微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn

Jun. 20, 2016, 43(6): 1244−1252
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.160152

研究报告

枯草芽孢杆菌携带 PBSX 类缺陷性原噬菌体的普遍性调查

晋婷婷[1,2] 付正伟[2] 沈萍[2] 陈向东[2*]

(1. 长治学院生物科学与技术系 山西 长治 046011)
(2. 武汉大学生命科学学院 病毒学国家重点实验室 湖北 武汉 430072)

摘 要:【目的】对来自中国典型培养物保藏中心(CCTCC)的 39 株枯草芽孢杆菌中的 PBSX 类缺陷性原噬菌体进行普遍性调查。【方法】对实验菌株进行丝裂霉素 C (MMC)诱导，得到诱导后的裂解液上清。通过裂解液上清中 13 kb DNA 片段的存在情况，及其对 PBSX 敏感菌 *Bacillus subtilis* W23 的攻击作用，判断该菌株是否携带 PBSX 类缺陷性原噬菌体。同时利用透射电镜检测裂解液上清中噬菌体状颗粒。【结果】39 株检测菌株中，24 株菌裂解液上清含有 13 kb DNA 片段，对 W23 也具有较强的攻击能力，为 PBSX 溶源菌；1 株菌裂解液上清中含有 13 kb DNA 片段，但不能攻击 W23；5 株菌裂解液上清中不含 13 kb DNA 片段，但依然对 W23 具有一定的攻击能力；另外 9 株裂解液上清中不含 13 kb DNA 片段，对 W23 也不具备攻击能力，其中 3 株菌株裂解液上清中能检测到大小不同于 PBSX 的噬菌体状颗粒。【结论】39 株检测菌株中，携带有 PBSX 的菌株占 61.5%的比重，具有一定普遍性；而工业菌株以及分离自神农架土壤中的野生菌株中含有不同于 PBSX 的多种噬菌体状颗粒。本文结果为进一步揭示 PBSX 对于宿主菌的作用提供了更多的理论依据。

关键词：枯草芽孢杆菌，缺陷性原噬菌体，PBSX

General investigation of PBSX-like defective prophages resident in *Bacillus subtilis* strains

JIN Ting-Ting[1,2] FU Zheng-Wei[2] SHEN Ping[2] CHEN Xiang-Dong[2*]

(1. Department of Biological Science and Technology, Changzhi College, Changzhi, Shanxi 046011, China)
(2. State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

Abstract: [Objective] To investigate PBSX-like defective prophages resident in 39 *Bacillus subtilis* strains preserved in China Center for Type Culture Colletion (CCTCC). **[Methods]** *B. subtilis* strains were induced with mitomycin C, yielding cell lysate supernatants. Agarose gel electrophoresis was used to detect the existence of 13 kb DNA fragments in cell lysate supernatants. Cell lysate

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31270145); The National Fund for Fostering Talents of Basic Sciences (No. J1103513); The Research (Innovative) Fund of Laboratory Wuhan University
***Corresponding author:** Tel: 86-27-68754533-82; E-mail: xdchen@whu.edu.cn
Received: February 22, 2016; **Accepted:** April 20, 2016; **Published online** (www.cnki.net)**:** April 21, 2016
基金项目：国家自然科学基金项目(No. 31270145)；国家基础科学人才培养基金资助项目(No. J1103513)；武汉大学实验教学中心开放实验资助项目
*通讯作者：Tel：86-27-68754533-82；E-mail：xdchen@whu.edu.cn
收稿日期：2016-02-22；接受日期：2016-04-20；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2016-04-21

supernatants were mixed with PBSX-sensitive strain, *B. subtilis* W23 to determine the killing activity against W23. Phage-like particles in the cell lysate supernatants were examined with transmission electron microscopy. **[Results]** Cell lysate supernatants of 24 strains were detected to have 13 kb DNA fragments, and had killing activity against W23. They were defined as PBSX lysogenic bacteria. 1 strain's lysate supernatants possessed 13 kb DNA fragments, but had no killing activity against W23. 5 strains' lysate supernatants displayed killing activity against W23 although 13 kb DNA fragments were not detected in them. 9 strains' lysate supernatants did not have 13 kb DNA fragments, as well as had no killing activity against W23. Among the 9 strains, 3 strains' lysate supernatants were detected to have phage-like particles distinguished with PBSX. **[Conclusion]** Among the 39 *B. subtilis* strains, 61.5% are PBSX lysogenic bacteria. Industrial strains and wild strains isolated from soil collected from Shennongjia harbor various phage-like particles distinguished from PBSX. Results in this paper provide more theory evidences for further uncovering the function of PBSX on host bacteria.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Defective prophage, PBSX

