

研究报告

一株裂解性奶牛乳房炎源大肠杆菌噬菌体的 分离鉴定及生物学特性分析

张倩¹ 张湘莉兰² 孙耀强¹ 于会举¹ 张培生¹ 刘鸽¹ 屈勇刚^{1*} 童贻刚^{2*} 李岩³

(1. 石河子大学动物科技学院 新疆 石河子 832003)

(2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

(3. 新疆生产建设兵团畜牧兽医工作总站 新疆 乌鲁木齐 830063)

摘要:【目的】从新疆石河子地区奶牛粪样中分离裂解性大肠杆菌噬菌体(*Escherichia coli* phage), 对其进行纯化及生物学特性分析。【方法】利用双层平板法从奶牛粪样中分离、纯化噬菌体, 将纯化后的噬菌体浓缩液用醋酸双氧铀负染后通过透射电子显微镜观察其形态特征。对该噬菌体进行全基因组测序和遗传进化分析, 同时测定噬菌体的宿主谱、最佳感染复数、一步生长曲线、热稳定性及酸碱稳定性。【结果】分离并纯化出一株裂解性噬菌体 vB_EcoM_XJ2, 噬菌斑圆形不透明, 直径 0.7 mm–1.2 mm; 电镜显示其头部呈正多面体对称, 有可伸缩性尾部; 核酸类型为双链 DNA, 基因组大小为 75.617 kb, G+C% 含量为 42.09%; 其核酸序列与大肠杆菌噬菌体 NJ01 和 vB_EcoP_SU10 相似性高达 94%。生物学特性研究显示该噬菌体能裂解多株临床分离的大肠杆菌; 能耐受 60 °C 左右高温, 在 pH 5.0–11.0 范围内效价稳定; 最佳感染复数为 0.1, 潜伏期为 15 min, 暴发期为 95 min, 裂解量约为 10.6 PFU/cell。【结论】vB_EcoM_XJ2 是一株在不同温度、不同酸碱性环境中具有较强适应能力的裂解性肌尾科大肠杆菌噬菌体。

关键词: 奶牛乳房炎, 大肠杆菌, 裂解性噬菌体, 生物学特性, 进化树分析

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31560699); The Project of Applied & Basic Research of Xinjiang Production and Construction Corps (No. 2015AG012)

*Corresponding authors: E-mail: QU Yong-Gang: quyonggang@shzu.edu.cn; TONG Yi-Gang: tong.yigang@gmail.com

Received: September 16, 2016; Accepted: November 17, 2016; Published online (www.cnki.net): November 29, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31560699); 新疆生产建设兵团应用基础研究计划项目(No. 2015AG012)

*通讯作者: E-mail: 屈勇刚: quyonggang@shzu.edu.cn; 童贻刚: tong.yigang@gmail.com

收稿日期: 2016-09-16; 接受日期: 2016-11-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-11-29

Isolation and characterization of a lytic phage infecting *Escherichia coli* from bovine mastitis

ZHANG Qian¹ ZHANGXIANG Li-Lan² SUN Yao-Qiang¹ YU Hui-Ju¹ ZHANG Pei-Sheng¹
LIU Ge¹ QU Yong-Gang^{1*} TONG Yi-Gang^{2*} LI Yan³

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

(2. Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

(3. The General Station of Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Xinjiang Production and Construction Corps, Urumqi, Xinjiang 830063, China)

Abstract: [Objective] To isolate and characterize the lytic phage from fecal samples of dairy cattle in Shihezi, Xinjiang. **[Methods]** The phage was isolated and purified from dairy cattle fecal samples by double-layer agar plate method. The purified phage was concentrated negatively stained with uranyl acetate and observed by transmission electron microscopy. Meanwhile, the genome of the isolated phage was sequenced. Its genetic and evolutionary history were analyzed. In addition, the host range, optimal multiplicity of infection (MOI), one-step growth curve, temperature and pH stability of the phage were investigated. **[Results]** One strain of phage that lysed *Escherichia coli* was isolated and named vB_EcoM_XJ2. The phage produced circular, not clear plaques with 0.7 mm–1.2 mm diameter. The electron microscope observation showed that the phage had a symmetrical Polyhedra the head and a contractile tails. The genome of the phage was comprised of double strand DNA, and the size was 75.617 kb with G+C% content of 42.09%. The homology of amino acid sequence of vB_EcoM_XJ2 was 94% with *Escherichia coli* phage NJ01 and vB_EcoP_SU10. The isolated phage was lytic to many strains of *Escherichia coli*, isolated from bovine mastitis milk samples. The phage could withstand the temperature up to 60 °C and keep stable titer under pH 5.0–11.0. The optimal MOI was 0.1, the incubation period was 15 min, the burst phase time was 95 min, and the burst size was 10.6 PFU/cell. **[Conclusion]** The newly isolated phage, named vB_EcoM_XJ2, belongs to lytic phage of Myoviridae, which shows strong capacity to adapt different environments conditions such as temperatures and acid-base values.

