

蛭弧菌研究进展<sup>\*</sup>朱文漓<sup>1 2</sup> 李永文<sup>1 3</sup> 屈刚<sup>1</sup> 吴江<sup>2</sup> 徐恒<sup>1 2 \* \*</sup>

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610064)

(通威股份通威水产科技有限公司 成都 610081) (天津医科大学总医院肺癌研究所 天津 350052)<sup>3</sup>

**摘要** 蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)是一类专性捕食革兰氏阴性菌的寄生细菌,在自然界分布广泛。蛭弧菌研究集中在蛭弧菌分类和基因组分析上,并以此指导蛭弧菌噬菌机制的研究,同时在生态学研究方面也有进展。蛭弧菌的噬菌性质可能作为一种行使杀菌功能的“活抗生素”成为目前研究热点。但在应用方面还存在一些需进一步研究和解决的问题。

**关键词** 蛭弧菌 噬菌 研究进展

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0808-04

Progress in Research of *Bdellovibrio*<sup>\*</sup>ZHU Wen-Li<sup>1 2</sup> LI Yong-Wen<sup>1 3</sup> QU Gang<sup>1</sup> WU Jiang<sup>2</sup> XU Heng<sup>1 2 \* \*</sup>

(Key Lab of Education Ministry for Biological Resources and Ecological Environment, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064) (Tongwei Group Tongwei Aquatic Science&Technology Co. Ltd, Chengdu 610081)<sup>3</sup>  
(Lung cancer Institute, Tianjin Medical University Hospital, Tianjin 350052)

**Abstract** *Bdellovibrio* is a kind of predatory bacteria that invade the other Gram-negative bacteria. It acts just like phages and it's abundant in existence. Recently, foreign researchers begin to focus on *Bdellovibrio*. The researches about *Bdellovibrio* focus on the aspects below: the taxonomy of BALOs, the genome analysis and phagocytosis mechanism of *Bdellovibrio*, the ecology of *Bdellovibrio*. Meanwhile, the phagocytosis of *Bdellovibrio* makes the researchers take interest in the application of using it as therapeutic agents, and lots of works have been done. They have found some problems in the application as well. Plenty of researches which are about the phagocytosis mechanism and application have to be done in the future.

**Key words** *Bdellovibrio* Phagocytosis Research progress

1962 年, Stolp 和 Petiold 在土壤中发现了蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)<sup>[6]</sup>。这是一类捕食革兰氏阴性菌的寄生细菌,在自然界广泛分布。随着分子生物学技术的发展,对其的研究集中在分类和基因组分析上;另外,蛭弧菌作为“活抗生素”可能性问题也成为热点。

## 1 蛭弧菌研究热点与进展

### 1.1 蛭弧菌的分类问题

伯杰氏(Bergey's)细菌鉴定手册第九版中将蛭弧菌列入薄壁菌门蛭弧菌属,分为 *Bd bacteriovorus*, *Bd stolpii* 和 *Bd starrii*, 以及一种自海水中分离尚未

确定分类地位的细菌 4 种。Andrew R Snyder 等<sup>[4]</sup>认为该分类方法可能不适合蛭弧菌,尝试利用基因组信息确定其分类地位。我们实验室分离得到几株蛭弧菌后曾尝试利用 16S rDNA 的方法来对得到的菌株进行系统分类定位。虽然国外期刊已有利用 16S rDNA 确定分类地位的报道<sup>[3, 4, 7]</sup>,但我们参照文献和改进方法都没能清除宿主菌基因的影响,得不到可信的结果。

Marcie L Baer 和 Jacques Ravel 等<sup>[3, 5, 7]</sup>认为以前确定的蛭弧菌属中只有一个种——噬菌蛭弧菌(*Bd bacteriovorus*)。新命名的 *Bacteriovorax* 属中包括斯托普蛭弧菌(*Bd stolpii*)、斯塔耳蛭弧菌(*Bd starrii*)以及

\* 通威股份科技发展项目

\*\* 通讯作者 Tel: 028-85414644, E-mail: xuheng@email.scu.edu.cn

收稿日期: 2006-09-12, 修回日期: 2007-03-06

尚未确定分类地位的海洋蛭弧菌。与蛭弧菌有相似生活机制的一类细菌称为 BALOs 或 BLOs (*Bdellovibrio* and like organisms), 主要指 *Bdellovibrio* 和 *Bacteriovorax* 属中的细菌<sup>[4,5]</sup>。蛭弧菌的分类地位还未完全确定,是由于其可处于自然界中的各种环境且种类繁多,无法进行十分系统的研究;并且其特殊的宿主菌-蛭弧菌的二组分生存系统不适合使用已有的分类鉴定法。

