

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(3):322-327; 4 March 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 腾冲热海一株栖热菌裂解性噬菌体的分离及其特征

洪伟<sup>1</sup>, 韩剑<sup>1</sup>, 戴欣<sup>2</sup>, 季秀玲<sup>1</sup>, 魏云林<sup>1\*</sup>, 林连兵<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 昆明理工大学生物工程技术研究中心, 昆明 650224)

(<sup>2</sup> 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

**摘要:** 【目的】*Thermus* (栖热菌) 属是嗜热细菌中比较古老的类群, 本研究探索从腾冲热海热泉分离栖热菌噬菌体, 并初步分析其特征。【方法】采用“双层平板法”从云南腾冲热海碱性热泉中分离纯化栖热菌噬菌体; 对噬菌体及其宿主进行电镜形态观察, 并进行噬菌体基因组限制性酶切片段多态性分析、噬菌体生理特征及蛋白组成分析。【结果】从腾冲热海热泉分离获得 1 株裂解性噬菌体, 其宿主菌 TC10 通过 16S rRNA 基因序列分析鉴定为 *Thermus* 属菌株。此噬菌体为长尾型, 头部直径 67 nm, 尾管长 837 nm、宽 10 nm, 最适感染温度为 65°C - 70°C, 最适感染 pH 值为 7.6, 对氯仿不敏感, 其形态与分离自俄罗斯勘察加半岛热泉的栖热菌噬菌体 P23-45 和 P74-26 有一定的差异, 蛋白组成差异显著, 为一株新的栖热菌噬菌体, 命名为 TTSP10 (*Tengchong Thermus Siphoviridae* Bacteriophage)。

**关键词:** 栖热菌; 嗜热噬菌体; TTSP10 (*Tengchong Thermus Siphoviridae* phage); 形态与生理特征

**中图分类号:** 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2010) 03-0322-06

嗜热微生物是极端微生物中的重要类群, 主要生活于各种地热环境, 如火山口及其周围区域、温泉、海底热溢口等, 对嗜热微生物的研究有助于提高对不同地热环境中的地球生物化学过程的认识。现在, 许多科学家又把目光集中在寄生于高温菌中的各种嗜热噬菌体 (Thermophilic phage)。噬菌体是感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的病毒的总称, 是地球上最为丰富和多样的生命形式, 并可能对微生物的进化产生了重要的影响<sup>[1]</sup>。噬菌体自被发现以来, 就被作为基因复制及表达调控研究的模型, 对嗜热微生物噬菌体的研究有助于丰富对生命起源与进化、生命本质及环境适应策略的认识。

腾冲热海作为我国著名的火山地热区, 具有不同水化学特征的温泉类型, 与之对应的漫长的微生物生态系统的演化, 孕育出了现代腾冲热海丰富的

高温微生物资源。从腾冲热海已分离到栖热菌 (*Thermus*)<sup>[2]</sup>、亚栖热菌 (*Meiothermus*)<sup>[3]</sup>、硫化叶菌 (*Sulfolobus*), 嗜酸热两面菌 (*Acidianus*) 等极端嗜热菌及硫化叶菌病毒 STSV1<sup>[4-5]</sup>。栖热菌 (*Thermus*) 是嗜热细菌中比较古老的类群, 该属菌株已成为研究高温菌及高温适应性机制的模式生物, 侵染栖热菌的噬菌体因在生物进化的独特地位 (宿主菌为处于生物进化树根部的古老细菌和古菌类群), 已成为高温菌研究的又一热点。从美国、冰岛、俄罗斯等国的热泉中已分离到栖热菌噬菌体<sup>[6]</sup>, 分离和研究腾冲热海中的栖热菌及其噬菌体, 不但可以获得一批高温噬菌体资源, 对阐明嗜热微生物嗜热机制也有重要意义。

