

doi: 10.7541/2017.99

两株副溶血弧菌烈性噬菌体的分离鉴定

宋增福^{1,2} 徐华东¹ 彭孟凡¹ 孙博超¹ 赵政¹ 张也¹ 任建峰^{1,3} 张庆华^{1,3}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306; 3. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 研究旨在筛选烈性噬菌体, 为副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)病害防控增加新的选择。以副溶血弧菌Vp13为宿主菌, 通过二层琼脂平板法筛选, 分离到了2株烈性噬菌体SX-2和SX-F。对其形态结构进行了透射电镜观察, 利用DNase I、RNase A、Mung Bean Nuclease和Hind III酶进行噬菌体核酸类型鉴定, 并对噬菌体的裂解谱、最佳感染复数、一步生长曲线进行了测定。透射电镜观察结果显示: SX-2核衣壳头部长约110 nm, 宽约50 nm, 尾部长约150 nm, 宽约10 nm, 为典型的复合体制; SX-F核衣壳呈正六边形, 长约为56.86 nm, 宽约50.74 nm, 未观察到尾部, 推测为正二十面体对称; 核酸测定结果显示两者均为线性双链DNA。依据国际病毒分类委员会第九次报告, SX-2符合肌尾噬菌体科特征, SX-F符合盖噬菌体科特征。噬菌体SX-2和SX-F对85株弧菌裂解结果显示: 噬菌体SX-2能够裂解23株副溶血弧菌和1株溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*), 噬菌体SX-F能够裂解19株副溶血弧菌和1株溶藻弧菌。SX-2和SX-F的最佳感染复数均为0.0001。一步生长曲线结果显示: SX-F的潜伏期约10min, 裂解期约70min, 裂解量为116.2; 噬菌体SX-2的潜伏期小于10min, 裂解期大约70min, 裂解量为209.3。两株噬菌体生物学特性表明SX-2与SX-F均为烈性噬菌体, 这为进一步探讨噬菌体防治技术奠定了基础。

关键词: 副溶血弧菌; 烈性噬菌体; 形态结构; 生物学特性

中图分类号: S945.1⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2017)04-0793-07

副溶血弧菌是典型的人畜共患病病原菌之一。在我国, 副溶血弧菌是沿海地区引起微生物食物中毒的最重要的病原菌, 在美洲和亚洲其他地区, 也经常有副溶血弧菌引起暴发性疾病的报道^[1]。人食用了被副溶血弧菌污染的海产品会引起腹泻、呕吐、发烧等症状, 严重的会导致死亡^[2-4]。在水产养殖业, 每年由副溶血弧菌引起的疾病同样十分严重, 主要症状为发炎、败血症等并导致水产动物的大量死亡。抗生素因治疗快、使用方便等优点, 是防治副溶血弧菌所致疾病的主要化学药物^[4, 5]。但抗生素的长期滥用加剧了细菌耐药性的产生, 导致防治效果越来越差, 并且对环境的污染也非常严重。2015年我国对虾产业遭遇重创, 副溶血弧菌是最为重要的病原^[6]。寻找新的抗生素替代产品成为

了生物与医药领域的研究热点。微生物防治对环境没有污染且不会破坏生态平衡, 越来越受到人们的关注^[7], 噬菌体防治技术由于其独特的优势又重新回到人们视野当中。

自从1917年Felix d'Herelle通过治疗实验证实噬菌体具有治疗细菌病的作用以来, 其已经成为当前国际上争夺这一类生物资源的又一战略高地^[8-11]。噬菌体分为温和噬菌体和烈性噬菌体2大类, 其中烈性噬菌体侵入细菌细胞内通过裂解酶的作用分泌内溶素破坏细胞壁并裂解细菌, 在裂解宿主菌的同时大量释放子代噬菌体, 一个噬菌体颗粒通过4个感染周期就可以使数十亿个细菌死亡。噬菌体具有宿主专一性, 一般只感染宿主菌而不裂解其他细菌, 不会破坏微生态平衡^[7, 12]。因此, 噬菌体疗法

收稿日期: 2016-05-24; 修订日期: 2016-07-15

基金项目: 上海市水产遗传育种协同创新中心基金(ZF1206); 上海海洋大学博士启动基金(A2-0203-00-100319); 上海市高校新进教师培训及科研启动基金(A1-2056-16-0021)资助 [Supported by the Shanghai Collaborative Innovation Center for Aquaculture Genetics and Breeding (ZF1206); Shanghai Ocean University Doctor start-up Fund(A2-0203-00-100319); Shanghai New College Teacher Training and Research Start-up Fund(A1-2056-16-0021)]

