

一株副溶血弧菌噬菌体的分离鉴定及生理特性

丁云娟 彭勇 林洪 王静雪* 孔令红

(中国海洋大学食品学院 食品安全实验室 山东 青岛 266003)

摘要: 为了探寻有效的控制副溶血弧菌的方法, 从水产品市场的污水中分离出来一株烈性噬菌体 qdvp001。采用双层平板法分离纯化噬菌体 qdvp001, 电镜观察其形态特征, 并利用双层平板法测定其生理特性, 包括热稳定性试验、最适 pH、最佳感染复数及一步生长曲线, 然后提取基因组进行酶切和序列分析。结果显示该烈性噬菌体 qdvp001 头部直径大约为 79 nm, 尾长大约 118 nm, 属于肌尾噬菌体科。它对 60 °C 以下的温度耐受力较强, 最适 pH 为 7.0-8.0 左右, 最佳感染复数是 0.000 1, 感染宿主菌的潜伏期约 20 min, 裂解期约 70 min, 并获得部分 DNA 片段的序列。将获得的 DNA 序列在 NCBI 上进行比对, 结果显示, qdvp001 与其他噬菌体的同源性较低。该噬菌体很可能是一种新发现的噬菌体。

关键词: 副溶血弧菌, 噬菌体, 生理特性, DNA 序列

Isolation, identification and physiological property of lytic phage against *Vibrio parahaemolyticus*

DING Yun-Juan PENG Yong LIN Hong WANG Jing-Xue* KONG Ling-Hong

(Food Safety Laboratory, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: To develop a effective controlling method against *Vibrio parahaemolyticus*, we isolated a lytic phage qdvp001 from aquatic sewage water. Phage qdvp001 was isolated by double-layer plate method and its morphology character were observed by transmission electron microscopic. Furthermore some physiological properties such pH stability, thermal stability, multiplicity of infection (MOI) and one step curve were also reported. Deoxyribose nucleic acid (DNA) from phage qdvp001 was digested with the restriction endonuclease and then analyzed the sequence. Phage qdvp001 with a head diameter of about 79 nm and a tail size of about 102 nm belongs to the family Myoviridae. It has a strong en-

基金项目: 教育部博士点专项基金项目(No. 20100132110013); 国家自然科学基金项目(No. 31071540); 现代农业产业技术体系建设专项资金(No. nycytx-50)

* 通讯作者: Tel: 86-532-82032389; ✉ snow@ouc.edu.cn

收稿日期: 2011-05-23; 接受日期: 2011-08-30

duration of temperature below 60 °C, its optimum pH value and MOI were about 7.0–8.0 and 0.000 1 respectively. The phage growth cycle with a detected latent period of 20 min with lytic period of 10 min. Six DNA sequences were obtained and showed low homology with others when compared with those reported information in NCBI. Phage qdvp001 might be a novel bacteriophage.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Bacteriophage, Physiological property, DNA sequence

随着海水养殖业的发展, 鱼类病害多有发生, 其中弧菌病已成为主要病症之一。弧菌病具有流行范围广、传播速度快、致病性强、死亡率高等特点, 每年此类疾病给国家和企业的渔业生产带来巨大的经济损失。目前, 国内外已经报道的弧菌病病原主要有副溶血弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、创伤弧菌和河弧菌等^[1]。副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)主要的感染对象有对虾、海水鱼类、文蛤和牡蛎等, 同时它也是引起食源性疾病的主要病原菌, 食用含有该菌的食品可能会引起腹泻、肠痉挛、恶心、呕吐和发烧等典型胃肠炎反应^[2]。目前对病原菌的治疗往往局限在使用抗生素和消毒剂, 这对于我国的海洋食品安全、水产养殖的可持续发展构成了极大的威胁^[1,3-4]。

噬菌体是一种细菌病毒, 分为烈性噬菌体和温和性噬菌体, 其中烈性噬菌体可以侵入细菌细胞内, 通过酶作用破坏细胞壁, 使细菌裂解。噬菌体疗法是一种安全、清洁的绿色方法, 利用噬菌体进行宿主菌的专一性裂解在医疗和水产养殖上的应用受到世人越来越多的关注。因此, 通过筛选裂解性能优良的副溶血弧菌噬菌体将在治疗副溶血弧菌病上具有广泛的应用前景。目前副溶血弧菌噬菌体的研究较少, 有关噬菌体基因序列的报道更少。本文从水产品市场的污水中分离出一株副溶血弧菌噬菌体 qdvp001, 研究了它的一些生理特性, 并对其进行分类鉴定, 为该噬菌体的应用提供了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

