

铜绿假单胞菌噬菌体 PaP4 的分离与鉴定

张琳 乐率 卢曙光 姚新月 赵岩 王竞 谭银玲 胡福泉* 李明

(第三军医大学基础部 微生物教研室 重庆 400038)

摘要: 【目的】鉴定一株新分离的铜绿假单胞菌噬菌体 PaP4 的生物学特性。【方法】双层琼脂培养法制备 PaP4 的单个噬斑, 观察噬斑特点; 用聚乙二醇 8000 浓缩 PaP4 颗粒后, 再用氯化铯密度梯度离心纯化; 用透射电子显微镜观察磷钨酸负染色的 PaP4 颗粒; 提取 PaP4 基因组核酸, 通过限制性内切酶图谱分析其核酸类型; 按照感染复数(MOI)分别为 0.000 1、0.001、0.01、0.1、1 和 10 加入噬菌体纯培养液和宿主菌, 充分裂解细菌后, 测定噬菌体滴度; 以 MOI=10 的比例加入噬菌体及宿主菌, 进行一步生长实验, 绘制一步生长曲线。【结果】PaP4 的噬斑直径约 3 mm–5 mm, 圆形透明边缘清晰; PaP4 噬菌体呈多面体立体对称的头部, 直径约 50 nm, 有一个约 30 nm 的短尾; 限制性酶切实验表明 PaP4 基因组为双链 DNA; 当 MOI 为 0.001 时 PaP4 感染其宿主菌产生的子代噬菌体滴度最高; 用一步生长曲线描绘了其生长特性。【结论】PaP4 属 dsDNA 短尾科裂解性噬菌体; 最佳感染复数是 0.001; 由一步生长曲线得出感染宿主菌的潜伏期是 25 min, 裂解期是 20 min, 平均裂解量是 150。

关键词: 铜绿假单胞菌噬菌体, 裂解性噬菌体, 短尾病毒科, 最佳感染复数, 一步生长曲线

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070153)

*通讯作者: Tel: 86-23-68752834; 信箱: hufuquan2009@yahoo.cn

收稿日期: 2012-12-11; 接受日期: 2013-01-16

Isolation and identification a novel *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP4

ZHANG Lin LE Shuai LU Shu-Guang YAO Xin-Yue ZHAO Yan
WANG Jing TAN Yin-Ling HU Fu-Quan* LI Ming

(Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: [Objective] To isolate and identify a novel *Pseudomonas aeruginosa* phage named PaP4 via its biological properties. **[Methods]** We used the double-layer agar culture method to make a single plaque. Phage particles of PaP4 were purified with CsCl₂ gradient centrifugation and the ultrastructure of PaP4 was examined by electron microscopy. We extracted the genome of PaP4 and identified the type of nucleic acid with restriction enzyme analysis. The host bacteria were infected with PaP4 at six different MOI. Three hours and thirty minutes 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 were taken at 15 min-intervals (up to 120 min) and immediately tittered by the double layer agar plate method. **[Results]** The plaques of PaP4 were transparent and their sizes were about 3 mm–5 mm in diameter. PaP4 had an isometric head approximately 50 nm in diameter and a long tail with 30 nm in length. 0.001 MOI-infected host bacteria gave the highest phage offsprings. One-step growth curve was determined according to the results of one-step growth experiments. **[Conclusion]** PaP4 is a virulent phage and belongs to *Podoviridae*. The whole genome can be digested by the restriction enzyme, indicating that PaP4 is a dsDNA virus. The optimal MOI of PaP4 is 0.001 and one-step growth experiment shows latent and burst periods are 25 min and 20 min, respectively, burst size is 150.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa* phages, Virulent phages, Podoviridae, Optimal MOI, One-step growth curve

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)为革兰氏阴性杆菌,是目前临床上造成医院内感染的最重要的机会致病菌之一。该菌本身对许多抗生素天然不敏感,并且随着抗生素的大量使用,铜绿假单胞菌对原本敏感的抗生素也产生了耐药性。因此,在临床上对铜绿假单胞菌感染的治疗,尤其是对多重耐药菌株感染的治疗成为非

