

研究报告

一株强裂解性大肠杆菌 T1 样噬菌体新成员的分离与鉴定

傅强 单文雅 王兆飞 李世雨 王恒安 孙建和 严亚贤*

(上海交通大学农业与生物学院 上海市兽医生物技术重点实验室 上海 200240)

摘要:【目的】自然界中噬菌体种类繁多,其裂菌功能在针对细菌耐药方面具有潜在应用价值。不同噬菌体也呈现出显著的基因多样性及宿主特异性。从上海某猪场仔猪肠内容物样品中分离、纯化大肠杆菌的裂解性噬菌体,分析其生物学特性和病毒学特征,为探索应用噬菌体治疗细菌性感染提供研究材料。【方法】采用双层琼脂平板法分离、纯化噬菌体,观察噬菌斑特征,通过电镜观察噬菌体形态特征,测定其裂菌谱、最佳感染复数、一步生长曲线和生物学特性,进行噬菌体全基因组测序和遗传进化分析。【结果】分离、纯化获得一株能高效裂解大肠杆菌 K-12 菌株的噬菌体,命名为 vB_EcoS_SH2 (SH2),噬菌斑呈圆形、大而透明、边缘整齐。电镜观察 SH2 的头部呈二十面体立体对称,尾部较长。噬菌体的潜伏期为 10 min,暴发期为 60 min,裂解量高达 121 PFU/感染细胞,其最佳感染复数为 0.1。基因组测序和比对结果表明,SH2 的核酸类型为 dsDNA,基因组全长为 49 088 bp, G+C% 含量为 45%, GenBank 登录号为 KY985004,结合电镜观察及 BLASTp 分析,确定其属于有尾噬菌体目长尾噬菌体科成员。同源性分析及进化分析表明,该噬菌体为大肠杆菌 T1 样噬菌体的新成员。【结论】分离鉴定了一株裂解效率极高的大肠杆菌 T1 样噬菌体,并确认其为 T1 样噬菌体新成员,为研究大肠杆菌噬菌体及其抗菌应用提供了新的实验材料。

关键词: 大肠杆菌, T1 样噬菌体, 生物学特性, 基因组分析

Isolation and characterization of an efficient lytic T1-like phage against *Escherichia coli*

FU Qiang SHAN Wen-Ya WANG Zhao-Fei LI Shi-Yu WANG Heng-An
SUN Jian-He YAN Ya-Xian*

(Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] Bacteriophages are recognized as the most abundant microorganisms on earth, and have potential to control antibiotic-resistant bacterial infections for their bactericidal activity.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31272580, 31372500, 31772744); Special Fund for Public Welfare Industry of Chinese Ministry of Agriculture (No. 201303041)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34206003; E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn

Received: July 09, 2017; **Accepted:** August 28, 2017; **Published online** (www.cnki.net): September 11, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31272580, 31372500, 31772744); 国家公益性行业(农业)科研专项项目(No. 201303041)

*通讯作者: Tel: 86-21-34206003; E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-07-09; **接受日期:** 2017-08-28; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-09-11

Bacteriophages display remarkable genetic diversity and host specificity. To determine the biological characteristics and sequences of an efficient lytic *Escherichia coli* phage isolated from swine intestines. [Methods] Potential phages in the samples from piglet intestinal contents were isolated and purified, and plaque characteristics of the phage were observed. Morphological analysis was performed by electron microscope. The host spectrum, multiplicity of infection, one-step growth curve, thermal stability, pH stability, sensitivity to ultraviolet and chloroform sensitivity were determined, and genomic evolution was analyzed. [Results] A new lytic *Escherichia coli* phage, named vB_EcoS_SH2 (SH2), was isolated. The phage plaque was shown as big, circular, transparent and neat. Morphological analysis by electron microscopy revealed that phage SH2 had an icosahedron head with 50 nm in diameter, and a systolic tail fiber with 8 nm width and 120 nm length. Phage SH2 had a short latent period of 10 min and an outbreak period of 60 min, and a burst size of 121 PFU/infected cell. The optimal MOI is 0.1. Genome sequencing and comparison revealed that the nucleic acid type of SH2 is dsDNA, and the DNA genome of SH2 is composed of 49 088 bp with a G+C% content of 45% (GenBank accession number: KY985004). Phage morphology and BLASTp analysis revealed that SH2 belongs to the family of Caudovirales, Siphoviridae. Genomic and phylogenetic analysis suggested that the phage is closely related to phage T1, with 95% homology to T1 phage. [Conclusion] A novel efficient lytic T1-like phage vB_EcoS_SH2 against *Escherichia coli* was identified. The microbiological properties of SH2 suggest that it may be useful for controlling bacterial populations.

Keywords: *Escherichia coli*, T1-like phage, Biological characteristics, Genomic analysis

噬菌体是一种细菌病毒, 在自然界中广泛存在。噬菌体以细菌为宿主, 影响着细菌的生态及进化^[1]。大多数噬菌体为有尾噬菌体, 具有尾丝蛋白, 能特异性识别并结合宿主菌表面的受体。有尾噬菌体目拥有 3 个成员, 分别是肌尾噬菌体科(Myoviridae)、长尾噬菌体科(Siphoviridae)和短尾噬菌体科(Podoviridae)^[2]。比较基因组学和蛋白组学分析技术在揭示噬菌体多样性及其进化关系, 以及噬菌体与宿主菌相互作用关系中发挥了重要作用。特别是对噬菌体及其裂菌机制的研究, 对减少抗生素的使用和细菌耐药性的产生具有积极作用。近年来, 有较多裂解性噬菌体用于细菌性疾病的预防和治疗^[3-4]、细菌检测^[5]及生食蔬菜的表面杀菌剂^[6], 为开发噬菌体裂菌制剂展示了广阔的应用前景。

噬菌体一般具有种属特异性甚至菌株特异性, 噬菌体尾丝蛋白与细菌表面受体结合, 介导噬菌体侵入细菌, 从而发挥裂菌作用, 因此, 尾丝蛋白和细菌表面受体决定了噬菌体的裂菌谱。本研究分离到一株裂解能力强大的噬菌体, 其对大肠杆菌 K-12 菌株具有高效裂解效果, 通过对其

编码蛋白的比对分析, 推测该噬菌体为 T1 样噬菌体。通过对其生物学特性及基因序列分析, 将为进一步揭示其高效裂菌机制及后续噬菌体的改造和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及菌株

实验中噬菌体分离所用的仔猪肠内容物样品采自上海某猪场。大肠杆菌 K-12 菌株 MC1061、MG1655 和 DM1187, 大肠杆菌 O157 菌株 Min27, 禽大肠杆菌(致病性大肠杆菌 APEC 和非致病性大肠杆菌 AFEC)分离株^[7], 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和 ATCC29213, 以及猪链球菌 HA9801 均由本实验室保存。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

液体 LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 加蒸馏水定容至 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。上层 LB 半固体培养基: 在液体 LB 中加入 0.7% (质量体积比)琼脂糖。下层固体 LB 培养基: 在液体 LB 中加入 1.5% (质量体积比)琼脂糖。DNase I、RNase A 和 Mung Bean Nuclease 购自

