

一株副溶血弧菌噬菌体 VPp1 的分离鉴定及裂解性能

彭 勇, 丁云娟, 林 洪, 王静雪

(中国海洋大学 食品科学与工程学院 食品安全实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为探究副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的生物防治方法, 从水产品市场处污水中分离出一株副溶血弧菌噬菌体 VPp1。并借助噬菌斑形态、电镜、酶切等技术对其进行了分类鉴定, 同时测定了其裂解谱、最佳感染复数、一步生长曲线以研究其裂解性能。分类鉴定结果表明, 其核酸是线型双链 DNA, 大小在 15 kb 左右。具有一个正二十面体的头部, 头部直径大约为 44 nm, 无尾, 属盖噬菌体科(*Tectiviridae*); 裂解性能研究结果表明, 其在双层平板上培养 12 h 可形成中心清亮的噬菌斑, 周围有大而明显的晕环。最佳感染复数为 0.0001, 潜伏期为 10 min, 裂解量为 90.3, 是符合条件的潜伏期短裂解量大的理想噬菌体, 可用作进一步的应用。

关键词: 噬菌体; 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*); 鉴定; 裂解性能

中图分类号: Q939.48 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)01-0096-06

弧菌病是由弧菌属(*Vibriosis*)细菌引起的一类细菌性疾病, 已成为海水养殖业的主要病症之一, 该病发病迅速、流行范围广、致病性强, 给国家和企业造成了巨大的经济损失。目前, 国内外已经报道的弧菌病病原主要有副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和河弧菌(*Vibrio fluvialis*)等^[1]。副溶血弧菌的主要感染对象是对虾、海水鱼类、文蛤、牡蛎等, 能引起海洋动物体表发炎、充血等症状, 感染蟹类、贝类会引起大量死亡^[2]。人体食用被感染的食品会引起腹痛、呕吐、腹泻、肠痉挛、恶心和发烧等典型胃肠炎反应^[3]。

目前, 弧菌病的防治方法主要是抗菌药物防治, 同时还有免疫防治、生物防治等^[1]。抗菌药物的大量使用不仅污染了养殖环境, 还导致了致病菌耐药性不断增强及养殖动物抗病能力的下降。免疫防治的研究刚刚起步, 疫苗的研制大多数为福尔马林灭活的全细胞疫苗, 减毒疫苗还缺乏安全性保障, 商品化生产还未开始。生物防治可大量减少抗菌素及杀虫剂的使用量, 保护生态环境, 降低病原微生物抗药性的产生。作为一种安全、绿色的治疗方法, 已经越来越受到人们的关注, 具有广泛的推广和应用前景。

噬菌体(Bacteriophage)是感染细菌和放线菌的

病毒, 是生物防治的主要手段^[4]。噬菌体分为烈性噬菌体和温和噬菌体两类, 烈性噬菌体可以通过酶的作用破坏细胞壁, 专一性裂解宿主菌。本研究从水产品交易市场的污水中分离出一株副溶血弧菌噬菌体, 在双层平板上培养 12 h 出现了清晰的噬菌斑, 属烈性噬菌体。并对其进行了初步的分类鉴定及裂解性能的研究, 为其代替抗生素应用于副溶血弧菌引起的弧菌病的治疗奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

分离噬菌体使用的菌种为 *Vibrio parahaemolyticus* 17802 (以下简称 VP 17802), 最初由 Fujino^[5] 等于 1953 年从日本一个食物中毒患者体内初次分离得到。购自美国典型微生物菌种保藏中心 (American type culture collection, ATCC)。

测定噬菌体裂解谱使用的 *V. parahaemolyticus*

收稿日期: 2011-12-02; 修回日期: 2012-03-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31071540); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(nycytx-50); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2011CQ024)

作者简介: 彭勇(1987-), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事食品质量与安全方面研究, 电话: 0532-82031550, E-mail: pengyongpy520@163.com; 王静雪, 通信作者, 电话: 0532-82032389, E-mail: snow@ouc.edu.cn

菌株 VP VIB304、VP VIB461、VP VIB800 来自中国海洋大学应用微生物实验室; VP 17802(sj)、F3-3 来自山东出入境检验检疫技术中心; qdfsVp001 由中国海洋大学食品安全实验室分离自青岛周边海水, 并经过生理生化特性测定及 16SrDNA 序列测定鉴定为一株新的副溶血弧菌。