常棘手的问题^[1-3]。在此背景下,人们把目光转向了噬菌体的治疗潜力^[4-5]。噬菌体是一类广泛存在于自然界中的可感染细菌的病毒,其数量庞大,约为细菌的10倍(>10³¹)^[6]。它于1915年由Frederick W. T. 研究发现,而1919年就将其作为抗菌物质进行实验研究。之后对于噬菌体的研究一直在继续,研究者相继鉴定了多种细菌的不同

噬菌体, 在噬菌体治疗方面也取得了许多显著成绩^[7-9]。然而, 噬菌体作为一种抗感染治疗手段迄今没能在临床推广应用。究其原因, 最重要的是我们对噬菌体这一生命现象的认识还不够, 尤其是对扩展噬菌体宿主谱、提高噬菌体治疗制剂的广谱性方面还缺乏有效突破口。因此, 新发现并鉴定不同的噬菌体仍然是非常重要的工作, 这将为噬菌体治疗的发展打下必要的基础。

本课题组多年来一直致力于分离鉴定新的噬菌体并对其进行深入研究, 先后报道了铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1、PaP2、PaP3, 以及摩氏摩根菌噬菌体 MmP1 和大肠工程菌噬菌体 EECp^[8,10-13]。近期, 我们利用噬菌体 PaP1 的同一宿主菌 PA1, 从医院污水中新分离出了一株铜绿假单胞菌噬菌体, 命名为 PaP4 (*Pseudomonas aeruginosa* phage 4), 并对其进行了一系列生物学鉴定实验。本课题为今后对该噬菌体治疗潜力的研究奠定了基础, 丰富了对噬菌体多样性的认识。

1 材料与方 法

1.1 材 料

噬菌体 PaP4 为西南医院污水中的分离株, 其宿主为 PA1。宿主菌铜绿假单胞菌 PA1 为新桥医院检验科分离的临床分离株, 用成都生物制品研究所提供的分群血清鉴定为第 11 群, 本实验室保存^[14]。

1.2 方 法

1.2.1 宿主菌的准备及噬菌体的分离: 将本室保存的 PA1 从液氮中复苏, 接种于普通琼脂平板中, 37 °C 培养过夜, 挑取单菌落 37 °C 振荡培养 6 h 至对数生长早期, 放入 4 °C 冰箱以备后续分离噬菌体使用。方法参照文献^[13]略有改动, 取西南医院污水处理站的污水 3 L, 加入固体 CaCl₂ 至终浓度为 1 mmol/L, 5 000×g 离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 高压灭菌过的滤膜过滤除菌。加入液体

LB 培养基 150 mL 和 PA1 菌悬液 3 mL, 充分混匀, 置 37 °C 培养过夜。次日将浑浊液 10 000×g 离心 10 min, 过滤除菌, 取滤液 0.3 mL 分置 2 个试管中, 每管中加入 PA1 宿主菌悬液 0.3 mL。混匀, 室温放置 15 min, 再加入 50 °C 左右融化的 0.6% 琼脂 LB 培养基 3 mL, 充分混匀, 倾倒在普通固体 LB 平板上, 37 °C 培养过夜, 次日观察噬菌斑生长情况。

挑取单个噬斑, 接种到宿主菌 PA1 中, 37 °C、160 r/min 振荡培养 6 h 扩增噬菌体, 10 000×g 离心 10 min, 上清即为噬菌体原液。可加无菌甘油至 30%, 液氮冻存储备用。采用终点滴定法确定噬菌体滴度, 即将噬菌体原液用 LB 液体培养基(超纯水也可)做 10 倍连续稀释后, 每稀释度分别取 100 μL 加入到 0.2 mL 宿主菌中。如上法计算噬菌体的滴度(PFU/mL)=噬斑数×稀释倍数×1 000/10。

