论著

文章编号:1000-5404(2012)12-1176-05

分枝杆菌噬菌体 Chy2 的分离及生物学特性

刘 平,邬亭亭,彭 丽,郭述良,罗永艾 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院呼吸科)

[摘要] **目的** 分离鉴定新分枝杆菌噬菌体并研究其生物学特性。**方法** 以平板法从泥土中分离纯化噬菌体,紫外线诱导法鉴定溶原性,从噬菌斑大小、颗粒形态和限制性内切酶分析三方面比较 Chy2、D29、TM4 异同;以不同感染复数(MOI)扩增 Chy2,测定最佳 MOI;通过一步生长实验测出 Chy2 潜伏期、裂解期和裂解量;采用单斑法测定 MOI 的裂解谱;检测 MOI 在不同 pH 值培养基中裂解耻垢分枝杆菌 mc^2155 的能力。**结果** 成功分离纯化 1 株分枝杆菌噬菌体,命名为 Chy2,其噬菌斑圆形透明,紫外线诱导法处理宿主菌后不能形成噬菌斑,头部呈椭圆形,长尾,基因组核酸能被双链 DNA 内切酶 *Eco*RⅠ、*Hind*Ⅲ、*Bam*HⅠ及 *Xba*Ⅰ切开,大小约 49 kb,与 D29、TM4 差异大;Chy2 最佳 MOI 为 9.58×10^{-5};Chy2 一步生长周期为 270 min,潜伏期 210 min,裂解期 60 min,裂解量为 23;Chy2 能裂解耻垢分枝杆菌 mc^2155、结核菌标准株 H_{37}Rv、多数临床耐药株;在 7H9 固体培养基 pH 值为 5.0 和 7.4 时,Chy2 均能裂解耻垢分枝杆菌 mc^2155。**结论** Chy2 属长尾噬菌体科,基因组为双链 DNA,宽噬谱广,是一种潜在的抗结核药物资源。

[关键词] 分枝杆菌噬菌体;耻垢分枝杆菌;结核分枝杆菌;生物学特性;耐药结核病
[中图法分类号] R372;R373.9;R378.91 [文献标志码] A

Isolation and biological characteristics of mycobacteriophage Chy2

Liu Ping, Wu Tingting, Peng Li, Guo Shuliang, Luo Yong'ai (Department of Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To isolate and identify a new mycobacteriophage Chy2, and to explore its biological characteristics. **Methods** The new mycobacteriophage was isolated and purified from soil by single-plate method. The phage was induced by ultraviolet ray (UV) to identify its lytic or lysogenic capacity. Chy2, D29 and TM4 were compared by the plaque size, particle morphology and restriction enzyme analysis. Chy2 was amplified by double-layer agar plate method in different multiplicity of infection (MOI) to find the optimal MOI. One-step growth experiment was performed to find the latent period, burst period and burst size of Chy2. The host range of Chy2 was examined by single-spot examination. The ability of Chy2 to crack *Mycobacterium smegmatis* mc^2155 at different pH values was examined. **Results** A new mycobacteriophage was successfully isolated and purified, which was named as Chy2. The plaques of Chy2 were round and transparent, and their sizes were about 3 mm in diameter. Plaques did not appear with the host bacteria induced by UV. Chy2 has an oval head and a long tail. The size of Chy2 genome was about 49 kb, which was different from that of D29 or TM4, and its genome can be digested by the restriction endonucleases of *Eco*RⅠ, *Hind*Ⅲ, *Bam*HⅠ and *Xba*Ⅰ. The optimal MOI and the highest titer of Chy2 were 9.58×10^{-5} and 7.2×10^{10} PFU/ml, respectively. The one-step growth cycle of Chy2 was 270 min, with the latent period 210 min, the burst period 60 min and the burst size 23. Chy2 could crack *Mycobacterium smegmatis* mc^2155, *Mycobacterium tuberculosis* H_{37}Rv and a majority of clinical drug-resistant bacterial strains. Chy2 could crack *Mycobacterium smegmatis* mc^2155 in solid medium at pH 5.0 and pH 7.4. **Conclusion** Chy2 belongs to Siphoviridae family and has genome of double-stranded DNA. Chy2 has a broad host range and, therefore, has a potential role in anti-tuberculosis treatment.