作者简介: 宋增福(1971—), 男, 山东临沂人; 博士, 副教授; 主要从事水产病害防控技术研究。E-mail: zfsong@shou.edu.cn

通信作者: 张庆华, E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

因其安全性、耐药性风险低且无环境污染等优点得到人们的重视^[13, 14]。全球范围的细菌耐药性蔓延的加剧也使得科学家们重新审视和评估噬菌体防治技术^[15]。我国学者相继分离出副溶血弧菌烈性噬菌体,如江艳华等分离到VpJYPI^[16]、丁云娟等分离到qdv001^[17]及彭勇等^[18, 19]分离到VPP1、VPP2和VPP3等,这些研究工作的开展为对噬菌体的应用奠定了良好基础。

尽管噬菌体防治技术显示出良好的应用前景,但目前的应用效果仍然不够理想,有待于进一步提高^[17, 20, 21]。本研究拟通过以具有强致病力的副溶血弧菌Vp13为宿主菌,筛选具有高效裂解能力的噬菌体,为进一步探索副溶血弧菌的噬菌体防控技术奠定物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*) Vp13由上海海洋大学食品学院赵勇教授惠赠(分离自患病南美白对虾), Vp1、Vp2等83株副溶血弧菌均分离自患病南美白对虾,副溶血弧菌VpATCC17802由加州大学洛杉矶分校(UCLA)王艳玲博士惠赠,溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)VaK由本室分离自患病南美白对虾。

水样采集 用于分离副溶血弧菌噬菌体的水样采集于上海市铜川路水产品批发市场下水道。2015年8月13日采集水样编号为1—11,10月3日水样编号为12—23。

培养基与试剂 胰蛋白胨大豆肉汤培养基(Tryptose soya broth, TSB, 北京路桥)、胰蛋白胨大豆琼脂培养基(Tryptose soya agar, TSA, 北京路桥)、缓冲蛋白胨水(北京路桥)、氯化钠(NaCl, 国药集团)、硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS, 北京路桥)、EZUP柱式细菌基因组抽提试剂盒(上海生工), PCR试剂: Master Mix 2×、D15000 marker(北京天根)、甘油、琼脂糖凝胶(上海生工)、Tris-HCl (0.5 mol/L pH 7.5 上海生工)、20%聚乙二醇6000 (PEG 6000), SM缓冲液(Sodium chloride magnesium sulfate buffer): NaCl 5.8 g、MgSO₄·7H₂O 2 g、TrisHCl 1 mol/L (pH 7.5) 50 mL、2% gelatin 5 mL, 蒸馏水补足至1000 mL。

主要实验仪器 恒温培养箱(MIR-262)、离心机(Eppendorf AG 5404)、电泳仪(DYY-6 C); PCR仪(Eppendorf AG 6325)、振荡培养箱(IN-NOVA 40R)、凝胶成像系统(GEL DOC XR型, Bio-

Rad)、高压灭菌锅(MLS-3780)、120KV生物型透射电镜(Tecnai G2 spirit biotwin)。

1.2 方法

噬菌体分离筛选 富集培养: 将采集的水样取20 mL加入50 mL离心管中,加入1 mL处于生长对数期的副溶血弧菌Vp13,混合均匀,同时加入200 μL CaCl₂和200 μL SM缓冲液以及20 mL 20% PEG溶液,并用盐度30‰的10×缓冲蛋白胨水加至50 mL过夜培养。

参考余茂效等^[22]的二层平板法进行副溶血弧菌噬菌体富集筛选,略作修改。

富集培养液8000 r/min离心20min,取上清液用微孔滤膜(直径=0.22 μm)过滤除菌2次;做10⁻¹—10⁻⁷稀释,分别取每个稀释度样液200 μL于灭菌的10 mL离心管中,3个平行;将培养了10h的副溶血弧菌悬液400 μL(对数期)与稀释液混合,同时加入100 μL CaCl₂和100 μL SM缓冲液并混合均匀,静置10—15min,进行二层平板法,分别于6h、12h、18h和24h观察噬菌斑出现情况。

噬菌体SX-2和SX-F的纯化与浓缩 参考余茂效等^[22]的噬菌体纯化方法,略作修改。挑取单个噬菌斑至1 mL SM缓冲液中充分震荡混匀,静置1—2h,吸取100 μL进行10倍法稀释至10⁻⁷,进行二层平板法验证分离得到的噬菌斑,连续纯化5次得到纯噬菌体^[20]。将纯化的噬菌体用二层平板固体培养8h后,倒入10 mL SM缓冲液,用1 mL移液枪反复吹打上层琼脂平板后,常温静置10h,使噬菌体充分释放到液体中,收集上清液即为浓缩液。

噬菌体SX-2和SX-F的电镜观察 参考Ramírez-Orozco等^[23]的方法,采用磷钨酸负染法进行透射电镜直接观察噬菌体。

噬菌体SX-2和SX-F增殖液制备 挑取上层平板上的噬菌斑置10 mL的SM缓冲液中混匀,先置4℃ 10h,然后将其进行8000 r/min离心20min,用10 mL一次性注射器吸取上清,最后经0.22 μm滤膜过滤除菌3次得到增殖液,于37℃保存备用。

