

## 分枝杆菌噬菌体 Guo1 环状基因组特征及生物学特性分析

姚义勇 江莉莎 张莉 郭述良\* 柳岩

(重庆医科大学附属第一医院 呼吸与危重症医学科 重庆 400016)

**摘要:**【目的】初步研究分枝杆菌噬菌体 Guo1 环状基因组特征及生物学特性。【方法】采用鸟枪法和重叠群组装策略完成 Guo1 全基因组测序; 使用 DNASTar、tRNAscan-SE、Promoter predictions、TRF、Glimmer、BLAST 软件分别对噬菌体的一般基因组学特征、tRNA、启动子、串联重复序列和编码基因进行分析; 运用 BLAST 软件检索与 Guo1 基因组相似的噬菌体并构建系统进化树, 推断 Guo1 的分群; 测定最佳感染复数、一步生长曲线以及对紫外线、氯仿、酒精、温度、pH 的敏感性。【结果】噬菌体 Guo1 的基因组为全长 40 086 nt 的环状双链 DNA, 属于 G 群分枝杆菌噬菌体; 含有 59 个推定基因, 7 个启动子序列和 3 个串联重复序列; Guo1 对紫外线有较强抵抗力, 对酒精、氯仿和高温敏感, 最适温度为 37 °C, 最适 pH 为 7.0, 最佳感染复数为 0.01, 潜伏期 120 min, 裂解期 120 min, 裂解量为 47 个。【结论】Guo1 是首次发现的具有环状双链 DNA 结构的 G 群分枝杆菌噬菌体, 完成了 Guo1 的全基因组测序, 并初步分析了 Guo1 的基因组特征和生物学特性。

**关键词:** Guo1, 分枝杆菌噬菌体 G 群, 环状基因组, 生物学特性

## Circular genetic information and biologic characteristics of mycobacteriophage Guo1

YAO Yi-Yong JIANG Li-Sha ZHANG Li GUO Shu-Liang\* LIU Yan

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the genetic and biologic characteristics of mycobacteriophage Guo1 with circular genome. [Methods] Sequenced the complete genome of Guo1 with Shot-gun library and config package strategy. Performed DNASTar, tRNAscan-SE, Promoter predictions, TRF, Glimmer, BLAST software for general genome characteristics, tRNA, promoter regions, tandem repeat sequences and putative function of predicted coding sequences, respectively. Utilized BLAST software to search for mycobacteriophages with genome similar as Guo1. Constructed phylogenetic tree to identify the cluster into which Guo1 should be grouped. Then measured the optimal

基金项目: 国家“十二五”重大专项课题(No. 2012ZX10003-009); 国家临床重点专科专项经费资助项目(No. 卫办医政函[2012] 649 号)

\*通讯作者: ✉: guosl999@sina.com

收稿日期: 2014-11-04; 接受日期: 2015-02-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-04

multiplicity of infection and one-step growth curve, and observed the sensibility to ultraviolet, chloroform, alcohol, temperature, pH. **[Results]** Guo1 contains a double strand circular DNA with a full length of 40 086 nt, which belongs to the cluster G mycobacteriophage and which contains 59 putative genes, 7 promoter regions and three tandem repeat sequences. Guo1 is resistant to ultraviolet but sensitive to alcohol, chloroform and high temperature. The optimal temperature is 37 °C while the optimal pH is 7.0. The optimal MOI of Guo1 is about 0.01. One step growth of it showed that both latent period and burst period are 120 min, and the average burst size is about 47. **[Conclusion]** Guo1 is a cluster G mycobacteriophage with double strand circular DNA found for the first time. We sequenced the complete genome of Guo1 and identified the circular genetic information and biologic characteristics.

**Keywords:** Guo1, Cluster G mycobacteriophage, Circular genome, Biologic characteristics

2012年WHO公布的疫情显示:2011年全球新增结核病人900万,值得注意的是印度和中国的耐药结核占到全世界的60%<sup>[1]</sup>,我国也是全球第二大结核病高负担国家,发病人数一直位于甲、乙类传染病前列<sup>[2]</sup>。结核病治疗面临着易复发和病程迁延两大难题,临床上常采用长疗程化疗来彻底清除结核菌,实际上在化疗初期2-3周就清除了90%以上的结核菌,其余8-9个月的疗程主要是清除潜伏感染的结核菌,长疗程显著增加了病人的经济负担和药物不良反应,导致病人治疗依从性显著下降,不规则用药和不足疗程用药增多。目前认为潜伏感染是由持留结核菌导致<sup>[3]</sup>,结核菌在面临不利条件(药物、免疫、缺氧等)会发生代谢降低、胞壁增厚等变化,进入持留状态对结核药产生耐受。

在藤黄微球菌中鉴定出的复苏因子(Resuscitation promoting factor, Rpf)能够使持留状态的结核菌恢复正常生长<sup>[4]</sup>,重新对药物产生敏感性,一般认为Rpf主要通过水解持留结核菌胞壁的肽聚糖来解除休眠增厚的细胞壁或通过水解细胞壁肽聚糖启动一系列信号通路来恢复生长<sup>[5-6]</sup>。分枝杆菌噬菌体具有能够裂解结核分枝杆菌的特性,使其成为新型抗结核病药物的研究热点,近年来关于利用噬菌体诊断和治疗结核病的各项研究已经取得了重大进展<sup>[7-9]</sup>,在对分枝杆菌噬菌体TM4基因组研究中发现含有Motif3基序的噬菌体具有Rpf样水解肽聚糖的作用,且可以更容易的将DNA注入休眠宿主菌<sup>[10-11]</sup>,本课题组通过体外实验确证了噬菌体TM4能够复苏休眠菌<sup>[12]</sup>。在完成了分枝杆菌噬菌体Guo1基因组测序和生物信息学初步分析之后,发现其具

