特约稿

噬菌体的过去、现在与未来

胡福泉
陆军军医大学基础医学院　微生物学教研室（重庆 400038）

【摘　要】噬菌体是由Frederick Twort和Félix d'Hérelle分别在1915和1917发现的。作为感染细菌的病毒，噬菌体天然地具有抗细菌感染的应用前景。在抗生素耐药性日益严峻的今天，人类在抗感染的斗争中不能只有抗生素这一种武器，这已成为全球共识。2016年，国家卫生计生委、发改委等14个部委联合印发了《遏制细菌耐药国家行动计划（2016-2020年）》，这个计划的实施还只是开局之战，破解细菌耐药性将是长期的战斗。在这一大背景下，噬菌体治疗（phagotherapy）作为抗细菌感染的手段再次引起了人们的高度关注。基于此，本文介绍了噬菌体的发现过程；噬菌体研究在推动科学进步上的历史贡献；噬菌体在疾病治疗中的应用；噬菌体在疾病诊断中的应用；噬菌体在疾病预防中的应用；噬菌体在农业领域的应用；噬菌体在工业及饮食卫生中的应用；噬菌体在生物高技术领域中的应用等相关内容。希望本文对于推动噬菌体教学、科学研究与未来应用中有所裨益。

【关键词】噬菌体　研究史　噬菌体治疗　抗感染
【中图分类号】R372　文献标志码 A　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2021.05.001

Bacteriophages in past, present and future

HU Fu-quan
Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Army Medical University, Chongqing 400038, China

【**Abstract**】Bacteriophages were respectively found in 1915 and 1917 by Frederick Twort and Félix d'Hérelle. The bacteriophages are the viruses infecting bacteria and so naturally of potential in anti-bacterium infection. Under the austerity situation of antibiotics resistance, human can not have only one weapon in anti-infection. In 2016, 14 Departments of China Government, including Ministry of Public Health and Development-reform Ministry, issued "National Containment Plan of Bacteria Antibiotics-resistance". The enforcement of this plan is only a start of human against bacterial resistance. The combat to bacterial resistance will be long-term battle. Under this situation, phagotherapy attracts again attention of mankind. In present paper, it will be focus on discovering history of bacteriophages, contribution of phages in scientific research, roles of phages in diseases treatment and roles of phages in agriculture, Industry, dietary hygiene and bio-hightech. We hope this review will benefit to the teach, scientific research and bacteriophage applications in various fields.

【**Key words**】Bacteriophage　Research history　Phagotherapy　Anti-infection

噬菌体（bacteriophage）是寄生在细菌体内的病毒。它们在细菌细胞中完成复制后可以导致宿主细胞的裂解，因此被命名为"噬菌体"，即它们可以"吃细菌"的意思。这一名称极大地吸引了人们在历史上对于噬菌体长久不衰的研究与关注。本文在此简述噬菌体的发现、噬菌体研究在推动科学进步上的历史贡献、噬菌体在疾病治疗中的应用、噬菌体在疾病诊断中以及其他领域中的应用。

1　噬菌体的发现

噬菌体是地球上最富多样性的生命体，它们存

基金项目：国家自然科学基金（31570173）
作者简介：胡福泉，教授、博导。E-mail：hoofuquan@aliyun.com

在于我们生活周围的土壤、水体、空气、海洋、饮用水、食品等环境中[1]。可以说，只要有细菌的地方，就会有噬菌体存在[2]。有文献报道，地球生物圈中的噬菌体数量可达10^{30}~10^{32}个。噬菌体对于维持地球生物圈中的微生菌群及其生态系统的平衡有着极为重要的作用，因此对人类的生存及其健康有着极为重要的意义，是值得我们高度关注和深入研究的生命现象。

人们公认噬菌体是由Frederick Twort和Félix d'Hérelle分别在1915和1917发现的[3]。在噬菌体被人类发现前已有种种迹象表明噬菌体的存在。19世纪末，恒河流域爆发了罕见的霍乱流行。但这次流行并没有迅速蔓延，而是很快自动消失了。当时，研究这次疫情的英国细菌学专家Ernest H.Hankin发现：城市上游水体中霍乱菌为10万个/毫升，下游则仅为90个毫升。因此他推测恒河水中可能存在着可以将霍乱病菌杀灭的物质。1896年Hankin报道印度的赞木纳河及恒河的水中存在对霍乱病菌具有杀菌活性的物质；这种活性具有可滤过性，且可被煮沸所破坏，但当时他推测可能是一种化学物质。Emmerich等（1901）报道有些细菌培养物在存放期间可以发生自溶解，用这种自溶解物可治愈同种细菌引起的实验感染动物。但这时人们还没有明确意识到“噬菌体”这种东西的存在。

