

文章编号: 1000-5862(2021)03-0241-05

1 株盐湖噬菌体 CJL-7 的分离及其生物学特性研究

刘中华, 于慧瑛, 伍芳芝, 曹建斌, 李 新*

(运城学院生命科学系, 山西 运城 044000)

摘要: 以嗜盐菌为宿主, 从山西省运城盐湖湖水中分离出 1 株噬菌体, 经浓缩纯化后用电镜观察其形态, 并进行限制性酶切、蛋白组成分析及生物学特性研究. 研究表明: 分离获得的 CJL-7 为双链 DNA 烈性噬菌体, 属微小噬菌体科; 其头部为正多面体结构, 直径约为 80 nm, 在其衣壳中至少含 3 种主要结构蛋白; 该噬菌体含有脂质包膜, 宿主范围较广; 低盐处理对该噬菌体的效价几乎没有影响, 其活性在 30 ~ 50 °C 范围内较稳定, 在 40 °C 时效价最高, 在碱性条件下活性更强.

关键词: 盐湖; 噬菌体; 嗜盐菌; 生物学特性

中图分类号: X 172 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2021.03.04

0 引言

运城盐湖位于山西省西南部, 有“中国死海”之称, 是世界第 3 大硫酸钠型内陆湖泊. 由于在运城盐湖湖水中含盐率高, 一般生物很难生存, 但一些嗜盐或耐盐生物如嗜盐菌、卤虫、螺旋藻等^[1-2], 经过长期的自然选择和进化, 体内产生出许多天然活性物质, 使其能够适应高盐的环境^[3-4]. 近年来, 人们已在盐域环境中的诸多嗜盐菌进行了较深入系统的研究, 并对其积极地进行开发利用^[5]. 噬菌体(Bacteriophage)是寄生于细菌、放线菌、螺旋体、霉形体、蓝细菌等微生物中的一类病毒, 广泛存在于自然环境中, 总量超过 1×10^{31} ^[6]. 由于噬菌体结构简单、基因数量较少, 可作为分子生物学和基因工程研究的理想材料和模型^[7]. N. S. Atanasova 等^[8]将生活在高盐环境中的病毒称为嗜盐病毒(Halovirus). 对嗜盐病毒的研究虽然开始较早^[9], 但截至 2016 年底被发现和报道的嗜盐病毒仅有 100 多株, 其中 14 株感染细菌, 其他均感染古菌^[10]. 目前, 对嗜盐病毒的研究多数局限于病毒的分离纯化和初步培养方面, 对其基因组学及基因改造方面的研究将是未来的发展方向.

本文以从运城盐湖湖水中分离获得的嗜盐菌 *Bacillus* sp. GQ39 作为宿主菌, 采用双层平板法从水样中定向筛选出 1 株具有较强感染力的嗜盐细菌

噬菌体, 然后对其进行形态学观察、限制性酶切和蛋白组成分析及部分生物学特性研究, 以期对运城盐湖微生物资源的开发利用提供一些基础性数据.

1 材料和方法

1.1 菌株

分离噬菌体所用水样采自运城盐湖. *Bacillus* sp. GQ39、*Chromohalobacter* sp. LY7-4、*Chromohalobacter* sp. LY7-3、*Halomonas* sp. GQ44、*Clostridium* sp. GQ8、*Clostridium* sp. GQ15、*Gracilibacillus* sp. SK1、*Halobacillus* sp. LY7、*Salimicrobium* sp. LY19、*Thalassobacillus* sp. LY18、*Virgibacillus* sp. SK31 等宿主菌株均分离自盐湖黑泥样品中, 由本实验室鉴定并保存.

1.2 培养基、主要试剂和仪器

1.2.1 培养基制备 人工盐水(30%): NaCl 240 g、MgCl₂ 30 g、MgSO₄ 35 g、KCl 35 g、CaCl₂ 0.35 mg, 定容至 1 L, 调节 pH 值为 7.5.

MGM 培养基: 人工盐水(30%) 200 mL、蛋白胨 2 g、酵母浸粉 0.4 g, 定容至 400 mL, 调节 pH 值为 7.5. 固体、半固体 MGM 培养基琼脂质量分数分别为 1.5% 和 0.5%.

病毒稀释液(VDS, 15%): 将质量分数为 30% 的人工盐水与双蒸水等体积混合, 灭菌后备用.