有与噬菌体TM4相同的Motif3基序,具有复苏持留结核菌的潜力,本研究初步探索噬菌体Guo1基因组学特征和生物学特性,为下一步开发利用Guo1奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 宿主菌及噬菌体来源:** 宿主菌:耻垢分枝杆菌(CMCC93202)来自中国药品生物制品检定所;分枝杆菌噬菌体Guo1为本课题组自主分离鉴定株。

**1.1.2 主要试剂及仪器:** λ噬菌体DNA提取试剂盒,艾比根生物技术有限公司;限制性内切酶Bgl II, Fermentas公司;DNase I、RNase A, Sigma公司;双层琼脂固体培养基,底层7H10培养基,上层7H9固体培养基(含0.4%琼脂), BD公司;噬菌体缓冲液(Phage buffer)用于稀释噬菌体,配方:Tris-base 1.211 g, MgSO<sub>4</sub> 1.204 g, NaCl 4 g, ddH<sub>2</sub>O 980 mL, pH 7.5。

CO<sub>2</sub>恒温培养箱, Thermo Forma公司;低温超速离心机, Sigma公司;数字图像分析系统, Bio-Rad公司; pH计, Mettler Toledo公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 纯化噬菌体颗粒:** 采用双层琼脂平板法扩增噬菌体, 24 h后刮取上层培养基, 4 °C、10 000×g离心10 min, 收集上清用0.22 μm滤器过滤除菌, 加入DNase I(终浓度40 mg/L)和RNase A(终浓度10 mg/L), 37 °C孵育30 min, 加入NaCl(终浓度58.5 g/L), 混匀后冰浴1 h, 10 000×g离心10 min后收集上清液, 在上清液中加入10%聚乙二醇

8000, 冰浴 1 h,  $11\ 000\times g$  离心 10 min, 弃上清, 倒置离心管, 待管底白色沉淀干燥后, 加入 1 mL Phage buffer 缓冲液反复吹打混匀, 吹打动作要轻柔, 避免破坏噬菌体尾端,  $4\ ^\circ\text{C}$  静置过夜。次日  $10\ 000\times g$  离心 10 min 收集上清液, 用  $0.22\ \mu\text{m}$  滤器过滤除菌后即得噬菌体粗制颗粒。

**1.2.2 提取分枝杆菌噬菌体 Guo1 核酸:** 用  $\lambda$  噬菌体 DNA 提取试剂盒提取 Guo1 核酸, 具体步骤如下: 取纯化的噬菌体颗粒 10 mL, 加入 2 mL 冰预冷的噬菌体沉淀液, 混匀后冰浴 1 h,  $10\ 000\times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$  离心 10 min, 弃上清, 干燥后收集白色沉淀; 加入  $500\ \mu\text{L}$  裂解缓冲液, 吹打重悬; 加入  $100\ \mu\text{L}$  20% SDS,  $70\ ^\circ\text{C}$  温育 10 min 后置冰上冷却; 加入  $100\ \mu\text{L}$  杂质沉淀液, 混匀后  $13\ 000\times g$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$  离心 10 min, 收集上清液, 加入  $350\ \mu\text{L}$  结合液 LB, 将混合液加入吸附柱中  $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 30 s, 倒掉废液; 向吸附柱中加入  $700\ \mu\text{L}$  漂洗液,  $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 1 min, 弃废液; 将吸附柱放回空收集管中,  $13\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 2 min, 除去漂洗液; 离心后将吸附柱放入  $1.5\ \text{mL}$  离心管中, 加  $100\ \mu\text{L}$  预热至  $50\ ^\circ\text{C}$  的洗脱缓冲液, 室温放置 1 min 后超速离心机  $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心 1 min, 收集离心管中的液体即得噬菌体基因组 DNA, 用紫外分光光度计检测核酸的浓度( $A_{260}$ )和纯度( $A_{260}/A_{280}$ ), 并进行琼脂糖凝胶电泳和脉冲场电泳检测 DNA 质量。

**1.2.3 Guo1 全基因组序列测定:** 将提取的 Guo1 核酸送北京六合华大基因科技股份有限公司(北京, 中国)按照鸟枪法策略进行测序, 经 Phred/PhraD/Consedh 软件组装重叠群和 PCR 扩增连接重叠群缺口, 完成全基因组测序, 上传序列信息至 GenBank, 登录号为 KJ725374。

**1.2.4 噬菌体基因组一般特性及编码基因预测分析:** 使用 DNASTar 软件包中 EditSeq 软件分析基因组大小、基因组碱基组成、G+C 含量; 采用华盛顿大学 LOW LAB 实验室的 tRNAscan-SE 软件预测基因组上的 tRNA 基因; 运用 Promoter predictions 软件预测可能的启动子区; 通过 TRF 软件预测 DNA

序列中的串联重复序列; 使用美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)网站上 Glimmer 软件预测噬菌体 Guo1 基因组的编码序列, 进一步对潜在编码序列进行同源性对比及基因功能注释。

**1.2.5 系统进化树构建:** 使用 BLAST 软件下的核酸序列比对(Nucleotide blast)进行全基因组序列比对, 设置参数为: Tree Method 选项“Neighbor-Joining”, Max Seq Difference 选项“0.05”, Database 选项“nr”, 根据相似性比对结果构建噬菌体系统进化树<sup>[13]</sup>, 初步判断确定噬菌体分群和生物进化关系。

