



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160398

抑制铜绿假单胞菌生长的噬菌体 K4 基因的筛选

周 维, 孙 利, 尤甲甲, 杨洪江

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 噬菌体基因组携带多种影响宿主菌生长的基因,是筛选新型抗菌素的可能靶位.本研究分别克隆铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)噬菌体 K4 携带的全部 75 个基因,在阿拉伯糖启动子控制下进行表达.实验结果表明,6 个噬菌体基因的表达产物能够显著抑制宿主菌的生长.生物信息学分析显示,基因 *gp72* 编码的末端酶大亚基与噬菌体基因组包装过程相关,基因 *gp49* 编码假定的 5'-3'核酸外切酶,其余 4 个基因编码产物未发现特定的蛋白结构域.利用脉冲场凝胶电泳分析宿主菌染色体 DNA 的完整性,在阿拉伯糖诱导 5 h 时,蛋白 Gp17、Gp41、Gp72、Gp29 和 Gp49 能够导致宿主菌染色体 DNA 的显著降解,这是抑制宿主菌生长的可能原因.蛋白 Gp67 对宿主菌染色体 DNA 没有影响,其抑制细胞生长的机制不同于其他蛋白.实验还发现,筛选基因的产物还能影响噬菌体的感染效率.本研究发现的抑制细菌生长的基因,能够为筛选新型抗菌素提供新的靶位.

关键词: 噬菌体 K4 基因; 抑制生长; 筛选

中图分类号: Q71 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2018)04-0007-07

Screening of Phage Genes Inhibiting the Growth of *Pseudomonas aeruginosa*

ZHOU Wei, SUN Li, YOU Jiajia, YANG Hongjiang

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Phage genes might inhibit the growth of host bacteria and are likely the targets for novel antibiotics screening. In this research, all 75 genes of *Pseudomonas aeruginosa* phage K4 were cloned and expressed under the control of arabinose promoter, respectively. Six of them might inhibit the growth of the host bacteria. Bioinformatic analysis showed that gene *gp72* encodes a terminase large subunit relating to phage genome packaging process; gene *gp49* encodes a hypothetical 5'-3' exonuclease; and the remaining four genes encode hypothetical proteins with unknown functional domains. Pulsed field gel electrophoresis was used in analyzing the chromosome DNA extracted from the host cells carrying the identified genes. After arabinose induction for 5 h, the strains expressing protein Gp17, Gp41, Gp72, Gp29, and Gp49, respectively, had their genome DNA degraded significantly, and the possible cause is that the growth of the host had been inhibited. No genome DNA degradation was observed in protein Gp67, indicating a different inhibition mechanism might be employed by the gene product. Our data also show that the products of the isolated genes might affect the infection efficiency of the phage. In conclusion, the genes identified in our work inhibiting the growth of the bacteria may serve as new targets for screening novel antimicrobial agents.

Key words: phage K4 gene; growth inhibition; screening

抗生素的广泛使用导致细菌耐药性菌株不断出现.噬菌体作为一种新型杀菌剂,越来越引起人们的

关注,不断有研究报道利用噬菌体治疗各种病原菌导致的疾病^[1-4].噬菌体通过编码裂解酶等因子,攻击

收稿日期: 2016-12-06; 修回日期: 2017-04-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31370205, 30970114)

作者简介: 周 维(1990—),女,湖南人,硕士研究生;通信作者: 杨洪江,教授, hongjiangyang@tust.edu.cn

宿主菌的细胞外部结构,破坏宿主菌的胞壁质,裂解宿主菌,导致宿主菌死亡^[5]。同时,噬菌体基因组携带多种基因,其编码蛋白能够控制细菌的多种代谢途径,达到抑制宿主菌生长或杀死宿主菌的目的。Datta等^[6]研究了 λ 噬菌体非致死基因对大肠杆菌(*E. coli*)生长的抑制作用,发现 λ 噬菌体 N-cIts 突变株中存在3种毒性因子对其宿主大肠杆菌生长有抑制作用。首先,其编码的O蛋白和P蛋白能够使溶源化细菌在42℃时被杀死。其次, λ 噬菌体基因组中 *kil* 编码的Kil蛋白可能破坏细胞膜的外部结构,并与其他抑制组分共同作用,从而抑制宿主菌的生长。最后, λ 噬菌体的 *cII* 基因产物能够抑制宿主菌染色体DNA的复制,从而抑制宿主菌的生长^[7]。枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)噬菌体 SPO1 基因组中,基因 *gp44*、*gp50* 和 *gp51* 是中期转录表达的基因,在未感染的枯草芽胞杆菌或大肠杆菌中表达时,其基因产物能够抑制细菌RNA的合成,从而导致宿主菌细胞的死亡^[8]。

