

荧光假单胞菌噬菌体 KS461-2 的分离及其生物学特性研究

王子微¹, 孙文敬¹, 王 辉¹, 刘 翔¹, 王 丽², 刘敬泽^{1,*}

(1. 河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050016

2. 华北制药集团有限责任公司, 河北 石家庄 050011)

摘 要: 从 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌荧光假单胞菌 A46 异常发酵液中分离得到 1 种噬菌体, 将其命名为 KS461-2。电镜观察表明, 噬菌体 KS461-2 呈蝌蚪状。根据 ICTV 对病毒的分类标准, 噬菌体 KS461-2 属长尾噬菌体科, 为烈性噬菌体。噬菌体 KS461-2 对宿主菌的最佳感染复数为 0.01, 温度和 pH 对其稳定性具有显著的影响。一步生长曲线显示, 噬菌体 KS461-2 的潜伏期约 30min, 裂解期约 135min, 裂解量为 24。SDS-PAGE 显示, 噬菌体 KS461-2 有 5 种主要的结构蛋白, 其分子量分别为 66.0、61.0、42.5、34.7 和 14.4kDa。

关键词: 2-酮基-D-葡萄糖酸; 荧光假单胞菌; 噬菌体 KS461-2; 分离; 生物学特性

Isolation and Biological Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Bacteriophages KS461-2

WANG Zi-wei¹, SUN Wen-jing¹, WANG Hui¹, LIU Xiang¹, WANG Li², LIU Jing-ze^{1,*}

(1. College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

2. North China Pharmaceutical Group Corporation, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: A phage, named KS461-2, was separated from the abnormal fermentation liquid of *Pseudomonas fluorescens* A46 strain which produced 2-keto-D-gluconic acid. The KS461-2 was tadpole-like bacteriophage as observed by electron microscope. According to ICTV (International Committee for Taxonomy of Viruses), it belongs to the Siphoviridae family and is a virulent phage. The optimal MOI (multiplicity of infection) of KS461-2 is 0.01. Temperature and pH value had remarkable effects on the stability of phage KS461-2. One-step growth curve showed that the latent period is 30min, the burst period 135 min, and the average burst size 24 phage particles/infected cell. SDS-PAGE profiles indicated that KS461-2 contains five structural proteins, and their molecular masses are 66.0, 61.0, 42.5, 34.7 and 14.4kDa respectively.

Key words 2-keto-D-gluconic acid *Pseudomonas fluorescens* phage KS461-2 isolation biological characterization
中图分类号: Q939.97 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2007)04-0187-05

自Frederrik Twort(1915)和Felixd' Herelle(1917)发现噬菌体^[1]以来, 人们逐渐认识到噬菌体作为感染细菌的病毒在自然界广泛存在。据估计, 在生物圈中噬菌体的数量高达 10^{31} ^[2]。但是, 相对于其他生物, 已分离的噬菌体还很少^[3]。至今, 在电子显微镜下观察到的噬菌体约 5300 种, 其中 96% 为有尾噬菌体^[4]。

2-酮基-D-葡萄糖酸(2-keto-D-gluconic acid, 2KGA)是合成食品抗氧化剂D-异抗坏血酸及其钠盐的前体, 通常采用细菌发酵方法由葡萄糖或淀粉水解糖转化而来^[5]。目前, 国内外已报道的 2KGA 产生菌较多, 如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、粘质沙雷氏菌

(*Serratia marcescens*)、鸡血藤欧文氏菌(*Erwinia milletia*)、球状节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)、恶臭假单胞菌(*Ps. putida*)和产酮产碱菌(*Alcaligenes ketogenes*)等^[5], 但荧光假单胞菌一直是国内外 2KGA 发酵生产中最主要的工业用菌。

噬菌体污染是近年来国内 2KGA 发酵生产中存在的主要问题之一。沈淑瑜等^[6]报道了 2KGA 产生菌荧光假单胞菌的噬菌体 PFAS; 赵峰梅等^[7]报道了 2KGA 产生菌荧光假单胞菌 K1005 的 2 株噬菌体 KS502 和 KS503; 孙文敬等^[8]报道了 2KGA 产生菌球状节杆菌 K1022 的 3 株噬菌体 KS211、KS212 和 KS213; 孙文敬等^[9]报道 2KGA 产

