

大肠杆菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性分析

王海磊,陈景超,鲁欣欣

(河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007)

摘要:利用野生型大肠杆菌 MG1655 为宿主菌,从下水道污水中分离得到一株噬菌体,编号为 Phage 1.其噬菌斑大小为 3~4 mm,透射电镜观察发现该噬菌体有正多面体头部和弯曲尾部,属于长尾科噬菌体.对该噬菌体的生物学特性包括最佳感染复数、一步生长曲线、温度、氯仿、pH 进行检测,结果显示该噬菌体的潜伏期为 10 min,繁殖周期为 20 min,对温度、氯仿以及 pH 耐受性良好.经基因组测序鉴定,该噬菌体为 *E. coli* T1 噬菌体.

关键词:大肠杆菌;噬菌体;分离鉴定;噬菌斑

中图分类号:Q938.8

文献标志码:A

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)俗称大肠杆菌,广泛存在于恒温动物肠道内^[1].*E. coli* 于 1885 年被德国细菌学家 Escherich 分离出来,在之后很长一段时间内被认为是肠道内的一种共生细菌,不仅不致病,反而有助于食物消化和吸收^[2].20 世纪 40 年代,人们渐渐发现 *E. coli* 有多个亚种,某些血清型的菌株对人和动物有致病性,感染后人和动物会表现出呕吐、腹泻等症状^[3-4].

噬菌体是环境中存在的能感染细菌的病毒,可在宿主菌体内大量繁殖,最终引起宿主菌裂解死亡.噬菌体最初被广泛运用于病原菌感染治疗及抑制体外环境中病原菌的生长^[5-6].19 世纪 40 年代后,随着抗生素被发现并得到广泛应用,噬菌体由于其宿主特异性强且不能在体外呈现较好的杀菌效果而逐渐被抛弃.然而近些年来,抗生素产品的大量应用,导致细菌耐药性问题日益突出.人们意识到利用抗生素进行抗菌治疗的巨大安全隐患,噬菌体疗法又被重新重视.因此,获得大量可利用的噬菌体资源成为研究人员关注的热点.噬菌体广泛存在于环境中^[7-10],理论上讲,微生物富集的地方都有其相对应的噬菌体,而且其数量与宿主菌的数量成正比.对于 *E. coli* 噬菌体而言,在养殖废水和生活废水中含量最为丰富.

虽然 *E. coli* 数量及种类非常丰富,可是能应用于实际研究的噬菌体却相对较少,为了获得更多的 *E. coli* 噬菌体,以丰富 *E. coli* 噬菌体资源库^[11].本实验利用 *E. coli* MG1655 为宿主菌,从河南新乡下水道污水中进行噬菌体的分离.经过连续筛选,得到一株对 *E. coli* MG1655 具有侵染性的烈性噬菌体.本文研究了该噬菌体的形态特征,以及其对温度、pH、氯仿的敏感性,并利用基因组测序技术对其进行鉴定.本实验获得的噬菌体丰富了 *E. coli* 噬菌体资源库,为该噬菌体的进一步应用奠定基础.

1 材料与方法

1.1 菌种

菌种:*E. coli* MG1655 由功能微生物绿色转化技术河南省工程实验室保藏.

1.2 培养基与缓冲液

LB 固体培养基:酵母粉 5.0 g · L⁻¹,蛋白胨 10.0 g · L⁻¹,NaCl 10.0 g · L⁻¹,琼脂 20.0 g · L⁻¹,调 pH 至 7.0.LB 软琼脂培养基中琼脂质量浓度为 6.0 g · L⁻¹.

收稿日期:2018-09-18;修回日期:2019-01-10.

基金项目:国家自然科学基金(U160411067)

作者简介(通信作者):王海磊(1978-),男,河南睢县人,河南师范大学特聘教授,博士,从事应用与资源微生物方面的研究,E-mail:whl@htu.cn.

SM 缓冲液: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 明胶 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $5.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入 50 mM Tris-HCl(pH 7.5).