Frederick Twort于1915年在国际著名杂志柳叶刀上发表了一篇文章，他当时试图在无活细胞的固体培养基上培养牛痘苗病毒。在一次偶然的试验中，他发现培养基上长出的污染菌落发生了“透明化变”（glassy transformation）。他将透明变菌落取一小点接种到其他菌落上，后者也发生了透明化转变。他用吉姆萨染色透明化变的菌落，在显微镜下观察，发现细菌变成了一些更小的颗粒。Twort在讨论中做推论：很可能存在一种比细菌更小的且在超显微镜下看不到的“小病毒”（small virus），它们在细菌胞中生长，形成一种具有“生长力”（power of growth）的“不定形体”（no definite individuals），它们可引起细菌的急性传染病。今天看来，Twort当时所看到“透明变”区域，正是我们今天所说的“噬斑”。他指出导致菌落透明化变的因子具有生长力，并使用了“virus”一词，已经接近噬菌体的本质。

同一时期，Felix d'Herelle正在进行另一项独立研究。当时，D'Herelle被征召去研究法国军队中爆发的痢疾。他取痢疾病人的大便进行过滤，以寻找那种可以在痢疾杆菌体内生长的“看不见的病毒”（invisible virus）。他惊奇地发现，这种不可见病毒可引起细菌培养物溶解，可使菌落变成透明区。他指出：这种不可见因子可以繁殖，细菌溶解是这种病毒繁殖的结果。总结自己的研究，D'Herelle于1917报道：发现了一种对细菌具有拮抗性的微生物（a microbe antagonisitic to bacteria）；他把菌落透明变区首次称之为“噬斑”（plaques）；把引起噬斑的东西称为“超微病毒”（ultraviruses）；认为它们可入侵细菌，在细菌体内繁殖并“消费”（expense）细菌；他第一次把这些超微病毒称之为噬菌体（bacteriophage）；他提出噬菌体可作为传染病的治疗因子。

然而，D'Herelle有关噬菌体的观点，一经提出，就挑战了细菌学家Jules Bordet的观点。Jules Bordet在1919刚获得诺贝尔奖，他的贡献是发现了血清成分抗体及补体的溶菌作用。于是Bordet及其同事立即着手研究噬菌体及其溶菌作用。Bordet认为所谓“噬菌体”不过是一种溶解酶而不是微粒性超显微的微生物。Bordet发动了对D'Herelle关于噬菌体观点的攻击。他立即用Twort的文章挑战D'Herelle发现噬菌体的优先权。D'Herelle则回应称：Twort观察到的现象与他自己所研究的噬菌体溶菌现象是有本质不同的。而Bordet的挑战反而激发了D'Herelle进行了一系列有关噬菌体本质的研究。这种激烈争议延续了十年之久。而Twort则是被动的卷入了这场战争，他扮演的是这场“Twort-D'Herelle”争议战中Bordet的替身。1932年，D'Herelle和André Gratia（Bordet的代表）同意进行一场科学决斗：在一个独立的实验室，由高度受人尊敬的独立科学家作为双方的代表：他们是Paul-Christian Flu（莱顿热带医学研究所所长）和E. Renaux（Liege大学的微生物学教授），由他们对Twort的物质和D'Herelle的物质，进行“平行比较”（side-by-side comparison）。最后，他们得到的结论是：Twort现象和D'Herelle现象是相同的。因此，在这之后，人们公认Twort和D'Herelle是噬菌体共同发现人。在噬菌体发现近100年之际（2015年9月），Nature Reviews Microbiology发表了长篇综述性文章以纪念Twort和D'Herelle在发现噬菌体中的历史贡献[4]。

2 噬菌体研究在推动科学进步上的历史贡献

噬菌体一经发现，人们就期待它在抗细菌感染

中发挥重大作用。然历史来到了1928年,亚历山大·弗莱明发现了青霉素。当时青霉素堪称抗感染的万能药,能将大部分细菌感染疾病治好。随后一大批其他类抗生素也相继被发现和应用。由于抗生素在抗细菌感染中的有效性、广谱性和廉价性,人们找到了抗感染的金钥匙。在随后的几十年中,噬菌体用于抗感染治疗的研究和应用没有再受到人们的重视。

然而无心插柳柳成荫,噬菌体研究却在生命科学领域结出了硕果。由于噬菌体个体微小,容易培养,且易于遗传操作。因此,噬菌体成为人们研究生命现象的理想对象和材料[5]。科学家们利用噬菌体作为研究对象,以探索生命现象的许多规律,并取得了巨大成功[6]。美国冷泉港被奉为分子生物学的"圣地",其实冷泉港学习班的头两期就是有关噬菌体的学习班,随后才转为分子生物学学习班。后来该学习班的讲义衍化成为了"分子克隆"(molecular cloning)一书,现已成为现代分子生物学的"圣经"。可以说人类在生命科学领域内所取得的许多伟大成果、以及奠定今天分子生物学基础的许多重要理论和技术都与噬菌体研究密切相关。这些重要成就包括:

Luria and Delbrück 1943年利用噬菌体完成"彷徨试验"(fluctuation test),揭示了细菌的突变是发生在噬菌体选择之前,噬菌体作为选择因素不过是把突变子选择出来而已。基于此他们提出了"突变与选择理论"。

Hershey and Chase 等1952年通过用放射性元素P^{32}标记噬菌体DNA、用S^{35}标记噬菌体衣壳蛋白。在噬菌体繁殖的子代中发现了P^{32},并没有发现S^{35}的存在,从而证实了遗传的物质基础是DNA, 这一工作获得了1969年诺贝尔生理学与医学奖。

1955年Seymour Benzer通过对T4噬菌体*rII*基因精细结构的解读,揭示了生物遗传学中"三联密码子"。

1961年,François Jacob and Jacques Monod报道了大肠杆菌的乳糖酶调控系统,指出乳糖酶受底物诱导表达,且乳糖酶的表达受到DNA-结合蛋白(抑制子)、激活子以及终止子的调控,这些工作充分利用了基于噬菌体的载体,以λ噬菌体为范例,揭示了基因表达调控的通路。为此,Jacob, Monod and Andrè Lwoff获得1965诺贝尔生理学与医学奖。

1960s晚期及1970s初期,Wende等发现了细菌的限制性修饰(restriction - modification,R-M)系统。DNA修饰(常常是甲基化修饰)是为了保护大肠杆菌自身的DNA免受限制性内切酶的切割。后来Smith等发现II-型限制性内切酶切割位点的序列特异性以及Weiss等人发现了T4噬菌体链接酶,这些工作直接为分子克隆技术的诞生奠定了必备基础。为此,Werner Arber, Daniel Nathans and Hamilton Smith获得1978年诺贝尔生理学与医学奖。

噬菌体载体为基因克隆提供了解决方案。λ噬菌体载体是强大的表达载体,Collins等利用λ噬菌体构建了粘粒(Cosmid),这使得大片段DNA克隆成为可能。基于P1噬菌体构建的人工染色体(artificial chromosomes),被用于克隆更大的DNA片段。基于M13噬菌体载体的构建、T7噬菌体DNA聚合酶的发现,为今天DNA高保真测序提供了解决方案。

噬菌体技术使得通过细菌基因的突变来研究基因功能成为可能。例如,λ自杀载体(在宿主菌中不能自主复制)可用于递送转座子,用于随机致突变研究。利用M13及fd噬菌体可以实现定点突变(site-directed mutagenesis)研究。又如Mu噬菌体在大肠杆菌中可随机转座,用于制备转座子文库。它们都是研究基因功能的强有力工具。

噬菌体在基因组测序技术的建立与发展中举足轻重,生物的全基因组测序首先就是在噬菌体中实现的。第一个被测序清楚的生物是由Walter Fiers等于1976年完成的ssRNA噬菌体MS2。紧接着,1977年Fred Sanger团队完成了ssDNA噬菌体ΦX174的基因组测序。1982年该团队又完成了dsDNA噬菌体λ的全基因组测序。在λ噬菌体测序中建立了鸟枪法文库,使用的限制性内切酶、T4连接酶、M13噬菌体载体,全都是噬菌体产物。所建立的这些测序方法与流程后来被用于大肠杆菌及人类基因以及其他许多生物基因组的测序。

噬菌体展示(phage display)技术被誉为生物工程技术领域的奇葩。Smith等利用噬菌体展示将编码某种生物活性肽或蛋白的基因替换噬菌体的衣壳蛋白基因,从而把具有应用价值的目标基因表达在噬菌体颗粒表面,实现大规模制备具有商业价值的生物活性肽或蛋白质产品。

最近,炙手可热的CRISPR-Cas9基因编辑技术是源于人们对噬菌体与细菌相互作用的深刻理解而建立起来的一种先进技术[17-18]。这种技术利用了细菌对噬菌体的免疫机制,采用任意人工合成的"引导RNA"(guiding RNA)序列与Cas9蛋白形成的复合物。在"引导RNA"的指引下,Cas9可在基因组序列上的任一位置实现人工切割与编辑。

噬菌体也催生了现代合成生物学(synthetic bi-

ology)技术。2003年,Venter等通过人工合成并组装了噬菌体ΦX174基因组,这是首个通过合成生物学技术合成的生物基因组。合成生物学旨在通过人工合成一些具有某种性质(或功能)的"基因元件",再把所需的元件组装在"底盘"(chassis)上,从而让微生物表达与生产成人们所需要的产品。

噬菌体整合酶、重组酶被常被用于催化两个序列的"位点特异性重组"(site-specific recombination)。基于噬菌体P1的Cre - loxP位点特异重组系统已在真核细胞或细菌中实现了精细的遗传操作。