1.2.2 噬菌体核酸的提取及鉴定: 参考萨姆布鲁克《分子克隆实验指南》第 3 版的提取方法, 将噬菌体接种到宿主菌悬液中, 37 °C 振荡培养至液体完全澄清。按 5.86 g/100 mL 加入 NaCl, 混匀溶解, 冰浴 1 h, 5 000×g 离心 15 min 去除残留的细菌碎片, 加入 DNase I、RNase A 至终浓度为 1 mg/L, 37 °C 温育 60 min 以降解宿主菌来源的 DNA 及 RNA。再加入固体聚乙二醇(PEG8000)至 10% (W/V), 混匀溶解, 冰浴过夜使噬菌体沉淀。4 °C、12 000×g 离心 10 min, 弃尽上清, 水分完全晾干后将沉淀悬于 2.5 mL TM 溶液(0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.2% MgSO₄·7H₂O)中。加入等体积氯仿, 振荡混匀, 5 000×g 离心 10 min, 小心吸取上层液体, 重复一次即得到噬菌体悬液。在其中加入 DNase I 和 RNase A, 37 °C 水浴 1 h, 进一步降解宿主菌的 DNA 和 RNA。加入 EDTA (pH 8.0)至 20 nmol/L 并加入 SDS 至终浓度为 0.5%, 蛋白酶 K 至 5 mg/L, 充分混匀, 56 °C 水浴 1 h, 释放出核酸同时也降解残留的 DNase I。

加入等体积的平衡酚(pH 8.0)抽提,离心收集上层水相;用等体积氯仿再抽提一次,收集水相;乙醇法沉淀核酸;然后用 TE 混悬沉淀, -20°C 保存备用。

1.2.3 噬菌体电镜观察:取步骤 1.2.2 中所得噬菌体粗颗粒悬液作为样本,用 CsCl_2 梯度离心纯化。取样本 20 μL 滴于铜网上,待其自然沉淀 15 min,用滤纸从侧面吸取多余液体,加 1 滴 2% 磷钨酸于铜网上,染色 5 min,干燥后电镜观察。

1.2.4 最佳感染复数的测定:感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 是指初始感染时加入噬菌体的总数与宿主菌总数的比值,也称为感染倍数。参照 Lu 等的方法,略有改动^[15]。将宿主菌 PA1 加 LB 液体培养基 37°C 培养至对数前期,用分光光度计 (Bio-Rad) 测定此时的 $OD_{600}\approx 0.2$, 相当于 1×10^8 CFU/mL。按照感染复数分别为 0.000 1、0.001、0.01、0.1、1 和 10 的 6 种不同比例,加入噬菌体纯培养液和宿主菌,再加入 LB 液体培养基使各管总体积相同,做好标记。在 37°C 摇床中 160 r/min 培养 3.5 h,再 $10\ 000\times g$ 离心 10 min,收集上清测定噬菌体滴度。各点均作双份复管培养取平均值,同时以不加噬菌体的宿主菌 PA1 和不加宿主菌的噬菌体 PaP4 作为对照,

以产生最高噬菌体滴度的 MOI 为最佳感染复数。

1.2.5 一步生长曲线的绘制:一步生长曲线可以反映噬菌体从吸附到宿主菌裂解释放子代噬菌体这样一个完整的增殖周期。参照 Lu 等的方法^[15],加入噬菌体及宿主菌使 MOI=10, 37°C 温育 15 min 后 $13\ 000\times g$ 离心 30 s,弃上清,用 LB 洗涤 2 次,悬浮于 5 mL LB 中,迅速置于 37°C 大振幅摇床中培养(160 r/min),开始计时,于 0 时刻和每隔 10 min 取样 30 μL ,共 2 h。 $13\ 000\times g$ 离心 30 s,取上清测定噬菌体滴度,各时间点均做双份复管取平均值,同时以不加噬菌体的宿主菌 PA1 和不加宿主菌的噬菌体 PaP4 作为对照,实验重复 3 次。根据统计数据,以感染的时间为横坐标,感染体系中噬菌体滴度为纵坐标,绘图。得出 PaP4 的潜伏期、爆发期和爆发量 3 个参量。

2 结果

2.1 噬菌体的噬斑特征

将经过处理后的污水与铜绿假单胞菌 PA1 共同培养后,获得噬菌体 PaP4。可见噬菌体 PaP4 形成的噬斑明显,直径约 3 mm–5 mm,圆形透明,边界清晰,呈现出裂解性噬菌体的噬斑特征(图 1A)。并且噬菌体的液体培养过程中,噬菌体