[**Key words**] *mycobacteriophage*; *Mycobacterium smegmatis*; *Mycobacterium tuberculosis*; biological characteristics; anti-drug tuberculosis

Supported by the Major Project of "Eleventh Five-year Plan" of National Science and Technology (2008ZX10303), Corresponding author: Guo Shuliang, E-mail: guosl99@sina.com

[基金项目] 国家"十一五"科技重大专项(2008ZX10303)
[通信作者] 郭述良,E-mail: guosl999@sina.com

噬菌体(bacteriophage, Phage)侵入宿主菌后,随即引起宿主细胞裂解,利用这一特性可治疗感染性疾病[1]。近年来,由于各种耐药性病原菌的出现,新型抗生素的研发越来越困难,而噬菌体作为一种抗菌剂,具有特异性强、自我增殖快、来源广等一些其他抗菌剂无法比拟的优点,随着大量噬菌体基因组的测序以及噬菌体疗法的技术手段逐渐成熟,噬菌体已成为新型抗菌药物开发的研究热点之一[1-3]。噬菌体疗法主要研究大肠杆菌、铜绿假单胞菌、葡萄球菌等快生长菌导致的感染,而结核分枝杆菌为慢生长胞内寄生细菌,相关研究较少,D29 和 TM4 是目前主要研究的 2 株分枝杆菌噬菌体(*mycobacteriophage*)[1-14]。本研究在国内分离鉴定出 1 株分枝杆菌噬菌体,命名为 Chy2,通过对其生物学特性以及与宿主菌间的作用规律进行研究并比较其与 D29 和 TM4 的差异,为噬菌体 Chy2 进一步开发应用、人工改建为一种新型抗耐药结核生物制剂提供基础。

1 材料与方法

1.1 分枝杆菌噬菌体 Chy2 的分离和鉴定

1.1.1 标本及宿主菌 标本为重庆医科大学附属第一医院结核病房花盆内的泥土,耻垢分枝杆菌 mc^2155 (CMCC 93202)、D29 由中国药品生物制品检定所王国治教授馈赠,TM4 由美国匹兹堡大学 Hatfull 教授赠送,结核分枝杆菌标准株 $H_{37}Rv$ (CMCC 93004)购自重庆市肺科医院,分枝杆菌临床分离株分离自本院结核患者痰标本(2010 年 3 月至 2011 年 4 月),罗氏药敏培养基(珠海贝索公司)鉴定菌种和检测药敏。扩增耻垢分枝杆菌时采用 7H9 液体培养基(美国 BD 公司),扩增其他分枝杆菌时采用罗氏培养基(珠海贝索公司),扩增噬菌体时采用 7H9、7H10 双层琼脂固体培养基(美国 BD 公司),所有与结核分枝杆菌(结核菌)相关的操作均在 P2 实验室进行。

1.1.2 分枝杆菌噬菌体分离纯化 参照 Hatfull 等[2]的方法,略有改动,取泥土标本 5 份(标记为 1~5 号),每份 5 g,分别加入 10 ml 7H9 液体培养基(含 10% 增菌液),37 ℃摇床 160 r/min 振荡培养过夜,富集噬菌体。次日离心取上清,0.22 μm 滤器过滤除菌,取 100 μl 滤过液加入 3.0×10^7 CFU 耻垢分枝杆菌 mc^2155 中,室温孵育 15 min,再加入 7H9 琼脂固体培养基混合铺板,37 ℃培养过夜,24 h 后 2 号标本有大小不一的噬菌斑出现,用 200 μl 枪头挑取圆形透明且直径最大的噬菌斑,加入 100 μl 7H9 液体培养基中,梯度稀释后用 7H9 单层琼脂平板反复铺板挑斑 5 次,直至噬菌斑形状、大小一致,即得纯化的噬菌体。噬菌体没有普遍应用的命名规则[15],本实验依据噬菌体分离地点重庆医科大学和标本号,命名为 Chy2。

