

研究报告

一株感染铜绿假单胞菌的双链 RNA 噬菌体
PaP6 的分离和鉴定郭棵棵¹ 杨雨卉¹ 沈伟¹ 费文斌² 乐率¹ 胡福泉^{1*}

(1. 第三军医大学基础部微生物教研室 重庆 400038)

(2. 菲吉乐生物科技有限公司 江苏 南京 210000)

摘要:【目的】鉴定一株新分离的铜绿假单胞菌噬菌体 PaP6 的生物学特性。【方法】利用铜绿假单胞菌临床分离株 PA038 为宿主, 从西南医院污水中分离得到一株裂解性噬菌体 PaP6, 观察其噬斑特点; 氯化铯密度梯度离心纯化噬菌体颗粒后, 用透射电子显微镜观察噬菌体形态; 提取 PaP6 基因组, 通过 DNA 酶和 RNA 酶酶切, 做基因组酶切图谱分析; 按照感染复数(MOI)分别为 10、1、0.1、0.01、0.001 和 0.000 1 加入噬菌体和宿主菌, 裂解细菌后, 测定噬菌体滴度; 以 MOI=10 的比例加入噬菌体和宿主菌, 绘制一步生长曲线; 用 112 株铜绿假单胞菌临床分离株检测 PaP6 宿主谱。【结果】PaP6 的噬斑直径约 2 mm–4 mm, 圆形透明, 边缘清晰; PaP6 噬菌体呈多面体立体对称的头部, 直径约 45 nm; 酶切图谱表明 PaP6 基因组对 DNase 不敏感, 对 RNase 敏感, 未酶切基因组具有 3 节段双链 RNA (dsRNA), 长度分别约为 9.0、4.5、3.5 kb, 共约 17 kb; 当 MOI 为 0.1 时 PaP6 感染其宿主菌产生的子代噬菌体滴度最高, 达到 3.4×10^9 PFU/mL; 用一步生长曲线描绘了其生长特性; PaP6 可以感染 40.1% 的临床分离株, 是一株比较广谱的噬菌体。【结论】首次报道了一株铜绿假单胞菌的 dsRNA 分节段噬菌体, 分类学上属于囊病毒科, 该噬菌体具有较广的宿主谱, 在噬菌体治疗领域具有应用前景。

关键词: 铜绿假单胞菌噬菌体, 双链 RNA 噬菌体, 囊病毒科噬菌体

Isolation and characterization of PaP6, a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage containing three dsRNA genomic segmentsGUO Ke-Ke¹ YANG Yu-Hui¹ SHEN Wei¹ FEI Wen-Bin² LE Shuai¹ HU Fu-Quan^{1*}

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

(2. Phagelux (Nanjing) Bio-tech Company Limited, Nanjing, Jiangsu 210000, China)

Abstract: [Objective] To characterize a novel *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP6 via its biological properties. [Methods] Double-layer agar culture method was applied to observe the plaques of PaP6. Phage particles were examined by electron microscopy after cesium chloride

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31570173)

*Corresponding author: E-mail: hufuquan2009@aliyun.com

Received: December 09, 2015; **Accepted:** March 02, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 04, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31570173)

*通讯作者: E-mail: hufuquan2009@aliyun.com

收稿日期: 2015-12-09; 接受日期: 2016-03-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-04

density gradient centrifugation. PaP6 genome was extracted and digested with either DNase or RNase. Phage and host were mixed with multiplicity of infection (MOI) 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 and 0.000 1 respectively. Phage titers were measured after bacteria lysis. For one step growth experiments, phage and host with an MOI of 10 were used. The host range of PaP6 was tested with 112 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates strains. **[Results]** The plaque of PaP6 was transparent and the edge of the plaque was clear. Its diameter was about 2 to 4 mm. PaP6 phage had an isometric head approximately 45 nm in diameter. Enzyme digestion experiment shows that PaP6 contained three double-stranded RNA segments. Infecting host bacteria with MOI of 0.1 gave the highest phage offspring. Phage growth characteristics were determined by one step growth curve. PaP6 infects 40.1% of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolated strains. **[Conclusion]** PaP6 genome is composed of three dsRNA segments, and it is the first reported Cystoviridae phage that infects *Pseudomonas aeruginosa*. The host range of PaP6 is wide, which implies its potential in phage therapy.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa* phages, dsRNA phage, Cystoviridae phage