从青岛南山水产市场处采集涮洗鱼贝类水产品的污水, 然后放置于 4 °C 冰箱中备用。

1.2 菌株和培养基

使用的菌种为 *Vibrio parahaemolyticus* 17802

(以下简称 VP17802), 最初是在日本肠胃炎爆发时从食物中毒患者体内分离出来的^[5], 为副溶血弧菌的典型菌株^[6], 购自美国典型微生物菌种保藏中心。培养基为高压灭菌的 2216E 培养基, 购自青岛高科园海博生物技术有限公司。

1.3 SM 缓冲液

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

1.4 噬菌体的分离与纯化

1.4.1 噬菌体的分离: 将 100 μL 对数期的 VP17802 加到 5 mL 双倍浓缩 2216E 液体培养基中, 再加入处理的污水(5 000 r/min, 10 min 离心)至 10 mL 体积, 120 r/min、37 °C 培养过夜, 次日将培养液 5 000 r/min, 10 min 离心并取上清液, 过 0.22 μm 的微孔滤膜, 得到噬菌体原液。

1.4.2 噬菌体的纯化: 采用双层平板法和液体增殖法对噬菌体进行纯化。用灭菌的 SM 缓冲液将噬菌体原液进行适当稀释, 取 100 μL 对数期的 VP17802 与 100 μL 噬菌体稀释液混合, 37 °C 静置 30–40 min, 再与 5 mL 半固体培养基混匀倒入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。

在上述出现单个噬菌斑的平板上, 用接种针挑取单个噬菌斑至 1 mL SM 中混匀, 4 °C 冰箱中过夜。次日经漩涡振荡器振荡混匀后, 取噬菌体液进行适当稀释, 将 100 μL 对数期的 VP17802 与 100 μL 噬菌体稀释液混合 37 °C 下静置 30–40 min, 再与 5 mL 半固体培养基混匀倒入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 3 次后即得纯的噬菌体 qdvp001。

1.5 噬菌体的生理特性

1.5.1 副溶血弧菌噬菌体的热稳定性试验: 各取 300 μL 1.19×10⁹ PFU/mL 的噬菌体 qdvp001 于无菌

EP 管中, 分别于 40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 的水浴中作用 20、40 和 60 min。待作用时间结束后立即将样品置于 4 °C 冰箱中冷却, 将样品稀释后取合适的梯度测定噬菌体的效价。

1.5.2 pH 对噬菌体活性的影响: 本实验选取的 pH 梯度为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0。各取 2.7 mL 不同 pH 的 2216E 液体培养基到无菌 EP 管中, 放在 37 °C 水浴锅中, 当温度平衡后加入 0.3 mL 的噬菌体 qdvp001, 37 °C 作用 1 h, 选择合适的稀释度铺双层平板测定噬菌体的效价。

1.5.3 噬菌体的最佳感染复数(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, 将噬菌体 qdvp001 与 VP17802 (10^9 CFU/mL)加入 2216E 液体培养基中, 37 °C 振荡培养 10 h, 4 000 r/min 离心 15 min, 去掉沉淀, 上清液用 0.22 μ m 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。

1.5.4 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^[7]的方法。将噬菌体 qdvp001 和对数生长期的 VP17802 按照感染复数为 0.1 的比例加入到液体培养基中, 37 °C 孵育 10 min, 12 000 r/min 离心 30 s, 弃上清, 用 2216E 液体培养基洗涤 2 次。加入等体积 37 °C 预热的 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, 在 0 时刻和每隔 10 min 取样, 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。

1.6 噬菌体的电镜观察

采用磷钨酸负染法, 方法如下: 取 100 μ L 增殖好的噬菌体 qdvp001, 滴在石蜡片上, 将铜网(具有膜的一面朝上)放置于噬菌体液滴上, 5 min 后将铜网自液滴上取下放置于干净的滤纸上, 晾干大约 5 min 左右, 用磷钨酸染色(用将沾有噬菌体的铜网膜面朝上放置于磷钨酸液滴上), 10 min 后将铜网自磷钨酸液滴上拿下, 晾干, 透射电镜观察并拍照。

