

# 霍乱弧菌分型噬菌体 VP3 基因组序列的测定与分析

赵英伟<sup>1,2</sup> 王多春<sup>2</sup> 汪 敏<sup>3</sup> 李燕萍<sup>2,4</sup> 阚 飙<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup> 苏州大学基础医学院 苏州 215123) (<sup>2</sup> 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 北京 102206)

(<sup>3</sup> 国家人类基因组南方研究中心 上海 201203) (<sup>4</sup> 南昌大学中德联合研究院 南昌 330047)

(<sup>5</sup> 北京大学医学部 北京 100083)

**摘 要** 测定和分析霍乱弧菌分型噬菌体 VP3 基因组序列,并为 El Tor 型霍乱弧菌两类菌株的分型方法原理提供研究基础。鸟枪法构建 VP3 噬菌体全基因组随机文库,测序拼接成最小重叠群,引物步移法填补缝隙序列,拼接后获得 VP3 全基因组序列。PCR 随机扩增噬菌体 DNA 片段并酶切鉴定,预测可能存在的开放读码框(ORF);对 VP3 和相关噬菌体的 DNA 聚合酶基因作进化树分析,协助判定 VP3 的分类;对预测的部分启动子区利用报道基因进行活性分析。VP3 全基因组为环状双链 DNA,长度 39504bp,酶切鉴定结果与序列一致。确定了 49 个 ORF,注释了 27 个 ORF 的编码产物,其中有 20 个基因产物与 T7 样噬菌体同源,包括 RNA 聚合酶(RNAP)、参与 DNA 复制的蛋白、衣壳蛋白、尾管及尾丝蛋白、DNA 包装蛋白等。DNA 聚合酶(DNAP)进化树分析表明 VP3 与 T7 样噬菌体有同源性。将预测的 10 个启动子序列克隆到 lacZ 融合质粒 pRS1274 上,经检测均具有启动子活性。测定和分析 VP3 的基因组序列,基因组结构与进化树分析提示 VP3 属于 T7 噬菌体家族。

**关键词** 霍乱弧菌 噬菌体 VP3 基因组

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)06-0851-05

霍乱是由霍乱弧菌引起的急性肠道传染病,是以发病急、传播快、波及范围广、能引起大流行特征的国际检疫传染病之一,也是我国法定的甲类传染病之一。根据多年来的防治实践和深入研究,高守一等<sup>[1]</sup>从国内分离并选择出 5 株噬菌体(VP1~VP5)根据霍乱弧菌菌株对噬菌体的敏感性不同,将 El Tor 型霍乱弧菌分为 32 个噬菌体型。结合生物学分型方法,El Tor 型霍乱弧菌可区分为两类不同菌株(流行株和非流行株)以及不同的菌型。该分型方法可作为追溯传染来源、传播途径和分析流行形式的流行病学研究工具之一。

鉴于分型噬菌体在霍乱分型方案中的重要性,有必要对其进行深入研究。5 株噬菌体的生物学特性已有较详细的描述<sup>[2]</sup>,为进一步从基因组角度了解噬菌体的特性,从而为解释 El Tor 型霍乱弧菌两类菌株提供证据,通过选取分型噬菌体中的 VP3 作为研究对象,采用鸟枪法构建了 VP3 全基因组文库,测序后拼接获得全基因组序列,经 PCR 扩增随机片段并酶切验证后,用生物信息学方法和软件对 VP3 序列进行分析,通过实验验证了 10 个启动子的

活性,并对 VP3 的来源做了分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 噬菌体的培养和纯化

VP3 为 O1 群 El Tor 霍乱弧菌的分型噬菌体,其宿主菌为 919C(O1 群 El Tor 生物型噬菌体-生物分型 1c)本室保存,VP3 的培养及纯化按文献[3]进行。

