

野生型鼠疫噬菌体 YP060 的分离和生物学特性鉴定

李存香 王鹏 申小娜 张海鹏 丁奕博 陈邬锦 和映天 和琼光
黄英 李振军 李伟

102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(李存香、申小娜、黄英、李伟); 102206 北京, 中国疾病预防控制中心研究生院(李存香); 811602 西宁, 青海省地方病预防控制所鼠疫预防控制科(李存香); 671000 大理, 云南省地方病研究所云南省自然疫源性疾病预防技术重点实验室(王鹏、张海鹏、丁奕博、陈邬锦); 674100 丽江, 云南省玉龙县疾病预防控制中心鼠疫预防控制科(和映天、和琼光); 850000 拉萨, 西藏自治区疾病预防控制中心行政办公室(李振军)

通信作者: 李振军, Email: lizhenjun@icdc.cn; 李伟, Email: liwei@icdc.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.06.025

【摘要】 目的 从鼠疫疫源地鼠巢中分离 1 株野生型鼠疫噬菌体 (YP060) 并分析其生物学特性。方法 采用双层琼脂平皿法从云南省鼠疫疫源地鼠巢中分离鼠疫噬菌体; 描述其形态特征; 了解裂解能力、宿主谱、最佳感染复数、一步生长特性; 分析不同温度和 pH 值、紫外线、氯仿对噬菌体的敏感性。结果 YP060 形态呈蝌蚪形, 头部为正多面体结构, 带有一伸缩的尾鞘; 对鼠疫疫苗株 EV76 的最佳感染复数为 0.1; 潜伏期为 50 min, 暴发期为 80 min; 宿主谱评价显示, YP060 仅裂解鼠疫疫苗株; YP060 在 30 ~ 50 °C 具有较强的热稳定性; pH 值 5 ~ 10 范围内均有较强的裂解活性; 对紫外线比较敏感; 对氯仿不敏感, 5% 浓度的氯仿对其活性基本没有影响。结论 本研究为国内首次从鼠疫疫源地鼠巢中分离到鼠疫噬菌体 YP060, 该噬菌体具有窄宿主谱和较强的生物学裂解特性。

【关键词】 鼠疫; 噬菌体; 鼠疫菌; 生物学特性

Isolation and biological characteristics on *Yersinia pestis* phage YP060 Li Cunxiang, Wang Peng, Shen Xiaona, Zhang HaiPeng, Ding Yibo, Chen Wujin, He Yingtian, He Qiongguang, Huang Ying, Li Zhenjun, Li Wei

State Key Laboratory for Communicable Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Li CX, Shen XN, Huang Y, Li W); Graduate School, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Li CX); Department of Plague Control and Prevention, Qinghai Institute for Endemic Disease Control and Prevention, Xining 811602, China (Li CX); Provincial Key Laboratory for Zoonosis Control and Prevention, Yunnan Institute for Endemic Disease Control and Prevention, Dali 671000, China (Wang P, Zhang HP, Ding YB, Chen WJ); Department of Plague Control and Prevention, Yulong Center for Disease Control and Prevention, Lijiang 674100, China (He YT, He QG); Executive Office, Tibet Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Lasa 850000, China (Li ZJ)

Corresponding authors: Li Zhenjun, Email: lizhenjun@icdc.cn; Li Wei, Email: liwei@icdc.cn

【Abstract】 **Objective** To isolate and identify the characteristics of *Yersinia pestis* phage YP060 from mice nests in Yunnan plague focus. **Methods** Phage YP060 was isolated from Yunnan plague focus by double-layer agar plate method with attenuated vaccine *Yersinia pestis* strain EV76 as the host bacterium. Phage particle was observed under the electron microscope while biological properties of phage YP060 including lytic capacity, host spectrum, optimal multiplicity of infection (MOI), one-step growth curve, sensitivity to temperature, pH, ultraviolet ray and chloroform etc. were identified. **Results** The particles of phage YP060 presented tadpoles-like features, with optimal

multiplicity of infection as 0.1. Latent period and burst period appeared as 50 min and 80 min, respectively. The phage endured the temperature between 30–50 °C, and it contained a stronger lysis activities in a range of pH 5 to 10. Phage YP060 was sensitive to ultraviolet rays but insensitive to chloroform while presented special lysis ability to *Yersinia pestis*. **Conclusion** *Yersinia pestis* phage YP060 was isolated for the first time from mice nests in plague natural focus in China. Our findings related to narrow host spectrum and stronger lysis activities.

