DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.002
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
378 2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)04-0378-03

铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 基因组测序

张克斌,金晓琳,朱军民,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 对新分离的铜绿假单胞菌 dsDNA 溶原性噬菌体 PaP3 进行基因组测序。方法 用 CsCl 梯度离心纯化噬菌体 PaP3 颗粒,提取噬菌体基因组 DNA,建立 shot-gun 随机文库,从文库中随机挑取克隆进行测序并完成序列组装,同时通过限制性内切酶图谱结合酶切片段的变性、复性实验分析基因组末端。结果 共进行了 778 条序列的测定与拼接,测序量达到 13.5 倍覆盖率,得到一条长为 44 249 bp 的重叠群,此重叠群错误率为 9.46ERR/10KB,测序结果和酶切图谱分析表明该 PaP3 基因组是一 44 249 bp 长的线性平端 dsDNA 分子。其碱基组成为 A=24.24%,G=26.18%,T=23.63%,C=25.94%;稀有碱基=0;A+T=47.87%,C+G=52.13%。结论 噬菌体 PaP3 基因组是由 44 249 bp 组成的线性平端双链 DNA 分子。测序完成为生物信息学分析和功能基因研究奠定了基础。

关键词:铜绿假单胞菌;噬菌体;基因组测序
中图法分类号:Q755;Q939.48 文献标识码:A

Genome sequencing for *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP3

ZHANG Ke-bin, JIN Xiao-lin, ZHU Jun-min, HU Xiao-mei, RAO Xian-cai, HU Fu-quan (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the sequence of the genome of *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP3. Methods PaP3 particles was purified with CsCl gradient centrifugation, and its genomic DNA was extracted in order to construct the shot-gun library. The randomly-picked clones underwent genome sequencing. The sequence was reconstructed, and then analyzed for the genome ends with restrictive endonuclease KpnⅠ spectrum under denaturing/annealing conditions. Results Through the 779 sequenced clones, a contig consisted of 44 249 bp was obtained, with 9.46 ERR/10 KB. The whole sequencing mount was 13.5 coverage of PaP3 genome. The genome is a linear dsDNA molecule with two blunt ends. The base constituents of the genome were A=24.24%, G=26.18%, T=23.63%, C=25.94%; Ambiguous=0; A+T=47.87%, C+G=52.13% respectively. Conclusion The PaP3 genome is a 44 249 bp linear dsDNA molecule with two blunt ends.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; bacteriophage; genome sequencing

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aerugonosa*)习惯上称绿脓杆菌,是人体最重要的条件致病菌,是创伤、烧伤及免疫受损机体最容易感染的细菌之一,严重危害着人类的健康。噬菌体(Bacteriophage)是细菌的病毒,它与宿主菌关系密切。一方面,溶原性噬菌体通过自身携带的外源性遗传物质改变宿主菌的生物学性状,同时其介导的基因水平转移(Horizontal transfer)影响宿主菌及自身基因的多样性[1~3];另一方面,基于裂菌性噬菌体能特异性裂解宿主菌,也基于如果诱导前噬菌体进入裂菌性生长周期就可导致细菌裂解[1],噬菌体有望发展成为抗细菌感染的生物制剂[4]。不管是想研究噬菌体与细菌间相互作用关系,还是研究噬菌体的工程改造和噬菌体治疗,都需要对噬菌体及其宿主菌的遗传学背景有极清楚的认识。绿脓杆菌 PAO1 菌株全基因组测序工作的完成为此奠定了良好基础[5],而绿脓杆菌噬菌体的基因组测序就显得更为必要。为此,本研究对一新分离的铜绿假单胞菌 dsDNA 溶原性噬菌体 PaP3 进行了全基因组测序。

1 材料与方法

1.1 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3

本研究测序对象为铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3,该噬菌体为本研究室自己分离鉴定,见文献[6]。

1.2 噬菌体 PaP3 颗粒的纯化

按照本室常规方法培养、收获噬菌体培养物,参照文献[7]λ 噬菌体纯化方法和 CsCl 密度梯度离心法获得铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 纯化物。