### 1.2 VP3 DNA 的提取和随机文库的构建

按 Promega 公司 Lambda DNA 抽提试剂盒说明书操作。超声波随机断裂 DNA,绿豆核酸酶补平 DNA 并用 GeneClean II Reagent Kit 回收 1.6~2.0kb DNA。与商品化的 pUC18/*Sma* I/CAP 连接。将连接产物电转化入感受态大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  中。挑取白色菌落,抽提质粒 DNA 作为测序的模板。引物为 pUC18 上的测序引物。正向引物:5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3';反向引物:5'-GCGGATAACAATTTCACACAGG-3'。PCR 反应条件:95℃ 20s,95℃ 20s,50℃ 15s,60℃ 4min,共 40 个循环。以乙醇沉淀扩增产物,用 10 $\mu$ L 测序上样缓冲液

基金项目:国家 973 项目(G1999054102)

\* 通讯作者。Tel 86-10-61739458 Fax 86-10-61739156 E-mail:kanbiao@icdc.cn

作者简介:赵英伟(1965-),女,黑龙江省哈尔滨市人,副教授,博士,主要从事病原菌分子生物学研究。E-mail:zhaoyingwei1993@sina.com。王多春对本项工作有同等贡献。

其他作者:董 辉<sup>3</sup>,刘中华<sup>2,5</sup>,闫梅英<sup>2</sup>,李 伟<sup>2</sup>,梁未丽<sup>2</sup>,张学光<sup>1</sup>,高守一<sup>2</sup>,金维荣<sup>3</sup>

收稿日期:2005-04-18,修回日期:2005-08-15

溶解沉淀 ,以 ABIPRLSM™ 377DNA 全自动测序仪进行序列测定。

### 1.3 序列的拼接

用 Phred/Phrap/Consed 软件包对测得的序列进行组装、拼接 ,得到若干最小重叠群( contig )。对最小重叠群之间的缝隙及其内部碱基分值较低( 小于 40 )的区域 ,通过软件中的“ autofinish ”程序设计特异测序引物 ,以噬菌体 DNA 为模板进行测序反应 ,测序后的结果参与拼接。

### 1.4 基因组序列的分析

ORF 的预测分别采用 Glimmer、NCBI 的分析程序 ORF Finder、Genemark 以及 GeneFinder( <http://www.cbi.pku.edu.cn/> );序列的同源性比较应用 NCBI 的 Blast 程序在核酸数据库和蛋白质数据库进行同源性检索 ;启动子区的预测利用 Promoter Prediction/Prokaryotic 程序( <http://www.fruitfly.org/seq.tools/promoter.html> );重叠序列的分析应用 DNASTar/GeneQuest 软件 ;噬菌体的聚类分析使用 PHYLP5.0 软件 ,输入噬菌体的 DNAP 核酸序列 ,采用邻位相连法构建进化发生树 ,根据 DNAP 在发生树的不同根系位置 ,确定噬菌体的归属类别和遗传进化关系。

### 1.5 启动子区的活性检测

PCR 扩增启动子序列 ,并分别与质粒 pRS1274 在 16℃连接 ,转化 CaCl<sub>2</sub> 制备的 JM109 感受态细胞 ,涂布含氨苄青霉素、X-Gal、IPTG 的 LBA 平板。37℃ 培养 16h ,挑取兰色单菌落 ,提取质粒进行酶切和 PCR 鉴定。

## 2 结果

### 2.1 拼接 VP3 基因组 DNA 序列和酶切验证

测序随机文库中的克隆子并进行拼接 ,获得的最小重叠群为 10 倍覆盖率 ,在裂隙区域的两侧设计引物、获得扩增片段后进行测序 ,然后再次进行拼接 ,获得完整环状的 VP3 基因组序列。在 VP3 DNA 序列上随机选取 5 个 1.6 ~ 2.0kb 的片段 ,这些片段的长度及在 VP3 序列上的位置分布分别为 :Hao12 : 1957bp( 32395 ~ 34352 ) ,Hao34 : 1807bp( 23979 ~ 25786 ) ,Hao56 : 2051bp( 18369 ~ 20420 ) ,Hao78 : 1649bp( 7196 ~ 8845 ) ,Hao90 : 1479bp( 1479 ~ 39395 ,即环状 DNA 的 39395 ~ 39504 + 1 ~ 1479 ) ,用 Oligo6.0 软件在这 5 个片段的两端设计引物 ,PCR 扩增这 5 个片段 ,用在该片段上的限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切鉴定。酶切后 5 个扩增产物均得到与预测切开