噬菌体SX-2和SX-F效价的测定 吸取100 μL纯化的噬菌体液进行10倍稀释,将10⁻⁵、10⁻⁶及10⁻⁷的噬菌体液分别与400 μL的Vp13混合,利用二层平板法观察噬菌斑的个数。

噬菌体效价(pfu/mL)=噬菌斑数量×稀释倍数/加入的噬菌体液体积

噬菌体SX-2和SX-F核酸类型鉴定 参照Sambrook等^[24]噬菌体核酸提取的方法,略有改动^[25, 26]。将增殖的噬菌体液加入DNase I (50 μg/mL)和RNaseA (100 μg/mL),摇床震荡1h (37℃, 50r),加入EDTA终止反应,加入等体积的20% PEG冰浴2h,

12000 r/min离心30min, 弃上清, 沉淀用200 μ L SM缓冲液洗脱, 洗脱液用EZUP柱式细菌基因组抽提试剂盒提取噬菌体核酸。采用DNase I、RNase A、Mung Bean Nuclease及Hind III进行酶切实验, 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切结果。

噬菌体SX-2和SX-F裂解谱的测定 采用双层平板法, 以噬菌体SX-2为例, 将浓度为 3.8×10^{10} pfu/mL的噬菌体液进行10倍稀释, 每个浓度取200 μ L的稀释液与400 μ L对数期的副溶血弧菌($A_{600}=0.941$)混合, 37 $^{\circ}$ C恒温放置10min, 再与10 mL半固体TSA培养基混匀并倒入事先制好的固体TSA琼脂平板上制成双层平板, 冷却凝固后倒置于37 $^{\circ}$ C恒温箱中培养。

噬菌体SX-2和SX-F最佳感染复数测定(MOI) 本实验按照感染复数为10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001、0.00001和0.000001的比例, 分别取SX-2和SX-F噬菌体液100 μ L与对数期的Vp13(1×10^7 pfu/mL) 100 μ L混合, 加入到10 mL TSB培养基中, 37 $^{\circ}$ C摇床120 r/min培养10h。将培养液经8000 r/min离心10min, 取上清经0.22 μ m滤膜除菌, 除菌后的噬菌体液用二层平板法检测噬菌体效价, 效价最高的所对应的感染复数为最佳感染复数。

噬菌体SX-2和SX-F一步生长曲线测定 参照余茂勋等^[22]、Ramirez-Orozco等^[23]的方法, 略做改动。以SX-2为例, 以MOI为0.1的比例加入SX-2和宿主菌Vp13(10^9 pfu/ 10^8 cfu), 37 $^{\circ}$ C静置10min, 8000 r/min离心1min, 用SM缓冲液洗涤3次去除未吸附的噬菌体, 将沉淀置于10 mL离心管中充分混匀。立即置于37 $^{\circ}$ C摇床培养(150 r/min), 并开始计时。在0时取样100 μ L, 以后每隔10min取样, 共120min, 每次取完的样品立即用二层平板法检测效价, 每个时间点做3次平行, 横坐标为感染时间, 纵

坐标为噬菌体效价, 绘制SX-2的一步生长曲线。

2 结果

2.1 噬菌体SX-2和SX-F筛选

从上海铜川路海产品市场下水道采集的2号水样和5号水样中分离到2株噬菌体, 分别为SX-2和SX-F。其中SX-2形成的噬菌斑中间透亮, 边缘有晕环, 随着时间的延长晕环会逐步增大。SX-F形成的噬菌斑是一个透亮的噬菌斑, 随着时间的延长没有出现晕环。2种噬菌体出现噬菌斑的时间均在6h。在分离的过程中, 添加20% PEG、10% CaCl₂以及SM缓冲液富集培养, 比直接用水样筛选更容易筛选到噬菌体(表1)。实验过程中发现噬菌体与宿主菌间的浓度比例与培养时间会影响噬菌斑的观察(表2)。

表1 PEG₁、CaCl₂及SM缓冲液的添加对噬菌体筛选的影响

Tab. 1 Effects of PEG₁, CaCl₂ and SM buffer on phage screening

水样稀释 倍数 Dilution of water sample	2号水样 Water sample of 2 (pfu/mL)	2号水样+缓冲 液 Water sample of 2+buffer (pfu/mL)	5号水样 Water sample of 5 (pfu/mL)	5号水样+缓冲 液 Water sample of 2+buffer (pfu/mL)
0	2	+++	2	+++
10 ¹	-	+++	-	+++
10 ²	-	+++	-	++
10 ³	-	++	-	++
10 ⁴	-	++	-	++
10 ⁵	-	43	-	36
10 ⁶	-	4	-	4

注: +噬菌斑数量; -未观察到噬菌斑; 副溶血弧菌Vp13为10⁸ cfu/mL; 表2同

Note: + The plaques; - no plaques; The strain of *V. parahaemolyticus* Vp13 is 10⁸ cfu/mL; the same applies Tab.2

表2 噬菌体与宿主菌浓度比对噬菌斑形成的影响

Tab. 2 Effects of concentration ratio of phage and host bacteria on the phage plaque

