DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.031

综述

文章编号:1000-5404(2004)04-0356-03

噬菌体宿主特异性变化的分子机制研究

Molecular mechanisms of the changes of host specificity of bacteriophage

张利军 综述,熊鸿燕 审校 (第三军医大学预防医学系流行病学教研室,重庆 400038)

噬菌体是细菌病毒,于1915年和1917年分别由Frederik Twort及Felixd'Herelle发现。人们将噬菌体作为一种抗细菌感染的制剂来使用,并取得一定的研究成果,噬菌体研究一度成为研究热点。由于噬菌体具有严格的宿主特异性,这就限制了噬菌体治疗的发展。随着分子生物学的长足进展,人们对噬菌体及其宿主菌的相互作用、噬菌体寄生的基因控制及特异性吸附的分子生物学机制有了比较清楚的认识,可利用这些原理对噬菌体蛋白或基因进行有目的的人工改造,改变噬菌体的宿主谱,现就相关技术进行综述。

1 单碱基改变扩展宿主谱

野生型噬菌体T7的宿主是大肠埃希菌,不能感染志贺菌。噬菌体T7有20面体头部和非常小的尾。基因组由39 936 bp线状双链DNA合成,有160 bp的末端冗余,含有50个基因。噬菌体T7能以3×10^{-8}的频率自发产生ss基因突变。这些突变噬菌体能克服噬菌体T7DNA的早期降解,在志贺菌和大肠埃希菌宿主上产生正常噬菌斑。

James等[1]对Hausmann噬菌体T7ss突变株和另两株自发ss突变株的进行DNA测序分析。Hausmann T7ss突变株和野生型噬菌体相比较存在四个点突变,点突变都位于gene9或gene10的编码结构域。一个点突变位于编码噬菌体T7衣壳组装蛋白的gene9第22 774个碱基,由腺嘌呤替代胞嘧啶(多肽链第275氨基酸由丝氨酸替代精氨酸)。另3个点突变都位于编码主要衣壳蛋白的gene10:第23 063个碱基由胸腺嘧啶替代鸟嘌呤(多肽链第32氨基酸由缬氨酸替代甘氨酸)、第23 150碱基由胞嘧啶替代腺嘌呤(多肽链第61氨基酸由脯氨酸替代谷氨酸)、第23 152碱基由胞嘧啶替代胸腺嘧啶(第62氨基酸由亮氨酸替代苯丙氨酸)。而自发性ss突变株和野生型噬菌体T7唯一的差别是gene10第23 150碱基由胞嘧啶替代腺嘌呤。他们通过重组试验证实第23 150单碱基突变是ss突变噬菌体扩展宿主谱到志贺菌的原因。

Ravin[2]研究发现5株德氏乳杆菌噬菌体突变株能裂解抗噬菌体德氏乳杆菌。基因测序发现gene17和gene71分别编码大、小两种尾丝蛋白,突变株噬菌体在gene71的3′端发生一个核苷改变。他们认为噬菌体gene71编码的尾丝蛋白C末端决定噬菌体的吸附性,通过碱基改变可以改变其宿主谱。

λ噬菌体是双链DNA噬菌体,为大肠杆菌温和噬菌体。编码λ噬菌体尾丝的基因有11个,而J基因编码的J蛋白的C末端决定噬菌体的特异性吸附。λ噬菌体特异性吸附于大肠埃希氏菌K12外膜的受体-LamB蛋白,LamB蛋白是由大肠杆菌基因lamB编码的[3]。LamB蛋白是由3条421个氨基酸的同质性多肽组成的三聚体膜蛋白。Werts等[4]研究发现LamB蛋白突变可产生两类抗λ噬菌体大肠杆菌突变株:Ⅰ型大肠杆菌突变株是lamb基因位点247 245 148突变;Ⅱ型大肠杆菌突变株是lamb基因位点151突变。他们还分离出两种噬菌体突变体:Ⅰ型突变体(λh^{+})和复合型突变体(λhh^{*})。λh^{+}噬菌体不仅可以感染野生型大肠杆菌,还可以感染所有Ⅰ型大肠杆菌突变株;λhh^{*}噬菌体可以感染所有的Ⅰ型和Ⅱ型大肠杆菌突变株;而野生菌谱λ噬菌体只能感染野生大肠杆菌,不能感染Ⅰ型和Ⅱ型大肠杆菌突变株。对宿主谱扩展的λh^{+}噬菌体和λhh^{*}噬菌体的J基因进行DNA序列分析,证实每株噬菌体都是单氨基酸改变。这些改变只是J基因远端的三个残基的变化:1 077位点Val→Ala,位点1 040Thr→Met,位点1 127Leu→Pro。重组试验证明噬菌体尾丝J蛋白的C末端氨基酸残基决定噬菌体对宿主菌的特异性吸附。他们认为在J蛋白1 040、1 077及1 127位点上突变点突变是噬菌体宿主谱扩展的原因,表明噬菌体的宿主谱是可以进行人工改造定向扩展的。