赛默飞世尔科技(中国)有限公司(Thermo Fisher Scientific)。PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司; Eppendorf mini spin 离心机购自德国 Eppendorf 公司; Tanon 2500R 全自动数码凝胶成像分析系统购自上海天能科技有限公司。

1.3 噬菌体的分离与鉴定

将从猪场采集的仔猪肠内容物样品稀释于灭菌的 PBS 中, 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 后过滤, 利用双层琼脂平板法, 以大肠杆菌 K-12 菌株 MC1061 作为指示菌(该菌株通常作为大肠杆菌噬菌体指示菌)检测样品中是否含有裂解性噬菌体。

1.4 噬菌体的富集及纯化

挑取双层琼脂平板上单个噬菌斑进行反复纯化, 直至获得形态和大小一致的噬菌斑。

1.5 噬菌体电镜观察

采用磷钨酸负染法, 通过电镜观察噬菌体形态。

1.6 噬菌体核酸类型鉴定

提取噬菌体基因组, 分别用 DNase I、RNase A 和 Mung Bean Nuclease 处理噬菌体基因组, 37 °C 消化 2 h, 将消化产物进行核酸电泳鉴定。

1.7 噬菌体的生物学特性分析

对噬菌体裂菌谱, 最佳感染复数, 一步生长曲线, pH 稳定性, 对紫外线、氯仿的敏感性, 热稳定性等生物学特性进行分析。

(1) 噬菌体裂菌谱的测定。分别取 200 μ L 待测细菌菌液与 10 mL 融化的上层琼脂混合, 冷却打孔后加入约 200 μ L 纯化的噬菌体上清液, 37 °C 培养 12 h 后观察裂菌效果。

(2) 噬菌体的最佳感染复数(Multiplicity of infection, MOI)。分别测定菌液浓度及噬菌体效价, 按照感染复数分别为 0.001、0.01、0.1、1、10、100 的比例将噬菌体与指示菌 MC1061 菌液混合, 培养 8 h 分别测定各个条件噬菌体的效价, 其中噬菌体效价最高的 MOI 即为最佳感染复数。

(3) 噬菌体一步生长曲线测定。按照最佳感染复数比例, 将噬菌体与对数期的 MC1061 菌液混合, 置于 37 °C、160 r/min 振荡培养, 分别在 0、10、20、30、40、50、60、90、120 和 150 min 时间点取样, 样品经滤膜过滤后, 测定噬菌体的效价, 进而绘制出噬菌体的一步生长曲线。

(4) 热稳定性测定。分别取 900 μ L 的 LB 液体培养基至 1.5 mL EP 管中, 将 EP 管置于 40、50、60、70、80 °C 水浴锅中预热, 设置 3 组平行实验。待培养基温度稳定后, 加入 100 μ L 噬菌体原液(10^8 PFU/mL), 分别在作用 30 min 和 60 min 后取出 EP 管置于冰上冷却。采用双层平板法获得各条件下噬菌体滴度, 从而评价噬菌体热稳定性。

(5) pH 稳定性测定。分别将培养基调至对应 pH 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、12.0、13.0、14.0, 灭菌备用。各取 900 μ L 不同 pH 的 LB 至 1.5 mL EP 管中, 分别加 100 μ L 噬菌体(10^8 PFU/mL), 并在 37 °C 水浴中孵育 1 h, 双层琼脂平板法测定其滴度, 评价噬菌体 pH 稳定性。

(6) 噬菌体对紫外线的敏感性测定。取 2 mL 噬菌体(10^8 PFU/mL), 置于 35 mm 无菌培养皿中, 于紫外灯下照射 0、15、30、45、60、75、90、105、120 min 及 6、18、32 h 后, 双层平板法测定噬菌体的滴度, 评价噬菌体对紫外线的敏感性。

(7) 噬菌体对氯仿的敏感性测定。将噬菌体上清液(10^8 PFU/mL)与氯仿按照 0、1%、2%、5% 的比例进行混合, 置于 37 °C 孵育 30 min, 分别在分层液中各取上层液体 100 μ L 进行噬菌体滴度测定, 评价噬菌体对氯仿的敏感性。

1.8 噬菌体全基因组测序

噬菌体基因组测序由北京军事医学科学院微生物流行病学研究所完成。通过构建噬菌体基因组的 DNA 测序文库, 利用 Life Technologies 公司的第二代高通量测序仪 PGM 完成测序工作。

1.9 噬菌体全基因组序列分析

使用 Newbler v2.9 软件和 CLC 软件对噬菌体 SH2 全基因组序列进行组装。利用 RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology)和 BASys (Bacterial Annotation System)在线注释进行全基因组注释。使用 NCBI BLAST 在线工具进行序列相似性比对分析, 并构建噬菌体尾丝蛋白序列的进化树。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌噬菌体的分离鉴定

2.1.1 噬菌体的分离及噬菌斑特征: 仔猪肠内容物样品过滤上清与大肠杆菌 K-12 菌株 MC1061 混合后, 经双层琼脂平板法测定和纯化, 37 °C 培养 6 h 后, 在平板上能形成明显噬菌斑。噬菌斑呈圆形、大而透明且边缘整齐, 呈现出裂解性噬菌体的噬菌斑特征(图 1)。

2.1.2 噬菌体的电镜观察: 纯化的噬菌体经磷钨酸负染后, 在透射电镜下所观察到的形态如图 2 所示。噬菌体 vB_EcoS_SH2 的头部呈二十面体立体对称, 头部直径约 50 nm, 噬菌体含非收缩性尾部, 宽约 8 nm、长约 120 nm。根据 2012 年国际病毒分类委员会第 9 次报告提出的噬菌体分类与命名标准, 该噬菌体符合长尾噬菌体科(Siphoviridae)特征。

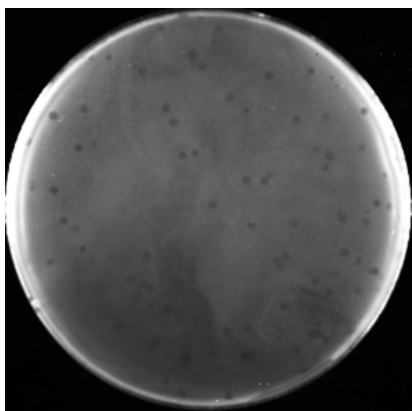


图 1 噬菌体 SH2 噬菌斑形态特征
Figure 1 Morphological feature of phage SH2 plaque

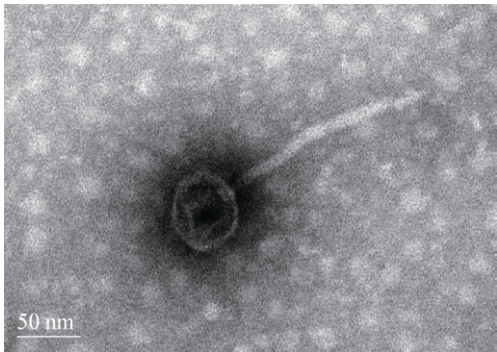


图 2 噬菌体 SH2 电镜照片
Figure 2 Electron micrograph of phage SH2

2.1.3 噬菌体的裂菌谱: 通过平板裂解实验及点板实验(Spot test assay)检测噬菌体对实验菌株的裂解效果。结果发现, 该噬菌体对大肠杆菌 K-12 菌株 MC1061、MG1655 和 DM1187 具有极强的裂解效果, 形成明显的裂菌圈。对大肠杆菌 O157 菌株 Min27, 部分 APEC 和 AFEC 菌株, 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和 ATCC29213 及猪链球菌 HA9801 均没有明显的裂解效果(表 1)。