PBSX 是存在于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 中的一种特殊的缺陷性原噬菌体，在正常情况下它的编码基因整合在宿主细胞基因组上，并随着宿主细胞基因组一同复制[1]。当宿主细胞受到外界环境刺激，如丝裂霉素 C (MMC)、紫外线(UV)或过氧化氢[2]等因素的诱导时[3]，PBSX 便会在宿主细胞中大量合成[4-5]，并通过裂解宿主细胞而释放到胞外[6-8]。成熟的 PBSX 噬菌体颗粒为头尾状，其头部直径约为 45 nm，尾部长 200 nm[9-10]。较为特殊的是，PBSX 衣壳蛋白中包裹的并非自身编码基因，而是一段只有 13 kb 的、来源于宿主基因组各个区段的、具有随机序列的 DNA 片段[11-14]。因此 PBSX 不能像普通噬菌体一样通过侵染敏感菌株而大量繁殖[15]，也因此而得名为缺陷性原噬菌体。但 PBSX 可以通过自外裂解的方式攻击那些基因组上不含 PBSX 的 *B. subtilis* 菌株[16-17]，且攻击过程中其头部 DNA 不会注射到敏感菌株细胞中[9]。

缺陷性原噬菌体 PBSX 最初由 Seaman 等在 *B. subtilis* 模式菌株 168 中发现[15]。之后，在一些其它 *B. subtilis* 菌株中也发现了 PBSX 或是与 PBSX 类似的缺陷性原噬菌体，它们在形态上十分类似[18-20]。其敏感菌攻击范围也呈现出丰富的多样性。关于缺陷性原噬菌体存在的意义至今不明，曾有人推测它通过对非自身溶源菌的杀伤作用而对自身宿主菌起保护作用[1,21]。2003 年，Westers 等人为地将 PBSX 编码基因进行缺失后，发现其宿主菌的运动性受到了很大程度的影响[22]。Piggot 等的研究也发现，PBSX 的部分基因缺失突变后其宿主菌在基本培养基中的生长速度会大大降低[23]，这说明缺陷性原噬菌体 PBSX 的存在有利于宿主菌在营养贫瘠条件下的正常生长。此外，也有实验证明，存在于缺陷性原噬菌体中的 DNA 具有转化活性[3,9,12]。因此，缺陷性原噬菌体也可以充当 DNA 仓库，为水平基因转移过程的进行提供源源不断的供体 DNA 资源。

以往的研究普遍推测 *B. subtilis* 携带 PBSX 类的缺陷性原噬菌体[6]，目前已经在 NCBI 上公布全基因组序列的 16 株 *B. subtilis* 均携带 PBSX 类缺陷性原噬菌体相关基因，但迄今为止尚无研究者通过具体实验进行这方面的普遍性调查工作。对 *B. subtilis* 携带 PBSX 类原噬菌体普遍性情况的调查，无疑将有助于理解 PBSX 类原噬菌体的生物学意义。由于 PBSX 类缺陷性原噬菌体的特殊性，不能通过常规的噬菌体效价测定法检测其存在及浓度。在前期研究中，我们成功地使用 MMC 诱导菌体，通过细胞裂解液上清中 13 kb DNA 条带的检测，及其对 PBSX 敏感菌株 *B. subtilis* W23 的攻击能力来进行 PBSX 类缺陷性原噬菌体的检测[24]。本文利用中国典型培养物保藏中心(CCTCC)的菌种保藏优势，对其保藏的 39 株 *B. subtilis* 菌株中的 PBSX

类缺陷性原噬菌体的存在情况进行普遍性调查，从而为进一步揭示其存在的意义提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

供试菌株见表 1，*B. subtilis* 168 和 W23 由本实验室保藏，其余 39 株 *B. subtilis* 全部由 CCTCC 提供，各菌株来源详见表 1。

细菌培养所用培养基为 LB 培养基(g/L，胰蛋白胨 10，酵母粉 5，NaCl 5，pH 7.4)，培养条件：37 °C、200 r/min。

1.2 主要试剂和仪器

丝裂霉素C (MMC)，美国罗氏公司；无菌滤器，美国Milipore公司；DNA产物纯化试剂盒，天根生化科技有限公司；真空浓缩仪，湖南赫西仪器公司；中文数显酶标仪，美国赛默飞世尔公司；超速离心机，美国Beckman公司；透射电镜(Tecnai G2 20 TWIN)，美国FEI公司。