2 序列重组扩展宿主谱

T4噬菌体属于有尾噬菌体A群。有尾噬菌体对宿主菌的识别特异性是由尾丝蛋白决定的[5]。T4噬菌体的尾丝分为远端和近端,远端由基因蛋白35(P35)、36(P36)、37(P37)组成,而近端由基因蛋白34(P34)组成。T4噬菌体识别宿主特异性的结构是位于尾丝远端的P37,而P37的C末端的120氨基酸残基对于识别宿主菌表面受体的特异性尤其重要。T4噬菌体识别的位点是宿主菌的外膜蛋白OmpC或脂多糖[6]。

T4噬菌体只感染大肠杆菌和亲缘关系近的志贺氏菌,但Ackermann[7]和Repoila[8]的研究对Tetart[9]扩展T4噬菌体宿主谱提供了启示。他们把噬菌体SV76.3和Mi基因组的一个片段(包括gene37和38)替换T4噬菌体尾丝基因的同源结构。结果发现这些突变体不仅可以在大肠杆菌增殖,而且可以在假结核耶尔森菌增殖。DNA分析发现这些突变体gene37的C末端的许多序列基序(His boxes)之间发生重复或替换。他们认为His box序列之间的重组能产生新的受体识别特异性,通过水平转移,T4噬菌体可以扩展其宿主谱。

Tetart等[10]报道了噬菌体尾丝基因的可塑性。在不同噬菌

作者简介:张利军(1975—),男,河南省濮阳县人,硕士,医师,主要从事噬菌体宿主谱特异性方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752286

收稿日期:2003-07-12;修回日期:2003-11-06

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

体中, 控制识别宿主的尾丝粘附素位于不同的基因产物中。T4 家系噬菌体的尾丝粘附素位于 P37 的 C 末端, T2 家系噬菌体的尾丝粘附素则存在 P38 中。决定宿主谱特异性的这些序列, 不论其同源性大小, 均可通过相互交叉而生成嵌合尾丝, 从而改变噬菌体的宿主谱。尾丝基因的镶嵌性便于噬菌体之间粘附素结构域的交换, 使噬菌体获得新的宿主谱, 可以感染分类学亲缘关系较远的宿主菌[11, 12]。

Lucchini[13] 发现通过基因重组嗜热链球菌温和噬菌体可转变为烈性噬菌体。嗜热链球菌噬菌体宿主谱由尾丝基因决定。尾丝蛋白由含氨基已酸重复的保守结构域和少许可变结构域组成。与 T 偶数噬菌体粘附素相似, 含氨基已酸的保守结构域是重组热点。

3　基因水平转导扩展宿主谱

大肠杆菌膜表面荚膜多糖(K 抗原)是 K 噬菌体的特异性吸附受体。噬菌体 K1E 尾丝蛋白拥有 N-乙酰神经氨酸酶, 特异性识别 K1 抗原; K5 噬菌体编码 K5 裂解酶蛋白, 特异性吸附 K5 抗原。Scholl 等[14] 用大肠杆菌 K5 做宿主菌从污水中发现并分离了一种对 *E. coli* K1 和 K5 都具有感染活性的噬菌体 φK1-5, 只要菌株上具有 K1 或 K5 抗原, 就可能被其感染。研究发现噬菌体 φK1-5 编码两种不同的尾丝蛋白, 使其能感染大肠埃希杆菌 K1 与 K5 菌种。编码尾丝蛋白区域的 DNA 序列分析显示其具有两个开放阅读框。第一个开放阅读框编码的蛋白是噬菌体 φK5 的 K5 溶解蛋白基因, 此基因使噬菌体 φK5 特异性感染大肠埃希杆菌 K5 菌株。第二个开放性阅读框编码一种与噬菌体 φK1E 的 N— 乙酰神经酰胺酶蛋白的氨基酸序列几乎完全一样的蛋白。这种蛋白让 φK1E 噬菌体特异性感染大肠埃希杆菌 K1 菌株。他们实验证实成熟噬菌体包括两种尾丝蛋白, 这两种蛋白可独立灭活。对噬菌体 φK5、φK1E 和 φK1-5 的尾丝基因比较发现这些基因是单体形式排列, 提出这类噬菌体可通过水平的基因转导扩展宿主谱。