噬菌体在长期进化过程中,其基因组具有极大的遗传多样性,能够编码多种特定蛋白质,具有阻止宿主菌细胞重要代谢过程的功能。一些噬菌体多肽识别宿主菌DNA复制和翻译机制的重要组成部分,从而阻止相应代谢途径的进行,导致细胞生长的停滞或死亡。Liu等^[9]首先筛选具有抑制宿主菌生长的噬菌体基因,通过高通量技术在化合物文库中筛选潜在的抗菌素分子,以期获得具有杀菌活性的新型抗菌素。由于噬菌体是地球上种类与数量最多的生物,具有丰富的遗传多样性,该种筛选抗菌素的策略预计能够成为获得新型抗菌素的重要途径。

本研究分别克隆铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)噬菌体 K4 携带的全部75个基因,在阿

拉伯糖启动子控制下进行表达,观察其表达产物是否能够抑制宿主菌的生长。同时,利用脉冲场凝胶电泳分析宿主菌染色体DNA的完整性,分析噬菌体基因表达产物抑制宿主菌生长的可能机制。本研究结果将有助于发现筛选新型抗菌素的新靶位。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α (*hsdR recA lacZY Φ 80 lacZ Δ M15*)、铜绿假单胞菌^[10](*Pseudomonas aeruginosa*)PAK(实验室菌株血清O6型)、质粒 pRKaraRed^[11](携带基因 *araC* 及 P_{BAD} 启动子)均由本实验室保存。

1.1.2 培养基、抗生素与酶

LB培养基(g/L):蛋白胨10,酵母粉5,氯化钠10,pH7.0~7.2。用于细菌常规培养。

抗生素:氨苄青霉素100 μ g/mL、四环素6 μ g/mL。

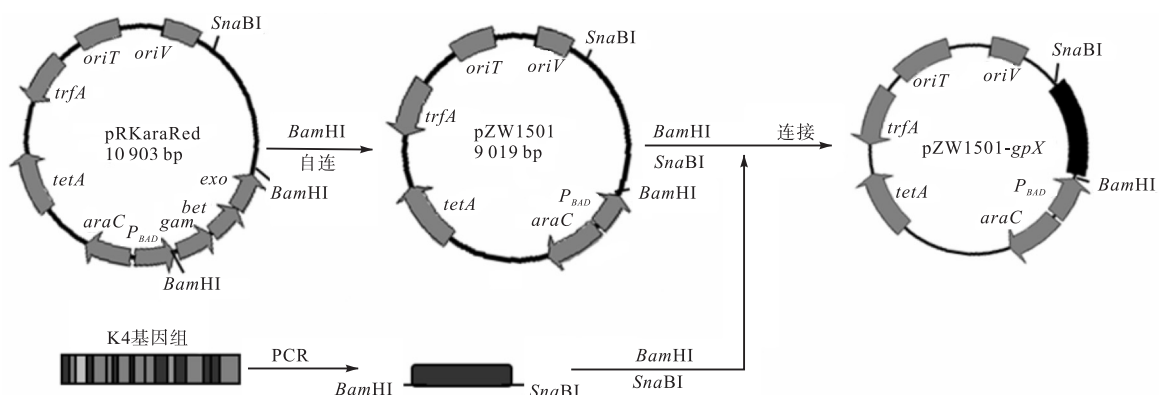
限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sna*B I, TaKaRa 公司;阿拉伯糖,北京博特普科学技术有限公司。

1.1.3 仪器

PCR基因扩增仪、脉冲场凝胶电泳仪,美国Bio-Rad公司;全自动凝胶成像仪,北京原平皓生物技术有限公司。

1.2 构建表达载体质粒及噬菌体 K4 基因克隆

实验所用的质粒为 pRKaraRed,利用 *Bam*H I 将3个 lambda-Red 系统基因(*exo*、*bet*、*gam*)切除,自连得到质粒 pZW1501,如图1所示^[11]。



X为噬菌体K4的75个基因中的一个基因; P_{BAD} 为阿拉伯糖启动子;*araC*为抑制因子,控制启动子 P_{BAD} 的表达;*tetA*为四环素抗性标记基因

图1 质粒 pZW1501 构建及噬菌体 K4 基因克隆示意图

Fig. 1 Construction of plasmid pZW1501 for cloning phage genes

根据已测定的噬菌体 K4 基因组序列进行分析,

发现 K4 基因组有 75 个基因。利用 Primer Premier

5.0 软件进行引物设计,以噬菌体 K4 基因组 DNA 为模板进行扩增. PCR 产物用限制性内切酶 *Sna*B I 和 *Bam*H I 酶切,与经相同酶切的载体质粒连接,连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞,在含四环素 6 μ g/mL 的 LB 培养基上筛选转化子,提取质粒并进行酶切验证(图 1).