### 1.3 噬菌体的生物学特性

**1.3.1 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的噬菌体数量与宿主菌数量的比值。参照 Lu 的方法<sup>[14]</sup>, 采用梯度稀释和双层琼脂培养法测定噬菌体滴度。预实验分别测定宿主菌和噬菌体的浓度, 按照 MOI 分别为  $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-1}$ 、1、 $10^1$ 、 $10^2$  的比例加入噬菌体和宿主菌, 各个 MOI 均采用双份复板培养取平均值, 同时设置不加噬菌体的宿主菌和不加宿主菌的噬菌体为对照组,  $37\ ^\circ\text{C}$  双层琼脂培养 24 h 后收集噬菌体, 采用梯度稀释测定噬菌体滴度, 能产生最高滴度噬菌体的 MOI 即为最佳感染复数。

**1.3.2 一步生长曲线的绘制:** 参照黄建军等<sup>[15]</sup>高感染复数测定噬菌体一步生长曲线的方法, 略有修改。按照 MOI=10 的比例加入噬菌体和宿主菌,  $37\ ^\circ\text{C}$  温育 15 min,  $13\ 000\times g$  离心 1 min, 弃上清, 7H9 液体培养基洗涤 2 次后, 重悬于 5 mL 的 7H9 液体培养基, 迅速置于  $37\ ^\circ\text{C}$  摇床培养( $160\ \text{r}/\text{min}$ ), 300 min, 每 30 min 取样  $100\ \mu\text{L}$ ,  $13\ 000\times g$  离心 1 min, 吸取上清, 采用梯度稀释和双层琼脂培养法测定噬菌体滴度, 各时间点做双份复管培养取平均值, 实验重复 3 次。以感染时间为横坐标, 实际测得的噬菌体滴度( $\times 10^4$  PFU/mL)为纵坐标, 绘制一步生长曲线, 得出裂解量、潜伏期和裂解期。由于采用的是高感染复数的方式, 可以认为整个反应体系的宿主菌均被噬菌体感染, 初始的宿主菌浓度即为初始感染的细菌数。根据: 裂解量=裂解末期噬菌体数/初期

感染噬菌体的宿主菌数,计算出噬菌体的裂解量。

**1.3.3 噬菌体对紫外线照射的抵抗力:**取噬菌体原液 3 mL 于直径 6 cm 的培养皿中,置于紫外灯(18 W, 36 cm)下照射 90 min,每 15 min 取样 100  $\mu$ L,暗处室温放置 30 min,测定其效价,实验重复 3 次。存活率以 0 min 时取样为 100%,计算出存活率。

**1.3.4 噬菌体对氯仿的敏感性:**750  $\mu$ L 噬菌体原液中加入等体积氯仿混匀,37  $^{\circ}$ C 静置 10 min,4 000 $\times$ g 离心 15 min,吸取上清,测定其效价,设置加入等体积 ddH<sub>2</sub>O 为对照组,实验重复 3 次,存活率以加入等体积 ddH<sub>2</sub>O 为 100%,计算存活率。

**1.3.5 噬菌体对酒精的抵抗力:**320  $\mu$ L 噬菌体原液中加入 95%酒精 1 180  $\mu$ L 混匀(酒精终浓度为 75%),37  $^{\circ}$ C 静置 10 min,4 000 $\times$ g 离心 15 min,吸取下层水相,测定其效价,设置加入同样体积 ddH<sub>2</sub>O 为对照组,实验重复 3 次,存活率以加入等体积 ddH<sub>2</sub>O 为 100%,计算存活率。

**1.3.6 温度对噬菌体的影响:**取等量噬菌体原液于不同温度(25、37、50、60  $^{\circ}$ C)分别水浴 30 min 及 60 min,取出后迅速冰浴冷却,测定噬菌体滴度,以处理温度为横坐标,实际测得的噬菌体滴度( $\times 10^5$  PFU/mL)为

纵坐标。

**1.3.7 pH 对噬菌体的影响:**将噬菌体加入不同 pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0)的 7H9 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 水浴 1 h,测定不同 pH 液体培养基中噬菌体的滴度。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组一般特性

Guo1 具有双链环状 DNA 基因组,长度为 40 086 nt,碱基组成:A=5 789,C=13 375,G=13 420,T=7 502,G+C 含量为 66.84%,这与分枝杆菌噬菌体 G 群的 G+C 含量很相近;tRNAscan-SE 软件未找到 tRNA。

### 2.2 启动子序列和串联重复序列预测结果

考虑到启动子位于结构基因的上游以及基因的分布,对 Promoter predictions 软件预测出的具有启动子结构特征的区域中,推测出 Guo1 基因组可能的 7 个启动子区,见表 1;TRF 软件预测出 3 个串联重复序列,见表 2。

### 2.3 噬菌体 Guo1 的编码基因预测分析

Glimmer 软件预测出 59 个编码基因(表 3),共

表 1 噬菌体 Guo1 启动子区的预测

Table 1 Putative promoter regions of mycobacteriophage Guo1

起始位点 Start site	终止位点 End site	评分 Score	启动子区 Promoter sequence
1 954	1 999	0.95	AACGGG <b>TTGAGT</b> CCGAGCTCGGATCCGTA <b>GATCA</b> TCGCCCGGGCAGCCTC
5 212	5 257	0.83	GTC <b>TTGAGC</b> CAGAATCGGTTCCAGCCGGC <b>GATGA</b> TGGTCGCGGGCAGTGT
15 331	15 376	0.82	TCGGG <b>TTGTCC</b> GAGCATCTGGTTCGATGAG <b>ATAGAT</b> CGCTTCTGCGCCGGC
17 020	17 065	0.90	GAATGACTTGTGGGTGTGGACGGTGCCGATG <b>TAGTT</b> CATCCGCTGTGCC
24 014	24 059	0.91	TCGGTT <b>TGAGT</b> GCGACCGTCCAGAAGACG <b>GAAAT</b> TGCTTGGCCGAACAGT
24 726	24 771	0.86	GCCAGG <b>TTCGAA</b> GTGCAACGGGCC <b>CAGGT</b> TG <b>TAA</b> TCCCTCACGGGCCCGT
38 359	38 404	0.82	GAGG <b>TCA</b> TGACGGGTCGATTCCGACGGC <b>GATCA</b> TGCGCGGTGTCCCTTG

注:-35 区和-10 区用下划线标注;转录的起始位置用黑体表示。

Note: The -35 region and -10 region shown in underlined type; The transcription start shown in bold type.