Keywords: Bovine mastitis, *Escherichia coli*, Lytic phage, Biological characteristics, Phylogenetic analysis

奶牛乳房炎在畜牧、兽医、食品等领域一直受到人们的广泛关注,是影响奶牛业发展及其经济效益的常见病和多发病。目前公认的引起奶牛乳房炎的主要致病菌是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、链球菌(*Streptococcus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)。大肠杆菌是引起奶牛乳房炎,特别是急性临床型奶牛乳房炎的主要病原菌^[1],由其引起的环境性乳房炎在许多国家和地区也有增多趋势^[2-4]。再者,抗生素的长期使用致使耐药菌株增多,给奶牛乳房炎的治疗带来困难^[5]。迫切需要研发新型药物,以控制耐药性病原菌引起的感染。噬菌体侵染宿主菌具有高度的特异性和高效性,当感

染宿主菌后可在宿主菌中繁殖,最终使宿主菌裂解死亡,但对于动植物基本没有副作用。噬菌体侵染宿主菌不易产生耐药性,使越来越多的研究者开始探索应用噬菌体防治细菌病的道路。研究发现,王太武^[6]克隆表达出噬菌体 LSB-1 裂解细菌相关酶 gp17 基因的纯化蛋白,能够有效抑制侵袭性大肠杆菌 8401; Jin 等^[7]对分离到的裂解性肌尾科噬菌体 ZZ1 进行了生物学特性和基因组学分析,发现其在人体正常温度下具有高度的抗菌效能,为抗菌剂的研发提供了依据;代保英^[8]针对 K88 大肠杆菌分离的噬菌体,为 K88 大肠杆菌的生物防治提供了材料和理论基础,其中宽裂解谱的 BpD 肌尾科噬菌体可

以作为生物防治幼畜腹泻的新材料,而短尾科噬菌体 BpB 丰富了人们对 K88 大肠杆菌噬菌体的认识;吕萌^[9]对分离的宽裂解谱肌尾科噬菌体 vB_EcoM-ep3 进行了基因组学和蛋白质组学方面的研究,发现其裂解酶 Lysep3 是一种全新的大肠杆菌裂解酶,为同源裂解酶的相关研究提供了重要的参考依据。基于噬菌体和奶牛乳房炎防治研究的现状,本实验以奶牛乳房炎源大肠杆菌为宿主菌,分离筛选裂解性噬菌体,研究其生物学特性,为噬菌体作为一种生物制剂用于治疗奶牛乳房细菌性感染提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和样品采集: 40 株奶牛乳房炎源大肠杆菌、2 株金黄色葡萄球菌、2 株肠球菌和 2 株沙门氏菌均由石河子大学动物传染病实验分离鉴定,奶牛粪便样品采自石河子周边 5 个奶牛场。

1.1.2 主要试剂及培养基: PEG8000 购于天津市光复精细化工研究所。SM 缓冲液: NaCl 5.8 g, MgSO₄·7H₂O 2.0 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 值为 7.5) 50 mL, 2%明胶 5 mL, 加蒸馏水定容至 1 L, 然后 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 4 °C 保存。PBS 缓冲液: NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.42 g, KH₂PO₄ 0.27 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 调节 pH 为 7.4, 然后 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 4 °C 保存。

液体 LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 酵母浸粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 加蒸馏水定容至 1 L。调节 pH 为 7.2-7.4, 然后 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 4 °C 保存。半固体 LB 培养基是在液体 LB 培养基基础上加入 0.7% (质量体积比)的琼脂。固体 LB 培养基是在液体 LB 培养基基础上加入 1.5% (质量体积比)的琼脂。

