

一株宽宿主谱大肠埃希菌噬菌体的 RNA 比较分析及其环境微生物杀灭效应观察

徐焰 彭道荣 熊鸿燕 张小宁 苏明权 孙怡群 郝晓柯

【摘要】目的 通过比较研究一株分离自医院污水的宽宿主范围大肠埃希菌(*E. coli*)噬菌体与野生型单一宿主谱 *E. coli* 噬菌体的核酸序列和微生物杀灭效应等生物学特性的改变探讨噬菌体识别特异性机制和将噬菌体作为生物消毒剂应用于环境污水净化的可行性。**方法** 采用抗体沉淀-盐酸胍一步法分别提取单一宿主谱 *E. coli* 噬菌体 f_2 株及宽宿主谱 *E. coli* 噬菌体株的 RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳鉴定其纯度; 采用简并引物逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及随机引物随机扩增多态性 DNA(RAPD)-PCR 比较分析噬菌体宿主谱改变时核酸序列组成的变化; 通过以上两噬菌体对环境样本中活菌和 *E. coli* 的杀灭效果的观察, 比较分析宿主谱改变对噬菌体的微生物杀灭效应这一生物学特性的影响。**结果** 噬菌体核酸分析试验证实, f_2 噬菌体及宽噬噬菌体均为 6000 bp 左右的单链 RNA 噬菌体。RAPD-PCR 结果显示, 两噬菌体基因 cDNA 扩增出的 RAPD-DNA 片段有明显的差异, 其中 26 条为可区分的 DNA 带型。利用简并引物进行的 RT-PCR 反应显示, 噬菌体 f_2 cDNA 在 450 bp 附近出现重复性较好的扩增片段, 而宽噬噬菌体 cDNA 在相同条件下未出现扩增产物。环境水样本微生物杀灭试验结果显示, 宽宿主谱株噬菌体对环境水样本中的 *E. coli* 杀灭率为 36.75% ~ 56.28%, 对水样本中活菌杀灭率为 30.84% ~ 47.96%; 而噬菌体 f_2 对环境水样本中的 *E. coli* 杀灭率则为 19.19% ~ 35.06%, 对水样本中活菌杀灭率为 13.05% ~ 27.85%。**结论** 宽宿主谱噬菌体微生物杀灭率明显高于野生型单一宿主谱噬菌体 f_2 ($P=0.000$); 核酸分析证实两噬菌体宿主特异性裂解效应已从基因水平发生了变化。

【关键词】 宿主谱; 大肠埃希菌噬菌体; 微生物杀灭试验

Study on the nucleic acid of *E. coli* bacteriophage with broad host range and its sterilization effect to sewage samples from the environment XU Yan*, PENG Dao-rong, XIONG Hong-yan, ZHANG Xiao-ning, SU Ming-guan, SUN Yi-qun, HAO Xiao-ke. *Department of Clinical Laboratories, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: HAO Xiao-ke, Email: haoxkg@163.com

【Abstract】Objective To study the change of nucleic acid sequence and the germicidal effect of an *E. coli* bacteriophage with broad host range isolated from hospital sewage as well as to study the mechanism of phage host specificity and the effect of killed bacteria by phage-disinfectant to the samples from sewage water. **Methods** To extract the nucleic acid from phage f_2 and phage with broad host range using anti-serum-carbamidine hydrochloride assay. Purity with agarose gel electrophoresis was then evaluated. Differences of nucleic acid sequence between phage f_2 and phage with broad host range with reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and random amplified polymorphic DNA(RAPD)-PCR were also comparing and analysed. Through observing the germicidal test of phage f_2 and phage with broad host range to samples from environment, different sterilization effects between the two phages were compared. **Results** Analytic test for nucleic acid revealed that the two phages both belonged to 6000 bp, single-stranded RNA bacteriophage. Significant differences in their specificity of RAPD-PCR and RT-PCR were found during the changed of host range; with 26 RAPD-cDNA differential fragments found that in

基金项目:教育部高等学校骨干教师资助计划基金资助项目(2000-65-66)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院检验科(徐焰、彭道荣、张小宁、苏明权、孙怡群、郝晓柯);第三军医大学预防医学院军队流行病学教研室(熊鸿燕)

通讯作者:郝晓柯, Email: haoxkg@163.com

two phages RAPD-PCR products. The RT-PCR product of phage f_2 was 450 bp cDNA fragment, but the phage with broad host range did not show PCR product. Treating the sewage water with phage under broad host range, the germicidal test showed that the cleaning rate of *E. coli* bacteria and phage f_2 in water samples from environment could reach 36.75% - 56.28%, 30.84% - 47.96%, 19.19% - 35.06% and 13.05% - 27.85%, respectively. **Conclusion** The cleaning rates to *E. coli* and bacteria by phage with broad host range were obviously higher than phage f_2 ($P=0.000$). Analytic test for nucleic acid indicated that host-specific lytic effect of phage with broad host range had been changed at genetic level.