片段的数量和大小相符合的片段( 图略 ) ,从而证实了 VP3 DNA 序列的正确性。

### 2.2 基因组一般特征

VP3 基因组为环状双链 DNA ,长度为 39502bp。G + C 含量为 42.62% ,低于霍乱弧菌测序菌株 N16961( 1 号染色体 G + C 含量为 46.91% ,2 号染色体 G + C 含量为 47.69% )。

### 2.3 ORF 的预测和注释

经 ORF 预测程序分析 VP3 的全序列 ,获得的 ORF 依据噬菌体 ORF 的确定标准<sup>[4]</sup> ,初步确定 VP3 基因组的 49 个 ORF ,这些 ORF 均具有特征性的转录起始序列 ,转录方向在 VP3 基因组上均向右。起始密码子多数使用了 ATG ,少数为 GTG( 基因 15 , 27 ) ,终止密码子 TAA、TAG 和 TGA 都有使用。VP3 基因组中前一基因的终止密码子与后一基因的起始密码子重叠现象比较常见。不翻译出来的部分较少( 根据预测结果 ,VP3 基因组有 10.96% 的序列不编码基因 )。翻译的 ORF 产物与已知的蛋白序列比较 ,最佳相匹配的产物列于表 1。

在 VP3 基因组序列中 ,49 个可能的 ORF 编码的多肽大小为 32aa ~ 1125aa。将推测的氨基酸序列在蛋白质数据库中进行同源检索 ,注释了 27 个 ORF 的编码产物 ,其中有 20 个基因产物与 T7 样噬菌体( T7、T3、phiYe03-12、gh-1 等 )的编码产物同源 ,其中高度同源的基因产物有 9 个 ,分别是 VP3 的 gp5、gp13、gp16、gp31、gp36、gp38、gp41、gp42 和 gp48( 表 1、图 1 )。