Scholl[15] 和 Ravin[16] 的研究也证实噬菌体能通过尾丝基因水平转移迅速改变或扩展宿主谱。

4　G 倒位扩展宿主谱

Mu 噬菌体颗粒由二十面体的头和一个可收缩的类似偶数噬菌体尾组成。Mu 噬菌体 DNA 异源双链作图揭示, 在基因组右末端 1.7 kb 处有 3 kb 的倒位环即 G 片段。这个片倒位控制噬菌体的宿主范围。位于 G 片段两侧有一对 34 bp 反向重复序列, 倒位是由这些反向重复序列之间特异性重组的结果。经过倒位, G 片段从一个取向转变为另一个取向, 从而改变 Mu 噬菌体的宿主谱。从大肠杆菌 K-12 所释放的噬菌体中分离的 DNA, G 片段主要是一个取向, 称之为 G(+)。从溶原菌释放的噬菌体分离的 DNA, G 片段有 2 个取向, 在这些细胞中的前噬菌体为 G(−)。G 片段编码两套基因: S、U 和 S′、U′, G(+)Mu 噬菌体基因组含 S、U 基因, 分别合成 S、U 蛋白, 而 G(−)Mu 噬菌体基因组含有 S′、U′ 基因, G 片段倒位阻止 S 和 U 蛋白的合成, 允许另一组蛋白 S′ 和 U′ 的合成。这两套基因决定噬菌体的吸附特异性, 据推测它们相同的 N 末端蛋白将尾丝锚在噬菌体尾上, 而可变的 C 末端选择识别敏感细菌表面上一组噬菌体受体。现已鉴定一个脂多糖细胞壁组分作为噬菌体的受体。位于 G 区右侧的 gin 基因编码 21.7× 10^3 Gin 蛋白, 它作用于 G 片段两侧的反向重复序列, 使片段倒位[17]。Kahmann 等[18] 证明位于 gin 基因内顺式作用位点"sin", 增加 gin 介导的重组。研究者发现 G(+)噬菌体的宿主范围包括大肠杆菌 K-12, 一些沙门氏菌和沙雷氏菌; G(−)噬菌体的宿主范围包括大肠杆菌 C, 柠檬酸杆菌, 志贺氏菌, 肠杆菌和欧文氏菌。G 倒位是基因剪接通过倒位的第 1 个例子, 也是原核生物中基因剪接的第 1 个例子。G 倒位研究成为扩展噬菌体宿主谱研究的重要篇章。

5　基因嵌合扩展宿主谱

大肠杆菌噬菌体 M13、fd、f1、If1 和 Ike 属于丝状噬菌体, M13、fd 和 f1 吸附带有 F 性菌毛的大肠杆菌, 所以统称为 Ff 噬菌体。Ike 是吸附带有 N 或 I 菌毛的大肠杆菌。尽管它们的主要外壳蛋白的氨基酸序列和病毒体的长度有差异, 但它们有相似的结构。

丝状噬菌体通过噬菌体的末端, 即 gene3 编码的外壳蛋白, 附着于宿主细胞表面结合菌毛末梢感染宿主。

Ff 噬菌体组是一条共价闭环 DNA 分子, 编码 11 个基因, 彼此紧密相连。gene3 蛋白(P3)是用 18 个残基氨基末端信号序列合成, 成熟的(P3)含有 406 个残基, 是 3 个结构域的蛋白质: P3-D1 是膜渗入结构域; P3-D2 是菌毛结构域; P3-D3 是噬菌体外壳结构域。每个结构域有富含甘氨酸的四肽和五肽重复将其分开。随后是一个 C 末端膜锚。缺失做图已初步确定每个结构域的作用。结构域 P3-D3 和跨膜片段负责基因 III蛋白锚在噬菌体衣壳。推断两个 N 末端结构域更直接参与感染过程。P3-D2 介导噬菌体吸附到它的主要受体-F 性菌毛的末梢。Peeters 等[19] 对 Ike 噬菌体进行基因测序, 发现与 M13、fd 和 f1 基因组有 55% 的同源性, 含有 10 个编码基因。Ike 和 If1 的对应基因大小非常相似, 且在基因组上的排序完全相同。两者都具有基因 III, 编码 P3 蛋白, 决定噬菌体对宿主菌的识别特异性。基因 III不断发生基因重组, 导致宿主特异性的差异。