1.1.2 培养基

2216E 培养基, 购自青岛高科园海博生物技术有限公司。

1.1.3 SM 缓冲液

5.8 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 50 mL 的 1 mol/L pH 7.5 Tris-HCl, 加蒸馏水至 1 000 mL, 灭菌备用。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体的分离

从青岛南山水产品市场处采集商贩暂养海产品的海水及污水样品 4 份并编号, 取青岛第一海水浴场岸边海水一份。取上述样品 30 mL 加入到 50 mL 的离心管中经 5 000 r/min, 10 min 离心, 取上清液 5 mL 加入 5 mL 2 倍浓度 2216E 液体培养基中, 同时加入 100 μL 对数期的 VP 17802(OD₆₀₀ = 0.837), 37°C 过夜培养。次日, 经 5 000 r/min, 10 min 离心, 取上清液过 0.22 μm 的微孔滤膜, 得到噬菌体原液, 4°C 冰箱保存。

采用双层平板法, 用灭菌的 SM 缓冲液对噬菌体原液进行适当稀释, 将 100 μL 对数期的 VP 17802(OD₆₀₀ = 0.837)与 100 μL 的噬菌体稀释液分别加入 5 mL 的 2216E 半固体培养基中, 混匀, 倒入事先制好的 2216E 固体琼脂上, 制成双层平板。待凝固后倒置, 并于 37 °C 恒温箱中培养。

1.2.2 噬菌体的纯化

参考文献方法进行噬菌体纯化^[6], 具体步骤为: 用接种针从上述出现噬菌斑单斑的双层平板上挑取一个单斑到 1 mL 的 SM 缓冲液中, 混匀, 4°C 冰箱过夜。次日, 用灭菌的 SM 缓冲液将上述噬菌体液进行适当稀释, 取 100 μL 的噬菌体稀释液与 100 μL 对数期的 VP 17802(OD₆₀₀ = 0.837)混合, 37 °C 恒温放置 30 min, 再与 5 mL 半固体培养基混匀倒入事先制好的固体琼脂平板上制成双层平板, 待凝固后倒置, 并于 37 °C 恒温箱中培养。重复双层平板纯化操作 5 次得到生物学纯的噬菌体株系。

1.2.3 噬菌斑的形态观察

将各株噬菌体分别用 SM 缓冲液进行适当稀释,

取合适稀释度噬菌体液用双层平板法做单斑培养, 观察各株噬菌体的噬菌斑特征。

1.2.4 噬菌体增殖液的制备

本研究采用固体增殖法, 选取合适稀释度的长有噬菌斑的双层琼脂平板, 加入 10 mL SM 缓冲液, 4°C 冰箱放置过夜。次日, 8 000 r/min, 15 min 离心, 取上清液过 0.22 μm 的微孔滤膜, 得到噬菌体增殖液, 4°C 冰箱保存。

1.2.5 噬菌体核酸的提取

取效价达到 10⁹ pfu/mL 以上的噬菌体增殖液 1 mL 经 12 000 r/min 离心 59 min (室温), 吸去上清, 收集噬菌体颗粒, 然后采用 UNIP-10 柱式细菌基因组提取试剂盒 (上海生工) 提取噬菌体的核酸。所提取的噬菌体核酸溶液置于-20 °C 保存。琼脂糖凝胶电泳鉴定提取结果。

1.2.6 噬菌体核酸类型的鉴定

取上述噬菌体的核酸溶液, 用 DNaseI、RNaseA 及 Mung Bean Nuclease 进行酶切实验, 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切结果。

1.2.7 噬菌体的电镜观察

采用磷钨酸负染法^[7-8], 方法如下: 取 20 μL 效价达 10¹⁰ pfu/mL 的噬菌体液, 滴在铜网上, 自然沉淀 2~3 min, 用滤纸从侧面吸去多余液体, 在铜网上加一滴 2% 的磷钨酸, 染色 10 min, 用滤纸从侧面吸取染液, 干燥后进行电镜观察并拍照。

1.2.8 噬菌体裂解谱的测定

采用双层平板法, 取 100 μL 的噬菌体稀释液与 100 μL 对数期的副溶血弧菌(OD₆₀₀ = 0.837)混合, 37 °C 恒温放置 30 min, 再与 5 mL 半固体培养基混匀倒入事先制好的固体琼脂平板上制成双层平板, 待凝固后倒置, 并于 37 °C 恒温箱中培养。根据噬菌体的效价, 选择形成 30~300 个噬菌斑的稀释度来分析 VPp1 对 VP 17802(sj)、F3-3、VP VIB304、VP VIB461、VP VIB800、qdfsVp001 菌株的裂解情况。