表 1 噬菌体 SH2 宿主范围 Table 1 Host range of phage SH2		
菌株类型 Strain type	菌株编号 No. of strains	裂菌活性 Lytic activity
大肠杆菌 K-12 菌株(4 株) <i>E. coli</i> K-12 strains (4)	MC1061	+++
	MG1655	+++
	DM1187	+++
	BL21	+++
禽大肠杆菌(5 株) APEC&AFEC strains (5)	APEC-2	-
	APEC-15	-
	AFEC-8	-
	AFEC-52	-
	APEC-63	-
大肠杆菌 O157 菌株(2) <i>E. coli</i> O157 strains (2)	Min27	-
	O157:H7 050402	-
金黄色葡萄球菌(2 株) <i>Staphylococcus aureus</i> (2)	ATCC25923	-
	ATCC29213	-
猪链球菌(1 株) <i>Streptococcus suis</i> (1)	HA9801	-

注: +++: 极强裂解性; -: 不裂解。
Note: +++: Very strong lytic ability; -: No lytic ability.

2.1.4 噬菌体核酸类型鉴定: 噬菌体基因组经 DNase I、RNase A 和 Mung Bean Nuclease 处理, 核酸电泳鉴定结果显示, 噬菌体 SH2 的基因组能被 DNase I 完全降解, 经 RNase A 处理后无明显变化, 表明其基因组核酸为 DNA。另外由于核酸不能被 Mung Bean Nuclease 降解, 表明该噬菌体基因组为双链 DNA (dsDNA) (图 3)。

2.2 大肠杆菌噬菌体的生物学特性

2.2.1 噬菌体 SH2 的最佳感染复数: 分别按照对应比例将细菌与噬菌体混合, 培养 8 h 后测定噬菌体滴度(表 2)。结果显示, 当 MOI=0.1 时, 培养后上清中噬菌体滴度最高, 表明该噬菌体最佳感染复数为 0.1。

2.2.2 噬菌体 SH2 的热稳定性: 噬菌体 SH2 在 40–80 °C 水浴中分别作用 30 min 和 60 min 后的滴度变化情况如图 4A 所示。随着温度升高, 噬菌体滴度迅速下降, 在各个温度下作用 30 min 和 60 min, 噬菌体滴度下降没有明显差别。

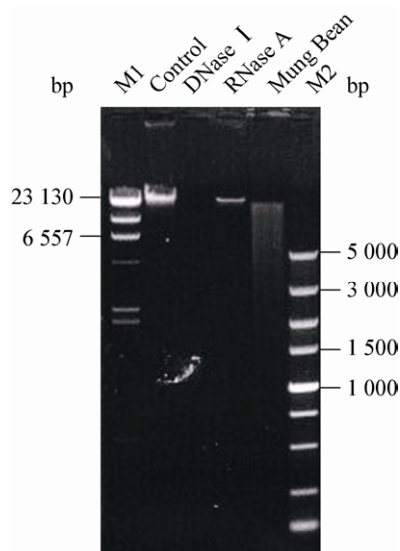


图 3 噬菌体 SH2 核酸类型鉴定

Figure 3 Nucleic acid type of phage SH2

注: M1: λ -Hind III digest DNA marker; Control: SH2 DNA; DNase I: 经 DNase I 处理; RNase A: 经 RNase A 处理; Mung Bean: 经 Mung Bean Nuclease 处理; M2: DL5000 marker

Note: M1: λ -Hind III digest DNA marker; Control: SH2 DNA; DNase I: DNase I treatment; RNase A: RNase A treatment; Mung Bean: Mung Bean Nuclease treatment; M2: DL5000 marker

表 2 噬菌体 SH2 最佳 MOI 测定
Table 2 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI) of phage SH2

管号 Number	细菌数 Bacteria (CFU/mL)	噬菌体数 Phage (PFU/mL)	感染复数 MOI	8 h 噬菌体滴度 Phage titer (PFU/mL)
1	1×10^8	1×10^5	0.001	5.73×10^8
2	1×10^8	1×10^6	0.01	7.40×10^9
3	1×10^8	1×10^7	0.1	1.30×10^{12}
4	1×10^8	1×10^9	1	2.45×10^{11}
5	1×10^7	1×10^8	10	7.80×10^{10}
6	1×10^7	1×10^9	100	3.22×10^{10}

2.2.3 噬菌体 SH2 的 pH 稳定性: 在不同 pH 条件下培养 1 h 后, 噬菌体 SH2 在 pH 6.0–9.0 范围能维持较好的活性, 噬菌体滴度没有明显变化, 而且在 pH 为 7.0 时, 噬菌体效价最高。随着 pH 值的升高或降低, 噬菌体的滴度下降明显; 在 pH 值为 2.0 和 13.0 时, 噬菌体完全失活(图 4B)。该结果表明噬菌体 SH2 能耐受弱酸和弱碱条件, 具有良好的酸碱耐受性。

2.2.4 噬菌体 SH2 对氯仿的敏感性: 将噬菌体与含不同比例氯仿的 LB 培养基混合, 孵育 30 min 后检测噬菌体滴度。结果显示, 氯仿对噬菌体的滴度有较为明显的影响, 随着氯仿浓度升高, 噬菌体存活率相应降低(图 4C), 提示该噬菌体对氯仿敏感。

2.2.5 噬菌体 SH2 对紫外线的敏感性: 噬菌体 SH2 经紫外线处理不同时间后, 检测噬菌体效价。结果显示, 在紫外线照射 15 min 后, 噬菌体效价急剧下降, 随着时间的延长, 噬菌体的存活率下降幅度变缓, 在处理 32 h 后仍有 30% 左右的噬菌体存活(图 4D), 表明该噬菌体对紫外线比较敏感, 但也具有一定的紫外线耐受能力。

2.2.6 噬菌体 SH2 的一步生长曲线: 如图 4E 所示, 噬菌体 SH2 感染宿主菌后的 10 min 内效价没有明显变化, 表明其潜伏期约为 10 min, 感染后 20–60 min 内噬菌体的滴度明显上升, 之后趋于稳定, 表明噬菌体裂解期约为 60 min。通过计算, 噬菌体裂解量约为 121 PFU/感染细胞, 表明噬菌体具有极强的裂解和复制能力。