1.7 噬菌体 DNA 的提取

将纯化好的噬菌体 qdvp001 进行增殖使其效价达到 10^9 PFU/mL 以上, 取出 1 mL 噬菌体液体

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 DNA, 得到的 DNA 用 Elution buffer 溶解, 并置于 -20 °C 保存。琼脂糖凝胶电泳鉴定提取结果。

1.8 噬菌体 qdvp001 基因组的酶切鉴定

分别用限制性内切酶 *Xba* I、*Hind* III、*Eco* R I、*Nde* I、*Dra* I 和 *Bam* H I 将噬菌体 qdvp001 核酸 37 °C 酶切 3 h, 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

反应体系(*Xba* I 还需加 2 μ L 的 BSA)如下: 噬菌体 DNA 5 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, 限制性内切酶 1 μ L, 灭菌三蒸水补足至 20 μ L。

1.9 噬菌体 DNA 序列的测定

1.9.1 噬菌体 DNA 酶切片段构建重组质粒测序: 参照 Tirasak Pasharawipas 等^[8]的方法, 用限制酶 *Xba* I 和 *Hind* III 分别双酶切噬菌体 qdvp001 的 DNA 和 pUC18 载体, 然后用 DNA Fragment Purification Kit (大连宝生物有限公司)回收噬菌体 DNA 酶切产物, 用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit (大连宝生物有限公司)回收 pUC18 载体酶切产物。将两种回收的酶切片段用 T4 DNA 连接酶连接, 转化感受态的大肠杆菌, 挑取平板上的白色菌落进行增殖, 然后提取质粒进行酶切鉴定, 将阳性重组质粒送交上海生工进行测序。

1.9.2 反向 PCR 进行测序: 根据获得的双酶切片段的序列设计反向 PCR 引物(表 1)。分别用限制性内切酶 *Xba* I、*Hind* III、*Eco* R I、*Nde* I 将噬菌体 qdvp001 核酸进行单酶切, 回收酶切片段, 用 T4 连接酶进行环化, 然后以环化的酶切片段为模板进行反向 PCR。采用 50 μ L 的反应体系: 模板 4 μ L, 引物各 2 μ L, LA *Taq* 酶 0.5 μ L, 10 \times LA PCR buffer II (Mg^{2+}) 5 μ L, dNTP mixture 10 μ L, 补充三蒸水至 50 μ L。PCR 反应循环参数为: 94 °C 8 min; 94 °C 1 min, 91 °C 1 min, 72 °C 4 min, 以后每个循环退火温度依次降低 1 °C, 直到 76 °C, 15 个循环; 94 °C 1 min, 76 °C 1 min, 72 °C 4 min, 20 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物纯化后连接于 pMD[®]18-T Simple Vector 载体, 转化感受态的大肠杆菌, 挑取平板上的白色菌落进行增殖, 并送交上海生工公司进行测序。

表1 反向 PCR 引物
Table 1 Inverse PCR primers

引物名称 Primer Name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
JF55Up	GGAACAGGAGGTGTTGAACCTAGACC TTTCTCGCCACG
JF55Down	GTCGCTCAGATTAAGGCTCTAGCCAC CCGCCAGAAGG
JF57Up	GCGTAAAAATCCTGCATTGAACGGGGC TCCTAAAAAATG
JF57Down	TGTCAGTCTTGTCTCAAATATGTGAA TTGGAGGTTGG
JF58Up	TGTTCCAGAAGTACCTTTACCTTCGCC TGAACGAGATG
JF58Down	ATGGCCTCGTGGTTCCATGAAAGGTA AAGGAGCTAAAG

1.9.3 序列分析: 将获得的序列进行拼接, 利用 ORF Finder 软件分析其开放阅读框, 并在 NCBI 上应用 BLAST 进行序列比对, 利用 MEGA 4.0 软件构建同源性分析图谱。

2 结果

2.1 噬菌体的分离纯化

从南山水产市场的污水中分离出了一株噬菌体 qdvp001, 通过双层平板发现, VP17802 被侵染, 出现了大量细小的噬菌斑(图 1), 纯化得到的噬菌斑呈圆形, 中心清亮, 边缘隐约有晕环, 纯化后的噬菌体经液体增殖后效价可达到 10^{10} PFU/mL 以上。