1.1.3 主要仪器: DNP-9082 电热恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; MIKRO 120 高速台式离心机, 德国 HETTICH 制造公司; Multifuge X1R 台式冷冻离心机, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; HVE-50 高压灭菌器, 日本 HIRAYAMA 公司; ZHWY-2102 双层恒温摇床, 上海智城公司;

YHC-260 医用药品保存箱, 上海天呈医流科技股份有限公司; JEM-1400 透射电子显微镜, 日本精工 (JEOL) 公司; Ion Torrent 测序仪 PGM, Life Technologies 公司。

1.2 方 法

1.2.1 宿主菌的准备: 将 40 株大肠杆菌分别接种于装有 2 mL 液体 LB 培养基的试管中, 于 37 °C、180 r/min 培养过夜, 置 4 °C 保存。

1.2.2 噬菌体的富集与分离: 参照文献[10]将采自石河子周边 5 个奶牛场的粪样混合于 1 L 的大烧杯中, 加自来水搅拌均匀, 静置 15 min, 用纱布和滤纸过滤。将所得滤液放于 4 °C 过夜。取所得滤液 200 mL 以及 40 株大肠杆菌菌悬液各 100 μL 分别加于已有 200 mL 液体 LB 培养基的锥形瓶中, 37 °C、180 r/min 振荡培养 24 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清。上清液与宿主菌各取 50 μL 混匀于试管中, 静置 15 min 后向试管中加 8-10 mL 0.7%的半固体培养基, 混匀后倒于固体培养皿中, 培养 8 h 后观察结果。

1.2.3 噬菌体的纯化与保存: 在无菌环境中用灭菌牙签挑取单个噬菌斑接种于其对应的宿主菌中, 于 LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 振荡培养 8 h, 将培养液 10 000 r/min 离心 10 min, 然后进行 10 倍比稀释, 稀释液与宿主菌混匀后双层平板法培养, 如此重复 3 次以上, 直至形成形状和大小均一的噬菌斑, 即可得到较纯的噬菌体。将噬菌体与 50%甘油等体积混匀后放于-20 °C 和-80 °C 冻存、备用。

1.2.4 噬菌体的浓缩和电镜观察: 噬菌体浓缩液的制备参照《分子克隆实验指南》第 3 版中 λ 噬菌体颗粒提取方法^[11]进行。取 20 μL 噬菌体浓缩液滴于铜网上, 自然沉淀 15 min, 用滤纸从侧面吸去多余液体, 经蒸馏水洗涤, 晾干, 加一滴 1%的醋酸双氧铀染液于铜网上染色 5 min, 用滤纸从侧面吸去染色液, 蒸馏水洗涤, 自然晾干后用电子显微镜观察噬菌体形态^[12]。

1.2.5 噬菌体全基因组测序: 将噬菌体的基因组处理为约 290 bp 的测序文库, 利用 Life Technologies

公司的 Ion Torrent 测序仪 PGM 完成,利用 Newbler 2.9 软件对基因组进行拼接处理。该部分的测序由北京军事医学科学院微生物学流行病学研究所进行。

1.2.6 噬菌体的生物学特性: 将分离纯化的裂解性大肠杆菌噬菌体进行裂解谱、最佳感染复数(MOI)、一步生长曲线、热稳定性、pH 稳定性的研究。

(1) 噬菌体裂解谱的测定:取纯化后的噬菌体原液 100 μL ,分别加入到 40 株奶牛乳房炎大肠杆菌菌悬液(50 μL)中,室温静置 15 min,采用双层平板法培养 8 h,观察结果。