DNaseI 和 Rnase 均购自北京索莱宝生物科技有限公司.

1.3 实验方法

1.3.1 噬菌体的分离筛选

取 *E. coli* MG1655 菌种, 在 LB 固体平板上反复纯化. 将单菌落接种于液体 LB 中, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床中 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 震荡培养 12 h , 得到菌悬液. 取下水道污水, 用无菌纱布过滤, 将滤过液用 $5 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜除去真菌等物质. 将过滤后污水倾倒入 250 mL 无菌的三角瓶中(三角瓶中预存有 30 mL $2 \times \text{LB}$ 培养液), 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 培养 $5 \sim 6 \text{ h}$. 将培养瓶中的液体于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $8\,000 \times g$ 离心 10 min , 上清用 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤于无菌容器中. 取多个含有 5 mL LB 培养液的试管, 将 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 过夜生长的 *E. coli* 菌悬液接种于试管中, 待试管中菌液浑浊后, 在每个试管中接种 1 mL 过滤液, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行震荡培养 $3 \sim 4 \text{ h}$ 后, 比较试管中菌液的浑浊程度, 选取浑浊程度较轻的培养液, $8\,000 \times g$ 离心 10 min , 上清再经过 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜去除菌体. 取滤过液 $200 \text{ }\mu\text{L}$, 与 $200 \text{ }\mu\text{L}$ *E. coli* 菌悬液混匀. 然后加入到 LB 软琼脂中($48 \text{ }^\circ\text{C}$), 迅速混匀后将软琼脂倒入含有 LB 固体培养基的培养皿中. 待琼脂凝固, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置过夜, 观察是否有噬菌斑出现.

取新鲜肉眼可见浑浊的 *E. coli* 菌液 $300 \text{ }\mu\text{L}$, 于 1.5 mL 无菌离心管中, 然后用无菌牙签挑取培养皿上疑似噬菌斑, 并在上述离心管中搅拌混匀. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温浴 20 min , 将该混合物加入到保温的 LB 软琼脂中($48 \text{ }^\circ\text{C}$), 摇晃均匀后将软琼脂倒入含有 LB 固体培养基的培养皿中, 观察是否有噬菌斑

1.3.2 噬菌体纯化与效价测定

取 1 mL SM 溶液于 1.5 mL 无菌离心管中, 用无菌牙签挑取噬菌斑在上述离心管中搅拌混合, 然后做梯度稀释. 选取 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 个稀释度样品各 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 加入到 1.5 mL 无菌离心管中, 再加入新鲜肉眼可见浑浊菌液并混匀, 取 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 混合物加入到软琼脂中, 并将软琼脂倒入含有 LB 固体培养基的培养皿中. 重复上述步骤 $3 \sim 4$ 次, 当平板上噬菌斑大小一致时, 则认为该噬菌体为纯培养.

用无菌 SM 溶液梯度稀释噬菌体悬液, 取合适梯度稀释液 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 与 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 新鲜肉眼可见浑浊 *E. coli* 菌液进行充分混匀. 将上述混合液 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 加入至 6 mL LB 软琼脂中, 快速充分混匀后立即将之倒入到铺有 LB 固体培养基的培养皿上, 待软琼脂凝固后, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置过夜. 噬菌体效价计算公式为:

噬菌体效价(pfu/mL) = 平均噬菌斑数目 \times 稀释倍数 $\times 10$

1.3.3 噬菌体悬液的制备

参照《分子克隆实验指南》^[12]中“液体裂解法制备 λ 噬菌体原种”进行. 挑取 *E. coli* 单菌落于 5 mL LB 液体中过夜培养. 然后按照 1% 的接种比进行接种. 待其 $OD_{600} = 0.5$ 时, 向培养液中加入高效价的噬菌体原液($10^{11} \text{ pfu} \cdot \text{mL}^{-1}$), 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养. 待液体澄清后, $12\,000 \times g$ 离心 20 min 去除细菌. 然后加入 DNaseI(10.0 mM) 和 Rnase (10.0 mM), 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min , 并加入 NaCl (1.0 M), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h , 之后加入 PEG 8000, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, $12\,000 \times g$ 离心 20 min 并收集沉淀, 用 SM 缓冲液重悬沉淀, 并用等体积氯仿去除 PEG 8000 及残余细胞碎片, 即得到噬菌体悬液.

