

参赛队员姓名：胡婉琳

中学：北京汇文中学

省份：北京

国家/地区：中国/北部

指导教师姓名：黄力

指导教师单位：中国科学院微生物研究所

论文题目：青海湖噬菌体多样性及与宿主
相互作用



北京汇文中学
BEIJING HUIWEN MIDDLE SCHOOL

研究报告

青海湖噬菌体多样性及与宿主相互作用

作者：胡婉琳

学校：北京汇文中学

指导：刘旺、黄力

宋秀珍（北京汇文中学）

所属院校：中国科学院大学

中国科学院微生物研究所

摘 要

噬菌体广泛存在于各种含盐环境中，担负着重要的生态功能。青海湖是我国最大的内陆湖，也是最大的咸水湖，但青海湖噬菌体至今鲜有报道。本研究利用采自青海湖的沉积物样品，分离得到 35 个菌株。根据 16S rRNA 基因序列分析，它们分别属于 4 个门的 13 个属，包括 6 个潜在新种。而后，通过丝裂霉素 C 诱导，从 3 个菌株中获得了 3 株头尾状噬菌体，即 QHL-VH1、QHL-VB5 和 QHL-VC10-3，它们分别感染 *Methylobacterium* sp. H1、*Halomonas* sp. B5 和 *Halomonas* sp. C10-3 菌株。对 QHL-VB5 进行了进一步分析，该噬菌体为长尾噬菌体，其基因组为 dsDNA，G+C 含量为 61.72%。通过测序获得了其部分基因组序列，基因组长度约为 40,078 bp，共有 61 个 ORFs。基因注释显示，该噬菌体编码结构蛋白、整合酶、转录调控因子及宿主细胞裂解相关蛋白。根据 SDS-PAGE 分析，噬菌体颗粒含 4 个主要结构蛋白，大小分别约为 55kDa、40kDa、35kDa 和 11kDa，质谱鉴定显示，它们分别为门户蛋白（phage portal protein）、假定蛋白（hypothetical protein）、主要衣壳蛋白（major capsid protein）、假定蛋白（hypothetical protein）。本研究首次报道了青海湖噬菌体的分离纯化，为认识噬菌体在青海湖生态系统中的作用提供了帮助。

关键词：青海湖；细菌分离培养；噬菌体分离培养；QHL-VB5；噬菌体鉴定

Abstract

Bacteriophages widely exist in various salt-containing environments and serve important ecological functions. Qinghai Lake is the largest inland lake as well as the largest saltwater lake in China. However, few reports on bacteriophages in Qinghai Lake are available at the present. In this study, 35 bacterial strains were isolated from sediment samples collected from Qinghai Lake. As revealed by 16S rRNA gene sequence analysis, they belong to 13 genera of four phyla, including six potential new species. Three head-tailed phages, named QHL-VH1, QHL-VB5 and QHL-VC10-3, were purified through mitomycin C induction from three of the strains, identified as *Methylobacterium* sp. H1, *Halomonas* sp. B5 and *Halomonas* sp. C10-3, respectively. QHL-VB5 was further studied. It belongs to *Siphoviridae*, and contains a dsDNA genome with a G+C content of 61.72%. The partial genome sequences of QHL-VB5 were obtained, the length of the genome is about 40,078 bp with 61 ORFs. Gene annotation revealed that the phage encodes structural proteins, integrases, transcriptional regulators, and proteins associated with host cell lysis. According to SDS-PAGE analysis, the phage particle contains four major structural proteins. They were identified as a phage portal protein (~55kDa), a major capsid protein (~35

kDa) and two hypothetical proteins (~40 and ~11 kDa) by mass spectrometry. This is the first report of the isolation and purification of phages from Qinghai Lake. Our results contribute to the understanding of the role of bacteriophages in the Qinghai Lake ecosystem.

Key Words: Qinghai Lake, Isolation of bacteria, Isolation of phages, QHL-VB5, Phage identification

目录

第 1 章 绪论.....	7
1.1 研究背景.....	7
1.1.1 环境病毒概述.....	7
1.1.2 青海湖及其噬菌体研究.....	8
1.1.3 噬菌体-宿主相互作用.....	8
1.1.4 嗜盐菌噬菌体基因组学研究.....	10
1.1.5 噬菌体的计数.....	10
1.2 研究目的及意义.....	11
第 2 章 研究内容与方法.....	11
2.1 实验材料.....	11
2.1.1 酶、试剂及试剂盒.....	11
2.1.2 培养基.....	12
2.1.3 其它试剂.....	12
2.1.4 引物.....	12
2.2 实验方法.....	13
2.2.1 沉积物样品.....	13
2.2.2 微生物富集培养.....	13
2.2.3 菌种分离和纯化.....	13
2.2.4 菌种保藏.....	14
2.2.5 细菌的初步鉴定.....	14
2.2.6 沉积物噬菌体的洗脱.....	15

2.2.7 噬菌体的分离.....	16
2.2.8 噬菌体 DNA 的提取与鉴定.....	16
2.2.9 宿主菌 B5 生长曲线的测定.....	17
2.2.10 噬菌体结构蛋白分析.....	17
2.2.11 噬菌体宿主范围检测.....	17
2.2.12 噬菌体基因组和系统发育学分析.....	17
第 3 章 研究结果与分析.....	18
3.1 青海湖沉积物可培养微生物的分离培养及多样性分析.....	18
3.2 青海湖沉积物噬菌体的多样性.....	19
3.3 噬菌体的分离和形态观察.....	20
3.4 宿主菌 B5 的生长曲线.....	21
3.5 噬菌体 QHL-VB5 结构蛋白的分析.....	22
3.6 噬菌体 QHL-VB5 宿主范围测定.....	23
3.7 噬菌体 QHL-VB5 及其宿主 Halomonas B5 的基因组学分析	23
3.8 QHL-VB5 的系统发育学分析.....	25
第 4 章 讨论.....	27
第 5 章 展望.....	28
参考文献.....	29
附录.....	31
致谢.....	39

第 1 章 绪论

1.1 研究背景

1.1.1 环境病毒概述

病毒是一类只能在活细胞内寄生的非细胞微生物，它们依靠其宿主代谢系统来复制核酸、合成蛋白质等，然后再通过装配得以增殖。病毒广泛存在于各类环境中，包括高盐环境。高盐环境是病毒含量最丰富的水环境之一，病毒样颗粒浓度可达 10^9 个/mL^[1]。病毒控制着环境中微生物群落的数量和构成，影响宿主驱动的元素地球化学循环，还能够介导水平基因转移^[2]，因此担负着非常重要的生态功能。

目前，人们从高盐环境中已分离得到 100 余株病毒，但其数量只占原核生物病毒（6300 余株）的不到 1.6%^[3]。截止至 2016 年 4 月，有 100 多株嗜盐菌病毒被报告和描述，其中 90 多株感染古菌，14 株感染细菌^[4]。

侵染细菌的病毒也称为噬菌体（Bacteriophage）。目前，从高盐环境中共分离到 14 株噬菌体（表 1.1）^[1]，包括长尾、肌尾、短尾和无尾 4 种形态，前 3 种归属于有尾噬菌体目（Caudovirales）。

表 1.1 从高盐环境中分离到的细菌噬菌体

Table 1.1 Bacteriophages isolated from hypersaline environments

噬菌体 Phage	来源 Origin	宿主 Host	形态 Morphology	类型 Type	基因组大小 Genome size (kb)
F9-11	西班牙高盐土壤中嗜盐单胞菌 (溶原)	<i>Halomonas halophila</i> G-2	长尾	溶原	ND
F5-4	西班牙高盐土壤中嗜盐单胞菌 (溶原)	<i>Halomonas halophila</i>	长尾	溶原	ND
F12-9	西班牙高盐土壤中嗜盐单胞菌 (溶原)	<i>Halomonas halophila</i>	长尾	溶原	ND
HM-15	西班牙高盐土壤	Uncharacterized strain 121	长尾	烈性	ND
HM-5	西班牙高盐土壤	Uncharacterized strain 131	长尾	烈性	ND
SCTP-I	意大利海水	<i>Salicola</i> sp. PV3	长尾	烈性	ND
QHHSV-1	中国云南乔后盐矿	<i>Halomonas ventosae</i> QH52-2	长尾	烈性	37

续表 1.1

Ps-G3	加拿大盐场	<i>Pseudomonas</i> sp. G3	肌尾	烈性	ND
UTAK	西班牙盐沼	<i>Salinivibrio costicola</i> sp. B1	肌尾	烈性	80
ΦgspC	美国盐渍土中盐单胞菌	<i>Halomonas</i> sp. 21	肌尾	溶原	340
SCTP-2	意大利海水	<i>Salicola</i> sp. PV4	肌尾	烈性	ND
SCTP-3	意大利海水	<i>Salicola</i> sp. S3-1	肌尾	烈性	ND
CW02	美国大盐湖	<i>Salinivibrio</i> sp. SA50	短尾	烈性	49
SSIP-I	以色列海水	<i>Salisaeta</i> sp. SP9-1	无尾	烈性	44

高盐环境中噬菌体分布非常广泛、种类也十分丰富，因其重要的生态功能，近来日益受到关注。虽然历经近30年的研究，但嗜盐菌噬菌体至今仅有10余株得到分离与培养，因此，分离纯化更多嗜盐菌噬菌体将有助于深入认识其生物学特征和生态功能，还将增加噬菌体资源储备。

1.1.2 青海湖及其噬菌体研究

青海湖地处青藏高原东北部，西宁市西北部，位于东经99°36′~100°16′，北纬36°32′~37°15′，是中国最大的内陆咸水湖，年平均气温 -1.5℃~1.5℃^[5]，面积为4456 km²^[6]，pH值约为9.2，盐含量为13.23~14.04 g/L^[7]。该湖处于西风带、东亚和印度夏季季风三大气候系统的交汇处，在过去的几十年里经历了明显的面积变化，是国家级自然保护区，国际重要湿地保护区^[8]，对于维护青藏高原东北部的生态安全具有重要意义。

青海湖具有丰富的生物资源，由于地理位置特殊，其对气候变化十分敏感，具有低温、低氧、高海拔、强辐射和昼夜温差大等特点。与此相适应，青海湖孕育和保存了独特的生物多样性，其水体与沉积物中栖息着嗜盐、嗜冷和嗜碱等多种微生物，但目前关于青海湖嗜盐菌噬菌体的相关报道较少^[9]。

1.1.3 噬菌体-宿主相互作用

(1) 噬菌体感染类型

噬菌体感染宿主可分为裂解性感染（lytic）、溶原性感染（lysogenic）、伪溶原性感染（pseudo lysogenic）、慢性感染（chronic）四种类型^[10]。常见的裂解方式为裂解性感染和溶原性感染两种：

- ① 裂解性感染：烈性噬菌体感染宿主菌的过程分为吸附、侵入、复制、装配、裂解这五个阶段，在入侵宿主细胞后裂解性噬菌体立即进入裂解循环，噬菌体基因组被复制并包装成子代噬菌体颗粒，然后通过宿主细菌裂解释放^[11]。
- ② 溶原性感染：引起溶原性感染的噬菌体被称为温和噬菌体。其可以进入溶原循环，将基因组整合到细菌染色体中成为前噬菌体（prophage），并作为宿主染色体的一部分。在丝裂霉素 C（Mitomycin C, MMC）、紫外线（UV）等条件的诱导下^[12]，细菌发生 SOS 反应，前噬菌体基因组切出，进入裂解循环。许多温和噬菌体也会发生低频的自发裂解与释放^[13]。另有一种假溶原性，假溶原性是一种不稳定的状态：在营养缺乏的条件下，噬菌体基因组保持非整合和非复制的状态；在营养条件改善时，噬菌体进入溶原或裂解生命周期（见图 1.1）^[11]。