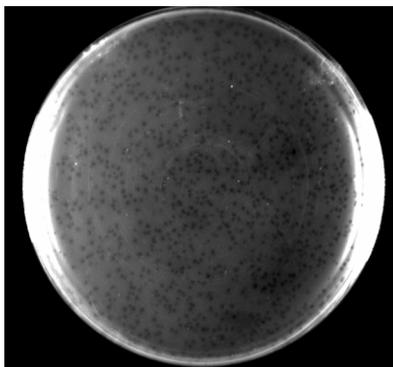


图1 噬菌体 qdvp001 的噬菌斑
Fig. 1 The bacteriophage plaque of qdvp001

2.2 噬菌体的生理特性

2.2.1 噬菌体的热稳定性试验: 热稳定性结果表明(图 2), 噬菌体在 40 °C 保温 60 min 后基本保持原活

性, 在 50 °C 保温 40 min 后噬菌体的存活率为 81.5%, 60 min 后噬菌体的效价仍可维持在 10^8 PFU/mL, 其存活率为 62.1%; 而且在 40 °C 和 50 °C 条件下相比, 噬菌体的活性变化不大。在 60 °C 保温 1 h 效价可在 10^6 PFU/mL 以上, 说明其对 60 °C 以下的温度, 耐受力较强。在 70 °C 和 80 °C 作用噬菌体的效价为 0, 噬菌体基本上被灭活。由此可见该噬菌体对 70 °C 及其以上的高温非常敏感。

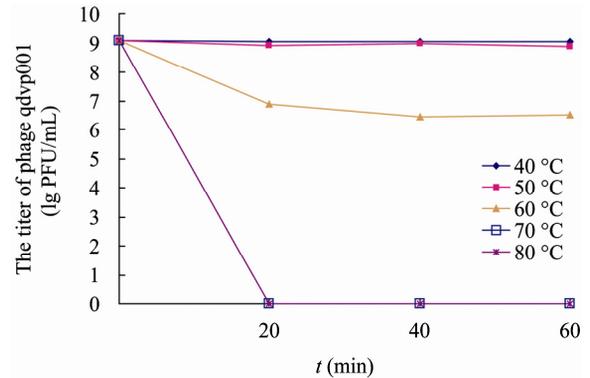


图2 噬菌体 qdvp001 的热稳定性
Fig. 2 Thermal stability of bacteriophage qdvp001

2.2.2 pH 对噬菌体活性的影响: 从曲线(图 3)可以看出, pH 在 4.0–12.0 范围内, 噬菌体都有较高的效价, 说明该噬菌体有较宽的 pH 耐受性, 噬菌体在 pH 3.0 时效价为 0, 且在 pH 12.0 时仍具有较高的效价, 达到 10^8 PFU/mL, 存活率达到 75.3%, 说明此噬菌体具有耐碱不耐酸的特性。在 pH 7.0–8.0 之间噬菌体的效价达到最高, 说明它在此 pH 范围内最稳定, 活性最强, 即此噬菌体的最适 pH 为 7.0–8.0。

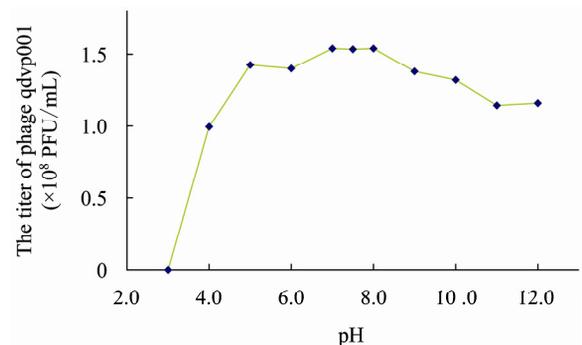


图3 噬菌体的 pH 稳定性
Fig. 3 pH stability of bacteriophage qdvp001

2.2.3 噬菌体最佳 MOI 值的测定: 根据表 2 的实验结果, 感染复数为 10 时, 噬菌体感染宿主菌后产生子代噬菌体的效价最低, 随着感染复数的降低, 噬菌体的效价越来越高, 当感染复数为 0.000 1 时, 噬菌体的效价达到 6.79×10^9 PFU/mL, 在 8 个感染复数中噬菌体的效价最高, 因此可以确定噬菌体 qdvp001 的最佳感染复数是 0.000 1。