【Key words】 Host range; *Escherichia coli* bacteriophages; Germicidal test

近年来, 抗生素耐药菌株的出现对细菌感染的治疗及消毒方法构成了严峻挑战, 使得噬菌体再度成为关注热点^[1]。噬菌体作为抗菌制剂的应用前景还有赖于突破其对宿主菌识别和裂解的特异性限制。如果能扩展噬菌体的“宿主谱”, 使之成为一种“广谱”裂菌性噬菌体, 那么, 这种新型生物抗菌剂的应用前景将是无法估量的。我们在研究中发现并筛选到一株可同时裂解五种不同株大肠埃希菌 (*E. coli*) 的噬菌体。为了进一步了解其宿主特异性改变机制, 我们将只能特异性裂解 *E. coli* 285 株的野生型 *E. coli* 噬菌体 f_2 及上述具有宽宿主范围的噬菌体株 (因其对 *E. coli* 285 株也具有裂解功能) 的核酸进行比较分析; 为促进噬菌体突破型特异性限制的研究奠定基础。并通过进一步观察噬菌体 f_2 和宽噬菌体对环境样本中微生物的杀灭效应, 初步验证宽宿主谱噬菌体用于环境微生物控制和净化的效果。

材料与方 法

一、材料:

1. 标本来源: *E. coli* 285 株及噬菌体 f_2 (军事医学科学院四所梁增辉教授惠赠); 宽宿主谱噬菌体株 (可裂解 *E. coli* 285、*E. coli* ATCC25922 以及基因工程菌 *E. coli* BL21、JM109、DH5 α) 分离自西南医院污水处理站污水。

2. 试剂和仪器: RNA PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司产品); 合成引物 (上海申友公司产品); 随机引物 (北京赛百盛基因技术有限公司产品); 盐酸胍、巯基乙醇 (鼎国试剂); 自动凝胶成像及分析系统 (Bio-RAD)。

二、方法:

1. 噬菌体核酸分析:

(1) 噬菌体核酸提取: 抗体沉淀-盐酸胍一步法采用周翔等的方法改进后进行^[2,3]。利用两噬菌体原液免疫家兔制备噬菌体抗血清^[4,5]; 10 ml 噬菌体原液中加入终浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 的 DNase I 及 RNase

A 降解宿主菌来源的核酸; 等体积氯仿抽提上层水相, 加入 400 μl 噬菌体抗体血清室温放置 1 - 2 h 后离心留取沉淀; 加入 1.5 ml 8 mol/L 盐酸胍溶液、1.5 ml 0.1 mol/L β -巯基乙醇、终浓度 0.5% 的 10% 十二烷基磺酸钠 (SDS)、1/10 体积 2 mol/L NaAc (pH 5.2), 混匀; 酸性酚: 氯仿: 异戊醇 (24:24:1) 抽提, 离心收集上层水相; 无水乙醇洗涤沉淀, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。以上噬菌体核酸经琼脂糖凝胶电泳鉴定噬菌体核酸纯度。

(2) 噬菌体核酸定性及定量分析: 核酸定量仪定量噬菌体 RNA 浓度; 用 DNA 酶及 RNA 酶消化噬菌体核酸定性核酸性质。

(3) 噬菌体核酸简并引物逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR): 引物设计及合成: 因噬菌体 f_2 的核苷酸全序列测定工作尚未公布, 资料显示其属单链 RNA *E. coli* 噬菌体 I 类群^[6], 所以我们根据四种已完成全序列核苷酸测定的单链 RNA *E. coli* 噬菌体中高度同源的保守序列和已公布的大肠 f_2 噬菌体 58 bp 的衣壳蛋白基因已知序列通过 primer 5.0 软件设计一对简并引物尝试扩增未知序列的噬菌体 f_2 及宽宿主谱株噬菌体的 cDNA, 以观察宿主谱改变时基因组成的变化。其中 Anti 引物为简并引物, 序列: CCT KCK ACG AGC CTA AAT; Sense 引物序列: AAA TCT GGA ACT AAC TAT TC。RT-PCR 反应参照 TaKaRa RNA PCR kit Ver 2.1 试剂盒使用说明进行, 退火温度梯度为 50.4 $^{\circ}\text{C}$ 、54.8 $^{\circ}\text{C}$ 、58.5 $^{\circ}\text{C}$ 、60.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

