

铜绿假单胞菌噬菌体的分离鉴定及耐噬 菌体突变频率测定*

张克斌 陈志瑾 金晓琳 饶贤才 胡福泉**

(第三军医大学基础部微生物学教研室 重庆 400038)

摘要: 用铜绿假单胞菌为宿主菌自污水中分离到3株不同的铜绿假单胞菌噬菌体, 命名为 PaP1、PaP2 及 PaP3。3者均为 DNA 双链噬菌体, 基因组大小分别约为 47kb、34kb 及 24kb。3株噬菌体原液滴度 (pfu) 分别为 10^9 /mL、 10^{11} /mL 和 10^{11} /mL。PaP1 为裂菌性噬菌体, PaP2 及 PaP3 为溶原性噬菌体。电镜观察, 3株噬菌体头部均为多面体立体对称颗粒, 直径分别约为 70nm、55nm 和 65nm。PaP1 属肌尾噬菌体科, PaP2 和 PaP3 属短尾噬菌体科。研究中还发现了铜绿假单胞菌的耐噬菌体现象及耐受菌与敏感菌之间的“菌群交替”现象, 经测定铜绿假单胞菌耐噬菌体的突变机率在 $1.4 \times 10^{-7} \sim 7.9 \times 10^{-7}$ 之间。

关键词: 铜绿假单胞菌, 噬菌体, 分离鉴定, 噬菌体耐受性

中图分类号: Q93-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0040-06

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA BACTERIOPHAGE AND DETERMINATION OF PHAGE-RESISTANCE MUTATION FREQUENCY

ZHANG Ke-Bin CHEN Zhi-Jin JIN Xiao-Lin RAO Xian-Cai HU Xiao-Mei HU Fu-Quan

(Department of Microbiology, The third military medical university, Chongqing 400038)

Abstract: Three bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from sewage and named as PaP1, PaP2 and PaP3. All belong to double-strand DNA phages, their genome is about 47kb, 34kb and 24kb respectively. The titre (pfu/mL) of three phages is respectively 10^9 , 10^{11} and 10^{11} . PaP1 is lytic phage, both PaP2 and PaP3 are lysogenic. Under electron microscope, All show icosahedral heads with diameter of 70nm, 55nm and 65nm respectively. PaP1 belongs taxonomically to Myoviridae, and both of PaP2 and PaP3 belong to Pedoviridae. The phage-resistance and substitution phenomenon of the resistant flora for the sensitive were observed, and the mutation frequency of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to the phage is about $1.4 \times 10^{-7} \sim 7.9 \times 10^{-7}$ determined by end-point -

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30070037)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30070037)

第三军医大学校管基金 (No. 997-2)

** 通讯作者

收稿日期: 2000-10-30, 修回日期: 2001-01-15

titer method.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Bacteriophage, Isolation and identification, Phage-resistance

噬菌体是细菌的病毒。它们在细菌毒力基因与耐药基因的水平转移、微生态平衡及生物多态性等方面均有重要作用^[1,2]。铜绿假单胞菌是一类重要的条件致病菌,其噬菌体家族也表现出多样性。目前有关铜绿假单胞菌噬菌体分类系统尚未确立,因而该系统有多少成员尚不清楚^[3]。铜绿假单胞菌天然情况下即对许多抗生素都不敏感,随着抗生素的广泛使用耐药菌株不断增多,临床治疗十分棘手。噬菌体治疗再度受到人们的重视^[4,5],但细菌耐噬菌体的报道尚不多。铜绿假单胞菌噬菌体分离、鉴定及耐噬菌体现象的研究将为噬菌体基因组学、噬菌体工程改造和噬菌体治疗工作奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 铜绿假单胞菌噬菌体的分离和滴定

宿主菌准备:铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa)由本校附属新桥医院检验科细菌室提供,经法国生物梅里埃公司生产的API细菌鉴定法进行鉴定。所用共6株,分别编号为Pa1、Pa2、Pa3、Pa4、Pa5和Pa6。用铜绿假单胞菌分群血清(成都生物制品研究所制)作血清学分群,分别为血清群9、6、3、6、20及11群。

标本及其处理:自本校西南医院污水处理站取污水(未消毒前)3000mL,加入固体CaCl₂至终浓度1mmol/L,用0.22μm滤膜过滤除菌。

噬菌体分离:参照文献[3]的方法加以改进。取过滤除菌标本3000mL,加LB液体培养基150mL,再加入6株宿主菌悬液各3mL,混匀。置37℃过夜混合扩增培养。次日过滤除菌,各取滤液0.3mL分置6支试管,每管中分别加入各宿主菌悬液0.3mL,混匀,室温放置15min。再加入47℃融化的0.7%琼脂LB培养基2mL,混匀,倾倒在固体LB平板上,37℃过夜培养,次日观察噬菌斑出现情况。