收稿日期: 2006-04-30

*通讯作者

基金项目: 国家高技术产业化示范工程项目(200306)

作者简介: 王子微(1980-), 女, 硕士研究生, 主要从事噬菌体生物学特性及其基因组学的研究。

生菌荧光假单胞菌 A46 的噬菌体 KS461。在上述报道中,研究的重点在于抗噬菌体菌株的选育,对所分离的噬菌体只进行了简单的形态学描述,并未对其生物学特性做比较系统的研究。

噬菌体除具有其他病毒的一些共同特性^[1]如个体微小、可通过除菌滤器、没有细胞结构外,每种噬菌体都具有其独特的特性。本研究从噬菌体 KS461-2 的形态学、噬菌斑形状、最佳感染复数、一步生长曲线、对酸碱和热的耐受性以及衣壳蛋白的组成等方面研究其生物学特性,试图了解噬菌体 KS461-2 与其宿主菌之间的基本关系,为 2KGA 发酵中噬菌体污染的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

荧光假单胞菌 A46 郑州拓洋生物工程有限公司。

1.2 培养基

1.2.1 肉汤培养基

牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1.0%, NaCl 0.5%, 琼脂 2.0%, pH7.0。该培养基用于细菌和噬菌体的保藏、扩增及活化等。

1.2.2 LB 培养基

牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1.0%, NaCl 0.5%, pH7.0。该培养基用于菌种的扩大培养及噬菌体原液的制备。

1.2.3 双层琼脂培养基

牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1.0%, NaCl 0.5%, 底层琼脂 2.0%, 上层琼脂 0.7%, pH7.0。该培养基用于噬菌体的分离纯化及噬菌体效价测定。

1.2.4 蛋白胨液

蛋白胨 1.0%, pH7.0。该液用于稀释噬菌体。

1.3 培养方法

荧光假单胞菌 A46 及噬菌体在肉汤培养基或双层琼脂培养基上的培养温度为 30℃, 培养时间为 24h; 噬菌体原液的制备和荧光假单胞菌 A46 的扩大培养均在 THZ-C 恒温振荡器(转速 200r/min)上进行, 培养温度为 30℃, 培养周期分别为 24h 和 20h。

1.4 噬菌体的分离、纯化及原液制备

取感染噬菌体的异常发酵液离心(4000r/min, 20min), 上清液经微孔滤膜(0.45μm)除菌即得含噬菌体的样液。采用 Adams 双层琼脂法对噬菌体进行分离, 然后以单斑穿刺法(连续重复 4 次)对噬菌体进行纯化^[10]。将纯化后的噬菌体加入已接菌的 LB 培养基中进行增殖培养, 再经离心(4000r/min, 20min)、微孔滤膜(0.45μm)过滤等过程除菌即可得到噬菌体原液^[7]。

1.5 噬菌体的电镜观察^[11]

取 20μl 滴度为 $10^{10} \sim 10^{11}$ pfu/ml 的噬菌体原液滴于铜网上, 自然沉淀 15min, 并用滤纸从侧面吸去多余液体。加 1 滴 2% 的磷钨酸(PTA)于铜网上对噬菌体染色 10min, 然后用滤纸从侧面吸去染液, 待样品干燥后用日立 H-7500 型电子显微镜观察。

1.6 最佳感染复数的测定

培养宿主菌 A46 至对数期, 取样涂板进行菌体计数。噬菌体原液滴度的测定采用双层琼脂计数法。按照感染复数分别为 100、10、1、0.1、0.01、0.001 的比例, 加噬菌体原液和宿主菌至 LB 肉汤培养基中, 并使各管培养基的总体积相同。30℃下摇床(200r/min)培养 3.5h, 离心(10000 × g, 10min)收集上清液。测定上清液中的噬菌体滴度, 以产生最高噬菌体滴度的感染复数(MOI)为最佳感染复数。