1.1.3 溶原性鉴定 参照文献[13]的方法,略有改动,随机选取 10 个噬菌斑,分别以无菌接种环在噬菌斑中心接触一下,划线接种于 7H9 固体培养基,37 ℃培养 3 d 后可见部分平板长出单个菌落,用接种环挑取单个菌落接种于 7H9 液体培养基中,调整菌浓度为 1.5×10^8 CFU/ml。取 5 ml 菌悬液加入平皿中,置于距紫外灯管(15 W)30 cm 处的磁力搅拌器上搅拌并照射,在照射 30 s 和 60 s 后,分别取出 2 ml 照射液,于 37 ℃继续振荡培养过夜,离心取上清,适当稀释,以原始病原菌为指示菌铺双层琼脂平板,不加上清液的原始病原菌菌液为阴性对照,噬菌体液加原始病原菌为阳性对照,观察噬菌斑,如有噬菌斑出现即为溶原性菌株。重复实验 3 次。

1.1.4 分枝杆菌噬菌体电镜观察 采用双层琼脂平板培养法扩增噬菌体,参照文献[14]中 λ 噬菌体颗粒提取方法,纯化噬菌体,调整噬菌体滴度至 5×10^{10} PFU/ml,负染后透射电镜(日立 H-7500)观察噬菌体 Chy2、D29、TM4 形态。

1.1.5 核酸提取及鉴定 取噬菌体纯化颗粒,采用 λ 噬菌体 DNA 提取试剂盒(北京艾比根公司)提取 DNA,定量后用限制性核酸内切酶 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ、*Bgl*Ⅱ(加拿大 Fermentas 公司)酶切噬菌体基因组,酶切反应体系置于 37 ℃过夜孵育后,酶切产物做琼脂糖凝胶电泳,经 *Hind*Ⅲ酶切的 λ 噬菌体 DNA(美国 NEB 公司)作为分子标记(marker),80 V 电压电泳,60 min 后停止电泳,观察拍照,根据酶切图谱分析噬菌体核酸类型和基因组大小以及比较新噬菌体与 D29、TM4 的差异。

1.2 分枝杆菌噬菌体 Chy2 最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)

MOI 是指初始感染时加入噬菌体的数量与宿主菌数量的比值。参照文献[16]的方法,略有改进,根据预实验测定噬菌体的滴度和麦氏比浊法测定的宿主菌(本实验为耻垢分枝杆菌 mc^2155)的浓度,按照不同的 MOI 加入 Chy2 和宿主菌,铺双层平板 37 ℃过夜培养,各点均作 3 份复板培养。用平板菌落计数法测定所加入宿主菌的浓度,计算出确切 MOI。次日收集噬菌体,梯度稀释测定滴度,产生最高噬菌体滴度的 MOI 为最佳 MOI。

1.3 分枝杆菌噬菌体 Chy2 一步生长曲线

参照文献[13,16]的方法,略有改动,加入 Chy2 及耻垢分枝杆菌 mc^2155 使 MOI 为 0.1,37 ℃温育 15 min 后加入 4% 硫酸亚铁铵杀灭未吸附的噬菌体,13 000×*g* 离心 1 min,弃上清,7H9 液体培养基洗涤 2 次后高倍稀释(100 000 倍),迅速置于 37 ℃大振幅摇床中培养(160 r/min),开始计时,根据预实验结果每 30 分钟取样 100 μl,13 000×*g* 离心 1 min,吸取上清测定噬菌体滴度,各时间点均作双份复管取平均值,实验重复 3 次。0 min 时离心后的沉淀与耻垢分枝杆菌 mc^2155 混合后铺板,产生的噬菌斑数即为感染初期感染了噬菌体的宿主菌数。根据实测值(未乘稀释倍数)绘制一步生长曲线,得出 Chy2 的潜伏期、裂解期和裂解量。