收稿日期: 2020-12-04

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31300002), 山西省重点学科建设(FSKSC, 2018), 山西省高等学校优秀青年学术带头人支持计划(2016)和山西省应用基础研究(201701D121088)资助项目.

通信作者: 李 新(1981—), 山东莱阳人, 教授, 博士, 主要从事微生物资源开发与应用研究. E-mail: lixin-eva@163.com

1.2.2 主要试剂及仪器 试剂: Sefinose™ 4B 琼脂糖凝胶, 购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; SDS、PEG 6000 和 DNA 纯化试剂盒, 购自上海生物工程有限公司; DNase I、RNase A、DNA Marker 及各种限制性核酸内切酶, 均购自大连宝生物公司。

仪器: 恒温摇床培养箱(HZQ-F160 哈东联), 电热恒温培养箱(DNP-9052, 上海精宏), 高速台式冷冻离心机(TGL-16M, 湖南湘仪), 电泳仪(DYY-6C, 北京六一), 凝胶成像分析系统(Tanon-1600, 上海天能), 透射电子显微镜(JEM-1400, 日本电子)。

1.3 水样富集与宿主菌活化

将 100 mL 盐湖水样和 200 mL MGM 培养基在 37 ℃、160 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 24 h, 然后将获得的培养液经 8 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤 2 次, 即得富集噬菌体的上清液。

将 *Bacillus* sp. GQ39 接种到 MGM 培养基中, 在 37 ℃ 下振荡培养过夜, 即得活化的宿主菌悬液。

1.4 噬菌体分离与鉴定

取 150 μL 富集噬菌体的上清液 + 50 μL 宿主菌悬液, 先在室温下孵育 15 min, 然后加入 3 mL 40 ℃ 的半固体 MGM 培养基, 混匀后一起倒入 MGM 固体平板中, 在 37 ℃ 下培养 1~2 d, 挑取特征明显的噬菌斑, 用双层平板法进行验证及反复纯化, 纯化后保存于 VDS 稀释液中。

1.5 噬菌体富集与纯化

将分离的噬菌体接种于含 *Bacillus* sp. GQ39 的 MGM 培养基中, 在 37 ℃ 下振荡培养至澄清, 经 10 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 后取上清液, 往上清液中加入 125 μg·mL⁻¹ DNase I 和 10 μg·mL⁻¹ RNase A, 在 37 ℃ 下水浴 30 min, 加 PEG 6000 调节其质量分数为 10%, 在 4 ℃ 下存放过夜, 经 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清液, 沉淀用适量 VDS 溶解, 即得噬菌体浓缩液。用 Sefinose™ 4B 琼脂糖凝胶过滤层析法对噬菌体进行纯化, 用紫外吸收光度法测定各时间段洗脱液的 O_D 值(A_{280}), 用双层平板法测定噬菌体效价。

1.6 核酸类型鉴定及限制性酶切分析

噬菌体 CJL-7 基因组提取参照《分子克隆实验指南》^[11]。取适量噬菌体 CJL-7 基因组溶液, 加入 DNase I 和 RNase A 进行消化, 以确定其核酸类型。另取适量噬菌体 CJL-7 基因组溶液分别加入限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III、*Kpn* I、*Sac* I、*Nde* I、*Xho* I 和 *Sal* I, 对酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.7 噬菌体电镜观察

在菌种富集传代后, 用 2% 的醋酸双氧铀溶液进行负染, 通过透射电镜观察其形态特征。

1.8 蛋白组成分析

为了检测噬菌体主要蛋白组成, 将纯化后的噬菌体与等体积的裂解液混和后, 沸水浴 10 min, 再在 13 000 r·min⁻¹ 下离心 2 min, 取上清液进行聚丙烯酰胺电泳。

1.9 生物学特性分析

(i) 宿主范围检测. 将获得的噬菌体悬液分别感染不同的嗜盐菌株, 用双层平板法对其宿主范围进行检测。(ii) 热稳定性. 将噬菌体悬液分别置于 30、40、50、60、70、80 和 90 ℃ 的恒温水浴中, 静置 30 min 后, 用双层平板法测定其效价。(iii) 低盐耐受性. 将含盐质量分数为 15% 的噬菌体悬液与无菌水以 1:1 000 的比例混合, 每隔 5 min 取样测定其效价。(iv) pH 稳定性. 配制 pH 值为 4~10 的 VDS 溶液, 加入噬菌体悬液后在室温下静置 1 h, 测定其效价。(v) 氯仿敏感性检测. 将 0.2 mL 氯仿与 1 mL 噬菌体悬液混和, 在振荡器上振荡 1 min, 然后在 8 000 r·min⁻¹ 下离心 1 min, 取上清液检测其效价。