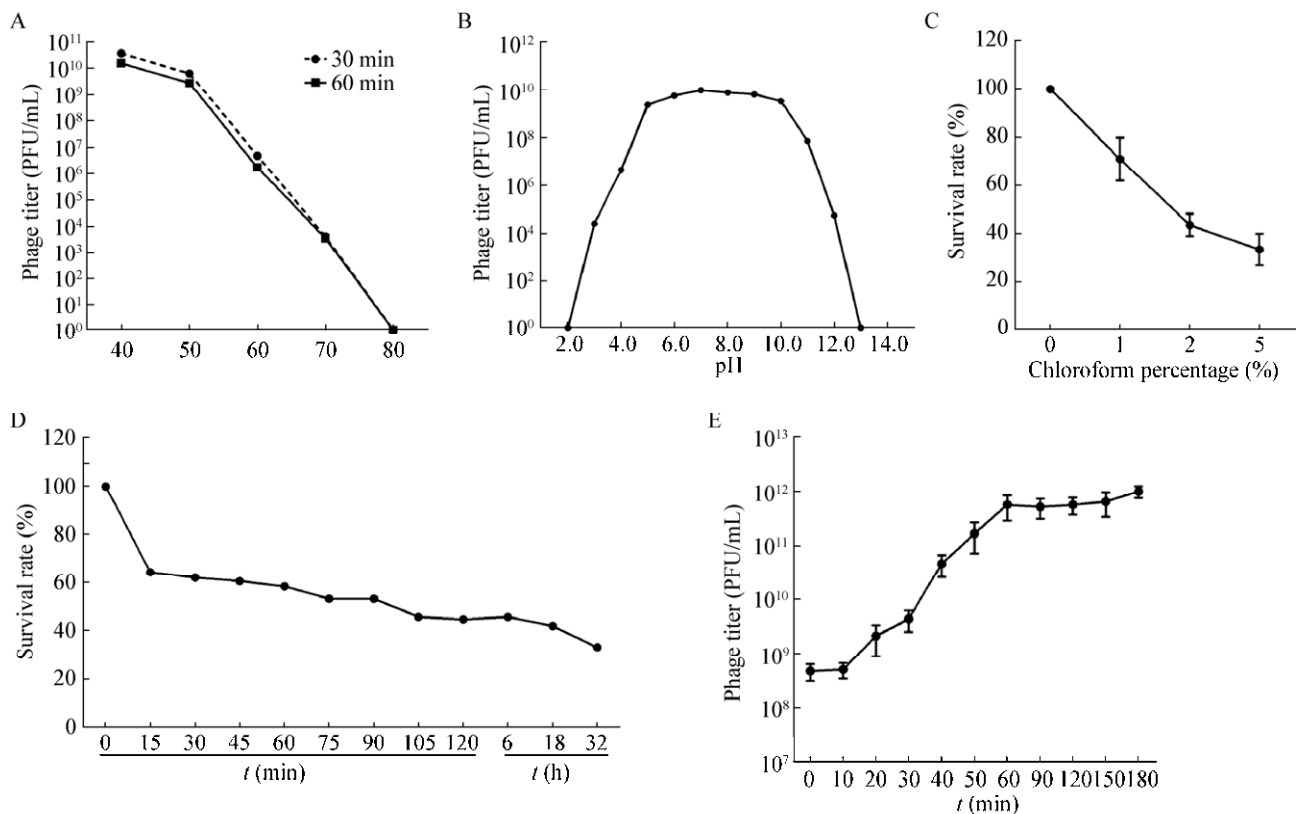


图4 噬菌体 SH2 的生物学特性

Figure 4 Biological characteristics of phage SH2

注: A: 噬菌体 SH2 的热稳定性; B: 噬菌体 SH2 的最适 pH 测定; C: 噬菌体 SH2 对氯仿敏感性测定; D: 噬菌体 SH2 对紫外线的敏感性; E: 噬菌体 SH2 的一步生长曲线。

Note: A: Thermal stability of phage SH2; B: Detection of the optimal pH of phage SH2; C: Detection of chloroform sensitivity of phage SH2; D: Sensitivity of phage SH2 to ultraviolet; E: One-step growth curve of phage SH2.

2.3 大肠杆菌噬菌体 SH2 基因组序列分析

经测序数据分析, 噬菌体 SH2 基因组长度为 49 088 bp, G+C% 含量为 45%, 基因组 A、G、T、C 碱基含量分别为 28%、24%、26%、21%。BLASTn 序列比对结果显示, SH2 基因组(GenBank 登录号为 KY985004)与 T1 噬菌体(*Enterobacteria* phage T1, GenBank 登录号为 AY216660)及 T1 样相关噬菌体(*Escherichia* phage JMPW2, GenBank 登录号为 KU194205; *Escherichia* phage ADB-2, GenBank 登录号为 JX912252; *Shigella* phage SH6, GenBank 登录号为 KX828710; *Shigella* phage pSf-2, GenBank 登录号为 KP085586;

Escherichia phage JMPW1, GenBank 登录号为 KU194206; *Shigella* phage Shf11, GenBank 登录号为 HM035024)基因组一致性较高。根据噬菌体尾丝蛋白序列构建进化树, 发现 SH2 噬菌体与 T1 噬菌体处于同一分支, 同属于 T1 virus genus 的 Cluster C (图 5), 提示 SH2 为 T1-like 噬菌体的新成员。

通过全基因组 RAST 在线初步注释和 NCBI 的 BLASTp 分析, 结果显示, 该基因组共有 80 个开放阅读框(ORFs), 其中 6 个 ORFs 为推定蛋白(Hypothetical protein)序列, 74 个 ORFs 的功能已知, 如表 3 所示。