而T7噬菌体RNA聚合酶已被用于合成生物学中的"回路设计"(circuit design)。因此,将噬菌体用于电池、存储器,生物计算机(biocomputor)等已不再是科幻小说中的事。

基于上述事实,可以毫不夸张地说,没有噬菌体的研究及其相关知识积累,就不会有今天的分子生物学技术、基因工程技术、合成生物学技术及基因编辑技术。

3 噬菌体在疾病治疗中的应用

噬菌体治疗(phagotherapy)是指利用噬菌体来治疗细菌引起的感染[9-11]。D'Herelle在研究法国军队士兵中爆发的痢疾时,发现恢复期痢疾病人之粪便中的噬菌体滴度最高,他认为病人的恢复与噬菌体的作用有关。在1919年夏天,他又使用噬菌体来预防鸡感染禽伤寒杆菌,并于1921年首次报告了用噬菌体来控制禽伤寒的流行。同年,Bruynoghe and Maisin报告使用葡萄球菌噬菌体来治疗皮肤疖子。此外噬菌体还被用来治疗死亡率很高的多杀巴斯德菌(*pasteurella multocida*)引起的牛出血性败血症。D'Herelle于1920 s想将噬菌体治疗延伸到人体治疗。在进行人体治疗之前,他口服了痢疾杆菌噬菌体悬液,在自己身上做安全性试验;在没有任何局部和全身反应情况下,他又给合作伙伴和他的家人注射了噬菌体悬液。在证实了噬菌体确实无害之后,他用痢疾杆菌噬菌体治疗了痢疾病人(1926)。

引起最广泛注意的是后来D'Herelle使用直接淋巴结注射噬菌体治愈了4例腹股沟淋巴结腺鼠疫(*bubonic plague*)。这一结果1925年报道在法国杂志《*La presse médical*》上。之后,英国政府邀请D'Herelle到印度孟买研究使用噬菌体治疗霍乱流行。来自印度1920 s and 1930 s的报告显示,口服噬菌体治疗使得霍乱病人症状的严重程度、持续时间、以及死亡率明显降低。1924年,巴西Oswaldo Cruz研究所生产了抗痢疾噬菌体制剂,用于治疗痢疾患者。1926年,George Eliava和D'Herelle在前苏联格鲁吉亚第比利斯建立了噬菌体研究所(Eliava Tbilisi Institute of Bacteriophage)。后来在1970 s,有几个WHO资助的在巴基斯坦进行的研究显示,高剂量的噬菌体治疗与四环素治疗有同等效果。这一时期,一些公司也开始在市场上销售噬菌体制剂。其中,第比利斯噬菌体研究所一直坚持噬菌体治疗的研究与应用,是现今国际上历史最长和规模最大的噬菌体治疗研究机构。1940 s年代,美国的Eli Lilly公司也曾生产了7种人用噬菌体制剂,用于治疗葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌等细菌感染。后来,由于抗生素的出现,噬菌体治疗被西方国家所忽略。这段期间,噬菌体治疗的研究主要存在于前苏联有关国家,如波兰、格鲁吉亚、俄罗斯等国境内。

在我国,新中国建立之初,抗生素非常匮乏。我国也开始了噬菌体治疗的研究和实践。大连生物制品研究所、武汉生物制品研究所都在我国开展过噬菌体制剂的生产与应用。1958年,劳动模范邱财康在大炼钢铁期间不幸严重烧伤,感染了绿脓杆菌,在生命垂危之际,我国微生物学界老前辈余灃教授率领的医疗小组利用噬菌体成功地抢救了邱财康的生命。当时人民日报报道了此事,这一事迹也被拍成电影《春满人间》。

当前,噬菌体治疗再度受到人们的关注。主要原因是随着抗生素的广泛使用甚至滥用,耐药性细菌不断出现且广泛流行,甚至出现了多耐药、泛耐药菌株及超级细菌(superbug)。超级细菌感染变得无药可用,细菌的耐药性已构成对人类的严重威胁。人类在抗生素之外,迫切需要寻求更多的抗感染手段。在此背景下,人类再次把目光投向了噬菌体治疗。2013年全球第一个噬菌体裂解酶产品Gladskin上市,用于治疗MRSA感染。目前还有多个噬菌体裂解酶已进入临床研究阶段。2013年美国FDA批准Intralytix公司研发的沙门氏菌噬菌体制剂SalmoFresh™为公认安全产品,并批准其上市。2014年,美国NIH认可噬菌体可作为抗耐药的手段之一。2014年,欧盟斥资520万欧元 启动噬菌体治疗细菌感染的跨国临床研究计划Phagoburn。2014年,法国、比利时和荷兰的科学家使用噬菌体治疗大肠杆菌和绿脓杆菌的烧伤患者。2017年美国圣地亚哥全球卫生研究所的专家Steffanie Strathdee利用噬菌体成功救治了其丈夫的超级细菌感染。目前,我国上海市公共卫生中心