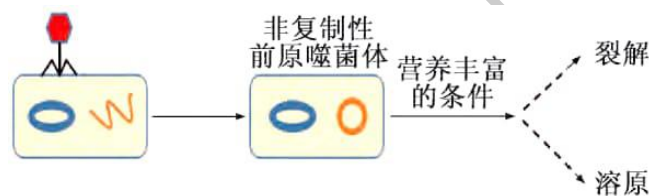


图 1.1 假溶原性示意图（孙亮, 徐凤宇等, 2019）

Figure 1.1 Schematic diagram of pseudolysogenicity

（2）噬菌体-宿主的攻防机制

在漫长的进化过程中，噬菌体与细菌处于你攻我防、此消彼长的状态，它们之间形成了一种复杂的互相抵抗机制^[14]。噬菌体感染并寄生于宿主细胞，需要不断适应和改变宿主细胞的环境以帮助自身完成复制、装配、释放子代噬菌体粒子或潜伏感染的生命过程。另一方面，宿主细胞为抵御噬菌体入侵，会做出多种反应，包括以启动抗噬菌体通路或凋亡通路等方式来达到清除噬菌体的目的^[15]。

① 宿主抵抗噬菌体的防御机制

为了抵御噬菌体感染，细菌进化出免疫系统以避免噬菌体吸附或阻止其 DNA 复制。目前，研究较多的防御机制有，CRISPR-Cas 系统、流产性感染机制（abortive-infection mechanisms, ABI）、限制修饰系统（R-Msystem）、阻断吸附等机制^[15]。

② 噬菌体抵抗宿主的防御机制

针对细菌免疫系统,噬菌体在与宿主的持续对抗中同步进化出了抗性机制,主要有 Anti-CRISPR 系统、毒素-抗毒素系统 (toxin antitoxin system, TA)、对抗限制性修复的系统和适应新受体等机制^[15]。

1.1.4 嗜盐菌噬菌体基因组学研究

目前,已确定核酸类型的高盐环境嗜盐菌噬菌体基因组均为双链 DNA^[1]。早期噬菌体研究主要集中在形态结构、感染特征上,而近 10 年来才对噬菌体进行比较详细的基因组学研究。随着测序技术的发展,噬菌体 Φ gspC、SSIP-I 和 CW02 先后被测序,并进行了比较详细的生物信息学分析^[1],其中,最引人注目的是噬菌体 Φ gspC,其基因组异常庞大,达到 340 kb^[16]。截止 2016 年 6 月,NCBI 上 80%以上噬菌体的基因组都小于 100 kb^[1]。

目前,嗜盐菌噬菌体的基因组学研究还处于起步阶段,预测出的部分开放阅读框 (open reading frames, ORFs) 功能未知,已知的功能一般涉及到结构基因、装配基因、复制和调控基因,以及裂解或溶源性基因等模块^[1]。嗜盐菌噬菌体可能有着一套独特的调控生命活动的基因体系^[1],因此,其 ORFs 的功能亟待更多研究。

1.1.5 噬菌体的计数

噬菌体颗粒非常微小,一般在 50-200 nm 之间,很难在光学显微镜下观察,也无法用分光光度法进行计数。目前,对于细菌噬菌体进行定量检测的常用方法有:噬菌斑计数法 (Plaque-forming unit, PFU)、实时荧光定量 PCR 技术 (qPCR) 和透射电镜技术 (Transmission electron microscopy, TEM)。

(1) 噬菌斑计数法

在适当条件下,一个噬菌体颗粒形成一个噬菌斑。噬菌斑计数法是根据样品在双层宿主平板上形成噬菌斑的数量来计算噬菌体的数量。PFU 通常仅适用于检测感染可培养宿主的烈性噬菌体,但环境中通常只有约 1%细菌可在实验室培养^[17],且宿主很可能由于已被噬菌体感染而对该噬菌体具有抗性,不形成噬菌斑。因此,该方法有一定的局限性。但由于该方法操作比较简便,准确度较高,在噬菌体的分离纯化和生物学分析方面起到了不可或缺的作用。

(2) 实时荧光定量 PCR 技术

实时荧光定量 PCR 技术主要分为 DNA 染料法 (常用 SYBR Green I、SYBR Gold、EvaGreen 与 EB)、荧光探针法、水解探针法。荧光是指在标准 PCR 体系中加入荧光物质;实时是指通过荧光信号的积累能够实时监测每次循环后 PCR 产物的变化,并生成荧光扩增曲线;定量是指该技术能够实现对初始模板的定量分析^[18]。通常将 PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,

设定为荧光域值 (threshold) [19]。每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数为 Ct 值 (Cycle threshold) 研究表明, 每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 可通过已知起始拷贝数的标准品得到标准曲线。只要获得未知样品 Ct 值, 即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数[20]。该技术对 PCR 反应中的模板进行定量, 使得定量更准确、灵敏。

(3) 透射电镜技术

透射电镜技术是测定噬菌体颗粒的常用方法, 使用乙酸双氧铀等染料对样品进行负染色, 可在透射电子显微镜下对噬菌体进行观察与计数。与 PFU 计数法相比, TEM 的优势在于噬菌体无需感染宿主即可直接计数, 同时能够提供噬菌体头部大小、尾部长短等形态信息[21]。

1.2 研究目的及意义

青海湖是我国最大的内陆湖, 具有独特的理化特征, 发挥重要的生态作用, 因此, 青海湖的生物多样性长期受到关注。但关于青海湖噬菌体的研究报道至今很少。本研究聚焦青海湖沉积物中的嗜盐菌噬菌体, 旨在丰富对青海湖中噬菌体分布和生物学特征的认知, 同时, 增加噬菌体资源储备。

第 2 章 研究内容与方法

2.1 实验材料

2.1.1 酶、试剂及试剂盒

表 2.1 主要实验试剂列表

Table 2.1 List of main experimental reagents

试剂名称	来源
丝裂霉素 C	MedChemExpress
氯化铯	Amresco
溶菌酶	Omega
蛋白酶 K	Takara
胶回收试剂盒	庄盟
DNA ladder	TIANGEN
Protein ladder	Fermentas
Bacterial DNA Kit	Omega
2×T5 Super PCR Mix (Colony)	Tsingke
其他化学试剂	国药集团

2.1.2 培养基

(1) 富集培养培养基:

L1 (g/L): 人工海水, 1 L; 硝酸钾, 2; 硫酸铵, 0.1; 五水合硫代硫酸钠, 2.5; 碳酸氢钠, 2; 维生素, 2.5 mL; pH9.0。

固体培养基中加入 1.5 g/mL 琼脂粉, 121 °C 灭菌 20 min。

1/3 2216E (g/L): 1/3 人工海水 1 L, 蛋白胨 1.67, 酵母浸粉 0.33, 柠檬酸铁 0.03, pH9.0。

固体培养基中加入 1.5 g/mL 琼脂粉, 121 °C 灭菌 20 min。

(2) 细菌分离培养基:

R2A (g/L): 人工海水, 1 L; 酵母提取物, 0.5; 蛋白胨, 0.5; 酪蛋白水解物, 0.5; 葡萄糖, 0.5; 甘露糖, 0.5; O-淀粉, 0.5; 丙酮酸钠, 0.3; pH9.0。

固体培养基中加入 1.5 g/mL 琼脂粉, 121 °C 灭菌 20 min。

1/3 2216E (g/L)

(3) 传代培养及形态观察所用培养基:

1/3 2216E (g/L)

2.1.3 其它试剂

(1) 人工海水

NaCl, 23.477 g; Na₂SO₄, 3.917 g; MgCl₂·6H₂O, 4.981 g; CaCl₂, 1.102 g; NaHCO₃, 192 mg; KCl, 664 mg; KBr, 6 mg; H₃BO₃, 20 mg; SrCl₂, 24 mg; NaF, 3 mg; ddH₂O, 1 L

(2) SM 缓冲液

10 mM Tris-HCl (pH 7.5); 100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄

(3) 透射电镜负染液

2% 乙酸双氧铀, 用 ddH₂O 溶解, 4 °C 保存

(4) SDS-PAGE 上样缓冲液 (2×)

100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.2% 溴酚兰, 4% SDS, 200 mM β-巯基乙醇, 20% 甘油

2.1.4 引物

细菌 16S rDNA 通用引物

27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

2.2 实验方法

2.2.1 沉积物样品

本研究中的 6 份青海湖地区沉积物样品由本实验室郑小伟博士于 2018 年 8 月采集自青海湖，样品编号为 S1、S2、S3、S4、S5、S7，沉积物样品详细信息见表 2.2。

表 2.2 青海湖沉积物样品信息表
Table 2.2 Sediment samples from Lake Qinghai

Sample number	Depth of water	N	E	T/°C	pH
S1	26.80m	36°42'41.44"	100°24'59.40"	12	9.84
S2	24.40m	36°41'54.08"	100°26'50.46"	/	/
S3	20.00m	36°22'4.54"	100°28'45.11"	12.4	9.84
S4	22.00m	36°40'46.70"	100°28'22.82"	/	/
S5	24.00m	36°41'23.10"	100°27'0.38"	/	/
S7	20.00m	36°40'25.30"	100°26'26.09"	12.1	9.82

2.2.2 微生物富集培养

(1) 好氧培养：称取 5 g 沉积物样品于 100 mL 1/3 2216E 培养基中进行好氧富集培养，于培养箱中 18 °C、180 rpm 摇床震荡培养 30 天。

(2) 无氧培养：称取 5 g 沉积物样品，置于 20 mL 1/3 2216E 培养基中，采用厌氧瓶抽真空，充氮气，反复 5 次，于培养箱中 18 °C、100 rpm 摇床震荡培养 30 天。

2.2.3 菌种分离和纯化

依据 2.1.2 液体培养基将富集物 10^3 、 10^4 和 10^5 倍稀释后取 50 μ L 涂布于 R2A 及 1/3 2216E 固体培养基，18 °C 培养。待长出可辨认菌落后，根据形状、颜色、大小等特征进行区分，挑取单菌落于 R2A 及 1/3 2216E 固体培养基上，分区划线法进行纯化。

2.2.4 菌种保藏

将宿主菌在 1/3 2216E 培养基中培养至 OD₆₀₀ 约为 0.5, 取 1 mL 菌液加入 2 mL 冻存管中, 加入 1 mL 30% 甘油于液氮中速冻, -80 °C 冰箱冻存。

2.2.5 细菌的初步鉴定

参照东秀珠等鉴定方法^[22]进行菌株的初步鉴定。

选择代表性的菌株, 测定 16S rRNA 基因序列, 从划线纯化的固体平板上挑取单菌落至 1.5 mL EP 管中, 加入 0.4 M NaOH 和 2% SDS 各 5 μ L, 室温裂解 5 min, 加入 90 μ L ddH₂O 稀释制备成菌体裂解液。取 1 μ L 菌液或菌体裂解液作为模板, 以 27F 和 1492R 为引物, 使用 T5 Super PCR Mix (Colony) 进行 16S rRNA 基因的扩增。

PCR 反应体系为:

2×T5 Super PCR Mix (Colony)	25 μ L
27F (10 μ M)	1 μ L
1492R (10 μ M)	1 μ L

菌落模板微量

ddH₂O 补足至 50 μ L

PCR 扩增程序为:

98 °C	3 min	
98 °C	10 s	} 35 个循环
56 °C	10 s	
72 °C	15 s	
72 °C	5 min	

后将 PCR 产物进行测序, 将测序结果提交到 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 与有效描述菌株的基因序列进行比对, 推测所属类群 (图 2.1)。



图 2.1 单菌落分离与鉴定流程

Figure 2.1 Flow chart of single colony isolation and strain identification

2.2.6 沉积物噬菌体的洗脱

取 5 g 沉积物样品溶解于 80 mL 经 0.22 μm 过滤灭菌的人工海水中, 加 4 mL 去污剂溶液 (0.1M EDTA, 0.1M 焦磷酸钠, 1%吐温 80), 18 $^{\circ}\text{C}$, 150 rpm 摇床震荡过夜培养; 取出培养物, 加入 100 μL 丝裂霉素 C 继续摇床培养 5 h; 取培养液 45 mL 于离心管中, 8000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取出上清液, 将沉淀用过滤灭菌的人工海水重悬涡旋震荡 30 s, 8000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min; 取出上清液, 合并两次上清液, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 27000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 超速离心 1 h; 弃上清, 沉淀用 1 mL 灭菌 SM 缓冲液重悬; 电镜观察, 拍照记录。噬菌体浓缩液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 (图 2.2)。