2 结果与分析

2.1 CJL-7 的分离纯化

从运城盐湖采集水样后, 以嗜盐菌 *Bacillus* sp. GQ39 为宿主, 采用双层平板法分离获得 1 株噬菌体, 命名为 CJL-7。其噬菌斑呈透明状, 直径约为 2~3 mm, 表现出典型的烈性噬菌体特征(见图 1)。

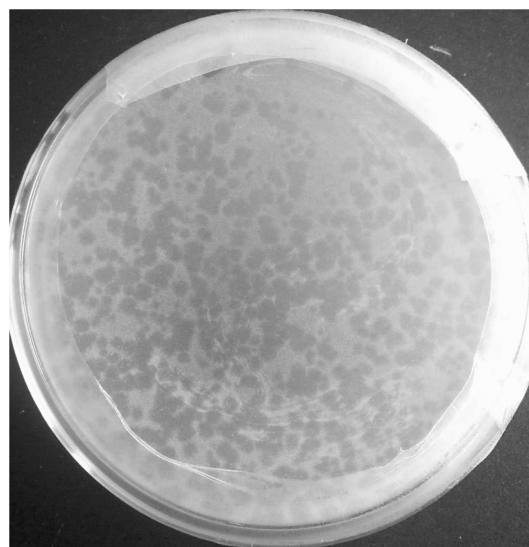


图 1 纯化后的噬菌体 CJL-7

2.2 形态学观察

在电镜下观察发现,噬菌体 CJL-7 为微球状结构,无尾,直径约为 80 nm,具有微小噬菌体科 (Microviridae) 的形态特征,呈典型的正多面体立体对称结构(见图 2)。

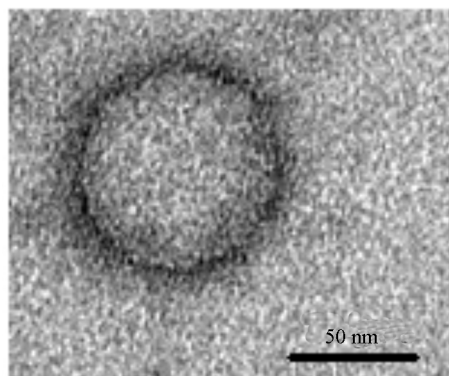


图2 噬菌体 CJL-7 的电镜形态

2.3 核酸提取及酶切鉴定结果

从图 3 可以看出, CJL-7 基因组大小约为 23 kb,且仅能被 DNase I 所消化,这表明其核酸类型为 DNA。在所选 8 种限制性核酸内切酶中,仅 *Hind* III、*Kpn* I 和 *Sal* I 可对基因组进行切割(见图 4),这进一步证明其基因组为双链 DNA。

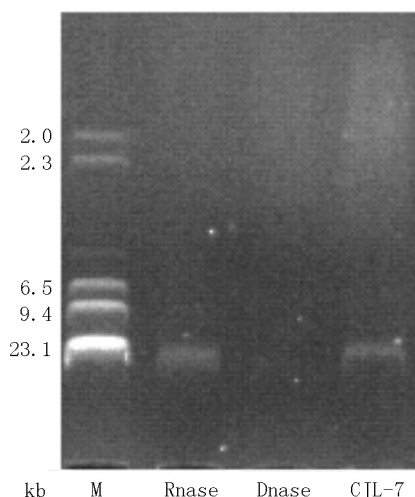


图3 CJL-7 基因组 DNase I 和 Rnase 酶切电泳结果

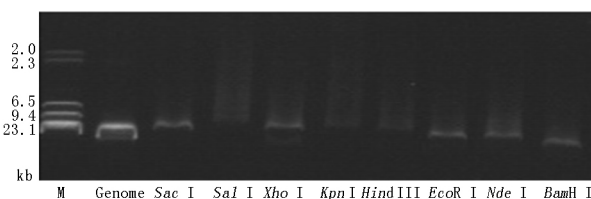


图4 CJL-7 基因组限制性酶切图谱

2.4 CJL-7 结构蛋白分析

为了解 CJL-7 的蛋白组成,对噬菌体经裂解处理后进行 SDS-PAGE 电泳,结果发现在其衣壳中至少含 3 种蛋白,在 110、50 和 21 kDa 处条带明显,推