1.3 PBSX类缺陷性原噬菌体的诱导

挑取受试菌株单菌落，接种于 5 mL LB 培养基中，37 °C、200 r/min 过夜培养，1%转接至 5 mL LB 培养基中，摇床培养 2.5−3.0 h [活菌数达到 $(2-3)\times10^7$ CFU/mL]。加入终浓度为 4 mg/L 的 MMC，迅速摇动。待充分混匀后，立即将上述 5 mL 菌液全部加入离心管中，12 000 r/min 室温离心 4 min。离心结束后去上清，菌体沉淀用 2 mL 新鲜 LB 洗涤 2 次，最终用 50 μL LB 重悬菌体，全部加入 5 mL LB 培养基中，37 °C、200 r/min 摇床培养 3 h。对照组用等量无菌水替代 MMC 进行相同操作。3 h 培养结束后菌体会裂解，菌液变澄清，取裂解液 12 000 r/min 离心 10 min，取上清，并用孔径为 0.45 μm 的无菌滤器过滤，得到无细胞裂解液上清。

表 1 实验菌株
Table 1 Strains used in this study

枯草芽孢杆菌菌株 *Bacillus subtilis* strains	菌株数量 Number of strains	来源 Resource
168，W23[a]	2	本实验室
AB91021[b]	1	武汉大学医学部
AB92005，AB92006，AB92007	3	美国俄亥俄州立大学枯草杆菌保藏中心
AB92009，AB92011，AB92012	3	湖北天门制药厂
AB93007，AB93010，AB93013，AB93014，AB93015，AB93016，AB93019，AB93020，AB93021，AB93022，AB93023，AB93024，AB93025，AB93026，AB93036	15	英国纽卡素大学医学院微生物系
AB92053，AB93089，AB93090，AB93091，AB93108，AB93150，AB93151，AB93174，AB93177	9	陕西省微生物研究所
AB90008，AB98014，AB98015，AB98016	4	中国科学院微生物研究所
AB93213	1	湖北神农架杉树坪土壤
AB93215	1	湖北神农架木鱼坪土壤
AB93219	1	湖北神农架九冲土壤
AB93221	1	湖北神农架送郎山土壤

注：[a]：*B. subtilis* 168 和 W23 由本实验室保藏；[b]：CCTCC 保藏编号.
Note: [a]: *B. subtilis* 168 and W23 are preserved by the laboratory; [b]: The preservation number in CCTCC.

1.4 细胞裂解液上清中 13 kb DNA 片段的检测

取 2 mL 细胞裂解液上清，在 45 °C 条件下真空浓缩 10 倍后，使用 DNA 产物纯化试剂盒提取 DNA。取上述样品进行琼脂糖凝胶电泳，检测 13 kb DNA 片段的存在情况。

1.5 细胞裂解液上清对 PBSX 敏感菌 W23 的攻击实验

挑取 *B. subtilis* W23 单菌落进行活化后(详见方法 1.3)，1%接种量转接至 5 mL LB 培养基中培养过夜。裂解液上清与 *B. subtilis* W23 菌液 100 μL+100 μL 等体积混合并加入酶标板中，使用 Thermo 中文数显酶标仪立即测其 OD_{630} 值。之后将酶标板放置于 37 °C 温室中静置 1 h 后，再次测定其 OD_{630} 值。根据裂解液上清与 *B. subtilis* W23 菌液混合 1 h 后 OD_{630} 值的降低情况，判断相应菌株裂解液上清对 *B. subtilis* W23 的攻击能力。168 菌体裂解液上清和 LB 培养基分别与 *B. subtilis* W23 菌液 100 μL+100 μL 等体积混合，分别作为阳性和阴性对照。

1.6 细胞裂解液上清中 PBSX 类缺陷性原噬菌体的电镜观察

取制备好的裂解液上清进行超速离心(Beckman 70 Ti 转子，25 000 r/min，4 °C，2 h)。离心后沉淀中加入 TMK buffer (Tris-HCl 0.01 mol/L，$MgCl_2$ 5 mmol/L，KCl 0.3 mol/L，pH 7.2)置于冰上过夜重悬。噬菌体样品使用 2% PTA 负染后，进行透射电镜(FEI Tecnai G2 20 TWIN)观察。