表 2 噬菌体 Guo1 串联重复序列的预测

Table 2 Putative tandem repeat sequences of mycobacteriophage Guo1

起始位点 Start site	终止位点 End site	长度 Length (nt)	重复序列 Tandem repeat sequences	评分 Score
20 791	20 831	21	GGTTCATCGCCCGCCCTGCT	55
30 456	30 484	15	CCAGCGTCGGCCGGC	51
34 509	34 564	20	CCGAGTTCCGGGTGCTGCTA	50

表3 噬菌体 Guo1 的基因注释  
Table 3 Gene annotation of mycobacteriophage Guo1

基因编号 Number	起始位点 Start site	终止位点 End site	基因长度 Length	核酸链 Strand	起始密码子 Start codon	NCBI 注释 NCBI annotation	功能预测 Putative function
1	277	810	534	-	ATG	Leo 0043	Hypothetical protein
2	813	2 216	1 404	-	ATG	Leo 0042	Hypothetical protein
3	2 234	3 319	1 086	-	ATG	Leo 0041	PDDEXK-like domain
4	3 316	3 468	153	-	ATG	Leo 0040	Hypothetical protein
5	3 452	3 802	351	-	ATG	Leo 0039	Hypothetical protein
6	3 802	3 951	150	-	ATG	Halo gp39	-
7	3 948	4 298	351	-	ATG	Leo	ASC-1-like protein
8	4 352	4 468	117	+	GTG	Halo gp37	Hypothetical protein
9	4 477	5 013	537	-	ATG	Leo 0035	Hypothetical protein
10	5 076	5 474	399	-	ATG	Sedge	repressor
11	5 471	5 716	246	-	ATG	Angel gp34	Helix-turn-helix domain
12	5 747	6 388	642	+	TTG	Leo	Integrase
13	6 385	7 002	618	-	GTG	Legendre 0028	Hypothetical protein
14	6 999	7 244	246	-	GTG	DNAIII 0030	Hypothetical protein
15	7 324	7 674	351	-	ATG	Halo gp29	-
16	7 700	8 908	1 209	-	ATG	Halo gp28	Lysin B
17	8 908	10 224	1 317	-	ATG	Halo gp27	Lysin A
18	10 285	10 479	195	-	ATG	Halo gp26	-
19	10 479	10 754	276	-	ATG	Halo gp2	-
20	10 754	10 936	183	-	ATG	Halo gp23	-
21	10 939	11 259	321	-	ATG	Leo	Minor tail protein
22	11 274	13 409	2 136	-	ATG	BPs 121	-
23	13 409	13 843	435	-	ATG	Leo	Minor tail protein
24	13 854	14 990	1 137	-	ATG	Leo	Minor tail protein
25	14 987	15 448	462	-	ATG	Halo	Minor tail protein
26	15 448	17 190	1 743	-	ATG	Halo	Minor tail protein
27	17 202	18 374	1 173	-	ATG	Halo	Minor tail protein
28	18 374	22 387	4 014	-	ATG	Halo	Tape measure protein
29	22 387	22 764	378	-	GTG	Leo 0015	Hypothetical protein
30	22 773	23 282	510	-	ATG	Bps	Potential virion protein
31	23 383	23 997	615	-	ATG	Bps	Major tail subunit
32	23 994	24 422	429	-	ATG	BPs 112	Hypothetical protein
33	24 434	24 697	264	-	ATG	BPs 111	Hypothetical protein
34	24 684	25 040	357	-	ATG	BPs 110	Hypothetical protein
35	25 040	25 537	498	-	ATG	BPs 19	Hypothetical protein
36	25 549	25 776	228	-	ATG	BPs 18	Hypothetical protein
37	25 813	26 748	936	-	ATG	Chy2 006	Capsid protein
38	26 794	27 336	543	-	ATG	BPs 16	Hypothetical protein
39	27 455	27 661	207	-	ATG	Halo gp5	Hypothetical protein
40	27 658	30 447	2 790	-	ATG	BPs 14	Major surface protein1B

(待续)

(续表 3)

41	30 448	30 696	249	-	ATG	Angel gp3	Portal protein
42	30 797	31 963	1 167	-	GTG	Sedge 003	Portal protein
43	31 960	33 396	1 437	-	ATG	Leo	Terminase
44	33 464	33 805	342	-	ATG	Halo gp1	-
45	33 851	34 672	822	+	ATG	Chy2 0058	Hypothetical protein
46	34 651	34 893	243	-	ATG	Halo gp63	-
47	34 992	35 327	336	-	ATG	Leo 0056	Pfam05305
48	35 359	35 541	183	-	ATG	Halo gp61	-
49	35 541	35 756	216	-	ATG	DNAIII 0054	Hypothetical protein
50	35 802	36 290	489	+	GTG	DNAIII 0055	Hypothetical protein
51	36 335	36 571	237	-	ATG	Leo 0053	Hypothetical protein
52	36 676	37 101	426	-	ATG	Legendre 006	Hypothetical protein
53	37 101	37 259	159	-	ATG	Halo gp55	-
54	37 316	37 591	276	+	GTG	Legendre 007	Hypothetical protein
55	37 803	38 393	591	-	ATG	Leo	RuvC
56	38 390	38 830	441	-	ATG	Halo gp51	-
57	38 827	39 171	345	-	ATG	Leo 0047	Hypothetical protein
58	39 168	39 488	321	-	ATG	Leo 0046	Hypothetical protein
59	39 687	40 058	372	-	ATG	Leo 0044	Hypothetical protein