本文报道分离自腾冲热海碱性热泉的一株栖热菌噬菌体, 并对其电镜形态、基因组限制性酶切片段

**基金项目:** 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题 (SKLMR-080605); 国家自然科学基金 (30660009, 30960022)

\* 通信作者。Tel: +86-871-3802069; E-mail: linlb@sohu.com

**作者简介:** 洪伟 (1985 -), 男, 贵州金沙人, 硕士研究生, 主要从事高温菌噬菌体研究。E-mail: hongwei2010@gmail.com

**收稿日期:** 2009-11-14; **修回日期:** 2009-12-27

多态性、蛋白组成及生理特征进行初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

从云南省腾冲县热海热泉采集水样及沉积物, 样品经室温保存于无菌的离心管中运至实验室, 采样点温度为 70℃ - 75℃, pH 值为 7.5 - 8.0。

### 1.2 培养基

培养基采用高温菌培养基 DSM88<sup>[7]</sup>, 调节 pH 值为 7.6。固体培养基的琼脂浓度为 2%, 半固体培养基的琼脂浓度为 0.8%。

### 1.3 栖热菌及其噬菌体分离

栖热菌分离采用稀释涂布平板法分离, 将不同采样点及不同稀释度的样品 100 μL 涂布于 DSM88 固体培养基平板上, 用胶带封口后置于密封的自封袋内, 置于 70℃ 恒温培养箱中培养 24 - 48 h, 挑取黄色单菌落 (栖热菌菌株产水不溶性黄色色素), 重复纯化 3 次获得纯菌株作为噬菌体分离的宿主菌。

栖热噬菌体采用双层平板法<sup>[8]</sup>分离, 将 20 mL 热泉样品接种到 200 mL DSM88 培养基中, 70℃ 恒温摇床振荡培养过夜, 所得培养液经无菌 0.22 μm 无菌滤膜除菌后取 100 μL 与 350 μL 培养至对数生长期的栖热菌混合, 室温静置 10 min 后与 3 mL 半固体培养基混匀, 将此半固体培养基均匀倾倒在 DSM88 固体平板上, 形成双层平板。将双层平板置于密封袋中放置于 70℃ 培养过夜。观察到噬菌斑产生后, 用牙签挑取单个噬菌斑, 溶于 DSM88 培养基中作为下次感染宿主细胞的病毒储液, 经 3 次纯化获得纯噬菌体。

### 1.4 宿主菌总 DNA 的提取、16S rRNA 基因扩增及测序

宿主菌总 DNA 采用 TaKaRa DNA 提取试剂盒提取, 16S rRNA 基因扩增采用细菌通用引物, 正向引物 f1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 r2: 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3'。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 45 s、50℃ 退火 45 s、72℃ 延伸 90 s、30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经胶回收后, 连接到 pMD18-T 载体上, 利用化学法转化 *E. coli* DH5α 感受态菌株, 通过蓝白斑筛选出重组质粒, 挑取阳性克隆, 由上海生物工程有限公司完成 16S rRNA 基因测序。

### 1.5 宿主菌及其噬菌体形态观察

将处于对数生长期的宿主菌菌体用 2% (W/V) 的醋酸双氧铀染色后使用透射电子显微镜观察

(JEOL JEM-1400)。

取效价为 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> PFU/mL 噬菌体液 20 μL 用 2% (W/V) 醋酸双氧铀染色后用透射电子显微镜观察 (JEOL JEM-1400)。

### 1.6 噬菌体 DNA 提取及限制性酶切片段长度多态性分析

将 100 mL 噬菌体富集液培养至噬菌体效价为 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> PFU/mL, 用贝克曼 Avanti J-25 离心机固定角度转头 JA-10 于 6000 r/min 离心 15 min, 去除培养液中的菌体及细胞碎片, 收集上清再以 10000 r/min 离心 15 min, 弃沉淀, 上清中加入 DNAase I 和 RNase A (终浓度为 1 μg/mL), 37℃ 消化 30 min, 使用贝克曼 XL-90 超速离心机 Ti70 固定转头 40000 r/min 离心 90 min, 沉淀用 1 mL ddH<sub>2</sub>O 重悬后, 置于 SIGMA 1-14 离心机 12000 r/min 离心 15 min, 上清即为含噬菌体颗粒的噬菌体悬液。

取 1 mL 以上述方法制备的噬菌体悬液, 加入 EDTA (终浓度 20 mol/L)、蛋白酶 K (终浓度 50 μg/mL) 和 150 μL 10% SDS, 于 56℃ 水浴保温 3 h, 用酚/氯仿法抽提噬菌体 DNA, 所得的 DNA 样品分别用 *Bam*H I、*Eco*R I、*Pst* I 和 *Xho* I 分别进行酶切分析。