1.4 分枝杆菌噬菌体 Chy2 宽噬实验

收集本科室结核菌室日常分离到的临床病原菌 32 株和结核分枝杆菌标准株 $H_{37}Rv$,参考文献[17]采用单斑法测定噬菌体的宽噬谱,以耻垢分枝杆菌 mc^2155 为阳性对照,37 ℃培养,每天观察实验结果,出现噬菌斑者为阳性,即噬菌体能裂解该菌株,6 周以后还未出现噬菌斑者判为阴性,即噬菌体不能裂解

该菌株。

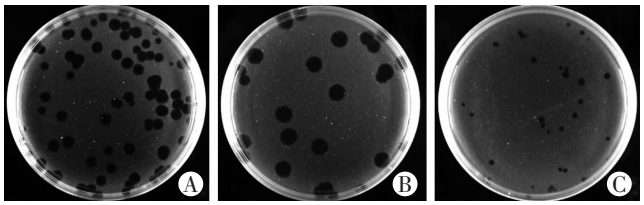
1.5 分枝杆菌噬菌体 Chy2 在不同 pH 值培养基中的裂解能力

将7H9固体培养基pH值调至5.0和7.4，取3.0×10^7 CFU耻垢分枝杆菌 mc^2155 与相同滴度(100 PFU/ml)的Chy2室温孵育15 min后与这两种培养基混合铺板，37 ℃培养过夜，观察Chy2在这两种培养基中的能否裂解宿主菌形成噬菌斑。

2 结果

2.1 分枝杆菌噬菌体噬菌斑和电镜观察

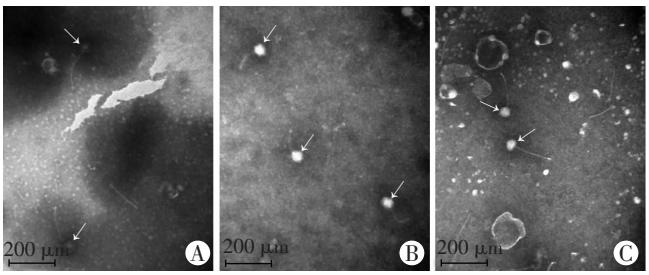
Chy2的噬菌斑圆形透明，直径约3 mm，呈现出烈性噬菌体的噬菌斑特征，D29和TM4的噬菌斑直径分别为5 mm和1 mm。见图1。



A、B、C：分别为Chy2、D29、TM4的噬菌斑

图1 不同噬菌体感染耻垢分枝杆菌 mc^2155 所形成的噬菌斑形态

分别选取10个结构完整的噬菌体，用DigitalMicrograph Demo3.4软件测量其大小，Chy2头部呈椭圆形，纵径为(62.4±1.7) nm，横径为(55.4±2.0) nm，长尾，可弯曲，不可收缩，尾长为(207.1±20.0) nm，可见尾板和尾丝，依据国际病毒分类委员会2005年颁布的分类标准[15]，Chy2属长尾噬菌体科(*Siphoviridae*)。D29头部呈多面立体对称，头部直径为(59.0±1.3) nm，尾长为(129.0±16.0) nm，TM4头部也呈多面立体对称，直径为(51.0±1.4) nm，尾长为(177.0±11.0) nm。见图2。



A、B、C：分别为Chy2、D29、TM4 ↑：噬菌体

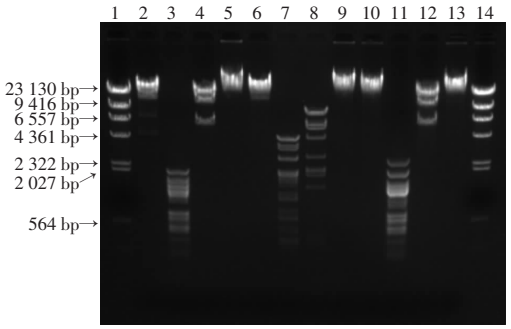
图2 不同噬菌体透射电镜观察 (TEM)