1.3 筛选影响宿主菌生长的基因

将重组质粒电击转化进入铜绿假单胞菌 PAK 菌株中,转化子在含有 6 μ g/mL 四环素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养. 将过夜培养的菌液转接至含有 6 μ g/mL 四环素的新鲜 LB 培养基中,实验组加 2% 的阿拉伯糖,对照组不加阿拉伯糖. 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 5 h,测定 600 nm 下的吸光度. 实验重复 3 次,按照式(1)计算相对菌体浓度.

$$\text{相对菌体浓度} = \frac{2\% \text{阿拉伯糖培养基的 } A_{600}}{\text{LB培养基的 } A_{600}} \quad (1)$$

1.4 涂板计数法确认噬菌体基因的抑制作用

按上述方法培养携带重组质粒的 PAK 菌株,转接至新鲜的含有 6 μ g/mL 四环素的 LB 培养基中继续培养至 $A_{600} = 0.6$. 重新转接至含有四环素终浓度为 6 μ g/mL 的 LB 培养基中,实验组加入 2% 阿拉伯糖,对照组不加阿拉伯糖. 继续培养,分别在 0、1、2、3、4、5、6、7、8 h 取样,用 0.9% 的生理盐水进行稀释,然后涂布平板,实验重复 3 次.

1.5 生物信息学分析

利用 DNA Master 软件和 SMART 蛋白结构域预测软件,在 NCBI 核酸数据库进行比对分析,预测噬菌体 K4 基因编码蛋白的功能.

1.6 脉冲场凝胶电泳分析宿主菌染色体 DNA

37 $^{\circ}$ C 过夜培养携带重组质粒的菌株,转接至新鲜的 LB 培养基中,继续培养至 $A_{600} = 0.6$,重新转接至新鲜含有 6 μ g/mL 四环素的 LB 培养基中,实验组加入 2% 的阿拉伯糖,对照组不加阿拉伯糖,37 $^{\circ}$ C 振

荡培养 5 h. 收集 2 mL 菌液,5 000 r/min 离心 5 min 弃上清液,细胞加入含 0.5% SDS 裂解液,澄清后加入 50 μ g/mL 蛋白酶 K,60 $^{\circ}$ C 过夜,过夜的混合物与指示剂溴酚蓝混合. 将梳子放入胶槽,倒入熔化的低熔点琼脂糖,制成胶块. 待胶块凝固后用移液枪将样品点入胶块中. 以 0.5 \times TBE 为电泳缓冲液,在 14 $^{\circ}$ C、120 $^{\circ}$ 、6 V/cm 线性条件下电泳.

1.7 噬菌体敏感性检测

敏感性实验采用双层点滴法进行^[12],将携带噬菌体基因的菌株作为指示菌,实验组培养基中含有 2% 阿拉伯糖,对照组培养基中不含阿拉伯糖. 将 K4 裂解液稀释 100 倍,取 1 μ L 点板,干燥后,倒置培养,每小时观察 1 次.

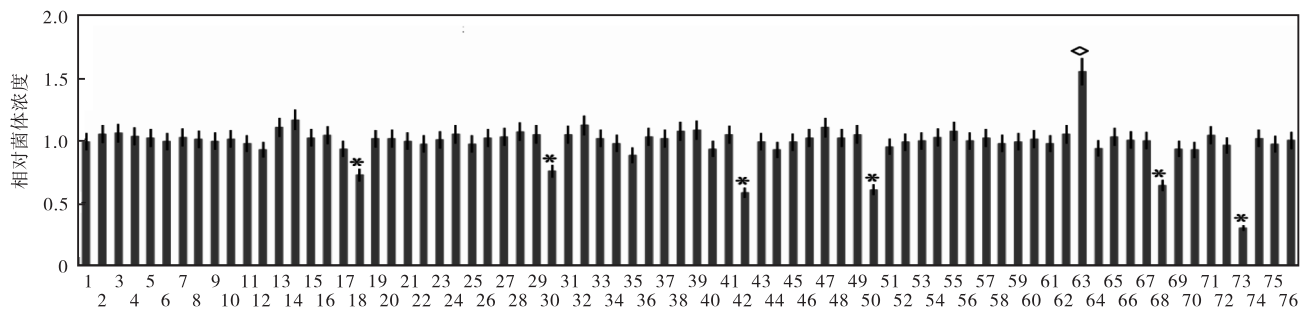
2 结果与分析

2.1 噬菌体 K4 基因组特征

铜绿假单胞菌噬菌体 K4 基因组较小,全长为 50 284 bp,包含 75 个基因. 通过生物信息学分析,发现噬菌体 K4 编码的大多数蛋白为功能未知的假定蛋白,只有少数基因产物具有已知功能. 其中,基因 *gp49* 编码假定的 5'-3'核酸外切酶,基因 *gp72* 编码末端酶大亚基,基因 *gp73* 编码门蛋白,基因 *gp74* 编码尾丝蛋白.