1.3.4 噬菌体的透射电镜观察

取噬菌体悬液 $10 \text{ }\mu\text{L}$ 于 Parafilm 上, 然后将覆盖有 Formavar 膜的铜网放置在噬菌体悬液上, 静置 30 min , 用吸水纸吸去多余的液体. 然后再用 2% 的磷钨酸负染色 10 min , 干燥后于透射电子显微镜 (HT7700, 日立高新技术公司) 下观察.

1.3.5 最佳感染复数 (Multiplicity of infection, MOI)

将 *E. coli* 菌液培养至 $OD_{600} = 0.6$, 分别取 $200 \text{ }\mu\text{L}$ *E. coli* 菌悬液与 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 稀释好的不同浓度的噬菌体悬液进行充分混合, 使其 MOI 为 0.001 , 0.01 , 0.1 , 1 和 10 . 从混合液中取出 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 加入到 LB 液体中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 3 h , $13\,000 \times g$ 离心 3 min , 取上清做梯度稀释并测定效价.

1.3.6 噬菌体的一步生长曲线

噬菌体悬液与 *E. coli* 菌液按照最佳感染复数混合,于 37 °C 静置 15 min,使充分吸附。10 000×g 离心 3 min 后弃上清,用 SM 缓冲液清洗沉淀 2 次。将重悬液加入到 100 mL LB 液体培养基中,37 °C,180 r·min⁻¹ 培养。分别在 5 min,10 min,20 min,25 min,30 min,35 min,60 min,90 min 时取样,样品离心后取上清测定效价。

1.3.7 对温度的敏感性检测

分别取 200 μL 噬菌体悬液(10⁸ pfu·mL⁻¹)于 1.5 mL 无菌离心管中,将之分别放到 45 °C,60 °C,75 °C,90 °C 水浴锅中进行处理,分别在 10 min,20 min 两个时间点取样并迅速放到冰上,对样品梯度稀释后测定效价。

1.3.8 对氯仿的敏感性检测

向噬菌体悬液中加入氯仿使其终体积分数分别为 1%,3%,5%,10%和 15%,37 °C,160 r·min⁻¹ 震荡 20 min。然后 4 °C,10 000×g 离心 2 min 取上清。将上清进行梯度稀释后测定效价。

1.3.9 对 pH 敏感性检测

分别取 100 μL 噬菌体稀释液于无菌 1.5 mL 离心管中,然后再向离心管中加入 800 μL 的无菌水,并用 HCl 和 NaOH 将 pH 调节到 2,3,4,5,6,7,8,9 和 10。最后定容至 1 mL,4 °C 静置 30 min 后,进行梯度稀释测定效价。

1.4 噬菌体的测序与鉴定

噬菌体 DNA 根据 Green 等人的方法进行抽提^[13],基因组测序由杭州联川生物技术股份有限公司进行测定,测序平台为 Hiseq (PE250)。测序后利用 MEGA 7.0.14 软件进行噬菌体进化树的构建。

2 结果与讨论

2.1 *E. coli* 噬菌体的分离与纯化

噬菌体在宿主菌数量丰富的环境中容易富集。对于 *E. coli* 而言,其在动物粪便污染的水体中数量最多。本实验通过对下水道污水与 *E. coli* MG1655 的共培养,发现在平板上有透明噬菌斑,反复纯化后得到纯的噬菌体,编号为 Phage 1。当以 *E. coli* MG1655 为宿主菌时,Phage 1 噬菌斑呈圆形,边缘清晰,直径大小为 3~4 mm。