1.3 噬菌体 PaP3 核酸的提取

取 PaP3 纯化物,用蛋白酶 K 消化破噬菌体衣壳,释放出噬菌体核酸,用平衡酚和氯仿抽提核酸,根据酶切图谱鉴定,并做核酸定量后备用。

1.4 鸟枪法随机文库的构建

参照 Dong H 等[8] 和 Fleischmann RD 等[9] 的方法进行。超声随机断裂噬菌体 DNA,以大多数 DNA 片段分布在 1.6~4 kb 左右为宜;绿豆核酸酶(华美公司)处理 DNA,琼脂糖凝胶电泳并回收 1.6~2 kb DNA 片段;与 pUC18/*Sma*Ⅰ/BAP(Amersham Pharmacia)连接后,电转化感受态大肠杆菌 DH5α;37 ℃ 200 r/min 振荡培养 40 min,取菌液涂布于 5~6 块 LB 平板,平板中氨苄青霉素(上海旭东海普药业有限公司)100 μg/ml,X-gal(GIBCO BRL)80 μg/ml,IPTG(GIBCO BRL)80 μg/ml,37 ℃培养过夜,次日挑取白色菌落用 Prep 96 Plasmid Kit (QIAGEN)小量抽提质粒 DNA 作为测序的模板。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070037);重庆市攻关课题资助项目(2000)
作者简介:张克斌(1968-),男,四川省岳池县人,博士,主治医师,讲师,主要从事微生物基因组和生物信息学方面的研究,发表论文 10 篇。现在附属新桥医院检验科,重庆 400037。电话:(023)68755000-74654
通信作者:胡福泉,电话:(023)68752240,E-mail:hufuquan@yahoo.com
收稿日期:2002-02-05;修回日期:2002-03-07

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

1.5　测序反应

测序反应使用试剂盒 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer), 引物为 pUC18 上的测序引物(上海生工合成), 上游引物序列为 5′ GTAAAACGACGGCCAGT 3′, 下游引物序列为 5′ GCGGATAACAATTTCACACAGG 3′。在 96 孔 PCR 反应板中, 每孔加模板 DNA 4 μl(100 ng/μl), ddH_2O 4 μl, 1 μmol/L 上游或下游引物 4 μl, Premix 8 μl。PCR 反应条件为: 95 ℃预变性 20 s, 然后 95 ℃ 20 s, 50 ℃ 15 s, 60 ℃ 4 min, 共 40 个循环。反应结束后以乙醇沉淀扩增产物, 用 10 μl 测序上样缓冲液溶解沉淀, 以 ABI PRISMTM377 型全自动 DNA 测序仪进行序列测定。

1.6　序列的拼接

用美国华盛顿大学基因组中心的 Phred/Phrap/Consed 软件包[7] 对测得的序列进行组装、拼接, 得到若干重叠群(Contig)。随着所测序列的增加, 小的重叠群逐渐融合为大的重叠群。对重叠群之间的缝隙(Gap)及其内部碱基分值较低(小于 40)的区域, 通过软件包中的"Antofinish"软件设计特异测序引物, 以噬菌体 DNA 或 Shot-gun 随机文库中的相应质粒 DNA 为模板进行测序反应, 测序后的结果参与拼接。

1.7　基因组末端分析

为了证实 PaP3 基因组是 DNA 还是 RNA? 双链还是单链? 闭环状还是线状? 是平端还是粘性末端, 本研究通过限制性内切酶图谱分析结合酶切片段的变性、复性实验来验证。方法是首先用 DNAStar 软件对测序所获序列进行酶切分析, 选择出最适合的限制性内切酶 *Kpn*I; 用 *Kpn*I(上海生工)做酶切图谱分析; 为进一步鉴定该基因组有无粘端, *Kpn*I 酶切产物经 94 ℃变性 5 min, 然后缓慢降至室温, 再降至 4 ℃, 以保证其有粘性末端充分复性的机会, 然后再电泳分析; 电泳条件为: 1× TAE, 0.7% 琼脂糖, 50 V× 2 h, 电泳在 4 ℃冰箱中进行, 用温度计监测电泳过程中系统内的温度, 其最高温度未超过 14 ℃, 这一温度可保证复性后的粘性末端不会因温度过高而变性解链。电泳后, 凝胶成像仪中观察并采集图像信息进行分析。

