

# MZTP02 噬菌体 *tmp* 基因的鉴定： 与尾巴装配相关的蛋白质\*

宋少云<sup>1</sup>, 廖 威<sup>1,2</sup>, 陈维春<sup>1,3</sup>, 李广宏<sup>1</sup>

- (1. 中山大学生命科学学院//有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275;
2. 广西职业技术学院食品与生物技术系, 广西南宁 530226;
3. 广东医学院生化和分子生物研究所, 广东 湛江 524023)

**摘要:** 苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 广泛用于生物防治, 但溶原性噬菌体的随机爆发严重影响了它的生产。一种新的苏云金芽孢杆菌溶原性噬菌体被分离出来并进行了基因组测序。TMP (tape measure protein) 蛋白质具有协助和控制噬菌体尾巴装配的功能, 是噬菌体侵染期间协助其吸附宿主的一种必需蛋白质。使用 PCR 方法从 MZTP02 噬菌体基因组中扩增出 *tmp* 基因后, 连接到 pQE30 质粒并用 M15 菌株进行表达, 获得了相对分子质量为 35 000 的蛋白质条带; 该蛋白质经 Ni-NTA 纯化后, 作为抗原注入新西兰家兔制备获得多克隆抗体; Western blot 分析发现了一条与原核表达大小一致的蛋白质表达带。噬菌体悬浮液混合 TMP 血清抗体后测定双层平板的滴度, 在噬菌体的侵染复数 (m. o. i) 小于 1 的情况下, 噬菌体的滴度与血清抗体的质量浓度呈反比关系。当一定滴度的噬菌体悬液分别混合 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的血清质量浓度时, 滴度分别为  $1 \times 10^5$  pfu/mL 和  $2 \times 10^3$  pfu/mL。这一结果表明 TMP 血清抗体能够与 TMP 蛋白质相结合, 从而导致了噬菌体滴度的降低。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌; 溶原性噬菌体; *tmp* 基因; 原核表达; 装配

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2013) 06-0114-06

## Identification of *tmp* Gene from Lysogenic Bacteriophage MZTP02: A Protein Associated with Phage Tail Packaging

SONG Shaoyun<sup>1</sup>, LIAO Wei<sup>1,2</sup>, CHEN Weichun<sup>1,3</sup>, LI Guanghong<sup>1</sup>

- (1. State Key Laboratory of Biocontrol and Institute of Entomology//School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Guangxi Vocational and Technical College, Nanning 530226, China;
3. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

**Abstract:** *Bacillus thuringiensis* is widely used for pest control. However, the fermentation production of this bacterium was severely influenced by the random outbreak of lysogenic phage from *B. thuringiensis*. In the present study, a novel bacteriophage MZTP02 was isolated from industrial *B. thuringiensis* strain MZ1 and sequenced for *tmp* gene encoding tail tape measure protein. By assisting and control the tail packaging of bacteriophage, the protein is an essential component to help phage attach to the host for successful infection. By PCR, *tmp* gene was amplified from the genome DNA of MZTP02 and cloned into pQE30 and expressed in M15. The TMP protein of 35 000 was obtained and purified by Ni-NTA column. Using the purified TMP protein as the immunogen, polyclonal serum was raised in the New Zealand rabbit. Western blot analysis of TMP proteins expressed in prokaryotic cells demonstrated a polypeptide with size of 35 000 which was in agreement with the predicted size of this protein. Results of plaque formation

\* 收稿日期: 2013-04-03

基金项目: “十五”国家科技攻关计划资助项目 (2001BA708B07-03); 国家“863计划”资助项目 (2001AA204011)

作者简介: 宋少云 (1966年生), 女, 研究方向: 生物杀虫剂; 通讯作者: 李广宏; E-mail: lsslgh@mail.sysu.edu.cn

of phage after TMP antiserum treatment showed a negative relationship to the concentration of antiserum when the concentration of multiplicity of infection (m. o. i) was less than 1, e. g. the titers were  $1 \times 10^5$  pfu/mL and  $2 \times 10^3$  pfu/mL when a degnized amounts of phage were mixed with TMP antiserum with concentration of 25  $\mu\text{g/mL}$  and 250  $\mu\text{g/mL}$  respectively. This result indicated that TMP antiserum can combine with TMP protein, and then depress the phage titer.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*; lysogenic bacteriophage; *tmp* gene; prokaryotic expression; packaging