1.2.9 噬菌体最佳感染复数(MOI 值)的测定

按照感染复数分别为 10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01、0.000 001 的比例, 分别将 100 μL 噬菌体与 100 μL VP 17802 (3×10⁷ CFU/mL) 加入 10 mL 2216E 液体培养基中, 37 °C 振荡培养 10 h, 4000 r/min 离心 15 min 去除菌体, 去掉沉淀, 上清液用 0.22 μm 的膜过滤, 用双层平板法测定噬菌体的效价, 效价最高的感染复数为最佳感染复数。

1.2.10 噬菌体一步生长曲线的测定

一步生长曲线的测定参照杜崇涛^[9]的方法。分别将 1 mL 噬菌体和 1 mL 对数生长期的 VP 17802 ($OD_{600} = 0.837$)按照感染复数为 10 的比例加入到 8 mL 2216E 液体培养基中, 37 °C 孵育 5 min, 12 000 r/min 离心 30 s, 弃上清, 用 2216E 液体培养基洗涤两次。加入等体积 37 °C 预热 2216E 液体培养基并充分混匀, 迅速置于 37 °C 振荡培养, 同时开始计时, 前 30 min 内每 5 min 取一次样, 以后每 10 min 取一次样, 测定噬菌体的效价。以感染时间为横坐标, 噬菌体的效价为纵坐标, 绘制一步生长曲线。

2 结果

2.1 噬菌体的分离、纯化及噬菌斑的形态观察

从青岛市南山水产市场的污水中分离出了一株噬菌体 VPp1, 通过双层平板 37°C 培养 12 h 发现, VP 17802 被侵染, 出现了大量的噬菌斑 (图 1)。纯化得到的噬菌斑呈圆形, 中心清亮, 边缘有大而明显的晕环, 纯化后的噬菌体经固体增殖后效价可达到 10^{10} pfu/mL 以上。

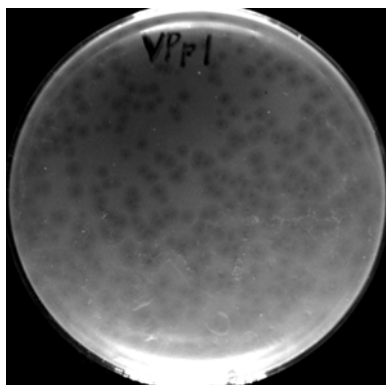


图 1 副溶血弧菌噬菌体噬菌斑的形态
Fig. 1 The bacteriophage plaque of phage VPp1

2.2 噬菌体核酸的提取

琼脂糖凝胶电泳图(图 2)显示, 提取的噬菌体核酸纯度较好, 浓度较高, 条带完整。通过 Quantity One 软件分析得噬菌体 VPp1 的核酸分子量为 15738.77 bp。

2.3 噬菌体核酸类型的鉴定

琼脂糖凝胶电泳图(图 3)显示, 噬菌体能被 DNaseI 降解, 而不能被 RNaseA 降解, 说明各噬菌体的核酸是 DNA, 而不是 RNA。电泳只有一条条带,

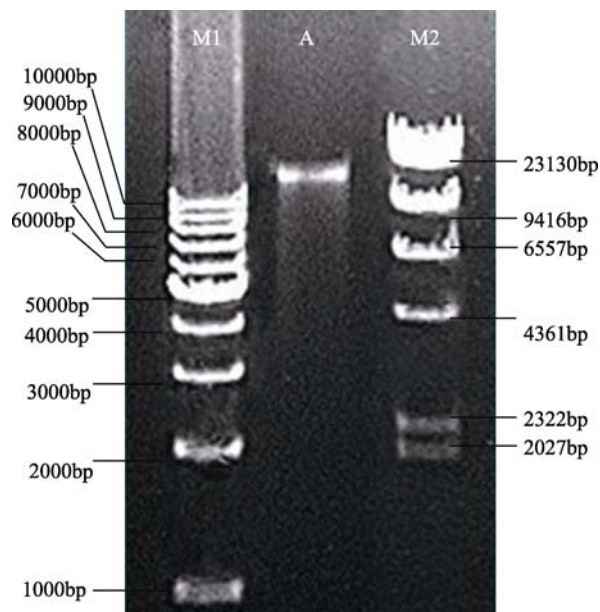


图 2 副溶血弧菌噬菌体的核酸
Fig. 2 The nucleic acid of phage VPp1
M1.1kb DNA 分子量标准; A. 噬菌体 VPp1 核酸; M2. λ -Hind III digest DNA 分子量标准
M1.1kb DNA ladder Marker; A. Phages nucleic acid; M2. λ -Hind III digest DNA Marker