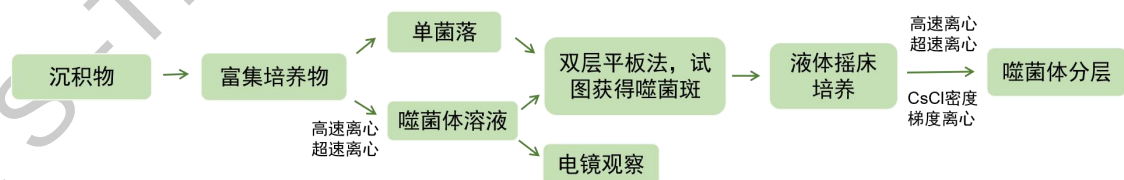


图 2.2 噬菌体的分离与纯化流程

Figure 2.2 Flow chart of virus separation and purification

2.2.7 噬菌体的分离

(1) 噬菌体浓缩液的制备

参照 Domelier 等的方法, 向 1/3 2216E 培养基中接种 1%含噬菌体宿主, 18 °C, 150 rpm 振荡培养约 5 h; 当培养液的 OD₆₀₀ 为 0.4-0.6 时, 加入丝裂霉素 C 至终浓度为 1 µg/mL, 诱导噬菌体释放; 继续振荡培养约 12 h, 将培养液置于 50 mL 离心管中, 在高速离心机中 4 °C, 10000 rpm 离心 30 min; 取上清液, 0.22 µm 滤膜过滤, 去除上清中的菌体, 27000 rpm, 4 °C超速离心 1 h, 弃上清, 沉淀用 0.5-1 mL 灭菌后的 SM 缓冲液重悬, 得到噬菌体浓缩液, 4 °C冰箱保存备用。

(2) 噬菌体形态的电镜观察

辉光放电 15 s 清洁铜网, 取噬菌体浓缩液样品 20 µL 滴在封口膜上, 将铜网倒扣在液滴上 1 min 并晾干; 用 2%乙酸双氧铀溶液负染色约 30 s, 自然干燥 15 min 以上, 使用 JEM-1400 电子显微镜进行观察并拍摄照片, 记录噬菌体形态, 并根据冯烨等整理的噬菌体最新分类体系^[23]初步进行噬菌体分类。

(3) 噬菌体的纯化

采用氯化铯 (CsCl) 密度梯度离心法对浓缩后的噬菌体进行纯化: 制备 0.9 g/mL 氯化铯 10%甘油储存液, 并将纯化的噬菌体溶液用 ddH₂O 稀释, 加入超离管中; 用矿物油封口后配平, 热封管口, 将离心管盖上适配的管盖配平, 两管误差不得超过 10 mg; 4 °C, 45,000 rpm 离心 24 h; 用酒精棉球清洁超离管外壁, 用小号针头从超离管上方插入, 使内外气压平衡; 用大号针头注射器扎入超离管, 抽取白色或淡蓝色的噬菌体条带。用孔径为 30 kDa 超滤管对抽取出的噬菌体溶液进行脱盐处理, 纯化后的噬菌体用 SM 缓冲液重悬。

富集后的噬菌体置于 4 °C条件下避光保存, 用于后续噬菌体的形态观察和核酸提取等实验。

2.2.8 噬菌体 DNA 的提取与鉴定

噬菌体的总DNA采用OMEGA的Bacterial DNA Kit或Viral DNA Kit提取, 具体如下:

取 OD₆₀₀ 为 0.5 的菌液 1 mL, 12000 rpm 离心 1 min 后弃上清液, 获得菌体沉淀; 加入适量 1×TE 缓冲液重悬菌体, 向菌体中加入 10 µL 溶菌酶, 37 °C水浴孵育 30 min; 加入蛋白酶 K (20 mg/mL) 和 20% SDS, 使终浓度分别为 1.4 µg/µL 和 1%, 总体积为 710 µL, 50 °C水浴 4-5 h; 1 µL RNaseA, 37 °C水浴孵育 30 min; 向消化产物加入 100 µL 5 M NaCl, 混匀后, 加入预热后的等体积 2% CTAB, 65 °C水浴孵育 10 min; 加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 4 °C, 13000

rpm 离心 30 min; 取上层的水相 800 μ L, 加入等体积氯仿: 异戊醇 (24: 1), 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm, 离心 10 min; 取上层水相 800 μ L, 加入 2 倍体积无水乙醇, 混匀后 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 2 h; 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm, 离心 30 min, 弃上清, 用 70% 冰乙醇洗涤一次; 干燥后, 取适量 ddH₂O 或 1 $\times$ TE 缓冲液溶解 DNA, Nanodrop 测定 DNA 浓度, -20 $^{\circ}$ C 冻存。

样品进行测序, 序列信息提交到 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 与有效描述噬菌体的基因序列进行比对。

2.2.9 宿主菌 B5 生长曲线的测定

将活化好的宿主菌 B5 接种于灭菌后的培养基 1/3 2216E 中, 始 OD₆₀₀ 约为 0.02, 25 $^{\circ}$ C 摇床培养。每隔 2-3 h 从培养液中取样, 用紫外分光光度计测定 OD₆₀₀。对于诱导噬菌体复制的样品, 培养至 10 h 加入丝裂霉素 C 至终浓度为 1 μ g/mL。

2.2.10 噬菌体结构蛋白分析

取纯化后的噬菌体浓缩液, 加入 2 $\times$ 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 13000 rpm 离心 10 min, 15% SDS-PAGE 电泳, 110 V, 2-3 h; 将 SDS-PAGE 上分离的条带逐条切下, 胰酶酶解后进行质谱鉴定, 所获的质谱数据使用 MASCOT 软件搜索分析。

2.2.11 噬菌体宿主范围检测

选取青海湖沉积物中分离的同属菌 (附录 2): K3、D4、C15、K9、C7、K2-2、C17、C5、C10-3、K5、K6, 检测所分离噬菌体的宿主范围。

配置琼脂浓度为 1.5 g/ml 的 1/3 2216E 固体培养基, 倒在培养皿中, 待平板凝固, 取 1 mL 对数生长期的同属菌菌液和 5 mL 约 45 $^{\circ}$ C 琼脂浓度为 0.6 g/ml 的 1/3 2216E 培养基快速混和, 均匀倒在单层培养基上, 待平板凝固后, 取纯化的噬菌体悬液 5 μ L, 滴定在平板上, 置于培养箱中培养, 观察是否有噬菌斑出现。

2.2.12 噬菌体基因组和系统发育学分析

(1) 噬菌体基因功能注释

样品进行测序后, 采用美国国家生物技术信息中心网站 (NCBI) 非冗余 (Non-Redundant, NR) 蛋白数据库的 protein-protein BLAST (Blastp) 搜索算法, 以 E-value $\leq e^{-3}$ 为阈值对噬菌体基因组预测的 ORFs 进行搜索比对, 根据得到的同源基因的功能进行注释。

(2) 噬菌体基因产物跨膜结构域预测

采用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线预测软件对噬菌体基因产物进行跨膜结构域的预测。

(3) 噬菌体系统发育进化树的绘制

使用 MEGA 软件, 基于噬菌体整合酶 (integrase) 氨基酸序列, 与 20 株噬菌体的整合酶进行比较, 构建邻接法系统发育树。同时, 使用 MEGA 软件, 基于噬菌体主要衣壳蛋白氨基酸序列, 与 15 株目前已分离到的盐单胞菌属细菌噬菌体的主要衣壳蛋白进行比较, 构建邻接法系统发育树。

(4) 病毒基因组图谱的绘制及基因功能注释

将预测的 ORFs 用 NCBI BLASTp 进行序列比对, 并对基因进行功能注释 ($E\text{-value} \leq e^{-3}$)。采用 easyfig 软件绘制病毒基因组图谱。

第 3 章 研究结果与分析

3.1 青海湖沉积物可培养微生物的分离培养及多样性分析

为了从青海湖分离纯化噬菌体, 我们首先尝试从青海湖分离纯化有可能是噬菌体宿主的细菌菌株。本研究从 6 份青海湖沉积物样品中共分离、纯化得到 35 株菌株 (见附录 1)。在菌落形态特征上, 形状以圆形、椭圆形居多; 菌落颜色以白色、乳白色居多, 部分菌落呈红色、粉色、黄色。

我们对这些菌株的 16S rRNA 基因序列进行测定, 发现其中有 28 株属于变形菌门 (*Proteobacteria*), 3 株属于 *Firmicutes* (厚壁菌门), 3 株属于 *Actinobacteria* (放线菌门), 1 株属于 *Bacteroidetes* (拟杆菌门) (图 3.1)。

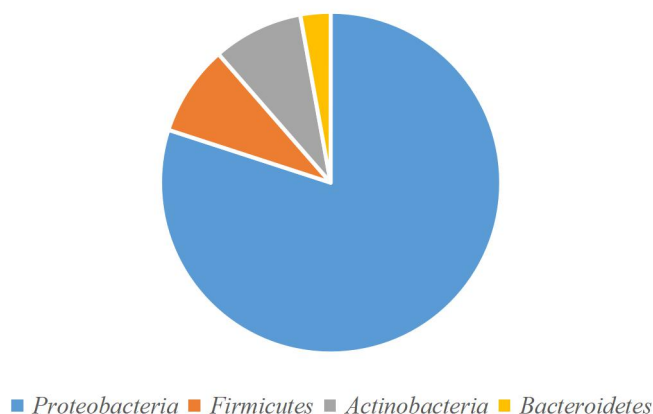


图 3.1 分离菌株门水平统计

Figure 3.1 Taxonomic distribution of isolated strains at the phylum level

分离得到的 35 株细菌归为 14 个属，分别为，*Methylobacterium*（甲基杆菌属），*Planktosalinus*，*Pseudomonas*（假单胞菌属），*Microbacterium*（微杆菌属），*Idiomarina*（海源菌），*Halomonas*（盐单胞菌属），*Thalassospira*（海旋菌），*Paracoccus*（副球菌属），*Planococcus*（动性球菌属），*Kocuria*（考克氏菌属），*Marinobacter*（海杆菌属），*Neorhizobium*（新根瘤菌属），*Lysinibacter*（赖氨酸杆菌属），*Nocardioides*（类诺卡氏菌属）（图 3.2）。其中，*Idiomarina*（海源菌），*Halomonas*（盐单胞菌属），*Thalassospira*（海旋菌）为优势属。

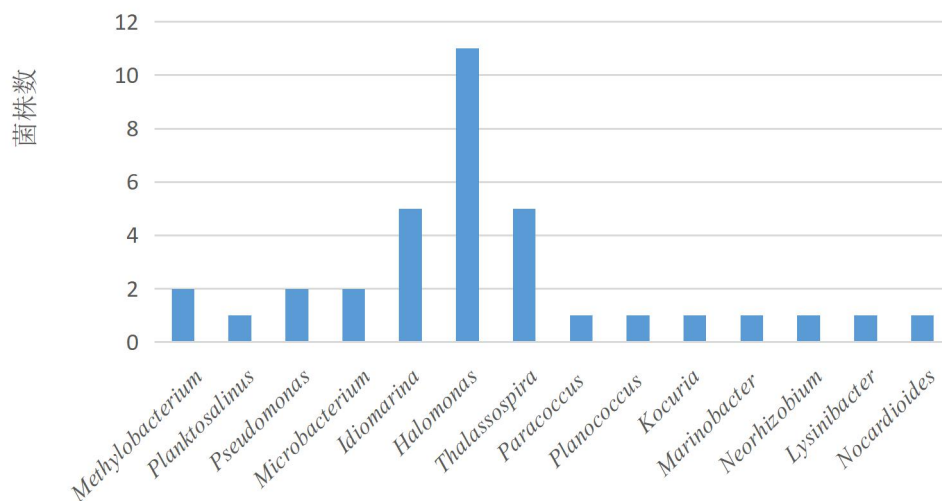


图 3.2 分离菌株属水平分布

Figure 3.2 Taxonomic distribution of isolates at the genus level

测序结果经与 NCBI 网站有效描述菌株的基因序列进行比对，其中 6 株菌株 H3、C1、C4、C6-1B、K1D 和 C6-1A 与其最近模式菌序列相似性均低于 97%。基于 16S rDNA 系统发育分析，推测这 6 个菌株可能为潜在新种。