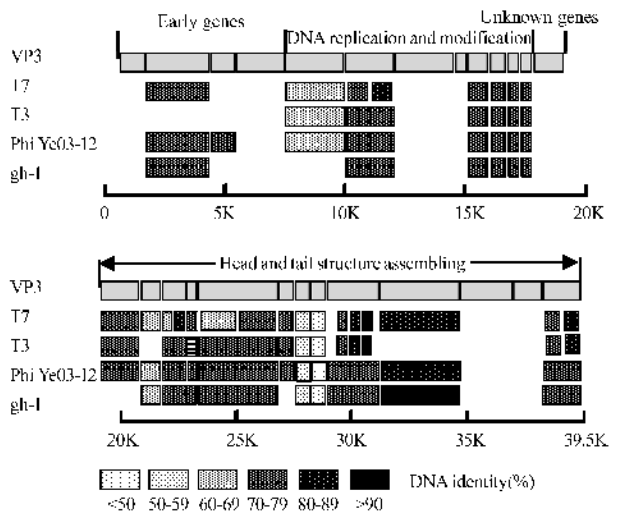


图1 VP3 的基因组构成及其与 T7 样噬菌体的比较

Fig.1 Genetic organization of the VP3 genome and comparison with T7-like phages

表 1 预测的 ORF、产物及可能的功能

Table 1 ORFs in the genomes of VP3 and it's putative function

Gene	Length /bp	Gene product			Function/Similarity	Expect
		Size( aa )	MW/kD	PI		
5	2652	884	99.7	7.0	T7 gene 1 ,RNAP	0.0
12	138	46	5.2	8.2	phage gh-1 ,primase /helicase	2e-07
13	1725	575	63.8	4.8	T7 gene 4B , helicase	0.0
16	2037	679	76.5	8.2	T3 DNA polymerase	0.0
22	411	137	15.6	5.4	T4 ORF49.2 , nrdC gene , nucleotide reductase subunit C	6e-04
23	864	288	32.9	5.3	phiYe03-12 , gene6 exonuclease	4e-88
24	672	224	25.2	4.4	phage gh-1 , putative ssDNA-binding protein	2e-33
25	453	151	17.2	9.5	phage gh-1 ,putative endonuclease	1e-50
26	435	145	16.0	7.9	phage gh-1 gene3.5 lysozyme ,amidase	6e-46
31	1599	533	58.3	4.7	phi Ye03-12 ,gene8 ,head-to-tail joining protein	0.0
32	789	263	28.4	4.3	phage gh-1 gene9 ,capsid assembly protein	1e-31
34	975	325	34.8	5.5	T7 gene 10A major capsid protein , gene 10B minor capsid protein	e-103
35	594	198	22.3	4.4	phi Ye03-12 ,gene 11 ,tail tubular protein A	2e-74
36	2385	795	88.8	5.1	T7 gene12 tail protein	0.0
38	519	173	19.8	4.4	phi Ye03-12 ,gene13 ,internal virion protein	0.0
39	585	195	21.0	5.5	phage gh-1 gene14 ,internal virion proteinB	2e-24
40	2214	738	83.7	5.4	T3 gene15 internal virion proteinC	9e-53
41	3375	1125	122.7	5.2	T7 gene16 internal virion protein	0.0
42	2283	761	82.6	5.5	phi Ye03-12 ,gene17 , tail fiber protein	0.0
48	1719	573	65.0	5.2	phage gh-1 gene19 , DNA packing protein B	0.0

VP3gp6 与 T3 的 gp1.3 以及 T3 复制起始区具有同源性,T3gp1.3 是 DNA 连接酶。VP3gp11 与 gh-1 的一个基因产物具有同源性,其基因产物功能目前还不清楚。VP3gp12 与 gh-1 的引发酶和解旋酶(primase/helicase)有同源性。VP3gp13 与 T7 基因 4B 解旋酶的同源性是 75%~88%;与 T3 基因 4A,基因 4B 的引发酶/解旋酶的同源性是 73%~89%。T7gene4 编码两个共线蛋白:63kD 蛋白,解旋酶从 4A 蛋白编码序列内部起始密码子( Met64 )翻译而成<sup>[5]</sup>。基因 4 蛋白作为六聚体结合单链 DNA,催化双链 DNA 解旋。63kD 蛋白具有引发酶/解旋酶活性<sup>[6]</sup>。VP3gp16 与 T7 gp5 有 74%~87% 的同源性, T7gene5 编码 DNAP。T7 DNAP 亚基分子量 80kD,具

有催化核苷酸在复制叉聚合和除去错误掺入的核苷酸两个酶促活性,增加 DNA 合成的精确性<sup>[7]</sup>。VP3 gp26 与假单胞菌噬菌体 gh-1、T7、T3、phi Ye03-12 基因 3.5 编码的溶菌酶和酰胺酶有较高的同源性。T7gene3.5 编码溶解酶,一个 17kD 的蛋白质,它切割细胞壁中的特定键,参与 DNA 复制和关闭转录。T7 溶解酶与 T7 RNAP 形成 1:1 复合物,阻止从起始复合物转换成延伸复合物,主要是抑制转录<sup>[8]</sup>。

2.4 启动子的预测及其活性检测

利用 Promoter Prediction/Prokaryotic 程序预测出 142 个区域具有相似于启动子序列结构的特征,结合考虑启动子位于结构基因上游以及基因或基因簇的分布,推测有 10 个区域为 VP3 可能的启动子区(表 2)。