2.2 噬菌体 K4 基因对宿主菌生长的影响

噬菌体基因组可能携带某些特定基因,其编码产物通过不同作用机制,控制宿主细胞的特定代谢途径,进而抑制细菌生长或杀死细菌. 为了分析噬菌体 K4 基因是否具有类似功能,扩增并克隆了 75 个噬菌体基因,按照筛选影响宿主菌生长的基因的方法,分析基因的功能,结果如图 2 所示.



*表示宿主菌生长受到抑制, \diamond 表示宿主菌生长速率有所提高. 1 为菌株 PAK/pZW1501, 2—76 分别为菌株 PAK/pZW1501-*gpX*

图 2 噬菌体 K4 基因对宿主菌 PAK 生长的影响

Fig. 2 Effects of phage K4 genes on the growth of the host strain PAK

实验结果发现,噬菌体 K4 的 75 个基因中,有 6 个基因在阿拉伯糖的诱导下,能够编码某种蛋白抑制其宿主菌铜绿假单胞菌 PAK 菌株的生长,它们分别是 *gp17*、*gp29*、*gp41*、*gp49*、*gp67*、*gp72*.

2.3 携带抑制基因的宿主菌生长时间曲线

为验证噬菌体 K4 基因功能,进行平板计数实验.将菌株 PAK/pZW1501 分别在含有 2% 阿拉伯糖和不含阿拉伯糖的 LB 培养基上培养,实验结果如图 3 所示,阿拉伯糖不影响菌株 PAK/pZW1501 的生长.携带抑制基因的菌株生长时间曲线如图 4 所示.

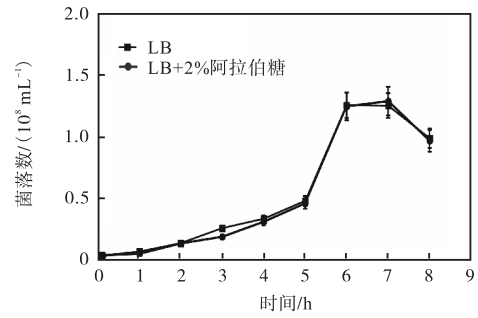
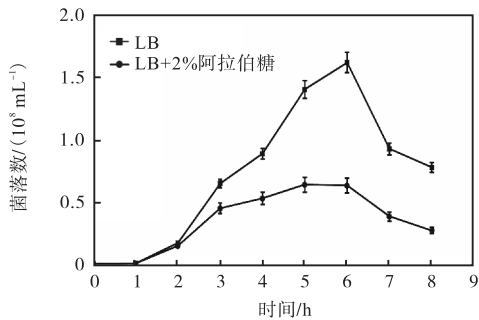
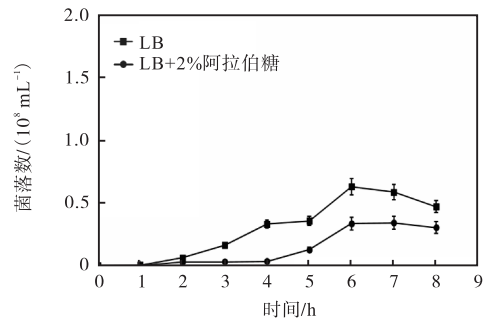


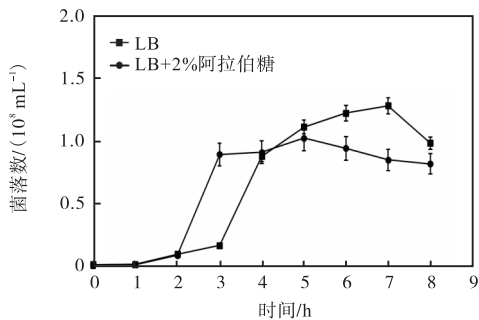
图 3 菌株 PAK/pZW1501 生长时间曲线
Fig. 3 Growth curve of strains PAK/pZW1501