1.2 蛭弧菌的基因组分析

Snjezana Rendulic 等 2004 年发表了对

*B. bacteriovorus* HD100 基因组的测序结果(表 1)<sup>[2]</sup>, 其环状染色体上有 3782950 个碱基对,预测编码 3584 个蛋白。基因组中发现 36 个 tRNA 基因和两个 rRNA 基因簇,有一个转座元件 ISBba777 和一个未知前噬菌体(unknown *Bdellovibrio* prophage),编码丰富的水解酶和转运子。预测的编码序列的 55% 可以据其同源性认定功能。可预测的 ORFs 的 11% 编码蛋白跟未知功能蛋白有同源性,而 34% 的 ORFs 编码蛋白看不出功能。没有发现蛭弧菌基因组中有宿主基因。

表 1 *B. bacteriovorus* HD100 基因组的重要特性<sup>[2]</sup>

Species	<i>B. bacteriovorus</i>	
Strain	HD100(Deutsche Sammlung Mikroorganismen DSM50701)	
Size	3782950bp	tRNA genes 36
GC content	50.7%	Mobile genetic elements 1 IS element 4 transposases
GC in coding areas	50.4%	Four regions of deviating GC content LPS synthesis
Predicted number of ORFs	3584	Prophage insertion in tRNA <sup>met</sup>
Coding sequences( CDS )	1995	Ribosomal gene cluster
Similar to known proteins		Restriction modification system
Conserved hypothetical proteins	382	CDS coding for hydrolytic enzymes 150 proteases/peptidases
Hypothetical proteins	1207	20 DNases
Coding potential	93%	9 RNases
Average CDS length	982bp	10 glycanases
rRNA operons	2	15 lipases
		89 other

1.3 蛭弧菌裂解宿主菌的作用机制

1.3.1 识别:攻击阶段(无复制发生)的蛭弧菌在鞭毛波形运动下靠辨别密集的宿主菌群产生的丝氨酸内酯<sup>[2]</sup>高速向宿主菌富集区域前进,无鞭毛端与宿主菌接触<sup>[1]</sup>(图 1)。蛭弧菌基因组中有 6 个成簇的

运动与鞭毛合成基因。

1.3.2 吸附与侵入 蛭弧菌在高速运动中与宿主短暂“识别”后以无鞭毛端吸附在宿主细胞壁上<sup>[1]</sup>。在鞭毛蛋白编码基因(*pil*)上发现位点 *hit* 的缺失会使蛭弧菌无法吸附宿主。蛭弧菌基因组中 *tad*(包括鞭毛装配基因 *tadA* 与 *tadB*)与 *pil* 基因是吸附与侵入所必需的<sup>[2]</sup>。蛭弧菌攻击宿主的一个机制是形成渗透孔<sup>[1]</sup>。宿主菌的小部分胞外膜和细胞壁被降解,利于蛭弧菌进入;降解停止后渗透孔封闭。预测蛭弧菌基因组中多数基因都与吸附过程有关。当蛭弧菌接触到宿主细胞肽聚糖内表面时,纤毛运动会推进蛭弧菌穿过渗透孔<sup>[2]</sup>。单个蛭弧菌接触并吸附宿主菌后,其它蛭弧菌便不能再吸附。吸附作用通常维持数分钟,侵入只需几秒钟。

1.3.3 定位与合成:进入周质空间后,蛭弧菌鞭毛停止运动并释放酶改造宿主胞壁,粘附在宿主胞膜上。之后形态变化,鞭毛脱落,菌体变长。宿主细胞由杆状变为圆球状,形成蛭质体(*bdelloplast*)<sup>[1]</sup>。