(4) 噬菌体随机引物随机扩增多态性 DNA (RAPD)-PCR: 引物及其序列选用北京赛百盛基因技术有限公司生产的 5 条随机系列引物 (表 1) 分别对两噬菌体 RNA 进行逆转录和 RAPD-PCR 扩增, 对其进行 DNA 多态性分析^[7,8]。逆转录反应及 RAPD-PCR 反应体系同 RT-PCR, 退火温度梯度分别为 40.7 $^{\circ}\text{C}$ 、46.0 $^{\circ}\text{C}$ 。

2. 噬菌体对环境水样本中细菌的杀灭效果观察:

表1 随机引物及其序列

引物编号	序列	引物编号	序列
806	5'CACGCTGACT 3'	809	5'GCCATGTACT 3'
807	5'CCTAGTACT 3'	810	5'CCACAAACCT 3'
808	5'GAGGTCTACT 3'		

(1)噬菌体抗血清制备及中和试验:按照文献[4,9]的方法改进后进行宽噬噬菌体及噬菌体 f₂ 抗血清的制备;参照文献[5]的方法检测以上两噬菌体对应抗体中和试验,测定其对应抗体中和反应 K 值。

(2)噬菌体微生物杀灭试验:从地面积水中采取水样,严格按照文献[10]要求进行消毒试验。取宽噬噬菌体 3 种浓度[噬菌体原液(10¹⁴ pfu/ml);1:10 倍、1:100 倍稀释液],分别在环境温度为 4℃、(20±2)℃ 和 37℃ 的条件下以 1:10 的比例将噬菌体悬液分别加入水样中,充分混匀,按设计要求,分别在作用 4、8、12、24、48 h 后取水样 0.55 ml,迅速加入相应噬菌体抗体血清(1:50 稀释)0.1 ml 进行中和,将混合液与 LB 普通营养琼脂(45℃)混合,以倾注法制作平板,并进行活菌计数;按同样方法,将混合液与伊红美蓝营养琼脂(45℃)混合,以倾注法制作平板,计数培养基中带有金属光泽的红色及紫红色菌落,并将它们分别接种于内有倒管的乳糖蛋白胨培养液中进行 37℃ 培养,以最终能在需氧或兼性厌氧条件下发酵乳糖产酸产气的革兰阴性无芽孢杆菌数进行 *E. coli* 计数。试验中,将噬菌体 f₂ 作为对照进行同样操作处理。同时还设立了阳性对照组(未加入噬菌体处理的样本)和阴性对照组(用灭菌的 0.03 mol/L PBS 替代环境水样本)。各试验点均重复 3 次试验。

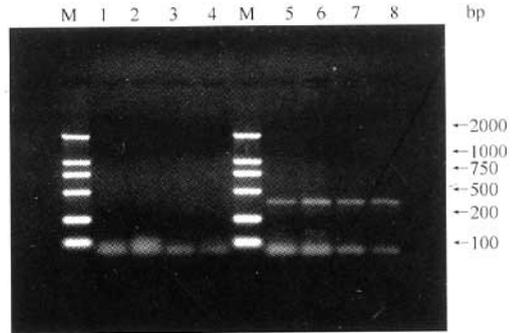
3. 统计学分析:微生物杀灭试验的数据采用 SPSS 10.0 软件进行多因素方差分析。

结 果

1. 噬菌体核酸提取及分析:经抗体沉淀-盐酸胍一步法提取的噬菌体核酸纯度好,条带完整。DNAse I 和 RNase A 降解反应证实噬菌体 f₂ 及其宽噬噬菌体核酸均为 RNA(约 6000 bp),在 RNase A 中完全降解。因 RNase A 在 NaCl 浓度为 3 mol/L 或更高时,可特异性切割单链 RNA^[2],所以上述噬菌体的核酸在以上条件下的降解可证实它们均为单链 RNA 噬菌体。核酸定量仪分析也进一步证实噬菌体 f₂ 及噬菌体宽噬株核酸均为 RNA,浓度分别为