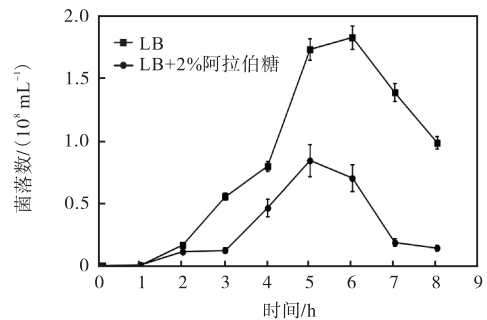
(a) 菌株 PAK/pZW1501-*gp17*



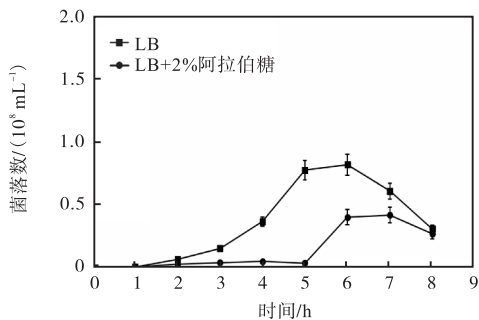
(b) 菌株 PAK/pZW1501-*gp29*



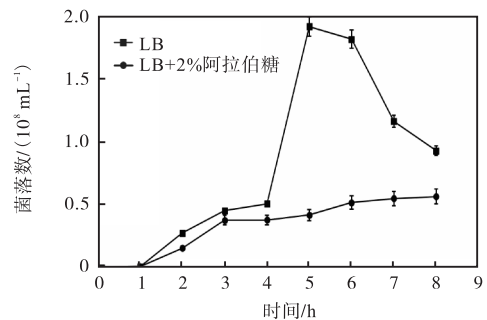
(c) 菌株 PAK/pZW1501-*gp41*



(d) 菌株 PAK/pZW1501-*gp49*



(e) 菌株 PAK/pZW1501-*gp67*



(f) 菌株 PAK/pZW1501-*gp72*

图 4 携带抑制基因的菌株生长时间曲线

Fig. 4 Growth curve of strains carrying the identified phage K4 genes with the inhibition function

有 4 个基因编码的蛋白,能够明显地抑制宿主菌的生长,它们分别是 *gp17*、*gp41*、*gp49* 和 *gp72*. 图 4(a)中 *gp17* 的表达产物从 3 h 开始抑制宿主菌的生长;图 4(b)中 *gp29* 的表达的产物对宿主菌同样有抑制作用,但抑制作用较弱;图 4(c)中基因 *gp41* 在阿

拉伯糖诱导条件下,表达的产物在 3 h 后对宿主细胞的生长产生抑制作用;图 4(d)中 *gp49* 编码的蛋白积累到 5 h 后才对宿主菌有抑制作用;图 4(e)中 *gp67* 编码的蛋白积累到一定量后导致宿主菌死亡;图 4(f)中 *gp72* 编码的蛋白从 3 h 开始抑制宿主菌的生长.

2.4 宿主菌生长相关基因的生物信息学分析

从上述实验可知,铜绿假单胞菌噬菌体 K4 中有 6 个基因能对其宿主菌的生长有影响,对这些基因进行生物信息学分析,结果见表 1。

表 1 噬菌体基因的生物信息学分析

Tab. 1 Bioinformatic analysis of phage gene

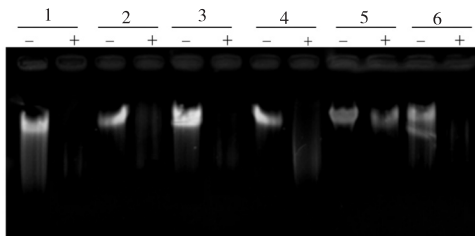
基因	氨基酸/个	功能
<i>gp17</i>	85	假定蛋白;与 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 噬菌体 KPP10 假定蛋白 KPPQO-gp070 同源性的 36% ^[16]
<i>gp29</i>	311	假定蛋白;与 <i>Salinivibrio</i> 噬菌体 CW02 假定蛋白的同源性为 38% ^[17]
<i>gp41</i>	98	假定蛋白;与 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 噬菌体 O4 假定蛋白的同源性为 100% ①
<i>gp49</i>	293	假定 5'-3'核酸外切酶;与 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 噬菌体 O4 假定蛋白的同源性为 100% ①
<i>gp67</i>	179	假定蛋白;与 <i>Salinivibrio</i> 噬菌体 CW02 假定蛋白的同源性为 45% ^[17]
<i>gp72</i>	536	末端酶大亚基;与 <i>Salinivibrio</i> 噬菌体 CW02 包装酶的同源性为 74% ^[17]