表 2 噬菌体最佳感染复数的确定
Table 2 The determination of bacteriophage MOI

感染复数 MOI	噬菌体数 Phage titer	细菌数 VP17802 number	8 h 后噬菌体的效价 Phage titer after 8 h
10.000 000	1×10^{10}	1×10^9	4.1×10^8
1.000 000	1×10^9	1×10^9	6.5×10^8
0.100 000	1×10^8	1×10^9	5.8×10^8
0.010 000	1×10^7	1×10^9	9.6×10^8
0.001 000	1×10^6	1×10^9	2.35×10^9
0.000 100	1×10^5	1×10^9	6.79×10^9
0.000 010	1×10^4	1×10^9	4.25×10^9
0.000 001	1×10^3	1×10^9	3.97×10^9

2.2.4 噬菌体一步生长曲线的测定: 根据一步生长曲线(图 4), 可以明显看出噬菌体 qdvp001 感染宿主菌后 20 min 内, 噬菌体的量没有增加, 即噬菌体 qdvp001 感染宿主菌的潜伏期约 20 min; 噬菌体感染宿主菌后 20–90 min, 噬菌体的量急速增加, 即噬菌体 qdvp001 的裂解期约 70 min; 在随后的 40 min 里, 噬菌体的量变化不大, 即噬菌体进入到稳定期。

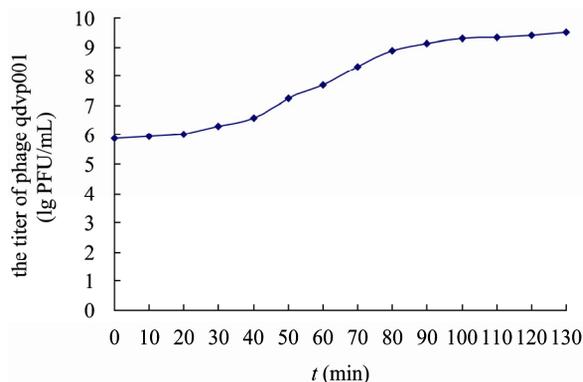


图 4 噬菌体 qdvp001 的一步生长曲线
Fig. 4 One-step growth curve of phage qdvp001

2.3 噬菌体的电镜观察

透射电子显微镜下噬菌体 qdvp001 的形态见图 5。其头部呈正六面形, 推测是正廿面体结构, 尾巴较长, 具有收缩尾鞘。头部直径大约为 79 nm, 尾长大约 118 nm。根据 ICTV 第 8 次报告的最新病毒分类系统的标准^[9], 该噬菌体属于肌尾噬菌体科。

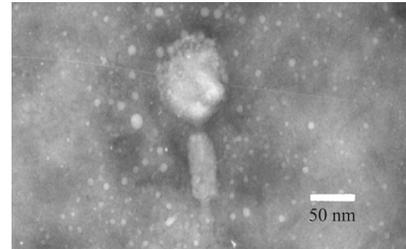


图 5 噬菌体 qdvp001 的电镜照片
Fig. 5 Electron micrograph of phage qdvp001

2.4 噬菌体 DNA 的提取和限制性内切酶酶切分析

采用 UNIP-10 柱式细菌基因组提取试剂盒(上海生工公司)提取的噬菌体核酸纯度较好, 它能够被限制酶 *Xba* I、*Hind* III、*Eco*R I 和 *Nde* I 切开, 而 *Dra* I 和 *Bam*H I 对其不起作用, 即 qdvp001 的 DNA 不含这两种酶的酶切位点。限制酶的酶切分析为下一步的双酶切测序提供了基础。

2.5 噬菌体 qdvp001 的 DNA 序列分析

通过双酶切测序共得到 6 个 DNA 片段序列 (GenBank accession No. 分别为 JF521455、JF521456、JF521457、JF521458、JF521459、JF521460)。通过对反向 PCR 产物测序得到 4 个 DNA 片段 (GenBank accession No. 分别为 JN004069、JN004070、JN004071、JN004072)。将酶切得到的序列与反向 PCR 得到的序列进行拼接, 利用 ORF Finder 软件分析其开放阅读框, 并在 NCBI 上应用 BLAST 进行序列比对, 发现只有 2 个开放阅读框 (GenBank accession No. 为 JN572113、JN572114) 编码的蛋白质分别与其他噬菌体的 Thymidylate synthase 和 Hypothetical protein 具有一定的同源性, 调出这些噬菌体相应序列采用 MEGA 4.0 软件进行同源性分析(图 6、图 7), 结果表明他们的同源性很低。而其他片段形成的开放阅读框所编码的蛋白质的同源性更低, 甚至有些与噬菌体无同源性, 而是与细菌或真核生物具有一定的同源性。