表 2 VP3 可能的启动子区

Table 2 Putative promoter regions of VP3

No.	Start	End	Score	Putative promoter sequence( 5'-3' )
1	452	497	0.99	AGTGT <u>TTG</u> ACTCGATATCAAAAGATGTATAAGATACACCACATAACG
2	1739	1784	0.94	ATCGTATTGACTTTTCGCTTTTGTTCACCGATAATGAACGTGTCCAACA
3	5898	5943	0.95	TCCTCTCTTAAAGTCTCATCTTTAGTATTTATCATTTGGAGATTATTATCA
4	7730	7775	1.00	CTCTATTGGAGAAACTTTATGTCATTCGTTAAATCAAATCAAACAAAC
5	10635	10680	0.98	TAAC <u>TTTG</u> TAAACCACATGTAAACAATAGGAGAAATACTCTATGACTATTA
6	13084	13129	0.92	TATCTTAAAGATTAACTTAAAGAAGGAGCAATATGCTAACACTCAG
7	15691	15736	0.98	TTCC <u>TG</u> ATTGTATGCATCCTAATGCTACATATTATGGGGATGTTGATTAC
8	21589	21634	0.99	TCCTATTTCATTATTCTTAGAAGGAGAATAAAATTATGGCAATGACTGGT
9	32523	32568	0.98	CGTCTTGCTGATAAAATGGCCGATGAAGCTATACTTCGTCTACCAAAGT
10	36196	36241	0.92	CAAGCTTGACGTTACCTTGACGAATACCTATAAGAAATCTTGCTGTGATG

The - 35 region and the - 10 region are indicated by underlining ; Transcriptional initiation codon is indicated by boldface type.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

## 2.5 VP3 的 DNAP 聚类 and 进化分析

选取 16 种短尾噬菌体(包括 VP3)和一种肌尾噬菌体(KVP30),采用 PHYLIP 程序中的临近连接法,以噬菌体的 DNAP(DNA 序列)做进化树比较(图 2)。结果发现 VP3 与 T7、T3、phiYeO3-12、gh-1、PhiA1122 同归为一个根系,即 T7 样噬菌体家族。此家族噬菌体形态上为短尾状,遗传物质均为 dsDNA,且大小接近(T7、T3、phiYeO3-12、gh-1 大小分别为:39936bp,38208bp,39600bp,37359bp)。VP3 与另一种短尾弧菌噬菌体 VpV262 进化关系较远。此结果与 VP3 ORF 的预测结果相符(表 1)。

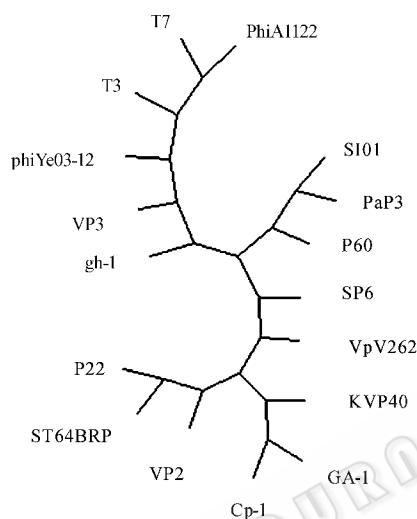


图 2 VP3 与相关有尾噬菌体 DNAP 基因进化树比较

Fig.2 Phylogenetic tree analysis of DNAP genes of VP3 and related tailed phages

## 3 讨论

由于与 T7 样噬菌体基因组相似,推测 VP3 基因组的转录可分为早、中、晚 3 个区域:其中基因 1~10 位于早期区域,属于早期转录的基因,包含克服宿主限制的蛋白质、蛋白激酶、RNAP 和未知蛋白。推测 VP3 抑制宿主限制酶的基因可能是基因 1,基因 11~26 位于第二区域,负责编码 DNA 复制和调控的蛋白质,包括 DNA 连接酶、内切核酸酶、溶菌酶、解旋酶、引发酶、DNAP、外切核酸酶;基因 30~48 位于晚期转录区域,负责编码噬菌体颗粒蛋白和成熟蛋白,包含头蛋白、头装配蛋白、主要头部蛋白、次要头部蛋白、尾管、尾丝蛋白、噬菌体颗粒中的蛋白质和 DNA 成熟蛋白。