噬菌体研究所朱同玉领导的小组在利用噬菌体治疗耐药性细菌如鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷佰菌等引起的难治性感染取得成功,在我国开启了噬菌体治疗的新征程。

如果对噬菌体治疗加以分析,我们不难看出其具有几方面的优越性:首先,噬菌体对细菌的侵染具有高度特异性,不会杀灭目标菌种之外的细菌,这就避免了噬菌体的使用不会导致"菌群失调"一类医源性疾病的发生;第二,噬菌体在体内清除目标菌后,会由于失去宿主菌,不能再复制,因而会从病人体内消失,不会发生蓄积中毒;第三,噬菌体只感染细菌,不进入人体细胞,不会扰乱人体细胞代谢,迄今尚未发现噬菌体治疗带来毒副反应;第四,噬菌体在细菌体内复制后,其遗传物质与宿主菌基因组间可发生重组,成为细菌多样性的驱动力;第五,由于噬菌体感染不进入人体细胞,目前尚未发现噬菌体对人体具有致突变能力与遗传毒性。

概括自噬菌体治疗的百年历史,人们用噬菌体治疗过的病原体包括葡萄球菌、链球菌、克雷伯氏菌、大肠杆菌、变形杆菌、绿脓杆菌、痢疾杆菌和沙门氏菌、鲍曼不动杆菌等[12]。在人体治疗过的疾病包括外伤感染、手术后感染、烧伤感染、胃肠炎、脓毒血症、骨髓炎、皮肤感染、泌尿道感染、脓胸和肺炎等等。最引人注目的是:对于那些由超级细菌感染的病人,已到无药可用的地步,噬菌体治疗是目前唯一的选择。

噬菌体治疗已有百年历史,但尚未得到广泛地应用,必然有其限制性瓶颈:

①噬菌体对宿主菌的识别特异性太高[13-14]。一般而言,一个噬菌体在同一"菌种"的菌株中,只能感染少数菌株,其敏感性覆盖率通常在百分之几至百分之十几。故通常认为:噬菌体对细菌识别特异性是在细菌"株"水平。很难找到一种噬菌体对某种细菌的感染普遍有效,这种状况严重限制了噬菌体制剂的广泛应用。

②噬菌体本是大分子蛋白和核酸的复合体,具有很强的免疫性,可激活机体对噬菌体制剂的免疫清除机制。因此,反复在同一个体使用噬菌体治制剂,会导致噬菌体制剂在体内的生物半衰期大为缩短,降低治疗效果。

③反复在同一个体使用同一噬菌体制剂,有可能引发过敏反应。

④噬菌体制剂被广泛应用后,必然像抗生素那样,细菌会对噬菌体产生耐受性[15]。

根据我们实验室的数据,细菌对噬菌体产生耐受的几率似乎比抗生素耐受几率更高。也就是说,在推广噬菌体治疗之后,细菌对噬菌体的耐受亦然会是一个严峻的问题。

4 噬菌体在疾病诊断中的应用

4.1 用于细菌的鉴定与分型

细菌鉴定与分型的传统技术是基于细菌的表型特征,如形态、染色、生化试验、血清学试验等表观特征。传统的细菌鉴定与分型技术定义的一个细菌的"种",利用噬菌体则可将其进一步分为若干"噬菌体型"。如利用噬菌体可将具有Vi抗原的的伤寒沙门氏菌分为96个噬菌体型。需要指出的是,由于噬菌体宿主谱的多样性,噬菌体在细菌鉴定中主要由于"种"之下的进一步分型[16]。噬菌体分型目前在临床病原学诊断中意义不大,但在病原体的流行病学溯源方面具有重要意义。

4.2 用于检测标本中的未知细菌

由于噬菌体必须在细菌活体内才能完成其复制,如果从标本中检出某种噬菌体常提示该样本中有相应的细菌存在。因此,如果用某种已知噬菌体作为诊断试剂,与临床标本在37 ℃孵育2 ~ 3 h,再检测噬菌体的数量,如果噬菌体数量明显增加,那就表明标本中存在相应的细菌。但在这种情况下,如果检测获得阳性结果,具有诊断意义;但若检测为阴性结果,由于噬菌体的宿主谱可能不能覆盖该菌种内的所有菌株,故不具有排除诊断的意义。

4.3 用于细菌诊断的噬菌体新技术

从诊断角度考虑,可以利用噬菌体对细菌的"裂解活性"作为判断指标来建立诊断方法。此外,也可利用噬菌体与宿主菌之间的"特异性吸附"来建立诊断方法。噬菌体与细菌间的特异性吸附是通过其"受体结合蛋白""RBP"与细菌受体的结合来完成的。"RBP"实质上是噬菌体与细菌受体结合的配体。但需要指出的是利用"特异性吸附"来建立的方法,其检出率可能会远远高于利用"裂解活性"来建立的检测。因为,即使噬菌体完成了吸附、穿入步骤,如果噬菌体不能完成复制,也不会出现裂解活性。此时就只能检测到"特异性吸附",而不能检测到"裂解活性"。下面介绍的新技术中,有的是基于裂解活性、有些是基于特异吸附的方法。