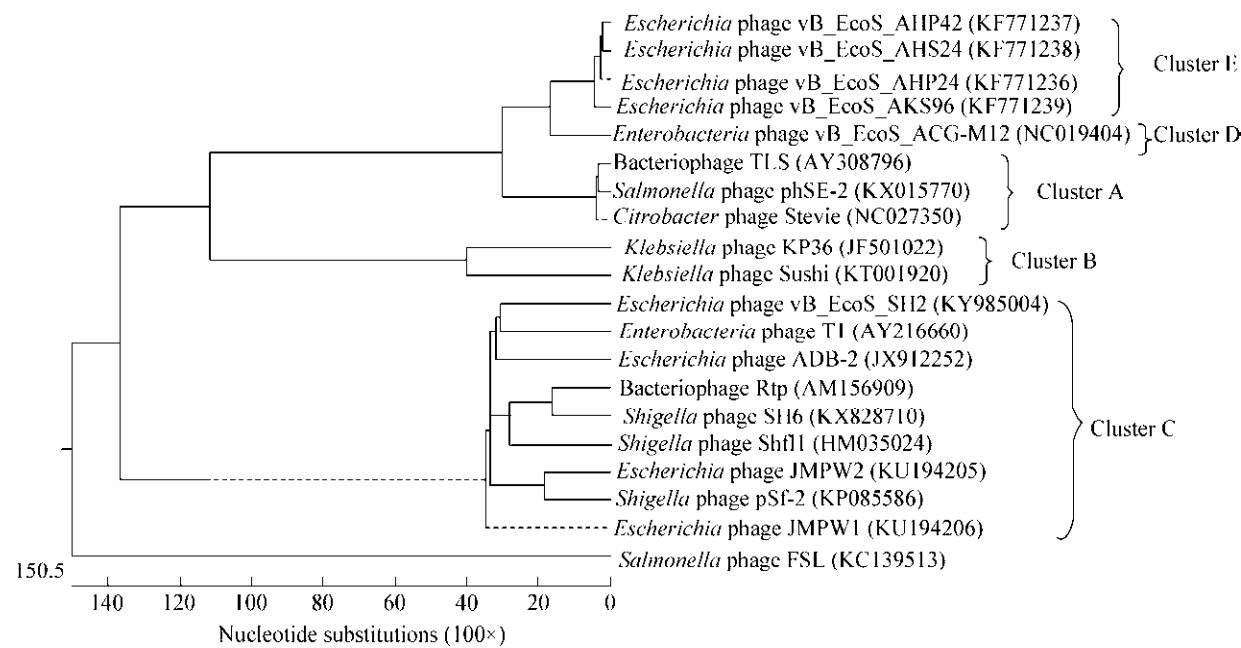


图 5 根据尾丝蛋白绘制的 SH2 噬菌体与 T1 样噬菌体家族进化关系

Figure 5 Evolutionary relationships between SH2 and the T1 virus genus phage according to tail fiber

表 3 噬菌体 vB_EcoS_SH2 注释及比对分析
Table 3 List and annotation of vB_EcoS_SH2 ORFs

ORF	Nucleotides	Strand	Protein length (aa)	Related protein ^a	BLASTp ^b				Description of related protein
					Score	E value	ID (%)	Overlap (aa)	
1	454-969	+	171	ALT58205.1	344	8e-120	97	171	Hypothetical protein [Escherichia phage JMPW1]
				YP_003867.1	170	6e-53	53	191	Hypothetical protein T1p77 [Escherichia virus T1]
2	1 060-1 254	+	64	YP_007112678.1	132	2e-39	100	64	Hypothetical protein B508_00065 [Escherichia phage ADB-2]
3	1 257-1 727	+	156	YP_004414822.1	298	4e-102	91	155	Hypothetical protein Shf11p03 [Shigella virus Shf11]
4	1 806-2 036	+	76	YP_003869.1	149	7e-46	93	76	Hypothetical protein T1p75 [Escherichia virus T1]
5	2 042-2 269	+	75	YP_003870.1	147	5e-45	91	75	Hypothetical protein T1p74 [Escherichia virus T1]
6	2 373-2 546	+	57	ALT58127.2	109	2e-30	95	57	Hypothetical protein JMPW2_005 [Escherichia phage JMPW2]
				YP_003872.1	105	7e-29	89	57	Hypothetical protein T1p72 [Escherichia virus T1]
7	2 556-2 747	+	63	ALT58128.1	126	6e-37	95	63	Hypothetical protein JMPW2_006 [Escherichia phage JMPW2]
8	2 819-3 307	+	162	YP_004414829.1	309	3e-106	93	162	Hypothetical protein Shf11p11 [Shigella virus Shf11]
				YP_003873.1	275	5e-93	83	162	Hypothetical protein T1p71 [Escherichia virus T1]
9	3 379-3 885	+	168	YP_007112685.1	322	2e-111	93	168	Hypothetical protein B508_00100 [Escherichia phage ADB-2]
				YP_003874.1	210	4e-67	65	161	Hypothetical protein T1p70 [Escherichia virus T1]
10	3 885-4 034	+	49	YP_003875.1	101	2e-27	94	46	Hypothetical protein T1p69 [Escherichia virus T1]

(待续)

(续表)

11	4 115–4 414	+	99	None						
12	4 411–4 698	+	95	ALT58132.1	195	2e–63	96	95	Hypothetical protein JMPW2_010 [<i>Escherichia</i> phage JMPW2]	
13	4 695–5 498	+	267	YP_009112993.1	392	1e–136	88	212	Hypothetical protein pSf2_055 [<i>Shigella</i> phage pSf-2]	
				YP_003876.1	231	2e–74	91	124	Hypothetical protein T1p68 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
14	5 483–5 701	+	72	YP_003878.1	147	4e–45	97	72	Hypothetical protein T1p66 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
15	5 769–6 380	+	203	YP_007112690.1	416	4e–147	97	203	Putative morphogenetic protein [<i>Escherichia</i> phage ADB-2]	
				YP_003880.1	322	1e–110	89	176	Putative polynucleotide kinase/ phosphatase [<i>Escherichia</i> virus T1]	
16	6 359–6 487	+	42	None						
17	6 489–7 061	+	190	YP_003883.1	393	1e–138	98	190	Hypothetical protein T1p62 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
18	7 134–7 343	+	69	YP_003884.1	135	3e–40	94	69	Hypothetical protein T1p61 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
19	7 340–7 699	+	119	YP_003885.1	213	6e–70	92	114	Hypothetical protein T1p60 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
20	7 683–7 913	+	76	YP_003886.1	154	6e–48	100	76	Hypothetical protein T1p59 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
21	7 913–8 116	+	67	YP_007112695.1	136	9e–41	96	67	Hypothetical protein B508_00150 [<i>Escherichia</i> phage ADB-2]	
				YP_003887.1	129	3e–38	97	67	Hypothetical protein T1p58 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
22	8 281–8 442	+	53	YP_004414842.1	107	1e–29	100	53	Hypothetical protein Shf1p26 [<i>Shigella</i> virus Shf1]	
				YP_003888.1	102	7e–28	96	53	Hypothetical protein T1p57 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
23	8 423–8 608	+	61	YP_007112696.1	122	1e–35	100	61	Hypothetical protein B508_00155 [<i>Escherichia</i> phage ADB-2]	
				YP_003889.1	90.9	4e–23	96	47	Hypothetical protein T1p56 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
24	8 610–8 837	+	75	ALT58227.1	145	9e–46	95	75	Hypothetical protein JMPW1_023 [<i>Escherichia</i> phage JMPW1]	
				YP_003890.1	145	5e–44	93	75	Hypothetical protein T1p55 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
25	8 922–9 446	+	174	YP_003891.1	349	9e–122	99	174	Putative terminase small subunit [<i>Escherichia</i> virus T1]	
26	9 485–1 1053	+	522	YP_004414846.1	1 095	0.0	100	522	Putative terminase large subunit [<i>Shigella</i> virus Shf1]	
				YP_003892.1	1 090	0.0	99	527	Putative terminase large subunit [<i>Escherichia</i> virus T1]	
27	11 108–12 391	+	427	YP_003893.1	865	0.0	99	427	Putative portal protein [<i>Escherichia</i> virus T1]	
28	12 381–13 142	+	253	YP_003894.1	518	0.0	98	253	Hypothetical protein T1p51 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
29	13 145–14 257	+	370	YP_003895.1	743	0.0	99	370	Putative major head subunit precursor [<i>Escherichia</i> virus T1]	
30	14 269–14 745	+	158	YP_003896.1	323	5e–112	100	158	Hypothetical protein T1p49 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
31	14 808–15 575	+	255	YP_003897.1	444	1e–156	95	255	Hypothetical protein T1p48 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
32	15 667–16 626	+	319	YP_003898.1	662	0.0	99	319	Hypothetical protein T1p47 [<i>Escherichia</i> virus T1]	