噬菌体滴定与保存:对有噬斑者,挑取单个噬斑,接种到对应宿主菌中,37℃下160r/min振荡培养6h以扩增噬菌体,10000g离心10min,收集上清即为噬菌体原液。可冻干保存或加无菌甘油至30%后液氮保存备用。滴度滴定采用终点滴定法,即将噬菌体原液用LB液体培养基作10倍连续稀释后,每稀释度取10μL,加入到0.2mL宿主菌中,如上法做噬斑测定:

滴度(pfu/mL) = 噬斑数 × 稀释倍数 × 1000/10

1.2 噬菌体与宿主菌的交叉培养试验

将分离的3株噬菌体与6株宿主菌交叉培养,即取噬菌体液各10μL分别加入0.2mL宿主菌悬液,混匀、制板、培养。根据噬斑鉴定各噬菌体是否存在交叉宿主菌。

1.3 噬菌体核酸提取

将噬菌体接种到对应宿主菌悬液中,37℃振荡培养,裂菌性噬菌体培养6h,溶原性噬菌体可培养24h。培养毕,按5.84g/100mL加入NaCl,混匀溶解,冰浴1h,10000g离心10min,去除菌体及碎片,向上清中加入DNase I(上海生工)和RNase A(华美生物工程公司)至终浓度1μg/mL,37℃温育60min,以裂解宿主菌来源的DNA和RNA;再加入固体PEG8000(Promega公司)至10%(w/v),混匀溶解,冰浴1h,4℃离心12,000g,10min,弃上清;用2mL TM液(0.05mol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.2% MgSO₄·

7H₂O) 混悬沉淀(取样作电镜观察);加等体积氯仿,振荡30,离心5,000g,10min,收集上层水相;加DNaseI至终浓度5 μ g/mL,RNaseA至1 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C温育1h,再次降解宿主菌来源的DNA及RNA;然后加入EDTA(pH8.0)至终浓度20mmol/L,加蛋白酶K(华美生物工程公司)至50 μ g/mL,加SDS至0.5%,混匀,56 $^{\circ}$ C1h;此步为破衣壳,释放出噬菌体核酸。再用等体积平衡酚(pH8.0)抽提,离心收集上层水相;用等体积氯仿再抽提一次,收集水相;乙醇法沉淀核酸;然后用TE100 μ L混悬沉淀,-20 $^{\circ}$ C保存。

1.4 噬菌体电镜观察

取噬菌体培养物上清或步骤1.3中所得浓缩噬菌体悬液作电镜观察。取20 μ L样本滴于铜网上,待其自沉15min,吸去多余液体,用2%磷钨酸染色10min,干燥后电镜观察。

1.5 酶切分析

取上述纯化的噬菌体核酸溶液,用EcoRV(Boehringer Mannheim公司)按常规酶切,于0.8%琼脂糖凝胶中电泳后观察结果。

1.6 铜绿假单胞菌耐噬菌体菌 PaP1 株的发现及其突变率测定

取噬菌体 PaP1 20 μ L,加入0.1mL Pa1 宿主菌液中培养3~6h,菌液逐渐变澄清,继续培养10余小时后,澄清液体再度返浊。我们认为是培养液中出现了耐受噬菌体的宿主菌。进而采用“终点滴定——返浊法”测定耐受菌株的发生机率。具体操作是:将宿主菌 Pa1 做10倍连续稀释,直至 10^{-10} 。于 10^{-6} ~ 10^{-8} 稀释管中各取样10 μ L,用菌落计数法测出细菌数/mL。同时,每个稀释度管中加入 PaP1 原液(10^9 pfu/mL)100 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C振荡培养,3~4h后可见各管逐渐开始变清,表明细菌已裂解,继续培养,可发现自高浓度菌液管开始逐渐返浊。直到再延长一天后不再有新的返浊管出现为止。此时判读结果:能返浊的最低浓度管中所含细菌数的倒数,即为耐受突变的机率。同时,返浊菌离心再作铜绿假单胞菌血清分群鉴定。重复3次实验。

2 结果

2.1 铜绿假单胞菌噬菌体的分离和滴度测定

在 Pa1、Pa4、Pa5 和 Pa6 作为宿主菌的平板上获得了5株噬菌体,其中在 Pa6 铺板上发现有两种不同的噬斑:一为裂菌性透亮噬斑,一为溶原性半透明噬斑,暂定名为 PaP1、PaP4、PaP5、PaP6a 和 PaP6b。后做宿主谱和 DNA 酶切图谱分析;发现 PaP1 和 PaP6a 为同一噬菌体,合名为 PaP1; PaP4 和 PaP6b 为一株,合名为 PaP3; PaP5 改名为 PaP2。各噬菌体原液的滴度是: PaP1 为 10^9 pfu/mL, PaP2 为 10^{11} pfu/mL, PaP3 为 10^{11} pfu/mL。