3.1 g/ml 和 3.0 g/ml; A₂₆₀/A₂₈₀ 分别为 1.96 和 1.91。

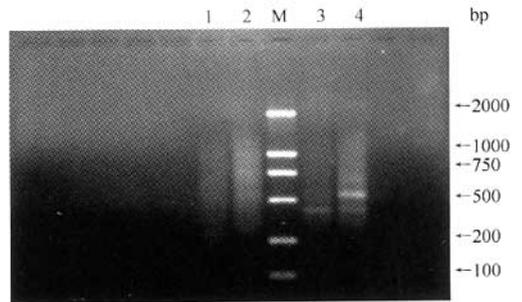
2. RT-PCR 反应产物:利用简并引物对两噬菌体核酸进行 RT-PCR 反应,噬菌体 f₂ cDNA 在 450 bp 附近出现重复性较好的扩增片段,而宽噬噬菌体 cDNA 在相同条件下未出现扩增产物。以简并引物在退火温度梯度为 50.4℃、54.8℃、58.5℃、60.5℃ 条件下的 RT-PCR 产物见图 1。



M:DNA Marker DL 2000; 1~4:宽宿主谱噬菌体 PCR 扩增结果; 5~8:噬菌体 f₂ PCR 产物(450 bp)

图1 噬菌体 f₂ 及宽宿主谱噬菌体的简并引物 RT-PCR 产物

3. RAPD-PCR 反应产物:利用 5 个随机引物对两噬菌体核酸进行 RAPD-PCR 扩增,其中筛选出 3 个具有多态性且重复性好的引物,上述 3 个随机引物对两噬菌体扩增的 DNA 片段进行分析,结果表明,两噬菌体基因 cDNA 扩增出的 RAPD-DNA 片段有明显的差异,其中 26 条为可区分的 DNA 带型。引物扩增的多态性图谱见图 2~4。

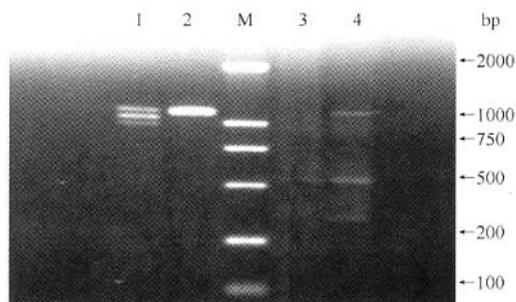


M:DNA Marker DL 2000; 1,2:宽宿主谱噬菌体不同温度梯度 RAPD-PCR 扩增结果; 3,4:噬菌体 f₂ 不同温度梯度 RAPD-PCR 产物

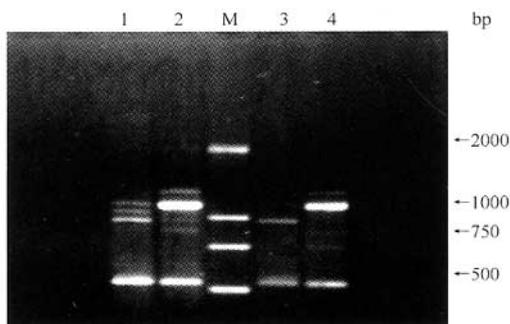
图2 噬菌体 f₂ 及宽宿主谱噬菌体的 RAPD-PCR 扩增产物

4. 噬菌体对环境水样本的消毒效果:

(1)噬菌体抗血清中和试验:以 1:100 稀释的抗噬菌体血清在 5 min 内中和 90% 以上的噬菌体为抗血清的鉴定结果,采血进行抗体中和试验。对应血清中和试验结果显示,噬菌体 f₂、宽噬噬菌体的速度常数 K 值分别为 30.1 和 41.5。



M: DNA Marker DL 2000; 1, 2: 宽宿主谱噬菌体不同温度梯度 RAPD-PCR 扩增结果; 3, 4: 噬菌体 f_2 不同温度梯度 RAPD-PCR 产物
图3 噬菌体 f_2 及宽宿主谱噬菌体的 RAPD-PCR 扩增产物



M: DNA Marker DL 2000; 1, 2: 宽宿主谱噬菌体不同温度梯度 RAPD-PCR 扩增结果; 3, 4: 噬菌体 f_2 不同温度梯度 RAPD-PCR 产物
图4 噬菌体 f_2 及宽宿主谱噬菌体的 RAPD-PCR 扩增产物