(待续)

										(续表)
33	16 676–16 963	+	95	YP_003899.1	187	4e–60	98	95	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p46
34	17 007–17 417	+	136	YP_003900.1	279	3e–95	98	136	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p45
35	17 417–17 788	+	123	YP_003901.1	248	1e–83	100	123	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p44
36	17 781–18 224	+	147	YP_003902.1	302	5e–104	99	147	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p43
37	18 214–18 612	+	132	YP_003903.1	277	1e–94	100	132	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p42
38	18 614–19 282	+	222	YP_003904.1	447	4e–159	97	222	Putative major tail protein [Escherichia virus T1]	
39	19 396–19 713	+	105	YP_003905.1	219	1e–72	99	105	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p40
40	19 761–20 030	+	89	YP_009112966.1	179	5e–57	98	89	Hypothetical protein [Shigella phage pSf-2]	pSf2_028
				YP_003906.1	114	7e–32	100	55	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p39
41	20 069–22 942	+	957	YP_003907.1	1 825	0.0	96	957	Putative tail tape measure protein [Escherichia virus T1]	
42	22 945–23 298	+	117	ALT58163.1	248	2e–83	100	117	Putative minor tail protein [Escherichia phage JMPW2]	
				YP_003908.1	240	2e–80	97	117	Putative minor tail protein [Escherichia virus T1]	
43	23 378–24 160	+	260	YP_003909.1	530	0.0	97	260	Putative minor tail protein [Escherichia virus T1]	
44	24 157–24 891	+	244	YP_003910.1	514	0.0	99	244	Putative minor tail protein [Escherichia virus T1]	
45	24 888–25 487	+	199	YP_003911.1	402	1e–141	100	199	Putative tail assembly protein [Escherichia virus T1]	
46	25 565–28 984	+	1 139	YP_003912.1	2 281	0.0	95	1172	Putative tail fiber protein [Escherichia virus T1]	
47	29 030–29 335	+	101	YP_003913.1	200	3e–65	99	101	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p32
48	29 335–30 024	+	229	YP_003914.1	446	2e–158	97	229	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p31
49	30 273–30 046	–	75	ALT58170.2	157	5e–49	100	75	Super-infection exclusion protein [Escherichia phage JMPW2]	
				YP_003915.1	142	5e–43	91	75	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p30
50	30 802–31 866	+	354	YP_003916.1	736	0.0	98	354	Exodeoxyribonuclease VIII [Escherichia virus T1]	
51	31 941–32 588	+	215	YP_003917.1	443	2e–157	99	226	Putative recombination protein [Escherichia virus T1]	
52	32 634–33 047	+	137	ALT58174.1	285	7e–98	100	137	Hypothetical protein JMPW2_052 [Escherichia phage JMPW2]	
				YP_003918.1	224	1e–73	87	140	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p27
53	34 632–33 076	–	518	ALT58175.1	1 066	0.0	100	518	Tail fiber protein [Escherichia phage JMPW2]	
				YP_003919.1	244	3e–69	74	728	Putative tail fiber [Escherichia virus T1]	
54	35 668–34 733	–	311	YP_009112953.1	653	0.0	99	311	Hypothetical protein [Shigella phage pSf-2]	pSf2_015
				YP_003921.1	627	0.0	96	306	Putative DNA primase [Escherichia virus T1]	
55	36 182–35 730	–	150	YP_003922.1	310	6e–107	99	150	Hypothetical protein [Escherichia virus T1]	T1p23
56	36 276–38 294	+	672	YP_003923.1	1 387	0.0	99	672	Putative ATP-dependent helicase [Escherichia virus T1]	
										(待续)

										(续表)
57	38 291–38 707	+	138	YP_003924.1	286	5e–98	99	138	Hypothetical protein T1p21 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
58	38 775–39 488	+	237	YP_003925.1	489	5e–175	98	237	Dam methylase [<i>Escherichia</i> virus T1]	
59	39 488–39 736	+	82	YP_003926.1	162	1e–50	94	83	Hypothetical protein T1p19 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
60	39 803–40 012	+	69	ALT58263.2	143	1e–43	99	69	Hypothetical protein JMPW1_059 [<i>Escherichia</i> phage JMPW1]	
				YP_003927.1	125	1e–36	86	69	Hypothetical protein T1p18 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
61	39 990–40 262	+	90	YP_009112946.1	175	1e–55	94	90	Hypothetical protein pSf2_08 [<i>Shigella</i> phage pSf-2]	
62	40 330–40 494	+	54	YP_003928.1	114	5e–32	98	95	Hypothetical protein T1p17 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
63	40 573–41 724	+	383	ALT58265.1	795	0.0	100	383	Hypothetical protein JMPW1_061 [<i>Escherichia</i> phage JMPW1]	
				YP_003929.1	575	0.0	71	377	Hypothetical protein T1p16 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
64	41 788–41 964	+	58	YP_003931.1	116	3e–33	93	58	Hypothetical protein T1p14 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
65	42 134–42 298	+	54	YP_003932.1	110	9e–31	98	71	Putative holin [<i>Escherichia</i> virus T1]	
66	42 298–42 786	+	162	YP_003933.1	330	8e–115	98	162	Endolysin [<i>Escherichia</i> virus T1]	
67	42 786–43 187	+	133	ALT58269.1	261	4e–88	100	134	Hypothetical protein JMPW1_065 [<i>Escherichia</i> phage JMPW1]	
				YP_003934.1	210	5e–68	79	133	Hypothetical protein T1p11 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
68	43 716–43 309	–	135	YP_003935.1	269	2e–19	97	135	Hypothetical protein T1p10 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
69	45 289–43 721	–	522	YP_003936.1	1 078	0.0	99	522	Hypothetical protein T1p09 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
70	45 782–45 366	–	138	YP_003938.1	273	5e–93	96	138	Hypothetical protein T1p07 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
71	46 075–45 863	–	70	YP_009113019.1	117	2e–33	96	70	Hypothetical protein pSf2_081 [<i>Shigella</i> phage pSf-2]	
				YP_003939.1	117	4e–33	81	69	Hypothetical protein T1p06 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
72	46 303–46 079	–	74	YP_003940.1	144	1e–43	99	74	Hypothetical protein T1p05 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
73	46 524–46 381	–	47	YP_003941.1	91.7	1e–23	93	47	Hypothetical protein T1p04 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
74	46 841–46 521	–	106	YP_003942.1	216	3e–71	96	106	Hypothetical protein T1p03 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
75	47 058–46 858	–	66	YP_003943.1	128	9e–38	94	66	Hypothetical protein T1p02 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
76	47 422–47 051	–	123	ALT58278.1	136	2e–78	91	138	Hypothetical protein JMPW1_074 [<i>Escherichia</i> phage JMPW1]	
				YP_003944.1	183	9e–58	72	123	Hypothetical protein T1p01 [<i>Escherichia</i> virus T1]	
77	47 683–47 498	–	61	ALT58279.1	119	2e–34	98	61	Hypothetical protein JMPW1_075 [<i>Escherichia</i> phage JMPW1]	
78	47 884–47 699	–	61	YP_007112675.1	120	6e–35	93	61	Hypothetical protein B508_00040 [<i>Escherichia</i> phage ADB-2]	
79	48 650–47 919	–	243	ALT58204.1	461	5e–164	96	241	Hypothetical protein JMPW2_082 [<i>Escherichia</i> phage JMPW2]	
80	48 859–48 647	–	70	YP_004414899.1	140	2e–42	93	70	Hypothetical protein Shf1p87 [<i>Shigella</i> virus Shf11]	

注: ^a: 与之最相近的基因组的基因和名称; None: 没有比对到与之相近的氨基酸序列; ^b: ID%, BLASTp 比对中的氨基酸一致性。

Note: ^a: The genes and names of the closest genome; None: No similar amino acid sequence; ^b: ID%, amino acid identities in BLASTp.