3.2 青海湖沉积物噬菌体的多样性

为了了解青海湖沉积物噬菌体的多样性，我们尝试将噬菌体颗粒从沉积物上洗脱下来，然后在刘旺师兄指导下进行透射电子显微镜观察。如图 3.3 所示，洗脱液中存在很多形态大小不同的噬菌体样颗粒。多数颗粒为头尾状，在部分样品中观察到棒状、丝状、球状、纺锤状等形态的噬菌体样颗粒，提示青海湖沉积物中存在着丰富的噬菌体类群。

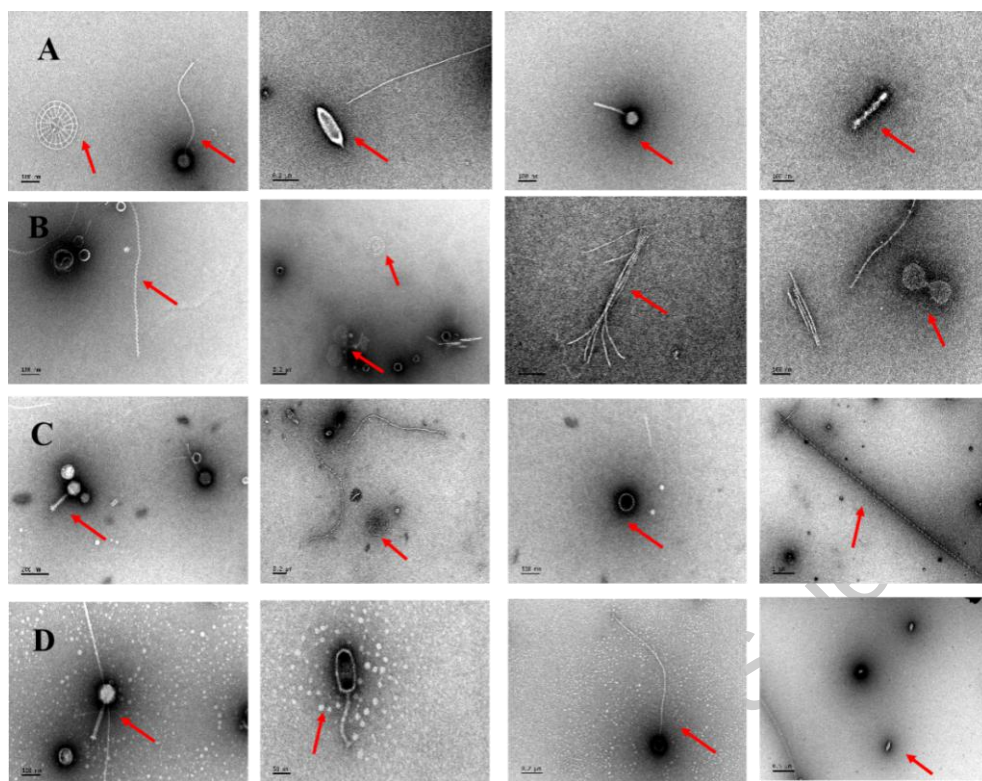


图 3.3 青海湖沉积物噬菌体洗脱电镜图

Figure 3.3 Electron micrographs of virus-like particles eluted from the sediment samples of Lake Qinghai

A. S1 样点洗脱电镜图 B. S4 样点洗脱电镜图
C. S5 样点洗脱电镜图 D. S6 样点洗脱电镜图

3.3 噬菌体的分离和形态观察

对分离、纯化得到的 35 株细菌菌株进行丝裂霉素 C 诱导，从三个分离菌株 (*Methylobacterium* sp.H1、*Halomonas* sp. B5 和 *Halomonas* sp. C10-3) 的纯培养物中获得了三株头尾状噬菌体，分别命名为 QHL-VH1、QHL-VB5 和 QHL-VC10-3。透射电镜观察结果显示，三株噬菌体形态类似，均为头尾状，具有二十面体头部，沿纵轴中心对称，尾部长度有较大差异 (图 3.4)。QHL-VH1 头部直径约为 65 nm，有一个非收缩性的尾部，尾长约 135 nm；QHL-VB5 头部直径约为 60 nm，末端有长的扭曲状尾丝，尾长约 160 nm；QHL-C10-3 头部直径约为 60 nm，尾长约 350 nm。根据冯焘等整理的噬菌体最新分类体系^[24]分类，三者均属于长尾噬菌体科。

另外，QHL-C10-3 噬菌体浓缩液中存在麻花状颗粒 (图 3.4C)，其头部螺旋状部分约为 100 nm，尾部约为 175 nm。该颗粒是否为噬菌体有待进一步分析。

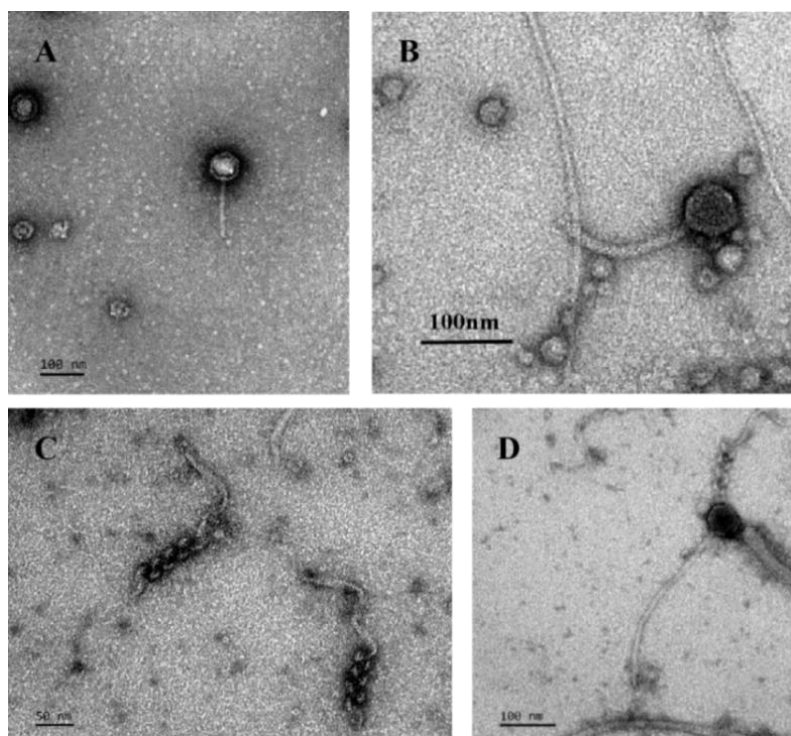


图 3.4 三株噬菌体的透射电镜图

Figure 3.4 Transmission electron micrographs of 3 virus strains

- A. 噬菌体 QHL-VH1 形态图 B. 噬菌体 QHL-VB5 形态图
C. QHL-C10-3 浓缩液中麻花状颗粒形态图 D. 噬菌体 QHL-C10-3 形态图

3.4 宿主菌 B5 的生长曲线

由于菌株 B5 在 1/3 2216E 培养基环境下繁殖快速，可以大量培养，故选择菌株 B5 及其噬菌体 QHL-VB5 噬菌体进行进一步分析。我们首先测定了 B5 的生长曲线。生长曲线可以揭示细菌生长的 4 个时期：迟缓期、对数期、平台期、衰亡期，反映细菌数量、生长状况等多个重要指标。如图 3.3 所示，B5 有显著的迟缓期、对数期、平台期，培养 10 h 加入丝裂霉素 C 后，与对照相比，OD₆₀₀ 值明显下降，最大值仅为 1.30 左右，说明丝裂霉素 C 诱导噬菌体释放，影响宿主菌的生长。

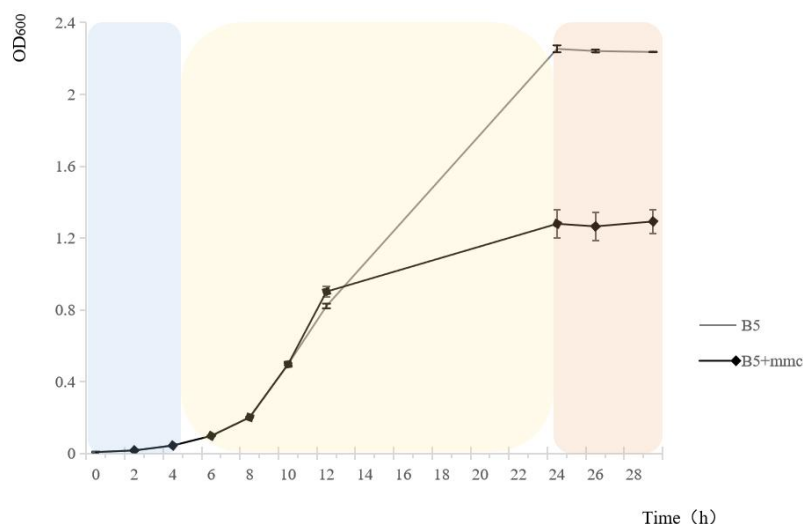


图 3.5 宿主细菌 B5 的生长曲线

Figure 3.5 Growth curve of host bacteria B5

3.5 噬菌体 QHL-VB5 结构蛋白的分析

为了了解 QHL-VB5 的结构蛋白，我们使用氯化铯密度梯度离心法对噬菌体进行纯化，然后对纯化后的噬菌体进行 SDS-PAGE 分析，在考马斯亮蓝染色后的胶图上获得蛋白质大小等信息。如图 3.6 所示，在 QHL-VB5 中检测到 4 种主要结构蛋白，估测大小分别为 55kDa、40kDa、35kDa 和 11kDa。在刘旺师兄的帮助下，使用 MASCOT 软件对所得质谱数据搜索分析（附录 5、附录 6），结果显示，该噬菌体 4 种主要结构蛋白分别为门户蛋白（phage portal protein）、假定蛋白（hypothetical protein）、主要衣壳蛋白（major capsid protein）、假定蛋白（hypothetical protein）。蛋白质分子量估测大小与理论大小基本符合，其中片段 2 蛋白质分子量估测值（40kDa）大于理论值（35.001kDa），推测该蛋白存在修饰。

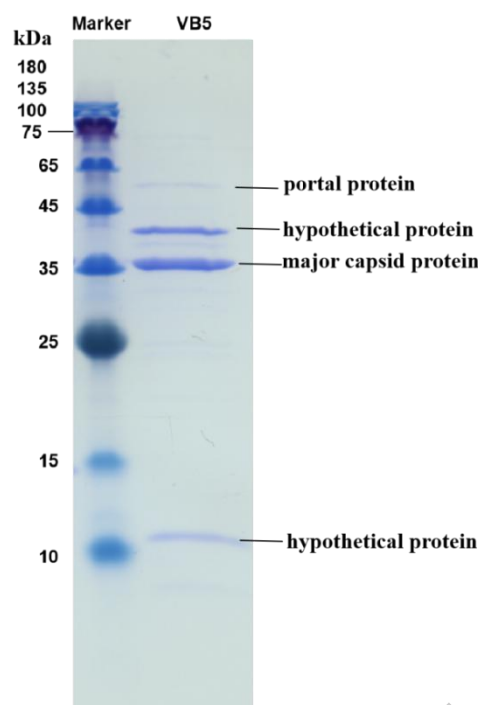


图 3.6 QHL-VB5 噬菌体结构蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 3.6 SDS-PAGE analysis of structural proteins from QHL-VB5