2 结果与分析

2.1 39 株枯草芽孢杆菌裂解液上清中 PBSX 类缺陷性原噬菌体的检测

对 39 株 *B. subtilis* 裂解液上清中 13 kb DNA 片段及其对菌株 W23 攻击作用进行检测后(图 1、2，表 2)，我们发现，24 株菌(来源于英国纽卡素大学医学院微生物系的全部 15 株菌株，美国俄亥俄州立大学枯草杆菌保藏中心的 AB92006 和 AB92007，陕西省微生物研究所的 AB92053 和 AB93174，中国科学院微生物研究所的全部 4 株菌，以及来源于

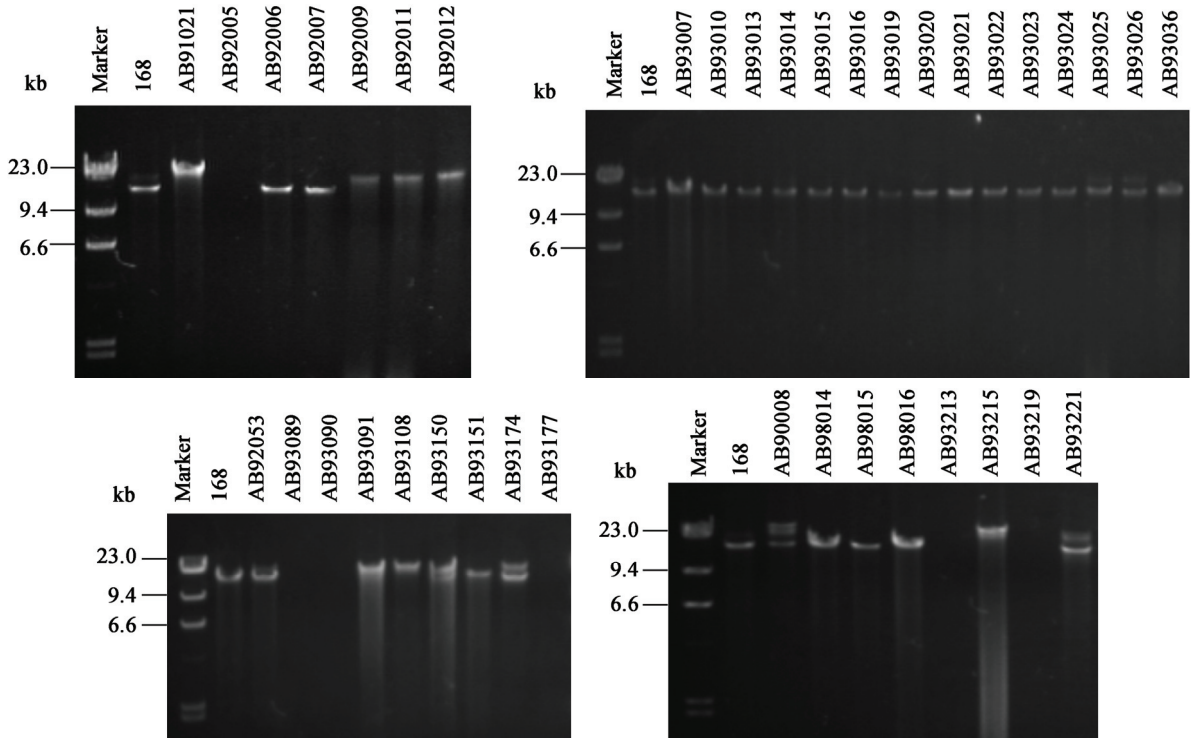

图 1 裂解液上清中 13 kb DNA 片段检测

Figure 1 Detection of 13 kb DNA fragments in cell lysate supernatants

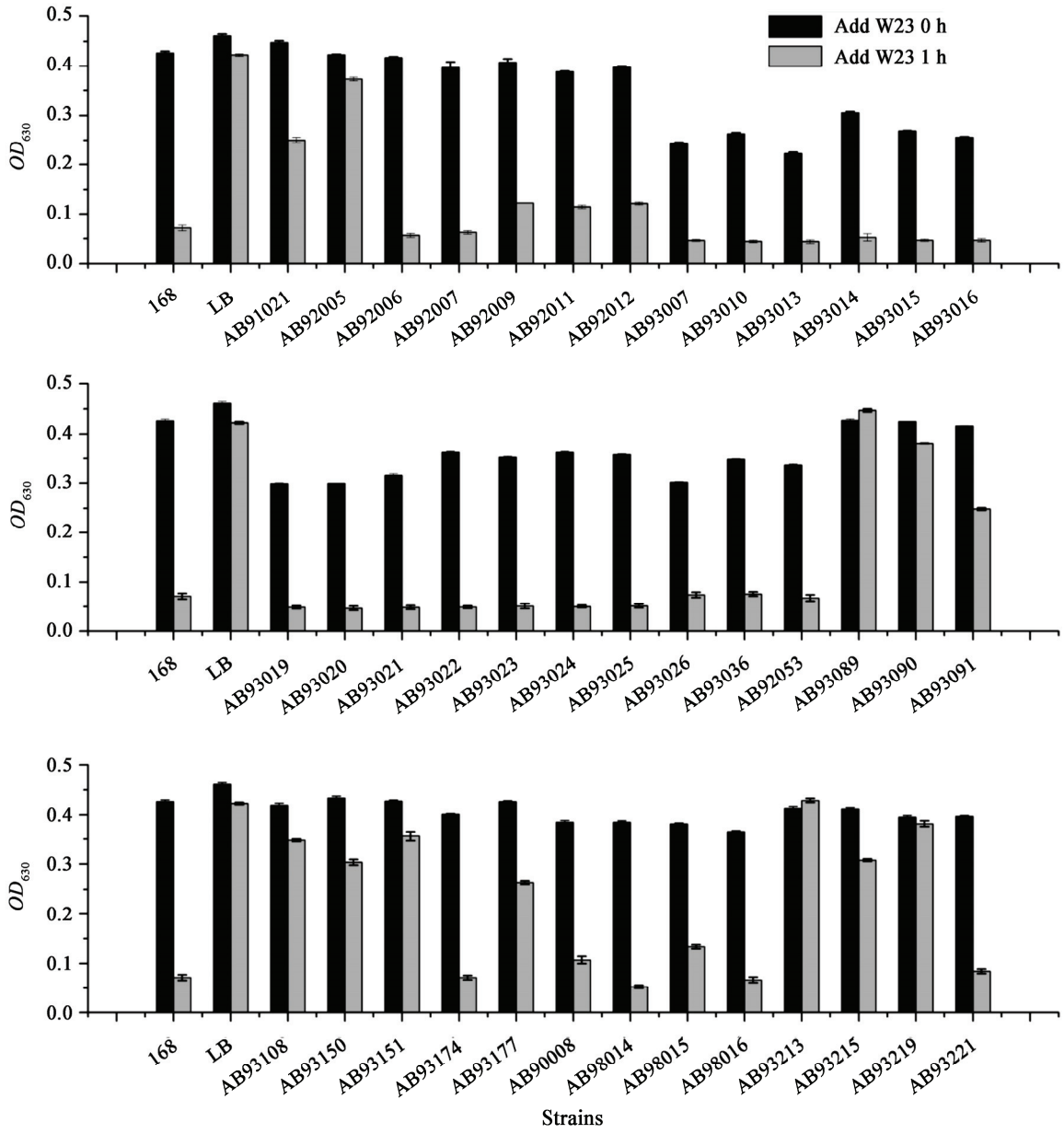

图 2 裂解液上清对 *B. subtilis* W23 的攻击性

Figure 2 Killing activity of cell lysate supernatants against *B. subtilis* W23

表 2 PBSX 类缺陷性原噬菌体的检测
Table 2 Detection of PBSX-like defective phage

枯草芽孢杆菌菌株 *Bacillus subtilis* strains	来源 Resource	13 kb DNA 片段检测 [a] Detection of 13 kb DNA fragment[a]	对 W23 的攻击性 [b] Killing activity against W23[b]
168	本实验室	+	++
W23	本实验室	/	/
AB91021	武汉大学医学部	−	−
AB92005	美国俄亥俄州立大学枯草杆菌保藏中心	−	−
AB92006	美国俄亥俄州立大学枯草杆菌保藏中心	+	++
AB92007	美国俄亥俄州立大学枯草杆菌保藏中心	+	++
AB92009	湖北天门制药厂	−	+
AB92011	湖北天门制药厂	−	+
AB92012	湖北天门制药厂	−	+
AB93007	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93010	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93013	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93014	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93015	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93016	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93019	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93020	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93021	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93022	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93023	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93024	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93025	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93026	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB93036 (BR151)	英国纽卡素大学医学院微生物系	+	++
AB92053	陕西省微生物研究所	+	++
AB93089	陕西省微生物研究所	−	−
AB93090	陕西省微生物研究所	−	−
AB93091	陕西省微生物研究所	−	+
AB93108	陕西省微生物研究所	−	−

(待续)

(续表)