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 被广泛应用于防控鳞翅类昆虫, 但是溶源性噬菌体的随机爆发对苏云金芽孢杆菌杀虫剂生产有很大的危害。苏云金芽孢杆菌 83% 的亚种都是溶源性噬菌体的寄主<sup>[1-2]</sup>, 噬菌体随机爆发的几率为 15% ~ 30%, 少数为 50% ~ 80%, 甚至可达 100%<sup>[3]</sup>。由于噬菌体的随机爆发造成杀虫剂生产巨大损失, 从 1960 年以来就开展了大量的研究<sup>[4]</sup>, 但到目前为止, 还没获得有效的方法来抑制噬菌体的随机爆发。1984 年, 发现苏云金芽孢杆菌菌株 H14 细胞内有一个小 DNA 分子的存在, 它是一个能够迁移的线性质粒<sup>[5]</sup>; 这个线性的 DNA 分子实际上对应的是溶源性噬菌体的前噬菌体形式。

目前只有 3 个从苏云金芽孢杆菌中分离的噬菌体 GIL01, Bam35 和 GIL16, 已进行了 DNA 测序<sup>[5-7]</sup>。GIL01 和 Bam35 属于复层噬菌体科, 它们能够侵染很多革兰氏阳性细菌, 在结构上只有少数几种核苷酸有差别。这 3 种噬菌体的基因组结构有着非常紧密的关联性<sup>[5]</sup>, 但对随机爆发噬菌体的机理仍然知之甚少。

噬菌体 MZTP02 是从苏云金芽孢杆菌菌株 MZ1 分离出来的<sup>[8]</sup>。它有一个 20 面体的头部、一条长的尾巴, 但没有发现尾刺。噬菌体基因组已经测序, 全长 15 717 bp, (G + C) 含量为 37.55% (GenBank, Accession No. AY894696)。序列分析表明两个 40 bp 长度内嵌终端的碱基重复率为 65%, 其功能为连结两端的基因组。噬菌体 MZTP02 基因组为包含 *tmp* 基因在内的 20 个开放读码框 (ORFs), 其中有 9 个编码噬菌体的尾巴蛋白质, 还有 2 个终端酶亚体、运输蛋白质、头部蛋白质和尾巴组分等蛋白质。

*Tmp* 基因编码的尾卷尺蛋白质 (TMP, tape measure protein) 在噬菌体 Bam35, Gil01, GIL16 和 MZTP02 中也被发现<sup>[9]</sup>。TMP 蛋白质是一种组成噬菌体尾巴的组分, 它在吸附时可以帮助噬菌体吸附细菌, 并控制尾巴的长度或者是尾巴蛋白亚体的形成, 其功能类似于噬菌体的尾巴装配蛋白质。这些

蛋白质可能包括了尾巴长度控制蛋白质, 尾巴纤维蛋白质, 尾巴组分蛋白质和尾巴亚结构蛋白质。

本文从噬菌体 MZTP02 中克隆到 *tmp* 基因并在原核细胞中进行了表达。功能结构分析表明 TMP 蛋白质在寄主中可以结合抗血清蛋白和吸附点, 这说明 TMP 蛋白质具有控制装配噬菌体尾巴的功能。TMP 抗血清可以抑制噬菌体的滴度, 估计可用于解决苏云金芽孢杆菌生产中控制噬菌体爆发的问题。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与噬菌体

出发菌株 MZ1 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, sv. H3a3b3c) 分离自广东省梅州市某公司。苏云金芽孢杆菌 ZK1 (*B. thuringiensis* subsp. *coreanensis*, sv. H25)、大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 TG1 和 M15 为本实验室保藏。噬菌体 MZTP02 通过丝裂霉素 C 诱变菌株 MZ1 中分离得到。