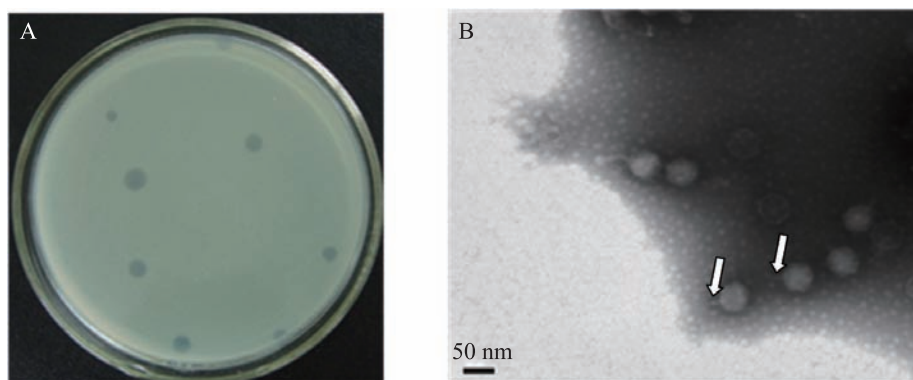


图 1 噬菌体 PaP4 的电镜照片和噬斑形态

Fig. 1 Plaques and electron microscopy photograph of phage PaP4

注:白色箭头所指为 PaP4 的短尾。

Note: The white arrows point at the short tail of PaP4.

可以完全裂解澄清宿主菌液。以上证据可初步判断噬菌体 PaP4 为裂解性噬菌体。

2.2 噬菌体电镜观察

将 CsCl₂ 梯度离心后得到的纯化 PaP4 颗粒, 用透射电镜观察其形态, 结果如图 1B 所示。由电镜照片可见, 噬菌体 PaP4 呈现出 1 个多面体立体对称的头部, 直径约为 50 nm, 以及一个长约 30 nm 的短尾, 因此我们可以通过形态学将其归类为短尾科噬菌体^[16]。

2.3 PaP4 核酸类型的鉴定

从图 2 可看出, PaP4 基因组核酸可被限制性内切酶 *Bam*H I、*Dra* I 及 *Nde* I 酶切, 而这 3 种酶均为双链 DNA 内切酶, 表明该基因组为双链 DNA。基因组被 *Dra* I 酶切后产生 2 个可见条带, 从它们的大小分析判断 PaP4 基因组约有 40 kb。

2.4 最佳感染复数

按照表 1 加入噬菌体和宿主菌, 在培养后待宿主菌被充分裂解, 测定各管中的噬菌体滴度, 根据实验结果统计, 当 MOI=0.001 时, 噬菌体 PaP4 感染其宿主菌 PA1 产生的子代噬菌体滴度为 6.4×10^{10} PFU/mL, 在 6 个感染复数中, 该感染率是最高的。因此, PaP4 感染其宿主菌 PA1 的最佳感染复数为 0.001。

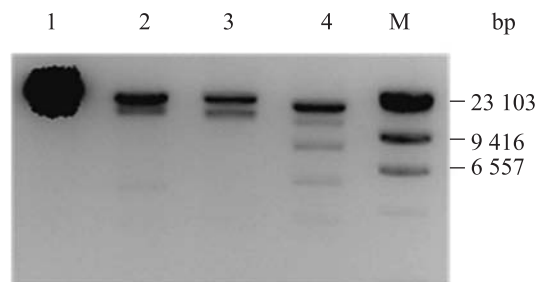


图 2 噬菌体 PaP4 全基因组酶切图谱

Fig. 2 Restriction enzyme digestion maps of PaP4 genomic DNA

注: 1: PaP4 全基因组; 2: PaP4 DNA/*Bam*H I; 3: PaP4 DNA/*Dra* I; 4: PaP4 DNA/*Nde* I; M: DNA 标记。

Note: 1: PaP4 genome; 2: PaP4 DNA/*Bam*H I; 3: PaP4 DNA/*Dra* I; 4: PaP4 DNA/*Nde* I; M: DNA ladder.