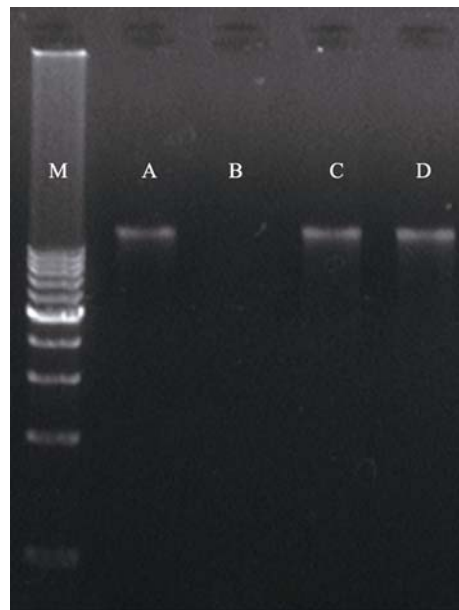


图 3 副溶血弧菌噬菌体核酸类型的判断
Fig. 3 Determination of the nucleic acid type of bacteriophage
M. 1kb DNA 分子量标准; A. 噬菌体的核酸; B. 噬菌体核酸的 DNaseI 酶切; C. 噬菌体核酸的 RNaseA 酶切; D. 噬菌体核酸的 Mung Bean Nuclease 酶切
M.1kb DNA ladder Marker; A. Phages nucleic acid; B. Phages nucleic acid mixed with DNaseI; C. Phages nucleic acid mixed with RNaseA; D. Phages nucleic acid mixed with Mung Bean Nuclease

说明噬菌体核酸是线型的。不能被 Mung Bean Nuclease 降解,说明噬菌体核酸是双链的而不是单链的。综合 3 种酶的酶切结果表明,本实验分离的株噬菌体的核酸是线型双链 DNA。

2.4 噬菌体的电镜观察

噬菌体在透射电子显微镜下的形态图(图 4)显示,噬菌体 VPp1 有一个呈正六边形的头部,推测是正廿面体结构,头部直径大约为 44 nm。无尾。根据 ICTV 第八次报告的最新病毒分类系统的标准^[10],该噬菌体属于盖噬菌体科(Tectivirus)。

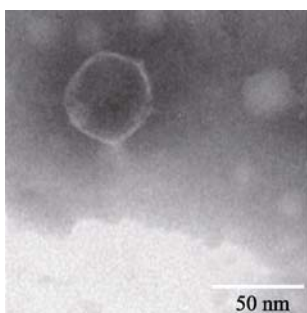


图 4 副溶血弧菌噬菌体 VPp1 的电镜照片 (×100000)
Fig. 4 Electron micrograph of phage VPp1

表 1 噬菌体 VPp1 最佳感染复数的测定

Tab. 1 Determination of bacteriophage VPp1 MOI

感染复数	噬菌体数(个)	细菌数(个)	噬菌体效价(pfu/mL)
10	$3.0 \pm 0.01 \times 10^8$	$3.0 \pm 0.03 \times 10^7$	$2.77 \pm 0.02 \times 10^9$
1	$3.0 \pm 0.02 \times 10^7$	$3.0 \pm 0.02 \times 10^7$	$3.78 \pm 0.03 \times 10^9$
0.1	$3.0 \pm 0.01 \times 10^6$	$3.0 \pm 0.01 \times 10^7$	$6.83 \pm 0.03 \times 10^9$
0.01	$3.0 \pm 0.02 \times 10^5$	$3.0 \pm 0.03 \times 10^7$	$7.51 \pm 0.01 \times 10^9$
0.001	$3.0 \pm 0.02 \times 10^4$	$3.0 \pm 0.03 \times 10^7$	$9.23 \pm 0.01 \times 10^9$
0.0001	$3.0 \pm 0.01 \times 10^3$	$3.0 \pm 0.02 \times 10^7$	$2.62 \pm 0.03 \times 10^{10}$
0.00001	$3.0 \pm 0.02 \times 10^2$	$3.0 \pm 0.01 \times 10^7$	$2.12 \pm 0.03 \times 10^{10}$
0.000001	$3.0 \pm 0.01 \times 10$	$3.0 \pm 0.03 \times 10^7$	$7.35 \pm 0.01 \times 10^9$