4.3.1 噬菌体触发的离子级联感应(sensing of phage-triggered ion cascade)技术 该方法是基于噬菌体在

侵染细菌时，会在细胞膜上溶解出一微孔，造成胞内离子外流，导致被称为“电容”的细胞膜内、外电势差变化，此变化可被感应和检测。该方法是基于裂解活性的方法。本法的优势在于检测过程中不要求培养细菌，检测的是活菌，且能被用于检测活的但不能培养的细菌。

4.3.2 基于噬菌体检测细菌的生物发光法 该法在4 ℃条件下将噬菌体结合到甲苯磺酰基活化的磁珠上，通过噬菌体的RBP与目标细菌结合，再通过磁性分离“噬菌体-磁珠-细菌”复合物，将其在37 ℃孵育，噬菌体进入细菌体内复制，并裂解细菌，释放出细菌胞内的ATP；继之，通过“荧光素酶-ATP”生物发光系统检测发光信号，从而实现检测目标细菌。该方法亦是基于裂解活性的方法。本方法有赖于噬菌体在活菌体内完成其复制，故本法检测到的只能是活的细菌，排除了死菌的干扰。

4.3.3 基于噬菌体检测细菌的电化学发光传感器法 该方法将已知的噬菌体（或其RBP）与羧化石墨烯结合形成复合物，再将此复合物定位到玻璃碳电极上，形成电化学发光（electrochemiluminescent，ECL）传感器，用于检测样本中的目标细菌。检测过程中，由于噬菌体与细菌的结合，形成一个非导电生物复合物，阻遏了界面电子传导，阻断了ECL活性分子的扩散，导致ECL的衰减。在一定范围内，这种ECL的衰减与样本中的细菌呈负相关。故利用此电化学发光传感器可实现样本中的细菌检测。本方法是一种非基于裂解活性的方法。

4.3.4 利用基因工程表达的噬菌体RBP检测细菌 该方法首先采用分子克隆技术在大肠杆菌中表达噬菌体的RBP。RBP不具有裂解活性，但具有与细菌特异性结合的能力，因此可用作检测细菌的试剂。在做RBP克隆表达时，还可将编码RBP的基因与报告基因（如荧光蛋白基因、荧光素酶基因等）共表达。然后利用报告基因，将噬菌体与细菌之间的特异性结合转化为一种可检测信号，实现对细菌的检测。该方法是一种纯粹基于特异性吸附的方法。

上述新方法尚处于探索之中，尚未进入临床应用，其根本原因是其覆盖度尚难达到细菌“种”的范围。

5 噬菌体在其他领域中的应用

5.1 噬菌体在疾病预防中的应用

噬菌体可调控特定环境中宿主菌的数量与分布。宿主菌达到一定数量，噬菌体就会繁殖起来；随着噬菌体的繁殖，宿主菌数量又会被压制下去。二者在动力学上存在着此起彼伏的态势。因此理论上讲，可以利用噬菌体来调控某一特定环境中的病原体数量，从而达到防控疾病的目的。最近，台湾慈济医院陈立光教授首次报道了这一机理的实践应用。从2009年开始，耐亚胺培南的鲍曼不动杆菌在台湾多地区（台北区、中区、南区、高屏区及东区）流行，且形势严峻。2015及2016年陈教授开始在流行最重的台湾东区使用所研制“噬菌体清洁剂”，耐药鲍曼得到很好控制。有人质疑上述结果是否与噬菌体清洁剂使用有关，故2017年刻意停止使用，当年就又出现流行反复。2018年重新使用了该噬菌体清洁剂，区域内的鲍曼不动杆菌流行重新得到控制。这项工作在台湾获得第13届“临床创新奖”。从上述实例表明在一些特定环境，如ICU病房、烧伤病房等的特定区域内，使用区域内分离的优势流行菌株作为宿主菌分离的噬菌体，再用此噬菌体来控制该病原体所致疾病的流行是可行的。

5.2 噬菌体在农业领域的应用

与人类疾病的防治类似，噬菌体同样可以用于牲畜和家禽类动物的细菌感染性疾病的治疗、诊断和预防。2006年，美国FDA批准了某公司针对产气荚膜梭菌的噬菌体制剂用于消除养殖禽类的细菌感染。由于动物用噬菌体治疗制剂应用的准入门槛较人用制剂低。因此，动物用噬菌体治疗制剂研制所承担的风险更小，成本更低。研制动物用噬菌体制剂更容易实现，也将更具有应用前景。