1.7 一步生长曲线的测定

一步生长曲线的测定采用由 Lu^[12]、Leuschner 等^[13]和 Foschino 等^[14]改进的方法。加噬菌体及对数期的宿主菌至 LB 肉汤培养基中, 30℃培养 10min, 离心(13000 × g, 30s)弃去上清液, 并用 LB 培养基洗涤 2 次。将经过洗涤的沉淀物加入已经预热的 LB 培养基中, 迅速在 30℃下振荡培养, 同时开始计时, 每隔 15min 取样, 然后立即用双层琼脂法测定培养液的噬菌体滴度。

1.8 pH 稳定性测定^[15]

处理介质为 1% 蛋白胨液。pH 用 NaOH 或 HCl 调节, 以雷磁 PHSJ-3F 型酸度计测定。将不同 pH 值的蛋白胨液 0.9ml 加入到 2ml 的 EP 管内, 置于温度为 25 ± 0.3℃的水浴中, 待温度平衡后加入噬菌体液 0.1ml, 经 60min 处理后以 pH7.0 的蛋白胨液进行适当稀释, 利用双层琼脂法测定各样品的噬菌体滴度。

1.9 热稳定性测定^[15]

将 0.9ml 的蛋白胨液加入到 2ml 的 EP 管内, 置于不同温度的水浴中, 待温度平衡后加入噬菌体液 0.1ml。按一定时间间隔取样, 并将样品立即放入冰水中降温, 然后经适当稀释后利用双层琼脂法测定各样品的噬菌体滴度。

1.10 噬菌体衣壳蛋白的 SDS-PAGE 电泳

参照 Lu^[12]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的分离、纯化及原液制备

经多次分离、纯化, 从荧光假单胞菌 A46 的异常发酵液中获得了 1 种噬菌体, 将其命名为 KS461-2, 它在双层琼脂平板上可产生形态基本一致的噬菌斑(图 1)。以荧光假单胞菌 A46 为宿主菌, 噬菌体 KS461-2 形成的噬斑为透明的边缘清晰的圆形噬菌斑, 直径约 2.5mm。将纯化后的噬菌体加入已接菌的 LB 培养基中进行增殖培养, 可以得到滴度达 10^{11} pfu/ml 以上的噬菌体原液。



图1 KS461-2的噬菌斑形态
Fig.1 Plaque morphology of phage KS461-2

2.2 噬菌体的电镜观察

电镜观察(图2)表明,噬菌体KS461-2的形态为蝌蚪状。KS461-2的头部为二十面体,长径60nm,横径50nm。KS461-2带有非收缩性的长尾,尾长80nm,尾径4nm。

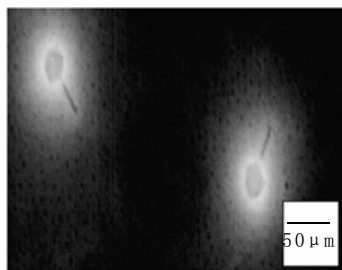


图2 噬菌体KS461-2的形态(×80k)
Fig.2 Electron micrograph of phage KS461-2(×80k)

2.3 最佳感染复数的确定

测得对数期菌体的浓度为 9×10^9 个/ml,噬菌体原液中噬菌体的浓度为 10×10^{10} 个/ml。按不同的感染复数加噬菌体和宿主菌于LB培养基中培养3.5h后,宿主菌被充分裂解,培养液变得澄清,测定培养液中的噬菌体滴度,结果见表1。

表1 噬菌体KS461-2最佳感染复数的测定
Table 1 Determination of optimal multiplicity of infection

管号	细菌数目	噬菌体数	感染复数	3.5h后噬菌体滴度 (pfu/ml)
1	9×10^7	9×10^9	100	6.0×10^8
2	9×10^8	9×10^9	10	1.3×10^9
3	9×10^8	9×10^8	1	1.7×10^{10}
4	9×10^9	9×10^8	0.1	3.0×10^{10}
5	9×10^9	9×10^7	0.01	2.4×10^{11}
6	5×10^{10}	5×10^7	0.001	9.0×10^{10}

根据表1的实验结果,当MOI=0.01时,噬菌体KS461-2感染其宿主荧光假单胞菌A46产生的子代噬菌体

滴度为 2.4×10^{11} pfu/ml,为6个感染复数下产生的最高的噬菌体滴度。因此,确定噬菌体KS461-2感染其宿主菌荧光假单胞菌A46的最佳感染复数为0.01。