测其为 3 种主要结构蛋白的位置。

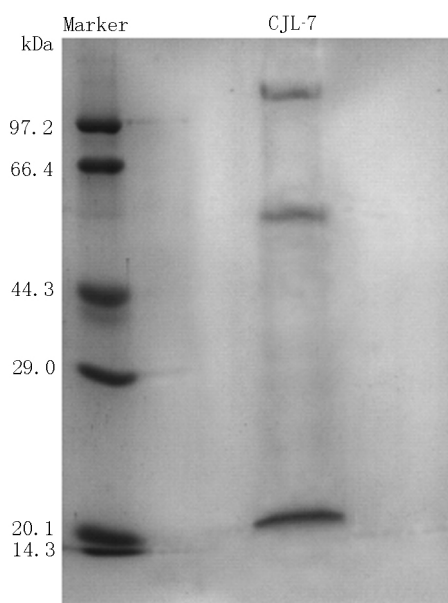


图5 CJL-7 衣壳蛋白 SDS-PAGE

2.5 噬菌体的生物学特性

2.5.1 宿主范围检测 将 CJL-7 分别试着感染实验室保存的不同类型的嗜盐菌,结果发现该噬菌体可以感染 *Bacillus* sp. GQ39、*Chromohalobacter* sp. LY7-4、*Chromohalobacter* sp. LY7-3、*Halobacillus* sp. LY7、*Gracilibacillus* sp. SK1、*Virgibacillus* sp. SK31 和 *Clostridium* sp. GQ15。

2.5.2 温度、低盐处理和 pH 值对 CJL-7 活性的影响 当在不同温度下对 CJL-7 进行处理时,发现在 30~50℃ 时其活性较为稳定,其中在 40℃ 时效价最高(其值为 7.70×10^6 pfu · mL⁻¹)。当温度超过 60℃ 时,噬菌体的效价降得很低,在 90℃ 时噬菌体完全失去活性(见图 6(a))。低盐耐受性检测发现, CJL-7 在无盐条件下其活性几乎不受影响(见图 6(b))。该噬菌体在 pH 值为 4~9 的培养液中,效价维持在一个相对较稳定的水平(约为 1.00×10^6 pfu · mL⁻¹)。但当 pH 值为 10 时,其效价迅速升高至 2.45×10^6 pfu · mL⁻¹(见图 6(c))。这表明 CJL-7 在碱性条件下活性较强。

2.5.3 氯仿敏感性检测 CJL-7 经氯仿处理后感染活性丧失(见图 7),这表明该噬菌体含有脂质包膜。

3 讨论

世界上分布着众多的高盐环境,如盐湖、盐场和盐原等。在此环境中,存在着细菌、真菌、嗜盐古菌和噬菌体等微生物,其中噬菌体总量约为其他微生物

的 10 ~ 100 倍^[12]。目前,对在高盐环境中嗜盐菌的研究较多,但对与之相互作用的、以细菌为食的噬菌体研究较少。在高盐环境中噬菌体的分离研究虽然从 20 世纪 80 年代已经开始,但至今仅从高盐环境中分离到 14 株细菌噬菌体,包括长尾、肌尾、短尾和

无尾 4 种形态,前 3 种归属于有尾病毒目,96% 的噬菌体均属此种类型^[13]。而无尾烈性噬菌体仅见 2 例报道^[14-15]。本文最终分离获得的也为无尾噬菌体,对其生物学特性的探讨可丰富在盐域环境中嗜盐噬菌体多样性的研究。