注:①噬菌体 O4 基因组已经上传至 GeneBank, 收录号为 NC.031274.1

蛋白 Gp49 具有 helix-hairpin-helix 结构,含有 helix-hairpin-helix 结构的蛋白质具有原核生物 DNA 聚合酶 5'核酸外切酶区域^[13],及真核和原核 RAD2 家族 5'-3'核酸外切酶活性,如 T4^[14]的前体及一些病毒核酸外切酶。蛋白 Gp72 中具有 ATP 酶活性中心。蛋白 Gp72 的 ATP 酶活性中心与噬菌体 T3 末端包装酶大亚基的 ATP 酶活性中心同源性为 28%,蛋白 Gp72 核酸内切酶活性中心与噬菌体 T3 末端包装酶大亚基核酸内切酶活性中心同源性为 34%^[15]。

2.5 脉冲场凝胶电泳分析宿主菌染色体 DNA

为了研究噬菌体 K4 基因抑制宿主菌生长的机制,在 2% 阿拉伯糖诱导 5 h 后,提取宿主菌染色体 DNA,利用脉冲场凝胶电泳分析宿主菌染色体 DNA 的完整性,结果如图 5 所示。



+ 表示添加 2% 阿拉伯糖,-表示不加阿拉伯糖。染色体 DNA 分别从以下菌株中提取:1. PAK/pZW1501-*gp17*; 2. PAK/pZW1501-*gp29*; 3. PAK/pZW1501-*gp41*; 4. PAK/pZW1501-*gp49*; 5. PAK/pZW1501-*gp67*; 6. PAK/pZW1501-*gp72*

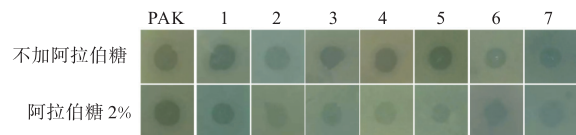
图 5 脉冲场凝胶电泳分析

Fig. 5 Pulsed-field gel electrophoresis

蛋白 Gp17、Gp29、Gp41、Gp49 和 Gp72 能够显著降解宿主菌基因组 DNA,可能是造成宿主菌生长受到抑制的原因;蛋白 Gp67 对宿主菌基因组 DNA 没有影响,其抑制细胞生长的机制不同于其他蛋白。

2.6 敏感性检测结果

噬菌体 K4 基因产物对宿主菌生长具有影响,这些基因产物是否对噬菌体 K4 的感染过程也产生影响?按照噬菌体敏感性检测方法所述,分析了在重组菌株中噬菌体 K4 的敏感性变化,结果如图 6 所示。37 °C 培养 5 h 后,空白对照铜绿假单胞菌 PAK 菌株及 PAK/pZW1501 菌株在添加 2% 阿拉伯糖或不加的诱导条件下,双层平板上均形成比较清晰噬菌斑。携带抑制作用基因的菌株在不加阿拉伯糖时,双层平板上出现清晰噬菌斑,而在阿拉伯糖质量分数为 2% 时,出现的噬菌斑是模糊的。这 6 个具有抑制宿主菌生长作用的基因中,通过功能预测基因 *gp49* 和 *gp72* 编码的蛋白质具有已知功能的结构域,而其余 4 个基因,编码的均为假定蛋白,功能尚不清楚。这 6 个基因表达的产物对宿主菌的生长均具有抑制作用,该 6 个基因可能通过抑制宿主菌的代谢过程,最终损伤了细胞的代谢活性即生理状态,从而导致了噬菌体 K4 感染效率的降低,从而形成模糊的噬菌斑。



1. PAK/pZW1501; 2. PAK/pZW1501-*gp17*; 3. PAK/pZW1501-*gp29*; 4. PAK/pZW1501-*gp41*; 5. PAK/pZW1501-*gp49*; 6. PAK/pZW1501-*gp67*; 7. PAK/pZW1501-*gp72*

图 6 携带生长抑制基因菌株对噬菌体 K4 的敏感性分析
Fig. 6 Spotting assay of strains carrying genes of phage K4

3 讨论

在筛选噬菌体 K4 对宿主菌具有作用的基因时,发现噬菌体 K4 的 *gp72* 基因是噬菌体 K4 的末端酶大亚基,能够抑制宿主菌生长。末端酶大亚基是由 400 ~ 750 个氨基酸组成,以单体的形式存在于溶液中,主要有 1 个核酸内切酶活性中心与 1 个 ATP 酶活性中心,具有 ATP 酶活性、核酸内切酶活性和 DNA 解旋酶活性。末端酶大亚基具有 ATP 酶活性区域,这个区域水解 ATP 释放出能量^[18-19]。根据 Hegde 等^[20]研究发现,噬菌体 T4 的末端酶大亚基与门蛋白特殊结合的相互作用是噬菌体 T4 组装 DNA