2.2 噬菌体溶原性鉴定

紫外线诱导法处理后宿主菌均不能形成噬菌斑，未发现Chy2为溶原性噬菌体的证据，结合图1所示噬菌斑清晰透明的特征，说明Chy2很可能为裂解性噬菌体。

2.3 噬菌体酶切图谱

Chy2、D29、TM4基因组核酸被限制性内切酶 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ、*Bgl*Ⅱ酶切后，酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后的结果如图3所示，泳道1、14为经 *Hind*Ⅲ酶切的λ噬菌体DNA，作为电泳的DNA分子标记(DNA marker)。从泳道2、3、4可见，Chy2基因组能够被 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ、*Bgl*Ⅱ酶切，这3种酶能够识别双链DNA分子特定的核苷酸序列并切割双链DNA分子的核酸内切酶，表明Chy2基因组为双链DNA，D29、TM4基因组经 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ酶切后的电泳图谱与Chy2有明显差别，但TM4经 *Bgl*Ⅱ酶切后与Chy2具有相似的3个片段。分析酶切图谱表明Chy2基因组大小约为49 kb，D29、TM4基因组大小分别约为47 kb和45 kb。见图3。



1、14：λ噬菌体DNA/*Hind*Ⅲ；2：Chy2 DNA/*Eco*RⅠ；3：Chy2 DNA/*Bam*HⅠ；4：Chy2 DNA/*Bgl*Ⅱ；5：Chy2基因组；6：D29 DNA/*Eco*RⅠ；7：D29 DNA/*Bam*HⅠ；8：D29 DNA/*Bgl*Ⅱ；9：D29基因组；10：TM4 DNA/*Eco*RⅠ；11：TM4 DNA/*Bam*HⅠ；12：TM4 DNA/*Bgl*Ⅱ；13：TM4基因组

图3 噬菌体基因组酶切电泳结果

2.4 噬菌体 Chy2 最佳 MOI

噬菌体滴度结果见表1。当MOI为9.58×10^{-5}时，Chy2感染耻垢分枝杆菌 mc^2155 后产生的子代噬菌体滴度在9个MOI中最高，即最佳MOI为9.58×10^{-5}，最高滴度为$(7.2\times10^{10}\pm3.6\times10^9)$ PFU/ml，后续实验大量扩增Chy2时，可根据最佳MOI扩增，以达到最大产量。

表1 噬菌体 Chy2 感染复数的测定

管号	细菌数	噬菌体数	MOI	滴度(24 h，PFU/ml)
1	4.3×10^7	4.12×10^9	95.8	$1.5\times10^9\pm1.2\times10^8$
2	4.3×10^7	4.12×10^8	9.58	$2.1\times10^9\pm1.7\times10^8$
3	4.3×10^7	4.12×10^7	9.58×10^{-1}	$3.2\times10^9\pm1.0\times10^8$
4	4.3×10^7	4.12×10^6	9.58×10^{-2}	$6.0\times10^9\pm2.3\times10^8$
5	4.3×10^7	4.12×10^5	9.58×10^{-3}	$6.0\times10^9\pm1.5\times10^8$
6	4.3×10^7	4.12×10^4	9.58×10^{-4}	$2.4\times10^{10}\pm1.8\times10^9$
7	4.3×10^7	4.12×10^3	9.58×10^{-5}	$7.2\times10^{10}\pm3.6\times10^9$
8	4.3×10^7	4.12×10^2	9.58×10^{-6}	$3.3\times10^{10}\pm2.6\times10^9$
9	4.3×10^7	4.12×10^1	9.58×10^{-7}	$2.6\times10^9\pm0.9\times10^8$

2.5 噬菌体 Chy2 一步生长曲线

以离心后实际测得上清液中噬菌体的滴度为纵坐标，感染时间为横坐标，绘制一步生长曲线，见图4。0 min时离心后的沉淀与耻垢分枝杆菌 mc^2155 混合后铺板，产生的噬菌斑数为12，即为感染初期感染了噬菌体的宿主菌数。根据该曲线，可以看出Chy2感染宿主菌的潜伏时间约为210 min，裂解期为210~270 min。270 min后进入平台期，噬菌体滴度不再增加。根据裂解量计算公式：裂解量=裂解末期噬菌体数/感染初期宿主菌数，计算如下：280/12≈23，即Chy2感染宿主菌的裂解量为23。