### 1.2 噬菌体 MZTP02 的纯化及其基因组 DNA 的提取

筛选指示剂菌株 ZK1, 噬菌体滴度的测定和双层琼脂平板的制作根据 Yu and Si<sup>[10]</sup>的方法。溶源性噬菌体的检测方法为: 出发菌株 MZ1 培养过夜制得的菌悬液, 用质量浓度 0.5  $\mu\text{g/mL}$  的丝裂霉素 C 处理, 震荡 4 h。然后, 5  $\mu\text{L}$  的诱导液、200  $\mu\text{L}$  处于对数生长期的检测菌株 ZK1 和 3 mL 含  $w = 0.7\%$  琼脂的 LB 的培养基混合均匀后, 倒入已经凝结有底层培养基 (含  $w = 2\%$  琼脂的 LB 培养基) 的平皿里, 制作双层培养基, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 ~ 16 h。出现噬菌斑, 证明原菌株有溶源性噬菌体存在。选取单独的噬菌斑纯化, 纯化根据 Sambrook<sup>[11]</sup>的方法, 连续纯化 5 代。噬菌体基因组 DNA 的分离提取根据 Verheust<sup>[7]</sup>的方法。

### 1.3 在 *E. coli* M15 菌株中表达 *tmp* 基因

双引物, P1: 5'-GGATCCATGGGAATA-ATCGGGCTACTTGG-3' 和 P2: 5'-GTCGACCTAAATACTTTCAATCTTCTTTC-3', 两端含有 *Bam*HI 与 *Sal*I 限制酶位切点, 使用 PCR 扩增噬菌

体 *tmp* 基因。PCR 产物提纯后, 克隆到质粒 pMD18-T (TaKaRa), 然后转入 pQE30 (Qiagen) 构建 pQE30*tmp* 载体, 其中 TMP 蛋白质在 N 端与  $6 \times \text{His}$  融合。包含 pQE30*tmp* 载体的 *E. coli* M15 (pREP4) 的菌体细胞培养至浊度 0.6 ( $A_{600\text{nm}}$ ) 后, 加入 1 mmol/L isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 的诱变剂, 于 37 °C 保温 4 h。离心 15 min, 转速 7 000 r/min。融合蛋白使用  $w = 12\%$  的 SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色。

#### 1.4 His-tagged TMP 蛋白的纯化及其抗体的制作

$6 \times \text{His}$ -tagged 蛋白质的纯化根据 QIAexpressinist™ 手册中方法进行。根据 Andrews<sup>[12]</sup> 的方法, 纯化的  $6 \times \text{His}$ -tagged 蛋白质用来采集兔子的抗体毒素血浆。

#### 1.5 蛋白质印迹分析

SDS-PAGE: 分离胶的  $w$  为 12%, 方法见文献 [11]。转移到硝酸纤维膜的方法见 Hybond-C super, Amersham Pharmacia。 $w = 1\%$  封闭溶液进行印迹封闭, TMP 蛋白抗体和原血清浓度比例为 1:500。免疫反应蛋白显示使用羊抗兔 IgG 和碱性磷酸酶。

#### 1.6 *tmp* 基因的功能分析

噬菌体滴度的测定方法见 Yu and Si<sup>[10]</sup>。TMP 抗体从注射 TMP 蛋白的兔子血液中采集。稀释的 TMP 蛋白与噬菌体溶液混合, 首先要试验出噬菌体滴度的范围, 使 TMP 蛋白与噬菌体的滴度存在一种正比关系。在此比例的范围, 噬菌体溶液分别与 TMP 抗体、对比蛋白质和同源的胞壁酸酶混合。