噬菌体 浓度 Concentra- tion of phages (pfu/mL)	SX-2噬菌斑形成时间 The formation time of plaque phage SX-2 (h)			SX-F噬菌斑形成时间 The formation time of plaque phage SX-F (h)		
	6	10	24	6	10	24
10 ²	+	+	-	+	+	-
10 ³	+	+	-	+	+	-
10 ⁴	++	++	-	++	++	-
10 ⁵	++	++	+	++	+++	+
10 ⁶	+++	+++	+	+++	+++	+
10 ⁷	++++	++++	++	++++	++++	++
10 ⁸	平板表面出现部分清亮, ++++	平板表面出现部分清亮, ++++	平板表面出现部分清亮, ++++	平板表面出现部分细样浑浊, ++++	平板表面出现部分细沙样浑浊, ++++	平板表面出现部分细沙样浑浊, ++++
10 ⁹	平板表面出现部分清亮, ++++	平板表面出现部分清亮, ++++	平板表面出现部分清亮	平板表面细沙样浑浊	平板表面细沙样浑浊	平板表面细沙样浑浊
10 ¹⁰	平板表面清亮	平板表面清亮	平板表面清亮	平板表面细沙样浑浊	平板表面细沙样浑浊	平板表面细沙样浑浊

2.2 噬菌体SX-2和SX-F电镜观察

噬菌体电镜照片结果显示: SX-F(图 1A)未观察到尾部, 是正六边形, 头部长约为56.86 nm, 宽约为50.74 nm。SX-2(图 1B)观察到头部和尾部, 头部长约110 nm, 宽约50 nm, 尾部长约150 nm, 宽约10 nm。

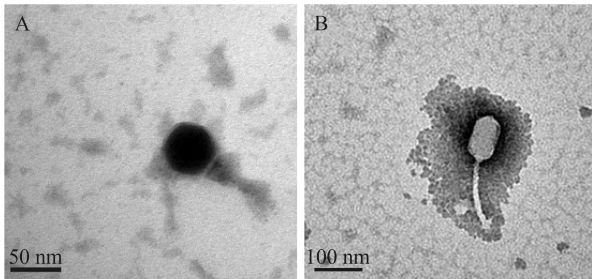


图 1 噬菌体SX-F(A)和SX-2(B)的透射电镜照片
Fig. 1 TEM micrograph of phage SX-F (A) and SX-2 (B)

2.3 噬菌体SX-2和SX-F核酸类型鉴定

1%琼脂糖凝胶电泳结果显示提取的噬菌体SX-2和SX-F核酸纯度好, 条带完整。二者都能被DNase I消化降解, 不能被RNase A消化降解, 说明遗传物质是DNA; 都不能被Mung Bean Nuclease消化降解, 能被Hind III 消化降解, 说明二者都是双链DNA; 二者核酸条带都是只有一个条带, 说明噬菌体SX-2和SX-F两者的核酸均为线性双链DNA。

2.4 噬菌体SX-2和SX-F裂解谱测定

对2株噬菌体分别做了除宿主菌外的85株弧菌裂解谱的检测, 其中VaK为溶藻弧菌, 其他均为副溶血弧菌。结果显示, 噬菌体SX-2能够裂解23株副溶血弧菌和1株溶藻弧菌VaK, 噬菌体SX-F能够裂解19株副溶血弧菌和1株溶藻弧菌VaK, 说明两株噬菌体都具有一定范围的裂解谱(表 3)。

2.5 噬菌体SX-2和SX-F最佳感染复数(MOI)测定

噬菌体SX-2和SX-F的效价都是在感染复数为0.0001时效价达到最高值, 所以二者的最佳感染复数都为0.0001(表 4)。

2.6 噬菌体SX-2和SX-F一步生长曲线测定

噬菌体SX-F的潜伏期约10min, 裂解期约70min, 根据计算公式计算SX-F裂解量=裂解末期噬菌体效价/感染初期宿主菌浓度, SX-F裂解量=5×10¹⁰/4.3×10⁸=116.2; 噬菌体SX-2的潜伏期小于10min, 裂解期约70min。SX-2裂解量=9×10¹⁰/4.3×10⁸=209.3(图 2)。

3 讨论

3.1 噬菌体分离

本研究从采集的23份水样中共分离到了2株副溶血弧菌Vp13的烈性噬菌体SX-2和SX-F。噬菌体

表 3 SX-2和SX-F对弧菌的裂解

Tab. 3 Lytic effect of SX-2 and SX-F on *Vibrio* spp.