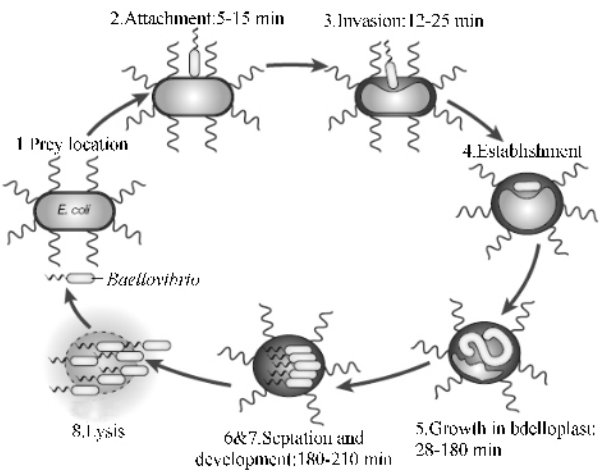


图 1 蛭弧菌生活周期<sup>[1]</sup>

此时蛭弧菌复制 DNA。基因组研究发现其有几个编码修改宿主肽聚糖酶的基因。蛭弧菌编码的大量多种转运子<sup>[2]</sup>吸取宿主胞质溶解物,这些物质要穿过宿主细胞膜和蛭弧菌细胞内外膜。有待研究的是宿主的膜转运系统是否在其自身胞质溶解物转运到蛭弧菌细胞的过程中发挥作用,蛭弧菌为了转运宿主的胞质溶解物是否将自身基因编码产物主动插入宿主细胞膜。Beck 和 Schwudke 等认为蛭弧菌可能在宿主周质空间中合成蛋白,不直接使用宿主蛋白<sup>[10]</sup>。*B. bacteriovorus* HD100 仅能合成 11 种蛋白质合成所需氨基酸,有 10 种氨基酸降解途径缺失,却存在激活所有种类 tRNA 的酶,表明蛭弧菌摄取到宿主氨基酸才进行蛋白生物合成。蛭弧菌可能是将宿主细胞内大分子降解后转运,将其合成自身所需大分子<sup>[2]</sup>。

**1.3.4 复制** 丝状的蛭弧菌细胞会长到几个普通蛭弧菌细胞的尺寸,后期形成膈将丝状细胞分成奇数个同样大小的子代细胞<sup>[1]</sup>。蛭弧菌利用宿主 DNA 合成自身 DNA,但宿主 DNA 总量通常小于蛭弧菌子代细胞 DNA 总量,即蛭弧菌会合成大量核苷酸。*B. bacteriovorus* HD100 基因组中有一套完整的嘌呤嘧啶合成基因,还有一个完整的合成一种特殊的类脂 A 分子的 LPS 合成途径<sup>[2,9,10]</sup>。

**1.3.5 增殖与释放** 宿主细胞质耗尽后,蛭弧菌分裂成子细胞并合成鞭毛。随着细胞增殖和水解酶产生,剩余宿主细胞膜被破坏,蛭弧菌被释放,寻找新宿主菌。单个蛭弧菌的生活周期会持续 4h ~ 6h<sup>[1]</sup>。

蛭弧菌的水解酶在其进入宿主细胞壁、降解宿主生物大分子聚合物以及裂解蛭质体这 3 个阶段都是至关重要的<sup>[2]</sup>。而蛋白酶和肽酶在基因组中的高密度表明它们在蛭弧菌生活周期中也十分重要。蛭弧菌的噬菌作用机制尚不明确,基因组数据会提供有用的参考。

#### 1.4 对蛭弧菌基因组中 *hit* 位点的研究

*Hit* 位点(*host-interaction locus*)是蛭弧菌在吸附和侵入阶段发挥作用的基因位点。Cotter 和 Thomashow<sup>[12]</sup>通过比较 H-I 突变株和 H-D(*host-dependent*)野生型菌株发现了 *hit* 位点。但除在 *B. bacteriovorus* 属菌株中发现 *hit* 位点,在 BALOs 的其它属中尚未发现和 *hit* 相似的位点<sup>[11,13,14]</sup>。*Hit* 仍