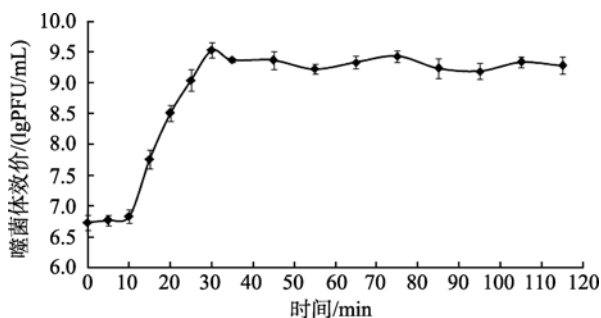


图 5 噬菌体 VPp1 的一步生长曲线
Fig. 5 One-step growth curve of phage VPp1

2.5 噬菌体裂解谱的测定

双层平板 37 培养 12 h 结果显示噬菌体 VPp1 除了能裂解 VP 17802 之外,还能裂解 VP 17802(sj)和 VP VIB304,不能 VP VIB304、VP VIB461、VP VIB800、VP 17802(sj)、F3-3、qdfsVp001。

2.6 噬菌体最佳感染复数(MOI 值)的测定

噬菌体最佳感染复数的测定结果分别见表 1。

从表 1 中数据可看出,当感染复数从 10 一直降到 0.0001 时,噬菌体的效价一直在升高,当感染复数再降低时,噬菌体效价开始降低,即当感染复数为 0.0001 时,噬菌体效价达到最高值 $2.62 \pm 0.03 \times 10^{10}$,所以噬菌体 VPp1 的最佳感染复数为 0.0001。

2.7 噬菌体一步生长曲线的测定

噬菌体 VPp1 的一步生长曲线测定结果分别见图 5。

据图 5,可以明显看出噬菌体 VPp1 感染宿主菌后 10 min 内,噬菌体的量没有增加,即潜伏期约 10 min;噬菌体感染宿主菌后 10~30 min,噬菌体的量急速增加,即噬菌体 VPp1 的裂解期约 20 min;在

随后的 90 min 里,噬菌体的量变化不大,即噬菌体进入到稳定期。根据裂解量计算公式:裂解量=裂解末期噬菌体效价/感染初期宿主菌浓度= $2.71 \times 10^9 / 3 \times 10^7 = 90.3$ 。

3 讨论

本研究曾于 4、5 月份进行过多次噬菌体的分离,均一无所获。6 月初的一次分离成功地分离出大量噬菌体,这说明气温对噬菌体分离的成功与否有很大影响,原因可能是气温低时水体中宿主菌的含量极少,致使噬菌体含量极少,所以很难分离出来。葡红

莘^[11]等的研究也提到过类似的情况。另外,杨吉霞^[12]在研究中提到从赤潮海水中分离噬菌体会更容易,原因是赤潮海水藻类爆发性增殖,而藻类与细菌、病毒之间存在着相生相克、错综复杂的互相作用,藻类增殖后,细菌、病毒的数量也会随之改变。这也许不失为一个好办法。

目前国际上噬菌体的分类标准尚不完善,2005年国际病毒分类委员会(ICTV)第八次报告将噬菌体进行了比较系统的分类与命名。其依据核酸类型、形态结构、基本特性及宿主菌类型等特征将噬菌体划分为群、目、科、属、种5个阶级,种下根据实际需要可设立亚种^[13]。本研究分离出的噬菌体核酸是线型双链DNA,根据第八次报告的分类方法,应首先划分为群I。噬菌体无尾,根据其形态特征可划分为盖病毒科盖噬菌体属。

噬菌体裂解谱测定结果显示,本研究提取的副溶血弧菌噬菌体的裂解谱范围并不广泛,但其能形成透亮的噬菌斑,说明其均有很强的裂解能力。另外,多方面的研究已表明^[14],虽然噬菌体对宿主菌有高度特异性,但通过人工改造,可以扩展噬菌体的裂解范围。本实验提取的噬菌体有待于用各种方法扩展其宿主谱,为其在致病菌检测方面的应用奠定基础。