【Key words】 Plague; Phage; *Yersinia pestis*; Biological characteristics

鼠疫噬菌体寄生于鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*, 鼠疫菌)。历史上鼠疫噬菌体曾用于鼠疫的治疗和预防^[1]。鼠疫噬菌体不仅可以鉴定鼠疫菌^[2],外环境中发现鼠疫噬菌体也被认为是存在鼠疫菌的间接证据。国外研究者曾从鼠疫尸体、染疫动物死尸、恢复期患者粪便、动物排泄物、污水以及鼠疫菌陈旧培养物中分离出鼠疫噬菌体^[2-3]。国内也曾有分离的报道^[4-6]。鼠疫噬菌体分为4个血清型,烈性噬菌体都属于血清I型,血清II~IV型都是溶原性噬菌体^[7]。

鼠疫噬菌体 Yep-phi^[8]和 PhiA1122^[9]分别是中国和美国CDC采用的诊断鼠疫噬菌体,二者均属于短尾噬菌体科,PhiA1122 不仅裂解鼠疫菌,而且在37 °C可裂解假结核耶尔森菌^[9],而 Yep-phi 在20 °C和37 °C均特异裂解鼠疫菌,对耶尔森菌属的其他种不裂解^[8]。目前我国鼠疫监测中已经发现天然的抗现有鼠疫诊断噬菌体的鼠疫菌,这使得依靠鼠疫噬菌体的现行诊断体系受到极大挑战。本研究从云南省玉龙县鼠疫疫源地鼠巢中分离获得1株野生型鼠疫噬菌体,并对其形态、裂解特性、宿主谱、最佳感染复数、一步生长特性等生物学特性进行观察和描述。

材料与方法

1. 细菌:鼠疫疫苗株EV76、6株假结核耶尔森菌和5株小肠结肠炎耶尔森菌、1株弗氏/中间耶尔森菌和1株克氏耶尔森菌为本实验室保存;另外1株克氏耶尔森菌和1株弗氏/中间耶尔森菌由中国CDC传染病预防控制所景怀琦研究员惠赠。

2. 培养基和试剂:实验用LB液体培养基、LB半固体培养基、LB固体培养基、噬菌体保存液(SM缓冲液)均按常规方法制备和保存。

3. 野生型鼠疫噬菌体的分离与纯化:①宿主菌株:鼠疫疫苗株EV76作为宿主菌置28 °C 120 r/min振荡培养20 h至对数生长期。②样本预处理:取云南省玉龙县黄山镇采集的鼠巢约5~6 g加入0.9%氯化钠注射液约30~35 ml,充分混匀、浸泡,4 °C冰箱过夜。次日取上述浸泡液3 000×g离心10 min,收集上清,用0.22 μm微孔滤膜过滤处理,收集滤

液。③样品原液中噬菌体的富集:将滤液中加入等体积2×LB液体培养基,然后接种对数生长期的鼠疫疫苗菌悬液300 μl,加入1 mol/L MgSO₄至终浓度为10 mmol/L,充分混匀,于28 °C摇床120 r/min振荡培养20~24 h。上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤,收集滤液。重复增殖一次。④鼠疫噬菌体的分离和纯化:取样品过滤液100 μl,加入对数生长期的鼠疫疫苗菌悬液100 μl,混合后室温放置10 min,加入到已融化至45 °C 6 ml LB半固体培养基中,轻轻振荡后倒入底层LB固体培养基中,置于28 °C恒温培养箱,20~24 h后观察噬菌斑。挑取单斑置于1 ml SM液中4 °C保存。噬菌体悬液10倍系列稀释后,按照上述双层琼脂平板法分离噬菌斑,重复5次得到纯化的鼠疫噬菌体。

4. 野生型鼠疫噬菌体的鉴定:①效价测定:采用10倍系列稀释和双层琼脂平板法,培养20~24 h后计数噬菌体效价。噬菌体效价(PFU/ml)=平均噬菌斑数×稀释倍数×10。②电镜下形态:用3 kDa规格离心超滤管浓缩后采用醋酸双氧铀负染色法处理^[10],日立HT7700透射电子显微镜下观察。③最佳感染复数和一步生长曲线按文献测定^[11]。④宿主谱分析^[12]:16株耶尔森菌属菌测定分离的鼠疫噬菌体裂解谱,置28 °C和37 °C培养20~24 h后观察结果。⑤野生型鼠疫噬菌体的理化因素敏感性试验^[12-13]:采用双层琼脂平板法测定温度、pH、紫外线、氯仿对噬菌体的敏感性。