沙门氏菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、李斯特菌等是家畜或家禽中重要的感染性病原体。这些病原体引起的家畜或家禽感染性疾病死亡率很高，严重影响到家畜与家禽的生产。在鱼和虾的水产养殖中，假单胞菌、杀鲑气单胞菌、嗜水产气单胞菌、发光弧菌、哈维弧菌、爱德华菌、嗜冷水螺菌常常是鱼或虾的重要病原体，对水产养殖危害很大。既往在畜牧、禽类及海产养殖中常常使用抗生素以保证产量，但由于抗生素使用引起的耐药性扩散以及抗生素残留对人类健康带来严重影响，引起了全球关注。各国相继出台了在动物性食品生产中限制抗生素使用的相关政策。因此，使用噬菌体来防治家畜、家禽、鱼虾的细菌感染性疾病是一个值得开拓的领域。

有些植物病害是由细菌引起的，噬菌体对于植物根际和叶际病原菌具有防控潜力。2005年，美国

即批准噬菌体制剂用于控制黄单胞菌和丁香假单胞菌引起的番茄和胡椒的斑点溃烂病。利用噬菌体来控制农作物病害是一个具有光明前景的应用领域[17]。

5.3 噬菌体在工业及饮食卫生中的应用

在发酵工业中,由于细菌污染常导致发酵失败,造成严重损失。使用噬菌体控制发酵过程中的污染,早已在发酵工业中成功使用。

食源性感染是公共卫生健康的主要威胁。WHO报告每年死于食物污染和水源性腹泻者约200万人。食源性疾病导致美国每年约100亿美元~830亿美元的经济损失。噬菌体制剂可用于控制食品中的细菌生长,使得食品得以保鲜,并控制食源性疾病的发生。在这一领域已有很多上市产品,美国FDA已经批准了4种噬菌体制剂用于食品安全。美国环保机构(EPA)也批准了一种噬菌体制剂用于控制食品加工厂的细菌污染。这几种制剂主要是针对李斯特菌、沙门氏菌的。

5.4 噬菌体在生物高技术领域中的应用

与噬菌体有关的分子生物学技术、生物工程技术很多。有的已是常规技术,篇幅之限,不一一介绍,这里强调三个方面的应用。

5.4.1 *转座子文库与细菌基因功能研究* 噬菌体转座子文库是用转座子转染目标菌株形成的文库。一个高质量的文库,文库中的每一个细菌都会被一个(且只能被一个)转座子随机插入,使该基因被插入失活。随机挑取菌株,以转座子序列为测序引物,侧向测序至细菌基因组的一段序列,即可知道该菌体被插入失活的基因,以失活基因命名该菌株。如此反复随机挑取菌株测序鉴定,直至挑取到每个基因的失活菌株,构成一个转座子失活基因的文库。有些生物工程公司专门制作这种转座子文库,目前很多菌种都有商品化的转座子文库出售。有了这种转座子文库,为我们研究单基因失活后的表型变异及基因功能研究提供了基础。目前,几乎所有病原学细菌都有菌株被完成了全基因组测序,但通过注释分析,我们会发现超过半数的细菌基因都是功能未知基因。有的基因,虽然被注释了一种功能,但这很可能只是该基因一个方面的功能,有些基因可能不止一种功能。因此,细菌的功能基因组学研究仍然任重道远。而转座子文库是我们研究基因功能的有用武器。

5.4.2 *噬菌体展示技术与生物制药* 噬菌体展示(phage display)技术是一种高效制备生物活性肽或蛋白质分子的现代分子生物学技术。其原理是用欲表达的基因替换噬菌体的衣壳蛋白编码基因,使欲制备的活性肽或蛋白质分子呈现在噬菌体颗粒表面。用这样重组的噬菌体感染宿主菌,获得大量噬菌体颗粒,再从噬菌体颗粒回收目标分子。这是一种制备生物活性肽或蛋白质分子的非常有用的生物制药技术。

5.4.3 *基因编辑技术与生物改造* 近年,人们在研究噬菌体与宿主菌相互作用的过程中发现了细菌的CRISPR/Cas系统。基于CRISPR/Cas的作用机制,建立起来了基因编辑技术。虽然,该系统中的Cas蛋白作为核酸切割酶,并不具有识别和特异切割DNA序列的特点,但在引导序列(guiding sequence)的引导下其切割活性就具备了特异性。而引导序列是可以人为任意合成的,这就使得我们有了在基因组上任意切割某一部位,或进而插入目标序列的技术手段,这就是基因编辑技术。基因编辑技术可用于编辑任何生物(包括人类)的基因组。但是,若将其用于编辑人体胚胎基因组时,在胚胎期被改变的基因组将存在于人体的所有有核细胞(包括生殖细胞),这就会导致被编辑的基因在人类扩散,其危险性是无法估计的。各国都严格禁止使用基因编辑技术来改变人体胚胎的基因组。因此,基因编辑技术用之于人体,仅限于编辑体细胞,用于治疗单基因遗传学疾病。而在微生物学中,基因编辑技术是制备微生物突变体的有力工具。