感染复数,又称感染倍数,是为研究病毒感染与产出之间量效关系而提出的一个重要生物学指标^[15]。噬菌体的感染复数是指初始感染时,加入噬菌体的数量与加入宿主菌数量的比值。不同的噬菌体的感染复数是不同的,存在一个最佳用量和最大产出问题,即最佳感染复数。最佳感染复数与噬菌体的种类、结构以及宿主菌有关,最佳感染复数反映了噬菌体的裂解能力。本研究分离的噬菌体VPp1的最佳感染复数分别为0.0001,邱德全^[16]等分离的副溶血弧菌噬菌体最佳感染复数在0.1~10,Onanong^[17]等测得食窦魏斯氏菌噬菌体感染宿主菌的最佳感染复数在0.01,与之相比较,可知噬菌体VPp1具有较强的裂解能力。

一步生长曲线可反映噬菌体3个重要的特征参数:潜伏期、裂解期、裂解量。可为噬菌体的治疗、检测等应用研究筛选出潜伏期短裂解量大的噬菌体。本研究分离的噬菌体VPp1的潜伏期较短,裂解量达90.3,表明其裂解能力是非常强的,可进一步应用于噬菌体治疗、检测等方面。

参考文献:

- [1] 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[J].水产科学,2009,28(8):475-481.
- [2] 吴后波,潘金培.弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J].中国水产科学,2001,8(1):89-93.
- [3] Yicheng S, Chengchu L. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety[J]. Food Microbiology, 2007, 24: 549-558.
- [4] 李亚晨,包永明,吕建发,等.海洋水产动物弧菌病的生物防治[J].水产科学,2004,23(2):35-38.
- [5] Fujino T, Miwatani T, Yasuda J. Taxonomic studies on the bacterial strains isolated from cases of "shirasu" food-poisoning (*Pasteurella parahaemolytica*) and related microorganisms[J]. Biken Journal, 1965, 8(2): 63-71.
- [6] 余茂劲,司穰东.噬菌体实验技术[M].北京:科学出版社,1991:10.
- [7] 宁淑香,聂丽平,陆敏.VP₁₀——一株海洋噬菌体的分离及特性研究[J].水产科学,2003,22(2):14-16.
- [8] 宁淑香,聂丽平,陆敏.河流弧菌-II (*Vibrio fluvialis*-II) 噬菌体——VP₈的分离与研究[J].微生物学杂志,2000,20(1):20-31.
- [9] 杜崇涛.大肠杆菌O157噬菌体的分离鉴定及其初步应用[D].长春:吉林大学,2008.
- [10] 洪健,周雪平. ICTV 第八次报告的最新病毒分类系统[J].中国病毒学,2006,21(1):84-96.
- [11] 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[J].水产科学,2010,29(5):291-294.
- [12] 杨吉霞.霍乱弧菌SWBC-a为靶细菌筛选宽裂解弧菌噬菌体[J].水产科学,2009,28(6):337-340.
- [13] 冯书章,刘军,孙洋.细菌的病毒——噬菌体最新分类与命名[J].中国兽医学报,2007,27(4):604-608.
- [14] Graschopf A, Blasi U. Functional assembly of the lambda S2 holin requires periplasmic localization of its N2 terminus[J]. Arch Microbiol, 1999, 172: 31.
- [15] 代保英.大肠杆菌K88噬菌体的分离、分类初步鉴定和生物学特性的测定[D].扬州:扬州大学,2009.
- [16] 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[J].微生物学通报,2007,34(4):735-739.
- [17] Onanong P, Nuttaporn P, Nuttika S, et al. Isolation and characterization of a novel *Podoviridae*-phage infecting *Weissella cibaria* N22 from Nham, a Thai fermented pork sausage[J]. Food Microbiology, 2011(28): 518-525.

Isolation, identification and lysis properties analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* phage VPp1

PENG Yong, DING Yun-juan, LIN Hong, WANG Jing-xue

(Food Safety Laboratory, College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, 266003, China)

Received: Dec.,2, 2011

Key words: phage; *Vibrio parahaemolyticus*; identification; lysis properties

Abstract: In order to develop an effective bio-controlling method against *Vibrio parahaemolyticus*, a virulent phage VPp1 was isolated from aquatic sewage water and identified by plaque shapes, restriction, electronic microscope and lysis properties analyses. The results revealed that VPp1 contains a linear double stranded DNA with 15kb in size and it has an icosahedral head with 44 nm in diameter and does not have a tail, suggesting that VPp1 belongs to the *Tectivirus* family. VPp1 forms plaques with transparent center and large halo after culture in double-layer agar plate for 12 hours and its optimum MOI value was 0.0001. A one-step growth experiment showed that the latent period and burst size were estimated at 10 min and 90.3 phage particles/infected cell, respectively. VPp1 could be widely used because of its short latent period and large burst size.

(本文编辑: 谭雪静)