3.6 噬菌体 QHL-VB5 宿主范围测定

接着,我们选取从青海湖沉积物中分离的盐单胞菌属的 12 个菌株(附录 2),对 QHL-VB5 的宿主范围进行测定。将噬菌体滴定在双层平板后培养 24 h,均未形成噬菌斑。因此推测,噬菌体 QHL-VB5 的宿主范围较窄。

3.7 噬菌体 QHL-VB5 及其宿主 *Halomonas* B5 的基因组学分析

我们从感染了 QHL-VB5 的宿主 *Halomonas* B5 菌液上清中分离纯化噬菌体并提取其 DNA,经测序,获得了 QHL-VB5 的基因组草图。QHL-VB5 为双链 DNA, G+C 含量为 61.72%。测序获得了其部分基因组序列,共拼接出 4 条 contig,如图 3.7 所示,其总长度约为 40,078 bp,编码 61 个 ORFs,基因组准确全长有待确定。基因注释结果显示,59 个 ORFs 在 NCBI 数据库中有相似序列(附录 4),2 个 ORFs 为未知功能序列。QHL-VB5 编码噬菌体尾蛋白(phage tail protein)、门户蛋白(phage portal protein)、主要衣壳蛋白(major capsid)、噬菌体尾卷尺蛋白(phage tail tape measure protein)、头部装饰蛋白(head decoration protein)、螺旋-转-螺旋转录调节因子(helix-turn-helix transcriptional regulator)、溶菌酶 RrrD(lysozyme RrrD)等蛋白。根据 TMHMM 预测,该噬菌体的 10 个蛋白含跨膜区(附录 4)。

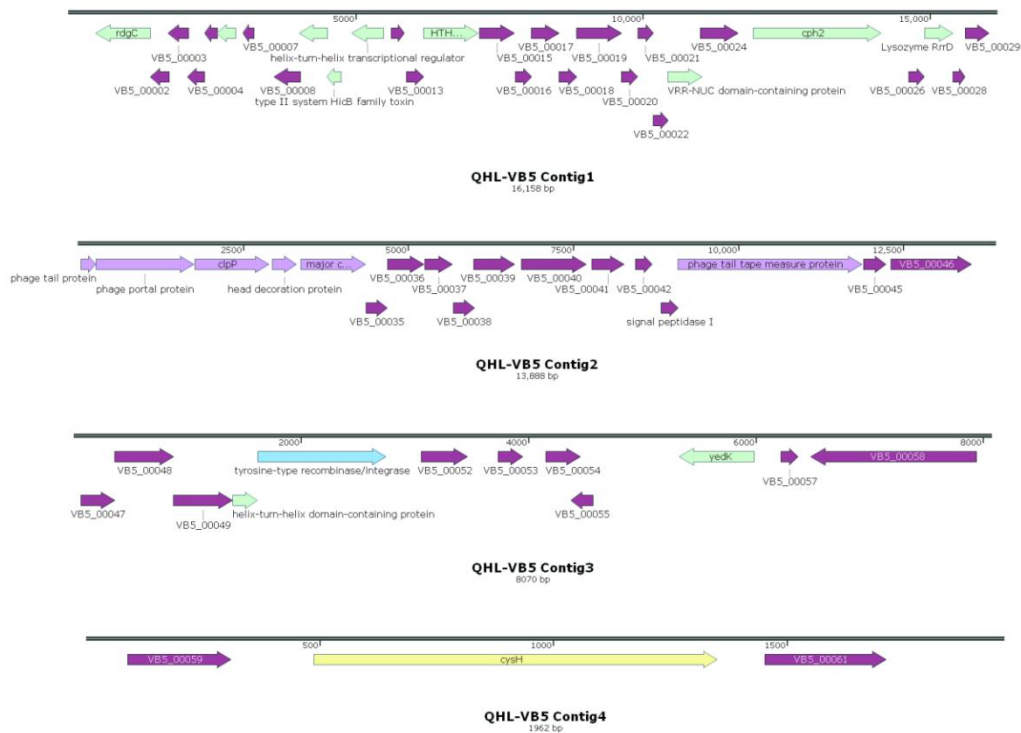


图 3.7 噬菌体 QHL-VB5 的基因组示意图

Figure 3.7 Schematic representation of the genome sequences of QHL-VB5

我们还将 QHL-VB5 与已发表的两株盐单胞菌属噬菌体 Φ HAP-1、QHHSV-1 进行比较, 分析它们之间的异同(表 3.1)。我们发现, 与 QHL-VB5 一样, Φ HAP-1 也编码结构蛋白, 如噬菌体尾蛋白、门户蛋白、主要衣壳蛋白、噬菌体尾卷尺蛋白等, 且主要结构蛋白大都成簇分布^[24]; 而 QHHSV-1 则编码重组相关蛋白、整合酶等^[25]。

 表 3.1 QHL-VB5、QHHSV-1 及 Φ HAP-1 的基因组比较

 Table 3.1 Comparison of the genomes of QHL-VB5, QHHSV-1 and Φ HAP-1

噬菌体	基因组	开放阅读框	总大小	GC 含量	重复序列	参考文献
Phage	Genome	ORFs	Total size (bp)	GC content	Repeat sequence	Reference
QHL-VB5	ds DNA	61	40,078	61.72%	ND	
QHHSV-1	ds DNA	72	37,270	66.80%	1(92bp,inverted)	[25]
Φ HAP-1	L-ds DNA	46	39,245	59.00%	1(1,631 bp)	[24]

此外，我们还测定了宿主 *Halomonas* B5 的基因组草图。*Halomonas* B5 基因组总长度约为 457,090 bp，G+C 含量为 62.91%，并且在其基因组上发现了整合的 QHL-VB5 序列。

3.8 QHL-VB5 的系统发育学分析

噬菌体之间的亲缘关系通常通过比较它们的结构蛋白的氨基酸序列相似性来确定。在刘旺师兄的帮助下，基于主要衣壳蛋白氨基酸序列构建了 QHL-VB5 与一些相关噬菌体的系统发育树。结果显示，QHL-VB5 与目前已分离到的盐单胞菌属的噬菌体均不同。图 3.8 中，QHL-VB5 主要衣壳蛋白所在的一支标注为粉色，来自其他盐单胞菌属细菌的噬菌体主要衣壳蛋白标注为浅黄色。可以清楚地看到，包括 QHL-VB5 在内的来自原噬菌体的主要衣壳蛋白聚为一簇，区别于分离自噬菌体的衣壳蛋白。

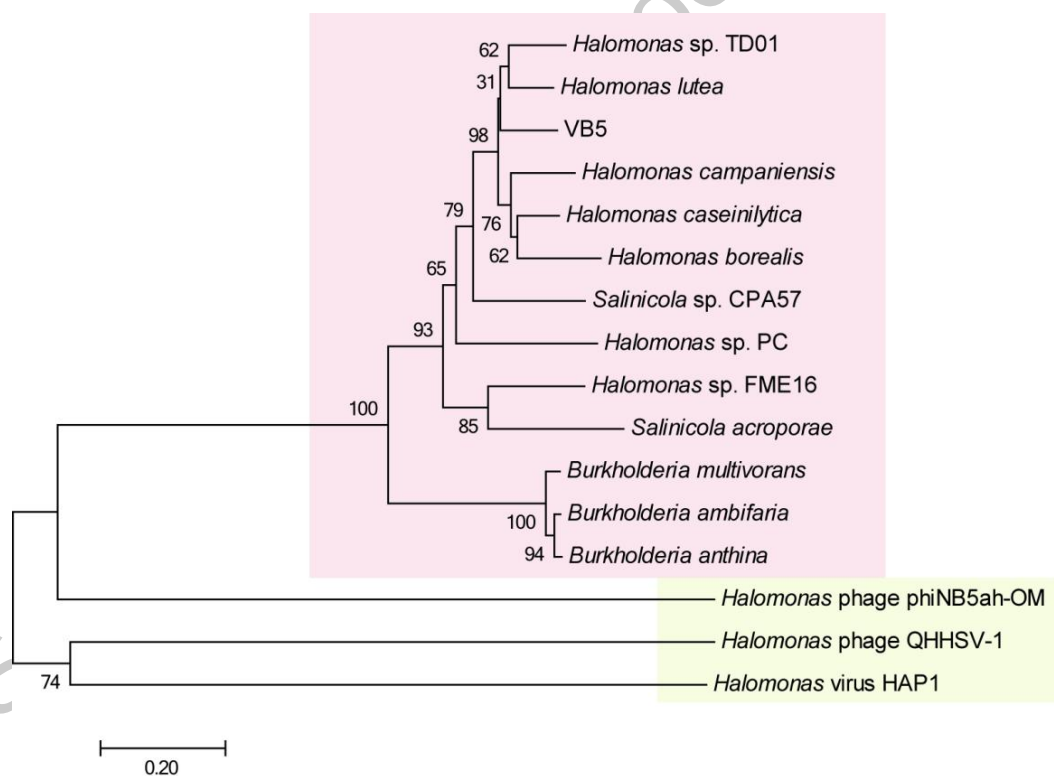


图 3.8 基于主要衣壳蛋白氨基酸序列的系统发育树

Figure 3.8 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of capsid proteins

考虑到 QHL-VB5 为温和噬菌体，我们还利用整合酶（integrase）进行了类似噬菌体的系统发育学分析(图 3.9)。结果显示，QHL-VB5 整合酶与 *Marinobacter*

phage PS3 的整合酶聚为一支，推测它们在进化关系上比较接近；QHL-VB5 整合酶与同为盐单胞菌的 QHHSV-1 的整合酶处于不同分支，说明二者的亲缘关系较远。比较基于结构蛋白和基于整合酶的系统发育树，我们推测，噬菌体基因组的不同功能单元可能可以相对独立地在不同噬菌体之间进行交换组合。