(2) 噬菌体的最佳感染复数(Multiplicity of infection, MOI)的确定:目的是为产生最高子代噬菌体时所用的噬菌体与宿主菌的比值最小。1) 宿主菌浓度的测定:取宿主菌单个菌落,接于 5 mL 液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养至对数生长初期,设未接菌的液体 LB 培养基为空白对照组,即在紫外分光光度计波长为 600 nm 条件下,测定宿主菌 OD_{600} 值约为 0.2 时,作 10 倍倍比稀释,取不同梯度的稀释液 100 μL 均匀涂布于固体 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,次日计数。细菌浓度(CFU/mL)=平板上菌落数 \times 稀释倍数 \times 10。2) 噬菌体滴度的测定:取 100 μL 噬菌体原液,接种于 5 mL 对数生长期的宿主菌菌液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养至澄清,10 000 r/min 离心 10 min,取上清,10 倍连续倍比稀释。从每个梯度中取 100 μL ,通过双层平板法测定噬菌体滴度,次日观察结果并计数。噬菌体滴度(PFU/mL)=噬斑数 \times 稀释倍数 \times 10。3) 按照感染复数分别为 0.001、0.01、0.1、1、10、100 的比例将噬菌体液和宿主菌菌液混合,静置 15 min,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀分别用 3 mL 的液体 LB 培养基重悬,使不同比例的培养体系总体积一致。37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 5 h,10 000 r/min 离心 10 min,取上清,做 10 倍倍比稀释。利用双层平板法对噬菌体增殖液进行滴度测定,获得最高滴度的噬菌体/细菌比例即为最

佳 MOI。

(3) 一步生长曲线测定:将培养至对数生长期的大肠杆菌 50 μL 与噬菌体按照最佳 MOI 的比例混匀,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 15 min,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,将所得沉淀重悬于 3 mL 的液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养,每隔 5、10 min 各取样 6 次,每隔 20 min 取样 3 次,测定噬菌体的滴度,从而绘制噬菌体感染宿主菌的一步生长曲线。

(4) 热稳定性测定:将已知滴度的噬菌体液等体积分装若干,分别在 40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养,在 0、20、40、60、80、100、120、140、160、180 min 分别取样,倒板。通过观察噬菌斑的形成情况,可得出在不同温度下、不同时间段内噬菌体的滴度,并绘制曲线。

(5) pH 稳定性测试:用浓盐酸(1 mol/L)、氢氧化钠溶液(1 mol/L)调 pH (pH 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、12.0)后的 PBS 缓冲液高压灭菌,取 100 μL 噬菌体分别加到 900 μL 不同 pH 的 PBS 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 2 h,10 倍倍比稀释后测定其滴度,绘制曲线,观察不同 pH 处理后噬菌体的生长情况。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的分离、纯化

以 40 株奶牛乳房炎源大肠杆菌为宿主菌,采用双层平板法反复纯化噬菌斑 3-4 次,直至所得噬菌斑形态、大小均一致,即为纯化的噬菌体。本试验所得的 1 株裂解性噬菌体,其噬菌斑形态和大小见图 1,噬菌斑圆形不透亮,有晕环但边缘整齐,将此噬菌体命名为 vB_EcoM_XJ2。

2.2 噬菌体裂解谱的测定

对该株裂解性大肠杆菌噬菌体进行裂解谱的测定,结果表明其可裂解 19 株奶牛乳房炎源大肠杆菌,但对金黄色葡萄球菌、肠球菌和沙门氏菌均无裂解能力(表 1)。

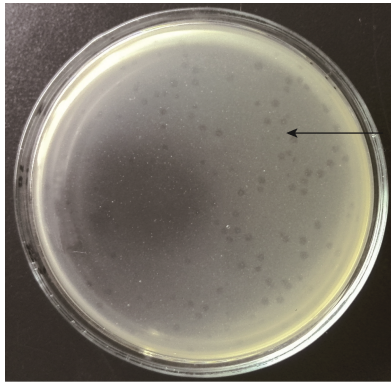


图1 双层平板法纯化噬菌体

Figure 1 Purified phage by double-layer agar plate method

2.3 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 的生物学特性

2.3.1 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 的最佳感染复数 (MOI)测定: 图 2 结果表明 vB_EcoM_XJ2 的最佳 MOI 为 0.1, 此时产生的子代噬菌体数量最多。在后续的生物特性研究中均以最佳 MOI 扩增。

2.3.2 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 的一步生长曲线测定: 从一步生长曲线中(图 3)可以看出, vB_EcoM_XJ2 感染宿主菌 15 min 内, 噬菌体的数量基本没有增