是至今为止被发现的唯一对于蛭弧菌与宿主相互作用有功能的位点<sup>[12]</sup>。*Hit* 位点包含 959bp<sup>[11]</sup>,没有明显 ORF<sup>[2]</sup>,可能包含编码一种 10.6kD 蛋白的 ORF。这种小蛋白分泌到胞外,侵入时作为酶或起调控作用<sup>[18]</sup>。*Hit* 位点紧跟在成簇的鞭毛编码基因后<sup>[2]</sup>(图 2),暗示鞭毛在蛭弧菌侵入宿主细胞时的重要作用<sup>[15]</sup>。*Hit* 位点突变引起蛭弧菌渗透作用减弱<sup>[11]</sup>。Schwudke 等的研究表明(图 3)*hit* 两侧预测的鞭毛编码基因和一些邻近编码基因可能形成一个转录单位<sup>[2,11]</sup>。基因组中预测的鞭毛编码基因(*cpaB*, *cpaC*, *tadA*, *tadB*)上游有两个小 ORFs,预测是鞭毛基因家族亚族——*flp*。整个生活周期中,*flp* 的转录量比 *hit* 高 2 ~ 3 个数量级,且二者转录趋势相似,这种趋势又和培养基中自由蛭弧菌数量变化趋势相似<sup>[11]</sup>。可能的解释是:*hit* 不编码蛋白,起调控作用,*flp* 编码重要的鞭毛蛋白。Cotter 和 Thomashow<sup>[12]</sup>、Gili Bare 和 Edouard Jurkevitch<sup>[8]</sup>研究表明 *hit* 位点的突变对于 HI 显型的出现是次要影响因素,不是引起 HI 显型的原因。除 *hit* 位点外,英国的 Lambert 等研究了蛭弧菌基因组中的 MCP (methyl-accepting chemotaxis protein)编码基因<sup>[16]</sup>,发现敲除 *mcp2* 基因的蛭弧菌侵染宿主的速度明显变慢,证明蛭弧菌寻找宿主的趋向性。另外,还有对 109J 的 *motAB* 基因操纵子<sup>[17]</sup>中 *motA* 对蛭弧菌的寄生生活必要性的报道。

#### 1.5 蛭弧菌微生态的相关研究进展

微生态研究对搞清蛭弧菌寄生机制和将蛭弧菌用作生物治疗剂非常有价值。Afinogenova 等<sup>[23]</sup>认为自然环境中蛭弧菌可在细胞群(biofilm)中生存。Markelova 等<sup>[20,21]</sup>研究了异物对自由活动和固定生长的蛭弧菌生长情况的影响,发现蛭质体在蛭弧菌对异化物质的适应过程中起保护作用,认为固定影响蛭弧菌的某些基因表达。固定的蛭弧菌长期持续蛭质体形态<sup>[22]</sup>,推测固体表面为蛭弧菌提供更好的生境<sup>[5]</sup>。美国研究者还利用 AFM(atomic force microscopy)对蛭弧菌在细胞群中的生活周期进行研究<sup>[19,24]</sup>。Megan E Nunez 等报道蛭弧菌可侵入细胞群减少宿主数量<sup>[19]</sup>。目前还没有深入研究蛭弧菌微生态,但这方面的研究将对蛭弧菌的实际应用至关重要。

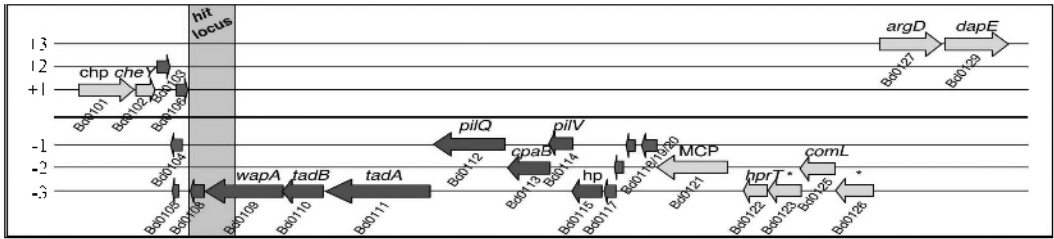


图 2 *B. bacteriovorus* HD100 基因组中与宿主相互作用有关的位点 *hit*<sup>[2]</sup>

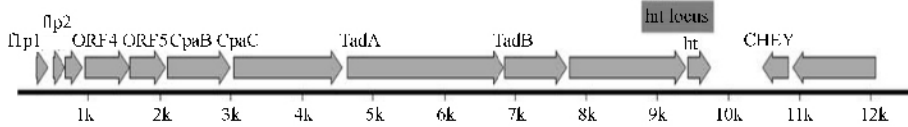


图 3 *B. bacteriovorus* HD114 关于 *hit* 位点及其两侧序列的遗传图<sup>[12]</sup>

2 展望

参考文献

蛭弧菌的噬菌性使研究者们对利用其作为一种可以行使杀菌功能的“活抗生素”发生了浓厚的兴趣并做了大量工作。蛭弧菌所呈现的一些特性:广泛的革兰氏阴性病原菌寄主、无产毒素的 LPS、极低的外源 DNA 插入水平以及适用于组合疗法的对其它制剂的天然抗性,是将蛭弧菌作为抗菌剂的有利条件。拥有广泛的宿主不完全是优点,它可能会寄生于对人体有益的共生微生物群上<sup>[1]</sup>。我们在实验中发现蛭弧菌的裂解能力有变迁过程。即蛭弧菌的噬菌斑在初期培养阶段一般较小,不能汇合裂解,培养一段时间后,单个噬菌斑会比初期培养时明显增大,最终汇合裂解。同时,保存一段时间后重新培养的蛭弧菌不仅效价降低,噬斑也减小。实验中最难解决的是蛭弧菌的保存,有关的国内外报道较少。我们综合国内外报道利用平板、甘油、液氮进行保存,但发现蛭弧菌的效价仍然下降,保存 3 个月无法复壮。