有 3 种不同的起始密码子, 其中 51 个 ATG, 7 个 GTG 和 1 个 TTG; Guo1 基因组的推定基因中, 最长的编码基因是基因 28 (4 014 nt), 编码卷尺蛋白, 最小的编码基因是基因 4 (153 nt), 编码的蛋白质功能不明, 除了 5 个编码基因位于正链外, 其余的编码基因都位于负链; 结构基因: 基因 41 和 42 编码入门蛋白, 基因 21、23、24、25、26 和 27 编码尾部蛋白, 基因 28 编码卷尺蛋白, 基因 37 编码衣壳蛋白; 裂解酶系统: 基因 16 和基因 17 分别编码裂解酶 B 和裂解酶 A; 整合酶系统: 基因 12 编码整合酶, 基因 10 编码阻遏酶; 基因 43 编码末端酶; 其中 11 个推定基因未匹配到相应的基因功能。

## 2.4 系统进化树构建

Guo1 全基因组序列 BLAST 比对发现: Guo1 与分枝杆菌噬菌体 G 群具有明显的同源性, 基因组序列覆盖率大于 95%, 一致性大于 98%, *E* 值为 0 的噬菌体有 14 株, 对 14 株相似性高的噬菌体构建系统进化树分析(图 1), Guo1 亲缘较近的是 Leo、BO4 和 DNAIII, 这 3 株噬菌体均由本课题组完成测序和基因初步分析, 已证实为 G 群噬菌体<sup>[16-18]</sup>,

且噬菌体 Liefie、Angel、Halo、Hope、BPs、Avrafan 均为 G 群噬菌体, 表明噬菌体 Guo1 应该归为分枝杆菌噬菌体 G 群。

## 2.5 生物学特性分析

**2.5.1 最佳感染复数测定:** 按照感染复数  $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-1}$ 、1、 $10^1$ 、 $10^2$  的比例加入噬菌体和宿主菌双层琼脂培养 24 h 后, 测定噬菌体滴度, 结果见表 4。当 MOI= $10^{-2}$  时, 产出的噬菌体数量最多, 因此推断最佳感染复数为 0.01。

**2.5.2 一步生长曲线的绘制:** 由图 2 中的噬菌体一步生长曲线可以看出: 分枝杆菌噬菌体 Guo1 感染宿主菌的潜伏期约为 120 min, 裂解期约为 120 min, 240 min 后进入平台期, 噬菌体的滴度不再增加, 裂解量约为 47 个。

**2.5.3 噬菌体对紫外线照射的抵抗力:** 图 3 表明噬菌体对紫外线具有很强的抵抗力, 在经历开始 30 min 的大幅下降后, 存活率上升并维持在 70% 长达 30 min; 60 min 时存活率又短暂下降, 在 75 min 时又开始上升, 至 90 min 时, 仍有 62% 的存活率。

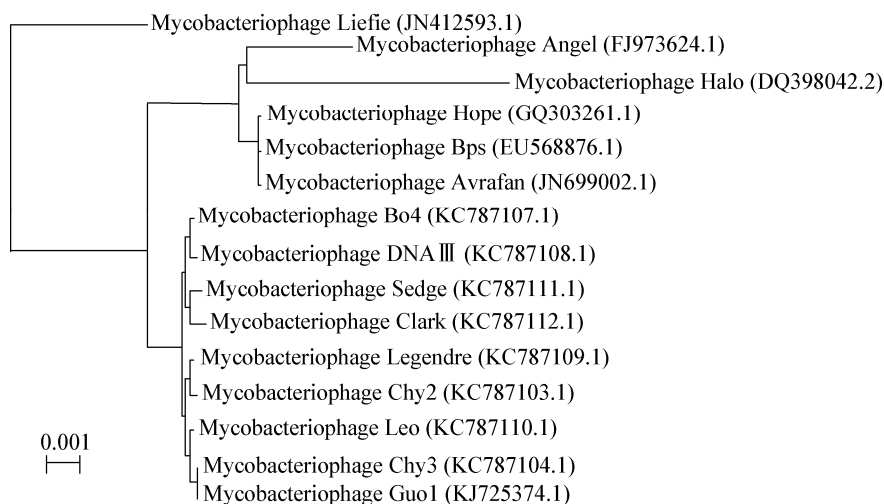


图 1 噬菌体 Guo1 的系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of mycobacteriophage Guo1

注: 进化树由 BLAST 比对产生(Tree method: Neighbor-Joining, Max Seq Difference: 0.05, Database: nr); 括号内代表 GenBank 中序列登录号; 标尺代表进化距离。

Note: Phylogenetic tree was constructed by BLAST (Tree method: Neighbor-Joining, Max Seq Difference: 0.05, Database: nr); The numbers in the bracket denote GenBank accession number, the scale plate denote evolutionary distance.