2.2 噬菌体的透射电镜观察

由于噬菌体体型小,因此常采用透射电镜观察其形态。国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses,ICTV)在 2000 年颁布标准将噬菌体分为长尾噬菌体科(Siphoviridae),短尾噬菌体科(Podoviridae),微小噬菌体科(Microviridae),丝状噬菌体科(Inoviridae)等 13 个科。Phage 1 由头部和尾部组成,头部是典型的多面体结构,直径大小约为 60 nm,有一个可弯曲的长尾,长度大约为 140 nm,尾部未见尾丝结构(图 2)。按照 ICTV 分类标准,Phage 1 属于有尾噬菌体目(Caudovirales)中的长尾噬菌体科(Siphoviridae)。

2.3 MOI 测定

当噬菌体与宿主菌之间的比例不同时,会对子代噬菌体的产生有较大的影响。噬菌体相关研究过程中,通常需要得到高效价的噬菌体悬液,所以研究噬菌体与宿主菌间的比例,有利于制备高效价的噬菌体悬液。MOI 是研究噬菌体感染量和子代噬菌体得率的一个指标,不同种类的噬菌体的最佳 MOI 不同。本实验对分离得到的 Phage 1 的最佳 MOI 进行测定,结果发现 MOI 为 0.001 时,7 h 后产生的子代噬菌体效价最高,为 4.65×10¹⁰ pfu·mL⁻¹(表 1)。因此,噬菌体 Phage 1 的最佳感染复数是 0.001。

2.4 一步生长曲线

噬菌体增殖过程一般会经历吸附、核酸注入、合成、组装、以及裂解释放 5 个阶段^[14],其增殖方式可用一

步生长曲线描述.图3清晰地显示了噬菌体的潜伏期、裂解期及裂解量.Phage 1的潜伏期大约为10 min,繁殖周期约为20 min.

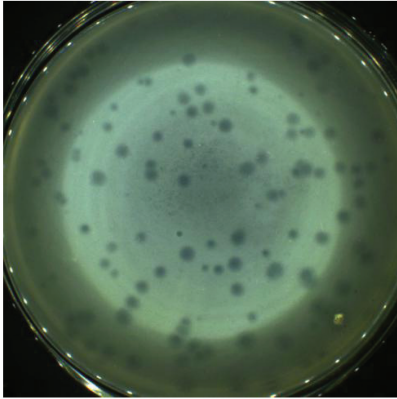


图1 噬菌体 Phage 1 的噬菌斑

Fig.1 Plaque of phage 1

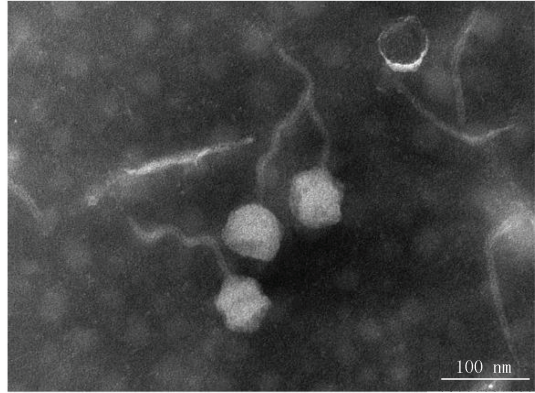


图2 噬菌体透射电镜图片

Fig.2 Transmission electron microscopy image of Phage 1

表1 不同感染复数下噬菌体效价

Tab.1 The phage titer under different MOIs

编号	<i>E. coli</i> 浓度/(cfu · mL ⁻¹)	噬菌体效价/(pfu · mL ⁻¹)	MOI	7 h 后效价/(pfu · mL ⁻¹)
1	10 ⁸	10 ⁵	0.001	4.65 × 10 ¹⁰
2	10 ⁸	10 ⁶	0.010	8.00 × 10 ⁹
3	10 ⁸	10 ⁷	0.100	7.00 × 10 ⁹
4	10 ⁸	10 ⁸	1.000	4.50 × 10 ⁹
5	10 ⁸	10 ⁹	10.000	2.00 × 10 ⁹