### 1.7 噬菌体蛋白组成分析

将 1 L 噬菌体富集液培养至噬菌体效价为 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> pfu/mL, 培养物于 10000 × g, 4℃, 15 min 离心 2 次, 收集上清以尽量除去菌体及其碎片。上清加入 DNAase I 和 RNase A (终浓度均为 1 μg/mL) 于 37℃ 消化 30 min 后加入 NaCl 至终浓度为 1 mol/L, 待 NaCl 完全溶解后冰上放置 1 h, 12000 × g, 4℃ 离心 15 min, 收集上清并加入 PEG6000 至终浓度为 10% (W/V), 待 PEG6000 完全溶解后, 于 4℃ 冰箱放置 3 h。所得溶液于 12000 × g, 4℃ 离心 20 min 收集病毒沉淀, 病毒沉淀用 13 mL 无菌 ddH<sub>2</sub>O 溶解, 使用等体积的氯仿抽提 1 次, 12000 × g 离心后收集水相。于水相中加入 CsCl (0.5 g/mL), 搅拌溶解后置于离心管中, 使用 Beckman 超速离心机, Ti90 转头, 120000 × g, 4℃, 离心 24 h 收集噬菌体, 制备样品用于 SDS-PAGE 电泳实验以确定 TTSP10 蛋白组成<sup>[15]</sup>。

### 1.8 物理及化学因素对噬菌体活性的影响

**1.8.1 温度及 pH 值对噬菌体活性的影响:** 温度对噬菌体活性的影响测定方法为: 将滴度为 1 × 10<sup>7</sup> pfu/mL 的噬菌体悬液 1 mL 置于 65℃、70℃、80℃、90℃ 水浴锅中每隔 10 min 取样, 测定各温度

梯度下不同时间噬菌体的滴度<sup>[9-10]</sup>。

pH 值对噬菌体活性的影响测定方法为:将 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10、11 的 DSM88 培养基 0.99 mL 加入 1.5 mL 无菌离心管中,加入 0.01 mL 滴度为  $1 \times 10^7$  pfu/mL 的噬菌体悬液,室温处理 1 h 后用 DSM88 培养基稀释 10 倍后取 20  $\mu$ L 与 350  $\mu$ L 对数期宿主细胞混合,室温静止 10 min,分别测定滴度<sup>[6]</sup>。

**1.8.2 氯仿、蛋白酶 K 及去垢剂等对噬菌体活性的影响:**①氯仿对噬菌体活性的影响测定方法为:将滴度为  $1 \times 10^7$  pfu/mL 的噬菌体悬液与氯仿混合,使得氯仿的终浓度为 25% (wt/v),室温放置 5 min 后(不断颠倒),于 6000  $\times$  g 离心 1 min,取上清测定滴度;②去垢剂对噬菌体活性的影响测定方法为:噬菌体悬液在室温下经 0.3% (wt/v) Triton X-100 处理 5 min 后测定滴度;噬菌体悬液经 0.1% SDS (wt/v) 在 50 $^{\circ}$ C 处理 3 min 后测定滴度;③蛋白酶 K 对噬菌体活性的影响测定方法为:噬菌体悬液在缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCL, 5 mmol/L EDTA) 中经

proteinase K (1 mg/mL) 56 $^{\circ}$ C 消化 1 h 后测定滴度<sup>[11]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 宿主栖热菌及其裂解性噬菌体的分离

从腾冲热海热泉分离到 30 多株栖热菌菌株,并分离得到一株噬菌体 TTSP10,TTSP10 能形成边缘清晰、透明的噬菌斑,经 24 h 培养,噬菌斑直径可达 1.5-3 mm,其宿主菌 TC10 的 16S rRNA 基因序列 (Accession Number:GU119889) 与 *Thermus* 属菌株的最大相似性达 99%,将宿主菌鉴定为 *Thermus* 属菌株 *Thermus* sp. TC10。

### 2.2 噬菌体形态观察

TTSP10 头部直径为 67 nm,具有典型的多面体结构,其尾管很长,长度为 837 nm,直径为 10 nm,尾管柔韧、易于弯曲,末端有尾板结构;头部和尾管相连接的尾领处有一定的收缩,直径为 15 nm,TTSP10 具有长尾噬菌体典型的特征,(图 1)所示为 TTSP10 及其宿主 *Thermus* sp. TC10 菌株的形态。