表 4 感染复数的测定

Table 4 Determination of multiplicity of infection

感染复数 MOI	噬菌体浓度 Number of bacterium phage (PFU/mL)	细菌浓度 Number of bacteria (CFU/mL)	24 h 滴度 Titer at 24 h (PFU/mL)
$10^{-3}$	$2 \times 10^9$	$1 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$
$10^{-2}$	$2 \times 10^8$	$1 \times 10^7$	$6.4 \times 10^7$
$10^{-1}$	$2 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$2.1 \times 10^7$
$10^0$	$2 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$0.7 \times 10^7$
$10^1$	$2 \times 10^5$	$1 \times 10^7$	$3.9 \times 10^7$
$10^2$	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^7$	$5.3 \times 10^7$

**2.5.4 噬菌体对氯仿的敏感性:** 噬菌体中加入氯仿作用 10 min 后, 与加 ddH<sub>2</sub>O 的对照组相比滴度下降明显, 存活率仅为 56%, 表明噬菌体对氯仿敏感。

**2.5.5 噬菌体对酒精的抵抗力:** 噬菌体中加入酒精作用 10 min 后, 进行双层平板测滴度, 未出现噬菌斑; 加 ddH<sub>2</sub>O 的对照组, 稀释至  $10^{-5}$  仍有 69 个噬菌斑, 表明噬菌体在 10 min 内就可以被 75% 酒精灭活。

**2.5.6 温度对噬菌体的影响:** 图 4 表明噬菌体对温

度很敏感, 最适温度为 37 °C, 在高于或低于最适温度时, 噬菌体的浓度都会明显降低, 在 60 °C 处理 30 min 噬菌体就完全失活; 除 37 °C 时处理时间对噬菌体滴度影响较小外, 在其他温度下, 噬菌体处理 30 min 后的滴度都要略高于 60 min。

**2.5.7 pH 对噬菌体的影响:** 图 5 表明噬菌体的最适 pH 为 7.0; 在碱性条件下, 噬菌体较稳定, 但 pH > 11.0 时噬菌体无法存活; 对酸性环境较敏感, 在 pH < 5.0 时活性明显下降 (pH = 5.0 时, 噬菌体滴度为  $2.7 \times 10^4$  PFU/mL), pH < 4.0 时噬菌体无法生存。

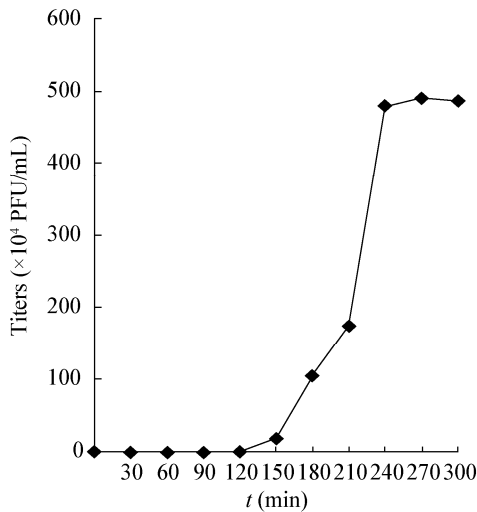


图2 噬菌体 Guo1 一步生长曲线

Figure 2 One step growth curve of Guo1

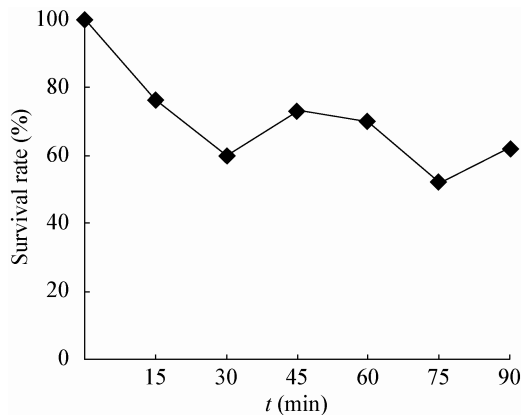


图3 噬菌体 Guo1 对紫外线的耐受性

Figure 3 Ultraviolet resistibility of Guo1

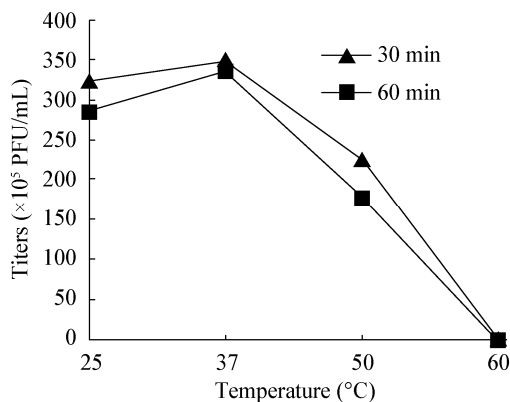


图4 温度对噬菌体 Guo1 的影响

Figure 4 Influence of temperature on Guo1

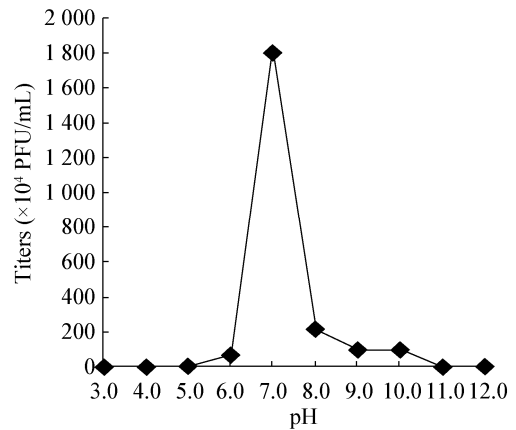


图5 pH 对噬菌体 Guo1 活性的影响

Figure 5 Influence of pH on the activity of Guo1

### 3 讨论

多数噬菌体基因组为线性双链 DNA,少数为环形 DNA,也有部分噬菌体的遗传物质为 RNA,而噬菌体 Guo1 是目前所发现的分枝杆菌 G 群噬菌体中唯一具有环状基因组结构的<sup>[19-20]</sup>,这值得我们进一步研究 G 群噬菌体之间的进化关系。重复序列的含量在不同的生物种类之间差异很大,如智人基因组中重复序列占 50%,而病毒基因组的重复序列只占 1%<sup>[21]</sup>。重复序列中含有丰富的遗传信息,参与基因表达的调控,在噬菌体 Guo1 中发现了 3 个串联重复序列,它们在基因表达中所起的作用尚不清楚。