铜绿假单胞菌是一种常见的机会致病菌, 常导致囊性纤维化病人的肺部感染以及免疫力低下人群的感染, 如烧伤和艾滋病人^[1]。随着抗生素的广泛应用甚至滥用, 铜绿假单胞菌的耐抗生素现象越来越普遍, 多重耐药的铜绿假单胞菌越来越常见于临床, 给临床治疗带来巨大挑战。因此, 噬菌体治疗再次受到人们的关注^[2-3]。

噬菌体是专门感染细菌的一类病毒, 可以杀死细菌。目前, 越来越多的实验证明了铜绿假单胞菌噬菌体治疗的可行性, 如 Morello 等用裂解性噬菌体成功治疗铜绿假单胞菌肺部感染的小鼠^[4]。Torres-Barceló 等用噬菌体 LUZ7 和链霉素联合使用, 可以更好地杀灭铜绿假单胞菌^[5]。2014 年欧盟发布了一项噬菌体临床试验“Phagoburn”, 在法国、比利时和荷兰招募 220 名伤口受到铜绿假单胞菌或大肠杆菌感染的烧伤患者, 用 Pherecydes 制药公司生产的噬菌体鸡尾酒制剂进行治疗的临床试验正在进行中^[6]。铜绿假单胞菌感染的噬菌体治疗前景被人们看好。

目前, NCBI 中可查询到的假单胞菌属噬菌体全基因组序列共有 139 条(2015 年 12 月 1 日)。其中, 92.8% 的噬菌体都属于有尾噬菌体目(Caudovirales), 具有双链 DNA, 根据其噬菌体尾丝的特点可以分为: 短尾病毒科(Podoviridae)、肌尾病毒科(Myoviridae)和长尾病毒科(Siphoviridae)。目前已知的感染假单胞菌属的无尾

噬菌体仅 10 株: 2 株 ssDNA 噬菌体, 属于丝状噬菌体科(Inoviridae), 2 株 ssRNA 噬菌体属于光滑病毒科(Leviviridae family), 属于分节段 dsRNA 囊病毒科(Cystoviridae)的噬菌体有 6 株, 分别是 phi6、phi8、phi12、phi13、phiNN 和 phi2954^[7-12]。

囊病毒科噬菌体是一类结构特殊的噬菌体, 具有 3 段双链 RNA, 且核衣壳外有一层外膜包裹。以研究最为深入的 phi6 为例, 其含有的 3 节双链 RNA 分别长 6 374、4 063 和 3 948 bp, 共编码 14 个基因, 绝大多数主要为结构蛋白。phi6 的完整病毒颗粒具有三层衣壳结构。最内层是由 120 个 P1 蛋白组成的核心衣壳, 核心衣壳外面由一层 P8 蛋白包裹。这两层一起称为核衣壳。核衣壳外面是一层脂质包膜, 包膜表面有 P9、P3 和 P6 三种蛋白, 其中 P3 和 P6 蛋白是噬菌体的受体吸附蛋白, 决定了其宿主的特异性^[13]。目前, NCBI 中报道的 6 株囊病毒科噬菌体都以丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)为宿主, 从植物表面分离得到。本文首次报道以铜绿假单胞菌为宿主, 从西南医院污水中分离到一株具有 3 节段 dsRNA 基因组的囊病毒科噬菌体, 命名为 PaP6 (*Pseudomonas aeruginosa* phage 6)。本课题组曾经报道了多株铜绿假单胞菌噬菌体的相关研究, 如 PaP1^[14]、PaP2^[15]、PaP3^[16], 而 PaP6 是一株国际上首次报道的感染铜绿假单胞菌的囊病毒科噬菌体。本课题对 PaP6 进行生物学特性的研究, 丰富了对噬菌体、

尤其是囊病毒科噬菌体多样性的认识,也为今后噬菌体治疗潜力的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 112 株铜绿假单胞菌临床分离株分别来自重庆西南医院、新桥医院和大坪医院临床科室。标准株 PAO1 为科室保存。噬菌体 PaP6 是以临床分离株 PA038 为宿主菌从西南医院污水中分离得到。