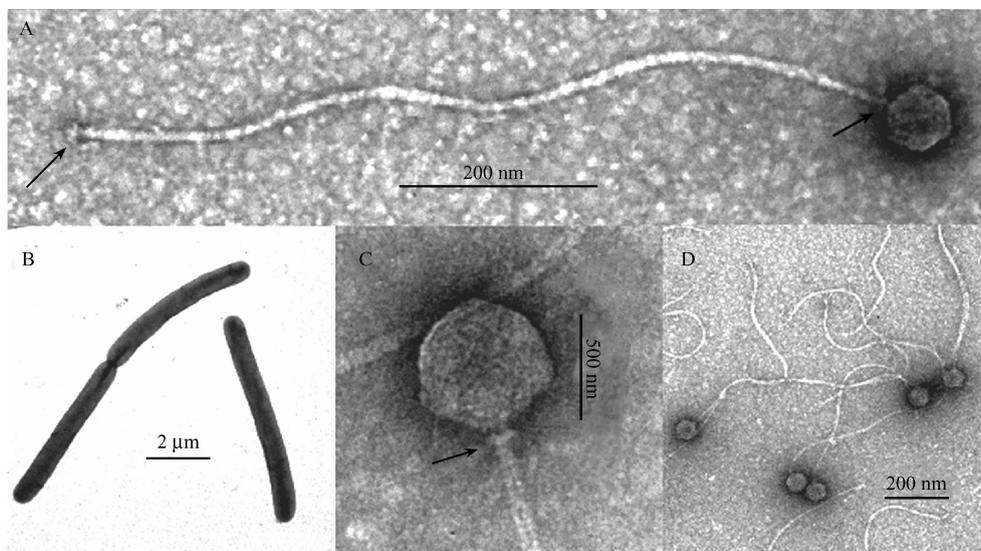


图 1 TTSP10 及其宿主电镜形态

Fig. 1 Transmission electron micrographs of TTSP10 and its host. A: Extremely long flexible tail and icosahedral head of TTSP10, black arrows show collar and endplate of TTSP10. B: Host cells of TTSP10. C: Icosahedral head magnified by 80,000 times, black arrow shows collar of TTSP10; D: TTSP10 virions.

### 2.3 限制性酶切片长度多态性分析

TTSP10 的基因组为双链 DNA,可以被 *Pst* I 酶切成多条大小不同的片段,用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切获得的片段相对较少,而 *Xho* I 对基因组 DNA 的酶切效率很低,进一步分析表明,其基因组 DNA 大小约为 60 kb,见图 2。

### 2.4 物理及化学因素对噬菌体活性的影响

#### 2.4.1 温度对噬菌体活性的影响:宿主菌 *Thermus*

TC10 在 50 $^{\circ}$ C-78 $^{\circ}$ C 可以被 TTSP10 感染,以培养温度为 65 $^{\circ}$ C 时获得的噬菌体滴度最大,培养液中噬菌体滴度可达  $3.5 \times 10^9$  pfu/mL。热稳定性分析表明(图 3),TTSP10 在 65 $^{\circ}$ C 最稳定,随着温度升高,噬菌体的存活率降低,在 70 $^{\circ}$ C 和 80 $^{\circ}$ C 分别保温 1 h 后,噬菌体的滴度分别下降 46% 和 96%,90 $^{\circ}$ C 处理 10 min 噬菌体失活。

#### 2.4.2 pH 值对噬菌体活性的影响:pH 的改变对噬

菌体滴度的影响不明显,其在 pH 为 4 - 11 均保持 35% 以上的滴度,尤以 pH8 时滴度最高。随着 pH 值的降低,TTSP10 活性快速的减少,当 pH 值等于 3 时完全失去感染宿主的能力,但其在 pH11 时仍保持 60% 的滴度,相比之下,TTSP10 在高 pH 环境下有较好的稳定性。