2.4 一步生长曲线的测定

根据一步生长曲线(图3),可清晰看出KS461-2感染宿主菌A46的潜伏期约30min,裂解期约135min。根据裂解量计算公式:裂解量=裂解末期噬菌体滴度÷感染初期宿主菌浓度,计算如下: $2.18 \times 10^{10} \div (9 \times 10^8) = 24$,即KS461-2感染宿主菌A46的裂解量为24。

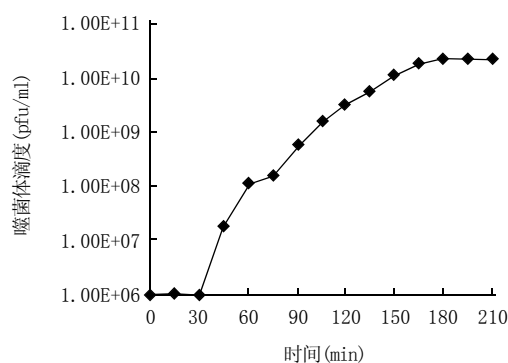


图3 噬菌体KS461-2一步生长曲线
Fig.3 One-step growth curve of phage KS461-2

2.5 pH对噬菌体KS461-2稳定性的影响

pH值对噬菌体KS461-2的稳定性具有显著影响(表2)。在pH7.0~10.0的范围内,噬菌体KS461-2的存活率高达93%以上。在酸性环境下,噬菌体KS461-2的存活率明显降低。pH4.0时,噬菌体KS461-2的存活率仅为6.8%。

2.6 温度对噬菌体KS461-2稳定性的影响

为了解温度对噬菌体KS461-2稳定性的影响,考察了不同温度条件下噬菌体的存活率(图4)。60℃处理60min,噬菌体KS461-2的存活率为20%左右;70℃处理60min,噬菌体KS461-2的存活率仅为0.18%;80℃处理60min,噬菌体KS461-2的存活率不足0.01%;90℃以上处理45min,噬菌体KS461-2几乎没有存活。从以上结果可以看出,噬菌体KS461-2对温度比较敏感。

2.7 噬菌体结构蛋白的SDS-PAGE电泳

由于噬菌体能够充分利用宿主菌的复制、转录和翻译工具,来完成自己的核酸和蛋白质合成以及噬菌体颗粒的组装。所以,噬菌体基因组所编码的蛋白主要是噬菌体本身必需的结构蛋白和极少数宿主菌不能提供的蛋白,如一些DNA复制和转录的调节蛋白以及包装辅

表2 pH对噬菌体KS461-2稳定性的影响
Table 2 Effects of pH on stability of phage KS461-2

pH	4	5	6	7	8	9	10
滴度(pfu/ml)	6.0×10^6	3.9×10^7	4.3×10^7	8.8×10^7	8.2×10^7	8.5×10^7	8.8×10^7

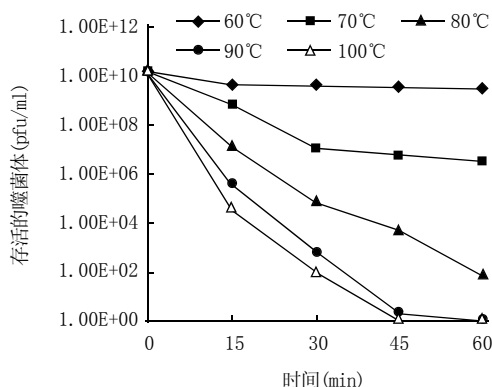
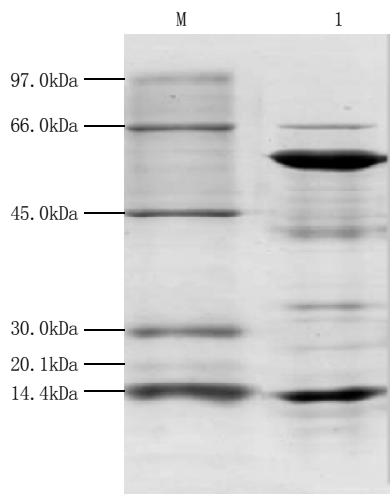