(2) 噬菌体对环境水样本的杀菌效果: 将噬菌体以 1:10 的比例加入环境水样本后, 与噬菌体 f_2 相比, 宽噬噬菌体可使水样本中的总菌数和 *E. coli* 群数明显下降 ($P=0.000$)。对水样本中总菌杀灭率

达 30.84% ~ 47.96%, 对 *E. coli* 的杀灭率达 36.75% ~ 56.28%。在 4~37℃ 条件下, 其杀菌效果随温度增加有上升的趋势 ($P=0.000$) (表 2), 并且噬菌体对水样中细菌的杀灭率随作用时间的延长逐渐增加 ($P=0.000$)。

讨 论

本试验所筛选的宽噬噬菌体显示出对多株 *E. coli* 具有裂解现象, 而且这种裂解效应的稳定性较好。对它的 cDNA 的进一步分析显示, 其随机扩增 DNA 多态性及 RT-PCR 与噬菌体 f_2 完全不同, 显示该噬菌体在对宿主吸附和裂解的生物效应上已从基因水平发生了改变。当然, 其准确机制还有待深入探讨。

如何将噬菌体作为一种生物消毒剂进行应用是研究者共同关注的问题。本研究结果显示, 宽噬噬菌体对环境水样本中的 *E. coli* 杀灭率可达到 36.75% ~ 56.28% 左右, 其杀菌率明显受到噬菌体含量、环境温度、作用时间等因素的影响 ($P=0.000$)。由于时间不足的原因, 本试验对环境水样本的处理时间最长设计为 48 h, 是否能通过进一步延长处理时间来提高噬菌体对水体的净化作用有待探讨。本研究结果还显示, 宽噬噬菌体不能完全杀灭水样本中的 *E. coli*, 其原因之一可能是由于该噬菌体对水样本中的某些 *E. coli* 菌株不能产生裂解作用。因此, 只能通过筛选新的相应噬菌体来进一步补充杀菌作用。

表2 两种噬菌体直接作用 48 h 对水样本中微生物的杀灭率 ($\bar{x} \pm s$)

噬菌体种类	浓度	不同温度下的杀菌率			F 值	P 值
		4℃	(22±2)℃	37℃		
总菌	原液	23.28 ± 1.75	25.16 ± 2.40	27.85 ± 3.54		
	1:10	20.33 ± 3.66	23.94 ± 2.40	26.20 ± 1.78		
	1:100	13.05 ± 1.82	15.16 ± 1.71	15.85 ± 1.75		
宽噬噬菌体	原液	43.75 ± 1.37	45.66 ± 2.33	47.96 ± 2.58	526.974*	0.000
	1:10	41.03 ± 2.55	45.37 ± 1.49	47.96 ± 1.86	231.546#	0.000
	1:100	30.84 ± 1.55	32.69 ± 2.20	33.98 ± 1.50	36.178△	0.000
<i>E. coli</i>	原液	32.19 ± 1.59	34.33 ± 0.68	35.06 ± 1.23		
	1:10	29.47 ± 1.44	31.89 ± 1.61	34.06 ± 1.10		
	1:100	19.19 ± 1.08	17.61 ± 0.89	21.06 ± 1.02		
宽噬噬菌体	原液	52.68 ± 1.30	54.44 ± 2.11	56.28 ± 0.90	1493.12*	0.000
	1:10	47.29 ± 1.49	51.30 ± 1.40	53.92 ± 1.11	1077.26#	0.000
	1:100	36.75 ± 1.47	39.44 ± 1.10	40.77 ± 1.61	54.006△	0.000

* 噬菌体种间的差异; # 噬菌体浓度间的差异; △ 不同温度间的差异

参 考 文 献

1 Ugorcakova J, Bukovska G. Lysins and holins: tools of phage-induced lysis. *Biologia (Bratislava)*, 2003, 58:327-334.

2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. eds. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996. 215-218.

3 周翔, 谭德勇, 王晓燕. 免疫沉淀法分离纯化感染细胞中的甲肝病毒 RNA. *云南大学学报*, 1998, 20:380-382.

4 魏泓. 医学实验动物学. 成都: 四川科学技术出版社, 2000. 247-391.

5 杨占秋, 余宏. 临床病毒学. 北京: 中国医药科技出版社, 2000. 320-326.

6 贾盘兴. 噬菌体分子生物学——基本知识和技能. 北京: 科学出版社, 2001. 1-25.