AB93150	陕西省微生物研究所	+	−
AB93151	陕西省微生物研究所	−	−
AB93174	陕西省微生物研究所	+	++
AB93177	陕西省微生物研究所	−	+
AB90008	中国科学院微生物研究所	+	++
AB98014	中国科学院微生物研究所	+	++
AB98015	中国科学院微生物研究所	+	+
AB98016	中国科学院微生物研究所	+	++
AB93213	湖北神农架杉树坪土壤	−	−
AB93215	湖北神农架木鱼坪土壤	−	−
AB93219	湖北神农架九冲土壤	−	−
AB93221	湖北神农架送郎山土壤	+	++

注：[a]：凡是裂解液上清中能检测到 13 kb DNA 片段的，即表示为“+”，反之则表示为“−”. [b]：“+”的数量表示裂解液上清对 W23 的攻击程度. ++：具有较强的攻击能力；+：具有微弱的攻击能力；−：不具备攻击能力.

Note: [a]: +: 13 kb DNA fragments could be detected in the cell lysate supernatants, −: 13 kb DNA fragments could not be detected in the cell lysate supernatants. [b]: The number of “+” indicates the degree of killing activity. ++: High; +: Low; −: No killing activity.

湖北神农架土壤中的 AB93221)，裂解液上清中不仅含有 13 kb DNA 片段，同时对 *B. subtilis* W23 也具有较强的攻击能力，初步确定为 PBSX 类缺陷性原噬菌体溶原菌。其中，有 2 株菌(AB93174 和 AB90008)裂解液上清中除了 13 kb DNA 片段，还能检测到一条分子量大于 13 kb 的 DNA 片段。1 株菌(AB93150)裂解液中含有 13 kb DNA 片段，但不能攻击 *B. subtilis* W23。5 株菌(湖北天门制药厂的 AB92009、AB92011、AB92012，陕西省微生物研究所的 AB93091 和 AB93177)裂解液中不含 13 kb DNA 片段，但依然对 *B. subtilis* W23 具有一定的攻击能力，说明其裂解液中可能含有不同于 PBSX 但能攻击 *B. subtilis* W23 的杀菌性物质。另外 9 株菌(武汉大学医学部的 AB91021，美国俄亥俄州立大学枯草杆菌保藏中心的 AB92005，陕西省微生物研究所的 AB93089、AB93090、AB93108、AB93151，以及湖北神农架土壤的 AB93213、AB93215、AB93219)裂解液中既不含 13 kb DNA 片段，同时对 *B. subtilis* W23 也不具备任何攻击能力。此外，AB91021、AB92009、AB92011、AB92012、AB93091、AB93108 和 AB93215，这 7 株菌种的裂解液上清中虽然不含 13 kb DNA 片段，但它们均含有一条分子量大于 13 kb 的 DNA 片段。

2.2 *B. subtilis* AB93213、AB93215、AB93219 裂解液上清电镜观察

在实验过程中，我们挑选了 3 株初步断定未携带 PBSX 类缺陷性原噬菌体的菌株 AB93213、AB93215 和 AB93219，对其裂解液上清进行电镜观察。结果意外发现，尽管这 3 株菌裂解液上清中不含 13 kb DNA 片段，同时也不能攻击 *B. subtilis* W23，但它们的裂解液上清中均能检测到类似于噬菌体的颗粒(图 3)。在 AB93213 裂解液上清中(图 3A)，观察到两种大小不同的头尾状颗粒，它们的头部直径分别为 65 nm 和 37 nm，尾长分别为 124 nm 和 204 nm。这两种噬菌体状颗粒的形态尺寸均不同于 PBSX。在 AB93215 裂解液上清中(图 3B)，也存

