DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.018

论著

文章编号:1000-5404(2003)23-2106-03

1株宽宿主谱大肠杆菌噬菌体的生物学特性观察

徐 焰,熊鸿燕,宋建勇,王思雄 (第三军医大学军事预防医学院军队流行病学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察1株自污水中分离的宽宿主谱大肠杆菌噬菌体的生物学特性。方法 采用宿主范围测定、噬菌斑计数、负染色电镜观察、血清中和试验及血清交叉中和试验、一步生长实验等技术观察分离的噬菌体。结果 ①宽宿主谱大肠杆菌噬菌体可裂解五株大肠杆菌;②针对不同宿主菌其噬菌斑形态、大小、透明度、边缘界限、中心透明区及晕环均发生相应变化;③电镜超微结构显示此噬菌体为直径20~40 nm的微球形颗粒,棱角不明显,偶见短尾;④噬菌体的抗血清K值为41.5,与f_2噬菌体血清学相关度为0.38;⑤潜伏期为30~35 min,裂解量为104。结论 分离所得的噬菌体是1株大肠杆菌宽宿主谱噬菌体,为直径20~40 nm的圆形颗粒,其与f_2噬菌体的血清相关度较低,可独立为一个血清型。

关键词:大肠杆菌;噬菌体;宿主谱;血清中和试验;一步生长曲线
中图法分类号:Q939.48;R378.21 文献标识码:A

Biological properties of an *E. coli* bacteriophage with broad host range

XU Yan, XIONG Hong-yan, SONG Jiang-yong, WANG Si-xiong (Department of Military Epidemiology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the biological properties of an *E. coli* bacteriophage with broad host range isolated from sewage. Methods The phage was identified by detection of the host range, calculation of phage plaque, negative staining for TEM, serological neutralization test and one step growth experiment. Results ① The strain of *E. coli* bacteriophage with broad host range could cause bacteriolysis of five *E. coli* strains of the same species; ② The plaque morphology, size, transparence, central transparent region, and the halo changed according to different host bacteria; ③ The ultrastructure under electron microscope showed that the bacteriophage was round-shaped particle with diameter between 20—40 nm and that short-tailed phages were occasionally visible; ④The anti-serum K value of the phage was 41.5, and the correlation coefficient between the phage and phage f_2 was 0.38; ⑤ The incubation period was 30—35 min and the lysis efficiency was 104. Conclusion The phage is a kind of *E. coli* bacteriophage with broad host range and round-shaped particle with diameter ranging from 20—40 nm. The serological correlation between the phage and phage f_2 is low.

Key words: *Escherichia coli*; phage; host range; serological neutralization test; one step growth curve; electron microscope

噬菌体是一类细菌的病毒。因其对于特异性宿主菌具有裂解作用,在发现之初,人们就考虑到将噬菌体作为一种抗细菌感染的制剂来使用,但长久以来,因其寄生宿主有明显的专一性,使得将噬菌体作为抗菌剂使用的设想受到限制[1]。最近,我们通过对环境样本的提取,筛选到1株宽宿主谱的大肠杆菌噬菌体,为开发其应用,我们首先对其相关的生物特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及噬菌体来源 标准f_2噬菌体及其宿主菌大肠杆菌285(军事医学科学院研究四所梁增辉教授惠赠);大肠杆菌BL21,大肠杆菌JM109,大肠杆菌HD5α菌(第三军医大学基础医学部微生物学教研室安静教授惠赠);大肠杆菌25922,大肠杆菌10536,大肠杆菌8099,金黄色葡萄球菌(ACTT 26001),伤寒沙门菌(ATCC 50071),甲型溶血性链球菌(ACTT 32213),乙型溶血性链球菌(ACTT 32210),绿脓杆菌(ACTT 10145),均购自军

基金项目:全军"十五"科技课题(01MA170)
Supported by the Scientific Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of PLA(01MA170)
作者简介:徐 焰(1969—),女,陕西省西安市人,硕士研究生,主管技师,主要从事噬菌体方面的研究。电话:(023)68752286
通信作者:熊鸿燕,电话(023)68752287
收稿日期:2003-06-04;修回日期:2003-09-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