T1 通过对 vB_EcoS_SH2 噬菌体与 T1 噬菌体基因组序列 ORF 比对分析发现, 有 69 个(86.3%) vB_EcoS_SH2 基因与 T1 噬菌体高度同源, 涵盖了几乎整个 T1 噬菌体的功能注释区域, 包括 DNA 包装相关的末端酶(ORF25, ORF26)、形态相关的尾丝蛋白(ORF41)、DNA 重组相关的 ssDNA binding 蛋白(ORF52)、DNA 复制相关的解旋酶区域(ORF55, ORF56)及裂解酶蛋白(ORF66)等(图 6)。但也有一些基因 ORF2、ORF3、ORF 7、ORF 11、ORF 12、ORF 77、ORF 78、ORF 79、ORF 80 与 T1 噬菌体基因组序列不同, vB_EcoS_SH2 与 T1 噬菌体基因组具有广泛的同源性, 但同时具备特异性, 表明噬菌体 vB_EcoS_SH2 为一株新的 T1 样大

肠杆菌噬菌体。

由于裂解量与噬菌体裂菌活性及增殖特性相关, 噬菌体的大裂解量是其用于治疗细菌感染的重要前提, vB_EcoS_SH2 裂解量为 121 PFU/感染细胞, 具有极强的裂菌能力^[8]。但由于 vB_EcoS_SH2 裂菌谱较窄, 制约了该噬菌体的治疗应用潜能。通过序列分析其原因, vB_EcoS_SH2 噬菌体尾丝蛋白(ORF46^{SH2})与同为 T1 样噬菌体的 SH6 (ORF48^{SH6})和 pSf-2 一致性很高, 分别为 94%和 97%; 而 SH6 与 pSf-2 噬菌体的裂菌谱均较窄^[2,9], 推测尾丝蛋白可能是造成 vB_EcoS_SH2 裂菌谱窄的原因。此外, SH6 噬菌体的另一个尾丝蛋白 ORF54^{SH6}被认为是 T1virus 和 Hk578virus 的结合,

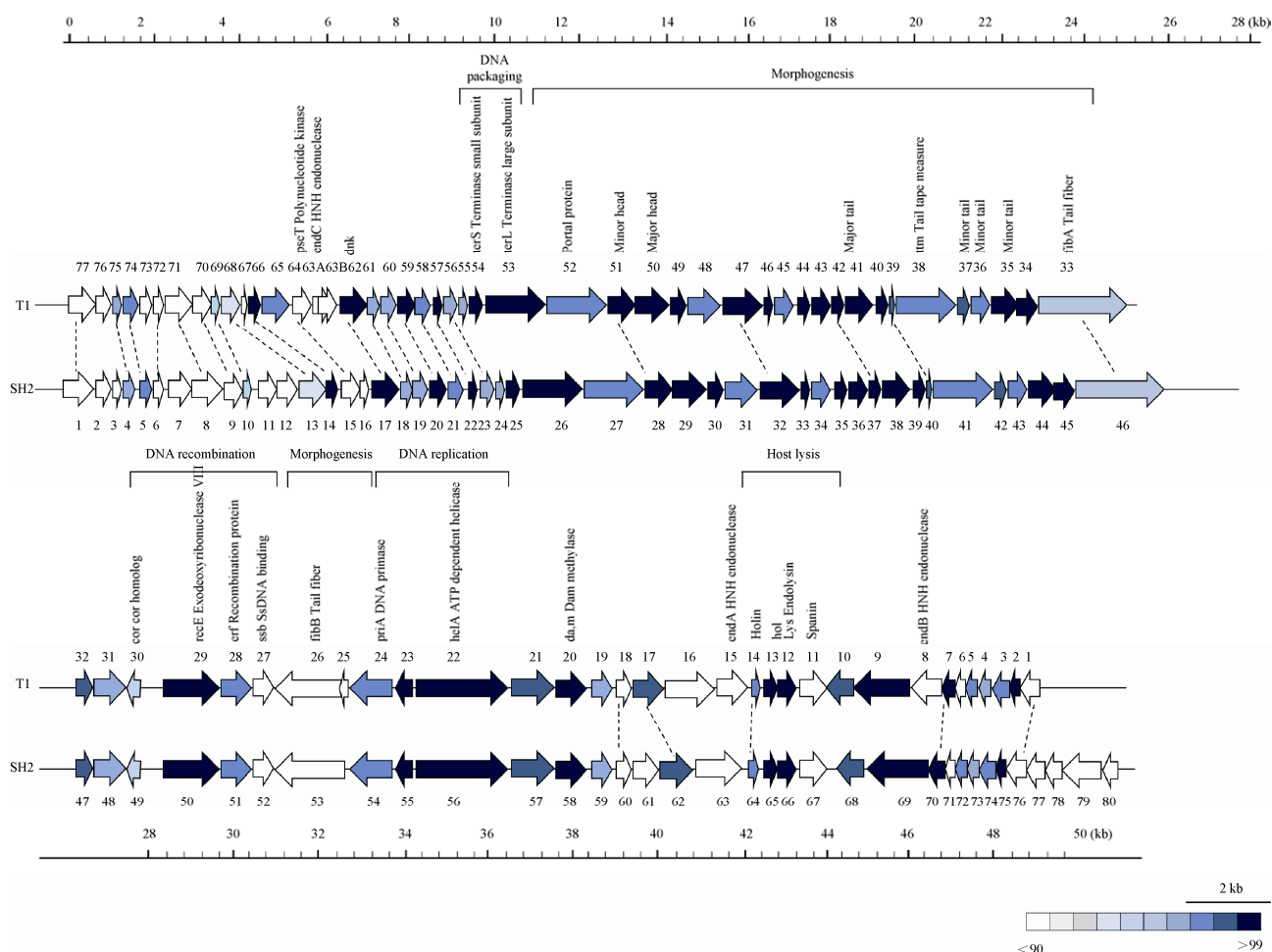


图 6 vB_EcoS_SH2 噬菌体与 T1 噬菌体基因组序列 ORF 比对分析

Figure 6 Schematic representation of the genomic organization of phage SH2 compared to phage