国外的报道指出<sup>[22-23]</sup>:烈性噬菌体需要比溶源性噬菌体更多的 tRNA 用于转录,推测可能是溶源性噬菌体可以利用宿主体内的 tRNA 而不需要自身提供 tRNA 所致,在 Guo1 的基因组中未发现一个 tRNA,提示 Guo1 属于溶源性噬菌体;基因 12 的推定基因与本实验室前期测序的噬菌体 Leo 整合酶基因<sup>[18]</sup>相似,推断为整合酶基因,且基因 10 的推定基因与噬菌体 Sedge 阻遏酶基因相似,一般认为同时具有这两种酶才能保证噬菌体的溶源性<sup>[24]</sup>,结合以上两种证据支持噬菌体 Guo1 属于溶源性噬菌体。

采用高感染复数的方法测定噬菌体一步生长



曲线, 可以认为初始加入的宿主菌全部被感染; 未能吸附宿主菌的噬菌体通过高倍稀释避免二次吸附, 造成对后续时间点噬菌体滴度的影响。一步生长曲线测得 Guo1 潜伏期 120 min, 明显小于课题组前期研究的分枝杆菌噬菌体 Legendre<sup>[25]</sup>(潜伏期 180 min)和 Chy2<sup>[26]</sup>(潜伏期 210 min), 通常认为潜伏期短的噬菌体具有更好的临床应用前景, 而裂解量大小对噬菌体的裂解能力的影响存在争议<sup>[27-28]</sup>。Guo1 对酒精、高热、氯仿敏感, 对紫外线表现出抵抗性, 在实验操作中可以选酒精和高压灭菌来进行消毒; 目前大多数实验室都使用紫外灯照射消毒, 该噬菌体对紫外线抵抗性强, 应该避免单用紫外线消毒。Guo1 的最适 pH 在 7.0 左右, 人体正常的血液 pH 在 7.35-7.45 之间, 推测 Guo1 可以在血液 pH 的环境下用于结核病的治疗, 此外结核菌为胞内寄生菌, 造成耐药的结核菌常存在于巨噬细胞溶酶体内, 溶酶体的 pH 为 5.0, 此时 Guo1 仍可以生存, 推测噬菌体具有杀灭胞内结核菌的潜力。

随着抗生素的广泛使用, 耐药现象不仅发生在其他细菌性疾病, 在结核分枝杆菌中也同样变得日益严峻, 第一代抗结核药(异烟肼, 利福平, 吡嗪酰胺和乙胺丁醇)使用近四十年后, 目前还没有一种新药投入市场, 能够杀灭耐多药结核菌和超级耐药结核菌<sup>[29]</sup>。由于噬菌体杀灭细菌具有专一性强, 不会破坏正常菌群<sup>[30-31]</sup>, 且用量少具有放大效应的特性<sup>[32]</sup>, 逐渐成为研究的重点, 并取得了一定进展, Wilson 等就利用结核分枝杆菌噬菌体 D29 能够裂解结核菌的特性建立了一种快速检验结核菌的新技术 PhaB<sup>[33]</sup>。噬菌体生物学特性和遗传背景的研究是利用噬菌体的基础。

Piuri 等<sup>[10]</sup>发现噬菌体 TM4 野生株与噬菌体 TM4 motif 3 缺陷株相比: 将基因组 DNA 注入耻垢分枝杆菌休眠菌的能力更强, 而将基因组 DNA 注入对数生长期耻垢分枝杆菌的能力无差别, 这可能提示复苏休眠菌是具有 Motif3 基序的噬菌体的特有作用。我课题组前期实验验证噬菌体 TM4<sup>[12]</sup>能促使体外休眠菌复苏, 初步研究发现噬菌体 Guo1 (数

据未列出)同样可以复苏休眠菌, 生物信息学分析显示 TM4 和 Guo1 的尾部蛋白均包含 Motif 3 基序, 具有与 Rpf 相似的水解肽聚糖的能力, 然而 Rpf 在体外通过水解细胞壁肽聚糖促使休眠菌复苏的机制尚不清楚。在目前已经完成测序的分枝杆菌噬菌体 G 群中 Guo1 是唯一具有环状基因组的, 在明确了噬菌体 Guo1 的生物学特性和基因组结构后, 本课题组正在进一步研究 Motif 3 是否参与甚至主导了体内结核休眠菌的复苏以及 G 群噬菌体之间的进化关系。

## 参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2012[M]. Geneva: WHO Library, 2012: 89
- [2] Technical Guidance Group of the Fifth National TB Epidemiological Survey, The Office of the Fifth National TB Epidemiological Survey. The fifth national tuberculosis epidemiological survey in 2010[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2012, 34(8): 485-486 (in Chinese)  
全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-486
- [3] Gomez JE, McKinney JD. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance[J]. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland), 2004, 84(1/2): 29-44
- [4] Er J, Zhu XW, Liu ZQ. Resuscitating effect for dormant tuberculosis by recombinant resuscitation promoting factor (Rpf) proteins[J]. China Medical Engineering, 2008, 16(2): 92-95 (in Chinese)  
俱静, 朱雪薇, 刘忠泉. 复苏因子促进休眠结核杆菌复苏作用的研究[J]. 中国医学工程, 2008, 16(2): 92-95
- [5] Keep NH, Ward JM, Cohen-Gonsaud M, et al. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states[J]. Trends in Microbiology, 2006, 14(6): 271-276
- [6] Telkov MV, Demina GR, Voloshin SA, et al. Proteins of the Rpf (resuscitation promoting factor) family are peptidoglycan hydrolases[J]. Biochemistry Biokhimiia, 2006, 71(4): 414-422
- [7] Mc Nerney R, Kambashi BS, Kinkese J, et al. Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of *Pulmonary tuberculosis*[J]. Journal Clinical Microbiology, 2004, 42(5): 2115-2120
- [8] Kumar V, Loganathan P, Sivaramakrishnan G, et al. Characterization of temperate phage Che12 and construction of a new tool for diagnosis of tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland), 2008, 88(6): 616-623
- [9] Trigo G, Martins TG, Fraga AG, et al. Phage therapy is effective against infection by *Mycobacterium ulcerans* in a murine footpad model[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2013, 7(4): e2183
- [10] Piuri M, Hatfull GF. A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells[J]. Molecular Microbiology, 2006, 62(6): 1569-1585
- [11] Pedulla ML, Ford ME, Houtz JM, et al. Origins of highly