2.5 噬菌体对温度的敏感性

噬菌体由蛋白及核酸组成,蛋白在高温状态下易发生变性,所以噬菌体活性往往受温度影响.由于组成不同噬菌体的结构蛋白不同,故其对温度的敏感程度也不一致.如胎儿弧菌(*Campylobacter fetus*)噬菌体 V-45在60 °C处理10 min会完全失活^[15],而嗜热芽孢杆菌(*Bacillus alcalophilus*)噬菌体在103 °C的高温下才会被彻底灭活^[16].本实验研究了 Phage 1 对温度的耐受性.当温度从45 °C上升到60 °C时,效价仅降低1个数量级(图4),说明其具有一定的温度耐受性.60 °C后,虽然噬菌体的效价随着温度的升高急剧下降,但并没有彻底失活.当环境温度为90 °C时,噬菌体仍有一定的效价.此外,同一温度下不同处理时间对效价也有一定的影响,在每个温度下,相比于处理10 min而言,处理20 min时噬菌体效价会降低0.5~2.0个数量级.

2.6 对 pH 的耐受性

pH 过大或者过小都会一定程度上引起噬菌体失活,而 pH 引起噬菌体失活的理论尚不成熟,主要有以下几种观点:1.噬菌体核酸在注入细菌环节容易受到 pH 的干扰;2.pH 会干扰噬菌体对感染宿主细胞的裂解;3.当 pH 接近噬菌体的等电点时,噬菌体会形成凝聚体,从而导致效价降低^[17].本实验测定了 pH 对噬菌体的影响(图5),发现随着 pH 的改变,效价波动范围较小,因此该噬菌体具有较好的 pH 耐受性.

2.7 对氯仿的敏感性

噬菌体的外壳蛋白质暴露于有机溶剂会变性失活,氯仿是常用的有机溶剂,其与蛋白质的羟基结合,能破坏蛋白质的结构从而使噬菌体变性.本实验将 Phage 1 暴露于不同氯仿浓度下,检测氯仿对噬菌体的影响.图6显示当氯仿浓度增大,噬菌体的效价降低幅度不大.当氯仿终浓度从1%增大到15%时,效价仅仅降低

两个数量级,说明噬菌体对氯仿具有较好的耐受性.