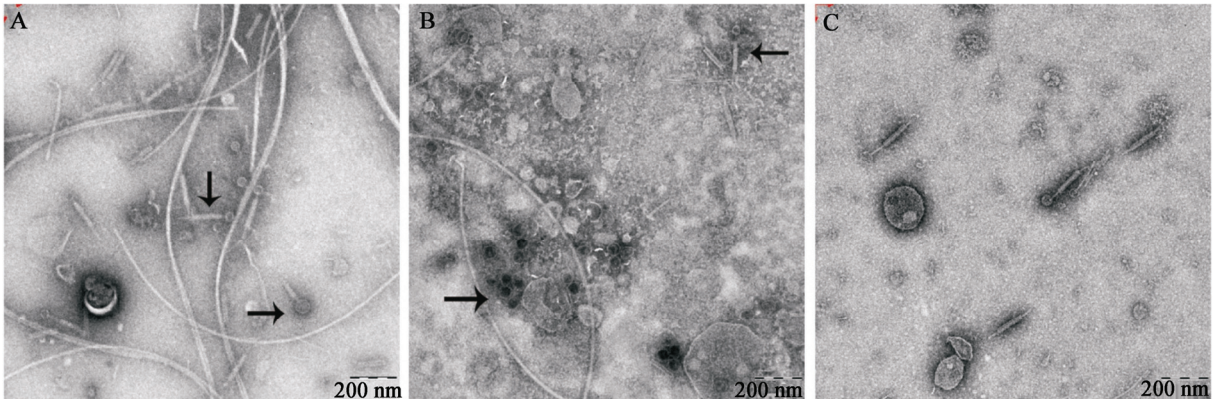

图 3 *B. subtilis* AB93213 (A)、AB93215 (B)和 AB93219 (C)裂解液上清中噬菌体颗粒电镜观察

Figure 3 Transmission electron micrographs of phage-like particles in cell lysate supernatants of *B. subtilis* AB93213 (A), AB93215 (B), and AB93219 (C)

在两种形态的噬菌体状颗粒，一种为头尾状，头部直径和尾长分别为 40 nm 和 127 nm，其尾长远远小于 PBSX；另一种噬菌体状颗粒为球状，直径约为 40 nm；而在 AB93219 裂解液上清中(图 3C)，观察到一种头尾状噬菌体状颗粒，头部直径和尾长分别为 51 nm 和 218 nm，均高于 PBSX。以上结果说明，这 3 株菌株均携带有基本特性有别于 PBSX 的噬菌体状颗粒。

3 结论与讨论

本文所使用并建立了初步检测 PBSX 类缺陷性原噬菌体的方法，即利用 MMC 诱导后裂解液上清中 13 kb 特征性 DNA 条带的检测，以及使用酶标仪测定菌液 OD_{630} 来验证裂解液对 PBSX 敏感菌 W23 的攻击作用。该方法快速简便，可以在短时间内初步检测到 PBSX 类缺陷性原噬菌体的存在情况。该方法对于其它类型缺陷性原噬菌体的检测也同样具有借鉴和应用价值。利用该方法，我们对中国典型培养物保藏中心所保藏的 39 株具有不同来源的 *B. subtilis* 菌株，进行了 PBSX 类缺陷性原噬菌体携带情况的普遍性调查。含有 PBSX 类缺陷性原噬菌体的菌株占到了 61.5%，说明 PBSX 溶源菌在 *B. subtilis* 中具有普遍性。此外，PBSX 溶源菌在受试菌株中占如此高的比例，结合 Westers[22] (PBSX 有利于宿主菌维持正常运动性)和 Piggot[23] 等(PBSX 有利于宿主菌在基本培养基中生长)的研究结果，这暗示了 PBSX 的存在对于宿主适应环境是有利的。本文结果为进一步揭示 PBSX 存在的意义，及其对宿主菌的作用提供了更多的理论依据。

在普查的这 39 株 *B. subtilis* 菌株中，来源于湖北天门制药厂的全部 3 株菌的裂解液都可以攻击 *B. subtilis* W23，但未检测到 PBSX 特征性 13 kb DNA 条带的存在，推测这 3 株菌可能携带能够攻击 *B. subtilis* W23，但不同于 PBSX 的噬菌体类似物质。分离自湖北神农架土壤的 4 株菌株，有 3 株菌(AB93213、AB93215 和 AB93219)的裂解液上清既不含 13 kb DNA，也不能攻击 *B. subtilis* W23；但在这 3 株菌的裂解液上清中，通过电镜观察到类似于噬菌体的颗粒(图 3)；而且在 AB93213 和 AB93215 裂解液上清中均检测到了两种形态的噬菌体状颗粒；这 3 株菌裂解液上清中的噬菌体状颗粒的形态大小均不同于 PBSX。因此我们推测，这 3 株分离自神农架土壤中的野生菌株，携带有不同于 PBSX 的噬菌体状颗粒；但这些噬菌体状颗粒究竟与 PBSX 之间是否存在联系，有多大差别，还需要通过实验进一步验证。从本文实验数据来看，工业菌株和野生菌株中含有丰富的噬菌体资源，这为进一步研究 *B. subtilis* 中的 PBSX 类以及其它相关噬菌体提供了丰富的研究资源。

参 考 文 献

[1] Wood HE, Dawson MT, Devine KM, et al. Characterization of PBSX, a defective prophage of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(5): 2667-2674