## 2 结果

### 2.1 *tmp* 基因的克隆

来自噬菌体 MZTP02 基因组 DNA 的 *tmp* 基因通过 PCR 扩增, 出现了一条大小为 1 000 的单一一条带 (图 1: A)。将 PCR 产物克隆到 pMD18-T 质粒并测序。测序结果与 MZTP02 基因组中 *tmp* 基因的序列一致。BamHI/SalI 限制酶分析显示, 基因片段已经插入了质粒 pMD18-T 中相应的位点上 (图 1: B)。使用 BamHI/SalI 限制酶处理的基因片段与 pQE30 载体连接, 重组载体命名为 pQE*tmp*。经 BamHI/SalI 限制酶分析, 表明 *tmp* 基因被正确插入 (图 1: C)。

### 2.2 *tmp* 基因在 *E. coli* M15 菌株中的表达及其纯化

含有 pQE*tmp* 质粒的 *E. coli* M15 菌株在 37 °C 用 IPTG (1 mmol/L) 诱导 5 h, 然后收获细胞。从含有 pQE*tmp* 质粒的 *E. coli* M15 菌株中获得了一条

35 000 的蛋白带 (图 2), 此带与预期的 TMP 蛋白质大小相当, 对比蛋白中没有出现相应的蛋白带。TMP 蛋白表达融合了  $6 \times \text{His}$ , 使用 Ni-NTA 柱子纯化。所有的泳道中仅出现一条蛋白带 (图 3)。

### 2.3 TMP 抗血清蛋白的制备和检测

TMP 抗血清蛋白从兔子血液中采集, 兔子注射纯化并融合了  $6 \times \text{His}$  的 TMP 蛋白质。蛋白质印迹分析表明, 抗体血清检测出在 *E. coli* 菌株表达的融合蛋白质产生了一条清晰的蛋白带, 大小为 35 000, 而非免疫血清没有相应的条带 (图 4)。

### 2.4 *tmp* 基因的功能分析

为了检测噬菌体的滴度, 将 TMP 抗血清与噬菌体悬液混合。结果表明, 在噬菌体 m. o. i 滴度小于 1 时, 噬菌体滴度与 TMP 抗血清的浓度成负比例关系。当一个指定的噬菌体质量浓度分别与 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 TMP 抗血清混合时, 相应地噬菌体的滴度分别为  $1 \times 10^5$  pfu/mL 和  $2 \times 10^3$  pfu/mL; 同时, 采用高纯度、来自相同基因组但不同基因的胞壁酸酶 (muramidase, MUR) 作对比, 结果发现噬菌体的滴度为  $10^7$  pfu/mL (图 5)。当加入噬菌体悬液的 TMP 蛋白抗体质量浓度增加 10 倍时, 噬菌体滴度却降低了 50 倍。这意味着 TMP 蛋白质可以与寄主细胞上的吸附点结合。在 TMP 蛋白质存在的情况下, 该蛋白与其抗体即吸附点相结合, 因此降低了噬菌体的滴度。TMP 蛋白质可能是噬菌体尾巴的一部分, 并控制噬菌体尾巴的装配。但是实验表明, 假如噬菌体 m. o. i 滴度大于 1 时, 噬菌斑的形成与 TMP 抗血清没有显示出负效果。

## 3 讨论

噬菌体 phi 11 (NP\_663684), ul36 (NP\_663684),  $\lambda$  Ba01 (YP\_020410), r1t (NP\_695070), phi LC3 (NP\_996715), TP901-1 (NP\_112708), TM4 (AAD17585), phi 3626 (NP\_612842) 和 315.6 (NP\_795697) 与噬菌体 MZTP02 的 *tmp* 基因序列有较高同源性, 这些噬菌体中的 *tmp* 基因功能是控制噬菌体尾巴的形成、装配及构建整个噬菌体尾巴的部件, 如尾丝和尾板<sup>[13-14]</sup>。从以上 10 种噬菌体 *tmp* 基因的保守区的类同来判断, 可以肯定的是噬菌体 MZTP02 与其他的噬菌体存在着某些相同的功能。

另外, *tmp* 基因的蛋白质序列与来自 57 种噬菌体的 10 种蛋白质显示出同源性<sup>[9]</sup>, 特别同源于来自 *Staphylococcus aureus* 和 *Lactococcus lactis* 细胞的