1.1.2 主要试剂: 液体 LB 培养基(1% NaCl, 1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母提取物)、固体培养基(含 1.5% 琼脂粉的液体培养基)、半固体培养基(含 0.75% 琼脂粉的液体培养基)、RNase A、DNase I、TE 缓冲液(1 mol/L pH 8.0 的 EDTA, 10 mmol/L TrisCl)、1% 琼脂糖凝胶、CsCl₂ 溶液(密度分别为 1.15 g/mL、1.35 g/mL、1.50 g/mL、1.70 g/mL)。

1.1.3 主要仪器: JM-250 核酸电泳仪, 大连捷迈科技发展有限公司; 透射式电镜, Philips; 高速低温离心机, Sigma; 核酸凝胶扫描仪、分光光度计、蛋白凝胶扫描仪, Bio-Rad。

1.2 方法

1.2.1 细菌和噬菌体的分离: 从西南医院污水处理站取得的污水, 10 000×g 离心 10 min, 取上清液, 用 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌。向过滤后的上清液中加入 200 mL 液体 LB^[16] 和 3 mL 培养至对数早期的临床菌株 PA038 菌液。置于 37 °C、220 r/min 培养过夜。次日, 将混合液 10 000×g 离心 10 min, 取上清, 用 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌。将滤液进行 10 倍的梯度稀释后, 从各个梯度中分别取 100 μL 与 100 μL 宿主菌 PA038 混合, 室温静置 15 min。加入大约 50 °C、0.75% 琼脂的半固体 LB 3 mL, 充分混匀后, 倒于普通的 LB 平板上, 半固体胶凝固后, 将双层琼脂平板置于 37 °C 培养过夜。次日观察是否有噬斑长出, 并观察噬斑特点。待噬斑形成后, 挑取单个噬斑, 将其接种于培养至对数早期的宿主菌中, 进一步纯化和扩增分离到的噬菌体, 低温保存备用。

1.2.2 噬菌体基因组的提取和鉴定: 采用天根生化科技(北京)有限公司的病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(Lot: N2603)进行抽提。抽提得到基因组后, 分别进行 DNase 和 RNase 酶切, 并进行琼脂糖电泳观察结果。

1.2.3 噬菌体的透射电镜观察: CsCl₂ 梯度离心纯化噬菌体颗粒, 80 000×g 离心 1.5 h, 然后取 20 μL 纯化后的噬菌体, 滴加在铜网上, 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 30 s, 同样将多余的染液吸干, 干燥后电镜观察。

1.2.4 噬菌体对氯仿的敏感性: 取 PaP6 噬菌体 200 μL, 加入等体积的氯仿, 充分振荡混合 1 min。10 000×g 离心 10 min。取上层液体, 即氯仿处理后的噬菌体。将氯仿处理前后的噬菌体液各 1 μL 分别滴加在含有宿主菌的双层琼脂平板上, 观察氯仿处理后噬菌体是否形成噬斑, 以确定其是否具有繁殖活性。

1.2.5 最佳感染复数测定: 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。方法是挑取宿主菌单菌落接种于 3 mL 液体 LB 中, 37 °C、220 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀=0.2, 相当于 1×10⁸ CFU/mL。按照 1:10 000、1:1 000、1:100、1:10、1:1、10:1 六种不同的比例加入噬菌体和宿主菌, 37 °C、220 r/min 振荡培养至宿主菌被裂解澄清, 再 10 000×g 离心 10 min, 收集上清, 并用噬斑实验测定噬菌体滴度。产生最高噬菌体滴度的比例即为最佳感染复数。

1.2.6 噬菌体的一步生长曲线: 一步生长曲线是指从噬菌体吸附到宿主菌被裂解而释放子代噬菌体这样一个完整的增殖周期, 它反映的是噬菌体在一个复制周期中的数量增殖变化规律。方法是将噬菌体比宿主菌为 10:1 充分混合, 置 37 °C、220 r/min 振荡培养 15 min 后, 13 000×g 离心 30 s, 弃上清, 用 1 mL 液体 LB 洗涤 3 次后, 再用预热的 LB 液混悬沉淀(总体积为 5 mL)并将其充分混匀, 然后迅速置于 37 °C 摇床中 160 r/min 振荡培养, 同