菌株Bacterial strain	SX -2	SX -F	菌株Bacterial strain	SX -2	SX -F	菌株Bacterial strain	SX -2	SX -F
Vp1	+	+	Vp32	-	-	Vp62	-	-
Vp2	-	-	Vp33	-	-	Vp63	+	-
Vp3	+	-	Vp34	+	-	Vp64	-	-
Vp4	-	-	Vp35	+	+	Vp65	-	-
Vp5	+	-	Vp36	-	-	Vp66	-	-
Vp6	+	-	Vp37	-	-	Vp67	-	-
Vp7	-	-	Vp38	-	-	Vp68	-	-
Vp8	-	+	Vp39	+	+	Vp69	-	-
Vp9	-	+	Vp40	-	-	Vp70	-	-
Vp10	-	-	Vp42	-	-	Vp71	-	-
Vp11	-	-	Vp43	-	-	Vp72	-	-
Vp12	-	-	Vp44	-	-	Vp74	-	-
Vp14	-	-	Vp45	+	+	Vp74	-	-
Vp15	-	-	Vp46	-	-	Vp75	-	-
Vp16	-	-	Vp47	+	-	Vp76	-	-
Vp17	-	-	Vp48	-	-	Vp77	-	-
Vp18	+	-	Vp49	-	-	Vp78	-	-
Vp19	-	-	Vp50	-	-	Vp79	-	-
Vp20	-	-	Vp51	-	-	Vp80	+	+
Vp21	+	+	Vp52	+	+	Vp81	+	+
Vp22	+	+	Vp53	+	+	Vp82	+	+
Vp23	-	-	Vp54	+	+	Vp83	+	+
Vp24	-	-	Vp55	-	-	Vp84	+	+
Vp25	-	+	Vp56	-	-	Vp90	-	-
Vp26	-	-	Vp58	-	-	Vp91	-	-
Vp27	-	-	Vp59	-	-	Vp92	-	-
Vp28	+	+	Vp60	-	-	Vp17802	-	-
Vp29	-	-	Vp61	-	-	VaK	+	+
Vp30	+	+						

注: +能够被裂解; -不能被裂解
Note: + Can be lysed; - can not be lysed

表 4 噬菌体SX-2和SX-F的最佳感染复数

Tab. 4 The optimal MOI of phage SX-2 and SX-F

感染复数MOI	噬菌体数The number of phage (pfu)	细菌数The number of bacteria (cfu)	噬菌体SX-2效价The phage titer of SX-2 (pfu/mL)	噬菌体SX-F效价The phage titer of SX-F (pfu/mL)
10	1×10 ⁸	1×10 ⁷	3.4×10 ⁹	2.9×10 ⁹
1	1×10 ⁷	1×10 ⁷	3.9×10 ⁹	3.9×10 ⁹
0.1	1×10 ⁶	1×10 ⁷	5.9×10 ⁹	5.3×10 ⁹
0.01	1×10 ⁵	1×10 ⁷	8.6×10 ⁹	8.2×10 ⁹
0.001	1×10 ⁴	1×10 ⁷	3.9×10 ¹⁰	3.8×10 ¹⁰
0.0001	1×10 ³	1×10 ⁷	5.6×10 ¹⁰	4.6×10 ¹⁰
0.00001	1×10 ²	1×10 ⁷	7.3×10 ⁹	7.1×10 ⁹
0.000001	1×10 ¹	1×10 ⁷	4.6×10 ⁹	4.4×10 ⁹

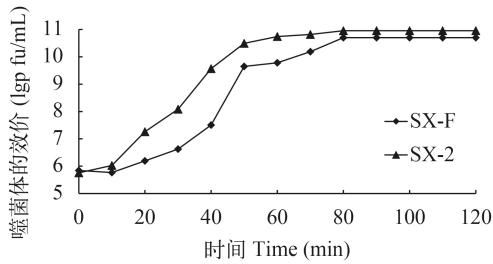


图2 噬菌体SX-F和SX-2的一生长曲线

Fig. 2 One-step growth curve of phage SX-F and SX-2

的分离受到多种理化因素的影响,如PEG和钙、镁离子、噬菌体与宿主菌间的浓度比例及培养时间等因素都会直接影响分离的结果。

PEG具有浓缩噬菌体颗粒和细菌的作用,能够促进噬菌体吸附在细菌表面; Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 能够增加细胞膜的通透性促进噬菌体的侵染。Samantha等^[27]在分离噬菌体时加入 CaCl_2 , 有助于快速筛选到噬菌体。实验通过水样直接筛选, 水样中噬菌体的效价为2 pfu/mL, 通过加入20% PEG、10% CaCl_2 以及SM缓冲液富集培养, 水样中噬菌体的效价为 4×10^6 pfu/mL, 显著促进了噬菌体的富集与效价的提升, 缩短了噬菌体分离的周期, 提高了噬菌体分离的效率。