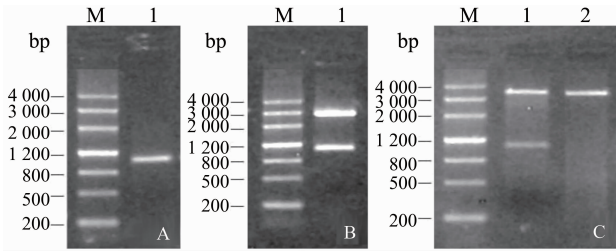


图 1 *tmp* 基因的克隆和鉴定

Fig. 1 Cloning and identification of *tmp* gene

A: *tmp* 基因的 PCR 产物 (lane 1); B: pMD18-Tmp/*Bam*HI + *Sal*I 的鉴定 (lane 1); C: pQEtmp (lane 1) 和 pQE30 载体的鉴定 (lane 2); M: 蛋白质标记

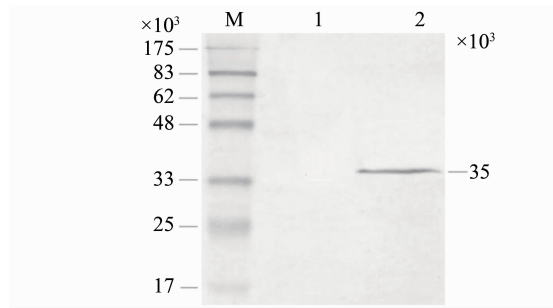


图 4 TMP 蛋白质的印迹分析试验

Fig. 4 Western blot analysis of TMP proteins

Lane 1-2 分别为: 注射前兔血清和注射后血清; M: 预染的蛋白质标记

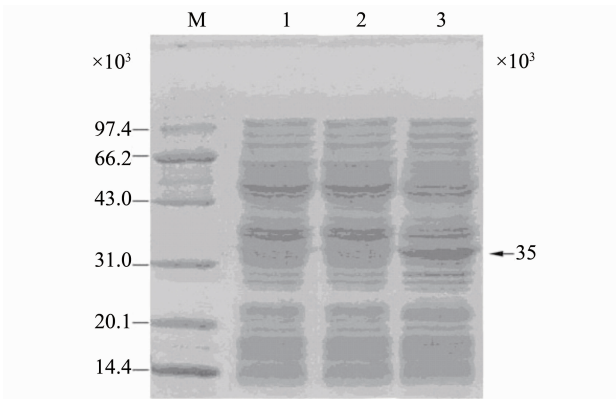


图 2 *tmp* 基因表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expressed proteins from *tmp* gene

Lane 1-3 分别为: M15 (pQE30), 非诱导的 M15 (pQEtmp) 和 诱导的 M15 (pQEtmp); M: 蛋白质标记

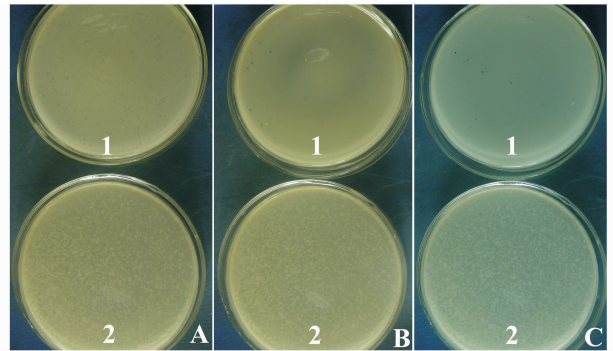


图 5 噬菌体悬液与 TMP 抗血清形成噬菌斑的检测

Fig. 5 Detection of plaque formation of phage treated with TMP antiserum

A1 和 B1: 无抗血清的对比皿; A2: 25 µg/mL TMP 抗血清; B2: 250 µg/mL TMP 抗血清; C1: 250 µg/mL TMP 抗血清; C2: 250 µg/mL MUR 抗血清