加, 这段时间被称为噬菌体的潜伏期; 感染后 15–110 min 这段时间噬菌体的数量急剧增加, 这段时间称为暴发期; 之后噬菌体的数量基本保持平衡。测得的 vB_EcoM_XJ2 噬菌体的潜伏期是 15 min, 暴发期是 95 min, 裂解量约为 10.6 PFU/cell, 此噬菌体的增殖能力较弱。

2.3.3 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 的热稳定性测定: 不同的噬菌体对温度的耐受性也会有所不同, vB_EcoM_XJ2 对温度的耐受结果(图 4)表明, 随温度的升高和处理时间的延长, 噬菌体的存活率逐渐降低。在室温至 50 °C 条件下, 噬菌体基本可以保持其原活性; 在 60 °C 条件下, 滴度开始下降, 但不明显, 60 °C 作用 2 h 后滴度开始有明显降低的趋势; 70 °C 条件下作用 40 min, 噬菌体全部失活。

2.3.4 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 的 pH 稳定性测定: 从图 5 可以看出, 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 经不同 pH 处理 2 h 后, pH 小于 5.0 时噬菌体失活, 而 pH 在 5.0–11.0 时酸碱度对噬菌体的影响不大, 且当 pH 为 9.0 时噬菌体活性最好。此结果表明该噬菌体具有很强的耐碱性。

表 1 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 对 46 株临床分离菌株的灵敏度

Table 1 The sensitivity of phage vB_EcoM_XJ2 to 46 strains of clinical isolates

菌株	敏感性	菌株	敏感性	菌株	敏感性	菌株	敏感性
Bacterial strains	Sensitivity	Bacterial strains	Sensitivity	Bacterial strains	Sensitivity	Bacterial strains	Sensitivity
<i>E. coli</i> 01	+	<i>E. coli</i> 13	+	<i>E. coli</i> 25	–	<i>E. coli</i> 37	–
<i>E. coli</i> 02	+	<i>E. coli</i> 14	+	<i>E. coli</i> 26	–	<i>E. coli</i> 38	–
<i>E. coli</i> 03	–	<i>E. coli</i> 15	+	<i>E. coli</i> 27	–	<i>E. coli</i> 39	–
<i>E. coli</i> 04	+	<i>E. coli</i> 16	+	<i>E. coli</i> 28	–	<i>E. coli</i> 40	–
<i>E. coli</i> 05	+	<i>E. coli</i> 17	+	<i>E. coli</i> 29	–	<i>S. aureus</i> 01	–
<i>E. coli</i> 06	–	<i>E. coli</i> 18	+	<i>E. coli</i> 30	–	<i>S. aureus</i> 02	–
<i>E. coli</i> 07	+	<i>E. coli</i> 19	+	<i>E. coli</i> 31	–	<i>Enterococcus</i> 01	–
<i>E. coli</i> 08	+	<i>E. coli</i> 20	+	<i>E. coli</i> 32	–	<i>Enterococcus</i> 02	–
<i>E. coli</i> 09	+	<i>E. coli</i> 21	+	<i>E. coli</i> 33	–	<i>Salmonella</i> 01	–
<i>E. coli</i> 10	–	<i>E. coli</i> 22	–	<i>E. coli</i> 34	–	<i>Salmonella</i> 02	–
<i>E. coli</i> 11	+	<i>E. coli</i> 23	–	<i>E. coli</i> 35	–		
<i>E. coli</i> 12	+	<i>E. coli</i> 24	–	<i>E. coli</i> 36	–		

注: +: 裂解; -: 不裂解。

Note: +: Lytic; -: Not lytic.

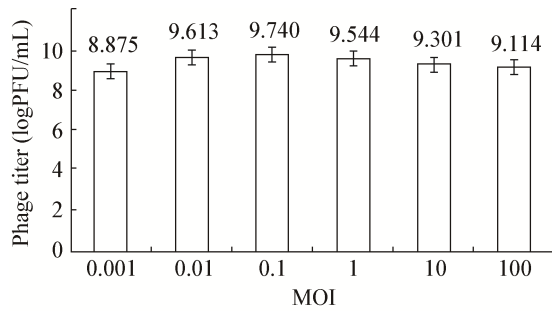


图2 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 的最佳 MOI 测定
Figure 2 Determination of optimal multiplicity of infection for phage vB_EcoM_XJ2