噬菌体与宿主菌间的浓度比例与培养时间会影响噬菌斑的观察。蔺红苹等^[20]分离噬菌体时, 噬菌体浓度显著高于宿主菌浓度时, 双层平板上呈细沙样浑浊或大面积清亮, 噬菌斑出现后随着时间的延长, 耐受菌生长后覆盖噬菌斑, 导致不能观察到噬菌斑。本研究通过优化二者间的浓度比例, 发现当噬菌体SX-2和SX-F与宿主菌浓度比例为 10^4 — 10^7 pfu/mL : 10^8 cfu/mL 时才能在二层平板上清楚地观察到噬菌斑。当噬菌体的浓度 (10^{10} pfu/mL) 显著高于宿主菌的浓度 (10^8 cfu/mL) 时, 观察到双层平板上出现细沙样混浊(SX-F)和清亮(SX-2)两种现象, 未能观察到完整的噬菌斑。培养时间也是影响噬菌斑观察的另一重要因素, 因此, 完整噬菌斑的观察要选择合适的培养时间。在本实验中, 当噬菌体与宿主菌混合浓度比例为 10^4 — 10^7 pfu/mL : 10^8 cfu/mL 时, 观察噬菌斑的最佳培养时间为6—10h, 此时, 能够观察到形态完整的噬菌斑; 当培养时间进一步延长时, 副溶血弧菌形成的菌苔能够覆盖噬菌斑, 从而无法观察到噬菌斑。

3.2 噬菌体的形态结构

邱德全等^[28]分离的副溶血弧菌噬菌体头部为正二十面体, 直径约110 nm, 尾部长约270 nm, 底部有3个刺突, 符合肌尾噬菌体科特征。江艳华等^[15]分离的副溶血弧菌噬菌体头部呈二十面体立体结

构, 直径约60 nm, 尾部宽约8 nm, 长约20 nm, 符合短尾噬菌体科特征。本文筛选的2株噬菌体与以上学者描述的副溶血弧菌噬菌体均不同, SX-2的衣壳蛋白由头部和尾部组成, 头部长约110 nm, 宽约50 nm, 尾部长约150 nm, 宽约10 nm, 属于复合对称, 核酸类型为线性双链DNA, 符合肌尾噬菌体科特征, SX-F未观察到尾部, 是正六边形, 推测为正二十面体, 头部长约为56.86 nm, 宽约为50.74 nm。核酸类型为线性双链DNA, 符合盖噬菌体科特征。这两株副溶血弧菌Vp13的噬菌体是否为新型噬菌体尚需进一步研究。

3.3 噬菌体裂解谱

噬菌体的裂解谱在生物防控方面具有重要的应用价值。但是由于噬菌体具有宿主专一性, 因此, 大部分噬菌体的裂解谱都十分窄。彭勇等^[18, 19]对分离到的噬菌体VPP1进行了8株弧菌裂解效果检测, 随后又对分离到的噬菌体VPP2和VPP3进行了12株弧菌裂解效果检测, 结果显示噬菌体VPP1、VPP2和VPP3只对2株弧菌具有裂解效果。本实验85株弧菌检测结果表明两株噬菌体具有较强的裂解能力, 裂解谱占到实验菌株的24%以上, 具有潜在的应用价值, 为开发新型抗菌的微生物制剂奠定了基础。

3.4 噬菌体的生物学特性

感染复数是病毒与宿主之间量化与产出的重要生物学指标^[20]。噬菌体最佳感染复数是指产出噬菌斑最多时对应的初始加入噬菌体数量与宿主菌数量的比值。丁云娟等^[17]分离的副溶血弧菌噬菌体最佳感染复数为0.1—10, Pringsulaka等^[21]测得食窦魏斯氏菌(*Weissella cibaria*)噬菌体感染宿主菌的最佳感染复数在0.01。本实验筛选到的2株噬菌体的最佳感染复数都是0.0001说明这2株噬菌体都具有较强的裂解能力。

噬菌体的一步生长曲线能够反映出噬菌体的3个特征: 潜伏期、裂解期和裂解量。从潜伏期可得知噬菌体吸附于细胞并释放出子代噬菌体的最短时间。裂解期是紧接在潜伏期后的宿主细胞迅速裂解、溶液中噬菌体粒子急速增加的一个阶段, 从理论上来说, 其裂解是瞬间出现的, 但因宿主群体中各个细胞的裂解不可能是同步进行的, 故出现较长的裂解期。裂解量指每个感染细胞所产生的子代噬菌体的平均数目。其中潜伏期和裂解量是噬菌体增值的2个特征性数据。噬菌体SX-F和SX-2的潜伏期(约10min)高于江艳华等^[16]分离到的噬菌体VpJYP1(5min), 低于丁云娟等^[17]分离的噬菌体qdp001(20min)。噬菌体SX-F的裂解量(110)与江

艳华等^[17]分离到的噬菌体VpJYP1(110)相同,略高于彭勇等^[19]分离到的噬菌体VPp1(90.3),噬菌体SX-2裂解量(209.3)显著高于噬菌体SX-F、VpJYP1以及VPp1。从潜伏期长短和裂解量的大小比较,本研究获得的两株噬菌体的裂解性能优良。

综上所述,本实验分离到的2株副溶血弧菌Vp13的噬菌体均为烈性噬菌体,具有良好的应用价值,可以作为抗生素的替代制剂用于水产养殖中副溶血弧菌疾病的防治。

参考文献:

- [1] Palanki M S S, Bhat A, Bolanos B, *et al.* Development of a long acting human growth hormone analog suitable for once a week dosing [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, **23**(2): 402—406
- [2] Su Y C, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety [J]. *Food Microbiology*, 2007, **24**(6): 549—558
- [3] Wang Y G, Zhang Z, Qing L, *et al.* The main diseases of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) and their prevention and treatment [J]. *Marine Fisheries Research*, 2004, **25**(6): 61—68 [王印庚, 张正, 秦蕾, 等. 养殖大菱鲆主要疾病及防治技术. 海洋水产研究, 2004, **25**(6): 61—68]
- [4] Zhang X, Cai J P. Determination of the antibiotic susceptibilities of four marine pathogenic *Vibrios* [J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2003, **31**(9): 66—69 [张昕, 蔡俊鹏. 四种海洋致病弧菌对抗生素敏感性的测定. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2003, **31**(9): 66—69]
- [5] Wu H B, Pan J P. Progress in studies of vibriosis in aquaculture [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, **8**(1): 89—93 [吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病. 中国水产科学, 2001, **8**(1): 89—93]
- [6] Yan M C, Chen S B, Shan L Z, *et al.* A critical review: pathogenic *Vibrio* in maricultural animals [J]. *Fishers Science*, 2009, **28**(8): 475—481 [闫茂仓, 陈少波, 单乐州, 等. 海水养殖动物致病弧菌的研究进展. 水产科学, 2009, **28**(8): 475—481]
- [7] Li Y C, Bao Y M, Lü J F. Biological control of vibriosis of the marine economic animals [J]. *Fishers Science*, 2004, **23**(2): 35—38 [李亚晨, 包永明, 吕建发, 等. 海洋水产动物弧菌病的生物防治. 水产科学, 2004, **23**(2): 35—38]
- [8] Zhang Q Y, Gui J F. A kind of strategic bio-resource not to be negelected-freshwater and marine viruses and their roles in the global ecosystem [J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2009, **24**(4): 414—420 [张奇亚, 桂建芳. 一类不可忽视的战略生物资源——淡水与海水中的病毒及其在生态系统中的作用. 中国科学院院刊, 2009, **24**(4): 414—420]
- [9] Dublanchet A, Fruciano E. A short history of phage therapy [J]. *Médecine Et Maladies Infectieuses*, 2008, **38**(8): 415
- [10] Qiu D Q, Zhou X J, Qiu M S. Study on anti-disease ability of *litopenaeus vannamei* and the biological control of *vibrio parahaemolyticus* bacteriophage under stresses of ammonia nitrogen [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(4): 455—461 [邱德全, 周鲜娇, 邱明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究. 水生生物学报, 2008, **32**(4): 455—461]
- [11] Wang S, Tong Y G. Recent advance in bacteriophage therapy [J]. *Microbiology*, 2009, **36**(7): 1019—1024 [王盛, 童贻刚. 噬菌体治疗研究进展. 微生物学通报, 2009, **36**(7): 1019—1024]
- [12] Young R, Wang I N, Roof W D. Phages will out: strategies of host cell lysis [J]. *Trends in Microbiology*, 2000, **8**(3): 120—128
- [13] Carlton R M, Noordman W H, Biswas B, *et al.* Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study and application [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2005, **43**(3): 301—312
- [14] Bruttin A, Brussow 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
- [15] Zhao C, Wang L. Bacteriophage therapy, old idea, new stage [J]. *Microbiology*, 2011, **38**(11): 1698—1704 [赵晨, 王榕. 噬菌体治疗——旧概念, 新阶段. 微生物学通报, 2011, **38**(11): 1698—1704]
- [16] Jang Y H, Wang L Z, Li F L, *et al.* Isolation, identification and biological properties of a lytic phage against *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Chinese Journal of Biological*, 2015, **28**(11): 1147—1152 [江艳华, 王联珠, 李凤铃, 等. 一株副溶血性弧菌裂解性噬菌体的分离, 鉴定及其生物学特性. 中国生物制品学杂志, 2015, **28**(11): 1147—1152]
- [17] Ding Y J, Peng Y, Lin H, *et al.* Isolation, identification and physiological property of lytic phage against *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microbiology*, 2011, **38**(11): 1639—1646 [丁云娟, 彭勇, 林洪, 等. 一株副溶血弧菌噬菌体的分离鉴定及生理特性. 微生物学通报, 2011, **38**(11): 1639—1646]
- [18] Peng Y, Wang J L, Ding Y J, *et al.* Isolation, identification and lysis property of two *Vibrio parahaemolyticus* phages [J]. *Fishers Science*, 2012, **31**(11): 645—650 [彭勇, 王静雪, 丁云娟, 等. 两株副溶血弧菌噬菌体的分离鉴定及裂解性能. 水产科学, 2012, **31**(11): 645—650]
- [19] Peng Y, Ding Y J, Lin H, *et al.* Isolation, identification and lysis properties analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* phage VPp1 [J]. *Marine Sciences*, 2013, **37**(1): 96—101 [彭勇, 丁云娟, 林洪, 等. 一株副溶血弧菌噬菌体VPp1的分离鉴定及裂解性能. 海洋科学, 2013, **37**(1): 96—101]
- [20] Lin H P, Qiu D Q, Tan L Y. Isolation and identification of a *Vibrio parahaemolyticus* phage [J]. *Fishers Science*, 2010, **29**(5): 291—294 [蔺红苹, 邱德全, 谭龙艳. 一株副