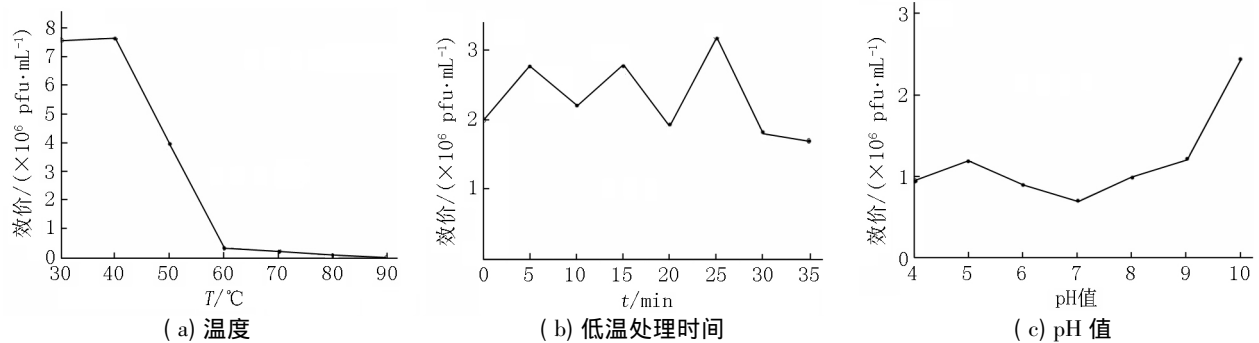
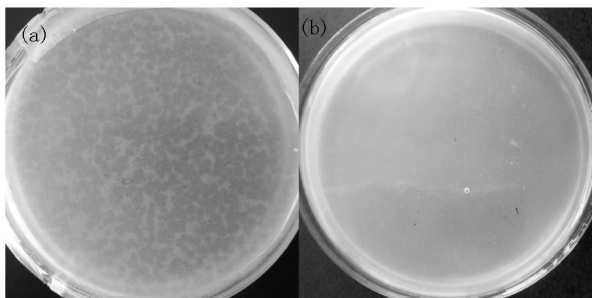


图 6 温度、低盐处理时间和 pH 值对噬菌体 CJL-7 活性的影响



(a) 正常培养 (b) 氯仿处理

图 7 氯仿处理对噬菌体 CJL-7 的影响

本文以实验室分离的嗜盐细菌 *Bacillus* sp. GQ39 为宿主,采用双层平板法从运城盐湖水中筛选获得 1 株裂解性噬菌体 CJL-7,该噬菌体呈典型的微球状结构且无尾,根据 ICTV 第 9 次病毒分类报告^[16],该噬菌体应属微小噬菌体科。CJL-7 基因组为双链 DNA,与已报道的多数嗜盐细菌噬菌体的 DNA 相一致^[17]。电泳结果显示其基因组长度约为 23 kb,且仅能被少数几种限制性核酸内切酶(如 *Hind* III、*Kpn* I 和 *Sal* I 等)切割,推测可能是其他相关的酶切位点被甲基化修饰。CJL-7 衣壳蛋白组成比以往报道的其他噬菌体更为简单,SDS-PAGE 电泳仅观察到 3 种主要结构蛋白。本文研究结果为噬菌体的研究提供了一些重要的数据,如核酸的类型及大小、衣壳蛋白的组成等。

盐湖独特的高盐环境使其中生活的微生物在长期的进化过程中形成了独特的盐适应机制,即只有在盐的作用下才能发挥其生物学活性^[18]。然而,在本文中低盐处理对噬菌体 CJL-7 的活性没有明显的抑制作用,在低盐处理 35 min 后,该噬菌体的感染活性几乎不受影响,推测 CJL-7 可能是在盐域环境中的 1 株特殊噬菌体。氯仿处理使 CJL-7 的感染活

性丧失,这表明该噬菌体含有脂质包膜,该特性与文献[19-20]报道的噬菌体类似。热稳定性研究表明 CJL-7 对温度变化较为敏感,CJL-7 在 30 ~ 50 °C 时较为稳定,且在 40 °C 时的效价最高。此外,该噬菌体在 pH 值为 10 时效价最高,即在碱性条件下其活性最强,与一些最佳 pH 值为碱性条件的嗜盐细菌噬菌体相似^[21-22],这表明 CJL-7 可能具有某些潜在的研究和应用价值。本文研究结果进一步丰富了运城盐湖噬菌体资源库,为接下来对运城盐湖微生物的开发利用打下了一定的基础。

4 参考文献

- [1] 郑绵平, 齐文. 我国盐湖资源及其开发利用 [J]. 矿产保护与利用, 2006, 50(5): 45-50.
- [2] 龙启福, 朱德锐, 韩睿, 等. 嗜盐菌相溶物质合成与转运调节机制 [J]. 环境科学与技术, 2011, 34(9): 63-66.
- [3] Oren A. Halophilic microbial communities and their environments [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 33(6): 119-124.
- [4] Morozkina E V, Slutskaya E S, Fedorova T V, et al. Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2010, 46(1): 1-14.
- [5] Li Xin, Yu Huiying. Biodiversity and screening of halophilic bacteria with hydrolytic and antimicrobial activities from Yuncheng salt lake, China [J]. Biologia, 2015, 70(2): 151-156.
- [6] Hendrix R W. Bacteriophage genomics [J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(5): 506-511.
- [7] Kurzepa A, Dąbrowska K, Świąta-Jeleń K, et al. Molecu-