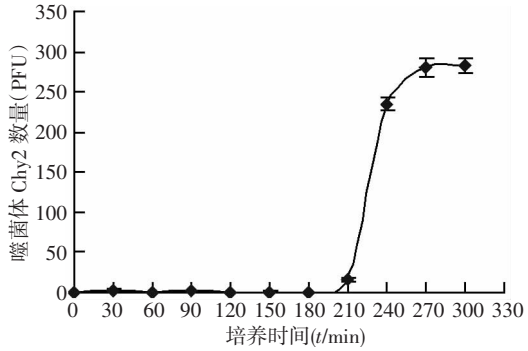


图 4 噬菌体 Chy2 一步生长曲线

2.6 噬菌体 Chy2 宽噬实验

经菌种鉴定,32 株临床分离株中有 28 株结核分枝杆菌(结核菌),2 株牛结核分枝杆菌,2 株非结核分枝杆菌,药敏结果见表 2。Chy2 的宽噬谱广,能裂解耻垢分枝杆菌 mc^2155、结核菌标准株 $H_{37}Rv$ 和多数临床分离菌株(表 2)。Chy2 不仅能裂解大部分敏感结核菌,还能裂解耐药结核菌,对广泛耐多药结核菌和耐药牛结核分枝杆菌裂解率高,除此之外,Chy2 还能裂解耐药非结核分枝杆菌。

表 2 Chy2 对临床分离株的宿主谱

临床分离株	药敏实验	细菌株数	裂解株数	裂解率(%)
结核分枝杆菌	敏感	5	4	80.0
	耐药	23	13	56.5
	MDR	7	3	42.9
	XDR	7	5	71.4
牛结核分枝杆菌	耐药	2	2	100.0
	MDR	1	1	100.0
非结核分枝杆菌	耐药	2	1	50.0

MDR:耐多药菌;XDR:广泛耐多药菌

2.7 分枝杆菌噬菌体 Chy2 在不同 pH 值的培养基中的裂解能力

当 7H9 固体培养基 pH 值为 5.0 和 7.4 时,Chy2 均能裂解耻垢分枝杆菌 mc^2155(图 5)。巨噬细胞溶酶体内的 pH 值为 5.0,人血液 pH 值为 7.35 ~ 7.45,即 Chy2 在这两者的 pH 环境下均能裂解宿主菌。