图4 噬菌体 KS461-2 的热稳定性曲线
Fig.4 Thermal stability curve of phage KS461-2

助蛋白。调节蛋白在宿主菌内表达和发挥作用，完成使命后在宿主菌的胞浆中降解，并不出现在噬菌体颗粒中。因此，利用纯化的噬菌体颗粒进行 SDS-PAGE 分离的蛋白质应为噬菌体的结构蛋白。



M. 标准蛋白(KD); 1. 噬菌体 KS461-2 蛋白。

图5 噬菌体 KS461-2 SDS-PAGE 图
Fig.5 SDS-PAGE of phage KS461-2

从图5可见，噬菌体 KS461-2 颗粒中至少含有8种衣壳结构蛋白。其中，5种结构蛋白的含量较高，其分子量分别为66.0、61.0、42.5、34.7和14.4kDa。

3 讨论

噬菌体分为烈性噬菌体和温和噬菌体。烈性噬菌体在固体培养基上形成清晰、透亮的溶菌空斑，即透明噬斑；温和噬菌体(即溶原性噬菌体)在固体培养基上形成浑浊的半透明噬斑。噬菌体 KS461-2 形成的噬斑具有烈性噬菌体的噬斑特征。

在形状和大小上，噬菌体 KS461-2 与以往报道的荧光假单胞菌的噬菌体如 PFAS、KS212、KS213、KS503

和 KS461 等都存在着一定差异，可以认为是一种新发现的噬菌体。ICTV(International Committee for Taxonomy of Viruses)将病毒分为3目61科241属^[16]，噬菌体为其中的1目，包括有13科30属^[4]。依据 ICTV 关于噬菌体的分类标准，KS461-2 应该属于长尾噬菌体科(Siphoviridae)。

不同的噬菌体具有不同的最佳感染复数。铜绿假单胞菌噬菌体 PaP2 的最佳感染复数为10^[17]，铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 的最佳感染复数为0.01^[18]，乳酸杆菌噬菌体 Φ JL-1 的最佳感染复数在0.01~0.03之间^[12]。不同噬菌体最佳感染复数不同的原因可能有：①噬菌体本身形态结构的不同，如噬菌体 Φ JL-1 和 KS461-2 属于长尾噬菌体科，噬菌体 PaP1 属于肌尾噬菌体科(Myoviridae)，噬菌体 PaP2 属于短尾噬菌体科(Pedoviridae)；②噬菌体所感染的宿主菌的不同。

噬菌体作为非细胞型微生物，其增殖形式表现为“一步生长”的特点。各种噬菌体都有独特的一步生长曲线，如铜绿假单胞菌噬菌体 PaP2 的潜伏期为75min，裂解期为90min，裂解量为34^[17]；铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 的潜伏期为20min，裂解期为40min，裂解量为65^[18]；对于乳酸杆菌噬菌体 Φ JL-1^[12]来说，3个值分别是35min、40min和22。

温度和 pH 对噬菌体 KS461-2 的稳定性具有显著的影响。依此看来，通过适当改变环境的 pH 值和温度，有可能在生产上达到有效控制噬菌体的目的。

参考文献：

- [1] 司稗东. 噬菌体学[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] HENDRIX R W. Bacteriophage genomics[J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6(5): 506-511.
- [3] RUBIRES X, MERINO S, AGUILAR A, et al. Isolation of three bacteriophage from *mesophilic Aeromonas* sp. that use different types of monopolar flagella as their primary receptor[J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 161: 53-57.
- [4] ACKERMANN H W. Bacteriophage observations and evolution[J]. Res Microbiology, 2003, 154: 245-251.
- [5] 孙文敬, 白照熙, 谢红, 等. 我国D-异抗坏血酸钠的研究和生产现状[J]. 微生物学通报, 1990, 17(3): 170-172.
- [6] 沈淑瑜, 王怡平, 乔昌济, 等. 荧光假单胞菌抗噬菌体菌株的选育[J]. 微生物学通报, 1996, 23(50): 282-285.
- [7] 赵峰梅, 孙文敬, 王慕华, 等. 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌荧光假单胞菌K1005抗噬菌体菌株的选育[J]. 工业微生物, 2000, 30(4): 45-49.
- [8] 孙文敬, 赵峰梅, 郭金权, 等. 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌球状芽孢杆菌K1022抗噬菌体菌株的选育[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(6): 36-39.
- [9] 孙文敬, 杨庆文, 赵峰梅, 等. 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌荧光假单胞菌A46抗噬菌体菌株的选育[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 67-70.
- [10] 赵峰梅, 孙文敬, 米丽娟, 等. 噬菌体污染对荧光假单胞菌K1005 2-酮基-D-葡萄糖酸发酵的影响[J]. 食品科学, 2002, 23(6): 72-74.
- [11] 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(3): 40-45.
- [12] LU Z, BREIDT J F, FLEMING H P, et al. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, Φ JL-1, from a cucumber