6 展望

噬菌体作为非细胞型病毒,严格寄生在前核细胞型微生物如细菌体内。它的培养成本低,且易于遗传造作。因此,噬菌体是生命科学领域研究生命现象及其规律的理想对象和材料。历史上,噬菌体研究为今天的分子生物学、合成生物学、基因工程技术、及基因编辑技术等领域做出了不可磨灭的巨大贡献。但人类在认识生命现象的本质及其规律方面,尚任重道远,相信噬菌体作为理想的研究对象和材料,将在生命科学领域继续发挥重大作用。

噬菌体作为细菌的天敌,在抗细菌感染领域具有天然地应用前景,但由于噬菌体的宿主谱太窄,严重限制了噬菌体治疗的推广与应用。在如何突破噬菌体治疗的限制性瓶颈、拓展噬菌体宿主谱、研发噬菌体基因编码产物等领域,亟待取得突破。在细菌对抗生素的耐药性日趋严重的今天,超级细菌的感染已导致无有效抗生素可用,在抗耐药性细菌感染方面,噬菌体治疗可能是最佳选择。

噬菌体应用不仅仅限于疾病治疗，它们在疾病诊断、疾病防控、兽医领域、生物制药、畜禽养殖、海产养殖、食品卫生、工业发酵、土壤生态防治等领域都有着光明应用前景。

参 考 文 献

[1] Zurabov F, Zhilenkov E. Characterization of four virulent *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages, and evaluation of their potential use in complex phage preparation[J]. Virol J, 2021, 18(1): 9.

[2] Secor PR, Dandekar AA. More than simple parasites: the sociobiology of bacteriophages and their bacterial hosts[J]. mBio, 2020, 11(2): e00041-20.

[3] Twort FW. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses[J]. Lancet, 1915, 186(4814): 1241-1243.

[4] Salmond GP, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future[J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(12): 777-786.

[5] Ramisetty BCM, Sudhakari PA. Bacterial 'grounded' prophages: hotspots for genetic renovation and innovation[J]. Front Genet, 2019, 10: 65.

[6] Roux S, Chan LK, Egan R, et al. Ecogenomics of virophages and their giant virus hosts assessed through time series metagenomics[J]. Nat Commun, 2019, 8(1): 858.

[7] Seed KD, Lazinski DW, Calderwood SB, et al. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity[J]. Nature, 2013, 494(7438): 489-491.

[8] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. Science, 2010, 327(5962): 167-170.

[9] Doub JB. Bacteriophage therapy for clinical biofilm infections: parameters that influence treatment protocols and current treatment approaches[J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9(11): 799.

[10] Kabwe M, Brown T, Speirs L, et al. Novel bacteriophages capable of disrupting biofilms from clinical strains of *Aeromonas hydrophila*[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 194.

[11] Maciejewska B, Olszak T, Drulis-Kawa Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application?[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(6): 2563-2581.

[12] Styles KM, Thummeepak R, Leungtongkam U, et al. Investigating bacteriophages targeting the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*[J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9(4): 200.

[13] He Y, Wang MY, Fan EC, et al. Highly specific bacteriophage-affinity strategy for rapid separation and sensitive detection of viable *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Anal Chem, 2017, 89(3): 1916-1921.

[14] Yue H, He Y, Fan EC, et al. Label-free electrochemiluminescent biosensor for rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* using phage as highly specific recognition agent[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 94: 429-432.

[15] Oechslin F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy[J]. Viruses, 2018, 10(7): 351.

[16] He Y, Wang MY, Fan EC, et al. Highly specific bacteriophage-affinity strategy for rapid separation and sensitive detection of viable *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Anal Chem, 2017, 89(3): 1916-1921.

[17] Vu NT, Oh CS. Bacteriophage usage for bacterial disease management and diagnosis in plants[J]. Plant Pathol J, 2020, 36(3): 204-217.

（2021-05-24　收稿）

专　家　简　介



胡福泉，陆军军医大学（原第三军医大学）微生物学教研室教授，博士研究生导师，专业技术三级，文职一级。教学名师，立三等功3次。研究方向为“噬菌体与宿主菌相互作用”。承担并完成国家自然科学基金、全军或重庆市重点课题、国家“863”课题、国家传染病重大专项子课题等20余项科研课题。发表学术论文160余篇，其中SCI论文70余篇。主编副主编及参编专著教材19部。获全军科技进步一等奖1项、二等奖1项、中华医学一等奖1项、中国预防医学一等奖1项，国家科技进步二等奖2项。政府特殊津贴专家、获全军育才金奖、全军优秀教师等荣誉。学术任职：全军医学科学技术委员会微生物学专业委员会副主任委员；重庆市微生物学会理事长、名誉理事长；中国微生物学会常务理事、中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会主任委员。