国外还对利用蛭弧菌作为食品工业杀菌剂或利用其改变生态环境、净化水体污染及利用蛭弧菌替代抗生素进行人体治疗的可行性<sup>[1]</sup>进行了一些研究,研究中已发现很多问题。另一株蛭弧菌基因组的测序工作即将完成,之后可以将两株蛭弧菌的基因组进行比较,进一步了解寄生所需基因,预测这些基因会超过 240 个<sup>[6]</sup>。蛭弧菌本身的一些特性不利于应用,在完全弄清其基因作用后,可能会进行基因修饰工作<sup>[6]</sup>。总之,对蛭弧菌的研究和将其有效的利用于实际生产还需要很长的过程。

[ 1 ] R Elizabeth S ,Carey L. Nature , 2004 , **2** : 669 ~ 675 .  
[ 2 ] Snjezana R ,Pratik J. Science , 2004 , **303** : 689 ~ 692 .  
[ 3 ] Marcie L B ,Jacques R. Int J Syst Evol Micr , 2000 , **50** : 219 ~ 224 .  
[ 4 ] Andrew R S ,Henry N W ,Marcie L B. Int J Syst Evol Micr , 2002 , **52** : 2089 ~ 2094 .  
[ 5 ] Shemesh Y ,Davidov Y ,Koval S ,et al . Agronomie , 2003 , **23** : 433 ~ 439 .  
[ 6 ] Andrew M. Embo Reports , 2004 , **5** : 754 ~ 757 .  
[ 7 ] Marcie L B , Jacques R ,Silvia A , et al . Int J Syst Evol Micr , 2004 , **54** : 1011 ~ 1016 .  
[ 8 ] Gili B ,Edouard J. Arch Microbiol , 2001 , **176** : 211 ~ 216 .  
[ 9 ] Dominik S ,Michael Li. J Biol Chem , 2003 , **278** : 27502 ~ 27512 .  
[ 10 ] Sebastian B , Dominik S ,Eckhard S , et al . J Bacteriol , 2004 , **186** : 2766 ~ 2773 .  
[ 11 ] Dominik S ,Anne B ,Sebastian B , et al . Curr Microbiol , 2005 , **51** : 310 ~ 316 .  
[ 12 ] Todd W C ,Michael F T. J Bacteriol , 1992 , **174** : 6018 ~ 6024 .  
[ 13 ] Jurkevitch E ,Minz D ,Ramati B , et al . Appl Environ Microbiol , 2000 , **66** : 2365 ~ 2371 .  
[ 14 ] Schwudke D ,Strauch E ,Krueger M , et al . System Appl Microbiol , 2001 , **24** : 385 ~ 394 .  
[ 15 ] Shilo M. Curr Microbiol , 1969 , **50** : 174 ~ 204 .  
[ 16 ] Carey L ,Margaret C M ,Smith R , et al . Environ Microbiol , 2003 , **5** : 127 ~ 132 .  
[ 17 ] Ronald S F ,Miguel AV ,Susan F K. Microbiology , 2004 , **150** : 649 ~ 656 .  
[ 18 ] Yair S ,Edouard J. Curr Microbiol , 2004 , **6** : 12 ~ 18 .  
[ 19 ] Megan E N ,Mark O M ,Phyllis H C , et al . Colloids Surfaces B , 2005 , **42** : 263 ~ 271 .  
[ 20 ] Markelova N Y. Microbiology , 2004 , **73** : 57 ~ 61 .  
[ 21 ] Markelova N Y. Process Biochem , 2002 , **37** : 1177 ~ 1181 .  
[ 22 ] Markelova N Y ,Gariev I A. Process Biochem , 2005 , **40** : 1089 ~ 1094 .  
[ 23 ] Markelova N Y ,Kerzhensev A S ,Horne J E. Sympoiuy , 17th WCSS , Thailand 2002 ,1763-1 ~ 1763-4 .  
[ 24 ] Megan E ,Nun ez ,Mark O , et al . Biophysical , 2003 , **84** : 3379 ~ 3388 .