结 果

1. 鼠疫噬菌斑的形态、大小及效价:从云南省玉龙县黄山镇采集的鼠巢中分离出1株以鼠疫疫苗株EV76为宿主菌的野生鼠疫噬菌体,命名为YP060。该鼠疫噬菌体形成的噬菌斑中心清晰,边缘模糊,直径约为0.9~1.2 mm,见图1。通过液体增殖培养后,鼠疫噬菌体YP060效价达到10⁷ PFU/ml。

2. 噬菌体形态:呈蝌蚪形,头部为正多面体结构,头部直径约为60 nm,尾部长约140 nm左右,有一收缩的尾鞘。根据Ackermann^[14-15]的分类,该噬菌体归类于肌尾噬菌体(*Myoviridae*)A1群,见图2。

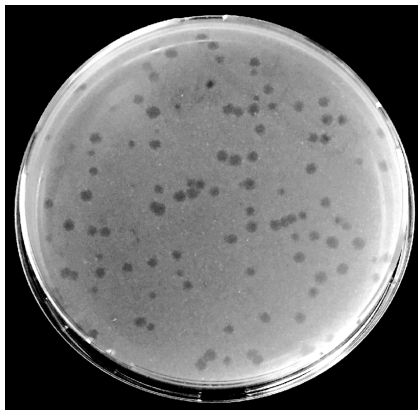


图1 鼠疫噬菌体 YP060 噬菌斑形态($\times 1$ 倍)

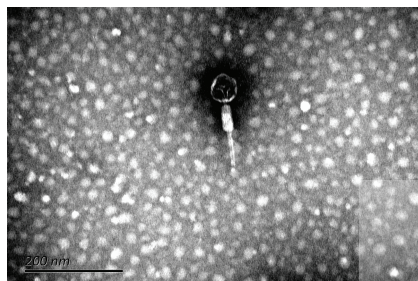


图2 鼠疫噬菌体 YP060 电镜下形态($\times 200\ 000$ 倍)

3. 最佳感染复数测定:当感染复数为0.1时,噬菌体 YP060 感染宿主菌 EV76 后所产生的子代噬菌体的效价最高,因此该噬菌体的最佳感染复数为0.1。

4. 一步生长曲线:野生型噬菌体 YP060 潜伏期约为 50 min,噬菌体侵染宿主菌 EV76 后 60 ~ 140 min 噬菌体产量急速增加,暴发期约 80 min,随后进入平台期,裂解量约为 7.1,见图 3。

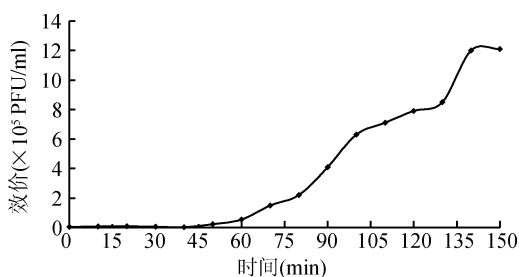


图3 鼠疫噬菌体 YP060 一步生长曲线

5. 鼠疫噬菌体 YP060 宿主谱分析:在 28 °C 和 37 °C 时仅裂解鼠疫疫苗株 EV76;对 15 株非鼠疫耶尔森菌均不裂解。这 15 株非鼠疫耶尔森菌包括假结核血清组 I ~ VI 型;小肠结肠炎 O : 3 标准株 3 株;小肠结肠炎 O : 9 标准株 2 株;弗氏/中间耶尔森菌和克氏耶尔森菌各 2 株。

6. 理化因素敏感性试验结果:鼠疫噬菌体 YP060 在 pH 5.0 ~ 10.0 范围内具有良好的裂解活

性。当 pH 值为 4 和 12 时,噬菌体基本失去感染宿主的能力;热稳定性结果表明在 50 °C 作用 60 min 后其活性基本保持不变,超过 50 °C 其效价急剧下降;将氯仿与分离的鼠疫噬菌体 YP060 以 1%、2%、5% 的比例作用后,测定效价分别为 2.26×10^7 、 1×10^7 、 1×10^7 PFU/ml,未经氯仿处理的鼠疫噬菌体 YP060 效价为 2.3×10^7 PFU/ml,提示该噬菌体的活性不受氯仿的影响;鼠疫噬菌体 YP060 经紫外线照射 2 ~ 4 min 后该噬菌体的存活率为 17.5%,14 min 后鼠疫噬菌体 YP060 失活,提示该噬菌体对紫外线比较敏感。