7 Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA danding patterns. *Biotechniques*, 1997, 14:214-217.

8 任瑞文, 卢强. 提高 RAPD 稳定性的几点经验与探讨. *生物技术通讯*, 2001, 12:517-518.

9 余茂效, 司雅东. 噬菌体实验技术. 北京: 科学出版社, 1991. 5-18.

10 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范, 1999. 9-13.

(收稿日期:2004-06-24)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

湖北省咸宁市学龄前儿童营养不良危险因素病例对照研究

蒋汝刚

营养不良威胁儿童的生存、生命质量和后续发育,也关系到我国人口素质的提高。本研究旨在了解湖北省咸宁市学龄前儿童营养不良的危险因素,为有效防治儿童营养不良提供科学依据。

1. 对象与方法:以咸宁市城区 6 所幼儿园筛查出来的 156 名营养不良儿童为病例组,按 1:2 配对原则,选择同班级、同性别、同年龄、同一居住地体重正常的健康儿童 312 名为对照组。按 WHO 推荐的身高标准体重作为判定标准,以体重低于 90% 标准体重为营养不良(80%~90% 范围为轻度,70%~80% 范围为中度,低于 70% 标准体重为重度营养不良)。采用统一的调查表,调查员通过入户直接询问方式调查,由儿童父母回答。问卷包括一般情况、饮食习惯、患病情况、家庭环境状况等内容。用 Epi Info 6.0 软件录入数据,用 SPSS 10.0 软件进行分析,多因素 logistic 回归分析中变量入选的条件为 $\alpha=0.05$ 。

2. 结果:共调查营养不良患者 156 例(男 81 例,女 75 例),年龄 3~6 岁,平均 4.52 岁 \pm 0.80 岁。其中轻度营养不良 139 例,占 89.1%;中度 12 例,占 7.7%;重度 5 例,占 3.2%。

对照组 312 人(男 162 人,女 150 人),年龄 3~6 岁,平均 4.53 岁 \pm 0.81 岁。两组人群的性别、年龄、班级、居住地等差异均无统计学意义。利用条件 logistic 回归模型对变量进行单因素分析,共筛选出 16 个有意义的变量。对单因素分析有意义的因素进行多因素条件 logistic 回归分析,最终入选的变量有 10 个(表 1)。

3. 讨论:研究表明,偏食和食量小是儿童营养不良的危险因素,常吃蔬菜、肉、蛋、奶类食品为保护因素。因此,调整饮食结构,合理膳食,纠正不良饮食习惯对预防营养不良的发生至关重要。结果显示,近 2 个月内患过严重疾病、经常患病的儿童易发生营养不良,应加强儿童疾病的综合管理,充分发挥儿童保健的网络管理优势,及时发现并纠正儿童期各种疾病。多因素分析表明,母亲文化程度高为保护因素,母亲不知道合理营养、家庭人均收入低、家庭不和睦为危险因素。因此,应采取合适的方式开展健康教育,提高父母的整体素质,营造良好的家庭环境,大力宣传科学的育儿方法,让儿童享受良好的保健服务,使儿童健康地成长。

表1 咸宁市学龄前儿童营养不良危险因素多因素条件 logistic 回归分析

变 量	β	s_e	Wald χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
母亲文化程度	-0.5162	0.1760	8.60	0.003	0.5968(0.4227~0.8426)
家庭人均收入低	1.3982	0.5410	6.68	0.010	4.0479(1.4019~11.6879)
家庭不和睦	1.2832	0.5665	5.13	0.024	3.6082(1.1887~10.9522)
母亲不知道合理营养	1.7475	0.5571	9.84	0.000	5.7402(1.9263~17.1058)
常吃蔬菜	-0.7352	0.2170	7.36	0.007	0.4794(0.3133~0.7335)
常吃肉、蛋、奶类食品	-1.4613	0.3426	18.19	0.000	0.2319(0.1185~0.4539)
偏食	2.2675	0.6322	12.86	0.000	9.6552(2.7966~33.3351)
食量小	2.1108	0.5796	13.26	0.000	8.2548(2.6506~25.7083)
近 2 个月内患严重疾病	0.9537	0.3824	6.22	0.013	2.5953(1.2265~5.4915)
经常患病	1.4628	0.5967	6.01	0.014	4.3180(1.3408~13.9062)

作者单位:437100 湖北咸宁学院预防医学教研室

(收稿日期:2004-12-16)

(本文编辑:尹廉)