2　结果

2.1　测序工作概况和结果

制备测序用基因组 DNA 样品用核酸定量仪检测, 样品 OD260/OD280 为 1.75, 符合 DNA 样品的标准(1.60—1.80)。未经酶切的样品直接电泳显示为单一条带, 说明纯度和完整性好, 符合测序样品要求。

将 PaP3 DNA 用超声波打断后, 回收 1.6～2.0 kb 片段构建 shot-gun 随机文库。从文库中随机挑取克隆进行测序, 共进行了 778 条序列的测定与拼接, 每条模板有效测序达 500～700 bp, 总测序量达到 PaP3 基因组的 13.5 倍覆盖率(Coverage), 得到一条长为 44,249 bp 的重叠群, 此重叠群错误率为 9.46ERR/10 KB。

PaP3 全基因组共 44, 249 bp。碱基组成: A= 24.24% [10702]; G= 26.18% [11585]; T= 23.63% [10456]; C= 25.94% [11479]; 稀有碱基对为 0[0]; A+T = 47.87% [21184]; C+G= 52.13% [23064]。

2.2　PaP3 基因组末端鉴定结果

将测序获得的 PaP3 全基因组序列, 用 DNAStar 软件做酶切图谱分析, 发现 *Kpn*I 最适合用于做酶切图谱分析, 因为 PaP3 全长 44249 bp 序列中仅存在 3 个 *Kpn*I 酶切位点, 分别位于 22 121 bp, 25 240 bp 和 36 374 bp 处。如果 PaP3 基因组为线状, 用 *Kpn*I 酶切, 就会出现四条带, 从大到小依次为 22 121 bp、11 134 bp、7 875 bp 和 3 119 bp。而如果为环状, 则只会出现三条带, 依次是 29 996 bp、11 134 bp 和 3 119 bp, 见图 1。

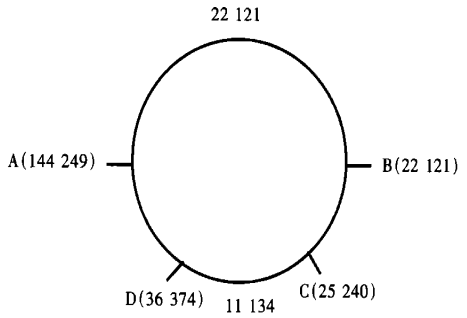
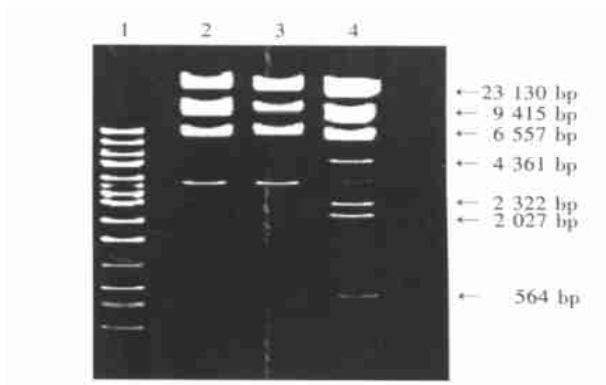


图 1　PaP3 基因组 DNA/*Kpn*I 酶切分析

Fig 1　Scheme of PaP3 genome DNA cut with endonuclease *Kpn* I

实际 *Kpn*I 酶切结果如图 2 所示。PaP3 基因组 DNA 能够被 *Kpn*I 切开, 表明该基因组为 DNA 分子, 经 *Kpn*I 酶切后, 获得 4 条带, 大小分别约为 22、11、7 和 3 kb, 根据上图可知不是共价闭合环状分子。结合酶切片段的变性和复性分析, 认定 PaP3 基因组 DNA 是线性 dsDNA 平端分子。



1: λDNA/*Hind* III marker; 2: PaP3/*Kpn* I, 94 ℃× 5 min→RT→4 ℃; 3: PaP3/Kpn; 4: λDNA/*Hind* III respectively