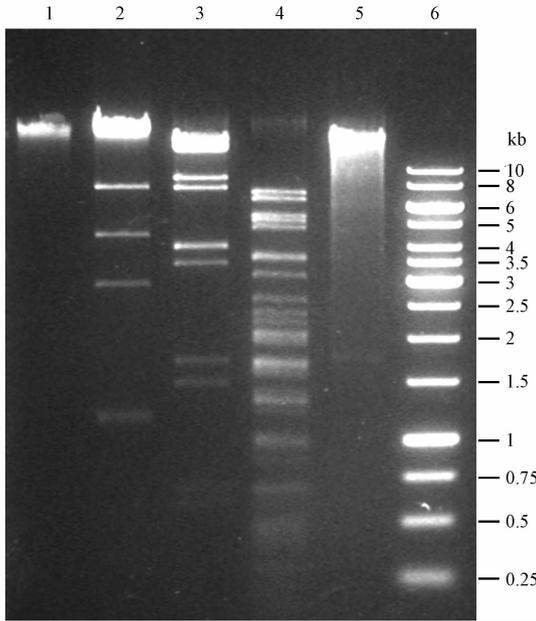


图 2 TTSP10 基因组 DNA 限制性酶切图谱

Fig.2 Restriction endonuclease digestion patterns of TTSP10. Lane1, Purified TTSP10 DNA; Lane2, TTSP10 DNA digested with *Bam*H I; Lane 3, TTSP10 DNA digested with *Eco*R I; Lane 4, TTSP10 DNA digested with *Pst* I; Lane 5, TTSP10 DNA digested with *Xho* I; Lane 6, size markers.

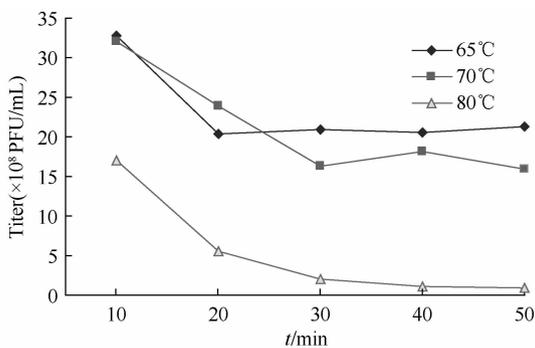


图 3 温度对噬菌体活性的影响

Fig.3 Effect of temperature on TTSP10.

**2.4.3 有机溶剂,去垢剂等对噬菌体活性的影响:** TTSP10 对氯仿不敏感,氯仿处理后仍剩余 85% 以上的滴度,但其对非离子去垢剂 Triton-X100 和 SDS 敏感,处理后滴度分别剩余 17% 和 32%,蛋白酶 K (1 mg/mL) 则能完全破坏噬菌体感染活性,这些现象表明,噬菌体 TTSP10 外壳具有蛋白质成分无脂质包膜。

## 2.5 噬菌体蛋白组成分析

SDS-PAGE 电泳结果见(图 4),TTSP10 蛋白组成表现为 3 条主要的条带,预测其大小(由上到下)依次为:44、42、39 kDa,其中以分子量为 44 kDa 条带含量最高,可能为其重要的结构蛋白,其电泳图谱分离自俄罗斯的 P23-45 有明显的差异<sup>[19]</sup>。

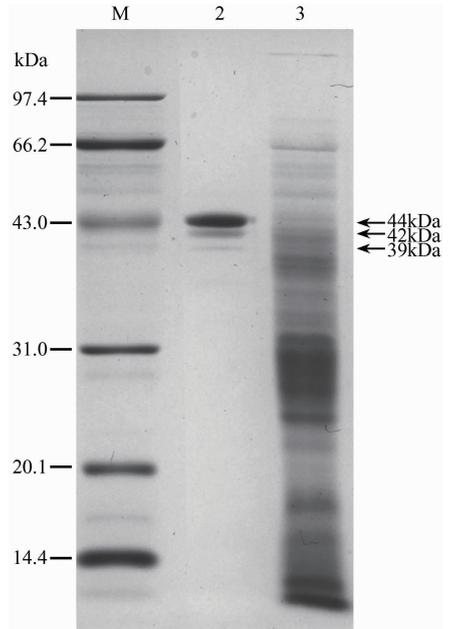


图 4 TTSP10 SDS-PAGE 图谱

Fig.4 SDS-PAGE of purified TTSP10 and its corresponding host. Lane M, protein marker. Lane 2, Purified TTSP10. Lane 3, *Thermus* sp. TC10 total protein.