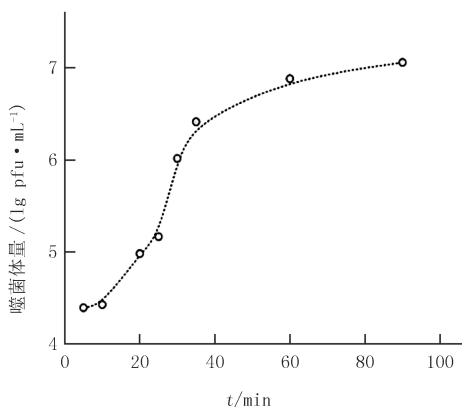


图3 噬菌体一步生长曲线

Fig.3 One-step growth curve of Phage 1

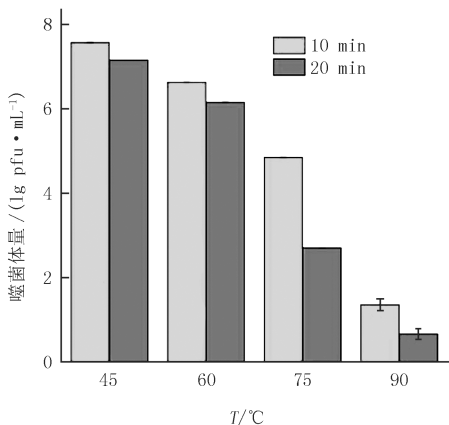


图4 不同温度下噬菌体对温度敏感性

Fig.4 Sensitivity of Phage 1 to temperature

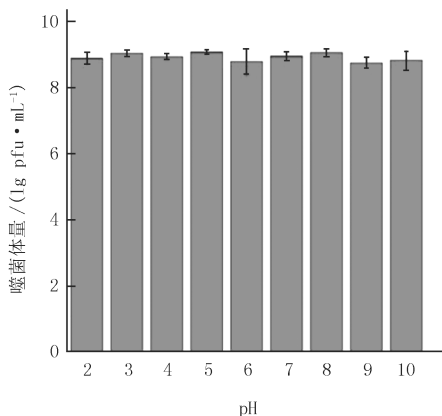


图5 噬菌体对 pH 的敏感性

Fig.5 Sensitivity of Phage 1 to pH

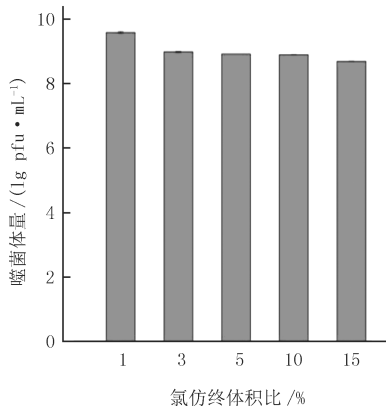


图6 噬菌体对氯仿的敏感性曲线

Fig.6 Sensitivity of Phage 1 to chloroform

2.8 基因组测序及鉴定

对 Phage 1 进行基因组测序,发现该噬菌体基因组大小为 48 737 bp,GC 含量为 46.13%.基因总长度 44 004 bp,平均长度 611 bp.共包含 72 个基因,包括头部蛋白前体物、衣壳粒及尾部蛋白、核酸内切酶、解螺旋酶等,涉及噬菌体的头部、尾部结构及 DNA 的复制、转录、修复等功能.噬菌体的基因组数据存储在 NCBI 数据库,注册号为 PRJNA494624.利用 blast 及 MEGA7.0.14 软件在 NCBI 数据库中进行比对和聚类分析,发现该噬菌体和 *E. coli* T1 噬菌体完整基因组 (AY216660.1) 的相似性为 99%,因此,该噬菌体被鉴定为 *E. coli* T1 噬菌体.其系统进化树如图 7 所示.

3 结论

本实验从下水道污水中成功分离到一株噬菌体 Phage 1.其噬菌斑大小为 3~4 mm,呈圆形,最佳感染复数为 0.001.一步生长曲线揭示其潜伏期约为 10 min,繁殖周期为 20 min.该噬菌体由正多面体的头部及长尾部组成,尾部可弯曲.噬菌体的生理生化检测发现该噬菌体对温度、氯仿以及 pH 均有良好的耐受性.基因组测序分析鉴定出该噬菌体为 *E. coli* T1 噬菌体.