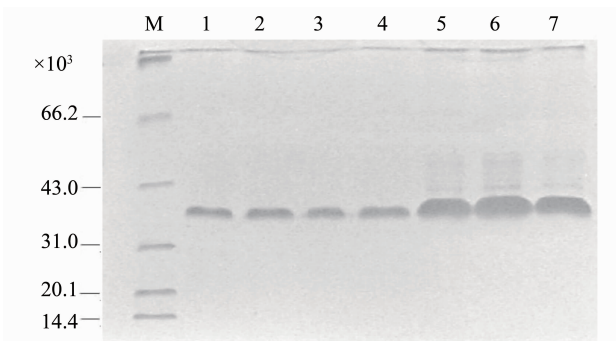


图 3 纯 TMP 蛋白质的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified TMP protein

Lane 1-4: 从缓冲液 D 中的抽提物; Lane 5-7: 从缓冲液 E 中的抽提物; M: 蛋白质标记

噬菌体 λBa01, 噬菌体 MZTP02 与噬菌体 λBa01, rlt, phiL3, TP901-1 和 ul36 同属于一个进化系中。但是噬菌体 MZTP02 与以上 10 种之外的噬菌体没有太高的同源性。例如, 与 *Staphylococcus aureus* 细胞的噬菌体 phi 13 仅有 28% 的同源性。

*tmp* 基因编码控制噬菌体尾巴长度及其他功能的蛋白质<sup>[9]</sup>, 所以该基因与噬菌体尾巴的装配有关。编码的蛋白质可能包括尾巴长度的控制蛋白、尾丝蛋白、尾巴构件蛋白、尾巴亚结构蛋白, 等等。当这些抗原蛋白质与相应的抗体结合时, 它们对宿主的吸附被削弱了。TMP 抗血清与宿主的吸附点共同竞争噬菌体。TMP 抗血清的质量浓度越大, 噬菌体能够吸附宿主的几率就越小, 形成噬菌斑的数量就越少。因此, 这一关系可以通过检测噬菌斑点滴度的变化来分析 *tmp* 基因的功能。

推测噬菌体 MZTP02 是一个新品种, 它从发酵菌株苏云金芽孢杆菌 MZ1 细胞中分离出来。基因组分析表明, *tmp* 基因的位置在 10 828 bp 和 11 872 bp 之间, 长度 1 044 bp。它编码了一个含有 348 个氨基酸的蛋白质, 大小 35 500。*tmp* 基因的功能使用 TMP 抗体来分析, 抗体被加到具有一定浓度的噬菌体悬液中, 噬菌斑的滴度下降 50 倍, 这一现象说明该基因的蛋白质功能与噬菌体的尾巴

装配有关。其理由可能是,当噬菌体与 TMP 抗血清混合时,抗体与噬菌体尾巴或者部分尾板结合,因此噬菌体尾巴难以、甚至无法与宿主细胞上的吸附点结合。这就解释了 *tmp* 基因编码类似于尾板、尾丝、结合蛋白等蛋白质,这些蛋白质具有与宿主吸附点结合的能力<sup>[15]</sup>。但发现当噬菌体的滴度 *m. o. i* 大于 1 时,滴度并没有反映这种负比例关系,说明很多噬菌体颗粒在同一时间内吸附到一个宿主细胞上,导致了该宿主细胞的破裂。

尽管我们推测到噬菌体尾巴与宿主细胞上的吸附点之间有这种关系,但还有不了解的地方,噬菌体尾巴是怎样与吸附点结合的?属于 *Lactococcus*<sup>1</sup>*actis* 家族的溶源性噬菌体 TP901 - 1 有一条很长、不会收缩、有终端基板的尾巴,后者估计与宿主细胞吸附点相结合起主要作用,但是其结合的机理还不清楚<sup>[16-17]</sup>。