## 3 讨论

栖热菌 (*Thermus*) 属作为嗜热真细菌中比较古老的类群<sup>[12]</sup>,自 1969 年 Thomas Brock 和 Hudson Freeze 从美国黄石公园分离得到第一株水生栖热菌以来就倍受关注,目前 *Thermus* 属以发表了 8 个种,它们分离自冰岛、日本、新西兰,俄罗斯堪察加半岛和美国黄石公园等地<sup>[13]</sup>,从一些栖热菌中已分离出相应的栖热菌噬菌体<sup>[6]</sup>,这些噬菌体分别属于肌尾噬菌体科 (*Myoviridae*),长尾噬菌体科 (*Siphoviridae*),覆盖层噬菌体科 (*Tectiviridae*) 和丝杆噬菌体科 (*Inoviridae*)。国内对嗜热噬菌体已有研究,章晓波等人从太平洋深海地热区分离得到两株嗜热芽孢杆菌噬菌体和一株地芽孢杆菌噬菌体,并对其中 GVE2 的 DNA 结合蛋白,胸苷酸合成酶,溶菌酶,尾管组装基因簇进行深入研究<sup>[14-18]</sup>。但至今国内未有栖热菌噬菌体的相关报道。本研究从腾冲热海热泉水样中获得一株长尾科噬菌体 TTSP10,该噬菌体具有正二十面体的头部和长达 837 nm 的

尾管,尾管略长于 M. X. Yu 在俄罗斯堪察加半岛 Dolina Geysers valley 和 Uzon Valley 分离到两株长尾科噬菌体 P23-45 和 P74-26<sup>[6]</sup>,就其蛋白图谱而言,TTSP10 SDS-PAGE 结果显示其含有 44、42、39 kDa 3 条主要条带,其中以分子量为 44 kDa 条带含量最高,可能为其重要的结构蛋白。相比之下,P23-45 的 SDS-PAGE 显示,其主要蛋白质的分子量分别为 50、40、17 kDa,这些特征说明 TTSP10 与 P23-45 存在明显差异<sup>[19]</sup>。此外,TTSP10 分离自腾冲热海,其宿主菌为在系统发育上形成独特地域性分布的热海栖热菌族群<sup>[2]</sup>。以上结果表明,TTSP10 为一株区别于 P23-45 和 P74-26 的长尾噬菌体科噬菌体。

P23-45 和 P74-26 的基因组序列测定已经完成,对其基因组的解析发现了一系列独特的基因,同时发现了常在真核生物存在的利用反向重复序列形成三链 DNA 结构进行基因表达调节的特殊方式<sup>[11]</sup>。进一步探索来源于腾冲热海的 TTSP10 基因组特征,将有助于比较在不同地理条件下相同噬菌体类型在基因组成上的差异,发现新基因,探索高温噬菌体的适应性机制。在研究中,我们已从腾冲热海分离到以上 4 个科的栖热菌噬菌体<sup>[20]</sup>,可见腾冲热海的栖热菌及其噬菌体同样具有多样性,腾冲热海作为我国重要的高温菌及其嗜热噬菌体资源宝库,值得进一步研究。

**致谢** 本研究部分工作在中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室完成,感谢黄力研究员的指导。

## 参考文献

- [ 1 ] Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000,64(1):69-114.
- [ 2 ] Lin LB, Chen CY, Peng Q, et al. *Thermus rehai* sp nov., isolated from Rehai of Tengchong, Yunnan Province, China. *Journal of Basic Microbiology*, 2002, 42(5):337-344.
- [ 3 ] Chen CY, Lin LB, Peng Q, et al. *Meiothermus rosaceus* sp nov isolated from Tengchong hot spring in Yunnan, China. *FEMS Microbiology Letters*, 2002,216(2):263-8.
- [ 4 ] Xiang X, Dong X, and Huang L. *Sulfolobus tengchongensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon isolated from a hot spring in Tengchong, China. *Extremophiles*, 2003,7(6):493-8.
- [ 5 ] Edwards RA, Rohwer F. Viral metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, 2005,3(6):504-10.
- [ 6 ] Yu MX, Slater MR, Ackermann HW. Isolation and characterization of *Thermus* bacteriophages. *Archives of Virology*, 2006,151(4):663-679.
- [ 7 ] F. T. Robb. Thermophiles Archaea : A laboratory manual, Cold Spring Harbor. *Laboratory Press*, 1995: 173.
- [ 8 ] Martha RJ, Clokie AMK. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. *Humana Press* 2008:28.
- [ 9 ] Colasito DJ, Rogoff MH. Characterization of lytic bacteriophages of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of General Virology*, 1969,5(2):267-74.
- [ 10 ] 孙佳,叶德赞, Agnes K, et al. 裂解性弧菌噬菌体的分离及生理特性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008(6):780-784.
- [ 11 ] Geslin C, Gaillard M, Flament D, et al. Analysis of the first genome of a hyperthermophilic marine virus-like particle, PAV1, isolated from *Pyrococcus abyssi*. *Journal of Bacteriology*, 2007,189(12):4510-4519.
- [ 12 ] 和致中,彭谦. 高温菌生物学. 科学出版社, 2000: 156.
- [ 13 ] Henne A, Bruggemann H, Raasch C, et al. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nature Biotechnology*, 2004,22(5):547-53.
- [ 14 ] Wu S, Liu B, Zhang X. Identification of a tail assembly gene cluster from deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2. *Virus Genes*, 2009,38(3):507-14.
- [ 15 ] Ye T, Zhang XB. Characterization of a lysin from deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008,78(4):635-641.
- [ 16 ] Wei DH, Zhang XB. Identification and characterization of a single-stranded DNA-binding protein from thermophilic bacteriophage GVE2. *Virus Genes*, 2008,36(1):273-278.
- [ 17 ] Wang Y, Zhang X. Identification and characterization of a novel thymidylate synthase from deep-sea thermophilic bacteriophage *Geobacillus* virus E2. *Virus Genes*, 2008, 37(2):218-24.
- [ 18 ] Liu B, Wu SJ, Song Q, et al. Two novel bacteriophages of thermophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal fields. *Current Microbiology*, 2006, 53(2):163-166.
- [ 19 ] Minakhin L, Goel M, Berdygulova Z, et al. Genome comparison and proteomic characterization of *Thermus thermophilus* bacteriophages P23-45 and P74-26: siphoviruses with triplex-forming sequences and the longest known tails. *Journal of Molecular Biology*, 2008,