- mosaic Mycobacteriophage genomes[J]. Cell, 2003, 113(2): 171-182
- [12] Gan YL, Guo SL. Preliminary study on resuscitation of mycobacteriophage TM4 in dormant cells of *M. tuberculosis*[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science Edition), 2014, 34(1): 13-16 (in Chinese)  
甘易玲, 郭述良. 噬菌体 TM4复苏结核休眠菌的初步研究[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2014, 34(1): 13-16
- [13] Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences[J]. Journal Computational Biology, 2000, 7(1/2): 203-214
- [14] 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): 225-35
- [15] Huang JJ, Hu XM, Rao XC, et al. Biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP2[J]. Journal of Third Military Medical University, 2004, 26(13): 1133-1136 (in Chinese)  
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
- [16] Gan YL, Liu P, Wu TT, et al. Genetic information of mycobacteriophages DNAIII and its anti-tuberculosis potential[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science Edition), 2013, 33(10): 1323-1327 (in Chinese)  
甘易玲, 刘平, 邬亭亭, 等. 分枝杆菌噬菌体 DNAIII的遗传学信息及抗结核潜力初步研究[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2013, 33(10): 1323-1327
- [17] Gan YL, Wu TT, LIU P, et al. Characterization and classification of Bo4 as a cluster G mycobacteriophage that can infect and lyse *M. tuberculosis*[J]. Archives Microbiology, 2014, 196(3): 209-218
- [18] Jiang LS, Wu TT, Liu P, et al. Genetic information and biological characteristics of the mycobacteriophage Leo[J]. Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong, 2014, 43(5): 506-511 (in Chinese)  
江莉莎, 邬亭亭, 刘平, 等. 分枝杆菌噬菌体 Leo 的生物学和基因组学特征[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2014, 43(5): 506-511
- [19] Hatfull GF, Jacobs-Sera D, Lawrence JG, et al. Comparative genomic analysis of 60 Mycobacteriophage genomes: genome clustering, gene acquisition, and gene size[J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 397(1): 119-143
- [20] Hatfull GF. Complete genome sequences of 138 mycobacteriophages[J]. Journal of Virology, 2012, 86(4): 2382-2384
- [21] Ai DY. The meanings of repeat sequences on genomes[J]. Chemistry of Life, 2008, 28(3): 343-345 (in Chinese)  
艾队元. 基因组中重复序列的意义[J]. 生命化学, 2008, 28(3): 343-345
- [22] de Paeppe M, Taddei F. Viruses' life history: towards a mechanistic basis of a trade-off between survival and reproduction among phages[J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e193
- [23] Bailly-Bechet M, Vergassola M, Rocha E. Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages[J]. Genome Research, 2007, 17(10): 1486-1495
- [24] Broussard GW, Oldfield LM, Villanueva VM, et al. Integration-dependent bacteriophage immunity provides insights into the evolution of genetic switches[J]. Molecular Cell, 2013, 49(2): 237-248
- [25] Liu P, Wu TT, Peng L, et al. Biological characteristics of mycobacteriophage Legendre and its potentials in drug resistant tuberculosis control[J]. Journal of Third Military Medical University, 2012, 34(9): 821-825 (in Chinese)  
刘平, 邬亭亭, 彭丽, 等. 噬菌体 Legendre 的生物学特性及抗耐药结核潜力的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(9): 821-825
- [26] Liu P, Wu TT, Peng L, et al. Isolation and biological characteristics of mycobacteriophage Chy2[J]. Journal of Third Military Medical University, 2012, 34(12): 1176-1180 (in Chinese)  
刘平, 邬亭亭, 彭丽, 等. 分枝杆菌噬菌体 Chy2的分离及生物学特性[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(12): 1176-1180
- [27] Niu DY. Use of bacteriophage to control *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and their environment[D]. Dalian: Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2009 (in Chinese)  
牛冬燕. 应用噬菌体控制牛及其饲养环境中大肠杆菌 O157:H7的研究[D]. 大连: 大连理工大学博士学位论文, 2009
- [28] Zhou YB, Shen XD, Li M, et al. The biological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP3[J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2006, 31(10): 999-1001 (in Chinese)  
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
- [29] Kaneko T, Cooper C, Mdluli K. Challenges and opportunities in developing novel drugs for TB[J]. Future Medicinal Chemistry, 2011, 3(11): 1373-1400
- [30] Zhao QY, Zhu RL. Recent advances and prospects in bacteriophage therapy[J]. China Journal of Veterinary Medicine, 2010, 44(7): 40-43 (in Chinese)  
赵庆友, 朱瑞良. 噬菌体制剂的研究现状及发展前景[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(7): 40-43
- [31] Hu ZY, Cai LT. Research progress on phage therapy of bacterial plant disease[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2011, 39(3): 101-103 (in Chinese)  
胡重怡, 蔡刘体. 噬菌体治疗作物细菌性病害的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(3): 101-103
- [32] Guenther S, Huwyler D, Richard S, et al. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods[J]. Applied Environmental Microbiology, 2009, 75(1): 93-100
- [33] Wilson SM, Al-Suwaidi Z, McNeerney R, et al. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Nature Medicine, 1997, 3(4): 465-468