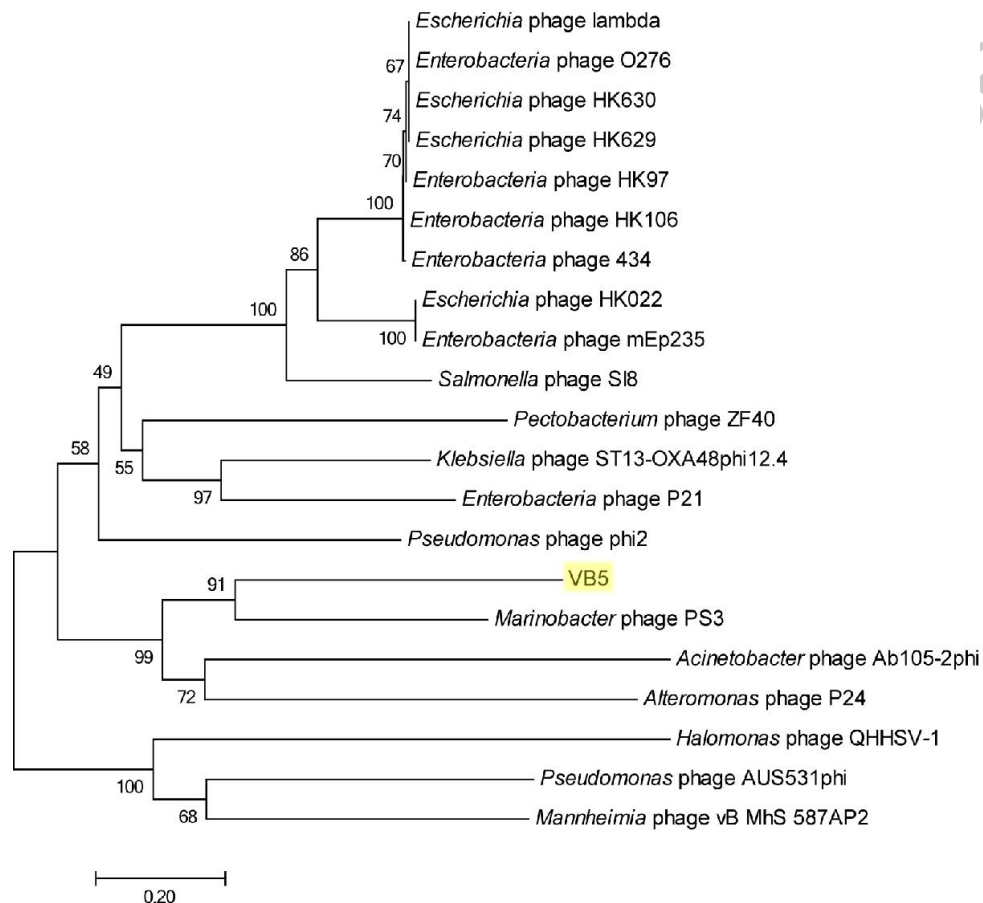


图 3.9 基于整合酶氨基酸序列的系统发育树

Figure 3.9 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of integrases

第 4 章 讨论

本研究首先从青海湖沉积物中分离得到 35 株菌株，分别属于变形菌门（28 株）、厚壁菌门（3 株），放线菌门（3 株）和拟杆菌门（1 株）。盐单胞菌属（11 株）、海源菌属（5 株）和海旋菌属（5 株）为优势属。作为比较，石晴等^[26]利用高通量测序平台对青海湖细菌（V3-V4 区）的 16S rRNA 基因进行测序，分析微生物群落组成，发现细菌群落归属 33 门 66 纲 395 属，优势类群为变形菌门（60.53%）、拟杆菌门（17.39%）和放线菌门（11.61%）。朱德锐等^[25]通过 16S rDNA Blast 分析青海大学医学院生物化学实验室现有的 35 株青海湖嗜盐菌，显示其中有 10 株菌株属于 γ -变形菌纲海洋螺菌目盐单胞菌科盐单胞菌属。因此，变形菌门、拟杆菌门、放线菌门的细菌，尤其是盐单胞菌在盐湖、盐场、海洋等环境中广泛存在。

本研究显示，青海湖噬菌体的形态多种多样，大多为头尾状，也有丝状、球状，甚至棒状、纺锤状，这些形态也常见于海洋^[27]、云南盐矿^[28]等环境中发现的噬菌体，显然，青海湖中存在极为丰富多样的噬菌体类群。

通过丝裂霉素 C 诱导，我们从三个菌株中获得了温和噬菌体，即 QHL-VH1、QHL-VB5 和 QHL-VC10-3，它们分别感染菌株 *Methylobacterium* sp. H1、*Halomonas* sp. B5 和 *Halomonas* sp. C10-3。据我们所知，这是首次从青海湖获得纯化的噬菌体，与青海湖样品电镜观察结果一致，分离得到的三个噬菌体毒株均为头尾状噬菌体。而后，我们对盐单胞菌噬菌体 QHL-VB5 进行了分析。该毒株拥有 dsDNA 基因组，测序获得其基因组草图，在这些序列中有 61 个 ORFs，均在 NCBI 数据库中有相似序列。其中，该噬菌体编码结构蛋白、整合酶、转录调控因子和与宿主细胞裂解相关蛋白。根据 TMHMM 预测，10 个蛋白含跨膜区。根据对噬菌体颗粒的 SDS-PAGE 分析，QHL-VB5 有 4 个主要结构蛋白，大小分别约为 55kDa、40kDa、35kDa、11kDa。使用 MASCOT 软件对所得质谱数据搜索分析，4 种主要结构蛋白分别为门户蛋白、假定蛋白、主要衣壳蛋白、假定蛋白。根据所得质谱数据搜索分析，初步推断该株噬菌体属于尾噬菌体目、长尾噬菌体科的嗜盐菌噬菌体。

第5章 展望

在本研究的基础上，拟进一步开展以下工作：

（1）噬菌体 QHL-VB5 的无噬菌体宿主的分离：拟采用多次传代的方法筛选无噬菌体宿主。

（2）麻花状类噬菌体颗粒的鉴定：在 QHL-C10-3 的噬菌体浓缩液中发现存在麻花状颗粒，拟通过氯化铯（CsCl）密度梯度离心法进行分离，进而确定该颗粒是否为噬菌体。

（3）噬菌体分离方法的改进：高盐水环境中噬菌体含量丰富，噬菌体样颗粒含量可达 10^9 个/mL，但可分离培养的噬菌体少之又少。拟创新思路，设计新的噬菌体分离纯化方法，争取获得更多新噬菌体。

参考文献

- [1] 傅超群,白萌,王永霞,李治滢,赖泳红,肖炜,崔晓龙.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(04): 920-928.
- [2] Atanasova NS, Bamford DH, Oksanen HM. Virus-host interplay in high salt environments[J]. Environmental Microbiology Reports, 2016, 8(4): 431-444, DOI: 10.1111/1758-2229.12385
- [3] Ackermann HW, Prangishvili D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. Archives of Virology, 2012, 157(10) : 1843-1849
- [4] Atanasova NS, Oksanen HM, Bamford DH. Haloviruses of archaea, bacteria, and eukaryotes [J]. Current Opinion in Microbiology, 2015, 25: 40-48
- [5] 史建全,祁洪芳,杨建新.青海湖自然概况和渔业资源现状[J].淡水渔业,2004,26(3): 3-5.
- [6] 吴志新,高原宝境——青海湖[J]. 供电企业管理,2007,4:56.
- [7] 张琨,蓝江湖,沈振兴等.青海湖流域水化学分析及水质初步评价[J].地球环境学报,2010,1(3): 162-168.
- [8] Ren Z, Wang F, Qu X, Elser JJ, Liu Y, Chu L. Taxonomic and Functional Differences between Microbial Communities in Qinghai Lake and Its Input Streams. Front Microbiol. 2017; 8:2319. Published 2017 Nov 22. doi:10.3389/fmicb.2017.02319
- [9] 冯虎元,马晓军,章高森等.青藏高原多年冻土微生物的培养和计数[J].冰川冻土,2004,26(2): 182-187.
- [10] Fuhrman, J. A. (1999). "Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects." Nature 399(6736):541-548.
- [11] 孙亮,徐凤宇.噬菌体对细菌毒力影响的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2019(01):36-39.
- [12] Zhao Y, Wang K, Ackermann H W et al. Searching for a "hidden" prophage in a marine bacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(2): 589-595.
- [13] Broudy T B, Pancholi V and Fischetti V. A Induction of lysogenic bacteriophage and phage-associated toxin from group a streptococci during coculture with human pharyngeal cells[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(3): 1440-1443.
- [14] 崔自红,季秀玲.细菌-噬菌体对抗性共进化研究进展[J].中国生物工程杂志,2020,40(Z1):140-145.
- [15] 苗蒙. RNA 病毒与宿主蛋白相互作用机制的研究[D].武汉大学,2019.
- [16] Seaman PF, Day MJ. Isolation and characterization of a bacteriophage with an unusually large genome from the Great Salt Plains National Wildlife Refuge, Oklahoma, USA[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 60(1): 1-13
- [17] Paul J H, Rose J B, Jiang S C et al. Coliphage and indigenous phage in Mamala Bay, Oahu, Hawaii[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(1): 133-138.

- [18] 梁子英,刘芳.实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展[J].现代农业科技,2020(06):1-3+8.
- [19] 阳成波,印遇龙,龚建华,郁海,黄瑞林,李铁军.实时定量 PCR 研究进展及其应用[J].中国预防兽医学报,2003(05):76-80.
- [20] 李萌,李雪,郑志强.实时荧光定量 PCR 技术的应用及研究进展[J].饲料博览,2018(07):94.
- [21] Suttle C A. Marine viruses-major players in the global ecosystem [J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(10): 801-812.
- [22] 东秀珠, 蔡妙英等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001
- [23] 冯焘,刘军,孙洋,冯书章.噬菌体最新分类与命名[J].中国兽医学报,2013,33(12):1954-1958.
- [24] Mobberley JM, Authement RN, Segall AM, Paul JH. The temperate marine phage PhiHAP-1 of *Halomonas aquamarina* possesses a linear plasmid-like prophage genome. J Virol. 2008 Jul;82(13):6618-30. doi: 10.1128/JVI.00140-08. Epub 2008 Apr 30. PMID: 18448537; PMCID: PMC2447096.
- [25]赵琴. 云南盐矿中嗜盐细菌病毒的分离及其生物学特性研究[D].云南大学,2015.
- [26] 石晴,韩睿,邢江娃,李永臻,沈国平,永胜,朱德锐.青海湖微生物群落的共生模式[J].中国高原医学与生物学杂志,2019,40(02):85-93+117.
- [27] 郑小伟,黄力.海洋病毒多样性及生态功能[J].中国科学基金,2018,32(05):456-458.
- [28] 赵琴,任鹏康,王永霞,李治滢,吴鸣,肖炜,崔晓龙.云南盐矿中病毒样颗粒的多样性[J].微生物学报,2015,55(10):1327-1335.

附录

附录 1 青海湖单菌测序结果分析

Appendix 1 Sequence analysis of single bacteria in Qinghai Lake

菌株 16S 一致的 编号 其他菌株	样品来源	比对序 列的长 度 (bp)	最相似序列 (GenBank 收录号)	相似性	备注
H1	H7	1/3 2216E 有氧 QH18-4/QH18-5	1315	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i> strain CBMB27(CP015367.1)	1
H3		1/3 2216E 有氧 QH18-4	1346	<i>Planktosalinus lacus</i> strain X14M-14 (NR_149250.1)	95.62% 潜在新种
H4		1/3 2216E 有氧 QH18-7	1382	<i>Pseudomonas bauzanensis</i> strain BZ93(NR_117232.1)	99.20%
H6		1/3 2216E 有氧 QH18-1	1357	<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain DSM 15019 genome assembly(LT629770.1)	99.93%
B4	B6/B7/B1 A1	1/3 2216E 厌氧 QH18-1	1378	<i>Idiomarina donghaiensis</i> culture-collection MCCC:1A03108 (KM407730.1)	1
B5	K5/K1C/K 2A	1/3 2216E 厌氧 QH18-1	1495	<i>Halomonas desiderata</i> strain FB2 (NR_026274.1)	98.10%
C2	C13	R2A 厌氧 QH18-7	904	<i>Thalassospira mesophila</i> strain MBE#74 (NR_114387.1)	97.98%
C5	C7/C12/C1 6	R2A 厌氧 QH18-7	895	<i>Halomonas arcis</i> strain AJ282 (NR_044115.1)	98.39%
C9B	C15	R2A 厌氧 QH18-7	888	<i>Halomonas aquamarina</i> strain DSM 30161 (MH283883.1)	98.15%
K3	K9	1/3 2216E 厌氧 QH18-1	1410	<i>Halomonas zhaodongensis</i> strainNEAU-ST10-25 (NR_125612.1)	99.45%
K6		1/3 2216E 厌氧 QH18-1	1453	<i>Halomonas titanicae</i> BH1 (NR_116997.1)	99.04%
C10- 3	C8/C14	R2A 厌氧 QH18-7	1073	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 DNA(AP019514.1)	97.68%
C10- 1		R2A 厌氧 QH18-7	982	<i>Paracoccus speluncae</i> strain 0911TES13M5 (NR_149253.1)	97.88%
K2-2		1/3 2216E 厌氧 QH18-1	1088	<i>Halomonas daqingensis</i> strain DQD2-30 (NR_044100.1)	98.06%
K8		1/3 2216E 厌氧 QH18-1	1053	<i>Planococcus rifietoensis</i> strain M8(CP013659.2)	99.05%
B1A 2		1/3 2216E 厌氧 QH18-1	910	<i>Idiomarina donghaiensis</i> culture-collection MCCC:1A03058 (KM407694.1)	1
C9A		R2A 厌氧 QH18-7	942	<i>Thalassospira mesophila</i> strain MBE#74 (NR_114387.1)	97.13%

