

噬菌体的应用与防治

刘秀侠, 穆熙军, 孙学森, 张继晓, 迟文超, 王兰伟, 许燕侠, 谷巍

(山东宝来利来生物工程股份有限公司研究院, 山东泰安 271000)

摘要 噬菌体结构简单, 有严格的宿主特异性, 可用于治疗致病菌感染引起的疾病, 对医学微生物学、遗传学、分子生物学等学科的发展起到推动作用。噬菌体作为生物界的一员, 在自然界中分布极广, 给人类生产发酵带来了极为不利的影 响。综述了噬菌体的应用前景、潜在风险及防治措施。

关键词 噬菌体; 应用; 防治

中图分类号 S852.65 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)32-12604-03

The Application and Prevention of Bacteriophages

LIU Xiu-xia et al (Shandong Baolai-Leelai Bio-Industrial Group, Tai'an, Shandong 271000)

Abstract Structure of bacteriophages is simple, and it has strict host specificity. It is widely used in treatment of pathogenic infections, and it plays an important role in promoting development of medical microbiology, genetics and molecular biology. As a member of biology, bacteriophages spread widely in nature, bringing serious impact to production of fermentation. This article briefly describes current prospects, potential risks and prevention measures of bacteriophages.

Key words Bacteriophages; Application; Control

噬菌体是感染细菌和放线菌等微生物的病毒, 最早由英国细菌学家 Twort^[1] 和加拿大细菌学家 Herelle^[2] 分别于 1915 年和 1917 年发现, 广泛存在于适合宿主菌生存的泥土、污水和空气等自然界中, 对于维持生态系统中不同细菌种类间的动态平衡起到非常重要的作用。噬菌体结构简单、基因数少, 是分子生物学及基因工程的良好试验系统。但是, 噬菌体的负面作用不容忽视, 微生物在工业发酵生产中极易被噬菌体污染, 导致发酵异常, 造成倒罐的严重损失。笔者探讨了噬菌体在各领域的应用前景及防治措施。

1 噬菌体的应用

1.1 作为分子生物学的研究工具 噬菌体是遗传调控、复制、转录与翻译等方面的生物学基础研究和基因工程中的重要材料或工具^[3]。遗传学中的转导作用就是以噬菌体作为媒介, 在 2 株细菌间传递遗传物质。

1.2 用于细菌的鉴定和分型 噬菌体只能侵染相应的细菌, 具有高度的特异性, 可用于细菌鉴定。同时, 噬菌体具有型的特异性, 可对细菌进行分型鉴定^[4]。目前已经利用噬菌体对沙门氏菌^[5]、大肠杆菌和伤寒菌等进行分型。

1.3 噬菌体展示技术和噬菌体抗体库 噬菌体展示技术是一种强有力的基因表达筛选技术, 1985 年首次由美国科学家 Smith^[6] 在《Science》杂志进行了阐述。噬菌体展示技术的基本原理是将外源蛋白的基因克隆到噬菌体的基因组 DNA 中, 从而在噬菌体的表面表达特定的外源蛋白。Ellis SE^[7] 等指出利用噬菌体展示多肽库可以筛选和确定线虫疫苗的抗原, 这是疫苗抗原鉴定的一种新方法。近年来随着流行性病毒引起的疾病逐渐增加, 抗病毒多肽被认为是预防和治疗疾病极有希望的方法。Castel G^[8] 等指出噬菌体展示技术特异性表达的重组多肽可以应用到抗病毒研究及药物开发中。

在噬菌体展示技术及 PCR 克隆技术基础上, 英国科学家 Winter^[9] 等率先在《Nature》杂志上发表文章阐述噬菌体抗体库技术。该技术是将抗体重链和轻链可变区基因与噬菌体的外壳蛋白基因重组, 将抗体片段 Fab 或 scFv 与噬菌体外壳蛋白以融合蛋白的形式展示于噬菌体颗粒表面, 进而快速高效筛选并富集针对某种抗原的特异性抗体, 从根本上改变了传统的单抗制备流程。Krishnaswamy^[10] 等利用噬菌体抗体库技术筛选到抗白色念珠菌 HM-1 杀伤毒素的 scFv-C1 阳性噬菌体抗体, 该噬菌体抗体比单克隆抗体结合抗原的特异性高 60 倍。刑佑尚^[11] 等报道了噬菌体抗体库技术在生物寄生虫检测、病毒检测、转基因产品检测、药物残留检测等领域的应用, 指出此技术在检验检疫领域具有天然的契合优势和光明的前景。噬菌体抗体库技术必将成为抗体生产的主要技术, 将给人类在疾病诊断、肿瘤研究、自身免疫性疾病研究、基因治疗、疾病防治和发病机制等方面带来极为广阔的前景。