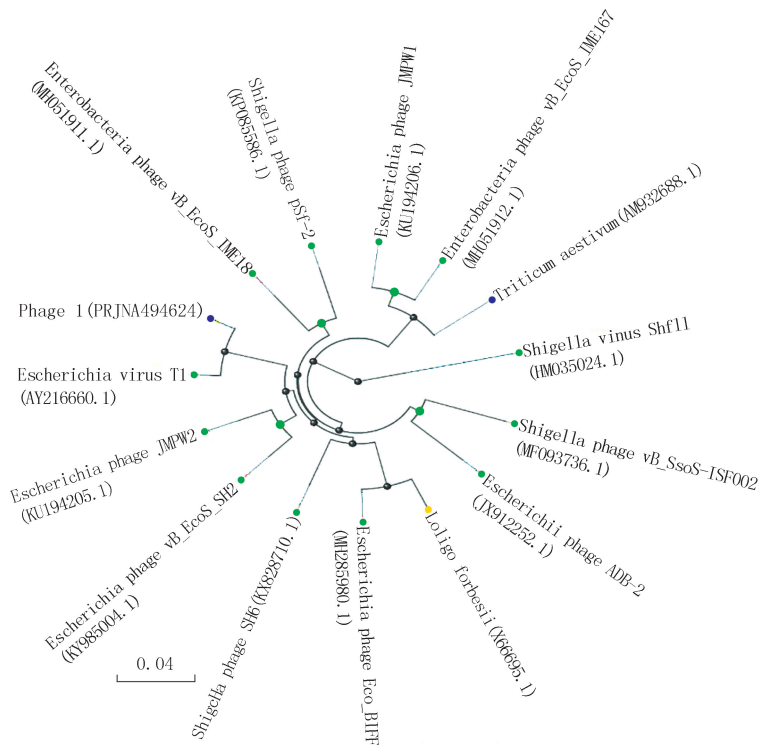


图7 Phage 1的系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree of Phage 1

参 考 文 献

- [1] Hudault S, Guignot J, Servin A L. Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection[J]. Gut, 2001, 49(1): 47-55.
- [2] Kosek M, Bern C, Guerrant R L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000[J]. Bull World Health Organ, 2003, 81(3): 197-204.
- [3] Singleton P. Bacteria in biology, biotechnology and medicine[J]. J Hospital Infection, 1999, 34(4): 409-410.
- [4] Orskov I, Orskov F, Jann B, et al. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli[J]. Bacteriol Rev, 1977, 41(3): 667-710.
- [5] Fessehaie A, Walcott R R. Biological control to protect watermelon blossoms and seed from infection by Acidovorax avenae subsp. citrulli[J]. Phytopathology, 2005, 95(4): 413-419.
- [6] Abedon S T, Kuhl S J, Blasdel B G, et al. Phage treatment of human infections[J]. Bacteriophage, 2011, 1(2): 66-85.
- [7] Nakai T, Park S C. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture[J]. Res Microbiol, 2002, 153(1): 13-18.
- [8] Park S C, Shimamura I, Fukunaga M, et al. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, Pseudomonas plecoglossicida, as a candidate for disease control[J]. Appl Environ Microb, 2000, 66(4): 1416-1422.
- [9] Momol T, Jones J, Olson S, et al. Integrated management of bacterial spot on tomato in Florida[J]. J Bacteriol, 2002, 192(24): 6346-6351.
- [10] Abuladze T, Li M, Menetrez M Y, et al. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by Escherichia coli O157:H7[J]. Appl Environ Microb, 2008, 74(20): 6230-6238.
- [11] 杜崇涛. 大肠杆菌 O157 噬菌体的分离鉴定及其初步应用[D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [13] Green MR, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [14] Labrie S J, Samson J E, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(5): 317-327.
- [15] Bryner J H, Ritchie A E, Foley J W, et al. Isolation and characterization of a bacteriophage for Vibrio fetus[J]. J Virol, 1970, 6(1): 94-99.
- [16] Hazem A. Effects of temperatures, pH-values, ultra-violet light, ethanol and chloroform on the growth of isolated thermophilic Bacillus

phages[J].New Microbiol,2002,25(4):469-476.

- [17] Langlet J,Gaboriaud F,Gantzer C.Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage[J].J Appl Microbiol,2007,103(5):1632-1638.

Isolation, identification and biological characteristics of an *Escherichia coli* phage

Wang Hailei, Chen Jingchao, Lu Xinxin

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: A bacteriophage was isolated from sewage effluent using wild type *Escherichia coli* MG1655 as the host, and then named as Phage 1. The plaque size of Phage1 was about 3—4 mm. Transmission electron microscopy reveals that the phage has a regular polyhedron head and a long cured tail, which suggests that Phage 1 belongs to Siphoviridae. The biological characteristics of the phage were detected, including the optimal MOI, one-step growth curve, and the tolerance to temperature, chloroform and pH value. The results showed that the latent period of the phage was about 10 min, and the rise phase was about 20 min. In addition, Phage 1 has good tolerances to temperature, chloroform and pH value. After genome sequencing analysis, the phage was identified as *Escherichia coli* T1 phage.

Keywords: *Escherichia coli*; Phage; Isolation and identification; Plaque

[责任编辑 王凤产]