过程中很重要的一步。

另外也发现,噬菌体 K4 的 *gp49* 基因能够抑制宿主菌的生长,利用 DNA master 软件和 SMART 蛋白结构域预测软件,在 NCBI 核酸数据库进行比对分析,预测 *gp49* 编码的蛋白是假定 5'-3'核酸外切酶。核酸外切酶是一类能从多核苷酸链的一端开始依次催化水解 3、5-磷酸二酯键、降解核苷酸的酶。核酸外切酶一般分为两种形式,单链的核酸外切酶与双链的核酸外切酶^[21]。噬菌体核酸外切酶属于双链核酸外切酶,这种酶催化双链 DNA 分子从 5'-P 末端进行逐步的水解释放出 5'-单核苷酸,但不能降解 5'-OH 末端^[22]。在 DNA 的复制过程中用到的相关酶及辅助因子有: DnaA、DnaB、DnaC、单链 DNA 结合蛋白(SSB)、RNA 聚合酶、DNA 解旋酶(拓扑异构酶 II)等; RAN 聚合酶 I 具有 5'-3'核酸外切酶活性,这对 DNA 复制的忠实性(只作用于双链 DNA 碱基配对部分,从 5'末端水解下核苷酸或寡核苷酸)极为重要,如果没有这种活性, DNA 复制的错误将会大大增加^[23]。蛋白 Gp49 是否具有 5'-3'核酸外切酶活性还有待进一步研究。

根据 Sampath 等^[24]的研究结果表明,枯草芽孢杆菌噬菌体 SPO1 在抑制宿主菌专一性生物合成中的作用有两个,即抑制宿主菌基因的表达和抑制宿主菌 DNA 的合成。总 RNA 合成的减少,这样可能直接增加 dNTP 的储存量及在治疗中引起在 DNA 合成速率中 dNTP 不真实的降低。Datta 等^[6]的研究发现噬菌体 λ 的 P 蛋白影响其宿主菌大肠杆菌 DnaA 蛋白结合 oriC DNA-链的功能。噬菌体 λ 的 P 蛋白也影响大肠杆菌 DnaA 蛋白结合 ATP 的功能, DnaA 蛋白是一种染色体复制发起蛋白,参与 DNA 复制的起始, DnaA 也是 ATP 结合蛋白^[25]。

噬菌体感染细菌是一个复杂的过程,其感染效率制约于宿主菌细胞的生理状态,随着环境因素变化而不同^[26]。本研究对噬菌体 K4 基因进行研究,发现噬菌体 K4 基因组携带着对宿主菌生长具有抑制的基因,编码多种具有不同功能的蛋白,影响细胞的多种代谢途径,最终损伤了细胞的代谢活性即生理状态,从而导致了噬菌体 K4 感染效率的降低,噬菌斑区域较对照模糊。

在本研究中,由脉冲场凝胶电泳分析结果可知,铜绿假单胞菌噬菌体 K4 中 6 个抑制宿主菌生长的基因的抑制机制分为两种类型。第一种类型是 *gp17*、*gp29*、*gp41*、*gp49*、*gp72* 这 5 个基因抑制宿主菌生长

的机制是一致的,这 5 个基因可能编码某种蛋白导致宿主菌染色体 DNA 的显著降解。第二种类型是 *gp67*,该基因编码的蛋白不能导致宿主菌染色体 DNA 的降解来抑制宿主菌的生长,而是应用其他的抑制机制,比如抑制宿主菌的代谢途径等,这需要进一步的探索与研究。

Molshanski-Mor 等^[27]运用高通量测序识别 T7 噬菌体的特征抑制基因序列。这一结果验证了通过识别噬菌体的基因来推断新靶点抑菌素方法的可行性,这也为治疗细菌感染提供了新的治疗途径。铜绿假单胞菌噬菌体 K4 的基因中大部分编码的 ORFs 是假定蛋白,而到目前为止,对已经完成测序的 600 多种噬菌体基因组序列分析表明,很大一部分预测的 ORFs 与现有数据库中的蛋白质序列无相似性;即使是人们研究最多的 T4 噬菌体,也有超过一半的 ORF 功能没有明确^[28]。这说明目前人们对大部分噬菌体的相关蛋白及其功能机制的研究少之又少,也就是说,通过研究噬菌体与宿主相互作用机制的前景巨大,这也将为噬菌体治疗、开发新的抗菌素及其应用的研究提供一定的基础。

参考文献:

- [1] Gu J, Li X, Yang M, et al. Therapeutic effect of *Pseudomonas aeruginosa* phage YH30 on mink hemorrhagic pneumonia[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 190: 5-11.
- [2] Biswas B, Adhya S, Washart P, et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(1): 204-210.
- [3] Hanlon G W. Bacteriophages: An appraisal of their role in the treatment of bacterial infections[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007, 30(2): 118-128.
- [4] Taylor P W, Stapleton P D, Luzio P J. New ways to treat bacterial infections[J]. *Drug Discovery Today*, 2002, 7(21): 1086-1091.
- [5] 王琰, 陆承平. 噬菌体裂解酶的抗菌特性[J]. *微生物学报*, 2009, 49(10): 1227-1281.
- [6] Datta I, Sau S, Sil A K, et al. The bacteriophage lambda DNA replication protein P inhibits the oriC DNA- and ATP-binding functions of the DNA replication initiator protein DnaA of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 38(1): 97-103.
- [7] Kedzierska B, Glinkowska M, Iwanicki A, et al. Toxicity

- of the bacteriophage λ *cII* gene product to *Escherichia coli* arises from inhibition of host cell DNA replication [J]. *Virology*, 2003, 313 (2) : 622–628.
- [8] Wei P, Stewart C R. Genes that protect against the host-killing activity of the E3 protein of *B. subtilis* bacteriophage SPO1 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177 (10) : 2933–2937.
- [9] Liu J, Dehbi M, Moeck G, et al. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics [J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22 (2) : 185–191.
- [10] Bradley T J, Khan N H. The production of extracellular lipids by *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 2000 in stationary liquid media containing macrogols [J]. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 1974, 26 (11) : 900–902.
- [11] Liang R, Liu J. Scarless and sequential gene modification in *Pseudomonas* using PCR product flanked by short homology regions [J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 209.
- [12] Yang H, Liang L, Lin S, et al. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii* [J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 131.
- [13] Urs U K, Murali R, Krishna Murthy H M. Structure of taq DNA polymerase shows a new orientation for the structure-specific nuclease domain [J]. *Acta Crystallographica*, 1999, 55 (12) : 1971–1977.
- [14] Mueser T C, Nossal N G, Hyde C C. Structure of bacteriophage T4 RNase H, a 5' to 3' RNA-DNA and DNA-DNA exonuclease with sequence similarity to the RAD2 family of eukaryotic proteins [J]. *Cell*, 1996, 85 (7) : 1101–1112.
- [15] Pajunen M I, Elizondo M R, Skurnik M, et al. Complete nucleotide sequence and likely recombinatorial origin of bacteriophage T3 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 319 (5) : 1115–1132.
- [16] Uchiyama J, Rashed M, Takemura I, et al. Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10 [J]. *Archives of Virology*, 2012, 157 (4) : 733–738.
- [17] Shen P S, Domek M J, Sanz-Garcia E, et al. Sequence and structural characterization of great salt lake bacteriophage CW02 a member of the T7-Like supergroup [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86 (15) : 7907–7917.
- [18] Nemecek D, Gilcrease E B, Kang S, et al. Subunit conformations and assembly states of a DNA-translocating motor: The terminase of bacteriophage P22 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 374 (3) : 817–836.
- [19] Alam T I, Rao V B. The ATPase domain of the large terminase protein, gp17, from bacteriophage T4 binds DNA: Implications to the DNA packaging mechanism [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 376 (5) : 1272–1281.
- [20] Hegde S, Padilla-Sanchez V, Draper B, et al. Portal-large terminase interactions of the bacteriophage T4 DNA packaging machine implicate a molecular lever mechanism for coupling ATPase to DNA translocation [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86 (8) : 4046–4057.
- [21] Dizman Y A, Muratoglu H, Sandalli C, et al. Chilo iridescent virus (CIV) ORF 012 L encodes a protein with both exonuclease and endonuclease functions [J]. *Medical Microbiology*, 2016, 161 (11) : 3029–3037.
- [22] Mitsunobu H, Zhu B, Lee S J, et al. Flap endonuclease activity of gene 6 exonuclease of bacteriophage T7 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289 (9) : 5860–5875.
- [23] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 406–424.
- [24] Sampath A, Stewart C R. Roles of genes 44, 50 and 51 in regulating gene expression and host takeover during infection of *Bacillus subtilis* by bacteriophage SPO1 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (6) : 1785–1792.
- [25] Erzberger J P, Mott M L, Berger J M. Structural basis for ATP-dependent DnaA assembly and replication-origin remodeling [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, 13 (8) : 676–683.
- [26] Qin X, Sun Q, Yang B, et al. Quorum sensing influences phage infection efficiency via affecting cell population and physiological state [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2017, 57 (2) : 162–170.
- [27] Molshanski-Mor S, Yosef I, Kiro R, et al. Revealing bacterial targets of growth inhibitors encoded by bacteriophage T7 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111 (52) : 18715–18720.
- [28] Miller E S, Kutter E, Mosig G, et al. Bacteriophage T4 genome [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67 (1) : 86–156.