续表附录 1

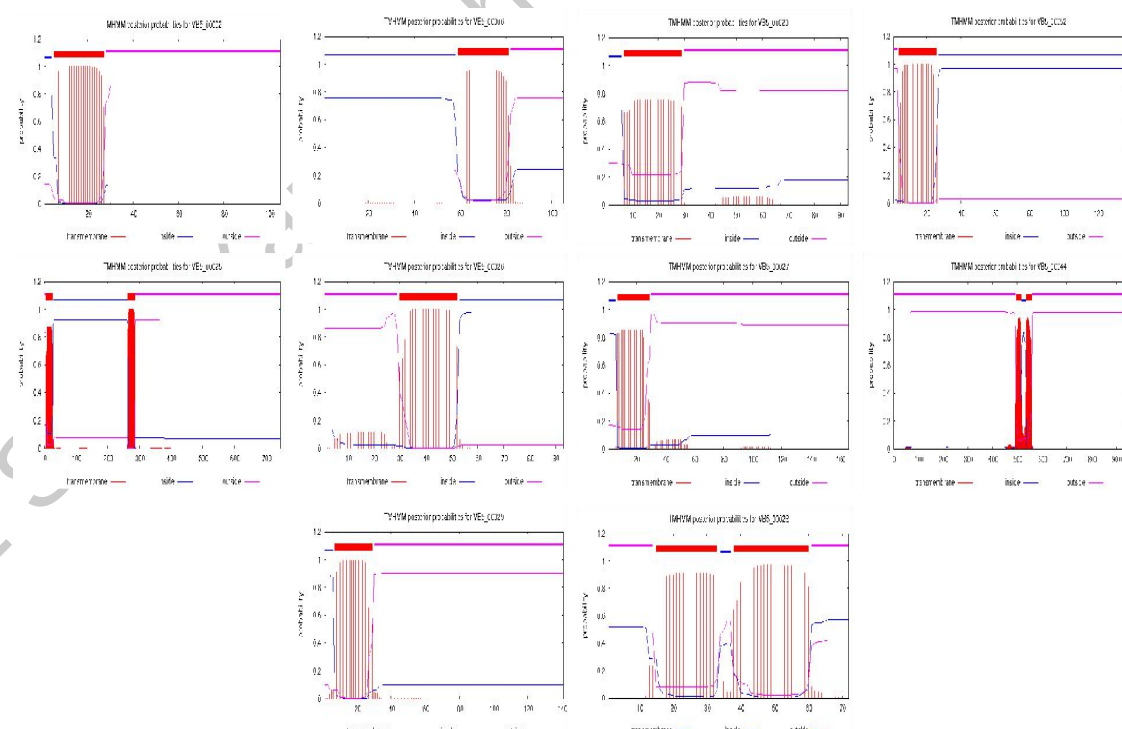
菌株 16S 一致的 编号 其他菌株	样品来源	比对序 列的长 度 (bp)	最相似序列 (GenBank 收录号)	相似性	备注
D1	1/3 2216E 厌氧 QH18-7	922	<i>Thalassospira mesophila</i> strain MBE#74 (NR_114387.1)	97.38%	
D3A	1/3 2216E 厌氧 QH18-7	833	<i>Kocuria rhizophila</i> strain DSM 11926 (KJ476722.1)	98.43%	
D3B	1/3 2216E 厌氧 QH18-7	838	<i>Marinobacter algicola</i> DG893 (NR_042807.1)	98.32%	
B3	1/3 2216E 厌氧 QH18-1	918	<i>Idiomarina donghaiensis</i> culture-collection MCCC:1A03058 (KM407694.1)	97.47%	
C17	R2A 厌氧 QH18-7	1078	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 DNA(AP019514.1)	97.15%	
B2	1/3 2216E 厌氧 QH18-1	983	<i>Idiomarina donghaiensis</i> culture-collection MCCC:1A03108(KM407730.1)	97.10%	
C1	C3 R2A 厌氧 QH18-7	931	<i>Thalassospira mesophila</i> strain MBE#74(NR_114387.1)	96.66%	潜在新种
D2	D4/D5 1/3 2216E 厌氧 QH18-7	945	<i>Halomonas arcis</i> strain AJ282 (NR_044115.1)	98.09%	
D7	1/3 2216E 厌氧 QH18-7	1049	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 DNA(AP019514.1)	98.00%	
D6	1/3 2216E 厌氧 QH18-7	897	<i>Thalassospira mesophila</i> strain MBE#74 (NR_114387.1)	98.21%	
C4	R2A 厌氧 QH18-7	1042	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 DNA(AP019514.1)	96.82%	潜在新种
C6-1 B	R2A 厌氧 QH18-7	1085	<i>Neorhizobium huautlense</i> strain SO2 (NR_024863.1)	96.00%	潜在新种
K1D	1/3 2216E 厌氧 QH18-1	1062	<i>Idiomarina donghaiensis</i> culture-collection MCCC:1A03058 (KM407694.1)	94.87%	潜在新种
C6-1 A	R2A 厌氧 QH18-7	876	<i>Lysinibacter cavernae</i> strain CC5-806 (NR_137362.1)	96.94%	潜在新种
C10- 2A	R2A 厌氧 QH18-7	903	<i>Nocardioides zeicaulis</i> strain JM-601(NR_148831.1)	98.56%	
H2A	1/3 2216E 有氧 QH18-1	951	<i>Microbacterium profundum</i> strain Shh49 (NR_044321.1)	98.63%	
H2B	1/3 2216E 有氧 QH18-1	914	<i>Pseudomonas bauzanensis</i> strain BZ93 (NR_117232.1)	98.69%	

附录 2 用来检测 QHL-VB5 宿主范围的 *Halomonas* 菌株
Appendix 2 *Halomonas* strains used in the host range test for QHL-VB5

菌株编号	16S rRNA 基因最相似菌株 (GenBank 收录号)	噬菌斑
B5	<i>Halomonas desiderata</i> strain FB2 (NR_026274.1)	+
K2-2	<i>Halomonas daqingensis</i> strain DQD2-30 (NR_044100.1)	-
K3	<i>Halomonas zhaocongensis</i> strain NEAU-ST10-25 (NR_125612.1)	-
K5	<i>Halomonas desiderata</i> strain FB2 (NR_026274.1)	-
K6	<i>Halomonas titanicae</i> BH1 (NR_116997.1)	-
K9	<i>Halomonas zhaocongensis</i> strain NEAU-ST10-25 (NR_125612.1)	-
C5	<i>Halomonas arcis</i> strain AJ282 (NR_044115.1)	-
C7	<i>Halomonas arcis</i> strain AJ282 (NR_044115.1)	+
C15	<i>Halomonas aquamarina</i> strain DSM 30161 (MH283883.1)	-
C17	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 DNA(AP019514.1)	-
C10-3	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 DNA(AP019514.1)	-
D4	<i>Halomonas arcis</i> strain AJ282 (NR_044115.1)	-

附录 3 QHL-VB5 编码蛋白的跨膜区

Appendix3 Transmembrane regions in QHL-VB5 proteins



附录 4 噬菌体 QHL-VB5 基因功能注释

Appendix 4 Functional annotation of phage QHL-VB5 gene

ORF no. (orientation)	Nucleotide position	Predicted function	Related BLASTP hit(s)(accession no.;E value)
1 (-)	485-1420	recombination-associated protein RdgC	recombination-associated protein RdgC [<i>Halomonas</i> sp. L5] (WP_149326608.1;6e-169)
2 (-)	1433-1750	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. L5] (WP_149326610.1;2e-37)
3 (-)	1747-2088	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas nitroreducens</i>] (WP_126484868.1;6e-45)
4 (-)	2085-2366	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. L5] (WP_149326612.1;0.041)
5 (-)	2377-2589	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. JCM 18142] (WP_127059946.1;6e-25)
6 (-)	2592-2909	helix-turn-helix transcriptional regulator	helix-turn-helix transcriptional regulator [<i>Halomonas muralis</i>] (WP_089729138.1;4e-28)
7 (-)	3046-3228	hypothetical protein	No significant similarity found
8 (-)	3592-4035	hypothetical protein EKK97_22755	hypothetical protein EKK97_22755 [<i>Halomonas</i> sp. BC-M4-5] (QHC51854.1;2e-51)
9 (-)	4032-4514	type II toxin-antitoxin system HicB family antitoxin	type II toxin-antitoxin system HicB family antitoxin [<i>Halomonas</i> sp. BC-M4-5] (QHC51855.1;1e-81)
10 (-)	4511-4750	type II toxin-antitoxin system HicA family toxin	type II toxin-antitoxin system HicA family toxin [<i>Halomonas</i> sp. BC-M4-5] (QHC51856.1;1e-37)
11 (-)	4940-5482	helix-turn-helix transcriptional regulator	helix-turn-helix transcriptional regulator [<i>Halomonas muralis</i>] (WP_089729132.1;2e-57)
12 (+)	5622-5852	hypothetical protein SAMN05661010_02545	hypothetical protein SAMN05661010_02545 [<i>Halomonas muralis</i>] (SDL78468.1;2e-28)
13 (+)	5883-6188	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. 3(2)] (WP_151444267.1;0.003)
14 (+)	6185-7141	helix-turn-helix domain-containing protein	helix-turn-helix domain-containing protein [<i>Halomonas</i> sp. TBZ202] (WP_134845226.1;2e-83)
15 (+)	7155-7775	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas borealis</i>] (WP_136247956.1;1e-109)
16 (+)	7778-8065	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. 3(2)] (WP_151444271.1; 5e-39)
17 (+)	8062-8547	DUF1643 domain-containing protein	DUF1643 domain-containing protein [<i>Halomonas meridiana</i>] (WP_074210827.1;8e-86)

续表附录 4

18 (+)	8544-8858	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas shengliensis</i>] (WP_089680341.1;2e-14)
19 (+)	8851-9636	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. L5] (WP_149326622.1;9e-51)
20 (+)	9633-9914	hypothetical protein EKK97_13920	hypothetical protein EKK97_13920 [<i>Halomonas</i> sp. BC-M4-5] (QHC50462.1;2e-05)
21 (+)	9911-10189	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas nitroreducens</i>] (WP_126484837.1;5e-44)
22 (+)	10186-10446	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. L5] (WP_149326623.1;2e-34)
23 (+)	10443-11042	VRR-NUC domain-containing protein	VRR-NUC domain-containing protein [<i>Halomonas campaniensis</i>] (WP_051626474.1;2e-68)
24 (+)	11005-11670	hypothetical protein HALO32_02590	hypothetical protein HALO32_02590 [<i>Halomonas</i> sp. 3(2)](VVZ96490.1;1e-61)
25 (+)	11920-14160	EAL domain-containing protein	EAL domain-containing protein [<i>Halomonas</i> sp. BC-M4-5] (QHC50393.1;0.0)
26 (+)	14628-14909	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. TBZ202] (WP_134848779.1;2e-31)
27 (+)	14906-15406	Lysozyme RrrD	lysozyme RrrD [<i>Halomonas taeanensis</i>] (WP_092522532.1;1e-73)
28 (+)	15399-15617	hypothetical protein AAY80_234	hypothetical protein AAY80_234 [<i>Stenotrophomonas</i> phage vB_SmaS-DLP_6] (AMQ66010.1;0.39)
29 (+)	15614-16039	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas borealis</i>] (WP_136247946.1;5e-33)

噬菌体 QHL-VB5 基因功能注释 (contig 2)

ORF no. (orientation)	Nucleotide position	Predicted function	Related BLASTP hit(s)(accession no.;E value)
30 (+)	48-269	phage tail protein	phage tail protein [<i>Halomonas borealis</i>] (WP_136247943.1;5e-27)
31 (+)	271-1764	phage portal protein	phage portal protein [<i>Halomonas hydrothermalis</i>] (WP_096922190.1;0.0)
32 (+)	1768-2898	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	Clp protease ClpP [<i>Halomonas muralis</i>] (WP_089729092.1;0.0)
33 (+)	2948-3313	head decoration protein	head decoration protein [<i>Halomonas campaniensis</i>] (WP_038484539.1;2e-55)