2.2 噬菌体与各宿主菌交叉培养试验

噬菌体与各宿主菌交叉培养试验结果见表1,说明3株噬菌体间存在交叉宿主菌,如 PaP1 及 PaP2 均裂解宿主菌 Pa1;同一噬菌体有多个不同血清群的宿主菌,如 PaP1。

表1 噬菌体与各宿主菌交叉培养试验结果

噬菌体	宿主菌					
	Pa1	Pa2	Pa3	Pa4	Pa5	Pa6
PaP1	++	-	-	++	-	++
PaP2	+	-	-	-	+	-
PaP3	-	-	-	+	-	+

注: ++为裂菌透明噬斑, +为溶原性半透明噬斑, -为无噬斑

2.3 噬菌体电镜观察

由电镜照片可见3种噬菌体都有一个多面体立体对称的颗粒,无囊膜,PaP1直径约70nm,并有一个约60nm的尾。PaP2直径约55nm,有一个短尾。PaP3直径约65nm,短尾欠清晰,但文献指出溶原性噬菌体都属有尾^[6],故PaP2及PaP3均应属短尾噬菌体。

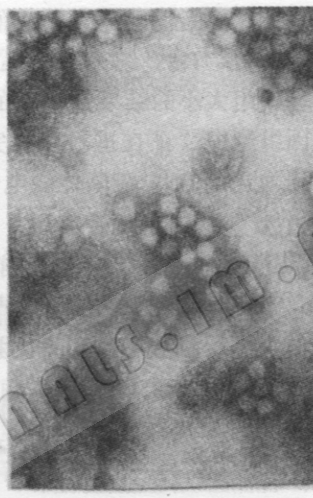
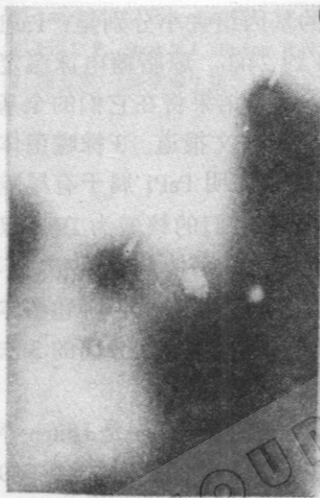


图1 PaP1电镜观察(X50K)

图2 PaP2电镜观察(X40K)

图3 PaP3电镜观察(X20K)

2.4 噬菌体核酸酶切图谱

3个噬菌体核酸皆可被 *EcoRV* 切开,表明它们的核酸均为双链DNA。它们的基因组大小分别约为:PaP1约47kb;PaP2约34kb;PaP3约24kb。详见图4。

2.5 铜绿假单胞菌耐噬菌体的突变频率

在裂菌实验中,将裂解至清的培养物作延时培养后,培养物再度返浊,分析为耐噬菌体细菌生长为优势菌群所致。采用分型血清鉴定耐受细菌,证实仍为血清9群铜绿假单胞菌,不是污染细菌。采用终点滴定-返浊法测定Pa1敏感宿主菌株产生耐受噬菌体突变的频率为 $1.4 \times 10^{-7} \sim 7.9 \times 10^{-7}$ 。这一突变频率与耐药性突变率相当。

3 讨论

噬菌体作为细菌的病毒在宿主菌之间进行频繁的转移,进而导致宿主菌之间遗传物质的转移与交换。因此噬菌体在细菌毒力基因与耐药基因的水平转移、微生态平衡及生物多态性等方面均有重要意义^[1,2]。同时,随着抗生素的广泛使用耐药菌株不断增多,临床抗感染治疗变得越来越棘手。噬菌体治疗作为一种治疗手段再度受到人们的