Endemann 等[20] 将 Ike 噬菌体的 gene3 的不同部位进行了删除突变, 然后再重组到 Ff 噬菌体基因组上。这种突变噬菌体获得了对 Ike 噬菌体宿主菌的吸附特异性, 但不引起感染。可能引起感染需要其他复杂结构的协同作用。因此, Ike 噬菌体和 Ff 噬菌体的基因是不可以整体替换的, 但可以嵌入另一噬菌体的识别基因中。

Marzari 等[21] 也将噬菌体 Ike gene3 做了不同部位的删除突变, 把 Ike 的 P3 的部分结构域克隆到成熟 fd P3 的 N 末端, 并不取代 fd 的 gene3。这样, 重组子既可感染具有 F+ 性菌毛的宿主菌, 也可感染噬菌体 Ike 的宿主菌, 从而扩展了 Fd 噬菌体的宿主谱。他们认为如果噬菌体至少带有 Ike P3 受体结构域, 这种带有嵌合 P3 噬菌体就能感染带有 N 和 F 菌毛的菌株。含有 Ike 噬菌体受体和渗入结构域的噬菌体不比仅含有 Ike 噬菌体受体结构域的噬菌体感染率高。这说明 fd 的渗入结构域在噬菌体感染 N 菌毛菌或 F 菌毛菌中发挥重要作用。而加上富含甘氨酸结构域感染率则可以提高 10 倍。表明有效的感染需要

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

噬菌体表面至少一个P3。事实表明,虽然噬菌体对宿主菌的裂解具有高度特异性,但并非一对一的关系,说明扩展噬菌体宿主谱是可行的。

OrfU是霍乱弧菌噬菌体CTX的微小衣壳蛋白,Heilpern[22]认为OrfU和噬菌体fd的蛋白P3功能相似,介导噬菌体CTX感染,在噬菌体的装配和释放方面起重要作用。他们把OrfU片段嵌入P3,成为OrfU-P3融合体。当噬菌体fd含有OrfU的N末端274个氨基酸后,它可以感染本来不感染的霍乱弧菌,Heilpern的成果充实了噬菌体宿主谱扩展研究。噬菌体宿主谱改变维持和促进自然界微生物的基因多样性和基因交换,有利于人类改造动物、植物和微生物[23]。

分子生物学的取得的辉煌成就,极大的促进噬菌体研究的发展。噬菌体研究成为新的研究热点,主要集中在噬菌体识别特异性的分子生物学基础及改变噬菌体宿主谱方面,目前人工改造噬菌体的理论和技术取得初步发展,将日趋成熟。但噬菌体宿主谱研究的成果仍比较有限,能改变宿主谱的噬菌体主要局限于有尾噬菌体的一小部分,改变的宿主谱也很窄。噬菌体研究如何取得实质性突破,全面完成噬菌体基因序列测序,掌握各基因的功能,研究清楚噬菌体和宿主菌的相互作用机制。将研究领域由有尾噬菌体扩展到无尾噬菌体,通过改变噬菌体基因,控制其宿主谱的变化,以满足人们扩展或缩小宿主谱的需求,这是噬菌体研究者的奋斗目标。

关键词:噬菌体;宿主;特异性变化;分子机制
中图法分类号:R373.9 文献标识码:A

参考文献:

[1] Pierce J C, Masker W E. A single-base change in gene 10 of bacteriophage T7 permits growth on *Shigella sonnei*[J]. J Virol, 1988, 62(11): 4369—4371.

[2] Ravin V, Raisanen L, Alatossava T. A conserved C-terminal region in Gp71 of the small isometric-head phage LL-H and ORF474 of the prolate-head phage JCL1032 is implicated in specificity of adsorption of phage to its host, *Lactobacillus delbrueckii*[J]. J Bacteriol, 2002, 184(9): 2455—2459.

[3] Wang J, Hofnung M, Charbit A. The C-terminal portion of the tail fiber protein of bacteriophage lambda is responsible for binding to LamB, its receptor at the surface of *Escherichia coli* K-12[J]. J Bacteriol, 2000, 182(2): 508—512.