图 2　PaP3/*Kpn* I 酶切电泳图

Fig 2　Electrophoresis of PaP3 with *Kpn* I　digestion

3　讨论

铜绿假单胞菌是人体最重要的条件致病菌。最近, 铜绿假单胞菌 PAO1 菌株全基因组测序工作已完成[5], 该项工作为人类更有效地防治该菌的感染奠定了基础。噬菌体是细菌的病毒, 它与宿主菌关系密切。一方面, 作为细菌病毒, 裂菌性噬菌体能特异性裂解宿主菌, 从而抑制宿主菌的繁殖, 影响其分布; 另一方面, 溶原性噬菌体能将其基因组整合于宿主菌基因组中, 通过自身携带的外源性遗传物质改变宿主菌的生物学性状, 如改变其耐药性和毒力等, 同时其介导的基因水平转移影响宿主菌及自身基因的多样性[1～3]。因此, 不管是想研究噬菌体与细菌间相互作用关系, 还是研究噬菌体的工程改造和噬菌体治疗, 都需要对噬菌体及其宿主菌的遗传学背景有极清楚的认识。为此, 本研究对我们新分离鉴定的铜绿假单胞菌溶原性噬菌体

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

PaP3 进行了全基因组测序。

本基因组测序采用了人类基因组和微生物基因组测序中最普遍使用的策略，即鸟枪法随机测序和重叠群组装的策略。其基本的工作步骤如下[8,9]：①用超声波处理将 DNA 打断成随机化片段，用琼脂糖凝胶电泳分离、回收 1.6～2.0 kb 左右的小片段；②将小片段克隆于测序载体；③随机挑取克隆，制备模板，进行两末端测序，测序量应达到 8～10 倍左右的高覆盖率；④应用 Phred/Phrap/Consed 软件将读出序列组装成连续的重叠群；⑤通过设计特异性引物对低质量测序区进行重复测序及 DNA walking，填补重叠群之间的缝隙。近几年 DNA 测序技术上出现了革命性突破，以薄板凝胶电泳为基础的自动测序技术和高通量(High throughput)毛细管阵列测序技术使全基因组测序策略得以顺利实施；高质量的 Taq DNA 聚合酶和高度敏感的荧光染料的出现，使测序的质量和准确度不断提高；同时，进行数据质量监测和组装的软件(如 Phred/Phrap/Consed 等)也在实际应用中得到不断的改进和完善。因此，目前鸟枪法已成为一条稳定、快速、低成本的基因组测序的技术路线。

就本研究的难点而言在于噬菌体基因组 DNA 的末端鉴定。对于一个 dsDNA 病毒，其基因组 DNA 末端存在三种可能，一是为一首尾相连的环状分子；二是线性平端；三是线性粘端，当然线性粘端又可分为 5′-突出粘端和 3′-突出粘端。而如果是环状 DNA 分子，测序组装后能自动成环，或用 Primer-walking 法可在假设首、尾处走通。但如果是线性分子，则必须鉴定其末端是平端还是粘性末端。

本研究中通过测序后的软件自动组装，PaP3 的基因组 DNA 序列未出现自动首、尾相连，高度提示该基因组可能是线性分子。我们通过限制性内切酶图谱分析和 PCR 扩增实验进一步证实了此点。测序所获序列经 DNAStar 软件分析，发现 *Kpn*Ⅰ是最适合本研究中做限制性内切酶图谱分析的。PaP3 全长序列中仅存在 3 个 *Kpn*Ⅰ酶切位点，实验发现 PaP3 DNA 经 *Kpn*Ⅰ酶切后，为 4 条带，大小分别约为 22、11、7 和 3 kb，说明 PaP3 DNA 并非为共价闭环状。如果为环状，则应该只有三条带，即 22 kb 片段与 7 kb 片段应该在 A 点(图 1)结合，形成一条 29 kb 的条带。此外，在接近测序结束时，曾在序列的 5′-端和 3′-端设计了多对引物，以完整基因组 DNA 为模板进行 PCR，如果模板为共价环状，则应该在 5′-端和 3′-端之间扩增出连续序列。但结果未能如愿，这进一步证实了 PaP3 DNA 为线性分子。