事医学科学院微生物流行病研究所菌种中心。

1.1.2　实验动物　　新西兰大耳白兔由我校实验动物中心提供。

1.1.3　主要试剂及仪器　　营养琼脂(杭州微生物试剂有限公司), 福氏佐剂(Sigma) Gel Doc2000 凝胶成像分析系统(Bio-Rad), 日立-800 型透射电镜(日本)。

1.2　方法

1.2.1　宽宿主谱大肠杆菌噬菌体筛选及其宿主范围测定　　参照文献[2]方法, 以大肠杆菌 285 为宿主菌, 取西南医院污水处理站处理前污水 1 000 ml, 加入固体 $CaCl_2$ 至终浓度 1 mmol/ L, 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 加液体 LB 培养基 50 ml, 再加入大肠杆菌 285 宿主菌悬液 1 ml, 混匀。置 37 ℃过夜培养。次日过滤除菌, 取滤液 0.3 ml 置试管中, 加入上述宿主菌悬液 0.3 ml, 混匀, 室温放置 15 min。再加入 47 ℃融化的半固体 LB 培养基 0.45 ml, 混匀, 倾倒于固体 LB 平板上, 作好平板标记, 37 ℃过夜培养, 次日观察噬菌斑出现情况。通过噬菌斑筛选分离到以大肠杆菌 285 为宿主菌的几株噬菌体。然后参照余茂效[3]的方法, 分别以大肠杆菌 285、大肠杆菌 JM109、大肠杆菌 HD5α 菌、大肠杆菌 25922、大肠杆菌 BL21、绿脓杆菌、伤寒杆菌、金黄色葡萄球菌、溶血型链球菌作为宿主菌与污水中分离得到的上述几株噬菌体制备双平板, 通过噬菌斑生长情况, 筛选到 1 株能同时裂解 5 株大肠杆菌的宽宿主谱大肠杆菌噬菌体, 暂将其命名为 X_1 噬菌体。

1.2.2　电子显微镜观察　　按常规电镜标本制备方法[4], 将纯化增殖的 X_1 噬菌体原液分别与等量其新增宿主菌大肠杆菌 285、大肠杆菌 25922、大肠杆菌 JM109、大肠杆菌 HD5α、大肠杆菌 BL21 混合, 37 ℃孵育约 45 min 待吸附完全后戊二醛固定, 用其悬液 20 μl 滴于蜡块上, 盖上附有 Formvar 膜的铜网, 待其自然沉淀 15 min, 取下铜网, 用滤纸从侧面吸收多余液体, 加 2% 磷钨酸(PTA)于铜网上, 染色 10 min, 用滤纸从侧面吸去染液, 干燥后用透射电镜在 45 kV, 34× 10^3 ~ 105× 10^3 倍数条件下对每个样本观察 15~20 个视野。

1.2.3　抗噬菌体血清制备和中和试验　　将 X_1 噬菌体原液过滤除菌(0.22 μm 滤膜)后加福氏佐剂皮下注射免疫纯种新西兰兔, 制备抗血清[5]。每周免疫注射 1 次, 大约免疫 6~8 周后试血。试血以 1∶100 稀释的抗噬菌体血清能在 5 min 内中和 90% 以上的噬菌体, 即可采血, 采血方式选择家兔心脏直接采血, 一次性获得家兔致死血量, 分离血清, 56 ℃灭活 30 min 后, 标记分装—20 ℃保存备用。按照同样的方法制备 f_2 噬菌体的抗血清, 作为对照。

血清中和试验: 噬菌体和它的抗体之间的反应是按照一种可测得的速率进行的, 这一速率是反应过程中噬菌体的浓度与抗体浓度和活性在一定温度下作用的函数, 通常以测定噬菌体 K 值这一速度常数表示上述噬菌体特征。按文献[3]方法进行血清中和试验并利用公式测定抗噬菌体血清 K 值。

附公式: $K = 2.3 \frac{D}{t} \times lg\left(\frac{P0}{P}\right)$

式中 P0 为试验起始 0 时测定的噬菌体数, P 为经 t min 后测定的噬菌体数, D 是使用的抗噬菌体血清在噬菌体-抗血清混合液中的稀释度。

1.2.4　血清交叉中和试验　　抗噬菌体血清的 K 值高低与其噬菌体的抗原性有密切关系, 同一属不同种的噬菌体, 甚至同一种不同型别的噬菌体 K 值均有差异。两种噬菌体在血清学上相关, 利用其中任何一种抗血清均可中和它们的感染性, 中和反应速率在同一类噬菌体与其抗血清反应中较在不相同的噬菌体与其抗血清反应中大, 因此, 用各种噬菌体与一种抗血清反应的 K 值可表明噬菌体之间的关系程度。