- lar modification of T4 bacteriophage proteins and its potential application: review [J]. *Folia Microbiologica* 2009, 54(1): 5-15.
- [8] Atanasova N S, Bamford D H, Oksanen H M. Virus-host interplay in high salt environments [J]. *Environmental Microbiology Reports* 2016 8(4): 431-444.
- [9] Calvo C, de La Paz A G, Bejar V, et al. Isolation and characterization of phage F9-11 from a lysogenic *Deleya halophila* strain [J]. *Current Microbiology*, 1988, 17(1): 49-53.
- [10] Atanasova N S, Oksanen H M, Bamford D H. Haloviruses of archaea, bacteria, and eukaryotes [J]. *Current Opinion in Microbiology* 2015 25(6): 40-48.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 格林 M R. 分子克隆实验指南 [M]. 4 版. 北京: 科学出版社 2017: 32.
- [12] Narasingarao P, Podell S, Ugalde J A, et al. De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities [J]. *ISME Journal* 2012 6(1): 81-93.
- [13] 傅超群, 白萌, 王永霞, 等. 高盐环境可培养细菌噬菌体的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(4): 920-928.
- [14] Aalto A P, Bitto D, Ravantti J J, et al. Snapshot of virus evolution in hypersaline environments from the characterization of a membrane-containing Salisaeta icosahedral phage 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, 109(18): 7079-7084.
- [15] Wang Chuanxu, Li Xin. JMT-1: a novel, spherical lytic halotolerant phage isolated from Yuncheng saline lake [J]. *Brazilian Journal of Microbiology* 2018 49(1): 262-268.
- [16] Andrew M Q K, Elliot L, Michael J, et al. Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses [R]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012: 385-386.
- [17] Vreeland R H. Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms [M]. Berlin: Springer Press, 2012: 81-116.
- [18] Rothschild L J, Mancinelli R L. Life in extreme environments [J]. *Nature* 2001 409(6823): 1092-1101.
- [19] Kukkaro P, Bamford D H. Virus-host interactions in environments with a wide range of ionic strengths [J]. *Environmental Microbiology Reports* 2009 1(1): 71-77.
- [20] Porter K, Tang S L, Chen C P, et al. PH1: an archaeovirus of *Haloarcula hispanica* related to SH1 and HHV-2 [J]. *Archaea* 2013 2013(3): 456318.
- [21] Hardies S C, Hwang Y J, Hwang C Y, et al. Morphology, physiological characteristics, and complete sequence of marine bacteriophage ϕ RIO-1 infecting *Pseudoalteromonas marina* [J]. *Journal of Virology* 2013, 87(16): 9189-9198.
- [22] Roine E, Kukkaro P, Paulin L, et al. New, closely related haloarchaeal viral elements with different nucleic acid types [J]. *Journal of Virology* 2010 84(7): 3682-3689.

The Isolation and Biological Characteristics of a Bacteriophage CJL-7 from Salt Lake

LIU Zhonghua, YU Huiying, WU Fangyi, CAO Jianbin, LI Xin*

(Department of Life Sciences, Yuncheng University, Yuncheng Shanxi 044000, China)

Abstract: There are abundant bacteriophages in salt lakes. Isolation and preliminary identification of their biological characteristics will be helpful for further development and utilization. Using halophilic bacteria as the host bacteria, a bacteriophage is isolated from Yuncheng salt lake and named CJL-7 in this study. Then it is observed under electron microscopy after concentration and purification. Finally, restriction enzyme digestion, protein composition analysis and biological characteristics are studied. The results show that CJL-7 is a double stranded DNA virulent phage and belongs to the microphage family. A polyhedron structure is in its head with a diameter of about 80 nm. There are at least three major structural proteins in its capsid. The bacteriophage contains lipid-encapsulated membranes and has a wide host range. Low salt treatment has little effect on its titer. The bacteriophage activity is stable in the range of 30—50 °C and has the highest titer at 40 °C. The activity is enhanced under alkaline conditions.

Key words: salt lake; bacteriophage; halophilic bacteria; biological characteristics

(责任编辑: 刘显亮)