时开始计时, 分别在 0 时刻和每隔 10 min 各取样 50 μL , 共取样 2 h。取样后, 立即 13 000 $\times g$ 离心 30 s, 吸取上清后用双层琼脂平板法测定噬菌体滴度。实验生物学重复 3 次。最后将实验所得数据进行统计绘图, 得出 PaP6 的潜伏期、暴发期和暴发量 3 个参量。

1.2.7 噬菌体结构蛋白的分析: 参考萨姆布鲁克《分子克隆实验指南》第 3 版的提取方法, 略有改动。取 PaP6 噬菌体原液 600 mL, 加入固体 PEG8000 (聚乙二醇)至终浓度 10% (质量体积比), 振荡溶解后冰浴 1 h。然后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 10 min, 尽量弃掉上清; 用 30 mL TM 液 (0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 混悬沉淀。然后对噬菌体粗制颗粒做 CsCl_2 密度梯度离心, 对样本进行浓缩, 再进行 SDS-PAGE。SDS 凝胶, 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 4%, 上样量为 50 μL , 电泳采用横流 20 mA、100 min。

1.2.8 PaP6 的宿主谱研究: 利用噬斑实验检验 PaP6 对 112 株临床菌株和 PAO1 的裂解能力。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的噬斑特征

从西南医院污水中分离得到噬菌体 PaP6。在平板上可观察到直径为 2 mm–4 mm 的圆形噬斑, 呈透明样, 边界清晰, 表现出裂解性噬菌体的噬斑特征(图 1A)。噬菌体在液体培养过程中, 可以完全将宿主菌裂解澄清, 因此, 初步断定 PaP6 为裂解性噬菌体。

2.2 噬菌体的形态特征

CsCl_2 密度梯度离心纯化噬菌体 PaP6 后, 用透射电镜进行观察。电镜照片可见, 噬菌体 PaP6 呈二十面体结构, 直径大小约 45 nm (图 1B), 未见尾部结构。

2.3 噬菌体对氯仿敏感

将噬菌体 PaP6 与等体积氯仿混合振荡 1 min 后, 噬菌体完全失去感染活性, 不能形成噬斑(图 1C), 表明噬菌体 PaP6 具有脂质囊膜结构, 对氯仿敏感。但在电镜放大 12 万倍的条件下, 未能看清楚噬菌体的囊膜结构。

2.4 噬菌体的核酸类型鉴定

图 2A 为噬菌体基因组的酶切鉴定, 泳道 2 显示未用核酸酶切的 PaP6 的基因组有 3 条带, 说明天然的 PaP6 基因组由 3 个节段组成。图 2A 中的 3、4 泳道显示, 3 个节段的基因组均可被 RNA 酶降解, 而不能被 DNA 酶降解, 说明 PaP6 的基因组为 3 节段的双链 RNA。3 节段大小分别约为: 9.0、4.5、3.5 kb (图 2A)。

2.5 噬菌体结构蛋白的分析

SDS-PAGE 主要是对噬菌体 PaP6 的结构蛋白进行分析。由电泳结果可知, 凝胶上至少出现了 9 条蛋白条带, 说明 PaP6 至少有 9 种结构蛋白(图 2B)。

2.6 最佳感染复数的测定

按照不同比例加入噬菌体和宿主菌, 培养 3.5 h 后, 测定各管中的噬菌体滴度。结果如表 1 所示, 当噬菌体与细菌的比例为 0.1, 产生的子代噬

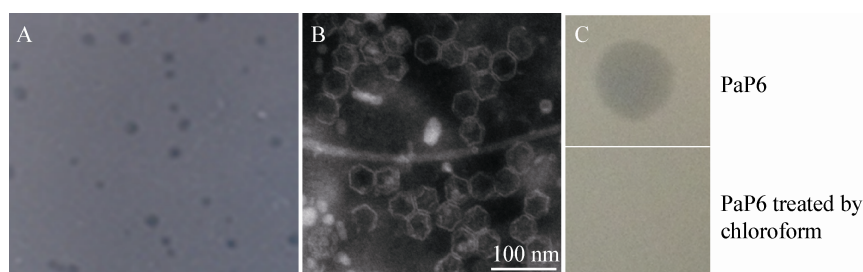


图 1 噬菌体 PaP6 噬斑、电镜形态和氯仿敏感实验

Figure 1 PaP6 plaques, electron microscopy photograph of phage and chloroform sensitive experiment

注: A: 噬菌体 PaP6 噬斑; B: PaP6 电镜形态; C: 氯仿敏感实验。

Note: A: PaP6 plaques; B: Electron microscopy photograph of PaP6; C: Chloroform sensitive experiment.