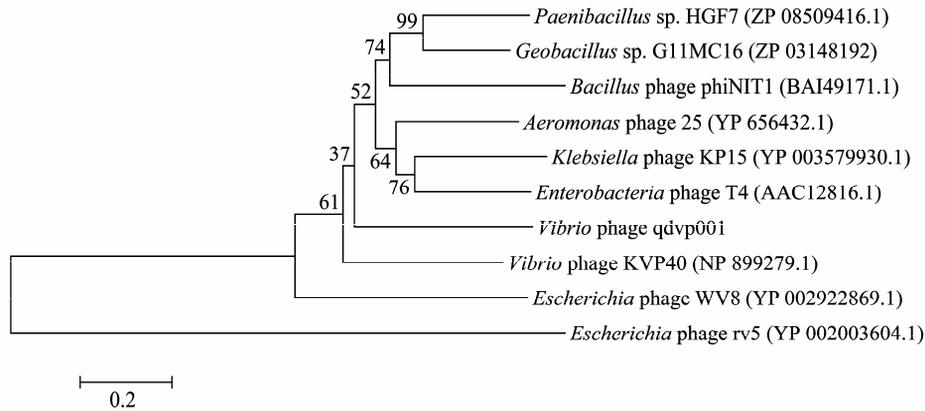


图 6 噬菌体的 Thymidylate synthase 系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the phage based on Thymidylate synthase

注: 分支处数字代表可信度; 括号内代表 GenBank 中序列接受号; 标尺代表进化距离。

Note: The number at the branch is reliability. The serial number in the bracket is GenBank accession number. The scaleplate is evolutionary distance.

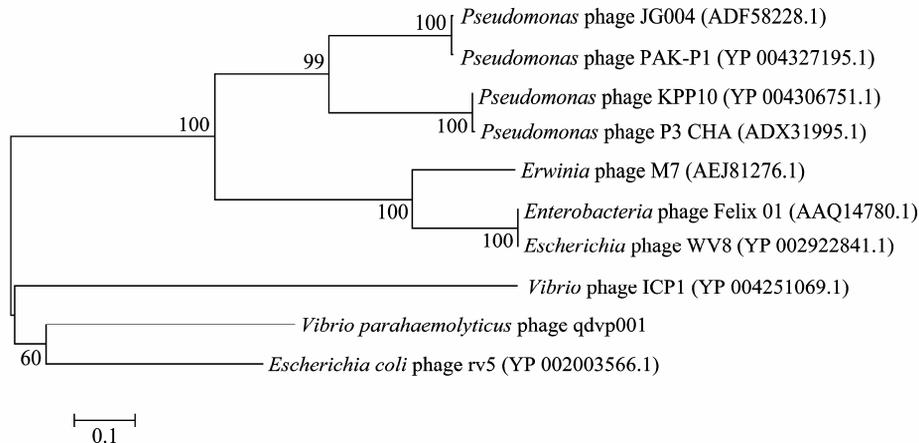


图 7 噬菌体的 Hypothetical protein 系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree of the phage based on Hypothetical protein

注: 分支处数字代表可信度, 括号内代表 GenBank 中序列接受号, 标尺代表进化距离。

Note: The number at the branch is reliability, the serial number in the bracket is GenBank accession number, the scaleplate is evolutionary distance.

3 讨论

本实验中我们分离出了一株以副溶血弧菌 (ATCC17802) 为宿主菌的噬菌体 qdvp001。噬菌体 qdvp001 可耐受 60 °C 的高温, 在 50 °C 作用 40 min 后存活率为 81.5%。杨文新^[10]研究的河流弧菌噬菌体 VP9 的热稳定性较差, 在 50 °C、30 min 下的存活率仅为 44%。噬菌体 qdvp001 在 pH 为 4.0–12.0 之间都有较高的活性, 在 pH 为 12.0 时该噬菌体的存活率为 75.3%。而广东海洋大学邱德全^[11]分离

的副溶血弧菌噬菌体在 pH 12.0 时, 存活率迅速下降, 大约为 25% 左右。副溶血弧菌的最适生长温度为 30 °C–37 °C, 对高温抵抗力小, 50 °C 处理 20 min、65 °C 处理 5 min 或 80 °C 处理 1 min 即可被杀死; 它的最适 pH 为 8.0–8.5, 对酸较敏感, 在 pH 6.0 以下不能生长, 噬菌体 qdvp001 对温度和 pH 的耐受力很强, 在其宿主菌的生长条件下, 该噬菌体都保持着很高的活性, 这为它在食品消毒及卫生检测等方面的应用提供了良好的条件。