1.4 用于检测和控制致病菌 食品和环境存在许多致病菌。研究表明噬菌体能够检测和控制食品和环境中的致病菌及腐败菌的生长。Brovko LY^[12] 等讨论了噬菌体检测致病菌的优缺点, 指出利用噬菌体检测食品安全及加工制造过程等方面存在的致病菌具有极大的应用前景。姜琴^[13] 等指出利用噬菌体可以实时、快速而准确地检测食品中的沙门氏菌, 在公共和食品卫生、畜牧兽医和口岸检疫中具有重要的意义。刘心妍^[14] 认为噬菌体不仅可用于检测食源性致病菌, 还可以应用在原料采集环节杀灭病原菌、生产或加工环节对设备等进行消毒、延长食品储藏期、消毒新鲜水果蔬菜等方面。

1.5 噬菌体疗法在各领域中的应用 噬菌体在宿主细胞中生长繁殖, 能够引起致病菌的裂解, 降低致病菌的密度, 从而减少或避免致病菌感染或发病的机会, 达到治疗和预防疾病的目的, 即噬菌体疗法^[15]。此疗法已广泛应用于兽医、农业

作者简介 刘秀侠(1988-), 女, 安徽淮北人, 实验员, 硕士, 从事分子病毒学及微生物生态制剂方面研究。

收稿日期 2013-10-08

和食品微生物学等领域。

1.5.1 噬菌体疗法在畜牧业中的应用。国内养殖业尤其是养鸡业常常受到畜禽肠道腹泻病的困扰,此病主要是由大肠杆菌、沙门氏菌等致病微生物引起^[16]。随着耐药性细菌的大量出现,用具有专一性强、不易产生抗性等优点的相关噬菌体来治疗细菌疾病受到重视。Smith^[17]和 Barrow^[18]等利用噬菌体疗法可以降低羊羔、仔猪和雏鸡患大肠杆菌肠道疾病的机率。

1.5.2 噬菌体疗法在水产养殖中的应用。爆发性疾病的频繁发生给水产养殖业造成巨大的经济损失,细菌性疾病噬菌体疗法在水产养殖业具有良好的应用前景。Park^[19]等在治疗 *Pseudomonas plecoglossicida* 等病菌引起的细菌性血型腹水感染时,通过喂食含噬菌体的食物可以有效清除致病细菌。

1.5.3 噬菌体疗法在治疗人类疾病中的应用。噬菌体疗法首先在人类疾病治疗中得到应用。1921年, Bruynoghe 和 Maisin^[20]率先用噬菌体制剂治疗葡萄球菌引起的皮肤感染。此后噬菌体广泛应用于耳鼻喉科、口腔科、眼科、皮肤科、儿科及肺部疾病等的治疗。随着抗生素的出现,噬菌体疗法被渐渐忽视。Kutter E^[21]等报道噬菌体疗法治疗或预防人类疾病具有极大的潜力,指出通过实践和试验等方法最终使噬菌体疗法商业化是避免此疗法被忽视的关键。

随着细菌抗生素耐药性的广泛存在,在许多领域使用噬菌体控制致病菌的生长和扩增。噬菌体治疗能够避免肠道菌群失衡,保持机体的正常免疫力,被认为是替代抗生素的一种安全、有效和有潜力的微生态制剂^[22]。

2 噬菌体的危害与防治

噬菌体作为一种宝贵的生物资源已被广泛应用于科学研究中,给人类带来了许多具有实用价值的科研成果。然而,由噬菌体引起的宿主病害可对人类健康、畜牧业、栽培业和发酵工业等带来不利的影响^[23]。

2.1 传统的噬菌体防御方法 国内发酵生产中大多采用传统的噬菌体防御方法(如环境消毒、菌种轮换、选育抗噬菌体菌株及利用药物防治噬菌体),这些方法只能在一定程度上控制噬菌体的污染。

2.2 有效的现代噬菌体防御方法

2.2.1 质粒抗噬菌体体系。某些质粒 DNA 能指导合成细胞表面抗原或介导产生遮蔽噬菌体吸附受体的胞外糖类,从而有效地抑制噬菌体吸附,且多数质粒可在不同宿主间转移,应用广泛。Tuncer Y 和 Akcelik M^[24]报道 *L. lactis* MPL56 的质粒可以编码能抑制噬菌体吸附的蛋白。

2.2.2 限制修饰系统。注入宿主细胞的大部分噬菌体 DNA 可被宿主细胞限制修饰系统中的限制酶消化,携带有 R/M 系统的质粒可以使宿主细胞抵抗更广泛的噬菌体侵袭。2003年,Gabs S 和 Josephsen J^[25]报道将 *L. lactis* W9 菌野生型质粒 pAlcat4 中的 R/M 系统 *LlaAI* 转入宿主菌,极大地提高了宿主菌在牛奶发酵过程中抵挡噬菌体感染的能力。