我们以 X_1 噬菌体及 f_2 噬菌体的抗血清分别与 f_2 噬菌体及 X_1 噬菌体进行交叉中和试验, 方法同上。测定它们的交叉中和反应速率 K, 并与其交叉前自身 K 值相比较, 以确定二者之间的相关度。

1.2.5　噬菌体一步生长实验　　方法步骤按文献[3]进行, 对宿主菌悬液进行活菌计数后, 先通过预备试验获得: ① 宿主细胞在培养基中于 37 ℃培养, 吸附噬菌体在 5 min 内的百分数; ② 抗噬菌体血清的适宜稀释度, 在 5 min 内可中和游离噬菌体的 95%; ③ 初测噬菌体的潜伏期; ④ 初测噬菌体的裂解量。然后依上述数据进行一步生长试验, 经过培养, 记录下噬菌斑产生列表, 即可计算潜伏期、吸附率、平均裂解量。从潜伏期终了至细菌裂解完成这一段时间为上升期。以噬菌斑平均数与时间作图, 可得出一条两端平稳中间上升的一级曲线。

对于噬菌体来说, 一步生长曲线是极具代表性的特征, 不同的噬菌体与同一宿主或同一噬菌体与不同宿主所表现出来的一步曲线是有很大区别的。但在一定的实验条件下, 应该说是一个稳定的特征, 因此, 绘制一级曲线时, 为了结果的稳定, 我们以相同的实验条件重复测定上述各项数据至少 3 次以保证曲线的稳定和准确性。

2　结果

2.1　X_1 噬菌体能同时裂解 5 株大肠杆菌

X_1 噬菌体能裂解大肠杆菌 285、大肠杆菌 25922、大肠杆菌 JM109、大肠杆菌 HD5α 菌、大肠杆菌 BL21, 而对于大肠杆菌 10536、大肠杆菌 8099 以及非大肠属的其它菌均不具有裂解能力。

2.2　X_1 噬菌体针对不同宿主菌的噬菌斑特征及其电镜形态

电镜超微结构观察显示: X_1 噬菌体为微球形颗粒, 棱角不明显, 偶见短尾。直径依不同宿主菌呈 20~40 nm。其噬菌斑形态针对不同宿主菌在大小、透明度, 边缘清晰度, 中心透明区及晕环大小略有不同。

2.3　噬菌体血清中和试验

将 X_1 噬菌体与对照 f_2 噬菌体分别免疫家兔制备抗血清后, 再分别与 X_1 噬菌体与对照 f_2 噬菌体作中和试验, 测定各噬菌体的抗血清中和速度常数 K 值, f_2 噬菌体抗血清 K 值= 30, X_1 噬菌体抗血清 K 值= 41.5。此外, 还分别进行交叉中和试验, 以交叉株和自身株的 K 值比率, 比较两噬菌体间的血清学相关度。见表 1, 从表 1 的结果看, 虽然两噬菌体有一些交叉, 但相关度较低, 故 X_1 噬菌体可独立为一个血清型。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 X_1噬菌体与 f_2 噬菌体间血清学相关度

Tab1 The serological correlation between the phage with broad host range and phage f_2

Phage	Phage antiserum	
	Phage f_2	Phage X_1
Phage f_2	1.00	0.52
Phage X_{-1}	0.38	1.00

2.4 噬菌体的吸附和一步生长实验

将抗血清分别与其相对应的噬菌体进行一步生长试验，结果见表 2 及图 1。

表2 X_1噬菌体及其标准株的一步生长实验结果

Tab 2 The results of one step growth experiment for the phage with broad host range and phage f_2

Phage	Adsorpton speed (ml/min)	Incubation period (min)	Average lysis efficiency
Phage f_2	9.5×10^{-12}	40～45	82
Phage X_1	1.6×10^{-11}	30～35	104