噬菌体感染复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^[12]。噬菌体在进行增殖时, 涉及到最佳比例和最大产出的问题, 即最佳感染复数。不同比例的噬菌体感染宿主菌, 得到的噬菌体的效价差别很大, 并不是噬菌体所占的比例越高其产率就越大。同时, 感染复数又是一个简单、易于测定且能够定量评价噬菌体裂解能力的指标, 可以作为筛选治疗性噬菌体的标准之一^[13]。本试验测得的 qdvp001 对 VP17802 的最佳感染复数为 0.000 1, 说明该噬菌体的裂解能力较强, 具有良好的应用前景。

电镜技术已经成为研究病毒的一种重要的手段。根据噬菌体的核酸类型(DNA or RNA, single or double)、衣壳的对称性等方面的特征可以对噬菌体进行分类。根据 VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses 的规定, 有尾噬菌体可分成肌尾噬菌体、长尾噬菌体、短尾噬菌体、复层噬菌体、被脂噬菌体、原质噬菌体等十几个科^[9]。qdvp001 属于肌尾噬菌体科, 该科噬菌体的主要特征为尾可收缩, 尾长 80 nm–455 nm, 尾复合物由中心管及收缩尾鞘组成, 尾藉颈部与头分开, 尾收缩时需要 ATP, 衣壳较大, 具有双链 DNA^[14]。肌尾噬菌体科的代表株为大肠杆菌 T4, 噬菌体 qdvp001 和 T4 之间具有一些形态方面的差别, 最明显的差别是它们头部的形状。qdvp001 的头部是正多面体形, 而噬菌体 T4 的头呈长多面体形, 约 111 nm×78 nm^[14]。副溶血弧菌噬菌体 KVP40 和 VP882 也属于肌尾噬菌体科。KVP40 噬菌体是从海水中分离得到的, 并且具有广泛的宿主菌, 它的头部大小约为 140 nm×70 nm^[15]。可见它的头要比 qdvp001 噬菌体大的多, 且衣壳的形状也不同, 为长多面体; 噬菌体 VP882 的头部为正多面体(48 nm±2 nm), 同其它报道的肌尾噬菌体科的噬菌体相比头部要稍小, 但它的尾巴很长(156 nm±8 nm), 且颈部要比噬菌体 qdvp001 长得多^[16]。

通过对 qdvp001 噬菌体与其它噬菌体比较, 发现 qdvp001 噬菌体的形态和生理特征有其独特性。但 qdvp001 噬菌体是否是一新发现的生物体, 最后还要从基因水平上来判定。因此我们对分离得到的

噬菌体进行了 DNA 测序, 并分析其开放阅读框, 然后在 NCBI 上进行同源性分析。通过比对发现 qdvp001 与其他噬菌体具有一定的同源性, 但同源性较低, 表明该噬菌体很有可能是一种新发现的噬菌体。

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] Su YC, Liu CC. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety[J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549–558.
- [3] 王印庚, 张正, 秦蕾, 等. 养殖大菱鲆主要疾病及防治技术[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 61–68.
- [4] 张昕, 蔡俊鹏. 四种海洋致病弧菌对抗生素敏感性的测定[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2003, 31(9): 66–69.
- [5] Fujino T, Miwatani T, Yasuda J, et al. 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] Fujino T, Sakazaki R, Tamura K. Designation of the type strain of *Vibrio parahaemolyticus* and description of 200 strains of the species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1974, 24(4): 447–449.
- [7] 杜崇涛. 大肠杆菌 0157 噬菌体的分离鉴定及其初步应用[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2008.
- [8] Tirasak P, Surasak T, Siriporn S, et al. Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand[J]. Virus Research, 2005, 114(1/2): 63–69.
- [9] 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.
- [10] 杨文新, 张岚翠, 邹侠. 一株海洋弧菌噬菌体-VP9 的分离和特性研究[J]. 辽宁师范大学学报: 自然科学版, 2004, 27(4): 468–470.
- [11] 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.
- [12] 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: 扬州大学硕士学位论文, 2009.
- [13] 牛冬燕. 应用噬菌体控制牛及其饲养环境中大肠杆菌