讨 论

鼠疫是一种流行于啮齿动物间,通过跳蚤传播的自然疫源性疾病。在检验材料中检出鼠疫菌特异的噬菌体,则提示该材料中可能有鼠疫菌或不久前曾被鼠疫菌污染过^[2]。既往研究发现动物鼠疫流行末期及流行静息期,在自然界宿主动物体、媒介中常分离出非典型鼠疫菌和鼠疫噬菌体^[6]。细菌生存环境中,噬菌体扮演重要作用,如霍乱流行期间河口水体中噬菌体数量和霍乱弧菌数量存在一种此消彼长的关系^[16]。云南省玉龙县于 2006 年发现并证实为鼠疫自然疫源地以来^[17],近 10 年动物鼠疫间歇流行^[17-18]。本研究从该县黄山镇南溪村采集的鼠巢中分离到野生型鼠疫噬菌体,可能与近期的动物鼠疫流行相对应。

研究新发现的噬菌体的生物学特性,是认识该噬菌体的基本前提。本研究电镜观察显示鼠疫噬菌体 YP060 其形态符合肌尾噬菌体科特征。该噬菌体的最佳感染复数为 0.1,由一步生长曲线得出噬菌体感染宿主菌潜伏期为 50 min,暴发期为 80 min,裂解量为 7.1,符合烈性噬菌体生物学特征。本次分离的野生型噬菌体效价比较低,这可能与噬菌体裂解细菌细胞速度缓慢和生长环境、生长条件等有关。

鼠疫诊断标准目前基于“四步”检验,即培养、镜检、噬菌体裂解实验和动物实验。目前“四步”检验中,人们越来越依靠噬菌体裂解实验的结果来判定鼠疫菌,甚至一些地方只剩下噬菌体实验。目前已经在鼠疫监测中发现天然的抗现有诊断鼠疫噬菌体的鼠疫菌存在。因此制备更多鼠疫诊断噬菌体的备选对鼠疫诊断具有重要意义。本研究发现的鼠疫噬菌体特异性较好。目前特异性评价的菌株样本数还较少,需要在更广泛菌株种属上进行系统评价。

噬菌体和细菌的相互作用中,噬菌体对维持细

菌微生态和促进宿主菌进化具有非常重要意义。目前已经有5株鼠疫噬菌体的全基因组序列公布^[8]。通过对分离的噬菌体进行基因组测序,分析我国鼠疫噬菌体与国外噬菌体的系统进化关系,对研究鼠疫噬菌体种系发生具有重要意义。分离和鉴定更多的鼠疫自然疫源地鼠疫噬菌体将对我国鼠疫微生态研究具有重要意义。