在证实了该基因组为线状 dsDNA 分子后，还需回答它是线状平端，还是线状粘端？本研究中结合使用限制性酶切图谱分析和恰当的变性、复性实验来回答这一问题。既使用 *Kpn* Ⅰ来酶切天然的、完整的基因组 DNA，酶切完成后使用了两个特殊条件处理：一是在酶切后，产物经 94 ℃变性 5 min，然后缓慢降至室温，再降至 4 ℃，如果有粘性末端，该条件保证了它们有充分机会复性；二是电泳在 4 ℃冰箱内进行，并用温度计监测了电泳全过程中系统内的温度，实际温度没有超过 14 ℃。一般噬菌体的粘性末端多为 10 多个以上碱基，有的达数十个以至上百个碱基，极少有少于 7 个碱基的粘端(如果再少于此数，这种粘端将没有什么生物学意义，因为它们难以形成粘着)[10,11]。即使是 7 个碱基的粘端(往往多为 GC 序列)，那么它们的 Tm 值也应该在 20 ℃以上。因此，在 14 ℃的电泳条件不会使粘着的粘端变性而断开。在这样的条件下，酶切图谱仍然显示为 4 条带的 PaP3 基因组，可以认为是线性 dsDNA 平端分子。

PaP3 基因组测序工作的完成为以下几方面的工作奠定了基础：①PaP3 功能基因组学研究；②PaP3 溶原性机理、溶原性/裂菌性转换及有效诱导手段的研究；③将噬菌体 PaP3 与其它噬菌体以及铜绿假单胞菌基因组等进行比较基因组学研究；④噬菌体与宿主菌相互作用关系的研究；⑤噬菌体介导基因水平转移(尤其是致病基因、耐药基因)，导致生物多样性方面的研究；⑥ 噬菌体工程改造和噬菌体治疗研究。

对 PaP3 基因组的生物信息学分析和进一步的功能基因研究将另文报道。

(致谢：本研究的测序工作部分在上海人类基因组南方中心完成，在此对中心的金维荣、汪敏、苏蓓、屠越峰、丁纯伟老师以及第二军医大学肝胆医院的董辉老师等的出色工作和辛勤劳动表示衷心感谢！)

参考文献：

[1] Boyd E F, Moyer K E, Shi L, *et al*. Infectious CTXPhi and the vibrio pathogenicity island prophage in Vibro mimicus: evidence for recent horizontal transfer between V. mimicus and V. Cholerae[J]. Infect Immun, 2000, 68(3): 1 507－1 513.

[2] Aizo Matsushiro, Koki Sato, Hiroshi Miyamoto, *et al*. Induction of prophages of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7 with norfloxacin[J]. J Bacteriol, 1999, 181(7): 2 257－2 260.

[3] Pereira M S, Barreto V P, Siqueira J J P. Phage-mediated transfer of tetracycline resistance in Staphylococcus aureus isolated from cattle in Brazil[J]. Microbios, 1997, 92(372－373): 147－155.

[4] 网上快讯：噬菌体重返生物治疗舞台[J]. 国外医学：微生物学分册, 1999, 22(4): 42.

[5] Stover C K, Pham X Q, Erwin A L, *et al*. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen[J]. Nature, 2000, 406(6 799): 959－964.

[6] 张克斌. 铜绿假单胞菌噬菌体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.

[7] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社, 1996: 136－137.

[8] Dong H, Lin W, Zhang C K, *et al*. Genomic sequence and expression analyses of human chromatin assembly factor 1 p150 gene[J]. Gene, 2001, 264(2): 187－196.

[9] Fleischmann R D, Adams M D, White O, *et al*. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd[J]. Science, 1995, 269(5 223): 496－512.

[10] Wu R, Taylor E. Nucleotide sequence analysis of DNA. II. Complete nucleotide sequence of the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA[J]. J Mol Biol, 1971, 57(3): 491－511.

[11] Ellis D M, Dean D H. Nucleotide sequence of the cohesive single-strand ends of Bacillus subtilis temperate bacteriophage phi 105[J]. J Viol, 1985, 55(2): 513－515.

(编辑 冷怀明)

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