续表附录 4

34 (+)	3380-4360	major capsid protein	major capsid protein [<i>Halomonas caseinilytica</i>] (WP_064699324.1;0.0)
35 (+)	4367-4690	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. TD01] (WP_039869658.1;1e-24)
36 (+)	4690-5244	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. 1513] (WP_076749159.1;1e-92)
37 (+)	5254-5673	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. TD01] (WP_009724509.1;2e-37)
38 (+)	5688-6014	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. TBZ202](WP_134848690.1;1e-47)
39 (+)	5996-6616	DUF1566 domain-containing protein	DUF1566 domain-containing protein [<i>Halomonas borealis</i>] (WP_136247934.1;1e-32)
40 (+)	6713-7705	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. TBZ202] (WP_134848693.1;0.0)
41 (+)	7779-8276	hypothetical protein HORIV_35300	hypothetical protein HORIV_35300 [<i>Halomonas olivaria</i>] (BB151109.1;1e-68)
42 (+)	8444-8701	DUF4124 domain-containing protein	DUF4124 domain-containing protein [<i>Halomonas</i> sp. BC04] (WP_043515673.1;8e-09)
43 (+)	8827-9096	signal peptidase I	signal peptidase I [<i>Rummeliibacillus</i> sp. TYF005] (WP_124218171.1;7.6)
44 (+)	9089-11881	phage tail tape measure protein	phage tail tape measure protein [<i>Halomonas</i> sp. TBZ202] (WP_134848727.1;0.0)
45 (+)	11897-12244	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. TBZ202] (WP_134848771.1;3e-53)
46 (+)	12315-13535	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. TBZ202] (WP_134848726.1;5e-85)

噬菌体 QHL-VB5 基因功能注释 (contig 3)

ORF no. (orientation)	Nucleotide position	Predicted function	Related BLASTP hit(s)(accession no.;E value)
47 (+)	62-361	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas caseinilytica</i>] (WP_069384006.1; 6e-08)
48 (+)	358-879	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Pseudomonas syringae</i> group genomo sp. 3] (WP_054090025.1;3e-62)
49 (+)	876-1397	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas smyrnensis</i>] (WP_016854757.1;1e-72)

续表附录 4

50 (+)	1401-1619	helix-turn-helix domain-containing protein	helix-turn-helix domain-containing protein [<i>Halomonas</i> sp. L5] (WP_149326605.1;1e-40)
51 (+)	1619-2752	tyrosine-type recombinase/integrase	tyrosine-type recombinase/integrase [<i>Halomonas</i> sp. L5] (WP_149326604.1;0.0)
52 (+)	3059-3466	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. PC] (WP_127042946.1;5e-13)
53 (+)	3733-3951	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. PYC7W] (WP_114480771.1;2e-40)
54 (+)	4156-4461	hypothetical protein QHH_28	hypothetical protein QHH_28 [<i>Halomonas</i> phage QHHSV-1] (APC45940.1;5e-36)
55 (+)	4378-4569	hypothetical protein	No significant similarity found
56 (+)	5329-5985	Putative SOS response-associated peptidase YedK	SOS response-associated peptidase [<i>Halomonas</i> korlensis] (WP_089796396.1;1e-106)
57 (+)	6223-6375	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. KCTC 52281] (WP_111414572.1;1e-14)
58 (+)	6487-7941	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. TBZ202] (WP_134848724.1;1e-131)

噬菌体 QHL-VB5 基因功能注释 (contig 4)

ORF no. (orientation)	Nucleotide position	Predicted function	Related BLASTP hit(s)(accession no.;E value)
59 (+)	89-310	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. KHS3] (WP_041159147.1;2e-32)
60 (+)	488-1351	Thioredoxin-dependent 5'-adenylylsulfate reductase	phosphoadenosine phosphosulfate reductase family protein [SAR202 cluster bacterium] (MQG77640.1;2e-123)
61 (+)	1452-1712	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. SL1] (WP_107182127.1;3e-19)

附录 5 蛋白质质谱鉴定噬菌体蛋白条带结果

Appendix 5 Identification of phage protein bands by protein mass spectrometry

Number	Protein View	Description	Protein sequence coverage	Nominal mass (kDa)
1	B5_01269	phage portal protein [<i>Halomonas</i> sp. DX6] (WP_167112622.1)	36%	55.505
2	B5_01260	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. DX6] (WP_167112640.1)	38%	35.001
3	B5_01266	major capsid protein [<i>Halomonas</i> sp. DX6] (WP_167112628.1)	67%	35.841
4	B5_01263	hypothetical protein [<i>Halomonas</i> sp. DX6] (WP_167112634.1)	28%	14.725

附录 6 MASCOT 蛋白质序列覆盖度分析结果

Appendix 6 Results of protein sequence coverage analysis from MASCOT

Protein sequence coverage: 36%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MTVTAKPRLR YRQQQLVQVR ASAYEGASTK **RRMAGKGTVA** **SGPNGPIERS**
 51 **LPMIVSR**SHN AIRNNPYAAS AKEKYVSNLV GTGIKFPQWD PIIQALNDRW
 101 VEECDADQVD NFYGLQSLAA GSQFEAGEAL GRIRYRRSD GLSVEMQLQV
 151 IEAEHLDPFF SQAFGGRLIK **MGIEFDGIGQ** **RRAYHLWRFH** **PHEQLTAQMN**
 201 **ERVFPVADNV** **IHMVRRRQPG** **QLRGVPELTS** **VIIRLYEIDE** **MQDATLARQK**
 251 **LSQLFGTFVK** **RKTAHDPEDD** **GNFGEVLVM** **PGDREQIDEF** **VFGGIHYLED**
 301 DEEVTFSPFP DIQQQYTEWL RSELLAVAAG AGITYEQLTG DLKGVNYSII
 351 **RAGLLEFRFR** **VEALQAQLMV** **HQWCRRIAAK** **WLDVAVTSGA** **LSIANYWQGA**
 401 **RELALALDWI** **APKAWVNDPL** **KEVTADLLEV** **RAGFKPRSEA** **AGERGWSLEQ**
 451 **LDARIQKGNQ** **SADGHLGLVD** **SDPRITAKNG** **ALQKALEALA** **ADTDEED**

Protein sequence coverage: 67%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MGIFDSDFIT LSSLTAINE VEYVFNQIGS LGLFEAEGIT TTSLVIEKDG
 51 **EKGLIENKE** **RGAPGTVGA** **DKRGISFQT** **AHLPTVGTVL** **ADEVQNVRAE**
 101 **GSEDQEQAVQ** **TVVNRILARM** **AFRIDMTHEY** **HLGAIINGKV** **LDSNGTIVY**
 151 **DLFQAFGTQ** **QTVANALGTA** **TTDVQKCLD** **IHEKVEDALG** **GLPYTGITVL**
 201 **CGKSFWRKFI** **GKHLVKEAYE** **RWQAGERLRG** **DPREGFMFGG** **IFWERYRGGG**
 251 **TIKVADTEAY** **AVPTGVMDLF** **ITREAPGDYM** **ETVNTLGLPF** **YSSSDPLKHG**
 301 **KGVLELAQSN** **PAHLCTRFKA** **GIKLTE**

Protein sequence coverage: 38%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MAITENGLLE YESGQAFNDW EEMSDAGDGQ VFEASFAPWS **GRSGFDTHVR**
 51 **PWGLATGGRV** **VAGTGNDSVH** **VEALTAYMPS** **ATGADSDGLL** **AVASDDVEVT**
 101 RAATSTHQIS SIVLSASGTL SAVAGTEGSS FTETRDAAGG **PPLIFVDAVE**
 151 **VAQVRLSSAD** **AAPVSDTEIF** **QVVGVMQERY** **DFPIWSEDP** **AGEVKFATAL**
 201 **PAIHTGEVFK** **RVSVMGYTPI** **FAELPYCSDF** **VFADESHSVN** **STDYSGPLG**
 251 **SVSRTLQAS** **FTHRANGIT** **DPIVRLKNQR** **LMFRWFQDRN** **RAPFSLTRGI**
 301 LGIARQYFVG DHVTVNATIS AELATVDFDG

Protein sequence coverage: 28%

Matched peptides shown in **bold red**.

1 MPTPKREALF **AALATAMNAH** **RARADIDKRD** **LPARVLWAGE** **DADVQRDRYG**
 51 EVSVITGASL **IAQHSAAANP** **DGWDAGQNDI** **MAQLIADATG** **GDRTLGLGLAD**
 101 DVAVTTTAIL YPDAGSNIT VGVDFAIRWS **HPLGNFYID**

致谢

2018年3月，我有幸由北京青少年科技俱乐部推荐进入中国科学院微生物研究所极端嗜热古菌遗传机制研究组，实验室指定课题为：极端环境下病毒多样性以及和宿主相互作用的研究。两年多的时光悄然即逝，从初到实验室手足无措的新手到能够初步了解科研的高中生，这段时光为我的中学生活添上了浓墨重彩的一笔。一路走来，要感谢每个人对我无偿的支持、鼓励和帮助。

首先感谢我的导师黄力研究员，是您指引我一步步认识科研、了解科研，带我走进科研的大门。您教授的研究思路，论文写作方法等让我受益匪浅，您对待科研的严谨态度、全身心的投入精神令我受益终身。记得我的工作小结中，几乎每句话都有您的批注，研究目的是什么、研究方法叙述是否清楚、研究结果是否表达准确您都一一予以指导，令我逐步形成了严谨的科研思维。

感谢戴欣副研究员对我实验思路及方法的指导，您的指导总是逻辑清晰而又细致入微。每次与您交流，我都收获颇丰。

“实验室生活”对我来说新鲜而又美好，感谢每一位师兄师姐对我的帮助和指导。感谢郑小伟老师（郑博）在论文写作、实验方法上的指点与帮助。感谢张宁宁师兄、王韶英师姐、熊代江师兄、李昂师兄、张俊霞师姐、丁念念师姐、袁琬娟师姐、侯蓓蕾师姐、已毕业的李之萌师兄对我在实验方法、仪器试剂使用方面的指导和帮助，也感谢您们在生活上对我的帮助。

特别要感谢的是刘旺师兄，您总是牺牲自己的休息时间，不辞辛苦，对每位中学生耐心指导、精心讲授。您详细地给我们讲解每一步实验原理，耐心示范实验操作、技巧，同时，提示我统筹安排实验时间，从零基础的小白到可以独立完成实验的学生，一路上少不了您的悉心指导。生活上，您也对我关心细致入微、考虑周到，一顿自助餐、冬日中的一杯奶茶都是我“实验室生活”中美好的回忆。

感谢学校老师和同学们对我实验方面的指导和帮助。感谢生物宋秀珍老师、张晓菲老师、韩烁老师对我在生物基础知识和实验方法上的指导和帮助，是您们的热情点燃了我对生物学科的兴趣，指引我了解生命的奥秘、探索生命的奇迹。感谢年级组长袁卫华老师在科研思维上对我的培养，是您的指导点燃了我对科研的热爱，使我找到了可以为之奋斗一生的目标。感谢戴梅老师、李莹老师从化学、科研活动方面给予的指导和鼓励。特别感谢关键老师对我参与科研方面的培养，您注重培养学生严谨、精益求精的做事态度，对我的问题，您总是耐心指导、详细答复。每次与您交流，令我对科研的理解进一步加深。感谢章漪然学长在实验方面的帮助和指导以及在生活学习上的鼓励。

最后，感谢我的家人对我的理解、支持和帮助。感谢姥姥对我的疼爱，您心疼我做实验辛苦，总是倍加关心和呵护。感谢爸爸妈妈对我的理解和全力支持，实验室路途遥远，您们总是亲自接送，感谢您在生活上对我无微不至的关心。