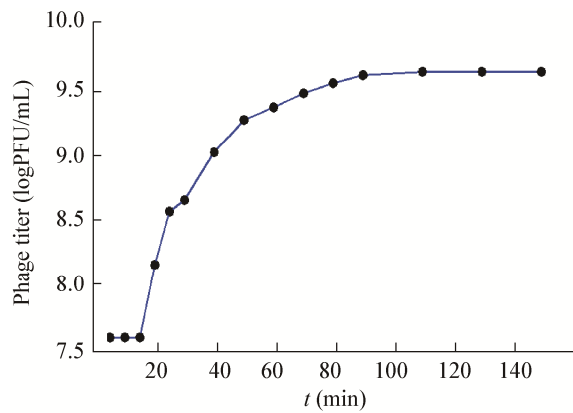


图3 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 的一步生长曲线
Figure 3 One-step growth curve of phage vB_EcoM_XJ2

2.4 噬菌体的电镜观察

纯化的噬菌体浓缩液经负染后,用透射电子显微镜观察。如图6所示,噬菌体 vB_EcoM_XJ2 扁长头且有收缩尾,头长约 104.8 nm×128.6 nm,尾长约 9.5 nm×128.6 nm。根据 2011 年国际病毒分类委员会第 9 次报告提出的噬菌体分类与命名标准,该

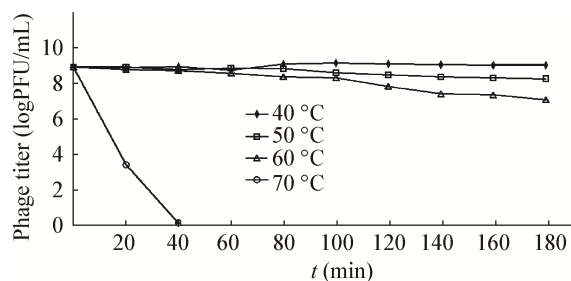


图4 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 的热稳定性测定
Figure 4 Determination of thermal stability of phage vB_EcoM_XJ2

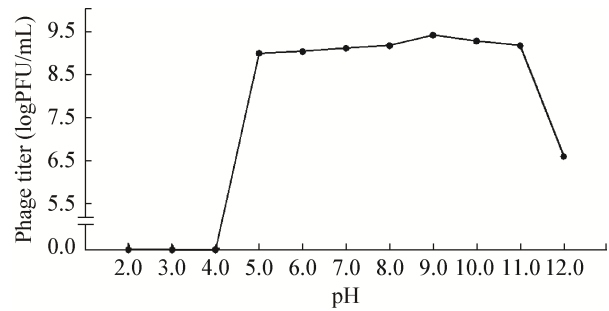


图5 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 的 pH 稳定性测定
Figure 5 Determination of pH stability of phage vB_EcoM_XJ2

噬菌体符合有尾噬菌体目(Caudovirales)肌尾噬菌体科(Myoviridae)的特征^[13]。

2.5 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 全基因组测序

测序结果表明,噬菌体 vB_EcoM_XJ2 基因组全长为 75 617 bp, G+C%含量为 42.09%。与 NCBI 上已公布的近缘噬菌体的全基因组进行比对,得知 vB_EcoM_XJ2 与大肠杆菌噬菌体 NJ01 和 vB_EcoP_SU10 的相似性高达 94%,但进化分析发现它们的亲缘关系较远(图 7),大肠杆菌噬菌体 NJ01 和 vB_EcoP_SU10 都是 C3-like 噬菌体中短尾噬菌体科家族中的一员,而由电镜观察可知 vB_EcoM_XJ2 是肌尾噬菌体科中的一员。

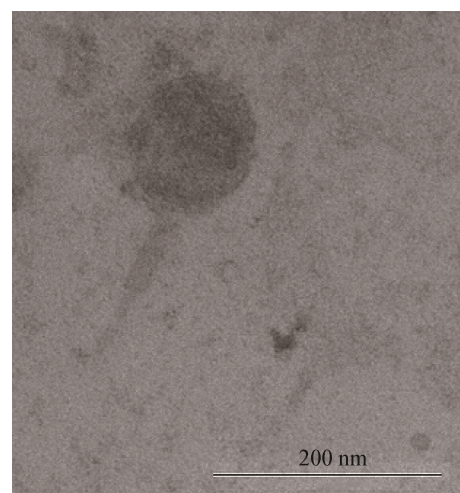


图6 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 的电镜照片
Figure 6 Electron micrograph of phage vB_EcoM_XJ2