[2] Hartford OM, Dowds BC. Cloning and characterization of genes induced by hydrogen peroxide in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of General Microbiology, 1992, 138(10): 2061-2068

[3] Siegel EC, Marmur J. Temperature-sensitive induction of bacteriophage in *Bacillus subtilis* 168[J]. Journal of Virology, 1969, 4(5): 610-618

[4] Thurm P, Garro AJ. Bacteriophage-specific protein synthesis during induction of the defective *Bacillus subtilis* bacteriophage PBSX[J]. Journal of Virology, 1975, 16(1): 179-183

[5] McDonnell GE, Wood H, Devine KM, et al. Genetic control of bacterial suicide: regulation of the induction of PBSX in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(18): 5820-5830

[6] Longchamp PF, Mauel C, Karamata D. Lytic enzymes associated with defective prophages of *Bacillus subtilis*: sequencing and characterization of the region comprising the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase gene of prophage PBSX[J]. Microbiology, 1994, 140 (8): 1855-1867

[7] Krogh S, Jørgensen ST, Devine KM. Lysis genes of the *Bacillus subtilis* defective prophage PBSX[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(8): 2110-2117

[8] Ward JB, Curtis CA, Taylor C, et al. Purification and characterization of two phage PBSX-induced lytic enzymes of *Bacillus subtilis* 168: an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and an N-acetylmuramidase[J]. Journal of General Microbiology, 1982, 128(6): 1171-1178

[9] Okamoto K, Mudd JA, Mangan J, et al. Properties of the defective phage of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Molecular Biology, 1968, 34(3): 413-428

[10] Mauël C, Karamata D. Characterization of proteins induced by mitomycin C treatment of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Virology, 1984, 49(3): 806-812

[11] Anderson LM, Bott KF. DNA packaging by the *Bacillus subtilis* defective bacteriophage PBSX[J]. Journal of Virology, 1985, 54(3): 773-780

[12] Hirokawa H, Kadlubar F. Length of deoxyribonucleic acid of PBSX-like particles of *Bacillus subtilis* induced by 4-nitroquinoline-1-oxide[J]. Journal of Virology, 1969, 3(2): 205-209

[13] Okamoto K, Mudd JA, Marmur J. Conversion of *Bacillius subtilis* DNA to phage DNA following mitomycin C induction[J]. Journal of Molecular Biology, 1968, 34(3): 429-437

[14] Shingaki R, Kasahara Y, Inoue T, et al. Chromosome DNA fragmentation and excretion caused by defective prophage gene expression in the early-exponential-phase culture of *Bacillus subtilis*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2003, 49(5): 313-325

[15] Seaman E, Tarmy E, Marmur J. Inducible phages of *Bacillus subtilis*[J]. Biochemistry, 1964, 3(5): 607-613

[16] Steensma HY. Adsorption of the defective phage PBS Z1 to *Bacillus subtilis* 168 Wt[J]. Journal of General Virology, 1981, 52(1): 93-101

[17] Steensma HY. Effect of defective phages on the cell membrane of *Bacillus subtilis* and partial characterization of a phage protein involved in killing[J]. Journal of General Virology, 1981, 56(2): 275-286

[18] Steensma HY, Robertson LA, van Elsas JD. The occurrence and taxonomic value of PBS X-like defective phages in the genus *Bacillus*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1978, 44(3/4): 353-366

[19] Haas M, Yoshikawa H. Defective bacteriophage PBSH in *Bacillus subtilis*. I. Induction, purification, and physical properties of the bacteriophage and its deoxyribonucleic acid[J]. Journal of Virology, 1969, 3(2): 233-247

[20] Huang WM, Marmur J. Characterization of inducible bacteriophages in *Bacillus licheniformis*[J]. Journal of Virology, 1970, 5(2): 237-246

[21] Buxton RS. Selection of *Bacillus subtilis* 168 mutants with deletions of the PBSX prophage[J]. Journal of General Virology, 1980, 46(2): 427-437

[22] Westers H, Dorenbos R, van Dijl JM, et al. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2003, 20(12): 2076-2090

[23] Piggot PJ, Buxton RS. Bacteriophage PBSX-induced deletion mutants of *Bacillus subtilis* 168 constitutive for alkaline phosphatase[J]. Journal of General Microbiology, 1982, 128(4): 663-669

[24] Jin TT, Zhang XM, Zhang Y, et al. Biological and genomic analysis of a PBSX-like defective phage induced from *Bacillus pumilus* AB94180[J]. Archives of Virology, 2014, 159(4): 739-752