[4] Werts C, Michel V, Hofnung M, *et al*. Adsorption of bacteriophage lambda on the LamB protein of *Escherichia coli* K-12: point mutations in gene J of lambda responsible for extended host range[J]. J Bacteriol, 1994, 176(4): 941—947.

[5] Montag D, Hashemolhosseini S, Henning U. Receptor-recognizing proteins of T-even type bacteriophages. The receptor-recognizing area of proteins 37 of phages T4 TuIa and TuIb[J]. J Mol Biol, 1990, 216(2): 327—334.

[6] Miller E S, Kutter E, Mosig G, *et al*. Bacteriophage T4 Genome[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(1): 86—156.

[7] Ackermann H W, DuBow M S. Bacteriophage taxonomy[A]. In: Viruses of Procaryotes[M]. Boca Raton: CRC Press, 1987. 13—44.

[8] Repoila F, Tetart F, Bouet J Y, Genomic polymorphism in the T-even bacteriophages[J]. EMBO J, 1994, 13(17): 4181—4192.

[9] Tetart F, Repoila F, Monod C, *et al*. Bacteriophage T4 host range is expanded by duplications of a small domain of the tail fiber adhesin[J]. J Mol Biol, 1996, 258(5): 726—731.

[10] Tetart F, Desplats C, Krisch H M. Genome plasticity in the distal tail fiber locus of the T-even bacteriophage: recombination between conserved motifs swaps adhesin specificity[J]. J Mol Biol, 1998, 282(3): 543—556.

[11] Tetart F, Desplats C, Kutateladze M, *et al*. Phylogeny of the major head and tail genes of the wide-ranging T4-type bacteriophages[J]. J Bacteriol, 2001, 183(1): 358—366.

[12] Hambly E, Tétart F, Desplats C, *et al*. A conserved genetic module that encodes the major virion components in both the coliphage T4 and the marine cyanophage S-PM2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(20): 11411—11416.

[13] Lucchini S, Desiere F, Brussow H. Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory[J]. J Virol, 1999, 73(10): 8647—8656.

[14] Scholl D, Rogers S, Adhya S, *et al*. Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*[J]. J Virol, 2001, 75(6): 2509—2515.

[15] Scholl D, Adhya S, Merril C R. Bacteriophage SP6 is closely related to phages K1-5, K5, and K1E but encodes a tail protein very similar to that of the distantly related P22[J]. J Bacteriol, 2002, 184(10): 2833—2836.

[16] Ravin V, Raisanen L, Alatossava T. A conserved C-terminal region in Gp71 of the small isometric-head phage IL-H and ORF474 of the prolate-head phage JCL1032 is implicated in specificity of adsorption of phage to its host, *Lactobacillus delbrueckii*[J]. J Bacteriol, 2002, 184(9): 2455—2459.

[17] Mu 噬菌体[A]. 见:贾盘兴. 噬菌体分子生物学—基本知识和技能[M]. 北京:科学出版社, 2001. 229—252.

[18] Kahmann R, Rudt F, Koch C. G inversion in bacteriophage Mu DNA is stimulated by a site within the invertase gene and a host factor[J]. Cell, 1985, 41(3): 771—780.

[19] Peeters B P, Peters R M, Schoenmakers J G, *et al*. Nucleotide sequence and genetic organization of the genome of the N-specific filamentous bacteriophage IKe. Comparison with the genome of the F-specific filamentous phages M13, fd and f1[J]. J Mol Biol, 1985, 181(1): 27—39.

[20] Endemann H, Gailus V, Rasched I. Interchangeability of the adsorption proteins of bacteriophages Ff and IKe[J]. J Virol, 1993, 67(6): 3332—3337.

[21] Marzari R, Sblattero D, Righi M, *et al*. Extending filamentous phage host range by the grafting of a heterologous receptor binding domain[J]. Gene, 1997, 185(1): 27—33.

[22] Heilpern A J, Waldor M K. pIIICTX, a predicted CTXphi minor coat protein, can expand the host range of coliphage fd to include *Vibrio cholerae*[J]. J Bacteriol, 2003, 185(3): 1037—1044.

[23] Jensen E C, Schrader H S, Rieland B, *et al*. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and Pseudomonas aeruginosa[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(2): 575—580.

(编辑 薛国文)

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