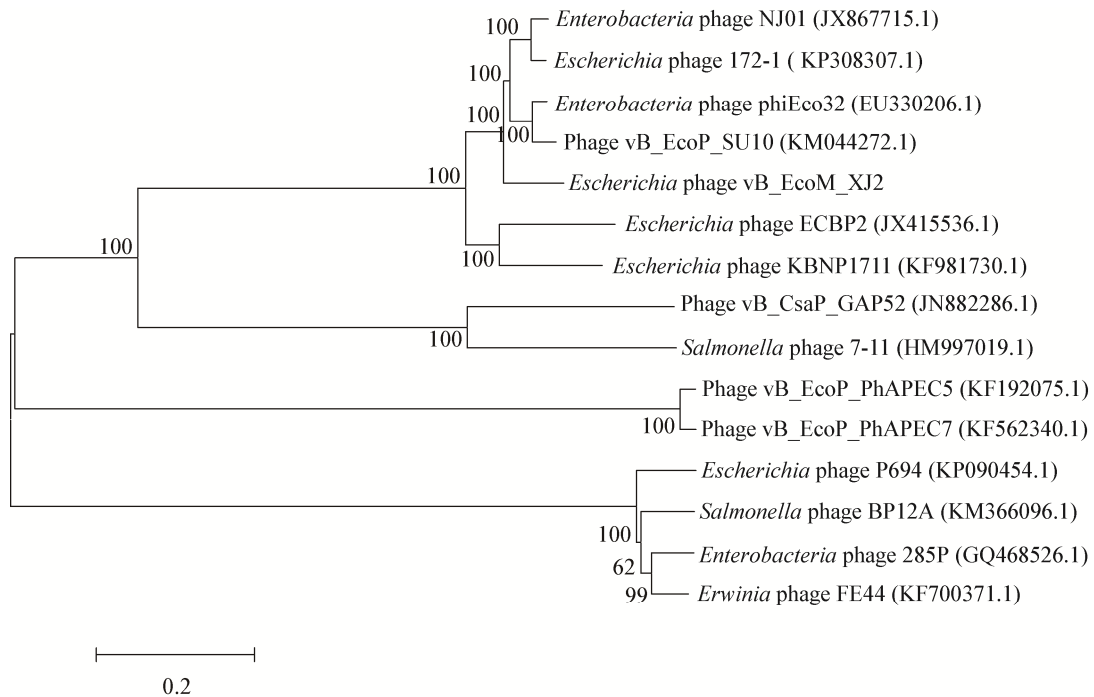


图7 噬菌体 vB_EcoM_XJ2 系统发育分析

Figure 7 Phylogenetic analysis of phage vB_EcoM_XJ2

注: 进化树利用 MEGA 5.2 软件中的 Neighbour-Joining 法构建; 分支上的数字是在 1 000 次重复后获得的置信值. 比例尺对应于每 0.005 个核苷酸.

Note: The tree was constructed with the MEGA 5.2 program using neighbour-joining cluster algorithm. Numbers at the branches are bootstrap confidence values obtained after 1 000 replicates. The scale bar corresponds to 0.005 substitution per nucleotide position.

3 结论与讨论

噬菌体广泛分布于自然界, 资源充足, 凡是有细菌生长的地方就会有与之相对应的噬菌体存在。与抗生素相比, 获得噬菌体相对容易, 本试验是从奶牛粪样中分离裂解性奶牛乳房炎源大肠杆菌噬菌体。通过裂解本实验室保存的菌株可知, 此株噬菌体目前只能裂解大肠杆菌, 而对金黄色葡萄球菌、肠球菌和沙门氏菌均无裂解能力。

本实验分离得到的 vB_EcoM_XJ2 噬菌体属于有尾噬菌体目肌尾噬菌体科的裂解性 dsDNA 噬菌体; 具有较好的耐热性及耐碱性, 能耐受 60 °C 左右的高温, 而且在 pH 5.0–11.0 时噬菌体的活性基本不变; 结合核苷酸序列同源性比对和系统发育树分析得知, vB_EcoM_XJ2 与已报道的 C3-like 噬菌体中的短尾噬菌体科噬菌体 NJ01 和 vB_EcoP_U10 虽相似性较高, 但亲缘性较远。该噬菌体的获得丰富