鲫鱼肝脏 AChE 的提取及有机磷农药对 AChE 的抑制效应研究

刘晓宇¹, 王 斌¹, 吴谋成¹, 杨 健², 徐 盈³

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 内陆渔业环境与资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘 要: 本研究利用淡水鲫鱼肝脏为主要原材料提取乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE), 并设计正交试验确定了鲫鱼肝脏中乙酰胆碱酯酶的最佳提取条件; 通过酶抑制法衡量敌敌畏、辛硫磷、三唑磷、乐果等四种不同种类有机磷农药对粗酶液的抑制作用; 将鱼肝和鱼脑中乙酰胆碱酯酶活性及蛋白含量的进行对比研究。研究结果表明: 提取液 pH 值、提取液种类以及原料与提取液的质量体积比对酶液的活性影响显著; 被测四种有机磷农药中, 敌敌畏对 AChE 活性抑制作用最强。鱼脑的 AChE 比酶活是肝脏的 AChE 比酶活的 3~7 倍。

关键词: 鲫鱼肝脏; 乙酰胆碱酯酶; 有机磷农药; 抑制; 提取

Study on Crucian Liver Extraction and Restraining Effects to AChE by Organophosphorus Pesticides

LIU Xiao-yu¹, WANG Bin¹, WU Mou-cheng¹, YANG Jian², XU Ying³

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. Key Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: In this paper, Crucian was used as the raw material. A three factors three levels orthogonal test was used to confirm the optimum extracting conditions of acetyl cholinesterase (AChE) from the Crucian liver so as to analyze the protein content and enzyme activity in the AChE coarse enzyme solution and compare the AChE activity and protein content in the liver and brain. As the enzyme restrain method was used to evaluate the restraining effects of dichlorvos, phoxim, triazophos, dimethoate in the coarse enzyme solution. The results of this study showed the pH, the type of the extraction solution and the quality volume ratio of the raw material to the extraction solution affect the activity of the enzyme significantly. Among the four organic phosphorus pesticides, dichlorvos shows the greatest restrain effect.

收稿日期: 2006-10-30

基金项目: 农业部专项基金项目(04-11-04B); 湖北省自然科学基金项目(2006ABA165)

作者简介: 刘晓宇(1969-), 女, 副教授, 研究方向为食品安全及农业资源综合利用。

- fermentation[J]. International J Food Microbiology, 2003, 84: 225-235.
- [13] LEUSCHNER R G K, ARENDT E K, HAMMES W P, et al. Characterization of a virulent *Lactobacillus sake* phage PWH2[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 39: 617-621.
- [14] FOSCHINO R, PERRONE F, GALLI A, et al. Characterization of two virulent *Lactobacillus fermentum* bacteriophage isolated from sour dough[J]. J Appl Bacteriol, 1995, 79: 677-683.
- [15] 余茂効, 贾盘兴, 徐星, 等. 多粘芽孢杆菌噬菌体的分离及其特性的研究[J]. 微生物学报, 1997, 14(2): 216-223.

- [16] REGENMORTEL M H V, FAUQUET C M, BISHOP D H L, et al. Virus taxonomy, seventh report of the international committee on taxonomy of viruses[C]. Academic Press, San Diego, 2000: 63-136; 267-284; 389-393; 645-650.
- [17] 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.
- [18] 李明, 申晓东, 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): 860-862.