另外一个蛋白质,捕获结合蛋白质 (Capture binding protein, CBP),可能涉及到噬菌体与宿主细胞的相互作用之中。这一蛋白与其他的蛋白质有着很多类似性,但是这些蛋白质的碳端结构大多不同<sup>[18]</sup>。有两种噬菌体蛋白质,大小分别为 31 000 和 16 000,涉及到噬菌体与宿主细胞的相互作用之中<sup>[19]</sup>。一些噬菌体 DNA 的序列被测出,并发现了一个读码框,该读码框部分折叠并与编码必要的尾巴蛋白质相结合<sup>[20]</sup>。当噬菌体与宿主细胞吸附点的反应时,非收缩尾巴不会在吸附反应中起到主要的作用<sup>[21]</sup>。

从早期的工作中了解到,噬菌体 T4 的基因 29 编码尾巴蛋白的长度<sup>[22]</sup>。对于具有收缩性或者是非收缩性尾巴的噬菌体,尾巴的长度由 *tmp* 基因决定。对于大多数的噬菌体,相应的蛋白质则由其基因组中的开放读码框决定<sup>[23]</sup>。在下个试验中,将 *tmp* 基因敲除掉并观察噬菌体突变体,以期发现噬菌体 MZTPO2 基因组 *tmp* 基因更多的功能。

## 参考文献:

- [1] SACKERMANN H W, SMIRNOFF W A. Study of lysogeny in *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* [J]. *Can J Microbiol*, 1978, 24: 818 - 826.
- [2] SUN F, YUAN Z M, LI T Y. Reduction of resistance of culex pipiens larvae to the binary toxin from *Bacillus sphaericus* by coexpression of cry4Ba from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* with the binary toxin gene [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001, 17: 385 - 389.
- [3] YU Z. *Bacillus thuringiensis* [M]. Beijing: Science Press, 1990.
- [4] CHAPMAN H M, NORRIS J R. Four new bacteriophages of *Bacillus thuringiensis* [J]. *J Appl Bacteriol*, 1966, 29: 529 - 535.
- [5] VERHEUST C, FORNELOS N, MAHILLON J. GIL16, a new gram-positive tectiviral phage related to the *Bacillus thuringiensis* GIL01 and the *Bacillus cereus* pBclin15 elements [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187: 1966 - 1973.
- [6] STROMSTEN N J, BENSON S D, BURNETT R M, et al. The *Bacillus thuringiensis* linear double stranded DNA phage Bam35, which is highly similar to the *Bacillus cereus* linear plasmid pBclin15, has a prophage state [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185: 6985 - 6989.
- [7] VERHEUST C, JENSEN G., MAHILLON J. pGIL01, a linear tectiviral plasmid prophage originating from *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* [J]. *Microbiol*, 2003, 149: 2083 - 2092.
- [8] LIAO W, SUN F, SONG S Y, et al. Biology of two lyso-genic phages from *Bacillus thuringiensis* MZ1 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47: 180 - 183
- [9] PEDERSEN M, OSTERGAARD S, BRESCIANI J, et al. Mutational analysis of two structural genes of the lysogenic lactococcal bacteriophage TP901 - 1 involved in tail length determination and baseplate assembly [J]. *Virol*, 2000, 276: 315 - 328.
- [10] YU M X, SI Z T. Experimental techniques for bacteriophages [M]. Science Press, Beijing, 1991, 19 - 23.
- [11] SAMBROOK J, DAVID R. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 147 - 185.
- [12] ANDREWS R E, IANDOLO J J, CAMPBELL B S, et al. Rocket immunoelectrophoresis of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1980, 40: 897 - 900.
- [13] MINDICH L, BAMFORD D, MCGRA W. Assembly of bacteriophage PRD1: particle formation with wild-type and mutant viruses [J]. *J Virol*, 1982, 44: 1021 - 1030.
- [14] TETART F, DESPLATS C, KRISCH H M. Genome plasticity in the distal tail fiber locus of the T-even bacteriophage: recombination between conserved motifs swaps adhesin specificity [J]. *Journal of molecular biology*, 1998, 282: 543 - 556.
- [15] LIN N T, LIU T J, LEE T C, et al. The adsorption protein genes of *Xanthomonas campestris* filamentous phages determining host specificity [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181: 2465 - 2471.