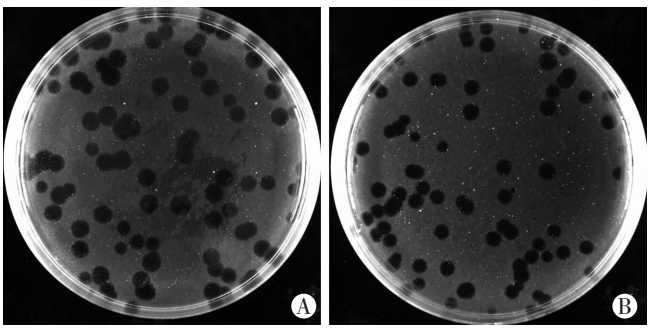


图 5 Chy2 在 pH 值为 5.0(A)和 7.4(B)的固体培养基中裂解耻垢分枝杆菌 mc^2155 形成噬菌斑

3 讨论

目前中国结核病疫情严峻,卫生部公布了全国第 5 次结核病流行病学抽样调查结果[17]:我国结核病年发患者数约为 130 万,占全球发病的 14.3%,位居全球第 2 位;15 岁及以上人群肺结核的患病率为 459/10 万,其中传染性肺结核患病率为 66/10 万,耐多药率更高达 6.8%。相较于耐药和耐多药结核带来的严重威胁,抗结核药物研发严重滞后,感染广泛耐多药结核菌的患者面临无药可医的危险境地,急需研发新型抗结核药物。分枝杆菌噬菌体有希望作为新型抗结核药物的开发对象。D29 是最早发现的分枝杆菌噬菌体之一,由 Froman 等[12]于 1954 年分离,经过 60 多年的研究,是目前研究最详尽的噬菌体,国内已有多篇文献报道利用 D29 治疗结核病[9-11],均观察到 D29 具有抗结核潜力,但是 D29 已被国外研究者注册专利[18],而 TM4 由本课题组从美国匹兹堡大学 Hatful 实验室引进,研究成果需与该实验室共享,所以要进一步研究噬菌体疗法必须寻找新的具有自主知识产权的噬菌体。本研究分离出 1 株分枝杆菌噬菌体 Chy2,其噬菌斑大小为 3 mm,与 D29 和 TM4 的噬菌斑形态有差异,电镜观察发现 Chy2 头部为椭圆形,不同于长尾噬菌体常见的多面立体对称形态,其尾部较 D29 和 TM4 长,酶切分析发现 Chy2、D29 和 TM4 经 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ酶切后的电泳图谱有明显差别,通过噬菌斑形态,噬菌体电镜观察和酶切分析比较表明 Chy2 是不同于 D29 和 TM4 的新分枝杆菌噬菌体,但 Chy2 经 *Bgl* Ⅱ酶切后与 TM4 具有相似的 3 个片段,说明这 2 个噬菌体具有一定程度的相似性。D29 和 TM4 经基因组测序发现基因组大小分别为 49 136 kb 和 52 797 kb[2],与分析酶切图谱得出的基因组大小有差别,经琼脂糖电泳只能初步估计 Chy2 基因组大小,要准确获得基因组大小还需经基因组测序研究。

Chy2 噬菌斑清晰透明,紫外线诱导法处理后的宿主菌均不能形成噬菌斑,未发现 Chy2 为溶原性噬菌体的证据,说明 Chy2 很可能为裂解性噬菌体,但要确认 Chy2 为裂解性噬菌体还需进行基因组学研究,本实验提取 Chy2 基因组 DNA,内切酶酶切分析发现 Chy2 基因组为双链 DNA 分子,下一步拟行基因组测序研究。

噬菌体一步生长实验前提是确保每一个宿主菌吸附 1 个噬菌体,所以本实验选择 MOI 为 0.1。由于是低复数感染,每条细菌只能被 1 个噬菌体感染,而未吸附噬菌体的宿主菌经过高倍稀释,可以避免二次吸附

和感染,因而不会影响到后续各时间点噬菌体滴度的测定。有实验选择的MOI为10[16],这样可以保证每条宿主菌都感染噬菌体,却有可能出现1条宿主菌感染多个噬菌体的情况。Chy2一步生长周期为270 min,而多数快生长菌如大肠杆菌、铜绿假单胞菌对应的噬菌体一步生长周期小于90 min[13,16,19]。耻垢分枝杆菌虽为快生长分枝杆菌,但相较于铜绿假单胞菌、大肠杆菌来说,它增殖的速度非常慢,这可能导致分枝杆菌噬菌体潜伏期和裂解期长。

噬菌体宿主识别的特异性在为微生物的鉴定和分型等方面作出贡献的同时,也给利用噬菌体进行抗菌治疗带来了困难,多价噬菌体的发现打破了特异性的束缚,为噬菌体疗法的临床应用奠定了基础。Chy2不仅能裂解耻垢分枝杆菌mc^2155、结核分枝杆菌标准株$H_{37}Rv$,还能裂解多数耐药结核菌,这为治疗耐药结核菌提供了新治疗手段。Chy2能裂解耻垢分枝杆菌,是用于抗结核治疗的重要条件。结核菌生长缓慢,如果用结核菌扩增Chy2,不仅耗费大量时间,产量也受到限制,耻垢分枝杆菌为快生长分枝杆菌,24 h内即可得到超过10^{12}PFU的噬菌体(100 ml),为噬菌体疗法提供大量的噬菌体。结核菌专性噬菌体如DS6A,培养结核菌加上扩增噬菌体,则需要1个月以上,而采用最佳MOI扩增D29,24 h得到的最高产量比Chy2低10倍,难以大量扩增是D29用于噬菌体疗法的障碍。此外,非结核分枝杆菌耐药率高,难治疗,预后差,Chy2能裂解耐药的非结核分枝杆菌,这为非结核分枝杆菌病的治疗提供了新思路。