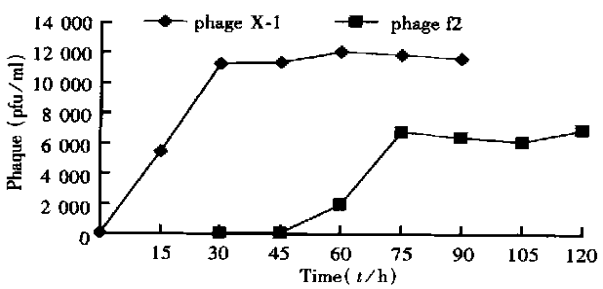


图 1 噬菌体 f_2 及噬菌体 X_1一步生长曲线

Fig 1 The one step growth curve of phage f_2 and phage X_1

3 讨论

近年来，人们开始对噬菌体在生态环境中的应用价值进行开发，并取得可喜进展。如 Park 等[6] 将在绿脓假单胞菌中分离的 2 株噬菌体(肌病毒科和短尾病毒科)用于养渔场香鱼出血性腹水疾病的防御和治疗，取得良好效果；Kotrba 等[7] 将金属粘附蛋白基因组装于噬菌体后，由于表面表达蛋白对 Zn^{2+}，Cu^{2+}，Cd^{2+} 的吸附效应，宿主细菌 *E. coli* 呈现出对这些金属的特殊生物聚集现象，为将生物法用于工业水体的净化、利用奠定了基础；我国大连水产学院的研究者针对河弧菌对人工养殖的破坏问题，在沿海水域筛选了该菌的多种特异噬菌体，以用于为河弧菌的快速检测及防治[8]。

裂菌性噬菌体是细菌的天然“杀手”，是灭活病原体最经济有效的纳米机器型材料。而且噬菌体的感染效率高到令人生畏的地步，只要重复 4 次感染周期，一个噬菌体颗粒便能够使数十亿个细菌细胞致死。鉴于噬菌体对其宿主菌的溶解破坏能力如此强大，因此，噬菌体被认为是治疗细菌感染及环境消毒的一种有效手段[9]。但长久以来，一般噬菌体所具有的寄生专一性使得将噬菌体作为抗菌剂使用受到障碍。在自然环境中直接筛选宽宿主寄生的噬菌体，或通过对较宽宿主寄生噬菌体的基因结构研究，以开发人工构建的宽宿主寄生噬菌体是目前相关领域研究者的关注热点。

本实验筛选的 X_{-1}噬菌体来自于环境样本，具有多宿主性特点，对其生物学特性进行系统观察，将有利于对其进一步开发应用、人工改建。

我们发现，X_{-1}噬菌体的宿主谱范围较宽，可同时裂解 5 株大肠杆菌。其形态与 f_2 噬菌体相同，但血清型和一步生长曲线的指标有很大差异，对宿主菌的吸附速率及裂解量均高于 f_2 噬菌体，裂菌潜伏期明显缩短，并显示其与大肠杆菌 285 株 f_2 噬菌体的血清学相关度较低，是一新的噬菌体株。

X_{-1}噬菌体所具有多宿主性的生物效应及其相应的基因结构基础是一项值得探索和观察的研究领域，我们将继续这些有趣研究工作，以揭示噬菌体宿主谱变化的机制。

参考文献：

[1] 司稚东，何小青. 噬菌体学[M]. 北京：科学出版社，1996. 25－45.

[2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1996. 215－218.

[3] 余茂效，司稚东. 噬菌体实验技术[M]. 北京：科学出版社，1991. 5－76.

[4] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[M]. 北京：人民军医出版社，2001. 222－257.

[5] 魏 泓. 医学实验动物学[M]. 成都：四川科学技术出版社，2000. 247－391.

[6] Park S C, Shimamura I, Fukunage M, *et al*. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(4): 1416－1422.

[7] Kotrba P, Doleckova L, de-Lorenzo V, *et al*. Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(3): 1092－1098.

[8] 林业杰，陈亢川，胡海林. 副溶血性弧菌噬菌体的生物学特性研究[J]. 海峡预防医学杂志，1998, 4(1): 9－11.

[9] Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, *et al*. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents[J]. J Infect, 1998, 36(1): 5－15.

（编辑 张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net