优质野菜资源。

### 参考文献:

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(下册) [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [2] 郭巨先, 杨暹. 华南主要野生蔬菜氨基酸含量及营养价值评价[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(6): 63-65.
- [3] CHEN Jiarui, LIN Qi, IB Friis, et al. Urticaceae[M]// Flora of China. Vol. 5. WU Z Y, et al, eds. Beijing: Science Press St. Louis; Missouri Botanical Garden Press, 2003; 76-189.
- [4] 刘克明. 湖南植物志(第二卷) [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001: 289-290.
- [5] YANG Yuenpo, SHIH Bingling, LIU Hoyih. Urticaceae [M]//. Flora of Taiwan. 2nd ed. Taipei: the Editorial Committee of the Flora of Taiwan, 1996, 2: 231.
- [6] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 1180.
- [7] 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会. 食品中水分的测定方法(GB/T 5009.3-2003) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [8] 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会. 食品中灰分的测定方法(GB/T 5009.4-2003) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [9] 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会. 食品中蛋白质的测定方法(GB/T 5009.5-2003) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [10] 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会. 食品中脂肪的测定方法(GB/T 5009.6-2003) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [11] 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会. 食品中还原糖的测定方法(GB/T 5009.7-2003) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [12] 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会. 食品中蔗糖的测定方法(GB/T 5009.8-2003) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [13] 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会. 水果、蔬菜可溶性糖测定法(GB/T 6194-1986) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [14] 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会. 食物中氨基酸的测定(GB/T 14965-1994) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [15] 程双奇, 陈兆平. 营养学 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1999: 22-23, 49-55, 196-200.
- [16] 杨月欣, 王光亚, 潘兴昌. 中国食物成分表(第一册) [M]. 2 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2009.
- [17] 中华人民共和国卫生部、中国国家标准化管理委员会. 食品中污染物限量(GB2762-2005) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [18] 童红梅. 崆峒山自然保护区山野菜及其营养成分研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(3): 1050-1051.
- [19] 蹇黎, 朱利泉. 贵州几种常见野菜营养成分分析[J]. 北方园艺, 2008, (9): 45-47.
- [20] 常丽新, 赵永光. 河北省七种野菜的营养成分分析[J]. 营养学报, 2006, 28(3): 277-278.
- [21] 孙晓慧, 郑奎玲, 廖莉玲, 等. 八种野菜氨基酸及维生素的含量分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 61-63.
- [22] 赵晨霞, 石进朝, 赵志强, 等. 北京地区几种野菜主要营养素的测定[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 442-445.
- [23] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 1088, 1099.

(上接第 118 页)

- [16] BRITSKAIA V S, DANILEICHENKO V V. The infection of bacilli by Mu cts phage integrated into the plasmid [J]. Mikrobio, 1990, 52: 57-63.
- [17] CHISTINA S V, LONE B, HORST N. Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1 [J]. J Bacteriol, 2005, 187: 4187-4197.
- [18] DUPONT K, VOGENSEN F K, NEVE H, et al. Identification of the receptor-binding protein in 936-species lactococcal bacteriophages [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 5818-5824.
- [19] LEVIN M E, HENDRIX R W, CASJENS S R. A programmed translational frameshift is required for the synthesis of a bacteriophage lambda tail assembly protein [J]. J Mol Biol, 1993, 234: 124-139.
- [20] MOORE S D, PREVELIGE P E. A P22 scaffold protein mutation increases the robustness of head assembly in the presence of excess portal protein [J]. J Virol, 2002, 76: 10245-10255.
- [21] VIANELLI A, WANG G R, GINGERY M. Bacteriophage T4 self-assembly: localization of gp3 and its role in determining tail length [J]. J Bacteriol, 2000, 182: 680-688.
- [22] DUDA R L. Expression of plasmid-encoded structural proteins permits engineering of bacteriophage T4 assembly [J]. Viro, 1990, 179: 728-737.
- [23] XU J, HENDRIX R W, DUDA R L. Conserved translational frameshift in dsDNA bacteriophage tail assembly genes [J]. Mol Cell, 2004, 16: 11-21.