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MOI 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，即存在着最佳感染复数。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抗体呈现等研究都有重要的指导意义。本研究测得 PaP2 对其宿主菌的最佳感染复数是 10。由于最佳感染复数的噬菌体感染宿主菌后产生的子代噬菌体最多，因此，在后续提取噬菌体基因组 DNA 时就以 MOI= 10 进行噬菌体对宿主菌的感染。Wang 等[8] 在培养铜绿假单胞菌噬菌体 D3112 时也用高 MOI 的噬菌体 D3112 去感染其宿主菌。

噬菌体作为非细胞型微生物，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，表现为“一步生长”的特点，可以通过绘制一步生长曲线了解其繁殖特点，如潜伏期、裂解量等等。噬菌体感染宿主菌的潜伏期和裂解期的长短以及裂解量的大小与噬菌体、宿主菌及环境条件都有关，各种噬菌体都有独特的一步生长曲线，如：铜绿假单胞菌噬菌体 φKMV 的潜伏期为 12 ~ 13 min，裂解期是 3 ~ 8 min，裂解量是 25 ~ 30[14]；而野油菜黄单胞菌噬菌体 XTP1 的潜伏期则为 2 h，裂解期是 2 h，裂解量是 35[5]；对于乳酸菌噬菌体 ΦJL-1 来说[4]，3 个值分别是：35 min，40 min，22。在本研究中根据 PaP2 的一步生长曲线，测得 PaP2 感染宿主菌 PA2 的潜伏期是95 min，裂解期是 90 min，裂解量是平均每个被感染宿主菌产生 34 个子代噬菌体。对于那些在临床上有应用前景的噬菌体而言，潜伏期短、裂解量小的噬菌体是特别被看好的。

参考文献：

[1] 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.

[2] J 萨姆布鲁克，E F 弗里奇，T 曼尼阿蒂斯，著. 金冬雁，黎孟枫，译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1996. 133－135.

[3] F 奥斯伯等，R 布伦特，R E 金斯顿 著. 颜子颖，王海林 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京：科学出版社，1998. 39.

[4] Lu Z，Breidt F J，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 Bacteriology，1994，176(11)：3354－3359.

[6] Hendrix R W. Bacteriophage genomics[J]. Curr Opin Microbiol，2003，6(5)：506－511.

[7] 黄建军，胡晓梅，朱军民，等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP2 的结构蛋白及其编码基因的研究[J]. 医学研究生学报，2004，17(4)：292－295.

[8] Wang P W，Chu L，and Guttman D S. Complete Sequence and Evolutionary Genomic Analysis of the Pseudomonas aeruginosa Transposable Bacteriophage D3112[J]. J Bacteriology，2004，186(2)：400－410.

[9] Nakayama K，Kanaya S，Ohnishi M，*et al*. The complete nucleotide sequence of (CTX，a cytotoxin- converting phage of Pseudomonas aeruginosa：implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages[J]. Mol Microbiol，1999，31(2)：399－419.

[10] Rybchin V N，Svarchevsky A N. The plasmid prophage N15：a linear DNA with covalently closed ends[J]. Mol Microbiol，1999，33(5)：895－903.

[11] Eggers C H，Samuels D S. Molecular evidence for a new bacteriophage of Borrelia burgdorferi[J]. J Bacteriology，1999，181(23)：7308－7313.

[12] SaintGirons I，Bourhy P，Ottone C，*et al*. The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within Leptospira biflexa：construction of an L. biflexa-Escherichia coli shuttle vector[J]. J Bacteriology，2000，182(20)：5700－5705.

[13] Hertwig S，Klein I，Lurz R，*et al*. PY54，a linear plasmid prophage of Yersinia enterocolitica with covalently closed ends[J]. Mol Microbiol，2003，48(4)：989－1003.

[14] Iavigne 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 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net