378(2):468-80.

*International Conference on Thermophiles Research*, 2009.[20] Lin LB, Huang L, Hong W. Diversity of thermophilic archaea and bacteria viruses in Tengchong China. 10<sup>th</sup>

## Isolation and characterization of a *Thermus* lytic bacteriophage from Tengchong Rehai hot spring

Wei Hong<sup>1</sup>, Jian Han<sup>1</sup>, Xin Dai<sup>2</sup>, Xiuling Ji<sup>1</sup>, Yunlin Wei<sup>1\*</sup>, Lianbing Lin<sup>1\*</sup><sup>(1)</sup>Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224)<sup>(2)</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of sciences, Beijing 100101)

**Abstract:** [ **Objective** ] Genus *Thermus* represents an ancient descendant within the domain of Bacteria. This research was focused on the isolation and characterization of *Thermus* bacteriophages from Tengchong Rehai hot spring. [ **Methods** ] Bacteriophage was isolated from Tengchong Rehai hot springs by double-layer plate method, and further characterized by morphology, temperature, pH and organic solvent effect on phage production, DNA restriction endonuclease digestion and protein composition analysis. [ **Results** ] One lytic bacteriophage was isolated from Tengchong hot spring. Its host strain *Thermus* sp. TC10 belonged to genus *Thermus* (16S rRNA gene accession number GU119889). This phage has a hexagonal head (67 nm in diameter) and an extremely long tail (837 nm in length and 10 nm in width). The optimum temperature and pH value for production of virions were about 65°C and 7.6, respectively. The phage was not sensitive to chloroform. The differences between this phage and the other two *Thermus Siphoviridae* phages P23-45 and P74-26, which were isolated from Russia's Kamchatka peninsula, demonstrated it was a novel bacteriophage and was denoted as TTSP10 (Tengchong *Thermus Siphoviridae* phage).

**Keywords:** *Thermus*; Thermophilic bacteriophage; TTSP10 (Tengchong *Thermus Siphoviridae* phage); Morphological and physiological characteristics

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (SKLMR-080605) and the Foundation of State Natural Science (30660009, 30960022)

\* Corresponding author. Tel: +86-871-3802069; E-mail: linlb@sohu.com

Received: 14 November 2009/Revised: 27 December 2009

### 《微生物学报》审稿程序

问: 贵刊的审稿程序是怎样的? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: 本刊严格遵守“三审制”, 即: 编辑部内审, 专家外审, 主编总审。从投稿日期开始, 争取在 2 个月之内给出审稿结果, 5-7 个月之内发表。

- (1) 收到来稿后, 首先将请 2 位专家进行初审, 再送主编进行最后的总审, 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审 2 位专家的意见分歧较大, 编辑部将再请第 3 位专家进行初审, 之后再送主编总审, 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见), 编辑会给作者发出 E-mail 告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后, 经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者, 在没有完成全部审稿之前, 不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。