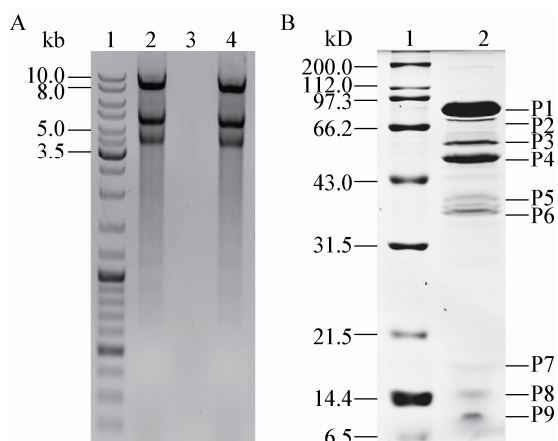


图2 噬菌体 PaP6 全基因组电泳结果和结构蛋白电泳图谱

Figure 2 PaP6 genome and SDS-PAGE analysis of PaP6 structure proteins

注：A：PaP6 基因组电泳图。1：蛋白分子量标准；2：未酶切的 PaP6 基因组；3：用 RNA 酶酶切后的 PaP6 基因组；4：用 DNA 酶酶切后的 PaP6 基因组。B：结构蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱。1：蛋白分子量标准；2：PaP6 噬菌体结构蛋白。

Note: A: Agarose gel electrophoresis of PaP6 genome. 1: Protein ladder; 2: PaP6 genome; 3: RNase digestion of the PaP6 genome; 4: DNase digestion of the PaP6 genome. B: SDS-PAGE analysis of PaP6 structure proteins. 1: Protein ladder; 2: Structural protein of PaP6.

表1 噬菌体最佳感染复数的测定

Table 1 Determination of optional 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	2.5×10^7
2	1×10^8	1×10^8	1×10^0	3.3×10^7
3	1×10^8	1×10^7	1×10^{-1}	8.5×10^9
4	1×10^8	1×10^6	1×10^{-2}	3.4×10^9
5	1×10^8	1×10^5	1×10^{-3}	4.5×10^7
6	1×10^8	1×10^4	1×10^{-4}	2.8×10^7

菌体滴度最高(8.5×10^9 PFU/mL)。因此, PaP6 的最佳感染复数为 0.1。

2.7 一步生长曲线的绘制

噬菌体的繁殖经历 3 个时期, 即潜伏期、裂解期和平台期。潜伏期是指从噬菌体开始吸附至细菌开始释放出新的噬菌体之间的一段时期; 裂解期

是被感染细菌开始裂解至全部菌细胞都被裂解之间的一段时期; 平台期是指裂解期之后, 噬菌体滴度保持稳定的时期。一步生长曲线显示, PaP6 感染宿主菌的潜伏期约为 10 min, 裂解期约为 50 min (图 3), 50 min 之后滴度变化不大, 为平台期。根据裂解量计算公式: 裂解量=暴发末期噬菌体滴度-感染初期宿主菌浓度, 即得出 PaP6 感染宿主菌 PA038 的裂解量约为 10。

2.8 PaP6 的宿主谱

通过对 112 株临床菌株和标准株 PAO1 进行噬斑实验, 发现 PaP6 不能裂解标准株 PAO1, 但是能裂解 40.1% 的临床分离株, 说明 PaP6 是一株相对广谱的噬菌体。

3 讨论

噬菌体是最具生物多样性的一类生物。有报道称生物圈中的噬菌体超过 10^{31} 种, 目前已分离鉴定的噬菌体仅 1 万种左右。因此, 分离鉴定尽可能多的新噬菌体, 对于人们了解噬菌体的生物多样性及其基因多样性和生物学特性具有重要意义。