2.5 一步生长曲线的绘制

一步生长曲线分为潜伏期、裂解期和平稳期 3 个阶段。潜伏期指噬菌体的核酸侵入宿主细胞以后至第一个成熟子代噬菌体装配前的一段时间。其值等于从噬菌体吸附细菌开始, 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。潜伏期后的宿主细胞迅速裂解, 溶液中噬菌体急速增加的一个阶段, 即是噬菌体的裂解期, 也称上升期。裂解也称爆发量, 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。在噬菌体 PaP4 的一步生长曲线图中(图 3), 可以清晰地看出其

表 1 噬菌体 PaP4 最佳感染复数的测定
Table 1 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI)

管号 Tube No.	细菌数 Number of bacteria	噬菌体数 Number of bacteriophages	感染复数 MOI	3.5 h 后滴度 Titer at 3.5 h (PFU/mL)
1	1×10^8	1×10^9	1×10^1	1.1×10^{10}
2	1×10^8	1×10^8	1×10^0	1.8×10^{10}
3	1×10^8	1×10^7	1×10^{-1}	3.3×10^{10}
4	1×10^8	1×10^6	1×10^{-2}	3.4×10^{10}
5	1×10^8	1×10^5	1×10^{-3}	6.4×10^{10}
6	1×10^8	1×10^4	1×10^{-4}	5.1×10^{10}

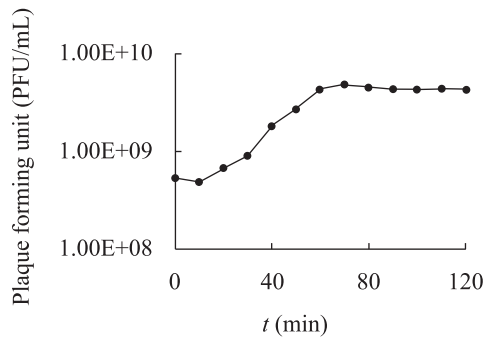


图3 噬菌体 PaP4 一步生长曲线

Fig. 3 One-step growth curve of PaP4

感染宿主菌 PA1 的潜伏期约为 25 min, 裂解期约为 20 min。根据裂解量计算公式: 裂解量=爆发末期噬菌体滴度÷感染初期宿主菌浓度, 即得出 PaP4 感染宿主菌 PA1 的裂解量为 150。

3 讨论

噬菌体可分为两类, 即毒性噬菌体和温和噬菌体。如果是毒性噬菌体(即裂解性噬菌体), 则发生增殖性或裂解性感染。噬菌体增殖, 最终导致宿主菌的裂解, 因此在固体培养基上可见清晰透亮的溶菌空斑, 即透明噬斑。而温和噬菌体(即溶源性噬菌体)则将其基因组整合到宿主菌染色体中, 在固体培养基上形成浑浊半透明的噬斑。所以通常根据噬菌体感染宿主菌后在固体培养基上形成噬斑的特点即可初步判断噬菌体的类型。铜绿假单胞菌噬菌体 PaP4 感染宿主菌 PA1 后形成的噬斑呈圆形透明, 表现出裂解性噬菌体的噬斑特性。以 PA1 为宿主菌的噬菌体 PaP1 也表现出裂解性噬菌体的噬斑特性, 而噬菌体 PaP2 和 PaP3 分别感染其宿主 PA2 和 PA3 后, 表现出溶源性噬菌体的特性^[10-12]。对于噬菌体治疗来说, 通常都选取毒性噬菌体, 即感染宿主菌后可以导致其宿主菌的完全裂解, 这样的噬菌体在抗感染治疗中将更有前景。

国际病毒分类学组织(ICTV)一般通过病毒的

形态(有无尾部等)及核酸类型(dsDNA, ssDNA, dsRNA, ssRNA)对新分离的噬菌体进行分类。其中有尾(包括长尾科、短尾科和肌尾科)且为双链 DNA 的假单胞菌属噬菌体占总数的绝大部分(>97%)^[17]。通过电镜观察及全基因组酶切, 我们判断 PaP4 即为短尾科 dsDNA 噬菌体。而 PaP1 为肌尾科 dsDNA 噬菌体; PaP2 及 PaP3 均为短尾科 dsDNA 噬菌体^[10-11,18]。将噬菌体确定到科后, 属的确定还需要其全基因组的序列比对以及蛋白功能相似性分析才能进行最终确定^[19]。