不同类型有尾噬菌体吸附受体的差异主要取决

于其尾部结构的不同。VP3 的基因 42 预测产物为尾丝蛋白,它与 T7、phiYeO3-12 和 phage gh-1 的尾丝蛋白在核酸水平一致性分别为 83%、85% 和 90%。VP3 与 T7 样噬菌体尾丝蛋白序列的主要差异在 C-末端部分,dsDNA 噬菌体的尾丝蛋白的 C-末端部分负责对宿主菌受体的结合,此部分的变异较噬菌体其它基因快,从而决定了噬菌体对宿主的选择性改变<sup>[9]</sup>。本实验中,VP3 不能裂解大肠杆菌实验受体菌(结果未列出),提示这部分的变异可能是其宿主特异嗜性不同的原因。T7 尾丝蛋白(gp17)的 C-末端部分通过吸附在脂多糖上的受体部位开始裂解过程<sup>[10]</sup>。钝化实验分析 VP3 的受体成分,发现 VP3 的感染与脂多糖相关<sup>[11]</sup>。

启动子区中的 Pribnow 框(-10 区序列)大多包含 TATAAT 序列或是稍有不同的变化形式,一致序列为 TATAAT。Sextama 框(-35 区)一致序列为 TTGACA。预测的 10 个 VP3 启动子区基本符合这些结构。为确定这些启动子是否具有功能,我们利用 lacZ 融合质粒载体 pRS1274 检测了其活性。pRS1274 在其克隆位点后携带有完整的大肠杆菌 lacZ 的编码序列,包括翻译起始位点,但没有 lacZ 启动子。在没有插入外源启动子时,融合载体表达的  $\beta$ -Gal 活性非常低,在克隆位点插入有启动子的外源片段后,下游的 lacZ 能在所插入片段中启动子的控制下进行表达。本研究中将 10 个启动子区克隆到 pRS1274 载体上,转化于大肠杆菌 JM109 中,所有克隆子均呈现兰斑,提示克隆的区域具有启动子活性,可为大肠杆菌的 RNAP 所识别。这可能因为 VP3 与 T7、T3 等基因组同源性较高,因此 VP3 的一些启动子区也可作为 T7、T3 等大肠杆菌 RNAP 所识别。