2.2.3 阻止噬菌体 DNA 的注入。一些宿主菌能够阻止噬菌体 DNA 通过宿主细胞膜转运到细胞质,从而成功抑制噬

菌体感染宿主菌,这是针对噬菌体早期感染的抑制作用。McGrath^[26]等在噬菌体 *Tuc2009* 中发现能够阻止其 DNA 注入宿主细胞的基因 *sie2009*。

2.2.4 流产感染系统。噬菌体 DNA 注入到宿主细胞后,在噬菌体 DNA 复制、转录、蛋白表达及包装病毒颗粒等阶段引起被噬菌体感染细胞的大量死亡。此系统多为质粒编码,少数存在于染色体中。Domingues S^[27]等报道 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* IL420 菌株的野生型质粒 pIL2614 中存在对噬菌体 936 具有有效抑制作用的 *abiP* 基因,此基因影响噬菌体 DNA 的复制和转录。

2.2.5 反义 RNA 技术。当对目标噬菌体的基因序列有所了解时,将噬菌体的非编码链即反义 DNA 与质粒相连,转入宿主细胞,由此得到的反义 RNA 与侵入宿主细胞的噬菌体 DNA 或 RNA 互补配对,形成不稳定的杂合体快速降解,从而达到抗噬菌体的目的。2002年,Sturino JM 和 Klaenhammer TR^[28]将 *S. thermophilus* 噬菌体 *Sfi21* DNA 保守区域克隆到质粒中,从而抑制 *S. thermophilus* 噬菌体的扩增。

噬菌体污染问题至今尚未完全解决,采取一些防治措施虽有一定的成效,但要防治噬菌体的污染必须确立防重于治的观念,如决不使用可疑菌种、严格保持环境卫生、选用 30 ~ 40 m 高空空气再经严格过滤等。

3 小结

噬菌体与人类实践的关系极为密切。噬菌体可用于生物防治、疫苗生产和作为遗传工程中的外源基因载体等,直接或间接地为人类创造出巨大的经济效益、社会效应和生态效应。同时,随着环境治理、生产管理和基因工程重组等技术的完善,人类可以有效地控制噬菌体对生产发酵的污染。因此,噬菌体作为生物的一大类,需要人类予以高度重视,具有广阔的研究及应用前景。

参考文献

- [1] TWORT F W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses [J]. *Lancet*, 1915, 186(4): 1241 - 1243.
- [2] D'HERELLE M F. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli [J]. *Comptes Rendus Academie Des Sciences*, 1917, 165(3): 373 - 375.
- [3] 刘明河. 细菌病毒——噬菌体的应用概况 [J]. *微生物学杂志*, 2002, 22(4): 56 - 61.
- [4] 江艳华, 姚琳, 王鹏, 等. 噬菌体及其裂解酶在食源性致病菌检测和控制在中的作用 [J]. *微生物学通报*, 2011, 38(10): 1561 - 1571.
- [5] CHO S, WHITTAM T S, BOXRUD D J, et al. Use of multiple-locus variable number tandem repeat analysis and phage typing for subtyping of *Salmonella* Enteritidis from sporadic human cases in the United States [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(3): 859 - 867.
- [6] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228: 1315 - 1317.
- [7] ELLIS S E, NEWLANDS G F J, NISBET A J, et al. Phage-display library biopanning as a novel approach to identifying nematode vaccine antigens [J]. *Parasite Immunology*, 2012, 34: 285 - 295.
- [8] CASTEL G, CHTEËOU M, HEYD B, et al. Phage display of combinatorial peptide libraries: application to antiviral research [J]. *Molecules*, 2011, 16(5): 3499 - 3518.
- [9] WARD E S, GUSSOW D, GRIFFITHS A D, et al. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli* [J]. *Nature*, 1989, 341: 544 - 546.
- [10] KRISHNASWAMY S, KABIR M E, MIYAMOTO M, et al. Cloning anti-fungal single chain fragment variable antibodies by phage display and competitive panning elution [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 395(1): 16

-24.

- [11] 邢佑尚,汪琳,赵胤泽,等.噬菌体抗体库及其在检验检疫中的应用[J].检验检疫学刊,2012,22(5):53-57.
- [12] BROVKO L Y, ANANY H, GRIFFITHS M W. Bacteriophages for detection and control of bacterial pathogens in food and food-processing environment[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2012, 67:241-288.
- [13] 姜琴,蒋鲁岩,黄克和.利用噬菌体快速鉴定沙门氏菌的研究[J].微生物学通报,2007,34(6):1138-1141.
- [14] 刘心妍.噬菌体在食品安全中的应用和潜在风险[J].微生物学通报,2011,38(6):916-920.
- [15] 钱震雯,岳启安,田凤丽.噬菌体治疗的研究概况[J].医学综述,2007,13(16):1256-1258.
- [16] 栗艳.鸡致病性大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J].畜禽业,2013(10):12-13.
- [17] SMITH H W, HUGGINS M B. Effectiveness of phages in experimental *E. coli* diarrhea in calves, piglets and lambs[J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129:2969.
- [18] BARROW P, LOVELL M, BERCHIERI A J. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1998, 5(3):294-298.
- [19] PARK SC, SHIMAMURA I, FUKUNAGA M, et al. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a Candidate for Disease Control [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66:1416-1422.