通常, 在分离纯化噬菌体颗粒, 提取噬菌体基因组, 噬菌体抗体呈现技术等研究中, 常常需要得到高产量的子代噬菌体纯培养物。而感染复数就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。本实验测得噬菌体 PaP4 对其宿主菌 PA1 的最佳感染复数为 0.001, 即 1 000 个细菌用 1 个噬菌体感染即可获得最佳的产量。说明在少量噬菌体存在的情况下, 他们就能迅速裂解宿主菌并获得自身的增殖。而噬菌体 PaP1、PaP2、PaP3 的最佳感染复数分别为 0.01、10、0.001^[10-12], 说明他们达到最佳产量时的细菌和噬菌体的比例存在差异。

噬菌体为非细胞型微生物, 它从吸附宿主菌到子代噬菌体的释放是一个爆发的过程, 表现为“一步生长”的特点。噬菌体感染宿主菌的潜伏期和爆发期的长短以及爆发量的多少与噬菌体、宿主菌及环境条件都有关, 因此, 每种噬菌体都有其独特的一步生长曲线。PaP1 感染宿主菌 PA1 的潜伏时间约为 20 min, 爆发时间约为 40 min, 爆发量为 65; PaP2 感染 PA2 的 3 个值为 75 min, 90 min, 34; 而 PaP3 感染 PA3 的 3 个值为 20 min, 60 min, 31^[10-12]。因此, 相比较而言, PaP4 的潜伏时间, 爆发时间较短, 而爆发量较大。就噬菌体治疗的临床应用前景而言, 潜伏时间和爆发时间短的噬菌体是研究的首选。例如铜绿假单胞菌噬

菌体 phiKMV 的潜伏时间和爆发时间分别是: 12–13 min, 3–8 min^[20]。

目前, 对于噬菌体的治疗来说, 已经取得了许多显著的成绩, 例如在实验动物身上, 噬菌体治疗细菌感染实验已获得成功并且未发现有任何副作用, 并且也有噬菌体治疗进入 I 期临床实验的成功报道^[21–23]。因此噬菌体治疗的前景有目共睹, 但同时我们也认识到还有一段漫长的路要走。例如噬菌体对宿主菌寄生有高度特异性, 如何寻找到广谱噬菌体, 或者如何对已有的噬菌体进行结构或功能方面的改造以扩展其宿主谱, 都是我们亟待解决的问题。本文完成了对铜绿假单胞菌噬菌体 PaP4 的分离与鉴定, 并将其生物学特性与同样为铜绿假单胞菌噬菌体的 PaP1、PaP2、PaP3 进行比较。更进一步加深了我们对这 4 个噬菌体基本特性的理解, 增加了对噬菌体多样性的认识, 同时为以后噬菌体治疗的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 毕东杰, 李燕, 王永梅. 医院铜绿假单胞菌耐药性监测分析[J]. 北京医学, 2011, 33(9): 784–785.
- [2] Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy[J]. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2010, 8(1): 71–93.
- [3] Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa*-a phenomenon of bacterial resistance[J]. Journal of Medical Microbiology, 2009, 58(Pt 9): 1133–1148.
- [4] Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction[J]. International Journal of Medical Microbiology: IJMM, 2006, 296(1): 5–14.
- [5] Hawkins C, Harper D, Burch D, et al. Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 146(3/4): 309–313.
- [6] Hendrix RW. Bacteriophage genomics[J]. Current opinion in microbiology 2003, 6(5):506–511.
- [7] Jin J, Li ZJ, Wang SW, et al. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. BMC Microbiology, 2012: 156.
- [8] Zhu J, Rao X, Tan Y, et al. Identification of lytic bacteriophage MmP1, assigned to a new member of T7-like phages infecting *Morganella morganii*[J]. Genomics, 2010, 96(3): 167–172.
- [9] Sillankorva S, Neubauer P, Azeredo J. Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens*[J]. BMC Biotechnology, 2008, 8: 80.
- [10] 李明, 申晓冬, 周莹冰, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1生物学特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 860–863.
- [11] 黄建军, 胡晓梅, 饶贤才, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP2生物学特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(13): 1133–1136.
- [12] 周莹冰, 申晓冬, 李明, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3生物学特性的研究[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(10): 999–1001.
- [13] Li S, Liu L, Zhu J, et al. Characterization and genome sequencing of a novel coliphage isolated from engineered *Escherichia coli*[J]. Intervirology, 2010, 53(4): 211–220.
- [14] 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.
- [15] Lu Z, Breidt F Jr, Fleming HP, et al. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, phiJL-1, from a cucumber fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 84(2): 225–235.
- [16] Ackermann HW. 5500 Phages examined in the electron microscope[J]. Archives of Virology, 2007, 152(2): 227–243.
- [17] Ceysens PJ, Lavigne R. Bacteriophages of *Pseudomonas*[J]. Future Microbiology, 2010, 5(7):