- 溶血弧菌噬菌体的分离与鉴定. 水产科学, 2010, **29**(5): 291—294]
- [21] Pringslaka O, Patarasinpaiboon N, Suwannasai N, *et al.* Isolation and characterisation of a novel *podoviridae*-phage infecting *Weissella cibaria* N 22 from Nham, a Thai fermented pork sausage [J]. *Food Microbiology*, 2011, **28**(3): 518—525
- [22] Yu M X, Si Z D. Phage Experimental Techniques [M]. Beijing: Science Press. 1991, 5—29 [余茂劼, 司稗东. 噬菌体实验技术. 北京: 科学出版社. 1991, 5—29]
- [23] Ramirez-orocho M, Serrano-pinto V, Ochoa-álvarez N, *et al.* Genome sequence analysis of the *Vibrio parahaemolyticus* lytic bacteriophage VPMS1 [J]. *Archives of Virology*, 2013, **158**(11): 2409—2413
- [24] Sambrook J, Russell D W, Huang P T, *et al.* Molecular Cloning A Laboratory Manual [M]. Beijing: Science Press. 2002, 147—243 [萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔, 黄培堂, 等. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社. 2002, 147—243]
- [25] Nasu H, Iida T, Sugahara T, *et al.* A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 strains [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, **38**(6): 2156—2161
- [26] Yamaichi Y, Iida T, Park K S, *et al.* Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species [J]. *Molecular Microbiology*, 1999, **31**(5): 1513—1521
- [27] Hawtrey S, Lovell L, Rondey K, *et al.* Isolation, characterization, and annotation: the search for novel bacteriophage genomes [J]. *The Journal of Experimental Secondary Science*, 2011, **1**: 6—14
- [28] Qiu D Q, Lin H P, Tan L Y. Study of the biochemical properties of the *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages [J]. *Microbiology*, 2007, **34**(4): 735—739 [邱德全, 蔺红苹, 谭龙艳. 一株副溶血弧菌噬菌体生理特性的研究. 微生物学通报, 2007, **34**(4): 735—739]

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TWO LYTIC PHAGES AGAINST *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

SONG Zeng-Fu^{1,2}, XU Hua-Dong¹, PENG Meng-Fan¹, SUN Bo-Chao¹, ZHAO Zheng¹, ZHANG Ye¹, REN Jian-Feng^{1,3} and ZHANG Qing-Hua^{1,3}

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Aquatic Animal Pathogens, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The aim of this study was to screen lytic phase and provide new alternatives for the prevention and control of *V. parahaemolyticus*. In this study, two lytic phages SX-2 and SX-F were isolated by double-layer plate method against the host bacteria *V. parahaemolyticus* Vp13. The morphological structures of these two phages were observed by transmission electron microscope (TEM). The types of nucleic acids were identified by the degradation characteristics of *DNase* I, *RNase* A, *Mung Bean Nuclease* and *Hind* III. The lysis spectrum, optimal multiplicity of infection and one step growth curve of SX-2 and SX-F were also analyzed. The results of TEM showed that the capsid protein of lytic phage of SX-2 was a complex symmetry with icosahedral symmetry head that had length of about 110 nm and width of about 50 nm and a spiral symmetry tail that had length of about 110 nm and width of about 10 nm. SX-F showed hexagon with length of about 56.86 nm and width of about 50.74 nm without a tail, which was icosahedral symmetry. Both SX-2 and SX-F were linear double stranded DNA bacteriophage. They were belonged to the family of *Myoviridae* and *Tectiviridae* based on the taxonomy standard of the ninth report of the International Committee Taxonomy of Viruses. Results of lytic experiment on 85 *Vibrio* strains showed that phage SX-2 could lysis 23 strains of *V. parahaemolyticus* and one strain of *Vibrio alginolyticus*, and phage SX-F could lysis 19 strains of *V. parahaemolyticus* and one strain of *V. alginolyticus*. The optimal multiplicity of infection of phage SX-2 and SX-F were 0.0001. One step growth curve showed that the incubation period of phage SX-F was about 10min, the lytic cycle was 70min, and the burst size was 116.2. The incubation period of the phage SX-2 was less than 10min, and the lytic cycle was about 70min, and the burst size was 209.3. These results indicated that both of them were lytic phages, which can be used as an alternative to control and prevention of the *V. parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; Lytic phage; Morphological structure; Biological characteristics