我们首次分离得到一株感染铜绿假单胞菌的 dsRNA 噬菌体。其噬菌体颗粒形态为对称的二十面体结构, 基因组为 3 节段的双链 RNA, 大小分别约为 9.0、4.5 和 3.5 kb, 总共约 17 kb。氯仿敏感实验证实 PaP6 对氯仿敏感, 说明 PaP6 是具有囊膜的噬菌体。PaP6 的 SDS-PAGE 结果显示其具有 9 个明显的结构蛋白, 其它几株囊病毒科噬菌体也具

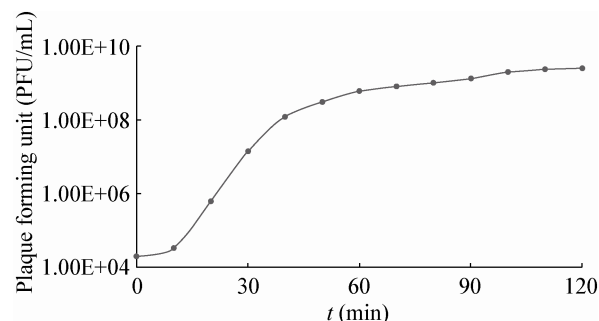


图3 噬菌体 PaP6 一步生长曲线

Figure 3 One-step growth curve of PaP6

有 8–9 个结构蛋白, 与 PaP6 的蛋白电泳图类似^[9,11]。根据噬菌体的形态学特征、有无尾部结构、有无囊膜、基因组结构特征、对氯仿的敏感性以及结构蛋白特征, 我们初步将 PaP6 确定为囊病毒科噬菌体。目前, 囊病毒科噬菌体的代表株是噬菌体 phi6, 已报道属于囊病毒科的噬菌体还包括 phi8、phi12、phi13、phiNN 和 phi2954, 但之前报道的这 6 株噬菌体均是以丁香假单胞菌(植物寄生菌)为宿主分离得到的。本研究分离鉴定的 PaP6, 是首次报道的一株能感染人类病原体铜绿假单胞菌的 dsRNA 噬菌体, 并将其分类到囊病毒科。这说明囊病毒科噬菌体不仅仅限于感染丁香假单胞菌, 也有感染铜绿假单胞菌的噬菌体。推测囊病毒科噬菌体在自然界的分布可能更为广泛。

铜绿假单胞菌是一种临床常见的机会致病菌, 耐药现象常常困扰着临床治疗。因此, 铜绿假单胞菌的噬菌体治疗已经从动物实验走向临床应用阶段了。噬菌体治疗相对抗生素治疗有一个缺点, 即噬菌体具有高度的菌株特异性, 可以杀死某些菌株, 往往不能杀死绝大多数其他菌株^[17]。因此, 噬菌体治疗大多需要制备含多种噬菌体的鸡尾酒混合制剂, 以提高其裂菌谱的覆盖率。在这种情况下, 广谱噬菌体的分离和应用则能更好地用于临床治疗。本课题分离的 PaP6 噬菌体宿主谱相对较广, 能感染约 40.1% 的临床菌株。因此, PaP6 有用于噬菌体鸡尾酒治疗的更大潜力。噬菌体鸡尾酒制剂常常需要根据细菌的变异情况进行调整, 补充或替换一些噬菌体。因此, 根据细菌变异情况而分离新的不同噬菌体来重新组合噬菌体鸡尾酒具有重要意义。

另外, 用一株噬菌体通过试管内人工进化、突变, 构建具有巨大库容量的噬菌体突变库, 从中筛选能裂解目标病原体的策略, 也是具有潜力的研究方向之一。细菌对噬菌体的不敏感性也可以理解为细菌对噬菌体的耐受, 而噬菌体又可通过突变来再次感染耐受了细菌, 这种噬菌体-宿主菌之间的寄生与反寄生历程是在相互斗争中的共进化现象^[18]。