- 1041–1055.
- [18] Tan Y, Zhang K, Rao X, et al. Whole genome sequencing of a novel temperate bacteriophage of *P. aeruginosa*: evidence of tRNA gene mediating integration of the phage genome into the host bacterial chromosome[J]. Cellular Microbiology, 2007, 9(2): 479–491.
- [19] Lavigne R, Seto D, Mahadevan P, et al. Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the *Podoviridae* using BLASTP-based tools[J]. Research in Microbiology, 2008, 159(5): 406–414.
- [20] Lavigne R, Burkal'tseva MV, Robben J, et al. The genome of bacteriophage phiKMV, a T7-like virus infecting *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Virology, 2003, 312(1): 49–59.
- [21] Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, et al. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy[J]. Clinical Otolaryngology: Official Journal of ENT-UK; Official Journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery, 2009, 34(4): 349–357.
- [22] Debarbieux L, Leduc D, Maura D, et al. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2010, 201(7): 1096–1104.
- [23] Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials[J]. PloS One, 2009, 4(3): e4944.

科技信息摘录

科学家研究血清素获重大突破

美国《科学》杂志将于3月21日同期在线发表两篇相关论文，介绍中科院上海药物研究所徐华强课题组、蒋华良课题组、美国 Scripps 研究所 Ray Stevens 课题组、北卡罗来纳大学 Bryan Roth 课题组关于五羟色胺（血清素）的联合研究成果。

五羟色胺是人体重要的一种神经递质与激素，在中枢神经系统中控制着认知、学习、感情、情绪等脑神经活动；在外周神经系统中，五羟色胺控制着生殖、代谢、血管收缩、骨骼发育等生理功能。因此，五羟色胺系统一直是药物研究与开发的热点，作用于该系统的药物广泛用于抗精神分裂症、偏头痛、抗呕吐及肥胖症等疾病。然而，五羟色胺功能复杂，亚型繁多，临床用的五羟色胺调节剂特异性和选择性差，常引起毒性副作用。由于五羟色胺受体是膜蛋白，柔性较大，蛋白质表达、提纯与结晶难度极高。而五羟色胺受体结构的长期匮乏，阻碍了五羟色胺受体的生物学理解及其药物研发。

徐华强课题组长期以来坚持 GPCR (G 蛋白偶联受体)结构与功能关系的研究，于2012年初与合作者同时攻克了五羟色胺受体 1B 及 2B 两个亚型的激动剂复合物的晶体结构。

徐华强等还与蒋华良课题组合作，利用计算生物学手段，对五羟色胺受体系统的配体识别机制进行系统的研究归纳，深入阐述了五羟色胺受体-配体结合的分子机制。在结构测定的基础上，他们又与美国北卡罗来纳大学 Bryan Roth 合作，利用点突变及下游信号传导的分析，揭示了五羟色胺受体亚型的信号传导特异性。

该研究项目得到了科技部、基金委、新药重大专项、中科院、美国 Van Andel 研究所及中国安利的资助。徐华强研究员和 Ray Stevens 研究员分别是中科院上海药物所的“千人计划”与外专“千人计划”专家。两篇文章的第一作者分别是王翀、蒋轶、马金鸣及 Daniel Wacker。其中来自于上海药物所的蒋轶自2010年致力于五羟色胺受体 1B 的研究工作，发展了 GPCR 受体的表达、提纯及结晶方法。

《科学》杂志审稿人对此研究给予高度评价，称其为“五羟色胺研究领域的里程碑”，并将这两项成果作为两篇论文同时发表。徐华强认为，这些研究将对五羟色胺系统的生物学发展及药物研究产生深刻影响，特别是对如何增强五羟色胺配体的特异性，降低其副作用有重要意义。

——摘自《中国生物技术信息网》2013/3/26
<http://www.biotech.org.cn/information/105922>