了研究者们对 C3-like 噬菌体的认识。就目前已报道的大肠杆菌噬菌体而言, vB_EcoM_XJ2 的裂解量较低^[14], 而与代保英^[8]分离的 BpD 相比, vB_EcoM_XJ2 对 pH 和温度的耐受范围广, 是一株裂解周期长但生物学特性好的肌尾科噬菌体。

由于奶牛乳房炎病因复杂, 乳腺生理结构特殊, 目前尚无高效的奶牛乳房炎疫苗, 传统治疗手段如抗生素疗法会带来诸如食品安全等问题, 因此研究和研发相关的新型基因工程疫苗具有重要的科研和实践意义, 也是防治奶牛乳房炎发生的必然趋势。同时, 在耐药菌株日益增加的今天, 裂解性噬菌体的获得为防治大肠杆菌性奶牛乳房炎带来了新的希望。

参考文献

- [1] Müştak HK, Günaydin E, Kaya İB, et al. Phylo-typing of clinical *Escherichia coli* isolates originating from bovine mastitis and canine pyometra and urinary tract infection by means of

- quadruplex PCR[J]. Veterinary Quarterly, 2015, 35(4): 194-199
- [2] Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, et al. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors[J]. Veterinary Research, 2003, 34(5): 521-564
- [3] Green MJ, Green LE, Bradley AJ, et al. Prevalence and associations between bacterial isolates from dry mammary glands of dairy cows[J]. Veterinary Record, 2005, 156(3): 71-77
- [4] Sumathi BR, Krishnappa ARGaG. Antibiogram profile based dendrogram analysis of *Escherichia coli* serotypes isolated from bovine mastitis[J]. Veterinary World, 2008, 1(2): 37-39
- [5] Mainali C, McFall M, King R, et al. Evaluation of antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates of broiler chickens at slaughter in Alberta Canada[J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(12): 2045-2051
- [6] Wang TW. Cloning, expression, anti-bacteria effects analysis and optimizing design prediction of bacteriophage LSB-1 lyase gene gp17 in *E. coli*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Third Military Medical University, 2014 (in Chinese)
王太武. 大肠杆菌噬菌体 LSB-1 裂解酶基因 gp17 的表达、抗菌效应分析及优化设计预测[D]. 重庆: 第三军医大学硕士学位论文, 2014
- [7] Jin J, Li ZJ, Wang SW, et al. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. BMC Microbiology, 2012, 12: 156
- [8] Dai BY. Isolation, identification and biological properties of the bacteriophages for *E. coli* K88[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2009 (in Chinese)
代保英. 大肠杆菌 K88 噬菌体的分离、分类初步鉴定和生物学特性的测定[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2009
- [9] Lü M. Genome sequencing of an *Escherichia coli* bacteriophage with novel lysin and activity detection of its lysin[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2015 (in Chinese)
吕萌. 一株含新裂解酶的大肠杆菌噬菌体基因组测序及其裂解酶的活性检测[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2015
- [10] Jamalludeen N, Johnson RP, Friendship R, et al. Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 124(1/2): 47-57
- [11] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Translated by Huang PT. 3rd Edition. Beijing: Science Press, 2002: 185-198 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 185-198
- [12] Yu JD. Isolation, characterization and biological features of lytic bacteriophages infecting *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2013 (in Chinese)
余静丹. 鲍曼不动杆菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性的研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2013
- [13] Feng Y, Liu J, Sun Y, et al. An introduction to current classification and nomenclature of bacterial viruses[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2013, 33(12): 1954-1958
冯焯, 刘军, 孙洋, 等. 噬菌体最新分类与命名[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(12): 1954-1958
- [14] Wang R, Han H, Zhang H, et al. Isolation and characterization of a lytic bacteriophage of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2012, 27(4): 163-167 (in Chinese)
王冉, 韩晗, 张辉, 等. 大肠杆菌 K88 噬菌体的分离鉴定及其生物学特性[J]. 华北农学报, 2012, 27(4): 163-167