导致其比 pSf-2 裂菌谱稍宽, 而本研究中的噬菌体 vB_EcoS_SH2 尾丝蛋白 ORF53^{SH2} 与其仅在 C 端结构域存在 89% 一致性, 这可能也是引起 vB_EcoS_SH2 裂菌谱窄的重要原因。

vB_EcoS_SH2 噬菌体的 ORF65 和 ORF66 为紧邻的编码穿孔素 Holin 和裂解酶 Endolysin 的基因。ORF65^{SH2} 与 ORF13hol^{T1} 和 SH6 Holin 一致性均高达 95%, 而 ORF66Lys^{SH2} 与 ORF14Lys^{T1} 和 ORF66Lys^{SH6} 一致性也分别为 93% 和 96%, SH6 作为高效裂解弗氏志贺氏菌的噬菌体^[2], vB_EcoS_SH2 噬菌体的 Holin 和 Endolysin 与 SH6 的高度一致性可能与 SH2 同样具有高效的裂解活性相关。

3 讨论

T1 样噬菌体一般具有末端冗余及环化的基因组, 长度约为 50 kb, 是长尾噬菌体科中 Tunalikevirus 属的成员之一。在形态学上, T1 样噬菌体具有直径约为 60 nm 的二十面体头部及长度约为 151 nm、直径约 8 nm 的高度灵活可变的尾部^[10]。本研究根据噬菌体的形态特征、基因组序列、尾丝蛋白基因序列比对等结果, 依据命名规则, 将该噬菌体命名为 vB_EcoS_SH2, 其中 vB 代表 Viruses bacteriophage (病毒噬菌体); Eco 代表 *Escherichia coli* (大肠杆菌); S 代表 Siphoviridae (长尾噬菌体科)。

吸附是噬菌体与细菌表面受体发生特异性结合的过程, 其特异性取决于噬菌体蛋白与宿主菌表面受体分子结构的互补性。T4 噬菌体属的噬菌体尾丝蛋白的相关研究表明, 其尾丝具有快速的适应能力, 能够利用 gp37 尾丝蛋白识别多种宿主菌受体(外膜蛋白或脂多糖 LPS)^[11]。该种属的噬菌体基因同源性较高, 但是却有着不同的宿主适应性。例如, T4 噬菌体和 AR1 噬菌体都具有高度保守的核心基因组, 但两者宿主范围却存在差异^[12]。T4 能感染 *E. coli* B 及 K-12 菌株, 而无法感染 *E. coli* O157:H7, AR1 噬菌体则能特异性感染 *E. coli* O157:H7 菌株^[13]。此外, 长尾噬菌体科的 T1 样噬菌体也存在同样的情况。作

为 T1 样噬菌体的 Rtp 噬菌体与 T1 噬菌体高度同源, 但 Rtp 噬菌体具有特异性的尾丝, 能够识别不同宿主的受体^[14]。噬菌体的宿主特异性与其尾丝蛋白识别宿主菌受体极为相关。本研究中 vB_EcoS_SH2 噬菌体宿主谱较窄, 仅能裂解大肠杆菌 K-12 系列菌株且具有极强的裂解效果, 但对 O157:H7 及其他类型菌株均没有裂菌作用。vB_EcoS_SH2 噬菌体是否以 OmpC 孔蛋白或 LPS 为受体^[14], 从而影响其宿主特异性还有待深入研究。然而, 同样作为 T1 样噬菌体成员的大肠杆菌噬菌体 vB_EcoS_AHP24、AHS24、AHP42 和 AKS96 则只裂解产志贺毒素大肠杆菌 (STEC) O157:H7 菌株, 而对非 STEC O157:H7 菌株没有效果^[15]。本研究中 vB_EcoS_SH2 噬菌体作为 T1 噬菌体家族的新成员, 有其独特的噬菌体裂菌谱特征, 课题组将进一步探究噬菌体的裂菌机制、噬菌体尾丝蛋白结构与宿主受体特异性, 最终为噬菌体改造、新型抗菌制剂的研发提供理论依据。

致谢: 感谢军事医学科学院微生物流行病学研究所童贻刚研究员课题组在噬菌体测序方面提供的大力帮助。

参考文献

- [1] Rohwer F. Global phage diversity[J]. Cell, 2003, 113(2): 141
- [2] Hamdi S, Rousseau GM, Labrie SJ, et al. Characterization of two polyvalent phages infecting *Enterobacteriaceae*[J]. Scientific Report, 2017, 7: 40349
- [3] Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(7): 2874-2878
- [4] Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, et al. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from bangladesh[J]. EBioMedicine, 2016, 4: 124-137
- [5] Cowley LA, Beckett SJ, Chase-Topping M, et al. Analysis of whole genome sequencing for the *Escherichia coli* O157:H7 typing phages[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 271
- [6] Woolston J, Parks AR, Abuladze T, et al. Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces[J]. Bacteriophage, 2013, 3(3): e25697
- [7] Fu Q, Su ZX, Cheng YQ, et al. Clustered, regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) diversity and virulence factor distribution in avian *Escherichia coli*[J]. Research in Microbiology, 2017, 168(2): 147-156
- [8] Wang IN. Lysis timing and bacteriophage fitness[J]. Genetics, 2006, 172(1): 17-26
- [9] Jun JW, Kim HJ, Yun SK, et al. Isolation and comparative genomic analysis of T1-like *Shigella* bacteriophage pSf-2[J].

- Current Microbiology, 2016, 72(3): 235-241
- [10] Roberts MD, Martin NL, Kropinski AM. The genome and proteome of coliphage T1[J]. Virology, 2004, 318(1): 245-266
- [11] Montag D, Hashemolhosseini S, Henning U. Receptor-recognizing proteins of T-even type bacteriophages: the receptor-recognizing area of proteins 37 of phages T4 Tula and Tulb[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 216(2): 327-334
- [12] Liao WC, Ng WV, Lin IH, et al. T4-Like genome organization of the *Escherichia coli* O157:H7 lytic phage AR1[J]. Journal of Virology, 2011, 85(13): 6567-6578
- [13] Yu SL, Ding HC, Seah JN, et al. Characterization of a phage specific to hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and disclosure of variations in host outer membrane protein ompC[J]. Journal of Biomedical Science, 1998, 5(5): 370-382
- [14] Wietzorrek A, Schwarz H, Herrmann C, et al. The genome of the novel phage Rtp, with a rosette-like tail tip, is homologous to the genome of phage T1[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(4): 1419-1436
- [15] Niu YD, Mcallister TA, Nash JHE, et al. Four *Escherichia coli* O157:H7 phages: a new bacteriophage genus and taxonomic classification of T1-like phages[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e100426

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、微生物蛋白质组学、微生物功能基因组、微生物工程与药物等领域的最新研究成果，产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有：研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>，点击作者投稿区，第一次投稿请先注册，获得用户名和密码，然后依照提示提交稿件，详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

来稿要求论点明确，数据可靠，简明通顺，重点突出。

3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码，未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过3人时全部列出，多于3人时列出前3人，后加“等”或“et al.”，作者姓前、名后，名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整，不用缩写，不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例：

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
- 王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
- 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
- 刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.2855)