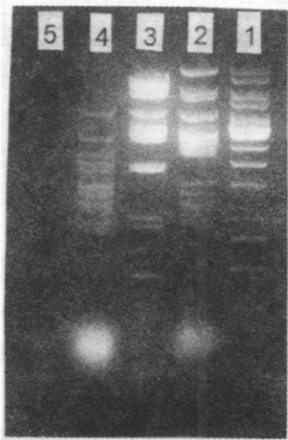


图4 各噬菌体核酸的 *EcoRV* 酶切图谱

- 1 DNA marker 250 ~ 10000bp,
- 2 PaP1, 3 PaP2, 4 PaP3,
- 5 Pa 上清液对照

重视^[4,5], 因此, 噬菌体分离、鉴定及耐噬菌体现象的研究将为噬菌体的工程改造和噬菌体治疗的深入研究奠定基础。

本研究在噬菌体分离的第一步中使用了混合宿主菌对污水标本作噬菌体初步扩增。这样做的优点是提高了分离到噬菌体的机会, 但由于噬菌体与宿主菌之间可能存在交叉关系, 因此, 在第二步中再使用不同的单一宿主菌分离到的噬菌体, 很可能是同一噬菌体。如本研究分离到5株噬菌体, 根据它们的宿主谱及后来的核酸酶切图谱分析, 就发现实际上为3株不同的噬菌体: PaP1、PaP2及PaP3, 前者为裂菌性噬菌体, 后两者为溶原性噬菌体。琼脂糖电泳表明它们的基因组大小分别是: PaP1约47kb, PaP2约34kb, PaP3约24kb。琼脂糖电泳测定基因组大小的结果是粗略的, 精确结果将在它们的全基因组测序(正在进行)完成后另文报道。3株噬菌体均为双链DNA噬菌体。电镜结果表明PaP1属于有尾噬

菌体; PaP2为短尾; PaP3在照片上难以确定是否有尾, 但根据它们的核酸为DNA双链, 且又是溶原性噬菌体, 故应属于短尾噬菌体^[6]。目前国际上噬菌体分类标准尚不完善, 1991年国际病毒分类委员会(ICTV)下设细菌病毒委员会第五次报告将噬菌体分为12科, 最重要的标准是核酸类型, 粒子形状和有无囊膜, 据此, 本文分离的3株噬菌体中PaP1属肌尾噬菌体科, PaP2和PaP3属短尾噬菌体科^[6]。

目前国际上已经完成全基因组测序的铜绿假单胞菌噬菌体仅有两个, 一是Luiten等人完成的PF3噬菌体, 含有5833个nt^[7]; 另一个是Hill等人完成的PF1噬菌体, 含7349个nt^[8]。两者均为单链DNA噬菌体。从基因组大小和已经完成的测序结果来看, 本文分离到的3株噬菌体与上述已测定的两个都不可能是同一种噬菌体。

本研究在用固定宿主菌量0.1mL(约 5×10^8)加不同稀释度的噬菌体来测定噬菌体原液效价的过程中, 偶然发现了宿主菌的耐受现象, 即已经裂解澄清的菌液在继续放置过程中又返浊的现象, 从这种返浊菌液中分离出来的细菌不再对原噬菌体敏感。分析认为这是原敏感宿主菌被裂解, 被突变出来的耐受菌所取代的一种“菌群交替”(Flora substitution)现象。过去见到的“菌群交替”现象多为长期使用抗生素的结果, 还未曾见到过有噬菌体引起的菌群交替现象的报道。耐受性突变当为随机小概率事件, 但在我们的实验中, 发现的是一种必然的规律性事件(每次、每管均发生)。分析认为是因为实验中使用的宿主菌量太大, 超过了产生耐受的突变概率的倒数, 因此在每管中都必然存在数个以上的耐受菌, 噬菌体裂解仍然起的是一种选择作用。这就给我们提出了一个严峻的问题: 细菌耐噬菌体突变的机率是多少? 如果这种机率很大的话, 那就意味着噬菌体作为治疗制剂是没有前景的, 因为人类分离制备和改造噬菌体的速度会跟不上细菌形成耐受的速度。带着这一问题, 我们用终点滴定——返浊法测定了铜绿假单胞菌耐变噬菌体突变的机率, 结果表明这种突变率在 $1.4 \times 10^{-7} \sim 7.9 \times 10^{-7}$ 之间, 落在了细菌耐抗生素的自然突变率之间($10^{-6} \sim 10^{-9}$)^[9]。这一结果说明, 噬菌体

治疗象抗生素一样,既有临床应用的前景,也面临产生耐受性的可能。

目前,我们已经获得了铜绿假单胞菌噬菌体——敏感宿主菌及噬菌体——耐受菌两个模型系统,这对于研究细菌耐受噬菌体机理是极有价值的系统。同时,对 PaP1、PaP3 的全基因组测序与其它深入研究正在进行之中,结果将另文发表。

参 考 文 献

- [1] Boyd E F, Moyer K E, Shi L, *et al.* *Infect-Immun* 2000, **68** (3): 1507 ~ 1513.
- [2] Blahova J, Kralikova K, Krcmery V, *et al.* *Acta-Virol* 1997, **41** (5): 293 ~ 296.
- [3] 余 贺.《医学微生物学》.北京:人民卫生出版社,1964.
- [4] Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, *et al.* *J. Infect* 1998, **36**: 5 ~ 15.
- [5] Lederberg. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, **93**: 3167 ~ 3168.
- [6] 司稚东,何晓青.《噬菌体学》.北京:科学出版社,1996.
- [7] Luiten R M, Putterman D G, Schoenmakers J G G, *et al.* *J Virol* 1985, **56**: 268 ~ 276.
- [8] Hill D F, Short N J, Perham R N, *et al.* *J Mol Biol* 1991, **218**: 349-364.
- [9] 闻玉梅.《医学微生物学》.北京:人民卫生出版社,1999.