如 Ferris 等利用 phi6 快速筛选到了 40 株可感染新宿主菌的突变噬菌体^[19], 而 Paterson 等用荧光假单胞菌及其噬菌体 phi2 进行共进化实验, 发现细菌-宿主共进化 4 周后, 新的噬菌体的宿主谱得到扩展^[20]。dsRNA 的丁香假单胞菌噬菌体 phi6 出现感染新宿主的突变概率是 1.156×10^{-6} ^[21], 而 dsDNA 的铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 出现感染新宿主的突变的概率约 1×10^{-8} ^[17], 也就是说 RNA 噬菌体的突变率相对 DNA 噬菌体高出约 100 倍。这是因为 dsRNA 噬菌体复制时需要 RNA 依赖的 RNA 聚合酶, RNA 聚合酶没有 DNA 聚合酶的保真性高, 因此 RNA 噬菌体(或者 RNA 病毒)常常具有较高的突变率^[19], 利用 dsRNA 噬菌体进行共进化实验更容易筛选到宿主谱突变或扩展宿主谱的噬菌体。这可能也是应对细菌突变而快速筛选新的突变噬菌体的方法之一。因此, 本课题组下一步将围绕 PaP6 的基因组特点及其突变和进化规律进行深入研究。

参考文献

- [1] Berrazeg M, Jeannot K, Enguéné VYN, et al. Mutations in β -Lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(10): 6248-6255
- [2] Beeton ML, Alves DR, Enright MC, et al. Assessing phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* using a *Galleria mellonella* infection model[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2015, 46(2): 196-200
- [3] Pires DP, Boas DV, Sillankorva S, et al. Phage therapy: a step forward in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(15): 7449-7456
- [4] Morello E, Sausseureau E, Maura D, et al. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16963
- [5] Torres-Barceló C, Arias-Sánchez FI, Vasse M, et al. A window of opportunity to control the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* combining antibiotics and phages[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106628
- [6] Resch G, Que YA, Gabard J, et al. Update on PHAGOBURN, the First European clinical trial of phage therapy[A]//Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology[M]. Boston, Massachusetts: American Society for Microbiology, 2014, 114: 1277
- [7] Gottlieb P, Wei H, Potgieter C, et al. Characterization of variant ϕ 12, a bacteriophage related to variant ϕ 6: nucleotide sequence of the small and middle double-stranded RNA[J]. *Virology*, 2002, 293(1): 118-124
- [8] Hoogstraten D, Qiao XY, Sun Y, et al. Characterization of Φ 8, a bacteriophage containing three double-stranded RNA genomic segments and distantly related to Φ 6[J]. *Virology*, 2000, 272(1): 218-224
- [9] Mäntynen S, Laanto E, Kohvakka A, et al. New enveloped

- dsRNA phage from freshwater habitat[J]. Journal of General Virology, 2015, 96(5): 1180-1189
- [10] Qiao XY, Qiao J, Onodera S, et al. Characterization of Φ 13, a bacteriophage related to Φ 6 and containing three dsRNA genomic segments[J]. Virology, 2000, 275(1): 218-224
- [11] Qiao XY, Sun Y, Qiao J, et al. Characterization of Φ 2954, a newly isolated bacteriophage containing three dsRNA genomic segments[J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 55
- [12] Vidaver AK, Koski RK, van Etten JL. Bacteriophage ϕ 6: a lipid-containing virus of *Pseudomonas phaseolicola*[J]. Journal of Virology, 1973, 11(5): 799-805
- [13] Katz A, Alimova A, Futerman E, et al. Bacteriophage ϕ 6-structure investigated by fluorescence Stokes shift spectroscopy[J]. Photochemistry and Photobiology, 2012, 88(2): 304-310
- [14] Lu SG, Le S, Tan YL, et al. Genomic and proteomic analyses of the terminally redundant genome of the *Pseudomonas aeruginosa* Phage PaP1: establishment of genus PaP1-Like phages[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62933
- [15] Huang JJ, Hu XM, Rao XC, et al. Biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP2[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 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] 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
- [17] Le S, He XS, Tan YL, et al. Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PaP1 and JG004[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68562
- [18] Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(5): 317-327
- [19] Ferris MT, Joyce P, Burch CL. High frequency of mutations that expand the host range of an RNA virus[J]. Genetics, 2007, 176(2): 1013-1022
- [20] Paterson S, Vogwill T, Buckling A, et al. Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution[J]. Nature, 2010, 464(7286): 275-278
- [21] Ford BE, Sun B, Carpino J, et al. Frequency and fitness consequences of bacteriophage Φ 6 host range mutations[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113078

(上接 p.906)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>