人体血液的pH值在7.35~7.45之间,Chy2在pH 7.4时,生长状态好,说明Chy2在血液的pH值环境内能很好的侵染宿主菌。结核菌为胞内寄生菌,潜伏在巨噬细胞溶酶体内,导致结核病治疗时间长和结核病复发,溶酶体内pH值为5.0左右,Chy2在pH值5.0时能侵染宿主菌形成噬菌斑,说明这株噬菌体在酸性环境下能裂解宿主菌。噬菌体D29在pH值为5.0的培养基中能形成噬菌斑,Peng等[5]的研究发现D29能裂解巨噬细胞内的结核菌,而TM4在pH值为5.0的培养基中不能形成噬菌斑,Broxmeyer等[6]研究发现TM4不能裂解巨噬细胞内的结核菌,需利用耻垢分枝杆菌作为载体才能裂解,故推测Chy2具有裂解巨噬细胞内结核菌的潜力。

参考文献:

[1] O'Flaherty S, Ross R P, Coffey A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria [J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(4): 801-119.

[2] Hatfull G F, Jacobs-Sera D, Lawrence J G, *et al*. Comparative genomic analysis of 60 Mycobacteriophage genomes: genome clustering, gene acquisition, and gene size [J]. J Mol Biol, 2010, 397(1): 119-143.

[3] 刘平, 邬亭亭, 彭丽, 等. 噬菌体Legendre的生物学特性及抗耐药结核潜力的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(9): 821-826.

[4] Rybniker J, Kramme S, Small P L. Host range of 14 mycobacteriophages in Mycobacterium ulcerans and seven other mycobacteria including Mycobacterium tuberculosis--application for identification and susceptibility testing [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt 1): 37-42.

[5] Peng L, Chan B W, Luo Y A, *et al*. Effect of mycobacteriophage to intracellular mycobacterium smegmatis and mycobacterium tuberculosis *in vitro*[J]. Respirology, 2005, 10(Suppl): A177.

[6] Broxmeyer L, Sosnowska D, Miltner E, *et al*. Killing of Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens [J]. J Infect Dis, 2002, 186(8): 1155-1160.

[7] Piuri M, Hatfull G F. A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells [J]. Mol Microbiol, 2006, 62(6): 1569-1585.

[8] Dusthackeer A, Hassan V N, Kumar V. Tape measure protein having MT3 motif facilitates phage entry into stationary phase cells of Mycobacterium tuberculosis [J]. Comput Biol Chem, 2008, 32(5): 367-369.

[9] 彭丽, 陈保文, 罗永艾, 等. 噬菌体D29对耐药结核病豚鼠的治疗作用[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(17): 1576-1579.

[10] 黄新, 高飞絮, 常胜合, 等. 噬菌体脂质体包被液治疗小鼠耐多药结核的初步研究[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(6): 482-485.

[11] 李宏鸣, 万学勤, 李伟忠. 噬菌体辅助治疗结核性口腔溃疡的初步观察[J]. 口腔颌面外科杂志, 2009, 19(2): 151-152.

[12] Froman S, Will D W, Bogen E. Bacteriophage active against virulent Mycobacterium tuberculosis. I. Isolation and activity [J]. Am J Public Health Nations Health, 1954, 44(10): 1326-1333.

[13] 张红明, 黄庆, 罗阳, 等. 肺炎克雷伯菌噬菌体的分离和生物学特性[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(15): 608-611.

[14] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 译. 北京: 科学出版社, 1996: 136-137.

[15] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, *et al*. Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.

[16] 李明, 申晓冬, 周莹冰, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体PaP1生物学特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 860-863.

[17] 中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心. 全国第五次结核病流行病学抽样调查结果简介[J]. 中国结核病预防控制, 2011, (3): 14-16.

[18] Pasechnik V A, Roberts A D G, Sharp R J. Treatment of intracellular infection: US, 6660264[P]. 2003-12-09.

[19] 徐焰, 熊鸿燕, 宋建勇, 等. 1株宽宿主谱大肠杆菌噬菌体的生物学特性观察[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(23): 2106-2108.

(**收稿**:2011-12-12;**修回**:2012-02-29)

(编辑 邓强庭)