烈性噬菌体含有保守的 DNA 复制基因,其中 DNAP 基因是烈性噬菌体的重要遗传特征,并被认为是比较噬菌体进化最合适的基因标志<sup>[12]</sup>。噬菌体的 DNAP(DNA 序列)进化树分析表明,VP3 与 T7 样噬菌体家族同归为一个根系。因此认为 VP3 属于 T7 样噬菌体。在 T7 噬菌体家族中,虽然它们有着许多相似的基因,但能够编码完全不同的蛋白来行使相同的功能,并分化出各自特有的宿主范围。因此,对 VP3 序列的深入研究将有助于我们揭示由基因差异引起噬菌体宿主范围不同的原因。获得 VP3 全基因组序列后,对基因组进行分析,可为噬菌体尤其是霍乱弧菌噬菌体家族研究增加遗传信息,总结规律,也可作为细菌的吸附、裂解研究作提示。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 高守一,魏承毓,丁静秋,等.霍乱防治手册.第五版.北京:卫生部疾病控制司,1999:59.
- [ 2 ] 高守一,吴顺娥,刘秉金.埃尔托型霍乱弧菌分型噬菌体特性的研究.副霍乱资料汇编,1984:237-242.
- [ 3 ] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南.黄培堂,等译.第三版.北京:科学出版社,2002:185-193.
- [ 4 ] Chitladda M, John D B, Barrie E D, et al. Sequence analysis and molecular characterization of the lactococcus lactis temperate bacteriophage BK5-T. *Appl Environ Microbiol* 2001 **8**:3564-3576.
- [ 5 ] Kong D, Griffith J D, Richardson C C. Gene 4 helicase of bacteriophage T7 mediates strand transfer through pyrimidine dimers, mismatches, and nonhomologous regions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**:2987-2992.
- [ 6 ] Kong D, Richardson C C. Role of the acidic carboxyl-terminal domain of the single-strand DNA-binding protein of T7 in specific protein-protein interactions. *J Biol Chem* 1998 **273**:6556-6564.
- [ 7 ] Yang X M, Richardson C C. Structure and functional organization of the DNA polymerase of bacteriophage T7. *J Biol Chem* 1996 **271**:24207-24212.
- [ 8 ] Barbara A M, Studier F W. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* 1987 **49**(2):221-227.
- [ 9 ] Hagg rd-Ljungquist E, Halling C, Calendar R. DNA sequences of the tail fiber genes of bacteriophage P2: evidence for horizontal transfer of tail fiber genes among unrelated bacteriophages. *J Bacteriol* 1992 **174**:1462-1477.
- [ 10 ] Steven A C, Trus B L, Maizel J V, et al. Molecular substructure of a viral receptor-recognition protein. The gp17 tail-fiber of bacteriophage T7. *J Mol Biol* 1988 **200**:351-365.
- [ 11 ] 赵英伟,王多春,李燕萍,等.霍乱弧菌噬菌体 VP3 受体成分的分析.中华流行病学杂志,2004, **12**:1092.
- [ 12 ] Chen F, Suttle C A, Short S M. Genetic diversity in marine algal virus communities as revealed by sequence analysis of DNA polymerase genes. *Appl Environ Microbiol* 1996 **62**:2869-2874.

Sequencing and analysis of *Vibrio cholerae* typing phage VP3 genomeZHAO Ying-wei<sup>1,2</sup> WANG Duo-chun<sup>2</sup> WANG Min<sup>3</sup> LI Yan-ping<sup>2,4</sup> KAN Biao<sup>2\*</sup><sup>(1)</sup> Department of Microbiology, Medical School, Soochow University, Suzhou 215123, China)<sup>(2)</sup> Department of Diarrheal Diseases, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)<sup>(3)</sup> Chinese National Human Genome Center, Shanghai 201203, China)<sup>(4)</sup> Sino-German Union Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)<sup>(5)</sup> Department of Medical, Peking University, Beijing 100083, China)

**Abstract**: DNA sequence and the genome of phage VP3 (a typing phage of *V. cholerae*) were analyzed. A random library of VP3 DNA was constructed by shot-gun library method. The VP3 genome sequence was assembled with contigs sequences, the gaps between different contigs were filled with sequencing data from primer walking. ORFs were predicted; Phylogeny of DNA polymerase sequences was analyzed to determine the class of VP3; The activity of putative promoter genes were analyzed using *lacZ* report system. VP3 genome is a 39504bp of circular double-stranded DNA. Twenty-seven out of forty-nine putative ORFs were annotated; twenty gene products were homologous with T7-like phages, including DNAP, DNA replicative protein, capsid, tail tubular, tail fiber protein, and DNA packaged protein. The activity of the putative promoter regions was confirmed through cloning those regions to LacZ-fuse plasmid pRS1274 and analysis of the expression of beta galactosidase. The complete genomic sequence of VP3 and phylogenetic tree analysis suggests VP3 is a member of T7 phage family.

**Key words**: *Vibrio cholerae*, Phage VP3, Genome

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G1999054102)

\* Corresponding author. Tel: 86-10-61739458; Fax: 86-10-61739156; E-mail: kanbiao@icdc.cn

Other authors: DONG Hui<sup>3</sup>, LIU Zhong-hua<sup>2,5</sup>, YAN Mei-ying<sup>2</sup>, LI Wei<sup>2</sup>, LIANG Wei-li<sup>2</sup>, ZHANG Xue-guang<sup>1</sup>, GAO Shou-yi<sup>2</sup>, JIN Wei-rong<sup>3</sup>

Received date: 04-18-2005