- [20] CHANISHVILL N, CHANISHVILI T, TEDIASHVILI M. Phages and their application against drug-resistant bacteria [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2001, 76:689-699.
- [21] KUTTER E, DE VOS D, GVASALIA G, et al. Phage therapy in clinical practice; treatment of human infections [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2010, 11(1):69-86.
- [22] 景绍红,胡占云.抗生素替代物在养猪生产中的应用[J].猪业科学,2011(5):78-80.
- [23] 周德庆.微生物学教程[M].2版.北京:高等教育出版社,1993:75-81.
- [24] YASIN T, MUSTAFA A. A protein which masks galactose receptor mediated phage susceptibility in *Lactococcus lactis subsp. lactis* MPL56 [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2002, 37(2):139-144.
- [25] GABS S, JOSEPHSEN J. Improvement of phage defence in *Lactococcus lactis* by introduction of the plasmid encoded restriction and modification system *Lla* AI [J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36:332-336.
- [26] MCGRATH S, VAN SINDEREN D, FITZGERALD G F. Bacteriophage derived genetic tools for use in lactic acid bacteria [J]. International Dairy Journal, 2002, 12:13-15.
- [27] DOMINGUES S, CHOPIN A, EHRlich S D, et al. The Lactococcal abortive phage infection system AbiP prevents both phage DNA replication and temporal transcription switch [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(3):713-721.
- [28] STURINO J M, KLAENHAMMER T R. Expression of antisense RNA against *Streptococcus thermophilus* bacteriophages [J]. Applied Environmental Microbiology, 2002, 68:588-596.

(上接第12587页)

2.1.5 土壤速效钾。由表4可知,标准农田的土壤速效钾平均值为84.5 mg/kg,比1984年提高了11.9 mg/kg,潜在缺钾(80~100 mg/kg)、缺钾(50~80 mg/kg)和极缺钾(<50 mg/kg)的面积均比1984年有所减少,但是相对缺乏的状况依然没有根本改善。

表4 湖州市标准农田土壤速效钾含量及比例

年份	平均值 g/kg	不同速效钾含量所占比例//%				
		>150 mg/kg	150~100 mg/kg	100~80 mg/kg	80~50 mg/kg	<50 mg/kg
1984	72.6	0.7	12.1	21.7	48.4	17.1
2008	84.5	5.0	21.9	20.4	36.2	16.5

2.2 标准农田等级 根据湖州市各县(市区)标准农田地力调查汇总资料,99.6%的标准农田为一、二等田,与浙江省85%左右的标准农田为二、三等田^[4]相比,湖州市标准农田质量整体较好。其中,一等一级田占3.9%,一等二级田占42.7%,二等三级田33.2%,二等四级田占19.8%,三等五级田占0.4%,三等六级田没有。湖州市的一等田主要位于吴兴区、南浔区、德清县东中部和长兴东部,绝大部分二等田分布于德清西部、长兴县的中西部和安吉县的大部,与地貌类型分布一致。

3 结论与讨论

(1)土壤化学性质。调查结果表明,土壤酸化趋势明显,有机质较丰富,普遍缺磷,缺钾较重。

(2)地力等级。湖州市标准农田质量整体较好,综合地力等级以一等、二等为主。

(3)增施有机肥。土壤有机质含量虽然较丰富,但有下降趋向,应通过秸秆还田、增施有机肥等措施防止进一步下降。

(4)补充磷钾。土壤有效磷、速效钾平均含量有所提高,但土壤缺钾和缺磷的比例依然很高。因此,采用测土配方施肥技术,适当控制氮肥用量,有针对性地增施磷钾肥。

(5)调整酸度。对于酸性土壤面积较大幅度增加状况,应合理调整用肥结构,适当多施钙镁磷肥、草木灰及石灰等碱性肥料,防止土壤进一步酸化。

参考文献

- [1] 边武英,董越勇.浙江省标准农田水稻土有机质现状及改良措施[J].浙江农业科学,2009(6):1046-1049.
- [2] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业科技出版社,2000.
- [3] 任周桥,单英杰,汪玉磊,等.浙江省标准农田地力调查与分等定级研究与应用[J].浙江农业学报,2011,23(2):404-408.
- [4] 陈一定,单英杰,顾培,等.浙江省标准农田地力与评价[J].土壤,2007,39(6):987-991.