志谢 感谢中国CDC病毒病预防控制所宋敬东博士在该研究中给予电镜照片帮助和支持

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] M.K. 沃尔德, D.I. 费里德曼, S.L. 阿迪亚, 等. 噬菌体——在细菌致病机理及生物技术中的作用[M]. 艾云灿, 孟繁梅, 译. 北京: 科学出版社, 2007: 6-7.
Wohlde MK, Friedman DI, Adhya SL, et al. Phage: Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology[M]. Ai YC, Meng FM, trans. Beijing: Science Press, 2007: 6-7.
- [2] 贺雄, 王虎. 现代鼠疫概论[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 265.
He X, Wang H. Introduction of modern plague[M]. Beijing: Science Press, 2010: 265.
- [3] Schwudke D, Ergin A, Michael K, et al. Broad-host-range *Yersinia* phage PY100: Genome sequence, proteome analysis of virions, and DNA packaging strategy[J]. J Bacteriol, 2008, 190(1): 332-342. DOI: 10.1128/JB.01402-07.
- [4] 金丽霞, 于守鸿, 祁芝珍, 等. 自四川石渠县分离3株野生型鼠疫噬菌体的鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(5): 124, 11. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2001.05.043.
Jin LX, Yu SH, Qi ZZ, et al. Isolation and identification of 3 strains *Yersinia pestis* Phage from Sichuan Province[J]. Chin J Zoon, 2001, 17(5): 124, 11. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694. 2001. 05.043.
- [5] 曹淑兰, 王洪喜, 张市, 等. 西藏44号鼠疫噬菌体特性及效价观察[J]. 中国地方病防治杂志, 1999, 14(1): 25.
Cao SL, Wang HX, Zhang S, et al. Biological characteristics of *Yersinia pestis* Phage 44 from Tibet Autonomous Region[J]. Chin J Ctrl Endem Dis, 1999, 14(1): 25.
- [6] 宋延富. 鼠疫以非典型形式在自然界长期保存的研究进展[J]. 中国地方病防治杂志, 1995, 10(2): 101-103.
Song YF. Research progress on long-term preservation of atypical *Yersinia pestis* in natural foci[J]. Chin J Ctrl Endem Dis, 1995, 10(2): 101-103.
- [7] Garcia E, Chain P, Elliott JM, et al. Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage [J]. Virology, 2008, 372(1): 85-96. DOI: 10.1016/j.virol.2007.10.032.
- [8] Zhao XN, Wu WL, Qi ZZ, et al. The complete genome sequence and proteomics of *Yersinia pestis* phage Yep-phi [J]. J Gener Virol, 2011, 92(1): 216-221. DOI: 10.1099/vir.0.026328-0.
- [9] Garcia E, Elliott JM, Ramanculov E, et al. The genome sequence of *Yersinia pestis* bacteriophage ϕ A1122 reveals an intimate history with the coliphage T3 and T7 genomes [J]. J Bacteriol, 2003, 185(17): 5248-5262. DOI: 10.1128/JB.185.17.5248-5262.2003.
- [10] 张哲, 李菁华, 逯茵茵, 等. 粪肠球菌裂解性噬菌体 ϕ En-ZZ8生物学特性的初步分析[J]. 微生物与感染, 2015, 10(4): 241-246.
Zhang Z, Li JH, Lu YY, et al. Biological characteristics of a virulent bacteriophage ϕ En-ZZ8 isolated from *Enterococcus faecalis*[J]. J Micr Infect, 2015, 10(4): 241-246.
- [11] 黄建军, 胡晓梅, 饶贤才, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体PaP2生物学特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(13): 1133-1136. DOI: 10.3321/j.issn.1000-5404.2004.13.003.
Huang JJ, Hu XM, Rao XC, et al. Biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* Phage PaP2 [J]. Acta Acad Med Milit Tert, 2004, 26(13): 1133-1136. DOI: 10.3321/j.issn.1000-5404.2004.13.003.
- [12] 张红明, 黄庆, 罗阳, 等. 肺炎克雷伯菌噬菌体的分离和生物学特性[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(5): 608-611. DOI: 10.3321/j.issn.1005-4529.2008.05.003.
Zhang HM, Huang Q, Luo Y, et al. Isolation and characterization of bacteriophage for *Klebsiella pneumonia* [J]. Chin J Nosocomiol, 2008, 18(5): 608-611. DOI: 10.3321/j.issn.1005-4529.2008.05.003.
- [13] 高苗, 杨金广, 刘旭, 等. 一株裂解性青枯雷尔氏菌噬菌体的分离及生物学特性分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(7): 1330-1338. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2015.07.08.
Gao M, Yang JG, Liu X, et al. Isolation and biological properties of a lytic phage infecting *Ralstonia solanacearum* [J]. Sci Agric Sin, 2015, 48(7): 1330-1338. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752. 2015.07.08.
- [14] Ackermann HW. 5 500 Phages examined in the electron microscope [J]. Arch Virol, 2007, 152(2): 227-243. DOI: 10.1007/s00705-006-0849-1.
- [15] Ackermann HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000[J]. Arch Virol, 2001, 146(5): 843-857.
- [16] Faruque SM, Naser IB, Islam MJ, et al. Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(5): 1702-1707. DOI: 10.1073/pnas.0408992102.
- [17] 宋志忠, 夏连续, 梁云, 等. 云南玉龙及古城区鼠疫自然疫源地判定及初步研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2008, 23(1): 3-7. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1889.2008.01.002.
Song ZZ, Xia LX, Liang Y, et al. Confirmation and study of plague natural foci for Yulong county and Guchengqu in Yunnan province [J]. Chin J Ctrl Endem Dis, 2008, 23(1): 3-7. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1889.2008.01.002.
- [18] 苏丽琼, 梁云, 吴鹤松, 等. 云南省2014年鼠疫监测结果[J]. 中国地方病防治杂志, 2015, 30(鼠疫监测增刊): 73-76.
Su LQ, Liang Y, Wu HS, et al. The surveillance of plague in Yunnan province, 2014 [J]. Chin J Ctrl Endem Dis, 2015, 30 (supplement of surveillance of plague): 73-76.

(收稿日期: 2016-03-15)

(本文编辑: 斗智)